

# Untersuchungen zur Struktur und Biogenese pflanzlicher Membranlipide

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN  
FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN  
vorgelegt von

**Heinz Peter Siebertz**

aus Dormagen

1979

---

Berichtersteller:

Prof. Dr. E. Heinz

Prof. Dr. H. Reznik

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 1979

BEI HERRN PROF. DR. E. HEINZ BEDANKE ICH MICH HERZLICH FÜR DIE  
VORZÜGLICHE BETREUUNG WÄHREND MEINER DOKTORARBEIT.

PROF. DR. R. DOUCE UND DR. J. JOYARD,  
DRF, BIOLOGIE VEGETALE, CENG UND USMG, GRENOBLE, FRANKREICH,  
DANKE ICH FÜR DIE ISOLATION UND INKUBATION DER ENVELOPES UND  
DIE WERTVOLLE ZUSAMMENARBEIT BEI DER IN VIVO MARKIERUNG DER  
MEMBRANLIPIDE DER CHLOROPLASTEN DES SPINATS,

ebenso

DR. M. LINSCHIED,  
INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN, FÜR DIE  
MASSENSPEKTROSKOPISCHEN ANALYSEN,

und

PROF. DR. L. BERGMANN,  
BOTANISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN,  
FÜR DIE KULTIVIERUNG DER GEWEBEKULTUREN DES TABAKS.

Dank sage ich auch

C. NIEFERT UND K. WRAGE, O. HARTLIEB.

Meiner Frau Margret gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

|           |                                                                                                     |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I</b>  | <b>Einleitung</b>                                                                                   | <b>1</b>  |
| <b>II</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                        | <b>13</b> |
| <b>1</b>  | <b>Material</b>                                                                                     | <b>15</b> |
| 1.1       | Chemikalien                                                                                         | 15        |
| 1.2       | Pflanzenmaterial                                                                                    | 17        |
| <b>2</b>  | <b>Methoden</b>                                                                                     | <b>19</b> |
| 2.1       | Isolierung von Chloroplasten, Envelopes und Thylakoiden                                             | 19        |
| 2.1.1     | <i>Schnelle</i> Chloroplasten aus Blättern des Spinats                                              | 19        |
| 2.1.2     | Dichtegradienten-Zentrifugation der Chloroplasten                                                   | 20        |
| 2.1.3     | Bestimmung der Intaktheit der Chloroplasten                                                         | 21        |
| 2.1.3.1   | Ferricyanid-Hill-Reaktion                                                                           | 21        |
| 2.1.3.2   | $CO_2$ -Hill-Reaktion                                                                               | 24        |
| 2.1.3.3   | NADPH-abhängige GAP-DH                                                                              | 25        |
| 2.1.4     | Envelopes                                                                                           | 26        |
| 2.2       | Inkubationen                                                                                        | 29        |
| 2.2.1     | Blätter                                                                                             | 29        |
| 2.2.2     | Grüne Gewebekulturen des Tabaks, Blaualgen                                                          | 29        |
| 2.2.3     | Chloroplasten                                                                                       | 29        |
| 2.2.4     | Envelopes und Thylakoide aus Chloroplasten des Spinats                                              | 35        |
| 2.2.4.1   | Envelopes (Douce/Joyard) + UDP-( $^{14}C$ )Gal                                                      | 35        |
| 2.2.4.2   | Envelopes + UDP-( $^{14}C$ )Gal                                                                     | 35        |
| 2.2.4.3   | Envelopes + ( $^{14}C$ )GL                                                                          | 35        |
| 2.2.4.4   | Envelopes + Monogalaktosyldiacyl-( $^{14}C$ )-glycerin + Mono-( $^{14}C$ )-galaktosyldiacylglycerin | 36        |
| 2.2.4.5   | Thylakoide + UDP-( $^{14}C$ )Gal                                                                    | 36        |
| 2.2.5     | In vivo Markierung der Membranlipide der Chloroplasten                                              | 37        |

|         |                                                                                                |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3     | Extraktion der Lipide                                                                          | 39 |
| 2.3.1   | Blätter                                                                                        | 39 |
| 2.3.2   | Envelope-, Thylakoid-, Chloroplasten- und Proteinsuspensionen, Fraktionen von Dichtegradienten | 39 |
| 2.3.2.1 | Allgemeines                                                                                    | 39 |
| 2.3.2.2 | Extraktion der von J. Joyard und R. Douce isolierten Envelopes                                 | 40 |
| 2.3.3   | Extraktion der Gewebekulturen des Tabaks                                                       | 40 |
| 2.3.4   | Extraktion der Kieselgelfractionen                                                             | 41 |
| 2.4     | Chromatographische und spektroskopische Verfahren                                              | 41 |
| 2.4.1   | Dünnschichtchromatographie                                                                     | 41 |
| 2.4.2   | GC und RGC                                                                                     | 46 |
| 2.4.3   | Radioaktivitätsbestimmungen                                                                    | 47 |
| 2.4.3.1 | Flüssigkeitszintillationszählung (LSC)                                                         | 47 |
| 2.4.3.2 | Scanning der Dünnschichtplatten, Autoradiographie                                              | 49 |
| 2.4.4   | Massenspektroskopie                                                                            | 52 |
| 2.5     | Qualitative Bestimmung der Lipide                                                              | 52 |
| 2.5.1   | Phosphatidylmethanol (PM)                                                                      | 53 |
| 2.5.2   | Acyliertes Digalaktosyldiglycerid (ADGD)                                                       | 53 |
| 2.5.3   | Präparation der Envelope-Lipide für die Massenspektroskopie (MS)                               | 54 |
| 2.5.4   | MGD- und DGD-Referenzspezies                                                                   | 56 |
| 2.6     | Quantitative Bestimmung der Lipide                                                             | 56 |
| 2.6.1   | Quantitative Bestimmung der Lipide des isolierten Envelope                                     | 56 |
| 2.6.2   | Quantitative Bestimmung der Lipide                                                             | 58 |
| 2.6.3   | Chlorophyllbestimmung                                                                          | 58 |
| 2.7     | Positionsanalyse                                                                               | 59 |
| 2.8     | Methylierungsanalyse                                                                           | 62 |
| 2.9     | Acylierung und Galaktosylierung des MGD-Äther-Analogons                                        | 62 |
| 2.9.1   | Acylierung                                                                                     | 63 |
| 2.9.2   | Galaktosylierung                                                                               | 64 |
| 2.10    | Aceton-Pulver                                                                                  | 65 |
| 2.11    | Chemische $\alpha$ -Oxidation in vivo markierter Fettsäuren                                    | 65 |

### III Ergebnisse und Diskussion 67

#### 3 Weitere Charakterisierung der $C_{16:3}$ -Pflanzen 69



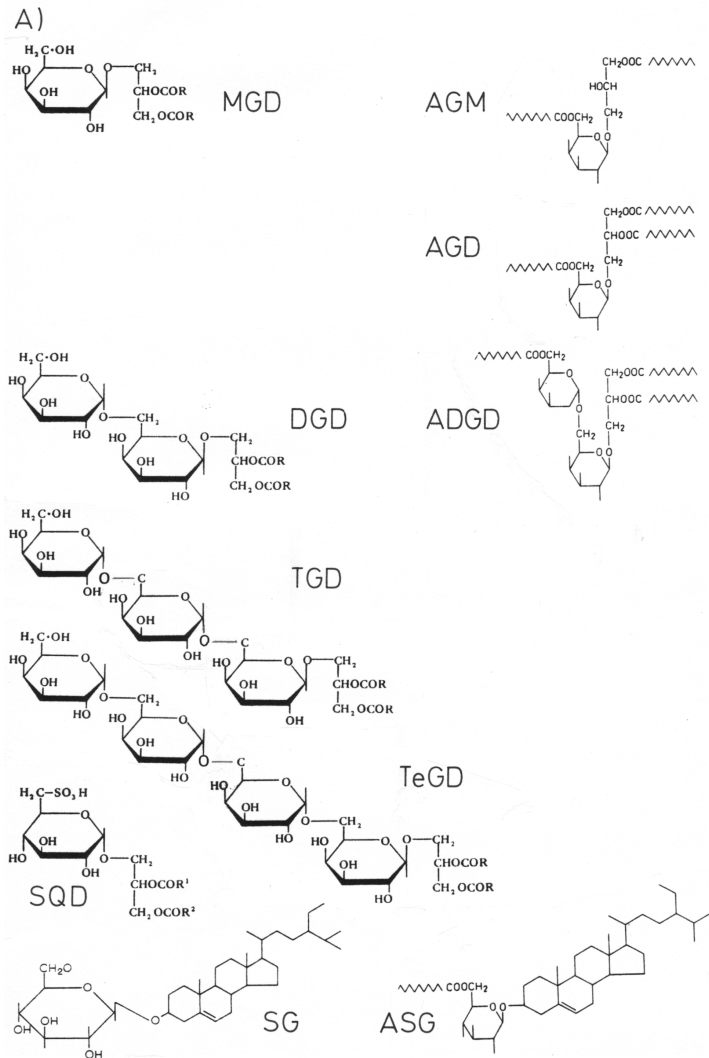
|          |                                                                                                        |            |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4</b> | <b>Acyllipide in photosynthetisch aktiven Gewebekulturen des Tabaks</b>                                | <b>77</b>  |
| 4.1      | Fettsäuremuster des Totallipidextraktes . . . . .                                                      | 78         |
| 4.2      | Lipidmuster der Gewebekulturen . . . . .                                                               | 79         |
| 4.3      | Fs der individuellen Acyllipide . . . . .                                                              | 80         |
| 4.4      | Positionsspezifische Verteilung der Fettsäuren in den Acyllipiden . .                                  | 84         |
| 4.5      | Zusammenfassung . . . . .                                                                              | 85         |
| <b>5</b> | <b><sup>14</sup>C-Markierung der Lipide photosynthetisch aktiver, grüner Gewebekulturen des Tabaks</b> | <b>87</b>  |
| 5.1      | Markierung der Fettsäuren im Lipidextrakt . . . . .                                                    | 87         |
| 5.2      | Markierung der Fettsäuren in den individuellen Acyllipiden . . . . .                                   | 90         |
| 5.3      | Positionsspezifische Verteilung der radioaktiv markierten Fettsäuren des MGD und PC . . . . .          | 92         |
| <b>6</b> | <b>Envelope Spinat</b>                                                                                 | <b>95</b>  |
| 6.1      | Pigmente und Lipide des isolierten Envelope . . . . .                                                  | 96         |
| 6.2      | Fettsäurezusammensetzung der Acyllipide der isolierten Envelopes                                       | 101        |
| 6.3      | Positionsspezifische Verteilung der Fettsäuren in den Acyllipiden der isolierten Envelopes . . . . .   | 102        |
| 6.4      | Fettsäurekombinationen in den Acyllipiden der isolierten Envelopes .                                   | 104        |
| 6.5      | Zusammenfassung . . . . .                                                                              | 110        |
| <b>7</b> | <b>Markierung der Galaktolipide des Envelope in vitro</b>                                              | <b>111</b> |
| 7.1      | Kinetik der UDP-( <sup>14</sup> C)Gal-Inkorporation . . . . .                                          | 113        |
| 7.2      | In vitro markierte Galaktolipidspezies . . . . .                                                       | 113        |
| 7.3      | In vitro Markierung der Galaktosen der Galaktolipide . . . . .                                         | 115        |
| 7.4      | Zusammenfassung . . . . .                                                                              | 121        |
| <b>8</b> | <b>Markierung der Membranlipide des Chloroplasten in vivo</b>                                          | <b>123</b> |
| 8.1      | Inkorporation in die Lipidfraktionen . . . . .                                                         | 123        |
| 8.2      | In vivo Markierung der individuellen Lipide . . . . .                                                  | 125        |
| 8.3      | Markierung der Fettsäuren der individuellen Lipide . . . . .                                           | 132        |
| 8.4      | In vivo markiertes MGD aus Envelope- und Thylakoidfraktionen . . .                                     | 134        |
| 8.5      | In vivo markiertes DGD aus Envelope- und Thylakoid-Fraktionen . .                                      | 139        |
| 8.6      | Galaktolipid-gekoppelte Desaturierung und Elongation der Fettsäuren                                    | 143        |
| 8.7      | In vivo radioaktiv markiertes SQD, PG und PC aus Envelope- und Thylakoidfraktionen . . . . .           | 148        |
| 8.8      | Funktionelles Modell der de novo Synthesesequenz der Galaktolipide                                     | 151        |
| <b>9</b> | <b>Metabolismus des MGD-Äther-Analogons</b>                                                            | <b>157</b> |

|                                                                      |                |
|----------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>10 Galaktosyltransferasen</b>                                     | <b>161</b>     |
| <b>11 Glykolipidsynthese in isolierten Chloroplasten</b>             | <b>163</b>     |
| 11.1 Markierung der Galaktolipide isolierter Chloroplasten . . . . . | 165            |
| 11.2 Markierung des SQD isolierter Chloroplasten . . . . .           | 172            |
| <br><b>IV Anhang</b>                                                 | <br><b>175</b> |
| <b>12 Anhang A: Zusammenfassung</b>                                  | <b>177</b>     |
| <b>13 Anhang B: Verzeichnisse</b>                                    | <b>181</b>     |
| Abkürzungen und Zeichen . . . . .                                    | 181            |
| Abbildungsverzeichnis . . . . .                                      | 190            |
| Tabellenverzeichnis . . . . .                                        | 193            |
| <br><b>14 Anhang C: Lebenslauf und Erklärung</b>                     | <br><b>197</b> |

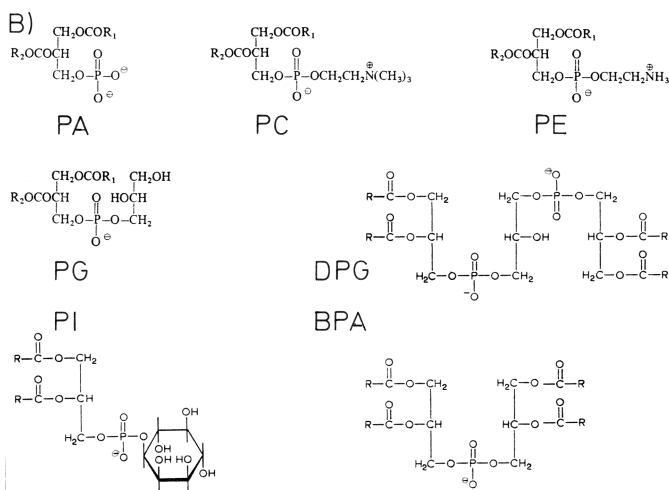
## **Teil I**

# **Einleitung**





**Abb. 1:** Pflanzliche (A) Glyko- und (B) Phospholipide



#### A) GLYKOLIPIDE Galaktolipide:

MGD (40), 1,2-Diacyl-3-O-( $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-sn-glycerin

DGD (40), 1,2-Diacyl-3-O-( $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6'))-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-sn-glycerin

TGD (40,183,48), 1,2-Diacyl-3-O-( $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6'))-O- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6'))-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-sn-glycerin

TeGD (48,116) 1,2-Diacyl-3-O-( $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6'))-O- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6'))-O- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6'))-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-sn-glycerin.

Sulfolipid: SQD (54), 1,2-Diacyl-3-O-(6'-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopyranosyl)-sn-glycerin

Sterylglykosid:

SG (94),  $\beta$ -3-O- $\beta$ -D-Glucopyranosylsitosterol

Acylierte Glykolipide:

AGM (31), 1-Acyl-3-O-(6'-O-acyl- $\beta$ -galaktopyranosyl)-sn-glycerin

AGD (80), 1,2-Diacyl-3-O-(6'-acyl- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-sn-glycerin

ADGD (78) 1,2-Diacyl-3-O-(6'-O-acyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6'))-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-sn-glycerin

ASG (94),  $\beta$ -3-O-(6'-O-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-sitosterol

#### B) PHOSPHOLIPIDE (94)

PA, Phosphatidsäure, 1,2-Diacyl-3-phospho-sn-glycerin

PG, Phosphatidylglycerin, 3-sn-Phosphatidyl-1'-sn-glycerin

PE, Phosphatidyläthanolamin, 3-sn-Phosphatidyl-O-äthanolamin

PC, Phosphatidylcholin, 3-sn-Phosphatidyl-O-cholin

PI, Phosphatidylinositol, 3-sn-Phosphatidyl-1'-myo-inositol

DPG, Diphosphatidylglycerin, 1',3'-Di-O-(3-sn-phosphatidyl)-sn-glycerin

BPA (164), 3-sn-Phosphatidyl-1'-(2',3'-diacyl)-sn-glycerin

---

Galaktolipide (Abb. 1A) sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie kommen sowohl in photosynthetisch aktiven als auch in photosynthetisch nicht aktiven Geweben höherer Pflanzen, Thallophyten und insbesondere auch in Blaualgen vor (40, 183, 116). Dabei sind sie bei den untersuchten  $C_3$ - und  $C_4$ -Pflanzen in den Membranen der Plastiden konzentriert und stellen wesentliche Bau- und Funktionselemente der Lipid-Bilayer dar (40).

Betrachtet man das Lipidprofil der Hüllmembranen und der Thylakoide der Chloroplasten in Abb. 2 auf S. 6 und beachtet die folgenden Daten, wird deutlich, dass die Galaktolipide die mengenmäßig dominierenden Fette auf unserer Erde sind. Bei einem Frischgewicht der Spinatblätter von 1 g bedecken die Thylakoide von  $4 \times 10^6$  Chloroplasten eine Fläche von  $50 \text{ m}^2$ , die Hüllmembranen bedecken dagegen nur  $800 \text{ cm}^2$  (40); sie enthalten 1 mg Chlorophyll und 0,85 mg MGD. Es lässt sich berechnen, dass die Phytomasse auf den Kontinenten und in den Meeren unserer Erde  $15,6 \times 10^9 \text{ t}$  MGD enthält (165). Ein Wert in dieser Größenordnung dürfte nur von einem anderen Lipid erreicht werden, dem Chlorophyll.

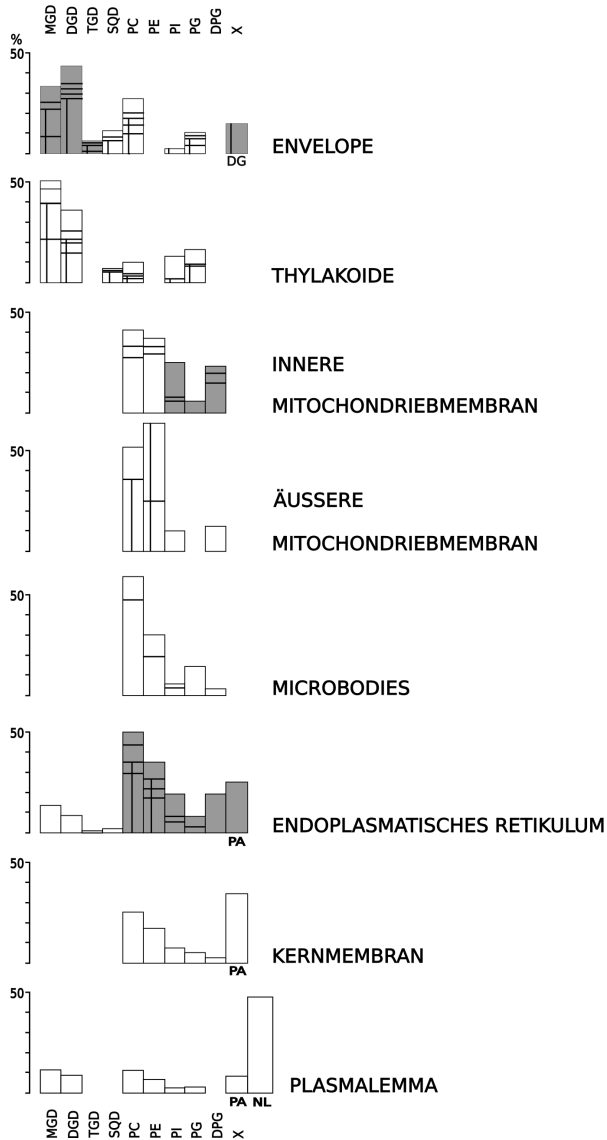
Trotz der offensichtlichen Relevanz sind einige wesentliche Details der Biosynthese des MGD offen. Diese Probleme sind Gegenstände der vorgelegten Arbeit und sollen kurz dargestellt werden. Daneben sei auf einige kürzlich erschienene, zusammenfassende Diskussionen der Galaktolipid-Biosynthese verwiesen (40, 41, 73).

Die Membransysteme pflanzlicher Zellen weisen charakteristische Lipidmuster auf (Abb. 2). Sie sind qualitativ und quantitativ verschieden. Darüber hinaus zeigen die individuellen Membranlipide ihrerseits charakteristische Fettsäuremuster. Zwei Fragestellungen sind daher:

Wie kommt das Lipidmuster einer Membran zustande? Wie kommt das spezifische Fettsäuremuster ihrer Lipide zustande?

Abb. 2 deutet an, dass die Membransysteme Lipide enthalten, die sie selbst oder das umschlossene Kompartiment nicht synthetisieren können (= weiße Balken, Synthesekapazität = graue Balken). Das endoplasmatische Retikulum (ER) soll mit seiner breit gefächerten Phospholipid-Synthesekapazität viele Membransysteme versorgen, darunter die Chloroplasten und Mitochondrien (109). Während Mitochondrien einige ihrer Phospholipide selbst synthetisieren können (95, 109), ist eine Biosynthese von Phospholipiden für die Chloroplasten bis jetzt noch nicht nachgewiesen worden (40). Die Chloroplasten bilden dennoch die Hauptmasse ihrer Membranlipide selbst, nämlich die Galaktolipide (GL), deren Vorkommen in anderen, nicht plastidären Membranen sehr umstritten ist (40). Membranbruchstücke, insbesondere des zerbrechlichen Envelope, könnten u. U. andere Organelle oder Membransysteme bei der Isolation verunreinigen.

Diese Problematik wird plausibel, wenn man bedenkt, dass die Hüllmembranen und Thylakoide aus Blättern des Spinats 97 % der Membranoberfläche in einer



**Abb. 2:** Acyllipidzusammensetzung der Membranen höherer Pflanzen (3-5, 33-36, 38, 43, 64, 89, 96, 105, 110, 115, 132, 153)



---

Zelle ausmachen (40). Daher ist ebenso nicht eindeutig geklärt, ob die Envelopes der alleinige Syntheseort der Galaktolipide sind (40).

Eine Serie von Enzymen der Biosynthese der Galaktolipide konnte in Envelopes lokalisiert werden (41):

Acyl-CoA Synthetase,  
Acyl-CoA:sn-Glycerin-3-Phosphat Acyltransferase,  
Acyl-CoA:Acyl-sn-Glycerin-3-Phosphat Acyltransferase,  
Phosphatidsäure Phosphatase.

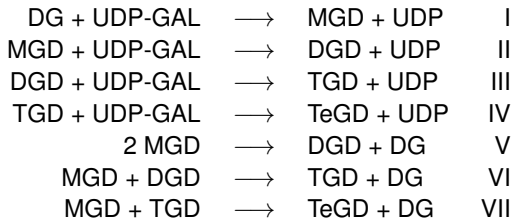
### Die Galaktosyltransferasen

- UDP-Gal

Diacylglycerin bzw. Galaktolipid Galaktosyltransferasen (41)

- Galaktolipid

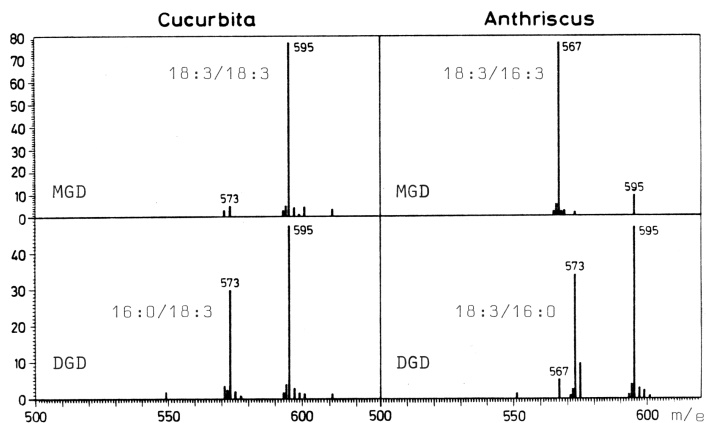
Galaktolipid Galaktosyltransferasen (17, 18),  
welche die folgenden Reaktionen katalysieren:



Offen ist, welchen Beitrag die beiden Enzymgruppen in vivo zur Synthese der einzelnen Galaktolipide leisten. In isolierten Envelopes sollen die Interlipid-Galaktosyltransferasen allein für die Bildung der Homologen DGD bis TeGD verantwortlich sein (17).

Wie die Reaktionsweise auch immer sei - in den meisten Eukaryonten unterscheiden sich die Galaktolipide in ihrer Fettsäurezusammensetzung; aufgrund des formalen Biosyntheseschemas sollten sie lediglich in der Zahl der Galaktosen voneinander abweichen.

Im Wesentlichen prägen das Vorkommen der Palmitinsäure  $C_{16:0}$  und der Hexadecatriensäure  $C_{16:3}$  diese Differenzen, die bei umfangreichen Untersuchungen am eindrucksvollsten durch die Massenspektroskopie (Abb. 3 auf S. 8) beschrieben worden sind (73). Pflanzen, die  $C_{16:3}$  bilden (=  $C_{16:3}$ -Pflanzen), übertragen diese Fettsäure spezifisch in die sn-2-Position des MGD und schließen sie aus anderen Lipiden aus. Dabei wird die  $C_{16:3}$  gepaart mit der Linolensäure  $C_{18:3}$  zur Lipidspezies



**Abb. 3:** Ausschnitte aus den Massenspektren ("Diglyceridprofil") des MGD und DGD aus einer  $C_{18:3}$ -Pflanze (*Cucurbita*) und einer  $C_{16:3}$ -Pflanze (*Anthriscus*) (nach 73)  
Ordinate = relative Intensität in %.

|     |            |              |
|-----|------------|--------------|
| MGD | $C_{18:3}$ | C-1-Position |
|     | $C_{16:3}$ | C-2-Position |

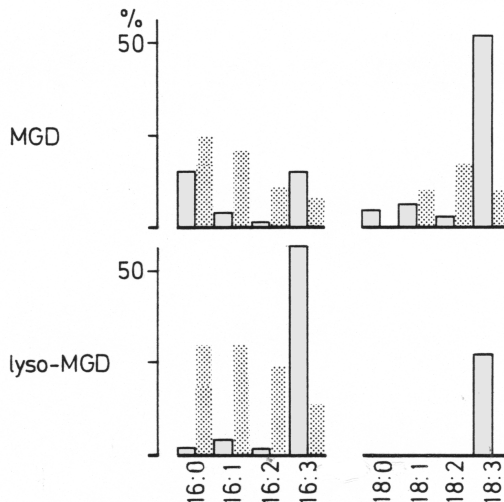
Diese Fettsäurekombination ist im DGD aus  $C_{16:3}$ -Pflanzen kaum vertreten. Umgekehrt ist die für das DGD typische Kombination

|     |            |              |
|-----|------------|--------------|
| DGD | $C_{18:3}$ | C-1-Position |
|     | $C_{16:0}$ | C-2-Position |

im massenspektroskopischen Diglyceridprofil des MGD aus  $C_{16:3}$ - wie aus  $C_{18:3}$ -Pflanzen nur in Spuren nachweisbar (73)! Beide Spezies,  $C_{18:3}/C_{16:3}$ -MGD und  $C_{18:3}$ - $C_{16:0}$ -DGD, repräsentieren neben den  $C_{18:3}/C_{18:3}$ -Kombinationen die Hauptkomponenten der beiden Lipide. Die Verteilung der  $C_{16:0}$  hängt im DGD (wie im SQD) von der systematischen Stellung der Pflanze in zweifacher Weise ab:

- (1) Je niedriger die Stellung in der Taxonomie, desto größer ist der Anteil der Palmitinsäure in der C-2-Position.
- (2) In  $C_{16:3}$ -Pflanzen treten beträchtliche Mengen der  $C_{16:0}$  in der C-2-Position des DGD und SQD auf (73).

Radioaktive Markierungen der Hexadecatriensäure im MGD junger Blätter verschiedener  $C_{16:3}$ -Pflanzen (155) verschärften die Gegensätze zwischen den beiden Galaktolipiden. Nicht nur MGD-Spezies, die  $C_{16:3}$  enthielten, sondern auch solche, in denen radioaktive Hexadecen- ( $C_{16:1}$ ) und Hexadecadiensäure ( $C_{16:2}$ ) verestert waren, blieben offensichtlich von der Galaktosylierung zum DGD ausgenommen.



**Abb. 4:** Fettsäuremuster (Mol-%) und Radioaktivitätsmuster (gepunktet, % von der Totalaktivität in den Fettsäuren) der Fettsäuren des MGD und 1-lyso-MGD. Blätter des *Kerbels* wurden 1 h lang mit  $^{14}\text{CO}_2$  inkubiert (155).

Wie die Galaktolipid-Biosynthese in den Chloroplasten unverkennbar zum Lipidprofil ihrer Membranen beiträgt, so mag die Kompartimentierung bestimmter Syntheseleistungen auch die Basis für die Herstellung dieser charakteristischen Fettsäuremuster der Galaktolipide sein. Folgende Mechanismen könnten dabei zugrunde liegen:

- (a) Ein bestimmtes Fettsäureangebot für die Lipidsynthese im Kompartiment
- (b) Eine Spezifität der Acyltransferasen des Kompartiments
- (c) Ein bestimmtes Angebot von Diacylglycerinen im Kompartiment
- (d) Eine Spezifität der Galaktosyltransferasen des Kompartiments
- (e) Eine spezifische, sekundäre Veränderung der Acylreste der Lipide des Kompartiments durch Austausch, Desaturierung oder Saturierung

(a) In der Tat besitzen Chloroplasten die größte Kapazität zur Fettsäuresynthese in pflanzlichen Zellen (166, 185). Bei in vitro Experimenten wurden bislang jedoch nur  $\text{C}_{16:0}$  und Ölsäure ( $\text{C}_{18:1}$ ), geringfügig auch Linolsäure ( $\text{C}_{18:2}$ ), aber nicht  $\text{C}_{18:3}$  radioaktiv markiert; dabei ist die Linolensäure eine Hauptkomponente der Chloroplasten (ca. 80 % der Fettsäuren der Lipide (109)).

(b) Über eine Spezifität der Acyltransferasen in Bezug auf Kettenlänge und Doppelbindungsanzahl der Fettsäuren und die Position am Glycerinkörper liegen nur wenige Untersuchungen vor (15, 16), die M. Bertrams und E. Heinz fortführen. Die

löslichen Enzyme aus Chloroplasten der Erbse und des Spinats dirigieren Fettsäuren (Donator: Acyl-CoA) ohne Berücksichtigung ihrer Natur in die C-1-Position des Glycerin-3-phosphats.

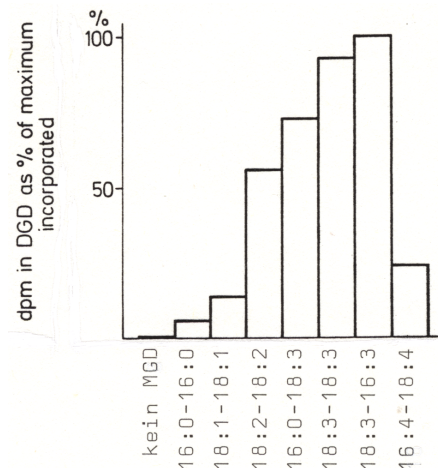
Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den erwähnten Markierungsexperimenten mit Blättern des Korbells und des Spinats, bei denen die Serie radioaktiver, ungesättigter  $C_{18}$ -Fettsäuren ausschließlich in der sn-1-Position des MGD und DGD,  $C_{16}$ -Fettsäuren dagegen nur in der Position C-2 verestert waren (155, 156, Abb. 4 S. 9). Die Separierung der markierten Galaktolipide in molekulare Spezies zeigte, dass diesen Markierungsmustern

(c) Fettsäurekombinationen in den Diglyceridanteilen zugrunde liegen mussten, die dem Massenmuster der Lipide nicht entsprachen und daher auf eine

(d) unspezifische Galaktosylierung eines

(c) breiten Spektrums von Diacylglycerinen bzw. MGD-Spezies hinwiesen.

Versuche, eine Spezifität der Galaktosyltransferasen *in vitro* zu charakterisieren, führten zu gegensätzlichen Aussagen (44, 120, 157, 158), die damit z. T. wiederum den Ergebnissen der *in vivo* Markierungen widersprechen (Abb. 5 auf S. 10).



**Abb. 5:** Abhängigkeit der DGD-Syntheserate von der Fettsäurezusammensetzung des MGD. Ein Acetonpulverextrakt sieben Tage alter Erbsenkeimlinge wurde mit den genannten MGD-Spezies und UDP- $(^{14}C)$ Gal inkubiert (157, verändert).

Die *in vivo* Experimente schienen uns der Lösung des Problems, wie das charakteristische Fettsäuremuster der Galaktolipide hergestellt würde, nicht näherzubringen - im Gegenteil: Je detaillierter die Analysen des *in vivo* markierten Lipids (Positionsanalyse der  $^{14}C$ -Fettsäuren, Separierung individueller Lipidspezies (155, 156)), um

---

so verwirrender die Resultate und um so anspornender die Einsicht, dass sich ein komplexer Mechanismus hinter dem so einfachen, formalen Schema der Biosynthese der Galaktolipide verbergen musste. Ein solcher Mechanismus könnte die MGD- und allgemein Lipid-gekoppelte Desaturierung der Fettsäuren sein, auf die die in vivo Experimente hindeuteten, die einen Beweis aber nicht liefern konnten (155, 156). Gute Evidenz für eine PC-gekoppelte Desaturierung liegt für mikrosomale Systeme vor (134, 135); sie wird von anderen Autoren u. a. auch für höhere Pflanzen diskutiert (2, 7, 55, 56, 62, 129 - 131, 144 - 146, 149, 160, 167, 179, 185).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und Diskussionen entstand die vorgelegte Arbeit. Die skizzierten Möglichkeiten und Mechanismen, die das Lipidmuster einer Membran und das Fettsäuremuster der individuellen Lipide prägen könnten, sollten durch verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt werden.

Zunächst galt es, das Phänomen der positionsspezifischen Markierung der Fettsäuren, das dem Fettsäurenmassenmuster des Lipids widerspricht (Abb. 4 auf S. 9) und deshalb den Status eines *unfertigen* Lipids repräsentiert, zu reproduzieren und eingehender, auch bei  $C_{16:3}$ -Pflanzen, zu studieren. Für ähnliche Experimente sollte ein homogeneres, leichter zu manipulierendes System als das aus einer Vielzahl von Geweben aufgebauten Blatt gesucht werden; in unserem Hause boten sich dazu die photosynthetisch aktiven und heterotrophen Gewebekulturen des Tabaks an (12), deren Lipide vor radioaktiven Inkubationsversuchen detailliert analysiert und mit den Lipiden aus Blättern der Mutterpflanze verglichen werden sollten. Einem anderen, vielversprechenden experimentellen Ansatz mit ähnlicher Zielsetzung geht in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Heinz R. Haas nach: Der Präparation pflanzlicher Protoplasten (57), die für die Isolation der Zellorganelle und Membransysteme besser geeignet sind als Blattgewebe. Die Ergebnisse der Experimente sollten einen wesentlichen Diskussionsbeitrag zur Biogenese der  $C_{16:3}$  und  $C_{18:3}$  (166), zur Spezifität der Acyltransferasen und Galaktosyltransferasen in vivo liefern.

Der zweite, wesentliche Ansatzpunkt der Arbeiten ist die Analyse in vivo wie in vitro radioaktiv markierter Lipide aus Chloroplasten und deren Suborganellfraktionen. Damit wollten wir - unter den oben genannten Gesichtspunkten - einem zentralen Ort der Lipidsynthese in der pflanzlichen Zelle näherkommen, der Galaktolipidsynthese in den Hüllmembranen des Kompartiments Chloroplast. Dabei galt es, alle Charakteristika der Lipid- und Fettsäurezusammensetzung des isolierten Envelope kennenzulernen. Dann richtete sich das besondere Augenmerk auf jene Lipidspezies, die von isolierten Envelopes und isolierten Chloroplasten gebildet werden können und auf den Vergleich mit ( $^{14}\text{C}$ )-Lipiden aus isolierten Chloroplasten, Envelopes und Thylakoiden, die in vivo radioaktiv markiert wurden. Bei den Untersuchungen sollte zugleich Licht auf die Abhängigkeit oder Relation der Biosynthese der Galaktolipide in Chloroplasten von oder zu extraplastidären Systemen fallen. Insbesondere mikrosomalem PC wird eine wichtige Rolle bei der Synthese der Linolensäure und

---

der Galaktolipide zugesprochen (144 - 146, 185). Mögliche Reaktionswege haben Douce und Joyard kürzlich zusammengefasst (40). Der komplexeste Kreislauf geht von der Synthese der  $C_{18:1}$  in Chloroplasten aus;  $C_{18:1}$  wird im Envelope in den CoA-Thioester umgewandelt, ins Cytoplasma entlassen und in PC inkorporiert, welches als Carrier für Desaturierung und Rücktransport in den Envelope dient. Dort kann es höher ungesättigte  $C_{18}$ -Fettsäuren oder gar seine Diglyceridanteile für die Galaktolipidsynthese zur Verfügung stellen.

Schließlich sollte auf enzymatischer Ebene die Charakterisierung der Spezifität der UDP-Gal:MGD Galaktosyltransferase (157, 158) weiter fortgeführt werden.

Das Problem der Lipid-gekoppelten Desaturierung sollte auf besondere Weise in Angriff genommen werden: Prof. Dr. E. Heinz synthetisierte ein MGD-Äther-Analogon (79), dessen Umsatz auf enzymatischer Ebene und mögliche Desaturierung in vivo geprüft werden sollte.

## **Teil II**

# **Material und Methoden**





# 1

## Material

### 1.1 Chemikalien

Die Herkunft und Spezifikation der verwendeten, radioaktiv markierten Substanzen, der Enzyme und einiger, wichtiger Chemikalien gibt die folgende Zusammenstellung an. Alle nicht genannten Chemikalien wurden von den einschlägigen Firmen im notwendigen Reinheitsgrad gekauft.

#### RADIOAKTIVE SUBSTANZEN

|                                                                              |                                           |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Na-(1- <sup>14</sup> C)Acetat, 55,3 mCi/mMol                                 | CEA Gif-S/Yvette France                   |
| Na-(U- <sup>14</sup> C)Acetat, 96,8 mCi/mMol                                 | dto.                                      |
| NaH <sup>14</sup> CO <sup>3</sup> , 56 mCi/mMol                              | Radiochem. Centre Amersham (GB)           |
| UDP-(U- <sup>14</sup> C)Gal, 322 mCi/mMol                                    | dto.                                      |
| UDP-(6- <sup>3</sup> H)Gal, 16,3 Ci/mMol                                     | dto.                                      |
| (1- <sup>14</sup> C)Heptadecansäure, 55,7 mCi/mMol                           | Applied Science Lab., State College (USA) |
| ( <sup>35</sup> S)Sulfat, pH 6-8, 5 Ci/mg                                    | Radiochem. Centre Amersham (GB)           |
| ( <sup>32</sup> P)Orthophosphat, in verdünnter HCl-Lösg. pH 2-3, 285 Ci/mg P | dto.                                      |

### ENZYME

|                                                               |                        |
|---------------------------------------------------------------|------------------------|
| Katalase, EC 2.3.1.7 (Rinderleber)                            | Sigma, St. Louis (USA) |
| 3-Phosphoglyceratkinase, EC 2.7.2.3 (Hefe)                    | Boehringer, Mannheim   |
| Lipase, EC 3.1.1.3 ( <i>Rhizopus arrhizus</i> )               | dto.                   |
| Phospholipase A <sub>2</sub> , EC 3.1.1.4 (Schweine Pankreas) | dto.                   |
| Phospholipase C, EC 3.1.4.3 ( <i>Bacillus cereus</i> )        | dto.                   |
| Phospholipase D, EC 3.1.4.4 (Kohl)                            | dto.                   |

### CHEMIKALIEN FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE

|                                              |                                              |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Chromosorb W, acid washed, Mesh-size 80/100  | Johns-Manville Products Corp. Manville (USA) |
| DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (0,25 mm dick) | Merck, Darmstadt                             |
| Gaschrom P, Mesh-size 100/120                | Applied Science Lab. (USA)                   |
| Kieselgel 60 G                               | Merck, Darmstadt                             |
| Kieselgel H nach Stahl                       | dto.                                         |
| Kieselgel 60 HR reinst                       | dto.                                         |
| Reoplex 400                                  | Applied Science Lab. (USA)                   |
| Silicon GE Se-30                             | dto. oder WGA, Düsseldorf                    |

### CHEMIKALIEN

|                                                         |                         |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|
| Basischer Ionenaustauscher Typ I Lewatit, 60 - 150 mesh | Merck, Darmstadt        |
| Dimethylsulfoxid                                        | dto.                    |
| Methyliodid                                             | dto.                    |
| Molekularsieb 3 Å, Perform 2 mm                         | dto.                    |
| <i>Percoll</i> <sup>TM</sup>                            | Pharmacia, Uppsala (S)  |
| Thionylchlorid                                          | Merck, Darmstadt        |
| Trimethylchlorsilan                                     | Macherey & Nagel, Düren |
| N-Trimethylsilylimidazol                                | dtp.                    |
| Unisolve I Gel-Scintillator                             | Zinsser, Frankfurt      |

Alle organischen Lösungsmittel wurden destilliert.  $CHCl_3$ , wurde über  $CaCl_2$ , Petroläther (Siedepunkt 40 - 60 °C) bei Bedarf über Molekularsieb getrocknet. Cardiolipin (DPG) war ein Geschenk von Prof. Dr. W. Fischer, Universität Erlangen.

## 1.2 Pflanzenmaterial

### *Spinacia oleracea*

Von den im Garten des Botanischen Instituts gezogenen Pflanzen wurden für ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat- oder  $^{14}\text{CO}_2$ -Inkubationen junge Blättchen geerntet (maximale Länge 1,5 cm), für die Isolation von Chloroplasten kräftige, große Blätter. Spinat, der für die Experimente in Grenoble / Centre d'Etudes a Nucléaires Verwendung fand, stammte aus den Anbaugebieten um Grenoble.

Herr H. Zimmer und Herr H. Uthmann zogen in den Gewächshäusern des Institutes heran: *Pisum sativum* Sorte 'Kleine Rheinländerin', *Vicia faba*, *Anthriscus cerefolium* und *Nicotiana tabacum* var. *Samsun*.

Die grünen und bleichen Gewebekulturen des Tabaks, SC I-Stamm (*Nicotiana tabacum* var. *Samsun*) stellten freundlicherweise Prof. Dr. L. Bergmann und Dr. H. Rennenberg zur Verfügung. Die Gewebe wurden in einem Vollmedium nach Mura-shige und Skoog kultiviert (12) und am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (10 - 12 Tage alt) extrahiert bzw. gefriergetrocknet. Die untersuchte, bleiche Kultur war 16 Tage alt, und die EMD-IT behandelten, grünen Suspensionskulturen wurden nach ca. 20 Tagen Wachstum geerntet.

Die Blaualgen (leg. et det. Dr. B. G. Feige) *Nostoc communis* und *Anabaena flos aquae* wurden in einem Vollmedium kultiviert, wie bei Zepke beschrieben (182).



## Methoden

### 2.1 Isolierung von Chloroplasten, Envelopes und Thylakoiden

#### 2.1.1 *Schnelle* Chloroplasten aus Blättern des Spinats

Spinatblätter wurden mindestens ein, höchstens drei Tage vor der Chloroplastenisolierung geerntet, gewaschen und abgedunkelt im Kühlraum aufbewahrt. Unmittelbar vor der Isolierung wurden die Blätter in eine flache Schale mit Eiswasser gelegt und aus etwa 50 cm Abstand mit einer Photolampe 10 - 15 Minuten lang beleuchtet. Die Blattspreiten wurden rechts und links der Mittelrippe abgerissen und in eiskaltem Isoliermedium im Starmix 3 x 3 sec. lang zerkleinert. Dabei kamen ca. 100 g Frischgewicht auf 250 ml Medium. Der Blattbrei wurde durch ein grobes Faltenfilter in vier im Eis stehende Zentrifugengläser (50 ml) filtriert. Das Homogenat wurde sofort auf einer Hettich-Rotixa/K-Zentrifuge 90 sec. bei 68 % Drehzahl und 100 % Bremskraft zur Sedimentation der Chloroplasten zentrifugiert (173). Die vier Sedimente wurden in je 2 ml Suspensionsmedium durch Aufsaugen mit einer Pasteur-Pipette suspendiert, in einem 10 ml Zentrifugenglas vereinigt und durch 60 sec. Zentrifugation bei 32 % Drehzahl von Verunreinigungen befreit. Der Überstand wurde in ein anderes Zentrifugenglas gegossen und zur Sedimentation der Chloroplasten wieder 90 sec. bei 68 % Drehzahl zentrifugiert. Das Sediment wurde zur Entfernung zerbrochener Chloroplasten zunächst mit Suspensionsmedium abgespült, bevor die fester sedimentierten Chloroplasten in wenig Suspensionsmedium aufgenommen wurden (Abb. 2.1 auf S. 22).

Alle Operationen wurden im Eisbad durchgeführt.

## 2. Methoden

---

Die geschilderte Aufarbeitung nahm vom Zerkleinern der Blätter an etwa 10 Min. in Anspruch.

Isoliermedium pH 6,5 (29, 102)

0,33 M Sorbit

5 mM  $Na_4 P_2 O_7$

5 mM  $MgCl$  mit HCL auf pH 6,5 eingestellt

Suspensionsmedium pH 7,6 (29, 51)

0,33 M Sorbit

50 mM Hepes

2 mM EDTA

1 mM  $MgCl_2$

1 mM  $MnCl_2$  mit KOH auf pH 7,6 eingestellt

Daten der Zentrifugation (mit leerem Rotorgehänge), Hettich-Rotixa/K

|       |      |      | Benötigte Zeit in sec. zum |           |
|-------|------|------|----------------------------|-----------|
| upm-% | upm  | g    | Beschleunigen              | Abbremsen |
| 32    | 1400 | 200  | 5                          | 16        |
| 68    | 3200 | 1370 | 11                         | 20        |
| 100   | 4800 | 3070 | 15                         | 23        |

### 2.1.2 Dichtegradienten-Zentrifugation der Chloroplasten

*Schnelle* Chloroplasten aus Blättern des Spinats, gewöhnlich vier der geschilderten Aufarbeitungen, wurden auf drei Dichtegradienten gegeben und in der Hettich-Rotixa/K-Zentrifuge bei maximaler Drehzahl 20 Min. lang zentrifugiert. Die Banden der intakten Chloroplasten wurden mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgesaugt. Diese Fraktion der *gereinigten, intakten* Chloroplasten kam im Falle der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation entweder direkt oder nach langsamer Verdünnung mit Suspensionsmedium, erneuter Sedimentation und Suspension zur Inkubation.

Die aus der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation erhaltene Fraktion ließ sich problemlos mit Suspensionsmedium verdünnen und durch Zentrifugation konzentrieren.

Linearer Sucrose-Dichtegradient:

60 - 22 % Sucrose im Puffersystem

10 mM Hepes

5 mM  $MgCl_2$

pH 7,5

Linearer Percoll-Dichtegradient:  
Percoll, pH 7,6 (mit HCl eingestellt)  
0,33 M Sorbit gegen Suspensionsmedium s v.

## 2.1.3 Bestimmung der Intaktheit der Chloroplasten

### 2.1.3.1 Ferricyanid-Hill-Reaktion

Die Bestimmung der Intaktheit einer Chloroplasten-Präparation mit Hilfe der Ferricyanid-Hill-Reaktion nutzt die Tatsache aus (68), dass intakte Chloroplastenhüllen für FeCy impermeabel sind. Die frei zugänglichen Thylakoide der enthaltenen, zerstörten Chloroplasten reduzieren jedoch das Hexacyanoferrat anion in lichtabhängiger Reaktion und unter Freisetzung von Sauerstoff. Dadurch ist die Reaktion in einfacher Weise mit einer Sauerstoffelektrode messbar.

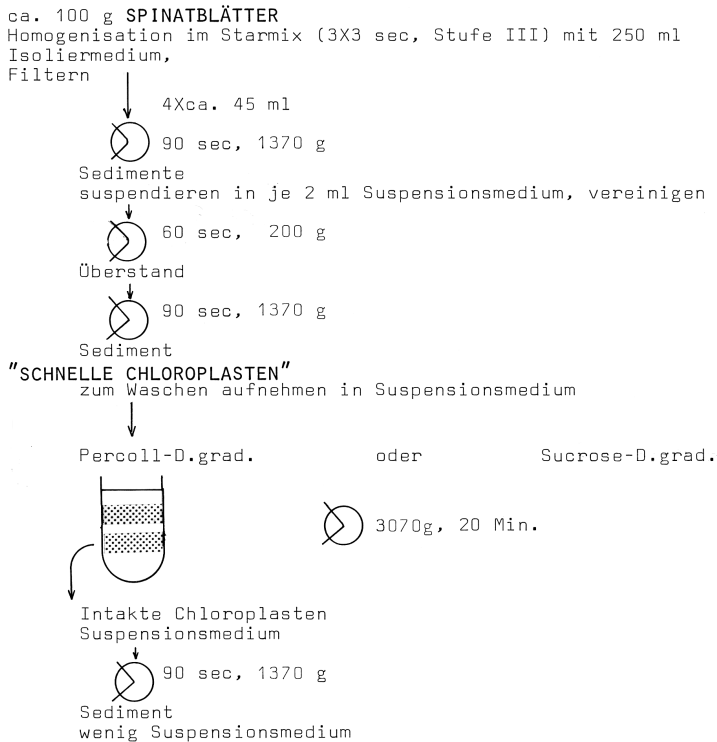
Aus dem Verhältnis der Raten der Sauerstoffentwicklung der Chloroplastensuspension einerseits (a) und der durch osmotischen Schock zerstörten Chloroplasten andererseits (b) errechnet sich der Prozentsatz der intakten Plastiden in der Probe.

(a) Zur Messung werden 2 ml Suspensionsmedium (Temperatur äquilibriert) und je 20  $\mu\text{l}$   $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung und 20 - 80  $\mu\text{l}$  Chloroplasten-Suspension in die Elektrodenküvette (Vol. 1,63 ml) pipettiert und die gelösten Gase mit Stickstoff vorsichtig ausgeblasen.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erlaubt die Bestimmung maximaler (51) Sauerstoffproduktion.  $\text{PO}_4^{3-}$  schaltet die  $\text{CO}_2$ -abhängige Sauerstoffproduktion durch die intakten Chloroplasten aus. Hat sich eine lineare Sauerstoffproduktion im Licht eingestellt (Abb. 2.2 (1) auf S. 23 Rate (a)), werden 20  $\mu\text{l}$  Ferricyanid-Hill-Reagenz in die Küvette eingespritzt und die gesteigerte Sauerstoffentwicklung gemessen (Rate A).

(b) In die Küvette werden 1 ml Wasser und 20 - 80  $\mu\text{l}$  Chloroplasten-Suspension pipettiert. Nach ca. 1 Min. wird 1 ml doppelt konzentriertes Suspensionsmedium und je 20  $\mu\text{l}$   $\text{PO}_4^{3-}$  - und  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hinzugegeben, Sauerstoff mit Stickstoff ausgeblasen und im Licht wie oben zunächst die Sauerstoffproduktionsrate b (Abb. 2.2 (2)), nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  FeCy die Rate B gemessen. Der prozentuale Anteil intakter Chloroplasten beträgt

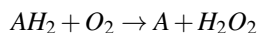
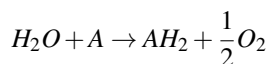
$$\text{Anteil} = 100 - \frac{(A - a) \times 100}{B - b}.$$

## 2. Methoden



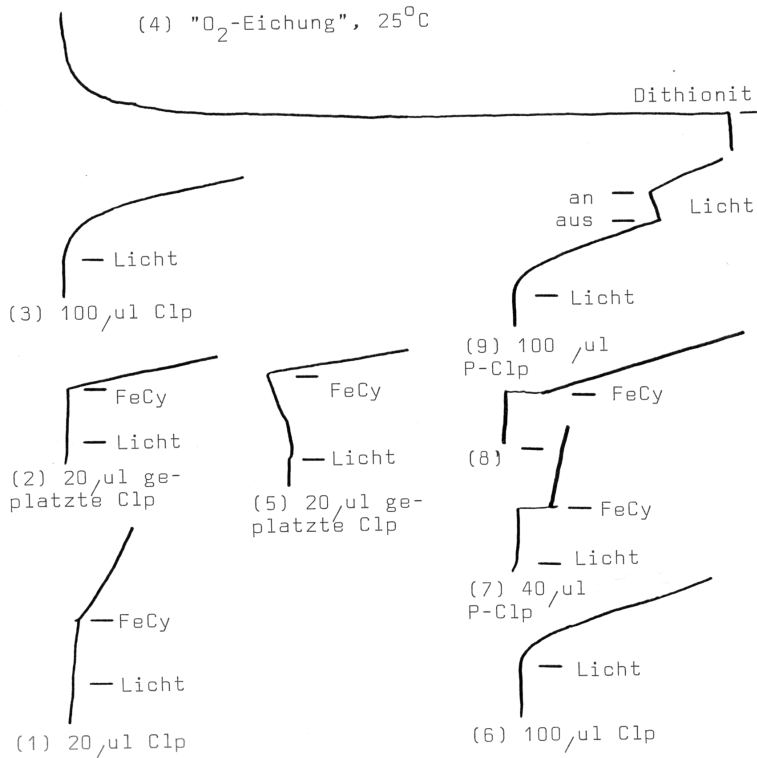
**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Isolation *schneller* und im Dichtegradienten gereinigter Chloroplasten aus Blättern des Spinats

Die Sauerstoffentwicklungsraten a und b (Abb. 2.2 (5)) können ein negatives Vorzeichen haben, da in geplatzten Chloroplasten ein lichtabhängiger Sauerstoffverbrauch auftreten kann, der auf sog. Mehler-Reaktionen (49, 65) zurückgeführt werden kann. Dabei wird bei nicht-zyklischem Elektronentransport ein endogener Akzeptor A reduziert, der mit Sauerstoff autoxydiert.



Durch Zugabe von 2  $\mu$ l Katalase-Lösung kann der Effekt dieser Reaktionsfolge aufgehoben werden.





**Abb. 2.2:** Messung der Hill-Reaktionen mit Hilfe der Sauerstoffelektrode

(1) bis (4): *schnelle* Chloroplasten der Inkubation 2.2.3.6-9

(1) Clp +  $NH_4$  +  $PO_4$  + Katalase

(2) dto. geplatzte Clp

(3) Clp +  $CO_2$  + Katalase

(4)  $O_2$ -Eichung der Elektroden (5) "MEHLER"-Reaktion der geplatzen, *schnellen* Clp der Inkubation 2.2.3.8., Clp +  $NH_4$  +  $PO_4$

(6) bis (9): Clp der Inkubation 2.2.3.3., Zusatzlösungen wie in (1)(2)(3)

(6)  $CO_2$ -Hill-Reaktion der 1  $\times$  gewaschenen, *schnellen* Clp, die für die Reinigung über Percoll-D.grad. eingesetzt wurden

(7) FeCy-Hill-Reaktion der Percoll-D.grad.-gereinigten Clp

(8) dto. der geplatzen P-Clp

(9)  $CO_2$ -Hill-Reaktion der Percoll-D.grad.-gereinigten Clp nach ca. 3 h Lagerung im Eisbad. Konzentrationsangaben für die  $NH_4$ -,  $PO_4$ -,  $CO_2$ -Medien s.u.

## 2. Methoden

Medien für die Hill-Reaktion

20  $\mu\text{l}$  dieser Lösungen, in die Elektrodenküvette injiziert, bewirken rechts angegebenen Konzentrationen.

|        |        |                              |        |
|--------|--------|------------------------------|--------|
| FeCy   | 160 mM | $K_3(Fe(CN)_6)$              | 2 mM   |
| $NH_4$ | 240 mM | $NH_4Cl$                     | 3 mM   |
| $PO_4$ | 400 mM | $Na_3PO_4$                   | 5 mM   |
| $CO_2$ |        | in Suspensionsmedium gelöst: |        |
|        | 0,8 M  | $NaHCO_3$                    | 10 mM  |
|        | 0,4 M  | $Na_4P_2O_7$                 | 5 mM   |
|        | 0,8 mM | $KH_2PO_4$                   | 0,1 mM |

### 2.1.3.2 $CO_2$ -Hill-Reaktion

$CO_2$ -Fixierung durch isolierte Chloroplasten ist ein Zeichen für ihre Intaktheit und Funktionsfähigkeit. Zur Messung wurden meist 50 - 100  $\mu\text{l}$  Chloroplasten-Suspension und 2 ml Medium, aber auch unverdünnte Chloroplasten-Suspensionen, z.B. Gradienten-Fractionen, in die Küvette pipettiert und nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$   $CO_2$ -Reagenz und 2  $\mu\text{l}$  Katalase, Ausblasen des Sauerstoffs wurde zunächst die Dunkelrate aufgenommen, dann die Rate bei Belichtung (Abb. 2.2 (3) auf S. 23). Die Rate der Sauerstoffentwicklung errechnet sich aus der Formel:

$$\frac{\frac{\mu\text{Mol}O_2}{\text{mgChlorophyll}}}{h} = \frac{cm_{O_2}}{cm_{Min.O_2}} \times \frac{2,16 \times n\text{Mol}O_{2T} \times \mu\text{l}_{Clp-E_{652}} \times ml_{Med.+Clp+Reag.}}{cm_{O_2Eich} \times E_{652} \times ml_{Aceton+Clp} \times \mu\text{l}_{Clp}}$$

Im Einzelnen:

|                                 |                                                                                                                        |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $n\text{Mol}O_{2T}$             | Menge Sauerstoff in nM, die sich bei gegebener Temperatur T im Wasser löst                                             |
| $\frac{cm_{O_2}}{cm_{Min.O_2}}$ | Rate der Sauerstoffentwicklung                                                                                         |
| $\mu\text{l}_{Clp-E_{652}}$     | Volumen der Chloroplastensuspension in $\mu\text{l}$ , das zur Chlorophyllbestimmung eingesetzt wurde                  |
| $ml_{Med.+Clp+Reag.}$           | Gesamtvolumen in ml setzt sich zusammen aus einpipettiertem Medium, der Clp.-Suspension und den zugegebenen Reagenzien |
| $cm_{O_2Eich}$                  | Ausschlag in cm bei $O_2$ Eichung der Sauerstoffelektrode (s. Abb. 2.2 (4) auf S. 23); dazu wird der Sauerstoffgehalt  |

im Medium bei offener Elektrodenkammer registriert, dann eine Spatelspitze Na-Dithionit hinzugegeben

$E_{652}$

Extinktion des Chlorophyllextraktes bei 652 nm; ein Aliquot der Chloroplasten-Suspension wird mit 1 oder 2 ml 80 %igem Aceton im Dunkeln ca. 30 Min. lang extrahiert und dann abzentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wird bestimmt. Das Volumen des Extraktionsmittels und die eingesetzte Clp.-Menge in ml gehen ein in die Größe  $ml_{Aceton+Clp}$

$\mu l_{Clp}$

Volumen der Clp-Suspension in  $\mu l$ , die zur Messung der Hill-Reaktion in die Elektrodenküvette pipettiert wird

Allgemeine Chlorophyllbestimmung: Ein Aliquot des chlorophyllhaltigen Lipidextraktes wird in 1 ml Aceton gelöst. Bei einer Küvettendicke von 1 cm gilt unter Vernachlässigung des Volumens des Aliquots die Formel

$\mu l \text{ Chl/ml } 80 \% \text{iges Aceton} = (E_{652} \times 1000) / 36 (23)$ .

### 2.1.3.3 NADPH-abhängige GAP-DH

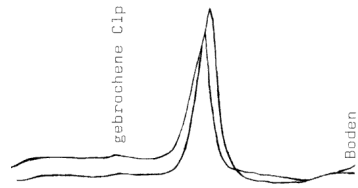
Die Intaktheit der Chloroplasten kann auch durch Messung der NADPH-abhängigen GAP-DH bestimmt werden. Nach Zerstörung des Envelope, z. B. infolge der Aufarbeitungsprozedur der Chloroplasten oder künstlich durch osmotischen Schock oder durch Triton X-100-Einwirkung herbeigeführt, kann das Enzym die Substrate des Tests umsetzen. Die Reaktion wird photometrisch bei 366 nm gemessen.

Testansatz:

600  $\mu l$  0,1 M Triäthanolaminpuffer (pH 7,8, 8 mM  $MgSO_4$ , 0,2 mg EDTA/ml, 0,33 M Sorbit)  
+ 10  $\mu l$  ATP, Na-Salz (40 mg/ml)  
+ 10  $\mu l$  NADPH, Na-Salz (10 mg/ml), dabei enthalten 0,5 ml NADPH-Lösung 10  $\mu l$  Phosphoglyceratkinase-Suspension  
+ 20  $\mu l$  Chloroplasten-Suspension oder osmotisch geschockte Chloroplasten  
Start  
+ 20  $\mu l$  3-Phosphoglycerat, Na-Salz (100 mg/ml), evtl. Zugabe von Triton X-100 (10  $\mu l$  10 %ige Lösung)

Isolierte Chloroplasten verlieren bei der Fraktionierung über Sucrose-D.grad. die Fähigkeit zur  $CO_2$ -Hill-Reaktion (39). Offensichtlich wird dabei ihr Envelope permeabel für Ferricyanid. Die Ferricyanid-Hill-Reaktion ist daher kein Maß für die physiologische Intaktheit der Chloroplasten. Dies zeigte sich bei Messung der NADPH-abhängigen GAP-DH der Chloroplasten, deren Aktivität in den osmotisch geschockten oder Triton X-100 behandelten Chloroplasten gegenüber den unbehandelten *intakten* Sucrose-D.grad. gereinigten Chloroplasten kaum gesteigert werden konnte (Abb. 2.4 S. 30). Bei diesem Test erwies sich die Zugabe von Triton X-100 als einfaches und wirkungsvolles Verfahren, den Envelope permeabel zu machen. Isolierung über Percoll-D.grad. hatte die geschilderte Auswirkung nicht (Abb. 2.3). Abgesehen von der gesteigerten *Intaktheit* auf der Grundlage der Messung der Ferricyanid-Hill-Reaktion (Abb. 2.2 (6-9) auf S. 23) gegenüber den gewaschenen *schnellen* Chloroplasten (etwa 95 % gegenüber 75 % bei Inkubation 2.2.3.3) waren auch die Werte der  $CO_2$ - und Ferricyanid-Hill-Reaktion größer (111 bzw. 328 gegenüber 107 bzw. 233  $\mu\text{mol } O_2/\text{mg Chl/h}$ ). Offensichtlich wird der Anteil intakter Chloroplasten auf der Basis des Chlorophyllgehaltes der Suspension gesteigert.

Die isolierten Chloroplasten blieben mehrere Stunden lang intakt, wie etwa die  $CO_2$ -Hill-Reaktion der Percoll-D.grad. gereinigten Chloroplasten nach 3 h Lagerung im Eisbad, aber auch der Scanstreifen einer Sucrose-D.grad.-Fraktionierung zeigt (Abb. 2.2 (9, 10) auf S. 23), deren Percoll-D.grad. gereinigte Chloroplasten 3 h lang bei 25° C in der Warburg-Apparatur bei ständigem Schütteln inkubiert worden waren. Nach einer derartigen 7 h Inkubation konnten allerdings kaum noch intakte Chloroplasten im Dichtegradienten gefunden werden.



**Abb. 2.3:** Scan (Chloroplasten oben und Protein unten) der Fraktionierung eines Sucrose-D.grad. beladen mit Percoll-D.grad. gereinigten Clp, die zuvor 3 h lang bei ständigem Schütteln in der Warburg-Apparatur inkubiert worden waren.

### 2.1.4 Envelopes

In den Laboratorien Biologie Vegetale/DRF, CENG et USMG/Grenoble isolierten Dr. J. Joyard und Prof. R. Douce große Mengen Envelopes aus Blättern des Spinats. Den benötigten Spinat baute ein Bauer in der Nähe von Grenoble an und lieferte stets in den Morgenstunden frisch geerntete Pflanzen an. Die gesammelten, tiefgefrorenen Suspensionen (11,5 ml, ca. 4,7 mg Prot./ml) mehrerer Aufarbeitungen sandten Joyard und Douce zur weiteren Analyse nach Köln. Diese umfassten: qualitative und quantitative Bestimmung der Lipide,

massenspektroskopische Untersuchung der Lipide,  
Analyse der Fettsäuren der Acyllipide,  
Positionsanalyse der Fettsäuren der Acyllipide.

Die Methodik der Präparation der Envelopes (Abb. 2.5), an der sich auch die eigenen Aufarbeitungen orientierten, ist ausführlich beschrieben worden (39) und im Schema (Abb. 2.6) kurz dargestellt.

