

**Die Modulation der Aktivität von
Phospholipase D aus *Brassica oleracea* var. *capitata*
durch die Membraneigenschaften**

Dissertation

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

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von
Herrn Konstantin Kuppe
geboren am 08. Juli 1979
in Halle (Saale)

Gutachter/-in:

- 1.
- 2.
- 3.

Halle (Saale),

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	8
2	THEORETISCHER TEIL.....	10
2.1	Biologische Membranen.....	11
2.1.1	<i>In vitro</i> - Modelle zellulärer Membranen	11
2.1.2	Aufbau biologischer Membranen	13
2.1.3	Phasenverhalten von Lipiden	14
2.1.4	Anpassung an Umweltbedingungen	16
2.2	Phospholipase D.....	18
2.2.1	Grenzflächenenzyme und Grenzflächenkatalyse	18
2.2.2	Pflanzliche Phospholipasen D	20
2.2.3	Biologische Funktionen der PLD	21
2.2.4	Regulation der PLD	22
2.2.4.1	Regulation durch Ca ²⁺	23
2.2.4.2	Regulation durch PIP ₂	23
2.2.4.3	Regulation durch die Membranmorphologie	24
2.2.4.4	Regulation durch Proteine	24
2.2.5	Struktur der PLD	24
2.2.6	Charakterisierung der PLD2 aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	26
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Material	28
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	Lipide	29
3.1.3	Proteine	29
3.2	Biochemische Methoden.....	30
3.2.1	Herstellung löslicher PLD	30
3.2.1.1	Expression	30
3.2.1.2	Zellaufschluß	30

3.2.1.3	Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie	30
3.2.1.4	Anionenaustauschchromatographie	31
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
3.2.2.1	Bradford-Test	31
3.2.2.2	UV-Absorptionsmessung	31
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.2.4	Bestimmung der PLD-Aktivität	32
3.2.4.1	Standardaktivitätstest nach D'Arrigo	32
3.2.4.2	Amplex Red [®] -Aktivitätstest	32
3.3	Biophysikalische Methoden	33
3.3.1	Herstellung von MLVs und SUVs	33
3.3.2	Isolation von Plasmamembranen aus Weißkohl-Blättern	33
3.3.2.1	Präparation des mikrosomalen Pellets	33
3.3.2.2	Plasmamembranreinigung im wässrigen 2-Phasensystem	33
3.3.3	Fluoreszenzspektroskopie	34
3.3.4	CD-Spektroskopie	35
3.3.5	LANGMUIR-Filmwaagemessungen	35
3.3.6	BREWSTER-Winkel-Mikroskopie	36
3.3.7	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	36
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	37
4.1	Herstellung der PLD und ihrer Varianten	37
4.1.1	Lösliche Wildtyp-PLD	37
4.1.2	Inaktive PLD-Varianten	37
4.2	Aktivitätsstudien	38
4.2.1	Einfluss der Substrataggregatstruktur auf die Aktivität	38
4.2.2	Aktivität gegenüber anionischen Modellmembranen	40
4.2.2.1	Analyse der <i>Lag</i> phase	41
4.2.2.2	Analyse des Ca ²⁺ -Bedarfs	42
4.2.3	Aktivität gegenüber pflanzenzell-analogen Modellmembranen	43
4.2.4	Aktivität gegenüber Plasmamembran-Isolaten aus Weißkohlblättern	45
4.2.5	Einfluss von Phasentrennung innerhalb neutraler Membranen auf die PLD-Aktivität	46
4.2.6	Aktivität gegenüber POPC/1,3-PC-Modellmembranen	47

4.3	Phospholipid-Bindungsstudien mit PLD	48
4.3.1	Inaktive Varianten der PLD	48
4.3.2	CD-Spektroskopie	49
4.3.3	Fluoreszenzlöschung.....	50
4.3.3.1	Tryptophanfluoreszenz- <i>Quenching</i>	50
4.3.3.2	Acrylamid- <i>Quenching</i>	51
4.3.4	LANGMUIR-Filmwaagemessungen	52
4.4	Physikalisch-chemische Charakterisierung von Phospholipid-Grenzflächen	53
4.4.1	BREWSTER-Winkel-Mikroskopie.....	53
4.4.2	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	55
4.5	PLD-Aktivität an Monoschichten	59
4.5.1	Aktivität als Funktion der Ca ²⁺ -Konzentration	59
4.5.2	Aktivität als Funktion des Oberflächendrucks	61
4.6	Zusammenfassende Diskussion	63
4.6.1	PLD ist ein Ca ²⁺ -abhängiges Grenzflächenenzym	63
4.6.2	Pflanzenzell-analoge Modellmembranen reduzieren den Ca ²⁺ -Bedarf	63
4.6.3	Ca ²⁺ -induzierte Mikrodomänen stimulieren die PLD-Aktivität	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	67
6	LITERATURVERZEICHNIS	69
	PUBLIKATIONEN, TAGUNGSBEITRÄGE UND POSTER	85
	DANKSAGUNG	87
	ERKLÄRUNG	88

Abkürzungsverzeichnis

1,3diC ₁₀ PC	1,3-Didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-2-phosphocholin
1,3diC ₁₂ PC	1,3-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-2-phosphocholin
1,3diC ₁₄ PC	1,3-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-2-phosphocholin
1,3diC _x PC	1,3-Diacyl- <i>sn</i> -glycero-2-phosphocholin
Amp	Ampicillin
BAM	BREWSTER-Winkel-Mikroskop (<i>BREWSTER angle microscope</i>)
BLM	Planare Lipiddoppelschichten (<i>black lipid membrane</i>)
Chol	Cholesterol
<i>cmc</i>	Kritische Mizellbildungskonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
diC ₆ PC	1,2-Dihexanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPA	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphat
DOPA	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycerol-3-phosphocholin
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (<i>differential scanning calorimetry</i>)
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FM	Frischmasse
GUVs	Riesige unilamellare Vesikel (<i>giant unilamellar vesicles</i>)
Kan	Kanamycin
LC	flüssig-kondensierter Lipidfilm
LE	flüssig-expandierter Lipidfilm
LUVs	Große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicles</i>)
MLV	Multilamellare Vesikel
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure

NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PA	Phosphatidsäure (<i>phosphatidic acid</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PI-PLC	PI-abhängige Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
pNP	<i>p</i> -Nitrophenol
POPA	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
PpNP	Phosphatidyl- <i>p</i> -nitrophenol
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
SUVs	Kleine unilamellare Vesikel (<i>small unilamellar vesicles</i>)
T _m	Übergangtemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

„It takes a membrane to make sense out of disorder in biology.”

Lewis Thomas in „The Lives of a Cell: Notes of a Biology Watcher”,
1974 The Viking Press

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Eine Vielzahl zellulärer Prozesse beruht auf der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Membranen. Voraussetzung dieser makromolekularen Interaktionen ist in vielen Fällen die reversible Bindung von Proteinen an spezifische Bereiche der Membranoberfläche (Teruel und Meyer, 2000). Dabei werden cytoplasmatische Proteine besonders im Zusammenhang mit Regulations- und Signalübertragungsvorgängen an die Membranen verlagert. In ihrer Gesamtheit bezeichnet man derartige Proteine als periphere Proteine (Cho und Stahelin, 2005). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Phospholipase D (Phosphatidylcholinphosphatidohydrolase, PLD, E.C. 3.1.4.4) und deren Wechselwirkungen mit Lipidoberflächen.

PLDs kommen in allen Reichen der belebten Welt (Pflanzen, Tiere, Pilze, Bakterien) vor (Exton, 2002). Seit sich die Hinweise verdichteten, dass PLDs wichtige Funktionen bei der zellulären Signaltransduktion erfüllen, ist das wissenschaftliche Interesse an diesen Enzymen deutlich erstarkt (Brindley *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1997; Wang, 1999).

Phospholipasen D werden zur Enzymklasse der Hydrolasen gezählt. Als grenzflächenaktive, periphere Proteine katalysieren sie die Spaltung der terminalen Phosphodiesterbindung von Glycerophospholipiden. Reaktionsprodukte sind Phosphatidsäure (*phosphatidic acid*, PA) und der Alkohol der polaren Kopfgruppe. In Gegenwart passender Akzeptoralkohole kann als Konkurrenzreaktion auch die Umesterung der Kopfgruppe (Transphosphatidylierung) katalysiert werden. Aufgrund dieser Eigenschaft finden PLDs schon seit Jahrzehnten Anwendung in der biotechnologischen Synthese von Phospholipiden mit besonderen Kopfgruppen (Ulbrich-Hofmann *et al.*, 2005). Dabei werden neben pflanzlichen Enzymen vor allem PLDs aus *Streptomyces*-Stämmen eingesetzt (Ulbrich-Hofmann, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde PLD aus *Brassica oleracea* var. *capitata* (Weißkohl), einer traditionellen Quelle dieses Enzyms, untersucht. Diese PLD gehört dem α -Typ an. Während das aus Weißkohl isolierte Enzym N-terminal acetyliert ist (Schöps *et al.*, 2002), wird bei der Expression in *Escherichia coli* das N-terminale Methionin abgespalten (Schäffner, 2001). In dieser Arbeit wurde das rekombinante Protein verwendet.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Frage, welche Bedeutung den Membraneigenschaften bei der Regulation der PLD-Aktivität zukommt. Ein Charakteristikum pflanzlicher PLDs des α -Typs ist das Erfordernis millimolarer Ca^{2+} -Konzentrationen zur Entfaltung optimaler Aktivität (Wang, 2000). Befindet sich der pflanzliche Metabolismus im Normalzustand, so treten innerhalb der Zellen jedoch keine derart hohen Ca^{2+} -Konzentrationen auf. Aus diesem Grund lag die Annahme nahe, dass der unphysiologische Ca^{2+} -Bedarf der PLD auf den artifiziellen Charakter der Assaybedingungen zurückzuführen ist. Als experimentelle Annäherung an die Gegebenheiten in der Zelle sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Simulation natürlicher Membranen durch unterschiedliche Modellsysteme analysiert werden.

Zunächst sollte ermittelt werden, welche Eigenschaften der Grenzschicht eine **Stimulation der PLD-Aktivität** bewirken können. Zu diesem Zweck wurde die Geschwindigkeit der Hydrolyseaktivität gegenüber Modellmembranen analysiert, welche Besonderheiten hinsichtlich der lateralen Organisation, der Membrankrümmung, des Gehalts an spezifischen Aktivatoren oder anionischen Phospholipiden aufwiesen. Für die Bestimmung der Aktivität gegenüber Vesikeln und Mizellen kam eine Enzym-gekoppelte Methode zum Einsatz, die auf dem fluoreszenzbasierten Nachweis des während der Reaktion frei werdenden Cholins basiert. Zudem wurde die Hydrolyse monomolekularer Lipidfilme mit Hilfe der LANGMUIR-Filmwaagetechnik untersucht.

In der Grenzflächenkatalyse stellt die Bindung des löslichen Enzyms an die Membran eine essentielle Voraussetzung dar (Berg *et al.*, 2001). Aus diesem Grund hängt auch die Aktivität der zu den Grenzflächenenzymen zählenden PLD in besonderem Maße von deren **Affinität gegenüber der Phospholipidoberfläche** ab. Deshalb war es ein Ziel, die Assoziation der PLD mit Modellmembranen quantitativ zu erfassen. Da Membranbindungsstudien mit phospholipidabbauenden Enzymen bestimmte Rahmenbedingungen vorgeben, mussten die verfügbaren Methoden vorab auf ihre Eignung für die gewünschten Studien geprüft werden.

In einem dritten Schritt sollte versucht werden, die **physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membranen** aufzuklären, welche für Modulationen des PLD-Aktivitätsmusters ursächlich sind. Die Methode der Dynamischen Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) kann Informationen zum thermotropen Phasenverhalten von Phospholipiden liefern. Durch Einsatz dieser Technik sollten Lipid-Doppelschichten besonders bezüglich des Auftretens lateraler Asymmetrien charakterisiert werden.

Die Kombination dieser biochemischen und biophysikalischen Ansätze ermöglichte es, neue Erkenntnisse zur Kontrolle der PLD-Aktivität zu gewinnen. Dabei spielen das Zusammenwirken von Ca^{2+} mit anionischen Phospholipiden und die Existenz spezieller Lipid-Mikrodomänen eine entscheidende Rolle.

2 Theoretischer Teil

Biologische Membranen bilden die Voraussetzung für die Biochemie des Lebens. Sie definieren das „Innen“ und das „Außen“ lebender Organismen. Erst die Abgrenzung von Reaktionsräumen hat die Ausbildung spezialisierter Kompartimente wie Zellkern, Vakuole, Mitochondrien oder Chloroplasten (Abb. 2.1) und damit die Evolution höherer, vielzelliger Organismen ermöglicht.

Membranen begrenzen die freie Diffusion gelöster Substanzen innerhalb der Zelle und regulieren als hochselektive Permeabilitätsschranken die Molekül- und Ionenzusammensetzung des intrazellulären Mediums. Sie speichern Energie in Form von Ionen- oder Metabolitengradienten. Sie bilden die Matrix für Multienzymkomplexe und regulieren den Informationsaustausch zwischen den Kompartimenten (Hazel *et al.*, 1991). Während kleine, hydrophobe Moleküle (O_2 , N_2 , CO_2) die Barriere relativ schnell durch Diffusion passieren können, werden geladene und größere Moleküle zurückgehalten. Ionen, Zucker, Aminosäuren oder Proteine werden mit Hilfe von aktiv oder passiv arbeitenden Transportproteinen (Pumpen, Kanäle, Carrierproteine) durch die Membran geschleust.

Membranen würden ohne das Cytoskelett in eine Vielzahl kleiner Vesikel zerfallen. Erst durch dieses Netz aus Proteinfilamenten ist die strukturelle Stabilität gegeben, um im Zusammenspiel mit der dynamischen Membran den Ablauf der Stoffwechselprozesse in der Zelle zu gewährleisten.

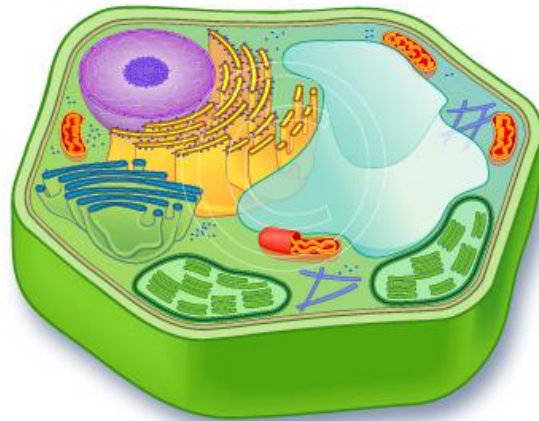


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung einer Pflanzenzelle.
Mit freundlicher Erlaubnis von www.science-art.com.

2.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen bestehen zu einem großen Teil aus Lipiden. Die einzelnen Lipidmoleküle der Membran sind im Gegensatz zu anderen biologischen Bausteinen wie Polynucleotide, Proteine und Polysaccharide nicht kovalent verknüpft. Sie besitzen aber die Eigenschaft der Selbstorganisation, die aus ihrer amphiphilen Natur resultiert. Phospholipide besitzen eine phosphathaltige, polare Kopfgruppe, welche über ein Glycerolrückgrat mit zwei apolaren Kohlenwasserstoff-Ketten verknüpft ist. Die Lipidaggregate werden hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert (Cevc, 1987). Eine Lipid-Doppelschicht (*bilayer*) wird gebildet, indem sich die Lipidmoleküle in zwei Lagen derart anordnen, dass die apolaren Ketten durch die polaren Kopfgruppen gegenüber dem wässrigen Milieu abgeschirmt werden.

Innerhalb der Membranen können Lipide auf unterschiedliche Arten frei bewegt werden. Je nach Lipid- und Membranaufbau kann sich ein Lipidmolekül durch laterale Diffusion verschieben, durch einen Flip-Flop-Prozess von einer Schicht zur nächsten springen oder sich vollständig von der Membran abtrennen (Binder *et al.*, 2003).

2.1.1 *In vitro* - Modelle zellulärer Membranen

Mit steigender Komplexität eines Systems wachsen auch die Schwierigkeiten der experimentellen Untersuchung desselben. Simplifizierungen im Versuchsaufbau sind zwar zum einen problematisch, zum anderen aber unverzichtbar, um zumindest für Teilaspekte zu interpretierbaren Aussagen zu kommen. Daher erscheint es bei experimentellen Membranstudien zweckmäßig, künstliche Modellsysteme zu nutzen. Die wichtigsten *in vitro*-Modelle in polaren Lösungsmitteln sind Vesikel, Mizellen, monomolekulare Schichten (*monolayer*) und planare Lipiddoppelschichten (*black lipid membrane*, BLM) (Abb. 2.2).

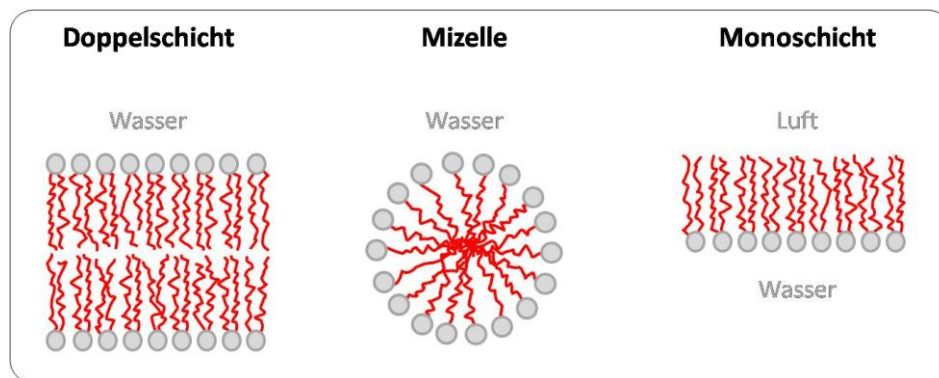


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Aggregationszustände von Phospholipiden in Wasser. Verändert nach Cevc (1987).

Vesikel entstehen bei der Dispersion von Lipiden in wässrigem Medium mit Hilfe von Ultraschall oder Filtration. Diese hohlkugelförmigen Aggregate werden von einer Lipiddoppelschicht begrenzt, welche selbst kein Lösungsmittel enthält. Nach der Größe unterscheidet man kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUVs) mit einem Durchmesser von 30 bis 100 nm, große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*, LUVs) mit einem Durchmesser von 100 bis 200 nm und riesige unilamellare Vesikel (*giant unilamellar vesicles*, GUVs), deren Größe von 1 bis 100 μm reicht. Vesikel aus mehreren konzentrischen Doppelschichten werden als multilamellare Vesikel (MLV) bezeichnet (Nöll, 1994).

Ein weiteres Modellsystem für Lipid-Doppelschichten bilden die planaren, sogenannten **black lipid membranes** (BLM). Diese werden in wässrigen Phasen erzeugt, indem zwei durch eine Teflonwand getrennte Monoschichten an einer Ausparung in der Wand *bilayer* ausbilden. Die relativ instabilen, artifiziellen Membranen eignen sich zu Untersuchungen von Stoff- und Ladungstransportprozessen, wie sie bei der Permeation durch Lipidschichten auftreten (Nöll, 1994).

Ist die durch die Kopfgruppen gebildete Oberfläche hinreichend groß und das Volumen der Kohlenwasserstoffketten hinreichend klein, so kommt es zur Ausbildung sphärischer Strukturen. Für derartige Aggregate wurde von McBain (1913) der Begriff **Mizellen** geprägt. Sie bestehen aus kugelförmig angeordneten Lipiden, deren Kopfgruppen nach außen und deren Ketten nach innen weisen. Im Inneren befindet sich kein Lösungsmittel. Die Selbstaggregation erfolgt nur oberhalb einer für jedes Lipid bzw. Detergenzmolekül charakteristischen Konzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration (*critical micelle concentration, cmc*). Unterhalb der *cmc* enthält die Lösung nur Monomere.

Durch das Spreiten von Lipiden auf einer wässrigen Oberfläche können **monomolekulare Schichten** (LANGMUIR-Filme) erzeugt werden. Dabei handelt es sich um zweidimensionale Schichtsysteme, welche nur aus einer Moleküllage bestehen. Die hydrophoben, apolaren Fettsäuren sind in die Luft gerichtet, während die polaren Kopfgruppen der amphiphilen Moleküle zum Wasser hin orientiert sind. Der Oberflächendruck und damit die pro Lipidmolekül verfügbare Fläche lässt sich mittels der Filmwaagetechnik kontinuierlich verändern (Möhwald, 1995).

2.1.2 Aufbau biologischer Membranen

Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Ernst Overton, dass die Durchgängigkeit einer Verbindung durch das Protoplasma in das Zellinnere umso leichter war, je größer die relative Löslichkeit der betreffenden Verbindung in „fetten Ölen“ oder ähnlichen Verbindungen war. Er führte dieses Phänomen auf eine „auswählende Löslichkeit“ der „Plasmahäute“ zurück, welche wasserlösliche Stoffe zurückhalten, andere gelöste Stoffe dagegen nach Maßgabe ihrer Lipidlöslichkeit hindurchlassen sollte (Collander, 1933).

Eines der ersten Modelle zur Erklärung des molekularen Aufbaus biologischer Membranen veröffentlichten Gorter und Grendel im Jahr 1925 (Gorter und Grendel, 1925). Sie gingen davon aus, dass die Kompartimentierung in den Zellen auf eine in sich geschlossene Lipiddoppelschicht zurückzuführen ist, deren hydrophile Enden ins wässrige Milieu zeigen. Der Anteil von Proteinen am Membranaufbau blieb in diesem Modell unberücksichtigt.

Die geringere Affinität gegenüber Wasser, welche im Vergleich künstlicher Phospholipid-Doppelschichten mit natürlichen Membranen festgestellt wurde, führte zur Entwicklung des DANIELLI-DAVSON-Modells (Danielli und Davson, 1935). Aufbauend auf der doppelschichtigen Natur des GORTER-GRENDEL-Modells postulierten sie, dass die hydrophilen Köpfe der Lipide als durchgehende Schicht mit Proteinen überzogen sind.

Nach dem SINGER-NICOLSON-Modell (Singer und Nicolson, 1972) dagegen sind Membranproteine mosaikartig in die Phospholipid-Doppelschicht eingelagert und ragen nur mit ihren hydrophilen Anteilen in das umgebende wässrige Milieu. Man spricht daher auch vom *Flüssig-Mosaik-Modell*. Die Autoren nahmen an, dass die Membrankomponenten, getrieben von der BROWN'schen Molekularbewegung, lateral ungehindert diffundieren können. Danach folgende Arbeiten bestätigten diese Annahmen im Grundsatz, zeigten jedoch auch die Grenzen des Modells auf. Das wachsende Wissen um die komplexe Regulation der zellulären Stoffwechselprozesse legte nahe, dass Membranen durch ein höheres Maß an Ordnung charakterisiert sind (Shimshick und McConnell, 1973; Gebhardt *et al.*, 1977).

1984 veröffentlichten Mouritsen und Bloom das sogenannte *Matratzen-Modell* biologischer Membranen (Mouritsen und Bloom, 1984). Die Basis ihrer Überlegungen bildete die Erkenntnis, dass Proteine, welche in die Membran eingebettet sind, oft eine andere Dicke haben als die Lipid-Doppelschicht (5 nm). An der Grenzfläche zwischen Protein und Lipiden müssten demnach Spannungen auftreten. In dem Fall, dass der hydrophobe Kern eines Membranproteins länger oder kürzer als 5 nm ist, so sollten entweder hydrophobe Bereiche des Proteins oder der Lipide dem polaren Lösungsmittel ausgesetzt sein, oder aber die Membran würde deformiert, um die Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zu minimieren. Um die auftretenden Spannungen zu neutralisieren, entwickelten die Autoren die Idee einer lokalen Ab- oder Zunahme der Membrandicke. Dies sollte zur Akkumulation bestimmter Lipide mit längeren bzw. kürzeren Kohlenwasserstoffketten in der Proteinumgebung führen und damit zu einer asymmetrischen lateralen Verteilung der Membrankomponenten. Dieses Konzept wird als hydrophobes Gleichgewicht (**hydrophobic matching**) bezeichnet.

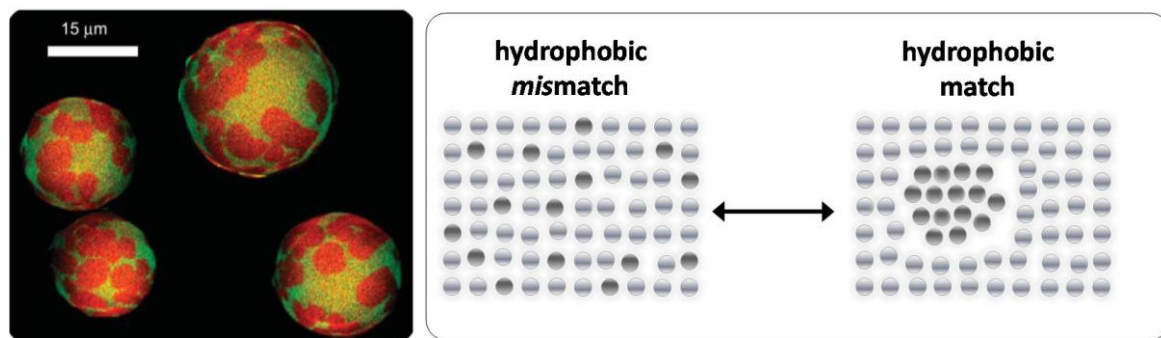


Abbildung 2.3: Konfokalmikroskopische Aufnahme von DLPC/DPPC(30:70)-GUVs bei 33°C (aus Hac *et al.*, 2005). Rechts: Schematische Darstellung des *hydrophobic matching*.

Die Koexistenz von Gelphasen (rot bzw. dunkelgrau) und fluiden Phasen (grün bzw. hellgrau) resultiert zum Teil aus dem hydrophoben Ungleichgewicht (*hydrophobic mismatch*) welches entsteht, wenn die hydrophoben Ketten sich in der Länge unterscheiden. Um die hydrophoben Bereiche vor den Wassermolekülen abzuschirmen, strebt jedes Lipid danach, sich mit Lipiden gleicher Kettenlänge zu umgeben (*hydrophobic match*).

Es kann auch auf proteinfreie Lipidsysteme mit Lipiden unterschiedlicher Kettenlängen angewandt werden (Abb. 2.3). Um die hydrophoben Bereiche von den Wassermolekülen zu schützen, streben die einzelnen Lipidspezies danach, sich mit Lipidketten ähnlicher Länge zu umgeben. Durch derartige Wechselwirkungen kann die Organisation von Lipiden in Form von Domänen oder – in besonderen Fällen – *rafts* erklärt werden. Diese geordneten Lipidstrukturen werden als Schnittstellen bei der Regulation vieler biologischer Funktionen an oder in Membranen betrachtet (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998).

Das *Dynamisch strukturierte Mosaik-Modell* nach Vereb *et al.* (2003) fasste jüngste Entwicklungen zusammen und legte die Betonung auf die nicht-zufällige Verteilung spezifischer Membrankomponenten und auf die Ausbildung unterschiedlich großer Lipiddomänenstrukturen. Die freie Diffusion von Proteinen wird danach durch Domänen, die Zusammenlagerung mit Proteinen und maßgeblich auch durch das Cytoskelett (oder andere cytosolische Interaktionen) beschränkt.

2.1.3 Phasenverhalten von Lipiden

Charakteristisch für Lipid-Doppelschichten ist deren thermotropes Phasenverhalten. Beim Erwärmen zeigen *Bilayer*, die nur aus einer Lipidspezies bestehen, bei einer definierten Temperatur einen Phasenübergang. Bei niedrigen Temperaturen befindet sich das Lipid in der Gelphase, in welcher die Kohlenstoffketten in der sogenannten *all-trans*-Konformation vorliegen (Melchior und Steim, 1976). Die Ketten sind parallel angeordnet, maximal gedehnt und der Querschnitt ist im Bereich der Ketten am kleinsten. Aus energetischer Sicht stellt die *all-trans*-Konformation ein Energieminimum dar. Eine Temperaturerhöhung bewirkt den Übergang von der *trans*- in die *gauche*-Konformation (Abb. 2.4). An einem bestimmten Punkt der Temperaturskala werden die Rotationsfreiheitsgrade der C-C-Bindungen der Ketten angeregt und die Kohlen- und Wasserstoffatome kommen sich in vielen Bereichen der Ketten näher (Horwitz *et al.*, 1972). Dies ist energetisch ungünstiger als die *trans*-Konformation. Derart „geschmolzene“ *bilayer* bilden fluide Phasen, in denen die einzelnen Lipidmoleküle einen größeren Querschnitt haben und kürzer sind als Lipide in der Gelphase.

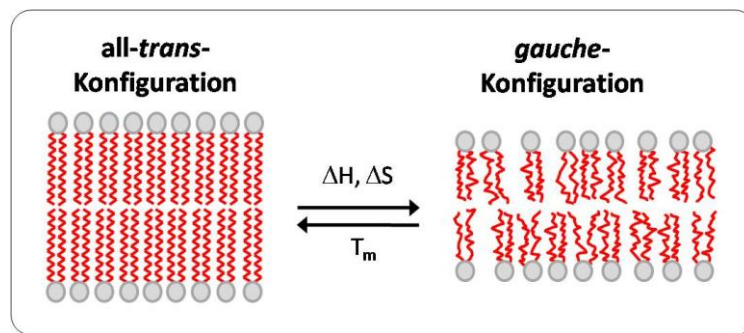


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des thermotropen Phasenübergangs in Lipid-Doppelschichten. Verändert nach Ivanova (2000).

