

**Studien zur Gewinnung und gentechnischen Modifizierung  
von Phospholipase D aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.)  
und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*)**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

von Alexandra Lerchner

geboren am 25. Juli 1977 in Halle (Saale)

Gutachterin/Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann
2. Herr Prof. Dr. Uwe Bornscheuer
3. Herr Prof. Dr. Claus Wasternack

Halle (Saale), 12. Januar 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000007822**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007822>]

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	2
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE .....	5
1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG .....	7
2 THEORETISCHER TEIL .....	9
2.1 PHOSPHOLIPASEN UND PHOSPHOLIPIDE .....	9
2.2 PLD IN DER PHOSPHOLIPIDSYNTHESE .....	11
2.3 VORKOMMEN VON PLDs .....	12
2.4 STRUKTUR UND ORGANISATION DER PLDs .....	15
2.5 KATALYSEMECHANISMUS UND RAUMSTRUKTUR DER PLDs .....	18
2.6 ZELLULÄRE FUNKTIONEN SOWIE AKTIVIERUNGS- UND REGULATIONSMECHANISMEN PFLANZLICHER PLDs .....	23
2.6.1 Funktion der pflanzlichen PLDs in zellulären Prozessen .....	23
2.6.2 Mögliche Aktivierungsmechanismen der pflanzlichen PLDs .....	25
3 MATERIALIEN .....	28
3.1 CHEMIKALIEN .....	28
3.2 ENZYME .....	29
3.3 ANTIKÖRPER .....	29
3.4 PHOSPHOLIPIDE .....	29
3.5 KITS .....	30
3.6 OLIGONUCLEOTIDE .....	30
3.7 PLASMIDE .....	34
3.8 BAKTERIENSTÄMME .....	35
3.9 KULTURMEDIEN .....	35
3.10 PFLANZENMATERIALIEN .....	36
4 METHODEN .....	37
4.1 KEIMUNG DER SCHLAFMOHNSAMEN .....	37
4.2 PRÄPARATION VON NUCLEINSÄUREN .....	37
4.2.1 Isolierung von mRNA aus Schlafmohn .....	37
4.2.2 DNA-Präparation .....	37
4.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schlafmohn .....	37
4.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	37
4.2.2.3 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel .....	38
4.2.3 Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren .....	38
4.2.4 Konzentrations- und Größenbestimmung von Nucleinsäuren .....	38
4.2.4.1 Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren .....	38
4.2.4.2 Größenbestimmung der Nucleinsäuren .....	38
4.2.5 Agarosegelelektrophorese .....	39
4.3 CDNA-SYNTHESE .....	39
4.4 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) .....	39
4.5 SUBKLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN IN DEN PCR4-TOPO-VEKTOR .....	41
4.6 ORTSGERICHTETE MUTAGENESE .....	42
4.6.1 QuikChange-Mutagenese .....	42
4.6.2 MultiQuikChange-Mutagenese .....	42
4.7 VERDAU MITTELS RESTRIKTIONSENDONUCLEASEN .....	42
4.8 DEPHOSPHORYLIERUNG .....	43

4.9 LIGATION.....	43
4.10 TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA IN E. COLI .....	43
4.10.1 Transformation in chemisch kompetente E. coli-Zellen.....	43
4.10.2 Transformation in elektrokompente E. coli-Zellen.....	43
4.11 ANZUCHT DER E. COLI-STÄMME ZUR PLASMIDPRÄPARATION .....	44
4.12 SEQUENZIERUNG VON PLASMIDEN .....	44
4.13 EXPRESSION.....	45
4.13.1 Expression der Konstrukte im pRSET5a-Vektor.....	45
4.13.2 Expression der Konstrukte im pET-28b(+)-Vektor.....	45
4.14 PROTEINREINIGUNG.....	46
4.14.1 Zellaufschluss.....	46
4.14.2 Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie.....	46
4.14.3 Anionenaustauschchromatographie.....	47
4.14.3.1 Q-Sepharose mit 15 mM Tris/HCl, pH 7,5.....	47
4.14.3.2 Q-Sepharose mit 15 mM Pipes, pH 7,5.....	47
4.14.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose.....	47
4.14.5 Konzentrierung und Dialyse .....	48
4.14.6 Ammoniumsulfatfällung.....	48
4.15 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION.....	48
4.15.1 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay).....	48
4.15.2 Bradford-Assay .....	48
4.15.3 Proteinbestimmung mittels Western-Blot.....	49
4.16 NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGEELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) .....	49
4.17 WESTERN-BLOT-TECHNIK.....	49
4.18 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG .....	50
4.18.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System .....	50
4.18.1.1 Diskontinuierlicher Mikrotiterplattentest .....	50
4.18.1.2 Kontinuierlicher Küvettestest.....	51
4.18.1.3 Einfluss des pH-Wertes und der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität .....	51
4.18.1.4 Einfluss der Ca <sup>2+</sup> -, Mg <sup>2+</sup> - und Zn <sup>2+</sup> -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität .....	51
4.18.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität und der Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem.....	52
4.18.2.1 Kinetische Messungen.....	52
4.18.2.2 Chromatographischer Prozess .....	53
4.18.2.3 Färbung der Phospholipide.....	53
4.18.2.4 Densitometrische Quantifizierung .....	53
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	55
5.1 PLD-ISOENZYME AUS SCHLAFMOHN.....	55
5.1.1 Sequenzbestimmung zweier PLD-Isoenzyme aus Schlafmohn .....	55
5.1.1.1 Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der mRNA von <i>pld1</i> und <i>pld2</i> .....	55
5.1.1.2 Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von <i>pld1</i> und <i>pld2</i> .....	57
5.1.1.3 Analyse der Primärstrukturen von PLD1 und PLD2 .....	59
5.1.2 Klonierung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 .....	62
5.1.3 Expression von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 .....	63
5.1.4 Reinigung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 .....	64
5.1.5 Biochemische Charakterisierung der Mohn-PLD-Isoenzyme.....	68
5.1.5.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System.....	68
5.1.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	69
5.1.5.3 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> -, Mg <sup>2+</sup> - und Zn <sup>2+</sup> -Konzentration.....	70
5.1.5.4 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem.....	72
5.2 KOHL-PLD2 UND KOHL-PLD2-ENZYMARIANTEN.....	76
5.2.1 Design von Kohl-PLD2-Enzymvarianten.....	76
5.2.1.1 Modifizierung der HKD-Motive und der ihnen benachbarten Regionen.....	76
5.2.1.2 Bedeutung des C-Terminus für die Katalyse.....	78
5.2.1.3 Bedeutung der Cystein-Reste für die PLD-Aktivität .....	78
5.2.2 Mutagenese und Expression der Kohl-PLD2-Enzymvarianten.....	79
5.2.3 Klonierungs- und Expressionsstudien von Kohl-PLD2 zur Etablierung eines neuen Expressionssystems.....	80
5.2.3.1 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pBAD22-Vektor .....	80

---

5.2.3.2 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pTWIN I-Vektor.....	81
5.2.3.3 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pET-28b(+)-Vektor und Lactose-Permease-mutierten <i>E. coli</i> -Stämmen .....	83
5.2.4 <i>Reinigung von Kohl-PLD2 sowie der Kohl-PLD2-Enzymvarianten</i> .....	86
5.2.4.1 Reinigung der in <i>E. coli</i> BL21(DE3)+pUBS520 exprimierten Enzyme .....	86
5.2.4.2 Reinigung der in <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS exprimierten Enzyme.....	87
5.2.5 <i>Biochemische Charakterisierung der Kohl-PLD2-Enzymvarianten</i> .....	89
5.2.5.1 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem.....	89
5.2.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System.....	97
6 ZUSAMMENFASSUNG .....	99
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	102
ANHANG.....	114
A1 GENSTRUKTUR VON PLD1 UND PLD2 AUS SCHLAFMOHNKEIMLINGEN .....	114
A2 PRIMÄRSTRUKTUR UND SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE FÜR DIE 2 PLD-ISOENZYME AUS SCHLAFMOHN .....	118
A3 MULTIPLES ALIGNMENT DER PRIMÄRSTRUKTUREN DER MOHN-PLD-ISOENZYME MIT PFLANZLICHEN PLDS DES $\alpha$ -TYPIS MITTELS CLUSTAL W .....	121
A4 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG VON PLD1 UND PLD2 AUS SCHLAFMOHN .....	125
A5 VERGLEICH DER HYDROPHOBIZITÄTSPROFILE.....	126
A6 PRIMÄRSTRUKTUR UND SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE VON KOHL-PLD2 .....	127
DANKSAGUNG .....	129
ERKLÄRUNG .....	130
LEBENS LAUF.....	131

**Abkürzungen und Symbole**

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
C2-Domäne	Ca <sup>2+</sup> /Phospholipidbindende Domäne
Cm	Chloramphenicol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
LB	Luria Bertani-Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie
mRNA	messenger-RNA
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	Pleckstrin-Homologie
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pNP	p-Nitrophenol
PpNP	Phosphatidyl-p-nitrophenol
PX	Phox-Homologie
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sn</i>	stereospecific numbering
SPA	Soja-Phosphatidsäure

SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SPG	Soja-Phosphatidylglycerol
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight

## IUPAC-Codes

A	Adenin	U	Uracil
C	Cytosin	W	Adenin / Thymin
M	Adenin / Cytosin	Y	Cytosin / Thymin / Uracil
G	Guanin	H	Adenin / Cytosin / Thymin / Uracil
R	Adenin / Guanin	K	Guanin / Thymin / Uracil
S	Cytosin / Guanin	D	Adenin / Guanin / Thymin / Uracil
V	Adenin / Cytosin / Guanin	B	Cytosin / Guanin / Thymin / Uracil
T	Thymin	N	Adenin / Cytosin / Guanin / Thymin / Uracil

## Kurzschreibweisen der Aminosäuren

Alanin	Ala, A	Leucin	Leu, L
Arginin	Arg, R	Lysin	Lys, K
Asparagin	Asn, N	Methionin	Met, M
Asparaginsäure	Asp, D	Phenylalanin	Phe, F
Cystein	Cys, C	Prolin	Pro, P
Glutamin	Gln, Q	Serin	Ser, S
Glutaminsäure	Glu, E	Threonin	Thr, T
Glycin	Gly, G	Tryptophan	Trp, W
Histidin	His, H	Tyrosin	Tyr, Y
Isoleucin	Ile, I	Valin	Val, V

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die große Familie der Phospholipasen spielt im Lipidstoffwechsel der Zellen, bei der Regulation der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Seneszenz und dem Zelltod eine wichtige Rolle. Phospholipasen D (PLDs), die Gegenstand dieser Arbeit sind, haben sehr viel Interesse auf sich gezogen, da neben ihrer Bedeutung bei der Membranumgestaltung und beim Membranabbau ihre Beteiligung an Regulationsprozessen als immer wahrscheinlicher angesehen wird (Wang, 2000).

PLD (Phosphatidylcholin-phosphatidohydrolase, E.C. 3.1.4.4) katalysiert die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung in Glycerophospholipiden unter Freisetzung von Phosphatidsäure und dem Alkohol der polaren Kopfgruppe. PLDs werden aufgrund ihrer Fähigkeit, in Glycerophospholipiden auch den Austausch der polaren Kopfgruppe zu katalysieren, vor allem zur Synthese von selten oder gar nicht in der Natur vorkommenden Phospholipiden oder Phospholipidanalogen genutzt. Dabei ist es von entscheidendem Vorteil, PLD-Vertreter zu finden, die diese Transphosphatidylierungsreaktion im Vergleich zur konkurrierenden Hydrolysereaktion favorisieren, wobei vor allem pflanzlichen PLDs aufgrund ihrer geringen Substratspezifität eine große Bedeutung zukommt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch Studien zur Gewinnung und gentechnischen Modifizierung von PLD aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata) Strukturelemente identifiziert werden, die für die hydrolytische Aktivität bzw. die Transphosphatidylierungsaktivität verantwortlich sind, um damit die Basis für ein gezieltes Proteindesign zu schaffen und Enzyme mit einer hohen Transphosphatidylierungsaktivität, einer geringen bzw. im Idealfall keiner Hydrolyseaktivität und einem möglichst breiten Substrat-Spektrum erzeugen zu können.

Zunächst sollten die Nucleotidsequenzen der beiden *pld*-Gene aus Mohnkeimlingen, die bereits teilweise sequenziert wurden (Lerchner, 2001), vollständig aufgeklärt werden. Nach anschließender Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektor sollten die Mohn-*pld*-Gene in *E. coli* exprimiert und nach Erarbeitung effizienter Isolierungs- und Reinigungsmethoden die PLD-Isoenzyme bis zur Homogenität gereinigt werden. Die enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme sollte im Vergleich mit den Befunden der slowakischen Kooperationspartner der Comenius-Universität Bratislava erfolgen, die ein PLD-Isoenzym mit einer bevorzugten Transphosphatidylierungsaktivität aus Mohnkeimlingen isolieren konnten (Bezakova et al., 2000; Oblozinsky et al., 2003).

---

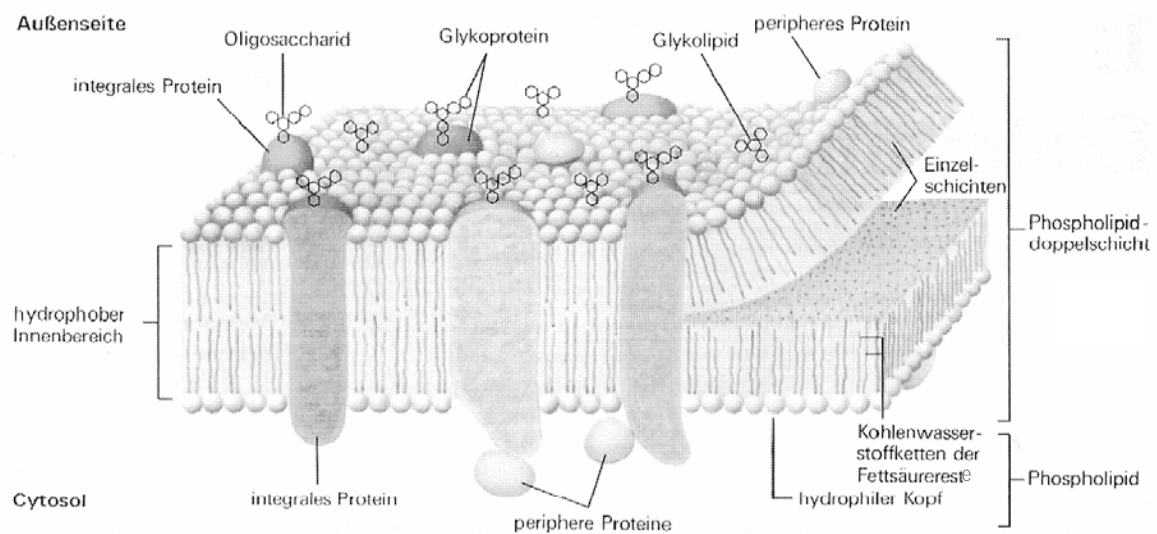
Weiterhin sollten mit Hilfe von Deletionen, Insertionen und gezielten Aminosäureaustauschen an rekombinanter PLD2 aus Weißkohl (Schäffner et al., 2002), die der aus dem Weißkohl isolierten PLD entspricht (Schöps et al., 2002), Informationen bezüglich der Struktur-Funktionsbeziehungen pflanzlicher PLDs erhalten werden. Die verschiedenen Enzymvarianten der rekombinanten PLD2 aus Kohl sollten dabei auf der Grundlage von Sequenzvergleichen ausgewählter nicht-pflanzlicher Vertreter der PLD-Superfamilie, etablierter pflanzlicher PLDs sowie durch den Vergleich der PLD2-Sequenz mit den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme abgeleitet werden. Die präparierten Kohl-PLD2-Enzymvarianten sollten in Analogie zu Schäffner et al. (2002) in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Die Charakterisierung der Enzymvarianten hinsichtlich der hydrolytischen und der Transphosphatidylierungsaktivitäten sollte im Vergleich zum Wildtyp-Enzym durchgeführt werden.



## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Phospholipasen und Phospholipide

Phospholipasen sind ubiquitär in der Natur vorkommende Enzyme, deren natürliche Substrate Glycerophospholipide sind, die neben Glykolipiden, Cholesterol und Proteinen Hauptbestandteil biologischer Membranen sind (**Abbildung 1**). Die Membranen haben eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung, die in **Tabelle 1** für verschiedene Membranen einer Pflanze dargestellt ist.



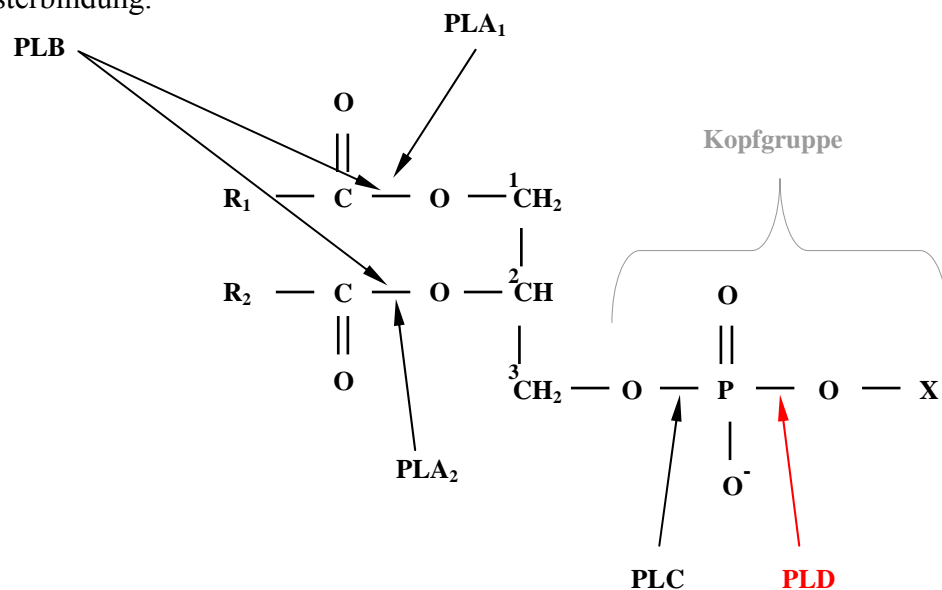
**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur einer Biomembran nach dem Flüssigmosaikmodell (*fluid mosaic model*, Singer und Nicolson, 1972; Hanke et al., 1997).**

Phospholipide sind je nach Struktur der Kopfgruppe unter physiologischen Bedingungen entweder neutral (Phosphatidylcholin, PC; Phosphatidylethanolamin, PE) oder weisen eine negative Ladung auf (Phosphatidsäure, PA; Phosphatidylglycerol, PG; Phosphatidylserin, PS). Die natürlichen Glycerophospholipide enthalten Glycerol, das in *sn1*- und *sn2*-Position mit Fettsäuren, in *sn3*-Position mit Phosphat verestert ist. Die Fettsäureketten repräsentieren den lipophilen, apolaren „Schwanz“ und das Glycerolgrundgerüst mit dem über die Phosphodiesterbindung gebundenen Alkohol bildet den hydrophilen, polaren Bereich des Moleküls. Die Fettsäurezusammensetzung natürlicher Phospholipide ist heterogen, wobei es allerdings deutliche Präferenzen in Abhängigkeit von der Herkunft der Phospholipide gibt. So werden zum Beispiel für Soja-PC folgende Anteile angegeben: 15,2 % Palmitin-, 7,4 % Öl-, 6,4 % Linolen-, 2,8 % Stearin- und 67,7 % Linolsäure. Dagegen hat Ei-PC eine ungefähre Zusammensetzung von 38,5 % Palmitin-, 31,7 % Öl-, 9,2 % Stearin- und 11,8 % Linolsäure (Gunstone, 1996).

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Glycerolipide verschiedener pflanzlicher Membranen (Heldt, 1999).**

Glycerolipide	Chloroplasten	Mitochondrien	
	Thylakoidmembran	Innenmembran	Plasmamembran
	[% des Acyllipid-Gesamtgehalts]		
Monogalactosyldiglycerid	51	0	0
Digalactosyldiglycerid	26	0	0
Sulfochinovosyldiglycerid	7	0	0
Phosphatidylcholin	3	27	32
Phosphatidylserin	0	25	0
Phosphatidylethanolamin	0	29	46
Phosphatidylglycerol	9	0	0
Phosphatidylinositol	1	0	19
Cardiolipin	0	20	0

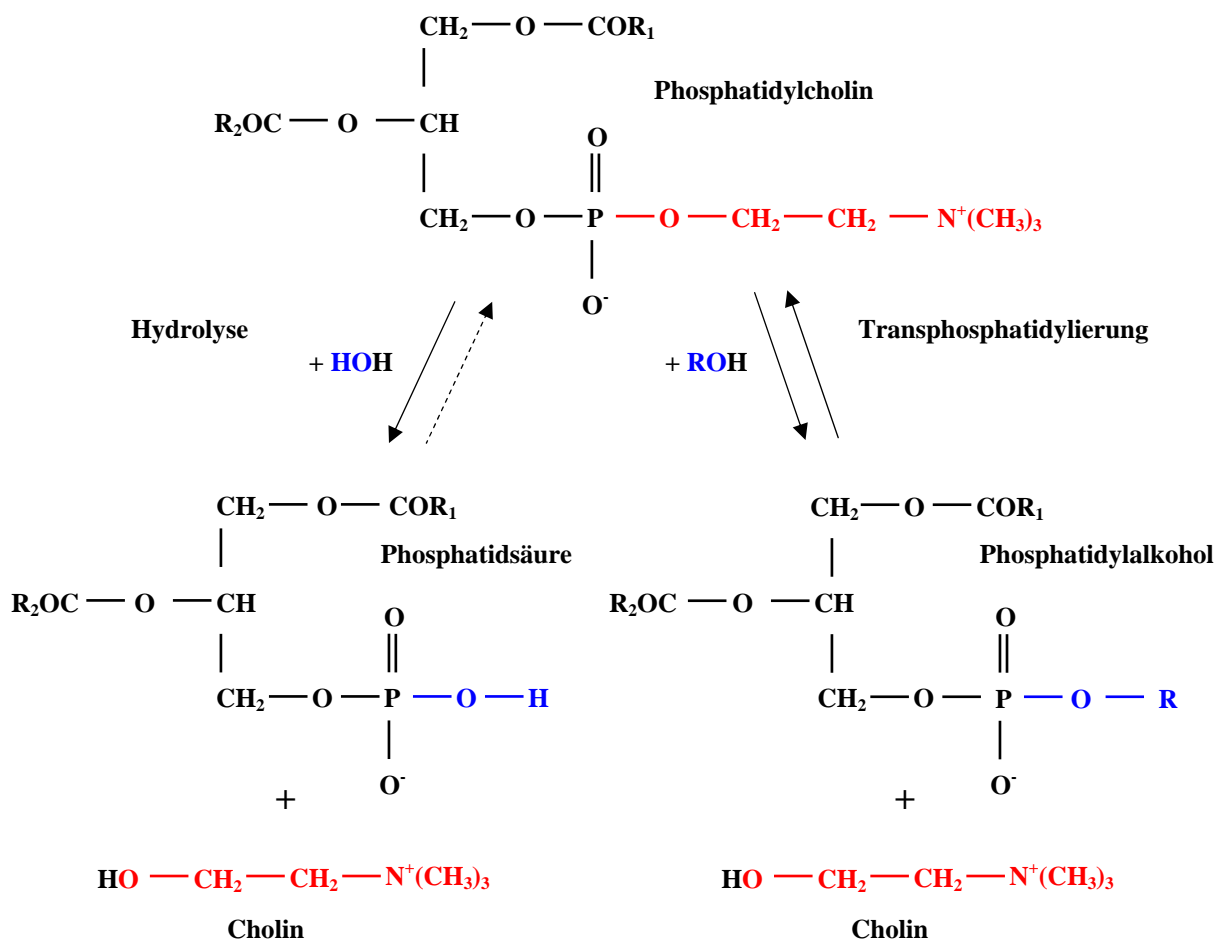
Die Klassifizierung der Phospholipasen in A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C und D erfolgt nach ihrer Spezifität hinsichtlich des Angriffsortes am Phospholipid (**Abbildung 2**). Phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>, E.C. 3.1.1.32) katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung in *sn1*-Position, Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, E.C. 3.1.1.4) die Hydrolyse der Esterbindung in *sn2*-Position. Phospholipasen, die Glycerophospholipide sowohl in *sn1*- als auch in *sn2*-Position hydrolysieren, werden als Phospholipasen B (PLB, E.C. 3.1.1.5) bezeichnet. Phospholipase C (PLC, E.C. 3.1.4.3) katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung, die dem Glycerolgerüst zugewandt ist, Phospholipase D (PLD, E.C.3.1.4.4) katalysiert die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung.



**Abbildung 2: Angriffsorte der Phospholipasen an einem Diacylglycerophospholipid.** R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>, gesättigte bzw. ungesättigte Alkylreste; X, Alkohol.

## 2.2 PLD in der Phospholipidsynthese

Wie in **Abbildung 2** dargestellt wurde, katalysiert PLD die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung natürlicher und synthetischer Phospholipide (**Abbildung 3**). In Anwesenheit eines geeigneten Akzeptoralkohols ist PLD außerdem in der Lage, diesen anstelle von Wasser auf den Phosphatidylrest zu übertragen (Transphosphatidylierung; **Abbildung 3**). Die Transphosphatidylierung ist die Konkurrenzreaktion zur Hydrolyse, wobei einige PLDs die Transphosphatidylierung gegenüber der Hydrolyse favorisieren und somit die Synthese neuer Phospholipide erlauben. Daher werden PLDs schon seit vielen Jahren zur Modifizierung der polaren Kopfgruppe in Phospholipiden verwendet. Während früher die PLD aus Weißkohl als traditionelle Enzymquelle, meist als Rohsaft oder in partiell gereinigter Form, verwendet wurde (Dawson, 1967; Kovatchev und Eibl, 1978; Juneja et al., 1987), werden heute PLDs aus *Streptomyces sp.* für synthetische Zwecke bevorzugt (D'Arrigo et al., 1994; Takami et al., 1994; Nakajima et al., 1994).



**Abbildung 3:** PLD-katalysierte Reaktionen mit Phosphatidylcholin als Substrat. R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>, gesättigte bzw. ungesättigte Alkylreste.

Die PLDs einiger *Streptomyces*-Stämme scheinen prädestiniert für die Umesterung von Glycerophospholipiden zu sein, wohingegen diese Reaktion durch PLD aus *Streptomyces chromofuscus* nicht katalysiert wird. Die PLD aus Weißkohl nimmt eine Zwischenstellung ein. Das Wasser und der Akzeptoralkohol konkurrieren hier offensichtlich stärker um den Phosphatidylrest und in den meisten Reaktionen muss daher die Bildung von Phosphatidsäure in mehr oder weniger hohem Ausmaß toleriert werden. PLD-katalysierte Reaktionen und Synthesebeispiele sind in Servi (1999) und Ulbrich-Hofmann (2000) ausführlich zusammengestellt. Das Spektrum der chemischen Strukturen der Alkohole, die mittels Transphosphatidylierung eingeführt werden können, ist breit und umfasst neben den natürlicherweise in Phospholipiden vorkommenden Komponenten (Glycerol, Cholin, Ethanolamin, Serin, Inositol) Nucleoside, Peptide, Arsenocholin, *N*-heterocyclische Alkohole und aromatische Verbindungen (Ulbrich-Hofmann, 2003). Generell werden primäre Alkohole besser als Akzeptoralkohole angenommen als sekundäre, eine Einführung tertiärer Alkohole ist nicht bekannt. Der durch die PLD katalysierte Kopfgruppenaustausch wurde auch bei der Verwendung von Lysophospholipiden (Virto et al., 2000) und von Etherphospholipiden (Achterberg et al., 1986; Testet-Lamant et al., 1992) beobachtet. Interessanterweise können auch Alkylphosphocholine (Aurich et al., 2002) und Alkylphosphonocholine (Brachwitz et al., 1997) relativ gut durch PLD aus Weißkohl umgeestert werden, d.h. dass PLD aus Weißkohl im Gegensatz zu den mikrobiellen Enzymen weniger spezifisch in Bezug auf den Rest des Moleküls ist und das Glycerol-Rückgrat in der Phosphodiesterstruktur des Substrates nicht benötigt.

### 2.3 Vorkommen von PLDs

Die erste PLD wurde von Hanahan und Chaikoff (1947) aus Karotten und Spinatblättern isoliert, nachdem die Existenz eines solchen Enzyms bereits von Contardi und Ercoli (1932) postuliert worden war. Später konnten PLDs auch in tierischen Organismen (z.B. Hamster, Maus, Mensch, Ratte), in Pilzen (z.B. *Aspergillus*), in Hefen und in Bakterien (z.B. *Streptomyces*) nachgewiesen werden (Heller 1978; Frohman et al., 1999; Liscovitch et al., 2000). Das Enzym ist im Pflanzenreich weit verbreitet und wurde unter anderem aus Weißkohlblättern (Davidson und Long, 1958; Dawson und Hemington, 1967; Yang et al., 1967; Allgyer und Well, 1979; Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992; Abousalham et al., 1993), aus dem Kallus von Orangen *Citrus sinensis* L. (Witt et al., 1987), aus Reiskleie (Lee, 1989), aus Erdnussamen (Heller et al., 1970; Heller et al., 1974), aus dem Endosperm von Rizinussamen (Wang et al., 1993), aus Sojabohnen-Zellkulturen (Abousalham et al., 1995),

aus Rapssamen (Novotna et al., 1999; Novotna et al., 2000) sowie aus Maiswurzeln (Brauer et al., 1990) isoliert, gereinigt und charakterisiert.

In den letzten 10 Jahren wurde dementsprechend eine Vielzahl von Sequenzen von *pld*-Genen verschiedenster Herkunft aufgeklärt. Die beiden ersten Sequenzen waren die des *pld*-Gens des Bakteriums *Streptomyces antibioticus* (Iwasaki et al., 1994) und des *pld*-Gens der Pflanze *Ricinus communis* (Wang et al., 1994). In **Tabelle 2** sind die Aminosäuresequenzen der derzeit in der NCBI-Genbank hinterlegten *pld*-Gensequenzen, die entsprechend der Definition der PLD-Superfamilie in Besitz zweier HKD-Motive sind (2.4), im Überblick dargestellt.

**Tabelle 2: Überblick über bekannte mikrobielle, tierische und pflanzliche PLDs. Aminosäuresequenzen aus der NCBI Genbank.**

Organismus	PLD-Typ, Accession-Nr.	Literaturangabe
<i>Bacillus anthracis</i>	PLD (514 AS), NP_655100	Read et al., 2002
	PLD (509 AS), NP_654568	Read et al., 2002
	PLD (397 AS), NP_653807	Read et al., 2002
<i>Nitrosomonas europaea</i>	PLD (385 AS), CAD83979	Chain et al., 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PLD (1099 AS), AAG06875	Stover et al., 2000
<i>Rhizobium species</i>	PLD (526 AS), AAQ87132	Streit et al., 2004
<i>Streptomyces antibioticus</i>	PLD (556 AS), Q53728	Iwasaki et al., 1994
<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	PLD (540 AS), JG0174	Ogino et al., 1999
<i>Streptomyces halstedii</i>	PLD (560 AS), BAB72230	Hatanaka et al., 2002
	PLD (552 AS), BAB92022	Mori et al., 2002
<i>Streptomyces septatus</i>	PLD (542 AS), BAB69062	Hatanaka et al., 2002
<i>Streptomyces species</i>	PLD (553 AS), AAN41662	Moon et al., 2003
<i>Yersinia pestis</i>	PLD (532 AS), CAB55256	Prentice et al., 2001; Parkhill et al., 2001
<i>Aspergillus nidulans</i>	PLD (833 AS), BAC67175	Hong et al., 2003
<i>Candida albicans</i>	PLD (1710 AS), BAA32278	Kanoh et al., 1998
<i>Caenorhabditis elegans</i>	PLD (1427 AS), BAA97571	Nakashima et al., 2000
<i>Drosophila melanogaster</i>	PLD (1278 AS), AAK00727	Crosby et al., 2001
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	PLD (849 AS), CAD26028	Katinka et al., 2001
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLD1 (1380 AS), P36126	Honigberg et al., 1992; Rose et al., 1995; Waksman et al., 1996
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PLD $\alpha$ 1 (809 AS), AAC49274	Dyer et al., 1995
	PLD $\alpha$ 2 (810 AS), Q9SSQ9	Theologis et al., 2000; Fan et al., 1999
	PLD $\alpha$ 3 (762 AS), Q9C888	Theologis et al., 2000
	PLD $\beta$ 1 (967 AS), P93733	Pappan et al., 1997; Lin et al., 1999; Fan et al., 1999

## Fortsetzung Tabelle 2

Organismus	PLD-Typ, Accession-Nr.	Literaturangabe
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PLD $\beta$ 2 (915 AS), O23078	Mayer et al., 1999; Fan et al., 1999
	PLD $\gamma$ 1 (858 AS), Q9T053	Qin et al., 1997; Mayer et al., 1999; Fan et al., 1999
	PLD $\gamma$ 2 (824 AS), Q9T051	Qin et al., 1999; Mayer et al., 1999
	PLD $\gamma$ 3 (866 AS), Q9T052	Qin et al., 1999; Mayer et al., 1999; Fan et al., 1999
	PLD $\delta$ (868 AS), Q9C5Y0	Gardiner et al., 2001; Wang et al., 2001; Katagiri et al., 2001; Mayer et al., 1999; Yamada et al., 2003
	PLD $\zeta$ 1 (1096 AS), AAL06337	Qin et al., 2002
	PLD $\zeta$ 2 (1039 AS), Q9M9W8	Salanoubat et al., 2000
<i>Arachis hypogaea</i>	PLD (793 AS), AAP50498	Xu et al., 2001
<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	PLD $\alpha$ 1 (810 AS), AAC78487	Pannenberg et al., 1998
	PLD $\alpha$ 2 (812 AS), AAC78486	Pannenberg et al., 1998; Kim et al., 1999
<i>Craterostigma plantagineum</i>	PLD $\alpha$ 1 (807 AS), CAB43063	Frank et al., 2000
	PLD $\alpha$ 2 (807 AS), CAB43062	Frank et al., 2000
<i>Cynara cardunculus</i>	PLD $\alpha$ (713 AS), CAE47482	Simoës et al., 2003
<i>Gossypium hirsutum</i>	PLD $\beta$ 1b (1162 AS), AAN05431	McHugh et al., 2002
	PLD $\delta$ 1a (854 AS), AAN05433	McHugh et al., 2002
	PLD $\delta$ 1b (849 AS), AAN05432	McHugh et al., 2002
<i>Lycopersicon esculentum</i>	PLD $\alpha$ 1 (809 AS), AAG45485	Almquist et al., 2000; Laxalt et al., 2001
	PLD $\alpha$ 2 (806 AS), AAG45486	Laxalt et al., 2001; Whitaker et al., 2001
	PLD $\alpha$ 3 (678 AS), AAG50297	Laxalt et al., 2001
	PLD $\beta$ 1 (847 AS), AAG45487	Laxalt et al., 2001
	PLD $\beta$ 2 (895 AS), AAG45488	Laxalt et al., 2001
<i>Mirabilis jalapa</i>	PLD (578 AS), AAP03643	Gookin et al., 2003
<i>Nicotiana tabacum</i>	PLD $\alpha$ (808 AS), CAB06620	Lein et al., 1997 und 2001

## Fortsetzung Tabelle 2

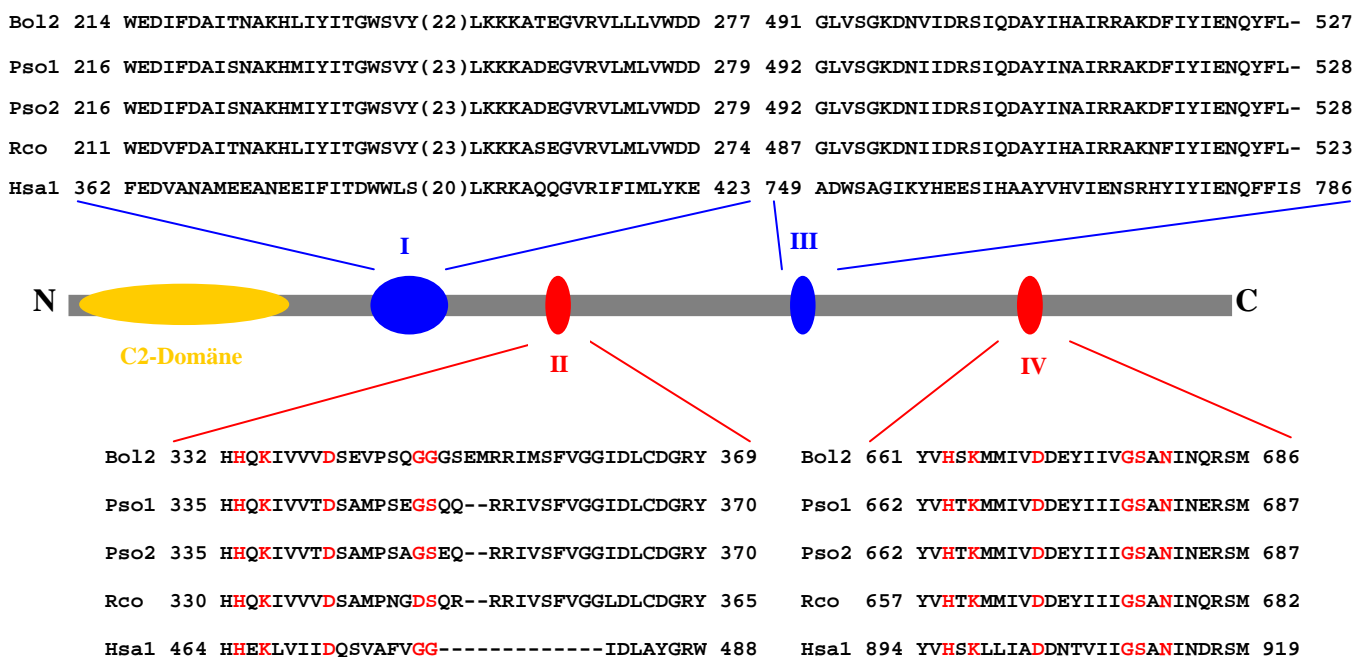
Organismus	PLD-Typ, Accession-Nr.	Literaturangabe
<i>Oryza sativa</i>	RPLD1 $\alpha$ (812 AS), BAA11136	Ueki et al., 1995 ; Morioka et al., 1997
	RPLD2 $\alpha$ (818 AS), BAA19466	Morioka et al., 1997
	RPLD3 $\alpha$ (832 AS), AAF78754	McGee et al., 2003
	RPLD4 $\alpha$ (842 AS), AAF78755	McGee et al., 2003
	RPLD5 $\delta$ (845 AS), AAF78756	McGee et al., 2003
<i>Papaver somniferum</i> *	PLD $\alpha$ 1 (813 AS), AAL48261	Lerchner et al., 2004
	PLD $\alpha$ 2 (813 AS), AAL48262	Lerchner et al., 2004
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	PLD $\alpha$ (808 AS), AAB70463	Cha et al., 1997
<i>Ricinus communis</i>	PLD $\alpha$ (808 AS), AAB04095	Wang et al., 1994
<i>Vigna unguiculata</i>	PLD $\alpha$ (809 AS), O04865	El Maarouf et al., 1999 ;
		El Maarouf et al., 2000
<i>Zea mays</i>	PLD $\alpha$ (812 AS), BAA11135	Ueki et al., 1995
<i>Cricetulus griseus</i>	PLD (1036 AS), T18530	Klaus et al., 2000
<i>Homo sapiens</i>	PLD (1074 AS), AAB49031	Hammond et al., 1995
	PLD2 (933 AS), O14939	Steed et al., 1998; Lopez et al., 1998; Strausberg et al., 2002
<i>Mus musculus</i>	PLD (1035 AS), T42093	Colley et al., 1997
	PLD2 (933 AS), AAC24519	Colley et al., 1997; Redina et al., 1998
<i>Rattus norvegicus</i>	PLD1a (1075 AS), BAA24076	Yoshimura et al., 1996 ; Nakashima et al., 1997
	PLD1b (1037 AS), BAA24077	Yoshimura et al., 1996; Nakashima et al., 1997
	PLD2 (933 AS), BAA24078	Yoshimura et al., 1996; Nakashima et al., 1997

\* im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt

## 2.4 Struktur und Organisation der PLDs

Alle PLD-Isoenzyme weisen zwei konservierte HxKxxxxDxxxxxxGG/S-Sequenzen (Ponting et al., 1996; Koonin, 1996; Morris et al., 1996) auf, die als HKD-Motive bezeichnet werden. Diese sind für die katalytische Aktivität notwendig und definieren die PLD-Superfamilie. Sie sind ebenso in bakteriellen Phospholipidsynthasen, bakteriellen Endonucleasen, in vom Pox-Virus umhüllten Proteinen und im Maus-Toxin aus *Yersinia pestis* (Ponting et al., 1996) vorhanden. PLD-Aktivität aufweisende Mitglieder der PLD-Superfamilie besitzen vier

konservierte Sequenzbereiche (I bis IV; **Abbildung 4**), von denen die Bereiche II und IV die HKD-Motive enthalten (Sung et al., 1997). Die Funktion der Sequenzbereiche I und III ist noch nicht genau bekannt, aber es wird angenommen, dass auch sie an der Katalyse beteiligt sind. Dem IYIENQYFF-Motiv im konservierten Sequenzbereich III, das nur in den eukaryotischen PLDs und in Cardiolipin- und Phosphatidylserinsynthasen zu finden ist, wurde aufgrund der Vielzahl an aromatischen Aminosäuren in dieser Region eine mögliche Rolle bei der Bindung des Cholinanteiles des Phosphatidylcholins zugeordnet (Sung et al., 1997). Diese Annahme resultiert zum einen aus Mutationsstudien von Sung et al. (1997) an humaner PLD1, bei denen sich die Aminosäure Phe784 (**Abbildung 4**) als unentbehrlich für den Erhalt der Aktivität erwies, und zum anderen aus Studien an Acetylcholinesterase, in denen gezeigt werden konnte, dass die Cholin-Interaktion mit dem Enzym über eine aromatische Region aus Phenylalaninen und Tyrosinen erfolgt (Harel et al., 1993; Gilson et al., 1994).



**Abbildung 4: Lokalisation der hoch-konservierten Sequenzbereiche der PLD-Superfamilie in PLD2 aus Weißkohl im Vergleich zu einer Auswahl anderer PLDs.** Spezies-Kurzformen: *Bol*, *Brassica oleracea*; *Hsa*, *Homo sapiens*; *Pso*, *Papaver somniferum*; *Rco*, *Ricinus communis*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2. Rot, Aminosäuren der katalytischen Motive.

In den N-terminalen Sequenzen von Säuger-, Hefe- und Nematoden-PLDs sowie in den pflanzlichen  $\zeta$ -PLD-Isoenzymen sind weiterhin Phox-Homologie (PX)- und Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen vorhanden, die weder in den mikrobiellen noch in den pflanzlichen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -PLD-Isoenzymen vorkommen (Frohman et al., 1999; Qin et al., 2002). Die letztgenannten pflanzlichen Isoenzyme besitzen dagegen, wie in **Abbildung 4** gezeigt, eine hoch-konservierte C2-Domäne (Qin et al., 2002), auf die im Folgenden noch



näher eingegangen werden soll. Die PX-Domäne ist gewöhnlich in Interaktionen mit anderen Proteinen oder mit 3-Phosphoinositiden involviert, während die PH-Domäne an Membran-Assoziationen beteiligt ist, in denen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) eine Rolle spielen (Exton, 2002). Die PH-Domäne ist ein ca. 100 Aminosäure-Reste umfassendes Strukturmotiv, das in vielen Signalmolekülen wie Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen, Tyrosinkinasen, Isoformen der Phospholipase C (PLC  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ), in G-Nucleotid-Austauschfaktoren sowie in Proteinen des Cytoskeletts zu finden ist (Krauss, 1997).

Die C2-Domäne (**Abbildung 4**) ist ein Ca<sup>2+</sup>-Bindungsmotiv mit einer Länge von ungefähr 130 Aminosäure-Resten und wurde zuerst für die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Isoformen der Proteinkinase C beschrieben (Coussens et al., 1996; Knopf et al., 1996; Ono et al., 1986a; Ono et al., 1986b; Parker et al., 1996). Einzelne und multiple Kopien von C2-Domänen konnten inzwischen in verschiedenen eukaryotischen Signalproteinen (z.B. Phosphoinositid-spezifischen PLCs, Phosphatidylinositol 3-kinasen, cytosolischen PLA<sub>2</sub>s), die mit Zellmembranen interagieren und intrazelluläre Prozesse vermitteln (z.B. Umbau von Membranen, Bildung von sekundären Botenstoffen, Aktivierung von GTPasen und Kontrolle der Proteinphosphorylierung), identifiziert werden (Nalefski und Falke, 1996). Die 3-dimensionalen Strukturen der C2-Domänen des neuronalen Proteins Synaptotagmin, der Phospholipase C $\delta$  und die der cytosolischen PLA<sub>2</sub> wurden durch Röntgenkristallstrukturanalyse und kernmagnetische Resonanz (NMR-Messungen) bestimmt (Shao et al., 1996; Essen et al., 1996; Xu et al., 1998). Aufgrund der Anordnung der  $\beta$ -Stränge werden zwei Faltungstopologien, Topologie I (in Synaptotagmin) und Topologie II (in PLC- $\delta$ ), unterschieden. Die C2-Domänen der pflanzlichen PLDs können aufgrund ihrer Sequenz-Homologie zu PLC- $\delta$  dem Faltungstyp II zugeordnet werden. Die Ca<sup>2+</sup>-Bindung erfolgt über vier Aspartat- bzw. Glutamat-Reste, die in den zwischen den  $\beta$ -Faltblättern liegenden *Loop*-Regionen lokalisiert sind (Sutton et al., 1995, Shao et al., 1996). Es wird angenommen, dass zwei in Asparagin bzw. Glutamin umgewandelte Aspartat- bzw. Glutamat-Reste in den pflanzlichen PLDs vom  $\alpha$ -Typ (multiples Alignment im **Anhang A3**) für die geringere Affinität zu Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Vergleich zu PLD $\beta$  verantwortlich sind (Zheng et al., 2000). Die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Translokation löslicher Proteine zu den Membranen und die daraus resultierende Phospholipidbindung wird für cytosolische PLA<sub>2</sub>, PLD $\alpha$  und PLD $\beta$  auf eine durch Ca<sup>2+</sup>-Bindung induzierte Konformationsänderung in der C2-Domäne zurückgeführt (Scott et al., 1990; Zheng et al., 2000). Die Konformationsänderung führt zu einer Exposition von hydrophoben oder geladenen Resten, die eine Membranbindung entweder durch

Eintauchen in die hydrophoben Membrankomponenten oder durch spezifische Bindung an die Kopfgruppe der Phospholipide ermöglicht.

PLDs aus Säugetieren, aus Hefen, aus Tetrahymena und einige pflanzliche PLDs benötigen  $\text{PIP}_2$  für ihre Aktivität (Qin et al., 2002; Brown et al., 1993; Sciorra et al., 1999; Hodgkin et al., 2000; Wang et al., 2001). In der Literatur werden Cluster basischer Aminosäure-Reste  $(\text{K/R})\text{xxxxKx}(\text{K/R})(\text{K/R})$  als Bindungsstellen für  $\text{PIP}_2$  bei Gelsolin, Vilin und  $\text{PLC}\delta$  (Janmey et al., 1992; Yu et al., 1992) und die Motive  $\text{RxxxxKxRR}$  und seine invertierte Sequenz  $\text{RKxRxxxxR}$  als Bindungsstellen für  $\text{PIP}_2$  bei pflanzlichen  $\text{PLD}\beta\text{s}$  (Qin et al., 1997) beschrieben. Obwohl die PH-Domäne  $\text{PIP}_2$  binden kann (Hodgkin et al., 2000), wird  $\text{PIP}_2$  wahrscheinlich an einer Region zwischen den konservierten Sequenzbereichen II und III gebunden, die auch für die Aktivität erforderlich ist (Sciorra et al., 1999; Zheng et al., 2002). Während  $\text{PIP}_3$  ebenso die Aktivität stimulieren kann, haben andere Phospholipide einen geringen bzw. gar keinen Effekt.

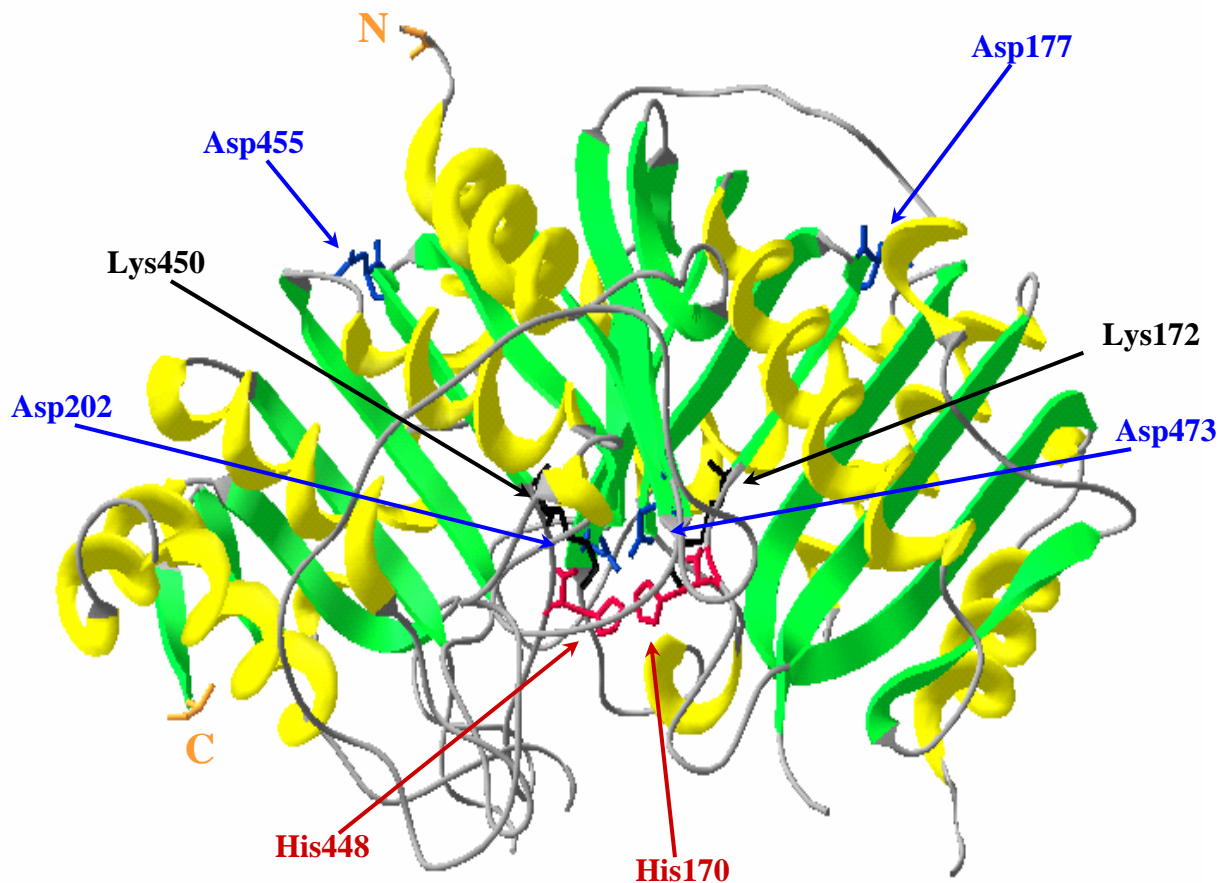
Wie in **Tabelle 2** gezeigt, gibt es in verschiedenen Pflanzen multiple PLDs, die in fünf Gruppen eingeteilt werden ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\zeta$ ; Qin et al., 2002).  $\text{PLD}\alpha$ , bezeichnet als konventionelle PLD, ist in Gegenwart millimolarer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aktiv, wohingegen die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoenzyme  $\text{PIP}_2$ -abhängig sind und ihre maximale Aktivität bei mikromolaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen erreichen (Qin et al., 2002). Das  $\delta$ -Isoenzym wird durch Ölsäure aktiviert, das  $\zeta$ -Isoenzym enthält eine PX- und eine PH-Domäne, ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig sowie selektiv für PC (Qin et al., 2002). Im Gegensatz dazu gibt es nur zwei Säuger-*pld*-Gene, deren Proteinprodukte ( $\text{PLD1}$  und  $\text{PLD2}$ ) alternativ gespleißt werden und eine Identität der Aminosäuresequenzen von ungefähr 50 % zeigen (Wang et al., 2001; Colley et al., 1997). Die  $\text{PLD1}$  wird *in vivo* und *in vitro* durch Proteinkinase C (PKC) und kleine G-Proteine der Rho- und Arf-Familien reguliert (Exton 1997, 1999 und 2002).  $\text{PLD2}$  dagegen hat eine hohe Grundaktivität und wird nicht durch PKC, Rho- oder Arf-Proteine *in vitro* beeinflusst (Hammond et al., 1997; Colley et al., 1997; Lopez et al., 1998).