Eigene Präparationen der Envelopes gingen von *schnellen*, mehrfach gewaschenen Chloroplasten aus, mit denen nach osmotischem Schock im Schwellmedium (Aufnehmen des letzten Sedimentes, mehrmaliges Aufziehen der Suspension in eine Pasteurpipette, dann Stehenlassen für einige Minuten im Eisbad) ein dreistufiger Sucrose-D.grad. überschichtet wurde. Nach 1 h Ultrazentrifugation bei 73000 g wurde die Bande der Envelopes mit einer Pasteurpipette abgesaugt; auf die Sedimentation der Membranen dieser Fraktion wurde verzichtet (im Gegensatz zu den Aufarbeitungen in Grenoble). Nach Dekantieren des Überstandes und Abspülen der lockeren, oberen Schicht konnte das Sediment der Thylakoide gewonnen werden.



**Abb. 2.5:**  $^{14}\text{C}$ -Envelopes im Dichtegradienten; Fraktion E30, s. 2.2.5

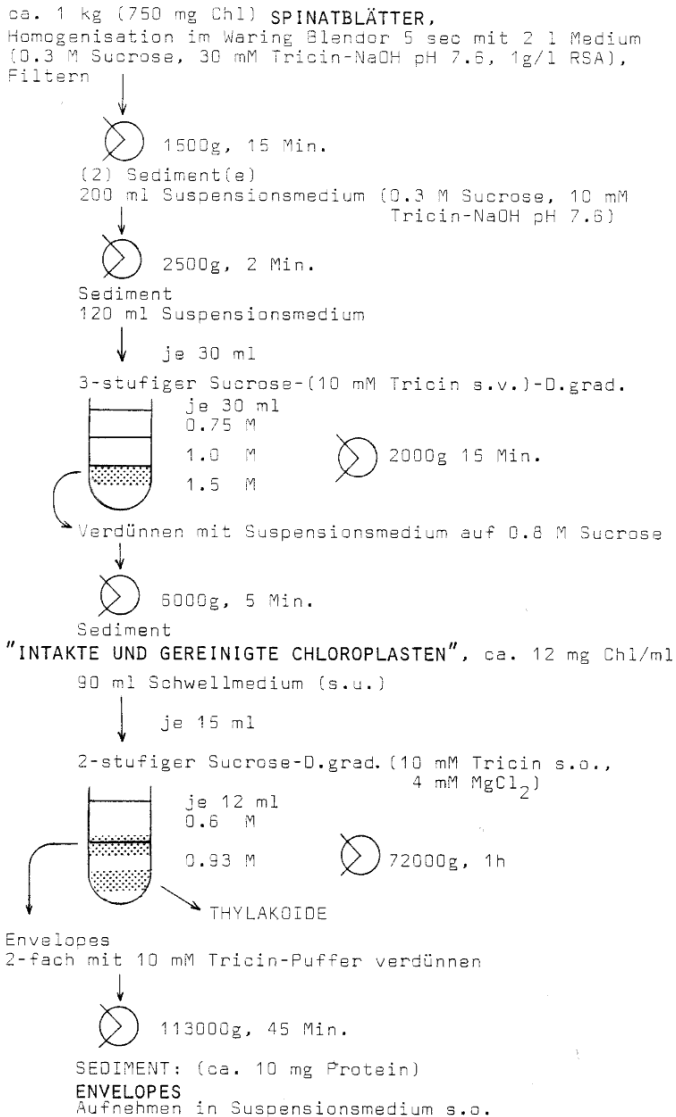
**Schwellmedium:**

|       |                     |
|-------|---------------------|
| 10 mM | Tricin-NaOH, pH 7,6 |
| 4 mM  | $\text{MgCl}_2$     |

**Diskontinuierlicher Dichtegradient:**

|       |      |   |                          |
|-------|------|---|--------------------------|
| 4 ml  | 1,5  | M | Sucrose in Schwellmedium |
| 10 ml | 0,93 | M | Sucrose in Schwellmedium |
| 10 ml | 0,6  | M | Sucrose in Schwellmedium |

## 2. Methoden



**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung der Isolation der Envelopes aus Blättern des Spinats nach R. Douce und J. Joyard (39)

## 2.2 Inkubationen

### 2.2.1 Blätter

Junge Blätter verschiedener, dikotyler Pflanzen (Spinat, Anthriscus, Erbse) wurden mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat (Applikation auf Blattoberfläche oder/und Aufnahme durch den Blattstiel) und  $^{14}\text{CO}_2$  inkubiert wie zuvor beschrieben (155).

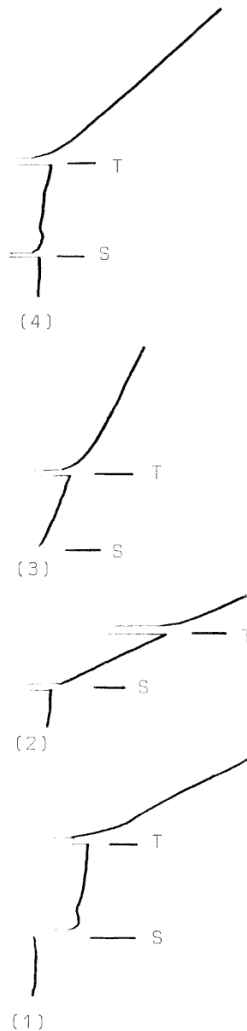
### 2.2.2 Grüne Gewebekulturen des Tabaks, Blaualgen

Ca. 20 - 30 ml der grünen Suspensionskulturen des Tabaks (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. L. Bergmann und Dr. H. Rennenberg.) oder der Blaualgenkulturen wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben im temperierten Warburg-Inkubationsgefäß bei 12000 Lux Beleuchtung mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat oder  $^{14}\text{CO}_2$  inkubiert (siehe Aufstellung). Dazu wurden die sterilen Suspensionen des Tabaks zuvor abge-nutscht und in wenigen ml des aufgefangenen Mediums aufgenommen. Die Blaualgenkulturen wurden erst nach dreimaligem Waschen mit Vollmedium verwendet. Im Falle der  $^{14}\text{CO}_2$ -Inkubationen wurden die Gefäße mit Gummikappen verschlossen und die  $^{14}\text{C}$ -Carbonatlösung wurde mit einer 1 ml Einwegspritze injiziert.

### 2.2.3 Chloroplasten

Aus Spinatblättern isolierte Chloroplasten verschiedener Reinigungsstufen (*schnelle*, ein- bis mehrfach gewaschene Chloroplasten, über Sucrose- oder Percoll-D.grad.-gereinigte Chloroplasten) wurden mit unterschiedlicher Zielsetzung mit den Isotopen  $^{14}\text{C}$ -Acetat, UDP- $^{14}\text{C}$ -Gal,  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  und  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  im Warburg, aber auch bei Raumtemperatur und Raumlicht in 15 ml Zentrifugengläschen inkubiert.

Eine Übersicht über die Inkubationen gibt die Tab. [2.1](#).



**Abb. 2.4:** Messung der NADP-abhängigen GAP-DH in Chloroplastenfraktionen; Testansatz s.

### 2.1.3.3

S = Start der Reaktion mit Substrat, T = Zugabe von 10 µl 10%iger Triton X-100 Lösung

(1) *schnelle* Clp

(2) osmotisch geschockte *schnelle* Clp

(3) Sucrose-D.grad.-gereinigte Clp

(4) Percoll-D.grad.-gereinigte Clp

dabei in (1-4) je 20 µl Clp-Suspension.



**Tab. 2.1:** Inkubationen der Gewebekulturen des Tabaks, der Blaualgen und der isolierten Chloroplasten aus Blättern des Spinats mit verschiedenen radioaktiven Substraten

|                                                                                                                                                     |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>zu 2.2.2 Grüne Gewebekulturen des Tabaks, Blaualgen</b>                                                                                          |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Grüne Gewebekulturen des Tabaks</b> , T 25°C, Dauer 1h 30Min., Warburg                                                                           |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                  |
| 3 Tage alt                                                                                                                                          | $^{14}\text{CO}_2$ , 20 $\mu\text{Ci}$                 | Chl 218/Ansatz                                                                                                                                                                                                                   |
| 3 Tage alt                                                                                                                                          | $^{14}\text{C}$ -Acetat                                | Chl 228/Ansatz                                                                                                                                                                                                                   |
| 7 Tage alt                                                                                                                                          | je 20 $\mu\text{Ci}$                                   | Chl 302/Ansatz                                                                                                                                                                                                                   |
| 10 Tage alt                                                                                                                                         | dto.                                                   | Chl 151/Ansatz                                                                                                                                                                                                                   |
| 20 Tage alt                                                                                                                                         | dto.                                                   | Chl 177/Ansatz                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Blaualgen</b>                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>Nostoc communis</i>                                                                                                                              | $^{14}\text{C}$ -Acetat                                | T 24°C, Dauer 30 Min., Warburg                                                                                                                                                                                                   |
| <i>Anabaena flos aquae</i>                                                                                                                          | je 10 $\mu\text{Ci}$                                   | T 24°C, Dauer 2 h 90 Min., Warburg                                                                                                                                                                                               |
| <b>zu 2.2.3 Isolierte Chloroplasten des Spinats</b>                                                                                                 |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>1. Schnelle Clp</b> , 1 x<br>gewaschen, 93 % intakt,<br>141 $\text{CO}_2$ -HR bzw. 592<br>FeCy-HR                                                | UDP- $^{14}\text{C}$ -Gal,<br>1,27x10 <sup>6</sup> dpm | Chl 75 bzw. 300, Raum-T, Raumlicht, Dauer 1 h 20 Min.                                                                                                                                                                            |
| <b>2. Clp über<br/>Sucrose-D.grad.<br/>gereinigt</b> , 91 % intakt,<br>145 $\text{CO}_2$ -HR bzw. 285<br>FeCy-HR (vor der<br>D.grad.zentrifugation) | UDP- $^{14}\text{C}$ -Gal, 1,2x10 <sup>6</sup><br>dpm  | Raum-T, Inkubationsgefäß abgedunkelt, Dauer 1 h 20 Min.<br>Nach der Inkubation wurde die Suspension mit frisch isolierten <i>schnellen</i> Clp<br>geträgert und über Sucrose-D.grad. in intakte und gebrochene Clp fraktioniert. |

|                                                                                            |                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>3. Clp über Percoll-D.grad. gereinigt.</b> Int. 95 %, 111 und 328 $CO_2$ - bzw. FeCy-HR | UDP- $^{14}C$ -Gal, $0,533 \times 10^6$ dpm | Suspension in 3 Inkubationsansätze geteilt (Chl 290/670, T 25°C, Dauer 1 h 30 Min., Warburg)<br>(1) + $CO_2$ -Medium + sn-G-3-P<br>(2) + $CO_2$ -Medium + sn-G-3-P, DUNKEL<br>(3) + $CO_2$ -Medium<br>Nach der Inkubation wurden die Suspensionen über Percoll-D.grad. in intakte und gebrochene Clp fraktioniert.                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>4. Clp über Percoll-D.grad. gereinigt</b>                                               | UDP- $^{14}C$ -Gal                          | Chl 160/300, T 25°C, Dauer max. 30 Min., + $CO_2$ -Medium + sn-G-3-P, Warburg<br>Entnahme von Aliquoten (50 $\mu$ l ) und sofortige Extraktion nach 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Min.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>5. Clp über Percoll-D.grad. gereinigt</b>                                               | UDP- $^{14}C$ -Gal, $0,8 \times 10^6$ dpm   | Pulse-Chase: T 25°C, Warburg<br>+ $CO_2$ -Medium + sn-G-3-P<br>Nach 30 Min. Inkubation im Zentrifugenglas wurde die Clp-Suspension mit 12 ml Suspensionsmedium aufgefüllt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit gleichen Medienbedingungen und UDP-Gal wieder aufgenommen und weiter inkubiert. Eine Hälfte der Suspension wurde sogleich extrahiert, die andere nach 3 h über Percoll-D.grad. in intakte und gebrochene Clp fraktioniert. Ein Aliquot des Ansatzes wurde bereits nach 10 Min. Inkubation direkt extrahiert. |
| <b>6. Schnelle Clp, 2 x gewaschen.</b> Int. 63 %, 34 und 226 $C0$ ,- bzw. FeCy-HR          | $^{14}C$ -Acetat 20 $\mu$ Ci                | Chl 1,28 mg/1030, T 20°C, Dauer 1 h 15 Min., Warburg<br>+ sn-6-3-P + UDP-Gal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

|                                                                                      |                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>7. Schnelle Clp, 2 x gewaschen</b> , Int. 89 %, 80 und 231 $CO_2$ - bzw. FeCy-HR  | $^{14}C$ -Acetat                                   | T 20°C, Dauer 1 h 15 Min., Warburg<br>(1) Chl 467/315, + sn-G-3-P<br>(2) Chl 156/110, + sn-G-3-P + UDP-Gal<br>(3) Chl 94/68, + sn-G-3-P + UDP-Gal, DUNKEL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>8. Schnelle Clp, 3 x gewaschen</b> , Int. 93 %, 124 und 442 $CO_2$ - bzw. FeCy-HR | $^{32}PO_4^{3-}$ , $^{35}SO_4^{2-}$ je 50 $\mu Ci$ | Clp.-Suspension (+ $CO_2$ -Medium) geteilt für Inkubationen mit Phosphat und Sulfat; Chl 290/1205 bzw. 290/703, T 20°C, Dauer 1 h, Warburg; Nach der Inkubation wurde jeder Ansatz geteilt:<br>(1) jeweils Fraktionierung der Suspensionen über Sucrose-D.grad. in intakte und gebrochene Clp, Extraktion der intakten Clp<br>(2) Abzentrifugieren der Suspensionen und Auflösen der Sedimente in destilliertem Wasser, anschließend Sucrose-D.grad.-Zentrifugation und Extraktion der gebrochenen Chloroplasten. |
| <b>9. Schnelle Clp, 2 x gewaschen</b> , Int. 87 %, 148 $CO_2$ -HR                    | $^{35}SO_4^{2-}$ ca. 400 $\mu Ci$                  | Die Clp-Suspension (6 ml, 2,6 mg Chl/ml, + $CO_2$ -Medium) mit dem bereits zugegebenen Isotop wurde auf 3 Ansätze aufgeteilt. T 23 C, Warburg;<br>(1) Chl 10,4 mg/4 ml, Entnahme von je 1 ml nach 35 und 65 Min., der restlichen 2 ml nach 125 Min. und Auftrennung in intakte und gebrochene Clp über Sucrose-D.grad., Extraktion der intakten Clp<br>(2) Chl 2,6 mg/1 ml, abgedunkelt<br>(3) Chl 2,6 mg/1 ml, + sn-G-3-P<br>Auch bei (2) und (3) Fraktionierung und Extraktion der intakten Clp                 |

|                                                                                    |                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>10. Clp, über Percoll-D.grad. gereinigt.</b> Int. 99 %, 105 CO <sub>2</sub> -HR | $^{35}\text{SO}_4^{2-}$<br>(1) ca. 100 $\mu\text{Ci}$<br>(2, 3) ca. 50 $\mu\text{Ci}$ | Die Suspension (+ CO <sub>2</sub> -Medium, 715 $\mu\text{g}$ Chl/ml) wurde für 3 Inkubationen in Licht verwendet: T 25°C, Warburg<br>(1) Chl 357/525, + sn-G-3-P; Entnahme von Aliquoten nach 20, 40 Min. und 2 h 30 Min. (200, 200 und 100 $\mu\text{l}$ )<br>(2) Chl 143/210, ohne Zusatz<br>(3) Chl 143/210, + $P_i$<br>Alle aliquoten Teile wurden nach der Inkubation über Percoll-D.grad. fraktioniert, nur die intakten Plastiden kamen zur Extraktion. |
| <b>11. Clp, über Percoll-D.grad. gereinigt</b>                                     | $^{35}\text{SO}_4^{2-}$<br>(1) ca. 25 $\mu\text{Ci}$<br>(2) ca. 100 $\mu\text{Ci}$    | T 25°C, Warburg, CO <sub>2</sub> -Medium<br>(1) Entnahme und Extraktion von Aliquoten nach 5, 10, 25, 20, 25 Und 20 Min.<br>(2) Pulse-Chase, Durchführung wie 5.<br>30 Min. Pulse, 2 h und 4 h 30 Min. Chase; die Aliquote wurden direkt extrahiert.                                                                                                                                                                                                           |

Während die <sup>14</sup>C-Acetatlösungen mit hoher spezifischer Radioaktivität in genügend kleinen Volumina direkt zu den Ansätzen gegeben werden konnten, wurden die Lösungen des radioaktiven Phosphats und Sulfats und der UDP-Gal zunächst mit gleichen Volumina des doppelt konzentrierten Suspensionsmediums versetzt. Die Zugabe einiger Substanzen, in der Aufstellung verkürzt dargestellt, erreichte im Totalvolumen der Ansätze die hier vermerkten Konzentrationen:

|                                               |         |
|-----------------------------------------------|---------|
| sn-G-3-P = sn-Glycerin-3-phosphat             | 0,16 mM |
| UDP-Gal                                       | 0,15 mM |
| CO <sub>2</sub> -Medium, enthält              |         |
| NaHCO <sub>3</sub>                            | 10 mM   |
| Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> | 5 mM    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>               | 0,1 mM  |
| P <sub>i</sub> = anorganisches Phosphat       | 10 mM   |

Weitere angegebene Daten sind: T = Temperatur, Chl =  $\mu\text{g}$  Chlorophyll im Ansatz/  $\mu\text{l}$  Totalvolumen, Int. = Intaktheit der Clp in % bestimmt mit der FeCy-Hill-Reaktion der Suspension und der osmotisch geschockten Clp, CO<sub>2</sub>-HR = CO<sub>2</sub>-Hill-Reaktion der Suspension, FeCy-HR = Ferricyanid-Hill-Reaktion der osmotisch geschockten Clp, Angaben in  $\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl/h}$ .

## 2.2.4 Envelopes und Thylakoide aus Chloroplasten des Spinats

### 2.2.4.1 Envelopes (Douce/Joyard) + UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal

Prof. Dr. R. Douce und Dr. J. Joyard isolierten Envelopes wie beschrieben und inkubierten die Suspensionen mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal (25  $\mu\text{Ci}$ ) bei Raumtemperatur und Raumlicht.

Für die Aufnahme einer Kinetik der ( $^{14}\text{C}$ )Gal-Einlagerung in die Gl entnehmen und extrahierten sie in einer ersten Versuchsreihe aliquote Teile nach 10, 20, 30, 60, 90 und 120 Min.

Eine zweite Präparation (25  $\mu\text{Ci}$  bzw. 5  $\mu\text{Ci}$  UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal extrahierten sie nach je 90 Min. (Markierung der Gl für eine Methylierungsanalyse).

Sie engten die Lipidextrakte zur Trockene ein und sandten diese unter Argonatmosphäre gasdicht verschlossen zur weiteren Analyse nach Köln.

### 2.2.4.2 Envelopes + UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal

Weitere Envelope-Präparationen dienten der biosynthetischen, radioaktiven Markierung der Gl, die u. a. bei Vorversuchen zur Methylierungsanalyse benötigt wurden. Dazu wurden die Suspensionen bei Raumlicht und Raumtemperatur ca. 30 Min. bis 1 h mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal inkubiert. Die markierten Gl fanden aber auch Verwendung bei Versuchen, exogene Lipide mit Envelope-Suspensionen zu metabolisieren.

### 2.2.4.3 Envelopes + ( $^{14}\text{C}$ )GL

So wurden die nach 1 h Reaktion (350  $\mu\text{l}$  Envelope-Suspension + 5  $\mu\text{Ci}$  UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal extrahierten und isolierten Gl MGD (896600 dpm), DGD (555800 dpm), TGD (395600 dpm) und TeGD (48960 dpm) auf 4 (MGD), 3 (DGD + TGD) oder 2 (TeGD) Teströhrchen aufgeteilt, zur Trockene eingengt und in 300  $\mu\text{l}$  10 mM Tricin-Puffer pH 7,7 ultrabeschallt. Jeweils die erste (1) der Lipidsuspensionen wurde nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Envelope-Suspension 2 h lang im Ultraschallbad (Kühlung auf Zimmertemperatur) inkubiert, die weiteren enthielten (2) UDP (0,1 mM), (3) UDP-Gal (0,4 mM, nur MDG-, DGD-, TGD-Ansätze) und (4) UDP (0,5 mM, nur MGD-Ansatz). Die Ansätze, die keine UDP oder UDP-Gal enthielten, trübten sich mit der Zeit stark. Die Assays wurden durch Injektion von 3 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 2/1$  gestoppt, extrahiert und gegen 0,35 ml NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Nach Dünnschichtchromatographie der Lipidextrakte in LM 1 wurden die Gl zur Radioaktivitätsmessung in Szintillationsröhrchen (5 ml MeOH vorgelegt) ausgeschabt. Die Radioaktivität in jedem der 4 Gl wurde als Prozentsatz der eingesetzten Aktivitätsmenge des Assays berechnet.

## 2. Methoden

---

### Radioaktive Lipide in 300 $\mu$ l Tricin-Puffer

|                                   | 224150<br>MGD | 185270<br>DGD | 181870<br>TGD | 24480<br>TeGD | dpm/Ansatz |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| 1. 100 $\mu$ l Envelope -         | •             | •             | •             | •             |            |
| 2. 100 $\mu$ l Envelope + UDP     | •             | •             | •             | •             | 0,1 mM     |
| 3. 100 $\mu$ l Envelope + UDP-Gal | •             | •             | •             |               | 0,4 mM     |
| 4. 100 $\mu$ l Envelope + UDP     | •             |               |               |               | 0,5 mM     |

#### 2.2.4.4 Envelopes + Monogalaktosyldiacyl-( $^{14}$ C)-glycerin + Mono-( $^{14}$ C)-galaktosyldiacylglycerin

Während R. Douce und J. Joyard das im Glycerinanteil ( $^{14}$ C)-markierte MDG (78300 dpm) zur Verfügung stellten, wurde das in seiner Gal radioaktive MGD (680700 dpm) durch in vitro Inkubation einer Envelope-Suspension mit UDP( $^{14}$ C)-Gal gewonnen. Die vereinigten MGD-Lösungen wurden in Aliquoten auf 8 Ansätze der maximal 2 stündigen Inkubationen aufgeteilt:

(1) Kontrolle zur Zeit 0; DC des Lipidgemisches in LM 7 und Ausschaben der Banden DG, MGD, Startfleck einschließlich TGD und TeGD in Szintillationsröhrchen (5 ml MeOH vorgelegt).

(2) Kontrolle 120 Min.: das zur Trockene im N-Strom eingeblasene Lipidgemisch wurde in 225  $\mu$ l Puffer (10 mM Tricin pH 7,7) aufgenommen und 2 h lang ultrabeschallt (Ultraschallbad, Kühlung auf Zimmertemperatur), dann mit 3 ml  $CHCl_3$ /MeOH = 2/1 extrahiert und gegen 0,5 ml NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Ein Aliquot (20  $\mu$ l l) der organischen Unterphase (auf 2 ml aufgefüllt) kam zur Szintillationszählung, der Rest wurde eingengt, dünnschichtchromatographiert und die Banden DG, MGD und Start wurden wie beschrieben zur LSC ausgeschabt.

(3 - 6) Zum eingeblasenen Lipidgemisch wurden 600  $\mu$ l Puffer und 300  $\mu$ l Envelope-Suspension (8 mg Prot./ml) pipettiert und wie oben beschallt. Nach (3) 30 Min., (4) 60, (5) 90 und (6) 120 Min. Entnahme von 10  $\mu$ l zur direkten LSC und 200  $\mu$ l zur Extraktion und weiteren Aufarbeitung wie unter (2) beschrieben. 1ml der zurückbleibenden wässrigen Oberphasen wurde gezählt.

(7 - 8) Das trockene Lipidgemisch wurde nach Zugabe von 150  $\mu$ l Puffer, 0,2 mM an UDP, und 300  $\mu$ l Envelope-Suspension beschallt. Entnahmen von 10  $\mu$ l für die LSC und 200  $\mu$ l für die Extraktion und weitere Aufarbeitung wie für (3- 6) beschrieben nach 60 und 120 Min.

#### 2.2.4.5 Thylakoide + UDP-( $^{14}$ C)Gal

Zur vergleichenden Untersuchung der Gl-Synthesekapazität wurden auch Thylakoidfraktionen mit UDP-( $^{14}$ C)Gal inkubiert. Dazu wurden einmal osmotisch geschockte

Clp über Sucrose-D.grad.-Zentrifugation gereinigt und ein Aliquot der Fraktion der gebrochenen Chloroplasten wurde

(a) direkt, andere wurden nach 2- (b) und 4- (c) -maligem Waschen mit Suspensionsmedium inkubiert (Zimmertemperatur, Raumlicht, 30 Min.). Als Bezugsgröße diente der Chlorophyllgehalt der Suspensionen:

(a) 563  $\mu\text{g}$  Ch1/2000  $\mu\text{l}$  Ansatz,  $1,32 \times 10^6$  dpm UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$

(b) 280  $\mu\text{g}$  Ch1/ 680  $\mu\text{l}$  Ansatz,  $0,66 \times 10^6$  dpm UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$

(c) 355  $\mu\text{g}$  Ch1/ 920  $\mu\text{l}$  Ansatz,  $0,66 \times 10^6$  dpm UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$

Bei einer Envelope- und Thylakoid-Präparation über Dichtegradienten-Ultrazentrifugation galt der Proteingehalt als Bezugsgröße (Inkubationen bei 30 °C, 30 Min.):

Envelope, 822  $\mu\text{g}$  Prot./3 ml Ansatz,  $1,52 \times 10^6$  dpm UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ ,

Thylakoide, 113 mg Prot./200  $\mu\text{l}$  Ansatz, 110000 dpm UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ .

### 2.2.5 In vivo Markierung der Membranlipide der Chloroplasten

Die in vivo Markierung der Lipide der Chloroplasten wurde während eines Aufenthaltes in Grenoble in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Douce und Dr. J. Joyard durchgeführt.

Die Blätter frisch geernteter Spinatpflanzen wurden unter Wasser abgeschnitten, unter Wasser mit ihren Stielen in Glasgefäße übergeführt und in einem Plexiglasten (ca. 0,7  $\text{m}^3$  Volumen) im Garten des CENG aufgereiht. Die natürliche Beleuchtung variierte zwischen 17000 und 21000 Lux, die Temperatur maß ca. 18 °C.

#### EXPERIMENT I

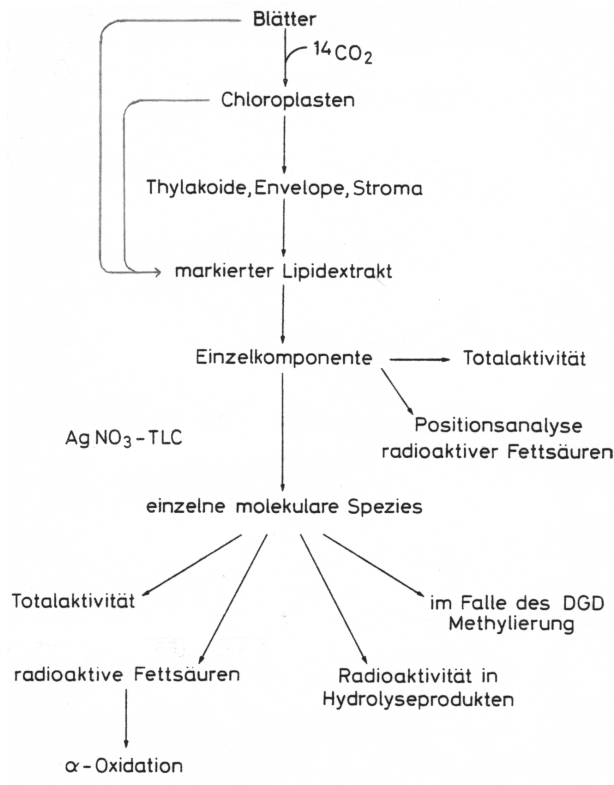
Zur Inkubation wurde  $^{14}\text{CO}_2$ , aus 150 mCi  $\text{Na}^{14}\text{CO}_3$  freigesetzt. Nach 45 Min. wurde die Luft des Inkubationskastens durch KOH-Lösung gepumpt und die Box wurde geöffnet. Blattproben von ca. 400 g Frischgewicht wurden nach weiteren 15, 105 und 195 Min. geerntet (Gesamtinkubationszeiten 1 h, 2 h 30 Min. und 4 h).

#### EXPERIMENT II

In einem zweiten Experiment wurden die Blätter ebenso mit 20 mCi  $^{14}\text{CO}_2$  inkubiert und zur einen Hälfte nach 30 Min. bei Öffnung der Plexiglasbox geerntet, zur zweiten Hälfte nach Ablauf weiterer 1,5 h.

#### EXPERIMENT III

Bei der dritten Versuchsreihe wurden Blätter 5 und 15 Min. lang mit je 50 mCi  $^{14}\text{CO}_2$ , und 30 Min. lang mit 100 mCi  $^{14}\text{CO}_2$  begast. Bei der 30 minütigen Inkubation wurde ein Teil der Blätter wie oben erst 1,5 h nach Öffnen der Box geerntet.



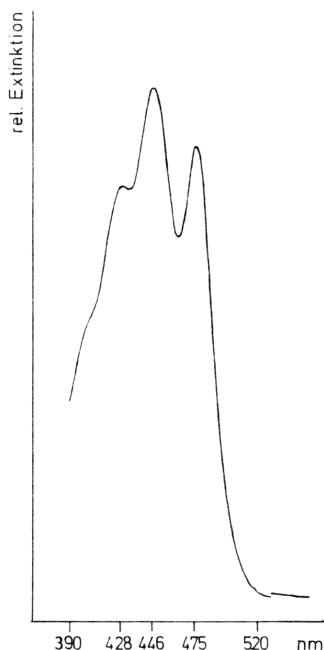
**Abb. 2.7:** Analyse der in vivo markierten Lipide

Von jeder Blattprobe wurde ein kleiner Teil extrahiert, während der Hauptteil der Isolation der Chloroplasten diente. Die Fraktion der intakten Chloroplasten wurde wiederum geteilt. Aus einem Aliquot wurden die Lipide extrahiert, die andere Portion wurde, ebenso mit *kalten* Chloroplasten geträgert, für die Präparation der Envelopes und Thylakoide eingesetzt. Die gewaschenen Lipidextrakte der einzelnen Fraktionen des Experiments I werden  $B_{1h}, B_{2,5h}, B_{4h}$  (Blätter),  $C_{1h}, C_{2,5h}, C_{4h}$  (Chloroplasten),  $T_{1h}, T_{2,5h}, T_{4h}$  (Thylakoide) und  $E_{1h}, E_{2,5h}, E_{4h}$  (Envelopes) genannt. Aus diesen Extrakten isolierte, individuelle Lipide wurden detaillierten Analysen unterzogen, wie Abb. 2.7 skizziert.



## 2.3 Extraktion der Lipide

### 2.3.1 Blätter



**Abb. 2.8:** Extinktion des Lipidextraktes der Envelope-Fraktion  $E_{4h}$

Zur Extraktion der Lipide aus jungen Blättern des Spinats, des Korbells, der Erbse und des Tabaks wurden die Blättchen mit ca. 3 ml  $CHCl_3$ /MeOH/Isopropanol = 2/1/0,5 in Sovirel-Schraubgläschen ca. 1 h lang auf 80 °C erhitzt und nach Abpipettieren der Lösung mit frischem Lösungsmittel bis zur völligen Farblosigkeit extrahiert. Größere Mengen Blattmaterial wurden in 100 oder 250 ml Erlenmeyerkolben zunächst ca. 15 Min. mit siedendem Isopropanol behandelt und mit  $CHCl_3$ /MeOH = 2/1 nach extrahiert. Die einzelnen Lösungsmittelfractionen wurden vereinigt und ausgeschüttelt (s.u.).

### 2.3.2 Envelope-, Thylakoid-, Chloroplasten- und Proteinsuspensionen, Fraktionen von Dichtegradienten

#### 2.3.2.1 Allgemeines

Das Lösungsmittel Chloroform/Methanol im Volumenverhältnis 2/1 kann ca. 4 % Wasser aufnehmen; daher wurden wässrige Suspensionen mit genügend  $CHCl_3$ /MeOH versetzt, um eine Phasentrennung zu vermeiden. Das biologische

Material wurde so entweder über Nacht bei niedriger Zimmertemperatur oder ca. 0,5 - 1 h mit heißem Lösungsmittel extrahiert. Grundsätzlich wurden die Rohextrakte gegen 0,45 %ige NaCl -Lösung ausgeschüttelt und die organischen Phasen abgezogen (*gewaschener* Lipidextrakt). Die beste Phasentrennung (organische Phase 59,6 % des Gesamtvolumens) trat ein, wenn dabei unter Berücksichtigung des Volumens der wässrigen Suspension das Verhältnis 100 Teile  $CHCl_3$ /MeOH = 2/1 25 Teile NaCl-Lösung hergestellt wurde. Bei quantitativen Analysen und bei isopropanolhaltigen Rohextrakten wurden die Oberphasen erneut extrahiert.

Diese Regeln konnten bei der Extraktion zwangsläufig größervolumiger Fraktionen der Sucrose-D.grad., die radioaktives, biologisches Material enthielten, nicht immer eingehalten werden.

Da die Zugabe des organischen Lösungsmittels meist zugleich die Reaktionen der Inkubationen stoppen sollten, musste auf langsames Verdünnen und erst danach mögliche Sedimentation der Chloroplasten verzichtet werden. Aber auch um die Kontamination der Laborgeräte so gering wie möglich zu halten, wurden diese Fraktionen in 25 ml Schliffzentrifugengläsern nur mit 3 - 5fachem Volumen  $CHCl_3$ /MeOH versetzt, mehrfach geschüttelt und über Nacht extrahiert. Ein beträchtlicher Zuckergehalt der organischen Phasen war dabei unvermeidbar, der sich auch nach Einengen des Extraktes und Neuaufnahme in  $CHCl_3$ /MeOH durch Ausschütteln gegen NaCl-Lösung nicht völlig eliminieren ließ.

Im Gegensatz zu den Fraktionen der Sucrose-D.grad. ließen sich die Fraktionen der Percoll-D.grad. schnell mit Suspensionsmedium verdünnen (kein osmotischer Schock der Clp.), so dass die Sedimente extrahiert werden konnten. Dies wiederum war deshalb von Bedeutung, weil Komponenten des Percoll® in organischen Lösungsmitteln löslich sind und erheblich die Dünnschichtchromatographie stören.

### 2.3.2.2 Extraktion der von J. Joyard und R. Douce isolierten Envelopes

Nach Auftauen der tiefgefrorenen Envelope-Suspension wurden deren Volumen bestimmt (11,5 ml) und 21 Aliquote (2 - 15  $\mu$ l) zur Proteinbestimmung entnommen. Von den Messwerten der Proteinbestimmung nach Lowry (104) fielen 13 in den linearen Bereich der geltenden Eichkurve, so dass der Proteingehalt der Suspension mit  $\bar{x} = 4,67$  mg/ml ( $s_{\bar{x}} = 0,1$  mg/ml  $\cong 2,1$  % von  $\bar{x}$ ,  $n = 13$ ), die gesamte Proteinmenge mit 53,6 mg angegeben werden kann.

Die Suspension wurde im Schütteltrichter mit 300 ml siedendem  $CHCl_3$ /MeOH = 2/1 für 1 h bis zur Farblosigkeit des Proteins extrahiert und mit NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die verbleibende wässrige Phase wurde nochmals extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden eingengt und über Nacht im Vakuum getrocknet (Lipidrockengewicht 122,6 mg, korrigiert für die Aliquot-Entnahmen). Zuvor wurde ein Aliquot zur DC der Pigmente abgenommen (s.u.).

### 2.3.3 Extraktion der Gewebekulturen des Tabaks

Das oben beschriebene Extraktionsverfahren führte bei der Extraktion der Suspensionskulturen des Tabaks (nach Abnutschen des Nährmediums und Waschen mit destilliertem Wasser) zu einem Artefakt (s.u.), der bei der Extraktion des lyophilisierten Materials mit heißem  $CHCl_3$ /MeOH/Isopropanol = 2/1/0,5 nicht auftrat. Daher wurden für die quantitativen Analysen der Lipide nur die gereinigten Extrakte gefriergetrockneter Kulturen eingesetzt.

### 2.3.4 Extraktion der Kieselgelfractionen

Aus dem Kieselgel für die Dünnschichtchromatographie lassen sich Lipide hoher Polarität mit deutlich geringerer Ausbeute extrahieren als apolare Lipide, wenn allein  $CHCl_3/MeOH = 2/1$  als Lösungsmittel verwendet wird. Eine Versuchsreihe mit radioaktiv markierten Gl ergab (Tab. 2.2), dass nach einstündiger Extraktion des von einer DC-Fertigplatte ausgeschabten Kieselgels nur ca. 8 % des TeGD im Überstand messbar waren. Erst nach Ausschütteln des Extraktionsansatzes mit NaCl-Lösung im oben angegebenen Verhältnis verbesserte sich die Ausbeute für TeGD um das 10fache. Daraus errechnete sich ein Korrekturfaktor von 1,26 für die Radioaktivitätsbestimmung oder die quantitative Bestimmung des TeGD. Im Falle des MGD, DGD und TGD waren die Verluste jedoch nach Zugabe der Salzlösung und kräftigem Schütteln der Proben vernachlässigbar klein. Dies wurde daher auch für die Ausbeuten anderer, polarer Acyllipide wie SQD, PG, PE und PC angenommen und von anderen Autoren bestätigt (175). Für die Extraktion dieser Lipide aus dem Kieselgel spielt der Wasserzusatz eine ebenso wichtige Rolle.

Routinemäßig wurden deshalb die Lipidbanden von der DC-Platte in Schliffzentrifugenröhrchen ausgeschabt (2 ml  $CHCl_3/MeOH = 2/1$  vorgelegt). Mit Zugabe von weiteren 2 ml Lösungsmittel wurden die Innenwände des Röhrchens abgespült und das Kieselgel wurde durch kurzes Beschallen im Ultraschallbad (Souvrex RK 100, Bandelin) dispergiert. Bei Extraktion des Kieselgels selbst gegossener DC-Platten wurden zuvor einige Tropfen NaCl-Lösung zugegeben. Dies erübrigte sich bei Fraktionen der DC-Fertigplatten, da deren festeres Kieselgel nach Anfeuchten mit Wasser ausgeschabt wurde. Durch das Ausschütteln mit 1 ml NaCl-Lösung wurde die organische Phase zugleich vom Kieselgel befreit. TeGD-Banden wurden in  $CHCl_3/MeOH/H_2O = 2/1/0,5$  ausgeschabt und kurz beschallt; das Kieselgel wurde abzentrifugiert. Fsme wurden wie zuvor beschrieben mit Äther (10 % MeOH) extrahiert (155).

## 2.4 Chromatographische und spektroskopische Verfahren, Radioaktivitätsbestimmung

### 2.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie der Lipide wurde bei Zimmertemperatur (Ausnahme: Silbernitratchromatographie) in mit Lösungsmittel gesättigten Chromatographiekammern durchgeführt. Dazu wurden Glasplatten wie üblich mit Kieselgel G Typ 60 oder H beschichtet und über Nacht bei mindestens 120° aktiviert. Fertigplatten (Merck) lieferten in der Regel bessere Trennergebnisse als selbst hergestellte Kiesel-

## 2. Methoden

**Tab. 2.2:** Ausbeute der Extraktion der Galaktolipide aus dem Kieselgel von DC-Fertigplatten Die Banden der radioaktiven Gl (DC auf DC-Fertigplatten in LM 1, aufgetragene Totalaktivität 107300 dpm) wurden in 1 ml  $CHCl_3$ /MeOH = 2/1 ausgeschabt und 1 h lang bei Zimmertemperatur extrahiert. In Aliquoten (30  $\mu$ l) des Überstandes wurde die Radioaktivität bestimmt (A). Dann wurden 4,1 ml  $CHCl_3$ /MeOH und 1,25 ml 0,45 %ige NaCl-Lösung zugegeben. Nach kräftigem Schütteln standen die Proben 30 Min. lang ruhig. Dann wurde in Aliquoten aus wässriger Ober- und organischer Unterphase die Radioaktivität bestimmt.

|                    | MGD   | DGD   | TGD   | TeDG  | Summe  |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| A Überstand        | 28200 | 21040 | 16870 | 1870  | 67980  |
| B org. Unterphase  | 26560 | 22450 | 35000 | 18320 | 102300 |
| C wässr. Oberphase | 950   | 830   | 2150  | 4760  | 8690   |
| Summe B+C          | 27510 | 23280 | 37150 | 23080 | 110990 |
| A als % von B+C    | 102,5 | 90,4  | 45,4  | 8,1   |        |
| B als % von B+C    | 96,6  | 96,4  | 94,2  | 79,4  |        |

gelplatten; dabei ist ihre Kapazität mit 1 mg Lipid/cm bei strichförmigem Auftragen der Probe sehr groß. Für die Silbernitratchromatographie ( $AgNO_3$  – DC) wurden Fertigplatten (0,25 mm dick) mit  $AgNO_3$ -Lösung (10 % in Acetonitril, 10 ml/400  $cm^2$ ) besprüht und vor Gebrauch für drei h bei mindestens 130°C aktiviert. Die Silbernitratchromatogramme wurden bei 4° C entwickelt. Lipide, die bei der dünn-schichtchromatographischen Reinigung mit Joddampf auf der DC-Platte sichtbar gemacht worden waren, konnten für die  $AgNO_3$ -DC nicht mehr eingesetzt werden.

Banden der individuellen Lipide, die weiter verarbeitet werden sollten, wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach Ansprühen der DC-Platte mit ANS im UV-Licht (380 nm) sichtbar gemacht. Wie schon oben angedeutet, bewährte sich die Lokalisation der Lipide mit Hilfe von Joddampf nicht. Zwei unabhängige DC-Auftrennungen des gleichen Envelope-Extraktes, Umesterung und GC-Analyse der Fsme der Gl führten zu großen Differenzen in der quantitativen Fettsäurezusammensetzung. Deformierte GC-Peaks deuteten an, dass insbesondere Trien- und Diensäuren bei der Aufarbeitung verändert worden waren. Daher wurde die Methode der Lokalisation durch Jodbedampfung nicht angewendet.

Tab. 2.3 fasst die verwendeten Laufmittel für die DC zusammen. Dort ist neben besonderen Nutzungshinweisen auch angegeben, auf welchen DC-Platten ein LM routinemäßig eingesetzt wurde (Fertig- oder selbst hergestellte Platten).

## 2.4. Chromatographische und spektroskopische Verfahren

**Tab. 2.3:** Laufmittelsysteme

F = DC-Fertigplatten 60 G, G und H = selbst hergestellte DC-Platten Kieselgel 60 G und H (5x40 cm); C = Chloroform, M=Methanol, W=Wasser, E=Eisessig, H=Hexan, Ä=Äther.

| Nr. Laufmittel                                    | P     | Trennung / Darstellung / Bemerkung                                                    |
|---------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Lipidgemische                                     |       |                                                                                       |
| 1 C/M/W = 70/30/4                                 | F     | GL von MGD bis TeGD; PE auf DGD, ADGD auf MGD, TCD nicht immer sauber von PC getrennt |
| 2 C/M/NH <sub>4</sub> OH = 70/20/1,5              | F, G  | Trennung MGD - ADGD,;, PM, APE, BPA. (180)                                            |
| 3 Aceton/Benzol/W = 91/30/8                       | F, H  | Gute Darstellung der wichtigsten Acyllipide                                           |
| 4 C/M/E/W = 170/30/20/7                           | F, H, | Trennung PE - DGD, PG - SQD, PC - TGD                                                 |
| 5 Pyridin/Ameisensäure/C = 30/7/50                | F     | PA, neigt zum <i>Auflaufen</i>                                                        |
| 6 H/Ä/E = 50/40/0,5                               | F     | 1,3-DG,., 1,2-DG, Fs, TG                                                              |
| 7 Ä/Isopropanol/M = 100/4,5/2,5                   | F     | Carotinoide, AGD, AGM, ASG, DG                                                        |
| 8 Benzol                                          | F     | Fsme, Sterine, DG                                                                     |
| 9 Ä/Petroläther = 3/90                            | G     | Fsme                                                                                  |
| Acylierte Lipide                                  |       |                                                                                       |
| 10 Ä/Petroläther = 2/1                            | F     | MGD, ADGD, DGD, SQD-Methylester                                                       |
| 11 C/M = 99/19                                    | F     | TGD, TeGD                                                                             |
| 12 H/Ä/E = 50/40/0,5                              | F     | DG                                                                                    |
| Hydrolyseprodukte des Lipids nach Lipase-Spaltung |       |                                                                                       |
| 13 H/Ä/E = 50/40/0,5                              | F     | Acetyliertes 1,2-DG (143)                                                             |
| 14 C/M/W = 75/20/1                                | G     | MGD                                                                                   |
| 15 C/M/W = 95/35/4                                | G     | DGD                                                                                   |
| 16 C/M/E/W = 50/35/4/4                            | G     | TGD                                                                                   |
| 17 C/M/E/W = 65/35/4/4                            | G     | SQD, PG, PE, PC                                                                       |
| Silbernitrat-Chromatographie                      |       |                                                                                       |
| 18 Petroläther/Ä = 80/20                          | F     | Fsme                                                                                  |
| 19 C/M/W = 60/21/4                                | F     | MGD                                                                                   |
| 20 C/M/W = 65/35/4                                | F     | DGD                                                                                   |
| 21 C/M/E/W = 50/25/4/4                            | F     | TGD                                                                                   |
| 22 C/M/E/W = 25/15/4/2                            | F     | TeGD                                                                                  |
| 23 C/M/W = 65/25/4                                | F     | SQD, PG, PC                                                                           |
| 24 C/M = 96/4                                     | F     | DG                                                                                    |

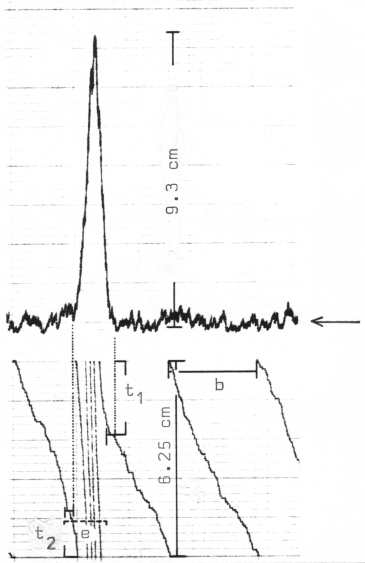
## 2. Methoden

---

| Verschiedenes          |   |                                               |
|------------------------|---|-----------------------------------------------|
| 25 C/M = 96/4          | F | Methylierungsprodukte des MGD, DGD, TGD, TeGD |
| 26 C/M = 95/5          | F | 2,3,4-tri- und 2,3,4,6-tetramethylgalaktose   |
| 27 C/M = 85/15         | F | Glycerin                                      |
| 28 Butanol/E/W = 5/4/1 | F | Mono-, Digalaktosylglycerin                   |



## 2.4.2 Gaschromatographie (GC) und Radiogaschromatographie (RGC)



**Abb. 2.10:** Radiogaschromatogramm  
Ca. 2200 dpm  $^{14}\text{C}$ -Margarinsäure, 15 %  
Reoplex (250cm x 1/8 Zoll-Stahlsäule),  
isotherm 195°C.

Auswertung: Background  $b = 100$   
cpm/2,8cm, Elutionsdauer  $e = 1,3$  cm,  
volle Integrationsausschläge  $I = 4$  (ein  
Ausschlag über 6,25 cm = 100 counts),  
Teilausschläge  $t_1 = 2,3\text{cm}$ ,  $t_2 = 1,5$  cm

$$\text{cpm} = I \times 100 + (t_1 + t_2) \times \frac{100}{6,25} - e \times b$$

Die GC der Fsme und des trimethylsilylierten MGD bzw. dessen Äther-Analogons und RGC der Fsme wurde wie beschrieben (155,156) mit 250 cm langen, 1/8 Zoll-Stahlsäulen, 15 % Reoplex auf Chromosorb W bzw. mit 100 cm langen 1/8 Zoll-Stahlsäulen, 2 % Silicon SE 30 auf Gaschrom P und den folgenden Geräten durchgeführt:

Hewlett-Packard 5700 A Gaschromatograph, bestückt mit einem Flammenionisationsdetektor, Hewlett-Packard Integrator 3380 A,

Perkin-Elmer Durchflussreaktor RGC 170 mit 10 ml Proportionalzählrohr, Integrator und Power-Supply LB 242 K der Firma Berthold, Rikadenki 2-Kanal-Schreiber.

Die Identität der Fettsäuren wurde wie zuvor durch Vergleich mit authentischen, käuflichen Fs (Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure), durch Rechromatographie nach Hydrierung sowie durch die Graphen 1g (Retentionszeit *isotherme Anal.*) = f (C-Zahl) bestimmt. Eine Hexadecensäure, deren Vorkommen im Pflanzenreich und speziell im PG beschrieben und deren Struktur aufgeklärt ist (54), konnte ausschließlich im PG oder im totalen Lipidextrakt detektiert werden und wurde deshalb als trans-3-Hexadecensäure (3-tr- $\text{C}_{16:1}$ ) angesprochen (siehe auch GLC-CI-MS). Ihr  $R_f$  ist bei den verwendeten Temperaturprogrammen deutlich verschieden von dem der Palmitölsäure. Weitere Unterscheidungen im Bereich der Hexadecensäuren konnten nicht getroffen werden, etwa in bezug auf die Lage der cis-Doppelbindung in Position 9 oder 7. Auch die Struktur der  $\text{C}_{16:2}$ , die mit ihrer Masse zwar kaum, aber mit ihrer hohen spezifischen Aktivität im MGD eine wichtige Rolle spielt, konnte durch GC nicht näher charakterisiert werden.



Zur Berechnung der absoluten Menge der Fs wurden die Flächen der einzelnen Komponenten auf die des internen Standards Margarinsäure ( $C_{17:0}$ ) bezogen. Molmengen wurden über die Multiplikation der absoluten Mengen mit Molfaktoren auf der Basis der Molekulargewichte der Fs bestimmt. Der Detektor-Response der einzelnen Fs wurde nicht bestimmt. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Detektor-Response für eine Komponente bei Absolutmengen größer als  $0,1 \mu\text{g}$  konstant ist (106). Während die Auswertung der Massenchromatogramme zunächst nach der Methode *Peak-Höhe x Peak-Weite auf halber Peak-Höhe* (94) mit Hilfe der programmierbaren Rechner HP 67 und HP 97 geschah, wurde auf diese Verfahren nur zurückgegriffen, wenn die programmierte Online-Auswertung des zwischenzeitlich erworbenen Integrators HP 3380 A fehlerhaft war.

Bei gleichbleibenden Geräteparametern und Gasflüssen bei der RGC stieg die Zählausbeute auf ca. 25 %, als die Stahlkapillare zwischen Verbrennungsrohr und T-Stück der Methaneinspeisung ausgetauscht wurde. Ein langsames Absinken dieser maximalen Ausbeute ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich Verbrennungsrückstände in dieser Kapillare niederschlugen.

Eine Arbeitsgruppe in Ungarn (97) bestätigte das ermittelte Plateau der Hochspannung für den gleichen Gerätetyp und demonstrierte, dass die Weite (= Elutionsdauer) des GC-Peaks keinen Einfluss auf die integrierte Impulszahl hat. Daher wurde die dem Peak zugehörige Impulszahl nicht mehr wie zuvor durch die Elutionsdauer dividiert, sondern lediglich der Background für die ausgemessene Elutionsdauer von der Impulszahl subtrahiert (siehe auch Abb. 2.10). Die errechneten cpm können leicht in absolute dpm transformiert werden, wenn die Probe Daten  $^{14}\text{C}_{17:0}$  bekannter Radioaktivität enthält; dpm einzelner Fs können aber auch bestimmt werden, wenn ein Aliquot der Probe zur LSC verwendet wird. Mit Hilfe der dort bestimmten, absoluten Aktivitätsgröße kann der prozentuale Anteil der Radioaktivität einer Komponente, ermittelt durch das Radiogaschromatogramm, in absolute Radioaktivität umgerechnet werden.

### 2.4.3 Radioaktivitätsbestimmungen

#### 2.4.3.1 Flüssigkeitszintillationszählung (LSC)

Organische Lösungsmittel mit geringem Wassergehalt wurden direkt in Szintillatorcocktail (5 g/l 2,5-Diphenyloxazol = PPO, 0,3 g/l 1,4-Bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol = DM-POPOP in Toluol), vorgelegt in 25 ml Glasszintillationsröhrchen der Firma Zinsser, Frankfurt, injiziert, und in einem Packard Instrument & Co Tricarb 3380 gezählt (Akkumulation von 10000 cpm, Standardabweichung der Einzelmessung dann 1 %, oder Abbruch der Messung nach 10 Min.). Sowohl das Lösungsmittel der Szintillatoren, Toluol, als auch das Material der Glaszählröhrchen

zeigen bei Verwendung von PPO in Toluol keine Phosphoreszenz (128). Die Proben wurden nach Abklingen der Photolumineszenz und Kühlung im Gerät über Nacht gezählt. Der Quench, verursacht durch Chlorophyll, Chloroform oder Wasser, wurde durch externe Standardisierung (128) und Eichkurven korrigiert. Ebenso wurden die Ausbeuten der kieselgelhaltigen Proben bestimmt; dabei wurde das Kieselgel nach dem Ausschaben in 5 ml MeOH durch Wirten auf dem Vortex-Gerät oder kurzes Beschallen im Ultraschallbad suspendiert und ca. 30 Min. lang extrahiert, bevor der Szintillatorcocktail (10 ml) hinzugegeben und die Probe erneut gut geschüttelt wurde. Dabei machte sich der Wassergehalt gegeben beim Ausschaben angefeuchteter DC-Fertigplatten positiv bemerkbar (s.o.). Die Aufnahme der Quenchkorrekturkurven zeigte, dass MeOH die Zählausbeute offensichtlich durch bessere Lösung der Substanzen im Szintillatorcocktail steigert (128). Dies ist insbesondere wichtig bei der Zählung kieselgelhaltiger Proben (175). Wasser kann die Ausbeute steigern, da es auch stark polare Lipide, wie z.B. lyso-Lecithin, adsorbiert an die aktiven Stellen des Kieselgels, zu ersetzen vermag (175). In diesem Zusammenhang sei bemerkt, dass die LSC stark polarer Lipide in Wasser aufnahmefähigen Szintillatormischungen wie Unisolve oder Aquasol (*colloid-counting*) erst dann in der gewünschten Weise effektiv wird, wenn der Probe Wasser beigemischt wird (175).

Wie Abb. 2.11 zeigt, liegt die Kurvenschar der  $CHCl_3$ - und MeOH-Quench-Testreihen dicht gedrängt und sie stimmt auch gut mit der der Chlorophyll- und Chlorophyll-Bleich-Testreihen (Abb. 2.12) mit Benzoylperoxid (28, 128) überein. Da in den meisten Fällen die Radioaktivität in Lösungen von  $CHCl_3/MeOH = 2/1$  zu bestimmen war, wurde die Messreihe des ( $CHCl_3/MeOH = 2/1$ )-Quenchs für eine Kurvenanpassung zugrunde gelegt. Auf der Basis dieser Quenchkorrekturkurve

$$\text{Zählausbeute in \%} = 100,61 + 17,93 \times \ln(\text{A.E.S.}^1 \text{ Ratio}),$$

$$\text{für A.E.S.} > 0,5 \text{ gilt \%} = 83 + 10 \times (\text{A.E.S. Ratio})$$

wurden alle LSC-Daten mit einem Programm für die Rechner HP 67/97 ausgewertet. Der maximale Fehler der dpm-Berechnung kann, alle Punkte der Quench-Messungen berücksichtigt,  $\pm 10 \%$  betragen, er dürfte aber für das meist gegebene Lösungsmittel  $CHCl_3/MeOH = 2/1$  sehr viel geringer sein (Abb. 2.11).

Wässrige Proben wurden mit dem Szintillator Unisolve Typ I gut gemischt, der bis zum Verhältnis 1:1 Wasser aufnehmen kann, sich dann aber stark trübt. In der Regel wurden 5 ml Unisolve mit maximal 3 ml wässriger Phase versetzt.

Die bestimmten A.E.S. Ratios der externen Standardisierung der klaren Proben waren dann, wenn keine anderen Quenchfaktoren hinzukamen, größer als 0,35. Von diesem Wert an deckt sich die aufgenommene Quench-Testreihe gut mit der oben angegebenen, universalen Quenchkorrekturkurve.

---

<sup>1</sup>atomic emission spectroscopy

Geringe Mengen Schwefelsäure färbten den Unisolve-Szintillator nicht grünlich, wie dies gewöhnlich im PPO-POPOP-Toluol-System geschieht, und führt - auch abgesehen von dieser Färbung - primär nicht zur Phosphoreszenz (128).

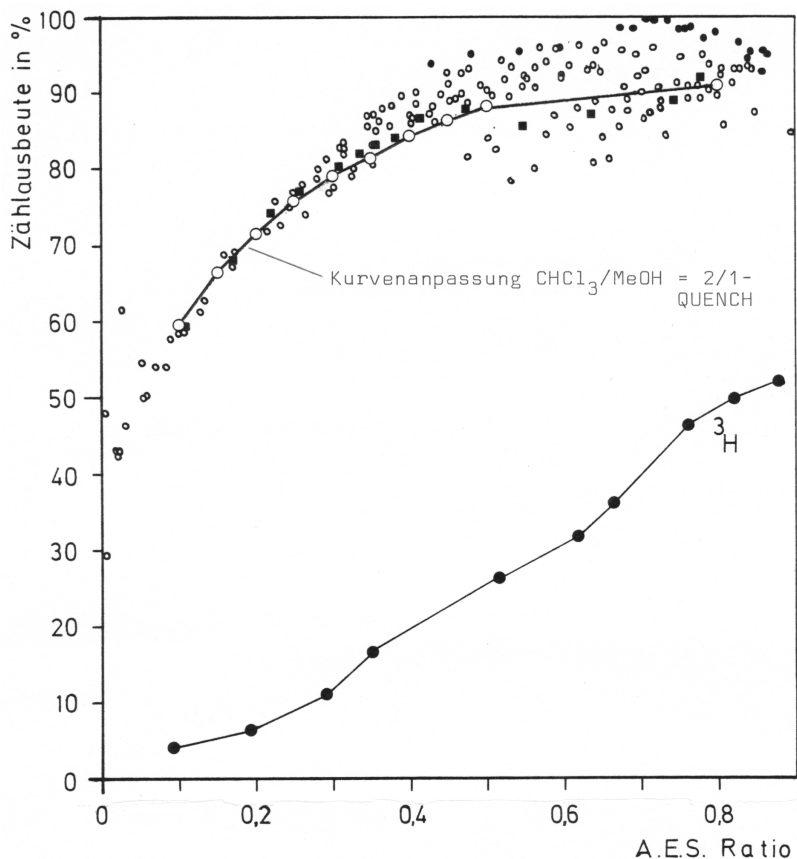
$^{35}\text{S}$  wurde im  $^{14}\text{C}$ -Kanal des Gerätes gemessen und wie oben quench korrigiert. Die erhaltenen Werte dienten als Grundlage für prozentuale Berechnungen und wurden nicht auf absolute dpm umgerechnet.

$^{32}\text{P}$  wurde im  $^{32}\text{P}$ -Kanal des Gerätes ohne externe Standardisierung im Toluol-Szintillationscocktail gemessen (128).

Zur Quench-Korrektur der Tritium-Proben (Toluol-Cocktail) diente eine Korrekturkurve (Abb. 2.11), die von Prof. Dr. E. Heinz übernommen wurde.

### 2.4.3.2 Scanning der Dünnschichtplatten, Autoradiographie

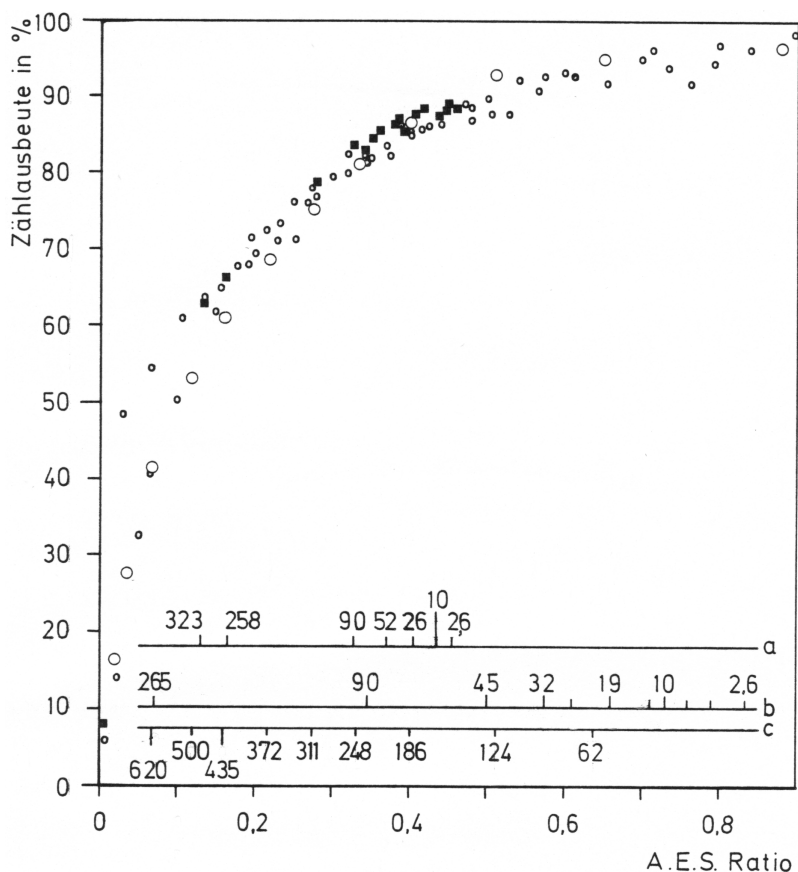
Banden radioaktiver Lipide wurden durch Scanning mit dem Perkin-Elmer Dünnschichtscanner Modell II LB 2723 der Firma Berthold oder durch Autoradiographie auf den DC-Platten lokalisiert. Dazu wurden die DC-Platten für ca. 14 Tage Röntgenpapier der Firma Agfa-Gaevert oder Kodak (Kodak Industrex Instant 620) exponiert.



**Abb. 2.11:** Flüssigkeitszintillationszählung:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -QUENCH

$^{14}\text{C}$ -Linolensäure bekannter Radioaktivität (Hersteller-Angabe) wurde so verdünnt, dass in  $10\ \mu\text{l}$  einer Standardlösung 25931 dpm enthalten waren. Daraus wurden mit einer  $10\ \mu\text{l}$ -Spritze je  $5\ \mu\text{l}$  entnommen und in Szintillationsröhrchen gespritzt (10 ml Szintillationscocktail vorgelegt, Nullwert überprüft). Der Pipettierfehler war klein:  $\bar{x} = 12316\ \text{dpm}$ ,  $s_{18} = 1,14\ \%$ .

Zu diesen Grundproben (●) wurden zunächst verschiedene Volumina MeOH pipettiert (○): 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 750  $\mu\text{l}$  sowie 1, 2, 3, 4 und 5 ml. Dann wurden durch sukzessive Zugabe von  $\text{CHCl}_3$  die  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Verhältnisse 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1,25:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1 und 3:1 erzeugt (■). Die Korrekturkurve für Tritium wurde von Prof. Dr. E. Heinz übernommen.



**Abb. 2.12:** Flüssigkeitszintillationszählung: Chlorophyll-QUENCH

a) ■ Chlorophylllösungen (2,58 - 1935  $\mu\text{g}$  Chl) wurden im Szintillationsröhrchen im  $\text{N}_2$ -Strom zur Trockene eingengt, in 0,5 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 2/1$  aufgenommen und mit 0,5 ml Benzoylperoxidlösung (0,5 % in Toluol) (28) versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurden 10 ml Szintillationscocktail und 5  $\mu\text{l}$  der radioaktiven Standardlösung (Abb. 2.11) hinzu pipettiert.

b) ○ Zu den Grundproben (s. Abb. 2.11) wurden zunächst 2-100  $\mu\text{l}$  Chlorophylllösung mit 2,58  $\mu\text{g}$  Chl/2  $\mu\text{l}$ , dann sukzessive bestimmte Volumina  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 2/1$  pipettiert.

c) ○ Die wie unter a) hergestellten, eingengten Chlorophyllproben wurden nicht in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , sondern direkt in Benzoylperoxidlösung aufgenommen und nach Bleichung mit Szintillatorlösung und radioaktivem Standard versehen.

### 2.4.4 Massenspektroskopie

Die massenspektroskopischen Analysen der acetylierten Lipidkomponenten wurden wie zuvor beschrieben (147,169,183) von Dr. M. Linscheid, Institut für Organische Chemie der Universität Köln, mit einem Massenspektrometer Varian-MAT 731 durchgeführt.

Obwohl bei den vorangegangenen Analysen stets mehrere Spektren während der Verdampfung der direkt injizierten Proben aufgenommen und gemittelt wurden, wies die Berechnung der quantitativen Fettsäurezusammensetzungen der Proben im Vergleich zur GC-Analyse große Differenzen aus; dies gab Anlass zu einer detaillierten Studie des Verdampfungsverhaltens eines Gemisches aus verschiedenen Lipidspezies. Dazu wurden ein Gemisch aus vier über präparative  $AgNO_3$ -DC (158) isolierten und gereinigten MGD-Spezies und eines aus zwei ebenso präparierten DGD-Spezies in das Gerät eingespritzt und die Intensitäten der relevanten Diglyceridfragmentationen während der Heizperiode zur Verdampfung der Probe in kürzest möglichen Abständen registriert.