Der endotherme Prozess des Phasenübergangs ist verbunden mit der Zunahme der Enthalpie und der Entropie des Systems. Die Enthalpiedifferenz ΔH resultiert aus der zusätzlichen Energie der Kohlenwasserstoffketten, die vergrößerte Entropiedifferenz ΔS aus der gesteigerten Flexibilität des Systems.

Das Schmelzen von Lipidmembranen kann durch Temperaturerhöhung ausgelöst und die dafür notwendige Energie mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie gemessen werden (McElhaney, 1982). Der Übergang von der Gelphase in die fluide Phase ist in DSC-Thermogrammen als scharfer Peak in einem schmalen Temperaturbereich zu erkennen. Die Temperatur, bei der die Hälfte der Moleküle im geschmolzenen Zustand vorliegt, wird als Übergangs- oder Schmelztemperatur (*transition temperature*, T_m) bezeichnet. Lipide schmelzen nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig stark. Es handelt sich folglich um eine kooperative Umwandlung (McElhaney, 1986). Die Übergangstemperatur wird durch mehrere Eigenschaften der Lipide beeinflusst, u.a. von der Kohlenstoffkettenlänge, dem Sättigungsgrad, der Ladung und dem Aufbau der Kopfgruppe (Bloom *et al.*, 1991). Mit Zunahme der Kettenlänge werden die VAN-DER-WAALS-Kräfte stärker, so dass mehr Energie zum Aufbrechen der geordneten Packung aufgewendet werden muss. Aus diesem Grund erhöht sich die Übergangstemperatur. Die Einführung einer Doppelbindung in eine der Kohlenstoffketten bewirkt ein Abknicken der Kette und damit das Herabsenken der Temperatur, bei welcher die Lipide in *all-trans*-Konformation vorliegen.

Lipidmischungen aus mehr als einer Lipidspezies zeigen ein komplexeres Phasenverhalten. Infolge unterschiedlicher Schmelztemperaturen können in bestimmten Temperaturbereichen die Entmischung der Lipide und damit die Koexistenz von Gel- und fluider Phase auftreten (Lee, 1977; Hac *et al.*, 2005). In ternären Lipidmischungen aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und Cholesterol (Chol) destabilisiert Cholesterol die Gelphase und induziert die Ausbildung zirkulärer, flüssig-geordneter (*liquid ordered*) Domänen in einer Umgebung aus flüssig-ungeordneten (*liquid disordered*) Lipiden (Mouritsen, 2008).

2.1.4 Anpassung an Umweltbedingungen

Wenn die Intensität und die Dauer eines bestimmten Umweltfaktors entsprechend ausgeprägt sind, wird in Organismen eine Spannung erzeugt. Manche Arten haben mittels genetischer Adaptationen eine dauerhafte Resistenz gegen derartige Stressoren erlangt, andere entwickeln durch kurzfristige Akklimatisierung eine Toleranz gegen bestimmte Arten von Stress (Liljenberg, 1992). Sessile und poikilotherme Organismen können auf Veränderungen der Umweltbedingungen wie z.B. Temperatur, Strahlungsintensität, Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit oder Herbivorenbefall nur im Wege physiologischer Anpassung reagieren (Los und Murata, 2004).

Höhere Pflanzen sind in besonderem Maße anpassungsfähig und in der Lage, verschiedenen Stressfaktoren mit spezifischen Adaptationen des Wachstums, der Entwicklungsvorgänge und des Metabolismus zu begegnen (Bargmann und Munnik, 2006). Eine bemerkenswerte Strategie stellt dabei die aktive Modulation zellulärer Membranen zur Aufrechterhaltung ihrer Fluidität dar.

Wie unter 2.1.3 dargestellt, ist der Phasenzustand von Lipiden und damit biologischer Membranen temperaturabhängig. Mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie untersuchten Szalontai *et al.* (2000) den Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Fluidität der Membranen des Cyanobacteriums *Synechocystis*. Dazu wurden die CH₂-Streckschwingungen der Alkylketten der Lipide analysiert. Dadurch war es möglich, Informationen über das *trans/gauche*-Verhältnis der Ketten zu erhalten. Die Ergebnisse zeigten, dass eine sehr konstante Membrandynamik über den gesamten Bereich physiologischer Temperaturen aufrechterhalten wurde, indem der Sättigungsgrad der Lipide zielgerichtet eingestellt wurde. Für eine derartige Verteidigung des physikalischen Membranzustands bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen wurde von Sinensky (1974), als Beispiel der Homeostase auf zellulärer Ebene, der Begriff „homeoviskose Adaptation“ geprägt.

Neben der Modifizierung der Alkylketten-Sättigung können eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen den Zustand von Membranen beeinflussen. Unter anderem kann die Zusammensetzung der Glycerolipide modifiziert, die Verteilung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren innerhalb der Lipide verändert, die Proteinzusammensetzung variiert oder auch die Aktivität von Ionenkanälen moduliert werden (Murata und Los, 1997).

Eine große Anzahl kälteinduzierter Gene wird in einer Art Rückkopplungsreaktion direkt durch die Membranfluidität reguliert (Inaba *et al.*, 2003). Beispielhaft dafür ist die gesteigerte Expression von Desaturasen bei **niedrigen Temperaturen**. Die Einführung zusätzlicher Doppelbindungen in die Fettsäureketten der Lipide bewirkt die Aufrechterhaltung der Membranfluidität und verhindert den Phasenübergang in die letale Gelphase (Hazel, 1995).

Hohe Temperaturen rufen eine Beschleunigung der Molekularbewegungen der Membrankomponenten hervor, verringern den Ordnungsgrad der Lipide und erhöhen auf diese Weise die Fluidität der Membran (Abb. 2.5).

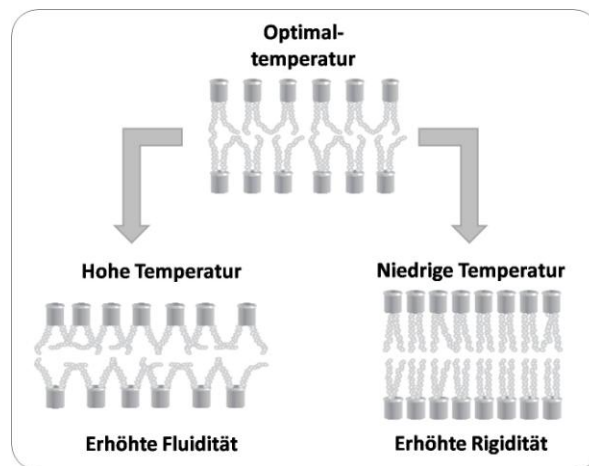


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Modifizierungen der Membranstruktur und des Zustands von Lipid-Doppelschichten unter Temperaturstress. Verändert nach Los und Murata (2004).

Daher erfordern diese Temperaturbedingungen Strategien, welche dem Schutz der Lipid-Doppelschichten vor Desintegration dienen. Bei Archaeobakterien ist als genotypische Anpassung an Lebensräume, in denen hohe Temperaturen vorherrschen, die Ausbildung besonderer Di- oder Tetraether-Lipide festgestellt worden, welche als membranüberspannende Brücken den Kollaps des hydrophoben Membrankerns verhindern (Hazel und Williams, 1991). Szalontai *et al.* (2000) vermuteten, dass bei hohen Temperaturen spezifische Membrandomänen umgestaltet oder die Lipid-Protein-Wechselwirkungen moduliert werden.

Als Reaktion auf **Wassermangel** wurde in Plasmamembranen aus Hafer ein Membranumbau beobachtet, bei dem das Phosphatidylcholin(PC)/Phosphatidylethanolamin(PE)-Verhältnis von 1,1 im bewässerten auf 0,7 im dehydrierten Zustand gesenkt wurde (Norberg und Liljenberg, 1991). Die Autoren interpretierten, dass die Erhöhung des Anteils an dem hexagonale Phasen ausbildenden PE die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Einstülpungen innerhalb der Membran erhöht. Eine gesteigerte Synthese von Triacylglyceriden wurde als Mechanismus diskutiert, um freie Fettsäuren aus der während der Stressphase stattfindenden Phospholipid-Hydrolyse zu binden und als Fettsäurespeicher für eine schnelle Phospholipidsynthese während der Erholungsphase zu nutzen (Navari-Izzo *et al.*, 1990).

Auch **hyperosmotischer Stress** induziert zelluläre Mechanismen, welche regulierend auf Membrandynamik und Lipidkomposition einwirken und dadurch die zelluläre Integrität sichern. Verbreitet ist die Steigerung des relativen Anteils an anionischen im Vergleich zu zwitterionischen Phospholipiden (Huflejt *et al.*, 1990). Bei *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) führten hohe NaCl-Konzentrationen zur Erhöhung des Gehalts an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂); zunächst nur in der Plasmamembran und später vor allem im Endomembran-System (König *et al.*, 2008).

2.2 Phospholipase D

2.2.1 Grenzflächenenzyme und Grenzflächenkatalyse

Membranproteine können anhand der Art ihrer Assoziation mit der Membran als integral oder peripher klassifiziert werden. Für integrale Membranproteine bildet die Membran eine stabilisierende Umgebung, bei deren Zerstörung auch das Protein strukturell geschädigt wird (Bowie, 2001). Periphere Membranproteine dagegen sind im wässrigen Milieu löslich. Unter bestimmten Bedingungen lagern sie sich reversibel mit Membranen zusammen. (Seaton und Roberts, 1996). Diese Proteine besitzen oft spezielle Lipidbindungsstellen, z.B. für Ceramide (Huwiler *et al.*, 1996), Diacylglyceride (Miège und Maréchal, 1999) oder anionische Phospholipide (Buckland und Wilton, 2000). Membranproteine, die an der von Lipidaggregaten und dem wässrigen Milieu gebildeten Grenzfläche enzymatische Reaktionen katalysieren, werden als Grenzflächenenzyme (*interfacial enzymes*) bezeichnet. Einen Überblick über die Vielfalt dieser Enzymspezies bietet Tabelle 2.1.

Die Arbeiten von Onda *et al.* (1996) geben einen Anhaltspunkt dafür, warum Grenzflächenphänomäne in biologischen Systemen so weit verbreitet sind. Die Autoren verglichen die Bindungskonstanten von Phosphat- und Guanidiniummolekülen, wobei die Beschaffenheit und Organisation der Phosphatumgebung variiert wurde (Abb. 2.6). Die geringste Bindungsaffinität zeigte sich bei einer homogenen Verteilung der Phosphat- und Guanidiniummoleküle in Wasser (Bindungskonstante $K = 1,4 \text{ M}^{-1}$). In Gegenwart von Lipid-Doppelschichten (*mikroskopischen Grenzflächen*) im wässrigen Milieu stieg die Bindungskonstante auf ca. 100 M^{-1} . Die einschichtige Organisation der Phosphatmoleküle an einer *makroskopischen* Monoschicht an der Luft-Wasser-Grenzfläche bewirkte eine weitere Steigerung von K auf 10^6 - 10^7 M^{-1} . Die Autoren führten diese Beobachtungen darauf zurück, dass die Grenzfläche die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Interaktionen unterstützt.

Tabelle 2.1: Substrate und Katalyseprodukte ausgewählter Grenzflächenenzyme. Verändert nach Berg und Jain (2002).

Substrat	Enzym	Produkt
Glycerophospholipide	Phospholipase A ₂	1-Acyl-Lysophospholipid + Fettsäure
Glycerophospholipide	Phospholipase C	Diacylglycerol + Phosphorylbase
Glycerophospholipide	Phospholipase D	Phosphatidsäure + Base
Glycerophospholipide	Acyltransferase	Glyceride + Cholesterolester
Phosphatidylinositol	PI-Kinasen	Phospho-PI
Sphingomyelin	Sphingomyelinase	Ceramid + Phosphatidylcholin
Ceramide	Ceramidase	Sphingosin + Fettsäure
Ganglioside	Galactosidase	Gangliosid + Galactose
Ganglioside	Galactosyltransferase	Gangliosid
Lysophospholipide	Acylase	Phospholipide
Glyceride	Lipasen	Fettsäuren + Glyceride/Glycerol
Glyceride	Diglyceridkinase	Phosphatidsäure
Cholesterolester	Cholesterolesterase	Cholesterol

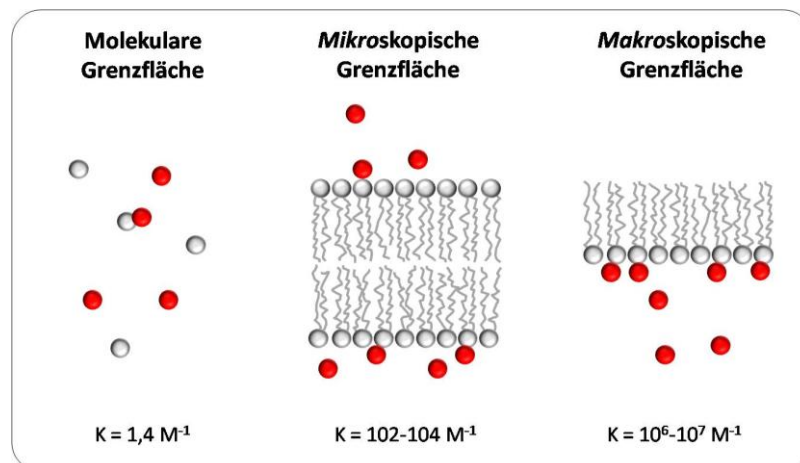


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Bindungsaffinität zwischen Phosphat und Guanidinium für verschiedene Grenzflächen im wässrigen Milieu. Verändert nach Onda *et al.* (1996).

Grenzflächenreaktionen weisen grundlegende Unterschiede im Vergleich zu Katalysen auf, welche in Lösung stattfinden. So üben die Membraneigenschaften direkten Einfluss auf die Enzymregulation aus (Kinnunen *et al.*, 1994). Dies bedeutet, dass die enzymatische Aktivität nicht nur durch die chemischen Eigenschaften der unmittelbar in die Reaktion involvierten Moleküle kontrolliert wird, sondern gleichermaßen durch die kollektiven Eigenschaften des Lipidverbands (Mouritsen *et al.*, 2006).

Bei der **kinetischen Betrachtung der Grenzflächenkatalyse** kann die MICHAELIS-MENTEN-Theorie nicht unverändert angewandt werden (Berg und Jain, 2002). Zusätzlich zu den Gleichgewichten

Enzym/Enzym-Substrat-Komplex,
Enzym-Substrat-Komplex/Enzym-Produkt-Komplex und
Enzym-Produkt-Komplex/Enzym+Produkt

muss das Gleichgewicht zwischen Enzym in Lösung und Enzym an der Grenzfläche einbezogen werden. Damit eine Reaktion stattfinden kann, muss das gelöste Enzym (E) mit der Grenzfläche interagieren (Abb. 2.7) und zum lipidassoziierten Enzym (E^*) werden. E^* kann im katalytischen Zentrum ein Substratmolekül binden und den Enzym-Substrat-Komplex (E^*S) bilden, in dem sich die Umwandlung zum Enzym-Produkt-Komplex (E^*P) vollzieht. Nach der Loslösung des Produktes (P) kann E^* eine weitere Reaktion katalysieren oder in die wässrige Phase dissoziieren (E). Das Gleichgewicht zwischen E und E^* , d.h. der Assoziationsgrad der Enzyme, wird durch die Eigenschaften der vom Substrat gebildeten Grenzfläche sowie der Gesamt-Substratkonzentration (bezogen auf das *Volumen* der Lösung) bestimmt, während die Oberflächenkonzentration des Substrates (bezogen auf die *Fläche* des Aggregats) das E^*/E^*S -Gleichgewicht kontrolliert. Gesteigert wird die Komplexität noch dadurch, dass infolge der Katalyse die Grenzflächeneigenschaften verändert werden und das E/E^* -Gleichgewicht verschoben wird (Gelb *et al.*, 1995). Von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Aktivität von Grenzflächenenzymen ist demzufolge die Kenntnis der Beschaffenheit der Substrataggregate.

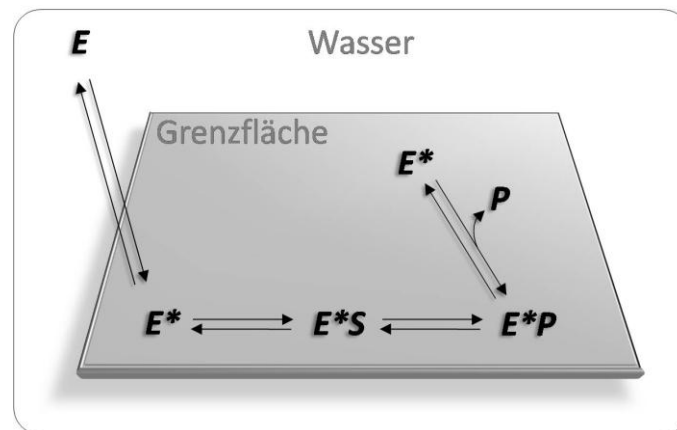


Abbildung 2.7: Adaptiertes MICHAELIS-MENTEN-Schema der Grenzflächenkatalyse. Grenzflächenassoziierte Zustände sind mit * gekennzeichnet. S bezeichnet das Substrat, P das Produkt. Verändert nach Berg und Jain (2002).

Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt also von der zweidimensionalen Oberflächenkonzentration der Komponenten an der Grenzfläche ab. Bis zur Sättigung ist der Anteil grenzflächenassoziiierter Enzymmoleküle direkt proportional zur Konzentration des Enzyms in der dreidimensionalen Lösung. Entscheidend ist auch, ob das Enzym nach Beendigung eines Katalysezyklus die Grenzfläche wieder verlässt (*hopping mode*) oder ob die Reaktion unmittelbar fortgesetzt wird (*scooting mode*) (Jain und Berg, 1989). Diese Verweilzeit des Enzyms an der Grenzfläche bestimmt die Prozessivität der Reaktion (Gelb *et al.*, 1995).

2.2.2 Pflanzliche Phospholipasen D

Die in der gesamten belebten Welt zu findenden Phospholipasen bilden eine Enzymgruppe, welche dem Phospholipid-Katabolismus zugeordnet wird. Entsprechend ihres Angriffsortes am Glycerophospholipid werden Phospholipasen dem A-, B-, C- oder D-Typ zugeordnet. PLD katalysiert die Spaltung der terminalen Phosphodiesterbindung. Als einzige Phospholipase kann PLD neben der Hydrolysereaktion in Gegenwart geeigneter Akzeptor-Alkohole auch die Umesterung bzw. Transphosphatidylierung von Phospholipiden beschleunigen. Während über die biologische Relevanz dieser Aktivität bislang allenfalls spekuliert worden ist (Yu *et al.*, 1996; McDermott *et al.*, 2004; Dippe und Ulbrich-Hofmann, 2009), kommt der Transphosphatidylierung in der biotechnologischen Synthese von Phospholipiden mit besonderen Kopfgruppen große Bedeutung zu (Ulbrich-Hofmann, 2003).

Pflanzen weisen zum Teil eine große Vielfalt an PLD-Isoenzymen auf. Auf Grundlage der Sequenzdaten wurden in *Arabidopsis thaliana* 12 und in Reis 16 verschiedenen PLDs bestimmt (Elias *et al.*, 2002). Die Klassifizierung dieser Enzyme erfolgt anhand ihrer Aktivitätsmuster. Dem α -Typ werden PLDs zugeordnet, die von der Gegenwart millimolarer Ca^{2+} -Konzentrationen abhängig sind. Auch PLDs des β -, δ - und γ -Typs beanspruchen Ca^{2+} zur Entfaltung optimaler Aktivität, jedoch sind hier Konzentrationen im mikromolaren Bereich ausreichend. Zusätzlich benötigen diese Enzyme Phosphatidylinositol. ζ -Typ-PLDs dagegen sind Ca^{2+} -unabhängig (Qin und Wang, 2002).

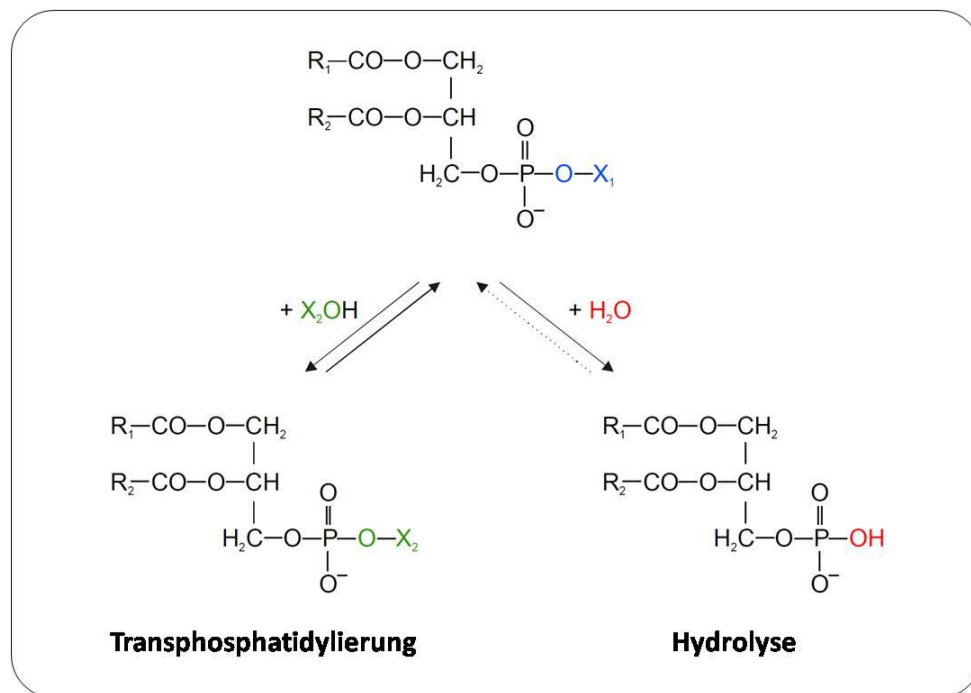


Abbildung 2.8: Hydrolyse und Transphosphatidylierung von Phospholipiden durch PLD. R1 bzw. R2 kennzeichnen Alkylreste. X1OH und X2OH sind primäre oder sekundäre Alkohole wie Cholin, Glycerol, Inositol oder Serin. Verändert nach Schäffner (2001).

Während über die Wechselwirkungen anderer Phospholipasen mit Phospholipidoberflächen relativ viel bekannt ist (Gelb *et al.*, 1995; James *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2001; Leidy *et al.*, 2006), sind Informationen über die Regulation von PLD durch spezifische Membraneigenschaften rar.

2.2.3 Biologische Funktionen der PLD

Wurde PLD-Aktivität zunächst in Karottenextrakt nachgewiesen (Hanahan und Chaikoff, 1947), folgten darauf Nachweise in weiteren Pflanzenspezies (Tookey, 1956; Davidson und Long, 1958), Tieren (Kater *et al.*, 1976), Pilzen (Blain *et al.*, 1976) und Bakterien (Ono *et al.*, 1970). Circa 50 Jahre später rückten PLD verstärkt in das wissenschaftliche Interesse, da ihnen zunehmend wichtige Funktionen in der Zelle zugeordnet werden konnten, welche nach Wang (2000) in drei Kategorien unterteilt werden können: (1) Lipidabbau, (2) Membranumbau und (3) Regulation/Signaltransduktion.

Die katabolen Eigenschaften der PLD spielen vor allem im Zusammenhang mit äußeren Stressoren wie z.B. Verwundung (Wang *et al.*, 2000), Wasserdefizit (Frank *et al.*, 2000) oder Pathogenbefall (Young *et al.*, 1996) eine Rolle. In diesen Fällen ließ sich eine Erhöhung der PLD-Konzentration in den Geweben direkt mit der Stresseinwirkung korrelieren. **Lipidabbauprozesse** finden in allen Entwicklungsphasen statt. So wurden erhöhte PLD-Aktivitätsniveaus auch bei Seneszenzprozessen (Fan *et al.*, 1997) sowie in meristemalen Geweben mit ausgeprägten Proliferations- und Membranumbauaktivitäten festgestellt (Xu *et al.*, 1997).

Membranumbauprozesse unter Beteiligung von PLD umfassen insbesondere die Lipidbiosynthese und Veränderungen der Membranlipidzusammensetzung (Li *et al.*, 2009). So konnte für *Avena sativa* (Hafer) gezeigt werden, dass als Reaktion auf Phosphatmangel die PLD-Aktivität hochreguliert wurde. Um die Membranfunktionen dennoch aufrechterhalten zu können, stiegen gleichzeitig in der Plasmamembran die Gehalte an phosphorfreien Lipiden wie Digalactosyldiacylglycerol, Glucosylceramiden und Sterolglycosiden (Andersson *et al.*, 2005).

Die Funktion der PLD im Kontext **regulatorischer Prozesse** leitet sich vor allem aus der Signalfunktion eines Produkts der PLD-katalysierten Phospholipidhydrolyse ab (Li *et al.*, 2009). Der sekundäre Botenstoff Phosphatidsäure (*phosphatidic acid*, PA) unterliegt als Reaktion auf Umwelt- und Entwicklungsstimuli starken Schwankungen (Munnik, 2001). Neben PLD beeinflussen auch andere PA-generierende Enzyme wie Alkyltransferase oder Diacylglycerolkinase den PA-Gehalt in der Zelle (Wang, 2004). Als physiologische Reaktion auf geänderte PA-Spiegel wurden u.a. die Ausschüttung von Pflanzenhormonen (Abscisinsäure, Ethylen), die spezifische Enzymaktivierung, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Modifizierungen am Cytoskelettnetzwerk beobachtet. Zielproteine dieser Signalübertragungsprozesse sind Proteinkinasen, Protein-Phosphatasen, Lipid-Kinasen, Lipid-Phosphatasen, Phospholipasen, NADPH-Oxidase und andere Enzyme (Wang, 2000). Die zeitliche und räumliche Regulation des PA-Spiegels ist bei allen Signalübertragungsprozessen von zentraler Bedeutung. In besonderem Maße gilt dies jedoch für intrazelluläre Lipid-Botenstoffe, da diese innerhalb der Zelle nur eine begrenzte Mobilität besitzen. So können diese *second messenger* in ihrem Wirkungsbereich auf bestimmte Membranen (Plasmamembran, Endoplasmatisches Retikulum, Kernmembranen) oder auch auf einzelne Mikrodomänen innerhalb spezifischer Membranen beschränkt sein (Li *et al.*, 2009).

2.2.4 Regulation der PLD

Unkontrollierte PLD-Aktivität hat die Hydrolyse von Phospholipiden und damit eine substantielle Schädigung der Membranintegrität zur Folge (Bargmann und Munnik, 2006). Ein Beleg dafür ist der Lipidabbau, welcher bei der Homogenisierung vieler Pflanzengewebe auftritt (Hanahan und Chaikoff, 1947). Aus diesem Grund wird die Aktivität der PLD in der Zelle sehr stark reguliert. Die Kontrolle erfolgt auf den unterschiedlichen Zeitskalen mit spezifischen Mechanismen. Die Langzeitregulation erfolgt auf Ebene der Genexpression, der Proteinsynthese sowie des Proteinabbaus und zielt ab auf das Aufrechterhalten der erforderlichen Proteingehalte in der Zelle. So konnte gesteigerte PLD-Aktivität oftmals mit hohen mRNA-Gehalten korreliert werden (Wang, 2000). Die kurzfristige Kontrolle der PLD basiert auf der Modulation der Enzymaktivität. Wirksame Steuerungsinstrumente sind dabei die Wechselwirkung mit spezifischen Interaktionspartnern und die Modifizierung von Membraneigenschaften.

2.2.4.1 Regulation durch Ca^{2+}

Von besonderer Bedeutung bei der Interaktion mit spezifischen Bindungspartnern ist die Ca^{2+} -Abhängigkeit der PLDs (mit Ausnahme der ζ -Typ-PLDs). Calcium spielt als essentieller sekundärer Botenstoff in vielen metabolischen Prozessen eine wichtige Rolle (White und Broadley, 2003; Lecourieux *et al.*, 2006). De Vrije und Munnik (1997) demonstrierten mittels eines *in vivo*-Assays an *Dianthus caryophyllus* (Gartennelke), dass gesteigerte PLD-Aktivität direkt auf einen Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels zurückgeführt werden kann. Unter *in vitro*-Bedingungen benötigen pflanzliche PLDs zum Erreichen optimaler Aktivität hohe Ca^{2+} -Konzentrationen (Pappan und Wang, 1999a). Interessanterweise liegt das Ca^{2+} -Erfordernis der PIP_2 -abhängigen PLDs des β - und γ -Typs aus *Arabidopsis thaliana* im mikromolaren Konzentrationsbereich, während α -Typ-PLDs einen Ca^{2+} -Bedarf im millimolaren Bereich (10-100 mM) aufweisen. Pappan *et al.* (1997) diskutierten diesen Unterschied als Resultat der Substitution von zwei der vier hochkonservierten Ca^{2+} -koordinierenden Aminosäurereste, wobei saure durch positiv geladene oder neutrale Aminosäuren ersetzt wurden. Bislang unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Schäffner) haben jedoch gezeigt, dass auch die Einführung der fehlenden sauren Aminosäuren in die C2-Domäne der PLD2 aus Weißkohl kein verändertes Ca^{2+} -Bindungsverhalten bewirkte. Für PLD α aus *Brassica oleracea* (Abousalham *et al.*, 1993), *Papaver somniferum* (Lerchner *et al.*, 2005) und *Ricinus communis* (Pappan und Wang, 1999b) wurde gezeigt, dass das pH-Optimum von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist. Die Ursachen für die Ca^{2+} -Abhängigkeit der PLD diskutieren viele Autoren im Zusammenhang mit der N-terminalen C2-Domäne, welche als Ca^{2+} -bindende Domäne bekannt ist (Kopka *et al.*, 1998; Torrecillas *et al.*, 2004; Mansfeld und Ulbrich-Hofmann, 2009).