## 2.5 Katalysemechanismus und Raumstruktur der PLDs

Bereits 1970 postulierten Stanacev und Stuhne-Sekalec, dass die durch PLD-Enzyme katalysierten Reaktionen über ein kovalentes Phosphatidyl-Enzym-Intermediat verlaufen. Studien von Holbrook et al. (1991) zum Einbau von  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  im Verlauf der Hydrolyse von Distearoyl-phosphatidylcholin zeigten, dass während der Katalysereaktion der PLD aus *Streptomyces chromofuscus* die P-O-Bindung und nicht die C-O-Bindung gespalten wird. Andere Studien an PLD aus Weißkohl zeigten, dass die Konfiguration am chiralen

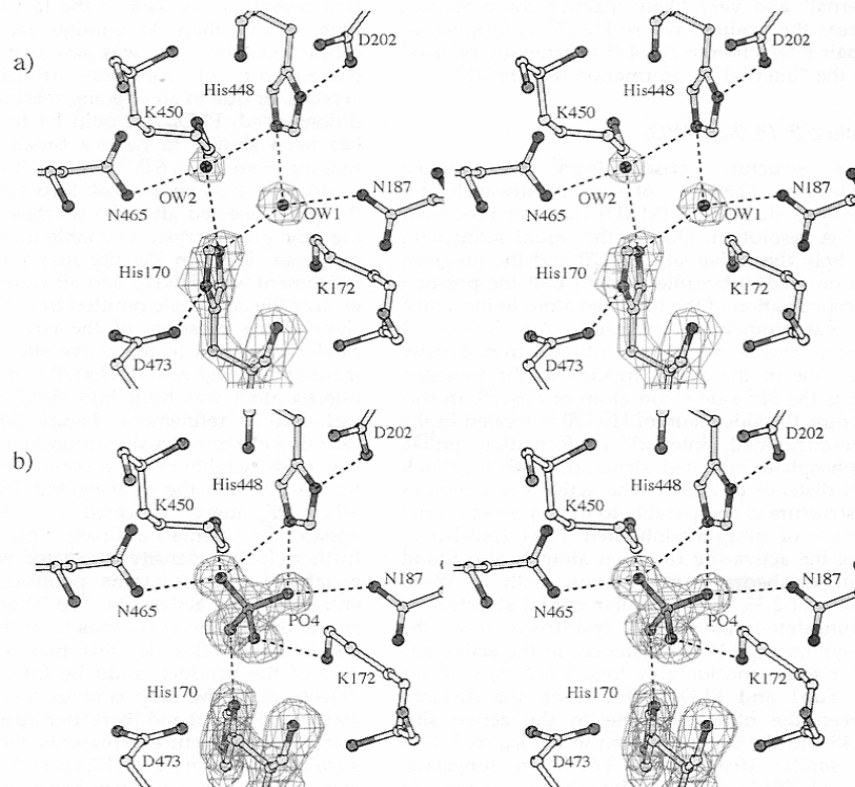
Phosphoratom sowohl bei der Hydrolyse als auch bei der Transphosphatidylierung mit verschiedenen radioaktiv markierten Substraten beibehalten wird (Bruzik und Tsai, 1982 und 1984; Jiang et al., 1984). Dies wurde von Raetz et al. (1997) durch radioaktive Markierungsexperimente an Phosphatidylserinsynthase (PSS) aus *E. coli* bestätigt, die wie alle zur PLD-Superfamilie gehörenden Enzyme ein HKD-Motiv besitzt. Bei PSS aus Hefe dagegen, die kein HKD-Motiv besitzt, wird eine Inversion der Konfiguration am Phosphoratom beobachtet (Raetz et al., 1997). Deshalb wurde für alle ein HKD-Motiv enthaltende Mitglieder der PLD-Superfamilie ein Ping-Pong-Mechanismus vorgeschlagen, der über ein Phosphatidyl-Enzym-Intermediat verläuft. Studien an humaner PLD (Sung et al., 1997) und Endonuclease Nuc (Gottlin et al., 1998) zur Identifizierung des an der Bindung des Proteins am Phospholipid beteiligten Aminosäure-Restes zeigten, dass der Histidin-Rest des HKD-Motives kovalent am Phospholipid gebunden und so das Phosphatidyl-Enzym-Intermediat gebildet wird.

Stuckey und Dixon (1999) gelang es, mit der Endonuclease Nuc die erste Kristallstruktur eines Mitgliedes der PLD-Superfamilie aufzuklären und das katalytische Zentrum zu rekonstruieren. Da die Endonuclease Nuc nur über ein HKD-Motiv verfügt, lagern sich zur Bildung des katalytischen Zentrums zwei Moleküle sattelförmig zu einem Dimer zusammen. Neben den beiden Histidin-Resten (His94) sind auch die Lysin-Reste (Lys96) der HKD-Motive und in der Nähe befindliche Asparagin-Reste (Asn111) wesentlich an der Bindung des Phosphates beteiligt. Die den Histidin-Resten benachbarten Glutamat-Reste (Glu122) stabilisieren möglicherweise die ionischen Formen der Histidin-Reste. Daraus wurde folgender Katalysemechanismus abgeleitet: Der Imidazol-Stickstoff des Histidin-Restes eines der beiden HKD-Motive geht mit dem Phosphoratom des Substrates eine kovalente Bindung unter Bildung eines phosphatidylierten Enzym-Intermediats ein, das im Verlaufe des angenommenen Ping-Pong-Mechanismus gespalten wird und im Falle der Hydrolyse Phosphatidsäure bzw. im Falle der Transphosphatidylierung ein modifiziertes Phospholipid freisetzt. Während bei der Endonuclease beide Histidin-Reste gleichberechtigt zur Bildung des Intermediats beitragen, fungiert bei der mikrobiellen PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF (PLD<sub>PMF</sub>), deren Kristallstruktur im Jahre 2000 von Leiros et al. aufgeklärt wurde (**Abbildung 5**), ausschließlich der Histidin-Rest im N-terminalen HKD-Motiv als Nucleophil.



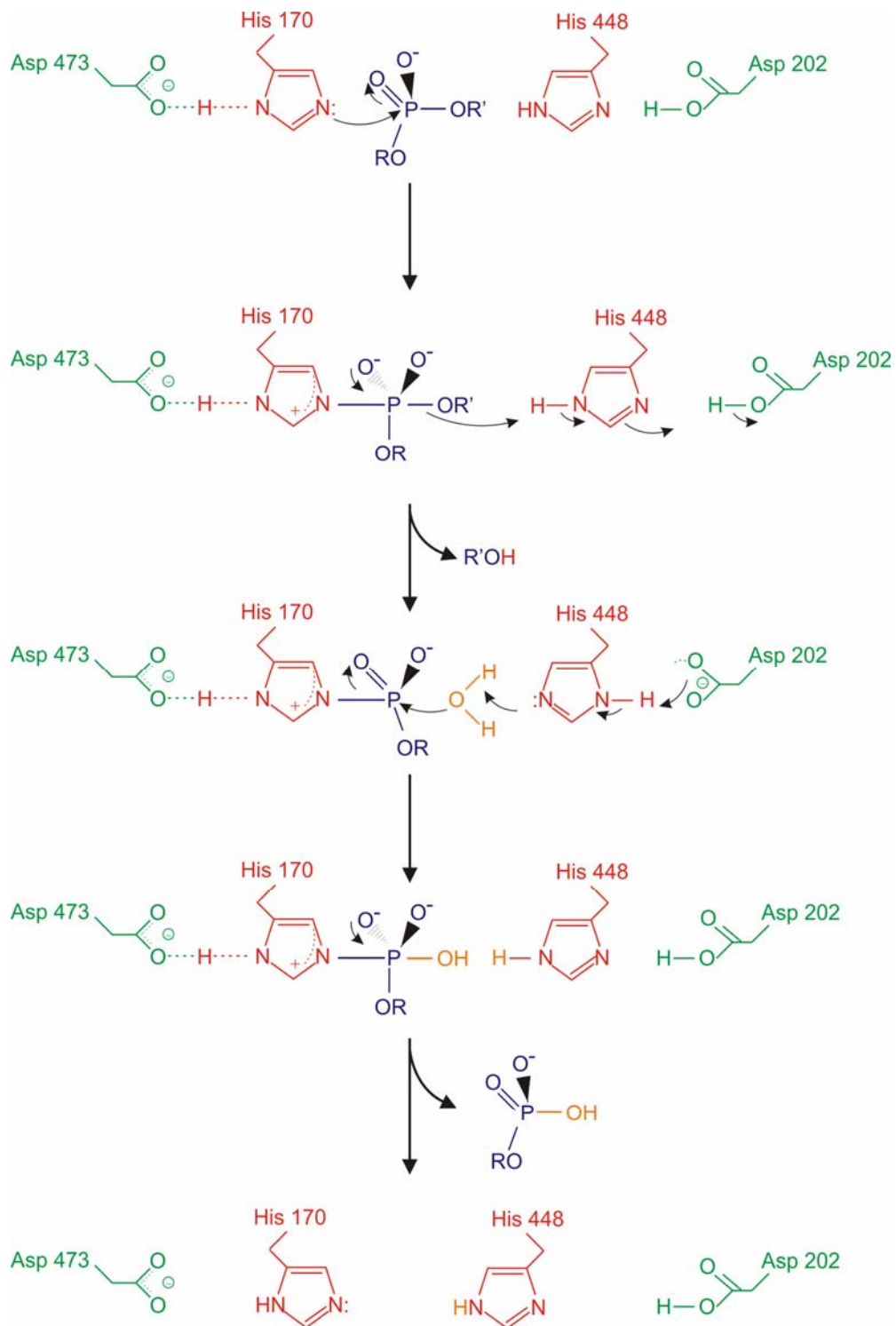
**Abbildung 5: Raumstruktur der PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF (PDB Accession-Nr. 1V0S).** N, N-Terminus; C, C-Terminus; grün,  $\beta$ -Faltblätter; gelb,  $\alpha$ -Helices; rot, Histidin-Reste der HKD-Motive; schwarz, Lysin-Reste der HKD-Motive; blau, Aspartat-Reste (177 und 455) der HKD-Motive und am Katalysemechanismus beteiligte Aspartat-Reste (202 und 473).

Das aktive Zentrum der PLD<sub>PMF</sub> (**Abbildung 6a**) ist ähnlich dem der Endonuclease Nuc (Leiros et al., 2004) aufgebaut. Der größte Unterschied besteht darin, dass die zwei Aspartat-Reste (Asp202 und Asp473), die im aktiven Zentrum der PLD<sub>PMF</sub> starke Wasserstoffbrückenbindungen zu den zwei Histidinen ausbilden, in Endonuclease Nuc als Glutamat-Reste vorliegen. Besonders interessant ist das aktive Zentrum der Phosphat-inhibierten Struktur der PLD<sub>PMF</sub> (**Abbildung 6b**). His170 dreht sich in Anwesenheit von Phosphat in Richtung des „Einganges“ des aktiven Zentrums und überführt dadurch das Seitenketten-Sauerstoffatom des negativ geladenen Asp473 in den ungebundenen Zustand. His170 befindet sich demnach in einer „äußeren“ und wahrscheinlich inaktiven Konformation, während im aktiven Zustand His170 weiter innen lokalisiert ist.



**Abbildung 6: Aktives Zentrum der PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF (Leiros et al., 2004).**  
 a) Nativer Zustand. Zwei Wassermoleküle (OW1 und OW2) besetzen die Bindungsstellen des Phosphatanteils des Substrates b) Phosphat-inhibierte PLD<sub>PMF</sub>.

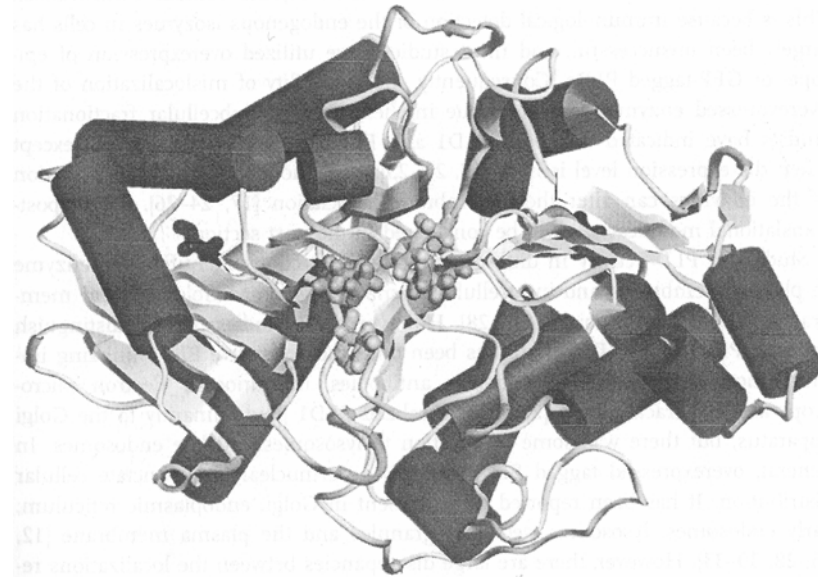
Die seit kurzem vorliegenden Kristallstrukturen der PLD<sub>PMF</sub> mit kurzkettigem Substrat oder Produkt (Leiros et al., 2004) gestatten nähere Einblicke in den Katalysemechanismus. Mit diesen Kristallstrukturen konnte eindeutig bewiesen werden, dass den beiden Histidin-Resten des aktiven Zentrums bei der Katalyse verschiedene Aufgaben zukommen (**Abbildung 7**). Der Imidazol-Stickstoff des N-terminalen His170 greift das Phosphoratom des Phospholipid-Substrates nucleophil an. Diesem nucleophilen Angriff folgt die Bildung eines penta-kordinierten, instabilen Phosphat-Intermediates, bevor das C-terminale His448 als Säure fungiert, die den Sauerstoff des freigesetzten Cholins protoniert. Dies führt zur Bildung eines stabilen tetrahedralen Reaktionsintermediates mit einer kovalenten P-N-Bindung zum His170. His448 ist nun in der Lage, das Wassermolekül zu deprotonieren und Phosphatidsäure freizusetzen.



**Abbildung 7: Reaktionsmechanismus für PLD aus *Streptomyces* sp. Stamm PMF mit Phosphatidylcholin als Substrat (nach: Leiros et al., 2004).** R, Diacylglycerol; R', Cholin.

Leider ist noch keine dreidimensionale Struktur einer pflanzlichen PLD bekannt, obwohl die Kristallisation einer PLD $\alpha$  aus *Vigna unguiculata* gelungen ist (Abergel et al., 2001). Da die pflanzlichen PLDs wesentlich größer als die mikrobiellen PLDs sind und der Grad der Übereinstimmung der Sequenzen gering ist (< 20 %), können diese Ergebnisse der PLD<sub>PMF</sub> nicht ohne weiteres auf die pflanzlichen PLDs übertragen werden, obwohl zu erwarten ist,

dass zumindest der Reaktionsmechanismus prinzipiell gleich verläuft. Diese Erwartung wird gestützt durch eine erst kürzlich veröffentlichte, durch molekulare Modellierung basierend auf der Struktur der PLD<sub>PMF</sub>, abgeleitete Struktur der katalytischen Region der Säuger-PLD1 (Exton, 2004; **Abbildung 8**).



**Abbildung 8: Modellerte katalytische Region der PLD1 (Exton, 2004).** Die Strukturen im Zentrum stellen die Histidin- und Lysin-Reste der HKD-Motive dar.

## 2.6 Zelluläre Funktionen sowie Aktivierungs- und Regulationsmechanismen pflanzlicher PLDs

### 2.6.1 Funktion der pflanzlichen PLDs in zellulären Prozessen

Eine Beteiligung der PLD an Signalwegen von Phytohormonen (Abscisinsäure, Ethylen), beim verletzungsinduzierten Lipidabbau, bei der Pflanzen-Pathogen-Interaktion, bei der Stress-induzierten Membranumgestaltung, bei den Prozessen der Seneszenz und Alterung und der Membranlipid-Umgestaltung sowie der Proliferation in Pflanzen wird diskutiert (Wang, 2000; **Abbildung 9**). Die Funktion der PLD in diesen Prozessen wird nachfolgend im Einzelnen dargestellt.

Durch verschiedene Methoden konnte nachgewiesen werden, dass die PLD $\alpha$  eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung des Abscisinsäure-Signals und der Ausprägung der Wirkung spielt. So kann zum Beispiel die Stimulation der Seneszenz in *Arabidopsis thaliana* infolge von Abscisinsäure-Gabe durch Unterdrückung der Expression des *pld $\alpha$* -Gens vermindert werden (Fan et al., 1997). Es konnte weiterhin durch Nachweis einer erhöhten PLD $\alpha$ -Promotor-Aktivität und mRNA-Menge (Fan et al., 1997; Ryu et al., 1995; Xu et al., 1997) gezeigt werden, dass die Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit Abscisinsäure zu einer

erhöhten PLD $\alpha$ -Genexpression führt, die einen verstärkten Membranabbau, einen niedrigeren Gehalt an Chlorophyll, eine reduzierte Photosyntheseleistung und einen höheren Verlust an Ionen verursacht. Auch bei der Behandlung von Aleuronzellen des Endosperms der Gerste mit Abscisinsäure (Ritchie und Gilroy, 1998) wurde eine erhöhte PLD-Aktivität gemessen. Das macht eine Beteiligung der PLD an der Signalisierung der durch Abscisinsäure regulierten Samenruhe und Samenkeimung wahrscheinlich. Darüber hinaus ist die PLD auch in die Signalkaskade eines zweiten Phytohormons, des Ethylens, einbezogen, das ebenfalls bei der Stressantwort und der Regulation der Seneszenz eine Rolle spielt.

Der erste spezifische zelluläre Prozess, mit dem die PLD in Verbindung gebracht wurde, ist der verletzungsinduzierte Lipidabbau, wie er beispielsweise bei der Zerkleinerung und Homogenisierung von frischem Möhrengewebe (Hanahan und Chaikoff, 1947) beobachtet wurde. Verwundungen und Verletzungen können Pflanzen durch Insektenfraß, Wind- und Frosteinflüsse und Pathogenbefall zugefügt werden. Eine Korrelation zwischen dem PLD-Expressionsmuster und dem Befall von *Oryza sativa*-Blättern mit *Xanthomonas oryzae* weist ebenfalls auf eine Beteiligung der PLD an Pflanzen-Pathogen-Interaktionen hin (Young et al., 1996).

Ein erhöhter Abbau von Membranphospholipiden spielt auch unter Stressbedingungen eine Rolle, wie zum Beispiel nach Exposition mit Kälte, Trockenheit,  $\gamma$ -Strahlung sowie gasförmigen Schadstoffen (z.B. SO<sub>2</sub>) oder in Folge von Nahrungsmangel (Willemot, 1983; Voisine et al., 1993; Wang, 2000).

Da Membranen während der Seneszenz und des Alterns ihre Integrität verlieren und dies mit einer fortschreitenden Abnahme des Membranphospholipidgehaltes und einer korrelierenden Erhöhung des Gehaltes an freien Fettsäuren und Sterolen verbunden ist (Thompson, 1988), wird vermutet, dass der PLD-vermittelte Lipidabbau eine Rolle beim Membranabbau von sich in der Seneszenz befindlichen Geweben und bei Alterungsprozessen von Samen spielt. Diese Annahme wird gestützt durch den Nachweis einer erhöhten PLD-Aktivität und PA-Bildung in Nelkenblüten, Bohnenkotelydonen, Tomatenfrüchten, Kohlblättern und Brokkoliblüten (Thompson, 1988; Voisine et al., 1993; Samama und Pearce, 1993).

Aber auch in jungen, schnell wachsenden Geweben, wie denen des Sprossmeristems, des Hypokotyls und der axialen Zonen der Knospenbildung, wo der Membranamgestaltung und den Proliferationsprozessen eine große Bedeutung zukommt, wurde ein erhöhtes PLD-Aktivitätsniveau beobachtet (Xu et al., 1997). Die Beschleunigung des Zellwachstums und der Proliferation erfolgt vermutlich über die Erzeugung mitoseauslösender Signale und die Synthese von Intermediaten für die Membranlipidsynthese und Membranamgestaltung.

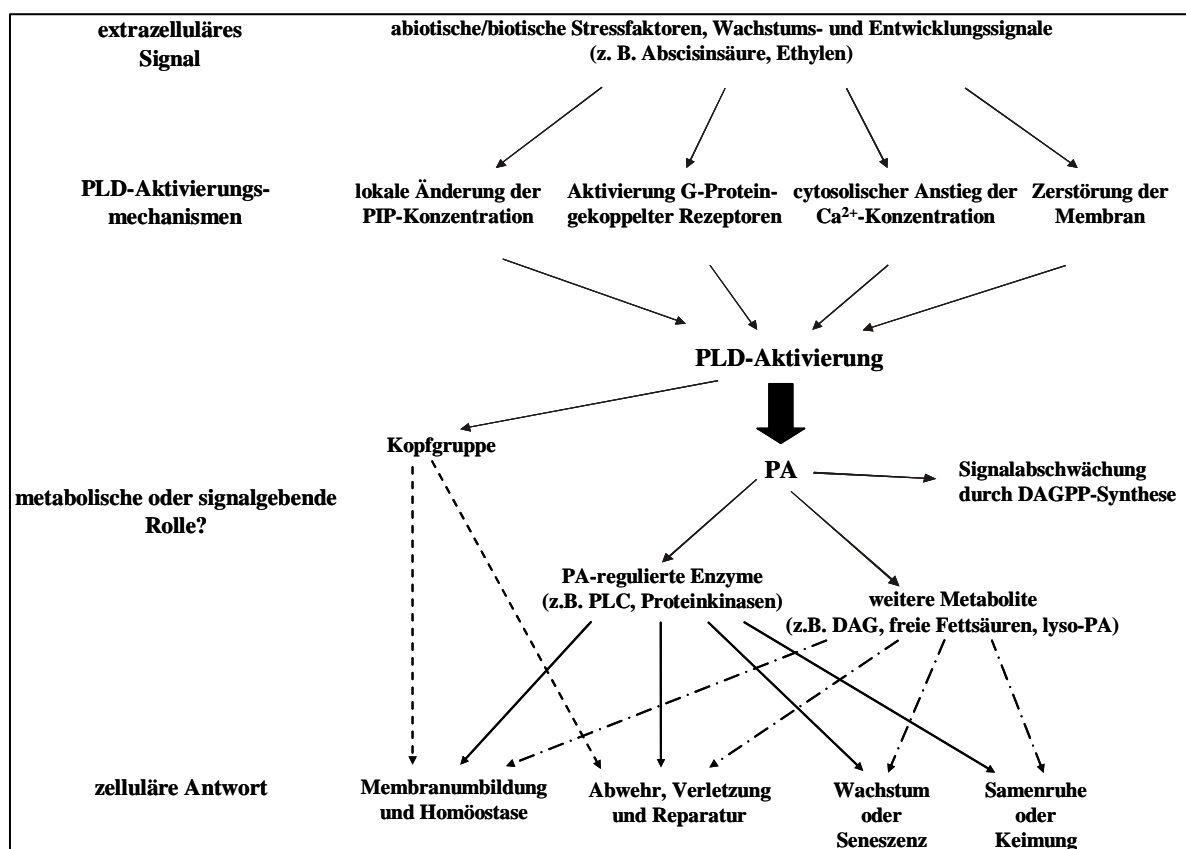


Weiterhin wurde ein erhöhtes PLD-Expressionsniveau in den Verbindungsregionen zwischen Haupt- und Seitenwurzeln und den Streckungs- und Differenzierungszone der Wurzeln beobachtet. Auch hier müssen die Zellen den Änderungen und/oder Schädigungen, die aus Gewebeexpansionen und Zelldifferenzierungen resultieren, gewachsen sein.

Ein weiterer Prozess, der mit einem schnellen Membranumbau und einer Proliferation verbunden ist, stellt die Keimung von Samen sowie das Keimlingswachstum dar.

### 2.6.2 Mögliche Aktivierungsmechanismen der pflanzlichen PLDs

In **Abbildung 9** sind mögliche Aktivierungsmechanismen für pflanzliche PLDs dargestellt, die hier kurz erörtert werden sollen.



**Abbildung 9:** Mögliche Mechanismen der Aktivierung und Rolle pflanzlicher PLD im Metabolismus und im Signalweg (nach: Pappan und Wang, 1999). DAG, Diacylglycerol; DAGPP, Diacylglycerolpyrophosphat; PA, Phosphatidsäure; PIP, Phosphatidylinositphosphat; PLC, Phospholipase C; PLD, Phospholipase D.

Extrazelluläre Signale werden von Membranrezeptoren registriert und über Kaskaden gekoppelter Reaktionen ins Zellinnere weitergeleitet. Die Signalübertragung durch G-Proteine verläuft in enger Assoziation mit der inneren Seite der Zellmembran. Pflanzliche PLDs werden aller Wahrscheinlichkeit nach durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert.

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als einem wichtigen *second messenger* in pflanzlichen Zellen wird eine aktivierende und regulatorische Wirkung auf pflanzliche PLDs zugeschrieben. Die Konzentration des freien  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytosol ist sehr niedrig und liegt bei 100 nM. Im Extrazellulärbereich liegt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dagegen im millimolaren Bereich. An der Regulation sind die folgenden Prozesse beteiligt: die Freisetzung aus  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum über verschiedene membranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sowie der Rücktransport in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. Bei Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle steigt die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf ca. 1  $\mu\text{M}$ . Unter diesen Bedingungen arbeiten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsysteme sehr effizient. Bei einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$ , z.B. infolge einer Zellschädigung, wird ein für die Zelle kritischer Wert erreicht, und  $\text{Ca}^{2+}$  wird mit Hilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern der inneren Mitochondrienmembran in die Mitochondrien eingeschleust.

Ein weiteres wichtiges Regulationselement ist die Phosphatidsäure (PA), die durch PLD-katalysierte Hydrolyse gebildet wird und metabolisch instabil ist, da sie der Cytidindiphosphodiacylglycerol-Synthase als Substrat für die Herstellung von Cytidindiphosphodiacylglycerol (CDP-DAG) dient. CDP-DAG ist ein wichtiger Ausgangsstoff für die Synthese der sauren Phospholipide (Kent, 1995). Die dafür benötigten Kopfgruppen werden entweder neu synthetisiert, oder es wird die bei der PLD-katalysierten Hydrolyse freigesetzte Kopfgruppe wiederverwendet. Die PLD-katalysierte Transphosphatidylierung konnte bisher in Pflanzen nicht direkt nachgewiesen werden. Die regulatorische Wirkung von PA in Pflanzenzellen beruht zum einen darauf, dass PA in Membranen bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bevorzugt hexagonale Phasen bildet (Cullis et al., 1986), deren Einlagerung in intakte Membranen eine Destabilisierung der Bilayerstruktur bewirkt und zu einer Erhöhung der negativen Ladung führt, in deren Folge noch mehr  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen eindringen kann. Zum anderen kann durch Dephosphorylierung mit Hilfe einer Phosphohydrolase Diacylglycerol (DAG) aus PA gebildet werden. DAG ist ein wichtiger *second messenger*, der primär über die Stimulierung der Proteinkinase C wirkt. Durch die  $\text{PLA}_2$  kann PA des Weiteren zu Lysophospholipiden und freien Fettsäuren umgesetzt werden, die anschließend über den Octadecanoid-Weg zu biologisch aktiven Molekülen, wie z.B. Jasmonsäure, metabolisiert werden (Munnik et al., 1998). Jasmonsäure und ihre Methylester sind hormonähnliche Signalsubstanzen, die unter anderem wie auch die Abscisinsäure die Seneszenz auslösen.

Weiterhin aktiviert das durch die PLD-katalysierte Hydrolyse freigesetzte PA auch die Phosphatidylinositol-5-phosphat-Kinase, die PKC sowie die PLC, die von besonderer

regulatorischer Bedeutung für die Spaltung von Inosit-haltigen Phospholipiden ist und die Freisetzung von DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) katalysiert. PIP<sub>2</sub> wird aus Phosphatidylinositol (PI) durch die Phosphorylierung des Inosit-Restes in 4' und 5'-Stellung mittels spezifischer Kinasen gebildet. PIP<sub>2</sub> kann auch durch die Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat-Kinase weiter zu Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat, einem membranständigen Botenstoff, phosphoryliert werden. Die beiden *second messenger* IP<sub>3</sub> und DAG lösen weitere spezifische Reaktionsketten aus. IP<sub>3</sub> aktiviert die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>, während DAG, wie bereits oben erwähnt, primär über die Stimulierung der PKC wirkt. Aus DAG kann durch die Diacylglycerolkinase wiederum PA gebildet werden. Durch die Bildung von Diacylglycerolpyrophosphat infolge der Phosphorylierung von PA kommt es hingegen zu einer Abschwächung der Signalgebung (Munnik et al., 1998).

### 3 Materialien

#### 3.1 Chemikalien

Acrylamid	Applichem GmbH, Darmstadt
Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Agarose	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Ammoniumsulfat	Applichem GmbH, Darmstadt
Ampicillin, Natriumsalz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
L-Arabinose	Applichem GmbH, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Merck Biosciences, Darmstadt
Caseinhydrolysat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Merck Biosciences, Darmstadt
Coomassie-Brillant-Blau G 250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
dNTP-Mix	Thermo Hybaid GmbH, Ulm
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
D-Glucose	Applichem GmbH, Darmstadt
Glycerin (87 %, 100 %)	Merck Biosciences, Darmstadt
Glycin	Applichem GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
n-Hexan (>99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Kanamycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Kupfersulfat (Pentahydrat)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Milchpulver	Oxoid Ltd., Basingstoke (England)
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Octanol (97 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Octyl-Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Phenyl-Sepharose 6 Fast flow	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Phosphatidyl-p-nitrophenol	synthetisiert von Dr. R. Schöps, MLU Halle-Wittenberg

Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Q-Sepharose Fast flow	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Regenbogenmarker	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Rinderserumalbumin	Pierce, Rockford (USA)
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Applichem GmbH, Darmstadt
Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

### 3.2 Enzyme

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme <i>Ban I</i> , <i>Ban II</i> , <i>Bgl II</i> , <i>BspM I</i> , <i>BstAP I</i> , <i>BstB I</i> , <i>Fsp I</i> , <i>Nco I</i> , <i>Nde I</i> , <i>Nsi I</i> , <i>Hind III</i> , <i>Sal I</i> , <i>Sap I</i> , <i>Sfc I</i> , <i>SnaB I</i> , <i>Tfi I</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNaseOUT™ (40 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Shrimp alkalische Phosphatase (1 U/μl)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
SuperScript™III RT (200 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
T4-DNA-Ligase (200 U/μl; 1 WeissU/μl)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 3.3 Antikörper

Anti-Kohl-PLD2-Antikörper aus Kaninchen	Comenius-Universität Bratislava (Dr. J. Rajcani)
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Esel	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

### 3.4 Phospholipide

Soja-Phosphatidsäure	Lipoid GmbH, Ludwigshafen
Soja-Phosphatidylcholin	Lipoid GmbH, Ludwigshafen
Soja-Phosphatidylglycerol	Lipoid GmbH, Ludwigshafen

### 3.5 Kits

ECL-Plus Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford (USA)
PolyATtract® System 1000	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
PUREGENE® DNA Isolation Kit	Gentra Systems, Minneapolis (USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)
QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)
SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 3.6 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. In den nachfolgend aufgeführten Oligonucleotiden sind die zur Ausgangssequenz veränderten Basen gelb markiert, die dabei eingeführten Restriktionsschnittstellen unterstrichen bzw. die entfernten Restriktionsschnittstellen durch Streichung des entsprechenden Restriktionsenzym dargestellt. Blau gekennzeichnet sind die Plasmide, die in Abweichung zum Wildtyp-Plasmid als Template für die Mutagenese-PCR eingesetzt wurden. Bei den Oligonucleotiden für das QuikChange-Mutagenese-Verfahren wurde nur der *forward*-Primer angegeben. Der *reverse*-Primer ist entsprechend revers komplementär.

#### Primer für die Sequenzbestimmung der Mohn-PLD-Isoenzyme

<b>Start Mohn PLDfw</b>	5´-ATG GCT CAG ATT YYT CTC CAY GGA ACT CTC CA-3´
<b>MohngF3-1rv</b>	5´-ATT AGT AGA GAG AAA GAA GGA TAG AAC-3´
<b>MohngF3-2rv</b>	5´-GAG AAA GAA GGA TAT AAG TAC ATA ACC-3´
<b>MohnPLD2F2rv</b>	5´-CGT ACA TCA TGT CCC AAG TCC-3´

### Primer für die Klonierung der Mohn-PLD-Isoenzyme

#### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

**ΔncoI mohnfw** 5'-GAT TCT GAA ATT GCA ATG GGA GGT TAC-3'

**Δ2ncoI mohnfw** 5'-CAG ATT TCT CTC CAC GGA ACT CTA CAT G-3'

**ΔhindIII mohnfw** 5'-GTT CTT TAG GAA ACT TGT GGA AAA C-3'

#### PCR-Verfahren

**mohn ncofw** 5'-CCG CGA ATT CGT CCC CAT GGC TCA GAT TT-3'

**mohn1hindrv** 5'-AGA GAG AAA GAA GGA AGC TTA CTA TGT TGT GAG AAT AGG-3'

**mohn2hindrv** 5'-AAG AAG GAT ATA AGT AAG CTT ACT ATG TAG TGA GAA TTG-3'

### Primer für die Klonierung der Kohl-PLD2

#### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

**Δncopl2fw** 5'-CTC GTG GCC AGG TTC ATG GGT TCC GTA T-3'

**mutncofw** 5'-GAA GGA GAT ATA CCC ATG GCC CAG CA-3'

**mutxbafw** 5'-CCT TAC AAC TTA ATA GAA TCT AGA ACC GGC TGC TAA  
CAA AG-3'

#### PCR-Verfahren

**pTWIN1 fw** 5'-GTT TAA CTT TAA GAA GGC TCT TCC AAC ATG GC-3'

**pTWIN1 rv** 5'-GCG CAG GAA GAG CTC TAT TAA GTT GTA AGG ATT G-3'

### Primer für die Mutagenese der Kohl-PLD2

#### Enzymvarianten in den katalytischen Motiven

#### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

##### T264Dfw

5'-CTT AAA AAG AAA GCT GAC GAA GGC GTT AG-3'

##### H333Dfw

5'-GCC ATG TTC ACG CAT GAT CAG AAG ATC GTA GTT G-3'

##### K335Rfw

*Sfc I* (G/TRYAG)

5'-GTT CAC GCA CCA CCA ACG TAT AGT AGT TGT GGA CAG C-3'

##### D340Efw

*Tfi I* (G/AWTC)

5'-GAA GAT CGT AGT TGT GGA ATC CGA GGT GCC GAG CCA-3'

##### Q334Sfw

*Bst BI* (TT/CGAA)

5'-CCA TGT TCA CGC ACC ATT CGA AGA TCG TAG TTG TGG AC-3'

##### V339TE342AV343Mfw

*Ban I* (G/GYRCC)

5'-AGA AGA TCG TAG TTA CTG ACA GCG CGA TGC CGA GCC AAG-3'

**H663Dfw***Sal I* (G/TCGAC)5´-CTT CAT GAT CTA CGT CGA CAG CAA AAT GAT GAT TG-3´**ZM K665R/S664Hfw***Bst BI* (TT/CGAA)5´-CAT GAT CTA CGT CCA TTC GAA AAT GAT GAT TGT TGA C-3´**K665Rfw (ZM K665R/S664H)**~~*Bst BI*~~ (TT/CGAA)5´-GAT CTA CGT CCA TTC GCG CAT GAT GAT TGT TGA CG-3´**S664Hfw (ZM K665R/S664H)**~~*Bst BI*~~ (TT/CGAA)5´-CAT GAT CTA CGT CCA CCA CAA AAT GAT GAT TGT TGA C-3´**D670Efw**5´-TGA TGA TTG TTG AGG ATG AGT ACA TTA TC-3´

## C-terminale Enzymvarianten

**QuikChange-Mutagenese-Verfahren****Δ 812pRSET5afw***Sna BI* (TAC/GTA)5´-CCT GCC TCC AAT CCT TAC GTA GTA ATA GAA GCT TGA TCC GGC-3´**Δ 812pET-28b(+)**fw*****Sna BI* (TAC/GTA)5´-CCT CCA ATC CTT ACG TAG TAA TAG AAG CTT GC-3´**Δ 808-812fw**~~*Bsp MI*~~ (ACCTGCNNNN/)5´-GAA ACA AAG TAG ACT ACC TCC CT TAAA TCC TTA CAA CTT AAT AGA A-3´**Δ 804-812fw**~~*Bsp MI*~~ (ACCTGCNNNN/)5´-CGT ATC CTC GGA AAC AAA GTA TAA TTC CTG CCT CCA ATC CTT AC-3´**Δ 801-812fw**5´-CGT ATC CTC GGA TAA CAA AGT AGA CTA C-3´**T812Afw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-GCC TCC AAT CCT TAC AGC GTA ATA GAA GCT TGA TCC-3´**T812Cfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GTG CTA ATA GAA GCT TGA T-3´**T812Dfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-ATC CTT ACG GAT TAA TAG AAG CT-3´**T812Ffw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-GCC TCC AAT CCT TAC ATT CTA ATA GAA GCT TGA TCC-3´**T812Gfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GGG CTA ATA GAA GCT TGA T-3´**T812Kfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GAA ATA ATA GAA GCT TGA T-3´**T812Nfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GAA CTA ATA GAA GCT TGA T-3´



**T812Rfw ( $\Delta$  812)**~~Sna-*BI*~~ (TAC/GTA)

5'-TCC AAT CCT TAC GCG TTA ATA GAA GCT TGA T-3'

**T812Sfw ( $\Delta$  812)**~~Sna-*BI*~~ (TAC/GTA)

5'-GCC TCC AAT CCT TAC ATC TTA ATA GAA GCT TGA TCC-3'

**T812Vfw ( $\Delta$  812)**~~Sna-*BI*~~ (TAC/GTA)

5'-TCC AAT CCT TAC GGT GTA ATA GAA GCT TGA T-3'

**T812Yfw ( $\Delta$  812)**~~Sna-*BI*~~ (TAC/GTA)

5'-GCC TCC AAT CCT TAC ATA CTA ATA GAA GCT TGA TCC-3'

**PLD2+SpRSET5afw**~~Hind-*III*~~ (A/AGCTT)

5'-CAA TCC TTA CAA CTT CTT AGC AGC TTG ATC CGG C-3'

**PLD2+SpET-28b(+)*fw***~~Hind-*III*~~ (A/AGCTT)

5'-CAA TCC TTA CAA CTT CTT AGC AGC TTG CGG CGG-3'

## Cystein-Enzymvarianten

**QuikChange-Mutagenese-Verfahren****C181Sfw***Ban II* (GRGCY/C)

5'-GAG ACA GGG CTC CAA AGT TTC TTT-3'

**ZM C307S/C310Sfw***Bst API* (GCANNNN/NTGC)

5'-TAG CGA AGT GCA TTC TGT GCT GT C TCC ACG TAA CCC T-3'

**C307Sfw (ZM C307S/C310S)**~~*Bst API*~~ (GCANNNN/NTGC)

5'-GAA GTG CAT TCT GTG TTG TGT CCA CGT AAC CCT-3'

**C310Sfw (ZM C307S/C310S)**~~*Bst API*~~ (GCANNNN/NTGC)

5'-GCG AAG TGC ATT GTG TGT TGT CTC CAC GTA AC-3'

**C741Sfw**~~*Nsi I*~~ (ATGCA/T)

5'-CTC GAG CTT GGA ATC CAT TGA GAA AGT TA-3'

**MultiQuikChange-Mutagenese-Verfahren****C85S***Fsp I* (TGC/GCA)

5'-P-CCT TCC ACA TCT ACT CTG CGC ACA TGG CTT CAG-3'

**C212S***Bgl II* (A/GATCT)

5'-P-CTC ACA GAT CTT GGG AGG ATA TT-3'

**C365S**

5'-P-GTA TTG ATC TCT CCG ACG GAC GTT-3'

**C625S**

5'-P-GAC GTT CTT CTC CCT TGG AAA C-3'

Enzymvariante V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V

### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

**V339T/E342A/V343Mfw** *Bam*<sup>I</sup> (G/GYRCC)

5´-AGA AGA TCG TAG TTA CTG ACA GCG CGA TGC CGA GCC AAG-3´

**Δ351/352fw (V339T/E342A/V343M)**

5´-CCA AGG AGG AGG GTC GAG GAG GAT CAT GAG C-3´

**Q346E/G348S/G349Q/S350Q/M356Vfw (V339T/E342A/V343M/Δ351/Δ352)**

5´-GAG GTG CCG AGC GAA GGA AGC CAA CAG AGG AGG ATC GTG AGC TTT GTC  
GGA-3´

### Sequenzierungsprimer

**M13fw** 5´-IRD800-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3´

**M13rv** 5´-IRD800-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3´

**T7promotor** 5´-IRD800-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3´

**T7terminator** 5´-IRD800-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3´

**pBAD22fwseq** 5´-IRD800-CTG TTT CTC CAT ACC CGT T-3´

**pBAD22rvseq** 5´-IRD800-GGC TGA AAA TCT TCT CT-3´

**SspDnaBinteinfw** 5´-IRD800-ACT GGG ACT CCA TCG TTT CT-3´

**MxeInteinrv** 5´-IRD800-GGC ACG ATG TCG GCG ATG-3´

**PLD2midfw** 5´-IRD800-GTT CAG GAC GTT GGA CAC-3´

**Sonde2rv** 5´-IRD800-TTA CCA CCY TGC TTT CTC CAT CTC TGC TC-3´

**Mohnseqfw** 5´-IRD800-CAA CTT GAG AGA GCT TTC TGA-3´

**Mohnseqrv** 5´-IRD800-TGC GGT CGA TGA TGT TGT C-3´

### 3.7 Plasmide

pBAD22 Amp<sup>r</sup>, Beckwith Lab., Boston (USA)

pCR4-TOPO Kan<sup>r</sup>, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pET-28b(+) Kan<sup>r</sup>, Merck Biosciences, Darmstadt

Kohl*pld2*pRSET5a Amp<sup>r</sup>, Dr. I. Schäffner (Schäffner et al., 2002)

pUBS520 Kan<sup>r</sup>, Dr. I. Schäffner (Schäffner et al., 2002)

pTWIN I Amp<sup>r</sup>, New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)

### 3.8 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Merck Biosciences)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> ER 2566 (NEB)	F <sup>-</sup> $\lambda$ <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ:: T7 gene 1 gal sulA11 <math>\Delta</math>(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) (Merck Biosciences)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1</i> (DE3) <i>pRARE</i> (Cm <sup>R</sup> )
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS (Merck Biosciences)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1</i> (DE3) <i>pLysSRARE</i> (Cm <sup>R</sup> )
<i>E. coli</i> TOP 10 (Invitrogen)	F <sup>-</sup> <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80 lacZ <math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 deoR araD139 <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galU galK rpsL (str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (tet<sup>R</sup>)]</i>
<i>E. coli</i> XL10-Gold ultrakompetent (Stratagene)	Tet <sup>R</sup> <i><math>\Delta</math>(mcrA)183 <math>\Delta</math>(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (tet<sup>R</sup>) Amy Cm<sup>R</sup>]</i>

### 3.9 Kulturmedien

#### Luria Bertani (LB)-Flüssigmedium:

LB-Flüssigmedium enthält pro Liter 10 g NaCl, 10 g Trypton und 5 g Hefeextrakt.

#### 2 × YeastTrypton (2 × YT)-Flüssigmedium:

2 × YT-Flüssigmedium enthält pro Liter 10 g NaCl, 20 g Trypton und 10 g Hefeextrakt.

#### LB-Agarplatten:

LB-Agarplatten bestehen aus LB-Flüssigmedium, dem 20 g Agar pro Liter zugesetzt wurde.

Den Medien wurden die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (Ampicillin 50 bis 100 µg/ml [Amp], Choramphenicol 25 µg/ml [Cm], Kanamycin 10 bis 50 µg/ml [Kan]).

SOC-Medium:

SOC-Medium enthält pro Liter 10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung und 20 ml 20% (w/v) Glucoselösung.

**3.10 Pflanzenmaterialien**

Die Schlafmohnsamen der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky wurden von Dr. L. Bezakova (Pharmazeutische Fakultät der Comenius-Universität Bratislava) zur Verfügung gestellt.

## 4 Methoden

### 4.1 Keimung der Schlafmohnsamen

In einer Petrischale wurden Samen der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky auf zuvor mit Leitungswasser angefeuchtetem Filterpapier zur Keimung gebracht. Die Petrischalen wurden 4 Tage bei 25°C im Dunkeln aufbewahrt. Die 4 Tage alten Keimlinge wurden mit einer Pinzette vom Endosperm separiert und als Ausgangsmaterial für die Isolierung der genomischen DNA sowie der Gesamt-RNA/mRNA verwendet.

### 4.2 Präparation von Nucleinsäuren

#### 4.2.1 Isolierung von mRNA aus Schlafmohn

Die Isolierung der mRNA erfolgte direkt aus 4 Tage alten Keimlingen mit dem PolyATtract® System 1000. Dazu wurden 100 mg 4 Tage alte Schlafmohnkeimlinge der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky mittels Mörser und Pistill mit wenig Seesand und flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das dabei entstandene Gewebepulver wurde nach Anleitung des Kit-Herstellers weiter aufgearbeitet. Die mRNA wurde mit 800 µl RNase-freiem Wasser eluiert und nachfolgend durch Ethanolpräzipitation konzentriert (4.2.3).

#### 4.2.2 DNA-Präparation

##### 4.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schlafmohn

Für die Isolierung der genomischen DNA wurden 1000 mg 4 Tage alte Schlafmohnkeimlinge der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky als Ausgangsmaterial mittels Mörser und Pistill, Seesand sowie flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die Isolierung erfolgte mit dem PUREGENE® DNA Isolation Kit nach Anleitung des Herstellers.

##### 4.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmide aus der Bakterienkultur erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Anleitung des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde 2 × mit 40 µl Puffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

#### **4.2.2.3 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel**

Zur Isolierung der DNA wurde diese mit einem Skalpell aus dem Agarosegel (4.2.5) ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Agarosegelstück nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die DNA wurde  $2 \times$  mit  $30 \mu\text{l}$  Puffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

#### **4.2.3 Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren**

Zur Nucleinsäureprobe wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatpuffer, pH 5,2, zugegeben, gut gemischt und mit dem 2,5-fachen Volumen 100 %igem Ethanol gefällt. Der Fällungsansatz wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  (RNA) oder Raumtemperatur (DNA) 10 min bis 2 h (in Abhängigkeit von der Menge der zu fällenden Nucleinsäure) inkubiert und anschließend zentrifugiert. Durch nachfolgendes Waschen mit einem Volumen 70 %igem Ethanol wurde das mitgefällte Salz größtenteils entfernt. Das Nucleinsäurepellet wurde 2 min an der Luft (RNA) bzw. unter Vakuum (SpeedVac-Savant; LifeScience-International GmbH, Frankfurt am Main; DNA) getrocknet und entsprechend dem weiteren Verwendungszweck im jeweiligen Puffer gelöst.

#### **4.2.4 Konzentrations- und Größenbestimmung von Nucleinsäuren**

##### **4.2.4.1 Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren**

Die Konzentration von Nucleinsäurelösungen ( $>25 \mu\text{g/ml}$ ) wurde photometrisch in einem Ultrospec 3000 Spektrophotometer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Ein Absorptionswert  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  von 1 entspricht  $50 \mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA,  $40 \mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA und  $33 \mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger RNA (Sambrook et al., 2001). Die Reinheit der Nucleinsäurelösung wurde durch Bestimmung des Verhältnisses  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ -Wert geprüft. Geringere Konzentrationen können im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel anhand des Molekulargewichtsmarkers abgeschätzt werden.

##### **4.2.4.2 Größenbestimmung der Nucleinsäuren**

Die Größenbestimmung der Nucleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards (Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter) im Agarosegel (4.2.5).

#### 4.2.5 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 0,5 bis 2 % ige (w/v) Gele verwendet. Den DNA-Lösungen wurde Probenpuffer zugegeben (10 × DNA-Probenpuffer: 50 % [v/v] 20 × TAE, 49,75 % [v/v] Glycerin, 0,25 % [w/v] Bromphenolblau). Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm Elektrodenabstand mit TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA in einer Ethidiumbromidlösung (1,5 µg/ml in TAE) angefärbt und nach Spülen mit Wasser mittels UV-Licht ausgewertet.

#### 4.3 cDNA-Synthese

1 µl genspezifischer cDNA-Synthese-Primer (2 pmol; MohnG3-1rv für *pld1* bzw. MohnG3-2rv für *pld2*; 3.6), 11 µl mRNA (bis zu 500 ng) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) wurden zur Auflösung von Sekundärstrukturen 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden folgende Reagenzien in angegebener Reihenfolge zupipettiert: 4 µl 5 × Erst-Strang-Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl) und 2 µl SuperScript™III RT (200 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 55°C inkubiert und anschließend durch 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Für die nachfolgende Amplifizierung mittels PCR war es erforderlich, die zur cDNA komplementäre mRNA durch RNase H zu entfernen. Dazu wurden dem inaktivierten cDNA-Synthese-Ansatz 1 µl (2 U) *E. coli* RNase H-Lösung zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert.

#### 4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung des unbekanntes Sequenzbereiches der cDNA bzw. der genomischen DNA und zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für nachfolgende Klonierungen wurde die Polymerasekettenreaktion angewendet.