Hexadecensäuremethylester ( $C_{16:1}$  aus PG des Spinats,  $C_{16:1}$  aus PG des Envelopes des Spinats, käufliche cis-9- $C_{16:1}$ ) wurden durch chemische Ionisation mit dem Reaktionsgas NO nach vorgeschalteter GC auf einer FFAP-Kapillarsäule untersucht (GLC-CIMS). Das Fragmentierungsmuster lässt nicht nur die Lokalisation der Doppelbindung zu, sondern die Intensität der verschiedenen Fragmente weist auch auf ihre Stereoisomerie hin (25). Danach sollte dem Massenspektrum des Hexadecensäuremethylesters aus PG des Envelope die Struktur der 3-trans- $C_{16:1}$  zugrunde liegen.

## 2.5 Qualitative Bestimmung der Lipide

Die Identität der einzelnen Komponenten der Lipidextrakte wurde ermittelt durch:

- Chromatographie und Rechromatographie in verschiedenen Laufmittelsystemen und Vergleich der  $R_f$ -Werte mit den aus der Literatur bekannten (Review 99, s. auch Abb. 2.9, S. 45)
- Cochromatographie bekannter Lipide, die als Referenzsubstanzen isoliert oder synthetisiert wurden
- Chromatographie von Abbauprodukten oder Derivaten einer Komponente
- Charakteristische Farbreaktionen (s. Tab. 2.5)
- Massenspektroskopische Untersuchungen

**Tab. 2.4:** Fettsäurezusammensetzung in Mol-% des PE, PG und der Acylierungsprodukte APE und BPA

PE bzw. PG wurden mit Palmitoleoyl- bzw. Oleoylchlorid umgesetzt, die Reaktionsprodukte durch präparative DC gereinigt.

|                      | C <sub>16:0</sub> | C <sub>16:1</sub> | C <sub>18:0</sub> | C <sub>18:1</sub> | C <sub>18:2</sub> | C <sub>18:3</sub> |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| eingesetztes PE      | 34,5              | 0                 | 3,6               | 7,8               | 52,3              | 4,8               |
| synthetisiertes APE  | 26,1              | 22,5              | 2,5               | 6,7               | 38,7              | 3,5               |
| berechnetes Soll APE | 21,0              | 33,3              | 2,4               | 5,2               | 34,9              | 3,2               |
| eingesetztes PG      | 22,7              | 33,0              | 1,6               | 2,7               | 12,4              | 27,7              |
| synthetisiertes BPA  | 12,2              | 14,3              | 2,8               | 52,7              | 6,2               | 11,8              |
| berechnetes Soll BPA | 11,3              | 16,5              | 0,8               | 51,3              | 6,2               | 13,8              |

### 2.5.1 Phosphatidylmethanol (PM)

In den Extrakten nicht gefriergetrockneter Gewebekulturen des Tabaks trat ein unbekanntes Lipid in großen Mengen auf, das in Lipidextrakten gefriergetrockneter Kulturen nicht vorkam. Dem  $R_f$ -Wert zufolge war es wenig polarer als MGD, zeigte positive Reaktion mit Ammoniummolybdat-Schwefelsäure, aber keine mit Ninhydrin und  $\alpha$ -Naphthol-Sprühareagenz. Aufgrund dieser Daten (insbesondere auch der  $R_f$ -Werte (111, 180)) konnte man vermuten, dass es sich um BPA handeln konnte, das als Artefakt einer intermolekularen Umesterung bekannt ist (24), aber auch in heterotrophen Zellkulturen vorkommen sollte (164) ebenso wie APE, oder möglicherweise auch um Mono- oder Dimethyl-PE (108) als Vorläufer in der Biosynthese des PC. Die Cochromatographie mit den beiden semisynthetischen Phospholipiden BPA und APE bestätigten dies jedoch nicht. Dazu wurden PE und PG mit Palmitoleoyl- bzw. Oleoylchlorid (32) umgesetzt; die gereinigten Produkte wiesen die theoretisch zu erwartende Fettsäurezusammensetzung auf (Tab. 2.4).

Das unbekannte Lipid chromatographierte aber identisch mit Phosphatidylmethanol, das aus PC in methanolischem Puffersystem mit Phospholipase D hergestellt wurde (30, 125). Möglicherweise entstand PM als Artefakt während der Extraktion durch eine Phospholipase D-katalysierte Transphosphatidylierung (37, 181) zwischen Phospholipiden und dem MeOH des Extraktionsmittels, da Enzymaktivitäten bei den gegebenen Extraktionsbedingungen der Gewebekulturen unzureichend abgestoppt wurden. Bei der Extraktion der gefriergetrockneten Gewebe trat dieser Artefakt jedoch nicht auf.

### 2.5.2 Acyliertes Digalaktosyldiglycerid (ADGD)

In Lipidextrakten der isolierten Envelopes konnte ein in beträchtlichen Mengen vorkommendes, acyliertes Galaktolipid identifiziert werden, welches im gewöhnlichen

**Tab. 2.5:** Sprühreagenzien für die DC

| Sprühreagenz                                                    | Detektiertes Lipid                      |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Ammoniummolybdat-Perchlorsäure<br>(Hanes-Reagenz) (114)         | Phosphorsäureester<br>(Zuckerphosphate) |
| $\alpha$ -Naphthol (7)                                          | Glykolipide                             |
| Natriummetaperjodat-Benzidin (114)                              | $\alpha$ -Diolgruppierungen             |
| Ammoniummolybdat-Schwefelsäure (Dittmer u.<br>Lester, 1964) (7) | Phospholipide                           |
| Ninhydrin (7)                                                   | Aminolipide                             |
| 50 % Schwefelsäure (Veraschen) (7)                              | Lipide                                  |
| Anilinnaphthalinsulfonsäure, 0,2 % in MeOH, UV<br>320 nm        | Lipide                                  |
| Dichlorfluorescein, 0,2 % in Äthanol, UV 320 nm                 | Glykolipide                             |

LM 1 auf oder nahe bei MGD chromatographiert. Eine gute Trennung von MGD war mit LM 2 gewährleistet. Das Spaltprodukt der alkalischen Hydrolyse hatte den gleichen  $R_f$ -Wert in LM 28 wie das des ADGD (78) und die massenspektroskopische Analyse des acetylierten Lipids (s.u.) bestätigte die Struktur des ADGD.

Durch Vergleich des chromatographischen Verhaltens mit AGM und AGD (69, 70, 80, 31) und Massenspektroskopie wurde ebenso AGD im Lipidgemisch des isolierten Envelope erkannt.

### 2.5.3 Präparation der Envelope-Lipide für die Massenspektroskopie (MS)

Folgende, aus dem Lipidextrakt der Envelope-Suspensionen isolierte, derivatisierte und gereinigte Lipide wurden massenspektroskopisch analysiert und in ihrer Identität bestätigt:

DG, TG, MGD, AGD, DGD, ADGD, TGD, TeGD, SQD, PG, PC, SG.

Dazu wurden die Glykolipide MGD, AGD, DGD, TGD, TeGD, ADGD, SG und SQD acetyliert, methyliert wie zuvor beschrieben (169) und durch DC in LM 10 (acetyliertes TGD und TeGD in LM 11) gereinigt. Die Banden der einzelnen Komponenten, nach Ansprühen der DC-Platten mit Dichlorfluoresceinlösung im UV-Licht sichtbar gemacht, wurden in MeOH ausgeschabt, kurz beschallt, mit Petroläther extrahiert und gegen Wasser ausgeschüttelt (Petroläther/MeOH/Wasser = 4/2/2). Die Dichlorfluorescein-haltigen, wässrigen Phasen wurden abgezogen, die organischen Phasen mit  $Na_2SO_4$  getrocknet und im  $N_2$ -Strom eingeengt. Die Banden des acetylierten TGD und TeGD wurden jedoch durch Ansprühen mit ANS sichtbar



**Tab. 2.6:**  $R_f$ -Werte von 11 isolierten MGD-Spezies bei der  $\text{AgNO}_3$ -DC in LM 19 und ihr molarer Anteil in % in den beiden Lösungen, die für die Inkubation des Protein-Aceton-Pulvers aus Blättern der Erbse und des Spinats verwendet wurden

Die  $R_f$ -Werte sind Mittelwerte aus drei  $\text{AgNO}_3$ -DC, bezogen auf  $R_f$  des 18:0/18:0-MGD = 1. Mol-% wurde bestimmt durch GC der Fsmc der Einzelkomponenten vor der Vereinigung.

| MGD-Spezies | $R_f$ | Mol-% |      |
|-------------|-------|-------|------|
|             |       | A 11  | B 4  |
| 18:0 18:0   | 1     | 9,2   |      |
| 16:0 18:2   | 0,88  | 16,2  |      |
| 16:1 18:1   | 0,86  | 13,7  | 34,7 |
| 16:1 18:2   | 0,77  | 3,0   |      |
| 16:0 18:3   | 0,73  | 20,1  | 15,6 |
| 18:2 18:2   | 0,70  | 7,3   |      |
| 16:1 18:3   | 0,54  | 1,3   |      |
| 18:2 18:3   | 0,45  | 8,8   | 17,7 |
| 16:2 18:3   | 0,35  | 5,3   |      |
| 18:3 18:3   | 0,26  | 6,5   | 33,1 |
| 16:3 18:3   | 0,21  | 8,5   |      |

gemacht, in vorgelegtes  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 2/1$  ausgeschabt, beschallt und gegen NaCl-Lösung ausgeschüttelt (s.o.).

Eine Hydrolyse der Phospholipide PC und PG mit Phospholipase C (125) setzte zunächst deren Diglycerid-Anteile frei, die acetyliert wurden. Dabei wurden die Produkte der Hydrolyse und Derivatisierung gereinigt durch DC in LM 6 = 12, sichtbar gemacht und extrahiert, wie oben beschrieben.

Die für die Massenspektroskopie präparierten Lipide wurden bei Raumtemperatur an der Vakuumpumpe getrocknet und in Petroläther gelöst, der über einem Molekularsieb aufbewahrt wurde.

Acetyliertes TGD und TeGD wurden in wasserfreiem  $\text{CHCl}_3/\text{Petroläther} = 1/1$  aufgenommen.

Die dem chromatographischen Verhalten nach als PI angesprochene Komponente "U" ließ sich nicht wie die genannten Phospholipide mit Phospholipase C spalten und daher nicht in der beschriebenen Form für die Massenspektroskopie derivatisieren. Das mit Ammoniummolybdat-Schwefelsäure positiv reagierende Lipid wurde ebenso nicht von Lipase und Phospholipase  $A_2$  umgesetzt, enthielt aber Fettsäuren, die als Produkt der Methanolyse gaschromatographisch analysiert wurden. Die Massenspektroskopie (Felddesorption) deutete an, dass "U" keinen Zuckeralkohol enthält. Die vergleichende Analyse eines tierischen PI<sup>2</sup>, das als solches in seiner

<sup>2</sup>Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Debuch, Universität Köln.

Struktur bestätigt wurde, zeigte, dass dieser Befund kein Artefakt der Analysetechnik ist.

### 2.5.4 MGD- und DGD-Referenzspezies

Als Referenzen für die  $AgNO_3$ -dünnschichtchromatographische Auftrennung des MGD nach Zahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren und deren Kettenlängen wurden 11 verschiedene MGD-Spezies durch präparative  $AgNO_3$ -DC (157) isoliert und ihre Reinheit durch GC-Analyse ihrer Fsme überprüft. Die Präparation ging von den natürlichen MGD-Gemischen aus *Anabaena* und *Cycas* aus.

Die gereinigten Spezies wurden zu Gemischen aus 11 und 4 Komponenten vereinigt, wie in Tab. 2.6 gekennzeichnet. Mit einem Protein-Aceton-Pulver aus Blättern der Erbse (157) wurde das 4er MGD-Gemisch mit UDP- $(^{14}C)$ Gal inkubiert; die so radioaktiv markierten DGD-Spezies dienten ihrerseits als Referenz bei der  $AgNO_3$ -DC des DGD.

Die beiden MGD-Spezies-Gemische wurden ebenfalls eingesetzt, um die Spezifität der Galaktosyltransferase in Aceton-Pulvern aus Blättern der Erbse und des Spinats zu testen.

## 2.6 Quantitative Bestimmung der Lipide

### 2.6.1 Quantitative Bestimmung der Lipide des isolierten Envelope

Ca. 20 % des Lipidextraktes (122,6 mg) der Envelope-Suspension (2.1.4 s.v.) wurden für die quantitative Bestimmung der Lipide und ihrer Fettsäuren eingesetzt.

Die Basis der Bestimmung war die GC-Analyse der Fsme des totalen Lipidextraktes (155) und der einzelnen Acyllipide mit dem internen Standard Margarinsäure ( $C_{17:0}$ ). Sie wurde vor der Methanolyse der Proben in Sovirel-Zentrifugenröhrchen (mit Teflon- Schraubverschluss, bei 80° C, 1 - 2 h, 1 N methanolische Schwefelsäure) zugefügt. Die eingesetzte Menge orientierte sich daran, dass  $6,25 \mu g \simeq 23$  nmol  $C_{17:0}$  unter den gegebenen GC-Bedingungen bei einer Empfindlichkeitseinstellung von  $100 \times 8$  (Range  $\times$  Attenuation, bzw.  $10 \times 8$  bei eingebautem Splitter, RGC) einen ca. 9 cm hohen Peak erzeugten. Bei fünf voneinander unabhängigen, quantitativen Bestimmungen des MGD aus grünen Gewebekulturen (DC in LM 2, Ausschaben der Banden in methanolische Schwefelsäure, Umestern inkl.  $14,25 \mu g$   $C_{17:0}$ , GC der Fsme) betrug die Standardabweichung des Mittelwertes 3,3 % vom Mittelwert (nmol/mg Totallipid).

Spezifische Radioaktivitäten wurden bestimmt, indem entweder

| Zones separated<br>by first TLC run in 1 | R <sub>f</sub> -<br>value | Components<br>present                   | Rechromato-<br>graphy in |
|------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| 1                                        | 0,90                      | DG,TG,<br>AGD,<br>pigments              | 6<br>7                   |
| 2                                        | 0,84<br>0,83              | MGD<br>ADGD                             | 2                        |
| 3                                        | 0,70<br>0,66<br>0,61      | SG,<br>traces of<br>2 unknown<br>lipids | 2                        |
| 4                                        | 0,52                      | DGD,<br>trace of<br>PE                  | 3<br>or<br>4             |
| 5                                        | 0,38                      | SQD<br>PG                               | 4                        |
| 6                                        | 0,26<br>0,22              | TGD<br>PC                               | 4                        |
| 7                                        | 0,10                      | TeGD                                    | —                        |
| 8                                        | 0,05                      |                                         | —                        |
| start                                    |                           |                                         |                          |

**Abb. 2.13:** DC-Separierung einzelner Lipidkomponenten

(a) ein definiertes Volumen radioaktiver  $C_{17:0}$  bekannter spezifischer Aktivität vor der Methanolyse der Probe zugesetzt wurde,

(b) mit der zu untersuchenden Fsme-Probe ein definiertes Volumen  $^{14}C_{17:0}$  in den RGC injiziert wurde oder

(c) in einem Aliquot der zu analysierenden Fsme die Radioaktivität durch LSC ermittelt wurde.

Vier Aliquote des Lipidextraktes (2.1.4) (3 - 5 mg) wurden nach folgendem Schema (Abb. 2.13) in die einzelnen Lipidkomponenten aufgetrennt, nach dem auch die Lipide für die Massenspektroskopie und die Positionsanalyse präpariert wurden.

Nach DC in LM 1 wurden nach Ansprühen der Platten mit ANS im UV-Licht acht Fraktionen sichtbar, die wie oben beschrieben aus dem Kieselgel extrahiert und in anderen LM chromatographiert wurden, wenn zwei oder mehr Komponenten enthalten waren. In diesem Falle wurde ein Aliquot der Fraktion vor der weiteren Aufarbeitung mit internem Standard methanolysiert und GC-analysiert.

Mit der Analyse der gereinigten, einzelnen Lipide konnte über deren prozentuale Anteile von der Fraktion und den Bezug auf die absolute Menge der Fraktion die absolute Menge der Komponenten berechnet werden. Dabei wurde ein gleich hoher Verlust für die verschiedenen Lipide bei der zweiten Chromatographie angenommen.

Unmittelbar nach der Extraktion der Envelope-Suspension war ein Aliquot des gewaschenen Extraktes in LM 7 chromatographiert worden. Die Banden der Pigmente wurden in MeOH/ $H_2O$  = 5/1 ausgeschabt und nach Zugabe von 5 ml  $CHCl_3$  kräftig geschüttelt. Das Kieselgel wurde abzentrifugiert und nach Abpipettieren des Überstandes erneut extrahiert; die vereinigten organischen Phasen wurden im  $N_2$ -Strom eingengt, in 0,5 ml Lösungsmittel aufgenommen, und die Extinktion der Lösungen wurde bei  $\lambda_i$  gemessen (87):

| Pigment             | Lösungsmittel | $\lambda_i$ (nm) | $\varepsilon_i$ (1/g × cm) |
|---------------------|---------------|------------------|----------------------------|
| $\beta$ -Carotin    | Hexan         | 450              | 250,5                      |
| Lutein + Zeaxanthin | Äthanol       | 447              | 255,0                      |
| Violaxanthin        | Äthanol       | 441              | 225,0                      |
| Neoxanthin          | Äthanol       | 438              | 227,0                      |

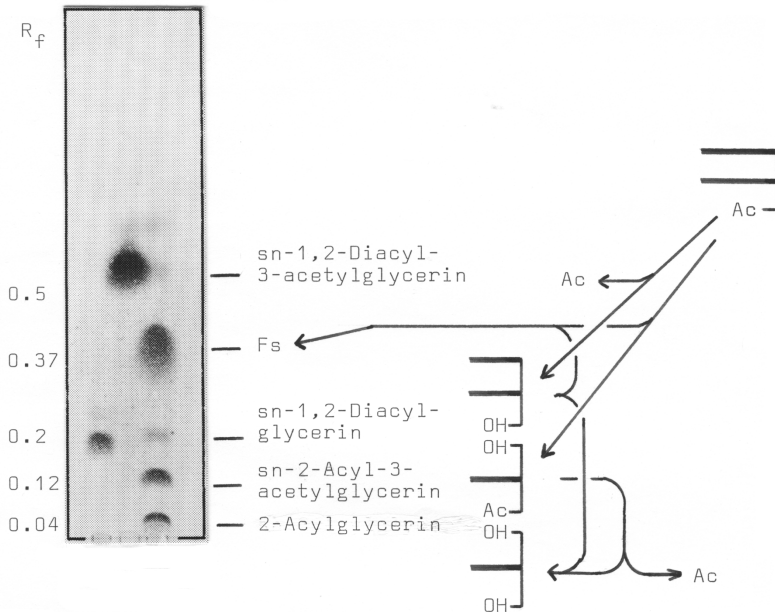
### 2.6.2 Quantitative Bestimmung der Lipide in Extrakten der Tabakblätter, der Gewebekulturen des Tabaks und anderer Lipidextrakte

Die quantitativen Bestimmungen der Acyllipide in anderen Lipidextrakten, z. B. denen der Thylakoid- oder Chloroplasten-Fractionen, orientierten sich am oben geschilderten Verfahren.

Die Analyse der Lipide des Tabaks ging jedoch von der DC-Fraktionierung in LM 3 aus (Kieselgel, H-Platten,  $5 \times 20$  cm). Wenn in diesem LM keine optimale Trennung erreicht wurde (kritische Paare SQD - PG, PG - PE), wurden wie oben die Komponenten gemeinsam ausgeschabt, Aliquote der Kieselgelextrakte GC analysiert, und die Reste wurden in LM 4 in einem zweiten chromatographischen Schritt in die einzelnen Acyllipide aufgetrennt.

### 2.6.3 Chlorophyllbestimmung

Es wurde die Extinktion 80 %iger Acetonlösungen bei 652 nm gemessen (23). Der Gehalt an Chlorophyll a und b in  $\mu\text{g/ml}$  80 % Aceton errechnet sich bei einer Schichtdicke der Kuvette von 1 cm nach der Formel ( $E_{652} \times 1000$ )/36.



**Abb. 2.14:** Lipasespaltung des acetylierten Diacylglycerins und DC der Hydrolyseprodukte in LM 13

## 2.7 Positionsanalyse

Die positionsspezifische Verteilung der Fettsäuren in den Glyco- und Phospholipiden wurde wie zuvor beschrieben (47,125,147,155) durch Hydrolyse des Lipids mit Lipase (*Rhizopus arrhizus*) untersucht. Die Lipase-Assays (0,5 ml) wurden mit 4 ml  $CHCl_3/MeOH = 2/1$  gestoppt und mit 0,5 ml essigsaurer NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die wässrige Phase schlierenfrei war (u. U. 1 Min. bei 20 % Drehzahl auf der Hettich-Rotixa/K-Zentrifuge zentrifugieren). Ein Grund für die häufig geringen Ausbeuten an freien Fettsäuren könnte sein, dass Triton X-100 die freien Säuren in der wässrigen Phase emulgiert. Während die Lyso-Verbindungen mit  $R_f$ -Werten von 0,3 - 0,7 in den angegebenen LM (Tab. 2.3, S. 43) in methanolische Schwefelsäure ausgeschabt und die Fsme nach Umesterung und Extraktion direkt GC-analysiert werden konnten, zeigten die Fs ähnliches chromatographisches Verhalten wie Triton (außer in LM 13); sie mussten daher nach

## 2. Methoden

**Tab. 2.7:** Fettsäurezusammensetzung (in Mol-%) des PC, des aus PC präparierten, acetylierten DG und deren Lyso-Verbindungen

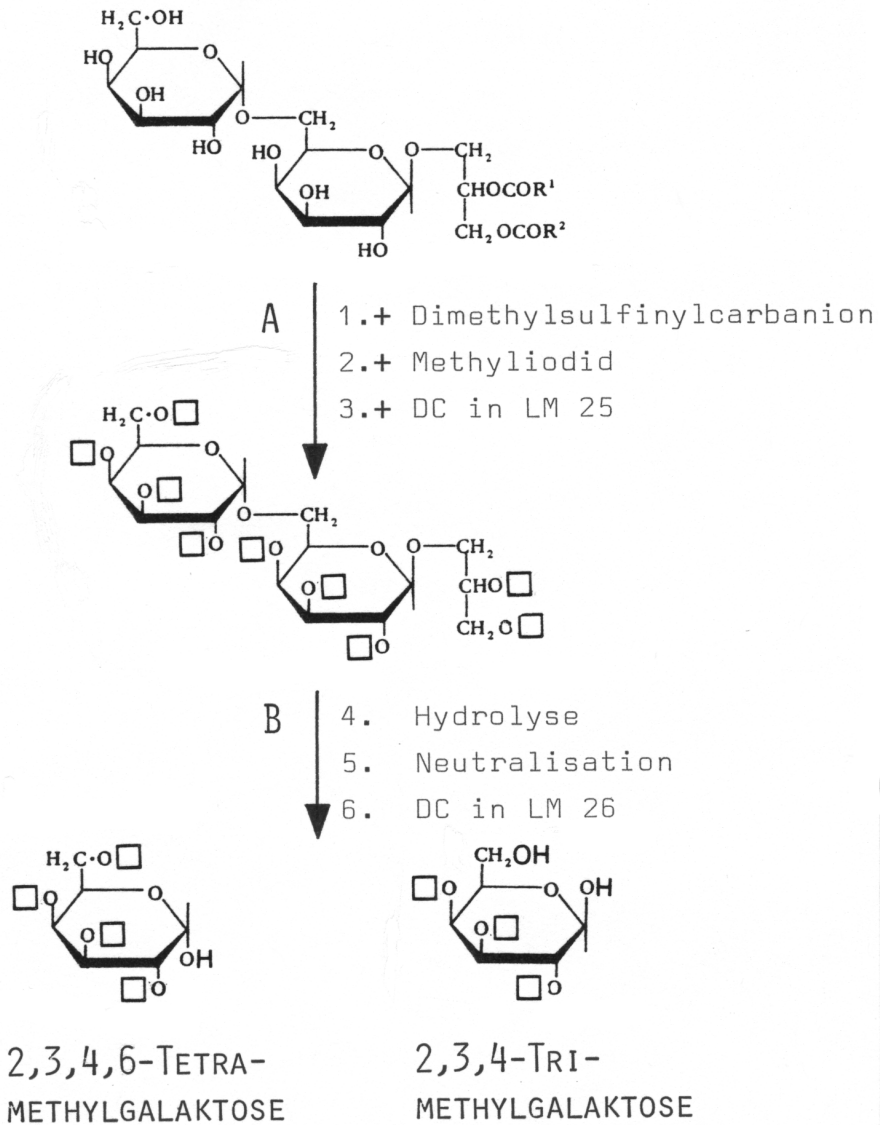
Mol-% der  $C_{16:1}$  stets kleiner als 1,3 %. Der prozentuale Anteil der Fs in der C-2-Position wurde auf der Basis der Lyso-Verbindungen berechnet.

|                                | $C_{16:0}$ | $C_{18:0}$ | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| PC                             | 16,2       | 3,5        | 13,5       | 62,3       | 4,5        |
| Lipase-Hydrolyse               |            |            |            |            |            |
| 1-lyso-PC                      | 3,1        | 0,4        | 13,8       | 77,7       | 5,0        |
| Fs C-1-Position                | 24,7       | 8,1        | 13,9       | 49,4       | 3,8        |
| % der Fs an C-2                | 9,6        | 5,7        | 51,1       | 62,4       | 55,8       |
| Phospholipase $A_2$ -Hydrolyse |            |            |            |            |            |
| Fs C-2-Position                | 3,7        | 0,9        | 14,7       | 75,8       | 4,9        |
| 2-lyso-PC                      | 25,1       | 6,6        | 12,6       | 51,8       | 3,9        |
| % der Fs an C-2                | 11,4       | 5,7        | 53,3       | 58,4       | 56,7       |
| acetyliertes 1,2-DG            | 17,2       | 4,2        | 14,4       | 59,0       | 4,1        |
| 2-Acylglycerin                 | 4,1        | 0,8        | 15,6       | 74,5       | 4,5        |
| % der Fs an C-2                | 13,4       | 6,0        | 55,6       | 62,7       | 61,0       |
| 2-Acyl-3-acetyllycerin         | 4,6        | 0,5        | 16,0       | 74,0       | 5,0        |
| Fs C-1-Position                | 28,3       | 6,6        | 13,5       | 47,3       | 3,0        |
| % der Fs an C-2                | 11,9       | 9,5        | 54,2       | 63,1       | 54,9       |

Umesterung dieser Fraktion dünnschichtchromatographisch von Verunreinigungen befreit werden (LM 9).

Der Hydrolyseansatz des TGD wurde ebenfalls mit  $CHCl_3$ /MeOH abgestoppt, aber nicht mit NaCl-Lösung gewaschen, sondern nach Zugabe von Isopropanol insgesamt eingeeengt, in MeOH aufgelöst und auf DC-Platten aufgetragen. Dieses Verfahren, auch bei Lipase-Hydrolyse anderer Lipide angewendet, führte zu besseren Ausbeuten in Bezug auf die abgespaltenen, freien Fs.

Der folgende Versuch demonstriert, dass die Lipase ebenfalls spezifisch die Fettsäureester der primären Hydroxylgruppe des sn-1,2-Diacyl-3-acetyllycerins umsetzt und die Hydrolyseprodukte stabil sind. Eine Probe PC wurde drei verschiedenen Hydrolysen unterworfen:



**Abb. 2.15:** Methylierung und Hydrolyse des DGD (Schematisch),  $\square$  = Methylrest

In den ersten beiden spalteten Lipase und Phospholipase  $A_2$  Fettsäureglycerines-ter des Lipids. Die Lyso-Verbindungen und abgespaltenen Fettsäuren wurden isoliert, GC-analysiert und der GC-Analyse der Fsme des intakten Lipids gegenübergestellt.

In der dritten Hydrolyse mit Phospholipase C wurde der Diglyceridbaustein des PC freigesetzt, der dünnschichtchromatographisch in LM 6 gereinigt wurde. Die DC zeigte, dass nur 1,2-Diacylglycerin entstanden war. Das isolierte 1,2-DG wurde acetyliert, im gleichen LM erneut gereinigt und seinerseits mit Lipase hydrolysiert (Abb. 2.14). Zuvor wurde ein Aliquot methanolysiert. Die Ergebnisse der Analysen listet Tab. 2.7 auf.

## 2.8 Methylierungsanalyse

Nach Methylierung und Hydrolyse der höheren Galaktolipide ist es möglich, innere und äußere Zucker dünnschichtchromatographisch zu trennen (Abb. 2.15).

Die durchgeführten Analysen der bei in vivo und in vitro Inkubationen radioaktiv markierten Gl folgten dem Verfahren von Hakamori und Fischer, das ausführlich beschrieben worden ist (122, 187, 188).

Die permethylierten Galaktosylglycerine wurden dünnschichtchromatographisch gereinigt (LM 25), extrahiert und eingeeengt wie beschrieben, und zur Hydrolyse über Nacht (80 °C, 0,3 ml 0,5N  $H_2SO_4$ , in 90 % AcOH) aufgenommen; nach Zugabe von 0,3 ml Wasser wurden die Proben für weitere 5 h auf 80 °C erhitzt, danach mit 1 ml MeOH über Anionenaustauscher in Acetat-Form gefiltert, der in eine 2 ml-Pasteur-Pipette eingeschlämmt war. Der Austauscher wurde mit  $3 \times 2$  ml MeOH, 2 ml  $CHCl_3$ /MeOH = 2/1 gespült, und der Extrakt wurde im  $N_2$ -Strom eingeeengt. Die Hydrolyseprodukte, 2,3,4,6-Tetra- und 2,3,4-Trimethylgalaktose, wurden in LM 26 chromatographiert, die Banden wurden durch Scanning und Autoradiographie sichtbar gemacht und zur LSC ausgeschabt.

## 2.9 Acylierung und Galaktosylierung des MGD-Äther-Analogs

Ein Aceton-Protein-Pulver aus Blättern der Erbse (Galaktosyltransferase) und eine Proteinfraction aus Blättern der Saubohne (AGD-bildendes Enzym) wurden mit den von Prof. Dr. E. Heinz und Frl. K. Wrage synthetisierten MGD-Äther-Analoga (79)

1,2-Di-O-octadec-9'-enyl-3-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-sn-glycerin

=  $C_{18:1}/C_{18:1}$ -MGD-Äther-Analogon,

1-O-Octadec-9'-enyl-2-O-hexdec-9'-enyl-3-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-sn-glycerin

=  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD-Äther-Analogon und

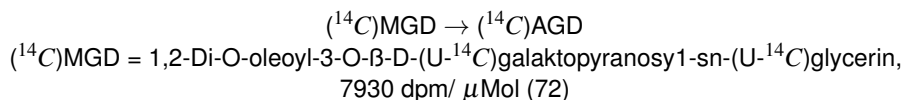


synthetischem Digalaktosyl-(9,10-<sup>3</sup>H)dioleoylglycerin  
 = (<sup>3</sup>H)DGD,  $1,07 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ Mol (72),  
 synthetischem C<sub>18:1</sub>/C<sub>16:1</sub>-DGD (71) und  
 mit UDP-(<sup>14</sup>C)Gal inkubiert.

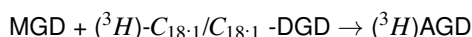
### 2.9.1 Acylierung

Durch Inkubation mit den bereits zuvor verwendeten Substraten wurde zunächst die aus jungen Blättern von *Vicia faba* isolierte Proteinfraction (34) in den folgenden Reaktionen (72, 76) charakterisiert:

#### a) Dismutation



#### b) Acyltransfer

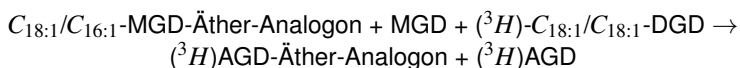


Dann wurde das C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:1</sub>-MGD-Äther-Analogon anstelle des natürlichen MGD eingesetzt, bzw. in Gemisch mit diesem.

#### c) Acyltransfer



#### d) Acyltransfer



Die benötigten, radioaktiven und natürlichen Substrate sowie das Äther-Analogon wurden eingeeengt, mit 0,75 ml 20 mM Na-Desoxycholat-Puffer pH 7,3 versetzt, beschallt und nach Zugabe von 0,75 ml Wasser nochmals beschallt, so dass die folgenden Substrat-Suspensionen zur Verfügung standen:

- a) 11 mg (<sup>14</sup>C)MGD/1,5 ml Puffer
- b) 6 mg MGD, 8 mg (<sup>3</sup>H)-C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:1</sub>-DGD/1,5 ml Puffer
- c) 6 mg C<sub>18:1</sub>/C<sub>16:1</sub>-MGD-Äther-Analogon, 8 mg (<sup>3</sup>H)-C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:1</sub>-DGD/1,5 ml Puffer
- d) 6 mg C<sub>18:1</sub>/C<sub>16:1</sub>-MGD-Äther-Analogon, 6 mg MGD, 12 mg (<sup>3</sup>H)DGD/1,5 ml Puffer
- e) 8 mg (<sup>3</sup>H)DGD/1,5 ml Puffer (Blindwert)

## 2. Methoden

---

In 20  $\mu\text{l}$  dieser Suspensionen sind

a) 21 522, b) 97 381, c) 100 461, d) 266 769 und e) 101 571 dpm enthalten. Aus den Ansätzen

110  $\mu\text{l}$  Acetat-Puffer, 1 M, pH 5,3,

110  $\mu\text{l}$  Proteinsuspension in 10 mM Phosphat-Puffer, pH 6,7, 50 mM Thioharnstoff, Start der Reaktion mit 110  $\mu\text{l}$  Substrat-Suspension,

wurden nach 2, 4, 6, 8 und 10 Min. 60  $\mu\text{l}$  entnommen und in 60  $\mu\text{l}$  vorgelegte 1 M Tris-Base injiziert. Die Suspensionen wurden extrahiert und die Extrakte, mit AGD und MGD geträgert, auf DC-Platten zur DC in LM 7 aufgetragen. Die Banden des AGD bzw. dessen Äther-Analoga wurden nach Ansprühen mit ANS im UV-Licht sichtbar gemacht und in Szintillationsröhrchen (5 ml MeOH vorgelegt) ausgeschabt.

Die restliche Proteinlösung wurde durch ca. 2-fache Verdünnung auf 6 ml Volumen mit Puffer aufgefüllt und mit 6 ml Acetat-Puffer (s. o.) und 6 ml Substrat-Suspension (ca. 32 mg  $C_{16:1}/C_{16:1}$ -DGD + 24 mg  $C_{18:1}/C_{18:1}$ -MGD-Äther-Analogen) bei Zimmertemperatur im Scheidetrichter inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch präparative DC gereinigt, acetyliert, erneut durch DC in LM 10 gereinigt und wie für MGD beschrieben für die Massenspektroskopie präpariert.

### 2.9.2 Galaktosylierung

Der für die Galaktosylierung des natürlichen MGD mit Aceton-Pulver aus Blättern der Erbse (s.u.) optimierte Testansatz (157,158) wurde übernommen.

Die Substrat-Suspensionen (je 1 mg Lipid in 100  $\mu\text{l}$  0,1 M MES-Puffer pH 6,0, 30 % Glycerin, 0,9 % Triton X-100)

a)  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD (isoliert durch präparative AgNO<sub>3</sub>-DC),

b)  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD-Äther-Analogen,

c)  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD +  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD-Äther-Analogen

wurden durch Beschallen des eingeengten Lipids in Puffer hergestellt (157) und für folgende Inkubationen (30 °C) verwendet:

160  $\mu\text{l}$  Aceton-Pulver-Suspension (9,1 mg Prot./ml),

+ 40  $\mu\text{l}$  Substratsuspension a), b), c), oder keine Zugabe (d),

+ 61 600 dpm UDP-(<sup>14</sup>C)Gal.

Aliquote von 20  $\mu\text{l}$  nach 2, 4, 7, 10, 15, 20 und 30 Min., im Falle der Blindprobe (d) nach 20 sec., 2, 10, 15 und 30 Min. entnommen, wurden in 4 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  = 2/1 gespritzt, mit NaCl-Lösung ausgeschüttelt und zur besseren Phasentrennung niedrigtourig zentrifugiert. In den Fällen a), b) und d) wurde die organische Unterphase in Szintillationsröhrchen übergeführt, eingeengt, in 200  $\mu\text{l}$  MeOH aufgenommen und mit Szintillationscocktail versehen im Tricarb gezählt. Im Falle c) wurde so nur mit der Hälfte der organischen Phase verfahren, das andere Aliquot wurde eingeengt, mit Natriummethylatlösung versetzt (30 Min., Erwärmen), dann nach Zugabe von

$CHCl_3$ /MeOH gegen NaCl-Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase wurde wie oben zur LSC vorbereitet.

## 2.10 Aceton-Pulver

Aus den ersten, gerade entfalteten Folgeblättern der Erbse und aus jungen Blättern des Spinats wurden nach der Methode von M. Siebertz (157) Aceton-Pulver hergestellt.

Die bei 2.5.4 genannten MGD-Spezies-Gemische wurden suspendiert (1 mg/100  $\mu$ l Puffer, s. 2.9.2) und für folgende Assays eingesetzt (30°C, 30 Min.):

240  $\mu$ l Suspension + 60  $\mu$ l MGD-Suspension + 25  $\mu$ l UDP-( $^{14}C$ )Gal  $\simeq$  0.5  $\mu$ Ci

a) Erbsen-Aceton-Pulver + MGD-Gemisch A 11

b) Erbsen-Aceton-Pulver + MGD-Gemisch B 4

c) Spinat-Aceton-Pulver + MGD-Gemisch A 11

d) Spinat-Aceton-Pulver + MGD-Gemisch B 4

( $^{14}C$ )-Einlagerung in DGD als Prozentsatz der angebotenen Radioaktivität der UDP-( $^{14}C$ )Gal: a) 26,7, b) 28,1, c) 5,0 und d) 5,9.

In ähnlicher Weise wurde ( $^{14}C$ )MGD mit UDP-Gal derivatisiert.

## 2.11 Chemische $\alpha$ -Oxidation in vivo markierter Fettsäuren

Aus dem Lipidextrakt der in vivo markierten Thylakoid-Fraktion  $T_{2,5h}$  (2.2.5, Experiment I) wurde ( $^{14}C$ )MGD zunächst durch sukzessive DC in LM 1 und 2 gereinigt, bevor es durch  $AgNO_3$ -DC in seine Lipidspezies aufgetrennt wurde. Die Banden der molekularen Spezies  $C_{18:1}/C_{16:0}$ ,  $C_{18:2}/C_{16:0}$  und  $C_{18:3}/C_{16:0}$  wurden mit Hilfe des Dünnschichtscanners lokalisiert und in methanolische Schwefelsäure zur Umesterung der Fettsäuren ausgeschabt. Dabei wurde eine gewisse Kreuzverunreinigung der Monoen- und Dienkomponenten in Kauf genommen, da bei der anschließenden  $AgNO_3$ -DC der Fsme die Trennung  $C_{18:1}$  -  $C_{18:2}$  unkritisch war. Die Banden der radioaktiven Fsme der einzelnen Lipidspezies wurden extrahiert und die Fraktionen der  $C_{16:0}$  jeder Spezies wurden vereinigt. Die Reinheit der so präparierten Fsme wurde zunächst durch RGC-Analyse überprüft, bevor die  $C_{18}$ -Fsme in Essigsäureäthylester aufgenommen und mit Palladium-Aktivkohle als Katalysator unter Wasserstoffatmosphäre über Nacht hydriert und wie der Palmitinsäureester verseift wurden (in 0,5 ml 0,5 N KOH + 1 ml MeOH, 80°C, 2 h). Die methanolischen Lösungen wurden angesäuert und wie beschrieben extrahiert. Für die folgende, chemische  $\alpha$ -Oxidation (186) wurden die freien Säuren in 0,5 ml Aceton aufgenommen und mit

## 2. Methoden

---

0,5 mg Palmitin- bzw. Stearinsäure geträgert. Die Proben, mit 17 mg  $KMnO_4$ -Pulver versehen, wurden über Nacht bei 56 °C im Ultraschallbad beschallt; nach Abkühlen wurden 1 ml 5 N Schwefelsäure und eine Spatelspitze Natriumpyrosulfit (Entfärbung der Probe) hinzugegeben und die Fettsäurefragmente drei mal mit Äther/Petroläther = 1/1 extrahiert.

Für deren RGC wurden wie üblich die Methylester hergestellt.

Das Temperaturprogramm der Analyse auf 15 % Reoplex/250 cm x 1/8 Zoll-Stahlsäule war 165 °C → 210 °C (16 Min.), Heizrate 1 °C/Min.

## **Teil III**

# **Ergebnisse und Diskussion**



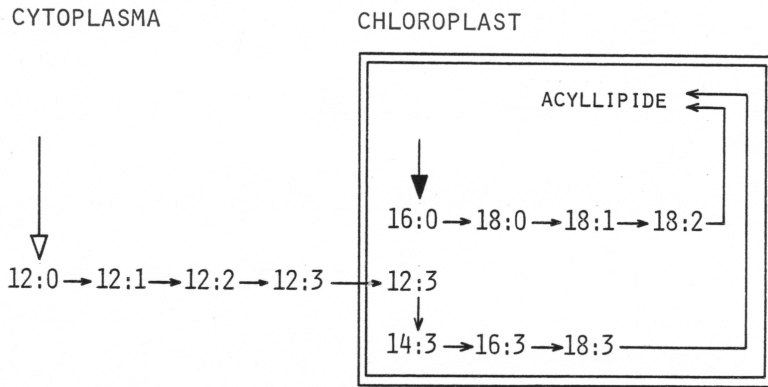
## Weitere Charakterisierung der $C_{16:3}$ -Pflanzen

### ... auf der Ebene der positionsspezifischen, radioaktiven Markierung der Fettsäuren in den Glycerolipiden

Die Hexadecatriensäure kommt nur in bestimmten Pflanzengruppen vor (86). Dazu zählen *Ranunculaceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Apiaceae*, *Rubiaceae*, *Campanulaceae*, *Solanaceae* u.a. In den Lipiden aus Blättern dieser Pflanzen ist die Säure in der sn-2-Position der Glycerinbausteine der Glykolipide konzentriert (73) und angereichert im MGD. Nach Inkubation junger Blätter einiger  $C_{16:3}$ -Pflanzen mit  $^{14}CO_2$ , und ( $^{14}C$ )-Acetat (*Anthriscus*, *Spinacia*, *Chenopodium*) stand das Muster der radioaktiven Markierung der Fettsäuren in unerwartet krassem Gegensatz zum Massenmuster dieses Galaktolipids. Dies traf insbesondere für die Markierung der Serie  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{16:2}$  und  $C_{16:3}$  zu (Abb. 4, S. 9). Die zeitliche Änderung des Radioaktivitätsmusters deutete auf eine Desaturierungssequenz der Palmitinsäure zur Hexadecatriensäure hin (155, 156, 27). Diese Interpretation des Biosyntheseweges der  $C_{16:3}$  widerspricht einer Hypothese, die eine Synthese des Prekursors  $C_{12:0}$ , dessen Desaturierung im Cytosol und eine konsekutive Verlängerung mit  $C_2$ -Einheiten im Chloroplasten annimmt (Abb. 3.1).

Die radioaktive Markierung der Intermediate  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$  und  $C_{16:2}$  ist daher ein wichtiger Diskussionspunkt. Sie konnte bei Inkubationen junger Blätter des Spinats, des Korbels und der grünen Gewebekulturen des Tabaks mit ( $^{14}C$ )-Acetat eindeutig reproduziert werden. Selbst bei Inkubation alter Spinatblätter, die Radioaktivität hauptsächlich in  $C_{16:0}$  des MGD einlagern, wird die Markierung der  $C_{16:3}$  und der Vorläufer  $C_{16:2}$  und  $C_{16:1}$  sichtbar, wenn nur genügend Aktivität zur RGC-Analyse eingesetzt wird (das resultierende Chromatogramm ist dann freilich nicht mehr schön).

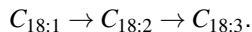
### 3. Weitere Charakterisierung der $C_{16:3}$ -Pflanzen



**Abb. 3.1:** Biosynthese der Hexadecatrien- und Linolensäure in Blättern des Spinats nach P. K. Stumpf (166)

Da  $^{14}\text{C}$ -ungesättigte Fs nur im MGD und keinem anderen Acyllipid, insbesondere nicht im DGD, radioaktiv markiert werden, scheint die Desaturierung in besonderer Weise mit MGD verknüpft zu sein (155, 156).

Ein anderes Charakteristikum der *in vivo* Markierung der Fs des MGD ist das Radioaktivitätsmuster der  $C_{18}$ -ungesättigten Fs, das auch in anderen Lipiden, aber nicht in PC, in ähnlicher Form registriert werden konnte. Aus der zeitlichen Änderung der Muster wurde ebenfalls auf eine Desaturierungssequenz geschlossen (155, 156), die von Ergebnissen anderer Autoren gestützt wird (60, 61, 168, 27):



Im Pflanzenreich sind sowohl CoA- wie ACP-Ester Substrate für Desaturasen, in den Chloroplasten des Spinats sind es Stearoyl-ACP und Oleoyl-CoA (166). Als Träger des Acylrestes werden aber auch Lipide diskutiert, und zwar PC, in Blau- und Grünalgen auch MGD (2, 7, 55, 56, 62, 129 - 131, 144 - 146, 149, 160, 167, 179).

Wie Abb. 3.1 zeigt, steht dieser Desaturierungssequenz wiederum ein anderes Modell der  $C_{16:3}$ -Synthese gegenüber, das eine separate Bildung der  $C_{18:3}$  durch Verlängerung der  $C_{16:3}$  annimmt (166). Als Substrate für die Elongation durch ein Stromasystem aus isolierten Chloroplasten des Spinats sind kürzlich Acyl-CoA beschrieben worden; innerhalb der Serie der  $C_{16}$ -Fs von  $C_{16:0}$ - bis  $C_{16:3}$ -CoA sinkt die *in vitro* messbare Elongationsrate. Der Esterstatus der Produkte wurde jedoch nicht festgestellt (172). Acetyl-CoA ist gegenüber Malonyl-CoA der wirkungsvollere  $C_2$ -Donator. Experimentelle Evidenz für den Elongationsmechanismus war u. a. die



---

Analyse der Radioaktivität der einzelnen C-Atome der  $C_{18}$ -Fettsäuren (85, 93) durch chemische  $\alpha$ -Oxidation. Der Abbau der Öl-, Linol-, Linolen- und der Palmitinsäure, isoliert aus den oligoenen MGD-Spezies in vivo markierter Thylakoide (Abb. 8.5), zeigt jedoch, dass die spezifische Radioaktivität in den  $C_8$  bis  $C_{18}$  ( $C_{18:1}$ ) bzw.  $C_{10}$ -bis  $C_{18}$ - bzw.  $C_{16}$ -Fragmenten der Säuren  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$ ,  $C_{18:3}$  etwa gleich ist. Dies sollte bedeuten, dass die vier Fettsäuren in gleicher Weise de novo synthetisiert worden sind. Eine de novo Synthese der  $C_{18:3}$  (*Euglena*, 21) und der  $C_{18:3}$  wie der Öl- und Linolsäure scheint auch der Hauptweg der Biosynthese in der fakultativ thermophilen Alge *Cyanidium caldarium* zu sein, wie die reduktive Ozonolyse der ( $^{14}C$ )-markierten Fettsäuren zeigt. Ein zellfreies System vermag aber auch  $C_{16:3}$  mit Malonyl-CoA zu verlängern (11). Diese Ergebnisse und die der chemischen  $\alpha$ -Oxidationen stützen die Hypothese der sequenziellen Desaturierung der  $C_{18:1}$  und sprechen zunächst gegen den Verlängerungsmechanismus der  $C_{16:3}$  in vivo, weil die Säure, wie oben erwähnt, in älteren Spinatblättern im MGD nur unwesentlich radioaktiv markiert ist. Die mögliche Prekursor-Rolle der  $C_{16:3}$  und der  $C_{16:1}$ ,  $C_{16:2}$  bei der Synthese der  $C_{18}$ -ungesättigten Fettsäuren, die in enger Relation zum MGD ablaufen könnte (155, 156), soll im Zusammenhang mit den Versuchsergebnissen der Inkubation der Gewebekulturen des Tabaks und im Abschnitt *Lipid-gekoppelte Desaturierung* weiter diskutiert werden.

Die Positionsanalyse der bei kurzzeitigen Inkubationen der jungen Blätter ( $^{14}C$ )-markierten Galaktolipide zeigte, dass das Verteilungsmuster der Fettsäuren auf der Ebene der Radioaktivität streng prokaryonten Charakter hat: Radioaktive Fettsäuren der Kettenlänge  $C_{16}$  besetzen die sn-2-Position des Glycerinbausteins, radioaktive Fettsäuren der Kettenlänge  $C_{18}$  bleiben von dieser Position ausgeschlossen (155, 156). Dieses Markierungsmuster widerspricht dem Massenmuster der Galaktolipide, da insbesondere  $C_{18:3}$  in großem Anteil auch in den Lyso-Verbindungen vorkommt.

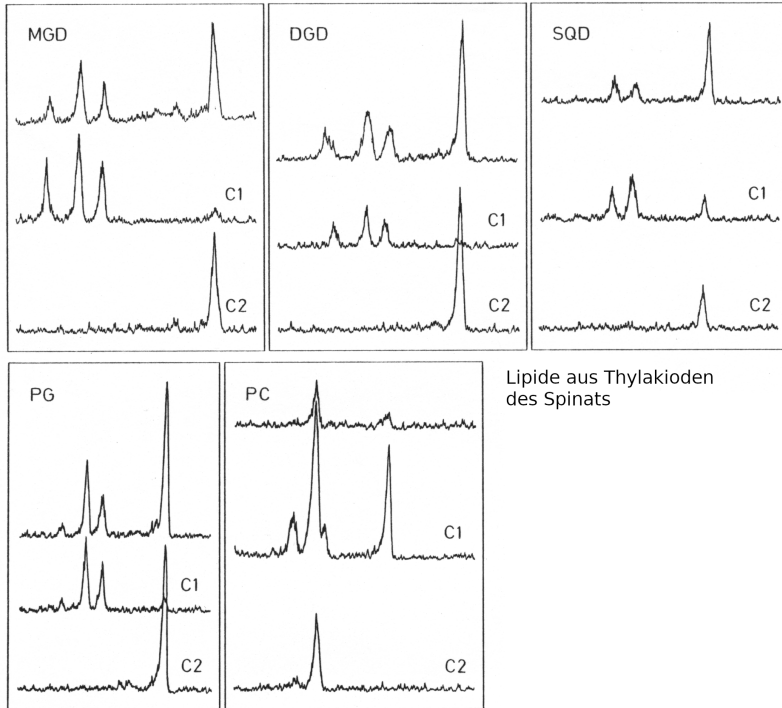
Aufgrund dieser Markierungsmuster der Galaktolipide (und des PC) aus  $C_{16:3}$ -Pflanzen konnten in Bezug auf die Fettsäuren und den DGD-Prekursor MGD verschiedene Pools definiert werden (156).

■  $C_{16:0}$  steht einerseits zur Desaturierung zur  $C_{16:3}$  hin zur Verfügung (siehe auch Abb. 3.5), die in enger Beziehung zur C-2-Position des MGD abläuft, daneben wird  $C_{16:0}$  unverändert in andere Lipide eingelagert und bleibt dort so erhalten (Ausnahme: 3-tr-16:1 in PG (63)).

■  $C_{18:3}$ , die in die Position C-1 des MGD und DGD eintritt, ist verschieden vom Pool der  $C_{18:3}$ , die die C-2-Positionen der Galaktolipide speist und sich in PC durch eine äußerst langsame Radioaktivitätseinlagerung auszeichnet.

■ MGD-Spezies, die  $C_{16}$ -ungesättigte Fettsäuren enthalten, sind von der Galaktosylierung zum DGD ausgeschlossen.

### 3. Weitere Charakterisierung der $C_{16:3}$ -Pflanzen

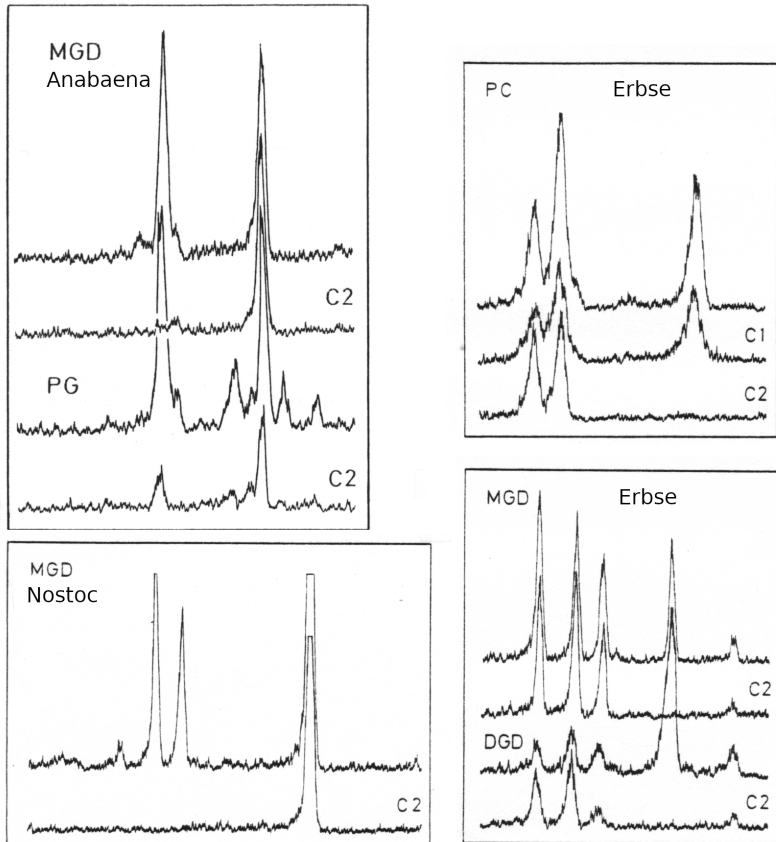


Lipide aus Thylakoiden  
des Spinats

**Abb. 3.2:** Positionsspezifische Verteilung der *in vivo* radioaktiv markierten Fettsäuren der Lipide aus isolierten Thylakoiden des Spinats (s. auch Tab. 6.4)

Blätter wurden 45 Min. lang mit  $^{14}CO_2$  inkubiert, nach weiteren 1 h 45 Min. geerntet und zur Isolation der Thylakoide eingesetzt (2.2.5).

Die isolierten, gereinigten Acyllipide wurden mit Lipase gespalten (2.7), und aus den Hydrolyseprodukten wurden wie beschrieben die ( $^{14}C$ )-Fsm für die RGC präpariert. In den Abb. repräsentiert jeweils die obere RGC-Spur die Fs des totalen Lipids, die mittlere die Fs der C-1-Position (C 1) und die untere die der lyso-Verbindung (C-2). Zur Identifikation der ( $^{14}C$ )-Fsm: Im Chromatogramm des totalen DGD treten von rechts nach links auf  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$ ,  $C_{18:3}$ ; die radioaktiven Fs der C-1-Position sind  $C_{16:0}$  (tr),  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$ ,  $C_{18:3}$ , die der C-2-Position (lyso-DGD)  $C_{16:0}$ . Im MGD sind Spuren von  $^{14}C_{16:1;2;3}$  erkennbar.



**Abb. 3.3:** Positionsspezifische Verteilung der in vivo radioaktiv markierten Acyllipide MGD, DGD und PC aus *Pisum sativum*, MGD aus *Nostoc communis*, sowie MGD und PG aus *Anabaena flos aquae*

Die Blätter der Erbse wurden 1,5 h lang mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat inkubiert, die Kulturen der Blaualgen 2,5 (*Anabaena*) und 1,5 h (*Nostoc*) lang (Warburg-Apparatur, 2.2.2). Erläuterungen zur Positionsanalyse und zur RGC s. Abb. 3.2. In den RGC des MGD und DGD ist  $^{14}\text{C}_{17:0}$  als interner Standard enthalten.

Weiterführende Analysen der Lipide, die in  $^{14}\text{CO}_2$ - oder ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat-Inkubationen ganzer Blätter bzw. der grünen Gewebekulturen des Tabaks radioaktiv markiert wurden, bestätigen und ergänzen die oben ausgeführten Charakteristika der positionsspezifischen Markierung, da nun auch die wesentlichen anderen Acyllipide des

### 3. Weitere Charakterisierung der $C_{16:3}$ -Pflanzen

---

Chloroplasten untersucht und die Fettsäuren der C-1-Position bei der Positionsanalyse mit erfasst wurden.

Nach kurzzeitiger Inkubation der Blätter des Spinats (2.2.5, Experiment I, Fraktion der isolierten Thylakoide) war radioaktiv markierte  $C_{16:0}$  nur in Spuren in der C-1-Position der Galaktolipide zu finden, in der aber die Radioaktivität der  $C_{18}$ -Fettsäuren konzentriert ist (Abb. 3.2).

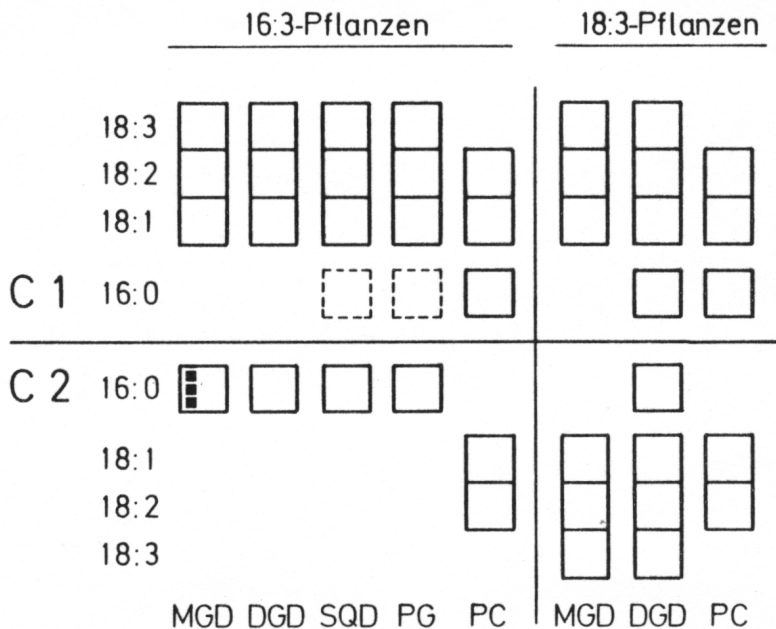
Von diesem klaren Verteilungsmuster setzen sich die Thylakoidlipide SQD und PG ab (siehe auch Abb. 3.4). In diesen Lipiden ist  $C_{16:0}$  minimal auch in der C-1-Position radioaktiv markiert. Die Masse der  $C_{16:0}$  verteilt sich dabei etwa gleich auf beide Positionen (Tab. 6.4). Radioaktive  $C_{18}$ -Säuren bleiben aber von der C-2-Position wie bei den Galaktolipiden ausgeschlossen.

In beiden Lipiden nehmen  $C_{18}$ -ungesättigte Fettsäuren schnell Radioaktivität auf und sind damit auch in ihrer Markierungskinetik vergleichbar mit den Galaktolipiden.

Ein ganz anderes Markierungsmuster präsentiert PC, das in Bezug auf  $C_{16:0}$  spiegelverkehrt zu den Verhältnissen in den Galaktolipiden ist. In Übereinstimmung mit der positionsspezifischen Verteilung der Masse der Palmitinsäure findet sich die ( $^{14}\text{C}$ )-Säure nur in der C-1-Position, radioaktive  $C_{18:1}$  und  $C_{18:2}$  besetzen beide Positionen.

Das positionsspezifische Markierungsmuster der Galaktolipide der  $C_{16:3}$ -Pflanzen ähnelt damit dem Massmuster prokaryonter, blaugrüner Algen (151, 183), in deren Galaktolipiden unabhängig vom Grad der Ungesättigtheit streng nach dem Kriterium der Kettenlänge die Positionen des Glycerinbausteins besetzt werden. In Analogie dazu zeigte die Positionsanalyse des radioaktiv markierten MGD aus *Nostoc* die Direktion der  $^{14}\text{C}_{16:0}$  in die C-2-Position und den Ausschluss der  $^{14}\text{C}_{18:X}$  von dieser Position. Im MGD und PG aus *Anabaena* (Abb. 3.3) konnten aber  $C_{18}$ -Fettsäuren radioaktiv markiert in der C-2-Position registriert werden, wenn auch in starker Abreicherung gegenüber der C-1-Position. In der Tat kommen im MGD-Speziesgemisch aus *Anabaena* im Gegensatz zu *Nostoc* auch  $C_{18}/C_{18}$  Kombinationen vor (183). Diese Spezies sollten die in der C-2-Position registrierte, radioaktive  $C_{18:X}$  tragen, möglicherweise sind sie deshalb symmetrisch markiert und leiten über zum Radioaktivitätsverteilungsmuster des MGD aus  $C_{16:3}$ -Pflanzen.

Es sollte interessant sein, den Analyseergebnissen der radioaktiv markierten Lipide aus Blättern der  $C_{16:3}$ -Pflanzen einige Daten der  $C_{18:3}$ -Pflanzen gegenüberzustellen. Wie es für eine  $C_{16:3}$ -Pflanze typisch ist, enthält MGD aus Blättern von *Pisum sativum* hauptsächlich Linolensäure (92 %), und Palmitinsäure macht als einziger Vertreter der  $C_{16}$ -Säuren nur 2,3 % der Fettsäuren aus. Tatsächlich war nach Inkubation der Blätter mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat (1,5 h) über 92 % der Radioaktivität der Fettsäuren in  $C_{18}$ -ungesättigten Fettsäuren lokalisiert, die offensichtlich beide Positionen belegten (Abb. 3.3). Auch im DGD scheinen  $^{14}\text{C}_{18:X}$  auf beide Positionen des Glycerinbausteins gleichmäßig verteilt zu sein. Im Gegensatz zum Massen-



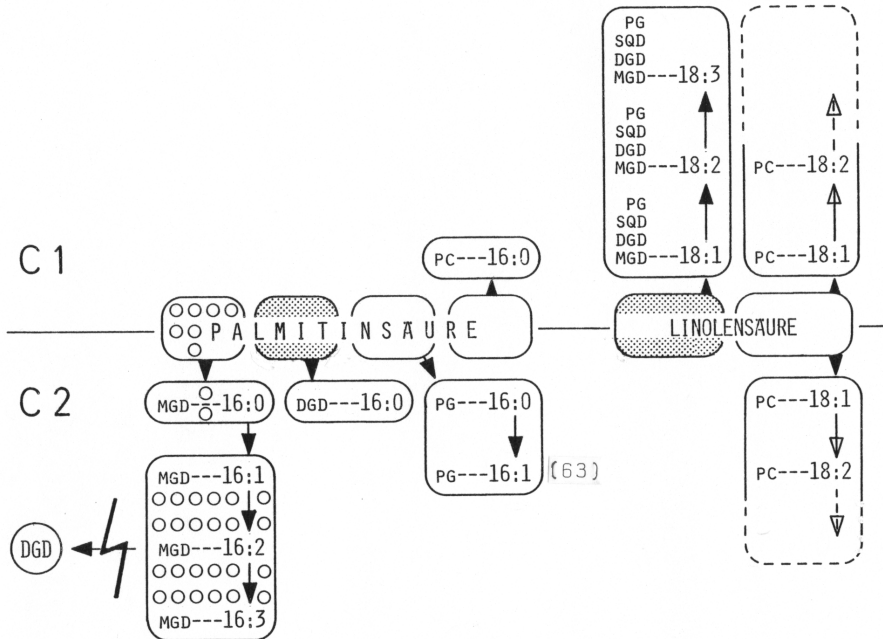
**Abb. 3.4:** Positionsspezifische Verteilung der ( $^{14}\text{C}$ )-Fs in Lipiden aus Blättern von  $\text{C}_{16:3}$ - und  $\text{C}_{18:3}$ -Pflanzen

■■■ = auch  $\text{C}_{16:1}$ ,  $\text{C}_{16:2}$  und  $\text{C}_{16:3}$  sind radioaktiv markiert.

muster war aber auch radioaktiv markierte  $\text{C}_{16:0}$  in der C-2-Position zu finden. Das Verteilungsmuster der ( $^{14}\text{C}$ )-Fettsäuren des PC gleicht dem Muster des Lipids aus  $\text{C}_{16:3}$ -Pflanzen auch in dem Faktum, dass  $\text{C}_{18:3}$  im Gegensatz zur Linolensäure anderer Lipide nach kurzfristiger Inkubation der Blätter nicht markiert wurde.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen  $\text{C}_{16:3}$ - und  $\text{C}_{18:3}$ -Pflanzen auf dem Niveau der ( $^{14}\text{C}$ )-Markierung der Fettsäuren (nach kurzzeitigen Inkubationen, s. auch Abb. 3.4) ist daher die positionsspezifische Verteilung der  $\text{C}_{18}$ -Fettsäuren in den Galaktolipiden. Wie Abb. 3.5 zusammenfasst, sinkt damit auch die Zahl der formal abzugrenzenden Fettsäure-Pools.  $\text{C}_{16:0}$  wird nicht zu  $\text{C}_{16:3}$  desaturiert; während aber bei ( $\text{C}_{16:3}$ )-Pflanzen ein MGD-Pool für die Galaktosylierung zum DGD verboten ist, dürfte im Falle der  $\text{C}_{18:3}$ -Pflanzen ein MGD-Pool nur der DGD-Synthese dienen, der  $\text{C}_{16:0}/\text{C}_{18:3}$ -Spezies enthält, die sich sowohl in der Masse als auch radioaktiv

### 3. Weitere Charakterisierung der $C_{16:3}$ -Pflanzen



**Abb. 3.5:** Pools der  $C_{16:3}$  und  $C_{18:3}$  und des MGD in  $C_{16:3}$ -Pflanzen

○ = Pool fällt in  $C_{18:3}$ -Pflanzen aus. Gepunktet: Pool enthält in  $C_{18:3}$ -Pflanzen eine andere Charakteristik in Bezug auf die Richtung der ( $^{14}C$ )-Fs in die Positionen am Glycerinbaustein der Lipide. Mit dem  $C_{18:3}$ -Pool sind die Prekursoren  $C_{18:1}$  und  $C_{18:2}$  eng verknüpft. Daher gibt das Schema auch die Messung dieser radioaktiv markierten Fs in den Lipiden wieder. Weitere Erläuterungen im Text.

markiert nicht anhäufen. In beiden Pflanzengruppen wird deshalb ein Unterschied zwischen den Galaktolipiden MGD und DGD aufrecht erhalten.