Auch andere Metallionen wurden auf ihr Effektorpotential in Bezug auf die PLD-Aktivität untersucht. So konnte bei PLD, die aus Samen von *Papaver somniferum* (Schlafmohn) isoliert wurde, eine vierfach höhere Aktivierung durch Zn^{2+} als durch Ca^{2+} gemessen werden (Oblozinsky, 2005). Studien an bakteriellen PLDs dagegen erbrachten keine Hinweise auf Aktivitätssteigerungen durch spezifische Metallionen (Ogino *et al.*, 1999)

2.2.4.2 Regulation durch PIP_2

PIP_2 kommt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in Pflanzen zu (Heilmann, 2009). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von PLDs durch direkte Bindung an spezielle PIP_2 -Bindungsmotive erfolgen kann (Zheng *et al.*, 2002). Üblicherweise macht PIP_2 weniger als 0,05 mol% des Gesamtlipidgehaltes von Pflanzen aus (Drobak, 1993). *In vitro*-Experimente an einer PLD aus *Arabidopsis thaliana* haben aber gezeigt, dass PIP_2 -Gehalte oberhalb von 0,1 mol% notwendig sind, um eine Aktivierung hervorzurufen (Pappan *et al.*, 1997). Umso wahrscheinlicher erscheint es, dass PIP_2 innerhalb der Membran asymmetrisch verteilt und die Interaktion mit Enzymen an die dynamische Ausbildung von Mikrodomänen gekoppelt ist. Als Hinweis darauf kann gewertet werden, dass die Aktivität von PLDs des α -Typs bei suboptimalen Ca^{2+} -Konzentrationen in Gegenwart von PIP_2 stimuliert wurde (Qin *et al.*, 1997). Dieser Effekt beruhte nicht auf der direkten Bindung von PIP_2 , sondern auf einer Modifizierung der physikalischen Parameter der PIP_2 -haltigen Substratvesikel (vgl. 2.2.4.3).

2.2.4.3 Regulation durch die Membranmorphologie

Die Gegenwart aggregierter Substratmoleküle bewirkt einen deutlichen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit der PLD (Allgyer *et al.*, 1979; Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992). Aber nicht nur der globale Organisationsgrad der Lipide hat einen Einfluss auf die PLD-Aktivität. Auch die Membranmorphologie ist in entscheidendem Maße daran beteiligt, PLD zu kontrollieren. Aktivitätsstudien an PLD β und γ aus *Arabidopsis thaliana* erbrachten Hinweise darauf, dass zur Entfaltung optimaler Aktivität die Gegenwart von Lipiden, welche zur Ausbildung hexagonaler Phasen neigen, notwendig ist (Wang, 2000). Solche nicht-lamellaren Phasen treten als Übergangsstrukturen bei Membranzwangsprozessen auf (Cullis *et al.*, 1986) und könnten dazu dienen, PLDs bei bestimmten zellulären Ereignissen zu aktivieren.

2.2.4.4 Regulation durch Proteine

Während die Wechselwirkungen von Säuger-PLDs mit Proteinen relativ gut untersucht sind (Exton, 2002), ist der Wissensumfang bezüglich pflanzlicher PLDs auf diesem Gebiet sehr begrenzt. Eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und *second messenger*-Systemen besetzen G-Proteine. Lein und Saalbach (2001) gelang der Nachweis, dass G-Protein aus *Nicotiana tabacum* (Tabak) direkt mit PLD aus Tabak interagiert und sich inhibierend auf die Aktivität des Enzyms auswirkt. Für PLD α 1 aus *Arabidopsis thaliana* konnte eine Bindung an die α -Untereinheit des G-Proteins gezeigt werden, wobei das DRY-Sequenzmotiv der PLD als Ort der Interaktion identifiziert wurde. Auch hier führte die Bindung des Effektorproteins zur Aktivitätsverminderung (Zhao und Wang, 2004).

2.2.5 Struktur der PLD

Gemeinsames Merkmal der Enzyme der zu einer sogenannten Superfamilie zusammengefassten PLDs ist das Vorhandensein von vier hoch-konservierten Sequenzbereichen innerhalb der Primärstruktur (I-IV, Abb. 2.9). Die Bereiche II und IV weisen die als HKD-Motiv bezeichnete spezifische Sequenz **HxKxxxxDxxxxxx** auf (Morris *et al.*, 1996).

Der hohe Konservierungsgrad der Histidin-, Lysin- und Aspartatreste war bereits ein Anhaltspunkt dafür, dass diese Aminosäuren im gefalteten Zustand des Proteins im aktiven Zentrum liegen (Wang, 1997). Gewissheit brachten die Aufklärung der Kristallstruktur (Leiros *et al.*, 2000) und die Analyse des Reaktionsmechanismus (Leiros *et al.*, 2004) der PLD aus *Streptomyces* sp. Stamm PMF. Die Bedeutung der Sequenzbereiche I und III ist noch nicht geklärt, eine Beteiligung an der Katalyse wurde aber diskutiert (Sung *et al.*, 1997).

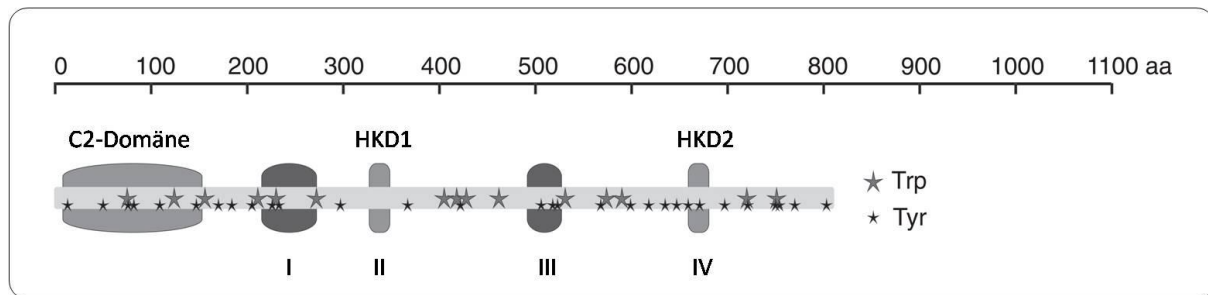


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Primärstruktur der PLD α 2 aus *Brassica oleracea* var. *capitata* (Weißkohl). Die N-terminale C2-Domäne und die vier hochkonservierten Regionen (I-IV) sind markiert. Verändert nach Stumpe *et al.* (2007).

Bis auf PLD ζ 1 aus *Arabidopsis thaliana* (Qin und Wang, 2002) besitzen alle bisher klonierten pflanzlichen PLDs eine **C2-Domäne** am N-Terminus. Diese regulatorischen Domänen bestehen aus ca. 130 Aminosäuren und wurden zuerst in Proteinkinase C und danach in vielen anderen Proteinen nachgewiesen (Nalefski und Falke, 1996). Sie besitzen die Eigenschaft, verschiedene Liganden und Substrate binden zu können (u.a. Ca²⁺, Phospholipide, Inositolphosphate) und damit die Membranassoziation von Proteinen zu vermitteln. Zur Beschreibung der Ca²⁺-regulierten Membranbindung der C2-Domänen – welche für die meisten, aber nicht alle C2-Domänen charakteristisch ist – wurden zunächst zwei Modelle diskutiert.

Das erste Modell basiert auf den Ergebnissen von NMR-Studien an der C2-Domäne von Synaptotagmin und rückt elektrostatische Wechselwirkungen in den Mittelpunkt (Zhang *et al.*, 1998), wobei Ca²⁺ als Brücke zwischen der C2-Domäne und anionischen Phospholipiden fungieren soll (Cho, 2001). Zheng *et al.* (Zheng *et al.*, 2000) konnten zeigen, dass Ca²⁺ die Ladung negativ geladener Aspartatreste neutralisieren kann und die positiv geladenen Seitenketten mit anionischen Phospholipiden interagieren. Kristallographisch nachgewiesen wurde die Ausbildung eines derartigen Ternärkomplexes für die C2-Domäne der Proteinkinase C α mit kurzkettigem Phosphatidylserin (Verdaguer *et al.*, 1999).

Das zweite Modell beruht auf einer Ca²⁺-induzierten Konformationsänderung der C2-Domäne, welche die Interaktion zwischen Phospholipiden und Protein verstärkt (Nalefski *et al.*, 1997). Die Arbeiten von Bittova *et al.* (1999) an der cytosolischen Phospholipase A₂ (PLA₂) bzw. von Medkova und Cho (1998) an Proteinkinase C demonstrierten, dass die Bindung von Calciumionen sowohl Konformationsübergänge bewirkt, als auch zur Ca²⁺-Brückenbildung führt.

2.2.6 Charakterisierung der PLD2 aus *Brassica oleracea* var. *capitata*

Lange bevor Erkenntnisse über die biologische Bedeutung der PLD verfügbar waren, wurde PLD aus *Brassica oleracea* var. *capitata* (Weißkohl) zur biotechnologischen Synthese von Phospholipiden verwendet (Dawson und Hemington, 1967). Mit Verfügbarkeit molekularbiologischer Techniken wurden in Weißkohl zwei PLD-Isoenzyme (PLD1 und PLD2) identifiziert, sequenziert und rekombinant in *E. coli* exprimiert, welche dem α -Typ angehören (Schäffner *et al.*, 2002). Das aus Weißkohl isolierte Enzym konnte dem Isoenzym PLD2 zugeordnet werden (Schöps *et al.*, 2002). Es besteht aus 812 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 92,1 kDa. Bei rekombinanter Expression wird das Methionin am N-Terminus abgespalten (Schäffner *et al.*, 2002), während das aus Weißkohl isolierte Enzym N-terminal acetyliert ist (Schöps *et al.*, 2002). Mittels Kleinwinkelstreuung wurde die äußere Form der PLD unter physiologischen Bedingungen analysiert (Stumpe *et al.*, 2007). Die Strukturabschätzung zeigt eine längliche Form, wobei basal und apikal locker strukturierte Bereiche zu erkennen sind (Abb. 2.10). Die Autoren spekulierten, dass die auffällige deckelartige Struktur (Abb. 2.10, A) auf Analogien zur Lid-Domäne der Lipasen (Aloulou *et al.*, 2006) hinweisen könnte.

Die Analyse der **phylogenetischen Verwandtschaft** auf Grundlage der Aminosäuresequenz (Guo *et al.*, 2006) zeigt, dass PLD2 aus Weißkohl (im Folgenden: PLD) einen besonders hohen Identitätsgrad mit PLD α 1 aus *Arabidopsis thaliana* aufweist (Abb. 2.11).

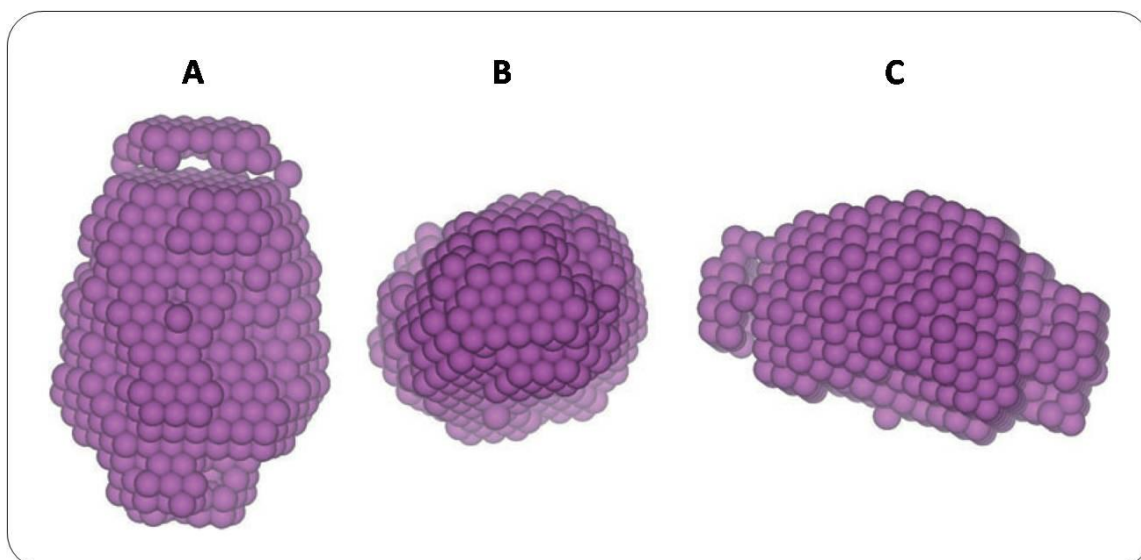


Abbildung 2.10: Strukturabschätzung der PLD aus *Brassica oleracea* var. *capitata* (Weißkohl). Basierend auf Daten aus der Kleinwinkelstreuung, nach Stumpe *et al.* (2007). Dargestellt sind drei unterschiedliche Ansichten: Frontalansicht (A), 90° um die y-Achse gedrehte Ansicht (B) und 90° um die z-Achse gedrehte Ansicht (C).

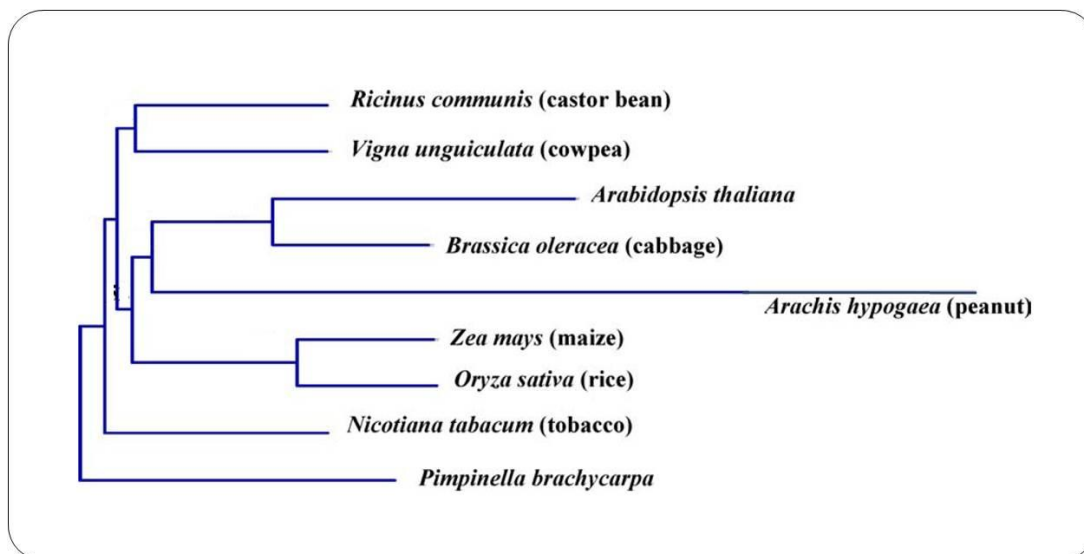


Abbildung 2.11: Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung unterschiedlicher pflanzlicher PLDs. Das Kladogramm wurde auf Grundlage der Aminosäuresequenzen konstruiert. Die Länge der Linien zeigt den relativen Abstand zwischen den Verzweigungen an, d.h. die Anzahl der substituierten Aminosäuren innerhalb eines Astes. Nach Guo *et al.* (2006).

Experimentell nachgewiesen wurde die **Ca²⁺-Bindung** der PLD mittels CD-Spektroskopie im Nah-UV-Bereich (Stumpe *et al.*, 2007). Interessanterweise wiesen die Bindungskurven eine hohe Übereinstimmung mit den Aktivitätskurven der PLD auf. Die abgeleiteten Dissoziationskonstanten (K_D) unterschieden sich um zwei Größenordnungen und legten das Auftreten von zwei Bindungsereignissen an verschiedenen Stellen des Moleküls nahe. Der niedrige K_D -Wert (0,1 mM) wurde als mögliche Calciumbindung an die C2-Domäne dargestellt, während der hohe K_D -Wert (10 bis 20 mM) als Bindung an die katalytischen Domänen diskutiert wurde. Die Autoren zeigten darüberhinaus, dass Ionenstärken (CaCl₂, NaCl) im höheren millimolaren Bereich zur Destabilisierung des Enzyms führen.

Unter *in vitro*-Bedingungen benötigt PLD zum Erreichen des **Aktivitätsoptimums** ca. 40 mM CaCl₂ und einen sauren pH-Wert (pH 5,5) (Tookey und Balls, 1956). In Pflanzenzellen sind Ca²⁺-Konzentrationen im millimolaren Bereich jedoch nur äußerst selten zu finden (White und Broadley, 2003), auch saure pH-Werte treten allenfalls in der Vakuole auf. Die Modulation der PLD-Aktivität durch Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) in Gegenwart natürlicher und synthetischer Substrate war Gegenstand mehrerer Untersuchungen (Jung *et al.*, 1989; Dittrich *et al.*, 1998). In allen Fällen war eine Steigerung der Aktivität durch SDS zu beobachten. Aufschlussreich war, dass die SDS-Aktivierung auch gegenüber monomer vorliegendem 1,2-Dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DiC₆PC) auftrat (Dittrich *et al.*, 1998). Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass SDS nicht nur die Eigenschaften der Substrataggregate beeinflusst hat, sondern auch direkt auf das Enzym wirkte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose	Eurogentec, Groningen, NL
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Amplex® Red-Reagenz	Invitrogen, Carlsbad, USA
Calciumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂	Applichem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Essigsäure, 96 %	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA
Kanamycinsulfat	Serva, Heidelberg
NaCl	Merck Biosciences, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Phosphatidyl- <i>p</i> -nitrophenol (PpNP)	Synthetisiert von Christa Kuplens, MLU, Halle
Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (Pipes)	Applichem, Darmstadt
Tickopur R33	Roth, Karlsruhe

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton®X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, MI, USA

Alle weiteren Chemikalien waren von höchster Reinheit. Es wurde nur deionisiertes Wasser verwendet.

3.1.2 Lipide

1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (POPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat (POPA)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol (POPG)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (POPE)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat (DOPA)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
L- α -Phosphatidylcholin aus Soja (PC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L- α -Phosphatidylethanolamin aus Soja (PE)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L- α -Phosphatidylinositol aus Soja (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat aus Rinderhirn (PIP ₂)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA

3.1.3 Proteine

Cholin-Oxidase (<i>Alcaligenes</i> sp.)	Sigma-Aldrich, Steinheim
LMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	97,0 kDa
Rinderserumalbumin	66,0 kDa
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	45,0 kDa
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	30,0 kDa
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	20,1 kDa
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,4 kDa
Peroxidase (Rettich)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Herstellung löslicher PLD

Die Herstellung löslicher PLD orientierte sich an den von Lambrecht und Ulbrich-Hofmann (1992), Abousalham *et al.* (1993) sowie Schäffner *et al.* (2002) etablierten Protokollen.

3.2.1.1 Expression

Kohl-PLD2 wurde im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) exprimiert, welcher die Plasmide pUBS520 und pRSET5a-pld2 enthielt (die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Susanne Stumpe). Als Kulturmedium wurde 2×YT Medium (1 % NaCl, 2 % Trypton, 1 % Hefeextrakt) verwendet. 500 ml Kulturmedium (50 µg/ml Amp und 25 µg/ml Kan) wurden mit Bakterienzellen aus einer Glycerolkultur angeimpft und bei 15°C mit 180 rpm 3 bis 4 Tage lang geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von ca. 8 bis 10 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 × g für 10 min (Avanti J-25, JA-10 Rotor, Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Zellaufschluß

Das Zellpellet von 1 l Kulturmedium wurde in 37 ml Zellysepuffer (30 mM Na-Pipes, pH 6,2, 10 mM EDTA) resuspendiert (13500 rpm, Ultraturrax T25 von Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) und die Zellen durch einen Hochdruck-Homogenisator (Gaulin Micron Lab40, APV, Lübeck) in 4 Passagen bei 700 bar aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 48000 × g für 20 min (Avanti J-25 Zentrifuge, JA-30.50 Rotor, Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) abgetrennt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.3 Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie

Der Rohextrakt wurde mit einer 1 M CaCl₂-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 50 mM CaCl₂ eingestellt und bei 5000 × g 10 min zentrifugiert. Bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde der Überstand auf eine mit 30 mM Na-Pipes, 50 mM CaCl₂, pH 6,2 äquilibrierte Octyl-Sepharose-Säule (20 ml Octyl-Sepharose CL-4B, Säulendimensionen: 300 mm × 15 mm) aufgetragen. Diese war mit einer LC-Anlage, bestehend aus Peristaltik-Pumpe P-1, Detektor Uvicord SII, Schreiber REC 102 und Fraktionssammler Frac-100 (Amersham Biosciences, Freiburg) verbunden. Nach Waschen der Säule mit 30 mM Na-Pipes, 50 mM CaCl₂, pH 6,2 wurde die PLD anschließend mit 5 mM Na-Pipes, pH 6,2, 0,1 mM EDTA eluiert. Die Eluate wurden elektrophoretisch analysiert (siehe 3.2.3) und die PLD-haltigen Fraktionen bei -80°C gelagert.

3.2.1.4 Anionenaustauschchromatographie

Nach Umpufferung in 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 wurde die Proteinlösung mittels Anionenaustauschchromatographie an einer Source 15Q-Säule (XK 16/20, Betthöhe 35 mm, Amersham Biosciences, Freiburg) gereinigt. Dabei kam eine Äkta FPLC™-Anlage (Amersham Biosciences, Freiburg) zum Einsatz. Die Elution der PLD erfolgte mittels steigendem NaCl-Gradienten (Laufmittel A: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, Laufmittel B: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 M NaCl) und kontinuierlicher Detektion der Absorption bei 280 nm. Die Reinheit des Proteins wurde mit SDS-PAGE überprüft. Die entsprechenden Fraktionen wurden zweimal gegen das hundertfache Volumen 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 dialysiert (Ausschlußgrenze: 20 kDa, Roth, Karlsruhe), zentrifugiert (30 min, 21460 × g) und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.2.2.1 Bradford-Test

Der Bradford-Test basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau an Proteine. Proteingebundener Farbstoff kann bei 590 nm detektiert werden (Bradford, 1976). Für den Bradford-Test im Mikrotiterplattenmaßstab wurden 25 µl Proteinlösung und 100 µl Bradford-Reagens eingesetzt. Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich 0 bis 400 µg/ml verwendet. Da dieser Test im Vergleich zu anderen Proteinbestimmungsmethoden am wenigsten aufwendig und der Einfluss störender Substanzen geringer ist, wurde der Bradford-Test zu Bestimmung der Proteinkonzentration während des Verlaufs der Proteinreinigung genutzt.

3.2.2.2 UV-Absorptionsmessung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer PLD-Proteinlösung wurde ein Spektrum von 240 bis 340 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) am Ultrospec 3000 Spektralphotometer (AmershamBiosciences, Freiburg) aufgenommen und die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde nach LAMBERT-BEER mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280} = 12680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (berechnet mit ProtParam ExPASy, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) bestimmt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) unter Verwendung von 0,75 mm dicken, 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Proteine wurden mit einer *Mighty-Small II Elektrophoresis unit* (Hoefer, San Francisco, CA, USA) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden durch Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) visualisiert.

3.2.4 Bestimmung der PLD-Aktivität

3.2.4.1 Standardaktivitätstest nach D'Arrigo

Dem Standardaktivitätstest der PLD liegt das Protokoll von D'Arrigo *et al.* (1995) zugrunde. Der diskontinuierliche Test wurde vor allem im Verlauf der Proteinreinigung eingesetzt und basiert auf der durch PLD-Aktivität hervorgerufenen Freisetzung von *p*-Nitrophenol (*p*NP) aus Phosphatidyl-*p*-Nitrophenol (PpNP) in einem mizellaren Reaktionssystem. In einer Mikrotiterplatte wurden zunächst 170 μ l Reaktionspuffer (Endkonzentration: 65 mM Na-Acetat, 50 mM CaCl₂, pH 5,5) vorgelegt und 20 μ l Enzymlösung zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l Phosphatidyl-*p*-nitrophenol-Stammlösung (10 mM Phosphatidyl-*p*-nitrophenol, 10 mM SDS, 10 % (v/v) Triton X-100) gestartet. Nach 10 min Inkubation bei 25 °C wurden 60 μ l Stopplösung (1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA) hinzugefügt und die Absorption bei 405 nm gemessen (Microplatereader Dynatech MR7000, Cheminst, Berlin). Der Messzeitraum befand sich im linearen Bereich der Progresskurven. Mit Hilfe einer Eichreihe im Konzentrationsbereich 0 bis 1 mM wurde die Enzymaktivität berechnet.

3.2.4.2 Amplex Red®-Aktivitätstest

Die PLD-Aktivität wurde mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Aktivitätstests bestimmt. Das im Verlauf der Hydrolysereaktion durch die PLD freigesetzte Cholin wird durch die Cholinoxidase zu Betain und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oxidiert. In Gegenwart von Meerrettich-Peroxidase reagiert das gebildete H₂O₂ in 1:1 Stöchiometrie mit dem Amplex® Red-Reagenz (10-Acetyl-3,7-dihydrophenoxazin). Dabei wird das fluoreszierende Resorufin gebildet.

Die Intensität der Resorufinfluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 542 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm bei 25 °C mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes (Polarstar Galaxy, BMG Labtechnologie, Offenburg) bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM Na-Pipes pH 7,0, 10 mM CaCl₂, 1 mM Phospholipide, 50 μ M Amplex® Red-Reagens, 1 U ml⁻¹ Meerrettich-Peroxidase, 0,1 U ml⁻¹ Cholinoxidase (aus *Alcanigenes* sp.) und 17 pM PLD. Die Aktivität wurde aus dem linearen Bereich der Progresskurve mit Hilfe einer Eichreihe (Cholinkonzentrationen von 0-400 μ M) berechnet.

Für die Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit von der Temperatur kam ein Jasco Spectrofluorometer FP-6500 (Jasco International, Tokyo, Japan) zum Einsatz. Zur Temperaturregulierung wurde ein Thermostat verwendet.

3.3 Biophysikalische Methoden

3.3.1 Herstellung von MLVs und SUVs

Zur Herstellung von MLVs und SUVs wurden die entsprechenden Lipide in Chloroform bzw. Chloroform/Methanol (9:1, v/v) gelöst und am Rotationsverdampfer zu einem Lipidfilm eingedampft. Dieser wurde im Ultraschallbad (Temperatur des Wasserbads: ca. 15-30 K oberhalb der Übergangstemperatur der Lipide) in 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 aufgenommen. Dabei entstand eine trübe Suspension von MLVs. Zur Herstellung von SUVs wurde diese anschließend mit Ultraschallpulsen von 3 Sekunden Länge gefolgt von 5 Sekunden Pause bei einer Gesamtdauer von 100 Sekunden (Vibra-Cell 72442, Bioblock-Scientific Instruments, Freiburg) behandelt, bis eine klare SUV-Lösung vorlag (Stieglitz *et al.*, 1999).

3.3.2 Isolation von Plasmamembranen aus Weißkohl-Blättern

Die Isolation und Reinigung von Plasmamembranen aus *Brassica oleracea* var. *capitata* erfolgte entsprechend dem Protokoll von Pönitz und Roos (1994).

3.3.2.1 Präparation des mikrosomalen Pellets

Eingefrorene Blätter von *Brassica oleracea* var. *capitata* wurden mit Trockeneis in einer Zelmühle (ZM 1000, Firma Retsch) bei 15.000 U/min aufgeschlossen. Nach dem Abdampfen des Trockeneises wurde das fein zermahlene Material (20 g FM) in 120 ml Extraktionspuffer (50 mM MOPS, 330 mM Saccharose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM DTE, 5 mM Ascorbinsäure, 1 % PEG, pH 7,5, 4°C) aufgenommen und mit einem Glashomogenisator bei 4°C weiter homogenisiert. Anschließend wurde das Rohhomogenat bei 500 x g 10 min zentrifugiert (Zentrifuge K23 D) und der Überstand einer weiteren Zentrifugation bei 15.000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 9500 U/min, 15 min) unterworfen. Anschließend wurde der Überstand bei 50.000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 30.000 U/min, 1 h) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet (mikrosomale Fraktion) wurde mit 2 ml Suspensionspuffer (4 mM K₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTE, 330 mM Saccharose, pH 7,8) gewaschen, in 9 ml desselben Puffers resuspendiert und im Zweiphasensystem fraktioniert.

3.3.2.2 Plasmamembranreinigung im wässrigen 2-Phasensystem

Die Vesikelsuspension des mikrosomalen Pellets wurde auf vorbereitete 2-Phasensysteme (36 g-System: Dextran T-500 20% - 11,7 g, PEG 3350 40% - 5,85 g, Saccharose - 3,05 g, 200 mM PO₄-Puffer (pH 7,8) - 0,675 ml, 200 mM KCl - 0,675 ml, 10 mM Na₂-EDTA - 0,27 ml, 10 mM DTE - 0,27 ml, Suspensionspuffer - 9 g) gegeben (9 ml Vesikelsuspension auf ein 36 g-System) und geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 500 x g 10 min, um die Phasen-Trennung in Ober (OP1)- und Unterphase (UP1) zu beschleunigen. Es wurden jeweils zwei 2-Phasensysteme benötigt (in 2 Zentrifugationsgläsern), von denen zunächst nur eines mit Vesikeln beschichtet wird. Die erste Oberphase (OP1) mit Vesikeln wurde nun auf die

frische Unterphase (UP2) mit Puffer, zur Unterphase (UP1) wurde frische Oberphase (OP2) gegeben, geschüttelt und einer erneuten Zentrifugation bei 500 x g unterworfen. Anschließend wurden die Oberphasen OP1 und OP2 vereinigt.