1. PCR-Ansatz zur Bestimmung der Nucleotidsequenz der mRNA (jeweils 50 µl-Ansatz pro Isoenzym):

- 5 µl 10 × *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Start Mohn PLDfw (10 pmol)
- 1 µl MohnG3-1rv bzw. MohnG3-2rv (jeweils 10 pmol)
- 2 µl cDNA (cDNA der Mohn-*pld1* bzw. der Mohn-*pld2*; 4.3)
- 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase
- 39 µl steriles, deionisiertes Wasser

2. PCR-Ansatz zur Bestimmung der Nucleotidsequenz der genomischen DNA ( $8 \times 50 \mu\text{l}$ -Ansätze für Gradienten-PCR):

5  $\mu\text{l}$   $10 \times$  *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer  
 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10 mM)  
 1  $\mu\text{l}$  Start Mohn PLDfw (10 pmol)  
 1  $\mu\text{l}$  MohnPLD2F2rv (10 pmol)  
 0,5  $\mu\text{l}$  genomische DNA (2,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 4.2.2.1)  
 1  $\mu\text{l}$  *Pfu*-DNA-Polymerase  
 40,5  $\mu\text{l}$  steriles, deionisiertes Wasser

Cycle-Profil für 1. und 2. PCR-Ansatz:	Denaturierung	95°C	3 min	} 40 Zyklen
	Denaturierung	95°C	1 min	
	<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Pause	4°C		

Die Gradienten-PCR wurde bei folgenden *Annealing*-Temperaturen durchgeführt: 50,0°C, 51,3°C, 53,5°C, 56,6°C, 61,2°C, 64,5°C, 66,7°C und 68,0°C. Zur Auswertung der PCRs wurde jeweils 1/10 des Volumens des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

3. PCR-Ansatz zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung von *Mohnpld1* sowie *Mohnpld2* in den Vektor pET-28b(+) (50  $\mu\text{l}$ -Ansatz):

5  $\mu\text{l}$   $10 \times$  *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer  
 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10 mM)  
 1  $\mu\text{l}$  mohn ncofw (10 pmol)  
 1  $\mu\text{l}$  mohn1hindrv bzw. mohn2hindrv (jeweils 10 pmol)  
 1  $\mu\text{l}$  *pld1*pCR4-TOPO bzw. *pld2*pCR4-TOPO ( $\Delta\text{ncoI}/\Delta\text{2ncoI}/\Delta\text{hindIII}$ ; 40 ng)  
 1  $\mu\text{l}$  *Pfu*-DNA-Polymerase  
 40  $\mu\text{l}$  steriles, deionisiertes Wasser



<i>Cycle-Profil:</i>	Denaturierung	95°C	3 min	
	Denaturierung	92°C	1 min	} 30 Zyklen
	<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Pause	4°C		

4. PCR-Ansatz zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung von *Kohlpld2* in den pTWIN1-Vektor (50 µl-Ansatz):

5 µl 10 × *Taq*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer  
 2,5 µl dNTP-Mix (10 mM)  
 1 µl pTWIN1fw (50 pmol)  
 1 µl pTWIN1rv (50 pmol)  
 1 µl *Kohlpld2*pRSET5a (3.7; 40 ng)  
 1 µl *Taq*-DNA-Polymerase  
 38,5 µl steriles, deionisiertes Wasser

<i>Cycle-Profil:</i>	Denaturierung	95°C	3 min	
	Denaturierung	92°C	1 min	} 30 Zyklen
	<i>Annealing</i>	45°C	1 min	
	Synthese	72°C	5 min	
	Synthese	72°C	5 min	
	Pause	4°C		

#### 4.5 Subklonierung von PCR-Produkten in den pCR4-TOPO-Vektor

Um die bei der Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase entstandenen PCR-Produkte in den pCR4-TOPO-Vektor ligieren zu können, war das Anfügen von 3'-A-Überhängen an die glatten DNA-Enden durch *Taq*-DNA-Polymerase notwendig. Ein typischer *Taq*-Reaktionsansatz (10 µl) enthielt: 5 µl gereinigtes PCR-Produkt, 3 µl steriles, deionisiertes Wasser, 1 µl 10 × *Taq*-Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTPs (10 mM) und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase. Nach einer 15-minütigen Reaktion bei 72°C erfolgte die Subklonierung dieser modifizierten PCR-Produkte in den pCR4-TOPO-Vektor mit dem TOPO TA Cloning Kit for Sequencing nach den Angaben des Herstellers.

## 4.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese ermöglicht den gezielten Austausch, die gezielte Einführung (Insertion), oder die Entfernung (Deletion) von Aminosäuren. Es werden zwei Primer (Oligonucleotide; 3.6) benötigt, ein *forward*-Primer und ein *reverse*-Primer, die beide die gewünschte Mutation enthalten. Zur Erleichterung des Screenings ist es von Vorteil, in die proteincodierende DNA-Sequenz eine Restriktionsschnittstelle einzufügen bzw. eine vorhandene zu entfernen.

### 4.6.1 QuikChange-Mutagenese

Der QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit wurde für die ortsgerichtete Mutagenese einzelner bzw. benachbarter Aminosäuren verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Mutagenese-PCR mit dem Primerpaar 5'-GAG GTG CCG AGC GAA GGA AGC CAA CAG AGG AGG ATC GTG AGC TTT GTC GGA-3' (Primerbezeichnung Q346E/G348S/G349Q/S350Q/M356V) wurde aufgrund der Länge der Primer das Protokoll für eine Zwei-Stufen-PCR von Wang et al. (1999) verwendet.

### 4.6.2 MultiQuikChange-Mutagenese

Um den gleichzeitigen Austausch zweier nicht unmittelbar benachbarter Aminosäuren zu ermöglichen, wurde die Mutagenese nach Angaben des Herstellers mit dem QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt.

## 4.7 Verdau mittels Restriktionsendonucleasen

Der Restriktionsverdau wurde zum einen für die Analyse der nach Subklonierung, Klonierung sowie Mutagenese erhaltenen Kolonien und zum anderen für Insert- sowie Vektorpräparationen in Vorbereitung der Klonierung verwendet. In einem 10 µl Ansatz (1 µl 10 × Reaktionspuffer; 0,2 bis 1 µg Plasmid; 1 bis 10 U Restriktionsenzym; 0,1 µl BSA [100 µg/ml], Zugabe abhängig vom Enzym) wurden die aus den Kolonien isolierten Plasmide (4.2.2.2) mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen 1 bis 2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur verdaut und agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Die Insert- und Vektorpräparationen wurden in einem 100 µl-Ansatz (10 µl 10 × Reaktionspuffer; 10 bis 40 µg PCR-Produkt, Plasmid bzw. Leervektor; 30 bis 60 U Restriktionsenzym; 10 µl BSA [100 µg/ml], bei *Xba I* erforderlich) mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen 12 bis 20 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme durch 20-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die Fragmente

wurden mittels Agarosegel getrennt und die gewünschten Fragmente, das *pld*-Gen sowie der linearisierte Vektor aus dem Gel isoliert (4.2.2.3).

#### **4.8 Dephosphorylierung**

Um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, wurde die mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen verdaute Vektor-DNA an den 5'-Enden durch eine einstündige Inkubation mit Shrimp alkalischer Phosphatase (1 U für 100 µl-Ansatz) bei 37°C dephosphoryliert. Durch eine nachfolgende 20-minütige Inkubation bei 65°C erfolgte die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase.

#### **4.9 Ligation**

Die Ligation des *pld*-Gens in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor erfolgte in einem 20 µl-Ansatz (2 µl 10 × Reaktionspuffer; 2,5 mM ATP; 2 U [Weiss] T4-DNA-Ligase; 100 ng Insert und Vektor im molaren Verhältnis 5: 1) für 2 Stunden bei 25°C. Der gesamte Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert.

#### **4.10 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli***

##### **4.10.1 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen**

100 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue; ER 2566) wurden mit der zu transformierenden DNA (20 µl-Ligationsansatz oder 4 ng Plasmid-DNA) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 40 Sekunden bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert und 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden diese 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einem selektiven Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

##### **4.10.2 Transformation in elektrokompente *E. coli*-Zellen**

50 µl elektrokompente *E. coli*-Zellen (BL21(DE3); Rosetta(DE3); Rosetta(DE3)pLysS; XL1-Blue) wurden mit 4 ng Plasmid-DNA gemischt. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation im Gene Pulser II (BioRad, München). Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf einem selektiven Medium ausplattiert sowie über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.11 Anzucht der *E. coli*-Stämme zur Plasmidpräparation

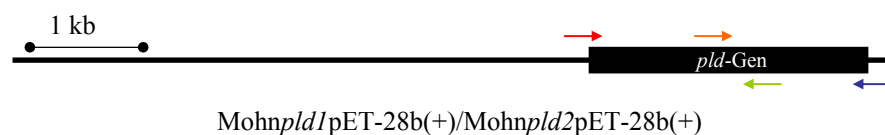
5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Amp bzw. Kan) wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte (mit Antibiotikum) beimpft und für 12 h bei 37°C, 180 rpm inkubiert.

#### 4.12 Sequenzierung von Plasmiden

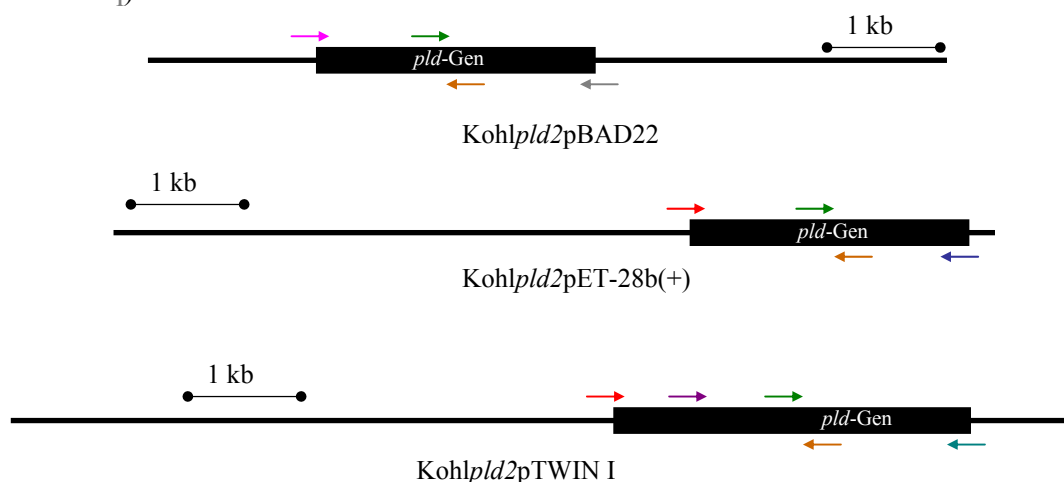
Die Sequenzierung erfolgte mit dem SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC nach dem Didesoxy-Verfahren (Sanger et al., 1977) unter Verwendung eines Li-Cor DNA Sequencer 4000 (MWG Biotech, Ebersberg). Für die Sequenzierungsreaktionen wurden jeweils 200 fmol Plasmid-DNA sowie am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markierte Primer (2 pmol/μl; Sequenzierungsprimer 3.6) genutzt.

Zur Bestimmung der Nucleotidsequenzen der in den pCR4-TOPO-Vektor subklonierten Mohn-PLD-Fragmente der genomischen DNA bzw. der cDNA wurden mindestens 5 Plasmide pro Fragment mit den Sequenzierungsprimern M13fw sowie M13rv sequenziert.

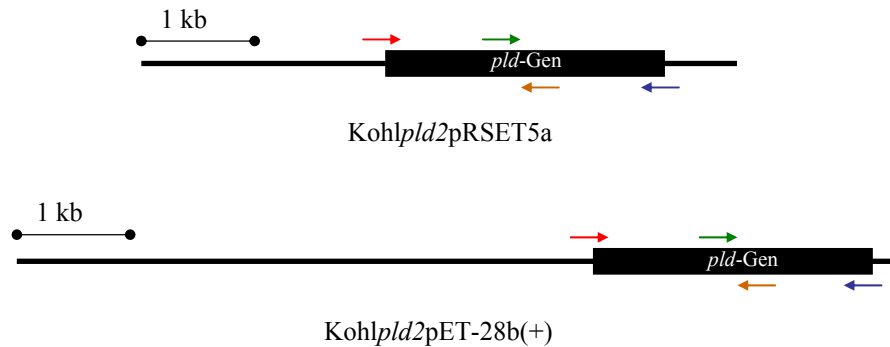
Zu der den kompletten Genbereich umfassenden Sequenzprüfung wurden für die Expressionskonstrukte Mohn*pld1*pET-28b(+) bzw. Mohn*pld2*pET-28b(+) pro Plasmid 4 Teilsequenzierungen mit den Sequenzierungsprimern **T7promotor**, **Mohnseqfw**, **Mohnseqrv** und **T7terminator** durchgeführt.



Die Expressionskonstrukte Kohl*pld2*pBAD22, Kohl*pld2*pET-28b(+) wurden in 4 bzw. das Expressionskonstrukt Kohl*pld2*pTWIN I in 5 Teilsequenzierungen überprüft (**T7promotor**, **PLD2midfw**, **Sonde2rv**, **T7terminator**, **SspDnaBinteinfw**, **MxeInteinrv**, **pBAD22fwseq**, **pBAD22rvseq**).



Zur Kontrolle der Kohl-PLD2-Enzymvarianten wurde ebenfalls der gesamte Genbereich in 4 Teilsequenzierungen (T7promotor, PLD2midfw, Sonde2rv, T7terminator) pro Plasmid sequenziert.



Die Gelelektrophorese wurde, wie in der Sequenzierbroschüre von MWG Biotech angegeben, durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE verwendet (5 × TBE: 0,45 M Tris/HCl, 0,45 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0).

Die primären Sequenzierungsdaten wurden mit BaseImagIR (Version 4, 1997) ausgewertet. Des Weiteren wurden für die Auswertung der Sequenzdaten die Programme MACAW (Version 2.0.5 Win32i, 1995), Gene Runner (Version 3.04, 1994), BioEdit (Version 5.0.6, 2001 und Version 6.0.7, 2004) sowie die GenBank des National Center for Biotechnology Information (Washington, DC; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) genutzt.

## 4.13 Expression

### 4.13.1 Expression der Konstrukte im pRSET5a-Vektor

Die Expression der Kohl-PLD2 sowie der Kohl-PLD2-Varianten erfolgte nach dem von Schöffner etablierten Expressionsprotokoll (Schöffner, 2001). Zur Expression der im pRSET5a-Vektor erzeugten Kohl-PLD2-Varianten sowie der Kohl-PLD2 im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)+pUBS 520 wurden 500 ml 2 × YT-Medium (50 µg/ml Amp und 25 µg/ml Kan) mit 10 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium; 50 µg/ml Amp und 25 µg/ml Kan) inokuliert und bei 15°C mit 180 rpm 3 bis 4 Tage lang geschüttelt, bis eine OD<sub>600nm</sub> von ca. 8 bis 10 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5000×g, 10 min) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

### 4.13.2 Expression der Konstrukte im pET-28b(+)-Vektor

Zur Produktion der rekombinanten Mohn-PLD1, Mohn-PLD2, Kohl-PLD2 sowie von einigen Kohl-PLD2-Varianten wurden 200 ml LB-Medium (25 µg/ml Cm und 10 µg/ml Kan) mit 4 ml einer Übernachtskultur (mit gleicher Medienzusammensetzung) von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-Zellen, die die entsprechenden sich im pET-28b(+)-Vektor befindlichen

Expressionskonstrukte enthielten, inokuliert und bei 37°C mit 180 rpm geschüttelt. Bei einer  $OD_{600nm}$  von 1 wurde die Expression mit 25  $\mu$ M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach Induktion wurde für 4 h bei 25°C mit 180 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 $\times$ g, 10 min) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

#### **4.14 Proteinreinigung**

##### **4.14.1 Zellaufschluss**

Das Zellpellet wurde in 40 ml Zellysepuffer (30 mM Pipes, pH 6,2, 10 mM EDTA) resuspendiert (Ultraturrax T25 von Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) und nach Zugabe von Lysozym (1,5 mg/g Zellen) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit einem Homogenisator (GAULIN Homogenisator von APV, Lübeck, 2 Passagen, 1200 bar). Nach Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (30000 $\times$ g, 20 min) wurde der Überstand (Rohextrakt) aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

##### **4.14.2 Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie**

Bei der Calcium-vermittelten hydrophoben Interaktionschromatographie wird die PLD in Gegenwart von  $Ca^{2+}$ -Ionen an Octyl-Sepharose gebunden und durch Entfernen der  $Ca^{2+}$ -Ionen selektiv eluiert (Lambrecht et al., 1992).

Die zu reinigende Proteinlösung (Rohextrakt oder mittels Q-Sepharose bzw. Phenyl-Sepharose teilgereinigte Proteinlösung), jeweils in 30 mM Pipes, pH 6,2 vorliegend, wurde mit einer 1 M  $CaCl_2$ -Stammlösung auf eine Endkonzentration von 50 mM  $CaCl_2$  (Kohl-PLD2/Kohl-PLD2-Varianten) bzw. von 200 mM  $CaCl_2$  (Mohn-PLD1/Mohn-PLD2) eingestellt und gegebenenfalls bei 5000 $\times$ g 10 min zentrifugiert. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine Octyl-Sepharose-Säule (20 ml Octyl-Sepharose CL-4B, Säulendimensionen: 300 mm  $\times$  15 mm), die mit einer LC-Anlage, bestehend aus Peristaltik-Pumpe P-1, Detektor Uvicord SII, Schreiber REC 102 und Fraktionssammler Frac-100 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verbunden war, aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 30 mM Pipes, pH 6,2, 50 mM bzw. 200 mM  $CaCl_2$  äquilibriert. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde die PLD anschließend mit 5 mM Pipes, pH 6,2, 0,1 mM EDTA eluiert. In den Fraktionen wurde zum einen die Proteinkonzentration (Bradford-Assay; 4.15.2) und zum anderen die hydrolytische PLD-Aktivität (4.18.1.1)

bestimmt. In den Peakfraktionen wurde die Reinheit des erhaltenen Proteins elektrophoretisch (SDS-PAGE; 4.16) überprüft.

### **4.14.3 Anionenaustauschchromatographie**

#### **4.14.3.1 Q-Sepharose mit 15 mM Tris/HCl, pH 7,5**

Die zu reinigende Proteinlösung (Octyl-Sepharose teilgereinigt, dialysiert und umgepuffert in 15 mM Tris/HCl, pH 7,5) wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine Q-Sepharose-Säule (20 ml Q-Sepharose, Säulendimensionen: 300 mm × 15 mm) aufgetragen, die zuvor mit 15 mM Tris/HCl, pH 7,5 äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde anschließend die PLD mit einem NaCl-Stufengradienten 15 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,2 M sowie 0,3 M NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden, wie unter Punkt 4.14.2 beschrieben, analysiert.

#### **4.14.3.2 Q-Sepharose mit 15 mM Pipes, pH 7,5**

Die zu reinigende Proteinlösung (Rohextrakt in 15 mM Pipes eingestellt auf pH 7,5 und filtriert [0,45 µm Filter, Roth]) wurde mit einer Flussrate von 0,8 ml/min auf eine Q-Sepharose-Säule (20 ml Q-Sepharose, Säulendimensionen: 60 mm × 35 mm) aufgetragen, die zuvor mit 15 mM Pipes, pH 7,5, äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde anschließend die PLD mit einem NaCl-Stufengradienten 15 mM Pipes, pH 7,5, 0,15 M sowie 0,2 M NaCl eluiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte wie unter Punkt 4.14.2 beschrieben.

#### **4.14.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose**

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie adsorbieren die unpolaren Oberflächenregionen eines Proteins bei hohen Salzkonzentrationen an die schwach hydrophoben Liganden der stationären Phase.

Die zu reinigende Proteinlösung (Rohextrakt) in 30 mM Pipes, pH 6,2, vorliegend wurde mit einer 0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung auf eine Endkonzentration von 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eingestellt und filtriert (0,45 µm Filter, Roth). Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0,6 ml/min auf eine Phenyl-Sepharose-Säule (20 ml Phenyl-Sepharose, Säulendimensionen: 300 mm × 15 mm) aufgetragen, die vorher mit 30 mM Pipes, pH 6,2, 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde anschließend die PLD mit 30 mM Pipes, pH 6,2, eluiert. Die Fraktionen wurden, wie unter Punkt 4.14.2 beschrieben, analysiert.

#### **4.14.5 Konzentrierung und Dialyse**

Die Proteinlösungen wurden mittels Viva-Spin-Concentratoren (5 kDa Cut-off; Vivascience AG, Hannover) bzw. Microcon-Concentratoren (Microcon YM-50; 50 kDa Cut-off; Millipore Corporation, Bedford [USA]) konzentriert. Um die Puffer- und Salzkonzentrationen im Ansatz zu senken, wurde die Proteinlösung gegen den entsprechend benötigten Puffer dialysiert (Dialyseschlauch: 8 kDa Cut-off; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg).

#### **4.14.6 Ammoniumsulfatfällung**

Die Proteinlösungen (Rohextrakte „inaktiver“ in Rosetta(DE3)pLysS exprimierter Kohl-PLD2-Varianten) wurden 1:1 mit einer 0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung versetzt und für 1 h auf Eis stehen gelassen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei  $21000\times g$  wurde der Überstand  $2 \times 2$  h gegen 5 mM Pipes, pH 6,2, dialysiert (1 ml Proteinlösung pro 600 ml Puffer).

### **4.15 Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **4.15.1 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der bis zur Homogenität gereinigten Enzyme wurde der Micro BCA Protein Assay Reagent Kit verwendet. Diese Methode beruht auf dem sensitiven colorimetrischen Nachweis eines BCA/ $\text{Cu}^+$ -Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und anschließende Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht (Smith et al., 1985), bei einer Wellenlänge von 550 nm. Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich 0 bis 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  genutzt.

#### **4.15.2 Bradford-Assay**

Dieser Assay basiert auf der Methode nach Bradford (1976), bei der Proteine durch Coomassie-Brillant-Blau-Einlagerung colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm nachgewiesen werden. Für den Bradford-Test im Mikrotiterplattenmaßstab wurden 50  $\mu\text{l}$  Proteinlösung und 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz eingesetzt. Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich 0 bis 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verwendet. Da sich der Bradford-Assay gegenüber den anderen Proteinbestimmungsmethoden als am wenigsten aufwendig erwies und der Einfluss störender Substanzen geringer ist, wurde dieser Assay für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Verlauf der Proteinreinigung genutzt.



### 4.15.3 Proteinbestimmung mittels Western-Blot

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration derjenigen Kohl-PLD2-Varianten, die nicht bis zur Homogenität gereinigt werden konnten, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch getrennt. Als Standard in der SDS-PAGE wurden Kohl-PLD2-Proben definierter Proteinkonzentration auf das Gel aufgetragen. Nach dem sich anschließenden Proteinblotting und der Immundetektion mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern (3.3) erfolgte die Quantifizierung der Proteinbanden mit dem Programm Aida (Version 2.00, 1997).

### 4.16 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde, wie in der Literatur beschrieben (Laemmli, 1970), in einer Mighty Small II SE250/SE260 Elektrophoresekammer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt. Es wurden 10 %ige Trenngele verwendet. Anschließend wurden die Proteinbanden durch Silber- (Blum et al. 1987) oder Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Färbe-Lösung: 0,5 g Coomassie-Brilliant-Blau G 250, 42,5 % [v/v] Ethanol, 5 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure; Entfärbungslösung: 7 % [v/v] Essigsäure, 20 % [v/v] Ethanol) detektiert.

### 4.17 Western-Blot-Technik

Nach SDS-PAGE wurde das Gel in einem Transfer-Puffer (50 mM Borat/NaOH, pH 9,0, 20 % [v/v] Methanol bzw. 25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 150 mM Glycin, 10 % [v/v] Methanol) äquilibriert. Unter Verwendung einer Fast Blot-Apparatur (Biometra GmbH, Göttingen) wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Hybond ECL Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) transferiert. Das Blotting erfolgte in 50 mM Borat/NaOH, pH 9,0, 20 % (v/v) Methanol bei 5 mA/cm<sup>2</sup> für 4 h oder in 25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol bei 2,7 mA/cm<sup>2</sup> für 2 h 45 min.

Vor der Reaktion mit den Antikörpern wurde die Blotmembran über Nacht bei 4°C mit 4 % Milchpulver in PBS-Puffer (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) blockiert. Anschließend wurde die Membran in folgenden Lösungen bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert:

- Anti-Kohl-PLD2-Antikörper aus Kaninchen (1:400 verdünnt in PBS-Puffer mit 4 % Milchpulver), 120 min
- PBS mit 0,05 % Tween 20, 3 × 10 min
- PBS mit 2 % Milchpulver, 20 min
- Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Esel (1:10000 verdünnt in PBS-Puffer mit

2 % Milchpulver), 80 min

- PBS mit 0,05 % Tween 20, 3 × 10 min.

Mit Hilfe des gebundenen, Peroxidase-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers konnten die Kohl-PLD2, die Kohl-PLD2-Varianten und die Mohn-PLD-Isoenzyme mittels ECL-Plus Western Blotting Detection Kit nachgewiesen werden, da die Peroxidase die Oxidation von Luminol katalysiert und so eine Chemilumineszenz ausgelöst wird. Das dabei entstehende Licht wurde auf einen Röntgenfilm (HyperFilm-ECL von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg; Entwickler/Fixierer von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) übertragen.

## **4.18 Aktivitätsbestimmung**

### **4.18.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System**

Dieser Aktivitätsbestimmung liegt der von D'Arrigo et al. (1995) etablierte PLD-Test zugrunde. Das aus Phosphatidyl-p-nitrophenol (PpNP) freigesetzte p-Nitrophenol (pNP) wird durch Messung der Absorptionsänderung bei geeigneter Wellenlänge photometrisch detektiert, entweder kontinuierlich bei 360 nm (pH 5,5) oder diskontinuierlich durch Abstoppen der Reaktion mit 1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA bei 405 nm.

#### **4.18.1.1 Diskontinuierlicher Mikrotiterplattentest**

Der diskontinuierliche Mikrotiterplattentest wurde zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität bei den Expressionsstudien sowie bei der Verfolgung der Proteinreinigungen verwendet. In einer Mikrotiterplatte wurden bei 30°C 170 µl Reaktionspuffer vorgelegt (100 mM NaAcetat, pH 5,5, 50 mM CaCl<sub>2</sub> für Kohl-PLD2 bzw. Kohl-PLD2-Varianten oder 150 mM CaCl<sub>2</sub> für Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2) und 50 µl Enzymlösung zugegeben. Durch Zugabe von 20 µl Substratstammllösung (10 mM PpNP, 10 % Triton X-100, 10 mM SDS) wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubationszeit bei 30°C wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Aktivität der Enzymlösung zwischen 10 und 120 min gewählt. Durch Zugabe von 60 µl Stopplösung (1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA) wurde die Reaktion abgestoppt und die Absorption wurde bei 405 nm gemessen (Microplatereader Dynatech MR7000, Cheminst, Berlin). Die Menge an gebildetem pNP wurde mit Hilfe einer Eichkurve, für deren Erstellung statt der Enzymlösung 50 µl pNP-Standardlösungen im Konzentrationsbereich 0 bis 1 mM verwendet wurden, berechnet. Eine Enzymeinheit (1 U) entspricht der Freisetzung von einem µmol pNP pro Minute bei 30°C.

#### 4.18.1.2 Kontinuierlicher Küvettentest

Der kontinuierliche Küvettentest wurde für die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität bei 30°C der bis zur Homogenität gereinigten Enzyme (Kohl-PLD2, Kohl-PLD2-Varianten, Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2) verwendet. In einer reduzierten Glasküvette (Lichtweg 1 cm) wurden 400 µl Reaktionspuffer (300 mM NaAcetat, pH 5,6, 120 mM CaCl<sub>2</sub>) und 50 µl Substratstammlösung (10 mM PpNP, 10 % Triton X-100, 10 mM SDS) im Photometer auf 30°C (Photometer U-2000 Hitachi, Tokio [Japan]) vortemperiert. Zum Start der Hydrolyse des PpNP wurden 50 µl Enzymlösung zugegeben und gut gemischt. Die durch die pNP-Bildung hervorgerufene Absorptionsänderung wurde über einen Zeitraum von 20 bis 40 min (abhängig von der enzymatischen Aktivität) bei 360 nm kontinuierlich gemessen. Die pNP-Konzentrationen wurden mit Hilfe einer entsprechenden Eichkurve, für deren Erstellung statt der Enzymlösung 50 µl pNP-Standardlösungen im Konzentrationsbereich 0 bis 1 mM verwendet wurden, berechnet. Eine Enzymeinheit (1 U) entspricht der Freisetzung von einem µmol pNP pro Minute bei 30°C.

#### 4.18.1.3 Einfluss des pH-Wertes und der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität

Um die Abhängigkeit der PLD-Hydrolyseaktivität vom pH-Wert und von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu bestimmen, wurde der diskontinuierliche Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) modifiziert. In eine Mikrotiterplatte wurden 170 µl Reaktionspuffer (60 mM Tris/HCl, 20 mM NaAcetat, 20 mM Glycin) vorgelegt, dessen pH-Wert im Bereich von 5,0 bis 8,5 mit Essigsäure oder Natronlauge eingestellt wurde und dem 0, 10, 25, 45 bzw. 100 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt wurden. Nach Zugabe von 50 µl Mohn-PLD1 bzw. Mohn-PLD2 wurde die Reaktion mit 20 µl Substratstammlösung (10 mM PpNP, 10 % Triton X-100, 10 mM SDS) gestartet. Die Reaktion wurde nach 90 min durch Zugabe von 1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA abgestoppt und die Absorption bei 405 nm gemessen.

#### 4.18.1.4 Einfluss der Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität

Zur Bestimmung des Einflusses der Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Konzentration auf die PLD-Hydrolyseaktivität wurde der diskontinuierliche Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) verwendet. Dazu wurden dem Reaktionspuffer (100 mM NaAcetat, pH 5,5) 0 bis 200 mM CaCl<sub>2</sub>, 0 bis 100 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. 0 bis 50 mM ZnCl<sub>2</sub> zugesetzt.

### **4.18.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität und der Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem**

Die Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität erfolgte im Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer nach Hirche et al. (1997), mit Soja-Phosphatidylcholin (SPC) als Substrat und Glycerol als Akzeptoralkohol. Detektiert wurde die Bildung von Phosphatidsäure (Hydrolyse) bzw. die Bildung von Phosphatidylglycerol (Transphosphatidylierung) mittels HPTLC (high performance thin layer chromatography; 4.18.2.1).

#### **4.18.2.1 Kinetische Messungen**

Die Umsetzung der Phospholipide wurde mittels HPTLC verfolgt. Als Standardsystem wurden 620 µl organische Phase (n-Hexan, 0,23 mmol 2-Octanol, 1,3 µmol [1 mg] SPC) und 80 µl wässrige Phase (300 mM NaAcetat, pH 5,6, 120 mM CaCl<sub>2</sub>, Enzym [0,05 bis 10 µg], 108 µM Glycerol [Akzeptoralkohol]) in 1,5 ml-Probefläschchen, die mit Butyl-Teflon-Septen verschlossen wurden, verwendet. Die Ansätze wurden bei 30°C geschüttelt (300 min<sup>-1</sup>, Horizontalschüttler GLG 3006, GFL). Der Start der Reaktion erfolgte durch die Injektion der wässrigen Phase in das die organische Phase enthaltende Probefläschchen. Zum Zeitpunkt 0 sowie nach 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 min nach dem Reaktionsstart wurde eine Probe aus der organischen Phase entnommen, wobei der entsprechende Ansatz vor der Probeentnahme für 30 s nicht geschüttelt wurde. Mit Hilfe eines TLC-Applicators AS 30 (Desaga, Wiesloch) wurden diese Proben auf HPTLC-Platten (Kieselgel 60, Merck Biosciences, Darmstadt) aufgetragen. Die folgenden Parameter wurden für das Plattenformat 100 mm × 200 mm genutzt:

- 24 Bahnen; zentrierte Ausrichtung
- strichförmige Auftragung; 3 mm Länge; 6 mm Abstand; Randabstand 28 mm
- 1 µl Auftragevolumen bei 3 s/µl.

Die organische Phase enthält den Hauptteil der Phospholipide (nahezu 100 %; Hirche, 1997). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die aus der organischen Phase entnommene Probe repräsentativ ist.

#### 4.18.2.2 Chromatographischer Prozess

Zur Quantifizierung der Phospholipide wurden die Proben auf 100 mm × 200 mm HPTLC-Platten aufgetragen. Pro Seite wurden 6 Mischungen mit Standardkonzentrationen Soja-Phosphatidsäure (SPA), SPC sowie Soja-Phosphatidylglycerol (SPG) aufgetragen (**Tabelle 3**). Nach Auftragung der letzten Probe wurden die Platten für 30 min bei einer relativen Luftfeuchte von 35 % getrocknet. Die Entwicklung erfolgte in einer Horizontalkammer (Camag, Muttenz) mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol-Ammoniak 70 : 40 : 10 (v/v/v). Anschließend wurden die Platten unter dem Abzug getrocknet und die Phospholipide mit Kupfersulfat/Phosphorsäure angefärbt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Standardmischungen 1 bis 6 aus SPA, SPC und SPG in Chloroform-Methanol 2: 1.**

	1	2	3	4	5	6
SPA, mM	1,12	0,84	0,56	0,28	0,07	1,40
SPC, mM	1,31	1,05	0,79	0,53	0,40	0,13
SPG, mM	0,13	0,26	0,66	1,05	1,31	0,53
Σ, mM	2,56	2,15	2,01	1,86	1,78	2,06

#### 4.18.2.3 Färbung der Phospholipide

Die luftgetrockneten Platten wurden auf einer Glasplatte für 3 min bei 120°C (Thermoplate S, Desaga, Wiesloch) belassen und nach Abkühlen in eine Färbelösung von 15,64 % (w/v) Kupfersulfat (Pentahydrat) in 8 % (v/v) Phosphorsäure getaucht. Danach wurden die Platten wieder auf die Thermoplate gelegt und auf 170°C erhitzt (Touchstone et al., 1983). Nach dem Eintreten der Färbung wurden die Platten auf Raumtemperatur abgekühlt und konnten densitometrisch vermessen werden.

#### 4.18.2.4 Densitometrische Quantifizierung

Die nach 4.18.2.3 gefärbten Platten wurden mit Hilfe des Densitometers CD 60 (Desaga, Wiesloch) im Extinktionsmodus unter Verwendung folgender Parameter vermessen:

- Spalt 0,2 mm × 4 mm
- Wellenlänge 390 nm, Remission
- Auflösung 0,1 mm, 8 Messungen pro Punkt.

---

Die Konzentration der entsprechenden Phospholipide wurde unter Verwendung der ermittelten Peakflächen der aufgetragenen Standards nach Kufner et al. (1979) mit Hilfe einer Gleichung vom Typ Michaelis-Menten berechnet. Für die mathematische Behandlung, insbesondere für lineare und nichtlineare Regressionen und die Ermittlung der Standardabweichungen wurde das Programmpaket SigmaPlot (Scientific graphing software, Version 2.01, 1994) genutzt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

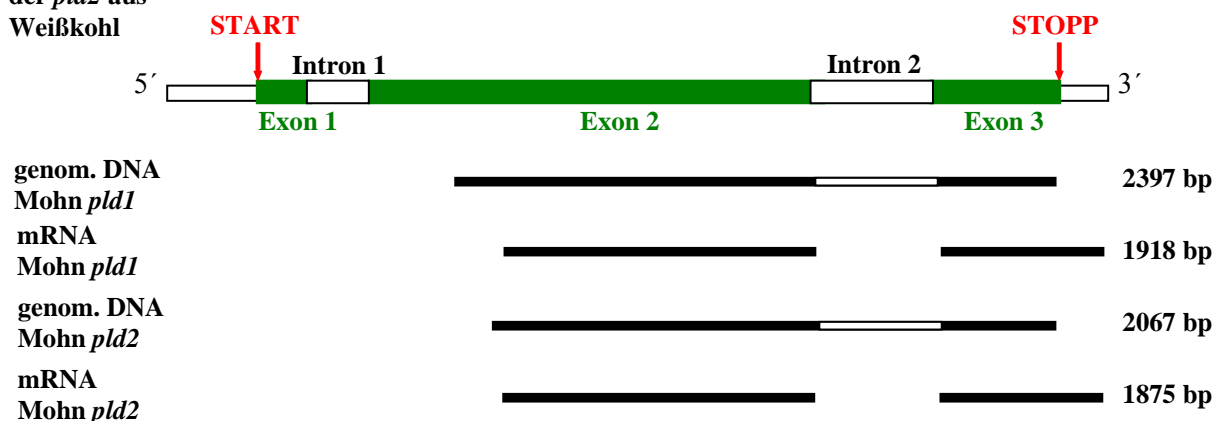
### 5.1 PLD-Isoenzyme aus Schlafmohn

#### 5.1.1 Sequenzbestimmung zweier PLD-Isoenzyme aus Schlafmohn

Zur rekombinanten Produktion der Mohn-PLDs war es notwendig, zunächst die Nucleotidsequenz des codierenden Genbereiches zu ermitteln, da dies die Grundlage für die Klonierung der Gene in einen geeigneten Expressionsvektor ist.

Ausgangspunkt für die Arbeiten war die Identifizierung von 2 PLD-Isoenzymen aus 4 Tage alten Schlafmohnkeimlingen (*Papaver somniferum* L. Váhovecky), von denen die Nucleotidsequenzen der mRNA und der genomischen DNA bis auf den 5'-Genbereich bereits sequenziert waren (Lerchner, 2001; **Abbildung 10**). Diese zwei strukturell sehr ähnlichen Mohn-*pld*-Gene waren mit *pld1* und *pld2* bezeichnet worden.

Genstruktur  
der *pld2* aus  
Weißkohl



**Abbildung 10:** Schematische Übersicht der zu Beginn der Arbeit bereits aufgeklärten Sequenzen der *pld1* bzw. *pld2* aus Mohn (Lerchner, 2001) im Vergleich mit der *pld2*-Genstruktur aus Weißkohl.

Nachfolgend sollen die Ergebnisse und Schwierigkeiten bei den Untersuchungen zur Sequenzbestimmung der kompletten Gene der Mohn-PLD-Isoenzyme zusammenfassend dargestellt werden.

#### 5.1.1.1 Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der mRNA von *pld1* und *pld2*

Um den unbekanntem Sequenzbereich erschließen zu können, wurde unter Verwendung von RACE-Methoden (rapid amplification of cDNA ends) versucht, durch Addition eines RNA bzw. DNA-Oligonucleotides mit bekannter Sequenz an das 5'-Ende der mRNA bzw. an das 3'-Ende der cDNA eine zweite Primer-Bindungsregion zu schaffen. Dafür wurden die Gene

Racer-Methode (Gene Racer Kit, Invitrogen), die SMART-Methode (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech), die Terminale Transferase-Strategie (5'-RACE System, Invitrogen), die GAGA-Strategie (Ligation eines DNA-Oligonucleotids) und die Zyklisierungsstrategie (Inverse PCR) verwendet, die jedoch alle nicht zum gewünschten Erfolg führten. Die Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenzen gelang schließlich durch die Anwendung folgender Strategie:

Zunächst wurde die mRNA aus 4 Tage alten Schlafmohnkeimlingen mit einer neuen Methode (PolyATtract® System 1000; 4.2.1) isoliert. Unter Verwendung der genspezifischen *reverse*-Primer MohnGF3-1rv bzw. MohnGF3-2rv und der Reversen Transkriptase SuperScript™III RT wurde die mRNA in die entsprechende cDNA umgeschrieben (4.3). In den sich anschließenden PCRs (4.4; 1. PCR-Ansatz) wurde zur Amplifizierung des unbekannt Sequenzbereichs als *forward*-Primer der degenerierte Primer Start Mohn PLDfw verwendet, der auf der Basis von Alignments mit den 3 bis dahin dem Mohn ähnlichsten *pld*-Sequenzen von *Ricinus communis*, *Zea mays* und *Nicotiana tabacum* in der Region des Start-Codons abgeleitet wurde (**Abbildung 11**).

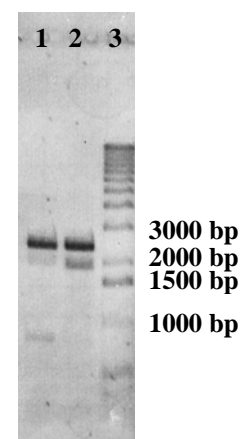
Start Mohn PLDfw	~~~~ATGGCTCAGATTYYTCTCCAYGGAACTCTCCA
<i>Nicotiana tabacum</i>	AAAAATGGCTCAGATTCTGCTCCATGGAACTCTCCATGTC
<i>Ricinus communis</i>	AGAAATGGCGCAGATATCTTTGCACGGAACTCTACATGTA
<i>Zea mays</i>	GGCCATGGCTCAGATCTTGCTCCACGGCACGCTCCACGCC

**Abbildung 11:** Alignment der *pld*-Sequenzen von *Ricinus communis* (NCBI GenBank L33686), *Zea mays* (NCBI GenBank D73410) und *Nicotiana tabacum* (NCBI GenBank Z84822) in der Region des Start-Codons zum Design des degenerierten Primers Start Mohn PLDfw.

Als *reverse*-Primer dienten die schon bei der cDNA-Synthese zum Einsatz gekommenen genspezifischen Primer. Unter Verwendung von *Pfu*-DNA-Polymerase wurde für beide Isoenzyme ein ca. 2500 bp großes PCR-Produkt erhalten (**Abbildung 12**).

**Abbildung 12:** Agarosegel der PCRs zur vollständigen Nucleotidbestimmung der mRNA der Mohn-*pld1* bzw. der Mohn-*pld2*.

- Bahn 1: PCR Mohn-*pld2*
- Bahn 2: PCR Mohn-*pld1*
- Bahn 3: Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter





Die PCR-Produkte wurden in den pCR4-TOPO-Vektor subkloniert, und die Konstrukte in *E. coli* TOP 10-Zellen transformiert (4.5). Die sich anschließende Sequenzierung bestätigte, dass beide Konstrukte das noch fehlende PLD-Fragment am 5'-Ende des *pld1*- bzw. *pld2*-Gens enthalten. Somit konnten für beide Isoenzyme die vollständigen mRNA-Sequenzen vom Start-Codon bis zum 3'-poly(A) identifiziert und in der Datenbank hinterlegt werden (NCBI-Genbank Accession Nr. AF451979 und AF451980; Lerchner et al., 2001, aktualisiert 2004). Die ermittelten vollständigen mRNA-Nucleotidsequenzen von *pld1* und *pld2*, bestehend aus 2679 bzw. 2601 Nucleotiden, sind zusammen mit den genomischen Nucleotidsequenzen (5.1.1.2) im **Anhang A1** aufgeführt. Die Nucleotidsequenzen des *pld1*- und *pld2*-Gens sind im codierenden Bereich zu 96,9 % identisch. Innerhalb dieser Nucleotidsequenzen konnte für beide Isoenzyme ein offenes Leseraster von 813 Aminosäuren gefunden werden (Primärstrukturen im **Anhang A2**).

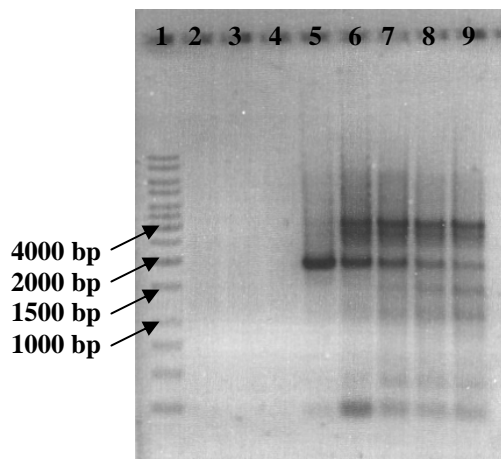
#### **5.1.1.2 Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von *pld1* und *pld2***

Die meisten eukaryotischen Gene sind mosaikartig aus codierenden Sequenzen (exprimierende Sequenzen oder Exons) und intervenierenden Sequenzen (Introns) aufgebaut. Der codierende Bereich eines eukaryotischen Gens ist daher nur ein Teil des gesamten Gens. Sowohl Intron- als auch Exonsequenzen werden in RNA transkribiert. Die Intron-Sequenzen jedoch werden aus der neusynthetisierten RNA durch den Vorgang des RNA-Spleißens entfernt.

Die Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von *pld1* und *pld2* wurde zunächst mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern, mit der Konstruktion einer genomischen DNA-Bank (Genomic cloning and packaging lambda packaging system, Promega), mittels Digoxigenin-RAGE/Supported-PCR und mittels Southern Blotting versucht. Alle diese Methoden führten jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Mit der folgenden Strategie gelang schließlich die Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenzen:

Die genomische DNA wurde aus 4 Tage alten Schlafmohnkeimlingen isoliert (4.2.2.1) und als Template in der Gradienten-PCR zur Amplifizierung des unbekanntes Sequenzbereiches eingesetzt (4.4; 2. PCR-Ansatz). Als *forward*-Primer wurde der degenerierte Primer Start Mohn PLDfw und als *reverse*-Primer MohnPLD2F2rv ein genspezifischer *reverse*-Primer aus dem zentralen Genbereich verwendet. Das entstehende PCR-Produkt sollte eine Größe zwischen 1800 und 2000 bp haben. In **Abbildung 13** ist zu erkennen, dass mit zunehmender *Annealing*-Temperatur PCR-Produkte, die auf eine unspezifische Primer-

Bindung zurückzuführen sind, nicht mehr gebildet werden. Bei einer *Annealing*-Temperatur von 61,2°C (Bahn 5) entstand nur noch das vermeintlich richtige PCR-Produkt (ca. 1900 bp). Dieses PCR-Produkt wurde in den pCR4-TOPO-Vektor subkloniert und die Konstrukte in *E. coli* TOP 10-Zellen transformiert (4.5).



**Abbildung 13: Agarosegel der Gradienten-PCR zur Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von Mohn-*pld1* und Mohn-*pld2*.**

Bahn 1: Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter

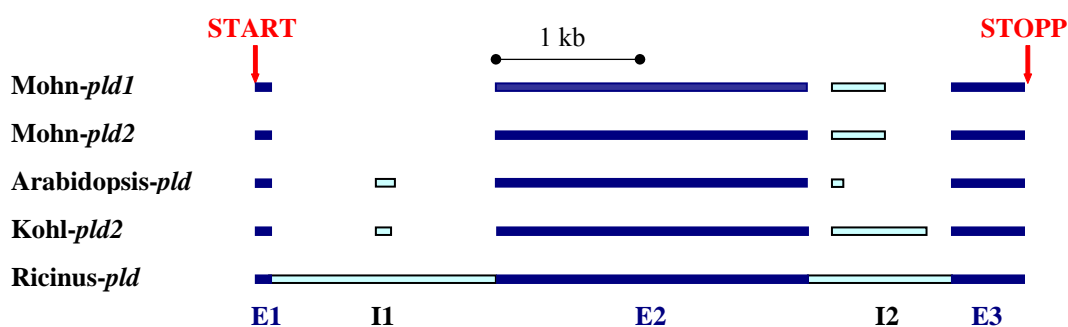
Bahnen 2 bis 9: Gradienten-PCR mit den

*Annealing*-Temperaturen 68,0°C, 66,7°C, 64,5°C,

61,2°C, 56,6°C, 53,5°C, 51,3°C und 50,0°C

Durch Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass in diesen Konstrukten das noch fehlende PLD-Fragment vorhanden ist. Somit liegen für beide Isoenzyme die genomischen DNA-Sequenzen vom Start- bis zum Stopp-Codon vor (NCBI-GenBank Accession Nr. AF451981 und AF451982; Lerchner et al., 2001, aktualisiert 2004).

Die ermittelten vollständigen genomischen DNA-Sequenzen von *pld1* und *pld2* bestehen aus 2829 bzw. 2828 Nucleotiden (**Anhang A1**). Für die genomische DNA beider Mohn-Isoenzyme konnte im Gegensatz zu anderen pflanzlichen PLDs vom  $\alpha$ -Typ, die meist 2 Introns besitzen (**Abbildung 14**), nur eine Intronstruktur (Intron 2 in **Abbildung 14**) ermittelt werden.



**Abbildung 14: Vergleich der Exon/Intron-Struktur ausgewählter pflanzlicher *pld* $\alpha$ -Gene.** Dunkelblau: Exonstrukturen E1-E3, hellblau: Intronstrukturen I1-I2.

Die Intronsequenzen der beiden Mohn-Isoenzyme bestehen aus 360 bp und sind wie auch die Exonstrukturen in hohem Maße ähnlich. Die Positionen des Introns im *pld1*- und *pld2*-Gen sind vergleichbar (**Anhang A1**). Die Länge der Intronbereiche in den verschiedenen pflanzlichen *pld* $\alpha$ -Genen variiert stark in Abhängigkeit von der Pflanzenart. Die Länge von

Intron 1 reicht von 88 (*Kohl-pld2*) bis 1442 bp (*Rizinus-pld*), die von Intron 2 von 84 (*Arabidopsis-pld*) bis 869 bp (*Rizinus-pld*).

### 5.1.1.3 Analyse der Primärstrukturen von PLD1 und PLD2

Für beide Isoenzyme wurde unter Verwendung des Programms BioEdit (Version 6.0.7, 2004) ein offenes Leseraster von 813 Aminosäuren gefunden (Primärstrukturen im **Anhang, A2**). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme unterscheiden sich in 11 Aminosäuren, sie sind somit zu 98,6 % identisch und zu 99,2 % ähnlich. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Massen betragen für PLD1 91,72 kDa und für PLD2 91,86 kDa. Mittels ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) wurden aus der Primärstruktur die isoelektrischen Punkte berechnet, die bei 5,60 für PLD1 und 5,53 für PLD2 liegen.

**Tabelle 4** zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen von PLD1 und PLD2 aus Mohn mit einigen ausgewählten mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen PLDs. Die mittels BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) bestimmten Identitäten und Ähnlichkeiten sind für beide Mohn-PLD-Isoenzyme gleich. Aus **Tabelle 4** lässt sich ein hoher Verwandtschaftsgrad zu anderen pflanzlichen PLDs des  $\alpha$ -Typs erkennen (71 bis 80 %), der durch die phylogenetische Analyse in **Abbildung 15** und das multiple Alignment im **Anhang A3** noch unterstrichen wird. Somit sind die Mohn-PLD-Isoenzyme eindeutig den  $\alpha$ -Typ-PLDs zuzuordnen. Den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den Mohn-PLD-Isoenzymen besitzen die PLDs aus *Zea mays* und *Nicotiana tabacum*. Beim Vergleich der phylogenetischen Daten der betrachteten  $\alpha$ -Typ-PLDs (**Abbildung 15**) fällt auf, dass das Verhältnis der Ähnlichkeiten der PLDs zueinander und deren Einordnung im phylogenetischen Stammbaum der gegenwärtigen Taxonomie der Pflanzenspecies entspricht. Die Pflanzen aus denen die betrachteten  $\alpha$ -Typ-PLDs stammen, gehören innerhalb der Abteilung der Samenpflanzen zur Unterabteilung Bedecktsamer (Magnoliophytina), wo sie wie folgt eingeordnet sind (Jäger et al., 2003):

- *Zea mays*:

2. Klasse Liliopsida (Einkeimblättrige), 3. Unterklasse Commelinidae

- *Papaver somniferum*:

3. Klasse Rosopsida (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige), 1. Unterklasse basale Rosopsida

- *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea* und *Ricinus communis*:

3. Klasse Rosopsida (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige), 2. Unterklasse Rosidae

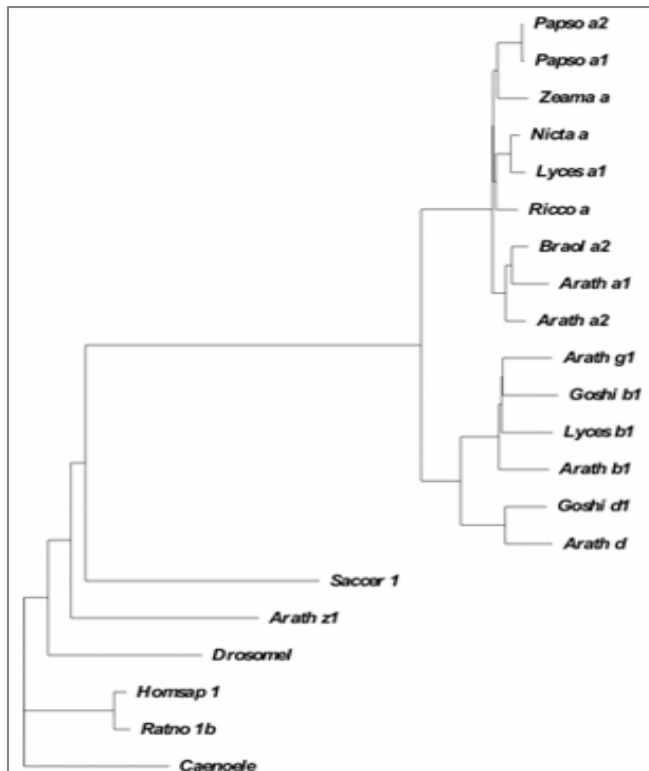
• *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum*:

3. Klasse Rosopsida (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige), 3. Unterklasse Asteridae.

**Tabelle 4: Vergleich der Aminosäuresequenzen von PLD1 sowie PLD2 aus Schlafmohn mit der von mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen PLDs.**

Species, PLD-Typ	Nummer in der NCBI-Genbank	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
<i>Streptomyces antibioticus</i> , PLD	Q53728	keine signifikante Ähnlichkeit	
<i>Streptomyces septatus</i> , PLD	BAB69062	keine signifikante Ähnlichkeit	
<i>Caenorhabditis elegans</i> , PLD	BAA97571	28	44
<i>Drosophila melanogaster</i> , PLD	AAK00727	28	45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , PLD1	P36126	26	43
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\alpha$ 1	AAC49274	71	80
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\alpha$ 2	Q9SSQ9	77	86
<i>Brassica oleracea</i> , PLD $\alpha$ 2	AAC78486	78	87
<i>Lycopersicon esculentum</i> , PLD $\alpha$ 1	AAG45485	78	87
<i>Nicotiana tabacum</i> , PLD $\alpha$	CAB06620	80	88
<i>Ricinus communis</i> , PLD $\alpha$	AAB04095	79	89
<i>Zea mays</i> , PLD $\alpha$	BAA11135	80	88
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\beta$ 1	P93733	44	61
<i>Gossypium hirsutum</i> , PLD $\beta$ 1	AAN05431	43	61
<i>Lycopersicon esculentum</i> , PLD $\beta$ 1	AAG45487	43	60
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\gamma$ 1	Q9T053	44	61
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\delta$	Q9C5Y0	44	59
<i>Gossypium hirsutum</i> , PLD $\delta$ 1	AAN05432	44	58
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\zeta$ 1	AAL06337	26	37
<i>Homo sapiens</i> , PLD1	AAB49031	29	43
<i>Rattus norvegicus</i> , PLD1b	BAA24077	24	36

Die Sequenzidentitäten zu den pflanzlichen PLDs des  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\zeta$ -Typs sind mit 26 bis 44 % deutlich geringer. Die PLDs eukaryotischer, nicht-pflanzlicher Organismen weisen 24 bis 29 % Sequenzidentität zu den PLDs aus Schlafmohn auf. Die mikrobiellen PLDs dagegen besitzen weder zu den Mohn-PLD-Isoenzymen noch zu anderen pflanzlichen PLDs eine signifikante Ähnlichkeit.