## Acyllipide in photosynthetisch aktiven Gewebekulturen des Tabaks

Eine zunehmende Zahl von Experimenten untersucht die Zusammensetzung und den Metabolismus der verschiedenen Lipidklassen, die in Gewebekulturen vorkommen (8, 53, 124, 140). Mit zwei Ausnahme wurden diese Experimente mit nicht grünen Kulturen ausgeführt (84, 189), deren Lipide in verschiedener Hinsicht von denen des photosynthetisch aktiven Gewebes der Mutterpflanze abweichen. Daher erschien es sinnvoll, die Lipide einer photosynthetisch aktiven Gewebekultur zu analysieren. Dazu boten sich in unserem Hause die Kulturen des Tabaks *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* an, deren SCI-Stamm seit der Proliferation aus einem Wundkallus von Prof. Dr. L. Bergmann kultiviert wird (12, 13). Der Vergleich der grünen Kultur mit dem Blattgewebe der Mutterpflanze sollte die Möglichkeit prüfen, ob die mixotrophen grünen Gewebekulturen als Modellsystem für Experimente auf dem Gebiet des Lipidmetabolismus geeignet sind. Dabei sollte der Tabak eine besonders interessante Pflanze sein, da er als Solanacee in die Gruppe der  $C_{16:3}$ -Pflanzen gehört (86). Für die weiteren Studien der Biosynthese der  $C_{16:3}$  und  $C_{18:3}$  und des Transfers in spezielle Positionen der Glycerinbausteine der Galaktolipide wäre ein leicht zu manipulierendes System wie das einer Gewebekultur von großem Vorteil. Daher interessierte uns vor radioaktiven Markierungsexperimenten insbesondere das Vorkommen der  $C_{16:3}$  in den Lipiden der grünen Kulturen des Tabaks.

**Tab. 4.1:** Fettsäurezusammensetzung (in Mol-%) der Lipidextrakte (Totalumesterungen) aus vier verschiedenen Geweben des Tabaks

Blätter (B), grüne (GK) und heterotrophe (HK) Gewebekulturen und etiolierte Kotyledonen (EK) sowie grüne Gewebekulturen, die mit dem Herbizid EMD-IT behandelt wurden (a = 0,2  $\mu$ M, b = 1  $\mu$ M, c = 100  $\mu$ M).

Ein Aliquot der aus dem Lipidextrakt der heterotropen Gewebekultur präparierten Fettsäuremethylester wurde hydriert und erneut gaschromatographisch analysiert (HKR). Für B und GK ist die Standardabweichung des Mittelwertes für n = 6 angegeben. Die untersuchten GK waren 10 - 12 Tage alt.

|     | $C_{16:0}$ | $C_{16:1}$ | 3 -<br>$trC_{16:1}$ | $C_{16:2}$ | $C_{16:3}$ | $C_{18:0}$ | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ | $C_{20:0}$ |
|-----|------------|------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| B   | 16,2       | 1,2        | 2,6                 | 0,8        | 7,0        | 1,8        | 1,7        | 14,1       | 55,3       | tr         |
|     | 0,4        | 0,3        | 0,1                 |            | 0,1        | 0,1        | 0,1        | 0,4        | 0,5        |            |
| GK  | 20,3       | 0,4        | 0,3                 | 0,5        | 0,4        | 4,3        | 5,9        | 34,6       | 32,9       | 0,9        |
|     | 0,7        | 0,1        | 0,1                 |            | 0,1        | 0,3        | 0,3        | 1,1        | 1,5        |            |
| HK  | 26,1       | 0,3        | tr                  | n.a.       | tr         | 4,6        | 3,5        | 53,1       | 11,3       | 1,2        |
| HKR | 28,0       | 0          | 0                   | n.a.       | 0,0        | 70,9       | 0          | 0          | 0          | 1,1        |
| EK  | 17,9       | 2,0        | tr                  | n.a.       | 0,8        | 7,7        | 8,2        | 35,4       | 27,3       | 0,7        |
| a   | 20,8       | 1,2        | 0,2                 | 0,8        | 0,7        | 4,0        | 7,8        | 29,2       | 34,1       | 1,2        |
| b   | 21,3       | 0,6        | 0,3                 | n.a.       | 0,3        | 4,5        | 7,3        | 35,8       | 27,0       | 0,9        |
| c   | 24,2       | 0,3        | 0,5                 | n.a.       | 0,3        | 6,1        | 11,8       | 31,4       | 24,4       | 1,0        |

### 4.1 Fettsäuremuster des Totallipidextraktes

Die Lipide in Blättern, grünen und bleichen Gewebekulturen machten 7,9, 6,3 bzw. 1,7 % ihres Trockengewichtes aus. Entsprechende Werte verschiedener anderer heterotropher Kulturen liegen im Bereich von 2,6 - 8,1 % (140). In Tab. 4.1 ist die Fettsäureanalyse der Totallipidextrakte zusammengefasst. Verfolgt man die Daten der Blätter über grüne zu den heterotropen Kulturen hin, stellt man einen Anstieg des Anteils der  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$ ,  $C_{18:2}$  und geringere Anteile der  $C_{18:3}$  fest. Besonders drastisch aber sind die Anteile der  $C_{16:3}$  und 3- $trC_{16:1}$  reduziert, die in photosynthetisch aktiven Geweben mit den Chloroplastenlipiden MGD und PG verknüpft sind. Die Fettsäurezusammensetzung der etiolierten Kotyledonen oder der mit den Herbizid EMD-IT behandelten, grünen Kulturen ähnelt der der grünen Kultur (Tab. 4.1). Bei Anzucht der Zellen in Medien mit höheren Herbizidkonzentrationen sinkt der Pigmentgehalt (59, 171). Die für  $C_{18:1}$  und  $C_{18:2}$  angegebenen Werte der heterotropen Kulturen unterscheiden sich von anderen Analysen (176), bei denen geringere bzw. größere Mengen dieser Säuren festgestellt wurden. Wie aber für andere Gewebekulturen gezeigt wurde (22, 140, 141, 161, 163), variieren quantitative



Fettsäure- und Lipidzusammensetzung in Abhängigkeit von Anzuchtbedingungen und Alter der Kulturen. Daher wurden die Fettsäuren in Lipidextrakten aus 4, 10, 13 und 16 Tage alten grünen Kulturen vergleichend analysiert. Die Fettsäuremuster der drei letztgenannten Kulturen unterscheiden sich nicht wesentlich von den in Tab. 4.1 angegebenen. Auch konnten ähnliche Werte  $\mu\text{Mol Ester/mg Lipid}$  (1,75 - 1,62) bestimmt werden. Im Gegensatz dazu hatten die vier Tage alten Kulturen einen geringeren Acylestergehalt/mg Lipid (1,42) und ein etwas verändertes Fettsäuremuster, in dem höhere Anteile der  $C_{18:2}$  (46 %) und niedrigere der  $C_{18:3}$  (21 %) auffallen. Der Trend der Reduktion der  $C_{18:2}$ -Anteile zugunsten der  $C_{18:3}$  in älteren Kulturen bestätigte sich bei Analyse der Fettsäuren aus 3, 7, 10 und 20 Tage alten grünen Kulturen, die mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat inkubiert worden waren (Tab. 5.1).

## 4.2 Qualitatives und quantitatives Lipidmuster der Gewebekulturen des Tabaks

Wie dies schon von anderen Autoren beschrieben worden ist (161, 163), kamen die gewöhnlichen Acyllipide, die Bestandteile der Membranen in Blättern sind, auch in den grünen und heterotrophen Kulturen vor. Dazu gehören insbesondere auch MGD, DGD und SQD, die in anderen Gewebekulturen nur in Spuren oder nicht vertreten sein sollen (142). BPA und APE, die als Referenzsubstanzen synthetisiert wurden, konnten nicht nachgewiesen werden, obwohl sie in z. T. erheblichen Mengen in heterotrophen Kulturen festgestellt wurden (140, 164). Andere identifizierte Phospholipide dagegen sind PG, PE, PC und PI<sup>1</sup>. Spuren von Phosphatidsäure und Cardiolipin wurden in geeigneten Laufmittelsystemen sichtbar, ebenso ein unbekanntes Phospholipid und freies Sterin, Acylsterin, Sterylglycosid, Acylsterylglycosid und Cerebrosid.

Die Unterschiede quantitativer Art in den Lipidmustern der untersuchten Gewebe (Tab. 4.2) sind nicht so drastisch, wie sie etwa für die oben erwähnten, ungesättigten  $C_{16}$ -Fettsäuren registriert werden konnten. Gegenüber den Blättern weisen die grünen und heterotrophen Gewebekulturen einen geringeren Gehalt der Chloroplastenlipide, insbesondere des MGD und SQD, und einen Anstieg der Phospholipide und des ASG auf. Diese Änderungen laufen parallel zur Reduktion des Chlorophyllgehaltes. Sie deuten die Dominanz der extraplastidären Membransysteme an (19). In der Tat demonstrieren elektronenmikroskopische Bilder von Plastiden (14) die starke Reduktion der Granastapel in den grünen Kulturen des Tabaks, die in den Plastiden heterotropher Zellen kaum noch ausgebildet sind (14, 19). Im normal ausgebildeten Chloroplasten machen die Thylakoide der Chloroplasten die Hauptmasse

<sup>1</sup> siehe auch PI = U aus isolierten Envelopes, S. 55

**Tab. 4.2:** Zusammensetzung der Acyllipide (in Mol-%) aus vier verschiedenen Geweben des Tabaks (Abkürzungen s. Tab. 4.1). 1 = mg Lipid/100 mg TGW; 2 =  $\mu$ Mol Ester/mg Lipid; 3 = mg Chl/100 mg Lipid; 4 = mg Protein/100 mg TGW

|    | MGD  | DGD  | SQD | PG  | PG   | PI   | PC   | ASG | 1   | 2    | 3    | 4    |
|----|------|------|-----|-----|------|------|------|-----|-----|------|------|------|
| B  | 47,1 | 25,3 | 5,7 | 7,1 | 3,9  | 1,1  | 8,7  | 0,9 | 9,7 | 1,24 | 13,1 | 25,5 |
| GK | 22,2 | 17,0 | 2,5 | 5,2 | 19,3 | 4,2  | 25,9 | 3,7 | 6,3 | 1,62 | 2,4  | 12,0 |
| GK | 25,2 | 23,4 | 2,8 | 4,8 | 12,8 | 5,9  | 25,0 | 1,8 | 6,1 | 1,89 | 2,7  | 9,0  |
| HK | 10,3 | 27,1 | 1,6 | 2,5 | 13,4 | 7,6  | 36,2 | 1,7 | 1,7 | 1,73 | -    | -    |
| a  | 22,7 | 17,9 | 1,6 | 3,9 | 21,4 | 7,3  | 25,3 | 1,8 | 6,8 | 1,66 | 1,9  | 9,8  |
| b  | 11,2 | 11,6 | 1,9 | 4,6 | 23,2 | 9,4  | 37,0 | 1,1 | 5,4 | 1,56 | 1,2  | 7,6  |
| e  | 12,1 | 11,3 | 1,7 | 8,3 | 30,3 | 13,5 | 20,9 | 1,9 | -   | 1,28 | -    | -    |

der Membranen einer Zelle aus (97 %) (40); ihre Reduktion erklärt das Absinken des relativen Anteils der Glykolipide und auch die Verschiebung des Verhältnisses MGD zu DGD.

### 4.3 Fettsäurezusammensetzung der individuellen Acyllipide

Einige Ergebnisse der Fettsäureanalyse (Tab. 4.3) der einzelnen Glycerolipide der verschiedenen Gewebe sind in Abb. 4.1 auf S. 83 dargestellt. Trends wie erhöhte Proportionen der  $C_{18:0}$ ,  $C_{18:2}$  und Reduktion der  $C_{18:3}$ , die in den Fettsäuremustern der Totallipide erkennbar wurden, lassen sich hauptsächlich auf die Veränderungen des Gehaltes der Chloroplastenlipide MGD, DGD, SQD und PG sowie deren in diesem Sinne veränderte Fettsäuremuster zurückführen. Eine ähnlich verallgemeinernde Regel kann für  $C_{16:0}$  in Glyko- und Phospholipiden aus Blättern, grünen und heterotrophen Kulturen nicht aufgestellt werden, da ihr prozentualer Anteil in den einzelnen Lipiden sehr unterschiedliche Werte annimmt.

So wird auf Kosten der  $C_{18:3}$   $C_{18:2}$  in den Glykolipiden der Gewebekulturen zur (mit-)dominierenden Fettsäure. Lediglich im MGD der bleichen Kultur bleibt  $C_{18:3}$  eindeutig die Hauptkomponente. Auch in den Phospholipiden PC, PE und PI, die hauptsächlich in extraplastidären Membransystemen lokalisiert sind, sinkt im Vergleich zu den Blättern der Anteil der  $C_{18:3}$  erheblich zugunsten der  $C_{18:2}$  in diesen Lipiden der Gewebekulturen, während die Proportionen der  $C_{18:0}$  erhalten bleiben.

**Tab. 4.3:** Fettsäurezusammensetzung (in Mol-%) der individuellen Acyllipide aus vier verschiedenen Geweben des Tabaks

B = Blätter, GK = photosynthetisch aktive, grüne Gewebekultur, HK = heterotrophe Gewebekultur, EK = etiolierte Kotyledonen

n (in der letzten Spalte) gibt die Anzahl der voneinander unabhängigen Präparationen und Analysen an, deren Ergebnisse für die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung des Mittelwertes herangezogen wurden.

Die Analysen des ASG aus drei verschiedenen grünen und heterotrophen Kulturen sind einzeln aufgeführt. Der Gehalt der  $C_{16:2}$  in MGD ist: B  $0,6 \pm 0,5$ , GK  $0,1 \pm 0,03$ ; in DGD B und GK tr, sowie SQD in B tr.

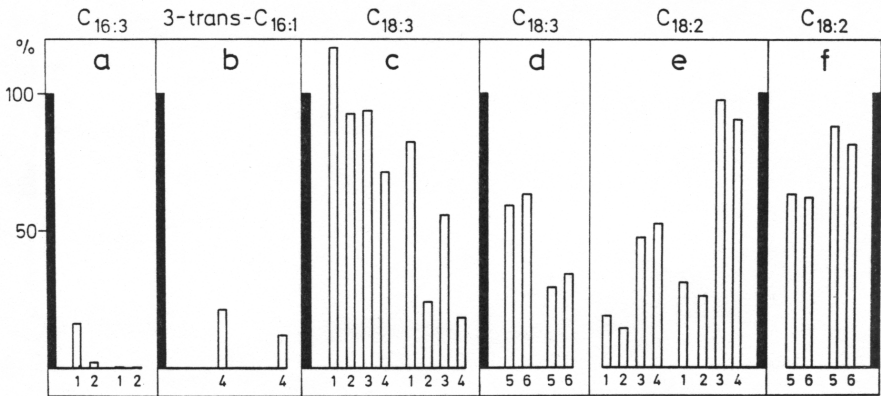
|     |    | $C_{16:0}$ | $C_{16:1}$ | $3 -$<br>$trC_{16:1}$ | $C_{16:3}$ | $C_{18:0}$ | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ | $C_{20:0}$ | n |
|-----|----|------------|------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---|
| MGD | B  | 3,5        | 1,0        |                       | 16,0       | 0,8        | 1,3        | 5,4        | 71,6       |            | 4 |
|     | ±  | 0,2        | 0,1        |                       | 0,5        | 0,2        | 0,1        | 0,1        | 0,8        |            |   |
|     | GK | 3,6        | 0,2        |                       | 2,5        | 0,9        | 1,4        | 8,5        | 82,8       |            | 5 |
|     | ±  | 0,2        | 0,1        |                       | 0,1        | 0,03       | 0,05       | 0,5        | 0,7        |            |   |
|     | HK | 11,9       | 0,3        |                       | tr         | 1,4        | 0,4        | 27,8       | 58,5       |            | 4 |
|     | ±  | 0,4        | 0,2        |                       |            | 0,7        | 0,4        | 0,8        | 0,6        |            |   |
|     | EK | 6,6        | 1,7        |                       | 0,7        | 3,4        | 2,5        | 8,1        | 77,0       |            | 1 |
| DGD | B  | 15,8       | 0,4        |                       | 2,3        | 1,7        | 1,7        | 5,4        | 71,3       |            | 3 |
|     | ±  | 0,4        | 0,2        |                       | 0,2        | 0,4        | 0,2        | 0,03       | 1,3        |            |   |
|     | GK | 16,9       | tr         |                       | tr         | 4,3        | 2,7        | 10,3       | 65,5       | tr         | 4 |
|     | ±  | 0,8        |            |                       |            | 0,2        | 0,1        | 1,5        | 2,2        |            |   |
|     | HK | 33,0       | 0,4        |                       |            | 6,8        | 2,3        | 39,7       | 17,1       | 1,0        | 3 |
|     | ±  | 0,3        | 0,3        |                       |            | 0,1        | 0,1        | 0,4        | 0,3        | 0,5        |   |
|     | EK | 17,4       | 2,9        |                       | tr         | 6,4        | 5,5        | 8,9        | 58,9       | tr         | 1 |
| SQD | B  | 48,7       | 1,4        |                       | 0,4        | 2,9        | 3,1        | 8,1        | 35,5       |            | 4 |
|     | ±  | 1,4        | 0,5        |                       | 0,2        | 0,4        | 0,3        | 0,4        | 0,6        |            |   |
|     | GK | 40,4       | 0,7        |                       |            | 4,7        | 4,4        | 16,7       | 32,9       |            | 4 |
|     | ±  | 4,3        | 0,3        |                       |            | 0,3        | 0,6        | 5,9        | 2,3        |            |   |
|     | HK | 56,0       | 0,8        |                       |            | 3,4        | 1,8        | 17,3       | 19,7       |            | 2 |
|     | ±  | 3,1        | 0,3        |                       |            | 0,2        | 0,4        | 0,4        | 0,2        |            |   |
|     | EK | 35,8       | 7,2        |                       |            | 12,3       | 10,5       | 9,7        | 24,5       |            | 1 |
| PG  | B  | 24,6       | tr         | 34,0                  |            | 2,2        | 5,6        | 11,4       | 22,4       |            | 2 |
|     | ±  | 3,5        |            | 0,1                   |            | 0,4        | 0,1        | 0,8        | 3,1        |            |   |
|     | GK | 46,7       | tr         | 7,3                   |            | 5,2        | 4,9        | 19,9       | 16,1       | tr         | 3 |
|     | ±  | 2,7        |            | 1,8                   |            | 0,2        | 0,2        | 3,9        | 2,4        |            |   |
|     | HK | 64,6       | 0,4        | 4,0                   |            | 2,8        | 0,9        | 22,0       | 4,0        |            | 3 |
|     | ±  | 0,9        | 0,2        | 0,3                   |            | 0,4        | 0,4        | 0,3        | 0,2        |            |   |
|     | EK | 35,3       | 4,2        | 0,8                   |            | 8,9        | 5,2        | 31,3       | 13,7       | 0,7        | 1 |

#### 4. Acyllipide in photosynthetisch aktiven Gewebekulturen des Tabaks

|     |    | $C_{16:0}$ | $C_{16:1}$ | 3 –<br>$trC_{16:1}$ | $C_{16:3}$ | $C_{18:0}$ | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ | $C_{20:0}$ | n |
|-----|----|------------|------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---|
| PE  | B  | 31,4       | tr         |                     | 4,6        | 2,1        | 41,9       | 20,1       | tr         |            | 2 |
| ±   |    | 1,0        |            |                     | 0,3        | 0,2        | 0,5        | 1,0        |            |            |   |
|     | GK | 21,7       | 0,2        |                     | 4,0        | 3,9        | 58,2       | 11,6       | 1,4        |            | 3 |
| ±   |    | 1,5        | 0,1        |                     | 0,3        | 0,4        | 3,1        | 0,5        | 0,3        |            |   |
|     | HK | 24,6       | 0,2        |                     | 2,2        | 0,4        | 66,1       | 5,8        | 0,5        |            | 4 |
| ±   |    | 1,1        | 0,1        |                     | 0,3        | 0,1        | 1,0        | 0,5        | 0,1        |            |   |
| PI  | B  | 38,8       | 1,6        |                     | 5,1        | 4,6        | 24,3       | 26,7       |            |            | 2 |
| ±   |    | 4,2        | 0,3        |                     | 2,2        | 2,4        | 1,4        | 3,3        |            |            |   |
|     | GK | 42,2       | tr         |                     | 2,5        | 3,4        | 35,0       | 17,0       | tr         |            | 2 |
| ±   |    | 2,0        |            |                     | 0,4        | 0,2        | 1,1        | 1,5        |            |            |   |
|     | HK | 45,6       | 0,2        |                     | 3,1        | 0,6        | 42,7       | 6,8        | tr         |            | 4 |
| ±   |    | 3,1        | 0,1        |                     | 0,8        | 0,3        | 2,3        | 0,5        |            |            |   |
|     | EK | 23,7       | 2,5        |                     | 11,9       | 4,5        | 36,1       | 21,4       | tr         |            | 1 |
| PC  | B  | 26,6       | 0,9        |                     | 4,7        | 3,4        | 39,1       | 25,0       | tr         |            | 3 |
| ±   |    | 1,3        | 0,1        |                     | 0,3        | 0,3        | 0,4        | 1,1        |            |            |   |
|     | GK | 19,6       | 0,2        |                     | 4,6        | 8,9        | 50,4       | 16,0       | 1,5        |            | 4 |
| ±   |    | 0,5        | 0,1        |                     | 0,4        | 0,8        | 2,3        | 1,2        |            |            |   |
|     | HK | 23,3       | tr         |                     | 3,8        | 1,6        | 62,6       | 8,5        | tr         |            | 4 |
| ±   |    | 0,4        |            |                     | 0,1        | 0,05       | 0,3        | 0,2        |            |            |   |
|     | EK | 29,3       | 1,6        |                     | 11,2       | 5,1        | 30,5       | 22,3       | tr         |            | 1 |
| ASG | B  | 47,2       | tr         |                     | 12,2       | 8,6        | 19,5       | 10,7       | 1,8        |            | 1 |
|     | GK | 26,3       | 0,7        |                     | 52,8       | 1,8        | 13,0       | 3,2        | 2,1        |            | 1 |
|     |    | 40,8       | 0,6        |                     | 11,5       | 8,9        | 28,8       | 6,4        | 2,9        |            | 1 |
|     |    | 39,9       | 1,2        |                     | 12,4       | 10,2       | 25,4       | 8,0        | 3,0        |            | 1 |
|     | HK | 43,4       | 2,1        |                     | 10,5       | 7,9        | 27,0       | 6,1        | 2,9        |            | 1 |
|     |    | 40,9       | tr         |                     | 23,4       | tr         | 32,4       | 3,3        | 3,0        |            | 1 |
|     |    | 41,2       | 5,3        |                     | 10,1       | 10,8       | 33,8       | 3,3        | 1,5        |            | 1 |
|     | EK | 40,5       | 4,7        |                     | 21,4       | 17,2       | 8,1        | 8,1        | tr         |            | 1 |

Wie erwartet, ist der Tabak eine typische  $C_{16:3}$ -Pflanze.  $C_{16:3}$  ist im MGD konzentriert, und die anderen Glykolipide enthalten nur Spuren dieser Säure. Diese Verhältnisse werden in der grünen Kultur noch deutlicher, obwohl der Prozentsatz der Säure von 16 auf 2,5 im MGD abgefallen ist. Im MGD der heterotrophen Kulturen sind nur noch Spuren von  $C_{16:3}$  nachweisbar.

Ähnliche Differenzen gelten für den Gehalt der 3-tr- $C_{16:1}$  des PG, die ein anderer Marker für Chloroplasten ist. Für die Chloroplasten von  $C_4$ -Pflanzen ist 3-tr- $C_{16:1}$  mit der Granabildung in Zusammenhang gebracht worden (170). Die beiden  $C_{16}$ -Säuren leiten sich aus  $C_{16:0}$  ab (9, 63, 155, 156), deren Desaturierung in spezifischer Weise an die Chloroplasten gebunden ist. Ihre geringen Prozentsätze in den grünen Kulturen deuten an, dass die Kapazität der Fettsäuredesaturierung in ihren Chloroplasten



**Abb. 4.1:** Vergleich der Fettsäureproportionen in den individuellen Lipiden aus Blättern, grünen und heterotrophen Kulturen des Tabaks

In (a) werden die Proportionen der  $C_{16:3}$  in MGD = 1 und DGD = 2, in (b) die der 3-tr- $C_{16:1}$  des PG = 4 verglichen; (c) und (e) fassen die Ergebnisse für  $C_{18:3}$  bzw.  $C_{18:2}$  in den Chloroplastenlipiden MGD, DGD, SQD = 3 und PG, (d) und (f) für die extraplastidären Phospholipide PE = 5 und PC = 6 zusammen. In (a-d) sind die Fettsäuren der Lipide aus Blättern = 100 % gesetzt, in (e) und (f) repräsentieren  $C_{18:2}$  in Lipiden aus heterotrophen Kulturen 100 %. Für jede der Fettsäuren sind weiterhin zwei Gruppen von Balken gesetzt, die linke für grüne, die rechte für bleiche Kulturen in (a-d), in (e) und (f) steht die linke Gruppe für Blätter, die rechte für grüne Kulturen.

reduziert ist. In dieser Hinsicht kann man die grünen Kulturen, wie auch vom Chlorophyllgehalt und der Häufigkeit der Grana in elektronenmikroskopischen Bildern zu erwarten ist, zwischen Blattgewebe und den heterotrophen Kulturen anordnen.

Die Fettsäurezusammensetzung der Acyllipide aus etiolierten Kotyledonen ähnelt der der grünen Kulturen, weil die beschriebenen Verschiebungen der Proportionen der  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:2}$  und  $C_{18:3}$  ebenso auftreten,  $C_{16:3}$  und 3-tr- $C_{16:1}$  aber nur in Spuren vorhanden sind. Die Analyse der Fettsäuren des ASG ergab bei den verschiedenen Experimenten variierende Werte, aber der hohe Anteil der gesättigten Fettsäuren sei erwähnt.

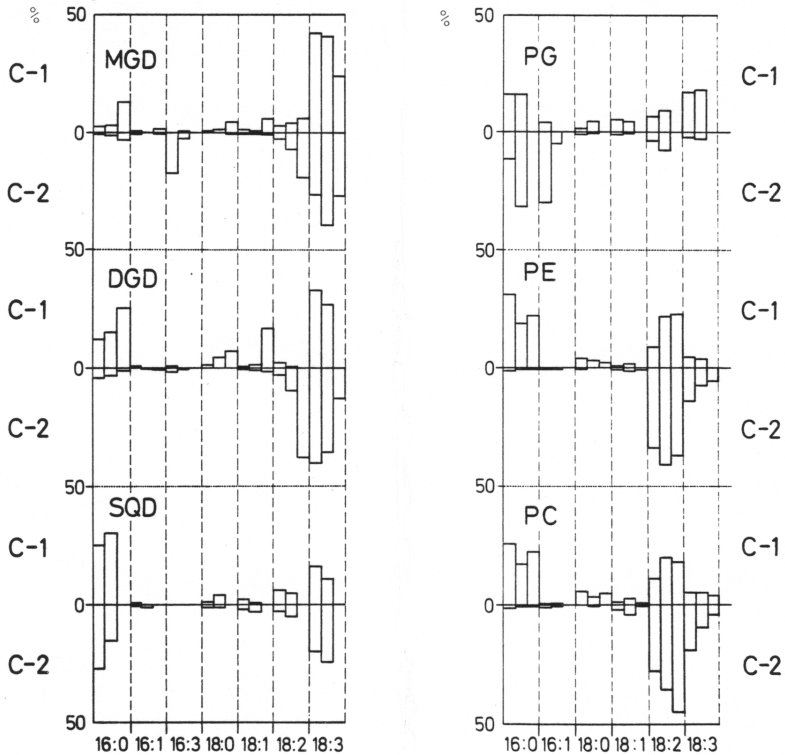
In den EMD-IT-behandelten, grünen Kulturen treten die beschriebenen Trends in der Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Lipide z. T. verstärkt auf. Eine Korrelation zur Konzentration des Herbizids im Nährmedium deutet sich an.

## 4.4 Positionsspezifische Verteilung der Fettsäuren in den Acyllipiden

Die Enzyme, die das individuelle, positionsspezifische Fettsäuremuster der einzelnen Lipide herstellen, arbeiten in den grünen Kulturen offensichtlich ebenso wie in den Blättern. Dies demonstrieren die durchgeführten Positionsanalysen (Abb. 4.2).

In den extraplastidären Phospholipiden PE und PC aus Blättern und grünen Kulturen ist die Palmitinsäure nahezu ausschließlich an C-1 lokalisiert. 3-tr- $C_{16:1}$  und  $C_{16:3}$  als Chloroplastenmarker besetzen die C-2-Position von PG bzw. MGD. Im PG als Chloroplastenlipid findet sich auch ein Großteil der  $C_{16:0}$  in der Innenposition. Dort füllt die Säure die Lücke auf, die der gegenüber Blatt-PG stark verringerte Anteil der 3-tr- $C_{16:1}$  im Lipid der Kultur hinterlässt. Die Palmitinsäure in den Chloroplastenlipiden DGD und SQD dominiert zwar am C-1-Atom, sie kommt aber auch zu einem gewissen Anteil in der Position C-2 vor, wie es für  $C_{16:3}$ -Pflanzen typisch ist (73). Die Ergebnisse der Positionsanalysen bestätigen die Verallgemeinerungen, die sich aus den Untersuchungen anderer  $C_{16:3}$ -Pflanzen ableiten lassen. Zum anderen sei betont, dass sich Blätter und grüne Kulturen grundsätzlich nicht in der Positionsverteilung der Fettsäuren in Phospho- und Glykolipiden unterscheiden. Daher scheint auch die Spezifität der enzymatischen Systeme, die diese asymmetrische Verteilung herbeiführen, in den grünen Kulturen nicht verändert zu sein.

In der heterotrophen Kultur ist das individuelle Muster der Fettsäurezusammensetzung in den einzelnen Lipiden einer gewissen Uniformität gewichen: Abgesehen vom MGD dominiert in allen Lipiden - auch im DGD - Linolsäure deutlich gegenüber Linolensäure, und der Prozentsatz der Palmitinsäure ist hoch. Diese Uniformität spiegelt sich auch in der positionsspezifischen Verteilung der Fettsäuren wider. Sie ist allgemein charakterisiert durch eine Präferenz der  $C_{16:0}$  an C-1, wie sie sonst nur in extraplastidären Phospholipiden so deutlich ausgeprägt ist. Insbesondere DGD ähnelt stark den Phospholipiden PE und PC in seinem Diglyceridanteil. Damit wird auch in der heterotrophen Kultur die Differenz in den Fettsäuremustern zwischen MGD und DGD aufrecht erhalten; dies geschieht, obwohl offensichtlich ein Parameter der Diversität zwischen MGD und DGD ausgefallen ist:  $C_{16:3}$  ist im MGD der bleichen Kulturen kaum noch nachweisbar, und mit einem hohen Gehalt an  $C_{16:0}$  trägt MGD ein Fettsäuremuster, das den Namen DGD verdient hätte. Dennoch weist DGD ein eigenes Fettsäuremuster mit besonderer, positionsspezifischer Verteilung auf, die an die Situation in  $C_{18:3}$ -Pflanzen erinnert. Deuten diese Fakten auf die Existenz zweier verschiedener Synthesewege des DGD hin - verschieden im Mechanismus und/oder in der Kompartimentierung?



**Abb. 4.2:** Positionsspezifische Verteilung der Fettsäuren zwischen C-1- und C-2-Position des Glycerinbausteins der individuellen Lipide aus Blättern (Balken an der linken Seite), grüner (mittlerer) und heterotropher Kulturen (rechter Balken) des Tabaks  
In ihren absoluten Längen repräsentieren die Balken zugleich die Fettsäurezusammensetzung (in Mol-%) der Lipide.

## 4.5 Zusammenfassung

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die grünen Gewebekulturen des Tabaks alle Lipide besitzen, die auch für die photosynthetischen Gewebe der Mutterpflanze charakteristisch sind. Dies trifft auch für das Vorkommen und die positionsspezifische Verteilung der Fettsäuren zu. Allerdings sind in den grünen Gewebekulturen die Chloroplasten eigenen Komponenten MGD, SQD,  $C_{16:3}$  und 3-tr- $C_{16:1}$  stark reduziert. Insbesondere der niedrige  $C_{16:3}$ -Gehalt, der für sich genommen die grünen Kulturen in die Nähe der  $C_{18:3}$ -Pflanzen rückt, bietet nun einen wichtigen Ansatz-

#### *4. Acyllipide in photosynthetisch aktiven Gewebekulturen des Tabaks*

---

punkt, in  $^{14}\text{C}$ -Markierungsversuchen die Rolle dieser Fettsäure im Hinblick auf die Linolensäuresynthese und die Galaktolipidsynthese zu untersuchen.



## **$^{14}\text{C}$ -Markierung der Lipide photosynthetisch aktiver, grüner Gewebekulturen des Tabaks**

### **5.1 Markierung der Fettsäuren im Lipidextrakt**

Die Markierung der Lipide mit dem Prekursor ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat war effektiver als die mit  $^{14}\text{CO}_2$ ; neben der Einlagerungsrate der Isotope zeigt dies die bevorzugte Inkorporation des Acetats - wie von Blattinkubationen her bekannt (155) - in die Acylreste der Lipide. So befanden sich ca. 35 - 40 % der gesamten Radioaktivität nach Methanolyse der Lipidextrakte in den Fraktionen der gereinigten F<sub>sm</sub>e bei Inkubationen verschieden alter Kulturen mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat, bei Inkubation der jüngsten mit  $^{14}\text{CO}_2$  jedoch nur 10 %.

Die geringe Markierung der Lipide der 20 Tage alten Kultur deutet an, dass deren Lipidmetabolismus ebenso wie das Wachstum der Kultur zu diesem Zeitpunkt stark reduziert ist. Dennoch weisen die RGC-Analysen der  $^{14}\text{C}$ -markierten Fettsäuren für die verschieden alten Kulturen auf den ersten Blick ein einheitliches Bild der Markierung auf (Tab. 5.1 B). Stets dominiert  $\text{C}_{18:1}$  in den Radioaktivitätsmustern (Methanolyse des totalen Lipidextraktes), geringere Aktivitätsanteile entfallen auf  $\text{C}_{16:0}$  und  $\text{C}_{18:2}$ .  $\text{C}_{18:3}$  wurde nur in Spuren markiert. Ähnliche Ergebnisse, die ebenso im Widerspruch zum Massenmuster der Fettsäuren stehen, jedoch mit deutlicherer Aktivitätseinlagerung in die Stearinsäure, wurden für Inkubationen heterotropher Kulturen erzielt (124).

Bei genauerer Inspektion der Tab. 5.1 fällt jedoch auf, dass der Radioaktivitätsanteil der  $\text{C}_{18:1}$  mit zunehmendem Alter der inkubierten Kulturen steigt und der der  $\text{C}_{16:0}$ , wenn auch geringfügiger, sinkt. Diese Veränderungen finden keine Parallele im Fettsäurenmassenmuster der Lipidextrakte.

## 5. $^{14}\text{C}$ -Markierung der Lipide photosynthetisch aktiver, grüner Gewebekulturen des Tabaks

---

Weitere Veränderungen auf quantitativer Ebene in Abhängigkeit vom Alter der inkubierten Kultur - angedeutet auch im Massenmuster der Totalfettsäuren durch veränderte Proportionen der  $\text{C}_{18:2}$  und  $\text{C}_{18:3}$  - wurden sichtbar, als die absolute Radioaktivität in den Fettsäuren auf ihre Mol-Masse bezogen wurde. Die geringere Einlagerungsrate der ältesten Kultur spiegelt sich in niedrigster spezifischer Aktivität ihrer Fettsäuren wider. In den Fettsäuren der jüngeren Kulturen steigt jedoch die spezifische Aktivität mit zunehmendem Alter der Kultur bis zum 10. Tag. Dieser Zuwachs korreliert mit hoher Proliferationsrate und Stoffwechselaktivität in der logarithmischen Wachstumsphase der Kulturen (13).

**Tab. 5.1:** Inkubation grüner Gewebekulturen des Tabaks mit  $^{14}\text{CO}_2$  und ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat  
3, 7, 10, 20 Tage alte grüne Gewebekulturen wurden 1,5 h lang in der Warburg-Apparatur inkubiert (2.2.2, S. 29).

#### A) Radioaktivität in den Lipidextrakten

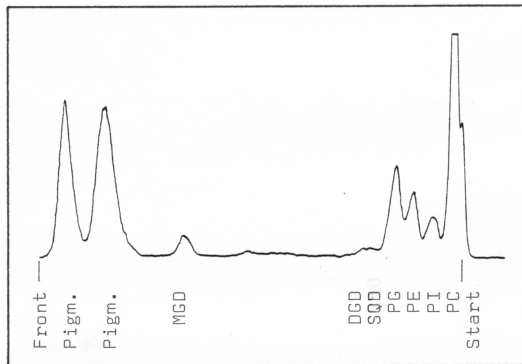
| Alter der Kultur in Tagen | $^{14}\text{C}$ -Prekursor | $\mu\text{g}$ Chl im Lipidextrakt | $10^6$ dpm im Lipidextrakt pro mg Chl | Radioaktivität in den Fs (%) |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| 3                         | $\text{CO}_2$              | 218                               | 0,665                                 | 10,0                         |
| 3                         | Acetat                     | 228                               | 27,4                                  | 38,3                         |
| 7                         | Acetat                     | 302                               | 27,1                                  | 39,7                         |
| 10                        | Acetat                     | 151                               | 64,0                                  | 40,4                         |
| 20                        | Acetat                     | 177                               | 1,04                                  | 35,0                         |

**B) Radioaktivität in den individuellen Fettsäuren (Methanolyse der totalen Lipidextrakte) in % von der Totalaktivität in den Fettsäuren, spezifische Aktivität der einzelnen Fettsäuren und der gesamten Fsme-Fraktion. Zusätzlich wird die Fettsäurezusammensetzung der Lipidextrakte in Mol-% angegeben.**

| Alter der Kultur in Tagen      | $^{14}\text{C}$ -Prekursor | $\text{C}_{16:0}$ | $\text{C}_{18:0}$ | $\text{C}_{18:1}$ | $\text{C}_{18:2}$ | $\text{C}_{18:3}$ | Total-Fs |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| Fettsäurezusammensetzung Mol-% |                            |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| 3                              | Acetat                     | 22,3              | 2,2               | 4,8               | 45,8              | 24,5              | -        |
| 7                              | Acetat                     | 19,9              | 3,0               | 5,2               | 43,4              | 28,4              | -        |
| 10                             | Acetat                     | 18,4              | 3,5               | 4,8               | 40,7              | 32,7              | -        |
| 20                             | Acetat                     | 22,0              | 3,8               | 3,8               | 31,4              | 38,0              | -        |
| Radioaktivität in %            |                            |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| 3                              | Acetat                     | 26,6              | 3,4               | 53,8              | 11,7              | tr                | -        |
| 7                              | Acetat                     | 18,5              | 3,2               | 60,9              | 17,5              | tr                | -        |
| 10                             | Acetat                     | 19,0              | tr                | 65,3              | 11,4              | 2,4               | -        |
| 20                             | Acetat                     | 18,5              | tr                | 72,1              | 09,4              | tr                | -        |
| Spezifische Aktivität dpm/nMol |                            |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| 3                              | Acetat                     | 90                | 119               | 841               | 19                | -                 | 75       |
| 7                              | Acetat                     | 151               | 176               | 1930              | 66                | -                 | 163      |
| 10                             | Acetat                     | 404               | n.a.              | 5290              | 109               | 29                | 391      |
| 20                             | Acetat                     | 3                 | n.a.              | 72                | 1                 | -                 | 4        |

## 5.2 Markierung der Fettsäuren in den individuellen Acyllipiden

Der nächste Schritt in der Analyse der radioaktiv markierten Lipide der Gewebekulturen war die Fraktionierung eines Extraktes in die einzelnen Acyllipide. Dabei trat die im Vergleich zu Blattlipiden bereits beschriebene Reduktion der Chloroplastenlipide in grünen Kulturen und die Dominanz extraplastidärer Phospholipide noch deutlicher zutage. Nach dreistündiger Inkubation einer 10 Tage alten Kultur mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat waren nur insgesamt 3,7 % der in die Lipidfraktion eingelagerten Radioaktivität in den Glykolipiden MGD (2,9 %), DGD und SQD nachweisbar, aber ca. 46 % in den Phospholipiden (Abb. 5.1), davon allein 27,8 % im PC.

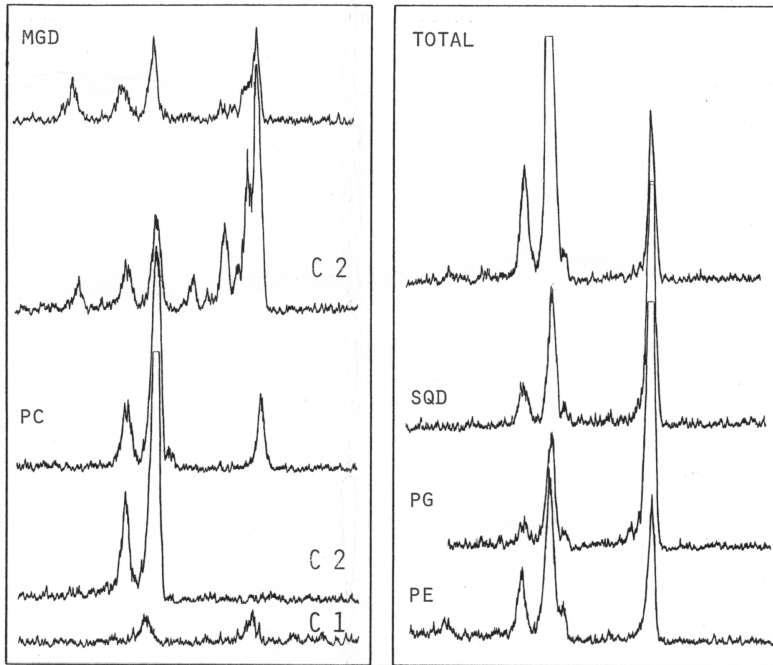


**Abb. 5.1:** Radioaktiv markierte Lipide einer zehn Tage alten, grünen Gewebekultur des Tabaks (DC-Scan, LM 3)

Die Kultur wurde 3 h lang mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat in der Warburg-Apparatur inkubiert.

In den einzelnen Lipiden der sieben Tage alten Kultur wurde die Markierung der Fettsäuren untersucht. Im PC ist  $\text{C}_{18:1}$  die eindeutig dominierende radioaktive Fettsäure (Abb. 5.2), ebenso im PE. Im PG dagegen sind ca. 70 % der Radioaktivität seiner Acylreste in  $\text{C}_{16:0}$  konzentriert.  $\text{C}_{18:3}$  konnte in keinem der genannten Phospholipide radioaktiv markiert registriert werden. Die radioaktiven Spuren, die von dieser Triensäure im Totalextrakt nachweisbar waren, finden sich im MGD wieder, wo ihr prozentualer Anteil von der Aktivität in den Fettsäuren 16 % ausmacht. Damit wird deutlich, wie sehr das beschriebene Markierungsmuster der Fettsäuren des Totalextraktes von den Phospholipiden und ihren Acylresten bestimmt wird.

Im MGD sind alle  $\text{C}_{18}$ -ungesättigten Fs etwa gleich stark markiert worden, dagegen übertrifft der Radioaktivitätsanteil der  $\text{C}_{18:1}$  in den bisher genannten Phospholipiden die zweite markierte  $\text{C}_{18}$ -Fs  $\text{C}_{18:2}$  um den Faktor 2,3 (PE) bis 4,8 (PG). Diese



**Abb. 5.2:** Radioaktiv markierte Fettsäuren einer sieben Tage alten, grünen Gewebekultur des Tabaks

TOTAL = Umesterung des gesamten Lipidextraktes, sowie  $^{14}\text{C}$ -Fs des SQD, PG, PE und Positionsanalyse des MGD und PC (C 1 = Fs der Position C-1, C 2 = Fs der Position C-2). Die Gewebekultur wurde 1,5 h lang mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat in der Warburg-Apparatur inkubiert. Erläuterungen zur Positionsanalyse und RGC s. Abb. 3.2 auf S. 72.

Markierungsmuster stützen die Hypothese, dass die Synthese der MGD eigenen  $\text{C}_{18:3}$  durch eine sequentielle Desaturierung der  $\text{C}_{18:1}$  in besonderer Weise von der Synthese dieser Triensäure separiert ist, die in extraplastidäre Phospholipide eingebaut wird (siehe auch Abb. 3.5).

Ein weiteres Charakteristikum des Fettsäuremusters des MGD ist die Markierung  $\text{C}_{16}$ -ungesättigter Fs, die bereits für MGD aus Blättern oben beschrieben wurde. Hier, im Falle der grünen Gewebekulturen des Tabaks, steht die Radioaktivität in  $\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{16:1}$ ,  $\text{C}_{16:2}$  und  $\text{C}_{16:3}$  allerdings in noch größerem Gegensatz zum Fettsäuremassenmuster des Lipids.

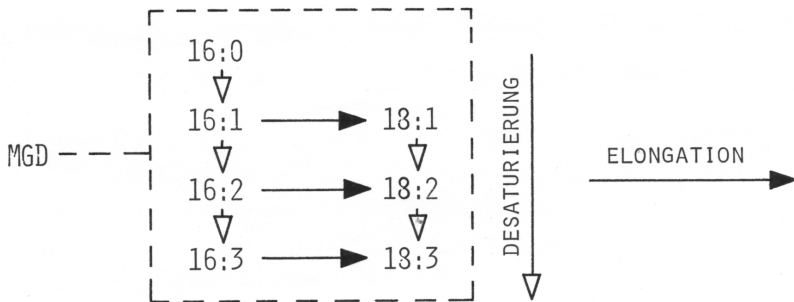
### 5.3 Positionsspezifische Verteilung der radioaktiv markierten Fettsäuren des MGD und PC

Die positionsspezifische Verteilung der radioaktiv markierten Fs des PC steht im Einklang mit anderen Analysedaten des in vivo markierten PC aus Blättern des Spinats, die schon ausführlich diskutiert worden sind. Mit radioaktiver  $C_{16:0}$  ist ausschließlich die sn-1-Position des Glycerinbausteins besetzt, während die markierten  $C_{18}$ -Säuren in beiden Positionen zu finden sind. Dabei deutet das Verhältnis der radioaktiven  $C_{16:0}/C_{18:1}$  der C-1-Position an, dass ca. 80 % der markierten  $C_{18:1}$  die Innenposition einnehmen. Die Ergebnisse der Positionsanalyse des MGD stehen im Gegensatz zu Analysen des MGD aus  $C_{16:3}$ -Pflanzen, deren Blätter in ebenso kurzzeitigen Inkubationen mit  $^{14}CO_2$  oder ( $^{14}C$ )-Acetat markiert wurden (155, 156). Zwar befinden sich, wie beschrieben, die radioaktiven  $C_{16}$ -Säuren in der C-2-Position, es waren aber nun auch markierte  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$  und  $C_{18:3}$  in der Lyso-Verbindung nachweisbar. Dieser Befund schränkt entweder die formale Separierung zweier  $C_{18:3}$ -Pools ein, die charakteristisch für  $C_{16:3}$ -Pflanzen ist (s. o.), es sei denn, die gewählte Inkubationszeit war zu lang, oder er disqualifiziert die grüne Gewebekultur des Tabaks als Vertreter der  $C_{16:3}$ -Pflanzen und rückt sie in die Nähe der  $C_{18:3}$ -Pflanzen, in deren MGD radioaktive  $C_{18}$ -Säuren die beiden Positionen am Glycerinbaustein symmetrisch besetzen. Es ist aber auch eine andere Interpretation der Ergebnisse möglich, die die Rolle der MGD-gebundenen  $C_{16:3}$  und die der  $C_{16:2}$  und  $C_{16:1}$  als Prekursoren der  $C_{18}$ -ungesättigten Fs in Betracht zieht.

Die vergleichende Analyse der Lipide aus Blättern des Tabaks und aus photosynthetisch aktiven, grünen Gewebekulturen hat ergeben, dass für Membransysteme der Chloroplasten typische Komponenten in den Kulturen in z. T. stark verminderter Menge vorkommen. Dazu zählen einerseits auf der Ebene intakter Lipide MGD und SQD, andererseits Fettsäuren, die spezifisch an Chloroplastenlipide gebunden sind: 3-tr- $C_{16:1}$  des PG und  $C_{16:3}$  des MGD. Als Grund für diesen Rückgang wurde eine verminderte Kapazität zur Desaturierung der Fs in den Chloroplasten angenommen. Während sich aber in PG der Precursor der Hexadecensäure in der für sie typischen C-2-Position anhäuft (Abb. 4.2), kann ähnliches für das positionsspezifische Fettsäuremuster des MGD nicht beobachtet werden. Hier füllt offensichtlich  $C_{18:3}$  die durch das Fehlen der  $C_{16:3}$  in der C-2-Position entstandene Lücke auf.

Die radioaktive Markierung der Lipide der grünen Gewebekultur zeigt, wie in der Tat parallel zum Massenmuster radioaktive  $C_{16:0}$  zur dominierenden Fs des PG wird, oder die  $^{14}C$ -Einlagerung in  $C_{18}$ -Dien- und Triensäuren der meisten Lipide gering ist. Bei der registrierten, starken Reduktion der  $C_{16:3}$  im MGD sollte man analog erwarten, dass die Radioaktivität in der Hexadecatriensäure und ihren Prekursoren  $C_{16:1}$  und  $C_{16:2}$  nur minimal oder überhaupt nicht festzustellen ist. Statt dessen wurden die Fettsäuren deutlich markiert. Sind sie Intermediate, die für die Synthese

ihrer  $C_{18}$ -Analoge notwendig sind, eines Synthesemechanismus, der in besonderer Weise mit der C-2-Position des MGD verknüpft und Grund dafür ist, dass nur im MGD die vollständige Serie der  $C_{18}$ -ungesättigten Fs deutlich markiert ist?



**Abb. 5.3:** Hypothese: MGD-gekoppelte Desaturierung und Elongation der  $C_{16}$ -Fs

Eine Weiterführung dieses Gedankens stimmt mit der Diskussion einer verminderten Desaturierungskapazität der Chloroplasten der grünen Kulturen überein. Wird nämlich die Desaturierung der  $C_{16:0}$  zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der  $C_{18:X}$ -Synthese, erfassen die Elongationsreaktionen die gebildeten  $C_{16:X}$ -Intermediate vollständig, so dass sich diese nicht anhäufen können. MGD-gekoppelte Desaturierung und Elongation wirken also möglicherweise in sinnvoller Weise zusammen. Als Dunkelkulturen von *Euglena* ergrünt - in diesem Zustand stellt  $C_{18:3}$  noch eine Nebenkomponeute dar - akkumulierte nicht nur  $C_{18:2}$ , sondern auch  $C_{16:2}$  im MGD (21).

Unter dem Aspekt der MGD-gekoppelten Desaturierung und Elongation der  $C_{16}$ -Fs, für die es weitere Indizien gibt (Kinetik der  $^{14}C$ -Inkorporation in die Fs des MGD, Anzahl der durch  $AgNO_3$ -DC bestimmbaren, radioaktiven MGD-Spezies (155, 156)), wäre es interessant, eine heterotrophe bleiche Gewebekultur mit ( $^{14}C$ )-Acetat zu inkubieren, in deren MGD  $C_{16:3}$  kaum noch nachweisbar ist, in der MGD aber das alleinige Lipid ist, in dem die Linolensäure ihre dominierende Rolle im Fettsäuremuster behaupten kann.

5.  $^{14}\text{C}$ -Markierung der Lipide photosynthetisch aktiver, grüner Gewebekulturen des Tabaks

---



## **Charakterisierung der Lipide der Envelopes der Spinatchloroplasten**

Die beiden Membranen des Envelope der Chloroplasten stellen die strukturelle und stoffwechselphysiologische Grenze zwischen Cytoplasma und Stroma dar. Sie verhindern eine unkontrollierte Durchmischung der löslichen Komponenten beider Kompartimente, und verschiedene Translokatoren der inneren Envelopemembran vermitteln andererseits den spezifischen Austausch von Intermediaten und Ionen. Diese wichtige Funktion im intrazellulären Transport mag möglicherweise bis in die makromolekulare Ebene hinaufreichen, da der Envelope die Determinanten enthält, die darüber entscheiden, ob ein im Cytoplasma synthetisiertes Protein in das Chloroplasteninnere gelangen kann oder nicht (42, 103).

Die Ausarbeitung einer Isolationstechnik war Voraussetzung für die Untersuchung der Zusammensetzung und der biosynthetischen Kapazität des Envelope (39, 41). Es stellte sich heraus, dass sich die Lipidgemische in Envelopes und Thylakoiden mit Ausnahme des Chlorophylls sehr ähneln. Dies mag andeuten, dass der Chloroplast Permeabilitätsbarrieren in seinen Membransystemen ökonomisch aufbaut, indem in ein ähnliches Set von Lipiden als Matrix verschiedene Proteine eingesetzt werden, die die verlangten Spezifitäten bewirken.

Die Lipidzusammensetzung des Envelope gewann besonderes Interesse, als gezeigt werden konnte, dass eine Vielzahl wesentlicher, lipidmetabolisierender Enzyme und damit die Kapazität zur Synthese der wichtigsten Membranlipide in Chloroplasten, nämlich der Galaktolipide, im Envelope lokalisiert ist. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse ist ein massiver Transport von Galaktolipiden aus dem Envelope in die Thylakoide hinein zu postulieren, ein Umstand, der die Ähnlichkeit der Lipidmuster beider Membransysteme erklären könnte. Andererseits sollte der Envelope im ER synthetisierte und herantransportierte Phospholipide oder Lipidbausteine aufnehmen und für den weiteren Transport in die Thylakoide hinein sorgen.

Bevor wir begannen, mit radioaktiven Markierungsexperimenten diese Beziehung zwischen ER-, Envelope- und Thylakoidlipiden und die Galaktolipidsynthesekapazität des Envelope zu studieren, führten wir eine detaillierte Analyse der Lipide der Hüllmembranen durch. Wir interessierten uns dabei insbesondere für die beschriebenen, spezifischen Unterschiede in den Diglyceridbausteinen innerhalb der Gruppe der Galaktolipide, da die Grundlage für die Herstellung spezifischer Lipidmuster einer Membran einerseits und des charakteristischen Fettsäuremusters ihrer Lipide andererseits die Kompartimentierung bestimmter Syntheseleistungen der Lipidgenese sein kann. So waren wir gespannt, ob die Lipidzusammensetzung des Envelope, der der alleinige Syntheseort der Gl sein soll, uns nicht überrascht mit einem einfachen Fettsäuremuster in den Gl, das eben nicht jene komplexen Differenzen aufweist, wie wir sie aus Blattextrakten kennen, sei es, weil der Envelope bei der Galaktolipidsynthese nur mit bestimmten Fettsäuren versorgt wird, weil dort Acyltransferasen mit charakteristischer Aktivität agieren, sei es, weil dort charakteristische Galaktosyltransferasen sitzen, die möglicherweise nur einen Teil der insgesamt in der Zelle vorkommenden Gl synthetisieren, oder sei es, dass die hier hergestellten Galaktolipide nach einem Transport, z.B. in die Thylakoide hinein, verändert werden.

Die Envelopes wurden mit dem Aufschluss des Blattgewebes beginnend in Sucrose/Tricin-Puffersystemen bei pH 7,6 isoliert. Die qualitative und quantitative Analyse der Lipide der gesammelten Fraktionen mehrerer Aufarbeitungen schloss die Positionsanalyse und Massenspektroskopie der Komponenten ein.

### 6.1 Pigmente und Lipide des isolierten Envelope

Einzige Pigmente, die aus der Envelope-Suspension extrahiert werden konnten, waren Carotinoide (0,2 % des Lipidgewichtes). Das Fehlen von Chlorophyll wies aus, dass die Präparation nicht mit Thylakoid-Membranpartikeln verunreinigt war. Ein anderer, negativer Lipidmarker, PE (39, 40, 105), der aus ER- und Mitochondrien-Membranen stammen mag, wurde in kleinen Mengen gefunden. Das Carotinoidmuster gleicht den zuvor bestimmten Verhältnissen (36, 38, 87, 89):

β-Carotin 15,5 %

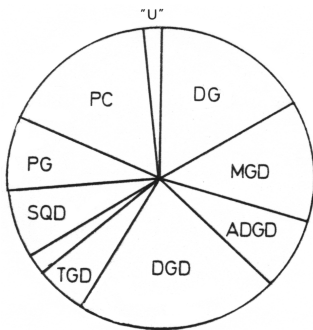
Lutein und Zeaxanthin 22,9 %

Violaxanthin 53,5 %

Neoxanthin 8,6 %

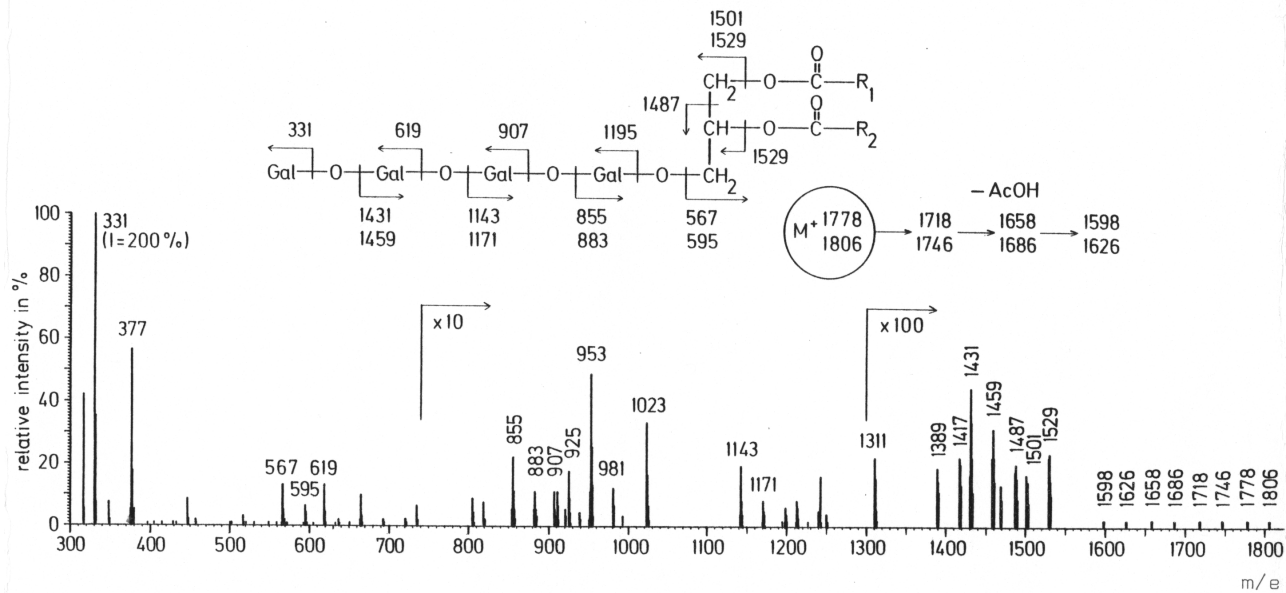
Das Muster zeigt, dass Envelopes, die aus zuvor verdunkelten Blättern isoliert wurden, mehr Violaxanthin (bis zu 3,5 x mehr) als Lutein und Zeaxanthin enthalten, während Envelopes, aus beleuchteten Blättern isoliert, ein kleineres Verhältnis aufweisen (0,75). Ursache dieser Differenzen kann ein Austausch des Violaxanthins zwischen Envelope- und Thylakoidmembranen sein (159).

Den Anteil der individuellen Acyllipide geben Tab. 6.3 und Abb. 6.1 wieder. Alle Lipide zusammengenommen (Trockengewicht) machen 69 % des Gewichtes der Envelopemembranen aus; ihr Proteingehalt ist daher sehr niedrig. Andere Autoren haben Werte von 0,8 (132), 1,2 (38) und 2 (90) mg Lipid/mg Protein angegeben. Der geringe Proteinanteil des Systems könnte zur Folge haben, dass große, proteinfreie Lipid-Bilayer-Flächen entstehen (162), die den unkontrollierten Ionenfluss durch die Membran hindurch reduzieren (127), aber auch die Labilität der Membran im Vergleich zu Thylakoiden bewirken könnten.



**Abb. 6.1:** Acyllipide aus isolierten Envelopes des Spinats

Galaktolipide repräsentieren etwa die Hälfte der Acyllipide des Envelope. Die Identität des TeGD, dessen chemische Strukturanalyse kürzlich beschrieben wurde (116), bestätigte die Massenspektroskopie des acetylierten Lipids (Abb. 6.1). Details, wie die anomere Konfiguration und Lokalisation der glykosidischen Bindungen, konnten aus dem Massenspektrum jedoch nicht abgeleitet werden. Im Zusammenhang mit der beschriebenen, chemischen Strukturanalyse (116) kann die Struktur 1.2-Diacyl-3-O-( $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6')-O- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6')O- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-(1'-6')-O- $\beta$ -Dgalaktopyranosyl)-sn-glycerin angenommen werden. Das Massenspektrum des TGD war identisch mit einem zuvor veröffentlichten (183).



**Abb. 6.2:** Massenspektrum des acetylierten Tetragalaktosyldiacylglycerins (TeGD) aus isolierten Envelopes (Spinat, 191)  
 Erläuterungen zur Massenspektroskopie siehe 2.4.4, S. 52 und 2.5.3, S. 54.

**Tab. 6.1:** Fettsäurezusammensetzung des ADGD in Mol-% aus isolierten Envelopes des Spinats

A) Berechnet aufgrund eines Transfers der Fettsäuren aus beiden Positionen der im isolierten Envelope zur Verfügung stehenden, möglichen Donatorlipide MGD, DGD und MGD + DGD.  
B) Tatsächlich registriertes Fettsäuremuster des ADGD.

| Donor                | C <sub>16:0</sub> | C <sub>16:3</sub> | C <sub>18:0</sub> | C <sub>18:1</sub> | C <sub>18:2</sub> | C <sub>18:3</sub> |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A)                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| MGD                  | 10,6              | 9,3               | 1,6               | 4,2               | 5,1               | 69,2              |
| DGD                  | 13,1              | 5,1               | 1,7               | 5,1               | 5,9               | 68,0              |
| MGD + DGD            | 11,9              | 7,2               | 1,6               | 4,7               | 5,5               | 69,0              |
| C-2-Position des MGD | 9,6               | 16,9              | 1,1               | 3,9               | 5,4               | 63,0              |
| B)                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| ADGD                 | 9,7               | 17,5              | 1,3               | 3,4               | 2,5               | 64,3              |

Mit Hilfe der Massenspektroskopie konnte auch ein Galaktolipid charakterisiert werden, das bislang noch nicht in Envelope-Lipidextrakten festgestellt worden war: ADGD (78). Sein Anteil macht nahezu 8 % aller Glycerolipide aus. ADGD und MGD verhalten sich bei der DC in LM 1 ähnlich. Dies mag auch der Grund dafür sein, dass der hier angegebene Prozentsatz für MGD niedrig erscheint (39), die Summe MGD + ADGD gleicht aber den aus der Literatur bekannten Daten (Tab. 6.2).

Die Entstehung von acylierten Galaktolipiden bei niedrigen pH-Werten in Blatt-homogenaten nach Zerstörung der Kompartimente ist als Artefakt gedeutet worden (72). Envelope-Suspensionen, bei pH 7,2 und pH 8,5 aus gleichem Blattmaterial isoliert, inkorporierten aber beide bei Inkubation mit UDP-(<sup>14</sup>C)Gal, pH 7,2, (<sup>14</sup>C)Gal in AGD, das in beiden Suspensionen auch bei pH 8,5 umgesetzt wurde zu MGD (17). Inkubiert bei noch niedrigeren pH-Werten, synthetisieren Envelope-Suspensionen große Mengen AGD, aber nicht ADGD (17, 75). Die hier analysierten Envelopes enthielten dagegen nur Spuren von AGD (Identität durch Massenspektroskopie des acetylierten Lipids nachgewiesen), aber eine große Menge ADGD. Ein weiterer, interessanter Aspekt ergibt sich, wenn man die Fettsäurezusammensetzung des ADGD vergleicht mit theoretisch berechneten Werten (Tab. 6.1). Das tatsächlich registrierte Muster des Envelope-ADGD wäre demnach nur Resultat eines spezifischen Acyltransfers der Fettsäuren der C-2-Position des MGD. Eine solche Spezifität konnte bei in vitro Untersuchungen des Acyltransfers nicht beobachtet werden (76). Deuten diese Details an, dass ADGD oder acylierte Galaktolipide allgemein in vivo eine besondere Funktion haben?