Für die Messungen, bei denen Membranvesikel ohne intrinsische Phospholipase-Aktivität nötig waren, wurde die Suspension für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend gekühlt.

3.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messungen wurden an einem FluoroMax-2® bzw. FluoroMax-3® mit Peltierelement (Horiba Jobin Yvon, München) unter Verwendung von 10 × 4 mm Fluoreszenzküvetten (Hellma, Müllheim) mit folgenden Parametern durchgeführt: Anregungs- und Emissionsspalt – 5 nm, Schrittweite – 1 nm, Integrationszeit – 1 s. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Es wurden Fluoreszenzemissionsspektren im Wellenlängenbereich von 310 bis 380 nm aufgezeichnet. Zur Korrektur wurde von jeder Probe ein Pufferspektrum aufgenommen und von dem Probenspektrum abgezogen.

Fluoreszenzlöschung

Bei den auf Fluoreszenzlöschung basierenden Experimenten wurde die Messung unmittelbar nach dem Zusammenpipettieren des Reaktionsansatzes gestartet.

Bei der Messung der Tryptophanfluoreszenz-Löschung durch Membranbindung wurde die Fluoreszenzemission in Gegenwart von 1 mM PC- bzw. PC/PE/PI/PIP₂-SUVs und CaCl₂-Konzentrationen im Bereich von 1 μM bis 100 mM verfolgt. Als Puffer wurde 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 verwendet. Die PLD-Konzentration betrug 460 nM. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der maximalen Emissionswellenlänge λ_{max} und der maximalen Fluoreszenzintensität.

Die Acrylamidlöschung der PLD-Fluoreszenz bei Membranbindung wurde in Gegenwart von 1 μM bzw. 10 mM CaCl₂ sowie 1 mM PC-SUVs, 460 nM PLD und 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 gemessen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die STERN-VOLMER-Gleichung (Gleichung 3.1) herangezogen. Diese beschreibt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration von Stoffen, welche die Fluoreszenz löschen (*quencher*):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad (3.1)$$

F_0 - Fluoreszenzintensität der Fluorophore in Abwesenheit des *quencher*s

F - Fluoreszenzintensität der Fluorophore in Gegenwart des *quencher*s

K_{sv} - STERN-VOLMER-Konstante

$[Q]$ - Konzentration des *Quencher*s

Bei Auftragung von F_0/F gegen $[Q]$ lässt sich aus dem Anstieg der Kurve die STERN-VOLMER-Konstante ablesen.

3.3.4 CD-Spektroskopie

Für die CD-Messungen kam ein Jasco J-810 Spectropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik, Gross-Umstadt) zum Einsatz. Die Fern-UV-CD-Spektren (250 bis 190 nm) wurden mit einer Bandweite von 1 nm, einer Integrationszeit von 1 s und einer Schrittweite von 0,1 nm aufgenommen. Bei einer Messgeschwindigkeit von 20 nm min⁻¹ wurden 10 Einzelspektren akkumuliert. Es wurden Quarzküvetten mit 1 mm Weglänge verwendet.

Für die bei 25°C durchgeführten Messungen wurden jeweils 10 µM Protein in 10 mM Pipes, pH 7,0 verwendet. Bei dem Experiment in Gegenwart von Phospholipiden enthielt der Messansatz zusätzlich 1 mM PC-SUVs und 10 mM CaCl₂. Bei jeder Messung wurden Referenzspektren ohne Protein aufgenommen und von den entsprechenden Spektren abgezogen.

Die auf die Anzahl der Aminosäurereste bezogene molare Elliptizität $[\theta]_{MRW}$ wurde aus den CD-Spektren nach Gleichung 3.2 ermittelt.

$$[\theta]_{MRW} (\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A} \quad (3.2)$$

$[\theta]_{MRW}$	- molare Elliptizität pro Aminosäurerest
θ	- Elliptizität (mdeg)
M	- Molekulare Masse des Proteins (g mol ⁻¹)
c	- Proteinkonzentration (mg ml ⁻¹)
d	- Schichtdicke der Küvette (cm)
N_A	- Anzahl der Aminosäurereste im Protein

3.3.5 LANGMUIR-Filmwaagemessungen

Die Messungen des Monoschicht-Oberflächendrucks wurden mit Hilfe von Wilhelmy-Filmwaagen (Riegler und Kirstein, Wiesbaden) durchgeführt, bei denen ein Filterpapierstück als Wilhelmy-Plättchen fungierte. Vor den Messungen wurde der Trog (Volumen: 11,15 ml, Oberfläche: 7,1 cm²) mit Detergenzlösung (Tickopur R33) gereinigt und mit deionisiertem Wasser gespült. Danach wurde die Subphase (10 mM Na-Pipes, 10 mM CaCl₂, pH 7,0) eingefüllt und mit einem Thermostaten auf 25°C temperiert. Das gleiche Wasserbad diente der Temperierung einer Plexiglas-Box, welche den Messaufbau abdeckte. Mit einer Dosierspritze wurde der Lipidfilm vorsichtig und tröpfchenweise auf die Oberfläche der Subphase aufgetragen. Als Lösungsmittel wurde eine Chloroform/Methanol-Mischung (9:1, v/v) verwendet. Eine mindestens 30 minütige Äquilibrierungszeit diente der Verflüchtigung des Lösungsmittels. Nach Einstellen eines konstanten Oberflächendrucks von 25 mN m⁻¹ ± 0,5 wurde die Proteinlösung in die Subphase injiziert (23 nM PLD). Um Störungen des Lipidfilms zu vermeiden, erfolgte die Injektion mittels eines Durchlasses im Trog direkt in die Subphase. Während der Messungen wurde die Subphase langsam mit einem Magnetrührer gerührt.

3.3.6 BREWSTER-Winkel-Mikroskopie

Die Morphologie von Lipidfilmen wurde mit einem BREWSTER-Winkel-Mikroskop (BREWSTER *angle microscope*, Mini-BAM, Nanofilm Technologie GmbH, Göttingen) untersucht. Das Messprinzip beruht darauf, dass parallel polarisiertes Licht beim BREWSTER-Winkel nicht von der Wasseroberfläche reflektiert wird. Gelangt eine Monoschicht als drittes Medium (neben Luft und Wasser) in den Strahlengang, kommt es zur Reflexion des eingestrahnten Laserlichtes (30 mW, 632 nm), das mit einer CCD-Kamera detektiert wird (Henon und Meunier, 1991). Die Auflösung der Bildaufnahmen betrug $< 20 \mu\text{m}$. Es wurde eine Oberfläche von $4,8 * 6,4 \text{ mm}^2$ analysiert. Zur Messung der Druck-Flächen-Isothermen wurde eine Filmwaage mit einer Fläche von 30 cm^2 (Riegler und Kirstein, Wiesbaden) verwendet.

3.3.7 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Für die DSC-Messungen wurde ein Microcal MC-2 (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA) verwendet. Alle Experimente wurden mit einer Heizrate von 1°C min^{-1} bei einer zeitlichen Auflösung von 3 s durchgeführt. Die SUVs wurden in Puffer (10 mM Na-Pipes, pH 7,0) gelöst. Für die Messungen in Gegenwart von Calciumionen wurden die SUV-Proben vor der Messung mit CaCl_2 (10 mM) versetzt und anschließend kräftig durchmischt. Die Lipidkonzentration in der Messzelle betrug 2,5 mM, die Referenzzelle enthielt Puffer (10 mM Na-Pipes, pH 7,0). Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu überprüfen, wurden jeweils vier Heiz-Scans ausgeführt. Sofern die Messungen zwei bis vier identisch waren, fand jeweils die Aufnahme des dritten Heiz-Scans Verwendung.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung der PLD und ihrer Varianten

4.1.1 Lösliche Wildtyp-PLD

PLD aus Weißkohl wurde rekombinant in *E. coli*-Zellen hergestellt. Dabei konnte auf Konstrukte zurückgegriffen werden, die innerhalb der Gruppe im Rahmen früherer Arbeiten erzeugt wurden (Schäffner, 2001). Die Zellen wurden bei 15°C in Kulturmedium exprimiert und anschließend im Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen (siehe dazu 3.2.1).

Die erste Stufe der PLD-Reinigung bildete eine Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie. Bei dieser Methode wird der Umstand genutzt, dass intakte PLD in Gegenwart von Calcium an das hydrophobe Säulenmaterial (Octylsepharose) bindet und durch Zugabe von EDTA gezielt eluiert werden kann. Die teilgereinigte Proteinlösung wurde mittels Anionenaustauschchromatographie bis zur Homogenität gereinigt. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.1, Bahn 2).

4.1.2 Inaktive PLD-Varianten

Für die Reinigung der inaktiven Varianten der PLD (H333D und D340E) konnte die Octylsepharose-Säule nicht genutzt werden, da interessanterweise nur funktionales Enzym an das Säulenmaterial gebunden wurde. Daher wurde der Rohextrakt zunächst über eine Phenylsepharose-Säule und anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Abb. 4.1, Bahnen 3 und 4).

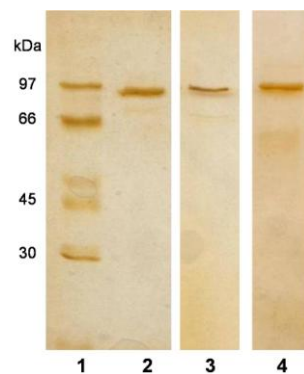


Abbildung 4.1: Reinheitskontrolle der gereinigten PLD-Varianten mittels SDS-PAGE. Proben der gereinigten Proteine wurden analysiert wie unter 3.2.3 beschrieben. Bahn 1 – LMW-Marker, Bahn 2 – WT-PLD, Bahn 3 – H333D, Bahn 4 – D340E.

4.2 Aktivitätsstudien

Den Ausgangspunkt der Aktivitätsstudien bildete die folgende Überlegung: Unter Laborbedingungen ist Aktivität bei PLDs des α -Typs nur in Gegenwart von unphysiologisch hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (im millimolaren Bereich) nachweisbar (vgl. 2.2.4.1). Da die natürliche Umgebung von Enzymen aber von einem dynamischen System gebildet wird, in dem Enzymreaktionen von einer großen Anzahl an Steuerungsmechanismen kontrolliert werden, waren Experimente notwendig, welche sich diesen Verhältnissen in hochvereinfachter Form annähern. Ziel der Untersuchungen war es, unter kontrollierten Modellbedingungen Informationen über die PLD-Regulation zu gewinnen, wobei die Parameter insbesondere hinsichtlich physiologischer Relevanz variiert wurden.

4.2.1 Einfluss der Substrataggregatstruktur auf die Aktivität

Phospholipide können in Abhängigkeit von der Kohlenstoff-Kettenlänge und der Konzentration unter anderem als Monomere, einschichtige Mizellen und doppel- oder vielschichtige Vesikel vorliegen (vgl. 2.1.1). Abbildung 4.2A verdeutlicht den Einfluss derart unterschiedlicher Substrataggregate auf die Aktivität der PLD. Gegenüber synthetischem, monomer vorliegendem diC_6PC zeigte die in der Zelle grenzflächenaktive PLD eine deutlich verringerte Aktivität im Vergleich zu POPC in Vesikelform. Die Unterschiede in den Progresskurven der Messungen mit MLVs bzw. SUVs (präpariert entsprechend 3.3.1) könnten als Hinweis darauf gedeutet werden, dass PLDs bestimmte Membrankrümmungen in ähnlicher Weise bevorzugen, wie dies für eine GPI-verankerte alkalische Phosphatase gezeigt wurde (Sesana *et al.*, 2008).

Das für viele Lipasen und Phospholipasen charakteristische Phänomen der **Grenzflächenaktivierung** beschreibt die bevorzugte Hydrolyse von Substrataggregaten gegenüber monomer vorliegenden Substratmolekülen (Wells, 1974).

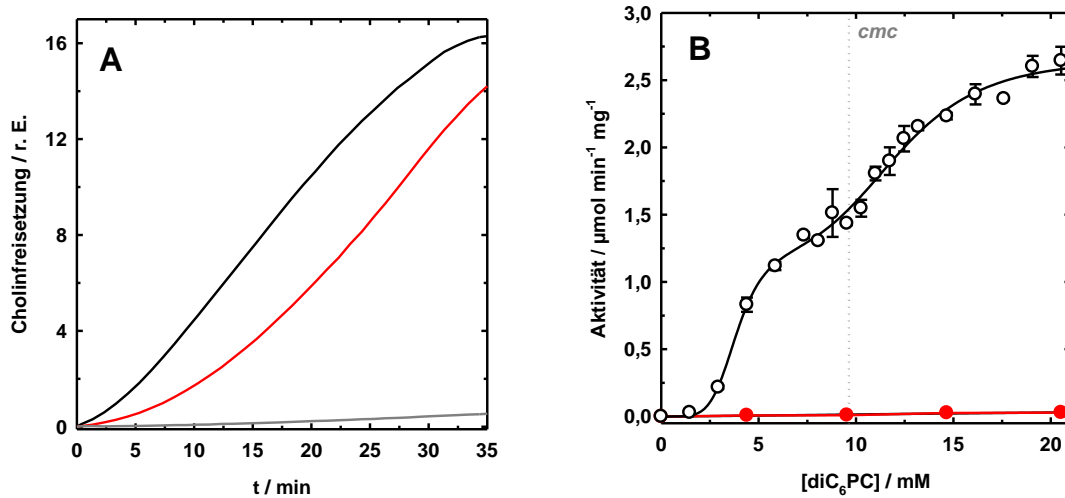


Abbildung 4.2: Abhängigkeit der PLD-Aktivität von der Substrataggregatstruktur.

A: Progresskurven der PLD-Aktivität gegenüber POPC-SUVs (schwarz), POPC-MLVs (rot) und diC₆PC (grau). Messansatz: 1 mM Phospholipide, 0,7 μM PLD, 10 mM CaCl₂, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C. **B:** PLD Aktivität als Funktion der diC₆PC-Konzentration in Abwesenheit (rot) und Gegenwart (schwarz) von 10mM CaCl₂. *cmc* verweist auf die kritische Mizellbildungskonzentration.

Messansatz: 17 pM PLD, 10 mm Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

In Abbildung 4.2B ist die Aktivität gegenüber dem kurzketigen Substrat diC₆PC in einem Konzentrationsbereich dargestellt, welcher sowohl monomere als auch mizellare Zustände umfasst. Die kritische Mizellbildungskonzentration von diC₆PC liegt bei $9,6 \pm 0,2$ mM (Dittrich *et al.*, 1998). In Gegenwart von 10 mM CaCl₂ (schwarze Kurve) stieg die PLD-Aktivität in Abhängigkeit von der diC₆PC-Konzentration bis zu einer Sättigung bei 20 mM Substrat. Unterhalb der *cmc* nahmen die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse einen sigmoiden Kurvenverlauf an. Mit Überschreitung der *cmc* begann eine zweite sigmoide Phase, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Aktivität gegenüber monomerem Substrat ungefähr verdoppelt wurde. Dieser Kurvenverlauf ist vergleichbar mit ähnlichen Messungen mit PLD aus Weißkohl (Allgyer und Wells, 1979; Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992; Abousalham *et al.*, 1997), ausgeprägte Sigmoidität wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht gefunden. In einer Studie zur PLD-Aktivität im monomeren Konzentrationsbereich von diC₆PC wurde dagegen ein sigmoider Kurvenverlauf mit einem Hill-Faktor von 1,8 beschrieben und als Hinweis auf die mögliche Existenz einer effektorartig wirkenden, zusätzlichen Substrat-Bindungsstelle gedeutet (Dittrich *et al.*, 1998).

Zum Verständnis dieser Grenzflächenaktivierung müssen die beiden im Verlauf einer Grenzflächenreaktion auftretenden Bindungsereignisse differenziert werden: (1) Zunächst assoziiert das Enzym nichtkovalent mit der Grenzfläche. (2) Danach erfolgt die Bindung der einzelnen Substratmoleküle im aktiven Zentrum und deren Umsetzung zum Produkt. Dass die Grenzflächenaktivierung der humanen pankreatischen Lipase an die Fähigkeit der deckelartigen *Lid*-Domäne gebunden ist, in Gegenwart einer Lipid-Wasser-Grenzfläche von der offenen zur geschlossenen Konformation überzugehen, demonstrierten Carriere *et al.* (1997) anhand von Mutationsstudien.

Auch im Fall der phosphoinositolspezifischen Phospholipase C- δ_1 wurde die Existenz einer nichtkatalytischen Region diskutiert, welche als Anker das Protein in Kontakt mit der Mizelle hält und dadurch die Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum verbessert (Rebecchi *et al.*, 1993). Kristallstrukturuntersuchungen an sekretorischen Phospholipasen A₂ bestätigten das Vorhandensein der separaten Stufen (1) Grenzflächenbindung und (2) Beladung des aktiven Zentrums (Gelb *et al.*, 1999). Auf Grundlage der einzigen bisher gelösten Raumstruktur einer PLD spekulierten Leiros *et al.* (2004) über die mögliche Bedeutung von zwei an der Oberfläche von PLD aus *Streptomyces* sp. Stamm PMF befindlichen *loops* als Grenzflächenbindungsstrukturen. Die Funktion von zwei innerhalb einer *loop*-Region lokalisierten Aminosäureresten bei der Substraterkennung wurde für PLD aus *Streptomyces septatus* TH-2 beschrieben (Uesugi *et al.*, 2007). Über die strukturellen Voraussetzungen der Membranassoziation pflanzlicher PLDs dagegen ist bislang nichts bekannt.

Die Ca²⁺-Abhängigkeit der durch PLD katalysierten Hydrolysereaktion wurde anhand der in Abwesenheit von Ca²⁺ ermittelten Werte ersichtlich (Abb. 4.2 B, rote Kurve). Unter diesen Bedingungen zeigte die PLD keine Reaktion gegenüber diC₆PC, während die Gegenwart von Ca²⁺ zu deutlich messbarer Aktivität führte (schwarze Kurve). Dieses Ergebnis stimmt überein mit zahlreichen Studien an PLD aus *Brassica oleracea* var. *capitata* (Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992; Stumpe *et al.*, 2007) bzw. anderen pflanzlichen PLDs des α -Typs (Wang, 2001; Lerchner *et al.*, 2005).

4.2.2 Aktivität gegenüber anionischen Modellmembranen

Als membranintegrierte Bindungspartner löslicher Enzyme dienen in der Zelle fast ausschließlich anionische Phospholipide (Langner und Kubica, 1999; Buckland und Wilton, 2000). Aus diesem Grund wurde die PLD-Aktivität gegenüber Mischvesikeln (SUVs) aus POPC/POPG, POPC/DOPA und POPC/POPA in Abhängigkeit vom molaren Anteil der anionischen Komponente untersucht (Abb. 4.3). Im Reaktionsansatz waren 10 mM CaCl₂ enthalten.

Der deutlichste Effekt war im POPC/POPA-System zu beobachten. Gegenüber reinen POPC-SUVs betrug die Anfangsgeschwindigkeit der Aktivität 0,6 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Bis ca. 2 mol% POPA erhöhte sich die PLD-Aktivität nur leicht. Die weitere Erhöhung des POPA-Anteils führte zu einer kooperativen Steigerung der Aktivität, welcher mit einer 500fachen Stimulation bei 10 mol% POPA ein Plateau erreichte (298,3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Das Ausmaß der Aktivierung hing stark von der Fettsäurestruktur ab. Wurde DOPA (mit zwei ungesättigten Ölsäureresten) anstelle von POPA (mit einer gesättigten Palmitinsäure und einer ungesättigten Ölsäure) in POPC-SUVs eingebaut, verminderte sich die Aktivierung auf den Faktor 20 (11,6 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Eine noch schwächere Stimulation zeigte sich mit POPG (1,2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

Die durch POPA hervorgerufene 500fache Aktivierung der PLD ist die stärkste bisher beschriebene Stimulation. Jung *et al.* (1999) berichteten für PLD aus *Brassica oleracea* var. *capitata* eine Phosphatidsäure-vermittelte Aktivierung um den Faktor 20. Dieser deutlich geringere Aktivierungseffekt ist möglicherweise auf die in der Publikation nicht näher dargelegte Fettsäurezusammensetzung der als Substrat eingesetzten Phospholipide zurückzuführen.

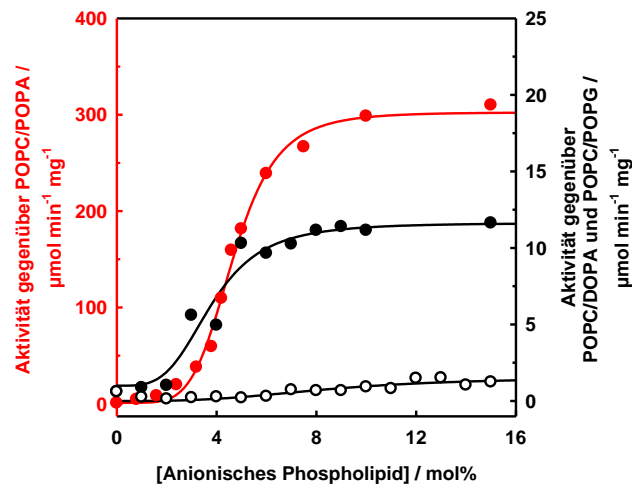


Abbildung 4.3: Einfluss anionischer Phospholipide auf die PLD-Aktivität gegenüber POPC/POPA- (rot), POPC/DOPA- (schwarz, gefüllte Kreise) und POPC/POPG-SUVs (schwarz, offene Kreise). PLD-Aktivität in Abhängigkeit von der anionischen Komponente. Messansatz: 1 mM Phospholipide, 17 pM PLD, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

4.2.2.1 Analyse der Lagphase

Der Einfluss anionischer Phospholipide wurde zudem deutlich bei der Analyse der *Lagphase*, welche typischerweise zu Beginn der Reaktionsprogresskurven zu beobachten war (Abb. 4.4A). Das Auftreten einer *Lagphase* ist bei lipidabbauenden Enzymen weit verbreitet. In der Literatur wurden unterschiedliche Erklärungen für dieses Phänomen diskutiert, wobei zuletzt anhand von Untersuchungen an Lipasen biochemisch und biophysikalisch begründete *Lagphasen* unterschieden wurden (Snabe und Peterson, 2003). Als *biochemische Lagphase* wurde die Zeitspanne definiert, in der keine oder kaum Hydrolyse von Esterbindungen stattfindet. Hierfür können mehrere mögliche Erklärungen herangezogen werden. Der erste biochemische Ansatz basiert auf der Langsamkeit der Adsorption des Enzyms an der Substratoberfläche, d.h. das Einstellen des E/E*-Gleichgewichtes ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Verger *et al.*, 1973). Als weiterer biochemischer Ansatz wurde die Beeinflussung der *Lagphase* durch Modulation der Membraneigenschaften betrachtet. Beispielsweise wurden bei PLA_2 als wichtige Einflussgrößen der Grenzflächenaffinität die Desorptionsrate der Produkte und deren Löslichkeit in der Lipidschicht erkannt. Die Akkumulation des Produktes an der Grenzfläche führte auch hier zu einer Verschiebung des E/E*-Gleichgewichtes (Jain und Berg, 1989). Als *biophysikalische Lagphase* wurde die bei Lipasen auftretende Zeitspanne bezeichnet, in welcher zwar Enzymaktivität auftrat, die Produktfreisetzung aus der Grenzfläche aber verzögert war (Snabe und Peterson, 2003).

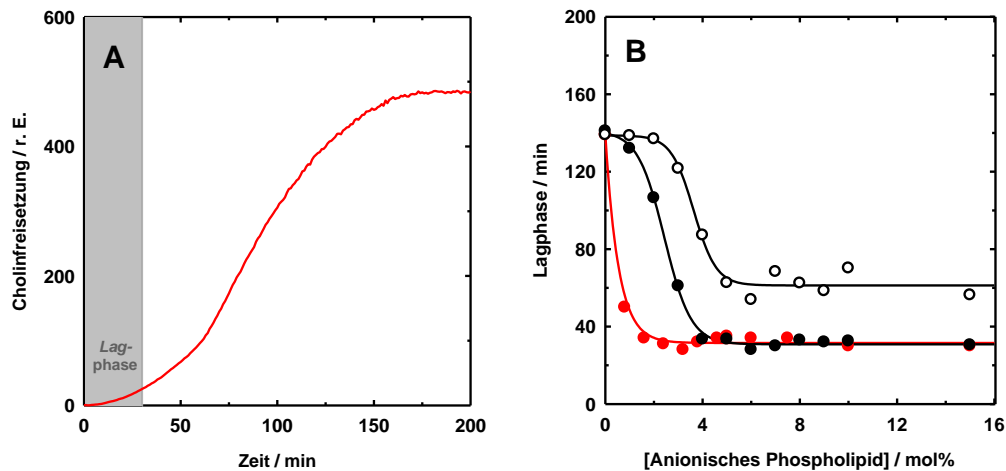


Abbildung 4.4: Lagphase der PLD-Aktivität.

A: Progresskurve der PLD-Aktivität gegenüber POPC/POPA(85:15)-SUVs. Der Bereich der *Lagphase* ist grau unterlegt. **B:** Einfluss anionischer Phospholipide auf die *Lagphase* der PLD-Aktivität gegenüber POPC/POPA- (rot), POPC/DOPA- (schwarz, gefüllte Kreise) und POPC/POPG-SUVs (schwarz, offene Kreise).

Messansatz: 1 mM Phospholipide, 17 pM PLD, 10 mM CaCl₂, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

Aus Abbildung 4.4B geht hervor, dass die *Lagphase* durch die Gegenwart von POPA und DOPA um ca. das 5fache und im Fall von POPG um ca. das 2,5fache reduziert wurde. Ein ähnlicher Effekt wurde für PLA₂ aus Schlangengift beschrieben. Auch hier ging einer Phase hoher Aktivität eine Latenzperiode voraus, welche umgekehrt proportional zum Stoffmengenanteil anionischer Lipide im Substrat war (Gadd und Biltonen, 2000). Interessanterweise zeigt Abbildung 4.4B auch, dass sich die Stoffmengenprozentage der anionischen Komponenten, bei welchen die *Lagphasen* den geringsten Wert erreichten, in der gleichen Reihenfolge ordneten wie die maximale Aktivität (POPA>DOPA>POPG). Die Schwellenwerte lagen dabei für POPA bei 2 mol%, für DOPA bei 4 mol% und für POPG bei 6 mol%. Die Freisetzung des der Aktivitätsbestimmung zugrunde liegenden löslichen Reaktionsproduktes Cholin stellt keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Es handelt sich bei der beobachteten Latenzperiode folglich um eine *biochemische Lagphase*, in der das E/E*-Gleichgewicht durch die anionischen Lipide in Richtung des grenzflächengebundenen Enzyms (E*) verschoben wird.

4.2.2.2 Analyse des Ca²⁺-Bedarfs

Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von anionischen Phospholipiden den Calciumbedarf der PLD beeinflusst, wurde die Aktivität gegenüber POPC und POPC/POPA (85:15) bei unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen bestimmt (Abb. 4.5). Die relative Aktivität war auch im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 2 mM CaCl₂ im POPA-haltigen System gegenüber reinen POPC-SUVs deutlich erhöht, jedoch zeigt der Verlauf der beiden Kurven große Übereinstimmungen, d.h. die Ca²⁺-Abhängigkeit blieb unverändert.

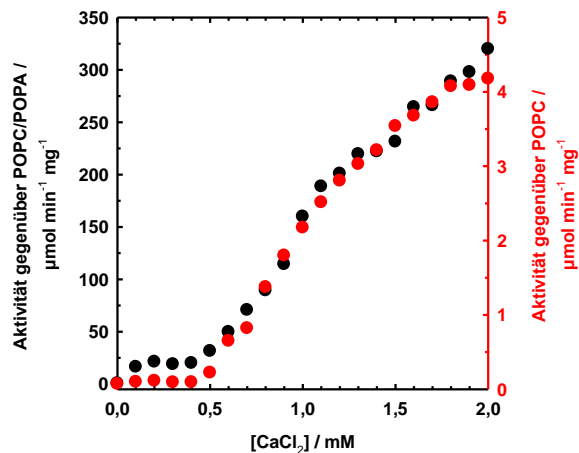


Abbildung 4.5: PLD-Aktivität in Abhängigkeit von der CaCl_2 -Konzentration.