**Abbildung 15: Phylogenetische Analyse der PLD-Familie.** Phylogramm, konstruiert mittels BioEdit (Version 6.0.7, 2004) mit der Distanz-Methode „Fitch phylogenetic tree“ (Fitch et al., 1987) auf der Grundlage eines multiplen Alignments mittels Clustal W (Thompson et al., 1994). Species-Kurzformen: *Arath*, *Arabidopsis thaliana*; *Braol*, *Brassica oleracea*; *Caenode*, *Caenorhabditis elegans*; *Drosomel*, *Drosophila melanogaster*; *Goshi*, *Gossypium hirsutum*; *Homsap*, *Homo sapiens*; *Lyoes*, *Lycopersicon esculentum*; *Nicta*, *Nicotiana tabacum*; *Papso*, *Papaver somniferum*; *Ratno*, *Rattus norvegicus*; *Ricco*, *Ricinus communis*; *Saccor*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Zeama*, *Zea mays*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2.

Die Aminosäurezusammensetzung beider Isoenzyme ist im **Anhang A4** dargestellt. Beide PLDs enthalten die in den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs hoch-konservierten 8 Cystein-Reste (multiples Alignment im **Anhang A3**). Zudem sind die Mohn-PLDs in Besitz eines weiteren Cystein-Restes in Position 144, wo sich interessanterweise bei den bisher sequenzierten  $\alpha$ -Typ-PLDs ein Serin-Rest befindet (**Anhang A3**). Die Mohn-PLD1 verfügt in Position 414 noch über einen zehnten Cystein-Rest.

Mit dem Programm SignalP (Bendtsen et al., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) konnten ausgehend von den Primärstrukturen der Mohn-PLD-Isoenzyme keine Signalpeptide für den Transport in den Zellkern, die Mitochondrien, Peroxisomen sowie Chloroplasten vorhergesagt werden. Es wird daher vermutet, dass beide Mohn-PLD-Isoenzyme intrazellulär vorkommen und damit die SH-Gruppen der Cystein-Reste in reduzierter Form vorliegen (Fahey et al., 1977). Für die PLD2 aus Weißkohl konnte das Vorliegen der Cystein-Reste in reduzierter Form gezeigt werden (Hwang et al., 2001).

Aus der Aminosäurezusammensetzung beider Isoenzyme (**Anhang A4**) geht weiterhin hervor, dass in beiden Mohn-PLD-Isoenzymen ein hoher Prozentsatz an hydrophoben Aminosäuren existiert (Ala, Val, Phe, Pro, Met, Ile und Leu: 38,5 % für PLD1 bzw. 39,98 % für PLD2). Der hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren ist vermutlich notwendig, um die Funktionen des Membranabbaus bzw. der Membranumgestaltung erfüllen zu können. Dabei sind für eine temporäre Bindung an die Zellmembran oberflächenexponierte hydrophobe Aminosäuren erforderlich. Glycin erhöht innerhalb von Proteinstrukturen durch das Fehlen

einer Seitenkette die lokale Flexibilität (Mount, 2001). Insofern ist es sehr interessant, dass Glycin mit 8,00 % bzw. 7,87 % die häufigste Aminosäure der Mohn-PLD1 sowie der Mohn-PLD2 darstellt.

Wie alle PLD-Aktivität zeigenden Mitglieder der PLD-Superfamilie (2.4, **Abbildung 4**) besitzen beide Mohn-PLD-Isoenzyme vier konservierte Sequenzbereiche, inklusive der 2 HKD-Motive. Am N-Terminus beider Isoenzyme befindet sich die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Phospholipidbindung verantwortliche C2-Domäne (multiples Alignment im **Anhang A3**). Die C2-Domäne von PLD1 und PLD2 aus Mohn enthält wie andere pflanzliche PLDs vom  $\alpha$ -Typ zwei konservierte saure Aminosäure-Reste (Glu42 und Asp101). In beiden Mohn-PLDs sind zwei mögliche  $\text{PIP}_2$ -Bindungsmotive vorhanden (multiples Alignment im **Anhang A3**). Sie sind zum einen in der C2-Domäne (KxxxxRxRK) und zum anderen in der Region zwischen dem ersten und zweiten HKD-Motiv (RxRxxxxK) lokalisiert.

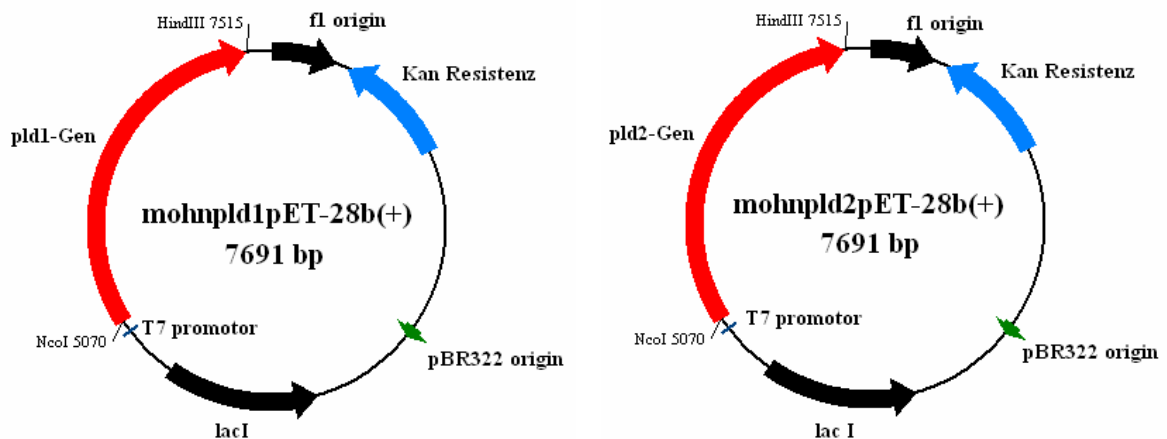
In den Aminosäuresequenzen der Mohn-PLD1 und der Mohn-PLD2 wurden mit Prosite (Hofmann et al., 1999; <http://www.expasy.ch/prosite/>) eine Asn-Glykosylierungsstelle, sechs Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C sowie zwei Phosphorylierungsstellen für Tyrosinkinase gefunden. Das weist auf eine Beteiligung der PLDs an Regulationsprozessen hin.

### 5.1.2 Klonierung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2

Beide Mohn-PLD-Isoenzyme sollten in Analogie zur Kohl-PLD2 mit einem neu etablierten Expressionssystem (pET-28b(+)-Vektor, *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS, 5.2.3.3) exprimiert werden, da aufgrund der hohen Identität der Primärstrukturen von Mohn-PLD1, Mohn-PLD2 und Kohl-PLD2 (**Tabelle 4**) die Vermutung nahe lag, dass sich die beiden Mohn-PLD-Isoenzyme bei der heterologen Expression in *E. coli* ähnlich verhalten.

Um eine Klonierung in den Vektor pET-28b(+) mit den Restriktionsenzymen *Nco I/Hind III* zu ermöglichen, wurden zunächst zwei im *pld1*- und *pld2*-Gen befindliche *Nco I*-Schnittstellen und eine *Hind III*- Schnittstelle in den Plasmiden *pld1*pCR4-TOPO bzw. *pld2*pCR4-TOPO (5.1.1.1) durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt (Primer  $\Delta\text{ncol mohn fw/rv}$ ,  $\Delta\text{2ncol fw/rv}$ ,  $\Delta\text{hindIII fw/rv}$ , 3.6). Die so veränderten Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. In einer sich anschließenden PCR (4.4; 3. PCR-Ansatz) wurden durch die flankierenden Primer *mohn ncofw* und *mohn1hindrv/mohn2hindrv* (3.6) die für die Klonierung erforderlichen Restriktionsschnittstellen angefügt. Nach Isolierung der PCR-Produkte aus einem Agarosegel und Restriktionsverdau mit *Nco I* und *Hind III* wurde das *pld1*- bzw. das *pld2*-Gen in den mit *Nco I* und *Hind III* linearisierten, dephosphorylierten

Vektor pET-28b(+) ligiert (4.9) und in *E. coli* XL1-Blue transformiert (4.10.1). Eine Selektion positiver Klone erfolgte durch Restriktionsverdau der erhaltenen Plasmide mit *Nco*I und *Hind*III und Analyse im Agarosegel. Die korrekte DNA-Sequenz der Expressionskonstrukte *pld1*pET-28b(+) und *pld2*pET-28b(+) wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Expressionskonstrukte (**Abbildung 16**) wurden nachfolgend in den *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS transformiert.



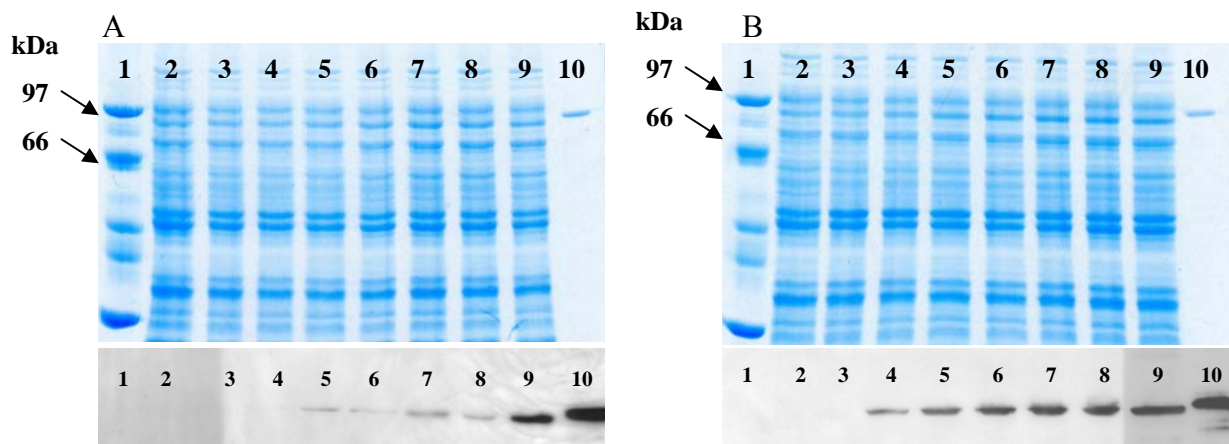
**Abbildung 16:** Expressionskonstrukte Mohn*pld1*pET-28b(+) und Mohn*pld2*pET-28b(+).

### 5.1.3 Expression von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2

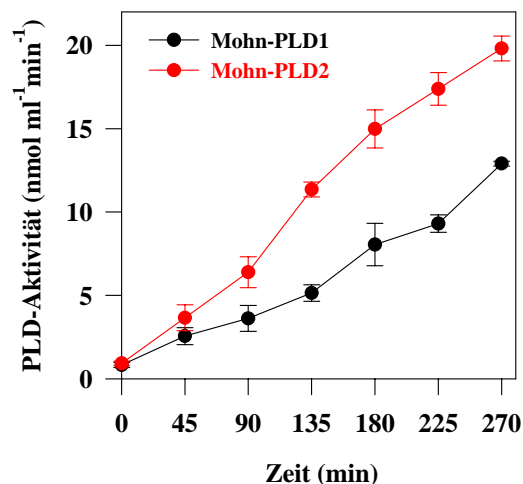
Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2 konnten erfolgreich mit Hilfe der Expressionskonstrukte *pld1*pET-28b(+) und *pld2*pET-28b(+) in *E. coli* löslich im Cytosol exprimiert werden. Eine Expression der beiden Isoenzyme in löslicher Form wurde angestrebt, da es bisher nicht gelungen ist, PLD aus Weißkohl aus *inclusion bodies* zurückzufalten. Die Expression der beiden Enzyme erfolgte in Analogie zur Kohl-PLD2 mit einem neu etablierten Expressionssystem (5.2.3.3).

Zur Verfolgung des Expressionsverlaufes wurden entnommene Zellproben mit Zellysepuffer (B-PERII Bacterial Protein Extraction Reagent, Pierce) aufgeschlossen. Der lösliche Proteinanteil wurde auf PLD-Aktivität getestet und die exprimierte Mohn-PLD1 bzw. Mohn-PLD2 mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Technik mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern nachgewiesen. Im SDS-PAGE-Gel (**Abbildung 17**, oben) sind die Expressionsbanden bei einer Größe von 91,8 kDa nur schwach zu erkennen, was bei einer löslichen Proteinexpression jedoch nicht ungewöhnlich ist. Der entsprechende Western-Blot (**Abbildung 17**, unten) mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern zeigt, dass die Bande der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme mit zunehmender Induktionszeit deutlich zunimmt. In Übereinstimmung damit konnte auch für beide Mohn-PLD-Isoenzyme im Verlauf der

Expression eine zunehmende hydrolytische PLD-Aktivität gemessen werden (**Abbildung 18**). Verglichen mit Mohn-PLD2 wird Mohn-PLD1 in etwas geringeren Mengen exprimiert, was sich auch in der hydrolytischen PLD-Aktivität der Mohn-Isoenzyme widerspiegelt.



**Abbildung 17: Verlauf der Expression von Mohn-PLD1 (A) bzw. Mohn-PLD2 (B).** SDS-PAGE-Gel (oben) und Western-Blot (unten): Bahn 1: LMW-Marker; Bahn 2: Expression des Vektors pET-28b(+) ohne *pld*-Gen (Negativkontrolle); Bahnen 3 bis 9: Expression der Mohn-PLD1 (A) bzw. Expression der Mohn-PLD2 (B) 0, 45, 90, 135, 180, 225 und 270 min nach Induktion; Bahn 10: 0,5 µg Kohl-PLD2 (Positivkontrolle).



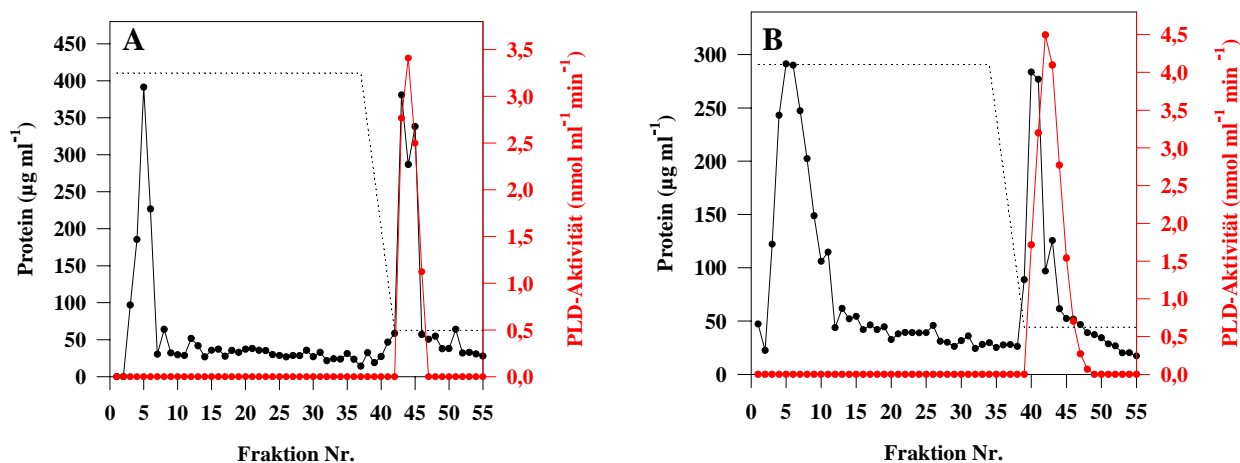
**Abbildung 18: Hydrolyseaktivität von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 im Verlauf der Expression.** Expressionsstamm: Rosetta(DE3)pLysS; Induktion: 25 µM IPTG bei  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ ; Kultivierungstemperatur 25°C. Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

### 5.1.4 Reinigung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2

Zur Reinigung der löslich exprimierten Mohn-PLDs wurden die *E. coli*-Zellen mit einem Homogenisator aufgeschlossen (4.14.1). Die nach Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation erhaltenen Rohextrakte wurden zunächst einer hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) an Phenyl-Sepharose unterworfen (4.14.4). Zur Auftragung wurde eine geringe  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration (0,4 M) gewählt, da unter diesen



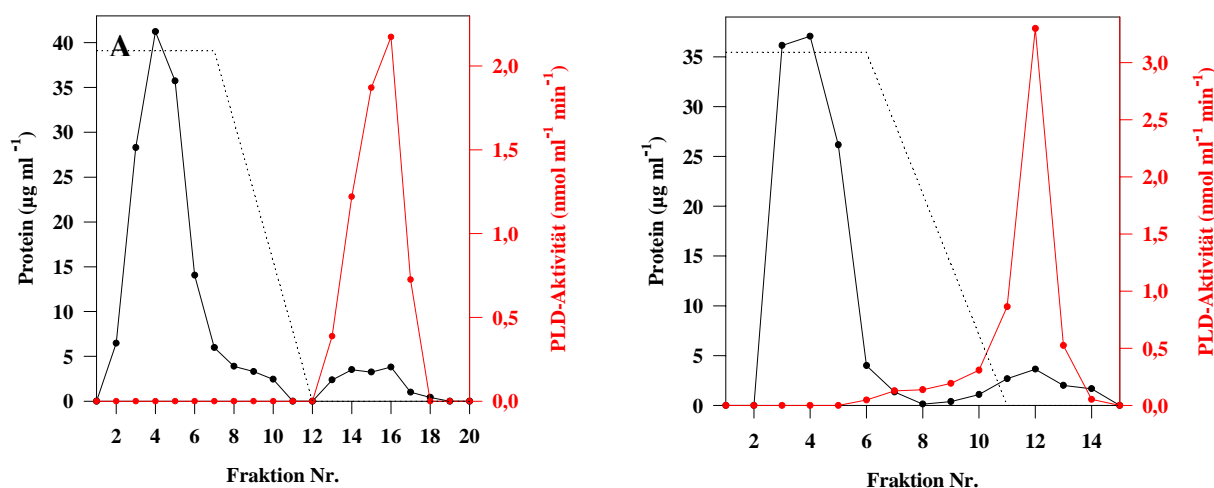
Bedingungen die Bindung der Mohn-PLD-Isoenzyme an das Säulenmaterial unter Erhalt ihrer Aktivität gewährleistet ist und ein großer Teil der Fremdproteine nicht an das Säulenmaterial bindet (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19: Reinigungsprofil für Mohn-PLD1 (A) und für Mohn-PLD2 (B) an Phenyl-Sepharose.** Schwarz, Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay; rot, Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Assay; gestrichelt, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gradient (oberes Niveau: 0,4 M, unteres Niveau: 0 M).

Der Reinheitsgrad betrug 15 für Mohn-PLD1 bzw. 14 für Mohn-PLD2. 90 % der eingesetzten Aktivität konnten mit einem abnehmenden (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gradienten eluiert werden. Eine Reinigung mittels Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie nach Lambrecht et al. (1992) war im ersten Schritt nicht möglich, da bei Zugabe von CaCl<sub>2</sub> eine starke Copräzipitation der PLD mit anderen cytosolischen Proteinen zu verzeichnen war, in deren Folge die Aktivität vollständig verloren ging. Die für die Präzipitation verantwortlichen Komponenten konnten mittels der beschriebenen HIC an Phenyl-Sepharose abgetrennt werden.

Die mit Hilfe von Phenyl-Sepharose teilgereinigte Proteinlösung wurde anschließend mittels Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie gereinigt (4.14.2). Bei Auftragung der teilgereinigten Proteinlösung in Gegenwart von 50, 100 oder 150 mM CaCl<sub>2</sub> wurden weder Mohn-PLD1 noch Mohn-PLD2 am Säulenmaterial gebunden. Erst bei einer Konzentration von 200 mM CaCl<sub>2</sub> ist es gelungen, Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2 an Octyl-Sepharose zu binden und diese durch Entfernen der Ca<sup>2+</sup>-Ionen selektiv und konzentriert zu eluieren. **Abbildung 20** zeigt die Reinigungsprofile für Mohn-PLD1 (A) sowie Mohn-PLD2 (B) an Octyl-Sepharose mit 200 mM CaCl<sub>2</sub>. Bei der Reinigung von Mohn-PLD2 konnte eine teilweise vorzeitige Elution dieses Enzyms aufgrund einer vermutlich schwächeren Bindung an Octyl-Sepharose in Gegenwart von 200 mM CaCl<sub>2</sub> nicht unterbunden werden. Das verursachte einen höheren Aktivitätsverlust (65 %) bei der Reinigung von Mohn-PLD2 an Octyl-Sepharose im Vergleich zur Mohn-PLD1 (32 %).



**Abbildung 20: Reinigungsprofil für Mohn-PLD1 (A) und für Mohn-PLD2 (B) an Octyl-Sepharose mit 200 mM  $\text{CaCl}_2$ .** Schwarz, Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay; rot, Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Assay; gestrichelt,  $\text{CaCl}_2$ -Gradient (oberes Niveau: 200 mM, unteres Niveau: 0 mM).

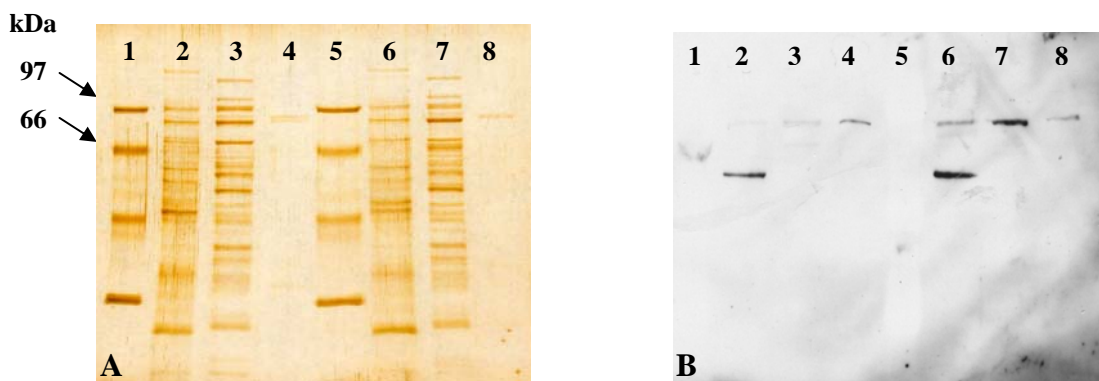
Das Prinzip der Calcium-vermittelten hydrophoben Interaktionschromatographie ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass die für die Adsorption an die hydrophoben Liganden der stationären Phase verantwortlichen unpolaren Regionen des Enzyms durch eine Calcium-induzierte Konformationsänderung an der Oberfläche des Proteins präsentiert werden. Abgeleitet aus Erfahrungen mit Reinigungsversuchen von inaktiven Kohl-PLD2-Varianten (5.2.4.1 und 5.2.4.2) an Octyl-Sepharose wird vermutet, dass das zu reinigende Enzym in seiner aktiven Konformation vorliegen muss, um mit dem Säulenmaterial interagieren zu können. Da die Bindung der Mohn-PLD-Isoenzyme an Octyl-Sepharose erst bei einer Konzentration von 200 mM  $\text{CaCl}_2$  erfolgreich war, ist anzunehmen, dass diese Enzyme eine in diesem Bereich liegende  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration für ihre Aktivität benötigen. Dies konnte durch die Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestätigt werden (5.1.5.3). Worauf der Unterschied zwischen Mohn-PLD2 und Mohn-PLD1 im Bindungsvermögen an Octyl-Sepharose zurückzuführen ist, bleibt jedoch unklar. Die Annahme, dass eine Abweichung im hydrophoben Charakter innerhalb einer spezifischen Region der Mohn-PLD2 verglichen mit Mohn-PLD1 der Grund sein könnte, wird durch die nahezu identischen Hydrophobizitätsprofile beider Enzyme (**Anhang A5**) nicht gestützt.

Aus 200 ml Expressionskultur konnten mit der in der **Tabelle 5** zusammengefassten Reinigungsprozedur 70 µg Mohn-PLD1 bzw. 50 µg Mohn-PLD2 in aktiver und elektrophoretisch einheitlicher Form isoliert werden.

**Tabelle 5: Quantifizierung der Reinigungsprozedur für Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2.** Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Ausbeute (%)	Reinheitsgrad
<b>Mohn-PLD1</b>					
Rohextrakt	86,838	0,0545	$6,276 \cdot 10^{-4}$	100	1
Phenyl-Sepharose	5,312	0,0490	$9,224 \cdot 10^{-3}$	90	15
Octyl-Sepharose	0,070	0,0319	0,456	58	726
<b>Mohn-PLD2</b>					
Rohextrakt	85,320	0,1038	$1,217 \cdot 10^{-3}$	100	1
Phenyl-Sepharose	5,170	0,0942	0,0182	90	14
Octyl-Sepharose	0,050	0,0252	0,504	25	397

In **Abbildung 21A** ist die Zunahme der Reinheit der Proteinlösungen während des Reinigungsprozesses gelelektrophoretisch dokumentiert. Zusätzlich wurde der Reinigungsverlauf mittels Western-Blot (**Abbildung 21B**) verfolgt.



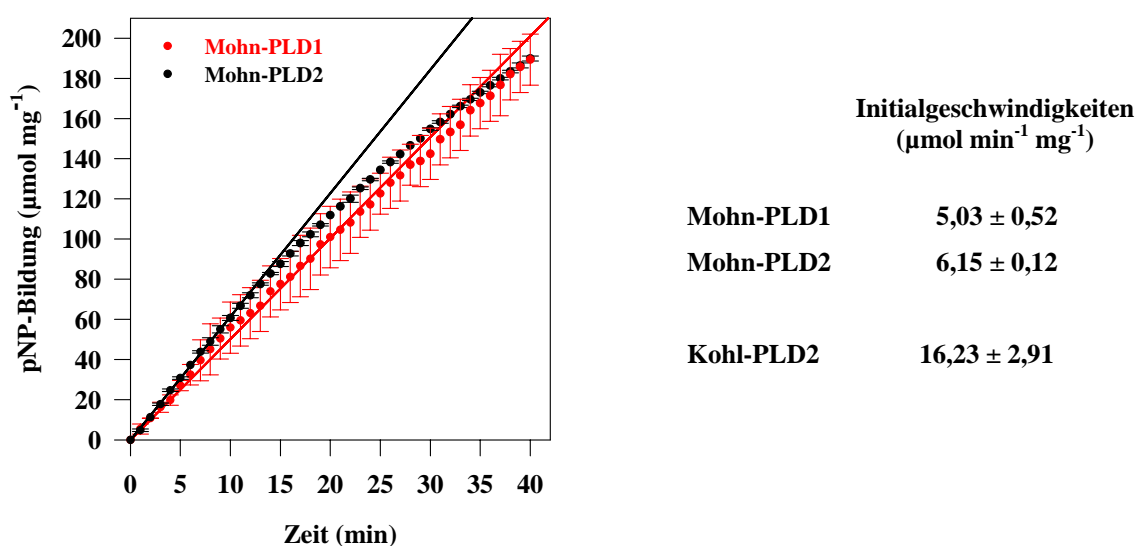
**Abbildung 21: Reinigung der Mohn-PLD-Isoenzyme.** SDS-PAGE-Gel (A) und Western-Blot (B): Bahn 1: LMW-Marker; Bahn 2: Rohextrakt der Mohn-PLD1; Bahn 3: Mohn-PLD1 nach Phenyl-Sepharose; Bahn 4: Mohn-PLD1 nach Octyl-Sepharose; Bahn 5: LMW-Marker; Bahn 6: Rohextrakt der Mohn-PLD2; Bahn 7: Mohn-PLD2 nach Phenyl-Sepharose; Bahn 8: Mohn-PLD2 nach Octyl-Sepharose.

### 5.1.5 Biochemische Charakterisierung der Mohn-PLD-Isoenzyme

Die rekombinant gewonnenen Mohn-PLD-Isoenzyme bildeten die Grundlage für die weitere biochemische Charakterisierung der beiden Isoenzyme, die im Rahmen dieser Arbeit vor allem auf die Ermittlung ihrer Hydrolyse- sowie Transphosphatidylierungseigenschaften gerichtet war.

#### 5.1.5.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System

Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System erfolgte mit einem kontinuierlichen Küvettentest (4.18.1.2), bei dem die durch die pNP-Bildung aus PpNP als Substrat hervorgerufene Absorptionsänderung kontinuierlich bei 360 nm gemessen wurde. Der verwendete Reaktionspuffer wurde in Analogie zu dem der wässrigen Phase in dem von Hirche et al. (1997) etablierten Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer gewählt, um die Ergebnisse der verschiedenen Aktivitätsassays besser miteinander vergleichen zu können, da auch die Aktivitätsmessungen für Kohl-PLD2 und die Kohl-PLD2-Varianten unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. In **Abbildung 22** ist der zeitliche Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten pNP-Bildung dargestellt.



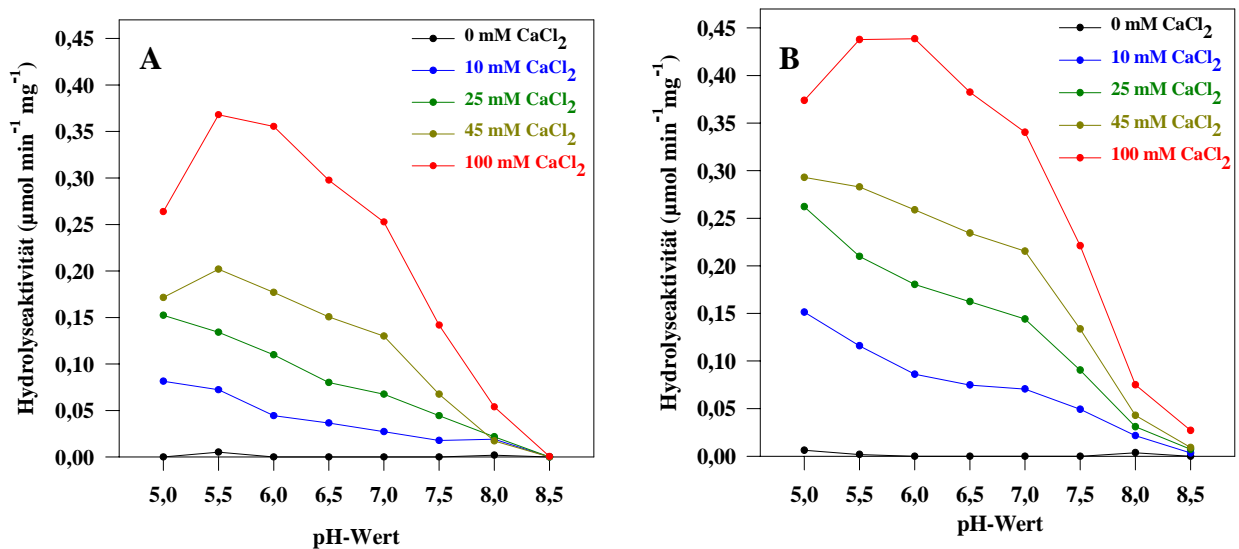
**Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten pNP-Bildung im micellaren System.** Durchgezogene Linien; lineare Regression zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten. Die gezeigten Messdaten wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten von PLD1 und PLD2 betragen  $5,03 \pm 0,52$  bzw.  $6,15 \pm 0,12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Demnach besitzen beide Enzyme bei der Verwendung des synthetischen Substrates PpNP eine vergleichbare hydrolytische Aktivität, die im Vergleich mit der hydrolytischen Aktivität der Kohl-PLD2 ( $16,23 \pm 2,91 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , 5.2.5.2) um den Faktor 3,2 bzw. 2,6 geringer ist.

### 5.1.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme in Abhängigkeit vom pH-Wert und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sollte zum einen Aufschluss über das pH-Optimum sowie die optimale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geben. Zum anderen sollte geprüft werden, ob eine in der Literatur kontrovers diskutierte Verschiebung des pH-Optimums pflanzlicher  $\alpha$ -Typ-PLDs in den sauren Bereich bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Allgyer et al., 1979; Abousalham et al., 1993) bzw. bei Absenkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Pappan und Wang, 1999) zu beobachten ist.

Die Aktivitäten der Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 wurden im pH-Bereich von 5,0 bis 8,5 und im Konzentrationsbereich von 20 bis 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , der für die  $\alpha$ -Typ-PLDs als optimal gilt (Wang, 2000), mit dem modifizierten diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.3) unter Verwendung von PpNP als Substrat bestimmt. Die höchste Hydrolyseaktivität wurde für beide Isoenzyme zwischen pH 5,5 und 6,0 in Gegenwart von 100 mM  $\text{CaCl}_2$  gemessen (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Einfluss des pH-Wertes und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität.** A, Mohn-PLD1; B, Mohn-PLD2. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Für beide Mohn-PLDs konnte in Gegenwart von 10 und 25 mM  $\text{CaCl}_2$  im untersuchten pH-Bereich 5,0 bis 8,5 das Aktivitätsoptimum noch nicht erreicht werden. Es wird daher vermutet, dass die Mohn-PLDs unter sauren Bedingungen bei physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aktiv sind. Beide Mohn-PLD-Isoenzyme zeigen eine Verschiebung des pH-Optimums der Hydrolyseaktivität bei einer Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den

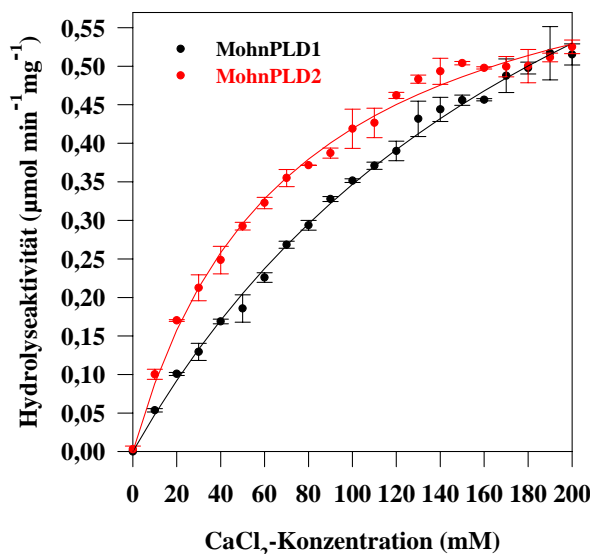
sauren Bereich. Dieser Befund stimmt mit dem von Pappan und Wang (1999) für Rizinus-PLD gefundenen Resultaten überein. Zudem konnten Pappan und Wang (1999) zeigen, dass sich die Rizinus-PLD $\alpha$ -Aktivität im sauren Bereich durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat bzw. Phosphatidylinositol-4-phosphat stimulieren ließ. Wie bereits unter Punkt 5.1.1.3 erwähnt, besitzen die Mohn-PLDs zwei potentielle PIP<sub>2</sub>-Bindungsstellen. Bei weiterführenden Aktivitätsstudien mit den Mohn-PLD-Isoenzymen wäre es daher sehr interessant, einen möglichen aktivierenden Effekt von PIP<sub>2</sub> bzw. PIP zu prüfen. In engem Zusammenhang damit steht der Befund von Zheng et al. (2000), der zeigt, dass PIP<sub>2</sub> an die C2-Domäne von pflanzlicher PLD $\alpha$  in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen sehr gut gebunden, jedoch bei Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen verdrängt wird. Die PIP<sub>2</sub>-Bindung wird dabei konzentrationsabhängig durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen (> 0,6 mM für den PLD $\alpha$ -C2-Komplex) inhibiert. Die Erhöhung der PLD-Aktivität *in vitro* durch unphysiologische, millimolare Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen resultiert wahrscheinlich aus den artifiziellen Aktivitäts-Assay-Bedingungen.

#### **5.1.5.3 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Konzentration**

Durch die Bestimmung der Hydrolyseaktivität der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Konzentration sollte der von Oblozinsky et al. (2003) beschriebene Metallioneneffekt geprüft werden. Bei Untersuchungen an einem aus Mohnkeimlingen isolierten PLD-Isoenzym mit PpNP als Substrat konnte dabei eine um den Faktor 4 höhere Aktivität in Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Ionen (optimale Konzentration: 5 mM) im Vergleich zur Aktivität bei Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen (optimale Konzentration: 10 mM) gemessen werden.

Die Hydrolyseaktivität der beiden rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme wurde im micellaren System in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Ionen mit PpNP als Substrat bestimmt (4.18.1.4). Beide Mohn-PLD-Isoenzyme sind bei pH 5,5 in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen inaktiv, wie bereits in **Abbildung 23** gezeigt. Durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen wurde die Aktivität der Mohn-PLD-Isoenzyme deutlich erhöht und eine maximale Aktivität bei 200 mM CaCl<sub>2</sub> erreicht (**Abbildung 24**). Im Vergleich dazu erreicht die rekombinante Kohl-PLD2 ihre maximale Hydrolyseaktivität bereits bei 45 mM CaCl<sub>2</sub> (Schäffner et al., 2002). Andere bisher bekannte pflanzliche  $\alpha$ -Typ-PLDs benötigen CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 20 und 100 mM (Wang, 2000) für ihre optimale katalytische Aktivität. Eine Aktivierung der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme durch Mg<sup>2+</sup>- oder Zn<sup>2+</sup>-Ionen konnte bei Konzentrationen zwischen 0 und 100 mM bzw. 0 und 50 mM nicht festgestellt werden. Diese

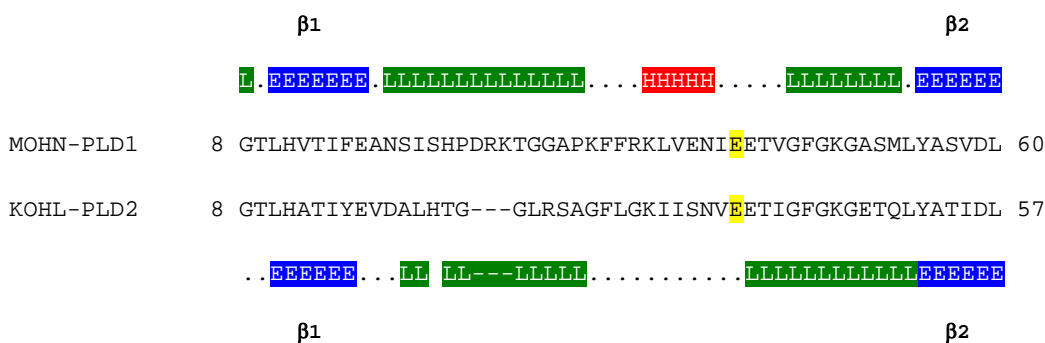
Ergebnisse liefern daher keinerlei Indiz dafür, dass das von Oblozinsky et al. (2003) beschriebene  $Zn^{2+}$ -aktivierbare PLD-Isoenzym mit einer der beiden rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme identisch ist.



**Abbildung 24: Einfluss der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Der sehr hohe  $Ca^{2+}$ -Bedarf für das Erreichen einer optimalen Aktivität spiegelt sich auch in der Reinigung beider Mohn-PLD-Isoenzyme mittels  $Ca^{2+}$ -vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie (5.1.4) wider, wo eine Bindung der beiden Enzyme erst bei 200 mM  $CaCl_2$  erfolgreich war. Eine Erklärung für den höheren  $Ca^{2+}$ -Bedarf im Vergleich mit anderen pflanzlichen PLDs kann nur in strukturellen Unterschieden innerhalb der C2-Domäne zu suchen sein. Die zwei für die  $Ca^{2+}$ -Bindung bei pflanzlichen PLDs des  $\alpha$ -Typs verantwortlichen sauren Aminosäure-Reste Glu42 und Asp101 sind auch, wie in 5.1.1.3 bereits beschrieben, in der C2-Domäne von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 enthalten. Möglicherweise ist der Aminosäure-Rest Glu42 jedoch so in einer Helix-Struktur involviert, dass er für eine Bindung von  $Ca^{2+}$  nicht zur Verfügung steht und demzufolge die  $Ca^{2+}$ -Bindung nur über den sauren Aminosäure-Rest Asp101 mit stark verminderter Affinität erfolgen kann. Die Gründe für diese Annahme ergeben sich aus dem Vergleich der Sekundärstrukturvorhersagen für die Mohn-PLD-Isoenzyme mit der für die Kohl-PLD2 und aus dem Vergleich der Hydrophobizitätsprofile dieser Enzyme (**Anhang A5**). Die Sekundärstrukturen wurden für die Mohn-PLD-Isoenzyme sowie für die Kohl-PLD2 mittels PHD (predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks; Rost, 1996; <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>) mit einer durchschnittlichen Genauigkeit

von > 82 % vorhergesagt (**Anhang A2** bzw. **A6**). Der Vergleich der Hydrophobizitätsprofile von Mohn-PLD1 und Kohl-PLD2 (**Anhang A5**) zeigt, dass die Region zwischen den Aminosäuren 20 bis 40 bei Mohn-PLD1 stark hydrophil ist, während diese Region bei der Kohl-PLD2 hydrophob ist. Dieser Befund wird durch eine in diesem Bereich für beide Mohn-PLD-Isoenzyme vorhergesagte Helix-Struktur gestützt (**Abbildung 25**), da  $\alpha$ -Helices im Allgemeinen an der Oberfläche von Proteinen liegen und tendenziell nur jede dritte oder vierte Aminosäure hydrophob ist (Mount, 2001). Diese helikale Struktur im Bereich der Aminosäure Glu42 (Glu39 bei der Kohl-PLD2) wurde für das Weißkohl-Enzym nicht vorhergesagt (**Abbildung 25**).



**Abbildung 25: PHD-Sekundärstrukturvorhersage für die Mohn-PLD1 bzw. die Kohl-PLD2 im Aminosäurebereich 8 bis 60 bzw. 57.** H, Helix; E, Faltblatt; L, Loop und andere Strukturelemente; gelb markiert, in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung involvierte Aminosäure Glu42 bzw. Glu39;  $\beta 1$  und  $\beta 2$ ,  $\beta$ -Faltblätter der C2-Domäne.

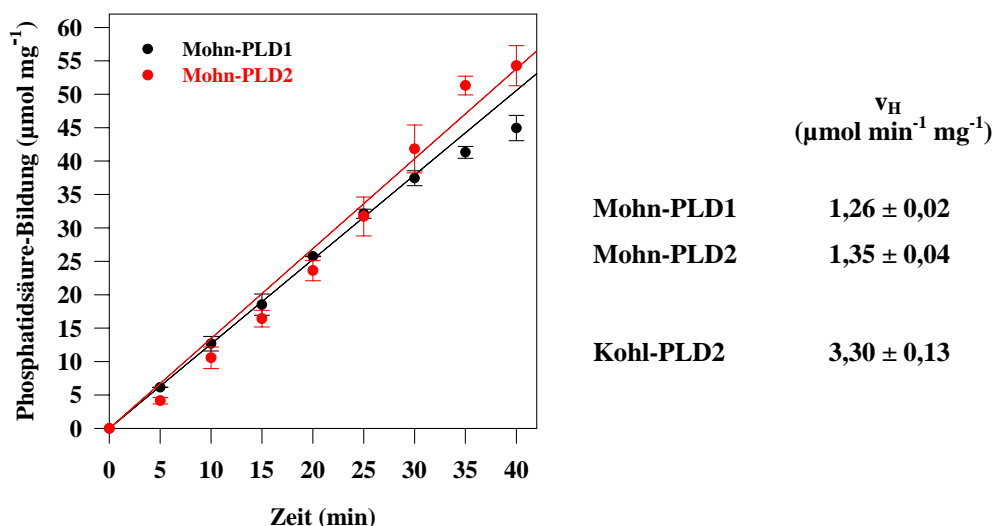
#### 5.1.5.4 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem

Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität und der Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer erfolgte nach Hirche et al. (1997) mit SPC als Substrat und mit Glycerol als Akzeptoralkohol (4.18.2). Aus dem zeitlichen Verlauf der PA-Bildung in Abwesenheit von Glycerol bzw. der PG- und PA-Bildung in Gegenwart von Glycerol wurden die Initialgeschwindigkeiten für die Hydrolyse ( $v_H$ ), für die Transphosphatidylierung ( $v_T$ ) und für die Hydrolyse als Konkurrenzreaktion ( $v_{HK}$ ) ermittelt. Das Transphosphatidylierungspotential ( $v_T/v_{HK}$ ) wurde aus den Quotienten der Transphosphatidylierungsaktivität ( $v_T$ ) und der hydrolytischen Konkurrenzreaktion ( $v_{HK}$ ) berechnet.

In **Abbildung 26** ist der zeitliche Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten Hydrolyse in Abwesenheit von Glycerol dargestellt. Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse ( $v_H$ ) von PLD1 und PLD2 betragen  $1,26 \pm 0,02$  bzw.  $1,35 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Beide Enzyme besitzen, wie auch bei der Verwendung des synthetischen Substrates



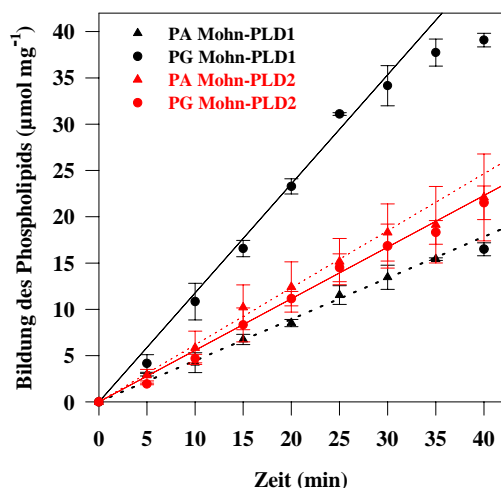
PpNP im micellaren System (5.1.5.1) gezeigt, eine vergleichbare hydrolytische Aktivität. Vergleicht man die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse der Mohn-PLDs mit der der Kohl-PLD2 ( $v_H = 3,30 \pm 0,13 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), sind diese ähnlich dem micellaren System mit PpNP als Substrat (5.1.5.1) um den Faktor 2,6 bzw. 2,5 geringer.



**Abbildung 26:** Zeitlicher Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten Bildung von Phosphatidsäure im Zweiphasensystem in Abwesenheit von Glycerol. Durchgezogene Linien; lineare Regression zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Für das aus Mohnkeimlingen isolierte PLD-Isoenzym wurde von Oblozinsky et al. (2003) im Zweiphasensystem Diethylether/Acetat-Puffer mit PC als Substrat eine Hydrolyseaktivität  $v_H = 0,342 \pm 0,051 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  gemessen. Ein direkter Vergleich der Daten ist jedoch nicht zulässig, da die Wahl der organischen Phase des Zweiphasensystems erhebliche Änderungen der PLD-Aktivitäten zur Folge hat (Hirche et al., 1997).

**Abbildung 27** zeigt den zeitlichen Verlauf der durch die rekombinanten Mohn-PLDs katalysierten Transphosphatidylierung und Hydrolyse in Anwesenheit von Glycerol. Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Mohn-PLD-Isoenzyme für die Transphosphatidylierung ( $v_T$ ) und die Hydrolyse ( $v_{HK}$ ) zeigen unerwartet signifikante Unterschiede, die sich im Transphosphatidylierungspotential widerspiegeln. Für Mohn-PLD1 konnte eine 2,6-fach höhere Umesterungsrate im Vergleich zur Hydrolyserate gemessen werden. Die Mohn-PLD2 dagegen hydrolysiert und transphosphatidyliert SPC gleichermaßen gut, obwohl sie sich in nur 11 Aminosäuren von Mohn-PLD1 unterscheidet.



	$v_T$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$v_{HK}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$v_T/v_{HK}$
Mohn-PLD1	$1,18 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,01$	$2,62 \pm 0,12$
Mohn-PLD2	$0,56 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,05$
Kohl-PLD2	$3,11 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,43$

**Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Bildung von Phosphatidylglycerol und Phosphatidsäure durch die Mohn-PLD-Isoenzyme im Zweiphasensystem.** Durchgezogene bzw. gestrichelte Linien; lineare Regression zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten der PG- bzw. der PA-Bildung. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den berechneten Initialgeschwindigkeiten für Kohl-PLD2  $v_T = 3,11 \pm 0,19 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und  $v_{HK} = 1,55 \pm 0,24 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  sowie deren Umesterungspotenz  $v_T/v_{HK} = 2,01 \pm 0,43$ , so ergeben sich die folgenden Aussagen: Die Transphosphatidylierungsaktivität der Mohn-PLD1 ist 2,6-fach geringer als die von Kohl-PLD2. Dies stimmt mit den Hydrolyseaktivitätsbestimmungen im micellaren und im Zweiphasensystem überein (5.1.5.1 und **Abbildung 26**), und lässt auf eine geringere spezifische Aktivität des Mohn-Enzyms schließen. Durch eine verhältnismäßig gering ausgeprägte Hydrolysereaktion in Anwesenheit von Glycerol ergibt sich für Mohn-PLD1 ein um den Faktor 1,3 verbessertes Transphosphatidylierungspotential im Vergleich zur Kohl-PLD2.

In Bezug auf die reduzierte Transphosphatidylierungsaktivität der Mohn-PLD2 im Vergleich zur Mohn-PLD1 wird vermutet, dass die bei den beiden Isoenzymen voneinander abweichenden Aminosäure-Reste in Position 349 (Glu bzw. Ala) und 352 (Gln bzw. Glu) innerhalb des ersten verlängerten HKD-Motives dabei eine Rolle spielen könnten.