Ca. 25 % der Acyllipide des Envelope sind Phospholipide: PC, PG und die Komponente 'U', die sich chromatographisch in verschiedenen Laufmittelsystemen wie PI verhielt, aber durch keine der Phospholipasen vom Typ D, C oder A, oder

**Tab. 6.2:** Absolute und relative Lipidzusammensetzung isolierter Envelopes und Thylakoide der Chloroplasten des Spinats

a) Isoliert bei pH 7,6, b) isoliert bei pH 8,5.

|                        | MGD  | DGD  | TGD | TeGD | DG   | SQD | PG  | PC   | PI  |
|------------------------|------|------|-----|------|------|-----|-----|------|-----|
| <b>Envelopes</b>       |      |      |     |      |      |     |     |      |     |
| Joyard, Douce (89), a) |      |      |     |      |      |     |     |      |     |
| μg/mg Protein          | 300  | 380  | 60  | 10   | -400 | 80  | 100 | 240  | 20  |
| Gewichts-%             | 21,5 | 27,2 | 4,3 | 0,7  | 14,3 | 5,7 | 7,2 | 17,2 | 1,4 |
| van Besouw (17), b)    |      |      |     |      |      |     |     |      |     |
| μg/mg Protein          | 570  | 455  | 23  |      | 22   | 34  | 120 | 180  |     |
| Gewichts-%             | 36   | 29   | 1,4 |      | 1,4  | 2,2 | 7,6 | 17,0 |     |
| <b>Thylakoide</b>      |      |      |     |      |      |     |     |      |     |
| Douce, Joyard (39)     |      |      |     |      |      |     |     |      |     |
| Gewichts-%             | 51   | 26   |     |      |      | 7   | 9   | 3    | 1   |

durch Lipase aus *Rhizopus arrhizus* spaltbar und aufgrund massenspektroskopischer Daten nicht identisch ist mit tierischem PI.

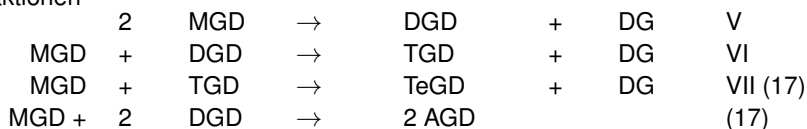
Die in Tab. 6.3 wiedergegebenen Werte bestätigen den hohen Diglyceridanteil (90) und die Verhältnisse  $MGD/DGD = 0,6 < 1$  und  $PG/PC = 0,4$  (39); Thylakoide enthalten nur Spuren DG, und MGD/DGD und PG/PC verhalten sich dort wie 2/1 und 3/1 (39).

Neben diesen Hauptkomponenten des Lipidgemisches aus Envelopemembranen konnten noch einige andere Lipide in Spuren erkannt werden. Dazu gehören, auch massenspektroskopisch identifiziert, TG, AGD, SG und PA, das aufgrund seines chromatographischen Verhaltens in verschiedenen LM (1, 2, 5) und seiner Farbreaktionen mit Sprühreagenzien als solches angesprochen wurde. Fettsäuren, Acylsterylglykosid und Cardiolipin waren nicht nachweisbar, obwohl ihr Vorkommen in Envelopes von anderen Autoren angegeben wird (132, 133). Wenn der geringe Gehalt an PE (38, 64, 89) nicht als endogener Bestandteil (132, 133), sondern als Kontamination diskutiert wird, müssen die oben genannten Spuren bestimmter Lipide eventuell ebenso unter diesem Aspekt betrachtet werden.

Wenn auch die geschilderte Lipidzusammensetzung der isolierten Envelopes gut mit früheren Analysen von R. Douce und J. Joyard übereinstimmt (36, 41, 89, 90), so sind andererseits Diskrepanzen quantitativer Art mit anderen Autoren festzustellen (64, 132, 133), obwohl sie alle vom selben Material ausgingen: Spinatblättern. Neben manchen endogenen und exogenen Faktoren der Anzucht, die das Blattmaterial verschieden werden lassen, neben methodischen Verschiedenheiten der Präparation, die Intaktheit, Ausbeute und Reinheit beeinflussen mögen, hat A. van Besouw auf einen Umstand aufmerksam gemacht, der die Lipidzusammensetzung der Membran entscheidend beeinflussen kann: den pH-Wert während der Isolationsprozedur und

eventueller Inkubation der isolierten Envelopes. Aus Envelopemembranen, isoliert bei pH 8,5, konnte er nur geringe Mengen an DG extrahieren, und der Prozentanteil des MGD war mit 36 % 7 % größer als der des DGD (d.h.  $\text{MGD/DGD} > 1$ ). Den Unterschied zu den beschriebenen Proportionen in bei pH 7,6 isolierten Envelopes führt er zurück auf die Aktivität der Interlipid-Galaktosyltransferase(n), die nur bei relativ niedrigem pH-Wert Galaktosylreste des MGD auf MGD, DGD und TGD übertragen und dabei DG freisetzen sollen. Als Folge dieses Reaktionsmechanismus können bei der verwendeten Isolationstechnik auch die hier beschriebenen Daten beeinflusst und die Proportionen des DG und der GL gegeneinander verschoben worden sein (Tab. 6.2). Allerdings, dies betont der Autor auch, ist die Intergalaktolipid-Galaktosyltransferase bei niedrigen Temperaturen, i.e. während der Zentrifugation, kaum aktiv. Daher könnten die DG- und GL-Pools des Envelope vielmehr durch die Vorbehandlung der Blätter beeinflusst werden; bei Stillstand des photosynthetischen Elektronentransportes sinkt der pH des Stromas in den Bereich ab, in dem Galaktolipid:Galaktolipid-Galaktosyltransferasen aktiv sind. Die zur Isolation des Envelope verwendeten Blätter stammten von Pflanzen, die in den frühen Morgenstunden geerntet und bis zur Aufarbeitung quasi im Dunkeln aufbewahrt wurden. Dies spiegelt sich z.B. im registrierten Verhältnis Violaxanthin/Zeaxanthin wieder.

Kalkuliert man auf der Basis der registrierten Quantitäten der GL und des DG eine „ursprüngliche“ Lipidzusammensetzung des Envelope, indem man die möglichen Reaktionen



zurückverfolgt, dann ergeben sich die Mol-%-Sätze MGD 43,3 und DGD 27,2 - die den von van Besouw bestimmten Werten - eher aber den Proportionen in Thylakoiden ähneln (Tab. 6.2).

## 6.2 Fettsäurezusammensetzung der Acyllipide der isolierten Envelopes

Die Daten der Fettsäureanalyse der individuellen Glycerolipide, auch die der NebenkompONENTEN erfassend, die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben waren, sind in Tab. 6.3 zusammengefasst.

Sowohl Di- als auch Triacylglycerin enthalten hohe Anteile von  $C_{16:3}$  und  $C_{18:3}$ , ebenso wie die Galaktolipide, von denen DGD den niedrigsten Gehalt an  $C_{16:3}$ , aber den höchsten an  $C_{16:0}$  aufweist.

SQD enthält zu etwa gleichen Teilen  $C_{16:0}$  und  $C_{18:3}$  und kann aufgrund dieses Musters deutlich von Galakto- und Phospholipiden unterschieden werden. Ebenso einzigartig ist das Fettsäuremuster des PG, weil es große Mengen von 3-tr- $C_{16:1}$  enthält, die in keinem anderen Lipid nachweisbar ist (s. Abschnitt 2.4.4 S. 52).

Die anderen Phospholipide PC, PE und Ü<sup>o</sup> weisen einen höheren Anteil an  $C_{16:0}$  auf und höhere Niveaus der  $C_{18:1}$  und  $C_{18:2}$ .

Wenn ein Vergleich mit einer Analyse später isolierter Thylakoide erlaubt ist, sind MGD, DGD und PC des Envelope gesättigter als die Thylakoidlipide (40, Tab. 6.4).

### 6.3 Positionsspezifische Verteilung der Fettsäuren in den Acyllipiden der isolierten Envelopes

Die Verteilung der Fettsäuren auf die Positionen sn-1 und sn-2 des Glycerinbausteins der Envelopelipide, analysiert durch Lipase- und Phospholipase  $A_2$ -Hydrolyse, ist in Abb. 6.3 dargestellt. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Verteilungsmuster, wie sie bisher nur für Lipide aus ganzen Blättern der  $C_{16:3}$ -Pflanzen bekannt waren, auch auf der Ebene der isolierten Hüllmembranen vorliegen.  $C_{16:3}$  - sofern sie in einem Lipid registriert werden konnte (DG, MGD - TGD) - ist in der sn-2-Position konzentriert, und auch  $C_{16:0}$  ist in erheblichen Anteilen in der C-2-Position typischer Chloroplastenlipide, wie DGD, SQD und PG verestert. 3-tr- $C_{16:1}$  besetzt exklusiv die C-2-Position im PG.

Die Phospholipide PE und PC weisen andere Verteilungsmuster auf und bilden daher eine eigene Gruppe. Sie schließen  $C_{16}$ -Fs von ihrer sn-2-Position nahezu vollständig aus. Die beiden Lipide kommen auch nicht in blaugrünen Algen vor (119), deren Vorfahren als phylogenetische Vorstufe der Plastiden angesehen werden. Die sn-1-Position der Acyllipide dieser Prokaryonten wird aber in strenger Kettenlängenspezifität mit  $C_{18}$ -, die sn-2-Position mit  $C_{16}$ -Fettsäuren besetzt (151, 183, Ausnahme: *Anacystis*). Daher wird das positionsspezifische Verteilungsmuster der Envelopelipide wie das der Thylakoidlipide (Tab. 6.4) als prokaryontes Merkmal des Organells angesehen (183). Man könnte spekulieren, dass alle Lipide, die zumindest einen Teil ihrer  $C_{16}$ -Fs in der C-2-Position des Glycerins tragen, im Chloroplasten synthetisiert werden. Während rekonstituierte Systeme aus isolierten Stroma- und Envelopefraktionen DG synthetisierten und UDP-Gal in MGD inkorporierten (88), und isolierte, intakte Chloroplasten SQD synthetisieren können (s.u.), konnte allein die Bildung von PG durch Chloroplasten- oder Envelopefraktionen noch nicht beobachtet werden (90).



**Tab. 6.3:** Fettsäurezusammensetzung (in Mol-%) des totalen Lipidextraktes (Total) und der einzelnen Acyllipide aus isolierten Envelopes des Spinats

Der Mol-Prozentsatz der Komponenten von der Gesamtheit der bestimmten Acyllipide ist in der letzten Spalte angegeben (einschließlich der Standardabweichung des Mittelwertes aus vier Bestimmungen). U = unbekanntes Phospholipid; chromatographische Eigenschaften wie PI.

|       | $C_{16:0}$ | $C_{16:1}$ | $3 - tr - C_{16:1}$ | $C_{16:2}$ | $C_{16:3}$ | $C_{18:0}$ | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ | $C_{20:0}$ | Mol-% | $\pm s_{\bar{x}}$ |
|-------|------------|------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|-------------------|
| Total | 14,0       | 0,4        | 3,6                 | tr         | 9,3        | 0,6        | 3,9        | 8,0        | 59,8       | 0,4        |       |                   |
| TG    | 5,5        | 0,6        | 0,5                 | tr         | 13,7       | 4,7        | 9,0        | 12,6       | 54,5       | 0          | tr    |                   |
| DG    | 5,7        | 0,8        | 1,0                 | tr         | 15,2       | 0,9        | 2,9        | 3,7        | 69,9       | 0          | 16,8  | 0,36              |
| MGD   | 5,2        | 0,7        | 0                   | tr         | 17,3       | 1,2        | 2,3        | 3,2        | 68,9       | D          | 13,2  | 0,14              |
| DGD   | 13,1       | 0,8        | tr                  | 0,3        | 5,1        | 1,7        | 5,1        | 5,9        | 68,0       | 0          | 21,6  | 0,33              |
| TGD   | 4,8        | 2,2        | 0                   | 0          | 18,8       | 0,7        | 2,3        | 1,7        | 69,6       | 0          | 5,2   | 0,07              |
| TeGD  | 8,8        | 2,0        | 0                   | 0          | 23,1       | 3,9        | 4,4        | 1,9        | 55,9       | 0          | 2,1   | 0,14              |
| ADGD  | 9,7        | 0          | 0                   | 0          | 17,5       | 1,3        | 3,4        | 2,5        | 64,3       | 0          | 7,8   | 0,12              |
| SQD   | 44,0       | tr         | 0                   | 0          | 1,8        | 1,2        | 1,9        | 5,0        | 46,1       | 0          | 7,5   | 0,18              |
| PG    | 17,9       | 0,7        | 33,6                | 0          | 0,5        | 1,0        | 2,0        | 4,4        | 39,3       | 0,9        | 7,3   | 0,19              |
| PC    | 20,5       | 1,3        | tr                  | tr         | 0,5        | 1,5        | 13,2       | 25,9       | 36,8       | 0,3        | 16,5  | 0,74              |
| U     | 31,6       | 6,7        | 0                   | 0          | 1,2        | 4,5        | 10,7       | 16,5       | 28,7       | 0          | 1,3   | 0,06              |
| PE    | 30,7       | 7,2        | 0                   | 0          | 0          | 4,5        | 13,3       | 18,4       | 25,9       | 0          | tr    |                   |

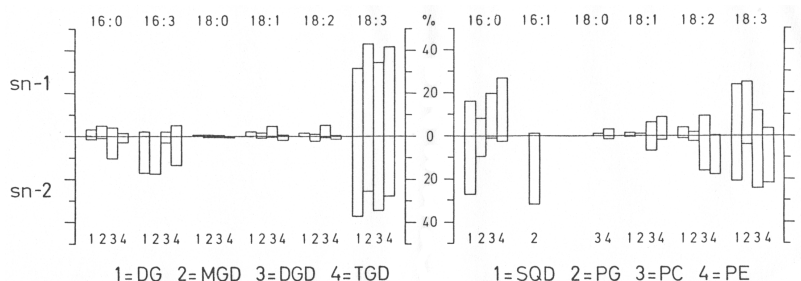
**Tab. 6.4:** Fettsäurezusammensetzung (in Mol-%) der einzelnen Acyllipide aus Blättern (**B**) und isolierten Thylakoiden (**T**) des Spinats und Anteile der einzelnen Fettsäuren in der C-2-Position in % (% an C-2)

Es wurden die Fraktionen  $B_{2,5h}$  und  $T_{2,5h}$  (2.2.5 S. 37, Experiment I) analysiert.

|              | $C_{16:0}$ | $C_{16:1}$ | $3-tr-C_{16:1}$ | $C_{16:2}$ | $C_{16:3}$ | $C_{18:0}$ | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ |
|--------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| MGD <b>B</b> | 0,9        | 0,3        | 0               | 0,2        | 26,6       | 0,3        | 0,8        | 0,7        | 70,3       |
| % an C-2     | 57,2       |            |                 |            | 100        |            | 21,4       | 53,5       | 27,5       |
| MGD <b>T</b> | 13,3       | tr         | 0               | tr         | 20,8       | tr         | 0,8        | 1,0        | 64,1       |
| % an C-2     | 3,8        |            |                 |            | 100        |            | 6,3        | 60,0       | 40,7       |
| DGD <b>B</b> | 9,1        | 0,5        | 0               | 0          | 3,2        | 1,2        | 3,3        | 2,0        | 80,0       |
| % an C-2     | 73,1       |            |                 |            | 56,2       | 27,1       | 14,4       | 46,9       | 49,8       |
| DGD <b>T</b> | 4,3        | 8,4        | 0               | 0          | 4,4        | 1,7        | 1,4        | 0,8        | 79,0       |
| % an C-2     | 72,1       | tr         |                 |            | 94,3       | 5,9        | 7,1        | 37,5       | 53,5       |
| SQD <b>B</b> | 44,1       | tr         | 0               | 0          | 1,0        | 2,2        | 3,4        | 4,0        | 43,6       |
| SQD <b>T</b> | 40,8       | tr         | 0               | 0          | 1,3        | 0,5        | 1,7        | 4,9        | 50,8       |
| % an C-2     | 88,1       |            |                 |            |            |            |            |            | 27,7       |
| PG <b>B</b>  | 17,7       | 0,9        | 34,6            | 0          | 0          | 1,6        | 3,3        | 4,2        | 37,8       |
| % an C-2     | 41,4       |            | 100             |            |            | 0          | 0          | 28,6       | 0          |
| PG <b>T</b>  | 17,7       | tr         | 36,5            | 0          | 0          | tr         | tr         | 2,0        | 43,8       |
| % an C-2     | 73,0       |            | 100             |            |            | 0          | 0          | 0          | 0          |
| PC <b>B</b>  | 23,3       | 1,3        | 0               | 0          | 0          | 1,7        | 11,1       | 25,6       | 37,0       |
| % an C-2     | 2,8        |            |                 |            |            |            | 53,2       | 68,4       | 70,0       |
| PC <b>T</b>  | 19,3       | tr         | 0               | 0          | 0          | tr         | 7,3        | 32,6       | 40,4       |
| % an C-2     | 6,7        |            |                 |            |            |            | 62,7       | 45,1       | 72,4       |
| PE <b>B</b>  | 28,3       | 1,5        | 0               | 0,4        | 0          | 1,7        | 7,3        | 34,1       | 26,7       |

## 6.4 Fettsäurekombinationen in den Acyllipiden der isolierten Envelopes

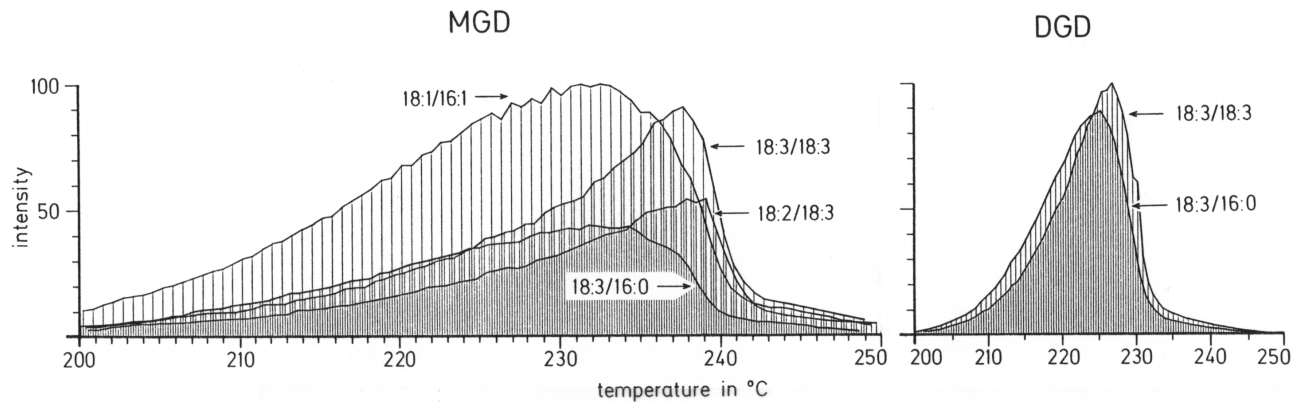
Die Paarung der Fettsäuren in den Glycerinbausteinen der Acyllipide wurde massenspektroskopisch untersucht. Für die direkte Injektion der Proben wurden die Galaktolipide acetyliert, SQD in den Triacetatmethylester umgewandelt, die Acylglycerine aus den Phospholipiden freigesetzt und ebenfalls acetyliert. Während der Verdampfung der Proben wurden mehrere Spektren unter besonderer Beachtung der Diglyceridfragmente aufgenommen und gemittelt (Abb. 6.5). Dies war notwendig, da verschiedene Spezies der Lipidprobe unterschiedlich schnell evaporieren.



**Abb. 6.3:** Positionsspezifische Verteilung der Fs zwischen C-1 und C-2 am Glycerinbaustein der Lipide des isolierten Envelopes (Spinat)

Qualitative und quantitative Aspekte des Verfahrens wurden in folgendem Versuch abgesichert.

Synthetische Mischungen aus vier bekannten MGD- und zwei DGD-Spezies wurden in das Massenspektrometer injiziert und die Intensitäten ihrer relevanten Diglyceridfragmenten während der Heizperiode in kurzen Abständen registriert. Diese Intensitäten sind in Abb. 6.4 als Funktion der Einlasstemperatur bei Aufheizen des Einlassblocks mit konstanter Rate aufgezeichnet. Im Falle des MGD wurde deutlich sichtbar, wie die Verdampfungsperiode der  $C_{18}/C_{16}$ -Kombinationen gegen tiefere Temperaturen verschoben ist. Derselbe Effekt konnte für DGD beobachtet werden, wenn auch die Überlappung der Evaporationskurven größer ist. Offensichtlich ist der Beitrag der Äthylgruppen zum Molekulargewicht des acetylierten DGD geringer als der zum acetylierten MGD. Für unser Analysenziel ist aber die Feststellung wichtig, dass keine Differenzen in der Verdampfungsperiode zwischen  $C_{18:3}/C_{16:0}$ - und  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -Spezies des MGD bestehen. Dieses Ergebnis kann auf DGD übertragen werden. Daher ist der Schluss gerechtfertigt, dass die aufgenommenen Massenspektren die Proportionen der Lipidspezies richtig wiedergeben, die sich nicht in der Kettenlänge, sondern nur in der Zahl ihrer Doppelbindungen unterscheiden. Das fast völlige Fehlen der  $C_{18:3}/C_{16:3}$ -Spezies des DGD (im Gegensatz zur Dominanz der  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -Spezies) kann also mit größter Wahrscheinlichkeit auf die tatsächliche Abwesenheit dieser Spezies in der Probe zurückgeführt werden und nicht auf Operationsbedingungen der Analyse. Ein quantitativer Vergleich von  $C_{18}/C_{16}$ - und  $C_{18}/C_{18}$ -Kombinationen dürfte dagegen mit größerem Fehler behaftet sein (Tab. 6.5).



**Abb. 6.4:** Relative Intensitäten der Diglyceridfragmentionen einer MGD-Lösung aus vier definierten Spezies und einer DGD-Lösung aus zwei definierten Spezies in Abhängigkeit von der Einlasstemperatur beim Aufheizen des Einlassblocks des Massenspektrometers mit konstanter Rate

**Tab. 6.5:** Quantitative Bestimmung (Mol-%) der Fettsäurezusammensetzung und der einzelnen Komponenten einer Lösung aus vier definierten MGD-Spezies durch GC der Fsme und MS der acetylierten MGD (Integration der Verdampfungskurven, Abb. 6.4)

| Fs                | GC   | MS   | Spezies                              | GC   | MS   |
|-------------------|------|------|--------------------------------------|------|------|
| C <sub>16:0</sub> | 7,3  | 8,7  | C <sub>18:3</sub> /C <sub>18:0</sub> | 14,6 | 17,5 |
| C <sub>16:1</sub> | 17,4 | 20,6 | C <sub>18:1</sub> /C <sub>16:1</sub> | 34,7 | 41,2 |
| C <sub>16:1</sub> | 17,3 | 20,6 | C <sub>18:2</sub> /C <sub>18:3</sub> | 17,7 | 16,4 |
| C <sub>18:2</sub> | 8,9  | 8,2  | C <sub>18:3</sub> /C <sub>18:3</sub> | 33,1 | 25,0 |
| C <sub>18:3</sub> | 49,2 | 41,9 |                                      |      |      |

Diese Einschränkung sollte beachtet werden, wenn man die in Abb. 6.5 wiedergegebenen Massenspektren betrachtet. Mit Ausnahme des DGD zeigen sie für die biosynthetisch eng miteinander verknüpften Lipide DG, MGD, TGD und TeGD ähnliche Diglyceridprofile. Die Hauptkomponenten der GL sind C<sub>18:3</sub>/C<sub>18:3</sub> und C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:3</sub>-Kombinationen, die in diesen Lipiden auch gleiche positionsspezifische Verteilung der Fs besitzen. Selbst in TG herrschen die Fettsäuren C<sub>18:3</sub> und C<sub>16:3</sub> vor und bilden in Kombination die Hauptspezies.

**Tab. 6.6:** Fettsäurezusammensetzung des DG aus isolierten Envelopes

Präparation der Envelopes a) bei pH 7,6, b) bei pH 7,8 oder c) der Chloroplasten des Spinats (Anteil der C<sub>16:3</sub> im Prozentsatz der C<sub>18:1</sub> enthalten).

|         | C <sub>14:0</sub> | C <sub>16:0</sub> | C <sub>16:1</sub> | C <sub>16:2</sub> | C <sub>16:3</sub> | C <sub>18:0</sub> | C <sub>18:1</sub> | C <sub>18:2</sub> | C <sub>18:3</sub> |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| a) (41) | 4,0               | 3,3               | tr                | tr                | 20,1              | 1,3               | 8,7               | 3,3               | 58,8              |
| b) (17) | 28,0              | 10,0              |                   | 14,0              | tr                |                   | 13,0              | 10,0              | 15,0              |
| c) (44) |                   | 16,8              | 15,3              |                   |                   | 1,6               | 8,4               | 14,0              | 43,9              |

Die Spezies des DG aus isolierten Envelopes sind in der Mehrzahl hoch ungesättigt. Im Gegensatz zu DG, extrahiert aus Spinatblättern, in dem ein Gehalt von 42,7 % C<sub>16:0</sub> (86) oder 16,8 % (Chloroplasten des Spinats, (44)) bestimmt wurde, enthalten sie nur 5,7 % Palmitinsäure. Man könnte daher annehmen, dass die Desaturierung der Fettsäuren in den Chloroplasten vor der Übertragung der Acylgruppen auf sn-Glycerin-3-phosphat geschieht. Angesichts des neu umrissenen, dismutativen Wegs der DGD-Biosynthese müssen die ungesättigten Diacylglycerine nicht notwendigerweise primäre Acylierungsprodukte sein. Sie könnten ebenso in folgender Reaktionssequenz entstehen: Acylierung des Glycerinphosphats mit einfach ungesättigten Fettsäuren, Galaktosylierung, Desaturierung der Acylgruppen des MGD

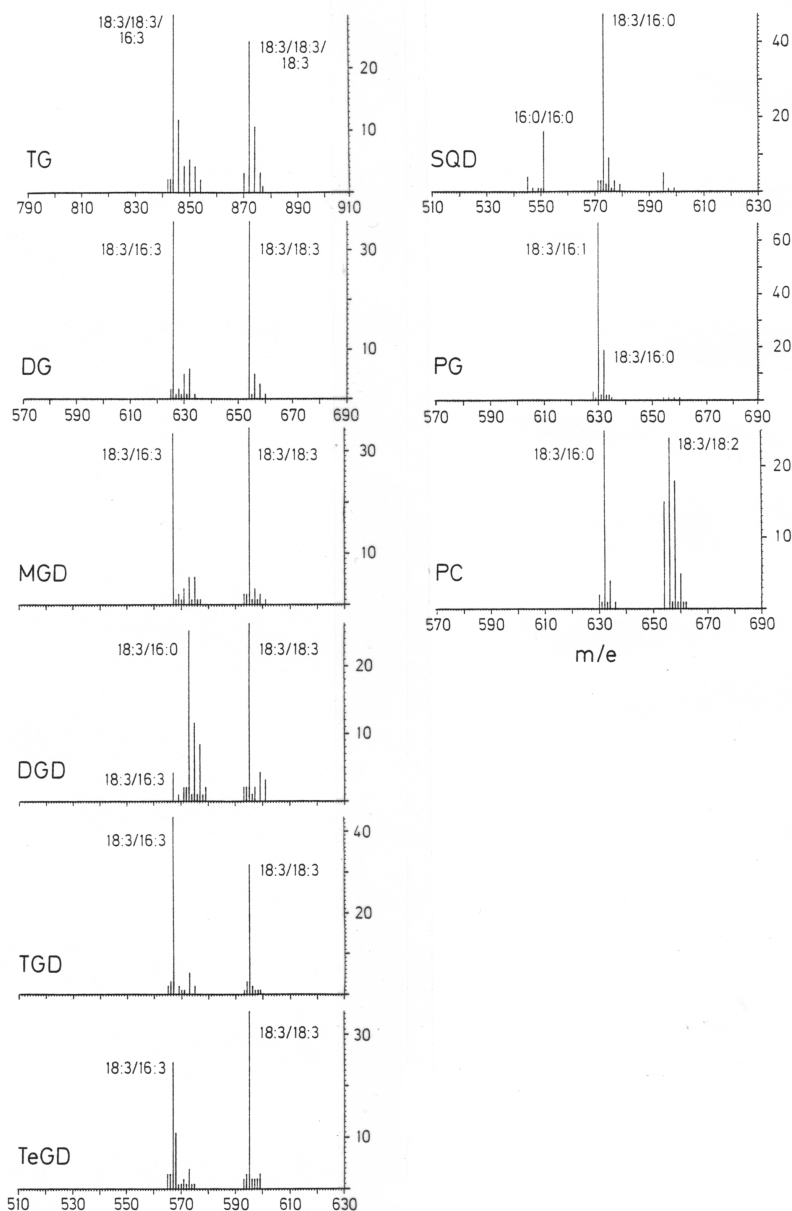
und schließlich Degalaktosylierung durch eine Interlipid-Galaktosyltransferase (s.u.). Unter alkalischen Bedingungen isolierte Envelopes weisen nicht nur, wie erwähnt, einen sehr viel niedrigeren DG- und höheren MGD-Gehalt auf (17), es konnte auch ein anderes Fettsäuremuster des DG bestimmt werden (Tab. 6.6).

Wegen der großen Übereinstimmung in Fettsäure- und Speziesmuster des DG und MGD aus Envelopes, isoliert bei pH 7,6, ist in der Tat die Frage berechtigt, ob DG während der Aufarbeitungsprozedur (inklusive Vorbehandlung der Blätter) durch die Aktivität der Interlipid-Galaktosyltransferase(n) entsteht und deshalb in dieser Form und in diesem Umfang (im Licht) nicht Bestandteil des Envelope in vivo ist. Wie insbesondere aber das Fettsäure- und Speziesmuster des DGD zeigt, wird offensichtlich die Qualität der Galaktolipidkomponenten des isolierten Envelope durch den möglicherweise ablaufenden Interlipid-Galaktosyltransfer nicht berührt.

Es ist in diesem Zusammenhang wichtig hervorzuheben, dass im MGD-Spezies-Gemisch des isolierten Envelope die Kombination  $C_{18:3}/C_{16:0}$  nur in kleiner Menge vertreten ist. MGD ist aber der unmittelbare Precursor des DGD, in dem diese Paarung eine Hauptkomponente darstellt. Andererseits enthält MGD  $C_{18:3}/C_{16:3}$ -Spezies, die im DGD kaum detektierbar sind. Diese Gegensätze wurden auch schon bei der Analyse der Glykolipide aus ganzen Blättern beobachtet (147). Man kann daher annehmen, dass die spezifischen Unterschiede im Diglyceridbaustein der Galaktolipide nicht auf einer unterschiedlichen, subzellulären Lokalisation bestimmter molekularer Spezies beruhen, da alle in Blattextrakten identifizierten Spezies und insbesondere auch  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -DGD in isolierten Envelopes vertreten sind.

SQD ist, wiederum in Übereinstimmung mit Analysen des Lipids aus ganzen Blättern (147, 169), das einzige Lipid, welches neben der dominierenden  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -Kombination  $C_{16:0}/C_{16:0}$ -Spezies enthält;  $C_{18}/C_{18}$ -Paarungen fehlen. Allgemein scheinen aber Dipalmitoyl-Spezies in Glyko- und Phospholipiden so weit wie möglich vermieden zu werden, um das Risiko lateraler Trennung einer gesättigten Phase in der Lipid-Bilayer zu vermindern.

Insbesondere bei negativ geladenen Lipiden, wie SQD und PG, kann laterale Phasentrennung eintreten bei sinkenden Temperaturen und steigenden Konzentrationen divalenter Kationen oder Protonen (46, 174). Wie man aufgrund des hohen Gehaltes an Triensäuren, der Paarung von gesättigten mit ungesättigten Fettsäuren und der sehr niedrigen Transition-Temperatur (Übergang in den flüssig-kristallinen Zustand) natürlicher Galaktolipide (154) erwarten sollte, konnte bei Fluoreszenz-Studien isolierter Envelopelipide kein Phasenübergang bei physiologischen Temperaturen beobachtet werden (26). Gefrierätztechnik und Elektronenmikroskopie machten kürzlich eine laterale Phasentrennung in Thylakoidmembranen des thermophilen *Cyanobacterium synechococcus lividus* (optimales Wachstum bei 52°C)



**Abb. 6.5:** Diglyceridprofile der Glycerolipide aus isolierten Envelopes der Chloroplasten des Spinats (Erläuterungen zur MS siehe 2.4.4, S. 52 und 2.5.3, S. 54.)

bei Abkühlung auf Zimmertemperatur sichtbar (50). Dabei entstanden große partikelfreie Bilayer-Flächen.

Das Diglyceridprofil des PG weist ebenso wie SQD keine  $C_{18}/C_{18}$ -Kombinationen auf. Mit diesem Charakteristikum lassen sich beide Lipide von der Gruppe der Galaktolipide und des DG abtrennen, andererseits aber auch von PC. Wie erwähnt ist ihnen aber die positionsspezifische Verteilung der  $C_{16:0}$  mit den GL gemeinsam.

In PC kommen viele Spezies in ähnlichen Proportionen vor. Sie sollten mit denen der GL verglichen werden, da PC, das im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert (91) und als Donator von Fs oder Diglyceridbausteinen diskutiert wird (145, 179, 185) und da der Envelope als Grenzmembran mit der Kapazität zur Galaktolipidsynthese der Ort sein sollte, an dem Bausteine unterschiedlichen subzellulären Ursprungs ausgetauscht und in der Lipidsynthese zusammengefasst werden könnten. Die Diglyceridprofile der Galaktolipide und des PC unterscheiden sich jedoch deutlich; dieser Befund stützt die genannte Donatorhypothese nicht, er kann sie andererseits nicht widerlegen. Wegen der unterschiedlichen, positionsspezifischen Verteilung der Fettsäuren in den  $C_{16:0}$ - $C_{18:3}$ -Paarungen könnte PC nur für einen Teil der gleichen Kombination im DGD, i.e.  $C_{16:0}/C_{18:3}$ , als Prekursor dienen. Ergebnisse der in vivo Markierung der Envelope- und Thylakoidlipide werden die mögliche Donatorfunktion des PC noch weiter einschränken.

### 6.5 Zusammenfassung

Die bei Analyse der Blattlipide bestimmten Diglyceridspezifitäten konnten auch in den Acyllipiden aus isolierten Envelopes des Spinats gefunden werden. Mit Ausnahme des DGD (umgekehrte Proportionen der  $C_{18:3}/C_{16:3}$ - und  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -Spezies) bilden die Galaktolipide und Diglycerid eine Gruppe mit uniformen Diglyceridmustern, die in einer biosynthetischen Sequenz entstehen könnten. Hexaene Spezies dominieren in dieser Gruppe.

SQD und PG einerseits und PC andererseits lassen sich von den Galaktolipiden separieren, da jedes dieser Lipide ein eigenes Diglyceridprofil aufweist. Dem Sulfolipid und PG ist das Fehlen von  $C_{18}/C_{18}$ -Kombinationen gemeinsam, mit der Gruppe der Galaktolipide und des DG verbindet sie das Auftreten von  $C_{16}$ - Fettsäuren in der C-2-Position.

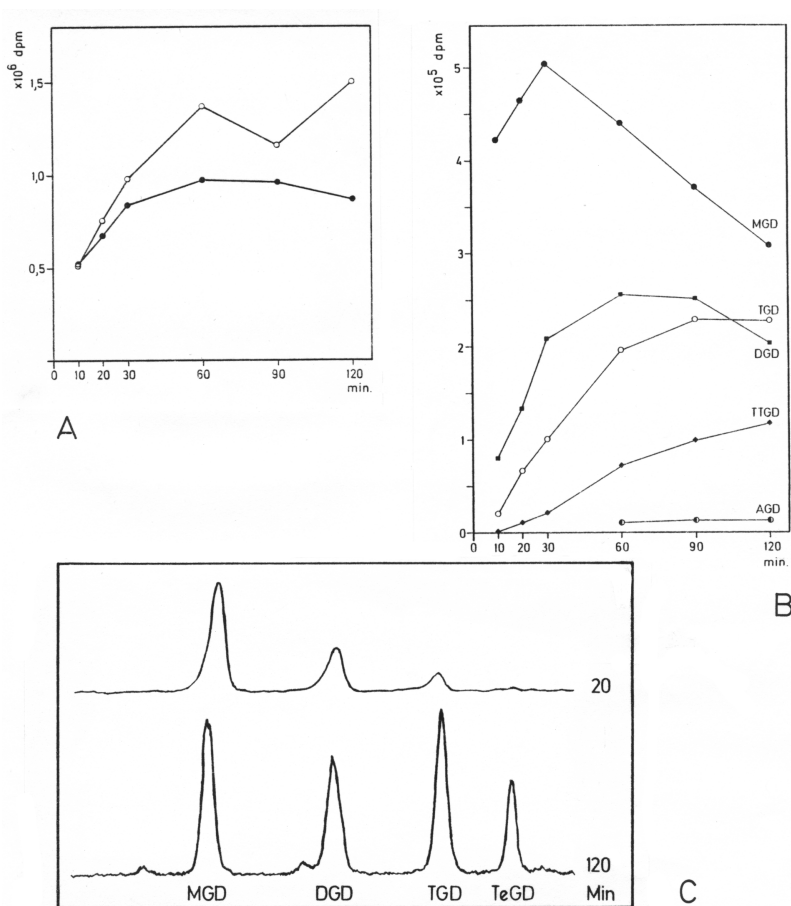


## Markierung der Galaktolipide des Envelope in vitro

Die detaillierte Analyse der Lipide des isolierten Envelope hat gezeigt, dass alle Spezifika in der Fettsäurezusammensetzung der Galaktolipide, wie sie aus Blattextrakten her bekannt sind, auch schon in diesem Membransystem zu finden sind. Sie scheinen daher nicht auf eine unterschiedliche, subzelluläre Lokalisation bestimmter molekularer Spezies zurückführbar zu sein. Es lag nahe, die Kapazität isolierter Envelopes zur Galaktolipidsynthese näher zu charakterisieren und insbesondere der Frage nachzugehen, ob der Envelope jene DGD-Spezies selbst synthetisieren kann, die ein ansonsten uniformes Bild der Diglyceridbausteine der Galaktolipide stört.

Dazu wurden bei pH 7,6 isolierte und resuspendierte Envelopes der Chloroplasten des Spinats mit UDP- $(^{14}\text{C})$ Gal inkubiert (2.2.4 S. 35), die GL wurden isoliert und analysiert in Bezug auf ihre Radioaktivität (Kinetik der  $(^{14}\text{C})$ -Einlagerung), die radioaktiv markierten Spezies ( $\text{AgNO}_3$ -DC) und die Verteilung der Radioaktivität auf die Galaktosen in den homologen Lipiden (Methylierungsanalyse).

## 7. Markierung der Galaktolipide des Envelope in vitro



**Abb. 7.1:** Kinetik der  $^{14}\text{C}$ -Gal-Inkorporation in die Galaktolipide bei Inkubation isolierter Envelopes des Spinats mit  $\text{UDP-}(^{14}\text{C})\text{Gal}$

A) offene Kreise  $\circ$ : Radioaktivität im Lipidextrakt; schwarze Kreise  $\bullet$ : Summe der Radioaktivität in den gereinigten, individuellen Galaktolipiden MGD, DGD, TGD, TeGD und AGD.

B) Radioaktivität in den gereinigten, individuellen GL.

C) Scan der DC des Lipidextraktes (LM 1) nach 20 und 120 Min. Inkubation.

Die Envelopes wurden bei pH 7,6 aus Blättern des Spinats isoliert, in einem Tricin-Puffer pH 7,6 suspendiert und mit  $\text{UDP-}(^{14}\text{C})\text{Gal}$  bei Raumlicht und Raumtemperatur inkubiert (2.2.4.1 und 2.8).

## 7.1 Kinetik der UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal-Inkorporation

Der Graph (Abb. 7.1) gibt die Kinetik der UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal-Inkorporation wieder, wie sie für bei pH 7,6 isolierte Envelopemembranen typisch ist (17, 90). Es fällt auf, dass die einzelnen Galaktolipide nicht der Größe ihres Masse-Pools entsprechend umgesetzt werden (Abb. 5.3). Jedes Galaktolipid, MGD, DGD und TGD, ist formal der Precursor für das nächsthöhere, homologe Lipid und die Synthesereihe beginnt mit dem Diglycerid. Auf jeden dieser Pools könnte UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal übertragen werden. Einer solchen Reaktionsweise widerspricht aber die registrierte Kinetik.

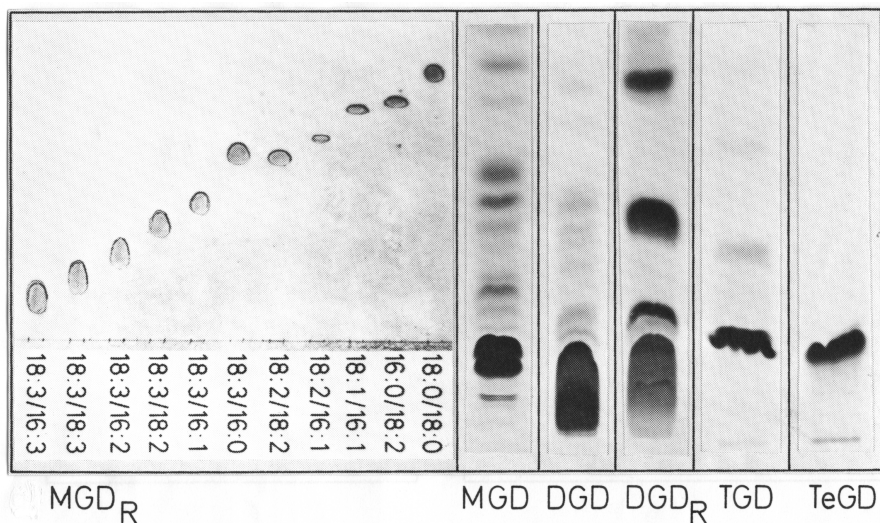
Die einzelnen GL-Pools konkurrieren offensichtlich nicht mit dem DG-Pool um UDP-Gal, d.h. es sollte eine Synthesesequenz ablaufen, die vom DG ausgeht und in der das neu synthetisierte MGD umgesetzt und weitergegeben wird bis hin zum TeGD. In den höheren Homologen akkumuliert Radioaktivität in einem Ausmaß, wie es nicht der Masse dieser Lipide im isolierten Envelope entspricht. So hat die Markierung des MGD nach 120-minütiger Inkubation schon stark abgenommen und TGD ist das nahezu höchst markierte GL, obwohl es nur ca. 5 % der gesamten Acyllipide ausmacht.

## 7.2 In vitro markierte Galaktolipidspezies

Eine Methode, die isolierten, im Zuckeranteil radioaktiv markierten Galaktolipide in das Spektrum ihrer Spezies aufzutrennen, ist die  $\text{AgNO}_3$ -DC. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode demonstriert die DC mit elf gereinigten Referenzspezies des MGD (Abb. 7.2) oder vier enzymatisch hergestellten  $^{14}\text{C}$ -Spezies des DGD. Dabei haben ungesättigte Lipidspezies niedrigere  $R_f$ -Werte als die gesättigten. Moleküle mit gleicher Doppelbindungszahl, aber unterschiedlicher Kettenlänge der Acylreste, werden auch getrennt; die kürzer kettige Komponente hat den niedrigeren  $R_f$ -Wert. So liegt z. B. die Spezies  $\text{C}_{18:3}/\text{C}_{16:3}$ -MGD dem Startfleck näher als die Spezies  $\text{C}_{18:3}/\text{C}_{18:3}$ -MGD.

Neben den Vergleichen sind in Abb. 7.2 die Autoradiogramme der  $\text{AgNO}_3$ -DC der in vitro markierten Galaktolipide wiedergegeben. In den Radioaktivitätsmustern dominieren hoch ungesättigte Spezies. Bei der DC des MGD wurden  $\text{C}_{18:3}/\text{C}_{18:3}$ - und  $\text{C}_{18:3}/\text{C}_{16:3}$ -Spezies gut voneinander getrennt; ob diese beiden Fettsäurekombinationen auch in den höheren Homologen markiert sind oder ob dies nur für die  $\text{C}_{18:3}/\text{C}_{18:3}$ -Kombination gilt, kann vom Chromatogramm her nicht entschieden werden.

Es fällt auf, dass die Dominanz der hexaenen Galaktolipidspezies im  $\text{AgNO}_3$ -DC-Radioaktivitätsmuster mit einer Ausnahme die führende Rolle der hexaenen Spezies



**Abb. 7.2:** Silbernitratchromatographie ( $\text{AgNO}_3\text{-DC}$ ) definierter MGD-Spezies (Referenzen =  $\text{MGD}_R$  s. 2.5.4 S. 56) und DGD-Spezies ( $\text{DGD}_R = C_{18:1}\text{-}C_{16:1}\text{-}, C_{18:3}\text{-}C_{16:0}\text{-}, C_{18:2}\text{-}C_{18:3}\text{-}$  und  $C_{18:3}\text{-}C_{18:3}\text{-DGD}$ ) und  $\text{AgNO}_3\text{-DC}$  der in vitro radioaktiv markierten Galaktolipide Isolierte Envelopes (pH 7,6) wurden 90 Min. lang mit  $\text{UDP-}^{14}\text{C}$ Gal inkubiert.  $\text{AgNO}_3\text{-DC}$  der gereinigten Gl s. 2.4.1 S. 41

bei der Kombination der Fettsäuren in den Diglyceridbausteinen widerspiegelt, wie sie die massenspektroskopischen Untersuchungen nachweisen (Abb. 6.5 S. 109).

Da auch im DG aus isolierten Envelopes Fettsäurekombinationen zu hexaenen Spezies vorherrschen, lässt sich formal begründen, dass die in vitro markierten hexaenen Spezies der GL aus dem hexaenen DG-Pool des isolierten Envelope durch sukzessive Galaktosylierung nach klassischem Mechanismus sowie aufgrund der möglichen Aktivität der Interlipid-Galaktosyltransferasen hervorgehen können. Im letzten Falle würde aus MGD hexaenes DG freigesetzt, das von neuem in die Synthesekette eintreten könnte (s.o.).

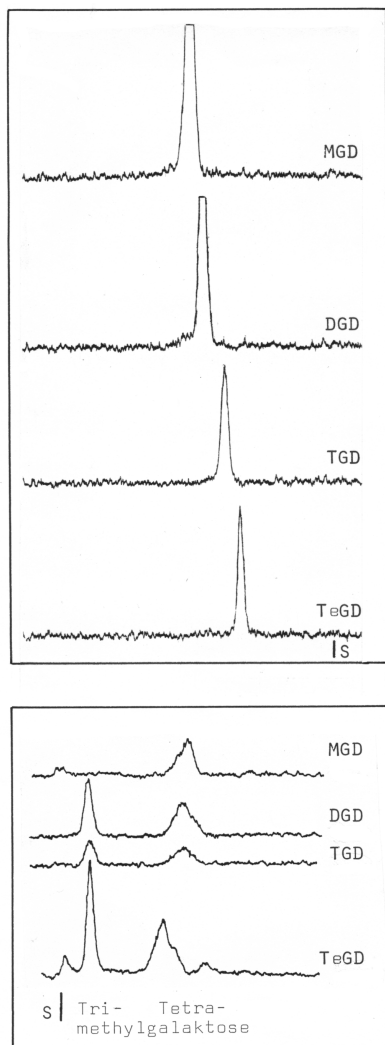
Im DG-Pool und auch im Pool des direkten Prekursors MGD des isolierten Envelope kommt aber eine Spezies nur in geringen Mengen vor, die für die Synthese des DGD notwendig wäre, nämlich die  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -Kombination. In der Tat wird diese DGD-Spezies bei der in vitro Inkubation der isolierten Envelopes nicht radioaktiv markiert, obwohl sie im Diglycerid-Profil des DGD des isolierten Membransystems enthalten ist.

Ebenso wichtig ist, dass diese Spezies offensichtlich nicht aus dem bestehenden DGD-Pool "herausgalaktosyliert" wird zum TGD, dessen  $AgNO_3$ -DC-Muster kaum andere als markierte hexaene Spezies ausweisen. Möglicherweise wird nur de novo synthetisiertes DGD für die Synthese des TGD benutzt, das aus der vermuteten de novo Synthesekette stammt.

## 7.3 In vitro Markierung der Galaktosen der Galaktolipide

Diesen Hinweisen auf eine de novo Synthesesequenz der GL und eine Separierung intermediärer GL-Pools, die Bestandteile dieser Reaktionskette sind, gingen wir mit einer anderen Analysenmethode nach (101, 177). Nach Methylierung der intakten GL und Hydrolyse der Methylierungsprodukte ist es möglich, die Radioaktivität in der äußeren und der bzw. den inneren Galaktosen der Lipide festzustellen (Abb. 2.15 S. 61). Wie erwartet, weist die DC der Hydrolyseprodukte des methylierten MGD nur eine radioaktive Bande seiner "äußeren" Galaktose auf. Bei den höheren Homologen konnten immer zwei Peaks registriert werden, die das Verhältnis der Radioaktivität in äußerer und innerer Galaktose mit ca. 1:1 wiedergaben. Diese Werte waren reproduzierbar und vergleichbar bei drei verschiedenen Inkubationen isolierter Envelopes mit UDP- $(^{14}C)$ Gal (Abb. 7.3).

Betrachtet man die Ergebnisse der Methylierungsanalyse für DGD unter dem Gesichtspunkt des klassischen Galaktosyltransfers, leuchtet unmittelbar ein, dass nur die Galaktosylierung de novo synthetisierten MGD zum Verhältnis 1:1 von äußerer und innerer Galaktose führt (Abb. 7.4 I a). Würde der bestehende MGD-Vorrat der Membran-Bilayer umgesetzt, in den das de novo synthetisierte MGD entlassen wird (Abb. 7.4 I b), wäre ein Überhang der Radioaktivität in der äußeren Gal zu erwarten.



**Abb. 7.3:** Dünnschichtchromatographie radioaktiv markierter GL

**Abb. 7.3:** Dünnschichtchromatographie der methylierten (LM 25) und anschließend hydrolysierten (LM 26), *in vitro* radioaktiv markierten Galaktolipide

Isolierte Envelopes (pH 7,6) wurden 1,5 h lang mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal inkubiert (2.2.4.1 S. 35) Zur Methylierungsanalyse s. 2.8 S. 62.

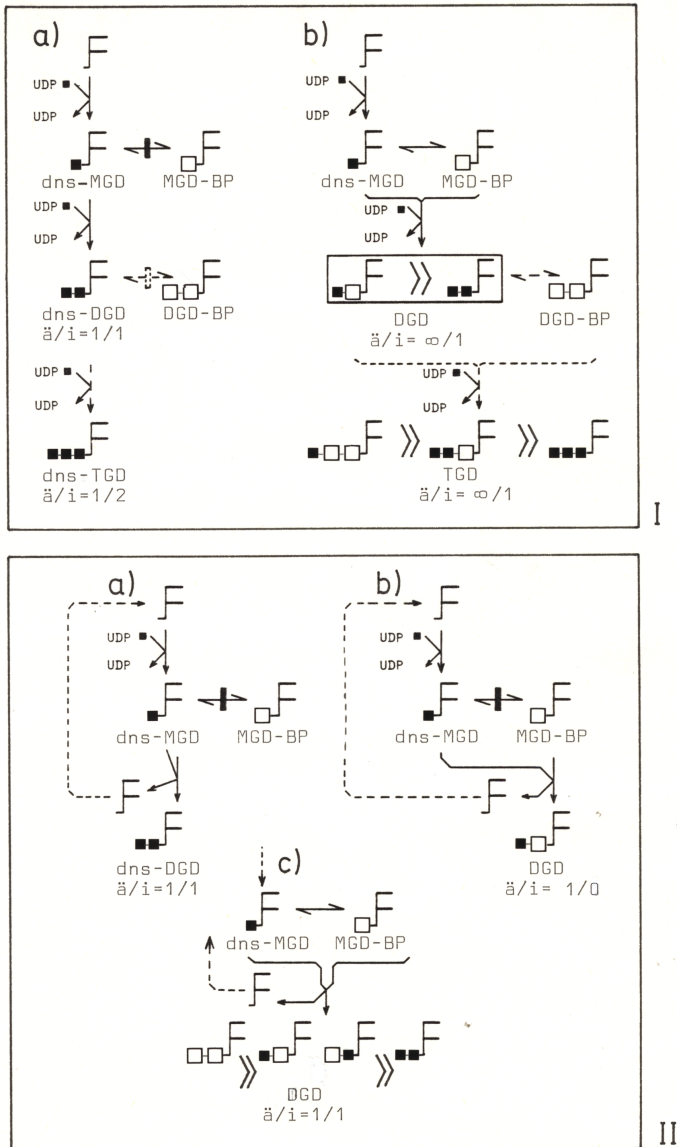
**Abb. 7.4:** Schema zur Diskussion der Methylierungsanalyse der *in vitro* radioaktiv markierten Galaktolipide auf der Grundlage der Aktivität der I UDP-Gal:DG bzw. MGD/DGD-Gal.transferase(n), II Galaktolipid:Galaktolipid-Gal.transferase(n) (17,18).

dns = de novo synthetisiertes Lipid; BP = präexistenter Bilayer-Pool des Lipids; ä/i = Verhältnis der Radioaktivität in äußerer und innerer Gal. des Lipids; ■ = ( $^{14}\text{C}$ )Gal; □ = Gal;  $\gg$  sehr viel mehr als.

Ia, IIa: Pool-Separierung und Pool-Mischungs-Verbot,

Ib, IIc: Pool-Mischung erlaubt,

II b: Pool-Separierung und Pool-Mischungs-Verbot, Funktion des de novo synthetisierten MGD als Galaktosedonator, des MGD-BP als Galaktoseakzeptor.

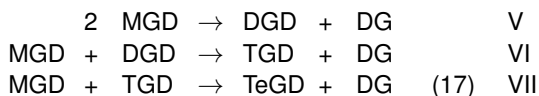


**Abb. 7.4:** Schema zur Diskussion der Methylierungsanalyse...

## 7. Markierung der Galaktolipide des Envelope in vitro

Als eine Konsequenz dieser Überlegung muss man die Separierung des Pools de novo synthetisierter MGD-Spezies vom bestehenden Pool der Membran-Bilayer des isolierten Envelope fordern und postulieren, dass Moleküle zwischen ihnen nicht ausgetauscht werden (s. auch Abb. 8.7). Dies deutete die Kinetik der  $^{14}\text{C}$ -Inkorporation bereits an. Die Markierungsverhältnisse der Gal in den höheren Homologen erlaubt keine so eindeutige Interpretation (Abb. 7.4). Es spricht aber auch hier dafür, dass de novo synthetisiertes DGD in einer de novo Synthesesequenz unmittelbar weiter umgesetzt wird und dass sich de novo synthetisiertes DGD nicht mit dem bestehenden DGD-Pool der Bilayer vermischen darf. Die Abweichung vom theoretisch zu erwartenden Wert 1:2 bzw. 1:3 für die Markierung der äußeren und inneren Gal des TGD bzw. TeGD ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei Inkubationsbeginn die Pools der de novo Synthesesequenz nicht radioaktiv markiert sind. In diesem Sinne ist oben das Fehlen einer radioaktiv markierten TGD-Spezies im  $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster gedeutet worden.

Abb. 7.4 II a-c) diskutiert die registrierten Markierungsverhältnisse auf der Basis der Interlipid-Galaktosyltransferasereaktionen, die unter den gegebenen pH- und Temperaturbedingungen der Inkubation zu den hohen Markierungsraten der höheren Homologen führen könnten.



In dieser Reaktionsfolge dient MGD als Gal-Donator, das seinerseits in der "Ping-Pong"-Reaktion entstehen soll, die eine Spezifikation des klassischen Gal-Transfers darstellt:



Dabei soll der linke Teil des Dismutationsschemas irreversibel sein (17). Zunächst sei betont, dass die registrierte Kinetik der in vitro Markierung auch unter Annahme dieser Reaktionen aufgrund ähnlicher Überlegungen auf eine de novo Synthesesequenz der Galaktolipide und eine Separierung von Pools hinweist, aus denen die de novo synthetisierten Moleküle zunächst nicht ausfließen dürfen in die großen, präexistenten Pools der Lipid-Bilayer. Geschähe dies, so sollte man nach Reaktionen V und VI Inkorporationsraten in die höheren Homologen erwarten, die um ein Vielfaches geringer sind als die registrierten Raten. Zu ähnlichen Schlüssen kommt auch van Besouw (17).



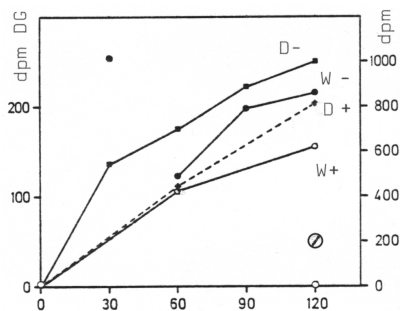
Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse erlauben präzisere Schlüsse:

Abb. 7.4 II b) Ausschluss der Übertragung der ( $^{14}\text{C}$ )Gal aus de novo synthetisiertem ( $^{14}\text{C}$ )MGD auf MGD der Membran-Bilayer, mit anderen Worten, Ausschluss der Separierung eines de novo Synthese-( $^{14}\text{C}$ )MGD-Donator-Pools und eines Akzeptor-Pools.

Abb. 7.4 II c) Ausschluss der Mischung des de novo synthetisierten MGD mit dem bestehenden MGD der Bilayer und die Dismutation zweier MGD-Moleküle aus diesem gemischten Pool heraus; zwar entstünde ein Verhältnis äußere/innere ( $^{14}\text{C}$ )Gal = 1:1, aber die Markierungsrate des DGD sollte sehr viel geringer sein als die registrierte (s.o.).

Abb. 7.4 II a) steht im Einklang mit I a): Separierung zweier MGD-Pools und Verbot der Vermischung beider.

Um eine mögliche Reversibilität der Galaktosyltransferreaktionen I oder I' und die mögliche Aktivität der Interlipid-Galaktosyltransferasen, Reaktionen V - VII, zu untersuchen, wurden folgende Experimente durchgeführt, die in Abb. 7.5 und 7.6 wiedergegeben sind (2.2.4.3 S. 35 und 2.2.4.4 S. 36).



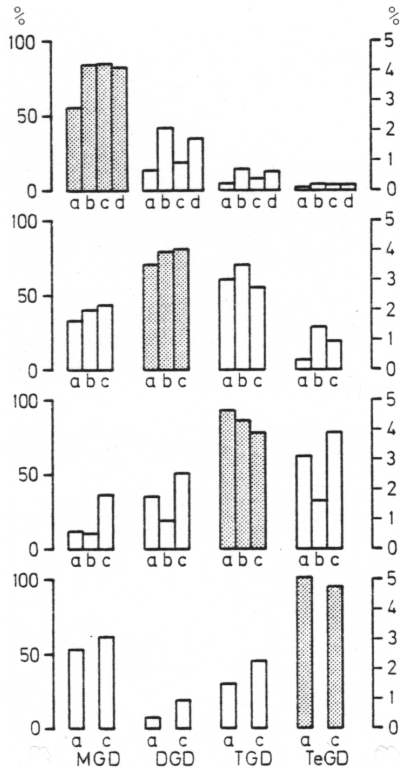
**Abb. 7.5:** Inkubation isolierter Envelopes mit ( $^{14}\text{C}$ )MGD

Erläuterungen in nebenstehendem Text.

Bei pH 7,6 isolierte und resuspendierte Envelopes wurden in Gegenwart (+), zum anderen ohne Zusatz von UDP (-) mit markiertem MGD (Mono- ( $^{14}\text{C}$ )-galaktosyldiacylglycerin und Monogalaktosyl-1-( $^{14}\text{C}$ )-diacylglycerin) bei ständigem Beschallen der Proben in einem Ultraschallbad inkubiert. In den Lipidextrakten wurde die Radioaktivität in den wässrigen Phasen (W, rechte Ordinate) und im Diglycerid (D, linke Ordinate) der organischen Phasen der ausgeschüttelten Lipidextrakte bestimmt. ○ repräsentiert die Aktivität im DG nach 0- und 120-minütigem Beschallen der MGD-Suspension, ⊙ die Aktivität in der zugehörigen Wasserphase (120 Min.). Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von

UDP, das ein starker, kompetitiver Hemmer der MGD-Synthese (Reaktionen I, I') ist ( $k_i = 18\mu\text{M}$ ) (17), wurden ( $^{14}\text{C}$ )DG und ( $^{14}\text{C}$ )Gal aus dem angebotenen MGD freigesetzt. In ähnlichen Experimenten wurde freie ( $^{14}\text{C}$ )Gal, abgespalten aus Mono- ( $^{14}\text{C}$ )-Galaktosyldiacylglycerin, nicht registriert (17). Andere Daten der Literatur über eine mögliche Reversibilität des Galaktosyltransfers sind ebenso widersprüchlich (73).

## 7. Markierung der Galaktolipide des Envelope *in vitro*



**Abb. 7.6:** Inkubation isolierter Envelopes mit ( $^{14}\text{C}$ )Galaktolipiden (gepunktete Balken, linke Ordinate)

Radioaktivität in den anderen GL = rechte Ordinate in % von der Gesamtausbeute. Erläuterungen in nebenstehendem Text.

Für eine Reversibilität sprechen aber auch die Ergebnisse von Inkubationen bei pH 7,6 isolierter und resuspendierter Envelopes mit im Gal-Anteil ( $^{14}\text{C}$ )markierten Galaktolipiden allein (a) und unter Zusatz von UDP-Gal (b, 0,4 mM) oder UDP (c und d; 0,1 bzw. 0,5 mM). Unabhängig von den Konditionen wurde aus jedem inkubierten Galaktolipid (= gepunktete Balken, Recovery in %, linke Ordinate) ( $^{14}\text{C}$ )Gal in alle anderen, auch die niedrigeren Homologen inkorporiert (Recovery in % von der Totalaktivität, rechte Ordinate, weiße Balken). Möglicherweise spielen dabei nicht nur die aufgeführten Interlipid-Gal.transferasereaktionen VI - VII eine Rolle, sondern auch andere Dismutationen, wie z.B.

$2 \text{ DGD} \rightarrow \text{TGD} + \text{MGD}$  VIII (17).

Wegen der geringen Umsatzraten wäre es wünschenswert, die Experimente in ähnlicher Form zu wiederholen. Sie zeigen, dass es offensichtlich schwierig ist, externe Lipide in die enzymatischen Reaktionen der Galaktolipidsynthese der Envelopemembranen einzuschleusen.

## 7.4 Zusammenfassung

Die Analysenergebnisse der in vitro radioaktiv markierten Galaktolipide können auf der Grundlage beider Galaktosyltransfermechanismen gedeutet werden: Ein hexaener DG-Pool des isolierten Envelope wird umgesetzt zum MGD, das damit in eine de novo Synthesekette der Galaktolipide eintritt. Diese Reaktionssequenz wird nicht aus den bestehenden Galaktolipid-Pools der Membran-Bilayer gespeist und die neu synthetisierten GL-Moleküle vermischen sich nicht mit den bestehenden Membran-Pools.

Der Ausgangspunkt der Synthesesequenz, der Diglycerid-Pool, stellt offensichtlich nicht in ausreichendem Maße die Spezies  $C_{18:3}/C_{16:0}$  zur Verfügung, so dass im Widerspruch zum Massenmuster des DGD aus isolierten Envelopes diese DGD-Spezies in vitro von den Hüllmembranen nicht synthetisiert wird.

Grundlage dieser Diskussion ist:

- die Kinetik der ( $^{14}C$ )Gal-Inkorporation
- Dominanz der hexaenen Spezies im  $AgNO_3$ -DC-Muster der radioaktiv markierten Galaktolipide analog zur Dominanz der hexaenen Spezies in den Diglycerid-Profilen der GL isolierter Envelopes (Ausnahme: DGD)
- Markierung der äußeren und inneren Galaktose des DGD im Verhältnis 1:1, Markierungsverhältnisse der höheren Homologen und Fehlen einer radioaktiv markierten  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -TGD-Spezies

Zwei Gesichtspunkte melden Zweifel an, ob die registrierte in vitro Markierung der Galaktolipide der in vivo Syntheseleistung des Envelope entspricht:

- Fehlende Synthese des  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -DGD
- hohe Syntheserate des TGD und TeGD

Douce und Joyard (40) nehmen an, dass der isolierte Envelope in seiner Synthesekapazität und -leistung gestört ist, da z.B. die Koppelung des Lipidsyntheseapparates an die Fettsäure liefernden Systeme des Stromas aufgehoben ist und die Acyl-CoA:sn-Glycerin-3-phosphat Acyltransferase bei der Präparation der Membranen verlorenggeht. Insofern könnte der Envelope als ein künstliches System betrachtet werden.