Aktivität gegenüber POPC (rot)- und POPC/POPA(85:15)-SUVs (schwarz). Messansatz: 1 mM Phospholipide, 17 pM PLD, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

Dass die Ca^{2+} -Affinität durch die Lipidbindung gesteigert werden kann, wurde anhand von Fluoreszenzstudien mit PLA_2 aus Schlangengift demonstriert (Lathrop *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass die Gegenwart von POPA keinen Einfluss darauf hatte, in welcher Weise die PLD-Aktivität von der Ca^{2+} -Konzentrationen abhing, deutet jedoch darauf hin, dass beiden Aktivierungseffekten (durch Ca^{2+} bzw. POPA) unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

4.2.3 Aktivität gegenüber pflanzenzell-analogen Modellmembranen

Wie bereits aufgeführt (siehe 4.2.2.2) benötigen PLDs des α -Typs *Fin vitro* zur Entfaltung optimaler Aktivität Ca^{2+} in millimolaren Konzentrationsbereichen (10-100 mM). Da derartige Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytoplasma pflanzlicher Zellen unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen, wurde die physiologische Bedeutung von Ca^{2+} in der Regulation von PLD angezweifelt (Pappan und Wang, 1999b). Die klassischen PLD-Aktivitätstests werden zumeist bei sauren pH-Werten, im mizellaren System und in Gegenwart künstlicher Substrate und Detergentien durchgeführt. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit – als experimentelle Modelle biologischer Membranen – plasmamembran-analogue SUVs eingesetzt und die Aktivitätstests bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt. Untersucht wurde der Einfluss von Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) sowie PIP_2 auf die Hydrolyse von PC. Das zwitterionische PE ist als Phospholipid mit der Tendenz zur Ausbildung nicht-lamellarer (hexagonaler) Phasen bekannt (Marrink und Mark, 2004). PI und PIP_2 kommen typischerweise in der inneren Plasmamembran eukaryotischer Zellen vor (Robbins *et al.*, 1999), wobei PIP_2 als multifunktionales Signal-Phospholipid gegenüber vielen Enzymen Effektorfunktionen besitzt (McLaughlin und Murray, 2005). Die Modellmembranen enthielten Soja-Phospholipide mit folgenden molaren Anteilen: PC – 36 mol%, PE – 52 mol%, PI – 10 mol% sowie PIP_2 aus Rinderhirn – 2 mol%. Diese Zusammensetzung der Phospholipide entspricht näherungsweise den Verhältnissen der Plasmamembranen pflanzlicher Zellen (Harwood, 1994).

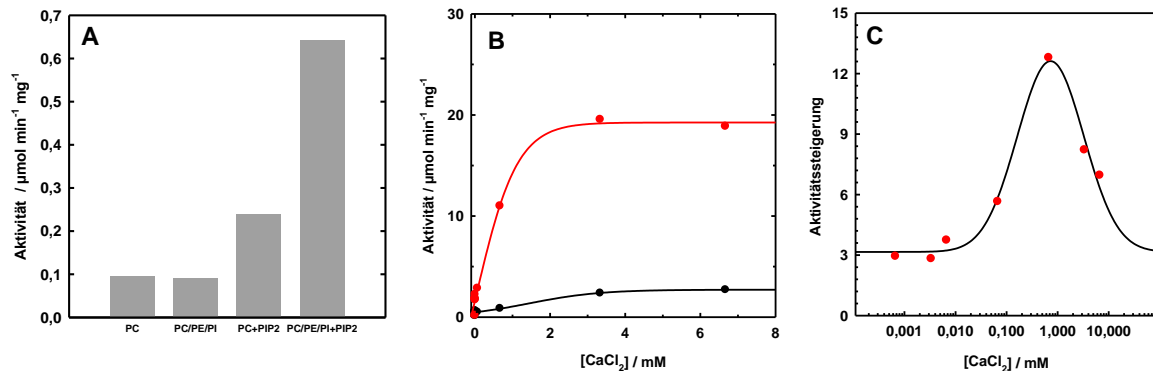


Abbildung 4.6: Aktivität der PLD gegenüber pflanzenzell-analogen Modellmembranen.

A: PLD-Aktivität gegenüber PC-, PC/PE/PI(37:53:10)-, PC/PIP₂(98:2)- und PC/PE/PI/PIP₂(36:52:10:2)-SUVs in Gegenwart von 10 μM CaCl₂, **B:** PLD-Aktivität gegenüber PC- (schwarz) und PC/PE/PI/PIP₂(36:52:10:2)-SUVs (rot) in Abhängigkeit von der CaCl₂-Konzentration. **C:** Aktivitätssteigerung im PC/PE/PI/PIP₂-System gegenüber dem PC-System, basierend auf den Daten aus Abb. 4.6B. Messansatz: 1 mM Phospholipide, 160 pM PLD, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

Zum Vergleich wurden SUVs eingesetzt, welche entweder nur aus PC (100 mol%), aus PC und PIP₂ (98:2 mol%) oder aus PC, PE und PI (37:53:10 mol%) bestanden. In Anwesenheit von 10 μM CaCl₂ zeigte sich, dass PIP₂ eine deutliche Aktivierung der PLD hervorrief (Abb. 4.6A). Die Aktivität gegenüber PC-SUVs wurde durch die Gegenwart von 2 mol% PIP₂ mehr als verdoppelt (von 0,10 auf 0,24 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Noch stärker war dieser Effekt bei den Plasma-Modellmembranen ausgeprägt. Die PLD-Aktivität gegenüber PC/PE/PI/PIP₂-SUVs (0,64 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) war im Vergleich zu PC/PE/PI-SUVs (0,09 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) um den Faktor 7 gesteigert.

Die in Abbildung 4.6B dargestellte Messung der Aktivität gegenüber PC- und PC/PE/PI/PIP₂-SUVs als Funktion der CaCl₂-Konzentration lieferte weitere Hinweise darauf, dass die PIP₂-enthaltenden Plasma-Modellmembranen PLD stimulierten. Die logarithmische Auftragung der Aktivitätssteigerung, d.h. des Quotienten aus der Aktivität gegenüber PC/PE/PI/PIP₂ und der Aktivität gegenüber PC, verdeutlicht, dass schon im nanomolaren Konzentrationsbereich eine 3-fache Aktivitätssteigerung auftrat (Abb. 4.6C). Die maximale Aktivitätssteigerung wurde bei 670 μM CaCl₂ mit einem Faktor von 13 erreicht.

Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit Studien an PLD α aus *Arabidopsis thaliana* (Qin *et al.*, 1997). Hier wurde die Aktivität gegenüber PC/PE/PIP₂ (5:87,5:7,5)-Vesikeln bei pH 7,0 und in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ bestimmt und eine deutliche Stimulation des Enzyms festgestellt. Die Autoren führten dieses Ergebnis zum einen auf strukturelle Eigenschaften der Membranen zurück, zum anderen auf eine Region innerhalb der C2-Domäne, welche als Bindungsstelle für anionische Phospholipide bekannt ist (Nalefski und Falke, 1996) und durch die PIP₂-Bindung eine Membranassoziation der PLD vermitteln könnte.

4.2.4 Aktivität gegenüber Plasmamembran-Isolaten aus Weißkohlblättern

Da Modellmembranen nur eine stark vereinfachte Annäherung an die Komplexität zellulärer Membranen darstellen, wurden natürliche Plasmamembranen aus Weißkohlblättern mittels Ultrazentrifugation und durch Reinigung im wässrigen Zweiphasensystem isoliert (siehe 3.3.2) und hinsichtlich ihres Einflusses auf die PLD-Aktivität untersucht.

Auch ohne die Zugabe von PLD war Hydrolyseaktivität gegenüber den isolierten Plasmamembran-Vesikeln nachweisbar (Abb. 4.7). Interessanterweise trat diese Aktivität schon bei 1 μM CaCl_2 auf. Nach Abstoppen dieser Aktivität durch Erhitzen (siehe 3.3.2.2) wurde bestimmt, welche Wirkung extern zugesetzte PLD gegenüber diesen Membranen zeigte. Dabei wurde deutlich, dass PLD gegenüber isolierten Plasmamembranen eine ähnliche Abhängigkeit von Calciumionen aufwies wie gegenüber Modellmembranen. Bei Ca^{2+} -Konzentrationen im mikromolaren Bereich war die Aktivität sehr gering und stieg dann im millimolaren Bereich auf ein Maximum bei 10 mM CaCl_2 . Aus der Ungleichheit der beiden Kurvenverläufe lässt sich schlussfolgern, dass es sich um zwei unterschiedliche Enzyme gehandelt hat. Möglicherweise wurde die intrinsische PLD-Aktivität von einem mit der membranassoziierten, PIP_2 -abhängigen PLD aus *Brassica napus* (Novotna *et al.*, 2003) vergleichbaren Enzym hervorgerufen.

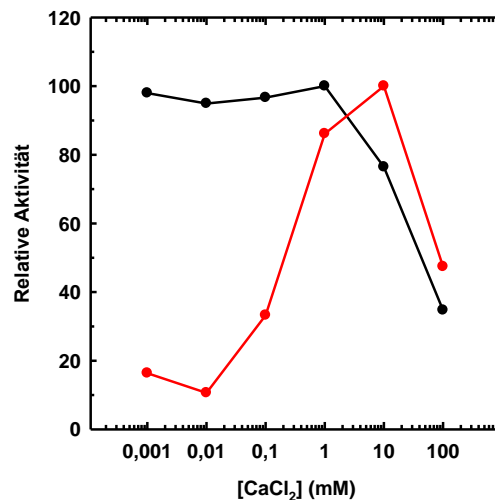


Abbildung 4.7: PLD-Aktivität gegenüber Plasmamembran-Isolaten als Funktion der CaCl_2 -Konzentration.

Intrinsische PLD-Aktivität (schwarz) und Aktivität extern zugesetzter PLD (160 pM, rot). Messansatz: 1 mM Phospholipide, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

4.2.5 Einfluss von Phasentrennung innerhalb neutraler Membranen auf die PLD-Aktivität

Zur Klärung der Frage, ob das Auftreten unterschiedlicher Lipidphasen innerhalb neutraler Membranen PLD beeinflusst, wurde die Aktivität gegenüber ungeladenen, an modellhaften *lipid raft*-Mischungen (Davis *et al.*, 2009) orientierten SUVs getestet.

Ein Phospholipid mit niedrigem Schmelzpunkt (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin - DOPC), eines mit hohem Schmelzpunkt (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin - DPPC) sowie Cholesterol wurden verwendet, um SUV-Präparationen herzustellen. In Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis der einzelnen Komponenten sollten diese SUVs Membranen im flüssig-geordneten Zustand (*liquid ordered*), im flüssig-ungeordneten Zustand (*liquid disordered*) sowie im Zustand der Koexistenz beider Phasen repräsentieren (Veatch und Keller, 2005).

Es zeigte sich, dass SUVs, die durch das Nebeneinander geordneter und ungeordneter Phasen geprägt waren (DOPC/DPPC/Chol, 40:40:20), keine signifikante Steigerung der PLD-Aktivität im Vergleich zu den SUVs im ungeordneten (DOPC/DPPC, 85:15) wie im geordneten (DOPC/DPPC/Chol, 3:62:35) Zustand hervorriefen (Abb. 4.8). Damit wurde ein klarer Unterschied zum Aktivierungsmechanismus der PLA₂ aus Schlangengift deutlich, welche spezifisch an Domänengrenzen sowie asymmetrischen oder defekten Regionen zwitterionischer Membranen angreift (Burack *et al.*, 1997). Auch bei Untersuchungen an Cholesterol-Oxidase aus *Streptomyces* sp. wurde die Steigerung der Bindungsaffinität gegenüber neutralen Membranen festgestellt, sofern diese sich in einem spezifischen Bereich der Phasenkoexistenz von *liquid ordered* und *liquid disordered* befanden (Ahn und Sampson, 2004).

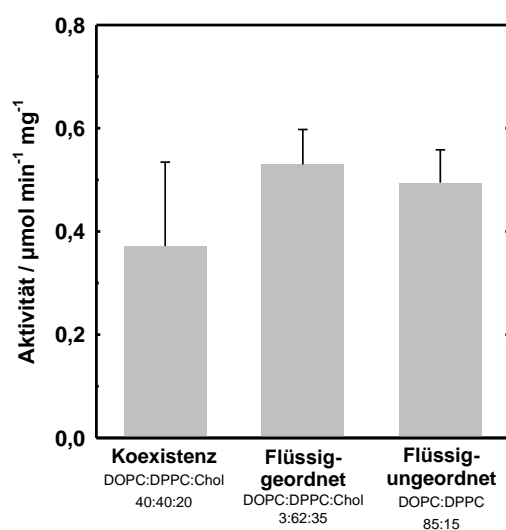


Abbildung 4.8: PLD-Aktivität gegenüber ungeladenen Modellmembranen. PLD-Aktivität gegenüber DOPC/DPPC/Chol- (40:40:20), DOPC/DPPC/Chol- (3:62:35) und DOPC/DPPC- (85:15) SUVs. Messansatz: 1 mM Phospholipide, 17 pM PLD, 10 mM CaCl₂, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

4.2.6 Aktivität gegenüber POPC/1,3-PC-Modellmembranen

Da es für Protein-Membran-Bindungsstudien teilweise notwendig ist, die PLD-Aktivität zu unterbinden (siehe 4.3), sollten Experimente unter Verwendung von Phospholipiden mit hemmender Wirkung auf PLD durchgeführt werden. Dazu konnte auf Ergebnisse der Studien von Haftendorn *et al.* (2000) zurückgegriffen werden. Diese erbrachten den Nachweis, dass synthetisches 1,3-Diacyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin (1,3diC_xPC) Substratanaloga für PLD darstellt und als Inhibitor verwendet werden kann. Im Rahmen der damaligen Arbeit wurde 1,3diC_xPC mit Kettenlängen von 8 bis 18 Kohlenstoffatomen hergestellt, auf welche in der vorliegenden Arbeit zurückgegriffen werden konnte.

Zunächst wurde der inhibitorische Einfluss der 1,3diC_xPC in Abhängigkeit von der Kohlenstoff-Kettenlänge untersucht (Abb. 4.9A). Dabei wurde die PLD-Aktivität gegenüber POPC/1,3diC_xPC(95:5)-SUVs mit Kettenlängen von C₈ bis C₁₈ im Vergleich zur Aktivität gegenüber reinen POPC-SUVs bestimmt. Es zeigte sich, dass 1,3-Didecanoyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin (1,3diC₁₀PC) und 1,3-Dimyristoyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin (1,3diC₁₄PC) die stärksten Reduktionen der PLD-Aktivität (13,2 bzw. 28,4 % der Aktivität gegenüber reinen POPC-SUVs) verursachten. Die geringste Hemmung bewirkte 1,3-Dilauroyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin (1,3diC₁₂PC) mit einer Reduzierung auf 78,0 %. Die Bindungsstudien (siehe 4.3.4) wurden mit 1,3diC₁₀PC durchgeführt, da dieses 1,3-PC die stärkste Inhibitorwirkung zeigte.

Die Messung der Aktivität in Abhängigkeit vom molaren 1,3diC₁₀PC-Anteil (Abb. 4.9B) ergab, dass mit Erhöhung der Inhibitorkonzentration in den POPC-SUVs die Restaktivität der PLD drastisch abnahm. Bei einem Anteil 10 mol% 1,3diC₁₀PC sank die Aktivität auf 8 % der Aktivität gegenüber reinen POPC-SUVs, bei 20 mol% 1,3diC₁₀PC auf 3 %. Bei 50 mol% 1,3diC₁₀PC war keine Aktivität mehr festzustellen. Abbildung 4.9C verdeutlicht, dass diese Hemmung der PLD-Aktivität keinen Einfluss auf das Ca²⁺-Erfordernis ausübt. In Untersuchungen mit 1,3diC₁₂PC konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibierung der PLD reversibler Natur ist (Haftendorn, 1997).

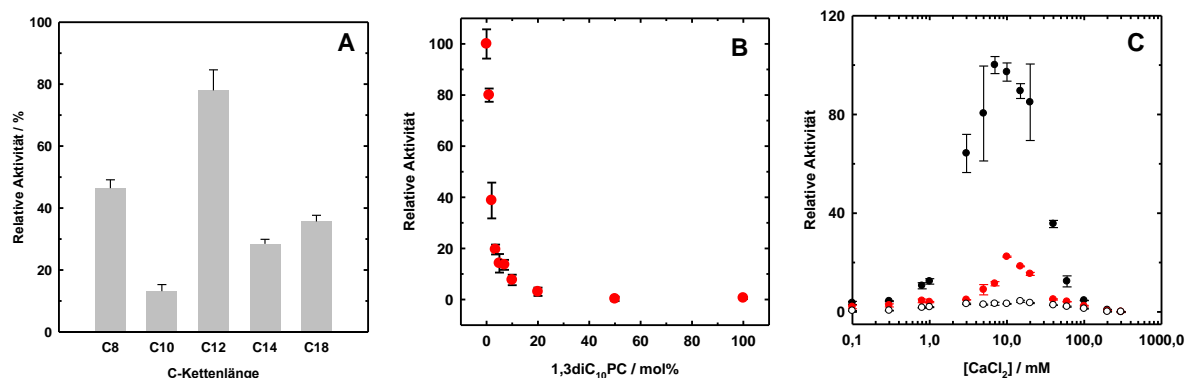


Abbildung 4.9: Aktivität der PLD gegenüber 1,3diC_xPC-haltigen POPC-SUVs.

A: PLD-Aktivität gegenüber POPC/1,3diC_xPC-SUVs (95:5) in Abhängigkeit von der Kohlenstoff-Kettenlänge des 1,3diC_xPCs. Die Werte sind bezogen auf die Aktivität gegenüber reinen POPC-SUVs (100 % Aktivität). **B:** PLD-Aktivität gegenüber POPC/1,3diC₁₀PC-SUVs in Abhängigkeit von der 1,3diC₁₀PC-Konzentration. **C:** PLD-Aktivität gegenüber POPC-SUVs (schwarz – gefüllte Kreise), POPC/1,3diC₁₀PC(19:1)-SUVs (rot) und POPC/1,3diC₁₀PC(9:1)-SUVs (schwarz – offene Kreise) in Abhängigkeit von der CaCl₂-Konzentration.

Messansatz: 1 mM Phospholipide, 17 pM PLD, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

4.3 Phospholipid-Bindungsstudien mit PLD

Die Regulation peripherer Proteine zielt in vielen Fällen auf die Modulation der Membranbindungsaffinität ab (Buckland und Wilton, 2000). Daher ist die quantitative Bestimmung der Membranbindung wesentlich für das Verständnis von Funktion und Kontrolle der PLD. Bei Bindungsstudien mit PLD muss (wie bei anderen lipolytischen Enzymen) besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, dass diese die Membran während der Messung ab- bzw. umbauen. Zur quantitativen Bestimmung der Membranbindung waren daher experimentelle Ansätze gefordert, bei welchen das Enzym keine katalytische Aktivität entfalten konnte oder bei welchen aussagefähige Messergebnisse trotz parallel stattfindender Hydrolyseaktivität zu ermitteln waren.

4.3.1 Inaktive Varianten der PLD

Zunächst wurde der Einsatz inaktiver Varianten der PLD geprüft. Dank innerhalb der Arbeitsgruppe durch Lerchner (2005) bereits ausgeführte Mutationsstudien an PLD konnte auf *E. coli*-Stämme zurückgegriffen werden, welche inaktive Enzymvarianten exprimierten. Es wurden zwei Varianten mit Punktmutationen im ersten HKD-Motiv ausgewählt. Bei der Enzymvariante H333D ist ein Histidin durch Aspartat substituiert, während bei der Enzymvariante D340E ein Aspartat gegen ein Glutamat ausgetauscht wurde. Nach Expression, Reinigung (siehe 4.1.2) und Inaktivitätskontrolle der Proteine erfolgte die Überprüfung der korrekten Faltung mittels Circular dichroismus- und Fluoreszenzspektroskopie. In Abbildung 4.10A sind die Fern-UV-CD-Spektren (190-240 nm) der beiden Enzymvarianten im Vergleich zur Wildtyp-PLD dargestellt. Die Spektren stimmten nahezu vollständig überein. Daraus kann gefolgert werden, dass die Sekundärstruktur der Proteine infolge der Mutation nicht verändert wurde.

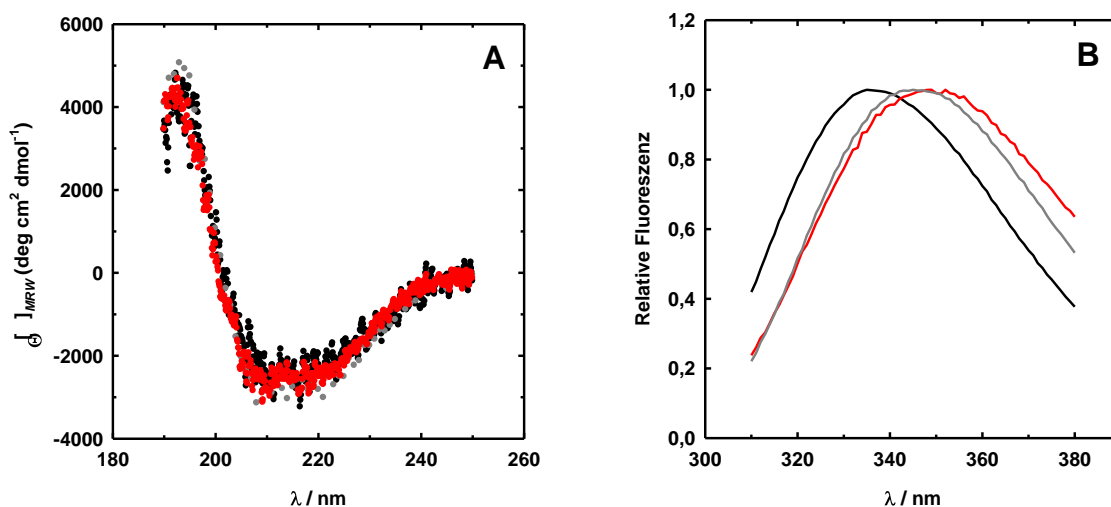


Abbildung 4.10: Spektroskopische Charakterisierung der inaktiven PLD-Varianten im Vergleich mit Wildtyp-PLD.

Wildtyp-PLD (schwarz), H333D-Variante (grau), D340E-Variante (rot). **A:** Fern-UV-CD-Spektren (10 μ M PLD). **B:** Fluoreszenzemissionsspektren (460 nM PLD). Messansatz: 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

Der Vergleich der drei entsprechenden Fluoreszenzspektren (310-380 nm) dagegen offenbarte Abweichungen der Emissionswellenlängenmaxima (Abb. 4.10B). Das Wellenlängenmaximum des Wildtyps lag bei 335 nm, das der Enzymvariante H333D bei 349 nm und das der Enzymvariante D340E bei 345 nm. Diese Verschiebung der Wellenlängenmaxima indiziert die Abnahme der Hydrophobizität der Umgebung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin – und damit Veränderungen in der Tertiärstruktur der inaktiven Varianten.

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Protein-Lipid-Bindungsstudien auf die Wildtyp-PLD gewährleisten zu können, ist die strukturelle Gleichheit der Enzymvarianten jedoch eine entscheidende Voraussetzung. Daher wurde von der Verwendung der Proteine H333D und D340E für die Untersuchungen abgesehen.

4.3.2 CD-Spektroskopie

PLD-Aktivität kann nur nach erfolgter Phospholipid-Bindung auftreten, wobei die Bindung an SUVs möglicherweise Modifizierungen der Sekundärstruktur induzieren kann. Daher wurde der Ansatz verfolgt, mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie strukturelle Änderungen der PLD als quantitatives Maß für die Membranbindung zu detektieren. Konformationsänderungen als Folge von Membranbindung wurden beispielsweise bei α -Lactoglobulin (Zhang und Keiderling, 2006), bei der Pleckstrin-homologen Domäne der Proteinkinase B (Milburn *et al.*, 2003), bei der CTP:PC-Cytidyltransferase (Taneva *et al.*, 2003) und bei der löslichen Cytochrom-b5 Häm-Bindungsdomäne (Basova *et al.*, 2008) beobachtet.

Zur Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren der PLD im inaktiven Zustand wurden $8,7 \mu\text{M}$ PLD in Pipes-Puffer (pH 7,0) mit 10 mM CaCl_2 eingesetzt. Für die Messung der aktivierten PLD wurden SUVs aus Soja-PC hinzugefügt. Wie Abb. 4.11 zeigt, wiesen beide Spektren große Übereinstimmungen auf. Dies deutet darauf hin, dass die Sekundärstruktur der PLD durch die Aktivierung nicht beeinflusst wurde (zumindest nicht innerhalb der Grenzen der Auflösung).

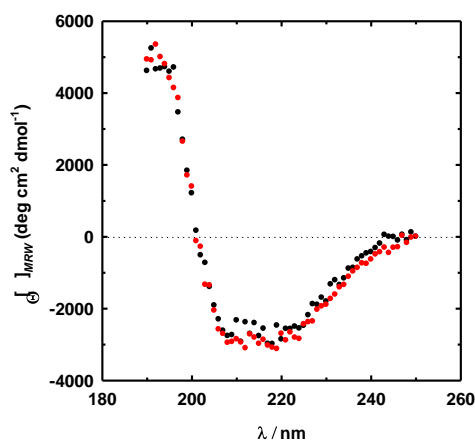


Abbildung 4.11: Einfluss der Aktivität auf die Sekundärstruktur von PLD. Fern-UV-CD-Spektren der PLD in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart von 1 mM PC-SUVs (rot). Messansatz: $10 \mu\text{M}$ PLD, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C .

4.3.3 Fluoreszenzlöschung

Die Wechselwirkung zwischen Phospholipiden und Proteinen kann in geeigneten Experimenten auch mittels Löschung (*quenching*) der Tryptophanfluoreszenz detektiert werden.

4.3.3.1 Tryptophanfluoreszenz-Quenching

Das Fluoreszenzsignal der aromatischen Aminosäure Tryptophan wird von der Hydrophobizität seiner Umgebung beeinflusst. Je unpolarer das Umfeld der Fluorophore, desto stärker in den blauen Bereich verschoben ist das Emissionsspektrum, je polarer die Umgebung, desto ausgeprägter ist die Rotverschiebung.

Die genauen Positionen der 15 Tryptophanreste der PLD innerhalb des Proteins sind aufgrund der fehlenden dreidimensionalen Struktur noch nicht geklärt. Es ist jedoch denkbar, dass einzelne lösungsmittlexponierte Tryptophanreste als Folge einer Membranbindung mit der Lipidumgebung in Wechselwirkung treten und deren Fluoreszenzemissionsspektren einer Blauverschiebung unterliegen. Das gemessene Summenspektrum aller Tryptophanreste sollte dadurch zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben werden. Durch Aufnahme von Fluoreszenzspektren bei Bedingungen, welche hinsichtlich der Bindungsaffinität des Proteins zur Membran variieren, sollte es daher möglich sein, auftretende Unterschiede quantitativ zu detektieren. Bei Studien an PLA₂ aus Schlangengift (Liu und Chong, 1999; Gadd und Biltonen, 2000), an der phosphatidylinositol-abhängigen Phospholipase C (PI-PLC) aus *Bacillus thuringiensis* (Guo *et al.*, 2008) und an der PET-Domäne des Prickle-Proteins (Sweede *et al.*, 2008) wurden derartige Veränderungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz genutzt, um die Assoziation der Proteine mit unterschiedlichen Membranen zu charakterisieren.

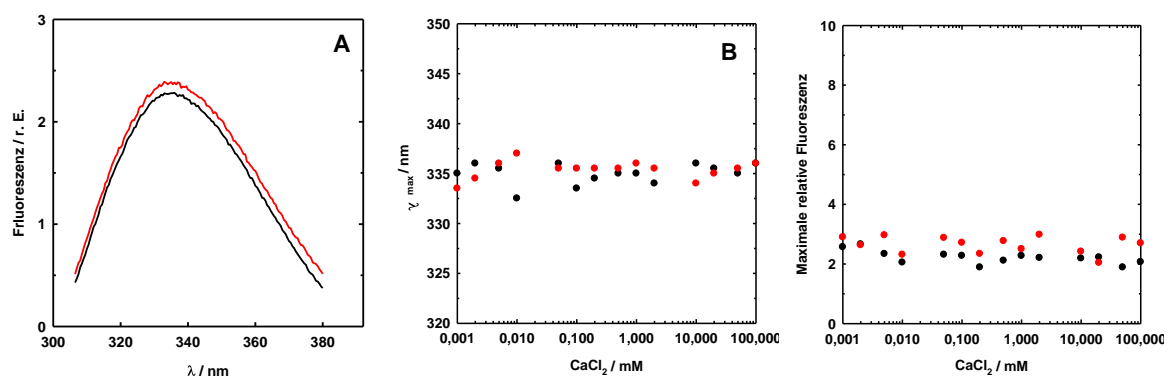


Abbildung 4.12: Einfluss der Membranbindung auf die Tryptophanfluoreszenz.

Fluoreszenzemission von PLD in Gegenwart von PC-SUVs (schwarz) und PC/PE/PI/PIP₂(36:52:10:2)-SUVs (rot). **A:** Fluoreszenzemissionsspektren bei 10 mM CaCl₂. **B:** Auftragung der maximalen Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der CaCl₂-Konzentration. **C:** Auftragung der maximalen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der CaCl₂-Konzentration.

Messansatz: 1 mM Phospholipide, 460 nM PLD, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

In Abbildung 4.12A sind beispielhaft Fluoreszenzemissionsspektren der PLD in Gegenwart von PC- bzw. PC/PE/PI/PIP₂-SUVs bei 10 mM CaCl₂ dargestellt. Die Auswertung der bei unterschiedlichen CaCl₂-Konzentrationen aufgenommenen Spektren (Abb. 4.12B und C) offenbarte keine Beeinflussung der intrinsischen PLD-Fluoreszenz durch die Anwesenheit der unterschiedlichen Phospholipide sowie die unterschiedlichen CaCl₂-Konzentrationen, weder im Hinblick auf der maximalen Emissionswellenlänge λ_{\max} (Abb. 4.12B), noch bezüglich der maximalen Fluoreszenzintensität (Abb. 4.12C). Die Grenzflächenbindung der PLD ist aus diesen Daten nicht ableitbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Umgebung der Tryptophanreste durch die Membranbindung nicht verändert wurde. Dies könnte darin begründet sein, dass PLD keine oberflächenexponierten Tryptophanreste besitzt, wie auch Stumpe *et al.* (2007) aus ihren Messungen schlussfolgerten. Auszuschließen ist dennoch nicht, dass Tryptophanreste, welche bei PLD in Lösung innerhalb des hydrophoben Proteinkerns abgeschirmt sind, bei Kontakt mit der Grenzfläche unmittelbar in die hydrophobe Lipidumgebung eindringen und infolgedessen die spektralen Eigenschaften der Tryptophanreste unverändert blieben. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass PLD 15 Tryptophanreste besitzt und es daher möglich ist, dass die Signale einzelner Reste nur geringen Einfluss auf die Gesamtfluoreszenz haben.