Von Oblozinsky et al. (2003) wurde im Zweiphasensystem Diethylether/Acetat-Puffer mit PC als Substrat und Glycerol als Akzeptoralkohol für das aus Mohnkeimlingen isolierte PLD-Isoenzym eine Transphosphatidylierungsaktivität  $v_T = 4,86 \pm 0,05 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  gemessen, wohingegen unter diesen Bedingungen eine Hydrolyseaktivität nicht detektiert werden konnte. Durch die Differenz in der Zusammensetzung der organischen Phase ist ein Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Aktivitäten der rekombinanten Mohn-PLDs nicht möglich. Es lässt sich aber dennoch sagen, dass die von Oblozinsky et al. (2003) gemessene hohe Transphosphatidylierungsaktivität in den rekombinant gewonnenen Mohn-PLDs nicht

beobachtet werden konnte. Es handelt sich bei dem von Oblozinsky et al. (2003) untersuchten Enzym offenbar nicht um eines der beiden rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme. Dafür sprechen auch die bereits unter Punkt 5.1.5.3 beschriebenen differierenden Hydrolyseaktivitäten in Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration. Ein experimenteller Nachweis mittels tryptischen Verdaus und anschließender massenspektrometrischer Analyse ist bisher an der nicht reproduzierbaren Gewinnung dieses Mohn-PLD-Enzyms aus Mohnkeimlingen nach Oblozinsky et al. (2003) gescheitert.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich aber ableiten, dass Differenzen im Transphosphatidylierungspotential pflanzlicher PLDs auf geringfügigen Aminosäureaustauschen beruhen. Unter dem biosynthetischen Gesichtspunkt bedeutet das, dass die gentechnische Modulation des Transphosphatidylierungspotentials von PLDs relativ einfach zu bewerkstelligen sein sollte.

## 5.2 Kohl-PLD2 und Kohl-PLD2-Enzymvarianten

### 5.2.1 Design von Kohl-PLD2-Enzymvarianten

Mit der Etablierung eines Verfahrens zur Gewinnung rekombinanter PLDs aus Weißkohl (Schäffner et al., 2002) war die Voraussetzung für Struktur-Funktionsstudien gegeben. Aufbauend auf multiplen Alignments, Sekundärstrukturvorhersagen und Hydrophobizitätsvergleichen sollten mit Hilfe von Deletionen, Insertionen und gezielten Aminosäureaustauschen Strukturelemente lokalisiert werden, die für die katalytische Aktivität der PLD, insbesondere für die Transphosphatidylierungsaktivität funktionsbestimmend sind. Für die durchgeführten Mutationsstudien wurde die rekombinante PLD2 aus Weißkohl verwendet, da sie der aus dem Weißkohl isolierten PLD entspricht (Schöps et al., 2002). Unter Berücksichtigung der Sekundärstrukturvorhersage wurden die verschiedenen Enzymvarianten der rekombinanten PLD2 aus Kohl vor allem auf der Grundlage von Sequenzvergleichen mit ausgewählten nicht-pflanzlichen Vertretern der PLD-Superfamilie (*E. coli*-Phosphatidylserinsynthase, *E. coli*-Cardiolipinsynthase, humane PLD1 sowie den PLDs aus *Streptomyces antibioticus* und *Streptomyces species*), etablierten pflanzlichen PLDs (*Nicotiana tabacum*, *Ricinus communis*, *Zea mays*) sowie durch den Vergleich der PLD2-Sequenz mit denen der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden, abgeleitet. Darauf aufbauend wurden die Bereiche des ersten und zweiten HKD-Motives, der bei pflanzlichen PLDs hoch-konservierte C-Terminus sowie die 8 in pflanzlichen PLDs ebenfalls hoch-konservierten Cystein-Reste für Mutationen ausgewählt. Von diesen Regionen wurde ein Einfluss auf die Aktivität insbesondere auf die Transphosphatidylierungsaktivität erwartet.

#### 5.2.1.1 Modifizierung der HKD-Motive und der ihnen benachbarten Regionen

Wie bereits im Abschnitt 2.4 erwähnt, haben pflanzliche PLD-Isoenzyme wie alle zur PLD-Superfamilie gehörenden Mitglieder zwei konservierte HKD-Motive, die für die katalytische Aktivität verantwortlich gemacht werden. Die Notwendigkeit der HKD-Motive auch für die katalytische Aktivität der pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs sollte durch die Punktmutationen H333D, K335R und D340E im ersten HKD-Motiv und die Punktmutationen H663D, K665R und D670E im zweiten HKD-Motiv bestätigt werden.

Die drei Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/ $\Delta$ 351/ $\Delta$ 352/M356V, bei denen der Aminosäureaustausch in den angrenzenden Regionen des ersten HKD-Motives der Kohl-PLD2 vorgenommen wurde, wurden aufgrund sequentieller Besonderheiten der Mohn-PLDs im Vergleich mit etablierten

pflanzlichen PLDs in Form eines multiplen Alignments abgeleitet (**Abbildung 28**). Dabei war nur der Bereich des ersten HKD-Motives interessant, da dieser im Vergleich zum Bereich des zweiten HKD-Motives nicht so hoch-konserviert ist (multiples Alignment im **Anhang A3**). Diese Enzymvarianten wurden in der Annahme entwickelt, dass die rekombinanten Mohn-PLDs über eine sehr ausgeprägte Transphosphatidylierungsaktivität verfügen, wie das von Oblozinsky et al. (2003) für eine aus Mohnkeimlingen isolierte PLD beschrieben worden ist.

		1. HKD-Motiv			
Arath a1	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	SRGGSEM--RRIVS	354
Arath a2	260	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	SGGSR--RRIVS	354
Braol a1	260	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	SRGGSQM--RRIVS	355
Braol a2	261	KKATEGV (65)	HHQRIVVVDSEV	PSQGGSEMRRIMS	357
Crapl a1	259	KKASEGV (65)	HHQRIIVVDS	LDLPSGGSDK--RRIVS	353
Crapl a2	259	KKANEGV (65)	HHQRIIVVDS	LDLPSGGSDK--RRIVS	353
Lyces a1	260	KKASEGV (65)	HHQRIIVVDS	ALPSGESEK--RRILS	354
Nicta a	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSELP	SGESEK--RRIVS	353
Orysa a1	263	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDHEL	PNQGSQ--RRIVS	357
Papso a1	264	KKADEGV (65)	HHQRIVVVDS	AMPSEGSQ--RRIVS	358
Papso a2	264	KKADEGV (65)	HHQRIVVVDS	AMPAGSEQ--RRIVS	358
Pimbr a	259	KKADEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	TSGSEN--RRVVS	353
Ricco a	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDS	AMPNGDSQR--RRIVS	353
Vigun a	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDS	ALPGGGSDK--RRIVS	354
Zeama a	263	RKASEGV (65)	HHQRIVVVDHE	MNPQGSQ--RRIVS	357

**Abbildung 28: Ausschnitt des multiplen Alignments (Anhang A3) mit Primärstrukturen pflanzlicher PLDs im Bereich des 1. HKD-Motives.** Blau, identische und ähnliche Aminosäuren; rot markiert, HKD des katalytischen Motives; schwarz, differierende Aminosäuren; gelb markiert, Positionen der Aminosäureaustausche T264D, V339T/E342A/V343M und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V. Species-Kurzformen: *Arath*, *Arabidopsis thaliana*; *Braol*, *Brassica oleracea*; *Crapl*, *Craterostigma plantagineum*; *Lyces*, *Lycopersicon esculentum*; *Nicta*, *Nicotiana tabacum*; *Orysa*, *Oryza sativa*; *Papso*, *Papaver somniferum*; *Pimbr*, *Pimpinella brachycarpa*; *Ricco*, *Ricinus communis*; *Vigun*, *Vigna unguiculata*; *Zeama*, *Zea mays*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2.

Aus dem Sequenzvergleich von Kohl-PLD2 und *Streptomyces species*-PLD wurden die Enzymvarianten Q334S (Aminosäureaustausch innerhalb des ersten HKD-Motives) und S664H (Aminosäureaustausch innerhalb des zweiten HKD-Motives) abgeleitet (**Abbildung 29**).

		1. HKD-Motiv	2. HKD-Motiv
Braol a2	332	HHQRIVVVDS (321)	VHSKMMIVDD 671
Stran	214	NSKLLVVDG (265)	LHHKLVSVDD 497
Strsp	169	NSKLLVVDG (269)	QHHKLVSVDS 456

**Abbildung 29: Alignment der PLD-Primärstrukturen von *Brassica oleracea*, *Streptomyces antibioticus* und *Streptomyces species* innerhalb des 1. und 2. HKD-Motives.** Blau, identische und ähnliche Aminosäuren; rot markiert, HKD der katalytischen Motive; schwarz, differierende Aminosäuren; gelb markiert, Positionen der Aminosäureaustausche Q334S und S664H. Species-Kurzformen: *Braol*, *Brassica oleracea*; *Stran*, *Streptomyces antibioticus*; *Strsp*, *Streptomyces species*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2.

Die Bereiche der beiden HKD-Motive sind die einzigen Regionen der Primärstrukturen pflanzlicher und *Streptomyces*-PLDs, die sich in Form eines Alignments miteinander vergleichen lassen. Ansonsten ist der Grad der Übereinstimmung zwischen diesen Sequenzen sehr gering (< 20 %). Dieser Vergleich ist von besonderem Interesse, da zum einen nur von der PLD aus *Streptomyces species* eine Kristallstruktur vorhanden ist und zum anderen *Streptomyces*-PLDs prädestiniert für die Umesterung von Glycerophospholipiden zu sein scheinen. Dies zeigen auch vergleichende Studien zwischen Kohl-PLD und *Streptomyces species*-PLD von Hirche und Ulbrich-Hofmann (2000), die zum Beispiel im Zweiphasensystem Diethylether/Acetat-Puffer mit PC als Substrat und Glycerol als Akzeptoralkohol eine Transphosphatidylierungsaktivität  $v_T = 1,12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  für Kohl-PLD und  $v_T = 32,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  für *Streptomyces species*-PLD messen konnten.

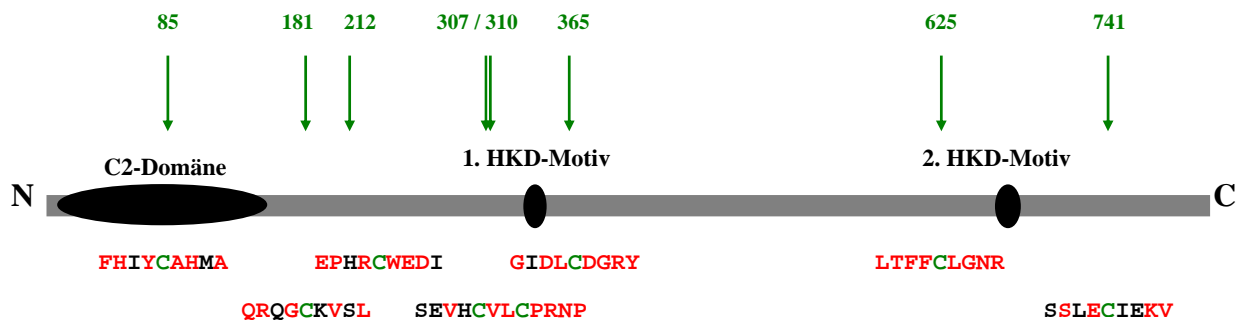
### 5.2.1.2 Bedeutung des C-Terminus für die Katalyse

Mutationsstudien an Säuger-PLDs wiesen auf eine wesentliche Bedeutung des C-terminalen Bereiches, insbesondere der C-terminalen Aminosäure, bei der Stabilisierung der funktionellen Konformation des aktiven Zentrums hin (Sung et al., 1999; Xie et al., 2000 und Liu et al., 2001). Aufgrund der hohen Konservierung des C-Terminus innerhalb der tierischen PLDs und auch innerhalb der pflanzlichen PLDs (multiples Alignment im **Anhang A3**) im Gegensatz zu den mikrobiellen PLDs war es von Interesse, die Bedeutung des C-Terminus pflanzlicher  $\alpha$ -Typ-PLDs für deren Aktivität zunächst durch systematische Deletion des C-Terminus sowie durch Anfügen einer zusätzlichen Aminosäure zu überprüfen. Daraus ergaben sich die Deletionsmutanten  $\Delta 812$ ,  $\Delta 808-812$ ,  $\Delta 804-812$  und  $\Delta 801-812$  sowie die Enzymvariante PLD2+S. Um Aufschluss über den Charakter der Wechselwirkungen des C-Terminus mit dem aktiven Zentrum zu erhalten, wurde die C-terminale Aminosäure gegen Gly, Ala, Val, Ser, Cys, Asp, Asn, Lys, Arg, Phe bzw. Tyr ausgetauscht (T812G, T812A, T812V, T812S, T812C, T812D, T812N, T812K, T812R, T812F und T812Y).

### 5.2.1.3 Bedeutung der Cystein-Reste für die PLD-Aktivität

Eine bisher in der Literatur kaum beachtete Gemeinsamkeit der pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs ist die Präsenz von 8 hoch-konservierten Cystein-Resten (multiples Alignment im **Anhang A3**). Indem die einzelnen Cystein-Reste der Kohl-PLD2 (**Abbildung 30**) durch Serin-Reste ausgetauscht wurden, sollte eine mögliche Bedeutung der Cystein-Reste für die enzymatische Aktivität ermittelt werden. Der Austausch der Cystein- durch Serin-Reste wurde gewählt, da Serin dem Cystein strukturell sehr ähnlich ist und vorhandene Wasserstoffbrückennetzwerke im Gegensatz zu einer Substitution durch Alanin nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Die

daraus resultierenden Enzymvarianten sind C85S, C181S, C212S, C307S, C310S, C365S, C625S und C741S.



**Abbildung 30: Überblick über die Cystein-Reste der PLD2 aus Weißkohl.** Grün, Positionen der Cystein-Reste; rot, den Cystein-Resten benachbarte, in den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs konservierte Aminosäure-Reste; schwarz, den Cystein-Resten benachbarte, in den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs differierende Aminosäure-Reste.

### 5.2.2 Mutagenese und Expression der Kohl-PLD2-Enzymvarianten

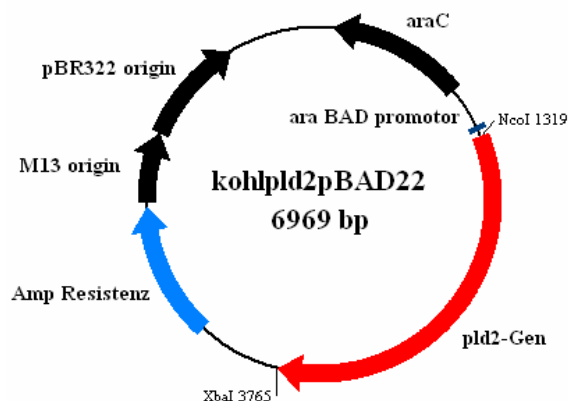
Als Matrize zur Einführung der Mutationen diente in Abhängigkeit vom gewählten Expressionssystem das Plasmid Kohl*pld2*pRSET5a (Wildtyp-Plasmid; 3.7) bzw. das Plasmid Kohl*pld2*pET-28b(+) (Wildtyp-Plasmid; 5.2.3.3). Die Verwendung von den Wildtyp-Plasmiden abweichenden Plasmiden ist unter Punkt 3.6 vermerkt. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde wie unter 4.6 beschrieben mit den unter 3.6 angegebenen Oligonucleotiden durchgeführt. Alle erzeugten Varianten wurden durch Sequenzierung des kompletten *pld2*-Gens überprüft (4.12). Die PLD2-Enzymvarianten im pRSET5a-Vektor wurden anschließend im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)+pUBS520 in Analogie zum Wildtyp-Enzym exprimiert (4.13.1; Schäffner et al., 2002), die PLD2-Enzymvarianten im pET-28b(+)-Vektor im *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS entsprechend des neu etablierten Expressionssystems (4.13.2; neues Expressionssystem unter 5.2.3.3). Die Wahl eines neuen Expressionssystems (5.2.3) war nach unerwarteten Schwierigkeiten bei der Expression einiger Kohl-PLD2-Enzymvarianten im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)+pUBS520 notwendig geworden. Aufgrund einer ungenügenden Stabilität des *pld2*-tragenden Plasmids kam es zum einen immer wieder zu Problemen bei der Anzucht der Vor- und Hauptkulturen und zum anderen zur Produktion von aktivem und inaktivem Protein ein- und derselben Enzymvariante.

## 5.2.3 Klonierungs- und Expressionsstudien von Kohl-PLD2 zur Etablierung eines neuen Expressionssystems

### 5.2.3.1 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pBAD22-Vektor

Der pBAD22-Vektor, konstruiert von Guzman et al. (1995), enthält den schwach transkribierenden *araBAD*-Promotor des Arabinoseoperons und sein regulatorisches Gen *araC*. Die Transkriptionsrichtung von *araC* verläuft entgegengesetzt zu der von *araBAD*.

Die Klonierung des Kohl-*pld2*-Gens in den pBAD22-Vektor erfolgte mit den Restriktionsendonucleasen *Nco I* und *Xba I*. Zur Herstellung des Expressionskonstruktes *Kohlpld2pBAD22* wurde in dem Plasmid *Kohlpld2pRSET5a* mittels ortsgerichteter Mutagenese die sich im Gen befindliche *Nco I*-Schnittstelle entfernt und N-terminal die für die Klonierung notwendige *Nco I*-Schnittstelle bzw. C-terminal die *Xba I*-Schnittstelle erzeugt ( $\Delta$ ncopl<sub>2</sub> fw/rv, mutnco fw/rv, mutxba fw/rv, 3.6). Nach Sequenzierung des so veränderten Plasmids wurde es ebenso wie der pBAD22-Vektor mit den Restriktionsendonucleasen *Nco I* und *Xba I* verdaut. Das *pld2*-Gen wurde wie unter 4.9 beschrieben in den linearisierten, dephosphorylierten pBAD22-Vektor ligiert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Im Anschluss an die Sequenzierung des so erhaltenen Expressionskonstruktes *Kohlpld2pBAD22* (**Abbildung 31**) wurde es in den *E. coli*-Stamm TOP 10 transformiert.



**Abbildung 31: Expressionskonstrukt *Kohlpld2pBAD22*.**

Für die Expression des Konstruktes *Kohlpld2pBAD22* wurden die folgenden Parameter variiert:

- Temperatur (25°C; 37°C)
- Induktorkonzentration (L-Arabinose: 0,00002 bis 0,2 %)
- Induktionszeitraum (0 bis 12 h)
- Repression mit D-Glucose (0,1 %ig).

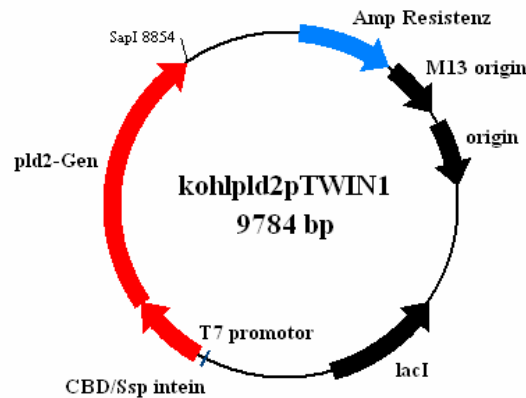


Die anderen Expressionsparameter wurden konstant gehalten (Expressionsstamm *E. coli* TOP10; Kulturmedium: LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin; Induktionszeitpunkt OD<sub>600nm</sub>: 0,6). Zur Kontrolle des Expressionsverlaufes wurden Proben entnommen und die Zellen mit Zellysepuffer (B-PERII Bacterial Protein Extraction Reagent, Pierce) aufgeschlossen. Der lösliche Proteinanteil wurde mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Technik mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern analysiert und auf PLD-Aktivität getestet. Lediglich bei einer Expressionstemperatur von 25°C und einer Induktion mit 0,2 % L-Arabinose wurde Kohl-PLD2 in aktiver Form exprimiert. Da bei Zusatz von 0,1 % D-Glucose zum Medium unter ansonsten gleichen Expressionsbedingungen kein Protein mit PLD-Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist die oben beschriebene Expression der Kohl-PLD2 vermutlich auf eine Basalexpression zurückzuführen. Auch alle anderen Expressionskulturen lieferten kein Protein mit PLD-Hydrolyseaktivität sowie keine erkennbaren Banden entsprechender Größe im SDS-PAGE-Gel bzw. im Western-Blot.

### 5.2.3.2 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pTWIN I-Vektor

Die Fusion eines hydrophoben, zur Bildung von *inclusion bodies* neigenden Proteins mit einem hydrophilen Protein verhindert oftmals die Aggregation. Der pTWIN1-Vektor erlaubt die translationale Fusion eines Intein-tags am N- und/oder C-Terminus des Zielproteins. An jedes Intein ist zudem eine Chitin-Bindungsdomäne fusioniert, die für eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie genutzt werden kann. Das Ziel-Protein kann durch pH- bzw. Temperaturänderung (N-terminales Fusionsprotein) bzw. durch niedermolekulare Thiolverbindungen (C-terminales Fusionsprotein) vom Intein abgespalten werden.

Zur Herstellung des Expressionskonstruktes Kohl*pld2*pTWIN1 wurden die zwei für die Klonierung erforderlichen *Sap I*-Restriktionsschnittstellen mittels PCR (4.4; 4. PCR-Ansatz) mit dem Plasmid Kohl*pld2*pRSET5a als Template unter Verwendung der flankierenden Primer pTWIN1 fw und pTWIN1 rv angefügt. Nach Isolierung des PCR-Produktes aus dem Agarosegel und Restiktionsverdau mit *Sap I* wurde das *pld2*-Gen in den mit *Sap I* linearisierten, dephosphorylierten Vektor pTWIN1 ligiert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Eine Selektion positiver Klone erfolgte durch Restiktionsverdau der erhaltenen Plasmide mit *Sap I* unter Berücksichtigung der Tatsache, dass durch die Klonierung eine der zwei *Sap I*-Schnittstellen eliminiert wurde. Bei Verwendung dieser Klonierungsstrategie ist nur die translationale Fusion eines Intein-tags am N-Terminus der PLD möglich. Die korrekte DNA-Sequenz des Expressionskonstruktes Kohl*pld2*pTWIN1 (**Abbildung 32**) wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Das Konstrukt wurde nachfolgend in die entsprechenden *E. coli*-Stämme transformiert.



**Abbildung 32: Expressionskonstrukt Kohlpld2pTWIN1.** CBD, Chitin-Bindungsdomäne von *Bacillus circulans*; Ssp intein, Intein von *Synechocystis sp.*

Die folgenden Parameter wurden bei der Überexpression des Konstruktes Kohlpld2pTWIN1 variiert:

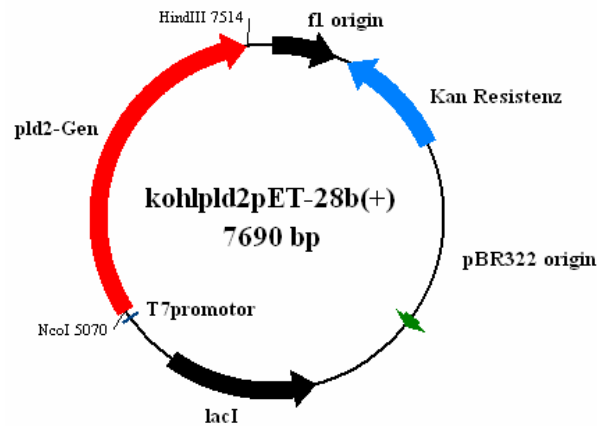
- Induktorkonzentration (IPTG: 25 bis 500  $\mu\text{M}$ )
- Induktionszeitraum (0 bis 20 h)
- *E. coli*-Expressionsstamm (ER 2566; BL21(DE3); BL21(DE3)+pUBS520; Rosetta(DE3)pLysS).

Die anderen Expressionsparameter wurden konstant gehalten (Kulturmedium: LB-Medium, 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin, 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin bei pUBS520, 25  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol bei pLysS; Induktionszeitpunkt  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ : 0,6; Temperatur: 15°C). Zur Verfolgung des Verlaufes der Expression wurden Zellproben entnommen und mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Technik analysiert und auf PLD-Aktivität getestet. Unabhängig vom Expressionsstamm wurde in allen Expressionskulturen Kohl-PLD2 ohne N-terminales Intein in geringen Mengen in löslicher Form exprimiert. Das Fusionskonstrukt Intein-PLD2 konnte weder im SDS-PAGE-Gel noch mittels Western-Blot detektiert werden. Das spricht für eine *in-vivo*-Spaltung, deren optimale Bedingungen für das N-terminale Intein mit einem pH-Wert von 7 und einer Temperatur von 25°C vom Hersteller angegeben sind. Die gemessenen sehr geringen PLD-Hydrolyseaktivitäten lagen im Fehler der Methode.

### 5.2.3.3 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pET-28b(+)-Vektor und Lactose-Permease-mutierten *E. coli*-Stämmen

Die Expression in den Lactose-Permease-mutierten *E. coli*-Stämmen Rosetta(DE3) und Rosetta(DE3)pLysS ermöglicht die Kontrolle des Expressionsniveaus durch die Induktorkonzentration. Durch die lacY1-Mutation wird der aktive Transport von Lactose in die Zellen unterbunden. Aufgrund der so erhöhten Sensitivität dieser Stämme gegenüber Lactose im Medium ist eine gleichmäßigere Aufnahme von IPTG in die Zellen einer Population gegeben. Die Rosetta-*E. coli*-Stämme ermöglichen zudem die Expression von eukaryotischen Proteinen, die selten in *E. coli* verwendete Codons enthalten (Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Kane, 1995; Kurland et al., 1996), indem sie die tRNAs für die Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA mittels eines kompatiblen, eine Chloramphenicolresistenz vermittelnden Plasmid liefern. Diese Expressionsstämme werden bevorzugt mit pET-Expressionsvektoren, konstruiert von Studier und Mofatt (1986), Studier et al. (1990) sowie Rosenberg et al. (1987), verwendet (pET: plasmid for expression by T7 RNA polymerase). Bei der Wahl des pET-Expressionsvektors wurde auf eine Kanamycin-Resistenz geachtet, da die Selektion mit Ampicillin in Expressionskulturen nicht so effizient ist, weil die von den Zellen sekretierte  $\beta$ -Lactamase sowie der pH-Abfall während des Expressionsverlaufes zum Abbau des Ampicillins führen. In Kan-pET-Vektoren ist außerdem die Transkriptionsrichtung des Resistenzgens entgegengesetzt zum T7-Promotor, so dass bei Induktion des T7-Promotors keine Erhöhung des Kan-Gen-Produktes erfolgt. In den meisten Amp-pET-Vektoren liegt das  $\beta$ -Lactamase-Gen downstream und in derselben Orientierung wie der T7-Promotor.

Um das Kohl-*pld2*-Gen über *Nco I*/*Hind III*-Schnittstellen in den pET-28b(+)-Vektor klonieren zu können, wurde im Plasmid Kohl*pld2*pRSET5a zunächst durch ortsgerichtete Mutagenese die sich im Gen befindliche *Nco I*-Schnittstelle entfernt und N-terminal die für die Klonierung notwendige *Nco I*-Schnittstelle erzeugt ( $\Delta$ ncopl*d2* fw/rv, mut*nco* fw/rv, 3.6). Nach Sequenzierung des so veränderten Plasmids wurde es ebenso wie der pET-28b(+)-Vektor mit den Restriktionsendonucleasen *Nco I* und *Hind III* verdaut. Nach Isolierung des *pld2*-Gens sowie des linearisierten Vektors aus dem Agarosegel wurde der Vektor dephosphoryliert und anschließend die Insert-DNA in den Vektor, wie unter 4.9 beschrieben, ligiert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Das Expressionskonstrukt Kohl*pld2*pET-28b(+) (**Abbildung 33**) wurde nach Bestätigung der korrekten DNA-Sequenz durch Sequenzierung in die entsprechenden *E. coli*-Expressionsstämme transformiert.



**Abbildung 33: Expressionskonstrukt Kohlpld2pET-28b(+).**

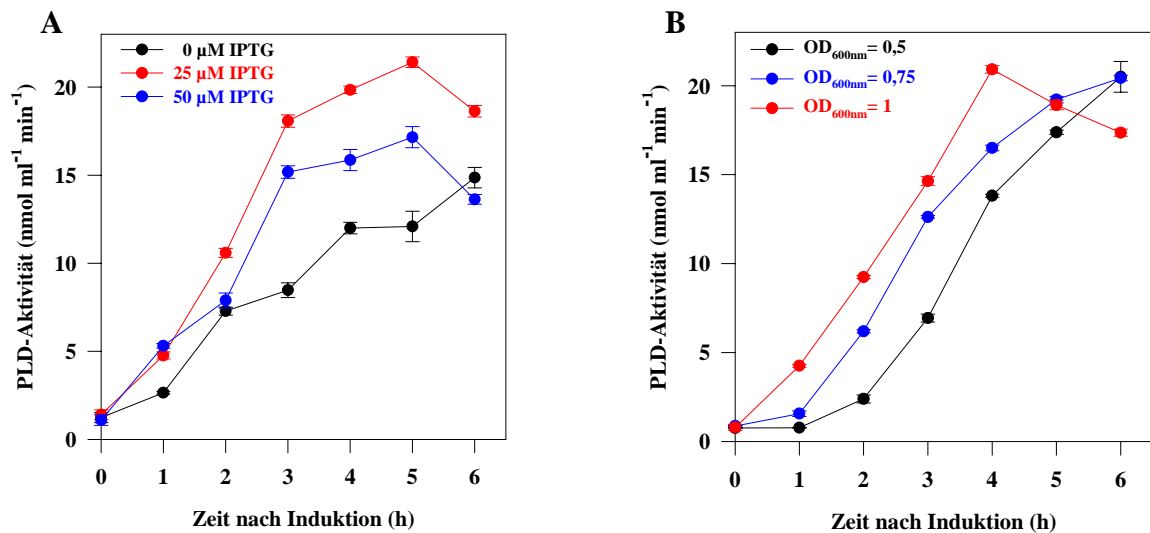
Zur Optimierung der Überexpression des Konstruktes Kohlpld2pET-28b(+) wurden folgende Parameter variiert:

- Temperatur (25°C, 37°C)
- Induktorkonzentration (IPTG: 25 bis 500 µM)
- Induktionszeitraum (0 bis 6 h)
- Induktionszeitpunkt (OD<sub>600</sub>: 0,5 bis 1)
- *E. coli*-Expressionsstamm (Rosetta(DE3); Rosetta(DE3)pLysS).

Das Kulturmedium (LB-Medium, 10 µg/ml Kan, 25 µg/ml Cm) wurde für alle Expressionsversuche gleich gewählt. Zur Verfolgung des Expressionsverlaufes wurden Zellproben mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Technik analysiert und auf hydrolytische PLD-Aktivität getestet.

In den bei 37°C angezogenen Expressionskulturen ist die PLD in Form von *inclusion bodies* akkumuliert worden. Nach Schein et al. (1988) ist es möglich, durch eine Temperaturerniedrigung die Ausbeute an löslichen rekombinanten Proteinen zu verbessern. Auch in diesem Fall konnte durch ein Absenken der Kultivierungstemperatur von 37°C auf 25°C die Kohl-PLD2 erfolgreich in löslicher Form im Cytosol von Rosetta(DE3)-Zellen exprimiert werden. Die Induktion der Expression erfolgte dabei mit 25 bzw. 50 µM IPTG, aber auch ohne Induktion wurde Kohl-PLD2 gebildet. Eine weitere Erhöhung der IPTG-Konzentration führte zu einer Bildung von *inclusion bodies*. Durch Verwendung des *E. coli*-Stammes Rosetta(DE3)pLysS wurde versucht, die beobachtete Basalexpression zurückzudrängen, da das in diesem Stamm vorhandene, die Chloramphenicolresistenz vermittelnde Plasmid pLysS geringe Mengen an T7-Lysozym, einem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase (Mofatt et al., 1987; Studier, 1991) liefert. **Abbildung 34A** zeigt, dass

sich die Basalexpression auch in diesem Stamm nur zum Teil unterdrücken ließ. Eine IPTG-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  erwies sich als optimal für die Expression von Kohl-*pld2*-pET-28b(+) in Rosetta(DE3)pLysS bei 25°C. Der Induktionszeitpunkt besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Expression der Kohl-PLD2 (**Abbildung 34B**). Das PLD-Aktivitätsmaximum ist bei allen 3 gezeigten Expressionskulturen ähnlich, die höchste Expressionsrate wird jedoch bei den bei einer höheren optischen Dichte induzierten Zellen schon nach 4 Stunden erreicht.

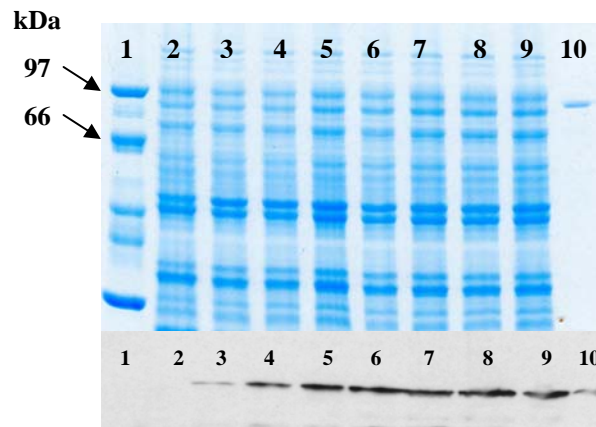


**Abbildung 34: Hydrolyseaktivität der Kohl-PLD2 im Verlauf der Expression von Kohl-*pld2*-pET-28b(+) in Rosetta(DE3)pLysS bei 25°C.** A: Einfluss der IPTG-Konzentration (Induktion bei  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,8$ ); B: Einfluss des Induktionszeitpunktes (Induktion mit 25  $\mu\text{M}$  IPTG). Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

Die optimierten Bedingungen für das neu etablierte Expressionssystem zur Expression von Kohl-PLD2 in aktiver, löslicher Form lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (4.13.2):

- Expressionsvektor: pET-28b(+)
- Expressionsstamm: Rosetta(DE3)pLysS
- Kulturmedium: LB-Medium, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kan, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cm
- Kultivierungstemperatur: 25°C
- Induktion: mit 25  $\mu\text{M}$  IPTG bei  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$  für einen Zeitraum von 4 h.

In **Abbildung 35** ist der Verlauf der Expression der Kohl-PLD2 im neu etablierten Expressionssystem anhand des SDS-PAGE-Geles (oben) bzw. des entsprechenden Western-Blots (unten) gezeigt.



**Abbildung 35: Verlauf der Expression der Kohl-PLD2.** SDS-PAGE-Gel (oben) und Western-Blot (unten): Bahn 1: LMW-Marker; Bahn 2: Expression des Vektors pET-28b(+) ohne *pld*-Gen (Negativkontrolle); Bahnen 3 bis 9: Expression der Kohl-PLD2 0, 45, 90, 135, 180, 225 und 270 min nach Induktion; Bahn 10: 0,5  $\mu$ g Kohl-PLD2 (Positivkontrolle).

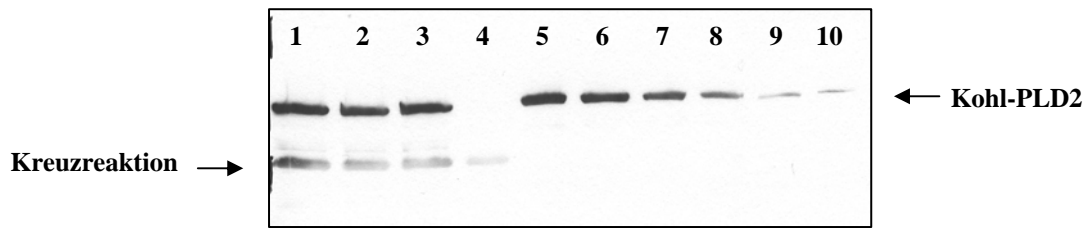
#### 5.2.4 Reinigung von Kohl-PLD2 sowie der Kohl-PLD2-Enzymvarianten

In Abhängigkeit von der gewählten Expressionsmethode und der Aktivität des Enzyms wurden für die Reinigung der Kohl-PLD2 und deren Varianten verschiedene Methoden angewendet, die im Folgenden näher dargestellt werden.

##### 5.2.4.1 Reinigung der in *E. coli* BL21(DE3)+pUBS520 exprimierten Enzyme

Nach Zellaufschluss (4.14.1) und Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurden die Kohl-PLD2 sowie die Kohl-PLD2-Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M, S664H, T812A, T812C, T812N, T812S, T812V, C85S, C181S, C212S, C307S, C310S, C365S und C741S mittels Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie (4.14.2) und anschließender Anionenaustauschchromatographie (4.14.3.1) bis zur Homogenität gereinigt (Standardreinigungsprotokoll). Die Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Assay (4.15.1) bestimmt.

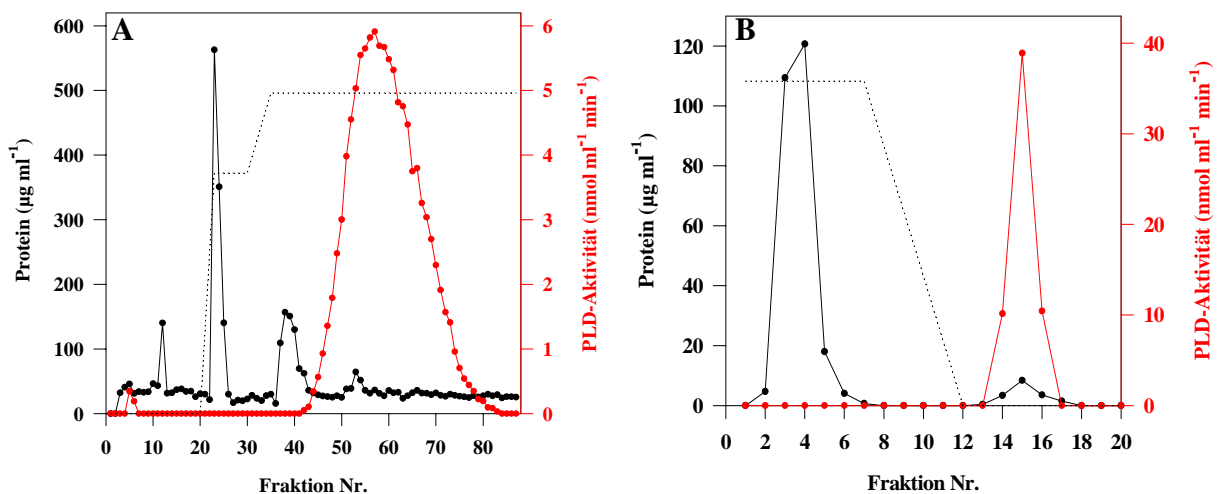
Die Kohl-PLD2-Enzymvarianten K335R, D340E, Q334S, H663D, K665R, D670E,  $\Delta$ 808-812,  $\Delta$ 804-812,  $\Delta$ 801-812, T812D, T812F, T812G, T812K, T812R und T812Y konnten aufgrund ihrer Inaktivität bzw. äußerst geringen Aktivität nicht mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie gereinigt werden, da inaktive Enzymvarianten nicht in der Lage sind, in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Octyl-Sepharose zu binden, wie bereits unter Punkt 5.1.4 diskutiert. In diesem Fall wurde der Rohextrakt für die Aktivitätsbestimmungen verwendet. Um auch für diese Enzymvarianten eine spezifische Aktivität angeben zu können, wurden die Proteinkonzentrationen im Rohextrakt mittels Western-Blot bestimmt (4.15.3). In **Abbildung 36** ist exemplarisch der Western-Blot für die Kohl-PLD2-Enzymvariante  $\Delta$ 808-812 dargestellt.



**Abbildung 36: Western-Blot zur Proteinbestimmung der Kohl-PLD2-Variante  $\Delta 808-812$ .** Bahnen 1-3: Rohextrakt von  $\Delta 808-812$ ; Bahn 4: Rohextrakt pRSET5a (Negativkontrolle); Bahnen 5 bis 10: Kohl-PLD2-Standard 3  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 1,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,2  $\mu\text{g}$ .

#### 5.2.4.2 Reinigung der in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS exprimierten Enzyme

Für die Reinigung der im *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS exprimierten Kohl-PLD2 konnte das unter 5.2.4.1 beschriebene Standardreinigungsprotokoll nicht zur Anwendung gebracht werden, da bei der für die chromatographische Reinigung an Octyl-Sepharose erforderlichen Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zum Rohextrakt die PLD-Aktivität durch Copräzipitation der PLD mit cytosolischen Fremdproteinen verloren ging. Es wurde deshalb versucht, durch Anionenaustauschchromatographie (4.14.3.2) die für die starke Präzipitation bei der  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe verantwortlichen Substanzen abzutrennen. Das Chromatogramm (**Abbildung 37A**) zeigt, dass durch diesen Schritt ein wesentlicher Reinigungseffekt erzielt werden konnte. Die aktiven Elutionsfraktionen wurden vereinigt, konzentriert und dialysiert (4.14.5).



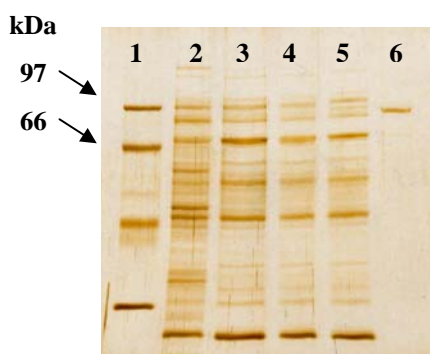
**Abbildung 37: Reinigung von Kohl-PLD2 mittels Q-Sepharose (A) und Octyl-Sepharose (B).** Schwarz, Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay; rot, Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Assay; A: gestrichelt, NaCl-Gradient (unteres Niveau: 0 M, mittleres Niveau: 0,15 M, oberes Niveau: 0,2 M); B: gestrichelt,  $\text{CaCl}_2$ -Gradient (oberes Niveau: 50 mM, unteres Niveau: 0 mM).

Nach diesem Schritt konnte der teilgereinigten Proteinlösung  $\text{CaCl}_2$  für die nachfolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie zugegeben werden (4.14.2), ohne dass durch Präzipitation bzw. Copräzipitation ein erheblicher Aktivitätsverlust auftrat (**Tabelle 6**). Das Reinigungsprofil der sich anschließenden hydrophoben Interaktionschromatographie in **Abbildung 37B** zeigt die erwartete selektive und konzentrierte Elution

von Kohl-PLD2 nach Entfernung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. **Abbildung 38** dokumentiert den Verlauf der Reinigung in einem SDS-PAGE-Gel. Aus 200 ml Expressionskultur konnten mit der in **Tabelle 6** zusammengefassten Reinigungsprozedur 22  $\mu\text{g}$  Kohl-PLD2 in aktiver und elektrophoretisch einheitlicher Form isoliert werden.

**Tabelle 6: Quantifizierung der Reinigungsprozedur für Kohl-PLD2.** Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Ausbeute (%)	Reinheitsgrad
Rohextrakt	97,370	0,5963	$6,124 \cdot 10^{-3}$	100	1
Q-Sepharose	12,517	0,5502	0,0439	92	7
Konz./ Dialyse	8,589	0,4732	0,0551	79	9
$\text{CaCl}_2$ -Zugabe	7,135	0,4453	0,0624	75	10
Octyl-Sepharose	0,022	0,2971	13,5	50	2204



**Abbildung 38: SDS-PAGE-Gel der Reinigung von Kohl-PLD2.**

Bahn 1: LMW-Marker  
 Bahn 2: Rohextrakt  
 Bahn 3: nach Q-Sepharose  
 Bahn 4: nach Konzentrierung/Dialyse  
 Bahn 5: nach  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe  
 Bahn 6: nach Octyl-Sepharose

Die Kohl-PLD2-Enzymvarianten C625S und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/ $\Delta$ 351/ $\Delta$ 352/M356V wurden in Analogie zu Kohl-PLD2 nach der obigen Reinigungsprozedur gereinigt. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Assay (4.15.1) bestimmt.

Da die Rohextrakte der inaktiven bzw. gering aktiven Kohl-PLD2-Enzymvarianten H333D,  $\Delta$ 812 und PLD2+S, die ebenfalls in Rosetta(DE3)pLysS-Zellen zur Expression gebracht wurden, aufgrund des oben beschriebenen Calcium-Copräzipitationseffektes nicht direkt für die Aktivitätsmessungen, die in Anwesenheit von 120 mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt werden, eingesetzt werden konnten, wurden die störenden Verunreinigungen mittels Ammoniumsulfatfällung (4.14.6) erfolgreich abgetrennt. Nach Dialyse standen die

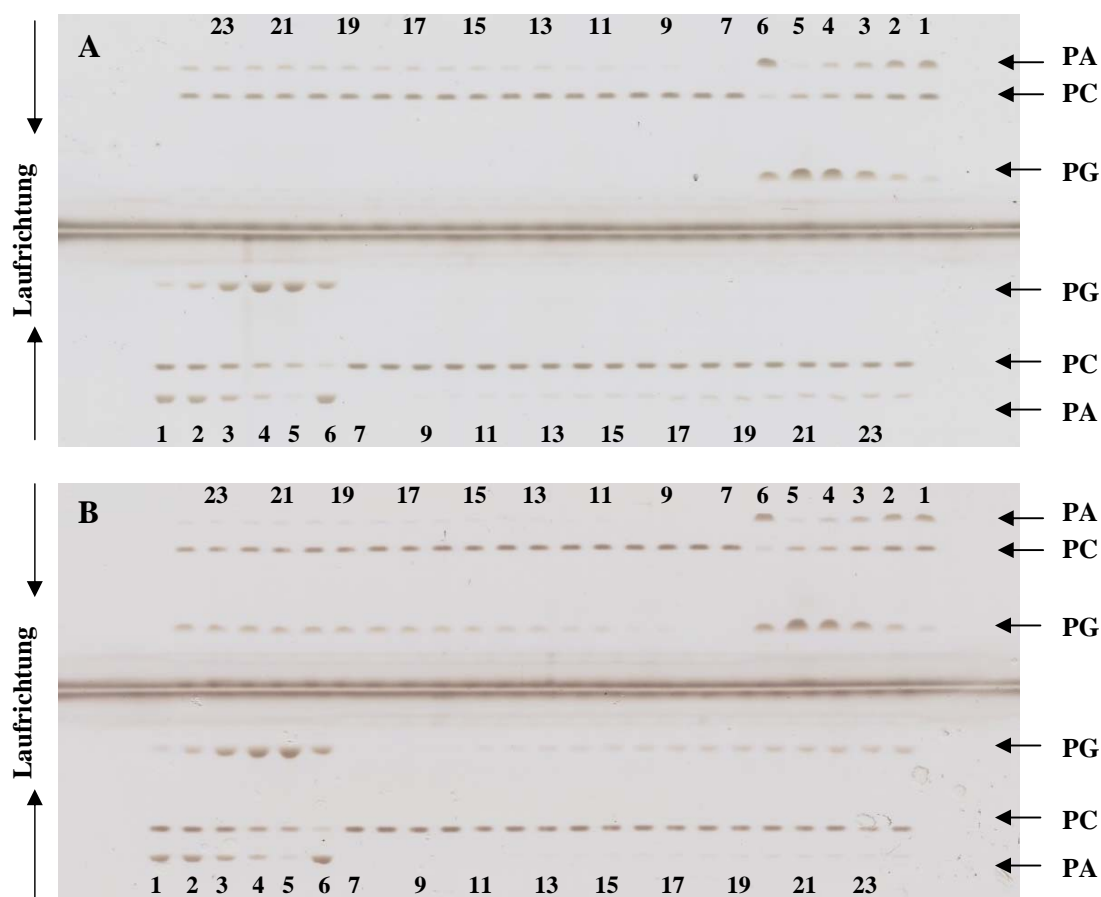


Proteinlösungen sowohl für die Bestimmung der Aktivitäten als auch der Proteinkonzentrationen mittels Western-Blot (4.15.3) zur Verfügung.

## 5.2.5 Biochemische Charakterisierung der Kohl-PLD2-Enzymvarianten

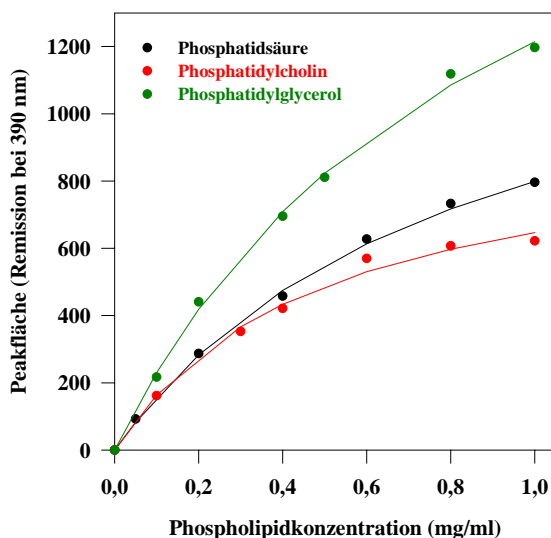
### 5.2.5.1 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem

Die Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität von Kohl-PLD2 und der Kohl-PLD2-Varianten erfolgte nach Hirche et al. (1997) im Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer mit SPC als Substrat und mit Glycerol als Akzeptoralkohol (4.18.2). **Abbildung 39** zeigt exemplarisch die Verfolgung von Hydrolysereaktionen in Abwesenheit von Glycerol (**A**) und von Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsreaktionen in Anwesenheit von Glycerol (**B**) auf einer HPTLC-Platte für die durch die Kohl-PLD2 katalysierten Reaktionen.



**Abbildung 39: Verfolgung von Hydrolyse- und von Transphosphatidylierungsreaktionen auf einer HPTLC-Platte.** A: Hydrolyse in Abwesenheit von Glycerol; B: Hydrolyse und Transphosphatidylierung in Anwesenheit von Glycerol. Doppelbestimmung mit Kohl-PLD2; Bahnen 1 bis 6: Standardmischungen 1 bis 6 (4.18.2.2); Bahnen 7 bis 24: Hydrolysereaktion (A) bzw. Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsreaktion (B) [7/ 8: 0 min; 9/10: 5 min; 11/12: 10 min; 13/14: 15 min; 15/16: 20 min; 17/18: 25 min; 19/20: 30 min; 21/22: 35 min; 23/24: 40 min].

Anhand der Standardmischungen 1 bis 6 (4.18.2.2) wurden für jede HPTLC-Platte Eichfunktionen (densitometrisch bestimmte Peakflächen versus Phospholipidkonzentrationen) zur Auswertung der Hydrolyse- bzw. Transphosphatidierungsreaktionen erstellt (**Abbildung 40**).



**Abbildung 40: Abhängigkeit der densitometrisch bestimmten Peakfläche von der Phospholipidkonzentration.** Die Anpassung erfolgte entsprechend der Gleichung  $y = a x / (b + x)$ .

Im Folgenden soll die Darstellung der mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse und deren Diskussion gegliedert nach den veränderten Regionen erfolgen, d.h. die Bereiche des ersten und zweiten HKD-Motives (5.2.1.1; rot), der hoch-konservierte C-Terminus (5.2.1.2; blau) und die 8 ebenfalls hoch-konservierten Cystein-Reste (5.2.1.3; grün) werden separat betrachtet.

In **Tabelle 7** (Bereiche der HKD-Motive), **Tabelle 8** (C-Terminus) und **Tabelle 9** (Cystein-Reste) sind die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse- und Transphosphatidierungsreaktionen der Kohl-PLD2-Varianten für die Hydrolyse in Abwesenheit von Glycerol ( $v_H$ ), für die Transphosphatidierung ( $v_T$ ) und für die Hydrolyse als Konkurrenzreaktion ( $v_{HK}$ ) sowie das Transphosphatidierungspotential ( $v_T/v_{HK}$ ) angegeben.