## Markierung der Membranlipide des Chloroplasten in vivo

Neben den Eingangs dargestellten Gründen kristallisierten sich aus den bisher geschilderten Analysen des isolierten Envelope und den Markierungsexperimenten vier Aspekte heraus, die in vivo ( $^{14}\text{C}$ )-Markierung der Hüllmembranen und der Thylakoide der Chloroplasten des Spinats zu studieren. Im isolierten Envelope konnten die charakteristischen Unterschiede im Diglyceridbaustein der Galaktolipide wiedergefunden werden, sie sind daher offensichtlich nicht auf eine spezifische Verteilung gewisser Lipidspezies auf verschiedene Kompartimente innerhalb der Zelle zurückführbar; dennoch wurde jene Spezies, die wesentlich zu diesen Unterschieden beiträgt, bei Inkubationen des isolierten Envelope nicht synthetisiert:  $\text{C}_{18:3}/\text{C}_{16:0}$ -DGD. In diesen Experimenten wurden aber die höheren Galaktolipid-Homologen mit Raten radioaktiv markiert, d.h. synthetisiert, die nicht der mengenmäßigen Repräsentation im isolierten Membransystem entsprechen. Daher lag der Verdacht nahe, dass isolierte Envelopes ein künstliches System darstellen, dessen Funktionen in vivo möglicherweise zu anderen Produkten führen könnten. Dennoch lieferten die Experimente wertvolle Hinweise auf eine de novo Synthesesequenz der Galaktolipide und die Separierung diverser Lipid-Pools. Die Analyse in vivo markierter Lipide des Envelope versprach daher besonders interessant zu werden.

### 8.1 Inkorporation in die Lipidfraktionen

Dazu wurden reife Blätter des Spinats mit  $^{14}\text{CO}_2$ , (2.2.5 S. 37) für 45 Min. (Experiment I), 30 Min. (Experiment II), 5, 15 und 30 Min. (Experiment III) inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde die  $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre gegen frische Luft ausgetauscht und die Blätter wurden entweder alle (Exp. III, 5 und 15 Min.) oder

## 8. Markierung der Membranlipide des Chloroplasten *in vivo*

teilweise (Exp. II, Exp. III, 30 Min.) oder erst nach weiteren 15, 105 und 195 Min. (Exp. I) und 90 Min. (Exp. II, III, 30 Min.) geerntet. Aus diesen Blättern (B) wurden Chloroplasten-, Envelope-, Thylakoid- und Stroma- (nur Exp. III) -Fraktionen isoliert (C, E, T und S). Für die Analysen standen somit Lipidextrakte folgender Fraktionen zur Verfügung:

|                | Min.<br>Pulse<br>$^{14}\text{CO}_2$ | Min.<br>Chase<br>$^{12}\text{CO}_2$   | Min.<br>Gesamt-<br>Inkub.-<br>Zeit | Lipidextrakte der<br>Fraktionen und<br>ihre Bezeichnung                                                          |
|----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Experiment I   | 45                                  | 15 → 60<br>105 → 150<br>195 → 240     |                                    | $B_{1h}, C_{1h}, T_{1h}, E_{1h}$<br>$B_{2.5h}, C_{2.5h}, T_{2.5h}, E_{2.5h}$<br>$B_{4h}, C_{4h}, T_{4h}, E_{4h}$ |
| Experiment II  | 30                                  | 0 → 30<br>90 → 120                    |                                    | $B_{30}, C_{30}, T_{30}, E_{30}$<br>B, C, T, E                                                                   |
| Experiment III | 5<br>15<br>30                       | 0 → 5<br>0 → 15<br>0 → 30<br>90 → 120 |                                    | B, C, T, E, S<br>B, C, T, E, S<br>B, C, T, E, S<br>B, C, T, E, S                                                 |

Mit den zuvor angewendeten Methoden  $\text{AgNO}_3$ -DC, Methylierungsanalyse, RGC der Fsme und Positionsanalyse der radioaktiven Acyllipide wurden detailliert die Fraktionen des Experimentes I untersucht. In diesem Experiment herrschte nach 45-minütiger  $^{14}\text{CO}_2$ -Inkubation eine Chase-Situation. Dennoch steigt die Radioaktivität in den Lipidextrakten der Blätter bis zum 4 h-Zeitpunkt, in den Lipidextrakten der Chloroplasten und deren Membranfraktionen fällt sie jedoch nach 2,5 h (Tab. 8.1, Abb. 8.1). Dabei ist ungewiss, inwieweit dieser Rückgang bzw. die bestimmten Radioaktivitätswerte in den Organell- und Suborganellfraktionen allgemein durch Metabolismus und Transportvorgänge während der Präparation beeinflusst wurden. Zwischen Extraktion der geernteten Blätter und Extraktion der Fraktionen C, E, T lagen Zeiten von ca. 2 - 3 h.

Die Summe der Radioaktivitäten in den Lipidextrakten der Fraktionen E und T decken sich gut mit den für die zugehörigen Chloroplastenfraktionen bestimmten Werten. Aus den Differenzbeträgen lässt sich, allein auf die Radioaktivität in den Extrakten der isolierten Hüllmembranen bezogen, berechnen, dass die Ausbeute bei der Präparation der Envelopes mindestens 44 % ( $E_{2.5h}, E_{4h}$ ) bis 61 % ( $E_{1h}$ ) beträgt. Damit ist auch die Größenordnung der maximalen Kontamination der Thylakoidfrak-

**Tab. 8.1:** Radioaktivität (in  $10^6$  dpm/mg Chlorophyll) und Chlorophyllgehalt (in mg) in den Lipidextrakten der Blätter, Chloroplasten-, Thylakoid- und Envelope-Fractionen

Experiment I, Erläuterungen zur Inkubation s. Text und 2.2.5.

Für Envelope-Fractionen werden total-dpm und relative Extinktionen bei 447 nm angegeben (Extinktion der Fraktion 4 h gleich 1 gesetzt). Radioaktivitäten in den Envelope-Fractionen auf den Chlorophyllgehalt in den Thylakoid-Fractionen bezogen.

| Fraktionen    | Radioaktivität |       |       | Chlorophyllgehalt |       |      |
|---------------|----------------|-------|-------|-------------------|-------|------|
|               | 1 h            | 2,5 h | 4 h   | 1 h               | 2,5 h | 4 h  |
| Blätter       | 6,00           | 10,05 | 10,30 | 3,98              | 5,23  | 2,85 |
| Chloroplasten | 1,87           | 2,86  | 2,60  | 3,47              | 1,95  | 1,18 |
| Thylakoide    | 1,69           | 2,41  | 2,29  | 14,85             | 11,48 | 8,43 |
| Envelopes 1   | 1,57           | 2,29  | 1,17  | 1,47              | 1,88  | 1,00 |
| Envelopes 2   | 0,11           | 0,20  | 0,14  |                   |       |      |
| Env. + Thyl.  | 1,80           | 2,61  | 2,43  |                   |       |      |

tionen mit Envelope-Membranbruchstücken festgelegt:  $T_{1h}$  4,1 %,  $T_{2,5h}$  10,4 %,  $T_{4h}$  7,4 %.

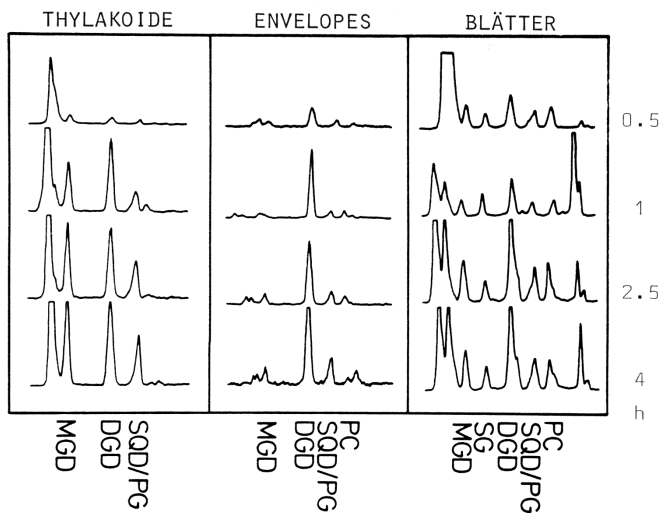
## 8.2 In vivo Markierung der individuellen Lipide

Die Markierungsmuster der Lipide aus ganzen Blättern, isolierten Chloroplasten- und Thylakoidfraktionen sind komplex. In alle wesentlichen Membranlipide ist während der Inkubation Radioaktivität eingelagert worden (Tab. 8.2, Abb. 8.1). Stets dominieren MGD, DGD, PG und PC. Überraschend hoch ist die Radioaktivität im DGD, das bei Inkubationen junger Blätter mit geringsten Raten markiert wurde (155, 156). Es übertrifft hier das MGD aus Blättern maximal um das Zweifache ( $B_{4h}$ ), während dieser Faktor in den Fraktionen C und T zwischen 1,1 und 1,6 liegt. Man könnte daher vermuten, dass insbesondere DGD auch in nichtplastidären Membransystemen vertreten ist (73). Hinweise auf eine mögliche, extraplastidäre Synthese des DGD lieferte auch die Analyse der Gewebekulturen des Tabaks (s.o.).

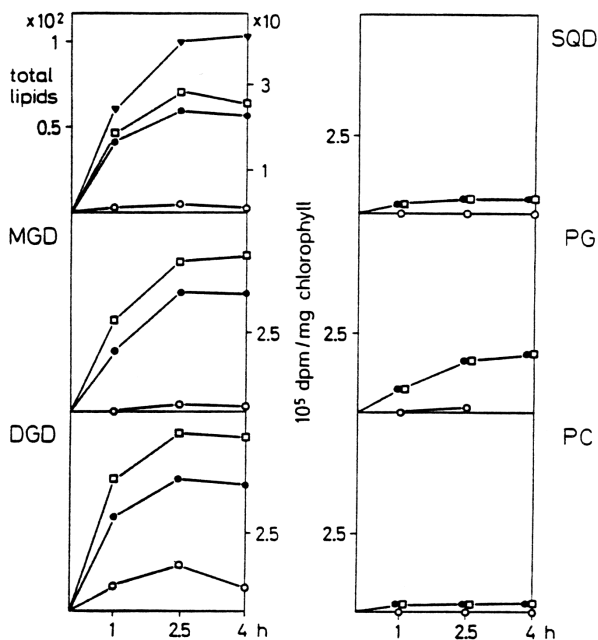
Die Werte der Aktivitäten in den Totallipidextrakten sowie in den individuellen Lipiden der Chloroplasten- und ihrer Membranfraktionen mögen in ihrer Relation zu den Werten der Blattlipide auch insofern beeinflusst sein, als die Isolation der Chloroplasten über Dichtegradienten die Selektion eines gewissen Chloroplastentyps impliziert.

Die höhere Radioaktivität im DGD aus Blättern, Chloroplasten und Thylakoidfraktionen widerspricht auch den molaren Proportionen der beiden Galaktolipide MGD/DGD, die etwa 2/1 entsprechen. Ähnliche Markierungsmuster wurden bei kurzzeitigen Inkubationen der Blätter (Experiment III) reproduziert. Die geringfügige

## 8. Markierung der Membranlipide des Chloroplasten in vivo



▼ Blätter    ○ Envelopes    □ Chloropl.    ● Thylakoide



**Abb. 8.1:** Radioaktivität in den Lipidextrakten aus Blättern, Clp, Thylakoiden und Envelope



Markierung des TGD und TeGD steht nun in besserer Beziehung zu ihrer Masse in isolierten Envelopes (s.o.).

Ein anderes, in Blättern hoch markiertes Lipid ist PC (höchste spezifische Aktivität, Tab. 8.3), dessen Prozentanteil von der Radioaktivität in den Acyllipiden der Fraktionen C, T und E dagegen niedrig ist. Dies deutet an, dass markiertes Lecithin zum Großteil in nicht plastidären Membranen lokalisiert ist. Völlig auf diese Membransysteme beschränkt sind radioaktives PE und SG; wie PE könnte daher auch SG als negativer Marker für Membransysteme des Chloroplasten angesehen werden.

Mit den drei letztgenannten Lipiden sind die wesentlichen Differenzen im Markierungsmuster der Blätter und der anderen Fraktionen angesprochen worden. Darüber hinaus ist es notwendig, einige Besonderheiten des ( $^{14}\text{C}$ )-Lipidmusters der isolierten Envelopes hervorzuheben. Die überraschend niedrige Totalaktivität in deren Extrakten fand sich hauptsächlich im DGD wieder, das mit 55 - 75 % der Aktivität in den Acyllipiden die sehr einfachen Markierungsmuster prägt. Ähnliche Muster konnten bei kurzfristigen Inkubationen reproduziert werden (s. o.). Zu allen untersuchten Zeitpunkten des Experimentes I enthalten die Lipide der isolierten Envelopes weniger Totalaktivität als die Lipide der Thylakoidfraktionen. Die Differenzfaktoren sind 18 - 25 für MGD, 10 - 14 für PG, 8 - 10 für SQD, 3 - 6 für DGD und ca. 2 für PC sowie 5 für die Lipide der Pigmentfront (Erläuterungen dazu s. Tab. 8.2). Bis zum Zeitpunkt 2,5 h steigt die Radioaktivität in all diesen Lipiden der isolierten Envelopes, offensichtlich werden die Lipid-Pools noch weiterhin mit Radioaktivität aufgefüllt, und ein Steady State ist noch nicht erreicht.

Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipide der Envelope- und Thylakoidfraktionen, vor allem die Dominanz des DGD in den isolierten Envelopes, widerspricht zunächst dem Bild, das man bei einer exklusiven Galaktolipidsynthese in den Envelopemembranen erwarten würde.

**Abb. 8.1:** Radioaktivität in den Lipidextrakten (oben: Scans der DC in LM 1, unten: Totallipid) und deren individuellen Acyllipiden aus Blättern, Chloroplasten-, Envelope- und Thylakoidfraktionen (Blätter, Totallipid, linke Ordinate)

Blätter des Spinats wurden 30 Min. (Experiment II) oder 45 Min. lang mit  $^{14}\text{CO}_2$  inkubiert (Experiment I). Die Radioaktivitätswerte sind auf den Chlorophyllgehalt der Fraktionen bezogen (Tab. 8.2).

---

Da das Markierungsverhältnis MGD/DGD in den Thylakoidfraktionen anders ist, kann nicht nur der Verlust radioaktiver GL aus den Envelopemembranen während der Präparation für die geringe Markierung des MGD bzw. der GL allgemein verantwortlich sein. Mögliche andere Gründe für die Markierungsverhältnisse in E und T könnten sein:

### Erläuterungen zur **Tab. 8.2**

<sup>1</sup>Für die Envelope-Fraktion wird der Chlorophyllgehalt der zugehörigen Thylakoid-Fraktion zugrunde gelegt.

<sup>2</sup>Pigment-Front bei TLC in LM 1: Die Chromatographie dieser Fraktion in LM 6 und 7 zeigt, dass die dort möglicherweise vorhandenen Lipide DG, Fs, AGD, ASG sowie Carotinoide nicht nennenswert radioaktiv markiert sind.

<sup>+</sup>Anteil in der PC-Fraktion enthalten.

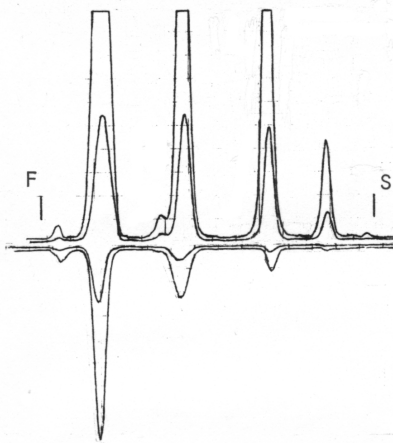
Die Daten wurden nach Fraktionierung der Lipidextrakte gemäß Schema 18 und LSC der ausgeschabten Kieselgelbanden errechnet. Die Zählausbeuten (Summe der dpm in den Lipidbanden einschließlich Pigment-Front in Bezug auf die zur DC eingesetzten Totalaktivitäten betrugen 100 % für die Fraktionen  $E_{1h,2,5h,4h}$  und  $C_{4h}$ , 94 - 93 % für  $B_{4h}$ ,  $T_{1h}$  und  $C_{1h}$ , 85 - 88 % für  $B_{1h,2,5h}$ ,  $T_{2,5h,4h}$  und  $C_{2,5h}$ .

---

**Tab. 8.2:** Radioaktivität der Acyllipide und des SG in  $10^3$  dpm/mg Chlorophyll<sup>1</sup>, Anteil der einzelnen Komponenten von der Summe der Radioaktivität in den Acyllipiden und SG in % sowie Anteil der Radioaktivität in den Pigmenten<sup>2</sup> von der Totalaktivität der Lipidextrakte in % (Zeile Pigm.) in den Lipidextrakten der Blätter, Chloroplasten-, Thylakoid- und Envelope-Fractionen (B, E, T und E.; Experiment I). Erläuterung im Text.

|       |     | <i>B<sub>1h</sub></i> | <i>B<sub>2,5h</sub></i> | <i>B<sub>4h</sub></i> | <i>C<sub>1h</sub></i> | <i>C<sub>2,5h</sub></i> | <i>C<sub>4h</sub></i> | <i>T<sub>1h</sub></i> | <i>T<sub>2,5h</sub></i> | <i>T<sub>4h</sub></i> | <i>E<sub>1h</sub></i> | <i>E<sub>2,5h</sub></i> | <i>E<sub>4h</sub></i> |
|-------|-----|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| MGD   | dpm | 384,6                 | 727,8                   | 705,6                 | 288,4                 | 481,9                   | 494,5                 | 193,7,                | 385,5                   | 378,4                 | 7,9                   | 22,0                    | 15,4                  |
|       | %   | 15,9                  | 24,0                    | ,19,3                 | 33,8                  | 36,9                    | 36,0                  | 30,5                  | ,36,5                   | 36,0                  | 7,1                   | 10,2                    | 11,8                  |
| DGD   | dpm | 691,4                 | 910,2                   | 1408                  | 424,9                 | 572,9                   | 550,1                 | 304,7                 | 425,6                   | 408,3                 | 82,5                  | 146,9                   | 71,6                  |
|       | %   | 28,6                  | 30,1                    | 38,5                  | 49,7                  | 43,9                    | 40,1                  | 47,9                  | 40,3                    | 38,8                  | 74,8                  | 68,4                    | 55,0                  |
| TGD   | dpm | +                     | +                       | +                     | 12,7                  | +                       | 29,6                  | +                     | +                       | 16,9                  | 8,7                   | 23,5                    | ,6,8                  |
|       | %   | +                     | +                       | +                     | 1,5                   | +                       | 2,2                   | +                     | +                       | 1,6                   | 7,9                   | 10,9                    | 5,2                   |
| SQD   | dpm | 43,5                  | 95,0                    | 77,8                  | 26,3                  | 47,3                    | 57,4                  | 28,3                  | 43,5                    | 46,5                  | 2,9                   | 5,6                     | 4,7                   |
|       | %   | 1,8                   | 3,1                     | 2,1                   | 3,1                   | 3,6                     | 4,2                   | 4,4                   | 4,1                     | 4,4                   | 2,6                   | 2,6                     | 3,6                   |
| PG    | dpm | 191,1                 | 300,7                   | 338,4                 | 82,9                  | 147,4                   | 187,0                 | 63,5                  | 159,7,                  | 179,2                 | 4,7                   | 13,2                    | 18,5                  |
|       | %   | 7,9                   | 9,9                     | 9,3                   | 9,7                   | 11,3                    | 13,6                  | 10,0                  | ,15,1                   | 17,0                  | 4,3                   | 6,2                     | 14,2                  |
| PE    | dpm | 75,1                  | 128,8                   | 161,7                 | -                     | -                       | -                     | -                     | -                       | -                     | -                     | -                       | -                     |
|       | %   | 3,1                   | 4,3                     | 4,4                   |                       |                         |                       |                       |                         |                       |                       |                         |                       |
| PC    | dpm | 533,5                 | 497,4                   | 491,8                 | 19,1                  | 55,0                    | 54,2                  | 45,5                  | 42,5                    | 22,7                  | 3,6                   | 3,5:                    | 11,1                  |
|       | %   | 22,1                  | 16,4                    | 13,4                  | 2,2                   | 4,2                     | 3,9                   | 7,2                   | 4,0                     | 2,2                   | 3,3                   | 1,6                     | 8,5                   |
| SG    | dpm | 499,7                 | 367,3                   | 473,1                 | -                     | -                       | -                     | -                     | -                       | -                     | -                     | -                       | -                     |
|       | %   | 20,7                  | 12,1                    | 12,9                  |                       |                         |                       |                       |                         |                       |                       |                         |                       |
| Summe | dpm | 2419                  | 3027                    | 3657                  | 854                   | 1305                    | 1373                  | 635                   | 1057                    | 1052                  | 110                   | 214                     | 130                   |
| Pigm. | %   | 47,4                  | 54,7                    | 47,4                  | 51,1                  | 47,1                    | 47,6                  | 57,4                  | 48,0                    | 47,6                  | 11,8                  | 11,9                    | 11,2                  |

- Transport der Galaktolipide in die Thylakoide hinein (und in extraplastidäre Systeme?)
- Eigene Galaktolipidsynthesekapazität der Thylakoide
- Eine Verschiebung der Markierungsverhältnisse aufgrund einer Aktivität der Interlipid-Gal.transferasen scheidet wahrscheinlich aus



**Abb. 8.2:** In vitro radioaktiv markierte Galaktolipide aus isolierten Envelopes (oben) und Thylakoiden (unten)

Isolierte Envelopes und Thylakoide des Spi-nats (pH 7,6) wurden 30 Min. lang mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal bei Raumlicht und -temperatur inkubiert. DC des Lipidextraktes in LM 1 (siehe auch Abb. 2.13 S. 57). Bei einer vergleichbaren Inkubation und DC des Extraktes in LM 2 konnte keine Markierung des ADGD, nur geringfügige des AGD festgestellt werden.

theserate. Nicht gewaschene Thylakoide haben dabei eine ca. 15fach größere Synthesekapazität als 4-fach in Suspensionsmedium gewaschene Thylakoide (2.2.4.5., Tab. 8.4). Im DC-Muster der markierten GL dominiert dabei MGD, und die Proportionen der Radioaktivitäten in den GL verschieben sich nach Waschen der Fraktionen

Im Einzelnen:

■ Schneller Transport der Galaktolipide, insbesondere des MGD, aus dem Envelope in die Thylakoide hinein, auch noch während der Isolationsprozedur der Organelle: Wegen des erheblichen Zeitversatzes zwischen Gewebeaufschluss und endgültiger Extraktion der Fraktionen können die Fragen des Transportes - und dies trifft auch für PC zu (obwohl dessen Differenzfaktor für die Markierung in Envelope- und Thylakoidfraktionen am kleinsten ist) - nicht beantwortet werden. Dazu wären andere experimentelle Ansätze mit kürzerer Zeitskala notwendig. In den Stromafraktionen des Experimentes III wurden aber all jene Lipide detektiert (= Transportformen?), die auch in den Fraktionen E und T radioaktiv markiert worden sind.

■ Galaktolipidsynthesekapazität der Thylakoide: Gegen diese These spricht zunächst, dass sorgfältig präparierte und mehrfach gewaschene Thylakoidfraktionen wenig Aktivität aus UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal in GL einlagern (ca. 6,7 nMol/mg Protein/h)(39) gegenüber isolierten Envelopes (45 nMol/mg Protein/Min. (39), 133 nMol/mg Protein/Min.(17)). Das ist eine um den Faktor 200 - 400 (39) niedrigere Syn-

zugunsten des MGD. Bei gleich langer Inkubation einer Envelopefraktion (Abb. 8.2) wurden MGD, DGD und TGD aber etwa gleich stark markiert. Daher erscheinen Zweifel berechtigt zu sein, ob die geringe Galaktolipidsyntheserate isolierter Thylakoide lediglich auf eine Kontamination mit Envelopepartikeln zurückgeführt werden darf. (Besitzen die Thylakoide eine UDP-Gal:Diacylglycerin-Galaktosyltransferase, fehlen ihnen Interlipid-Galaktosyltransferasen?)

■ Aktivität der Interlipid-Galaktosyltransferase(n): Man könnte zunächst annehmen, dass sie bei neutralem pH das *in vivo* markierte MGD während der Isolation der Chloroplasten und Envelopes umsetzen. Da MGD auch im Diglyceridbaustein radioaktiv markiert ist (Tab. 8.3), sollte man die Akkumulation des ( $^{14}\text{C}$ )DG erwarten, falls nicht *in vivo* markiertes MGD nur Galaktoseakzeptor ist und/oder das möglicherweise enzymgebundene DG sogleich weiter galaktosyliert wird. ( $^{14}\text{C}$ )DG konnte in den Lipidextrakten aber nur in Spuren detektiert werden (Tab. 8.2, Abb. 8.1). Die Aktivität der Transferasen würde zwar das ungewöhnliche Markierungsverhältnis MGD/DGD von  $1/5$  ( $E_{4h}$ ) -  $1/10$  ( $E_{1h}$ ) erklären, nicht aber die geringe Radioaktivitätseinlagerung in TGD und TeGD. Da die Aktivität der Interlipid-Gal.transferasen auch von verhältnismäßig geringen Schwankungen der Temperatur stark beeinflusst werden kann (aktiv oberhalb  $17^\circ\text{C}$ , bei neutralem und saurem pH (17)), sollten die Bedingungen der Isolationen und Inkubationen der Envelopes bei *in vivo* und *in vitro* Experimenten näher miteinander verglichen werden. In beiden Fällen war die Isolationsprozedur gleich: Milieu der Medien pH 7,6, Manipulationen bei niedrigen Temperaturen (Eisbäder, Kühlraum, Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$ ). Daher kann trotz des neutralen pH angenommen werden, dass die Transferasen unter diesen Bedingungen nur wenig oder nicht aktiv waren. Van Besouw zeigte in einem Experiment, dass unter den Bedingungen pH 7,2, Kälte bei der Zentrifugation, das Verhältnis der radioaktiven Markierung der GL untereinander gleich blieb.

Während nach den Zentrifugationen die Envelopefraktionen für die *in vitro* Inkubationen im Medium pH 7,6 bei Zimmertemperatur, d.h.  $T > 18^\circ\text{C}$ , gehalten wurden, kamen die Envelopefraktionen der *in vivo* Experimente sogleich zur Extraktion. Daher spielt eine Aktivität der Interlipid-Gal.transferasen bei den *in vitro* Experimenten möglicherweise eine Rolle (s.o.), die Markierungsverhältnisse der *in vivo* Experimente dürften aber kaum beeinflusst worden sein. Dafür spricht auch die geringe Markierung des TGD und TeGD. Ein anderer Parameter mag in diesem Sinne hinzukommen: Die Vorbehandlung der Blätter. Beim *in vivo* Experiment I waren sie mindestens 1 h lang belichtet, und die Photosyntheseaktivität sollte den pH des Stromas der Chloroplasten ins Alkalische verschoben haben. Die Blätter der *in vitro* Experimente waren unbelichtet (siehe auch Violaxanthingehalt der isolierten Envelopes). Es fehlen allerdings Anhaltspunkte dafür, inwieweit die Interlipid-Gal.transferasen an der *in vivo* Synthese des DGD beteiligt sind oder ob sie gar das alleinige DGD-synthetisierende System des Envelopes sind (17).

**Tab. 8.3:** Spezifische Aktivität der Lipide in dpm/nMol (Spalte SAL), spezifische Aktivität ihrer Fettsäuren in dpm/nMol (Spalte SAFs), Anteil der Radioaktivität in den Fettsäuren von der Gesamtaktivität der individuellen Lipide in % (Spalten %-Fs) und relative, spezifische Aktivität der Fettsäuren der Lipide (Spalten RSAFs) in den Lipidextrakten der Blätter, Thylakoid- und Envelopefraktionen (B, T und E, Experiment I)

Die Werte bzw. Berechnungen basieren a) auf GC der Fsme und LSC der intakten Lipide sowie der Fsme, b) auf LSC der Hydrolyseprodukte der Lipide und c) auf Umrechnung der dpm/mg Chl aus Tab. 8.2 über den bekannten %-Anteil der Markierung in den Fs in dpm/mg Chl der Fs des Lipids, die durch den Mol.-%-Satz des Acyllipids dividiert und dann auf den für MGD errechneten Wert = 1 bezogen wurden. Um die Berechtigung dieser Manipulation zu prüfen, wurden diese Werte für  $B_{2,5h}$  den Werten  $SAFs^a$  von  $B_{2,5h}$  bezogen auf MGD = 1 gegenüber gestellt ( $RSAFs^d$ ).

|     | $SAL^a$    |              | % Fs       |              |            | $RSAFs^d$  |            | $RSAFs^c$ |  |
|-----|------------|--------------|------------|--------------|------------|------------|------------|-----------|--|
|     | $B_{2,5h}$ | $B_{2,5h}^a$ | $B_{2,5h}$ | $T_{2,5h}^b$ | $E_{4h}^b$ | $B_{2,5h}$ | $B_{2,5h}$ | $E_{4h}$  |  |
| MGD | 232        | 25           | 17,4       | 32,9         | 47,1       | 1          | 1          | 1         |  |
| DGD | 730        | 17           | 3,4        | 9,8          | 17,4       | 0,68       | 0,56       | 1,05      |  |
| SQD | 306        | 21           | 10,9       | 32,2         | 49,0       | 0,84       | 0,84       | 0,56      |  |
| PG  | 716        | 288          | 49,7       | 75,6         | 86,7       | 11,5       | 8,8        | 3,7       |  |
| PE  | 507        | 90           | 26,3       | -            | -          | 3,6        | 2,6        | -         |  |
| PC  | 807        | 303          | 51,6       | 76,3         | 28,1       | 12,1       | 12,5       | 0,3       |  |

### 8.3 Markierung der Fettsäuren der individuellen Lipide

Die Markierungsmuster der Fettsäuren (Umesterung der Totalextrakte) sind in allen untersuchten Fraktionen B, C, T und E von den Fs  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$  und  $C_{18:2}$  geprägt.  $C_{16}$ -ungesättigte Fs sind nur geringfügig radioaktiv markiert worden, im Gegensatz zu ( $^{14}C$ )-Inkubationen junger Blätter des Spinats (155, 156), und auch Linolensäure zählt zu den schwach markierten Fettsäuren. Beides deutet an, dass die Fettsäure-desaturierung in großen, reifen Blättern des Spinats gedrosselt ist.

Die detaillierte Untersuchung der Fettsäuren der einzelnen Acyllipide liegt nur für die Fraktionen  $B_{2,5h}$  und  $T_{2,5h}$  vor. Wegen der großen Übereinstimmung der  $AgNO_3$ -DC-Muster der Lipide aus den einzelnen Fraktionen sei die Übertragung der Fettsäurenmarkierungsmuster der Lipide der Thylakoidfraktionen auf die der Envelopelipide erlaubt (s.u.). Die Analysen zeigten, dass radioaktiv markierte  $C_{16}$ -ungesättigte Fs wie zuvor allein im MGD lokalisiert sind, und  $^{14}C_{18:3}$  nur in den für Chloroplasten typischen Lipiden, nicht aber in PC zu finden ist (Abb. 3.2, S.72).

**Tab. 8.4:** Inkorporation von ( $^{14}\text{C}$ )Gal in die Galaktolipide bei Inkubation isolierter Envelopes und Thylakoide des Spinats mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal für 30 Min. bei 30°C bzw. Raumtemperatur und pH 7,6 (Experiment 2.2.4.5, S. 36)

b) Berechnet auf der Basis von a); c) berechnet auf der Basis von b) und einem Chlorophyllgehalt der Thylakoide von 147  $\mu\text{g}$  Chl/mg Prot. (39); d) berechnet aufgrund der Einlagerungsrate dpm/mg Prot./30 Min.

|                                  | $\frac{10^5 \text{ dpm}^a}{\text{mg Chl}}$ | $\frac{\text{nMol Gal}^b}{\text{mg Chl} \times \text{h}}$ | $\frac{\text{nMol Gal}^c}{\text{mg Prot.} \times \text{h}}$ |
|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Thylakoide                       | 6,78                                       | 2,84                                                      | 13,9                                                        |
| Thylakoide, 2 $\times$ gewaschen | 1,14                                       | 0,34                                                      | 2,3                                                         |
| Thylakoide, 4 $\times$ gewaschen | 0,45                                       | 0,14                                                      | 0,9                                                         |
| Envelopes                        |                                            |                                                           | 4,4 <sup>d</sup>                                            |
| Thylakoide                       |                                            |                                                           | 0,024 <sup>d</sup>                                          |

Statt dessen ist PC das einzige Lipid, in dem nicht radioaktive  $\text{C}_{16:0}$ , sondern  $^{14}\text{C}_{18:1}$  im Fs.markierungsmuster dominiert. Dies und die Ergebnisse der Positionsanalyse der in vivo markierten Acyllipide der Thylakoidfraktion, die in Abschnitt C 1 ausführlich diskutiert worden sind, schränken die vieldiskutierten Donatorfunktionen des PC für die Galaktolipidsynthese in Chloroplasten auf einige wenige, präzise formulierbare Möglichkeiten ein:

#### ■ Fettsäuren aus PC

Wie aus der kurzen Charakterisierung der Fettsäurenmarkierungsmuster ersichtlich, wäre  $^{14}\text{C}_{18:1}$  der "heiße"Kandidat, den PC als Fettsäurerest in die Galaktolipidsynthese einschleusen könnte. Tatsächlich ist  $\text{C}_{18:1}$  eine der Fettsäuren, die, wie unten erläutert wird, neben  $\text{C}_{16:0}$  in die de novo Synthese des MGD eingeht. Andererseits sind Palmitin- und Ölsäure Endprodukte der Fettsäure-de novo Synthese der Chloroplasten (166, 185).

#### ■ Diglyceridbausteine

Die Acylglycerinbausteine, die etwa durch Reversibilität der CDP-Cholin:sn-1,2-Diacylglycerin Cholinphosphattransferase-Reaktion aus PC freigesetzt werden könnten, tragen radioaktive Fettsäuren in Positionen, wie sie für Galaktolipide der Chloroplasten aus  $\text{C}_{16:3}$ -*Pflanzen* nicht charakteristisch sind (s. o.)  $^{14}\text{C}_{16:0}$  des PC ist in der C-1-Position verestert, in MGD und DGD jedoch in der C-2-Position,  $\text{C}_{18:1}$  und  $\text{C}_{18:2}$  markieren in PC beide Positionen  $\pm$  symmetrisch, in MGD sind radioaktive  $\text{C}_{18}$ -ungesättigte Fs auf die C-1-Position beschränkt.

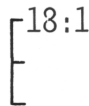
Die ( $^{14}\text{C}$ )-DG-Bausteine aus



oder allgemein



sind daher für die Galaktolipidsynthese nicht kompatibel. In Frage käme lediglich die Lysoverbindung 1-( $^{14}\text{C}$ )-Oleoylglycerin:



Eine mögliche Funktion des PC als Lieferant der  $\text{C}_{16:0}$  und der  $\text{C}_{18:1}$  bzw. als Donator eines 1-Oleoylglycerin-Bausteins kann mit den vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden. Von den aus Blättern isolierten ( $^{14}\text{C}$ )-Lipiden ( $B_{2,5h}$ ) besitzt PC die höchste spezifische Aktivität sowohl als intaktes Lipid als auch in seinen Acylresten, und der Anteil der Markierung der Fettsäuren in Bezug auf die Radioaktivität des intakten Lipids ist ebenfalls hoch (Tab. 8.3). Ihre Markierung in der Fraktion  $E_{4h}$  ist aber relativ niedrig und eine Berechnung der relativen spezifischen Aktivitäten der Fettsäuren des PC ergibt Werte, die keineswegs überzeugend auf eine Donatorfunktion des PC hinweisen. Die Situation mag anders sein in  $\text{C}_{18:3}$ -Pflanzen. Di-( $^{14}\text{C}$ )-oleoyl/linoleoylglycerin aus PC könnte in die MGD-Synthese einfließen (160), da in beiden Lipiden radioaktive  $\text{C}_{18}$ -Fs die Positionen des Glycerins  $\pm$  symmetrisch besetzen.

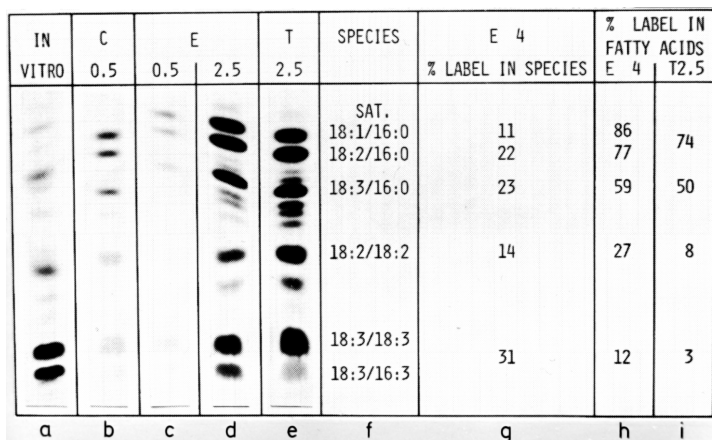
## 8.4 In vivo markiertes MGD aus Envelope- und Thylakoidfraktionen

Die in vivo radioaktiv markierten Galaktolipide aus den Fraktionen  $E_{4h}$  und  $T_{2,5h}$  wurden denselben Analysen unterworfen wie die ( $^{14}\text{C}$ )-Galaktolipide der in vitro Experimente. Es galt vor allem, die in vivo synthetisierten Spezies zu bestimmen und die Hinweise auf eine de novo Synthesesequenz der Galaktolipide zu verfolgen.

Eine weitere Andeutung dafür ist oben schon gegeben, aber nicht besonders hervorgehoben worden: Die geringe Markierung des Diacylglycerins, obwohl die



#### 8.4. In vivo markiertes MGD aus Envelope- und Thylakoidfraktionen



**Abb. 8.3:**  $AgNO_3$ -DC des in vivo markierten MGD aus Chloroplasten, Envelopes und Thylakoiden des Spinats ( $C_{30}$ ,  $E_{30,2,5h}$ ,  $T_{2,5h}$ , b - e)

Blätter wurden 30 bzw. 45 Min. lang mit  $^{14}CO_2$  inkubiert (2.2.5 S. 2.2.5, Exp. I, III). Zum Vergleich:

a) In vitro radioaktiv markiertes MGD (s. auch Abb. 7.2). f) zeigt die durch Cochromatographie mit Referenzspezies und durch RGC ihrer Fsme (Abb. 8.5) identifizierten Spezies. g) gibt den %-Anteil der Radioaktivität einzelner Spezies an, h) und i) den Anteil der Radioaktivität in den Fettsäuren einzelner Spezies.

GL einen gewissen Anteil ihrer Radioaktivität in den Acylresten tragen (Tab. 8.3). Diese Beobachtung ist auch schon bei anderen Experimenten mit ganzen Blättern gemacht worden (144, 178); sie kann bedeuten, dass neugebildetes DG sogleich galaktosyliert wird und daher nicht akkumulieren kann.

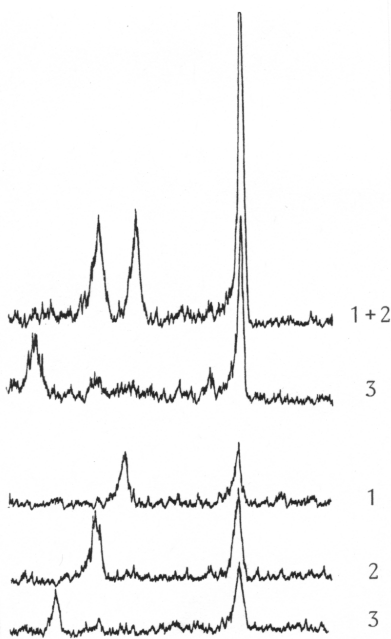
Diese Interpretation wird gestützt durch die  $AgNO_3$ -DC-Muster des radioaktiven MGD aus Blättern, Chloroplasten-, Thylakoid- und Envelopefraktionen des Experimentes I, die z. T. in Abb. 8.3 wiedergegeben sind. In vivo markiertes MGD weist ein ganz anderes, komplexes Muster auf als in vitro markiertes; dabei gleichen sich die Muster der MGD aus den verschiedenen, analysierten Fraktionen. Am Beispiel der  $AgNO_3$ -DC des MGD der Envelopepräparationen  $E_{30}$  und  $E_{2,5h}$  besonders deutlich erkennbar, sind im Muster viele Spezies vertreten. Die mehr gesättigten dominieren zur kurzen Inkubationszeit, und erst nach längerer Zeit sind höher ungesättigte und hexaene Spezies stark markiert; letztgenannte sind es, die die große Masse des MGD in Blättern wie in isolierten Envelopes repräsentieren und das  $AgNO_3$ -DC-Muster des in vitro markierten MGD allein prägten. Auf diesen Gegensatz der in vivo und in vitro Spezies-Muster soll die Vergleichs-DC, Spur a in Abb. 8.3, aufmerksam machen.

**Tab. 8.5:** Chemische  $\alpha$ -Oxidation der Palmitin-, Öl-, Linol- und Linolensäure der in vivo markierten MGD-Spezies  $C_{18:1}/C_{16:0}$ ,  $C_{18:2}/C_{16:0}$  und  $C_{18:3}/C_{16:0}$  aus Thylakoiden des Spinats ( $T_{2,5h}$ , Exp. 1)

| Frag-<br>ment | Masse der Fs-Fragmente<br>in Mol-% aus den Fs |            |            |            | Relative spez. Aktivität<br>der Fs-Fragmente aus den Fs |            |            |            |
|---------------|-----------------------------------------------|------------|------------|------------|---------------------------------------------------------|------------|------------|------------|
|               | $C_{16:0}$                                    | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ | $C_{16:0}$                                              | $C_{18:1}$ | $C_{18:2}$ | $C_{18:3}$ |
| $C_8$         | 1,02                                          | 5,99       | 0          | 0,91       | 0                                                       | 100        | 0          | 0          |
| $C_9$         | 0,71                                          | 7,79       | 1,71       | 2,26       | 0                                                       | 77         | 0          | 0          |
| $C_{10}$      | 4,23                                          | 8,95       | 3,06       | 4,16       | 86                                                      | 85         | 57         | 0          |
| $C_{11}$      | 9,31                                          | 9,43       | 7,92       | 5,97       | 94                                                      | 72         | 93         | 67         |
| $C_{12}$      | 13,35                                         | 10,63      | 11,41      | 8,33       | 100                                                     | 65         | 100        | 100        |
| $C_{13}$      | 10,89                                         | 8,28       | 9,61       | 7,91       | 96                                                      | 63         | 66         | 76         |
| $C_{14}$      | 17,19                                         | 9,40       | 12,02      | 10,76      | 88                                                      | 65         | 71         | 76         |
| $C_{15}$      | 11,36                                         | 7,60       | 10,01      | 9,52       | 96                                                      | 71         | 59         | 66         |
| $C_{16}$      | 31,93                                         | 11,81      | 16,71      | 18,13      | 81                                                      | 79         | 80         | 56         |
| $C_{17}$      | -                                             | 6,01       | 9,27       | 9,08       | -                                                       | 59         | 70         | 43         |
| $C_{18}$      | -                                             | 14,13      | 18,26      | 22,97      | -                                                       | 62         | 58         | 39         |

Einen wichtigen Unterschied zum in vitro Muster stellt auch die Variation des Musters mit der Zeit dar (Abb. 8.3 b, c, d). Die drei Hauptbanden, sichtbar nach kurzer Inkubationszeit (30 Min., Experiment II), wurden nicht nur durch Cochromatographie und Vergleich mit den Referenzspezies identifiziert, sondern auch durch RGC ihrer Fsme (Abb. 8.4). Daher können sie eindeutig als 18:1/16:0-, 18:2/16:0- und 18:3/16:0-MGD angesprochen werden. Aus der Positionsanalyse des totalen MGD (Abb. 3.2) lässt sich ableiten, dass die radioaktiv markierte Palmitinsäure ausschließlich die C-2-Position des Glycerinbausteins besetzt, während die ungesättigten  $^{14}C_{18}$ -Fs in der Position C-1 dieser Spezies lokalisiert sind.

Die Silbernitratmuster des MGD reflektieren die Spezieskomposition des DG-Pools, der zur Galaktosylierung durch die UDP-Gal:sn-1,2-Diacylglycerin Galaktosyltransferase in vivo zur Verfügung stand. Dieser Pool muss in eben solcher Weise radioaktive, oligoene Spezies enthalten, wie sie im  $AgNO_3$ -DC-Muster des MGD registriert wurden. Deshalb differiert er deutlich vom in vitro galaktosylierten DG-Pool, wie die Unterschiede der  $AgNO_3$ -DC-Muster des in vitro und in vivo markierten MGD demonstrieren, und die oligoenen DG-Spezies dürfen nicht, wie auch die Massenspektroskopie des DG aus isolierten Envelopes oder die GC seiner Fsme zeigen, in der Membran-Bilayer akkumulieren, sondern sie gehen offensichtlich sogleich in die Galaktosylierungsreaktion ein. Damit ist das erste Pool-Mischungsverbot der in vivo Galaktolipidsynthese ausgesprochen, wie es für die Galaktolipid-Pools der de novo Synthesesequenz in vitro bereits charakterisiert worden ist (Abb. 8.7).



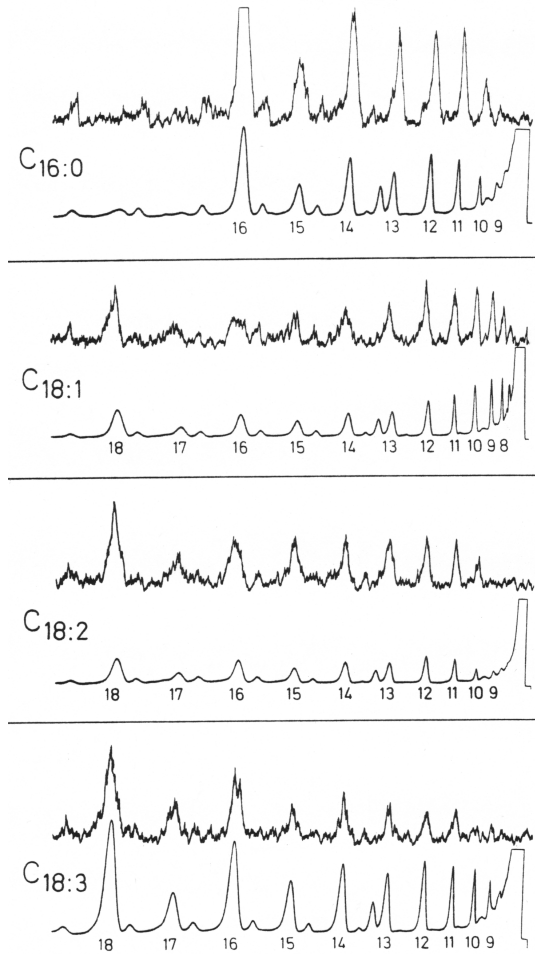
**Abb. 8.4:** RGC der Fsme aus den individuellen in vivo markierten MGD-Spezies  
 1 =  $C_{18:1}/C_{16:0}$ , 2 =  $C_{18:2}/C_{16:0}$ , 3 =  $C_{18:3}/C_{16:0}$  der Fraktionen  $T_{2,5h}$  (oben) und  $E_{4h}$  (untere Spuren, Exp. I).

die aus den drei genannten MGD-Spezies der Thylakoidfraktion  $T_{2,5h}$  isoliert wurden. Die Fettsäurefragmente  $C_8$  bis  $C_{16}$  bzw.  $C_{18}$  besitzen etwa gleiche spezifische Aktivität (Abb. 8.5 und Tab. 8.5).

Aus diesen Daten mag man den Schluss ziehen, dass das in vivo  $AgNO_3$ -DC-Muster des MGD der Envelopefraktionen nicht durch die Spezifität der Galaktosyltransferase zustande kommt, sondern durch die Galaktosylierung oligoener, de novo synthetisierter DG. Je gesättigter eine Spezies, desto höher ist die Rate ihrer Synthese. Trotz des raschen Erscheinens der produzierten, oligoenen Spezies bleiben diese nicht erhalten und akkumulieren nicht. Auch in  $C_{18:3}$ -Pflanzen dominieren im  $AgNO_3$ -DC-Muster des in vivo markierten MGD oligoene Spezies (z.B.  $C_{18:1}/C_{18:1}$ ) (179), die im Massenmuster des Lipids nur Spurenkomponenten darstellen (73).

Die Daten der Spalten h und i in Abb. 8.3 sind die Ergebnisse der Hydrolysen der MGD-Spezies aus den Fraktionen  $E_{4h}$  und  $T_{2,5h}$ . Sie geben die höchsten Prozentsätze der Radioaktivität in den Fs der separierten Spezies für die oligoenen MGD an, die nahezu den Wert erreichen, der bei einer völligen Neusynthese = uniformen Markierung eines  $C_{18}/C_{16}$ -MGD zu erwarten ist (79 %). Daher sind die im totalen MGD registrierten, radioaktiven Fettsäuren nach kurzzeitiger Inkubation in wenigen oligoenen MGD-Spezies konzentriert (s.o.), nämlich den positionsspezifischen Kombinationen  $C_{18:1}/C_{16:0}$ ,  $C_{18:2}/C_{16:0}$  und  $C_{18:3}/C_{16:0}$ . Wie zuvor bei Inkubationen junger Blätter erkannt (155, 156), ist die Summe der Radioaktivitäten in den  $C_{16}$ -Säuren gleich der Aktivität in den  $C_{18}$ -Säuren. Dies deutet an, dass gleichsinnig markierte Fettsäuren in diese Spezies inkorporiert worden sind.

Im Zusammenhang mit den Daten der Verteilung der Radioaktivität auf Acylreste und Zuckeranteil des Lipids kann man daher annehmen, dass die oligoenen MGD-Spezies aus de novo synthetisierten Bausteinen zusammengesetzt sind. Für die Fettsäuren bestätigt dies die chemische  $\alpha$ -Oxidation der  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$  und  $C_{18:3}$ ,



**Abb. 8.5:** RGC der durch chemische  $\alpha$ -Oxidation aus Palmitin-, Öl-, Linol- und Linolensäure der *in vivo* markierten MGD-Spezies  $C_{18:1}/C_{16:0}$ ,  $C_{18:2}/C_{16:0}$  und  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ( $T_{2,5h}$ , Exp. I) präparierten Fettsäurefragmente (2.8 S. 62)

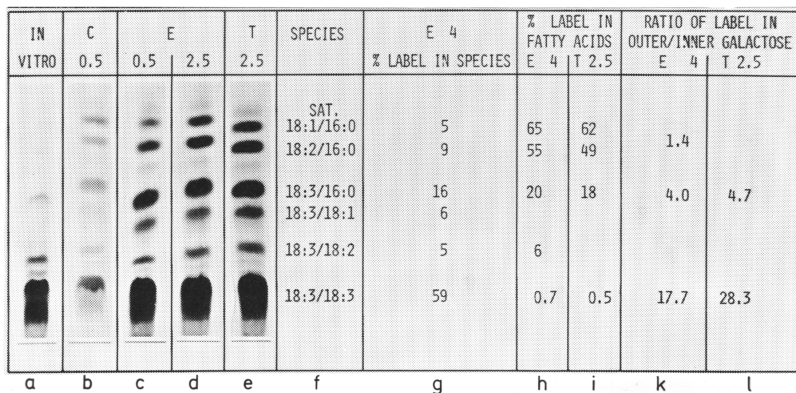
Eine Möglichkeit des Turnover ist die MGD-gekoppelte Desaturierung, die von anderen Autoren schon für PC (7, 55, 56, 62, 167, Charakterisierung eines Enzyms: 134, 135) und MGD (2, 129 - 131, 149) in niederen Pflanzen und für PC in höheren Pflanzen (144 - 146, 160, 179) diskutiert worden ist.

Ein starkes Argument für die MGD-gekoppelte Desaturierung ist die Analyse der Markierung in Acylresten und Zucker der MGD-Spezies. Höher ungesättigte und hexaene MGD-Spezies tragen erst nach längerer Inkubationszeit deutlich Radioaktivität in ihren Gal (kaum in den Acylresten). Das bedeutet, dass diverse DG-Spezies mit Gal aus verschiedenen stark markierten UDP-Gal-Pools umgesetzt worden sind? Eine zu postulierende Separierung vieler verschiedener UDP-Gal-Pools erscheint mir jedoch als sehr unwahrscheinlich. Eine sinnvolle Interpretation ist die oben ausgeführte, einfache Reaktionsfolge: Galaktosylierung des oligoenen, de novo synthetisierten DG, die Aktion der MGD-gekoppelten Desaturasen würde zur Akkumulation hexaener Spezies und zur Änderung des  $AgNO_3$ -DC-Musters führen. Das Auftreten hoch ungesättigter MGD-Spezies, die fast nur in ihrem Zuckeranteil radioaktiv sind, bedeutet keinen Widerspruch zu dieser Reaktionsfolge. Bei  $^{14}CO_2$ -Inkubationen ganzer Blätter werden Gal und UDP-Gal im Anabolismus der Zelle offensichtlich schneller radioaktiv markiert als Fs, die in die Lipidsynthese eingehen; darauf weisen u.a. vergleichende Inkubationen junger Blätter des Korbells und des Spinats mit ( $^{14}C$ )-Acetat und  $^{14}CO_2$  (155) und der Blätter von *Vicia faba* (177, 179) hin. Im Fließgleichgewicht der de novo Synthese des DG und MGD würden daher zunächst oligoene, kalte Fs und ( $^{14}C$ )Gal zusammengefügt und erst zum späteren Zeitpunkt ständen (U- $^{14}C$ )Fs zur Verfügung. Das oligoene Mono-(U- $^{14}C$ )galaktosyl-( $^{12}C$ )-diacylglycerin wird zwischenzeitlich zur hexaenen Spezies desaturiert. Daher ist die Verteilung der Radioaktivität auf Fettsäuren und Galaktose in den oligoenen Spezies der Thylakoidfraktion  $T_{2,5h}$  nach etwa 2,5 stündiger Inkubation der Blätter ein glücklicher Zufall gewesen. Auf der Basis des Modells der MGD-gekoppelten Desaturierung und des unterschiedlichen Metabolismus der Fettsäuren und der Galaktosereste wird die Verschiebung dieses Verhältnisses im MGD aus der Fraktion  $E_{4h}$  verständlich.

## 8.5 In vivo markiertes DGD aus Envelope- und Thylakoid-Fractionen

Die  $AgNO_3$ -DC des in vivo markierten DGD weist ebenfalls recht komplexe, aber untereinander ähnliche Muster für das Lipid aus den Fraktionen B, C, T und E aus (Abb. 8.6), die wie beim MGD verschieden sind vom DGD-Muster der in vitro Inkubationen der isolierten Envelopes (Spur a in Abb. 8.6). In den in vivo Mustern (Spuren b - e) treten vielmehr und auch weitaus gesättigtere Spezies auf, unter denen auch die gesuchte  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -Kombination ist. Man muss annehmen, dass diese Spezies nicht aus dem bestehenden MGD-Pool der Membran-Bilayer des isolierten Envelope abgeleitet werden kann (s.o.). In vivo könnte sie aber aus de

## 8. Markierung der Membranlipide des Chloroplasten in vivo



**Abb. 8.6:**  $AgNO_3$ -DC des in vivo radioaktiv markierten DGD aus den Fraktionen ( $C_{30}$ ,  $E_{30,2,5h}$ ,  $T_{2,5h}$ , b - e)

Blätter des Spinats wurden 30 bzw. 45 Min. lang mit  $^{14}CO_2$  inkubiert (Exp. I, II, 2.2.5).

Zum Vergleich:

a) in vitro radioaktiv markiertes DGD (2.2.4.1). g) gibt den %-Anteil der Radioaktivität einzelner Spezies der Fraktion  $E_{4h}$  wieder, h) und i) geben die Anteile der Aktivität in den Fettsäuren einzelner Spezies der Fraktionen  $E_{4h}$  und  $T_{2,5h}$ , k) und l) für die gleichen Fraktionen das Verhältnis der Radioaktivität in äußerer und innerer Gal des DGD wieder.

novo synthetisiertem MGD entstehen, das seinerseits aus oligoem, de novo synthetisiertem DG hervorgeht.

Diese Auffassung wird durch zwei experimentelle Befunde gestützt: Die Ergebnisse der Hydrolysen individueller DGD-Spezies und deren Methylierungsanalysen. Die höchsten Anteile der Radioaktivität in den Fettsäuren der DGD-Spezies aus den Fraktionen  $E_{4h}$  und  $T_{2,5h}$  konnten wiederum für oligoene Spezies bestimmt werden, die dem theoretisch berechneten Wert für eine uniforme Markierung des  $C_{18}/C_{16}$ -Lipids nahekommen (70 %). Die Werte dienen wiederum als Indikator für das Zusammenfügen de novo synthetisierter Prekursoren. Die Tatsache, dass ein gewisser Teil des de novo synthetisierten MGD, welches in seiner Masse im Vergleich zum großen, bestehenden, hexaenen Pool der Lipid-Bilayer des Envelope sehr klein sein sollte, umgesetzt wurde zum DGD, spricht ebenfalls dafür, dass auch in vivo neu synthetisiertes, oligoenes MGD nicht im existierenden MGD-Pool verschwindet, sondern in einer de novo Synthesekette weitergegeben wird, die mit der de novo Synthese des oligoenen DG beginnt. Dieses zweite Pool-Mischungsverbot für Lipide des Envelope in vivo skizziert Abb. 8.7. ( $^{14}C$ )DGD, in vitro radioaktiv markiert, enthielt etwa gleich viel Aktivität in terminaler und innerer Gal. Für DGD aus in vivo markierten Membranen ergab die Methylierungsanalyse zunächst völlig andere

Proportionen der Markierung der Tetramethyl- und Trimethylgalaktose, nämlich eine deutlich höhere Aktivität der äußeren Gal: 35-, 22- und 13fach im DGD aus den Fraktionen  $E_{2,5h}$ ,  $T_{2,5h}$  und  $C_{2,5h}$ . Wesentlich kleinere Verhältnisse (ca.5) registrierten Williams et al. (177) bei Markierungen des DGD in Blättern aus  $C_{18:3}$ -Pflanzen (*Vicia faba*, 10-minütige Inkubation mit  $^{14}CO_2$ ); sie vermuteten daher, ( $^{14}C$ )Gal werde z.T. auf nicht markiertes, präexistentes MGD übertragen, z.T. auf einen Pool neugebildeten MGD. Die Methylierungsanalyse einzelner, separierter DGD-Spezies erlaubt die nähere Beschreibung der skizzierten DGD-Pools.

Sie zeigt nämlich, dass die registrierten Markierungsverhältnisse zusammengesetzte Größen sind, da die Markierungsverhältnisse äußerer und innerer Galaktosen der oligoenen Spezies durchaus dem Wert 1:1 angenähert sind und sie sich mit zunehmender Ungesättigtheit der Spezies deutlich zugunsten der äußeren Galaktose verschieben. Wie zuvor muss aus den Verhältnissen 2,9 ( $T_{2,5h}$ ) und 1,4 ( $E_{4h}$ ) gefolgert werden, dass auf oligoenes, de novo synthetisiertes MGD ( $^{14}C$ )Gal übertragen worden ist. Unabhängig vom Mechanismus der Reaktion ist damit das Verbot der Pool-Mischung des de novo synthetisierten MGD einerseits und des hexaenen MGD der Lipid-Bilayer des Envelope andererseits *in vivo* bestätigt. Denn in den Fällen I/II b und c, Abb. 7.4 S. 117, würden hauptsächlich hexaene DGD-Spezies entstehen, die bei I/II b darüber hinaus nur in der äußeren Galaktose radioaktiv markiert wären.

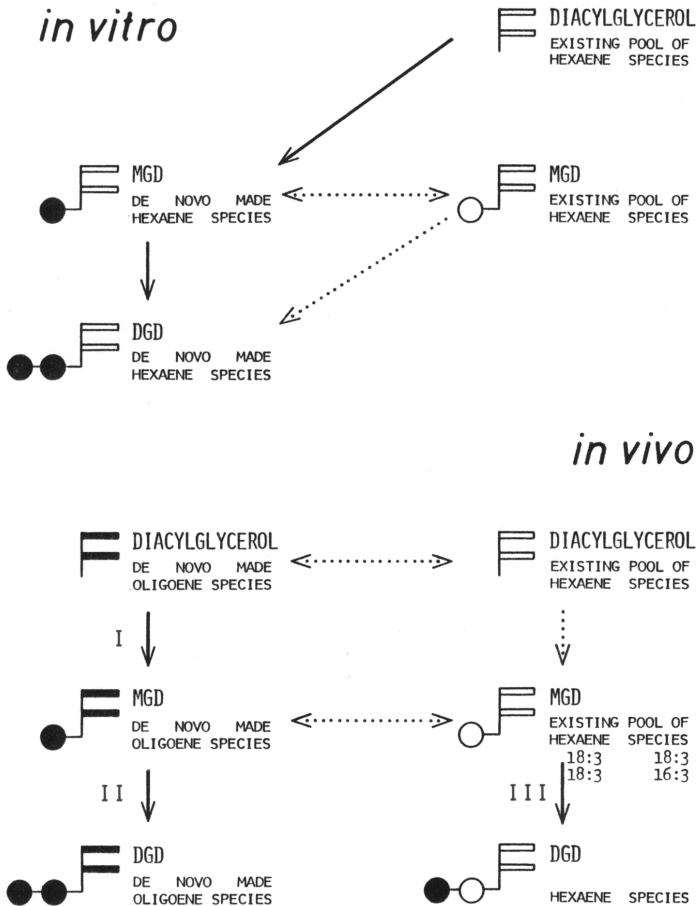
Dagegen muss (zumindest formal, s.u.) ein Pool eines präexistierenden, hexaenen MGD separiert werden, dessen ( $^{14}C$ )-Galaktosylierung zu jenen DGD-Spezies führt, die im  $AgNO_3$ -DC-Muster geringsten  $R_f$ -Wert besitzen und deren Radioaktivität hauptsächlich in der terminalen Galaktose lokalisiert ist (Abb. 8.7, Reaktion III). Für diese Reaktion gilt die oben genannte Beschränkung unabhängig von den beteiligten Enzymen offensichtlich nicht. Aus Experimenten der ( $^{14}C$ )-Markierung der Fs ist aber bekannt, dass  $C_{18:3}/C_{16:X}$ -MGD-Spezies von der Galaktosylierung ausgeschlossen bleiben (155, 156). Daher darf der genannte MGD-Pool nur  $C_{18:3}/C_{18:3}$ - ( $C_{18:3}/C_{18:X}$ ) Paarungen enthalten.

Mit dieser zusätzlichen Separierung sind somit drei MGD-Pools definiert worden, die in den Hüllmembranen der Chloroplasten existieren können: De novo synthetisierte, oligoene Spezies, die schnell zu DGD galaktosyliert werden (Reaktion II in Abb. 8.7) und deshalb nicht mit dem großen Pool der hexaenen Spezies in der Lipid-Bilayer äquilibrieren. Jene hexaenen Spezies sind aber unterschieden in  $C_{18:3}/C_{16:3}$ - und  $C_{18:3}/C_{18:3}$ -Kombinationen, von denen nur letztgenannte zum DGD umgesetzt werden (Reaktion III). Oligoene DGD-Spezies entstehen aus de novo synthetisiertem MGD (II), und diese Reaktion gehört in eine de novo Synthesesequenz der Galaktolipide (I und II).

Abb. 8.7 fasst die verschiedenen Schlussfolgerungen aus den *in vivo* und *in vitro* Markierungsexperimenten der Galaktolipide der Envelopes zusammen. Prominenteste Unterschiede der *in vivo* und *in vitro* Synthese der GL sind die Speziescharak-



## 8. Markierung der Membranlipide des Chloroplasten *in vivo*



**Abb. 8.7:** Pool-Separierung und Charakteristika des DG und der Galaktolipide *in vivo* und *in vitro*

Gepunktete Pfeile meinen einen langsamen Austausch oder langsame Reaktion.



teristika der Diglyceride, die in die de novo Synthesekette der Galaktolipide eintreten und die  $AgNO_3$ -DC-Muster aller radioaktiven Folgeprodukte prägen.

## 8.6 Galaktolipid-gekoppelte Desaturierung und Elongation der Fettsäuren

Oligoene, radioaktiv markierte, de novo synthetisierte MGD- und DGD-Spezies häufen sich in den Membransystemen der Chloroplasten in vivo nicht an. Die Vielzahl der Spezies durch positionsspezifische De- und Reacylierung in die vier Spezies zu überführen, die die Struktur- und Funktionselemente der Membranen sind (s. o.), i. e.

$$\frac{C-1}{C-2} \quad \frac{18:3}{16:3} - MGD, \frac{18:3}{18:3} - MGD, \frac{18:3}{16:0} - DGD, \frac{18:3}{18:3} - DGD,$$

wäre ein äußerst komplizierter Vorgang.

Eine andere Möglichkeit des Turn-overs der oligoenen Spezies ist die Lipid-gekoppelte Desaturierung der Fs, die bereits als einfacher Mechanismus diskutiert worden ist, das spezifische Fettsäuremuster aller Acyllipide zu bewirken (155, 156).