4.3.3.2 Acrylamid-Quenching

Die Fluoreszenzlöschung mittels extern zugesetzter Löschesubstanzen (*quencher*) wie Acrylamid wird genutzt, um zu bestimmen, wie stark lösungsmittlexponiert die Tryptophanreste von Proteinen sind (Pande *et al.*, 2006; Thuduppathy *et al.*, 2006; Raja *et al.*, 2007). Besäße PLD dem Medium zugewandte Tryptophanreste (siehe dazu 4.3.3.1), so sollte es möglich sein, die Intensität der Tryptophanfluoreszenz durch Zugabe von Acrylamid zu vermindern. Infolge der Membranbindung der PLD könnte dieser Effekt dagegen verloren gehen, weil die Tryptophanreste möglicherweise so in der Lipidschicht verborgen sind, dass die Zugänglichkeit für das relativ große Acrylamidmolekül nicht mehr gegeben ist und das Fluoreszenzsignal durch den *quencher* nicht mehr beeinflusst werden kann.

Abbildung 4.13 stellt die Ergebnisse eines derartigen Experiments dar. Es wurden Fluoreszenzemissionsspektren in Gegenwart von 1 μ M PC-SUVs und 10 mM CaCl₂ aufgenommen. Die Auftragung erfolgte entsprechend der STERN-VOLMER-Gleichung (siehe 3.3.3). Beide Kurven zeigten eine übereinstimmende, lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von der Acrylamid-Konzentration. Auch dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Tryptophanreste der PLD sich – unabhängig von der CaCl₂-Konzentration – im Inneren des Proteins befinden.

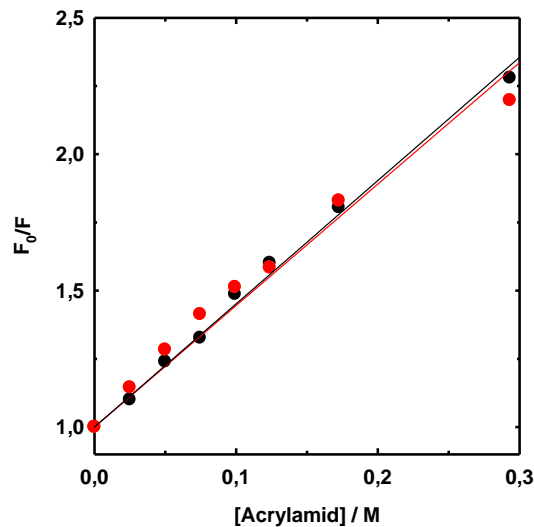


Abbildung 4.13: PLD-Fluoreszenz-Löschung durch Acrylamid bei Membranbindung. Auftragung nach Stern-Volmer. Messung in Gegenwart von PC-SUVs bei 1 μM (schwarz) und 10 mM CaCl_2 (rot). Messansatz: 1 mM Phospholipide, 460 μM PLD, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

4.3.4 LANGMUIR-Filmwaagemessungen

Die LANGMUIR-Filmwaagetechnik (siehe 3.3.5) wurde eingesetzt, um den Einfluss von POPA auf die Membranbindung der PLD zu untersuchen. Soll der Anstieg des Oberflächendrucks dabei als Maß für die Bindung verwendet werden, ergibt sich bei der Arbeit mit Phospholipasen die Schwierigkeit, dass das eigentliche Bindungssignal durch die entgegengesetzt wirkenden Druckveränderungen infolge der Phospholipid-Hydrolyse überlagert werden kann (Quarles und Dawson, 1969). Daher wurde in den Filmwaagemessungen 1,3-Dimyristoyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin (1,3-diC₁₄-PC) als Substratanalogon verwendet. Dieses künstliche Phospholipid trägt die Fettsäuren in *sn*1- und *sn*3-Position und hat ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin. Es kann von PLD jedoch nicht gespalten werden und übt eine hemmende Wirkung auf das Enzym aus (vgl. Abschnitt 4.2.6).

Die Injektion von PLD in die Subphase des LANGMUIR-Trogs führte zu einem Anstieg des Oberflächendrucks der 1,3diC₁₄PC-Monoschicht, welcher proportional zur PLD-Konzentration der Subphase war (Abb. 4.14A). Aus diesem Grund erschien diese Methode geeignet für die Messung der PLD-Bindung an Phospholipidoberflächen mit unterschiedlichen Gehalten an POPA.

Abbildung 4.14B zeigt die Geschwindigkeit des Oberflächendruckanstiegs in der 1,3-diC₁₄-PC-Monoschicht in Abhängigkeit von der POPA-Konzentration im Lipidfilm. Mit ansteigendem Anteil an POPA wurde die Geschwindigkeit des Oberflächendruckanstiegs bis auf das 30fache erhöht. Die Gegenwart von POPA bewirkte demnach eine bemerkenswerte Steigerung der Phospholipid-Enzym-Interaktion. Bindungsstudien an PLD aus *Streptomyces chromofuscus* ergaben eine ähnliche Präferenz der Assoziation mit PA-haltigen Oberflächen (Stieglitz *et al.*, 1999).

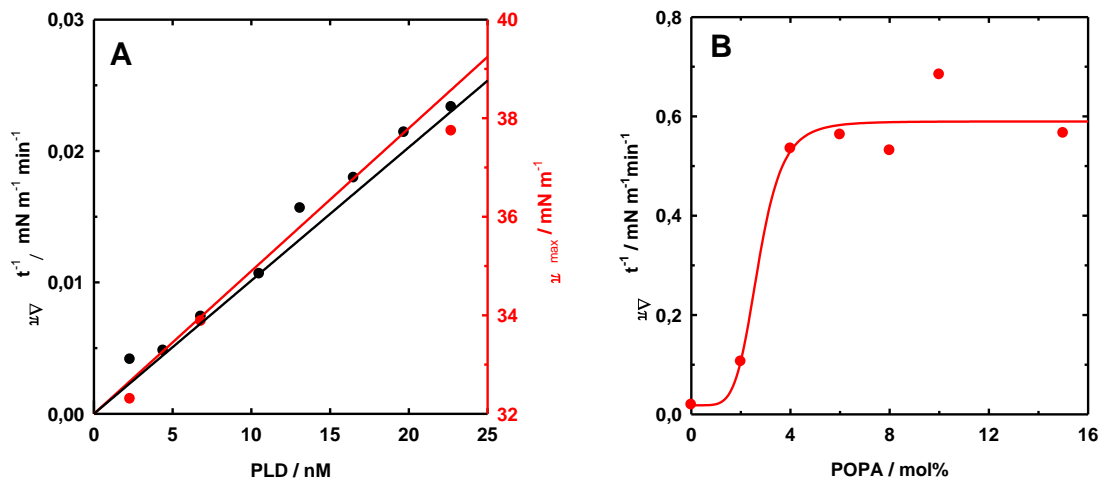


Abbildung 4.14: LANGMUIR-Filmwaagemessungen mit nicht-hydrolysierbaren Monoschichten. **A:** Abhängigkeit des Oberflächenendrucks in 1,3diC₁₄PC-Monoschichten von der PLD-Konzentration in der Subphase. Auftragung der Geschwindigkeit des Oberflächendruckanstiegs (schwarz) und des maximalen Oberflächenendrucks (rot). **B:** Bindung der PLD an 1,3diC₁₄-PC/POPA-Monoschichten als Funktion der POPA-Konzentration nach Injektion von 23 nM PLD. Messansatz: Anfangsoberflächenendruck 25 mN m⁻¹, 10 mM CaCl₂, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

Interessanterweise schwächte die Gegenwart von Ca²⁺ diese Interaktion ab, während bei PLD aus *Streptomyces chromofuscus* die zunächst schwache Bindung an PC-Grenzflächen durch Ba²⁺ gesteigert werden konnte. Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen (*surface plasmon resonance*, SPR) an PLD aus *Streptomyces* sp. dagegen zeigten, dass diese PLD eine besondere Präferenz gegenüber neutralen POPC-Membranen besitzt (Uesugi und Hatanaka, 2009).

4.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung von Phospholipid-Grenzflächen

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membranen prägen die Wechselwirkung zwischen PLD und Substrat ebenso wie die Charakteristika des Enzyms selbst (Hirche und Ulbrich-Hofmann, 1999; Wang, 2001). Besonders die räumliche Organisation von Lipidaggregaten ist als Schlüssel für das Verständnis zellulärer Prozesse in den Fokus gerückt (siehe 2.1.2). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit SUVs hinsichtlich des Auftretens von Phasentrennungen untersucht.

4.4.1 BREWSTER-Winkel-Mikroskopie

Die BAM-Technik kann zur Visualisierung dünner Filme auf Grenzflächen eingesetzt werden. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, ohne zusätzliche Hilfsmittel (wie z.B. markierte Lipide in der Fluoreszenzmikroskopie) laterale Asymmetrien innerhalb von Phospholipidmonoschichten zu detektieren (DeWolf *et al.*, 1999).

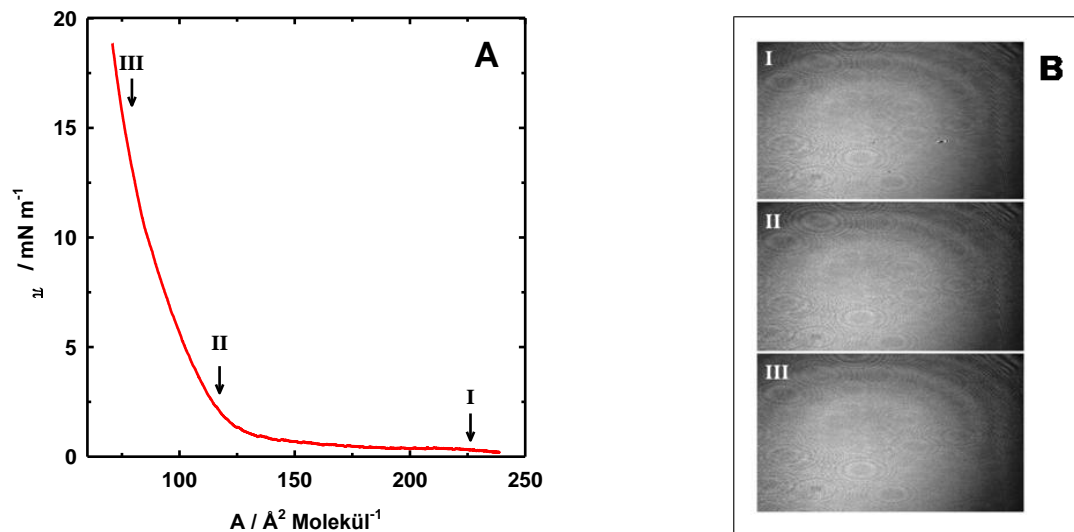


Abbildung 4.15: π/A -Isotherme und Brewster-Winkel-Mikroskopie.

A: Abhängigkeit des Oberflächenendrucks einer POPC/POPA-Monoschicht (80:20) von der Gesamtfläche. **B:** BAM-Aufnahmen bei Oberflächenendrücken von 1 mN m^{-1} (I), 3 mN m^{-1} (II) und 16 mN m^{-1} (III).

Messansatz: Monoschicht - POPC/POPA (80:20); Subphase - 10 mM CaCl_2 , 10 mM Na-Pipes , pH 7,0 bei 25°C .

Bei geringem Oberflächendruck befinden sich Phospholipide an der Wasser-Luft-Grenzfläche in einem zweidimensionalen, gasanalogen Zustand. Dabei liegen die Kohlenwasserstoffketten aufgrund des hohen Platzangebots in zufälliger Anordnung auf der Wasseroberfläche. Im Prozess der Kompression richten sich die Ketten auf. Es wird ein Plateau erreicht, bei dem eine Mischphase aus gasanalogem und flüssig-expandiertem (LE) Film vorherrscht. Bei weiterer Kompression wandelt sich der Film von einer rein flüssig-expandierten Phase über einen Übergangsbereich (LE/LC) in die flüssig-kondensierte Phase (LC) um. In der flüssig-kondensierten Phase sind die Kopfgruppen und die Ketten in dichter Packung zusammengelagert. Dabei strecken sich die Ketten und stehen mit einem Neigungswinkel zur Oberfläche, der bei unterschiedlichen flüssig-kondensierten Phasen variieren kann (Kerth, 2003). Diesen Umstand macht man sich in der Brewster-Winkel-Mikroskopie zu nutze. Polarisiertes Licht wird dabei unter dem sogenannten Brewster-Winkel auf die Luft-Lipid-Grenzfläche gestrahlt (Henon und Meunier, 1991). Von der Anordnung der Phospholipide an der Wasseroberfläche hängt es ab, in welcher Weise das Licht reflektiert wird (He *et al.*, 2004). Dieses kann über eine Kamera in eine Bildinformation umgewandelt werden. Bei ausreichender Phasengröße kann diese Technik dazu verwendet werden, das Auftreten von räumlich abgegrenzten Lipidaggregationen (Domänen) zu visualisieren (DeWolf *et al.*, 1999).

Mit einem Langmuir-Trog und einer Wilhelmy-Waage wurde die Oberflächendruck(π)/Flächen(A)-Isotherme einer POPC/POPA-Monoschicht (80:20) aufgezeichnet, welche die charakteristischen Phasenübergänge aufwies (Abb. 4.15A). Parallel dazu wurden BAM-Bilder (Abb. 4.15B) bei ansteigenden Oberflächenendrücken festgehalten. Eine Bildung von Lipidaggregaten ist auf den Bildern nicht erkennbar. Dies könnte zum einen darauf hinweisen, dass eine Phasentrennung nicht auftrat, zum anderen aber auch darin begründet sein, dass die Größe der Domänen unterhalb des Auflösungsvermögens des BAM lag.

4.4.2 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die Dynamische Differenzkalorimetrie wurde eingesetzt, um das thermotrope Phasenverhalten von reinen POPC SUVs im Vergleich zu POPC/POPA, POPC/DOPA und POPC/POPG (1:1) SUVs zwischen 7 und 70°C zu bestimmen. In 10 mM Pipes, pH 7,0 wurden die Phasenübergänge der einzelnen Lipidpräparationen mit und ohne 10 mM CaCl₂ gemessen.

In Abwesenheit von Ca²⁺ wurden im betrachteten Temperaturbereich keine Übergangspeaks detektiert (Abb. 4.16A). Dies weist darauf hin, dass die einzelnen Lipidkomponenten homogen verteilt waren und die Phasenübergangstemperaturen unterhalb des Detektionslimits des DSC-Gerätes von 7°C lagen. Folglich befanden sich die Lipide im untersuchten Temperaturbereich (7-70°C) im fluiden Zustand. Die Temperatur des gel-flüssig-Übergangs betrug weniger als 7°C, wahrscheinlich lag sie nahe der T_m von POPC (-3°C) (Curatolo *et al.*, 1985).

Die Zugabe von 10 mM CaCl₂ bewirkte das Erscheinen von Umwandlungspeaks in allen SUV-Präparationen. Da diese Übergänge nur in Gegenwart von Ca²⁺ auftraten und T_m in Abhängigkeit von der anionischen Komponente variierte, können sie als Phasenübergänge der Komplexe aus anionischen Phospholipiden mit Calciumionen (AP/Ca²⁺-Komplexe) identifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die SUVs unterhalb der T_m der AP/Ca²⁺-Komplexe durch eine nicht-ideale Vermischung der einzelnen Phospholipidkomponenten geprägt waren. Offenbar induzierte Ca²⁺ die Segregation der anionischen Lipide in Form von Mikrodomänen, innerhalb derer die AP/Ca²⁺-Komplexe angereichert wurden. Zum Verständnis der treibenden Kräfte hinter diesem Separationsprozess kann das Konzept des *hydrophobic matching* (Mouritsen und Bloom, 1984) herangezogen werden. Eine Studie, in der die strukturellen Eigenschaften von Komplexen aus 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycerol-3-phosphat (DMPA) mit Ca²⁺ analysiert wurden, erbrachte den Nachweis, dass die Bindung zwischen DMPA und Ca²⁺ im Verhältnis 1:1 erfolgt (Laroche *et al.*, 1991). Das zweifach ionisierbare DMPA-Molekül trug bei neutralem pH-Wert eine negative Ladung. Die Bindung des Ca²⁺ ersetzte das zweite Proton und führte zur Bildung neutraler PA/Ca²⁺-Komplexe. Innerhalb der DMPA/Ca²⁺-Domänen koordinierte ein Calciumion jeweils vier Lipidmoleküle. Es ist anzunehmen, dass die laterale Organisation der AP/Ca²⁺-Mikrodomänen in der vorliegenden Arbeit in ähnlicher Weise strukturiert war. Wahrscheinlich lagerten sich die AP/Ca²⁺-Komplexe zusammen, um Spannungen mit den umgebenden POPC-Molekülen auszuweichen, deren Kohlenstoffketten größere Freiheitsgrade aufwiesen.

Abbildung 4.16B stellt die DSC-Thermogramme von POPC/POPE-SUVs dar. Unabhängig vom Vorhandensein von CaCl₂ war zwischen 10 und 20°C ein Peak zu beobachten. Dieser kann auf den Phasenübergang der POPE-Moleküle zurückgeführt werden. Eine Ca²⁺-induzierte Komplexbildung wie in Gegenwart anionischer Lipide (Abb. 4.16A) wurde im neutralen POPC/POPE-System nicht beobachtet. Die homogene, Ca²⁺-unabhängige Verteilung von PC und PG zeigten auch DSC- und ESR-Untersuchungen von Ohki *et al.* (1989).

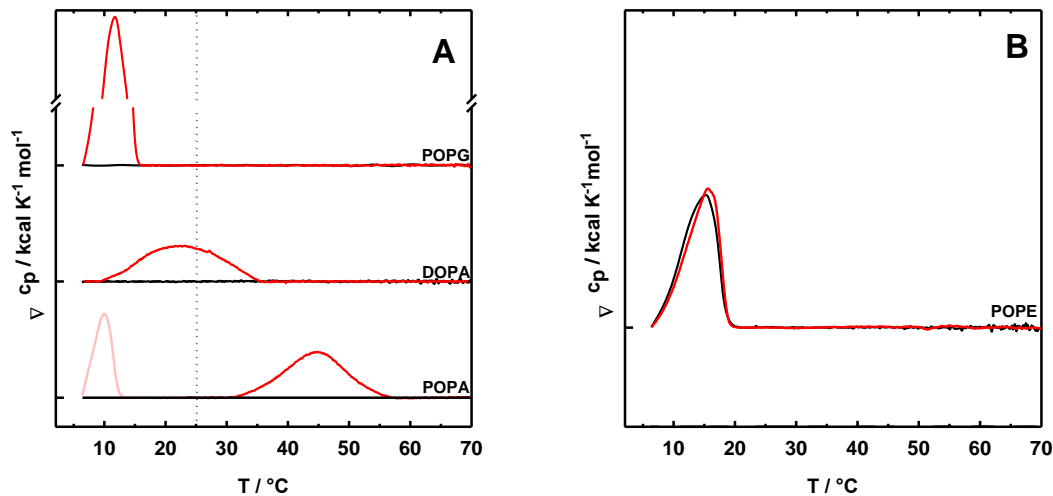


Abbildung 4.16: Einfluss von CaCl_2 auf das Phasenverhalten von POPC/POPA-, POPC/DOPA-, POPC/POPG- und POPC/POPE-SUVs.

Die Messungen wurden in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart (rot) von 10 mM CaCl_2 durchgeführt. **A:** DSC-Thermogramme der Messungen mit POPC/POPA-, POPC/DOPA-, POPC/POPG(1:1)-SUVs. Die gepunktete Linie markiert die Temperatur, bei welcher die Aktivitätsmessungen in Abb. 4.2 durchgeführt wurden. **B:** DSC-Thermogramme der Messungen mit POPC/POPE(1:1)-SUVs.

Messansatz: 2,5 mM Phospholipide, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0.

Weil ein Phasenübergang ein statistisches Phänomen darstellt, ist für dessen Erscheinen im Thermogramm eine Mindestmenge separierter Moleküle notwendig (Ohki *et al.*, 1989). Die T_m -Werte der Aggregate lagen oberhalb von 7°C , deshalb konnten deren Phasenübergänge in den DSC-Thermogrammen verfolgt werden. Das Auftreten lateraler Phasentrennung in Gegenwart von Ca^{2+} wurde für andere PC/PA-Systeme bereits beschrieben (Graham *et al.*, 1985; Garidel und Blume, 2000). Dass POPA die Ausbildung von Domänen im POPC/POPA induziert, legen auch die Ergebnisse von Shoemaker und Vanderlick (Shoemaker und Vanderlick, 2003) nahe. Untersuchungen zur Ca^{2+} -Bindung an POPC/POPG-Vesikel führten zu dem Ergebnis, dass auch diese Wechselwirkungen elektrostatischer Natur sind (MacDonald und Seelig, 1987). Dabei wurde für die entstehenden POPG- Ca^{2+} -Komplexe eine einfach positive Ladung gefunden (Shoemaker und Vanderlick, 2003).

Die POPC-Moleküle lagen im erfassten Temperaturbereich im fluiden Phasenzustand vor. Eine Interaktion von POPC-Molekülen mit Ca^{2+} wurde jedoch auch in einer Studie mit reinen POPC-Vesikeln nachgewiesen (Altenbach und Seelig, 1984). Diese Wechselwirkung wurde als hochdynamischer Prozess beschrieben, bei dem die Verweildauer von Ca^{2+} an den Cholin-Kopfgruppen 10^{-5} s betrug. Die in Gegenwart von 10 mM CaCl_2 an der Membran gemessene Ca^{2+} -Konzentration lag bei 28 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{M POPC}$, wobei einem Ca^{2+} jeweils zwei Phospholipide zugeordnet wurden. Filmwaageuntersuchungen an DPPC-Monoschichten konnten belegen, dass eine derartige Stöchiometrie bei Oberflächendrücken, wie sie in Lipid-Doppelschichten vorherrschen (oberhalb von 25 mN m^{-1}), auftritt (Sovago *et al.*, 2007).

Aufschlussreich war, dass die T_m -Werte der Mikrodomänen in Abhängigkeit von der anionischen Komponente deutlich variierten (Abb. 4.16). Der Austausch einer gesättigten

Fettsäure (in POPA) durch eine ungesättigte (in DOPA) resultierte im Absenken der T_m um ca. 21°C. Die Modifizierung der Kopfgruppe von POPA zu POPG bewirkte sogar eine Reduzierung der T_m um ca. 32°C. Der starke Einfluss der Fettsäurezusammensetzung von PA auf die T_m wurde auch in einer Studie von Silvius (Silvius, 1990) dargestellt. Hier wurde Carbazol-markiertes, fluoreszierendes PC verwendet, um laterale Phasentrennung in Mischvesikeln aus PC und anionischen Phospholipiden zu detektieren.

Die Übergangstemperaturen sanken in der Reihenfolge POPA>DOPA>POPG mit T_m -Werten von 44, 23 und 12°C. Damit lässt sich eine interessante Parallele zu den Aktivitätsmaxima aus Abbildung 3 herstellen, welche in der gleichen Reihenfolge sanken. Bei 25°C – der Temperatur, bei welcher die Aktivitätstests durchgeführt wurden – sollten die Membranen der POPC/POPG SUVs demnach vollständig in der fluiden Phase vorliegen und die der POPC/DOPA-SUVs sich im Schmelzbereich der DOPA/ Ca^{2+} -Komplexe befinden. Nur die Membranen der POPC/POPA-SUVs sollten durch die Koexistenz gel-artiger POPA- Ca^{2+} -Komplexe und einer fluiden Phase geprägt sein. Der zweite Ca^{2+} -induzierte Peak in den POPC/POPA-SUVs (rosa, im Temperaturbereich 5-15 °C) ist wahrscheinlich der Umwandlung der POPC-reichen Phase zuzuordnen.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei den oben beschriebenen Peaks um die Phasenübergänge der AP/ Ca^{2+} -Komplexe handelte, ergibt sich aus Abbildung 4.17A. Darin sind die DSC-Thermogramme von POPC- und POPC/POPA-SUVs bei ansteigenden POPA-Stoffmengenprozenten dargestellt. Wie die Auftragung des Flächeninhalts der in Gegenwart von Ca^{2+} ermittelten Übergangspeaks (ΔH) als Funktion des POPA-Gehalts verdeutlicht, ist die Fläche unterhalb der den POPA/ Ca^{2+} -Peaks zugeordneten Kurve proportional zur POPA-Konzentration (Abb. 4.17B).

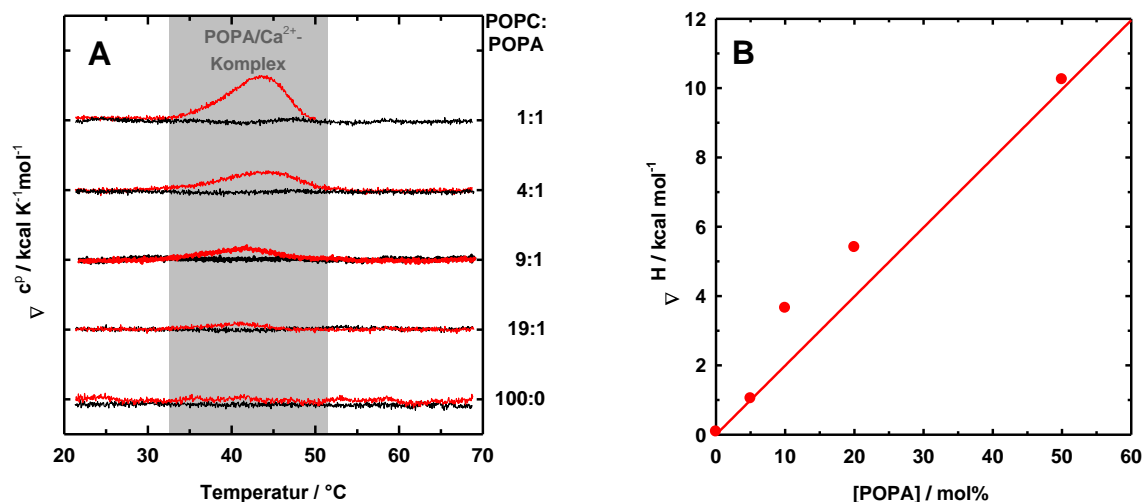


Abbildung 4.17: Einfluss des POPA-Gehalts auf das Phasenverhalten von POPC/POPA-SUVs in Abhängigkeit von der $CaCl_2$ -Konzentration.

Die Messungen wurden in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart (rot) von 10 mM $CaCl_2$ durchgeführt. **A:** DSC-Thermogramme der Messungen mit POPC/POPA(1:1)-SUVs. Grau unterlegt ist der Phasenübergang der POPA/ Ca^{2+} -Komplexe. **B:** Flächeninhalt des POPA/ Ca^{2+} -Peaks (ΔH) als Funktion der POPA-Konzentration.

Messansatz: 2,5 mM Phospholipide, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0.

PLD-Aktivität im Zusammenhang mit dem Phasenverhalten

Um die Phasenübergänge der POPC- und der POPC/POPA-SUVs im Zusammenhang mit der PLD-Aktivität betrachten zu können, wurde die Temperaturabhängigkeit der PLD-Aktivität gegenüber POPC- und POPA-SUVs bestimmt und mit den entsprechenden DSC-Thermogrammen in Beziehung gebracht (Abb. 4.18). In beiden Fällen wurden Kurven mit Aktivitätsmaxima ermittelt. Im POPC/POPA-System jedoch lag die Temperatur, bei welcher die Aktivität wieder abnahm, um 5°C niedriger als im POPC-System. Dabei ließ sich eine bemerkenswerte Analogie des Verlaufs der Aktivitätskurve mit dem thermischen Phasenverhalten der POPC/POPA-SUVs beobachten. Auch im Fall der humanen, sekretorischen PLA₂-IIA wurde eine besondere Affinität einer Phospholipase gegenüber lokalen Anreicherungen anionischer Lipide in Form von Domänen demonstriert (Leidy *et al.*, 2006). Diese Studie erbrachte den Nachweis, dass Phasendiagramme zur Voraussage der Enzymaktivität genutzt werden können.

Interessanterweise zeigten die Messdaten in Abbildung 4.18 im Temperaturbereich des Phasenübergangs, besonders zwischen 32,5 und 40°C, auffällig große Standardabweichungen. Diese weisen möglicherweise auf den hoch dynamischen Zustand hin, in welchem sich die Membranen in diesem Abschnitt auf der Temperaturskala befanden.

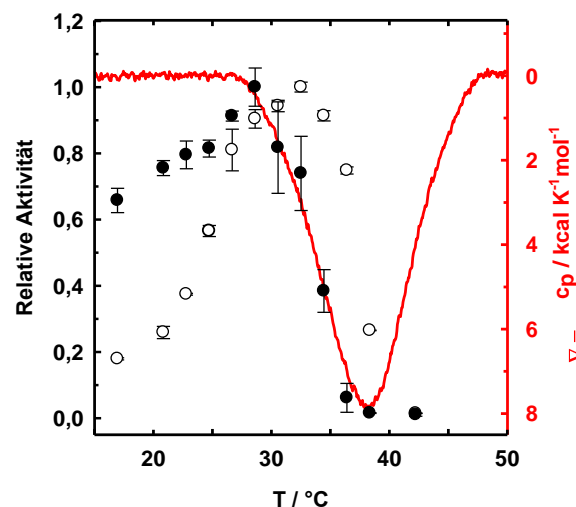


Abbildung 4.18: Einfluss der Temperatur auf die PLD-Aktivität.