#### *Bereiche des ersten und zweiten HKD-Motives*

Der vollständige Aktivitätsverlust der Enzymvarianten **H333D**, **K335R**, **D340E**, **H663D**, **K665R** und **D670E** (**Tabelle 7**) zeigt, dass beide HKD-Motive auch für die katalytische Aktivität der pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs erforderlich sind. Unter der Annahme, dass das aktive Zentrum der Kohl-PLD2 ähnlich dem der PLD aus *Streptomyces species* (2.5) aufgebaut ist, wurde in der Enzymvariante H333D durch die Substitution des Histidins durch Aspartat wahrscheinlich der nucleophile Angriff des Imidazol-Stickstoffs am Phosphoratom des

Phospholipid-Substrates unterbunden, bei der Enzymvariante H663D kann durch den Austausch vermutlich die Funktion als Säure bei der Protonierung des Sauerstoffs zur Freisetzung der polaren Kopfgruppe nicht mehr gewährleistet werden. Die Lysin-Reste (335 und 665) und die Aspartat-Reste (340 und 670) der beiden HKD-Motive sind vermutlich an der Stabilisierung der Konformation des aktiven Zentrums beteiligt. Trotz Erhalts der positiven Ladung bei den Enzymvarianten K335R und K665R bzw. der negativen Ladung bei den Enzymvarianten D340E und D670E kommt es wahrscheinlich in Folge der Änderung der Orientierung und Distanz zum Proteinrückgrat zu einem vollständigen Aktivitätsverlust.

**Tabelle 7: Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse und Transphosphatidylierung für die Kohl-PLD2-Varianten im Bereich des ersten und zweiten HKD-Motives.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Initialgeschwindigkeiten ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )			
	$v_H$	$v_T$	$v_{HK}$	$v_T / v_{HK}$
Kohl-PLD2	$3,30 \pm 0,13$	$3,11 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,43$
<b>T264D</b>	<b><math>6,80 \pm 0,48</math></b>	<b><math>3,27 \pm 0,55</math></b>	<b><math>1,10 \pm 0,06</math></b>	<b><math>2,97 \pm 0,66</math></b>
<b>H333D</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>Q334S</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>K335R</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>D340E</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>V339T/E342A/V343M</b>	<b><math>3,51 \pm 0,38</math></b>	<b><math>3,19 \pm 0,13</math></b>	<b><math>0,90 \pm 0,05</math></b>	<b><math>3,54 \pm 0,34</math></b>
<b>V339T/E342A/V343M/Q346E/ G348S/G349Q/S350Q/<math>\Delta</math>351/ <math>\Delta</math>352/M356V</b>	<b><math>4,19 \pm 0,32</math></b>	<b><math>4,57 \pm 0,35</math></b>	<b><math>1,36 \pm 0,07</math></b>	<b><math>3,36 \pm 0,43</math></b>
<b>H663D</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>S664H</b>	<b><math>8,77 \pm 1,04</math></b>	<b><math>3,71 \pm 0,21</math></b>	<b><math>1,04 \pm 0,02</math></b>	<b><math>3,57 \pm 0,27</math></b>
<b>K665R</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>D670E</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>

Wie oben diskutiert, sind beide Histidin-Reste (333 und 663) der HKD-Motive am Katalysemechanismus beteiligt. Gestützt auf die Untersuchungen von Leiros et al. (2004) an PLD aus *Streptomyces species* Stamm PMF wird vermutet, dass auch bei der Kohl-PLD2 der Imidazol-Stickstoff des N-terminalen His333 für den nucleophilen Angriff am Phosphoratom des Phospholipid-Substrates verantwortlich ist. Dass der richtigen Orientierung und Distanz zu den an der Katalyse beteiligten Aminosäure-Resten des ersten HKD-Motives eine größere Bedeutung zukommt als denen des zweiten HKD-Motives, wird durch die Enzymvarianten **Q334S** und **S664H** nahe gelegt. Die substituierten Aminosäure-Reste sind zwischen dem

Histidin-Rest und dem Lysin-Rest des ersten bzw. des zweiten HKD-Motives laut der Sekundärstrukturvorhersage für Kohl-PLD2 (**Anhang A6**) jeweils in einer *Loop*-Region lokalisiert. Auch in der verfügbaren Kristallstruktur von *Streptomyces species* Stamm PMF befinden sich die beiden Aminosäure-Reste in einer *Loop*-Region. Durch die beiden aus dem Sequenzvergleich mit *Streptomyces*-PLDs abgeleiteten Substitutionen Q334S und S664H wurden vermutlich Änderungen der Struktur und Ladung erreicht, die sich bei der Enzymvariante Q334S in einem vollständigen Aktivitätsverlust äußerten (**Tabelle 7**). Die Enzymvariante S664H hingegen hat eine dem Wildtyp gegenüber um den Faktor 2,6 erhöhte Hydrolyseaktivität bzw. um den Faktor 1,2 erhöhte Transphosphatidylierungsaktivität (**Tabelle 7**). Die Hydrolyse in Konkurrenz zur Umesterung ist im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzt, das Transphosphatidylierungspotential ist dementsprechend erhöht.

Die Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V, bei denen der Aminosäureaustausch aufgrund sequentieller Besonderheiten der Mohn-PLDs im Vergleich mit etablierten pflanzlichen PLDs und unter der Annahme einer sehr ausgeprägten Transphosphatidylierungsaktivität der rekombinanten Mohn-PLDs, wie bereits unter Punkt 5.2.1.1 beschrieben, vorgenommen wurde, besitzen eine wildtypähnliche (V339T/E342A/V343M), eine 1,3-fach (V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V) bzw. eine 2-fach (T264D) erhöhte Hydrolyseaktivität in Abwesenheit von Glycerol (**Tabelle 7**). Bei der Umesterung zeigen die Enzymvarianten T264D sowie V339T/E342A/V343M wildtypähnliche Aktivitäten, bei der Hydrolyse in Anwesenheit von Glycerol jedoch eine verminderte Aktivität. Die Enzymvariante V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V weist hinsichtlich dieser Reaktion eine wildtypähnliche Aktivität auf, besitzt aber bei der Umesterungsreaktion eine um den Faktor 1,5 erhöhte Aktivität. So ist es bei allen 3 Enzymvarianten gelungen, das Transphosphatidylierungspotential geringfügig zu erhöhen. Das zeigt die Bedeutung der sich in unmittelbarer Nähe des ersten HKD-Motives befindlichen Aminosäuren für die Katalyse. Die Umgebung des ersten katalytischen Motives, wie im multiplen Alignment im **Anhang A3** zu sehen, ist wesentlich schwächer konserviert als die Umgebung des zweiten katalytischen Motives. Ogino et al. (2003) konnten anhand von Mutationsstudien an PLD aus *Streptomyces cinnamoneus* zeigen, dass durch Substitution der beiden Glycin-Reste des ersten verlängerten HKD-Motives (HxKxxxxDxxxxxxGG) durch Serin-Reste die Transphosphatidylierungsaktivität gesteigert werden kann. Interessant ist, dass die rekombinanten Mohn-PLDs im ersten verlängerten HKD-Motiv anstelle des zweiten Glycin-Restes schon über einen Serin-Rest verfügen. Diese Mutation zeigte bei der PLD aus

*Streptomyces cinnamoneus* eine 16-fach höhere Transphosphatidylierungsaktivität (Ogino et al., 2003). Bei der Enzymvariante V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/ $\Delta$ 351/ $\Delta$ 352/M356V, wo das gesamte erste verlängerte HKD-Motiv der rekombinanten Mohn-PLD1 übernommen wurde, konnte die Transphosphatidylierungsaktivität, wie bereits oben erwähnt, um den Faktor 1,5 erhöht werden.

### C-Terminus

Aus den Ergebnissen der Mutationen am C-Terminus (**Tabelle 8**) kann geschlussfolgert werden, dass die konservierten C-terminalen Aminosäuren pflanzlicher PLDs für die enzymatische Aktivität ebenfalls essentiell sind.

**Tabelle 8: Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse und Transphosphatidylierung für die Kohl-PLD2-Varianten am hoch-konservierten C-Terminus.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Initialgeschwindigkeiten ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )			
	$v_H$	$v_T$	$v_{HK}$	$v_T / v_{HK}$
Kohl-PLD2	$3,30 \pm 0,13$	$3,11 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,43$
$\Delta$ 812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
$\Delta$ 808-812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
$\Delta$ 804-812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
$\Delta$ 801-812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812D	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812K	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812R	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812F	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812Y	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812G	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
PLD2+S	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812N	$2,47 \pm 0,23$	$3,31 \pm 0,20$	$0,99 \pm 0,06$	$3,34 \pm 0,40$
T812S	$2,19 \pm 0,11$	$2,89 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,02$	$4,25 \pm 0,23$
T812C	$1,88 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$4,00 \pm 0,46$
T812A	$0,93 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	$2,64 \pm 0,17$
T812V	$8,64 \pm 1,74$	$3,78 \pm 0,64$	$1,48 \pm 0,10$	$2,55 \pm 0,60$

Schon die Entfernung der letzten Aminosäure Threonin in der Enzymvariante  $\Delta$ 812 führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Der C-Terminus scheint im Inneren des Proteins verborgen zu sein. Dafür spricht der vollständige Aktivitätsverlust bei der Einführung von

geladenen Aminosäuren (T812D, T812K und T812R), von aromatischen Aminosäuren (T812F und T812Y), der räumlich kleineren Aminosäure Glycin (T812G) sowie einer zusätzlichen Aminosäure (PLD2+S). Polare, ungeladene Aminosäuren (T812N und T812S) senken die hydrolytische Aktivität, wohingegen die Aktivität in der Umesterungsreaktion nicht so stark herabgesetzt wird. Daraus ergibt sich ein deutlich gesteigertes Transphosphatidylierungspotential. Ein drastischer Aktivitätsverlust ist allerdings bei der Umesterung der Enzymvariante T812C zu verzeichnen. Die Einführung der unpolaren, aliphatischen Aminosäure Alanin (T812A) hatte eine drastische Senkung sowohl der Hydrolyse- als auch der Transphosphatidylierungsaktivität zur Folge. Zu einer deutlichen Steigerung der hydrolytischen Aktivität führte die Einführung der unpolaren, aliphatischen Aminosäure Valin als C-terminale Aminosäure (T812V). Die in der Umesterung gemessenen Aktivitäten dagegen sind mit denen des Wildtyps, der Kohl-PLD2, vergleichbar.

Gestützt auf die oben genannten Ergebnisse kann angenommen werden, dass der C-Terminus pflanzlicher  $\alpha$ -Typ-PLDs eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der funktionellen Konformation des aktiven Zentrums wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen spielt, wie bereits für die Säuger-PLDs von Liu et al. (2001) vorgeschlagen wurde. Durch die deutliche Herabsetzung der hydrolytischen Aktivität bei der Enzymvariante T812S ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur Steigerung des Transphosphatidylierungspotentials der PLD gefunden worden.

### *Cystein-Reste*

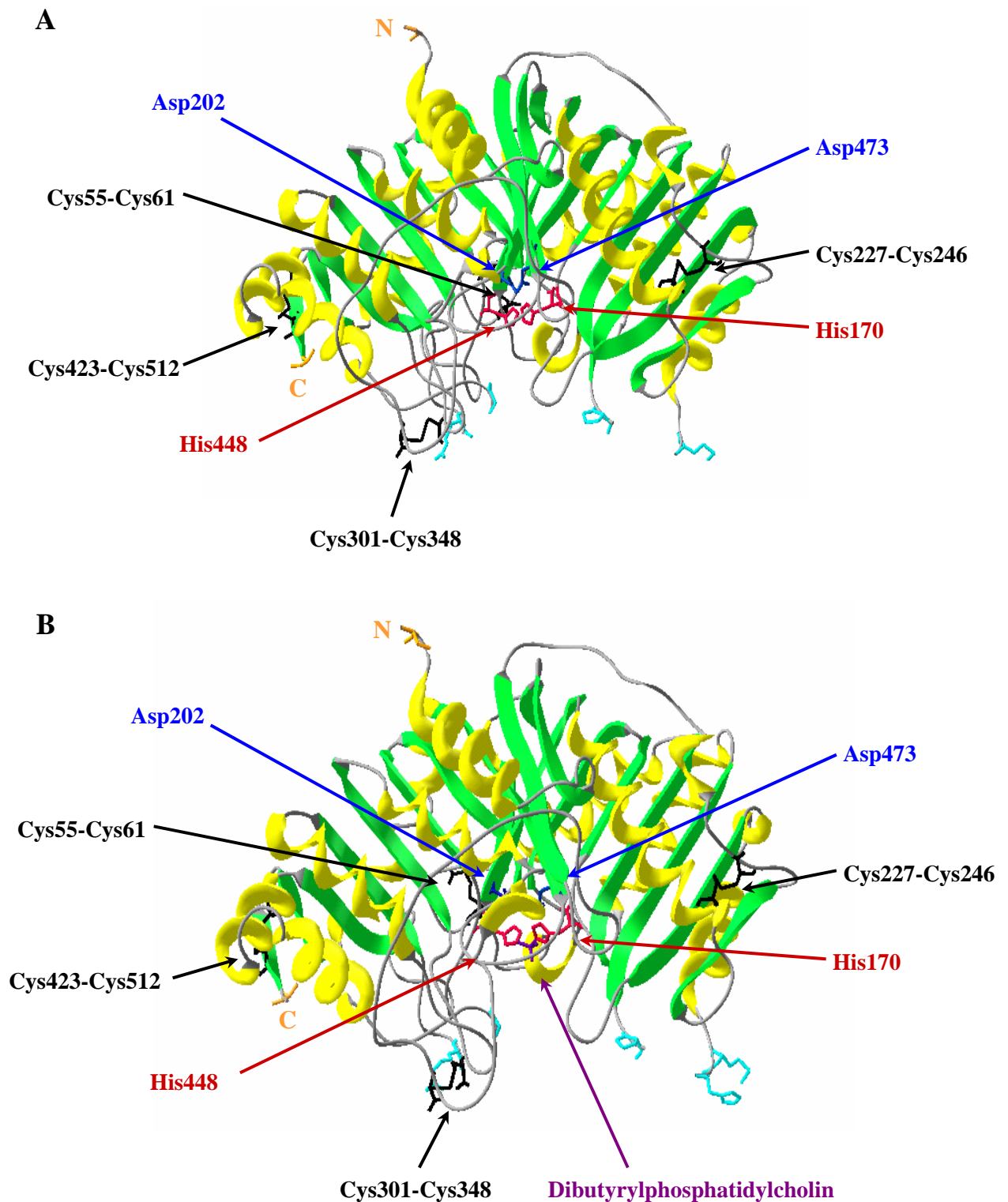
Der Austausch von einem Cystein-Rest gegen einen Serin-Rest führte in keinem Fall zum völligen Verlust der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität (**Tabelle 9**). Die Aktivität der Enzymvarianten C85S und C307S ist jedoch stark vermindert. Das könnte mit der Integration der Cystein-Reste 85 und 307 in jeweils einer  $\beta$ -Faltblattstruktur (laut Sekundärstrukturvorhersage, **Anhang A6**) zusammenhängen. Die Cysteinvarianten C365S und C741S zeigen sowohl in den Hydrolyse- als auch in Transphosphatidylierungsreaktionen beide dem Wildtyp-Enzym gegenüber verminderte Aktivitäten. Da die PA-Bildung als Resultat der Konkurrenzreaktion sehr gering ist, führt dies zu einem deutlich erhöhten Umesterungspotential. Die Enzymvarianten C181S und C212S weisen ebenfalls ein dem Wildtyp-Enzym gegenüber erhöhtes Transphosphatidylierungspotential auf, das in diesem Fall auf einer verminderten hydrolytischen Aktivität gegenüber einer wildtypähnlichen Umesterungsaktivität beruht. Eine Steigerung der Gesamtaktivität, mit leichter Präferenz für die Umesterungsaktivität, ist bei den Cysteinvarianten C310S und C625S gelungen. Es sind

überraschenderweise die Cystein-Reste, die bezogen auf die Primärstruktur den beiden katalytischen HKD-Motiven (333-340 sowie 663-670) am nächsten liegen und deren Regionen zudem am stärksten konserviert sind (**Abbildung 28**). Bei C625S konnte das Transphosphatidylierungspotential um einen Faktor von 2,8 erhöht werden.

**Tabelle 9: Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse und Transphosphatidylierung für die Kohl-PLD2-Cysteinvarianten.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Initialgeschwindigkeiten ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )			
	$v_H$	$v_T$	$v_{HK}$	$v_T / v_{HK}$
Kohl-PLD2	$3,30 \pm 0,13$	$3,11 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,43$
C85S	$0,08 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$5,25 \pm 1,63$
C181S	$2,07 \pm 0,10$	$2,25 \pm 0,15$	$0,68 \pm 0,03$	$3,31 \pm 0,37$
C212S	$2,61 \pm 0,06$	$3,12 \pm 0,10$	$0,68 \pm 0,02$	$4,59 \pm 0,28$
C307S	$0,14 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$2,38 \pm 0,43$
C310S	$4,58 \pm 0,28$	$5,93 \pm 0,95$	$1,63 \pm 0,04$	$3,64 \pm 0,67$
C365S	$1,16 \pm 0,04$	$1,17 \pm 0,10$	$0,24 \pm 0,01$	$4,88 \pm 0,63$
C625S	$6,77 \pm 0,66$	$8,70 \pm 0,63$	$1,54 \pm 0,09$	$5,65 \pm 0,74$
C741S	$1,05 \pm 0,02$	$2,02 \pm 0,09$	$0,40 \pm 0,01$	$5,05 \pm 0,36$

Aufgrund der durch den Austausch der Cystein-Reste gegen Serin-Reste erzielten signifikanten Effekte, wird eine mögliche Rolle der Cystein-Reste bei der Substrat- bzw. Akzeptorbindung in Betracht gezogen. Dies soll am Beispiel der verfügbaren Kristallstrukturen der PLD aus *Streptomyces species* Stamm PMF (Leiros et al., 2004) verdeutlicht werden, die wie die Kohl-PLD2 und die anderen *Streptomyceten*-PLDs in Besitz von 8 Cystein-Resten ist. Diese sind in *Loop*-Regionen an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert und bilden im Gegensatz zu den in reduzierter Form vorliegenden Cystein-Resten der Kohl-PLD2 (Hwang et al., 2001) vier Disulfidbrücken aus (**Abbildung 41A**). **Abbildung 41B** zeigt die Position dieser 4 Disulfidbrücken in der Kristallstruktur der PLD<sub>PMF</sub> mit dem Substrat Dibutyrylphosphatidylcholin. Durch die Substratbindung kommt es zu lokalen Änderungen der Struktur, die sich vor allen in den *Loop*-Regionen widerspiegeln. Die bisher in der Literatur nicht diskutierte Bedeutung der Cystein-Reste der PLDs basiert vermutlich auf der Stabilisierung der PLD-Struktur während der durch die Substratbindung bzw. Bindung des Wassers oder Akzeptoralkohols hervorgerufenen Konformationsänderung des Enzyms.



**Abbildung 41: Die vier Disulfidbrücken der PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF.** A: Struktur ohne Substrat (PDB Accession-Nr. 1V0S); B: Struktur mit dem Substrat Dibutylphosphatidylcholin (PDB Accession-Nr. 1V0W). N, N-Terminus; C, C-Terminus; grün,  $\beta$ -Faltblätter; gelb,  $\alpha$ -Helices; rot, Histidin-Reste der HKD-Motive; blau, Aspartat-Reste; violett, Substrat Dibutylphosphatidylcholin; schwarz, Disulfidbrücken; türkis, flexible Loops zur Einbettung des Enzyms in die Membran Pro126 bis His129/Met130 und Arg382 bis Gly389.



### 5.2.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System

Die Hydrolyseaktivitäten der Kohl-PLD2-Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M, V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V, S664H, T812N, T812S, T812V, C181S, C212S, C310S und C625S wurden aufgrund ihrer wildtypähnlichen bzw. erhöhten hydrolytischen Aktivität im Zweiphasensystem mit SPC als natürlichem Substrat zusätzlich zum Vergleich im micellaren System mit dem künstlichen Substrat PpNP bestimmt. Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität erfolgte mit einem kontinuierlichen Küvettentest (4.18.1.2), bei dem die durch die pNP-Bildung hervorgerufene Absorptionsänderung kontinuierlich bei 360 nm gemessen wurde. Die berechneten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolysereaktionen der Kohl-PLD2 und der Kohl-PLD2-Varianten sind in **Tabelle 10** dargestellt.

**Tabelle 10: Initialgeschwindigkeiten der Kohl-PLD2 und ausgewählter Kohl-PLD2-Varianten der Hydrolyse von PpNP im micellaren System.** Die gezeigten Messdaten wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Hydrolyse ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
<b>Kohl-PLD2</b>	<b>16,23 ± 2,91</b>
<b>T264D</b>	<b>6,27 ± 0,46</b>
<b>V339T/E342A/V343M</b>	<b>10,93 ± 0,60</b>
<b>V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/ G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V</b>	<b>46,80 ± 4,57</b>
<b>S664H</b>	<b>34,69 ± 2,25</b>
<b>T812N</b>	<b>7,92 ± 0,29</b>
<b>T812S</b>	<b>3,94 ± 0,34</b>
<b>T812V</b>	<b>47,98 ± 3,51</b>
<b>C181S</b>	<b>3,73 ± 0,25</b>
<b>C212S</b>	<b>11,05 ± 0,51</b>
<b>C310S</b>	<b>27,52 ± 2,14</b>
<b>C625S</b>	<b>17,77 ± 1,20</b>

Die Hydrolyseaktivitäten der Enzymvarianten **V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V**, **S664H**, **T812N**, **T812V**, **C212S** und **C310S** im micellaren System mit dem synthetischen Substrat PpNP sind mit den im Zweiphasensystem bestimmten Hydrolyseaktivitäten ( $v_H$  in **Tabelle 7, 8** bzw. **9**) vergleichbar.

Die Kohl-PLD2-Enzymvarianten **T264D**, **V339T/E342A/V343M**, **T812S**, **C181S** und **C625S** dagegen zeigen im Vergleich zum Wildtyp, eine stark verminderte hydrolytische Aktivität im PpNP-Assay verglichen mit den Aktivitäten im Zweiphasensystem. Der Unterschied zwischen den beiden verwendeten Substraten PpNP im wässrig micellaren System und SPC im Zweiphasensystem besteht in der Kopfgruppe. Die im PpNP enthaltene Kopfgruppe pNP ist gegenüber dem Cholin der Kopfgruppe des Substrates SPC strukturell größer. Die Unterschiede in den hydrolytischen Aktivitäten im wässrig micellaren System und im Zweiphasensystem könnten daher auf eine unterschiedliche Akzeptanz der Kopfgruppe des Substrates bei dessen Bindung im aktiven Zentrum, bedingt durch die eingeführte Mutation bzw. indirekt durch die Beteiligung der entfernten Aminosäuren an der Substratbindung, zurückgeführt werden. Allerdings spielt bei den PLDs die supramolekulare Substratstruktur, wie sie bei Phospholipiden sowohl in Micellen als auch im Zweiphasensystem vorhanden ist, eine wichtige Rolle für die beobachtete Enzymaktivität (Hirche und Ulbrich-Hofmann, 1999). Eine Interpretation der Aktivitätsdaten hinsichtlich der molekularen Substratstruktur ist daher nur unter Vorbehalt möglich.

Insgesamt aber lässt sich aus den Mutationsstudien der Kohl-PLD2 ableiten, dass die untersuchten Strukturbereiche (HKD-Motive, C-Terminus, Cystein-Reste) auf Aminosäureaustausche sehr sensibel reagieren. In Hinblick auf die weiterführenden Untersuchungen mit biotechnologischen Zielstellungen sind besonders die Mutationen interessant, bei denen sich eine Aktivitätserhöhung, insbesondere eine Erhöhung der Transphosphatidylierungsaktivität, abzeichnet.

## 6 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollten durch Studien an den PLDs aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata) Strukturelemente identifiziert werden, die für die hydrolytische Aktivität bzw. die Transphosphatidylierungsaktivität verantwortlich sind. Damit sollte die Basis für ein gezieltes Proteindesign zur Erzeugung von PLDs mit einer hohen Transphosphatidylierungsaktivität, geringer Hydrolyseaktivität und einem möglichst breiten Substrat-Spektrum geschaffen werden.

Dazu sollten zunächst die Nucleotidsequenzen der beiden *pld*-Gene aus Mohnkeimlingen, von denen bisher ca. 2/3 bekannt waren (Lerchner, 2001), vollständig aufgeklärt und nachfolgend die rekombinant in *E. coli* gewonnenen Isoenzyme hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften charakterisiert werden. Die Ermittlung der vollständigen Nucleotidsequenzen der mRNA sowie der genomischen DNA aus 4 Tage alten Schlafmohnkeimlingen gelang mittels PCR mit degeneriertem *forward*-Primer in der Region des Start-Codons und genspezifischem *reverse*-Primer. Die mRNA-Nucleotidsequenzen von PLD1 und PLD2 sind im codierenden Bereich zu 96,9 % identisch und weisen ein offenes Leseraster von 813 Aminosäuren auf. In den genomischen DNA-Sequenzen von PLD1 und PLD2 konnte im Gegensatz zu anderen pflanzlichen PLDs von  $\alpha$ -Typ, die meist 2 Introns besitzen, nur eine 360 bp große Intronstruktur ermittelt werden.

Die Primärstrukturen der Mohn-PLD-Isoenzyme sind zu 98,6 % identisch sowie zu 99,2 % ähnlich und weisen den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs aus *Zea mays* und *Nicotiana tabacum* auf. Die aus der Primärstruktur der Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2 abgeleiteten Massen sind 91,72 kDa und 91,86 kDa, die berechneten isoelektrischen Punkte 5,60 und 5,53. Wie die anderen PLD-Aktivität zeigenden Mitglieder der PLD-Superfamilie besitzen die Mohn-PLD-Isoenzyme die bei allen pflanzlichen PLDs vorkommenden konservierten Sequenzbereiche I bis IV, darunter die zwei katalytischen HKD-Motive. Am N-Terminus beider Isoenzyme befindet sich die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Phospholipidbindung verantwortliche C2-Domäne. Da bei der Analyse der Primärstrukturen beider Mohn-Enzyme keine Signalsequenzen gefunden wurden, ist ein intrazelluläres Vorkommen beider Enzyme und damit ein Vorliegen der SH-Gruppen der Cystein-Reste in reduzierter Form anzunehmen. Im Unterschied zu anderen pflanzlichen PLDs des  $\alpha$ -Typs besitzt Mohn-PLD1 zehn und Mohn-PLD2 neun Cystein-Reste. Bei der Suche funktioneller Motive in den Aminosäuresequenzen der Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 konnten eine Glykosylierungsstelle, sechs Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C und zwei

Phosphorylierungsstellen für Tyrosinkinase, ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der PLD an Regulationsprozessen, gefunden werden.

Das Mohn-*pld1*- sowie das *pld2*-Gen wurden zur heterologen Genexpression in *E. coli* jeweils in den Expressionsvektor pET-28b(+) kloniert. Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 konnten in *E. coli* in löslicher Form im Cytosol exprimiert werden. Nach Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose und anschließender Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose konnten für die Mohn-PLD1 58 % und für die Mohn-PLD2 25 % der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden. Die beiden gereinigten Isoenzyme zeigen gegenüber dem synthetischen Substrat PpNP eine spezifische Hydrolyseaktivität von  $5,03 \pm 0,52$  bzw.  $6,15 \pm 0,12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und gegenüber dem Substrat SPC im n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer-System eine spezifische Hydrolyseaktivität von  $1,26 \pm 0,02$  bzw.  $1,35 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Beide Mohn-PLD-Isoenzyme sind in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen inaktiv. Bei der Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde eine maximale Aktivität bei 200 mM  $\text{CaCl}_2$  erreicht, wohingegen  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen keine Aktivierung bewirkten. Die pH-Optima der Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 liegen im pH-Bereich 5,5 bis 6,0 bei 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , wobei bei Absenkung der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration eine Verschiebung des pH-Optimums in den sauren Bereich erfolgt. Die Messungen der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivitäten der beiden rekombinanten Isoenzyme gegenüber dem Substrat SPC im n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer-System mit Glycerol als Akzeptoralkohol ergaben signifikante Unterschiede. Für die Mohn-PLD1 konnte eine 2,6-fach höhere Umesterungsrate im Vergleich zur Hydrolyserate gemessen werden, während die Mohn-PLD2 gleichermaßen gut hydrolysiert und transphosphatidyliert.

Aufbauend auf multiplen Alignments, Sekundärstrukturvorhersagen und Hydrophobizitätsvergleichen wurden gezielt Aminosäuren der HKD-Motive und benachbarter Regionen sowie am C-Terminus der rekombinanten Kohl-PLD2 ausgetauscht, Aminosäuren am C-Terminus entfernt bzw. eingefügt und die 8 hoch-konservierten Cystein-Reste einzeln durch Serin-Reste substituiert, um Informationen bezüglich der Struktur-Funktionsbeziehungen pflanzlicher PLDs zu erhalten. Alle 35 erzeugten Kohl-PLD2-Enzymvarianten konnten nach Etablierung eines neuen Expressionssystems in löslicher Form im Cytosol exprimiert werden. Die Reinigung der Kohl-PLD2 und der Kohl-PLD2-Enzymvarianten erfolgte in Abhängigkeit von der gewählten Expressionsmethode und der Aktivität des Enzyms. Die Messungen der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivitäten der Kohl-PLD2-Enzymvarianten im n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer-System mit SPC als Substrat lassen die folgenden Interpretationen zu:

1. Beide HKD-Motive sind notwendig für die katalytische Aktivität. Es wird angenommen, dass der Imidazol-Stickstoff des N-terminalen His333 für den nucleophilen Angriff am Phosphoratom des Phospholipid-Substrates verantwortlich ist.
2. Die Mutationen der C-terminalen Aminosäure Thr812 legen die Vermutung nahe, dass der C-Terminus, der mit hoher Wahrscheinlichkeit im Inneren des Proteins verborgen ist, die funktionelle Konformation des aktiven Zentrums über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert.
3. Die Cystein-Reste 181, 212, 365 und 741 sind vermutlich in die Bindung des Wassers bzw. des Akzeptoralkohols involviert, da durch ihre Substitution die hydrolytische Aktivität deutlich gesenkt wurde. Die Cystein-Reste 310 und 625, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den beiden HKD-Motiven befinden, spielen dagegen sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Substratbindung und der Bindung des Wassers bzw. des Akzeptoralkohols, da durch ihre Substitution die Gesamtaktivität mit Präferenz der Transphosphatidylierungsaktivität gesteigert werden konnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Mohn-PLD-Isoenzyme in ausreichender Menge und Reinheit für weiterführende Struktur- und Funktionsuntersuchungen bereitgestellt werden können. Obwohl sich die rekombinanten Mohn-PLDs in nur 11 Aminosäuren voneinander unterscheiden, wurden für die Hydrolyse und die Transphosphatidylierung im Zweiphasensystem bei Anwesenheit von Glycerol stark differierende Aktivitäten zwischen beiden Isoenzymen gemessen. Als Strukturelemente, die einen signifikanten Einfluss auf die hydrolytische Aktivität bzw. die Transphosphatidylierungsaktivität haben, konnten mit der vorliegenden Arbeit neben der Bestätigung der Bedeutung der HKD-Motive für den Katalysemechanismus, der C-Terminus sowie die hoch-konservierten Cystein-Reste identifiziert werden. Bei den erzeugten Kohl-PLD2-Enzymvarianten C212S, C365S, C625S, C741S und T812S ist es gelungen, eine deutliche Steigerung des Transphosphatidylierungspotentials zu erreichen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abergel C**, Abousalham A, Chenivresse S, Riviere M, Moustacas-Gardies A-M, Verger R (2001) Crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta Cryst.* D57, 320-322

**Abousalham A**, Riviere M, Teissere M, Verger R (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim. Biophys. Acta* 1158, 1-7

**Abousalham A**, Teissere M, Gardies AM, Verger R, Noat G (1995) Phospholipase D from soybean (*Glycine max.* L.) suspension-cultured cells: Purification, structural and enzymatic properties. *Plant Cell Physiol.* 36, 989-996

**Achterberg V**, Fricke H, Gercken G (1986) Conversion of radiolabelled ethanolamine plasmalogen into the dimethylethanolamine and choline analogue via transphosphatidylolation by phospholipase D from cabbage. *Chem. Phys. Lipids* 41, 349-353

**Allgyer TT**, Wells MA (1979) Phospholipase D from savoy cabbage: Purification and preliminary kinetic characterization. *Biochemistry* 18, 5348-5353

**Almquist KC**, Paliyath G (2000) Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for phospholipase D alpha (Accession Number 201661) from *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Physiol.* 122, 292

**Aurich I**, Dürrschmidt P, Schierhorn A, Ulbrich-Hofmann R (2002) Production of octadecylphospho-L-serine by phospholipase D. *Biotechnol. Letters* 24, 585-590

**Bendtsen JD**, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides – SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783-795

**Bezakova L**, Oblozinsky M, Proksova A, Weissova K, Psenak M (2000) Phospholipase D activity of poppy seedlings, *Papaver somniferum* L. *Chem. Phys. Lipids* 107, 22

**Blum H**, Beier H, Gross J (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8, 93-99

**Brachwitz H**, Oelke M, Bergmann J, Langen P (1997) Alkylphospho-L-serine analogs: Synthesis of cytostatically active alkylphosphono derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 1739-1742

**Bradford MM** (1976) A rapid and a sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

**Brauer D**, Nungesser E, Maxwell RJ, Schubert C, Tu SI (1990) Evidence for and subcellular localization of a Ca-stimulated phospholipase D from maize roots. *Plant Physiol.* 92, 672-678

**Brinkmann U**, Mattes RE, Buckel P (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 85, 109-114

**Brown HA**, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75, 1137-1144

**Bruzik K**, Tsai MD (1982) Phospholipids chiral at phosphorus. 1. Stereochemistry of transphosphatidylolation catalyzed by phospholipase D. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 863-865

**Bruzik K**, Tsai MD (1984) Phospholipids chiral at phosphorus. Synthesis of chiral phosphatidylcholine and stereochemistry of phospholipase D. *Biochemistry* 23, 1656-1661

**Cha YY**, Lee KW, Kim JC, Han TJ, Lee WS, Cho SH (1997) Nucleotide sequence of a cDNA encoding phospholipase D (accession no.U96438) from *Pimpinella brachycarpa*. *Plant Physiol.* 114, 1135

- Chain P**, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Land M, Hauser L, Hooper A, Klotz M, Norton J, Sayavedra-Soto L, Arciero D, Hommes N, Whittaker M, Arp D (2003) Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 185, 2759-2773
- Colley WC**, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuller Y, Sagi, DB, Morris AJ, Frohman MA (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biology* 7, 191-201
- Colley WC**, Altschuller YM, Sue-Ling CK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Branch KD, Tsirka SE, Bollag RJ, Bollag WB, Frohman MA (1997) Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem. J.* 326, 745-753
- Contardi A**, Ercoli A (1932) Über die enzymatische Spaltung der Lecithine und Lysocithine. *Biochem. Z.* 261, 275
- Coussens I**, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233, 859-866
- Crosby JA**, Redina O, Frohman M (2001) *Drosophila melanogaster* homolog of phospholipase D (PLD) gene. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number AAK00727
- Cullis PR**, Hope MJ, Tilcock CPS (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem. Phys. Lipids* 40, 127-144
- D'Arrigo P**, de Ferra L, Piergianni V, Ricci A, Scarcelli D, Servi S (1994) Phospholipase D from *Streptomyces* catalyzes the transfer of secondary alcohols. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 14, 1709-1710
- D'Arrigo P**, Piergianni V, Scarcelli D, Servi S (1995) A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Anal. Chim. Acta* 304, 249-254
- Davidson FM**, Long C (1958) The structure of the naturally occurring phosphoglycerides. *Biochem. J.* 69, 458-466
- Dawson RMC**, Hemington N (1967) Some properties of purified phospholipase D and especially the effect of amphipathic substances. *Biochem. J.* 102, 76-86
- Dawson RMC** (1967) The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D. *Biochem J.* 102, 205-210
- Dyer JH**, Zheng L, Wang X (1995) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA (Accession No. U36381) encoding phospholipase D from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 109, 1497
- El Maarouf H**, Zuily-Fodil Y, Gareil M, d'Arcy-Lameta A, Pham-Thi AT (1999) Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp. differing in drought tolerance. *Plant Mol. Biol.* 39, 1257-1265
- El Maarouf H**, Carriere F, Riviere M, Abousalham A (2000) Functional expression in insect cells, one-step purification and characterization of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Eng.* 13, 811-817
- Essen LO**, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380, 595-602
- Exton JH** (1997) Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol. Reviews* 77, 303-320
- Exton JH** (1999) Regulation of Phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 121-133
- Exton JH** (2002) Phospholipase D – Structure, Regulation and Function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 144, 1-94

- Exton JH** (2004) Lipases and phospholipases in drug development. Ed. G. Müller und S. Petry, *Wiley-VCH Verlag*, 55-78
- Fahey RC**, Hunt JS, Windham GC (1977) On the cysteine and cystine content of proteins. Differences between intracellular and extracellular proteins. *J. Mol. Evol.* 10, 155-160
- Fan L**, Zheng S, Wang X (1997) Antisense suppression of phospholipase D $\alpha$  retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest arabidopsis leaves. *Plant Cell* 9, 2183-2196
- Fan L**, Zheng S, Cui D, Wang X (1999) Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase D $\alpha$ , D $\beta$ , and D $\gamma$  in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 119, 1371-1378
- Fitch WM**, Margoliash E (1987) Construction of phylogenetic trees. *Science* 11, 279-284
- Frank W**, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F, Bartels D (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12, 111-124
- Frohman MA**, Morris AJ (1999) Phospholipase D structure and regulation. *Chem. Phys. of Lipids* 98, 127-140
- Frohman MA**, Sung TC, Morris (1999) Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 175-186
- Gardiner JC**, Harper JDI, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ, Marc J (2001) A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell* 13, 2143-2158
- Gilson MK**, Straatsma TP, McCammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1994) Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* 263, 1276-1278
- Gookin TE**, Hunter DA, Reid MS (2003) No significant change in phospholipase D expression during opening and senescence of *Mirabilis jalapa* calyces. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number AAP03643
- Gottlin EB**, Rudolph AE, Zhao Y, Matthews HR, Dixon JE (1998) Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9202-9207
- Gunstone FD** (1996) Fatty acid and lipid chemistry. *Chapman & Hall*
- Guzman LM**, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121-4130
- Hammond SM**, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem.* 270, 29640-29643
- Hammond SM**, Jenco JM, Cadwallader K, Cook S, Frohman MA, Morris AJ (1997) Characterization of phospholipase D1. Activation on the purified enzyme by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ARF and Rho family G-proteins and protein kinase C- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 272, 3860-3868
- Hanahan DJ**, Chaikoff IL (1947) A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J. Biol. Chem.* 169, 699-705
- Hanke W**, Hanke R (1997) Methoden der Membranphysiologie. *Spektrum Akademischer Verlag*, 16
- Harel M**, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9031-9035
- Hatanaka T**, Negishi T, Kubota-Akizawa M, Hagishita T (2002) Study on thermostability of phospholipase D from *Streptomyces sp.* *Biochim. Biophys. Acta* 1598, 156-164
- Hatanaka T**, Negishi T, Kubota-Akizawa M, Hagishita T (2002) Purification, characterization and sequencing of phospholipase D from *Streptomyces septatus* TH-2. *Enz. Microb. Technol.* 31, 233-241



- Heldt** HW (1999) Pflanzenbiochemie. *Spektrum Akademischer Verlag* 2.Auflage, 365-367
- Heller** M, Arad R (1970) Properties of the phospholipase D from peanut seeds. *Biochim. Biophys. Acta* 210, 276-286
- Heller** M, Mozes N, Peri (Abramovitz) I, Maes E (1974) Phospholipase D from peanut seeds IV. Final purification and some properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 369, 397-410
- Heller** M (1978) Phospholipase D. *Adv. Lipid Res.* 16, 267-326
- Hirche** F, Koch MHJ, König S, Wadewitz T, Ulbrich-Hofmann R (1997) The influence of organic solvents on phospholipid transformations by phospholipase D in emulsion systems. *Enz. Microb. Technol.* 20, 453-461
- Hirche** F (1997) Phospholipase D-katalysierte Phospholipidtransformationen- Studien zum Einfluß von Reaktionsmedium, Substratpolymorphismus und Enzymquelle. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- Hirche** F, Ulbrich-Hofmann R (1999) The interfacial pressure is an important parameter for the rate of phospholipase D catalyzed reactions in emulsion systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 383-389
- Hirche** F, Ulbrich-Hofmann R (2000) The interdependence of solvent, acceptor alcohol and enzyme source in transphosphatidylolation by phospholipase D. *Biocatal. Biotransf.* 18, 343-353
- Hodgkin** MN, Masson MR, Powner D, Saqib KM, Ponting CP, Wakelam MJO (2000) Phospholipase D regulation and localization is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate specific PH domain. *Curr. Biol.* 10, 43-46
- Holbrook** PG, Pannell LK, Daly JW (1991) Phospholipase D-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine occurs with P-O bond cleavage. *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 155-158
- Hofmann** K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 215-219
- Hong** S, Horiuchi H, Ohta A (2003) Molecular cloning of a phospholipase D gene from *Aspergillus nidulans* and characterization of its deletion mutants. *FEMS Microbiol. Letters* 224, 231-237
- Honigberg** SM, Conicella C, Esposito RE (1992) Commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of the SPO14 gene. *Genetics* 130, 703-716
- Hwang** I-S, Park S-J, Roh T-Y, Choi M-U, Kim H-J (2001) Investigation of sulfhydryl groups in cabbage phospholipase D by combination of derivatization methods and matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectro.* 15, 110-115
- Iwasaki** Y, Nakano H, Yamane T (1994) Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 290-299
- Iwasaki** Y, Horiike S, Matsushima K, Yamane T (1999) Location of the catalytic nucleophile of phospholipase D of *Streptomyces antibioticus* in the C-terminal half domain. *Eur. J. Biochem.* 264, 577-581
- Jäger** EJ, Neumann S, Ohmann E (2003) Botanik. *Spektrum Akademischer Verlag* 5.Auflage, 165-332
- Janney** PA, Lamb J, Allen PG, Matsudaira PT (1992) Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin. *J. Biol. Chem.* 267, 11818-11823
- Jiang** RT, Shyy YJ, Tsai MD (1984) Phospholipids chiral at phosphorus. Absolute configuration of chiral thiophospholipids and stereospecificity of phospholipase D. *Biochemistry* 23, 1661-1667
- Juneja** LR, Hibi N, Inagaki N, Yamane T, Shimizu S (1987) Comparative study on conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylglycerol by cabbage phospholipase D in micelle and emulsion systems. *Enz. Microb. Technol.* 9, 350-354

- Kane** JF (1995) Effects of rare codon clusters on high level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 494-500
- Kanoh** H, Nakashima S, Zhao Y, Sugiyama Y, Kitajima Y, Nozawa Y (1998) Molecular cloning of a gene encoding phospholipase D from the pathogenic and dimorphic fungus, *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 359-364
- Katagiri** T, Takahashi S, Shinozaki K (2001) Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD $\delta$ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *Plant J.* 26, 595-605
- Katinka** MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivares CP (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450-453
- Kent** C (1995) Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 315-343
- Kim** DU, Roh TY, Lee J, Noh JY, Jang YJ, Hoe KL, Yoo HS, Choi MU (1999) Molecular cloning and functional expression of a phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Biochim. Biophys. Acta* 1437, 409-414
- Klaus** JR, Baldassare JJ, Raben DM (2000) *Cricetulus griseus* (Chinese hamster) phospholipase D (PLD) gene. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number T18530
- Knopf** JL, Lee MH, Sultzmam LA, Kriz RW, Loomis CR, Hewick RM, Bell RM (1986) Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46, 491-502
- Koonin** EV (1996) A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope proteins. *TIBS* 21, 242-243
- Kovatchev** S, Eibl H (1978) The preparation of phospholipids by phospholipase D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 101, 5221-5226
- Krauss** G (1997) Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. *Wiley-VCH Verlag*, 315
- Kufner** G, Schlegel H (1979) Die Michaelis-Menten-Gleichung als Eichfunktion bei der Remissionsmessung nach Dünnschichtchromatographie. *J. Chromatogr.* 169, 141-152
- Kurland** C, Gallant J (1996) Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 489-493
- Laemmli** UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lambrecht** R, Ulbrich-Hofmann R (1992) A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 81-88
- Laxalt** AM, Riet B, Verdonk JC, Parigi L, Tameling WIL, Vossen J, Haring M, Musgrave A, Munnik T (2001) Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: rapid and specific expression of LePLD $\beta$ 1 on elicitation with xylanase. *Plant J.* 26, 237-247
- Lee** MH (1989) Phospholipase D of rice brain. I. Purification and characterization. *Plant Sci.* 59, 25-33
- Lee** MH (1989) Phospholipase D of rice brain. II. The effects of the enzyme inhibitors and activators on the germination and growth of root and seedling of rice. *Plant Sci.* 59, 35-43
- Lein** W, Saalbach G (1997) Characterization of tobacco phospholipase D. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number CAB06620
- Lein** W, Saalbach G (2001) Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 172-183
- Leiros** I, Secundo F, Zambonelli C, Servi S, Hough E (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* 8, 655-667

**Leiros I**, McSweeney S, Hough E (2004) The reaction mechanism of phospholipase D from *Streptomyces sp.* strain PMF. Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product. *J. Mol. Biol.* 339, 805-820

**Lerchner A** (2001) Identifizierung zweier Isoenzyme der Phospholipase D aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.). Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)

**Lerchner A**, Schäffner I, Weissova K, Ulbrich-Hofmann R (2001, aktualisiert 2004) Identification of two isoenzymes of phospholipase D from opium poppy. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number AF 451979, AF 451980, AF 451981, AF 451982

**Lin X**, Kaul S, Rounsley SD, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason TM, Bowman CL, Barnstead ME, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee JJ, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg SL, Fraser CM, Venter JC (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402, 761-768

**Liu MY**, Gutowski S, Sternweis PC (2001) The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 276, 5556-5562

**Liscovitch M**, Czarny M, Fiucci G, Tang X (2000) Phospholipase D: Molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. Soc.* 345, 401-415

**Lopez I**, Arnold RS, Lambeth JD (1998) Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). *J. Biol. Chem.* 273, 12846-12852

**Mayer KFX**, Schueller C, Wambutt R, Murphy G, Volckaert G, Pohl T, Duesterhoeft A, Stiekema W, Entian KD, Terryn N, Harris B, Ansoerge W, Brandt P, Grivell LA, Rieger M, Weichselgartner M, de Simone V, Obermaier B, Mache R, Mueller M, Kreis M, Delseny M, Puigdomenech P, Watson M, Schmidtheini T, Reichert B, Portetelle D, Perez-Alonso M, Boutry M, Bancroft I, Vos P, Hoheisel J, Zimmermann W, Wedler H, Ridley P, Langham SA, McCullagh B, Bilham L, Robben J, Van der Schueren J, Grymonprez B, Chuang YJ, Vandenbussche F, Braeken M, Weltjens I, Voet M, Bastiaens I, Aert R, Defoor E, Weitzenegger T, Bothe G, Ramsperger U, Hilbert H, Braun M, Holzer E, Brandt A, Peters S, van Staveren M, Dirkse W, Mooijman P, Klein Lankhorst R, Rose M, Hauf J, Koetter P, Berneiser S, Hempel S, Feldpausch M, Lamberth S, Van den Daele H, De Keyser A, Buysschaert C, Gielen J, Villarreal R, De Clercq R, Van Montagu M, Rogers J, Cronin A, Quail MA, Bray-Allen S, Clark L, Doggett J, Hall S, Kay M, Lennard N, McLay K, Mayes R, Pettett A, Rajandream MA, Lyne M, Benes V, Rechmann S, Borkova D, Bloecker H, Scharfe M, Grimm M, Loehnert TH, Dose S, de Haan M, Maarse AC, Schaefer M, Mueller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Fartmann B, Grandrath K, Dauner D, Herzl A, Neumann S, Argiriou A, Vitale D, Liguori R, Piravandi E, Massenet O, Quigley F, Clabaud G, Muendlein A, Felber R, Schnabl S, Hiller R, Schmidt W, Lecharny A, Aubourg S, Chefdor F, Cooke R, Berger C, Monfort A, Casacuberta E, Gibbons T, Weber N, Vandenbol M, BARGUES M, Terol J, Torres A, Perez-Perez A, Purnelle B, Bent E, Johnson S, Tacon D, Jesse T, Heijnen L, Schwarz S, Scholler P, Heber S, Francs P, Bielke C, Frishman D, Haase D, Lemcke K, Mewes HW, Stocker S, Zaccaria P, Bevan M, Wilson RK, de la Bastide M, Habermann K, Parnell L, Dedhia N, Gnoj L, Schutz K, Huang E, Spiegel L, Sekhon M, Murray J, Sheet P, Cordes M, Abu-Threideh J, Stoneking T, Kalicki J, Graves T, Harmon G, Edwards J, Latreille P, Courtney L, Cloud J, Abbott A, Scott K, Johnson D, Minx P, Bentley D, Fulton B, Miller N, Greco T, Kemp K, Kramer J, Fulton L, Mardis E, Dante M, Pepin K, Hillier LW, Nelson J, Spieth J, Ryan E, Andrews S, Geisel C, Layman D, Du H, Ali J, Berghoff A, Jones K, Drone K, Cotton M, Joshu C, Antonoiu B, Zidanic M, Strong C, Sun H, Lamar B, Yordan C, Ma P, Zhong J, Preston R, Vil D, Shekher M, Matero A, Shah R, Swaby IK, O'Shaughnessy A, Rodriguez M, Hoffman J, Till S, Granat S, Shohdy N, Hasegawa A, Hameed A, Lodhi M, Johnson A, Chen E, Marra MA, Martienssen R, McCombie WR (1999) Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402, 769-777

**McGee JD**, Roe JL, Sweat TA, Wang X, Guikema JA, Leach JE (2003) Rice phospholipase d isoforms show differential cellular location and gene induction. *Plant Cell Physiol.* 44, 1013-1026

**McHugh JL**, Wessler HG, Benjamin RC, Chapman KD (2002) Molecular identification of a cotton phospholipase D beta isoform 1b. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number AAN05431

**McHugh JL**, Wessler HG, Benjamin RC, Chapman KD (2002) Molecular identification of a cotton phospholipase D delta isoform 1b. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number AAN05432