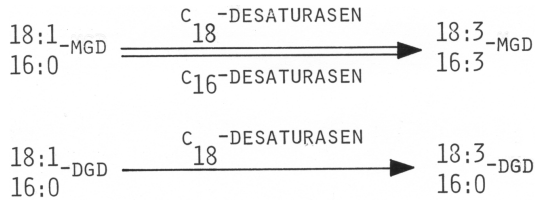
Da  $C_{18:1}$  und  $C_{16:0}$  sowohl in diesen als auch in zuvor ausgeführten Experimenten der in vivo Markierung der Membranlipide die Fettsäuren sind, die schnell, mit hoher spezifischer Aktivität und Positionsspezifität im MGD markiert werden, da  $C_{16:0}$  und  $C_{18:1}$  die Endprodukte der Fs-de novo Synthese (*ACP-Track*) in Chloroplasten sind (166, 185), die sich im isolierten Organell anhäufen (146, 121, 112, 185), liegt es nahe anzunehmen, dass die primär und mit höchster Rate synthetisierte oligoene DG-Spezies die Kombination

$$\frac{18:1}{16:0} - DG$$

ist (siehe auch *Glykolipidsynthese in isolierten Chloroplasten*, S. 163), die weitergegeben in die Galaktolipide zu den genannten Spezies desaturiert werden kann.

Einige Zwischenprodukte dieser Desaturierungssequenz sind in reproduzierbaren  $AgNO_3$ -DC-Mustern der in vivo markierten MGD und DGD identifiziert worden (Abb. 8.3, 8.4, 8.6), alle intermediären Fettsäuren,  $C_{16}$ - wie  $C_{18}$ -ungesättigte, sind radioaktiv in ihrer positionsspezifischen Veresterung nachweisbar (Abb. 3.2, 5.2).  $C_{16}$ -Desaturasen bearbeiten dabei offensichtlich spezifisch MGD-gekoppelte Palmitinsäure,  $C_{18}$ -Desaturasen akzeptieren  $C_{18}$ -Fettsäuren in beiden Lipiden:

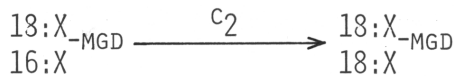
## 8. Markierung der Membranlipide des Chloroplasten in vivo



Die Ergebnisse der Hydrolysen der separierten Galaktolipidspezies stützen die Hypothese ebenso wie die Daten der chemischen  $\alpha$ -Oxidation der vier Fettsäuren der oligoenen Spezies des de novo synthetisierten MGD, die Kinetik der ( $^{14}\text{C}$ )-Inkorporation in die Fettsäuren (155, 156), die Zahl der in den  $\text{AgNO}_3$ -DC-Mustern feststellbaren Spezies (155) und die zeitliche Änderung der  $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster der GL (s.o., 155, 156).

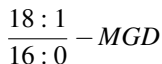
Die Hydrolysedaten entkräften insbesondere das Argument, das zeitlich sich ändernde  $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster der Galaktolipide entstehe durch langsames, konsekutives Auffüllen existierender Fs-Thioester-Pools mit Radioaktivität, die zu einer Desaturierungssequenz gehören, und Übertragen der Fettsäuren aus diesen Pools in die Lipide (156).

Ein scheinbar offener Punkt ist die Bildung der  $\text{C}_{18:3}/\text{C}_{18:3}$ -Spezies der beiden Galaktolipide. Da  $\text{C}_{18:X}/\text{C}_{18:X}$ -Spezies im  $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster des MGD nach kurzfristiger Inkubation keine wesentliche Rolle spielen, ist es fraglich, ob auch eine  $\text{C}_{18:1}/\text{C}_{18:1}$ -DG-Spezies in die de novo Synthesesequenz der Galaktolipide eintritt, die nur in der C-1-Position eine radioaktive Fettsäure tragen darf. Die Analyse der  $^{14}\text{C}$ -Acyllipide aus photosynthetisch aktiven Gewebekulturen des Tabaks lieferte den Hinweis, dass  $\text{C}_{16}$ -ungesättigte Fs der C-2-Position des MGD möglicherweise Prekursoren der analogen  $\text{C}_{18}$ -Fs sind:

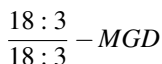


Wie zuvor diskutiert (155) und in vitro (CoA-Status der Fs, (172)) bestätigt, mag die Elongation der Fettsäuren mit geringerer Doppelbindungsanzahl schneller sein.

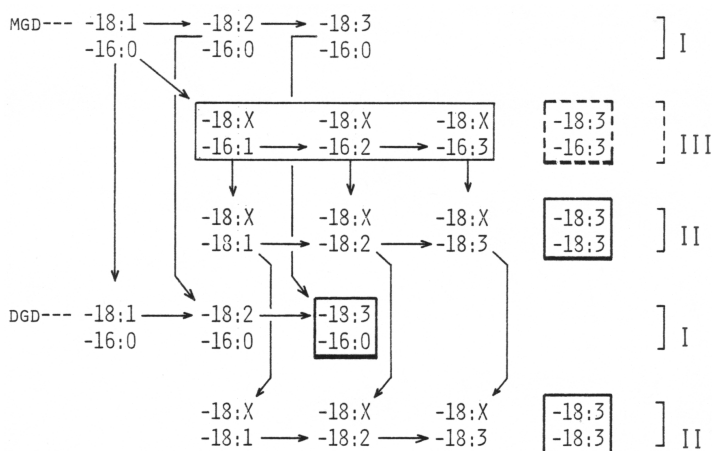
Die Reaktionsfolge: MGD-gekoppelte Desaturierung und -Elongation der  $\text{C}_{16}$ -ungesättigten Intermediate würde vom Edukt



zum Endprodukt



### 8.6. Galaktolipid-gekoppelte Desaturierung und Elongation der Fettsäuren



**Abb. 8.8:** Schema der MGD- und DGD-gekoppelten Desaturierung und der MGD-gekoppelten Elongation  
Erläuterungen im Text.

führen. Ist dabei im Blattgewebe (im Gegensatz zu grünen Gewebekulturen, s.o.) die Elongation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, häuft sich  $C_{16:3}$  in der C-2-Position des MGD an, i.e. die Spezies

$$\frac{18:3}{16:3} - MGD,$$

die für alle  $C_{16:3}$ -*Pflanzen* charakteristisch ist. Die intermediär entstandenen  $C_{18:X}/C_{18:X}$ -MGD-Spezies könnten Galaktosyltransferasen zu DGD umsetzen, die in der Folge von  $C_{18}$ -Desaturasen weiter zum Endprodukt

$$\frac{18:3}{18:3} - DGD$$

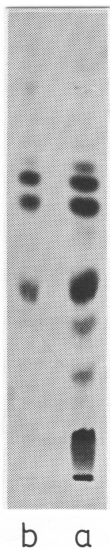
hin verändert werden.

Damit spielt die Desaturierung der  $C_{16:0}$  in Relation zur C-2-Position des MGD und die MGD-gekoppelte Elongation der  $C_{16:X}$  eine Schlüsselrolle bei der Synthese von  $C_{18:3}/C_{18:3}$ -Spezies der Chloroplastenlipide. Entsprechend den genannten Spezifitäten treten  $C_{18}/C_{18}$ -Kombinationen in der Tat nur im MGD und DGD, aber nicht im SQD und PG aus Envelopes und Thylakoiden auf (Abb. 6.3, 6.5, Tab. 6.4, s. u.)!

Da die Elongationen in vivo möglicherweise die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der  $C_{18:3}/C_{18:3}$ -Speziessynthese sind, könnten auch folgende, nach kurzfristigen Inkubationen ganzer Blätter immer wieder festgestellten Daten Effekte der beschriebenen Reaktionsfolge sein:

(1) Langsame Markierung der  $C_{18}$ -ungesättigten Fs in der C2-Position der Galaktolipide.

(2) Markierung des hexaenen DGD hauptsächlich in der äußeren Gal (im Gegensatz zu den Markierungsverhältnissen oligoener DGD), obwohl es aus der Galaktosylierung de novo synthetisierten und elongierten MGD, aber nicht aus hexaenem MGD des existierenden Bilayer-Pools hervorgegangen ist. Die formal separierte Galaktosylierung der hoch ungesättigten und hexaenen MGD-Spezies (Abb. 8.7, Reaktion III) ist daher möglicherweise mit Reaktion II gleichzusetzen. Eine ähnliche Situation ist für die Markierungsverhältnisse hoch ungesättigter MGD-Spezies oben diskutiert und für  $(^{14}C)$ DGD aus  $(^{14}C)$ -Acetat- und  $^{14}CO_2$ -inkubierten, jungen Blättern des Spinats (155, 156) und der Saubohne (179) bereits erfasst worden (Abb. 8.9).



**Abb. 8.9:**  $AgNO_3$ -DC des in vivo markierten DGD (155, 156)

Junge Blätter des Spinats wurden 1 h lang mit  $(^{14}C)$ -Acetat bzw.  $^{14}CO_2$  inkubiert.

b)  $(^{14}C)$ -Acetat wird bevorzugt in die Fs eingelagert und macht das im Text beschriebene Reaktionsschema (Abb. 8.8, Zeilen I) durch Markierung der Fettsäuren sichtbar,

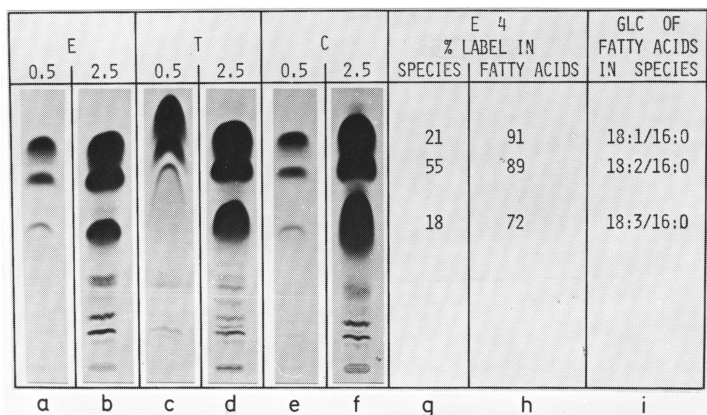
a)  $^{14}CO_2$  dagegen wird schnell in Hexosen fixiert und macht durch Gal-Übertragung auf MGD zusätzlich die Zeilen II sichtbar.

Wenn auch Thylakoidmembranen möglicherweise keine GL synthetisieren können (s.o.), so treten dennoch alle  $(^{14}C)$ -Lipidspezies (auch die der im Folgenden behandelten Lipide PG und SQD), die in den Fraktionen der Envelopes registriert werden können, auch in isolierten Thylakoiden auf. Daher muss man annehmen, dass die Kapazität dieser Membranen zur Desaturierung und Elongation der Kapazität der Envelopes ähnlich ist.

Für die Herstellung der diskutierten, positionsspezifischen Verteilung der  $(^{14}C)$ -Fs im Diglyceridbaustein ist möglicherweise eine Spezifität der Acyltransferasen des Chloroplasten für die Kettenlänge der Fs oder die Alles-oder-Nichts Sensibilität *gesättigt-ungesättigt* ausreichend,

**Abb. 8.9:**  $AgNO_3$ -DC des  $(^{14}C)$ DGD

da die weiteren Charakteristika des lipidspezifischen Fettsäuremusters im Pathway der Galaktolipid-gekoppelten Desaturierung eingeführt werden. Substrate der Acyltransferasen sind die Fettsäure-CoA-Thioester (15, 92, 166). Die Untersuchungen der Fettsäurespezifität gereinigter Enzyme stehen nicht im Einklang mit der postulierten Acylierung des Glycerinphosphats. Die löslichen Enzyme aus den Chloroplasten



**Abb. 8.10:**  $AgNO_3$ -DC des in vivo radioaktiv markierten PG (a - f)

Blätter des Spinats wurden 45 Min. lang mit  $^{14}CO_2$  inkubiert (2.2.5, Experiment I). Abkürzungen wie in Abb. 8.4 S. 137.

g) gibt den %-Anteil der Radioaktivität einzelner Spezies an,

h) den Anteil der Radioaktivität in den Fs einzelner Spezies.

i) bezeichnet die Spezies, deren Fsme radiogaschromatographisch untersucht wurden (Abb. 8.11).

der Erbse und des Spinats übertragen Fettsäurereste unabhängig von Kettenlänge oder Zahl der Doppelbindungen aus Acyl-CoA in die sn-1-Position (15, 16). Es gibt aber Hinweise darauf, dass Fettsäuren aus Acyl-ACP in beide Positionen eintreten können (16). Möglicherweise ist daher auch der Status der zur PA-Synthese angebotenen Fs ein Kriterium für die positionsspezifische Acylierung. Auf der Basis des beschriebenen Stoffwechselweges könnte man aber spekulieren, dass die Untersuchungen zur Spezifität der Acyltransferasen in Bezug auf die Fettsäuren in vitro irreführend sind, da den Enzymen in vivo nur wenige, definierte Fettsäurespezies zur Verfügung stehen könnten, i.e.  $C_{18:1}$ - und  $C_{16:0}$ -Thioester.

In Übereinstimmung mit der diskutierten These stellten Joyard et al. (88) fest, dass rekonstituierte Systeme aus Stroma und Envelopemembranen ( $^{14}C$ )-Acetat in die Fettsäuren  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$ , wenig auch in  $C_{16:1}$  und  $C_{18:1}$  einlagerten und diese in alle Intermediate der MGD-de novo Synthese, i.e. Monoacylglycerin, PA, DG und schließlich MGD inkorporierten, wenn sn-Glycerin3-phosphat und UDP-Gal zugefügt wurden (pH-Optimum 9):  $C_{18}$ -Fs wurden bevorzugt in die C-1-Position des Glycerin-3-phosphats übertragen,  $C_{16}$ -Fs in die C-2-Position. Während im Radioaktivitätsmuster der freien Fs  $C_{18:0}$  deutlich dominierte, waren  $C_{16:0}$  und  $C_{18:0}$  in PA, DG, MGD ungefähr gleich stark markiert.

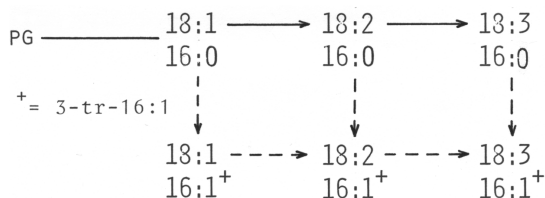
Die Autoren vermuten, dass die Desaturierung dieser  $C_{18}/C_{16}$  Spezies in Kopplung an MGD in den Hüllmembranen der Chloroplasten abläuft und Chinone im Desaturierungsmechanismus eine wichtige Rolle spielen.

Die Inkubationen intakter Chloroplasten mit UDP- $(^{14}C)$ Gal und  $(^{14}C)$ -Acetat demonstrieren ebenso, dass die Organelle, versorgt mit UDP-Gal, unabhängig von extraplastidären Systemen und Bausteinen  $C_{18:1}/C_{16:0}$ -MGD de novo synthetisieren und desaturieren können (s.u.).

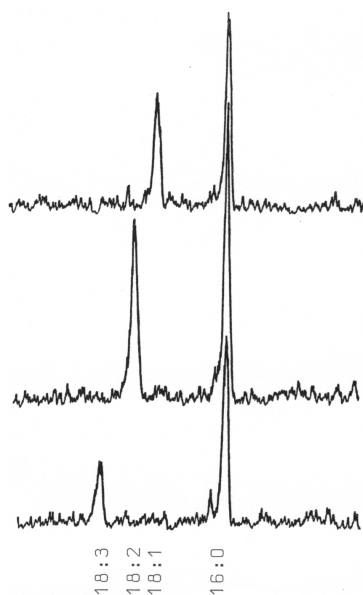
### 8.7 In vivo radioaktiv markiertes SQD, PG und PC aus Envelope- und Thylakoidfraktionen

In den MS-Diglyceridprofilen des SQD und PG aus isolierten Envelopes (Abb. 6.5, S. 109) stellen wie bei den GL wenige Spezies die Hauptkomponenten des Lipids dar:  $C_{18:3}/C_{16:0}$ - und  $C_{16:0}/C_{16:0}$ -Kombinationen bzw.  $C_{18:3}/3\text{-tr-}C_{16:1}$ - und  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -Paarungen. Entsprechend dominieren die Fettsäuren dieser Spezies im Fettsäurenmassenmuster. Im Gegensatz dazu wurden bei diesen und früheren (155, 156) Markierungsexperimenten Fettsäuren hoch radioaktiv markiert, die im Massenmuster Spurenkomponenten sind und die zu Fettsäurekombinationen zusammentreten, die massenspektroskopisch kaum erfassbar sind, im  $AgNO_3$ -DC-Muster der radioaktiven Lipide aber sichtbar werden (Abb. 8.10, 8.13). Diese Muster erreichen keinen so hohen Grad an Komplexität wie die der GL, da  $C_{18}/C_{18}$ -Kombinationen im SQD und PG fehlen, wie die Analyse der Lipide aus isolierten Envelopes zeigte. Nach kurzen Inkubationszeiten dominieren relativ gesättigte Spezies beider Lipide (s.  $E_{30}$ ,  $T_{30}$  und  $C_{30}$ ). Im Falle des PG konnten die drei Hauptkomponenten der Fraktion  $E_{2,5h}$  durch RGC der Fsme identifiziert werden (Abb. 8.11). Aufgrund der Positionsanalyse des totalen PG, isoliert aus der Fraktion  $T_{2,5h}$  (Abb. 3.2, S. 72) und der großen Übereinstimmung der  $AgNO_3$ -DC-Muster der einzelnen analysierten Fraktionen untereinander lässt sich schließen, dass es sich stets um die Spezies  $C_{18:1}/C_{16:0}$ -,  $C_{18:2}/C_{16:0}$ - und  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -PG handelt. Diese oligoenen häufen sich, wie oben aufgezeigt, nicht an, werden aber, wie auch die Hydrolysen der separierten Spezies andeuten, mit hoher Rate gebildet.

Die Daten der Hydrolysen machen ebenfalls darauf aufmerksam, wie sehr das DC-Muster durch die Radioaktivität in den Fettsäuren geprägt ist. In Anbetracht der Kinetik der  $(^{14}C)$ -Inkorporation in die Fettsäuren des PG junger Blätter (155, 156), liegt es auch hier nahe, folgende Desaturierungssequenz in Relation zum Lipid anzunehmen:



Die Desaturierung zur 3-tr- $C_{16:1}$  in Koppelung an das Lipid ist bereits von anderen Autoren diskutiert worden (63); radioaktive 3-tr- $C_{16:1}$  konnte in den untersuchten Fraktionen nur in Spuren festgestellt werden. Die Säure sollte, ans PG gebunden, sich silbernitratchromatographisch (10) wie  $C_{16:0}$  verhalten. Dies deutet die starke Meniskusbildung einerseits und *Ausschwänzen* der dritten Bande, in der  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -PG und die große Masse des  $C_{18:3}/3\text{-tr-}C_{16:1}$ -PG vertreten sein sollten.



**Abb. 8.11:** RGC der Fsmc der in vivo markierten PG-Spezies (s. Abb. 8.10) aus der Fraktion  $E_{4h}$  (2.2.5 Exp. I)

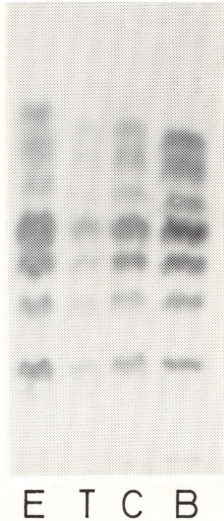
Bei der Interpretation der  $AgNO_3$ -DC-Muster des in vivo radioaktiv markierten SQD müssen ähnliche Überlegungen angestellt werden. Die Fettsäurekomposition der Spezies kann jedoch nur indirekt erschlossen werden: Von den drei Hauptkomponenten tragen zwei Spezies ca. 60 % der Radioaktivität in den Acylgruppen, während die dritte Spezies deutlich höher im Sulfoquinosylrest markiert ist. Da nach 2,5 h Inkubation neben  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$  und  $C_{18:2}$ , aber noch nicht  $C_{18:3}$  radioaktiv sind, können die Daten der Positionsanalyse so interpretiert werden, als handle es sich um die Fettsäure-Paarungen  $C_{16:0}/C_{16:0}$  und  $C_{18:X}/C_{16:0}$ . Da sich das  $AgNO_3$ -DC-Muster nach längerer Inkubationszeit ebenfalls zugunsten der höher ungesättigten Spezies ändert, liegt es nahe, die Desaturierungssequenz



zu postulieren. Somit scheint  $C_{18:1}/C_{16:0}$ -DG ein möglicher, universeller Vorläufer in der Lipidgenese der Chloroplasten zu sein (s.u.). In welchen Lipidspezies jedoch  $C_{16:0}$  verestert ist, die in der C-1-Position des nicht fraktionierten PG und SQD geringfügig radioaktiv



markiert registriert wurde (Abb. 3.2, S. 72), ist offen ebenso wie die Identität und Bedeutung weiterer, schwächer markierter Lipidbanden mit geringem  $R_f$ . Sie stellen möglicherweise einen Artefakt bei der DC durch Komplexierung der negativ geladenen Lipide mit Kationen dar (123).



Andersartig ist das Spektrum des in vivo markierten PC, dessen  $AgNO_3$ -DC aus den Fraktionen E, C, T, B (2,5 h) in Abb. 8.12 gezeigt wird. In einigen Spezies der Fraktion  $E_{4h}$  konnte radioaktiv markierte  $C_{18:1}$  festgestellt werden, offensichtlich parallel dazu alternieren die Prozentanteile der Radioaktivitäten in den Acylresten zwischen hohen und niedrigen Werten.

Ein ähnliches Phänomen konnte im Speziesmuster des in vivo markierten PC aus jungen Maisblättern beobachtet werden (160); es ist möglicherweise auf die Kombination der geringer radioaktiven  $C_{16:0}$  mit  $C_{18:1}$  zurückzuführen. Die Paarungen der ( $^{14}C$ )Fs zu

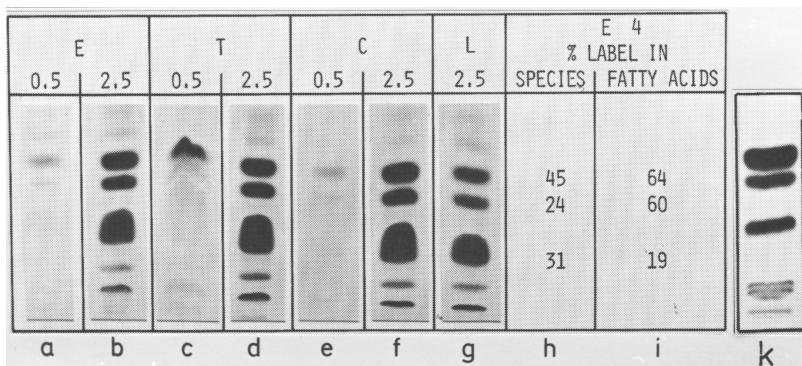
$$\frac{16:0}{18:1} - PC \text{ und } \frac{18:1}{18:1} - PC$$

**Abb. 8.12:**  $AgNO_3$ -DC des in vivo radioaktiv markierten PC aus Blättern, Chloroplasten, Thylakoiden und Envelopes des Spinats  
Blätter wurden 45 Min. lang mit  $^{14}CO_2$  inkubiert (Experiment I, 2.2.5, S. 37). Analyse des Lipids aus den Fraktionen  $E_{2,5h}$ ,  $T_{2,5h}$ ,  $C_{2,5h}$  und  $B_{2,5h}$ .

ständen weder  $C_{16:3}$ - noch in  $C_{18:3}$ -Pflanzen im Widerspruch zur bestimmten, positionsspezifischen Verteilung der radioaktiv markierten Fettsäuren (s.o., Abb. 3.2, 3.3, 3.4). RGC der Fsme des unfractionierten ( $^{14}C$ )-Lipids aus Blättern ( $B_{2,5h}$ ) und Thylakoiden ( $T_{2,5h}$ ) und die  $AgNO_3$ -DC weisen darauf hin, dass a) die Membranen des Chloroplasten nach kurzfristigen Inkubationen ein vielfältiges Spektrum unfertiger Spezies enthalten und b)  $C_{18}$ -Dien- und Triensäuren entweder nur zögernd in Lecithin eingebaut oder in Koppelung an dieses Lipid langsam desaturiert werden. Daher ist ein Fs-Pool der  $C_{18:3}$  separiert worden, der in PC inkorporiert wird (s.v., 156).

Neben dieser Separierung und dem andersartigen Muster der positionsspezifischen Markierung der Fs mag nun auch das  $AgNO_3$ -DC-Muster zur Abtrennung des PC von anderen Lipiden des Chloroplasten, i.e. der Gruppe: MGD, DGD, SQD, PG, beitragen.





**Abb. 8.13:**  $AgNO_3$ -DC des in vivo markierten SQD aus Blättern, Chloroplasten, Envelopes und Thylakoiden des Spinats (a - g)

Blätter wurden 45 Min. lang mit  $^{14}CO_2$  inkubiert (2.2.5 Exp. I).

h) gibt den %-Anteil der Radioaktivität einzelner Spezies an,

i) den Anteil der Radioaktivität in den Fettsäuren einzelner Spezies. k)  $AgNO_3$ -DC des in vitro markierten SQD: Isolierte, Perkoll-D.grad. gereinigte Chloroplasten wurden 20 Min. lang mit  $^{35}SO_4^{2-}$  in der Warburg-Apparatur inkubiert (Experiment 2.2.3.10). Extraktion der erneut über Perkoll-D.grad. gereinigten, intakten Chloroplasten.

## 8.8 Funktionelles Modell der de novo Synthesesequenz der Galaktolipide

In vivo Markierungsmuster der Lipide des Envelope unterscheiden sich wesentlich von denen in vitro synthetisierter Galaktolipide durch

- die Vielzahl der individuellen ( $^{14}C$ )-Spezies, insbesondere durch das Auftreten relativ gesättigter Spezies
- die zeitliche Änderung der  $AgNO_3$ -DC-Muster und die Dominanz der oligoenen Spezies nach kurzzeitigen Inkubationen

Positionsanalysen unfraktionierter, individueller Acyllipide sowie Analysen der oligoenen Lipidspezies, wie Hydrolysen, Methylierungsanalysen, chemische  $\alpha$ -Oxidation der Fs der MGD-Spezies, RGC der Fsme, führten zur Identifizierung und Charakterisierung einiger molekularer Spezies. Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- In vivo und in vitro galaktosylierter DG-Pool des Envelope sind qualitativ verschieden.

- In vivo werden oligoene DG-Spezies, womöglich nur eine  $C_{18:1}/C_{16:0}$ -Kombination synthetisiert.
- Galaktolipide werden in einer de novo Synthesesequenz gebildet.
- Pools der de novo synthetisierten, oligoenen DG und Galaktolipide sind separiert und verschieden von den bestehenden Pools der Membran-Bilayer.
- Oligoene Spezies werden mit höchster Rate gebildet, häufen sich aber nicht an. Alle Daten, auch die früherer Experimente (155, 156), stützen die Diskussion der MGD-gekoppelten Desaturierung und -Elongation und der DGD-gekoppelten Desaturierung.  $C_{18}$ -Desaturasen sollten auch de novo synthetisierte, oligoene SQD- und PG-Spezies umsetzen. Für die MGD-spezifische  $C_{16}$ -Desaturierung und -Elongation wird eine besondere Rolle bei der Bildung der  $C_{18}/C_{18}$ -Galaktolipidspezies diskutiert.
- Eine mögliche Donatorfunktion des PC für die Galaktolipidsynthese in den Envelopes der Chloroplasten kann eingeschränkt werden.

In diesem Abschnitt soll versucht werden, die verschiedenen Pools der Galaktolipide, ihres Prekursors DG und die Verbote der Pool-Mischung auf zytologische Strukturen und die Hypothese eines funktionellen Modells zu übertragen.

Die vier Bilayer-Hälften der Hüllmembranen der Chloroplasten sind in ihrer Protein- und wahrscheinlich auch in ihrer Lipidzusammensetzung verschieden (41, 103). Mit diesen Asymmetrien könnte die Separierung der Pools korrelieren, die insbesondere in der inneren Membran lokalisiert sein mögen, da Douce und Joyard dort die Enzyme der Lipidbiosynthese vermuten (41). Diese Annahme deckt sich mit dem Konzept, dass eine wachsende, sich ausdehnende Membran die benötigten Lipide in der Membran selbst synthetisiert und durch die enzymatischen Reaktionen der Biogenese zur Asymmetrie der Lipid-Bilayer beiträgt (83, 103).

Die Galaktolipide der Envelopes lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die kleinere von beiden wird schnell radioaktiv markiert und beinhaltet Intermediate der de novo Synthesekette der Galaktolipide und *unfertige* Lipide, deren Acylreste noch abgewandelt werden müssen. Es sind dies die oligoenen Spezies, die engen Kontakt zu den aktiven Zentren Membran-eingebetteter Enzyme halten oder an sie gebunden sind. Die Lipidmoleküle können nicht in die Bilayer der Membran diffundieren; ansonsten würden sie einem weiteren Umsatz entkommen und in der Membran akkumulieren.

Die 2. Gruppe von Lipiden repräsentiert fertige, desaturierte Moleküle, die die Enzymkomplexe verlassen und die großen, strukturellen Pools der Membran-Bilayer aufbauen.

Die spekulativen Enzymkomplexe enthalten eine Vielzahl von Proteinen, von denen die meisten fest an und in die Envelopemembran gebunden sind:

- 1 Acyl-CoA Synthetase,
- 2 Acyl-CoA:sn-Glycerin-3-phosphat Acyltransferase (assoz.),
- 3 Acyl-CoA:Acyl-sn-glycerin-3-phosphat Acyltransferase,
- 4 Phosphatidsäure Phosphatase,
- 5 UDP-Gal:sn-1,2-Diacylglycerin Galaktosyltransferase,
- und
- 6 UDP-Gal:Galaktolipid Galaktosyltransferasen (41).

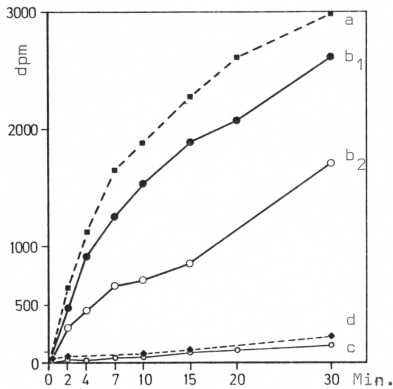
Die Sequenz beginnt mit der Aktivierung der de novo synthetisierten Fettsäuren  $C_{16:0}$  und  $C_{18:1}$  und der positionsspezifischen Direktion der  $C_{16:0}$  in die sn-2-, der  $C_{18:1}$  in die sn-1-Position des Glycerinphosphats, das im Cytoplasma synthetisiert (82) und durch den Phosphat-Triosephosphat-Translokator (81) in den Chloroplasten eingeschleust wird und ebenso wie die Fettsäuren auf der Stroma-Seite der inneren Hüllmembran zur Verfügung steht. Als Kriterien für die positionsspezifische Übertragung der Fettsäuren sind die Kettenlänge und der Thioester-Status genannt worden. Der Verlust des Phosphatrestes mag die Bewegung des DG in die äußere Bilayer der inneren Hüllmembran induzieren (1). An dieser Membranseite ist die im Cytoplasma gebildete UDP-Gal (98), die nur die äußere Hüllmembran schnell passieren kann (67), für die UDP-Gal:DG-Gal.transferase als Substrat erreichbar. Um das de novo synthetisierte, oligoene MGD konkurrieren nun drei Reaktionen:

- Weitere Galaktosylierung
- Transport in die Thylakoide (und in extraplastidäre Systeme?) hinein
- Desaturierung

Ein der PC-Synthese in Erythrozytenmembranen ähnlicher Mechanismus (83) könnte dafür sorgen, dass MGD-Spezies, die  $C_{16}$ -ungesättigte Fs enthalten, für die weitere Galaktosylierung zum DGD nicht erreichbar sind: PE und die Methyltransferase I sind in der cytoplasmatischen Seite der Membran-Bilayer lokalisiert. Die Methylierung zum Phosphatidyl-N-monoäthyläthanolamin hat eine intramembrane Translokation des Lipidmoleküls zur Folge. In die Membran eingesenkt soll die aktive Seite des Enzyms liegen, und für die Reaktion ist  $Mg^{++}$  essentiell, das möglicherweise die Phosphatgruppe des PE neutralisiert. Nach weiterer Methylierung erscheint das fertige PC auf der Außenseite der Bilayer. Die Intermediate sind während des Umsatzes nicht durch Phospholipase C spaltbar.

Zwei Typen von Desaturasen seien in der Bilayer der inneren Hüllmembran dem Multienzymkomplex zugehörig:  $C_{18}$ -Desaturasen, die in Koppelung an MGD und DGD deren  $C_{18}$ -Fs desaturieren, und  $C_{16}$ -Desaturasen, die spezifisch für die Acylreste des MGD die Intermediate für eine Elongation zu den  $C_{18}$ -ungesättigten

Analoga herstellen. Indem aber MGD-gekoppelte  $C_{16}$ -Desaturasen und -Elongasen agieren, könnten die MGD-Spezies für eine Galaktosylierung blockiert sein, wie oben Methyl-PE gegen den Angriff der Phospholipase geschützt ist.



**Abb. 8.14:** Radioaktivität in den Produkten der enzymatischen Galaktosylierung des MGD und des MGD-Äther-Analogs

Ein Acetonpulver-Proteinextrakt junger Blätter der Erbse wurde mit den Lipidsuspensionen

a)  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD, b)  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD +  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD-Äther-Analogon, c)  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -MGD-Äther-Analogon, d) ohne Lipidsuspension und mit UDP- $(^{14}C)$ Gal inkubiert (2.9.2, S. 64).

Die Reaktionsprodukte wurden DC-gereinigt. Im Falle b) wurde ein Aliquot der Ansätze unverändert ( $b_1$ ), ein zweites nach alkalischer Hydrolyse zur DC aufgetragen ( $b_2$ ) und die in den Reaktionsprodukten bestimmte Radioaktivität mit zwei multipliziert.

Die produzierten  $C_{18}/C_{18}$ -Kombinationen erscheinen nun möglicherweise wieder auf der Innenseite der inneren Envelopemembran, wo sie weiter desaturiert ( $C_{18}$ -Desaturasen) und auch galaktosyliert werden können, eventuell unabhängig von UDP-Gal durch die Interlipid-Gal.transferasen. Diese Transferasen sind möglicherweise dann aktiv, wenn der pH-Wert des Stromas neutral oder sauer ist. Im Gegensatz dazu sind die Enzyme 1 - 5 im Alkalischen aktiv (88) (Relation zur Fettsäure-de novo Synthese während der Photosynthese?). Auf diese Weise könnten höhere Galaktolipide unabhängig von UDP-Gal gebildet werden, wenn der fotosynthetische Elektronentransport nicht läuft. Daneben können im Licht Desaturierung und Galaktosylierung der oligoenen MGD-Spezies sowie Desaturierung der entstandenen DGD-Spezies in der äußeren Bilayer-Hälfte ablaufen.

Stets jedoch bleiben oligoene, de novo synthetisierte Lipide in enger Relation zu den Enzymen dieses spektakulären Komplexes. Sie könnten einen Anulus relativ gesättigter Natur schaffen, der die Aktivität der eingebetteten Enzyme stimuliert (109, 150). Kürzlich wurde ein zweiphasiger Arrhenius-Graph der Aktivität der Galaktosyltransferasen beschrieben (17), der aber nicht nur als viskotropher Effekt der Anulus-Lipide (150), sondern auch als Diversität des Galaktosyltransfers interpretiert werden kann (Reaktionen I - IV, V - VII).

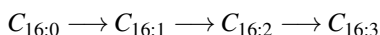
Erst die Endprodukte  $C_{18:3}/C_{18:3}$ -MGD und  $C_{18:3}/C_{16:0}$ ,  $C_{18:3}/C_{18:3}$ -DGD werden in die Pools der Lipid-Bilayer entlassen. Offensichtlich kann auch  $C_{18:3}/C_{16:3}$ -MGD den Komplex verlassen und möglicherweise liegt gerade darin der Grund, warum diese Spezies nicht galaktosyliert wird, obwohl sie nicht mehr wie oben beschrieben durch eine MGD-gekoppelte Desaturase oder -Elongase blockiert ist: Gehören Galaktosyltransferasen ebenso zum Multienzymkomplex, setzen sie nur Moleküle um, die in diesem Komplex von Enzym zu Enzym weitergegeben werden.

Das Modell vermag die Ergebnisse der *in vivo* Markierungsexperimente der Galaktolipide zu erklären, ebenso die Ergebnisse der *in vitro* Experimente. *In vitro* werden oligoene DG nicht synthetisiert, aber hexaenes DG, das möglicherweise in der Interlipid-Gal.transferase-Reaktion frei wird, kann in die *de novo* Synthesekette des Enzymkomplexes eintreten. Zwei der Konkurrenzreaktionen um das gebildete MGD und DGD entfallen in dieser Situation: Abtransport und Desaturierung. Als Folge davon werden höhere Galaktolipidhomologe ungewöhnlich stark markiert.



## Metabolismus des MGD-Äther-Analogons

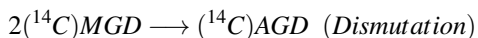
Aufgrund der Kinetik der ( $^{14}\text{C}$ )-Inkorporation in die Fettsäuren des MGD in *Chlorella* und der Markierung individueller Spezies haben Safford und Nichols (149) eine MGD-gekoppelte Desaturierung diskutiert. Die Ergebnisse der Markierung der Fettsäuren junger Blätter des Korbells und des Spinats stützten diese These und wiesen insbesondere auf die Sequenz



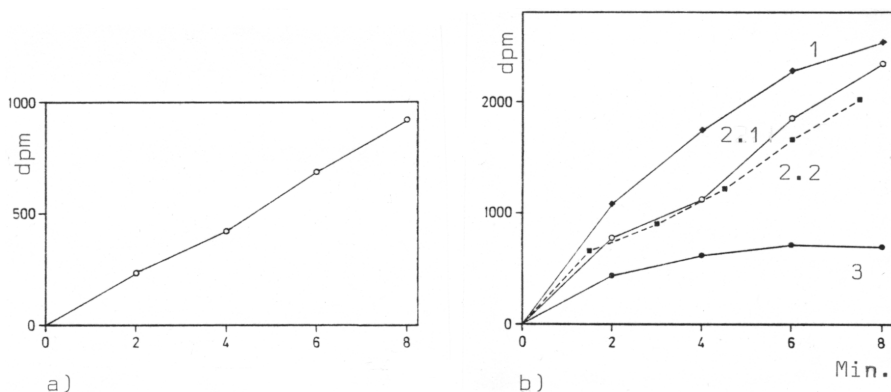
hin, deren radioaktive Intermediate, in der C-2-Position des MGD verestert, nachgewiesen werden konnten (155, 156). In dieser Arbeit geschilderte Markierungsversuche und umfangreiche Analysen haben die These einer MGD-gekoppelten Desaturierung erhärtet (s. o.). Daher synthetisierte Prof. Dr. E. Heinz ein Äther-Analogon des MGD. Die Desaturierung dieses Moleküls würde eindeutig demonstrieren, dass lipidgebundene Acylreste Substrate für die Desaturierung sind und dass De-Reacylierungsmechanismen (56) keine Rolle spielen. Die Versuche, das tritiierte Äther-Analogon in vivo zu desaturieren, sind jedoch bislang fehlgeschlagen. Zwar nehmen Protoplasten aus jungen Haferblättern (57) das in Liposomen verpackte Lipid auf und acylieren es zum AGD-Analogon (58) und photosynthetisch aktive Gewebekulturen des Tabaks metabolisieren es zu einer Komponente, die sich dünnschichtchromatographisch dem DG analog verhält. Inkubationen von Blaualgen, Wasserlinsen und jungen Haferkeimlingen (Injektion in die Karyopsen) waren jedoch völlig erfolglos (74). Dennoch sei der Metabolismus des Lipids in vitro dargestellt. Die Ergebnisse der Versuche ermutigen, das Projekt MGD-Äther-Analogon weiter zu verfolgen.

Ein Acetonpulver-Protein-Extrakt aus jungen Blättern der Erbse setzte das Äther-Analogon mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal um zum DGD-Äther-Analogon (Abb. 8.14). Der Versuch wurde, jedoch nur einmal reproduziert. Eine Proteinfraction aus Blatthomogenaten

junger *Vicia faba*-Pflanzen katalysiert den Transfer von Acylgruppen aus Galaktolipiden in die 6'-Position der terminalen Gal von Galaktolipiden (69 - 72, 76, 78, 80, 34). Dieses Lipid-metabolisierende Enzym ist ein Protein der Hüllmembranen der Chloroplasten (75). Abb. 55 a zeigt den Umsatz



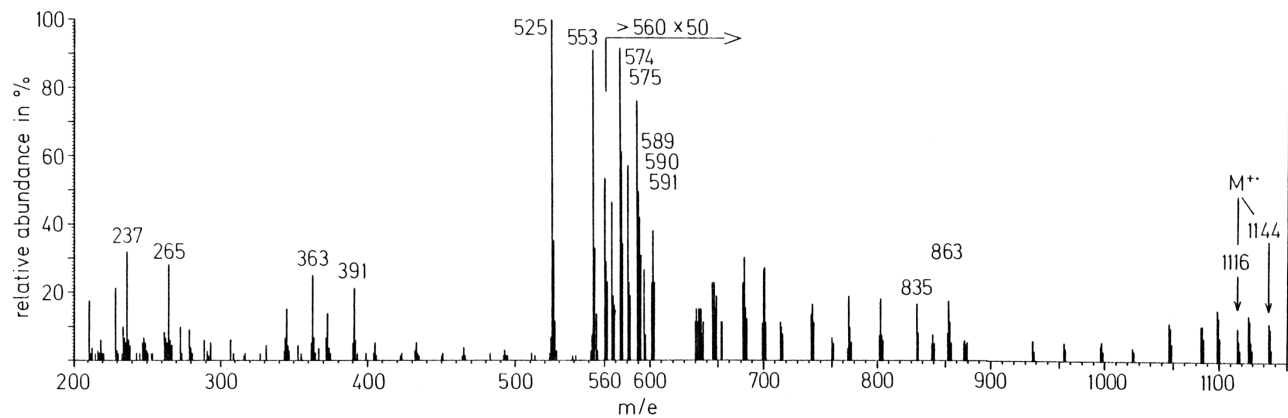
durch die Proteinfraction aus *Vicia faba*, Abb. 55 b den Acyltransfer aus DGD, dessen Fettsäuren Tritium-markiert sind, auf MGD und das MGD-Äther-Analogon. Diese Reaktion war reproduzierbar. Die Struktur des 6'-acylierten Äther-Analogons ließ sich massenspektroskopisch bestätigen (Abb. 56). Abb. 57 gibt die GC der Fsme der 6'-Position wieder, die aus semisynthetischem  $\text{C}_{18:1}/\text{C}_{16:1}$ -DGD (Fettsäurezusammensetzung 47,4 bzw. 52,6 Mol-%) auf das Äther-Analogon übertragen wurden. Das derivatisierte MGD-Äther-Analogon, ob enzymatisch acyliert, acetyliert oder trimethylsilyliert, verhält sich chromatographisch anders als das entsprechend umgesetzte MGD (Abb. 58).



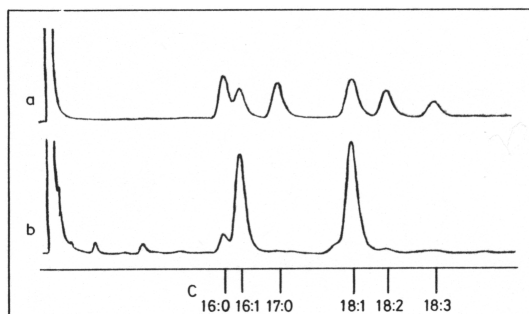
**Abb. 9.1:** Radioaktivität in den Produkten der enzymatischen Acylierung des MGD und des MGD-Äther-Analogons

Eine Proteinfraction aus Blättern der Saubohne wurde a) mit  $(^{14}\text{C})\text{MGD}$  und b) mit 1.  $(^3\text{H})\text{DGD} + \text{MGD} + \text{MGD-Äther-Analogon}$ , 2. mit  $(^3\text{H})\text{DGD} + \text{MGD-Äther-Analogon}$  (2.1, 2.1: 1. und 2. Versuch) und 3. mit  $(^3\text{H})\text{DGD}$  inkubiert (2.9.1, S. 63). Die Reaktionsprodukte wurden dünnschichtchromatographisch gereinigt.



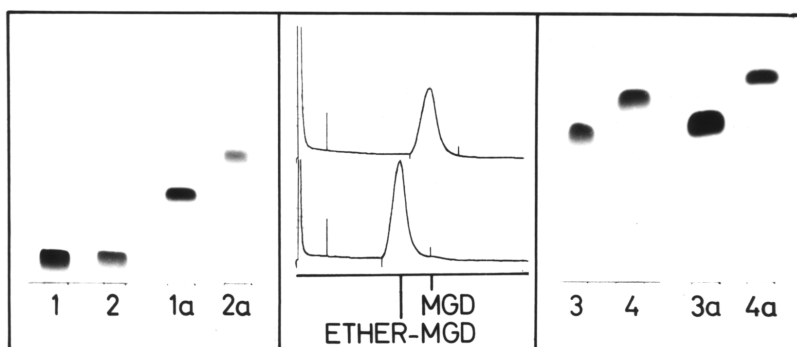


**Abb. 9.2:** Massenspektrum des acetylierten 1,2-Di-O-octadecenyl-3-O-(6'-O-acetyl- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-sn-glycerins  
Erläuterungen zur Synthese des acylierten MGD-Äther-Analogons s. Abb. 9.3.



**Abb. 9.3:** GC der Fsme des acylierten MGD-Äther-Analogons

Eine Proteinfraction aus Blättern der Saubohne wurde mit  $C_{18:1}/C_{16:1}$ -DGD und  $C_{18:1}/C_{18:1}$ -MGD-Äther-Analogon inkubiert (2.9.1). Das (acetylierte) Produkt wurde massenspektroskopisch identifiziert (Abb. 9.2), die Fs der 6'-Position wurden gaschromatographisch analysiert (b). (a) = Fs.referenzgemisch. Bei der enzymatischen Reaktion wurden beide Fs des Donators DGD auf das MGD-Äther-Analogon übertragen.



**Abb. 9.4:** Chromatographisches Verhalten des MGD und des MGD-Äther-Analogons und ihrer Derivate

Links: DC des MGD (1) bzw. MGD-Äther-Analogons (2) vor und nach Acetylierung (1a, 2a) in LM 7 und 10.

Mitte: GC des trimethylsilylierten  $C_{16}/C_{16}$ -MGD und des MGD-Äther-Analogons (Ether-MGD).

Rechts: DC des acylierten MGD (3) und des acylierten MGD-Äther-Analogons (4) vor und nach Acetylierung (3a, 4a) in LM 7 und 10.

## Galaktosyltransferasen

In jüngster Zeit ist ein zweiter Typ von Galaktosyltransferasen beschrieben worden, der nicht UDP-Gal als Gal-Donator, sondern MGD oder gar höhere Galaktolipid-homologe bei der Synthese des DGD, TGD und TeGD nutzt (Reaktionen V - VIII) (17). Hinweise auf die Existenz zweier verschiedener Enzymsysteme, u.a. auch unterschiedliche Temperatur und pH-Optima der MGD- und DGD-Synthese, unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Triton X-100, hatten andere Autoren zuvor erkannt (20, 21, 40, 73, 75). Auch die Fettsäuremuster der Galaktolipide in heterotrophen Gewebekulturen des Tabaks deuten eine unterschiedliche Entstehungsweise des MGD und DGD an, entweder auf der Basis verschiedener Enzyme oder verschiedener Kompartimentierung. Tatsächlich ist unklar, ob alle Galaktolipid-bildenden Enzyme der pflanzlichen Zelle in den Hüllmembranen der Chloroplasten konzentriert sind (73) oder ob sie auch in den Fraktionen des Cytoplasmas (40, 73, 157, 158) und der Thylakoide vorkommen. Offen ist auch, zu welchen Anteilen die UDP-Gal:DG bzw. Galaktolipid Galaktosyltransferasen und Galaktolipid:Galaktolipid Galaktosyltransferasen in vivo an der Synthese des DGD und der höheren Homologen beteiligt sind. In isolierten Envelopes soll die Interlipid-Gal.transferase allein für deren Bildung verantwortlich sein (17).

Nimmt man eine *freie Desaturierung* ACP- oder CoA-gebundener Fettsäuren an, sollte die Spezifität der Galaktosyltransferasen ein wichtiger Faktor sein, der das Fettsäuremuster des gebildeten Lipids mit bestimmt: Sie sollten aus einem breiten Spektrum von DG- bzw. GL-Spezies jene auswählen und mit hoher Rate umsetzen, die für das Galaktolipid repräsentativ sind. Die wenigen Arbeiten, die dieses Problem mit angereicherten Proteinfractionen oder Acetonpulver-Extrakten untersuchten, erbrachten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. M. Siebertz und E. Heinz registrierten höchste Umsatzraten für hoch ungesättigte MGD-Spezies, wenn Acetonpulver-Extrakte mit UDP(<sup>14</sup>C)Gal und einzelnen, definierten MGD-Spezies

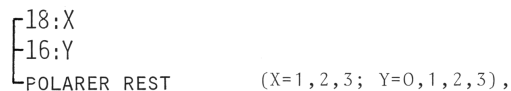
inkubiert wurden (Abb. 5, S. 10). Das einzige Reaktionsprodukt war dabei ( $^{14}\text{C}$ )DGD, radioaktives MGD konnte nicht registriert werden. Daher kann einer UDP-Gal:MGD Galaktosyltransferase diese *in vitro* Synthese zugeschrieben werden. Die Silbernitratmuster *in vivo* markierter Galaktolipide (155, 156) wiesen aber deutlich darauf hin, dass die Galaktosyltransferasen keinerlei Spezifität in Bezug auf das Diglyceridprofil der Substrate besitzen. Die Silbernitratmuster und ihre zeitliche Änderung sind auf der Basis der Lipid-gekoppelten Desaturierung diskutiert worden, eines Mechanismus, der mitverantwortlich sein kann für die Herstellung Lipid-spezifischer Fettsäuremuster (s.o.). Eine Spezifität der Galaktosyltransferasen stellt daher nicht mehr ein notwendiges Charakteristikum der Enzyme dar. In der Tat belegen die Differenzen der  $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster *in vivo* und *in vitro* markierter Galaktolipide der Envelope-Fractionen, dass die Galaktosyltransferasen dieses Membransystems DG und MGD in unspezifischer Weise umsetzen.

Es schien interessant genug zu sein, diese Ergebnisse, die in gewissem Widerspruch zu den oben genannten Versuchsdaten meiner Frau stehen, *in vitro* zu überprüfen, indem Acetonpulver der Erbse nicht mit einzelnen MGD-Spezies, sondern mit einem Gemisch verschiedener Spezies inkubiert wurden. In diesen Gemischen (Tab. 2.6, S. 55) waren neben hexaenen Molekülen auch solche vertreten, die für das Massenmuster des DGD aus Blättern der Erbse und des Spinats untypisch sind. Alle Spezies wurden von den Acetonpulvern der Erbse und des Spinats in etwa ihrer Masse in den Suspensionen entsprechend umgesetzt. Es kann daher als gesichert gelten, dass die UDP-Gal:DG bzw. MGD Galaktosyltransferasen aus Erbsen und Spinat keinerlei Spezifität in Bezug auf die Fettsäurezusammensetzung ihrer Substrate besitzen.

## Glykolipidsynthese in isolierten Chloroplasten

Lipid-Bilayer der Chloroplasten werden aus wenigen Acyllipiden aufgebaut: MGD, DGD, SQD, PG und PC (Abb. 2, S. 6). Die vier erstgenannten können in  $C_{16:3}$ -Pflanzen zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Kriterien dafür sind

- das z.T. ausschließliche Vorkommen von  $C_{16}$ -Fettsäuren in der C-2-Position ihres Glycerinbausteins,
- die positionsspezifische Markierung ihrer Fettsäuren bei kurzzeitigen Inkubationen der Blätter mit  $^{14}CO_2$  oder ( $^{14}C$ )-Acetat in der Form



- die schnelle Inkorporation von  $^{14}C$  in ihre Linolensäure.

Die Merkmale legen es nahe zu vermuten, dass diese Lipide, die ähnliche Charakteristika in prokaryonten Algen aufweisen, im Chloroplasten synthetisiert werden.

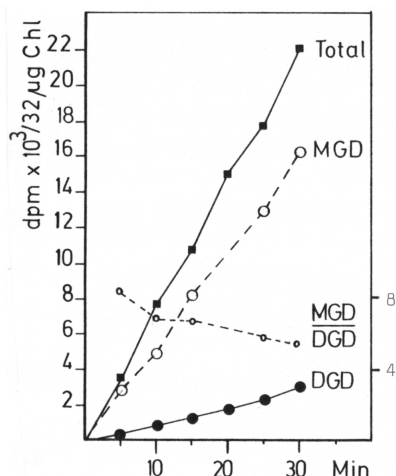
Ein Fettsäure-Synthetase-Komplex ( $C_{18:0}$ -ACP,  $C_{16:0}$ -ACP) und ein *Switching System* der Chloroplasten (166), die  $C_{16:0}$ - und  $C_{18:1}$ -CoA bereitstellen, sind seit längerer Zeit bekannt. Bei Inkubation isolierter Chloroplasten mit verschiedenen Prekursoren konnten aber Trien-Fettsäuren, die die Hauptkomponenten im Organell repräsentieren, nicht radioaktiv markiert werden, sondern lediglich gesättigte  $C_{16}$ -,  $C_{18}$ -Fs sowie Ölsäure, in der stets am meisten Radioaktivität akkumulierte (166, 146, 121, 112). Joyard et al. konnten die (nahezu) vollständige de novo Synthese des

MGD und DGD im rekonstituierten System aus Stroma und Hüllmembranen der Chloroplasten des Spinats nachweisen, wenn Glycerin-3-phosphat und UDP-Gal dem Medium zugesetzt wurden. Alle dazu notwendigen Enzyme sind im Envelope lokalisiert oder lose daran gebunden. Auch isolierte Chloroplasten synthetisierten MGD, wenn UDP-Gal im Inkubationsmedium angeboten war (112). Ohne diesen Prekursor war DG stets einziges (121) oder hauptsächlich markiertes Acyllipid (112, 146). Aus dieser Tatsache, der fehlenden Markierung von Linol- und Linolensäure und Inkubationen ganzer Blätter leiten Slack, Roughan und Koautoren u. a. ab, dass die im Chloroplasten de novo synthetisierte  $C_{18:1}$  in mikrosomales PC übertragen, und, an diesem Träger desaturiert, in die Synthese der Galaktolipide des Chloroplasten rückgeführt wird.

Mikrosomen katalysieren die Bildung des PG; da eine CDP-Diacylglycerin Synthetase im Envelope nicht nachweisbar ist (41), ist es unklar, ob PG in Chloroplasten gebildet werden kann. Obwohl SQD wie die Galaktolipide (113,136-139) allein in den Chloroplastenmembranen vertreten sein soll (40), sind Syntheseort und exakter Biosyntheseweg des Lipids unbekannt (119).

In Anbetracht dieser Ergebnisse einerseits und der diskutierten in vivo und in vitro Markierungsexperimente, die eine de novo Synthesesequenz der Galaktolipide im Envelope der Chloroplasten des Spinats, eine Lipid-gekoppelte Desaturierung und Elongation (MGD) der Fettsäuren der Galaktolipide in Envelopes und Thylakoiden belegen und auch auf eine Lipid-gekoppelte Desaturierung des de novo synthetisierten PG und SQD in diesen Membransystemen hinweisen, schien es sinnvoll, die Synthesekapazität isolierter Chloroplasten erneut und in Bezug auf diese Details zu untersuchen. Dazu wurden isolierte Chloroplasten des Spinats mit UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ ,  $(^{14}\text{C})\text{-Acetat}$ ,  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ , und  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  unter verschiedenen Bedingungen inkubiert.

## 11.1 Markierung der Galaktolipide isolierter Chloroplasten



**Abb. 11.1:** ( $^{14}\text{C}$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide (Total, MGD und DGD) bei Inkubation isolierter, Percoll-D.grad.-gereinigter Chloroplasten des Spinats mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal (Tab. 2.1 s. 2.2.3.4 S. 31). Rechte Ordinate: Verhältnis der Radioaktivitäten MGD/DGD.

$\text{C}_{18:1}$  radioaktiv (Tab. 11.2); der Anteil der  $\text{C}_{14:0}$  ist bei der Inkubation mit UDP-Gal deutlich geringer im Vergleich zum Ansatz ohne UDP-Gal. Umgekehrtes gilt für Oleat. Im MGD wurden weitere ungesättigte Fettsäuren registriert:  $\text{C}_{16:1}$ ,  $\text{C}_{16:2}$  und  $\text{C}_{18:2}$ .

Die Positionsanalyse des Lipids zeigte, dass  $\text{C}_{16}$ -Fettsäuren die C-2-Position besetzen. Eine ähnliche positionsspezifische Markierung der Fettsäuren beschreiben auch Joyard et al. (88), obwohl sie  $^{14}\text{C}_{14:0}$  und  $^{14}\text{C}_{16:2}$  weder in der Fraktion der freien Fettsäuren noch im MGD entdeckten.  $^{14}\text{C}_{14:0}$  trat aber bei ( $^{14}\text{C}$ )-Inkubationen isolierter Chloroplasten auf, die Murphy und Leech durchführten (121). Beachtenswert ist der Ausschluss dieser radioaktiven Säure aus der C-2-Position des MGD. Die  $\text{AgNO}_3$ -DC des MGD, das bei Inkubationen der Percoll-D.grad.-gereinigten Chloroplasten mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal radioaktiv markiert wurde (Tab. 11.1, Exp. c)), zeigt,

Isolierte, *schnelle* wie Percoll-D.grad.-gereinigte Chloroplasten lagern im Dunkeln wie im Licht ( $^{14}\text{C}$ )Gal aus UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal in die Galaktolipide MGD, DGD, TGD und TeGD ein (Tab. 11.1, Abb. 11.1). Bei Gabe von Licht und sn-Glycerin-3-phosphat wurden nur MGD und DGD radioaktiv markiert, und das Verhältnis der Radioaktivitäten in MGD und DGD verschob sich zugunsten des MGD. In Verbindung mit der Beleuchtung der Chloroplasten-Suspensionen stimuliert Glycerinphosphat die Totaleinlagerung. Diesen Effekt registrierten auch andere Autoren bei ( $^{14}\text{CO}_2$ )-Inkubationen (112). Er tritt bei ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat-Inkubation *schneller* Chloroplasten deutlicher zutage (Tab. 11.2). Der Prekursor wurde in die Fraktion der freien Fettsäuren, in MGD und zwei weitere Komponenten eingelagert, von denen sich eine wie ADGD verhält, aber nicht deutlich in DG (112, 121, 146) und PA (88) wie zuvor. MGD wurde nur dann markiert, wenn UDP-Gal im Medium vorhanden war. In den Fraktionen der freien Fettsäuren sind  $\text{C}_{14:0}$ ,  $\text{C}_{16:0}$  und

## 11. Glykolipidsynthese in isolierten Chloroplasten

**Tab. 11.1:** ( $^{14}\text{C}$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide bei Inkubation isolierter, intakter Chloroplasten des Spinats mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal

*Schnelle* (Exp. a, b) oder Percoll-D.grad.-gereinigte (Exp. c), intakte Chloroplasten wurden 80 (a) und 90 (b, c) Min. lang bei Raumlicht (a), im Dunkeln (DKL, b, c3)) und bei Beleuchtung (c1, c2) bei 20 - 25° C inkubiert. In Exp. b) und c) wurden die Suspensionen anschließend im Sucrose- (b) oder Percoll-D.grad. (c) zentrifugiert und die Fraktionen der intakten, bei Exp. b) auch die der gebrochenen Chloroplasten extrahiert.

<sup>1</sup> Bei a) und b) Flächen-% der Scans der DC-Platten (LM 1), bei c) LSC der ausgeschabten Lipidbanden (LM 3).

+ G3P = Zusatz von Glycerin-3-phosphat.

Siehe Exp. 2.2.3.1-3, S. 31.

|                | 10 <sup>6</sup> dpm<br>in den GL<br>pro mg Chl | Radioaktivität <sup>1</sup> in % |     |     |      | ( $^{14}\text{C}$ )MGD/<br>( $^{14}\text{C}$ )DGD |
|----------------|------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-----|------|---------------------------------------------------|
|                |                                                | MGD                              | DGD | TGD | TeGD |                                                   |
| Exp. a)        | -                                              | 39                               | 27  | 24  | 9    | 1,4                                               |
| Exp. b) DKL    |                                                |                                  |     |     |      |                                                   |
| intakte CLP    | -                                              | 56                               | 27  | 15  | 2    | 2,1                                               |
| gebrochene CLP | -                                              | 70                               | 28  | 2   | 0    | 2,5                                               |
| Exp. c)        |                                                |                                  |     |     |      |                                                   |
| 1) -           | 1,6                                            | 80                               | 20  | 0   | 0    | 4,0                                               |
| 2) + G3P       | 2,0                                            | 87                               | 13  | 0   | 0    | 6,6                                               |
| 3) + G3P / DKL | 1,7                                            | 52                               | 40  | 5   | 3    | 1,3                                               |

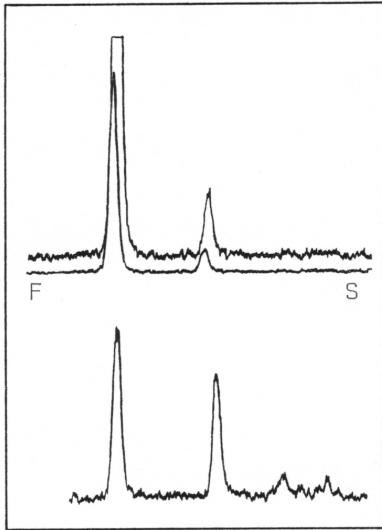
dass bei diesen in vitro Experimenten mehr MGD-Spezies radioaktiv markiert wurden, als sich aufgrund des dürftigen ( $^{14}\text{C}$ )-Fettsäuremusters vermuten ließ. Das Muster des radioaktiven MGD (Abb. 61) gleicht den  $\text{AgNO}_3$ -DC-Mustern des in vivo markierten MGD aus Chloroplasten-, Envelope- oder Thylakoidfraktionen, wenn die Chloroplastensuspensionen beleuchtet wurden und mit Glycerin-3-phosphat versehen waren.

Eine Vielzahl von Spezies ist erkennbar und oligoene Spezies dominieren gegenüber hexaenen. War Glycerin-3-phosphat nicht im Medium vorhanden, oder wurden die Chloroplasten im Dunkeln inkubiert, ging die Markierung der oligoenen Spezies deutlich zurück.

Das MGD- $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster der Dunkel-Inkubation erinnert an das Muster des MGD, das bei Inkubation isolierter Envelopes mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal erhalten wurde. Diese Diversität in den MGD-Mustern tritt parallel zur Änderung des Markierungsverhältnisses MGD/DGD auf (Tab. 11.1, Abb. 11.2). Im Gegensatz dazu sind die  $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster des DGD einfach und mehr oder weniger uniform bei den verschiedenen



Inkubationsbedingungen. Oligoene Spezies, darunter die  $C_{18:3}/C_{16:0}$ -Kombination, sind nur geringfügig radioaktiv markiert worden.



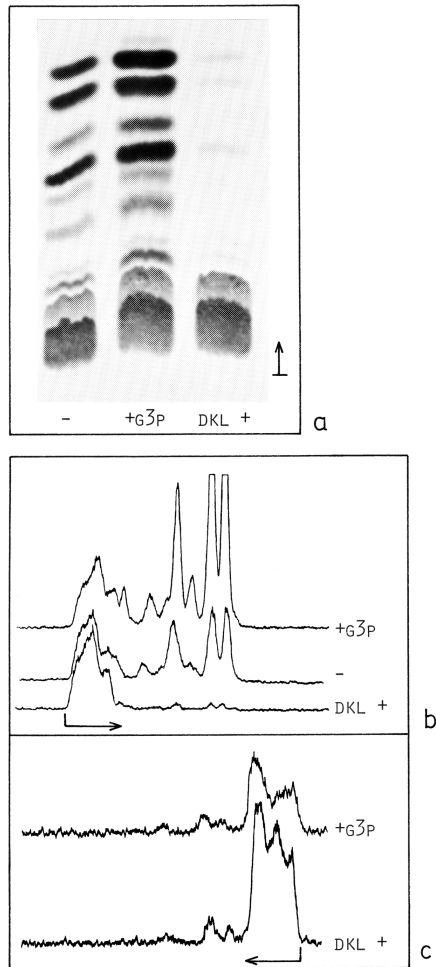
**Abb. 11.2:** ( $^{14}C$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide bei Inkubation isolierter, Percoll-D.grad.-gereinigter Chloroplasten des Spinats mit UDP-( $^{14}C$ )Gal im Licht (oben) und im Dunkeln (unten) DC der Lipidextrakte im LM 3. Erläuterungen s. Tab 11.1, Exp. c 2) und 3).

Isolierte, physiologisch intakte, *schnelle* oder Percoll-D. grad.-gereinigte Chloroplasten inkorporieren ( $^{14}C$ )Gal in die Galaktolipide. Offenbar ist der extern angebotene Gal-Donator für die Galaktosyltransferasen erreichbar. Die LSC der wässrigen Phasen bei der Extraktion der nach der Inkubation wiederum Dichtegradientengereinigten, intakten Chloroplasten weist darauf hin, dass UDP-( $^{14}C$ )Gal nicht in den Chloroplasten aufgenommen wird und dort akkumuliert. Dieser Befund stützt die oben diskutierte These, UDP-Gal und DG würden an der Außenseite der inneren Hüllmembran umgesetzt. Das Markierungsmuster der Galaktolipide in der Fraktion der gebrochenen Chloroplasten (Tab. 11.1) deutet an, dass insbesondere MGD und die niederen Homologen schnell aus dem Envelope in die Thylakoide hinein transportiert werden.