Temperaturabhängigkeit der PLD-Aktivität gegenüber POPC- (offene Kreise) und POPC/POPA(85:15)-SUVs (gefüllte Kreise). Um den Phasenübergang des POPA/POPC-Systems zu verdeutlichen, wurde die entsprechende DSC-Kurve in rot unterlegt.

Messansätze: Aktivität - 1 mM Phospholipide, 17 pM PLD, 10 mM CaCl₂, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0; DSC: 2,5 mM Phospholipide, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0.

4.5 PLD-Aktivität an Monoschichten

Wie schon Abschnitt 4.3.4 verdeutlichte, erlaubt es die LANGMUIR-Filmwaagetchnik, die Eigenschaften von Lipid-Monoschichten als biomimetische Modellsysteme („halbe Membranen“) und deren Interaktion mit peripheren Proteinen an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu analysieren (Meister *et al.*, 2006). Dabei bietet die *monolayer*-Technik den Vorteil, dass über die Orientierung der Lipidmoleküle an der Grenzfläche relativ viel bekannt ist (Quarles und Dawson, 1969; Cornut *et al.*, 1996; Hind *et al.*, 2001). Neben der Zusammensetzung der Subphase (pH, Puffer, Ionenstärke) und der Phospholipidkomposition können auch die zweidimensionalen Eigenschaften der monomolekularen Lipidschichten (molekulare Packung der Lipide, Oberflächendruck, Fläche pro Lipidmolekül) kontrolliert, verändert und gemessen werden. Aus diesen Gründen ist die *monolayer*-Technik gut geeignet zur Untersuchung von enzymkatalysierten Grenzflächenreaktionen und damit zur Bestimmung der Enzymaktivität (He *et al.*, 2004).

4.5.1 Aktivität als Funktion der Ca^{2+} -Konzentration

Abbildung 4.19A zeigt Progresskurven des Oberflächendrucks von POPC-Monoschichten. Dafür wurde PLD bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen in einen runden Teflon-Trog mit konstanter Fläche injiziert und die zeitliche Entwicklung des Oberflächendrucks gemessen. In Gegenwart von 10 mM CaCl_2 nahm der Oberflächendruck unmittelbar nach Enzymzugabe rapide ab, ohne dass eine *Lag*phase zu beobachten war (Abb. 4.19A, rote Kurve). Die maximale Geschwindigkeit des Oberflächendruckabfalls betrug $-9,6 \text{ mN m}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Abb. 4.19B). Nach der Phase maximaler PLD-Aktivität folgte eine graduelle Verlangsamung des Oberflächendruckabfalls bis auf einen Minimalwert von $23,0 \text{ mN m}^{-1}$.

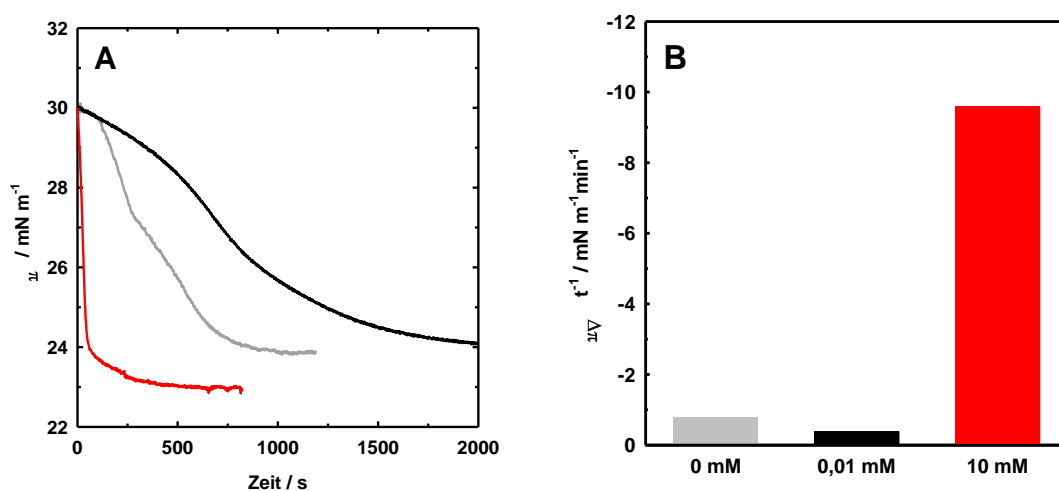


Abbildung 4.19: Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die Aktivität der PLD gegenüber Monoschichten. **A:** Progresskurven des Oberflächendrucks von POPC-Monoschichten nach PLD-Injektion (23nM). **B:** Aus den linearen Bereichen der Progresskurven abgeleitete maximale Geschwindigkeit des Oberflächendruckabfalls. Die Messungen erfolgten in Gegenwart von 0 mM (grau), 0,01 mM (schwarz) und 10 mM CaCl_2 (rot) in der Subphase eines runden Teflon-Trogs mit konstanter Fläche. Subphase: 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C.

Eine derartige enzyminduzierte Verminderung des Oberflächendrucks kann eindeutig als Hydrolyseaktivität der PLD interpretiert werden. Wahrscheinlich diffundierte das wasserlösliche Reaktionsprodukt Cholin in die Subphase, während das entstehende POPA an der Luft/Wasser-Grenzfläche verblieb. He *et al.* (2004) wiesen nach, dass sich die molekulare Fläche pro Lipidmolekül infolge des geringeren Raumanspruchs der PA-Kopfgruppe im Vergleich zu PC verringerte und damit (bei gleichbleibender Fläche) der Oberflächendruck sank. In ähnlicher Weise wurde die *monolayer*-Technik angewendet, um die Aktivität der Phospholipase C aus *Bacillus cereus* (Holopainen *et al.*, 2002) zu bestimmen und den Effekt von oberflächenaktiven Enzymen auf die Aktivität pankreatischer und mikrobieller Lipasen zu analysieren (Gargouri *et al.*, 1985).

Aus der in Gegenwart von 0,01 mM Ca²⁺ gemessenen Progresskurve kann eine zwar verminderte, aber dennoch deutliche Hydrolyseaktivität abgeleitet werden (Abb. 4.19A, schwarze Kurve). Auffällig war das Vorhandensein einer ausgeprägten *Lag*phase. Diese ging allmählich in eine kurze Phase schnelleren Oberflächendruckabfalls über, der aber mit 0,4 mN m⁻¹ min⁻¹ (Abb. 4.19B) ca. 24 Mal niedriger lag als der Wert bei 10 mM CaCl₂. Im Anschluss fiel der Druck langsam bis auf minimal 24,1 mN m⁻¹.

Von besonderem Interesse ist das Ergebnis der Messung, in welcher der Subphase kein CaCl₂ zugesetzt wurde. In diesem Fall verringerte sich der Oberflächendruck nach einer kurzen *Lag*phase relativ schnell. Die Maximalgeschwindigkeit des Oberflächendruckabfalls lag mit 0,8 mN m⁻¹ min⁻¹ ca. um das 12fache unter dem bei 10 mM CaCl₂ gemessenen Wert. Gegenüber dem Wert bei 0,01 mM CaCl₂ bedeutet dies jedoch eine Verdopplung. Ein ähnlicher Effekt wurde in einer älteren *monolayer*-Studie, welche ebenfalls an PLD aus *Brassica oleracea* var. *capitata* durchgeführt wurde, beschrieben (Quarles und Dawson, 1969). Hier wurden bei der Hydrolyse von radioaktiv markierten, monomolekularen Filmen aus Hefe-PC die höchsten Werte in Gegenwart von 0,2 mM CaCl₂ ermittelt. Entgegen den in Abb. 4.19 dargestellten Ergebnissen wurde im Ca²⁺-freien System in der damaligen Untersuchung keine Aktivität festgestellt.

Bei Filmwaagemessungen mit unterschiedlichen Phospholipasen wurde beobachtet, dass der Oberflächendruck nach Injektion des Proteins in die Subphase anstieg. Dieser Effekt wurde auf die Membranpenetration der Enzyme zurückgeführt, so z.B. bei PLA₂ aus Schlangengift (Zhai *et al.*, 2003), bei humaner cytosolischer PLA₂ (Lichtenbergova *et al.*, 1998; Bittova *et al.*, 1999), bei der C2-Domäne der PI-PLC (Ananthanarayanan *et al.*, 2002) und bei PLD aus *Streptomyces chromofuscus* (El Kirat *et al.*, 2004). Ein derartiger Effekt konnte mit PLD nicht gefunden werden, obwohl dieses Enzym in Gegenwart nicht-hydrolysierbarer Monoschichten einen Anstieg des Oberflächendrucks bewirken kann (Abb. 4.14).

4.5.2 Aktivität als Funktion des Oberflächendrucks

Durch Umwelteinflüsse hervorgerufene Membranumbauprozesse können Veränderungen des Flächen/Volumen-Verhältnisses der Zellen mit sich bringen und damit auch den Oberflächendruck der Membranen beeinflussen. Derartige Modifizierungen der Packungsdichte von Phospholipiden üben vermutlich eine direkte Kontrolle auf die Aktivität der PLD aus, wie die in Abbildung 4.20 wiedergegebenen Ergebnisse eines Modellversuchs verdeutlichen. POPC/POPA(4:1)-Monoschichten wurden im LANGMUIR-Trog unterschiedlich stark komprimiert, PLD in die Subphase injiziert und die Abnahme der Fläche als Maß für die Aktivität des Enzyms aufgezeichnet. Das Ergebnis war eine Optimumskurve mit einem Maximum bei 20 mN m^{-1} . Es fiel auf, dass die Aktivität bei weiter steigendem Oberflächendruck sehr stark abnahm und ab 30 mN m^{-1} Werte nahe Null erreichte, während die Aktivität bei geringeren Oberflächendrücken zunächst stark sank, der Abfall unter 14 mN m^{-1} aber auffällig verlangsamt war.

Die Bedeutung des Grenzflächendrucks für die PLD-Aktivität wurde bereits von Hirche und Ulbrich-Hofmann (1999) erkannt. Die Auswertung der Hydrolyseaktivität in Gegenwart unterschiedlicher Puffer/Lösungsmittel-Kombinationen ergab jedoch Aktivitätsoptima im Bereich von $10\text{-}15 \text{ mN m}^{-1}$. Die Abweichungen zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich wahrscheinlich auf die andersgeartete Beschaffenheit der Grenzfläche (organisches Lösungsmittel/Wasser bzw. Luft/Wasser) und auf Unterschiede bei den eingesetzten Phospholipiden (Soja-PC bzw. POPC/POPA) zurückführen. Die Abhängigkeit der Aktivität vom Oberflächendruck wurde auch bei anderen Phospholipasen festgestellt.

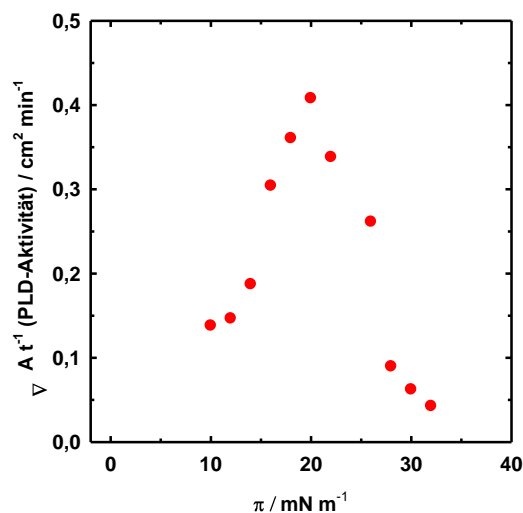


Abbildung 4.20: Abhängigkeit der PLD-Aktivität vom Oberflächendruck.

In einem LANGMUIR-Trog mit konstantem Oberflächendruck wurde die Abnahme der Gesamtfläche ($\Delta A \text{ t}^{-1}$) einer POPC/POPA(4:1)-Monoschicht nach PLD-Injektion als Funktion des Anfangsoberflächendrucks (schwarz) gemessen.

Messansatz: Monoschicht - POPC/POPA (4:1); Subphase - 23nM PLD, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 bei 25°C .

PLD aus *Helianthus annuus* zeigte ein ähnliches Aktivitätsoptimum wie Weißkohl-PLD (Abousalham *et al.*, 1996). Bei PLA₂ aus Schweinepankreas (Verger *et al.*, 1976) und bei PLCβ (James *et al.*, 1997) wurden als Folge oberhalb von 20 mN m⁻¹ ansteigender Oberflächendrücke verminderte Aktivitätsniveaus festgestellt. Da diese von verlängerten *Lag*phasen begleitet wurden, deuteten die Autoren ihre Ergebnisse dahingehend, dass die Penetration der Enzyme in die *monolayer* durch die dichtere Packung der Lipide erschwert wurde. Interessanterweise teilen diese Phospholipasen die Eigenschaft, hydrolytische Aktivität nur unterhalb des für Biomembranen bestimmten lateralen Drucks von ca. 30-35 mN m⁻¹ (Escriba *et al.*, 2008) zu entfalten. PLA₂ aus Schlangen- oder Bienengift dagegen zeigen Aktivität auch im Bereich normaler zellulärer Oberflächendrücke (Demel *et al.*, 1975; Ransac *et al.*, 1992). Die als Funktion des Oberflächendrucks ermittelten Optimumskurven der Enzymaktivität können unter Berücksichtigung von zwei Faktoren analysiert werden (Verger *et al.*, 1976). (1) Bei ansteigendem Oberflächendruck steigt die relative Substratkonzentration an der Grenzfläche und damit die spezifische Aktivität des Enzyms an, während (2) die relative Enzymkonzentration am Lipidfilm sinkt. Das Optimum der Kurve entspricht daher dem Zustand, bei dem das Verhältnis aus Monoschicht-gebundenem Enzym und dessen spezifischer Aktivität maximal ist. Oberhalb des Optimums sinkt die Menge an oberflächenaktivem Enzym, darunter sinkt die spezifische Aktivität.

4.6 Zusammenfassende Diskussion

4.6.1 PLD ist ein Ca^{2+} -abhängiges Grenzflächenenzym

Eine bemerkenswerte Eigenschaft fast aller pflanzlichen PLDs ist das Erfordernis von **Calciumionen als essentielle Aktivatoren** (Pappan und Wang, 1999a). Das Enzym aus Weißkohl, die am besten beschriebene pflanzliche PLD, besitzt zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen, deren Affinität sich um zwei Größenordnungen (0,1 und 10 mM) unterscheiden (Stumpe *et al.*, 2007). Optimale Aktivität zeigte sich nur in Gegenwart millimolarer CaCl_2 -Konzentrationen; dies wurde sowohl bei Messungen der Aktivität gegenüber monomolekularen Filmen (Abb. 4.19) als auch im SUV-System (Abb. 4.5 und 4.6B) festgestellt. Der Calciumbedarf bestand unabhängig von der Präsenz anionischer Phospholipide (Abb. 4.5) und wurde auch nicht durch die Organisationsform der Phospholipide beeinflusst (Abb. 4.2). In Abwesenheit von CaCl_2 war gegenüber dem kurzkettigen Substrat diC_6PC keine Aktivität messbar (Abb. 4.2B). In Gegenwart von 10 mM CaCl_2 dagegen hydrolysierte das Enzym sowohl monomer als auch mizellar vorliegendes diC_6PC . Unabhängig von der Substrataggregatstruktur konnte bei suboptimalen Ca^{2+} -Konzentrationen dennoch eine deutliche – wenn auch verminderte – Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.5, 4.6B+C und 4.19). Interessant ist hierbei die Frage, inwiefern die Aktivität in diesem Konzentrationsbereich mit der Ca^{2+} -Bindungsstelle höherer Affinität in Zusammenhang gebracht werden kann.

Die **Sensibilität der PLD gegenüber der Substrataggregatstruktur** und die Bedeutung des Vorhandenseins einer Wasser/Lipid-Grenzfläche für die Enzymaktivität verdeutlichten die Aktivitätsmessungen mit Phospholipiden unterschiedlicher Struktur (Abb. 4.2A). Sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeiten traten auf, wenn PC in Form von Monomeren (1 mM diC_6PC) vorlag. Gegenüber Vesikeln dagegen zeigte die PLD eine deutlich gesteigerte Aktivität, wobei unilamellare Vesikel eine im Vergleich zu multilamellaren Vesikeln stärkere Stimulation hervorriefen. Diese Ergebnisse demonstrieren die ausgeprägte Präferenz der PLD gegenüber Phospholipiden im zusammengelagerten Zustand und damit das charakteristische Aktivitätsmuster eines Grenzflächenenzym.

4.6.2 Pflanzenzell-analoge Modellmembranen reduzieren den Ca^{2+} -Bedarf

Die Gegenwart von plasmamembran-analogen SUVs, die PC, PE, PI und PIP_2 (im Verhältnis 36:52:10:2) enthielten, bewirkte eine Stimulation der **PLD-Aktivität bei suboptimalen Ca^{2+} -Konzentrationen**. Die Hydrolysegeschwindigkeit bei 670 μM Ca^{2+} war im Vergleich zur Aktivität gegenüber reinen PC-SUVs um den Faktor 13 gesteigert (Abb. 4.6B und C). Diese Stimulation geht wahrscheinlich auf das Zusammenwirken von zwei unabhängigen Aktivierungseffekten zurück: (1) Die spezifische Bindung von PIP_2 als Aktivator und (2) die besonderen strukturellen Eigenschaften der Membranen.

Anhand von Sequenzanalysen wurde bei mehreren pflanzlichen PLDs der konservierte Sequenzbereich **K/RxxxxRxRK** als PIP₂-Bindungsmotiv identifiziert (Wang, 2000), so auch in der C2-Domäne von PLD aus *Brassica oleracea* var. *capitata* (Schäffner *et al.*, 2002). Es ist daher denkbar, dass die beobachtete **Aktivierung durch die Bindung von PIP₂** innerhalb dieser spezifischen Sequenzmotive zu erklären ist. Pappan *et al.* (2004) diskutierten in diesem Zusammenhang eine wechselseitige Abhängigkeit der Bindung von Ca²⁺ und PIP₂.

Auch kann davon ausgegangen werden, dass die **laterale Organisation** der pflanzenzell-analogen Modellmembranen im Vergleich zur Situation innerhalb reiner POPC-SUVs verändert war. Das Vorhandensein von PE, einem Phospholipid mit der Tendenz zur Ausbildung nicht-lamellarer Phasen, hat wahrscheinlich die Krümmung der Membranen beeinflusst (Cullis *et al.*, 1986; Marrink und Mark, 2004). Auch die Gegenwart des anionischen PI kann eine Modulation der Membranstruktur hervorgerufen haben. So kam eine Studie mit PC/PI-Vesikeln (Ohki *et al.*, 1981) zu dem Ergebnis, dass Ca²⁺ die Eigenschaften des Phasendiagramms beeinflusst, wobei das Auftreten lateraler Phasentrennung nicht festgestellt wurde.

Interessanterweise kam die Stimulation vor allem beim **Zusammenspiel dieser beiden Effekte** zum tragen (Abb. 4.6A). Die vermutete strukturelle Heterogenität der PC/PE/PI-SUVs rief keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich mit PC-SUVs hervor. Die Gegenwart von PIP₂ in den PC/PIP₂-SUVs führte hingegen zu einer Aktivierung um das 2,5fache. Strukturelle Veränderungen der Lipidorganisation durch PIP₂ als Ursache der Aktivierung können in diesem Fall ausgeschlossen werden, da ein struktureller Beitrag bei einer PIP₂-Konzentration von 2 mol% nicht zu erwarten ist. Erst das gleichzeitige Vorhandensein von PC, PE und PI sowie des Aktivators PIP₂ führte zu der beobachteten Aktivitätssteigerung um das 13fache.

4.6.3 Ca²⁺-induzierte Mikrodomänen stimulieren die PLD-Aktivität

Neben der Aktivierung durch das Vorhandensein einer Grenzfläche, durch Ca²⁺ und durch pflanzenzell-analoge Modellmembranen konnte die Stimulation der PLD-Aktivität durch SUVs mit höheren Anteilen anionischer Phospholipide gezeigt werden. Untersucht wurde die Aktivität bei 10 mM CaCl₂ und pH 7,0. Im Vergleich zur Aktivität gegenüber reinen POPC-SUVs steigerte sich die Hydrolysegeschwindigkeit gegenüber POPC-SUVs, die POPA, DOPA oder POPG enthielten, maximal um den Faktor 500, 20 bzw. 2 (Abb. 4.3). Die DSC-Analyse der entsprechenden SUVs offenbarte, dass das thermotrope Phasenverhalten in Gegenwart von 10 mM CaCl₂ in bemerkenswerter Weise mit den Ergebnissen der Aktivitätsstudien korreliert werden konnte. Die geringste Stimulation der PLD-Aktivität rief POPG hervor. Das Thermogramm der POPC/POPG-SUVs zeigt, dass oberhalb der Temperatur des Schmelzpeaks der POPG/Ca²⁺-Komplexe (16°C) und damit auch während der bei 25°C durchgeführten Aktivitätsmessungen alle im System vorhandenen Lipide im fluiden Phasenzustand vorlagen (Abb. 4.16). Im Gegensatz dazu befanden sich die POPC/DOPA-SUVs bei 25°C nahe der Übergangstemperatur. Dies bedeutet, dass PLD in diesem Fall Aktivität gegenüber Substrataggregaten entfaltete, deren DOPA/Ca²⁺-Domänen sich im Übergang vom fluiden zum

Gel-Zustand befanden. Die Reaktionsgeschwindigkeit war in diesem Fall um das 20fache erhöht. Die stärkste Stimulation wurde jedoch im POPC/POPA-System gefunden. Unter Bedingungen, bei denen die SUVs von der Koexistenz fluidere POPC-reicher und gel-artiger POPA/Ca²⁺-reicher Domänen geprägt waren, stieg die Aktivität auf den 500fachen Wert an.

Einen weiteren Hinweis auf die **Interdependenz von lateraler Membranheterogenität und PLD-Aktivität** lieferte die rapide Aktivitätsabnahme bei Temperaturen oberhalb von 32,5°C (Abb. 4.18). Bei dieser Temperatur begann das Aufschmelzen der POPA/Ca²⁺-Komplexe. Der absteigende Ast der Aktivitäts/Temperatur-Kurve stimmte exakt mit dem endothermen Peak des DSC-Thermogramms der POPC/POPA-SUVs überein. Üblicherweise wird eine derartige Inaktivierung auf die bei hohen Temperaturen einsetzende thermische Entfaltung der Enzyme zurückgeführt. Diese Möglichkeit kann jedoch ausgeschlossen werden, da Faltungsstudien an PLD den Nachweis erbracht haben, dass das Enzym bis 50°C stabil ist (Haufe, 2006). Das Temperaturoptimum der PLD gegenüber reinen POPC-SUVs dagegen lag bei 37°C.

Eine Aktivitätssteigerung durch lokale Anreicherungen anionischer Lipide wurde auch bei sekretorischen PLA₂ beobachtet und intensiv untersucht (Burack *et al.*, 1993; Leidy *et al.*, 2006). In diesen Fällen beruhte die laterale Phasentrennung jedoch auf der Unmischbarkeit von Phospholipiden, welche sich hinsichtlich der Ladung (Leidy *et al.*, 2006) oder der Fettsäurezusammensetzung (Burack *et al.*, 1993) unterschieden. Die nicht-ideale Verteilung der Lipide in den Experimenten der vorliegenden Arbeit dagegen resultierte aus der Ca²⁺-induzierten Ausbildung von Mikrodomänen aufgrund der gleichzeitigen Anwesenheit anionischer Phospholipide und Ca²⁺. Des Weiteren wurde die Bedeutung der Calciumionen in der Mikrodomänen-vermittelten Aktivierung dadurch bestätigt, dass PLD gegenüber dem ternären *lipid raft*-Modellsystem DOPC/DPPC/Chol keine gesteigerten Hydrolysegeschwindigkeiten zeigte (Abb. 4.8). Daraus folgt, dass laterale Phasentrennung *per se* nicht hinreichend ist, um eine Aktivitätssteigerung der PLD zu bewirken.

Für die Art, wie derartige PA/Ca²⁺-Mikrodomänen innerhalb zellulärer Membranen regulierend wirken könnten, wurden unterschiedliche Mechanismen diskutiert (Faraudo und Travesset, 2007): (1) Die bloße Modulation der Membranstruktur, (2) Botenfunktion durch spezifische Interaktionen mit Proteinen und (3) die Assoziation von Proteinen an die Membran und/oder die Beeinflussung der Enzymaktivität. Möglicherweise sind bei pflanzlichen PLDs alle Mechanismen zutreffend. Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse erscheint es jedoch am wahrscheinlichsten, dass die lokale Ca²⁺-Anreicherung innerhalb der Mikrodomänen dem hohen Ca²⁺-Bedarf der PLD in optimaler Weise entspricht. Möglicherweise wird die Verankerung negativ geladener Aminosäurereste der PLD in der Phospholipidoberfläche durch die Ca²⁺-angereicherten Membranregionen begünstigt. Für diese Annahme spricht, dass die zu Beginn der Hydrolysereaktion zu beobachtenden *Lagphasen* in Gegenwart anionischer SUVs deutlich verkürzt waren (Abb. 4.4B). Eine **erhöhte Bindungsaffinität der PLD gegenüber POPA/Ca²⁺-haltigen Lipidoberflächen** legen auch die Ergebnisse der Filmwaagemessungen nahe (Abb. 4.14B).

Es ist daher denkbar, dass Ca²⁺ als biologischer Schalter fungiert, welcher die Zelle in die Lage versetzt, die PLD-Aktivität spezifisch zu regulieren. Eine solche Ca²⁺-vermittelte Kontrolle der

PLD im Zusammenspiel mit PA erscheint plausibel, da unbeschränkte PLD-Aktivität den Zusammenbruch des zellulären Membrannetzwerks zur Folge hätte. Als Reaktion auf spezifische Umwelteinflüsse und physiologische Zustände sind Pflanzen in besonderem Maße darauf angewiesen, Adaptationsstrategien auf zellulärer Ebene umzusetzen. Eine regulatorische Wirkung von Ca^{2+} und PA wurde auch bei anderen Enzymen nachgewiesen, u.a. bei der extrazellulären Phosphoesterase mit PLD-artiger Aktivität aus *Streptomyces chromofuscus* (Geng *et al.*, 1998; El Kirat *et al.*, 2004; Wagner und Brezesinski, 2007). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass das ausgeklügelte Wechselspiel zwischen Ca^{2+} und PA ein generell gültiges Prinzip der Regulation membranassoziierter Enzyme darstellt.

5 Zusammenfassung

Das Wissen über die Regulation eines Enzyms bildet die Grundlage seiner biotechnologischen Anwendung. Bei der Verwendung von Phospholipase D (PLD) als Biokatalysator führt das hohe Ca^{2+} -Erfordernis (im millimolaren Bereich) der Enzyme, insbesondere der des α -Typs, häufig zu Problemen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wechselwirkung von PLD aus Weißkohl mit unterschiedlichen Modellmembranen zu charakterisieren und die Rolle von Ca^{2+} bei der Aktivierung zu beleuchten. Im Mittelpunkt stand die Ermittlung von Einflussgrößen, die zu einer Steigerung der Enzymaktivität beitragen können sowie die Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen.

Aktivitätsstudien wurden unter Verwendung einer fluoreszenzbasierten, Enzymgekoppelten Methode durchgeführt, bei welcher das während der Hydrolysereaktion frei werdende Cholin quantifiziert wird. Experimente mit Phosphatidylcholin (PC) in unterschiedlichen Organisationsformen (Monomere, Mizellen, Vesikel) verdeutlichten die Präferenz der PLD gegenüber Substrataggregaten. Es konnte auch aufgezeigt werden, dass die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration keine Auswirkungen auf die Bevorzugung der Hydrolyse zusammengelagerter PC-Moleküle hat. Eindeutig nachgewiesen wurde die Aktivierung der PLD durch anionische Phospholipide. Dazu wurden Vesikel aus 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) mit unterschiedlichen Anteilen an 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphat (POPA), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphat (DOPA) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) eingesetzt. Die deutlichste Steigerung der Aktivität wurde in Gegenwart von POPC/POPA-Vesikeln und 10 mM CaCl_2 gemessen. DOPA und POPG riefen gleichfalls eine Stimulation hervor, jedoch in weit geringerem Ausmaß. Auffällig war, dass die Lagphase, welche typischerweise zu Beginn der Reaktion zu beobachten war, durch die anionischen Lipide verkürzt wurde. Auch anionische

Modellmembranen, welche in ihrer Zusammensetzung an pflanzlichen Plasmamembranen orientiert waren und PC, Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) und L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) enthielten, führten zu erhöhter PLD-Aktivität. Interessant war, dass mit derart zusammengesetzten Vesikeln auch bei sehr geringen Ca²⁺-Konzentrationen (im nanomolaren Bereich) eine Aktivierung zu beobachten war. Dagegen zeigte sich keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber neutralen Membranen (mit Cholesterol), die durch das Auftreten lateraler Asymmetrien geprägt waren.