- McHugh** JL, Wessler HG, Benjamin RC, Chapman KD (2002) Molecular identification of a cotton phospholipase D delta isoform 1a. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number AAN05433
- Moffatt** BA, Studier FW (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49, 221-227
- Moon** MW, Kim HK, Lee JK, Oh TK (2003) Purification, characterization, and cloning phospholipase D from *Streptomyces* sp. P821. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number AAN41662
- Mori** K, Hagishita T, Iwabuchi M, Hatanaka T (2002) Purification, characterization, cloning and sequencing of Phospholipase D from *Streptomyces halstedii* subsp. *Scabies* K6. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number BAB92022
- Morioka** S, Ueki J, Komari T (1997) Characterization of two distinctive genomic clones (Accession Nos. AB001919 and AB001920) for phospholipase D from rice (PGR97-076). *Plant Physiol.* 114, 396
- Morris** AJ, Engebrecht J, Frohman MA (1996) Structure and regulation of phospholipase D. *TIPS* 17, 182-185
- Mount** DW (2001) Bioinformatics: Sequence and genome analysis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 386-387
- Munnik** T, Irvine RF, Musgrave A (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1389, 222-272
- Nakajima** J, Nakashima T, Shima Y, Fukuda H, Yamane T (1994) A facile transphosphatidylation reaction using a culture supernatant of actinomycetes directly as a phospholipase D catalyst with a chelating agent. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1193-1198
- Nakashima** S, Matsuda Y, Akao Y, Yoshimura S, Sakai H, Hayakawa K, Andoh M, Nozawa Y (1997) Molecular cloning and chromosome mapping of rat phospholipase D genes, pld1a, pld1b and pld2. *Cytogenet. Cell Genet.* 79, 109-113
- Nakashima** S, Hisamoto N, Banno Y, Matsumoto K, Nozawa Y (2000) Molecular cloning of phospholipase D from *C. elegans*. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number BAA97571
- Nalefski** EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5, 2375-2390
- Novotna** Z, Kas J, Daussant J, Sajdok J, Valentova O (1999) Purification and characterization of rape seed phospholipase D. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 531-537
- Novotna** Z, Valentova O, Martinec J, Feltl T, Nokhrina (2000) Study of phospholipases D and C in maturing and germinating seeds of *Brassica napus*. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 817-818
- Oblozinsky** M, Schoeps R, Ulbrich-Hofmann R, Bezakova L (2003) Two uncommon phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (*Papaver somniferum* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 1631, 153-159
- Ogino** C, Negi Y, Matsumiya T, Nakaoka K, Kondo A, Kuroda S, Tokuyama S, Kikkawa U, Yamane T, Fukuda H (1999) Purification, characterization, and sequence determination of phospholipase D secreted by *Streptovercillium cinnamoneum*. *J. Biochem.* 125, 263-269
- Ogino** C, Izumi M, Shimizu N (2003) Investigation of catalytic function of phospholipase D enzyme by site directed mutagenesis. *11<sup>th</sup> European congress on biotechnology in Basel*, P329
- Ono** Y, Kurokawa T, Fujii T, Kawahara K, Igarashi K, Kikkawa U, Ogita K, Nishizuka Y (1986a) Two types of complementary DNAs of rat brain protein kinase C. *FEBS Lett.* 206, 347-352
- Ono** Y, Kurokawa T, Kawahara K, Nishimura O, Marumoto R, Igarashi K, Sugino Y, Kikkawa U, Ogita K, Nishizuka Y (1986b) Cloning of rat brain protein kinase C complementary DNA. *FEBS Lett.* 203, 111-115
- Pannenberg** I, Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann (1998) Identification of two isoenzymes (accession nos. AF090444 and AF090445) of phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Plant Physiol.* 118, 1102

- Pappan K**, Qin W, Dyer JH, Zheng L, Wang X (1997 a) Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLD  $\beta$ , from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 272, 7055-7061
- Pappan K**, Wang X (1999) Plant phospholipase D $\alpha$  is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 347-353
- Parker PJ**, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD, Ullrich A (1986) The complete primary structure of protein kinase C – the major phorbol ester receptor. *Science* 233, 853-859
- Parkhill J**, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MTG, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeno-Tarraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Karlyshev AV, Moule S, Oyston PCF, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413, 523-527
- Ponting CP**, Kerr ID (1996) A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci.* 5, 914-922
- Prentice MB**, James KD, Parkhill J, Baker SG, Stevens K, Simmonds MN, Mungall KL, Churcher C, Oyston PC, Titball RW, Wren BW, Wain J, Pickard D, Hien TT, Farrar JJ, Dougan G (2001) *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid. *J. Bacteriol.* 183, 2586-2594
- Qin C**, Wang X (2002) The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a Calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD $\zeta$ 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol.* 128, 1057-1068
- Qin W**, Pappan K, Wang X (1997) Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): cloning of PLD-gamma and regulation of plant PLD-gamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium. *J. Biol. Chem.* 272, 28267-28273
- Qin W**, Dyer JH, Zheng L, Wang X (1999) Isolation and nucleotide sequence of the fourth phospholipase D (accession no. AF138281), PLD-gamma 2, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 120, 635
- Raetz CRH** (1987) Phospholipids chiral at phosphorus. Steric course of the reactions catalyzed by phosphatidylserine synthase from *Escherichia coli* and yeast. *Biochem. J.* 26, 4022-4027
- Read TD**, Salzberg SL, Pop M, Shumway M, Umayam L, Jiang L, Holtzapple E, Busch JD, Smith KL, Schupp JM, Solomon D, Keim P, Fraser CM (2002) Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 296, 2028-2033
- Redina OE**, Frohman MA (1998) Organization and alternative splicing of the murine phospholipase D2 gene. *Biochem. J.* 331, 845-851
- Ritchie S**, Gilroy S (1998) Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2697-2702
- Rose K**, Rudge SA, Frohman MA, Morris AJ, Engebrecht J (1995) Phospholipase D signaling is essential for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 12151-12155
- Rosenberg AH**, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. *Gene* 56, 125-135
- Rost B** (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Methods in Enzymology* 266, 525-539
- Ryu SB**, Wang X (1995) Expression of phospholipase D during castor bean leaf senescence. *Plant Physiol.* 108, 713-719
- Salanoubat M**, Lemcke K, Rieger M, Ansorge W, Unseld M, Fartmann B, Valle G, Bloecker H, Perez-Alonso M, Obermaier B, Delseny M, Boutry M, Grivell LA, Mache R, Puigdomenech P, De Simone V, Choisine N, Artiguenave F, Robert C, Brottier P, Wincker P, Cattolico L, Weissenbach J, Saurin W, Quetier F, Schaefer M,

- Mueller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Benes V, Wurmbach E, Drzonek H, Erfle H, Jordan N, Bangert S, Wiedelmann R, Kranz H, Voss H, Holland R, Brandt P, Vezzi A, D'Angelo M, Pallavicini A, Toppo S, Simionati B, Conrad A, Hornischer K, Kauer G, Loehnert TH, Nordsiek G, Reichelt J, Scharfe M, Schoen O, Bargues M, Terol J, Climent J, Navarro P, Collado C, Perez A, Ottenwaelder B, Duchemin D, Cooke R, Laudie M, Berger-Llauro C, Purnelle B, Masuy D, de Haan M, Maarse AC, Alcaraz JP, Cottet A, Casacuberta E, Monfort A, Argiriou A, Flores M, Liguori R, Vitale D, Mannhaupt G, Haase D, Schoof H, Rudd S, Zaccaria P, Mewes HW, Mayer KFX, Kaul S, Town CD, Koo HL, Tallon LJ, Jenkins J, Rooney T, Rizzo M, Walts A, Utterback T, Fujii CY, Shea TP, Creasy TH, Haas B, Maiti R, Wu D, Peterson J, Van Aken S, Pai G, Militscher J, Sellers P, Gill JE, Feldblyum TV, Preuss D, Lin X, Nierman WC, Salzberg SL, White O, Venter JC, Fraser CM, Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Kato T, Asamizu E, Sasamoto S, Kimura T, Idesawa K, Kawashima K, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakayama S, Nakazaki N, Shinpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (2000) Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis*. *Nature* 408, 820-822
- Samama** AM, Pearce RS (1993) Aging of cucumber and onion seeds: Phospholipase D, lipoxygenase activity and changes in phospholipids content. *J. Exp. Bot.* 44, 1253-1265
- Sambrook** J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sanger** F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Schäffner** I (2001) Identifizierung und rekombinante Herstellung von Phospholipase D Isoenzymen aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle(Saale)
- Schäffner** I, Rücknagel K-P, Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R (2002) Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 79-87
- Schein** CH, Noteborn MHM (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* 3, 151-154
- Schöps** R, Schierhorn A, Schäffner I, Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R (2002) Identification of phospholipase D from cabbage as N-terminally acetylated PLD2. *J. Protein Chem.* 21, 407-411
- Sciorra** VA, Rudge SA, Prestwich GD, Frohman MA, Engebrecht J, Morris AJ (1999) Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *Embo J.* 20, 5911-5921
- Scott** DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB (1990) Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. *Science* 250, 1541-1546
- Seidel** HM, Pompliano DL, Knowles JR (1992) Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of the gene product in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 2598-2608
- Servi** S (1999) Phospholipases as synthetic catalysts. *Topics Curr. Chem.* 200, 127-158
- Shao** X, Davletov BA, Sutton RB, Südhof TC, Rizo J (1996) Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* 273, 248-251
- Simoes** I, Mueller E, Otto A, Bur D, Faro C, Pires E (2003) Plant aspartic proteinase cardosin A interacts with phospholipase D alpha via an exposed KGE sequence. Direct submission *NCBI GenBank*, accession number CAE47482
- Singer** SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731
- Smith** PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 79, 76-85

- Stanacev** NZ, Stuhne-Sekalec L (1970) On the mechanism of enzymatic phosphatidylation. Biosynthesis of cardiolipin catalyzed by phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 210, 350-352
- Steed** PM, Clark KL, Boyar WC, Lasala DJ (1998) Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB Journal* 12, 1309-1317
- Stover** CK, Pham XQT, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim RM, Smith KA, Spencer DH, Wong GKS, Wu Z, Paulsen IT (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964
- Strausberg** RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YSN, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJM, Marra MA (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903
- Streit** WR, Schmitz RA, Perret X, Staehelin C, Deakin WJ, Raasch C, Liesegang H, Broughton WJ (2004) An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 186, 535-542
- Stuckey** JA, Dixon JA (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nature* 398, 278-284
- Studier** FW, Mofatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130
- Studier** FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185, 60-89
- Studier** FW (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219, 37-44
- Sung** TC, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Temel R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engebrecht J, Frohman MA (1997) Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.* 16, 4519-4530
- Sung** TC, Zhang Y, Morris AJ, Frohman MA (1999) Structural analysis of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* 274, 3659-3666
- Sutton** RB, Davletov BA, Berghuis AM, Südhof TC, Sprang SR (1995) Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I. A novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929-938
- Takami** M, Hidaka N, Suzuki Y (1994) Phospholipase D-catalyzed synthesis of phosphatidyl aromatic compounds. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 2140-2144
- Testet-Lamant** V, Archaimbault B, Durand J, Rigaud M (1992) Enzymatic synthesis of structural analogs of PAF-acether by phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1123, 347-350
- Theologis** A, Ecker JR, Palm CJ, Federspiel NA, Kaul S, White O, Alonso J, Altafi H, Araujo R, Bowman CL, Brooks SY, Buehler E, Chan A, Chao Q, Chen H, Cheuk RF, Chin CW, Chung MK, Conn L, Conway AB, Conway AR, Creasy TH, Dewar K, Dunn P, Etgu P, Feldblyum TV, Feng JD, Fong B, Fujii CY, Gill JE, Goldsmith AD, Haas B, Hansen NF, Hughes B, Huizar L, Hunter JL, Jenkins J, Johnson-Hopson C, Khan S, Khaykin E, Kim CJ, Koo HL, Kremenetskaia I, Kurtz DB, Kwan A, Lam B, Langin-Hooper S, Lee A, Lee JM, Lenz CA, Li JH, Li YP, Lin X, Liu SX, Liu ZA, Luros JS, Maiti R, Marziali A, Militscher J, Miranda M, Nguyen M, Nierman WC, Osborne BI, Pai G, Peterson J, Pham PK, Rizzo M, Rooney T, Rowley D, Sakano H, Salzberg SL, Schwartz JR, Shinn P, Southwick AM, Sun H, Tallon LJ, Tambunga G, Toriumi MJ, Town CD,

Utterback T, Van Aken S, Vaysberg M, Vysotskaia VS, Walker M, Wu D, Yu G, Fraser CM, Venter JC, Davis RW (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 816-820

**Thompson JE** (1988) Senescence and aging in plants. Ed. L.D. Nooden und A.C. Leopold, *Academic Press*, 52-84

**Thompson JD**, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22, 4673-4680

**Touchstone JC**, Levin SS, Dobbins MF, Beers PC (1983) Analysis of saturated and unsaturated phospholipids in biological fluids. *J. Liquid Chromatogr.* 6, 179-192

**Ueki J**, Morioka S, Komari T, Kumashiro T (1995) Purification and characterization of phospholipase D from rice (*Oryza sativa* L.) and cloning of cDNA for PLD from rice and maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol.* 36, 903-914

**Ulbrich-Hofmann R** (2000) Enzymes in Lipid Modification. Ed. U. Bornscheuer, *Wiley-VCH Verlag*, 219-262

**Ulbrich-Hofmann R** (2003) Enzyme-catalyzed transphosphatidylation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 305-307

**Virto C**, Svensson I, Adlercreutz P (2000) Hydrolytic and transphosphatidylation activities of phospholipase D from savoy cabbage towards lysophosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* 106, 41-51

**Voisine R**, Vezina LP, Willemot C (1993) Modification of phospholipids catabolism in microsomal membranes of gamma-irradiated cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiol.* 102, 213-218

**Waksman M**, Eli Y, Liscovitch M, Gerst JE (1996) Identification and characterization of a gene encoding phospholipase D activity in yeast. *J. Biol. Chem.* 271, 2361-2364

**Wang C**, Wang X (2001) A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane. *Plant Physiol.* 127, 1102-1112

**Wang W**, Malcolm BA (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *BioTechniques* 26, 680-682

**Wang X**, Dyer JH, Zheng L (1993) Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 486-494

**Wang X**, Xu L, Zheng L (1994) Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* 269, 20312-20317

**Wang X** (2000) Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and the cellular functions. *Prog. Lipid Res.* 39, 109-149

**Wang X** (2001) Plant phospholipases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 211-231

**Whitaker BD**, Smith DL, Green KC (2001) Cloning, characterization and functional expression of a phospholipase D<sub>a</sub> cDNA from tomato fruit. *Physiol. Plantarum* 112, 87-94

**Willemot C** (1983) Rapid degradation of polar lipids in frost damaged winter wheat crown and root tissue. *Phytochem.* 22, 861-863

**Witt W**, Yelenosky G, Mayer RT (1987) Purification of phospholipase D from citrus callus tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 164-170

**Xie Z**, Ho WT, Exton JH (2000) Conserved amino acids at the C-terminus of rat phospholipase D1 are essential for enzymatic activity. *Eur. J. Biochem.* 267, 7138-7146

**Xu G**, Guo BZ, Holbrook CC, Lynch RE (2001) Identification and partial sequence of a PLD-like gene encoding for phospholipase D in peanut. *Hua Sheng Xue Bao* 30, 1-10



- Xu** GY, McDonagh T, Yu HA, Nalefski EA, Clark JD, Cumming DA (1998) Solution structure and membrane interactions of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. *J. Mol. Biol.* 280, 485-500
- Xu** L, Zheng S, Zheng L, Wang X (1997) Promotor analysis and expression of a phospholipase D gene from castor bean. *Plant Physiol.* 115, 387-395
- Yamada** K, Lim J, Dale JM, Chen H, Shinn P, Palm CJ, Southwick AM, Wu HC, Kim CJ, Nguyen M, Pham PK, Cheuk RF, Karlin-Newmann G, Liu SX, Lam B, Sakano H, Wu T, Yu G, Miranda M, Quach HL, Tripp M, Chang CH, Lee JM, Toriumi MJ, Chan MM, Tang CC, Onodera CS, Deng JM, Akiyama K, Ansari Y, Arakawa T, Banh J, Banno F, Bowser L, Brooks SY, Carninci P, Chao Q, Choy N, Enju A, Goldsmith AD, Gurjal M, Hansen NF, Hayashizaki Y, Johnson-Hopson C, Hsuan VW, Iida K, Karnes M, Khan S, Koesema E, Ishida J, Jiang PX, Jones T, Kawai J, Kamiya A, Meyers C, Nakajima M, Narusaka M, Seki M, Sakurai T, Satou M, Tamse R, Vaysberg M, Wallender EK, Wong C, Yamamura Y, Yuan S, Shinozaki K, Davis RW, Theologis A, Ecker JR (2003) Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* 302, 842-846
- Yang** SF, Freer S, Benson AA (1967) Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 242, 477-484
- Yoshimura** S, Nakashima S, Ohguchi K, Sakai H, Shinoda J, Sakai N, Nozawa Y (1996) Differential mRNA expression of phospholipase D (PLD) isozymes during cAMP-induced differentiation in C6 glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 494-499
- Young** SA, Wang X, Leach JE (1996) Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Cell* 8, 1079-1090
- Yu** FX, Sun HQ, Janmey PA, Yin HL (1992) Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J. Biol. Chem.* 267, 14616-14621
- Zheng** L, Krishnamoorthi R, Zolkiewski M, Wang X (2000) Distinct Ca<sup>2+</sup> binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D  $\alpha$  and  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 275, 19700-19706
- Zheng** L, Shan J, Krishnamoorthi R, Wang X (2002) Activation of plant phospholipase D $\beta$  by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: characterization of binding site and mode of action. *Biochemistry* 41, 4546-4553

## Anhang

A1 Genstruktur von *pld1* und *pld2* aus Schlafmohnkeimlingen

Gelb markiert, Sequenzunterschiede in der codierenden Region, die keine Änderung in der Aminosäure bewirken; violett markiert, Sequenzunterschiede in der codierenden Region, die eine Änderung in der Aminosäure bewirken; blau, Intronbereich; grün markiert, Start-Codon; rot markiert, Stopp-Codon.

mRNAp1d1	1	ATG	GCTCAGATTTCTCTCCATGGA	ACTCTACATGTTACGATCTTTGAAGCAA	AATTCAATT	60
mRNAp1d2	1	ATG	GCTCAGATTTCTCTCCATGGA	ACTCTACATGTTACGATCTTTGAAGCGA	AATTCAATT	60
gDNAp1d1	1	ATG	GCTCAGATTTCTCTCCATGGA	ACTCTACATGTTACGATCTTTGAAGCAA	AATTCAATT	60
gDNAp1d2	1	ATG	GCTCAGATTTCTCTCCATGGA	ACTCTACATGTTACGATCTTTGAAGCGA	AATTCAATT	60
mRNAp1d1	61	TCTCATCCTGATAGGAAA	ACTGGTGGTGCTCCTAAGTTC	TTTAGGAAGCTTGTGGAAAAC		120
mRNAp1d2	61	TCTCATCCTGATAGGAAA	ACTGGTGGTGCTCCTAAGTTC	TTTAGGAAGCTTGTGGAAAAC		120
gDNAp1d1	61	TCTCATCCTGATAGGAAA	ACTGGTGGTGCTCCTAAGTTC	TTTAGGAAGCTTGTGGAAAAC		120
gDNAp1d2	61	TCTCATCCTGATAGGAAA	ACTGGTGGTGCTCCTAAGTTC	TTTAGGAAGCTTGTGGAAAAC		120
mRNAp1d1	121	ATCGAGGAGACAGTTGG	ATTGGCAAAGGAGCTAGTATG	CTTTATGCCTCAGTTGATCTC		180
mRNAp1d2	121	ATCGAGGAGACAGTTGG	ATTGGCAAAGGAGCTAGTATG	CTTTATGCCTCAGTTGATCTC		180
gDNAp1d1	121	ATCGAGGAGACAGTTGG	ATTGGCAAAGGAGCTAGTATG	CTTTATGCCTCAGTTGATCTC		180
gDNAp1d2	121	ATCGAGGAGACAGTTGG	ATTGGCAAAGGAGCTAGTATG	CTTTATGCCTCAGTTGATCTC		180
mRNAp1d1	181	GATAAGGCTAGAGTTGG	AAGGACCAGAATCATAAAA	GATGAACCTGTCAACCCTA	AGTGG	240
mRNAp1d2	181	GATAAGGCTAGAGTTGG	AAGGACCAGAATCATAAAA	GATGAACCTGTCAACCCTA	AGTGG	240
gDNAp1d1	181	GATAAGGCTAGAGTTGG	AAGGACCAGAATCATAAAA	GATGAACCTGTCAACCCTA	AGTGG	240
gDNAp1d2	181	GATAAGGCTAGAGTTGG	AAGGACCAGAATCATAAAA	GATGAACCTGTCAACCCTA	AGTGG	240
mRNAp1d1	241	TAT	GAGTCTTTTCACATCTACT	GTGCCATATGGCTGCTAAT	GTCACTTCACTGTCAA	300
mRNAp1d2	241	TAC	GAGTCTTTTCACATCTACT	GTGCCATATGGCTGCTAAT	GTCACTTCACTGTCAA	300
gDNAp1d1	241	TAT	GAGTCTTTTCACATCTACT	GTGCCATATGGCTGCTAAT	GTCACTTCACTGTCAA	300
gDNAp1d2	241	TAC	GAGTCTTTTCACATCTACT	GTGCCATATGGCTGCTAAT	GTCACTTCACTGTCAA	300
mRNAp1d1	301	GATGATAATCCCAT	TGGAGCAACTCTGATTGGA	AGAGCTTATGTTCC	TATTGACAAAGTT	360
mRNAp1d2	301	GATGATAATCCCAT	TGGAGCAACTCTGATTGGA	AGAGCTTATGTTCC	TATTGACAAAGTT	360
gDNAp1d1	301	GATGATAATCCCAT	TGGAGCAACTCTGATTGGA	AGAGCTTATGTTCC	TATTGACAAAGTT	360
gDNAp1d2	301	GATGATAATCCCAT	TGGAGCAACTCTGATTGGA	AGAGCTTATGTTCC	TATTGACAAAGTT	360
mRNAp1d1	361	CTAAGTGGGGAAGA	AGTGGATGAATGGGTCG	AGGTGGTAGATCAGGAG	CGTAATCCTGTG	420
mRNAp1d2	361	CTAAGTGGGGAAGA	AGTGGATGAATGGGTCG	AGGTGGTAGATCAGGAG	CGTAATCCTGTG	420
gDNAp1d1	361	CTAAGTGGGGAAGA	AGTGGATGAATGGGTCG	AGGTGGTAGATCAGGAG	CGTAATCCTGTG	420
gDNAp1d2	361	CTAAGTGGGGAAGA	AGTGGATGAATGGGTCG	AGGTGGTAGATCAGGAG	CGTAATCCTGTG	420
mRNAp1d1	421	CAAGTGGTTGTA	AGATCCACGTGAAGCTG	CAATATTTGATGTTGG	TCAAGACAAGAAT	480
mRNAp1d2	421	CAAGTGGTTGTA	AGATCCACGTGAAGCTG	CAATATTTGATGTTGG	TCAAGACAAGAAT	480
gDNAp1d1	421	CAAGTGGTTGTA	AGATCCACGTGAAGCTG	CAATATTTGATGTTGG	TCAAGACAAGAAT	480
gDNAp1d2	421	CAAGTGGTTGTA	AGATCCACGTGAAGCTG	CAATATTTGATGTTGG	TCAAGACAAGAAT	480
mRNAp1d1	481	TGGGCTCGGGGA	AATTAGAAGCGCCAAAT	TTCTGGAGTTCCTTAC	ACATTCTTCACCCAG	540
mRNAp1d2	481	TGGGCTCGGGGA	AATTAGAAGCGCCAAAT	TTCTGGAGTTCCTTAC	ACATTCTTCACCCAG	540
gDNAp1d1	481	TGGGCTCGGGGA	AATTAGAAGCGCCAAAT	TTCTGGAGTTCCTTAC	ACATTCTTCACCCAG	540
gDNAp1d2	481	TGGGCTCGGGGA	AATTAGAAGCGCCAAAT	TTCTGGAGTTCCTTAC	ACATTCTTCACCCAG	540
mRNAp1d1	541	AGAACAGGATG	CAAAGTTTCTCTATAT	CAAGATGCTCACGTCC	CAGATAACTTTATTCC	600
mRNAp1d2	541	AGAACAGGATG	CAAAGTTTCTCTATAT	CAAGATGCTCACGTCC	CAGATAACTTTATTCC	600
gDNAp1d1	541	AGAACAGGATG	CAAAGTTTCTCTATAT	CAAGATGCTCACGTCC	CAGATAACTTTATTCC	600
gDNAp1d2	541	AGAACAGGATG	CAAAGTTTCTCTATAT	CAAGATGCTCACGTCC	CAGATAACTTTATTCC	600
mRNAp1d1	601	AAAATCCCTCT	TGCTGGAGGCAAGATTT	ACGAGCCTGCCAGATG	TGGGAGGATATATTT	660
mRNAp1d2	601	AAAATCCCTCT	TGCTGGAGGCAAGATTT	ACGAGCCTGCCAGATG	TGGGAGGATATATTT	660
gDNAp1d1	601	AAAATCCCTCT	TGCTGGAGGCAAGATTT	ACGAGCCTGCCAGATG	TGGGAGGATATATTT	660
gDNAp1d2	601	AAAATCCCTCT	TGCTGGAGGCAAGATTT	ACGAGCCTGCCAGATG	TGGGAGGATATATTT	660

mRNApld1	661	GATGCAATCAGTAATGCGAAACACATGATTTACATTACTGGGTGGTCTGTGTACACTGAA	720
mRNApld2	661	GATGCAATCAGTAATGCGAAACACATGATTTACATTACTGGATGGTCTGTGTACACTGAA	720
gDNApld1	661	GATGCAATCAGTAATGCGAAACACATGATTTACATTACTGGGTGGTCTGTGTACACTGAA	720
gDNApld2	661	GATGCAATCAGTAATGCGAAACACATGATTTACATTACTGGATGGTCTGTGTACACTGAA	720
mRNApld1	721	GTCGTTTTGATAAGGGACTCTAGAAGGCAAAAACCTGGTGGGGACATCACTCTTGGAGAG	780
mRNApld2	721	GTCGTTTTGATAAGGGACTCTAGAAGGCAAAAACCTGGTGGGGACATTACCCCTTGGAGAG	780
gDNApld1	721	GTCGTTTTGATAAGGGACTCTAGAAGGCAAAAACCTGGTGGGGACATCACTCTTGGAGAG	780
gDNApld2	721	GTCGTTTTGATAAGGGACTCTAGAAGGCAAAAACCTGGTGGGGACATTACCCCTTGGAGAG	780
mRNApld1	781	TTGCTTAAGAAAAAGGCTGATGAAGGTGTTAGGGTCCTTATGCTTGTATGGGATGACAGA	840
mRNApld2	781	TTGCTTAAGAAAAAGGCTGATGAAGGTGTTAGGGTCCTTATGCTTGTATGGGATGACAGA	840
gDNApld1	781	TTGCTTAAGAAAAAGGCTGATGAAGGTGTTAGGGTCCTTATGCTTGTATGGGATGACAGA	840
gDNApld2	781	TTGCTTAAGAAAAAGGCTGATGAAGGTGTTAGGGTCCTTATGCTTGTATGGGATGACAGA	840
mRNApld1	841	ACCTCTGTGGGTTTATTGAAAAAAGATGGATTGATGGCTACCATGACGAAGACACTTTT	900
mRNApld2	841	ACCTCCGTGGGTTTATTGAAAAAAGATGGATTGATGGCTACTCATGACGAAGACACTTTT	900
gDNApld1	841	ACCTCTGTGGGTTTATTGAAAAAAGATGGATTGATGGCTACCATGACGAAGACACTTTT	900
gDNApld2	841	ACCTCCGTGGGTTTATTGAAAAAAGATGGATTGATGGCTACTCATGACGAAGACACTTTT	900
mRNApld1	901	AATTACTTCCAAGGTACACAGGTGAACTGTGTCTTGTGTCCCCGTAATCCTGATGATGGA	960
mRNApld2	901	AATTACTTCCAAGGTACACAGGTGAACTGTGTCTTGTGTCCCCGTAACCTGATGATGGA	960
gDNApld1	901	AATTACTTCCAAGGTACACAGGTGAACTGTGTCTTGTGTCCCCGTAATCCTGATGATGGA	960
gDNApld2	901	AATTACTTCCAAGGTACACAGGTGAACTGTGTCTTGTGTCCCCGTAACCTGATGATGGA	960
mRNApld1	961	GGCAGCTTCATTCAGGATTTACAGATCTCAACTATGTTCACTCATCACCAGAAGATTGTT	1020
mRNApld2	961	GGCAGCTTTATTCAGGATTTACAGATCTCAACTATGTTCACTCATCACCAGAAGATCGTG	1020
gDNApld1	961	GGCAGCTTCATTCAGGATTTACAGATCTCAACTATGTTCACTCATCACCAGAAGATTGTT	1020
gDNApld2	961	GGCAGCTTTATTCAGGATTTACAGATCTCAACTATGTTCACTCATCACCAGAAGATCGTG	1020
mRNApld1	1021	GTCACGGATAGTGCAATGCCAGTGAAGGATCAAAACAGAGGAGAATTGTGAGTTTTGTT	1080
mRNApld2	1021	GTCACGGATAGTGCAATGCCAGTGAAGGATCAAAACAGAGGAGAATAGTGAGTTTTGTT	1080
gDNApld1	1021	GTCACGGATAGTGCAATGCCAGTGAAGGATCAAAACAGAGGAGAATTGTGAGTTTTGTT	1080
gDNApld2	1021	GTCACGGATAGTGCAATGCCAGTGAAGGATCAAAACAGAGGAGAATTGTGAGTTTTGTT	1080
mRNApld1	1081	GGGGTATTGATCTCTGCGATGGAAGATATGATACTCAGTTCATTCTCTTTTTAGAACC	1140
mRNApld2	1081	GGGGTATTGATCTCTGCGATGGAAGATATGATACTCAGTTCATTCTCTTTTTAGAACC	1140
gDNApld1	1081	GGGGTATTGATCTCTGCGATGGAAGATATGATACTCAGTTCATTCTCTTTTTAGAACC	1140
gDNApld2	1081	GGGGTATTGATCTCTGCGATGGAAGATATGATACTCAGTTCATTCTCTTTTTAGAACC	1140
mRNApld1	1141	TTGGATACTGCCCATCATGATGATTTCCATCAACCTAACTTCACTGGTGGTGAATTACT	1200
mRNApld2	1141	TTGGACACTGCTCACCATGATGATTTCCATCAACCTAACTTCACTGGTGGTGAATTACT	1200
gDNApld1	1141	TTGGATACTGCCCATCATGATGATTTCCATCAACCTAACTTCACTGGTGGTGAATTACT	1200
gDNApld2	1141	TTGGACACTGCTCACCATGATGATTTCCATCAACCTAACTTCACTGGTGGTGAATTACT	1200
mRNApld1	1201	AAAGTGGGCCAGGGAGCCTTGGCATGATATCCACTCCTGTTTAGAAGGACCCATTGCT	1260
mRNApld2	1201	AAAGTGGGCCAGGGAGCCTTGGCATGATATTCATTCTCGTCTAGAAGGACCCATTGCT	1260
gDNApld1	1201	AAAGTGGGCCAGGGAGCCTTGGCATGATATCCACTCCTGTTTAGAAGGACCCATTGCT	1260
gDNApld2	1201	AAAGTGGGCCAGGGAGCCTTGGCATGATATTCATTCTCGTCTAGAAGGACCCATTGCT	1260
mRNApld1	1261	TGGGATGTCCTTTTCAATTTTGAACAGAGGTGGAGGAAAACAGGGTGGGAAAAGACATTCTG	1320
mRNApld2	1261	TGGGATGTACTTTTCAATTTTGAACAGAGGTGGAGGAAAACAGGGTGGGAAAAGACATTCTG	1320
gDNApld1	1261	TGGGATGTCCTTTTCAATTTTGAACAGAGGTGGAGGAAAACAGGGTGGGAAAAGACATTCTG	1320
gDNApld2	1261	TGGGATGTACTTTTCAATTTTGAACAGAGGTGGAGGAAAACAGGGTGGGAAAAGACATTCTG	1320
mRNApld1	1321	GTCAACTTGAGAGAGCTTTCTGAGATAATTATTCCCTCCCTCCCCGTTACGTTCTCTGAA	1380
mRNApld2	1321	GTCAACTTGAGAGAGCTTTCTGAGATAATTATTCCCTCCCTCTCCTGTACGTTCTCCGAA	1380
gDNApld1	1321	GTCAACTTGAGAGAGCTTTCTGAGATAATTATTCCCTCCCTCCCCGTTACGTTCTCTGAA	1380
gDNApld2	1321	GTCAACTTGAGAGAGCTTTCTGAGATAATTATTCCCTCCCTCTCCTGTACGTTCTCCGAA	1380
mRNApld1	1381	GACCCAGAATCATGGAACGTTTCAGTTGTTTCAGATCCATTGATGGTGGGGCTGCTTTTGGGA	1440
mRNApld2	1381	GACCCAGAATCATGGAATGTTCAATTATTTCAGATCCATTGATGGTGGTGGCTGCCTTTGGGA	1440
gDNApld1	1381	GACCCAGAATCATGGAACGTTTCAGTTGTTTCAGATCCATTGATGGTGGGGCTGCTTTTGGGA	1440
gDNApld2	1381	GACCCAGAATCATGGAATGTTCAATTATTTCAGATCCATTGATGGTGGTGGCTGCCTTTGGGA	1440
mRNApld1	1441	TTCCCTGATTACCTGAGGATGCAGCCAAAGCTGGGCTTGTTAGTGGAAAAGACAACATC	1500
mRNApld2	1441	TTCCCTGATTACCTGAGGATGCAGCCAAAGCTGGGCTTGTTAGTGGAAAAGACAACATC	1500
gDNApld1	1441	TTCCCTGATTACCTGAGGATGCAGCCAAAGCTGGGCTTGTTAGTGGAAAAGACAACATC	1500
gDNApld2	1441	TTCCCTGATTACCTGAGGATGCAGCCAAAGCTGGGCTTGTTAGTGGAAAAGACAACATC	1500

mRNApld1	1501	ATCGACCGCAGCATT	CAGGATGCTTATATTAATGCCATT	CGAAGAGCAAAGGACTTCATT	1560
mRNApld2	1501	ATCGACCGCAGCATT	CAGGATGCTTATATTAATGCCATT	CGAAGAGCAAAGGACTTCATT	1560
gDNApld1	1501	ATCGACCGCAGCATT	CAGGATGCTTATATTAATGCCATT	CGAAGAGCAAAGGACTTCATT	1560
gDNApld2	1501	ATCGACCGCAGCATT	CAGGATGCTTATATTAATGCCATT	CGAAGAGCAAAGGACTTCATT	1560
mRNApld1	1561	TACATAGAAAATCAGTATTT	CCTCGGAAAGTTCATACGGTTGGAAAGCAGATGGCATTAAAG	1620	
mRNApld2	1561	TACATTGAAAATCAGTATTTT	CTCGGAAAGTTCATACGGTTGGAAAGCAGAGGGCATTAAAG	1620	
gDNApld1	1561	TACATAGAAAATCAGTATTT	CCTCGGAAAGTTCATACGGTTGGAAAGCAGATGGCATTAAAG	1620	
gDNApld2	1561	TACATTGAAAATCAGTATTT	CTCGGAAAGTTCATACGGTTGGAAAGCAGAGGGCATTAAAG	1620	
mRNApld1	1621	CCTGAGGAAATAAACGCTCTGCATCTTATTCCCAAGGAACTCTCACTAAAAATTGTTAGC	1680		
mRNApld2	1621	CCAGAGGAAATAAATGCTCTGCATCTTATTCCCAAGGAACTCTCACTAAAAATTGTTAGC	1680		
gDNApld1	1621	CCTGAGGAAATAAACGCTCTGCATCTTATTCCCAAGGAACTCTCACTAAAAATTGTTAGC	1680		
gDNApld2	1621	CCAGAGGAAATAAATGCTCTGCATCTTATTCCCAAGGAACTCTCACTAAAAATTGTTAGC	1680		
mRNApld1	1681	AAGATTGAAGCTGGTGAGAGGTTTACTGTC	TATGTCGTTGTTCCGATGTGGCCAGAGGGT	1740	
mRNApld2	1681	AAGATTATGGCTGGTGAGAGGTTTACTGTTTATGTTGTTGTTCCAATGTGGCCAGAGGGT	1740		
gDNApld1	1681	AAGATTGAAGCTGGTGAGAGGTTTACTGTC	TATGTCGTTGTTCCGATGTGGCCAGAGGGT	1740	
gDNApld2	1681	AAGATTATGGCTGGTGAGAGGTTTACTGTTTATGTTGTTGTTCCAATGTGGCCAGAGGGT	1740		
mRNApld1	1741	ATCCCAGAGAGTGTCATCAGTTCAGGCGATATTAGATTGGCAGAGGAGGACTTGGGACATG	1800		
mRNApld2	1741	ATCCCAGAGAGTGTCATCAGTTCAGGCGATATTAGATTGGCAGAGGAGGACTTGGGACATG	1800		
gDNApld1	1741	ATCCCAGAGAGTGTCATCAGTTCAGGCGATATTAGATTGGCAGAGGAGGACTTGGGACATG	1800		
gDNApld2	1741	ATCCCAGAGAGTGTCATCAGTTCAGGCGATATTAGATTGGCAGAGGAGGACTTGGGACATG	1800		
mRNApld1	1801	ATGTACGCTGACATCACTCAAGCTCTTAAAGCTAAAGGGCTTGTGCTGACCCTAGGGAC	1860		
mRNApld2	1801	ATGTACGCTGACATCACTCAAGCTCTTAAAGCTAAAGGGATTGTAGCTGACCCTAGGGAC	1860		
gDNApld1	1801	ATGTACGCTGACATCACTCAAGCTCTTAAAGCTAAAGGGCTTGTGCTGACCCTAGGGAC	1860		
gDNApld2	1801	ATGTACGCTGACATCACTCAAGCTCTTAAAGCTAAAGGGATTGTAGCTGACCCTAGGGAC	1860		
mRNApld1	1861	TACTTGACATTCTTCTGTCTCGGTAATCGAGAGGTGAAGAAAGAAGGAGAGTATGTACCA	1920		
mRNApld2	1861	TATTTGACATTCTTCTGTCTCGGTAATCGAGAGGTGAAGAAAGAAGGAGAGTATGTACCA	1920		
gDNApld1	1861	TACTTGACATTCTTCTGTCTCGGTAATCGAGAGGTGAAGAAAGAAGGAGAGTATGTACCA	1920		
gDNApld2	1861	TATTTGACATTCTTCTGTCTCGGTAATCGAGAGGTGAAGAAAGAAGGAGAGTATGTACCA	1920		
mRNApld1	1921	TCAGAAACTCCAGACCCTGATACGGATTATAGTAGAGCTCAGGCGGCTCGACGATTTCATG	1980		
mRNApld2	1921	TCAGAAACTCCAGACCCTGATACAGATTATAGTAGAGCTCAGGAGGCTCGACGATTTCATG	1980		
gDNApld1	1921	TCAGAAACTCCAGACCCTGATACGGATTATAGTAGAGCTCAGGCGGCTCGACGATTTCATG	1980		
gDNApld2	1921	TCAGAAACTCCAGACCCTGATACAGATTATAGTAGAGCTCAGGAGGCTCGACGATTTCATG	1980		
mRNApld1	1981	ATCTACGTTACACCAAGATGATGAT-----	2006		
mRNApld2	1981	ATCTACGTTACACCAAGATGATGAT-----	2006		
gDNApld1	1981	ATCTACGTTACACCAAGATGATGATAGGTACGTATGACGGCTTTAGTGATTTCTTTTAT	2040		
gDNApld2	1981	ATCTACGTTACACCAAGATGATGATAGGTACGTATGACGGCTTTAGTGATTTCTTTTAT	2040		
mRNApld1	2006	-----	2006		
mRNApld2	2006	-----	2006		
gDNApld1	2041	TAGCTTGAATTAGCATTTTCTGAAATCTTTCTTCTTAGATTGGGAATATAGATTAGTGGT	2100		
gDNApld2	2041	TAGCTTGAATTAGCATCTTCTGAAATCTTTCTTCTTAGACTGGGAATATAGATTAGTGGT	2099		
mRNApld1	2006	-----	2006		
mRNApld2	2006	-----	2006		
gDNApld1	2101	TTAAATGTTAATTTACAACCTTGATCTGGTAACTCTAGACGTGCATAGTTGGTCTAAATC	2160		
gDNApld2	2100	TTAAATGTTAATTTAAAACCTTGATCTGGTAACTCTAGACGTGCATAGTTGGTCTAAATC	2159		
mRNApld1	2006	-----	2006		
mRNApld2	2006	-----	2006		
gDNApld1	2161	AGGAGTCAAGACTCCAATGTTCTTCCCAAGTCTTAACA-GTTAACATGTTTAGAAAACCTC	2219		
gDNApld2	2160	AGGAGTCATGAATCCAATTTTCTTCCCAAGTCTTAACACGTTTACTCATTTAGAAAACCC	2219		
mRNApld1	2006	-----	2006		
mRNApld2	2006	-----	2006		
gDNApld1	2220	TGTAACCTAGGTGTCAATTGCCATTGCTGAGGTGTCCCAACCCCTGCTTACATGTTAGTC	2279		
gDNApld2	2220	TGCAAACTAGGCGTCGTTGCTGTTGGTGAGGTGTCCCAACCCCTGCGTAAACATGTTAGTC	2279		
mRNApld1	2006	-----	2006		
mRNApld2	2006	-----	2006		
gDNApld1	2280	AAAAAAATGGAACCTTGCTTTGATGTTGTAGTTCAATCATGCCGAAACTAAATACTCA	2339		
gDNApld2	2280	GACAAAATGAACTTGTGCTTTGATGTTGTAGTTCAATCATGCCGAAACTAAATACTCA	2339		

mRNApld1	2006	-----AGTTGACGATGAATACATAATCATTGGATCAGC	2039
mRNApld2	2006	-----AGTTGATGATGAATACATAATCATTGGATCAGC	2039
gDNApld1	2340	TTTTGGATTATTTTGCCTGCTTTTACAGTTGACGATGAATACATAATCATTGGATCAGC	2399
gDNApld2	2340	TTTTGGATTATTTTGCCTGCTTTTACAGTTGATGATGAATACATAATCATTGGATCAGC	2399
mRNApld1	2040	TAACATCAATGAGAGATCAATGAATGGTGCAAGGGATTCTGAAATTGCCATGGGAGGTTA	2099
mRNApld2	2040	CAACATCAACGAGAGATCAATGAATGGTGCAAGAGATTCTGAAATTGCCATGGGAGGTTA	2099
gDNApld1	2400	TAACATCAATGAGAGATCAATGAATGGTGCAAGGGATTCTGAAATTGCCATGGGAGGTTA	2459
gDNApld2	2400	CAACATCAACGAGAGATCAATGAATGGTGCAAGAGATTCTGAAATTGCCATGGGAGGTTA	2459
mRNApld1	2100	CCAACCTCATCACCTAGCTCACAGAGAACCAGCAACGGGTCAAATCCACGGATTCCGTAT	2159
mRNApld2	2100	CCAACCTCATCACCTAGCTCACAGAGAACCAGCAACGGGTCAAATCCACGGATTCCGTAT	2159
gDNApld1	2460	CCAACCTCATCACCTAGCTCACAGAGAACCAGCAACGGGTCAAATCCACGGATTCCGTAT	2519
gDNApld2	2460	CCAACCTCATCACCTAGCTCACAGAGAACCAGCAACGGGTCAAATCCACGGATTCCGTAT	2519
mRNApld1	2160	GGCATTATGGTATGAACATCTTGGCATGCTCGATGAAGTTTTCTCCATCCTAACAGCGA	2219
mRNApld2	2160	GGCATTATGGTATGAACATCTTGGCATGCTGGATGAAGTTTTCTCCATCCCAACAGTGA	2219
gDNApld1	2520	GGCATTATGGTATGAACATCTTGGCATGCTCGATGAAGTTTTCTCCATCCTAACAGCGA	2579
gDNApld2	2520	GGCATTATGGTATGAACATCTTGGCATGCTGGATGAAGTTTTCTCCATCCCAACAGTGA	2579
mRNApld1	2220	GGAATGTGTGCAAAAGGTGAACAGGATCGCTGATAAAATACTGGGATCTTACTCGAGTGA	2279
mRNApld2	2220	GGAATGTGTGCAAAAGGTGAACAGGATCGCTGATAAAATACTGGGATCTGTACTCGAGCGA	2279
gDNApld1	2580	GGAATGTGTGCAAAAGGTGAACAGGATCGCTGATAAAATACTGGGATCTTACTCGAGTGA	2639
gDNApld2	2580	GGAATGTGTGCAAAAGGTGAACAGGATCGCTGATAAAATACTGGGATCTGTACTCGAGCGA	2639
mRNApld1	2280	TTCTCTTGAACGTGATCTACCTGGACACCTCCTTAGGTACCCAATTGGAATCACTGAAAA	2339
mRNApld2	2280	TTCTCTTGAACGTGATCTACCTGGACACCTCCTCAGGTACCCAATTGGAATCACTGAAAA	2339
gDNApld1	2640	TTCTCTTGAACGTGATCTACCTGGACACCTCCTTAGGTACCCAATTGGAATCACTGAAAA	2699
gDNApld2	2640	TTCTCTTGAACGTGATCTACCTGGACACCTCCTCAGGTACCCAATTGGAATCACTGAAAA	2699
mRNApld1	2400	TGGAGATGTTACTGCGTTGCCCGGTTCATGAGTTCTTCCCCGACACTAAAGCTAGAGTACT	2399
mRNApld2	2400	TGGAGATGTGACTGAGTTGCCAGGTTCATGAGTTCTTCCCCGACACTAAAGCACGTGTTCT	2399
gDNApld1	2700	TGGAGATGTTACTGCGTTGCCCGGTTCATGAGTTCTTCCCCGACACTAAAGCTAGAGTACT	2759
gDNApld2	2700	TGGAGATGTGACTGAGTTGCCAGGTTCATGAGTTCTTCCCCGACACTAAAGCACGTGTTCT	2759
mRNApld1	2400	TGGTGC CAAGTCTGATTACCTTCCCTCCTATTCTCACAACATAGGTTCTATCCTTCTTTCT	2459
mRNApld2	2400	TGGTGC CAAGTCCGATTACCTTCCCTCCAATTCTCACTACATAGGTTATGTACTTATATCC	2459
gDNApld1	2760	TGGTGC CAAGTCTGATTACCTTCCCTCCTATTCTCACAACATAGGTTCTATCCTTCTTTCT	2819
gDNApld2	2760	TGGTGC CAAGTCCGATTACCTTCCCTCCAATTCTCACTACATAGGTTATGTACTTATATCC	2819
mRNApld1	2460	CTCTACTAATCGTACTCTTATATCATACTAGTggtataatggtatgtagtataataaaaaat	2519
mRNApld2	2460	TTCTTTCTCCCGTACTCTTATATCCAATAAAAAGT-----	2493
gDNApld1	2820	CTCTACTAAT-----	2829
gDNApld2	2820	TTCTTTCTC-----	2828
mRNApld1	2520	ctcttgccTGTAACTTTGGAGTGTTTA---GGGTTTATGATCATAGATTGTTTATTTTA	2576
mRNApld2	2493	-----TGTAACTTTGGAGTGTTTAAttaGGTTTCTGATCAGAGATTGTTTATTTTA	2545
gDNApld1	2829	-----	2829
gDNApld2	2828	-----	2828
mRNApld1	2577	TAAATtctgcatgtgTGGTCACAGGTCTGTTTGGCTTATAAGCTGTATTTTCTCATCTGT	2636
mRNApld2	2546	CAAAAT-----TGGTCACGGTCTGTTTCGCTTATAAACTGTATTTGCTAATTTGT	2595
gDNApld1	2829	-----	2829
gDNApld2	2828	-----	2828
mRNApld1	2637	TTTAGTaatgaaattctgtgttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	2679
mRNApld2	2596	TTTAGT-----	2601
gDNApld1	2829	-----	2829
gDNApld2	2828	-----	2828

## A2 Primärstruktur und Sekundärstrukturvorhersage für die 2 PLD-Isoenzyme aus Schlafmohn

Gelb markiert, Sequenzunterschiede; türkis markiert, Cystein-Reste; rot, HxKxxxxDxxxxxGSxN (katalytische Motive); grau markiert, Asn-Glykosylierungsstelle NFTG; PHD Sekundärstrukturvorhersage, profile network prediction Heidelberg für alle Reste mit einer durchschnittlichen Genauigkeit von > 82 %; H, Helix; E, Faltblatt; L, Loop (andere Strukturelemente); ., keine Vorhersage (Rel < 5); Rel, Wahrscheinlichkeitsfaktor (0 für gering bzw. 9 für hoch).

PHDMohn1			L..EEE.L.EEEEEEE.LLLLLLLLLLLLLL...HHHH...LLLLLLL.EEEEE
Mohn1	1	MAQISLHGTLHVTIFEANSISHPDRKTGGAPKFFRKLVENIEETVFGKGASMLYASVDL	60
Mohn2	1	MAQISLHGTLHVTIFEANSISHPDRKTGGAPKFFRKLVENIEETVFGKGASMLYASVDL	60
PHDMohn2			L..EEE.L.EEEEEEE.LLLLLLLLLLLLLL...HHHH...LLLLLLL.EEEEE
PHDMohn1			.....EEE.LLLLLL...EEE.E...EEEEEEE.LLLL.EEEEEEE.E...
Mohn1	61	DKARVGRTRIIKDEPVNPKWYESFHICYAHMAANVIFTVKDDNPIGATLIGRAYVPIDKV	120
Mohn2	61	DKARVGRTRIIKDEPVNPKWYESFHICYAHMAANVIFTVKDDNPIGATLIGRAYVPIDQV	120
PHDMohn2			.....EEE.LLLLLL...EEEE...EEEEEEE.LLLL.EEEEEEE.....
PHDMohn1			LLI.HH.....LLLLLLLLL.EEEEEEE.LLLLLL...LLLLLLLLL.....
Mohn1	121	LSGEEVDEWEVVDQERNPVQGGCKIHVKLQYFDVGQDKNWARGIRSAKFPGVPTFFFTQ	180
Mohn2	121	LSGEEVDEWEVVDERNPVQGGCKIHVKLQYFDVGQDKNWARGIRSAKFPGVPTFFFTQ	180
PHDMohn2			LLI.HH.H.....LLLLLLLLL.EEEEEEE.LLLLLL...LLLLLLLLL.....
PHDMohn1			LLL.EEEEE.LLLLLLLL.LLLLLLLLLL...HHHHHHHHH...EEE.....
Mohn1	181	RTGCKVSLYQDAHVPDNFIPKIPLAGGIYEPARCWEDIFDAISNAKHMIIYITGWSVYTE	240
Mohn2	181	RTGCKVSLYQDAHVPDNFIPKIPLAGGIYEPARCWEDIFDAISNAKHMIIYITGWSVYTE	240
PHDMohn2			LLL.EEEEE.LLLLLLLL.LLLLLLLLLL...HHHHHHHHH...EEE.....E
PHDMohn1			EEEE.LLLLLLLLLL.HHHHHHHH.L.EEEEEEE.LL.....LL.LL.HHHH
Mohn1	241	VVLIRDSRRQKPGGDITLGELLKKKADEGVRVLMVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEDTF	300
Mohn2	241	VVLIRDSRRQKPGGDITLGELLKKKADEGVRVLMVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEDTF	300
PHDMohn2			EEEE.LLLLLLLLLL.HHHHHHHH.L.EEEEEEE.LL.....LL.LL.HHHH
PHDMohn1			HH.LL.EEEEE.LLLLLLL.EE...EEEE...EEEE.LLLLLLL.EEEEE.
Mohn1	301	NYFQGTQVNCVLCPRNPDDGGSFIQDLQISTMFTHHQKIVVTDSAMPSEGSQQRRIVSFV	360
Mohn2	301	NYFQGTQVNCVLCPRNPDDGGSFIQDLQISTMFTHHQKIVVTDSAMPSEGSQQRRIVSFV	360
PHDMohn2			HH.LL.EEEE.LLLLLLL.EE...EEEE...EEEE.LLLLLLL.EEEEE.