Licht beeinflusst die Synthese der Galaktolipide (im Gegensatz zu in vivo Experimenten (101)). Zwar bewirkt es allein keine Stimulierung der totalen Inkorporationsrate, es bestimmt aber wesentlich das Verhältnis der Radioaktivitäten in MGD und

DGD und das Spektrum der gebildeten MGD-Spezies (Abb. 11.2, 11.3).

Höhere Homologe werden nur im Dunkeln radioaktiv markiert und unter dieser Bedingung ist auch die Markierungsrate des DGD groß. Da die isolierten Chloroplasten stets im gleichen Medium aufgenommen wurden, bzw. z.B. in Experiment c), Tab. 11.1 aus der gleichen Aufarbeitung stammten, mag dieses Phänomen auf eine Stimulierung der Aktivität der Interlipid-Gal.transferasen durch den internen pH der Chloroplasten zurückzuführen sein. Bei photosynthetischem Elektronentransport ist das Stroma alkalisch. Die pH-Schwankung in unbelichteten Chloroplasten kann in vivo wie in vitro ausreichen, die Interlipid-Gal.transferasen zu aktivieren, die die Homologen DGD, TGD und TeGD bilden. Oben ist bereits diskutiert worden, dass



**Abb. 11.3:** ( $^{14}\text{C}$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide bei Inkubation isolierter, Percoll-D.grad.-gereinigter Chloroplasten des Spinats mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal im Licht mit (+ G3P) und ohne Glycerin-3-phosphat im Inkubationsmedium (-) oder im Dunkeln mit Glycerinphosphat im Medium (DKL +)

*AgNO<sub>3</sub>*-DC des gereinigten MGD:

a) Autoradiogramm, b) Scans der DC-Platte, c) Scans der DC-Platte der *AgNO<sub>3</sub>*-DC des gereinigten ( $^{14}\text{C}$ )DGD.

dies möglicherweise unabhängig vom Gal-Donator UDP-Gal in/an der Innenseite der inneren Hüllmembran geschieht.

Dem gegenüber mag im Licht die MGD- und DGD-Synthese durch UDP-Gal:DG bzw. MGD Galaktosyltransferasen überwiegen, und das Hauptsyntheseprodukt ist MGD. Im Dunkeln werden nur hexaene MGD-Spezies gebildet. Ebenfalls fast ausschließlich hexaene MGD wurden bei den in vitro Inkubationen isolierter Envelopes registriert. Daraus kann man schließen,

a) dass die UDP-Gal:DG Galaktosyltransferase auch im Dunkeln aktiv ist (auch eine Voraussetzung dafür, dass Interlipid-Gal.transferasen ein radioaktives Substrat umsetzen können);

b) dass ein hexaener DG-Pool, der in bei pH 7,6 isolierten Envelopes groß ist und auch in isolierten Chloroplasten existiert, möglicherweise aus den Reaktionen der Interlipid-Gal.transferasen hervorgeht.

**Tab. 11.2:** ( $^{14}\text{C}$ )-Inkorporation in die Lipide bei Inkubation isolierter, intakter Chloroplasten des Spinats mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat

*Schnelle* Chloroplasten wurden unter verschiedenen Lichtbedingungen (Beleuchtung = L, Dunkelheit = Dkl) und unter Zusatz von Bikarbonat (nicht a)), Glycerin-3-phosphat und UDP-Gal (nicht b)1)) 75 Min. lang bei ca. 20° C in der Warburg-Apparatur inkubiert (Tab. 2.1 s. 2.2.3.6./7.). Die Fettsäuren  $\text{C}_{16:3}$  und  $\text{C}_{18:0}$  wurden nicht radioaktiv markiert.

| I  |   |         |               | Markierung der Komponenten               |    |    |     |
|----|---|---------|---------------|------------------------------------------|----|----|-----|
|    |   |         |               | $\frac{10^3 \text{ dpm}}{\text{mg Chl}}$ | Fs | DG | MGD |
| a) | + | UDP-Gal | + L           | n.a.                                     | +  | -  | +   |
| b) | 1 | -       | + L           | 1,2                                      | +  | -  | -   |
|    | 2 | +       | UDP-Gal + L   | 3,7                                      | +  | -  | +   |
|    | 3 | +       | UDP-Gal + DKL | 0,7                                      | -  | -  | -   |

| II                                                                                                                                                    |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Radioaktivität der Fettsäuren in der Fraktion der freien Fettsäuren (Fs) und im MGD in % von der Totalaktivität in den Fs in den einzelnen Fraktionen |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|                                                                                                                                                       | $\text{C}_{14:0}$ | $\text{C}_{16:0}$ | $\text{C}_{16:1}$ | $\text{C}_{16:2}$ | $\text{C}_{18:1}$ | $\text{C}_{18:2}$ | $\text{C}_{18:3}$ |
| a)                                                                                                                                                    |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| MGD                                                                                                                                                   | 5                 | 63                | 9                 | 3                 | 15                | 5                 | 0                 |
| Lyso-MGD                                                                                                                                              | tr                | 81                | 19                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| Fs                                                                                                                                                    | 11                | 41                | 0                 | 0                 | 49                | ?                 | 0                 |
| b)                                                                                                                                                    |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| 1) FS                                                                                                                                                 | 27                | 45                | 0                 | 0                 | 28                | ?                 | 0                 |

Oligoene DG-Spezies stehen offensichtlich nur bei Belichtung der Chloroplasten zur MGD-Synthese zur Verfügung, wenn diese aus de novo synthetisierten Fettsäuren und Glycerin-3-phosphat neu gebildet werden können. Der interne Glycerin-3-phosphat-Pool der Chloroplasten scheint klein, aber doch vorhanden zu sein. Fehlt nämlich Glycerinphosphat im Inkubationsmedium, ist der Anteil der oligoenen Spezies von den synthetisierten MGD-Molekülen geringer, d.h., die de novo Synthese des Diglycerids kann nicht im optimalen Umfang ablaufen.

Die Bildung des hexaenen DGD unter allen gegebenen Bedingungen spricht zunächst dafür, dass hauptsächlich präexistierendes, hexaenes MGD galaktosyliert wurde, wie dies Reaktion III in Abb. 8.7 andeutet. Dieser Umstand kann aber auch anders interpretiert werden (s.o.).

Bei ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat-Inkubationen der Chloroplasten wurde im wesentlichen  $\text{C}_{16:0}$  und  $\text{C}_{18:1}$  positionsspezifisch im MGD markiert. Das de novo synthetisierte, oligoene DG mag daher auch hier  $\text{C}_{18:1}/\text{C}_{16:0}$ -DG sein, das sich nicht anhäuft (Tab. 11.2), sondern sogleich zu MGD umgesetzt wird, wenn UDP-Gal zur Verfügung steht (88). Fehlte UDP-Gal in anderen Experimenten, akkumulierte dieses radioaktive Vorläufer-Molekül (88, 112, 121, 146). Wie das  $\text{AgNO}_3$ -DC-Muster des radioaktiven MGD zeigt (Abb. 11.3), tritt das gebildete, monoene MGD wie in Blättern in die diskutierte Desaturierungs- und Elongationssequenz ein. Es gelang leider nicht, in Pulse-Chase-Experimenten dies überzeugend zu demonstrieren (Tab. 2.1 s. 2.2.3.5.).

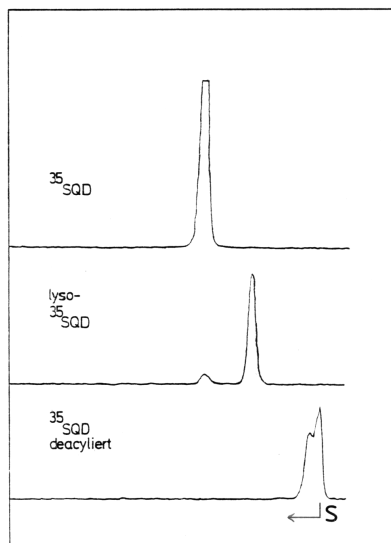
Die markierten Fettsäuren  $\text{C}_{16:1}$ ,  $\text{C}_{16:2}$  und  $\text{C}_{18:2}$  treten nur im MGD auf, aber nicht in der Fraktion der *freien* Fettsäuren. Dies kann bedeuten, dass die Desaturierung der Fettsäuren hauptsächlich in Relation zum Galaktolipid abläuft. Daher sind die Fehlversuche (166, 185), die Di- und Triensäuren in isolierten Chloroplasten radioaktiv zu markieren, nicht auf fehlende mikrosomale Desaturase- und Trägersysteme der Fettsäuredesaturierung zurückzuführen, sondern auf unphysiologische Inkubationsbedingungen, die es den Chloroplasten nicht erlaubten, Lipidsubstrate für die Desaturierung herzustellen. Die Inkubationsversuche mit Percoll-D.grad.-gereinigten Chloroplasten zeigen dagegen, dass Chloroplasten unabhängig von mikrosomalen Systemen und Donatoren oligoene wie akkumulierende hexaene MGD-Spezies selbstständig synthetisieren können, wenn UDP-Gal im Inkubationsmedium vorhanden ist. Die zuvor diskutierte und bereits eingeschränkte Funktion des PC als Donator von  $^{14}\text{C}_{18:1}$  oder 1-( $^{14}\text{C}$ )-Oleoylglycerin erscheint ohnehin paradox, da kürzlich erneut demonstriert wurde, dass  $\text{C}_{16}$  und  $\text{C}_{18}$ -Fettsäuren möglicherweise ausschließlich in Chloroplasten de novo synthetisiert werden (185), und Oleoylglycerin ein Intermediat der Galaktolipid-de novo Synthese in Envelopes ist, das von Chloroplasten allein hergestellt werden kann (88).

Hexaenes DG muss daher kein primäres Syntheseprodukt sein, sondern könnte durch die Interlipid-Gal.transferase-Reaktionen aus desaturiertem MGD entstehen und in die de novo Synthesesequenz der GL eintreten. Dieser Sekundärkreislauf

kann, wie die deutliche Markierung hexaener MGD-Spezies zeigt, das *Bild* der MGD- (und DGD-) de novo Synthese und -Desaturierung verfälschen. Der Umfang dieser Verschleierung mag von der aktuellen de novo Syntheserate des oligoenen DG und der Pool-Größe des hexaenen DG, d.h. der Aktivität der Interlipid-Gal.transferasen, abhängen.

Die Chloroplastenlipide SQD, PG und PC wurden bei ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat-Inkubationen nicht radioaktiv markiert im Gegensatz zu anderen Experimenten (112, 121, 146).  $^{32}\text{P}$  wurde bei Inkubationen mit  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  nicht in Phospholipide eingelagert (Tab. 2.1 s. 2.2.3.8.).

## 11.2 Markierung des SQD isolierter Chloroplasten



**Abb. 11.4:** DC des in vitro radioaktiv markierten SQD vor (oben), nach Lipase-Spaltung (Mitte) und nach Verseifung mit Natriummethylat (unten) in LM 17

*Schnelle* Chloroplasten des Spinats wurden 1 h lang mit  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  inkubiert. Die Suspension wurde vor der Extraktion über Sucrose-D.grad.-Zentrifugation fraktioniert (Tab. 2.1 s. 2.2.3.8.).

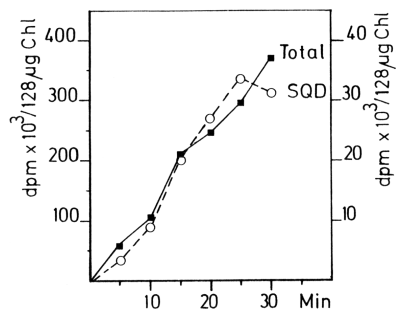
erschuss von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  aufnimmt (Abb. 63). Auch in anderen in vivo Experimenten konnte nur ein stationäres Markierungsmuster registriert werden (77). Im Gegensatz dazu stehen die oben geschilderten Ergebnisse der in vivo Experimente (Abb. 8.13).

Die Aufnahme des Sulfats und die Inkorporationsrate können durch Beeinflussung der Sulfat- (118) und Phosphat- (81) -Translokatoren mit Glycerin-3-phosphat und Phosphat manipuliert werden. In Gegenwart von Glycerin-3-phosphat scheint die Syntheserate oligoener Spezies größer zu sein.

Die Inkubationsversuche zeigen: Isolierte, physiologisch intakte Chloroplasten inkorporieren  $^{32}\text{P}$  aus  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  in SQD unabhängig von mikrosomalen Systemen.

*Schnelle* wie Percoll-D.grad.-gereinigte Chloroplasten des Spinats inkorporierten  $^{32}\text{P}$  aus  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  bei Belichtung in eine einzige Lipidkomponente, die sich dünn-schichtchromatographisch wie SQD verhält. Das Lipid war durch Lipase und Alkali spaltbar und aufgrund der DC-Charakteristika der Spaltprodukte (Abb. 11.4) als SQD angesprochen worden. Das markierte Lipid befindet sich in Envelopes und Thylakoiden (Tab. 2.1 s. 2.2.3.8)(74). Die Silbernitratchromatographie des  $^{35}\text{SQD}$  weist vier Spezies aus (Abb. 8.13 k), die schon bei in vivo Markierung des Lipids feststellbar waren; es handelt sich möglicherweise um die Spezies  $\text{C}_{16:0}/\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{18:1}/\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{18:2}/\text{C}_{16:0}$  und  $1\text{C}_{18:3}/\text{C}_{16:0}$ . Eine mögliche Lipidgekoppelte Desaturierung wurde oben bereits diskutiert. Die Versuche, in einem Pulse-Chase-Experiment die Desaturierung der monoenen Spezies nachzuweisen, führten zu keinem überzeugenden Ergebnis. Die Spezies scheinen schon nach 5 - 10 minütiger Inkubation in einem Verhältnis zueinander radioaktiv zu sein, das sich nicht mehr wesentlich ändert. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Chloroplast schnell einen Über-

Dabei wird ein Spektrum von Spezies radioaktiv markiert, das dem des in vitro markierten ( $^{14}\text{C}$ )SQD aus Blättern, Chloroplasten-, Thylakoid- und Envelopefraktionen ähnelt. Damit wird die Vermutung, dass Lipide, die einen gewissen Anteil ihrer  $\text{C}_{16}$  Fettsäuren in der C-2-Position tragen, in Chloroplasten synthetisiert werden (s.o.), für ein weiteres Lipid bestätigt.



**Abb. 11.5:**  $^{35}\text{S}$ -Inkorporation in das SQD bei Inkubation intakter, Percoll-D.grad.-gereinigter Chloroplasten des Spinats mit  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  (Tab. 2.1 s. 2.2.3.11)

Linke Ordinate: Radioaktivität im Lipidextrakt der einmal gewaschen Clp (die aus dem Ansatz entnommenen Aliquote wurden in 10 ml vorgelegtes Suspensionsmedium pipettiert und sofort 1 Min. lang bei 100 % Drehzahl auf der Hettich-Rotixa/K zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Sedimente extrahiert).

Rechte Ordinate: Radioaktivität im DC-gereinigten SQD.





**Teil IV**

**Anhang**



## Anhang A: Zusammenfassung

Die Acyllipide der Chloroplasten aus  $C_{16:3}$ -*Pflanzen* können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Glykolipide MGD, DGD, SQD und das Phospholipid PG einerseits sowie Lecithin andererseits. Charakteristika der ersten Gruppe sind:

- Das z. T. ausschließliche Vorkommen von  $C_{16}$ -Fettsäuren in der C2-Position des Glycerinbausteins.
- Die positionsspezifische Markierung der Fettsäuren bei kurzen Inkubationen ganzer Blätter, photosynthetisch aktiver Gewebekulturen des Tabaks und isolierter Chloroplasten mit  $^{14}CO_2$  oder  $^{14}C$ -Acetat. Dabei werden  $^{14}C_{18}$ -ungesättigte Fs nahezu ausschließlich in der C-1-,  $^{14}C_{16}$ -Fs überwiegend in der C-2-Position verestert. Abgesehen von der Fettsäurezusammensetzung unterscheiden sich damit die Galaktolipide aus  $C_{16:3}$ -*Pflanzen* wesentlich von denen aus  $C_{18:3}$ -*Pflanzen*, in denen die Fettsäuren in beiden Positionen symmetrisch radioaktiv markiert werden.
- Die schnelle Inkorporation von  $^{14}C$  in die Linolensäure der C-1-Position.

Demgegenüber stehen die Phospholipide PC und PE, deren Palmitinsäure allein in der C-1-Position vorkommt und nur dort radioaktiv markiert wird. Ungesättigte  $^{14}C_{18}$ -Fettsäuren besetzen beide Positionen. Die  $C_{18:3}$  des PC zeichnet sich durch langsame ( $^{14}C$ )-Inkorporation aus.

Sind in einem  $C_{16:3}$ -*Gewebe* wie den grünen Zellkulturen des Tabaks typische Komponenten der Chloroplasten stark reduziert (Gehalt des MGD, SQD, der 3-trans-Hexadecensäure des PG und der Hexadecatriensäure des MGD), so bleiben die genannten Charakteristika der  $C_{16:3}$ -*Pflanzen* doch weitgehend erhalten.

Die Charakteristika der ersten Lipidgruppe, die auch für prokaryonte Algen typisch sind, legen die Vermutung nahe, dass die Galaktolipide, SQD und PG in

den Chloroplasten synthetisiert werden. Der Nachweis dafür gelang jedoch nur für die Biosynthese der Galaktolipide und des SQD in isolierten, Percoll-D.grad.-gereinigten, physiologisch intakten Chloroplasten des Spinats. Sie ist unabhängig von cytoplasmatischen Lipid-Prekursoren oder Desaturasesystemen und bedarf nur der Faktoren sn-Glycerin-3-phosphat, UDP-Gal und - im Falle der Inkorporation von  $^{35}\text{S}$  aus  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  in das SQD - Licht.

Die in vivo wie in vitro gebildeten Glykolipide und PG des Chloroplasten gehen aus einer de novo Synthese des uniformen DG-Bausteins sn-1-Oleoyl-2-palmitoylglycerin hervor. Umgewandelt in das monoene Lipid entstehen daraus die Spezies, die in den Membranen der Chloroplasten strukturelle und funktionelle Komponenten darstellen. Dies sind, wie die massenspektroskopischen Analysen und Positionsanalysen der Lipide aus isolierten Envelopes zeigen, die Spezies

$$\frac{C-1}{C-2} \frac{18:3}{16:3} - \text{MGD}, \frac{18:3}{16:0} - \text{DGD}, \frac{18:3}{16:0} - \text{SQD}, \frac{18:3}{3-tr-16:1} - \text{PG}.$$

Als verantwortlich für die Herstellung dieser Lipid-spezifischen Fettsäuremuster wird die Lipid-gekoppelte Desaturierung diskutiert. Dabei könnten  $C_{18}$ -Desaturasen die Ölsäure aller genannten Lipide umsetzen,  $C_{16}$ -Desaturasen sind jedoch spezifisch für MGD und PG. Bei der Synthese der Fettsäurekombinationen hexaener Spezies

$$\frac{C-1}{C-2} \frac{18:3}{18:3} - \text{MGD}, \frac{18:3}{18:3} - \text{DGD},$$

spielt die Desaturierung und Elongation der Palmitinsäure in Relation zur C-2-Position des MGD eine zentrale Rolle.

Dieses Modell der Lipid-gekoppelten Desaturierung und Elongation der Fettsäuren bringt auf einfachste Weise die spezifischen Fettsäuremuster der Lipide zustande; insbesondere erklärt es auch die charakteristischen Unterschiede der Galaktolipide, die schon in den Hüllmembranen des Chloroplasten vorhanden sind. Desaturierung und Elongation sollten in Envelopes und Thylakoiden in gleicher Weise ablaufen. Die Kapazität zur umfassenden Galaktolipidsynthese ist jedoch in den Envelopes konzentriert.

Es wird ein Multienzymkomplex diskutiert, der in diesem Membransystem lokalisiert sein soll und der die de novo Synthese oligoener DG-, MGD- und DGD-Spezies sowie Desaturierung und Elongation der Fettsäuren der Galaktolipide katalysiert.

Die oligoenen Lipidspezies bleiben an diesen Komplex gebunden; sie vermischen sich nicht mit und entweichen nicht in die existierenden hexaenen Lipid-Pools der Membran-Bilayer. Drei Reaktionen konkurrieren um de novo synthetisiertes MGD:

---

Transport, Desaturierung und Galaktosylierung. Während MGD-gekoppelte  $C_{16}$ -Desaturasen und -Elongasen  $C_{18:X}/C_{18:X}$ -MGD-Spezies bilden, mögen die MGD-Moleküle für die Galaktosyltransferase unerreichbar sein.

UDP-Gal:DG bzw. MGD Galaktosyltransferasen könnten an der Außenseite der inneren Envelopemembran oligoenes DG und MGD galaktosylieren, während Interlipid-Gal.transferasen unabhängig von UDP-Gal auf der Innenseite jene  $C_{18:X}/C_{18:X}$ - und insbesondere  $C_{18:3}/C_{18:3}$ -MGD-Spezies umsetzen könnten, die das MGD-gekoppelte Desaturasen- und Elongasensystem verlassen. Beide Galaktosyltransferasen-Typen seien dem Multienzymkomplex zugehörig. Das bei der Interlipid-Gal.transferase-Reaktion entstandene hexaene DG, das einen großen Pool in bei pH 7,6 isolierten Envelopes repräsentiert, würde daher kein primäres Syntheseprodukt darstellen; es kann in die de novo Synthesesequenz der Galaktolipide erneut eintreten. Oligoene Lipidspezies werden nur bei Belichtung der Blätter oder der isolierten Chloroplasten gebildet, während sinkender pH des Stromas bei Dunkelheit die Interlipid-Gal.transferasen und damit die Synthese hexaener Spezies stimulieren könnte. Ein allgemeines Charakteristikum der Galaktosyltransferasen ist die Unspezifität in Bezug auf das Fettsäuremuster des Lipidsubstrates.

Prekursoren, die aus mikrosomalem PC abgespalten möglicherweise der Galaktolipidsynthese in den Chloroplasten dienen könnten, sind Oleat und Oleoylglycerin; sie können aber in isolierten, D.grad.-gereinigten Chloroplasten unabhängig von extraplastidären Systemen synthetisiert werden. Ein wesentlicher Beitrag der PC-Bausteine zur Galaktolipidsynthese in  $C_{16:3}$ -*Pflanzen* ist daher ausgeschlossen. Dies bestätigt die Glykolipidsynthese durch gereinigte, physiologisch intakte Chloroplasten.

Evidenz für diese Aussagen bieten folgende Experimente und Analysen:

- Qualitative und quantitative Bestimmung der Acyllipide und Untersuchung ihrer Fettsäurezusammensetzung einschließlich Positionsanalyse aus Blättern, photosynthetisch aktiven und heterotrophen Gewebekulturen des Tabaks und aus isolierten Envelopes des Spinats
- Massenspektroskopische Analyse der Acyllipide isolierter Envelopes des Spinats
- Kinetik der ( $^{14}C$ )-Inkorporation in die Fettsäuren der Acyllipide in jungen Blätter des Korbells, des Spinats und von *Chenopodium* (155)
- Analyse der positionsspezifischen, radioaktiven Markierung der Fettsäuren nach kurzzeitigen Inkubationen ganzer Blätter, der photosynthetisch aktiven Gewebekulturen des Tabaks, der isolierten Chloroplasten des Spinats und der Blaualgen *N.Nostoc* und *Anabaena* mit den Prekursoren ( $^{14}CO_2$ ) und ( $^{14}C$ )-Acetat in den Acyllipiden aus isolierten Thylakoiden des Spinats, den

Galaktolipiden aus jungen Blättern des Korbells, des Spinats und der Erbse, des PC aus jungen Blättern der Erbse, des MGD und PG aus *Nostoc* und *Anabaena*, des MGD aus isolierten Chloroplasten

- Silbernitratchromatographie des in vitro mit dem Prekursor UDP-Gal markierten MGD aus isolierten Envelopes und aus Chloroplasten des Spinats sowie der anderen, markierten Galaktolipide aus isolierten Envelopes
- Silbernitratchromatographie der in vivo markierten Acyllipide MGD, SQD, DGD, PG und PC aus Blättern, Chloroplasten-, Thylakoid- und Envelopefraktionen des Spinats
- Hydrolyse der durch Silbernitratchromatographie separierten, in vivo markierten Lipidspezies aus den Fraktionen der Chloroplasten, Thylakoide und Envelopes des Spinats
- Methylierungsanalyse der durch  $AgNO_3$ -DC separierten ( $^{14}C$ )DGD-Spezies aus Envelope- und Thylakoidfraktionen des Spinats
- Methylierungsanalyse der in vitro markierten Galaktolipide aus isolierten Envelopes des Spinats
- Identifikation der MGD- und DGD-Spezies durch Cochromatographie von Referenzspezies ( $AgNO_3$ -DC) und RGC der F<sub>sm</sub>e aus den Spezies des MGD und PG aus Envelope- und Thylakoidfraktionen (in vivo Markierungen)
- Chemische  $\alpha$ -Oxidation der Fettsäuren der separierten, in vivo markierten, oligoenen MGD-Spezies aus isolierten Thylakoiden des Spinats
- $^{35}S$ Inkorporation aus  $^{35}SO_4^{2-}$  in SQD durch isolierte Chloroplasten des Spinats
- Silbernitratchromatographie des in vitro markierten SQD
- In vitro Galaktosylierung definierter MGD-Spezies durch einen Acetonpulver-Extrakt aus jungen Erbsen

Auf der Grundlage dieser Analysen wurde die Lipidgenese in den Chloroplasten höherer Pflanzen diskutiert. Dennoch bleiben Fragen offen, z. B. die Herkunft der DGD-Spezies  $C_{16:0}/C_{18:3}$ . Weiterführende Experimente sollten die Proportionen und die Regulation der Aktivität der UDP-Gal:DG bzw. Galaktolipid Galaktosyltransferasen und der Interlipid-Galaktosyltransferasen in vivo und den Transport der im Envelope gebildeten Lipide untersuchen. Zur weiteren Bearbeitung des Modells der Lipid-gekoppelten Desaturierung und Elongation der Fettsäuren sollten andere Wege gesucht werden. Ein solcher, neuer experimenteller Ansatzpunkt ist der Versuch der in vivo Desaturierung eines MGD-Äther-Analogons.

## Anhang B: Verzeichnisse

### Abkürzungen und Zeichen

|             |                                                                                     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| AGP         | Acyl Carrier Protein                                                                |
| ANS         | Anilinnaphthalinsulfonsäure, 0,2 %ige Lösung (MeOH)                                 |
| APE         | N-Acyl-1-Phosphatidyläthanolamin                                                    |
| ATP         | Adenosintriphosphat                                                                 |
| BPA         | Bis-Phosphatidsäure                                                                 |
| Chl         | Chlorophyll, Chlorophyllgehalt                                                      |
| Clp         | Chloroplasten                                                                       |
| CoA         | Coenzym A                                                                           |
| cpm         | Zählrate: Impulse pro Minute                                                        |
| DC          | Dünnschichtchromatographie                                                          |
| DG          | Diglycerid                                                                          |
| DGD         | Digalaktosyldiacylglycerin                                                          |
| D.grad.     | Dichtegradient                                                                      |
| DPG         | Diphosphatidylglycerin                                                              |
| dpm         | Zerfallsrate: Zerfälle pro Minute                                                   |
| EMD-IT 5914 | Herbizid (5-Dimethylamino-methylen-2-oxo-4-phenyl-2,5-dihydrofuran-carbonitril-(3)) |
| ER          | Endoplasmatisches Reticulum                                                         |
| FeCy        | Ferricyanid                                                                         |
| Fs          | Fettsäure(n)                                                                        |
| Fsme        | Fettsäuremethylester                                                                |
| Gal         | Galaktose                                                                           |
| GC          | Gaschromatographie                                                                  |
| GL          | Galaktolipid                                                                        |

### 13. Anhang B: Verzeichnisse

---

|           |                                                |
|-----------|------------------------------------------------|
| Glu       | Glucose                                        |
| HEPES     | 4-(2-Hydroxyäthyl)-1-piperazinäthansulfonsäure |
| h         | Stunde(n)                                      |
| LM        | Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie  |
| LSC       | Flüssigkeitszintillationszählung               |
| Me        | Methylrest                                     |
| MeOH      | Methanol                                       |
| MES       | 2-(N-Morpholino)-äthansulfonsäure              |
| MGD       | Monogalaktosyldiacylglycerin                   |
| Ms        | Massenspektroskopie                            |
| n.a.      | nicht analysiert, nicht bestimmt               |
| NL        | Neutrallipid(e)                                |
| PA        | Phosphatidsäure                                |
| PL        | Phosphatidylcholin                             |
| PE        | Phosphatidyläthanolamin                        |
| PG        | Phosphatidylglycerin                           |
| PI        | Phosphatidylinositol                           |
| $P_i$     | Phosphat                                       |
| $PP_i$    | Pyrophosphat                                   |
| RGC       | Radiogaschromatographie, -chromatogram         |
| s         | Standardabweichung                             |
| SG        | Sterylglycosid                                 |
| SQD       | Sulfoquinovosyldiacylglycerin                  |
| TeGD      | Tetragalaktosyldiacylglycerin                  |
| TG        | Triglycerid                                    |
| TGD       | Trigalaktosyldiacylglycerin                    |
| tr, TR    | Trace, Anteil kleiner als 0,5 %                |
| Tricin    | N-Tris-(Hydroxymethyl)-methylglycin            |
| Tris      | Tris-hydroxymethyl-aminomethan                 |
| UDP       | Uridindiphosphat                               |
| UDP-Gal   | Uridindiphosphogalaktose                       |
| $\bar{x}$ | Arithmetisches Mittel, Mittelwert              |



Die Kürzel bezeichnen, wenn nicht anders angegeben, die Fettsäuren mit Doppelbindungen in den Positionen:

| Kürzel              | Fettsäure          | Position                   |
|---------------------|--------------------|----------------------------|
| $C_{16:0}$          | Palmitinsäure      | -                          |
| $C_{16:1}$          | Hexadecensäure     | $\Delta$ 7 cis             |
| $3 - tr - C_{16:1}$ | Hexadecensäure     | $\Delta$ 3 trans           |
| $C_{16:2}$          | Hexadecadiensäure  | $\Delta$ 7, 10 all cis     |
| $C_{16:3}$          | Hexadecatriensäure | $\Delta$ 7, 10, 13 all cis |
| $C_{18:0}$          | Stearinsäure       | -                          |
| $C_{18:1}$          | Ölsäure            | $\Delta$ 9 cis             |
| $C_{18:2}$          | Linolsäure         | $\Delta$ 9, 12 all cis     |
| $C_{18:3}$          | Linolensäure       | $\Delta$ 9, 12, 15 all cis |

Bei der Schreibweise von Lipidspezies, z.B.  $C_{18:1}/C_{16:0}$  DGD, repräsentiert die erstgenannte Fettsäure die in der C-1-Position, die zweitgenannte die in der C-2-Position des Glycerinbausteins veresterte Fettsäure. Wenn die Kombination in einer molekularen Spezies nicht festgelegt ist oder nicht bestimmt wurde, werden die Fettsäuren durch Bindestrich getrennt, z.B.  $C_{18:1}-C_{16:0}$  DGD.

## Verzeichnis der Literatur

- 1 Allan, D., P. Thomas, R. H. Michell; *Nature* 276, 289 (1978)
- 2 Appleby, R. S., R. Safford, B. W. Nichols; *BBA* 248, 205 (1971)
- 3 Bahl, J., B. Francke, R. Monéger; *Planta* 129, 193 (1976)
- 4 Bahl, J., R. Monéger; *Compt. Rend.* 281, 1713 (1975)
- 5 Bailey, D. S., D. H. Northcole; *Biochem. J.* 156, 295 (1976)
- 6 Bajwa, S. S., P. S. Sastry; *Ind. J. Biochem. Biophys.* 10, 65 (1973)
- 7 Baker, N., F. Lynen; *Eur. J. Biochem.* 19, 200 (1971)
- 8 Barg, R., N. Umiel; *Z. Pflanzenphysiol.* 83, 437 (1977)
- 9 Bartels, C. T., A. T. James, B. W. Nichols; *Eur. J. Biochem.* 3, 7 (1967)
- 10 Barton, P. G., F. D. Gunstone; *J. Biol. Chem.* 250, 4470 (1975)
- 11 Bedord, C. J., V. McMahon, B. Adams; *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 15 (1978)
- 12 Bergmann, L.; *J. Gen. Physiol.* 43, 841 (1960)
- 13 Bergmann, L., W. Grosse, P. Koth; *Z. Pflanzenphysiol.* 80, 60 (1976)
- 14 Bergmann, L., unveröffentlicht
- 15 Bertrams, M., E. Heinz; *Planta* 132, 161 (1976)
- 16 Bertrams, M., E. Heinz; in "Biochemistry and Physiology of Plant Lipids", L.A. Appelqvist, C. Liljeborg (Hrsg.), Amsterdam 1979 (in press)
- 17 Besouw, A. van; Dissertation, Nijmegen (1979)
- 18 Besouw, A. van, J. F. G. M. Wintermans; *BBA* 529, 44 (1978)
- 19 Blank, W., K. Zaar, H. Kleinig; *Planta* 137, 85 (1977)
- 20 Blee, E., R. Schantz; *Plant Sci. Letters* 13, 247 (1978)
- 21 Blee, E., R. Schantz; *Plant Sci. Letters* 13, 257 (1978)
- 22 Bligny, R.; *Plant Physiol.* 59, 502 (1977)
- 23 Bruinsma, J.; *BBA* 52, 576 (1961)
- 24 Brundish, D. E., N. Shaw, J. Baddiley; *Biochem. J.* 104, 205 (1967)
- 25 Busker, E., H. Budzikiewicz; *Tetrahedron*, submitted 1979
- 26 Champigny, M. L., J. Joyard; *Compt. Rend.* 286, 1791 (1978)
- 27 Cherif, A., J. P. Dubacq, R. Mache, A. Oursel, A. Trémolières; *Phytochem.* 14, 703 (1975)
- 28 Chow, P. N. P.; *Anal. Biochem.* 80, 507 (1977)
- 29 Cockburn, B. J., A. R. Wellburn; *J. Exp. Bot.* 25, 36 (1974)
- 30 Comfurius, P., R. F. Zwaal; *BBA* 488, 36 (1977)
- 31 Critchley, C., E. Heinz; *BBA* 326, 184 (1973)
- 32 Dawson, R. M. C., N. Clarke, R. H. Quarles; *Biochem. J.* 114, 265 (1969)
- 33 Demandre, C.; *Physiol. Vég.* 13, 103 (1975)
- 34 Dieler, H. P. Staatsexamensarbeit, Köln 1974
- 35 Donaldson, R. P., N. E. Tolbert, C. Schnarrenberg; *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 199 (1972)
- 36 Douce, R., A. A. Benson; *Port. Acta Biol.* 14, 45 (1974)

- 
- 37 Douce, R., M. Faure, E. Maréchal; *Compt. Rend.* 262, 1549 (1966)
  - 38 Douce, R., R. B. Holtz, A. A. Benson; *J. Biol. Chem.* 248, 7215 (1973)
  - 39 Douce, R., J. Joyard; in "Methodological Survey in Biochemistry", E. Reid (Hrsg.) 1979 (in press)
  - 40 Douce, R., J. Joyard; in "Plant Biochemistry", P. K. Stumpf (Hrsg.) 1979 (in press)
  - 41 Douce, R., J. Joyard; in "Biochemistry and Physiology of Plant Lipids", L. A. Appelqvist, D. Liljenberg (Hrsg.), Amsterdam 1979 (in press)
  - 42 Douce, R., J. Joyard; in "Chloroplast Development", Akoyunoglou (Hrsg.), New York 1978 (in press)
  - 43 Douce, R., C. Lance; *Physiol. Vég.* 10, 181 (1972)
  - 44 Eccleshall, T. R., J. C. Hawke; *Phytochem.* 10, 3035 (1970)
  - 45 Ferrari, R. A., A. A. Benson; *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 185 (1961)
  - 46 Findlay, E. J., P. G. Baron; *Biochem.* 17, 2400 (1978)
  - 47 Fischer, W., E. Heinz, M. Zeus; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1115 (1973)
  - 48 Fujino, Y., T. Miyazawa; *BBA* 572, 442 (1979)
  - 49 Gimmler, H., in "Photosynthesis I, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 5", A. Trebst, M. Avron, A. Pirson, M. H. Zimmermann (Hrsg.), 448, Berlin 1977
  - 50 Golecki, J. R.; *Arch. Microbiol.* 120, 125 (1979)
  - 51 Good, N. E.; in "Photosynthesis I, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 5", A. Trebst, M. Avron, A. Pirson, M. H. Zimmermann (Hrsg.), 429, Berlin 1977
  - 52 Good, N. E., C. W. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. J. Zawa, R. M. M. Singh; *Biochem.* 5, 472 (1966)
  - 53 Gregor, H. D.; *Chem. Phys. Lipids* 20, 77 (1977)
  - 54 Gurr, M. I., A. T. James; "Lipid Biochemistry", 2. Aufl., New York 1975
  - 55 Gurr, M. I., P. Brawn; *Eur. J. Biochem.* 17, 19 (1970)
  - 56 Gurr, M. I., M. P. Robinson, A. T. James; *Eur. J. Biochem.* 9, 70 (1969)
  - 57 Haas, R.; Diplomarbeit, Köln 1978
  - 58 Haas, R., E. Heinz, unveröffentlicht
  - 59 Hampp, R., N. Sankhla, W. Huber; *Physiol. Plant.* 33, 53 (1975)
  - 60 Harris, R. V., P. Harris, A. T. James; *BBA* 106, 465 (1965)
  - 61 Harris, R. V., A. T. James; *BBA* 106, 456 (1965)
  - 62 Harris, R. V., A. T. James, P. Harris; in "Biochemistry of Chloroplasts", Vol. 2, T. W. Goodwin (Hrsg.), 241, London, New York 1967
  - 63 Harwood, J. L.; in "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids", T. Galliard, E. I. Mercer (Hrsg.), 44, London, New York, San Francisco 1975

- 64 Hashimoto, H., S. Murakami; *Plant & Cell Physiol.* 16, 895 (1875)
- 65 Hauska, G.; in "Photosynthesis I, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 5", A. Trebst, M. Avron, A. Pirson, M. H. Zimmermann (Hrsg.), 253, Berlin 1977
- 66 Haverkate, F., L. L. M. van Deenen; *BBA* 106, 78 (1965)
- 67 Heber, U.; *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 393 (1974)
- 68 Heber, U., K. A. Santarius; *BBA* 109, 390 (1965)
- 69 Heinz, E.; *BBA* 144, 321 (1967)
- 70 Heinz, E.; *BBA* 144, 333 (1967)
- 71 Heinz, E.; *BBA* 231, 537 (1971)
- 72 Heinz, E.; *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 359 (1973)
- 73 Heinz, E.; in "Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants", M. Tevini, H. K. Lichtenthaler (Hrsg.), 102, Berlin, Heidelberg 1977
- 74 Heinz, E.; unveröffentlicht
- 75 Heinz, E., M. Bertrams, J. Joyard, R. Douce; *Z. Pflanzen-physiol.* 87, 325 (1978)
- 76 Heinz, E., H. P. Dieler, J. Rullkötter; *Z. Pflanzenphysiol.* 75, 78 (1975)
- 77 Heinz, E., J. L. Harwood; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 897 (1977)
- 78 Heinz, E., J. Rullkötter, H. Budzikiewicz; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 612 (1974)
- 79 Heinz, E., H. P. Siebertz, M. Linscheid; *Chem. Phys. Lip.* 1979 (in press)
- 80 Heinz, E., A. P. Tulloch; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350, 493 (1969)
- 81 Heldt, H. W.; in "Transport in Plants III, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 3", C. R. Stocking, U. Heber (Hrsg.), 137, Berlin 1976
- 82 Hippmann, H., E. Heinz; *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 408 (1976)
- 83 Hirata, F., J. Axelrod; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2348 (1978)
- 84 Hüsemann, W., S. S. Radwan, H. K. Mangold, W. Barz; angekündigt in: H. K. Mangold in "Plant Tissue Culture and its Bio- technological Application", W. Barz, E. Reinhard, M. H. Zenk (Hrsg.), Berlin, Heidelberg, New York 1977
- 85 Jacobson, B. S., C. G. Kannangara, P. K. Stumpf; *Biochem. Biophys. Res. Com.* 51, 487 (1973)
- 86 Jamieson, G. R., R. H. Reid; *Phytochem.* 10, 1837 (1971)
- 87 Jeffrey, S. W., R. Douce, A. A. Benson; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 807 (1974)
- 88 Joyard, J., M. Chuzel, R. Douce; in "Biochemistry and Physio-logy of Plant Lipids", L. A. Appelgvist, C. Liljenberg (Hrsg.), Amsterdam 1979 (in press)
- 89 Joyard, J., R. Douce; *Physiol. Vég.* 14, 31 (1976)
- 90 Joyard, J., R. Douce; *BBA* 424, 125 (1976)
- 91 Joyard, J., R. Douce; *Compt. Rend* 282, 1515 (1976)
- 92 Joyard, J., R. Douce; *BBA* 486, 273 (1977)
- 93 Kannangara, C. G., B. S. Jacobson, P. K. Stumpf; *Biochem. Biophys. Res. Com.* 52, 648 (1973)

- 
- 94 Kates, M.; "Techniques of Lipidology", Amsterdam, London 1972
- 95 Kates, M., M. O. Marshall; in "Recent Advances in the Biochemistry of Plant Lipids", T. Galliard, E. I. Mercer (Hrsg.), 115, London, New York, San Francisco 1975
- 96 Keenan, T. W., R. T. Leonard, T. K. Hodges; *Cytobios.* 7, 103 (1973)
- 97 Kiricsi, I., K. Varga, P. Fejes; *J. Chromatogr.* 123, 279 (1976)
- 98 Königs, B., E. Heinz; *Planta* 118, 159 (1974)
- 99 Kuksis, A.; *J. Chromatogr.* 142, 3 (1977)
- 100 Yang, S. F., S. Freer, A. A. Benson; *J. Biol. Chem.* 242, 477 (1967)
- 101 Lem, N. W., J. P. Williams; *Phytochem.* 17, 1893 (1978)
- 102 Lilley, R. McC., M. P. Fitzgerald, K. G. Rienits, D. A. Walker; *New Phytol.* 75, 1 (1975)
- 103 Lodish, H. F., J. E. Rothman; *Scientific American* 240, 38 (1979)
- 104 Lowry, O. H., H. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall; *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
- 105 Mackender, R. D., R. M. Leech,; *Plant Physiol.* 53, 496 (1974)
- 106 Mareš, P., E. Tvřizká, V. Tamchyna; *J. Chromatogr.* 146, 241 (1978)
- 107 Marshall, M. O., M. Kates; *BBA* 260, 558 (1972)
- 108 Marshall, M. O., M. Kates; *FEBS Letters* 31, 199 (1973)
- 109 Mazliak, P.; in "Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants", M. Tevini, H. K. Lichtenthaler (Hrsg.), Berlin, Heidelberg (1977)
- 110 McCarty, R. E., R. Douce, A. A. Benson; *BBA* 316, 266 (1973)
- 111 McIlwain, D. L., C. E. Ballou; *Biochemistry* 5, 4054 (1966)
- 112 McKee, J. W. A., J. C. Hawke; *FEBS Letters* 94, 273 (1978)
- 113 Menke W., R. Radunz, G. H. Schmid, F. Koenig, R. D. Hirtz; *Z. Naturforsch.* 31, 436 (1976)
- 114 Merk, E.; "Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier- chromatographie", Darmstadt 1970
- 115 Meunier, D., M. P. Mazliak; *Compt. Rend.* 275, 213 (1972)
- 116 Miyazawa, T., Y. Fujino; *Agric. Biol. Chem.* 42, 1979 (1978)
- 117 Moreau, F., J. Dupont, C. Lance; *BBA* 345, 294 (1974)
- 118 Mouriaux, G., R. Douce; *Compt. Rend.* 286, 277 (1978)
- 119 Mudd, J. B., R. E. Garcia; in "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids", T. Galliard, E. I. Mercer (Hrsg.), 161, London, New York, San Francisco 1975
- 120 Mudd, J. B., H. H. D. M. van Vliet, L. L. M. van Deenen; *J. Lip. Res.* 10, 623 (1969)
- 121 Murphy, D. J., R. M. Leech,; *FEBS Letters* 88, 192 (1978)
- 122 Nakano, M., W. Fischer; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1439 (1977)
- 123 Nielsen, H.; *J. Chromatogr.* 89, 259 (1974)

- 124 Nothelfer, H. G., R. H. Barckhaus, F. Spener; BBA 489, 370 (1977)
- 125 N.N.; Biochemica Information II, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim 1975
- 126 Ongun, A., J. B. Mudd; J. Biol. Chem. 243, 1558 (1968)
- 127 Papahadjopoulos, D., M. Moscarello, E. H. Eylar, T. Isac; BBA 401, 317 (1975)
- 128 Peng, C. T.; "SSample Preparation in Liquid Scintillation Counting", Review 17 der Radiochemical Centre Ltd., Amersham Buchler GmbH & Co KG, Buck's 1977
- 129 Pohl, P.; Z. Naturforsch. 28c, 264 (1973)
- 130 Pohl, P.; Z. Naturforsch. 28c, 270 (1973)
- 131 Pohl, P., H. Wagner; Z. Naturforsch. 27b, 53 (1972)
- 132 Poincelot, R. P.; Arch. Biochem. Biophys. 159, 134 (1973)
- 133 Poincelot, R. P.; Plant Physiol. 58, 595 (1976)
- 134 Pugh, E. L., M. Kates; BBA 316, 305 (1973)
- 135 Pugh, E. L., M. Kates; BBA 380, 442 (1975)
- 136 Radunz, A.; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 411 (1969)
- 137 Radunz, A.; Z. Naturforsch. 26, 916 (1971)
- 138 Radunz, A.; Z. Naturforsch. 27, 821 (1972)
- 139 Radunz, A., R. Berzborn; Z. Naturforsch. 25, 412 (1970)
- 140 Radwan, S. S., H. K. Mangold; Adv. Lipid Res. 14, 171 (1971)
- 141 Radwan, S. S., H. K. Mangold; Chem. Phys. Lipids 14, 87 (1975)
- 142 Radwan, S. S., F. Spener, H. K. Mangold, E. J. Staba; Chem. Phys. Lipids 14, 72 (1975)
- 143 Renkonen, O.; BBA 125, 288 (1966)
- 144 Roughan, P. G.; Biochem. J. 117, 1 (1970)
- 145 Roughan, P. G.; Lipids 10, 609 (1975)
- 146 Roughan, P. G., C. R. Slack, R. Holland; Biochem. J. 158, 593 (1976)
- 147 Rullkötter, J., E. Heinz, A. P. Tulloch; Z. Pflanzenphysiol. 76, 163 (1975)
- 148 Safford, R., R. S. Appleby, B. W. Nichols; BBA 239, 509 (1971)
- 149 Safford, R., B. W. Nichols; BBA 210, 57 (1970)
- 150 Sandermann, H.; BBA 515, 209 (1978)
- 151 Sato, N., N. Murata, Y. Miura, N. Keta; BBA 572, 19 (1979)
- 152 Schlotzhauer, P. F., J. J. Ellington, A. I. Schepartz; Lipids 12, 239 (1977)
- 153 Schwertner, H. A., J. B. Biale; J. Lip. Res. 14, 235 (1973)
- 154 Shipley, G. G., J. P. Green, B. W. Nichols; BBA 311, 531 (1973)
- 155 Siebertz, H. P.; Diplomarbeit, Köln 1976
- 156 Siebertz, M., E. Heinz; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 27 (1977)
- 157 Siebertz, M.; Diplomarbeit, Köln 1976
- 158 Siebertz, M., E. Heinz; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 27 (1977)
- 159 Siefertmann-Harms, D., J. Joyard, R. Douce; Plant Physiol. 61, 530 (1978)

- 
- 160 Slack, C. R., P. G. Roughan, N. Balasingham; *Biochem. J.* 162, 289 (1977)
- 161 Song, M., N. Tattre; *Can. J. Bot.* 51, 1893 (1973)
- 162 Sprey, B., W. M. Laetsch; *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 360 (1976)
- 163 Stearns, E.M., W. T. Morton; *Phytochem.* 14, 619 (1975)
- 164 Stearns, E. M., W. T. Morton; *Lipids* 12, 451 (1977)
- 165 Strasburger, E., F. Noll, H. Schenck, A. F. W. Schimper; "Lehrbuch der Botanik", 31. Aufl., neubearbeitet von D. Denffer, F. Ehrendorfer, K. Mägdefrau, H. Ziegler, Stuttgart, New York 1978
- 166 Stumpf, P. K.; in "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids", T. Galliard, E. I. Mercer (Hrsg.), 95, London, New York, San Francisco 1975
- 167 Talamo, B., N. Chang, K. Bloch; *J. Biol. Chem.* 248, 2738 (1973)
- 168 Trémolierès A., P. Mazliak; *Plant Sci. Letters* 2, 193 (1974)
- 169 Tulloch, A. P., E. Heinz, W. Fischer; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 879 (1973)
- 170 Tuquet C., T. Guillot-Salomon, M. de Lubac, M. Signol; *Plant Sci. Letters* 8, 59 (1977)
- 171 Urbach D., M. Suchanka, W. Urbach; *Z. Naturforsch.* 31, 652 (1976)
- 172 Vance, W. A., P. K. Stumpf; *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 210 (1978)
- 173 Walker, D. A.; "Methods Enzymol. XXIII, Photosynthesis Part A", A. S. Pietro (Hrsg.), 211, London, New York 1971
- 174 Watts, A., K. Harlos, W. Maschke, D. Marsh; *BBA* 510, 63 (1978)
- 175 Webb, R. A., D. F. Mettrick; *J. Chromatogr.* 67, 75 (1972)
- 176 Weete, J. D.; *Lipids* 6, 684 (1971)
- 177 Williams, J. P., M. Khan, S. Leung; *J. Lipid Res.* 16, 61 (1975)
- 178 Williams, J. P., G. R. Watson, M. Khan, S. Leung; *Plant Physiol.* 55, 1038 (1975)
- 179 Williams, J. P., G. R. Watson, S. Leung; *Plant Physiol.* 57, 179 (1976)
- 180 Wilson, R. F., R. W. Rinne; *Plant Physiol.* 54, 744 (1974)
- 181 Yang, S. F., S. Freer, A. A. Benson; *J. Biol. Chem.* 242, 477 (1967)
- 182 Zepke, H. D., Diplomarbeit, Köln 1976
- 183 Zepke, H. D., E. Heinz, A. Radunz, M. Linscheid, R. Pesch; *Arch. Microbiol.* 119, 157 (1978)

### Nachträge

- 184 Roughan, P. G., C. R. Slack; *Biochem. J.* 162, 457 (1977)
- 185 Ohlrogge, J. B., D. N. Kuhn, P. K. Stumpf; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1194 (1979)
- 186 Netting, A. G., P. von Wettstein-Knowles; *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 613 (1976.)

- 187 Hakamori, S.-I.; J. Biochem. 55, 205 (1964)  
188 Yang, H.-J., S.-I. Hakamori; J. Biol. Chem. 246, 1192 (1971)  
189 Thomas, D. R., A. K. Stobart; J. Exp. Bot. 21, 274 (1970)



# Abbildungsverzeichnis

|      |                                                                                                                                               |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1    | Strukturformeln pflanzlicher Lipide . . . . .                                                                                                 | 3  |
| 2    | Acyllipidzusammensetzung der Membranen höherer Pflanzen . . . . .                                                                             | 6  |
| 3    | Massenspektroskopie des MGD und DGD . . . . .                                                                                                 | 8  |
| 4    | Fettsäuremuster und Radioaktivitätsmuster des MGD . . . . .                                                                                   | 9  |
| 5    | Abhängigkeit der DGD-Syntheserate von der Fettsäurezusammensetzung des MGD . . . . .                                                          | 10 |
| 2.1  | Isolation der Chloroplasten . . . . .                                                                                                         | 22 |
| 2.2  | Messung der Hill-Reaktionen . . . . .                                                                                                         | 23 |
| 2.3  | Fraktion der Chloroplasten im Dichtegradienten . . . . .                                                                                      | 26 |
| 2.5  | Envelopes im Dichtegradienten . . . . .                                                                                                       | 27 |
| 2.6  | Isolation der Envelopes . . . . .                                                                                                             | 28 |
| 2.4  | Messung der GAP-DH in Chloroplastenfraktionen . . . . .                                                                                       | 30 |
| 2.7  | Analyse der in vivo markierten Lipide . . . . .                                                                                               | 38 |
| 2.8  | Extinktion des Lipidextraktes der Envelope-Fraktion $E_{4h}$ . . . . .                                                                        | 39 |
| 2.9  | $R_f$ -Werte . . . . .                                                                                                                        | 45 |
| 2.10 | Radiogaschromatogramm . . . . .                                                                                                               | 46 |
| 2.11 | $CHCl_3$ /MeOH-QUENCH . . . . .                                                                                                               | 50 |
| 2.12 | Chlorophyll-QUENCH . . . . .                                                                                                                  | 51 |
| 2.13 | DC-Separierung einzelner Lipidkomponenten . . . . .                                                                                           | 57 |
| 2.14 | Lipasespaltung des acetylierten Diacylglycerins und DC der Hydrolyseprodukte in LM 13 . . . . .                                               | 59 |
| 2.15 | Methylierung und Hydrolyse des DGD . . . . .                                                                                                  | 61 |
| 3.1  | Biosynthese der Hexadecatrien- und Linolensäure in Blättern des Spinats nach P. K. Stumpf (166) . . . . .                                     | 70 |
| 3.2  | Positionsspezifische Verteilung der in vivo radioaktiv markierten Fettsäuren der Lipide aus isolierten Thylakoiden des Spinats . . . . .      | 72 |
| 3.3  | Positionsspezifische Verteilung der in vivo radioaktiv markierten Fettsäuren der Lipide MGD, DGD und PC aus <i>Pisum sativum</i> etc. . . . . | 73 |

|     |                                                                                                                                                      |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4 | Positionsspezifische Verteilung der ( $^{14}\text{C}$ )-Fs in Lipiden aus Blättern von $C_{16:3}$ - und $C_{18:3}$ -Pflanzen                         | 75  |
| 3.5 | Pools der $C_{16:3}$ und $C_{18:3}$ und des MGD in $C_{16:3}$ -Pflanzen                                                                              | 76  |
| 4.1 | Vergleich der Fettsäureproportionen in den individuellen Lipiden aus Blättern, grünen und heterotrophen Kulturen des Tabaks                          | 83  |
| 4.2 | Position der Fs in Blättern und Kulturen des Tabaks                                                                                                  | 85  |
| 5.1 | DC-Scan Lipide einer grünen Gewebekultur des Tabaks                                                                                                  | 90  |
| 5.2 | $^{14}\text{C}$ -Fs grüner Gewebekultur des Tabaks                                                                                                   | 91  |
| 5.3 | Hypothese: MGD-gekoppelte Desaturierung und Elongation der $C_{16}$ -Fs                                                                              | 93  |
| 6.1 | Acyllipide aus isolierten Envelopes des Spinats                                                                                                      | 97  |
| 6.2 | Massenspektrum des acetylierten Tetragalaktosyldiacylglycerins (TeGD) aus isolierten Envelopes (Spinat)                                              | 98  |
| 6.3 | Positionsspezifische Verteilung der Fs zwischen C-1 und C-2 am Glycerinbaustein der Lipide des isolierten Envelopes (Spinat)                         | 105 |
| 6.4 | Relative Intensitäten der Diglyceridfragmentionen einer MGD- und einer DGD-Lösung (MS)                                                               | 106 |
| 6.5 | Diglyceridprofile der Glycerolipide des Envelope                                                                                                     | 109 |
| 7.1 | Kinetik der ( $^{14}\text{C}$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide bei Inkubation isolierter Envelopes des Spinats mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal | 112 |
| 7.2 | Silbernitratchromatographie ( $\text{AgNO}_3$ -DC) definierter MGD-Spezies                                                                           | 114 |
| 7.3 | Dünnschichtchromatographie radioaktiv markierter GL                                                                                                  | 116 |
| 7.4 | Diskussion der Methylierungsanalyse                                                                                                                  | 117 |
| 7.5 | Inkubation isolierter Envelopes mit ( $^{14}\text{C}$ )MGD                                                                                           | 119 |
| 7.6 | Inkubation isolierter Envelopes mit ( $^{14}\text{C}$ )GL                                                                                            | 120 |
| 8.1 | Radioaktivität in den Lipidextrakten aus Blättern, Clp, Thylakoiden und Envelope                                                                     | 126 |
| 8.2 | In vitro radioaktiv markierte Galaktolipide aus isolierten Envelopes und Thylakoiden                                                                 | 130 |
| 8.3 | $\text{AgNO}_3$ -DC des in vivo markierten MGD aus Chloroplasten, Envelopes und Thylakoiden des Spinats                                              | 135 |
| 8.4 | RGC der Fsme aus den individuellen in vivo markierten MGD-Spezies                                                                                    | 137 |
| 8.5 | RGC der durch chemische $\alpha$ -Oxidation aus Palmitin-, Öl-, Linol- und Linolensäure der in vivo markierten MGD-Spezies                           | 138 |
| 8.6 | $\text{AgNO}_3$ -DC des in vivo radioaktiv markierten DGD                                                                                            | 140 |
| 8.7 | Pool-Separierung und Charakteristika des DG und der Galaktolipide in vivo und in vitro                                                               | 142 |

---

|      |                                                                                                                  |     |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.8  | Schema der MGD- und DGD-gekoppelten Desaturierung und der MGD-gekoppelten Elongation . . . . .                   | 145 |
| 8.9  | $AgNO_3$ -DC des ( $^{14}C$ )DGD . . . . .                                                                       | 146 |
| 8.10 | $AgNO_3$ -DC des in vivo radioaktiv markierten PG . . . . .                                                      | 147 |
| 8.11 | RGC der Fsme der in vivo markierten PG-Spezies (s. Abb. 8.10) aus der Fraktion $E_{4h}$ (2.2.5 Exp. I) . . . . . | 149 |
| 8.12 | $AgNO_3$ -DC des in vivo radioaktiv markierten PC . . . . .                                                      | 150 |
| 8.13 | $AgNO_3$ -DC des in vivo markierten SQD . . . . .                                                                | 151 |
| 8.14 | Galaktosylierung des MGD-Äther-Analogons . . . . .                                                               | 154 |
| 9.1  | Acylierung des MGD-Äther-Analogons . . . . .                                                                     | 158 |
| 9.2  | Massenspektrum des acylierten MGD-Äther-Analogons . . . . .                                                      | 159 |
| 9.3  | GC der Fsme des acylierten MGD-Äther-Analogons . . . . .                                                         | 160 |
| 9.4  | Chromatographisches Verhalten des MGD und des MGD-Äther-Analogons und ihrer Derivate . . . . .                   | 160 |
| 11.1 | ( $^{14}C$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide (Total, MGD und DGD) . . . . .                                | 165 |
| 11.2 | ( $^{14}C$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide . . . . .                                                     | 167 |
| 11.3 | ( $^{14}C$ )Gal-Inkorporation in die Galaktolipide (isolierte Clp) . . . . .                                     | 168 |
| 11.4 | DC des in vitro radioaktiv markierten SQD . . . . .                                                              | 172 |
| 11.5 | $^{35}S$ -Inkorporation in das SQD . . . . .                                                                     | 173 |



# Tabellenverzeichnis

|     |                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.1 | Übersicht über die Inkubationen . . . . .                                                                                                                                                         | 31  |
| 2.2 | Ausbeute der Extraktion der Galaktolipide aus dem Kieselgel von DC-Fertigplatten . . . . .                                                                                                        | 42  |
| 2.3 | Laufmittelsysteme F = DC-Fertigplatten 60 G, G und H = selbst hergestellte DC-Platten Kieselgel 60 G und H (5x40 cm); C = Chloroform, M=Methanol, W=Wasser, E=Eisessig, H=Hexan, Ä=Äther. . . . . | 43  |
| 2.4 | Fettsäurezusammensetzung in Mol-% des PE, PG und der Acylierungsprodukte APE und BPA . . . . .                                                                                                    | 53  |
| 2.5 | Sprühreagenzien für die DC . . . . .                                                                                                                                                              | 54  |
| 2.6 | $R_f$ -Werte von MGD-Spezies . . . . .                                                                                                                                                            | 55  |
| 2.7 | Fettsäurezusammensetzung (in Mol-%) des PC, des aus PC präparierten, acetylierten DG und deren Lyso-Verbindungen . . . . .                                                                        | 60  |
| 4.1 | Fettsäurezusammensetzung der Lipidextrakte aus vier verschiedenen Geweben des Tabaks . . . . .                                                                                                    | 78  |
| 4.2 | Zusammensetzung der Acyllipide aus vier verschiedenen Geweben des Tabaks . . . . .                                                                                                                | 80  |
| 4.3 | Fettsäurezusammensetzung der individuellen Acyllipide aus vier verschiedenen Geweben des Tabaks . . . . .                                                                                         | 81  |
| 5.1 | Inkubation grüner Gewebekulturen des Tabaks . . . . .                                                                                                                                             | 89  |
| 6.1 | Fettsäurezusammensetzung des ADGD in Mol-% aus isolierten Envelopes des Spinats . . . . .                                                                                                         | 99  |
| 6.2 | Absolute und relative Lipidzusammensetzung isolierter Envelopes und Thylakoide der Chloroplasten des Spinats . . . . .                                                                            | 100 |
| 6.3 | Fettsäurezusammensetzung des totalen Lipidextraktes und der einzelnen Acyllipide des Envelope . . . . .                                                                                           | 103 |
| 6.4 | Fs der Lipide aus Blättern und Thylakoiden . . . . .                                                                                                                                              | 104 |

|      |                                                                                                                                                                            |     |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.5  | Quantitative Bestimmung vier definierter MGD-Spezies . . . . .                                                                                                             | 107 |
| 6.6  | Fettsäurezusammensetzung des DG aus isolierten Envelopes . . . .                                                                                                           | 107 |
| 8.1  | Quantitative Bestimmung vier definierter MGD-Spezies . . . . .                                                                                                             | 125 |
| 8.2  | Radioaktivität der Acyllipide und des SG in verschiedenen Fraktionen                                                                                                       | 129 |
| 8.3  | Spezifische Aktivität der Lipide in verschiedenen Fraktionen B, E, T .                                                                                                     | 132 |
| 8.4  | Inkorporation von ( $^{14}\text{C}$ )Gal in die Galaktolipide . . . . .                                                                                                    | 133 |
| 8.5  | Fs DG Envelopes . . . . .                                                                                                                                                  | 136 |
| 11.1 | ( $^{14}\text{C}$ )Gal-Inkorporation in die GL bei Inkubation isolierter, intakter Clp<br>des Spinats mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal . . . . .                             | 166 |
| 11.2 | ( $^{14}\text{C}$ )-Inkorporation in die Lipide bei Inkubation isolierter, intakter Chlo-<br>roplasten des Spinats bei Inkubation mit ( $^{14}\text{C}$ )-Acetat . . . . . | 169 |

## Anhang C: Lebenslauf und Erklärung

### Lebenslauf

#### Tabellarisch

|             |                                                                                                                                                                                 |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 20.05.1950  | Geburt in Dormagen am Rhein, Sohn des technischen Angestellten Peter Siebertz und seiner Ehefrau Gerta geb. Förster                                                             |
| 07.06.1969  | Abitur, Städt. Gymnasium Dormagen                                                                                                                                               |
| 1969 - 1971 | Soldat auf Zeit (2 Jahre), Luftwaffe, letzter Dienstgrad: Oberleutnant der Reserve                                                                                              |
| 1971 - 1976 | Studium der Biologie an der Universität zu Köln                                                                                                                                 |
| 17.05.1974  | Vermählung mit Margret Jung                                                                                                                                                     |
| 23.09.1976  | Diplom im Fach Biologie, Thema der Diplomarbeit: "Markierung der Hexadecatriensäure in Blättern", gestellt von Prof. Dr. E. Heinz, Botanisches Institut der Universität zu Köln |
| 1976 - 1979 | Promotion, Thema: "Untersuchungen zur Struktur und Biogenese pflanzlicher Membranlipide", unter Anleitung von Prof. Dr. E. Heinz, Botanisches Institut der Universität zu Köln  |

Köln, 21.05.1979

Heinz Peter Siebertz

## Erklärung zur Digitalisierung

Die vorliegende digitale Form meiner Dissertation wurde erzeugt durch OCR der originalen Druckvorlagen<sup>1</sup> von 1979, Bildbearbeitung und neuen Textsatz mit der Arbeitsumgebung  $\text{\LaTeX}$ . Daraus ergaben sich Veränderungen im Schriftbild, den Seitenzahlen und der Kapitelnummerierung. Die neuen Möglichkeiten der Querverweise wurden genutzt und Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen aufgenommen. Die neue deutsche Rechtschreibung wurde angewendet. Die Inhalte sind identisch geblieben.

Köln, den 24.11.2021 gez. Dr. Heinz Peter Siebertz

---

<sup>1</sup>Das Original wurde gedruckt von Walter Kleikamp, Zülpicher Str. 205, 5000 Köln 41 (Sülz), Tel.: 442372