PHDMohn1	LL . LLLLLLLL . . . . . LLLLLLLLLLLLLLLL . . . . . LL . . .
Mohn1	361 GGIDL CDGRYDTQFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFTGGAITKGGPREPWHDIHSCLEGPIA 420
Mohn2	361 GGIDL CDGRYDTQFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFTGGAITKGGPREPWHDIHSRLEGPIA 420
PHDMohn2	LLL . LLLLLLLL . . . . . L . LLLLLLLLLLLLLLLL . . . . . LL . . .
PHDMohn1	HHHHHHHHHH . LLL . . . . . H . . . . . LLLLLLLLLLLL . EEEEE . LLLLLL
Mohn1	421 WDLVFNFEQRWRKQGGKDILVNLRELSEI IIPSPVTFSEDPESWNVQLFRSIDGGAAGF 480
Mohn2	421 WDLVFNFEQRWRKQGGKDILVNLRELSEI IIPSPVTFSEDPESWNVQLFRSIDGGAAGF 480
PHDMohn2	HHHHHHHHHH . LLL . . . . . LLLLLLLLLLLL . EEEEE . LLLLLL
PHDMohn1	LLL HHHH . . . . . LLL . . . . . HHHHHHHHH . . . . . EEEEE . . . . . LLLLLL
Mohn1	481 FPDSPEDAAGLVSGKDNIIDRSIQDAYINAIIRAKDFIYIENQYFLGSSYGWKA DGIK 540
Mohn2	481 FPDSPEDAAGLVSGKDNIIDRSIQDAYINAIIRAKDFIYIENQYFLGSSYGWKA EGIK 540
PHDMohn2	LLL HHHH . . . . . LLL . . . . . HHHHHHHHH . . . . . EEEEE . . . . . LLLLLL
PHDMohn1	LLLLLLLLL . . . . . HHHHHHHH . . . . . EEEEE . LLLLLLL . HHHHHHHHHHHHHH
Mohn1	541 PEEINALHLIPKELSLKIVSKI EAGERFTVYVVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRTWDM 600
Mohn2	541 PEEINALHLIPKELSLKIVSKI MAGERFTVYVVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRTWDM 600
PHDMohn2	LLLLLLLLL . . . . . HHHHHHHH . . . . . EEEEE . LLLLLLL . HHHHHHHHHHHHHH
PHDMohn1	HHHHHHHHHH . LLLLLL . . . . . L . . . . . LLLLLLLLLLLLLLL . . . . . HHHHHH . EE
Mohn1	601 MYADITQALKAKG L VADPRDYLTFF C LGNREVKKEGEYVPSETPDPD TDYSRAQA AARRFM 660
Mohn2	601 MYADITQALKAKG I VADPRDYLTFF C LGNREVKKEGEYVPSETPDPD TDYSRAQE AARRFM 660
PHDMohn2	HHHHHHHHHH . LLLLLL . . . . . L . . . . . LLLLLLLLLLLLLLL . HHHHHH . . . . . E
PHDMohn1	EEE . . . . . EEEE . EEEEE . L . . . . . LLLL . . . . . LLLLLLLLLLLL . . . . . H
Mohn1	661 IYVHTKMMIVDDEYII IGSANINERSMNGARDSEIAMGGYQPHHLAHREPATQI HGFRM 720
Mohn2	661 IYVHTKMMIVDDEYII IGSANINERSMNGARDSEIAMGGYQPHHLAHREPATQI HGFRM 720
PHDMohn2	EEE . . . . . EEEE . EEEEE . L . . . . . LLLL . . . . . LLLLLLLLLLLL . . . . . HH
PHDMohn1	HHHHHHHHHH . LLLL . HHHHHHHHHHHHHHHH . HHHH . . . . . LL
Mohn1	721 ALWYEHGLMDEVFLHPNSEE CVQKVNRIADKYWDLYSSDSL ERDLPGHLLRYPIGITEN 780
Mohn2	721 ALWYEHGLMDEVFLHPNSEE CVQKVNRIADKYWDLYSSDSL ERDLPGHLLRYPIGITEN 780
PHDMohn2	HHHHHHHHHH . LLLL . HHHHHHHHHHHHHHHH . L . HHHH . . . . . L . E . LL

PHDMohn1 I.E..TTTTT.TTTTTT.E..TTTTTTTTTTTT

Mohn1 781 GDVTALPGHEFFPDTKARVLGGKSDYLPPILTT 813

Mohn2 781 GDVTELPGHEFFPDTKARVLGAKSDYLPPILTT 813

PHDMohn2 I...TTTT.T.TTTTTT.E..TTTTTTTTTTTT



### A3 Multiples Alignment der Primärstrukturen der Mohn-PLD-Isoenzyme mit pflanzlichen PLDs des $\alpha$ -Typs mittels Clustal W

Blau, identische und ähnliche Aminosäuren; schwarz, Sequenzunterschiede; gelb markiert, Cystein-Reste; rot markiert, HxKxxxxDxxxxxxGSxN (katalytische Motive); grün,  $\beta$ -Faltblätter der C2-Domäne (Zheng et al., 2000); CBL, Ca<sup>2+</sup>-Bindeloop; violett markiert, für Ca<sup>2+</sup>-Bindung verantwortliche saure Aminosäuren; dunkelgrün markiert, mögliche PIP<sub>2</sub>-Bindungsmotive KxxxxRxRK bzw. RxRxxxxK. Species-Kurzformen: *Arath*, *Arabidopsis thaliana*; *Braol*, *Brassica oleracea*; *Crapl*, *Craterostigma plantagineum*; *Lyces*, *Lycopersicon esculentum*; *Nicta*, *Nicotiana tabacum*; *Orysa*, *Oryza sativa*; *Papso*, *Papaver somniferum*; *Pimbr*, *Pimpinella brachycarpa*; *Ricco*, *Ricinus communis*; *Vigun*, *Vigna unguiculata*; *Zeama*, *Zea mays*.

		←β1→		CBL 1		←β2→			
Arath a1	1	MAHDLHGLT	HATIYVDAL	HGG---GVMQ	G-FLGKILAN	VEETIGVGKG	ETRYLATIDL		56
Arath a2	1	MEECLLHGR	HATIYVDHL	HAE---GGRS	G-FLGSILAN	VEETIGVGKG	ETQLYATIDL		56
Braol a1	1	MAQHLLHGLT	HATIYVDL	HTG---GLRS	G-FFGKILAN	VEETIGVGKG	ETQLYATIDL		56
Braol a2	1	MAQHLLHGLT	HATIYVDAL	HTG---GLRS	AGFLGKIISN	VEETIGVGKG	ETQLYATIDL		57
Crapl a1	1	MAQILLHGLT	HVTIYVDQL	H-----SGGG	GNFFTCLKAN	IEETVGFQKG	TPKIYASIDL		55
Crapl a2	1	MARILLHGLT	HVTIYVDRL	H-----AGGG	GNIFSCLRAN	IEEKVGFQKG	TPKIYASIDL		55
Lyces a1	1	MAQIQLHGLT	HVTIFEVDNL	QG----EEEG	GHFFSKIKQH	FEETVGIQKG	TPKLYATIDL		56
Nicta a	1	MAQILLHGLT	HVTIYVDNL	Q-----KEGG	GHFFSKIKEH	VEETIGVFQKG	TPAIYATVDL		55
Orysa a1	1	MAQMLHGLT	HATIFEAASL	SNPHRASGSA	PKFIRKVEG	IEDTVGVQKG	ATKVYSTIDL		60
Papso a1	1	MAQISLHGLT	HVTIFEANSI	SHPDRKTGGA	PKFFRKLVEN	IEETVGFQKG	ASMLYASVDL		60
Papso a2	1	MAQISLHGLT	HVTIFEANSI	SHPDRKTGGA	PKFFRKLVEN	IEETVGFQKG	ASMLYASVDL		60
Pimbr a	1	MAKTLHGLT	HVTIFEVDHL	K-----AGSV	VVFSESLRRT	LRKPLVLAGK	TPKIYASIDL		55
Ricco a	1	MAQISLHGLT	HVTIYVDKL	H-----SGGG	PHFFRKLVEN	IEETVGFQKG	VSKLYATIDL		55
Vigun a	1	MAQILLHGLT	HATIYVDEL	H-----GGGG	GNFFSKLKQN	IEETVGIQKG	VTKLYATIDL		55
Zeama a	1	MAQILLHGLT	HATIFEASL	SNPHRATGGA	PKFIRKLVG	IEDTVGVQKG	ATKIYATVDL		60

		←β3→		CBL 2		←β4→		CBL 3		←β5→		←β6→			
Arath a1	57	QKARVGRTRK	IKNEPKNPKW	YESFQVSVVT	WLLISSLSK	DDIPIGATLI	GRAYIPVDQV								116
Arath a2	57	EKARVGRTRK	ITKEPKNPKW	FESFHYCGH	MAKHVIFTVK	DANPIGATLI	GRGYIPVEDI								116
Braol a1	57	QRARVGRTRK	IKDEAKNPKW	YESFHYCAH	LASDIIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYVPVDQV								116
Braol a2	58	QKARVGRTRK	ITDEPKNPKW	YESFHYCAH	MASDIIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYVPDDEV								117
Crapl a1	56	EKARVGRTRM	IEHEPNPRW	YESFHYCAH	MASNVIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYIPVQEI								115
Crapl a2	56	EKARVGRTRM	IEHEPNPRW	YESFHYCAH	LASNIIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYVPVDV								115
Lyces a1	57	EKARVGRTRK	IEENEPNPRW	YESFHYCAH	MASNVIFTIK	DDNPFASLI	GRAYVPVEEL								116
Nicta a	56	EKARVGRTRK	IKNEPNPRW	YESFHYCAH	MASNVIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYVPVEEL								115
Orysa a1	61	EKARVGRTRM	ITNEPINPRW	YESFHYCAH	MASNVIFTVK	IDNPIGATNI	GRAYLPVQV								120
Papso a1	61	DKARVGRTRI	IKDEPNPKW	YESFHYCAH	MAANVIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYPIDKV								120
Papso a2	61	DKARVGRTRI	IKDEPNPKW	YESFHYCAH	MAANVIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYPIDQV								120
Pimbr a	56	DKARVGRTRM	IEENEPNPKW	NESFHYCGH	PSTNVIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYLPVHEL								115
Ricco a	56	EKARVGRTRI	LENEQSNPRW	YESFHYCAH	QASNVIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYVPVEEL								115
Vigun a	56	EKARVGRTRI	IEENTNPKW	NESFHYCGH	LASNIIFTVK	DDNPIGATLI	GRAYVPVSEV								115
Zeama a	61	EKARVGRTRM	ISNEPNPRW	YESFHYCAH	MAADVIFTVK	IDNSIGASLI	GRAYLAVQDL								120

		←β7→		←β8→					
Arath a1	117	ING-EVDQVW	EILDNDRNPI	QGGSKIHVKL	QYFHVIEDRN	WNMGIKSAKF	PGVPYTFSSQ		175
Arath a2	117	LHGEEVDRWV	DILDNEKNPI	AGGSKIHVKL	QYFGVEKDKN	WNRGIKSAKF	PGVPYTFSSQ		176
Braol a1	117	IHGEEVDQVW	EILDNDRNPI	HGGSKIHVKL	QYFGVEADR	WNQGIKSAKF	PGVPYTFSSQ		176
Braol a2	118	INGEEVEKWW	EILDNDRNPI	HGESKIHVKL	QYFAVEADR	WNMGVKSASF	PGVPYTFSSQ		177
Crapl a1	116	LDGEEIDRWV	EILDNKNPI	SGESKIHVKL	QYFDVTRDLN	WNRGIKSVKY	PGVPYTFSSQ		175
Crapl a2	116	LDGEEIDRWV	ELLDNKNPI	RGESKIHVKL	QFFDVARDLN	WNRGIKSIKY	PGVPYTFSSQ		175
Lyces a1	117	LEGEEIDKWV	EIMDKEMNPI	AEGSKIHVKL	QFFDVSRDPN	WGRGIRSSRY	PGVPYTFSSQ		176
Nicta a	116	LEGEEIDKWV	EILDREMNPI	AEGSKIHVKL	QFFDVSRDPN	WGRGIRSSKY	PGVPYTFSSQ		175
Orysa a1	121	LNDEEIDRWL	DICDNNRESV	GE-SKIHVKL	QYFDVSKDRN	WARGVRS TKY	PGVPYTFSSQ		179
Papso a1	121	LSGEEVDEWV	EVVDQERNPV	QGGCKIHVKL	QYFDVGQDKN	WARGIRSAKF	PGVPYTFSSQ		180
Papso a2	121	LSGEEVDEWV	EVVDEERNPV	QGGCKIHVKL	QYFDVGQDKN	WARGIRSAKF	PGVPYTFSSQ		180
Pimbr a	116	LEGEEVDKWW	EILDEKNPI	SEGSKIHVKL	QYFDITQDRN	WAHGIRSSKF	PGVPYTFSSQ		175
Ricco a	116	LDGEEIDRWV	EILDEKNPV	HSGSKIHVKL	QYFEVTKDRN	WGQIRSSKY	PGVPYTFSSQ		175
Vigun a	116	LDGHEIDKWV	EILDTEKNPI	EGGSKIHVKL	QYFDVLKDRN	WARGIRSPKY	PGVPYTFSSQ		175
Zeama a	121	LGEEIDKWV	EISDENREPV	GD-SKIHVKL	QYFDVGKDRN	WARGVRS TKY	PGVPYTFSSQ		179

Arath a1	176	RQGCKVSLYQ	DAHIPDNFVP	RIPLAGGKNY	EPQRCWEDIF	DTISNAKHLI	YITGWSVYAE	235
Arath a2	177	RRGCKVSLYQ	DAHIPGNFVP	KIPLAGGKNY	EPHRCWEDIF	DAITNAKHLI	YITGWSVYTE	236
Braol a1	177	RQGCKVSLYQ	DAHIPDNFVP	RIPLAGGKNY	EPQRCWEDIF	DAISNAQHMI	YITGWSVYTE	236
Braol a2	178	RQGCKVSLYQ	GAHVPDNFVP	KIPLAGGKNY	EPHRCWEDIF	DAITNAKHLI	YITGWSVYTE	237
Crapl a1	176	RTGCKVSLYQ	DAHVPDSFIP	DIPLSGSNY	DPHRCWEDVF	DAISNAKHLI	YITGWSVYTE	235
Crapl a2	176	RKGCKVTLYQ	DAHIPDNFIP	EIPLSGSNY	SPHRCWEDVF	DAISNAKHLI	YITGWSVYTE	235
Lyces a1	177	RPGRVSLYQ	DAHVPDNFIP	KIPLSGGKY	EPHRCWEDIF	DAITNAKHLI	YITGWSVYTE	236
Nicta a	176	RTGCRVSLYQ	DAHVPDNFIP	KIPLSGGKY	EPHRCWEDIF	DAITNAKHLI	YITGWSVYTE	235
Orysa a1	180	RQGCKVTLYQ	DAHVPDNFIP	KIPLADGKNY	EPHRCWEDIF	DAISNAQHMI	YITGWSVYTE	239
Papso a1	181	RTGCKVSLYQ	DAHVPDNFIP	KIPLAGGKIY	EPARCWEDIF	DAISNAKHLI	YITGWSVYTE	240
Papso a2	181	RTGCKVSLYQ	DAHVPDNFIP	KIPLAGGKIY	EPARCWEDIF	DAISNAKHLI	YITGWSVYTE	240
Pimbr a	176	RPGRISLYQ	DAHVPDNFVP	KIPLSGGKFY	EPHRCWEDVF	DAITNAKHFI	YITGWSVYTE	235
Ricco a	176	RQGCKVSLYQ	DAHIPDNFVP	KIPLAGGNY	EPHRCWEDVF	DAITNAKHLI	YITGWSVYTE	235
Vigun a	176	RQGCKVSLYQ	DAHVPDNFVP	KIPLAGGKNY	EAHRCWEDIF	DAITNAKHLI	YITGWSVYTE	235
Zeama a	180	RQGCKVTLYQ	DAHVPDNFVP	RIQLADGKNY	EPHRCWEDIF	DAISKAQHMI	YITGWSVYTE	239

Arath a1	236	IALVRDSRRP	KPGGDVTIGE	LLKKKASEGV	RVLLLVWDDR	TSVDVLKKDG	LMATHDEETE	295
Arath a2	237	ISLVRDSRRP	KQGGDVTIGE	LLKKKASEGV	KVILLVWDDR	TSVDLLKKDG	LMATHDEETE	296
Braol a1	237	IALVRDSRRP	KPGGDVTIGE	LLKKKASEGV	RVLLLVWDDR	TSVDVLKKDG	LMATHDEETE	296
Braol a2	238	ITLVRDSRRP	KPGGDMTIGE	LLKKKASEGV	RVLLLVWDDR	TSVDVLKKDG	LMATHDEETE	297
Crapl a1	236	ITLIRDSRRE	KPGGDITLGE	LLKKKASEGV	NVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDEETE	295
Crapl a2	236	IPLIRDSRRE	KPGGEITLGE	LLKKKANEGV	NVLMVWDDR	TSVGLLKRDR	LMATHDEETE	295
Lyces a1	237	IALVRDSRRQ	KPGGDIMLGE	LLKKKASEGV	KVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDQETE	296
Nicta a	236	ITLVRDSRRQ	KPGGDITLGE	LLKKKASEGV	KVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDQETE	295
Orysa a1	240	ITLVRDSNRP	KPGGDITLGE	LLKKKASEGV	RVLMVWDDR	TSVGLLKRDR	LMATHDEETE	299
Papso a1	241	VVLIRDSRRQ	KPGGDITLGE	LLKKKASEGV	RVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDEETF	300
Papso a2	241	VVLIRDSRRQ	KPGGDITLGE	LLKKKASEGV	RVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDEETF	300
Pimbr a	236	FALIRDTRP	KPGGDIMLGE	LLKKKASEGV	RVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDQETE	295
Ricco a	236	ISLIRDSRRP	KPGGDITLGE	LLKKKASEGV	RVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDEETE	295
Vigun a	236	ISLIRDSRRP	KAGGDQITIGE	LLKKKASEGV	RVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDEETE	295
Zeama a	240	ITLVRDSNRP	KPGGDITLGE	LLKKKASEGV	RVLMVWDDR	TSVGLLKKDG	LMATHDEETA	299

Arath a1	296	NFFRERDVHC	ILCPNPDDG	GSIVQSLQIS	TMFTHQKIV	VDSSEMPERG	G-SEMRRIVS	354
Arath a2	297	NFFRGTDVNC	ILCPNPDDG	GSIVQNLQIS	TMFTHQKIV	VDSSEMPERG	S--RSRRIVS	354
Braol a1	297	NFFRGSDVHC	ILCPNPDDG	GSIVQNLQVS	AMFTHQKIV	VDSSEMPERG	G-SQMRRIVS	355
Braol a2	298	NYFNGSEVHC	VLCPRNPDDG	GSIVQNLQVS	AMFTHQKIV	VDSSEVPSQG	GGSEMRRIMS	357
Crapl a1	296	HYFQGTDVHC	VLCPRNPDDG	GSFVQDLQIS	TMFTHQKII	VDSDLPSGG	--SDKRRIVS	353
Crapl a2	296	NYFQGTDVHC	ILCPNPDDG	GSFVQDLQIS	TMFTHQKII	VDSDLPSGG	--SDKRRIVS	353
Lyces a1	297	QYFQGTDVNC	VLCPRNPDDG	GSFVQDLQIS	TMFTHQKII	VDSALPSGE	--SEKRRIVS	354
Nicta a	296	QYFQGTDVNC	VLCPRNPDDG	GSFVQDLQIS	TMFTHQKIV	VDSALPSGE	--SEKRRIVS	353
Orysa a1	300	NYFHGSDVNC	VLCPRNPDDG	GSIVQDLQIS	TMFTHQKIV	VDSHELPNQG	--SQRRIVS	357
Papso a1	301	NYFQGTQVNC	VLCPRNPDDG	GSFIQDLQIS	TMFTHQKIV	VDSAMPSEG	--SQRRIVS	358
Papso a2	301	NYFQGTQVNC	VLCPRNPDDG	GSFIQDLQIS	TMFTHQKIV	VDSAMPSEG	--SEKRRIVS	358
Pimbr a	296	EYFRDSNVHC	VLCPRNPDDG	GGIIQGLTIS	TIFTHQKIV	VDSSEMPERG	--SENRRIVS	353
Ricco a	296	HFFQNTDVHC	VLCPRNPDDG	GSFVQDLQIS	TMFTHQKIV	VDSAMPNGD	--SQRRIVS	353
Vigun a	296	QYFRDSDVHC	VLCPRNPDDG	GSIVQDLQIS	TMFTHQKIV	VDSALPGGG	G--SDKRRIVS	354
Zeama a	300	NYFHGTDVNC	VLCPRNPDDG	GSFVQDLQIS	TMFTHQKIV	VDSHELPNQG	--SQRRIVS	357

Arath a1	355	FVGGIDLCDG	RYDYSVPLLV	QDIGHSHDD	FHQPNFTGAA	ITKGGPREPW	HDIHSRLEGP	414
Arath a2	355	FVGGDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFTGAA	ITKGGPREPW	HDIHCRLEGP	414
Braol a1	356	FVGGIDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTVHDD	FHQPNFTGAA	ITKGGPREPW	HDIHSRLEGP	415
Braol a2	358	FVGGIDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTVHDD	FHQPNFTGAS	ITKGGPREPW	QDIHSRLEGP	417
Crapl a1	354	FVGGIDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFTGAA	ITKGGPREPW	HDIHSRLEGP	413
Crapl a2	354	FVGGIDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFTGAV	IAKGGPREPW	HDIHSRLEGP	413
Lyces a1	355	FVGGIDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFADGS	ITKGGPREPW	HDIHSRLEGP	414
Nicta a	354	FVGGIDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFPDGA	ITKGGPREPW	HDIHSRLEGP	413
Orysa a1	358	FVGGDLCDG	RYDTQYHSLF	RTLDSHDD	FHQPNFATAS	IKKGGPREPW	HDIHSRLEGP	417
Papso a1	359	FVGGIDLCDG	RYDTQFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFTGGA	ITKGGPREPW	HDIHSCLEGP	418
Papso a2	359	FVGGIDLCDG	RYDTQFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFTGGA	ITKGGPREPW	HDIHSRLEGP	418
Pimbr a	354	FVGGIDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFEGAA	ITKGGPREPW	HDIHSRLEGP	413
Ricco a	354	FVGGDLCDG	RYDTPFHSLF	RTLDSAHDD	FHQPNFAGAS	IEKGGPREPW	HDIHSRLEGP	413
Vigun a	355	FVGGDLCDG	RYDTAFHSLF	RTLDTAHDD	FHQPNFPGAA	ITKGGPREPW	HDIHSRVEGP	414
Zeama a	358	FIGGIDLCDG	RYDTQYHSLF	RTLDTVHDD	FHQPNFEGGS	IKKGGPREPW	HDIHSRLEGP	417

Arath a1	415	IAWDVMYNFE	QRWSKQGGKE	ILVKLRDLS	IIITPSVPMF	QETTMCMSN	CLGPLMEELL	474
Arath a2	415	IAWDVLYNFE	QRWSRQGGKD	ILVKMRELGD	IIIPSPVLF	SEDHDVWNVQ	LFRSIDGGAA	474
Braol a1	416	IAWDVLYNFE	QRWSKQGGKD	ILVKLRELS	IIITPSVPMF	QEDHDVWNVQ	LFRSIDGGAA	475
Braol a2	418	IAWDVLYNFE	QRWSKQGGKD	ILVKLRELS	IIITPSVPMF	QEDHDVWNVQ	LFRSIDGGAA	477
Crapl a1	414	IAWDVLFNFE	QRWKQGGK	VLLNLREIDD	-IIPPTSVTY	HDDPETWNVQ	LFRSIDGGAA	472
Crapl a2	414	IAWDVLFNFE	QRWKQAGRD	LLINLREIED	-IIPPTVPTY	DDDQETWNVQ	LFRSIDGGAA	472
Lyces a1	415	IAWDVLFNFE	QRWRKQGGK	ILVNFRELD	VIIPSPVPMY	PDDHETWNVQ	LFRSIDGGAA	474
Nicta a	414	IAWDVLFNFE	QRWRKQGGK	VLVNFRELD	IIIPSPVMH	LDDSETWNVQ	LFRSIDGGAA	473
Orysa a1	418	IAWDVLYNFE	QRWRKQGGK	LLLQLRDLSD	TIIPSPVPMF	PEDRETWNVQ	LFRSIDGGAA	477
Papso a1	419	IAWDVLFNFE	QRWRKQGGK	ILVNLRELSE	IIIPSPVTF	SEDPESWNVQ	LFRSIDGGAA	478
Papso a2	419	IAWDVLFNFE	QRWRKQGGK	ILVNLRELSE	IIIPSPVTF	SEDPESWNVQ	LFRSIDGGAA	478
Pimbr a	414	VAWDVLFNFE	QRWRKQGGK	ILLNLRELQD	VIIPSPVTF	PDDDETWNVQ	LFRSIDGGAA	473
Ricco a	414	IAWDVLFNFE	QRWRKQGGK	LLIQLRELED	VIIPSPVPMY	PDDFEAWNVO	LFRSIDGGAA	473
Vigun a	415	IAWDVLFNFE	QRWRKQGGK	ILAPLRELED	VIIPSPVTF	PDDHETWNVQ	LFRSIDGGAA	474
Zeama a	418	IAWDVLYNFE	QRWRKQGGK	LLVLRDLDP	IIIPSPVPMF	PEDRETWNVQ	LFRSIDGGAA	477

Arath a1	475	LGFP SRLKLL	RKPGLYSGK	NIIDRSIQDA	YIHAIIRAKD	FIYVENQYFL	GSSFAWAADG	534
Arath a2	475	AGFPDSPEAA	AEAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIHAIIRAKD	FIYIENQYFL	GSSFAWSADG	534
Braol a1	476	AGFPESPEAA	AEAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIHAIIRAKD	FIYIENQYFL	GSSFAWAADG	535
Braol a2	478	AGFPDSPEVA	AEAGLVSGK	NVIDRSIQDA	YIHAIIRAKD	FIYIENQYFL	GSSFAWAADG	537
Crapl a1	473	FGFPDTPPEA	AKSGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIQAIRRAKN	FIYIENQYFL	GACFGWDSND	532
Crapl a2	473	FGFPETPEEA	AKAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIQAIRRAKN	FIYIENQYFL	GCFCFGWDSND	532
Lyces a1	475	FGFPDTPEDA	AKAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIHAIIRAKN	FIYIENQYFL	GSCADWQCDD	534
Nicta a	474	FGFPETPEDA	AKAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIHAIIRAKN	FIYIENQYFL	GSSYDWQSDD	533
Orysa a1	478	FGFPDTPPEA	AKAGLVSGK	QIIDRSIQDA	YIHAIIRAKN	FIYIENQYFL	GSSYAWKPEG	537
Papso a1	479	FGFPDTPEDA	AKAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YINAIRRAKD	FIYIENQYFL	GSSYGWKADG	538
Papso a2	479	FGFPDTPEDA	AKAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YINAIRRAKD	FIYIENQYFL	GSSYGWKAEG	538
Pimbr a	474	FFFPQTPPEA	AKAGLVSGK	NIIIVRSIQDA	YIHAIIRGPKI	SFILKISIFL	EALLAGIQRI	533
Ricco a	474	FGFPETPEDA	PEAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIHAIIRAKN	FIYIENQYFL	GSSFCGSPDG	533
Vigun a	475	FGFPDTPEDA	AKAGLVSGK	NIIDRSIQDA	YIHAIIRAKN	FIYIENQYFL	GSSFSWNNDD	534
Zeama a	478	FGFPETPEEA	ARAGLVSGK	QIIDRSIQDA	YVNAIRRAKN	FIYIENQYFL	GSSYGWKPEG	537

Arath a1	535	ITPEDINALH	LIPKELSLKI	VSKIDQGEKF	RVYVVPMWP	EGLPESGSVQ	AILDWQRRTM	594
Arath a2	535	IKPEEINALH	LIPKELSLKI	VSKIKAGEKF	KVYVVPMWP	EGIPESGSVQ	AILDWQKRTM	594
Braol a1	536	ITPEDINALH	LIPKELSLKI	VSKIEKGEKF	RVYVVPMWP	EGLPESASVQ	AILDWQRRTM	595
Braol a2	538	ITPEDINALH	LIPKELSLKI	VDKIEKGEKF	RVYVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQRRTL	597
Crapl a1	533	IKVEDVGALH	LIPKELSMKI	VSKIEAGERF	TVYIVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQRRTM	592
Crapl a2	533	IKVEDVGALH	LIPKELSLKI	VSKIEAGERF	AVYVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQRRTM	592
Lyces a1	535	IKVEDIGALH	VIPKELALKI	VSKIEAGERF	TVYVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQRRTM	594
Nicta a	534	IKVEDIGALH	VIPKELALKI	VSKIEAGERF	TVYVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQRRTM	593
Orysa a1	538	IKPEDI GALH	LIPKELALKV	VSKIEAGERF	TVYVVPMWP	EGVPESGSVQ	AILDWQRRTM	597
Papso a1	539	IKPEEINALH	LIPKELSLKI	VSKIEAGERF	TVYVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQRRTW	598
Papso a2	539	IKPEEINALH	LIPKELSLKI	VSKIMAGERF	TVYVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQRRTW	598
Pimbr a	534	LKMRTSVLCI	LIPKELSLKI	VSKIEAGKRF	TVYVVLPMWP	EGIPESGSVQ	AILDWQRRTM	593
Ricco a	534	IKPEDI GALH	LIPKELSLKI	LSKIAAGERF	TVYIVVPMWP	EGIPESASVQ	AILDWQKRTM	593
Vigun a	535	IKREEI GALH	LIPKELSLKI	VSKIEAGERF	AVYVVPMWP	EGIPESSSVQ	AILDWQKRTI	594
Zeama a	538	IKPEEI GALH	LIPKELSLKI	VSKIEAGERF	TVYVVPMWP	EGVPESASVQ	AILDWQRRTM	597

Arath a1	595	EMMYKDV IQA	LKGLEGP-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKDGE	YEPAEKPPDP	TDYMRAQEAR	653
Arath a2	595	EMMYKDV IKA	LRNGLGEGED	PRDYLTF FCL	GNREVKKDGE	YEPSEKPEPD	TDYIRAQEAR	654
Braol a1	596	QMMYKDIVQA	LRAQGLE-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKKEGE	YEPAEKPPAD	SSYMKAQEAR	654
Braol a2	598	EMMYKDV TQA	LRAQGLE-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKKEGE	YEPAEKPPDP	TDYMRAQEAR	656
Crapl a1	593	DMMYKDV VQA	LQAKGIE-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKSGE	YEPSEKPEPD	SDYLKAQEAR	651
Crapl a2	593	DMMYKDV VQA	LRAK GIE-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKGGE	YEPT EQPEPD	SDYLRAQQAR	651
Lyces a1	595	EMMYKCI VQA	MNAKGIE-ED	PRNYLTF FCI	GNREVKKSGE	YEPSESPEPD	SNYMRAQEAR	653
Nicta a	594	EMMYKH I VQA	LNAKGIE-ED	PRNYLTF FCI	GNREVKKSGA	YEPSETPEPD	SDYIRAQEAR	652
Orysa a1	598	EMMYTDI TEA	LQAKGIE-AN	PKDYLTF FCL	GNREVQAGE	YQPEKPEAD	TDYSRAQEAR	656
Papso a1	599	DMMYADI TQA	LKAKGLV-AD	PRDYLTF FCL	GNREVKKKEGE	YVPSETPPDP	TDYSRAQAAR	657
Papso a2	599	DMMYADI TQA	LKAKGIV-AD	PRDYLTF FCL	GNREVKKKEGE	YVPSETPPDP	TDYSRAQEAR	657
Pimbr a	594	EMMYKDI IQA	LQANGIE-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKR DGE	YEPSEKPPDP	TDYSRAQESR	652
Ricco a	594	EMMYKDI VQA	LKANGII-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKSGE	YEPAEKPEPD	TDYIRAQEAR	652
Vigun a	595	EMMYKDV VQA	LRAKGS D-ED	PRNYLTF FCL	GNREVKKSGE	YEPAEKPEPD	SDYQRAQEAR	653
Zeama a	598	EMMYTDI AQA	LEANGIE-AN	PKDYLTF FCL	GNREVKKQEGE	YEPSEHPEPD	TDYIRAQEAR	656

Arath a1	654	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GGYQPHHLSH	RQPARGQIHG	713
Arath a2	655	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GGYQPYHLST	RQPARGQIHG	714
Braol a1	655	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GGYQPHHLSH	RQPARGQIHG	714
Braol a2	657	RFMIYVHSEK	MIVDDEYIIV	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GGYQPHHLSH	RQPARGQVHG	716
Crapl a1	652	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GAYQPYHLNT	RNRARGQIHG	711
Crapl a2	652	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GAYQPYHLNT	RNRARGQIHG	711
Lyces a1	654	RFMIYVHSEK	MIVDDEYIIV	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GAYQPYHLAT	SKPARGQVHG	713
Nicta a	653	RFMIYVHSEK	MIVDDEYIIV	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GAYQPHHLLAT	REPARGQIHG	712
Orysa a1	657	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GGYQPYHLAT	RQPARGQIHG	716
Papso a1	658	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINERSM	NGARDSEIAM	GGYQPHHLLAH	REPATGQIHG	717
Papso a2	658	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINERSM	NGARDSEIAM	GGYQPHHLLAH	REPATGQIHG	717
Pimbr a	653	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGAKDSEIAM	GAYQPHHLLAT	REPARGQIHG	712
Ricco a	653	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GAYQPHHLLST	RQPARGQIHG	712
Vigun a	654	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GGYQPYHLAN	TQPARGQVYG	713
Zeama a	657	RFMIYVHTKM	MIVDDEYIII	GSANINQRSM	DGARDSEIAM	GAYQPYHLAT	RQPARGQIHG	716

Arath a1	714	FRMSLWYEHL	GMLDETFLLDP	KLSESIKVN	RISDKYWDFY	SSESLEHDL	GHLRLYPVIGV	773
Arath a2	715	FRMSLWYEHL	GMLDETFLLDP	SSQECIQVN	RVADKYWDLY	SSESLEHDL	GHLRLYPVIGI	774
Braol a1	715	FRMSLWYEHL	GMLDETFLLDP	SSVECEIKVN	RISDKYWDLY	SSESLEHDL	GHLRLYPVDV	774
Braol a2	717	FRMSLWYEHL	GMLDETFLLDP	SSLECEIKVN	RIADKYWDFY	SSESLEHDL	GHLRLYPISV	776
Crapl a1	712	FRMALWYEHL	GMLDETFLEP	DSEECVRKVN	HVADKYWDLY	ASEELEKDL	GHLRLYPVIGI	771
Crapl a2	712	FRMALWYEHL	GMLDEAFLEP	ENECCVRKVN	EIADRYWELY	ASEELENDL	GHLRLYPVEI	771
Lyces a1	714	FRMALWYEHL	GMLDETFQHP	ESECCVRKVN	QIADKYWDLY	SSESLELDL	GHLRLYPVIGV	773
Nicta a	713	FRMALWYEHL	GMLDETFLLHP	ESECCVSKVN	RMADKYWDLY	SSESLELDL	GHLRLYPVIGV	772
Orysa a1	717	FRMALWYEHL	GMLDDVFQRP	ESLECVQKVN	RIAKEYWDMY	SSDDLQQLD	GHLRLSYPVIGV	776
Papso a1	718	FRMALWYEHL	GMLDEVFLHP	NSECCVQKVN	RIADKYWDLY	SSDSLRLDL	GHLRLYPVIGI	777
Papso a2	718	FRMALWYEHL	GMLDEVFLHP	NSECCVQKVN	RIADKYWDLY	SSDSLRLDL	GHLRLYPVIGI	777
Pimbr a	713	FRMSLWYEHL	GMLDDTLALP	ESVDCVQKVN	TVADKYWDLY	SSETLENDL	GHLRLYPVIAV	772
Ricco a	713	FRMSLWYEHL	GMLDESFLNP	ESECCVRKVN	QMAEKYWDLY	SSETLEHDL	GHLRLYPVIGV	772
Vigun a	714	FRMSLWYEHL	GMLHDTFQRP	ESECCINKVN	QIADKYWDLY	SSESLELDL	GHLRLYPVIGV	773
Zeama a	717	FRMSLWYEHL	GMLDDVFQRP	ESVECVQKVN	EVAEKYWDLY	SSDDLQQLD	GHLRLSYPVIGV	776

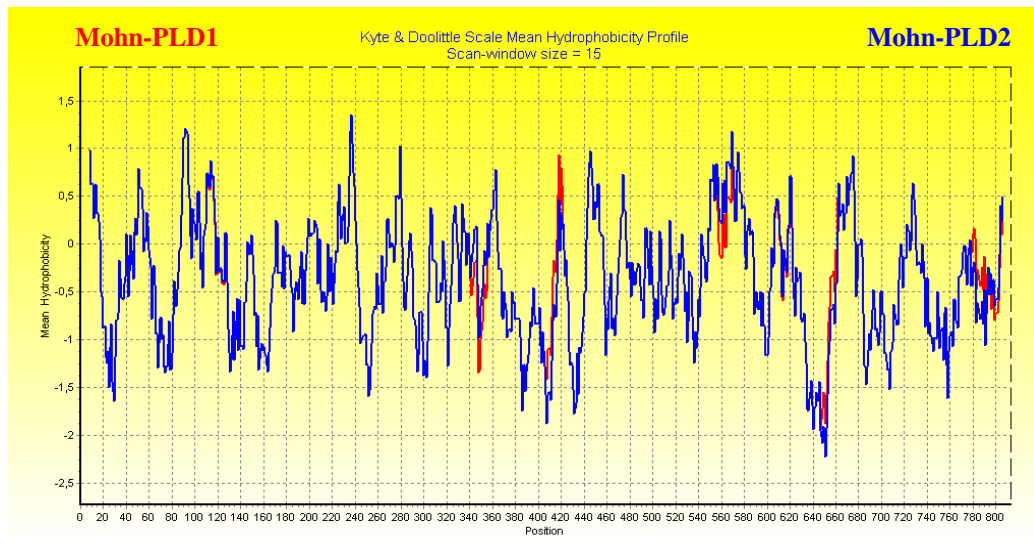
Arath a1	774	ASEGDITELP	GFEFFPDTKA	RILGTKSDYL	PPILTT	809
Arath a2	775	ASEGNITELP	GCEFFPDTKA	RILGVKSDYM	PPILTT	810
Braol a1	775	DGEGDVTEFP	GFEFFPDTKA	RILGTKSDYL	PPILTT	810
Braol a2	777	DNEGNITELP	GFEFFPDSKA	RILGNKVDYL	PPILTT	812
Crapl a1	772	SSDGEVTELP	GTEFFPDTKA	RVLGTKSDYL	PPILTT	807
Crapl a2	772	AGDGGVTELP	GAEFFPDTKA	RVLGAKSDYL	PPILTT	807
Lyces a1	774	ASEGDITELP	GHEFFPDTKA	RVLGTKSDYL	PPNLTT	809
Nicta a	773	ASEGDVTELP	GAEHFPDTKA	RVLGTKSDYL	PPILTT	808
Orysa a1	777	ASDGVVTELP	GMEYFPDTRA	RVLGAKSDYM	PPILTS	812
Papso a1	778	TENGDVTELP	GHEFFPDTKA	RVLGKSDYL	PPILTT	813
Papso a2	778	TENGDVTELP	GHEFFPDTKA	RVLGAKSDYL	PPILTT	813
Pimbr a	773	ASEGNVTELP	GTEFFPDTKA	RVLGAKSDFL	PPILTT	808
Ricco a	773	ASEGDVTELP	GTEFFPDTKA	RVLGAKSDYL	PPILTT	808
Vigun a	774	ASEGEVTELP	GFEFFPDTKA	RILGAKADYL	PPILTT	809
Zeama a	777	TADGSVTELP	GMENFPDTRA	RVLGNKSDYL	PPILTT	812

**A4 Aminosäurezusammensetzung von PLD1 und PLD2 aus Schlafmohn**

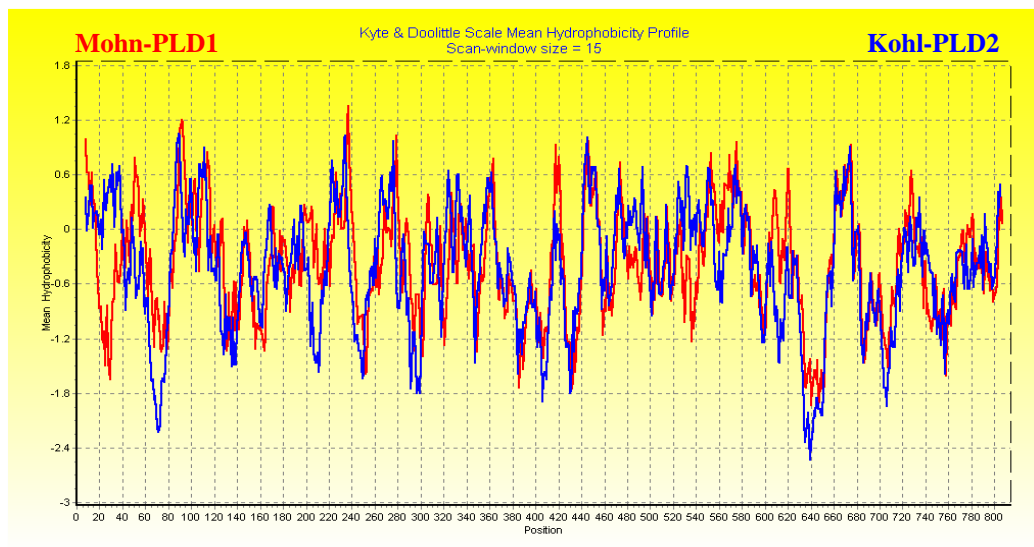
<b>Aminosäure</b>	<b>Mohn-PLD1</b>		<b>Mohn-PLD2</b>	
<b>Alanin</b>	<b>53</b>	<b>(6,52 %)</b>	<b>53</b>	<b>(6,52 %)</b>
<b>Cystein</b>	<b>10</b>	<b>(1,23 %)</b>	<b>9</b>	<b>(1,11 %)</b>
<b>Asparaginsäure</b>	<b>64</b>	<b>(7,87 %)</b>	<b>63</b>	<b>(7,75 %)</b>
<b>Glutaminsäure</b>	<b>49</b>	<b>(6,03 %)</b>	<b>52</b>	<b>(6,40 %)</b>
<b>Phenylalanin</b>	<b>37</b>	<b>(4,55 %)</b>	<b>37</b>	<b>(4,55 %)</b>
<b>Glycin</b>	<b>65</b>	<b>(8,00 %)</b>	<b>64</b>	<b>(7,87 %)</b>
<b>Histidin</b>	<b>27</b>	<b>(3,32 %)</b>	<b>27</b>	<b>(3,32 %)</b>
<b>Isoleucin</b>	<b>62</b>	<b>(7,63 %)</b>	<b>63</b>	<b>(7,75 %)</b>
<b>Lysin</b>	<b>44</b>	<b>(5,41 %)</b>	<b>43</b>	<b>(5,29 %)</b>
<b>Leucin</b>	<b>55</b>	<b>(6,77 %)</b>	<b>54</b>	<b>(6,64 %)</b>
<b>Methionin</b>	<b>18</b>	<b>(2,21 %)</b>	<b>19</b>	<b>(2,34 %)</b>
<b>Asparagin</b>	<b>27</b>	<b>(3,32 %)</b>	<b>27</b>	<b>(3,32 %)</b>
<b>Prolin</b>	<b>45</b>	<b>(5,54 %)</b>	<b>45</b>	<b>(5,54 %)</b>
<b>Glutamin</b>	<b>29</b>	<b>(3,57 %)</b>	<b>28</b>	<b>(3,44 %)</b>
<b>Arginin</b>	<b>45</b>	<b>(5,54 %)</b>	<b>46</b>	<b>(5,66 %)</b>
<b>Serin</b>	<b>45</b>	<b>(5,54 %)</b>	<b>45</b>	<b>(5,54 %)</b>
<b>Threonin</b>	<b>39</b>	<b>(4,80 %)</b>	<b>39</b>	<b>(4,80 %)</b>
<b>Valin</b>	<b>54</b>	<b>(6,64 %)</b>	<b>54</b>	<b>(6,64 %)</b>
<b>Tryptophan</b>	<b>16</b>	<b>(1,97 %)</b>	<b>16</b>	<b>(1,97 %)</b>
<b>Tyrosin</b>	<b>29</b>	<b>(3,57 %)</b>	<b>29</b>	<b>(3,57 %)</b>

## A5 Vergleich der Hydrophobizitätsprofile

### Vergleich der Hydrophobizitätsprofile der Mohn-PLD-Isoenzyme



### Vergleich der Hydrophobizitätsprofile von Mohn-PLD1 und Kohl-PLD2



## A6 Primärstruktur und Sekundärstrukturvorhersage von Kohl-PLD2

Türkis markiert, Cystein-Reste; rot, HxKxxxxDxxxxxxGSxN (katalytische Motive); PHD Sekundärstrukturvorhersage, profile network prediction Heidelberg für alle Reste mit einer durchschnittlichen Genauigkeit von > 82 %; H, Helix; E, Faltblatt; L, Loop (andere Strukturelemente); ., keine Vorhersage (Rel < 5); Rel, Wahrscheinlichkeitsfaktor (0 für gering bzw. 9 für hoch).

		L.....EEEEEE...LL.LLLLLL.....LLLLLLLLLLLLEEEEEE.L.	
Kohl-PLD2	1	MAQHLLHGTLHATIYEVDA LHTGGLRSAGFLGKIIISNVEETIGFGKGETQLYATIDLQKA	60
		.....LLLLLL.....EEE.LLLEEEEEEE.LLLLLL...EEEE...LL	
Kohl-PLD2	61	RVGRTRKITDEPKNPKWYESFHIYCAHMASDIIFTVKDDNPIGATLIGRAYVPVDEIVING	120
		LLL.....LLLLLLLLLLL.EEEEEEE...LLL.....LLLLLLLLLLL.....LLL	
Kohl-PLD2	121	EEVEKWVEILDDDRNP IHGESKIHVKLQYFAVEADRNNMVGKSAKFGVPYTFFSQRQG	180
		L.EEEE.L.LLLLLLLLLLLLLL.LL...HHHHHHHHH...EEEE...EEEE	
Kohl-PLD2	181	CKVSLYQGAHVDPDNFVPKIPLAGGKNYEPHRCWEDIFDAITNAKHLIYITGWSVYTEITL	240
		EE.LLLLLL...HHHHHHHHHLLL.EEEEE.LLLLLL...LL...LL...HH..	
Kohl-PLD2	241	VRDSRRPKPGDMTLGELLKKKKATEGVRVLLLWDDRTSVDVLKKGGLMATHDEDTENYF	300
		.LL.EEEE...LLLLL.....LL.EEEE.LLLLLLLLLLLL.EEEEE..	
Kohl-PLD2	301	NGSEVHCVLCPRNPDDGGSIVQNLQVSAMFTHQKIVVVDSEVPSQGGGSEMRRIMSFVG	360
		L...LLLLL.....LL.....LLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL.....LL.H	
Kohl-PLD2	361	GIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHHDDFHQPNFTGASITKGGPREPWQDIHSRLEGPIAW	420
		HHHHHHHHHH.....LLLLLLLLLLLLLLLLLLL...EEEE.LLLLLL	
Kohl-PLD2	421	DVLYNFEQRWSKQGGKILVKLRELSDIITPSPVMFQEDHDVWVWVQLFRSIDGGAAGF	480
		LLL.....LLL...HHHHHHHHHHHHH...EEE.....L.LL..	
Kohl-PLD2	481	PDSPEVAAEAGLVSGKDNVIDRSIQDAYIHAIRRAKDFIYIENQYFLGSSFAWAADGITP	540

LLLL.....HHHHHHHHHHH...LL.EEEEEELLLLLL...HHHHHHHHHHHHHHH

Kohl-PLD2 541 EDINALHLIPKELSLKIVDKIEKGEKFRVYVVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRTLEMM 600

---

HHHHHHHHH...LLLLL.....LLLLLLLLLLLLLLLLL...HH.....EE

Kohl-PLD2 601 YKDVTQALRAQGLEEDPRNYLTFFC LGNREVKKEGEYEPAERPDPDPTDYMRAQEARRFMI 660

---

EE...EEE..EEEEELLL...LLLLL.....LL...LLLLL...HHH

Kohl-PLD2 661 YVHSKMMIVDDEYIIVGSANINQRSMGDARDSEIAMGGYQPHLSHRQPARGQVHGFRMS 720

---

HHHHH.LLL.LLLLLL.HHHHHHHHHHHHHH...HHH.....LLL

Kohl-PLD2 721 LWYEHGLMDETFLDPSLECIKVNRIADKYWDFYSSESLEHDLPGHLLRYPISVDNEG 780

---

...LLLLLLLLLLLLLLL...LLLLLLLLLLLLL

Kohl-PLD2 781 NITELPGFEFFPDSKARILGNKVDYLPPILTT 812



## Danksagung

Hier möchte ich all jenen danken, die zum Entstehen und Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann, in deren Arbeitsgruppe ich die experimentellen Arbeiten durchführen konnte und die mir jede materielle und moralische Unterstützung gewährte. Grosses Interesse am Fortgang der Arbeit, ideenreiche Diskussionen sowie Kritik und Anregungen zum Manuskript haben die vorliegende Arbeit in dieser Form ermöglicht.

Frau Dr. Johanna Mansfeld möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Labor, ihre unermüdliche Unterstützung jeglicher Art während vielfältiger experimenteller Unwegsamkeiten und nicht zuletzt für das kritische Lesen bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Ulrich Arnold danke ich für die sehr hilfreichen Diskussionen sowie die Anregungen zur Erstellung der vorliegenden Arbeit und seine fortwährende moralische Unterstützung.

Den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ulbrich-Hofmann, Dr. Yvonne Markert (Roche Diagnostics, Penzberg), Dr. Ines Schöffner (ZAMED, Halle) sowie Dr. Peter Dürrschmidt (IBFB Pharma, Leipzig) danke ich für das stetige Interesse am Voranschreiten dieser Arbeit, für die fruchtbaren Diskussionen und die experimentellen Hilfestellungen.

Frau Dr. Regina Schöps und Frau Christa Kuplens möchte ich zum einen für die Bereitstellung des PpNP-Substrates und zum anderen für die sehr wertvolle Unterstützung bei der Reinigung der Kohl-PLD2 sowie der Kohl-PLD2-Enzymvarianten danken.

Frau Dr. Lydia Bezakova (Pharmazeutische Fakultät der Comenius Universität Bratislava) in Vertretung des slowakischen Kooperationspartners danke ich für die Überlassung der Schlafmohnsamen der Sorte *Papaver somniferum* L. Vahovecky.

Herrn Dr. Julius Rajcani (Comenius Universität Bratislava) danke ich für die Überlassung der Anti-Kohl-PLD2-Antikörper aus Kaninchen.

Mein Dank gilt weiterhin der Lipoid GmbH (Ludwigshafen) für die Bereitstellung der Phospholipide.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ulbrich-Hofmann für die kritische und schöpferische Atmosphäre.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, keine anderen Quellen und Hilfsmittel zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation verwendet und der Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Ich habe die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir an keiner anderen Einrichtung zur Bewerbung um einen Doktorgrad eingereicht. Ich selbst habe mich zuvor noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), den 12.01.2005

Alexandra Lerchner

## Lebenslauf

Name: Lerchner  
Vorname: Alexandra  
Geburtsdatum: 25.07.1977  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Wohnanschrift: Anna-Schubring-Str. 5, 06120 Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

1984-1986 Polytechnische Oberschule Boleslaw-Bierut, Halle/Saale  
1986-1996 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Halle/Saale, Schule mit  
erweitertem Fremdsprachenunterricht (Russisch: 3. bis 12. Klasse)  
Abschluss: Abitur

### Berufsausbildung

10/1996 – 07/2001 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg; Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für  
Biotechnologie in der Abteilung „Technische Enzymologie“ bei Prof.  
R. Ulbrich-Hofmann zum Thema: „Identifizierung zweier Isoenzyme  
der Phospholipase D aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.)“  
Abschluss: Diplom-Biochemikerin  
09/2001 – 08/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biotechnologie,  
Abteilung „Technische Enzymologie“, Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg bei Frau Prof. R. Ulbrich-Hofmann; Anfertigung der  
Promotion zum Thema: „Studien zur Gewinnung und gentechnischen  
Modifizierung von Phospholipase D aus Schlafmohn (*Papaver  
somniferum* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*)“

### Stipendium

10/2001 – 12/2003 Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes  
Sachsen-Anhalt