Um Anhaltspunkte für die Erklärung der beobachteten Aktivierungseffekte zu bekommen, wurden **Membranbindungsexperimente** durchgeführt. Dazu mussten zunächst Methoden etabliert werden, welche die Quantifizierung der PLD-Bindung an die Phospholipidoberfläche ermöglichten. Besonderes Augenmerk musste hierbei auf die immanente Eigenschaft lipidabbauender Enzyme gelegt werden, die Membran im Verlauf der Messung abzubauen. Als geeignetste Technik erwies sich hier die Messung des Oberflächendrucks mit einer LANGMUIR-Filmwaage. Eingesetzt wurden hierfür nicht-hydrolysierbare Monoschichten aus 1,3-Dimyristoyl-*sn*-glycero-2-phosphocholin (1,3diC₁₄PC) mit unterschiedlichen Anteilen an POPA. Nach Injektion von PLD in die Subphase war die Geschwindigkeit des Oberflächenanstiegs deutlich erhöht, sofern POPA in der Phospholipidschicht enthalten war (in Gegenwart von 10 mM CaCl₂). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch anionische Lipide wie POPA die Affinität der PLD zur Phospholipidoberfläche gesteigert wurde. Ein weiteres interessantes Resultat war die ausgeprägte Abhängigkeit der PLD-Aktivität vom Oberflächendruck (π), wobei die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ gemessen wurde.

Die **physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phospholipide**, welche der Zunahme der Aktivität und der Membranbindung zugrunde liegen, wurden mit Hilfe der Dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Phospholipidvesikel bei gleichzeitiger Gegenwart von Ca²⁺, anionischen Phospholipiden (AP) und POPC in bestimmten Temperaturbereichen durch die Koexistenz von fluiden POPC-Molekülen und gel-artigen AP/Ca²⁺-Domänen geprägt sind. Ein Vergleich der DSC-Daten mit den Ergebnissen der Aktivitätsstudien offenbarte, dass die dramatische Aktivierung im POPC/POPA-System mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der in diesen Membranen besonders ausgeprägten lateralen Heterogenität resultierte.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Ca²⁺ in der Zelle als biologischer Schalter fungiert, welcher im Zusammenspiel mit den anionischen Membranlipiden (und anderen möglichen Faktoren) die Aktivität der PLD strikt reguliert.

6 Literaturverzeichnis

- Abousalham, A., Ivanov, M.G., Douchet, I. and Verger, R.** (1996) A new method for determining phospholipase D activity using the monomolecular film technique. *Chem Phys Lipids*, **79**, 107-112.
- Abousalham, A., Nari, J., Teissere, M., Ferte, N., Noat, G. and Verger, R.** (1997) Study of fatty acid specificity of sunflower phospholipase D using detergent/phospholipid micelles. *Eur J Biochem*, **248**, 374-379.
- Abousalham, A., Riviere, M., Teissere, M. and Verger, R.** (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim Biophys Acta*, **1158**, 1-7.
- Ahn, K.W. and Sampson, N.S.** (2004) Cholesterol oxidase senses subtle changes in lipid bilayer structure. *Biochemistry*, **43**, 827-836.
- Allgyer, T.T. and Wells, M.A.** (1979) Phospholipase D from savoy cabbage: purification and preliminary kinetic characterization. *Biochemistry*, **18**, 5348-5353.
- Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D. and Carriere, F.** (2006) Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 995-1013.
- Altenbach, C. and Seelig, J.** (1984) Ca²⁺ binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic resonance. Evidence for the formation of a Ca²⁺ complex with two phospholipid molecules. *Biochemistry*, **23**, 3913-3920.
- Ananthanarayanan, B., Das, S., Rhee, S.G., Murray, D. and Cho, W.** (2002) Membrane targeting of C2 domains of phospholipase C-delta isoforms. *J Biol Chem*, **277**, 3568-3575.

- Andersson, M.X., Larsson, K.E., Tjellstrom, H., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S.** (2005) Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem*, **280**, 27578-27586.
- Baldassare, J.J., Rhinehart, K.B. and Silbert, D.F.** (1976) Modification of membrane lipid: physical properties in relation to fatty acid structure. *Biochemistry*, **15**, 2986-2994.
- Bargmann, B.O. and Munnik, T.** (2006) The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 515-522.
- Basova, L.V., Tiktopulo, E.I., Kutysenko, V.P., Mauk, A.G. and Bychkova, V.E.** (2008) Phospholipid membranes affect tertiary structure of the soluble cytochrome b5 heme-binding domain. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1015-1026.
- Berg, O.G., Gelb, M.H., Tsai, M.D. and Jain, M.K.** (2001) Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chem Rev*, **101**, 2613-2654.
- Berg, O.G. and Jain, M.K.** (2002) *Interfacial Enzyme Kinetics*: John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Binder, W.H., Barragan, V. and Menger, F.M.** (2003) Domains and rafts in lipid membranes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 5802-5827.
- Bittova, L., Sumandea, M. and Cho, W.** (1999) A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *J Biol Chem*, **274**, 9665-9672.
- Blain, J.A., Patterson, J.D., Shaw, C.E. and Akhtar, M.W.** (1976) Study of bound phospholipase activities of fungal mycelia using an organic solvent system. *Lipids*, **11**, 553-560.
- Bloom, M., Evans, E. and Mouritsen, O.G.** (1991) Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q Rev Biophys*, **24**, 293-397.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Elektrophoresis* **8**, 93-99.
- Blume, A.** (1983) Apparent molar heat capacities of phospholipids in aqueous dispersion. Effects of chain length and head group structure. *Biochemistry*, **22**, 5436-5442.
- Bowie, J.U.** (2001) Stabilizing membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 397-402.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brindley, D.N., Abousalham, A., Kikuchi, Y., Wang, C.N. and Waggoner, D.W.** (1996) "Cross talk" between the bioactive glycerolipids and sphingolipids in signal transduction. *Biochem Cell Biol*, **74**, 469-476.

- Brown, D.A. and London, E.** (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol*, **164**, 103-114.
- Buckland, A.G. and Wilton, D.C.** (2000) Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochim Biophys Acta*, **1483**, 199-216.
- Burack, W.R., Dibble, A.R., Allietta, M.M. and Biltonen, R.L.** (1997) Changes in vesicle morphology induced by lateral phase separation modulate phospholipase A2 activity. *Biochemistry*, **36**, 10551-10557.
- Burack, W.R., Yuan, Q. and Biltonen, R.L.** (1993) Role of lateral phase separation in the modulation of phospholipase A2 activity. *Biochemistry*, **32**, 583-589.
- Carriere, F., Thirstrup, K., Hjorth, S., Ferrato, F., Nielsen, P.F., Withers-Martinez, C., Cambillau, C., Boel, E., Thim, L. and Verger, R.** (1997) Pancreatic lipase structure-function relationships by domain exchange. *Biochemistry*, **36**, 239-248.
- Cevc, G.** (1987) *Phospholipid Bilayers - Physical Principles and Models*: John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Cho, W.** (2001) Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J Biol Chem*, **276**, 32407-32410.
- Cho, W., Bittova, L. and Stahelin, R.V.** (2001) Membrane binding assays for peripheral proteins. *Anal Biochem*, **296**, 153-161.
- Cho, W. and Stahelin, R.V.** (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **34**, 119-151.
- Collander, R.** (1933) Ernst Overton - Ein Nachruf. *Protoplasma*, **20**, 228-231.
- Cornut, I., Desbat, B., Turlet, J.M. and Dufourcq, J.** (1996) In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface. *Biophys J*, **70**, 305-312.
- Cullis, P.R., Hope, M.J. and Tilcock, C.P.** (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids*, **40**, 127-144.
- Curatolo, W., Sears, B. and Neuringer, L.J.** (1985) A calorimetry and deuterium NMR study of mixed model membranes of 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine and saturated phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta*, **817**, 261-270.
- D'Arrigo, P., Piergianni, V., Scarcelli, D. and Servi, S.** (1995) A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Anal Chim Acta*, **304**, 249-254.
- Danielli, J.F. and Davson, H.** (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Physiol*, **5**, 495-508.
- Davidson, F.M. and Long, C.** (1958) The structure of the naturally occurring phosphoglycerides. 4. Action of cabbage-leaf phospholipase D on ovoidlecithin and related substances. *Biochem J*, **69**, 458-466.
- Davis, J.H., Clair, J.J. and Juhasz, J.** (2009) Phase equilibria in DOPC/DPPE-d₆₂/cholesterol mixtures. *Biophys J*, **96**, 521-539.

- Dawson, R.M.C. and Hemington, N.** (1967) Some Properties of Purified Phospholipase D and especially the Effect of Amphipathic Substances. *Biochem J*, **102**, 76-86.
- de Vrije, T. and Munnik, T.** (1997) Activation of phospholipase D by calmodulin antagonists and mastoparan in carnation petals. *J Exp Bot*, **48**, 1631-1637.
- Demel, R.A., Geurts van Kessel, W.S., Zwaal, R.F., Roelofsen, B. and van Deenen, L.L.** (1975) Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim Biophys Acta*, **406**, 97-107.
- DeWolf, C., Leporatti, S., Kirsch, C., Klinger, R. and Brezesinski, G.** (1999) Phase separation in phosphatidylinositol:phosphatidylcholine mixed monolayers. *Chem Phys Lipids*, **97**, 129-138.
- Dippe, M. and Ulbrich-Hofmann, R.** (2009) Substrate specificity in phospholipid transformations by plant phospholipase D isoenzymes. *Phytochemistry*. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.01.011
- Dittrich, N., Haftendorn, R. and Ulbrich-Hofmann, R.** (1998) Hexadecylphosphocholine and 2-modified 1,3-diacylglycerols as effectors of phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*, **1391**, 265-272.
- Drobak, B.K.** (1993) Plant Phosphoinositides and Intracellular Signaling. *Plant Physiol*, **102**, 705-709.
- El Kirat, K., Chauvet, J.P., Roux, B. and Besson, F.** (2004) Streptomyces chromofuscus phospholipase D interaction with lipidic activators at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta*, **1661**, 144-153.
- Elias, M., Potocky, M., Cvrckova, F. and Zarsky, V.** (2002) Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC Genomics*, **3**, 2.
- Escriba, P.V., Gonzalez-Ros, J.M., Goni, F.M., Kinnunen, P.K., Vigh, L., Sanchez-Magraner, L., Fernandez, A.M., Busquets, X., Horvath, I. and Barcelo-Coblijn, G.** (2008) Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med*, **12**, 829-875.
- Exton, J.H.** (2002) Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett*, **531**, 58-61.
- Fan, L., Zheng, S. and 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.
- Faraudo, J. and Travesset, A.** (2007) Phosphatidic acid domains in membranes: effect of divalent counterions. *Biophys J*, **92**, 2806-2818.
- Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F. and Bartels, D.** (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell*, **12**, 111-124.

- Gadd, M.E. and Biltonen, R.L.** (2000) Characterization of the interaction of phospholipase A(2) with phosphatidylcholine-phosphatidylglycerol mixed lipids. *Biochemistry*, **39**, 9623-9631.
- Gargouri, Y., Pieroni, G., Riviere, C., Sugihara, A., Sarda, L. and Verger, R.** (1985) Inhibition of lipases by proteins. A kinetic study with dicaprin monolayers. *J Biol Chem*, **260**, 2268-2273.
- Garidel, P. and Blume, A.** (2000) Calcium Induced Nonideal Mixing in Liquid-Crystalline Phosphatidylcholine-Phosphatidic Acid Bilayer Membranes. *Langmuir*, **16**, 1662-1667.
- Gebhardt, C., Gruler, H. and Sackmann, E.** (1977) On domain structure and local curvature in lipid bilayers and biological membranes. *Z Naturforsch [C]*, **32**, 581-596.
- Gelb, M.H., Cho, W. and Wilton, D.C.** (1999) Interfacial binding of secreted phospholipases A₂: more than electrostatics and a major role for tryptophan. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 428-432.
- Gelb, M.H., Jain, M.K., Hanel, A.M. and Berg, O.G.** (1995) Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A₂. *Annu Rev Biochem*, **64**, 653-688.
- Geng, D., Chura, J. and Roberts, M.F.** (1998) Activation of phospholipase D by phosphatidic acid. Enhanced vesicle binding, phosphatidic acid-Ca²⁺ interaction, or an allosteric effect? *J Biol Chem*, **273**, 12195-12202.
- Gorter, E. and Grendel, J.** (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of blood. *J Exp Med*, **41**, 439-443.
- Graham, I., Gagne, J. and Silvius, J.R.** (1985) Kinetics and thermodynamics of calcium-induced lateral phase separations in phosphatidic acid containing bilayers. *Biochemistry*, **24**, 7123-7131.
- Guo, B.Z., Xu, G., Cao, Y.G., Holbrook, C.C. and Lynch, R.E.** (2006) Identification and characterization of phospholipase D and its association with drought susceptibilities in peanut (*Arachis hypogaea*). *Planta*, **223**, 512-520.
- Guo, S., Zhang, X., Seaton, B.A. and Roberts, M.F.** (2008) Role of helix B residues in interfacial activation of a bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry*, **47**, 4201-4210.
- Hac, A.E., Seeger, H.M., Fidorra, M. and Heimbürg, T.** (2005) Diffusion in two-component lipid membranes - a fluorescence correlation spectroscopy and monte carlo simulation study. *Biophys J*, **88**, 317-333.
- Haftendorn, R.** (1997) Modifizierte 1,3-Diacylglyceride - Synthesen, Assoziationsstudien und enzymatische Untersuchungen mit Phospholipase D. *Dissertationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, 102.

- Haftendorn, R., Schwarze, G. and Ulbrich-Hofmann, R.** (2000) 1,3-Diacylglycero-2-phosphocholines - synthesis, aggregation behaviour and properties as inhibitors of phospholipase D. *Chem Phys Lipids*, **104**, 57-66.
- Hanahan, D.J. and Chaikoff, I.L.** (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.
- Harwood, J.L., Cryer, A., Gurr, M.I. and Dodds, P.** (1994) *Medical and agricultural aspects of lipids*. In: Gunstone, F.D., Harwood, J.L. and Padley, F.B. (Eds.) *The Lipid handbook*, CRC Press, Boca Raton.
- Haufe, S.** (2006) Untersuchungen zur Struktur und Faltung der Phospholipase D aus Weißkohl. *Dissertationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, 121.
- Hazel, J.R.** (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol*, **57**, 19-42.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., Livermore, R. and Mozingo, N.** (1991) Thermal adaptation in biological membranes: functional significance of changes in phospholipid molecular species composition. *Prog Lipid Res*, **26**, 277-282.
- He, Q., Zhai, X. and Li, J.** (2004) Direct Visualization of the Dynamic Hydrolysis Process of an L-DPPC Monolayer Catalyzed by Phospholipase D at the Air/Water Interface. *J Phys Chem B*, **108**, 473-476.
- Henon, S. and Meunier, J.** (1991) Microscope at the Brewster Angle: direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Rev Sci Instrum*, **62**, 936-939.
- Heilmann, I.** (2009) Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends Plant Sci*. doi: 10.1016/j.tplants.2008.12.002
- Hind, A.R., Bhargava, S.K. and McKinnon, A.** (2001) At the solid/liquid interface: FTIR/ATR - the tool of choice. *Adv Colloid Interface Sci*, **93**, 91-114.
- Hirche, F. and 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.
- Holopainen, J.M., Angelova, M.I., Soderlund, T. and Kinnunen, P.K.** (2002) Macroscopic consequences of the action of phospholipase C on giant unilamellar liposomes. *Biophys J*, **83**, 932-943.
- Horwitz, A.F., Horsley, W.J. and Klein, M.P.** (1972) Magnetic resonance studies on membrane and model membrane system: proton magnetic relaxation rates in sonicated lecithin dispersions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 590-593.
- Huflejt, M.E., Tremolieres, A., Pineau, B., Lang, J.K., Hatheway, J. and Packer, L.** (1990) Changes in membrane lipid composition during saline growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol*, **94**, 1512-1521.

- Huwiler, A., Brunner, J., Hummel, R., Vervoordeldonk, M., Stabel, S., van den Bosch, H. and Pfeilschifter, J.** (1996) Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6959-6963.
- Inaba, M., Suzuki, I., Szalontai, B., Kanasaki, Y., Los, D.A., Hayashi, H. and Murata, N.** (2003) Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *synechocystis*. *J Biol Chem*, **278**, 12191-12198.
- Ivanova, V.P.** (2000) Theoretical and experimental study of protein-lipid interactions. *Dissertationsschrift*, Georg-August-Universität Göttingen, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 113.
- Jain, M.K. and Berg, O.G.** (1989) The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. *Biochim Biophys Acta*, **1002**, 127-156.
- James, S.R., Paterson, A., Harden, T.K., Demel, R.A. and Downes, C.P.** (1997) Dependence of the activity of phospholipase C beta on surface pressure and surface composition in phospholipid monolayers and its implications for their regulation. *Biochemistry*, **36**, 848-855.
- Jung, K., Koh, E. and Choi, M.** (1989) Catalytic Properties of Phospholipase D using Phosphatidic Acid as an Activator. *Bull Korean Chem Soc*, **10**, 595-600.
- Kater, L.A., Goetzl, E.J. and Austen, K.F.** (1976) Isolation of human eosinophil phospholipase D. *J Clin Invest*, **57**, 1173-1180.
- Kerth, A.** (2003) Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid- und Flüssigkristall-Filmen an der Luft/Wasser-Grenzfläche. *Dissertationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, 134.
- Kinnunen, P.K., Koiv, A., Lehtonen, J.Y., Rytomaa, M. and Mustonen, P.** (1994) Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. *Chem Phys Lipids*, **73**, 181-207.
- Knauf, K.** (2007) Physikochemische Charakterisierung homologer kationischer Tenside und deren Wechselwirkung mit Modellmembranen bestehend aus DMPC und DMPG. *Dissertationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät II – Chemie und Physik 115.
- König, S., Ischebeck, T., Lerche, J., Stenzel, I. and Heilmann, I.** (2008) Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem J*, **415**, 387-399.

- Kopka, J., Pical, C., Hetherington, A.M. and Muller-Rober, B.** (1998) Ca²⁺/phospholipid-binding (C2) domain in multiple plant proteins: novel components of the calcium-sensing apparatus. *Plant Mol Biol*, **36**, 627-637.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambrecht, R. and Ulbrich-Hofmann, R.** (1992) A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **373**, 81-88.
- Lambrecht, R. and Ulbrich-Hofmann, R.** (1993) The Adsorptive Immobilization of Phospholipase D Mediated by Calcium Ions. *Biotech Bioeng*, **41**, 833-836.
- Langner, M. and Kubica, K.** (1999) The electrostatics of lipid surfaces. *Chem Phys Lipids*, **101**, 3-35.
- Laroche, G., Dufourc, E.J., Dufourcq, J. and Pezolet, M.** (1991) Structure and dynamics of dimyristoylphosphatidic acid/calcium complexes by 2H NMR, infrared, spectroscopies and small-angle x-ray diffraction. *Biochemistry*, **30**, 3105-3114.
- Lathrop, B., Gadd, M., Biltonen, R.L. and Rule, G.S.** (2001) Changes in Ca²⁺ affinity upon activation of Agkistrodon piscivorus piscivorus phospholipase A₂. *Biochemistry*, **40**, 3264-3272.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol*, **171**, 249-269.
- Lee, A.G.** (1977) Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta*, **472**, 237-281.
- Leidy, C., Linderoth, L., Andresen, T.L., Mouritsen, O.G., Jorgensen, K. and Peters, G.H.** (2006) Domain-induced activation of human phospholipase A₂ type IIA: local versus global lipid composition. *Biophys J*, **90**, 3165-3175.
- Lein, W. and Saalbach, G.** (2001) Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochim Biophys Acta*, **1530**, 172-183.
- Leiros, I., McSweeney, S. and 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.
- Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S. and Hough, E.** (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure*, **8**, 655-667.
- Lemmon, M.A.** (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 99-111.

- Lerchner, A.** (2005) Studien zur Gewinnung und gentechnischen Modifizierung von Phospholipase D aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Dissertationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, 113.
- Lerchner, A., Mansfeld, J., Schaffner, I., Schops, R., Beer, H.K. and Ulbrich-Hofmann, R.** (2005) Two highly homologous phospholipase D isoenzymes from *Papaver somniferum* L. with different transphosphatidylation potential. *Biochim Biophys Acta*, **1737**, 94-101.
- Li, M., Hong, Y. and Wang, X.** (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbali.2009.02.017
- Lichtenbergova, L., Yoon, E.T. and Cho, W.** (1998) Membrane penetration of cytosolic phospholipase A₂ is necessary for its interfacial catalysis and arachidonate specificity. *Biochemistry*, **37**, 14128-14136.
- Liljenberg, C.S.** (1992) The effects of water deficit stress on plant membrane lipids. *Prog Lipid Res*, **31**, 335-343.
- Liu, F. and Chong, P.L.** (1999) Evidence for a regulatory role of cholesterol superlattices in the hydrolytic activity of secretory phospholipase A₂ in lipid membranes. *Biochemistry*, **38**, 3867-3873.
- Los, D.A. and Murata, N.** (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 142-157.
- Macdonald, P.M. and Seelig, J.** (1987) Calcium binding to mixed phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, **26**, 1231-1240.
- Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R.** (2009) Modulation of phospholipase D activity in vitro. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbali.2009.03.003
- Marrink, S.J. and Mark, A.E.** (2004) Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membranes. *Biophys J*, **87**, 3894-3900.
- McBain** (1913) Colloids and their viscosity. *Transactions of the Faraday Society*, **9**, 93 - 107.
- McDermott, M., Wakelam, M.J. and Morris, A.J.** (2004) Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*, **82**, 225-253.
- McElhaney, R.N.** (1982) The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem Phys Lipids*, **30**, 229-259.
- McElhaney, R.N.** (1986) Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems. *Biochim Biophys Acta*, **864**, 361-421.
- McLaughlin, S. and Murray, D.** (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, **438**, 605-611.

- Medkova, M. and Cho, W.** (1998) Differential membrane-binding and activation mechanisms of protein kinase C- α and - ϵ . *Biochemistry*, **37**, 4892-4900.
- Meister, A., Nicolini, C., Waldmann, H., Kuhlmann, J., Kerth, A., Winter, R. and Blume, A.** (2006) Insertion of lipidated Ras proteins into lipid monolayers studied by infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS). *Biophys J*, **91**, 1388-1401.
- Melchior, D.L. and Steim, J.M.** (1976) Thermotropic transitions in biomembranes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, **5**, 205-238.
- Miege, C. and Marechal, E.** (1999) 1,2-sn-Diacylglycerol in plant cells: Product, substrate and regulator. *Plant Physiol Biochem*, **37**, 795-808.
- Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R. and Van Aalten, D.M.** (2003) Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J*, **375**, 531-538.
- Möhwald, H., Dietrich, A., Bohm, C., Brezesinski, G. and Thoma, M.** (1995) Domain formation in monolayers. *Mol Membr Biol*, **12**, 29-38.
- Morris, A.J., Engebrecht, J. and Frohman, M.A.** (1996) Structure and regulation of phospholipase D. *Trends Pharmacol Sci*, **17**, 182-185.
- Mouritsen, O., Andresen, T.L.H., A., Hansen, P.L., Jakobsen, A.F., Jensen, U.B., Jensen, M.O., Jørgensen, K., Kaasgaard, T., Leidy, C., Simonsen, A.C., Peters, G.H. and Weiss, M.** (2006) Activation of interfacial enzymes at membrane surfaces. *J. Phys.: Condens. Matter*, **18**, 1293-1304.
- Mouritsen, O.G., Bagatolli, L.A. and Simonsen, A.C.** (2008) *The Membrane Interface as a Structured Compartment and a Substrate for Enzyme Action*: John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Mouritsen, O.G. and Bloom, M.** (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys J*, **46**, 141-153.
- Munnik, T.** (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci*, **6**, 227-233.
- Murata, N. and Los, D.A.** (1997) Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiol*, **115**, 875-879.
- Nalefski, E.A. and Falke, J.J.** (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*, **5**, 2375-2390.
- Nalefski, E.A., Slazas, M.M. and Falke, J.J.** (1997) Ca²⁺-signaling cycle of a membrane-docking C2 domain. *Biochemistry*, **36**, 12011-12018.
- Navari-Izzo, F., Vangioni, N. and Quartacci, M.F.** (1990) Lipids of soybean and sunflower seedlings grown under drought conditions. *Phytochemistry* **29**, 2119-2123.
- Nöll, G.G.** (1994) Biologische Membranen - Physikalische Modelle: Monolayer, Bilayer und Liposomen. *Techn. Wiss./Naturw.*, **11**, 129-150.

- Norberg, P. and Liljenberg, C.** (1991) Lipids of Plasma Membranes Prepared from Oat Root Cells : Effects of Induced Water-Deficit Tolerance. *Plant Physiol*, **96**, 1136-1141.
- Novotna, Z., Martinec, J., Profotova, B., Zdarova, S., Kader, J.C. and Valentova, O.** (2003) In vitro distribution and characterization of membrane-associated PLD and PI-PLC in *Brassica napus*. *J Exp Bot*, **54**, 691-698.
- Oblozinsky, M., Ulbrich-Hofmann, R. and Bezakova, L.** (2005) Head group specificity of phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (*Papaver somniferum* L.). *Biotechnol Lett*, **27**, 181-185.
- Ogino, C., Negi, Y., Matsumiya, T., Nakaoka, K., Kondo, A., Kuroda, S., Tokuyama, S., Kikkawa, U., Yamane, T. and Fukuda, H.** (1999) Purification, characterization, and sequence determination of phospholipase D secreted by *Streptovercillium cinnamomeum*. *J Biochem*, **125**, 263-269.
- Ohki, K., Sekiya, T., Yamauchi, T. and Nozawa, Y.** (1981) Physical properties of phosphatidylcholine-phosphatidylinositol liposomes in relation to a calcium effect. *Biochim Biophys Acta*, **644**, 165-174.
- Ohki, K., Takahashi, K., Kato, S. and Maesono, A.** (1989) Short- and long-range Ca^{2+} -induced lateral phase separations in ternary mixtures of phosphatidic acid, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Chem Phys Lipids*, **50**, 109-117.
- Onda, M., Yoshihara, K., Koyano, H., Ariga, K. and Kunitake, T.** (1996) Molecular Recognition of Nucleotides by the Guanidinium Unit at the Surface of Aqueous Micelles and Bilayers. A Comparison of Microscopic and Macroscopic Interfaces. *J Am Chem Soc*, **118**, 8524-8530.
- Ono, Y. and White, D.C.** (1970) Cardiolipin-specific phospholipase D activity in *Haemophilus parainfluenzae*. *J Bacteriol*, **103**, 111-115.
- Pande, A.H., Qin, S., Nemecek, K.N., He, X. and Tatulian, S.A.** (2006) Isoform-specific membrane insertion of secretory phospholipase A2 and functional implications. *Biochemistry*, **45**, 12436-12447.
- Pappan, K., Qin, W., Dyer, J.H., Zheng, L. and Wang, X.** (1997) Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLDbeta, from *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **272**, 7055-7061.
- Pappan, K. and Wang, X.** (1999a) Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*, **1439**, 151-166.
- Pappan, K. and Wang, X.** (1999b) Plant phospholipase Dalpha is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca^{2+} concentrations. *Arch Biochem Biophys*, **368**, 347-353.
- Pappan, K., Zheng, L., Krishnamoorthi, R. and Wang, X.** (2004) Evidence for and characterization of Ca^{2+} binding to the catalytic region of *Arabidopsis thaliana* phospholipase Dbeta. *J Biol Chem*, **279**, 47833-47839.

- Pappan, K., Zheng, S. and Wang, X.** (1997) Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in Arabidopsis. *J Biol Chem*, **272**, 7048-7054.
- Pönitz, J. and Roos, W.** (1994) A Glucose-Activated Electron Transfer System in the Plasma Membrane Stimulates the H⁺-ATPase in *Penicillium cyclopium*. *J Bact*, **176**, 5429-5438.
- Qin, C. and 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. and Wang, X.** (1997) Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLDgamma and regulation of plant PLDgamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium. *J Biol Chem*, **272**, 28267-28273.
- Quarles, R.H. and Dawson, R.M.** (1969) The hydrolysis of monolayers of phosphatidyl(Me-14C)choline by phospholipase D. *Biochem J*, **113**, 697-705.
- Raja, M., Spelbrink, R.E., de Kruijff, B. and Killian, J.A.** (2007) Phosphatidic acid plays a special role in stabilizing and folding of the tetrameric potassium channel KcsA. *FEBS Lett*, **581**, 5715-5722.
- Ransac, S., Aarsman, A.J., van den Bosch, H., Gancet, C., de Haas, G.H. and Verger, R.** (1992) Rat platelet phospholipase A2. Kinetic characterization using the monomolecular film technique. *Eur J Biochem*, **204**, 793-797.
- Rebecchi, M.J., Eberhardt, R., Delaney, T., Ali, S. and Bittman, R.** (1993) Hydrolysis of short acyl chain inositol lipids by phospholipase C-delta 1. *J Biol Chem*, **268**, 1735-1741.
- Robbins, K.M., Bhuvaramurthy, N., Pliska-Matyshak, G. and Murthy, P.P.** (1999) The isolation and characterization of right-side-out plasma membrane vesicles from barley aleurone cells. *Lipids*, **34**, 75-82.
- Schäffner, I.** (2001) Identifizierung und rekombinante Herstellung von Phospholipase D-Isoenzymen aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Dissertationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, 84.
- Schäffner, I., Rücknagel, K.-P., Mansfeld, J. and 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.
- Schöps, R., Schierhorn, A., Schaffner, I., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R.** (2002) Identification of phospholipase D from cabbage as N-terminally acetylated PLD2. *J Protein Chem*, **21**, 407-411.
- Seaton, B. and Roberts, M.F.** (1996) *Peripheral Membrane Proteins*: Birkhäuser, Boston.
- Sesana, S., Re, F., Bulbarelli, A., Salerno, D., Cazzaniga, E. and Masserini, M.** (2008) Membrane features and activity of GPI-anchored enzymes: alkaline phosphatase reconstituted in model membranes. *Biochemistry*, **47**, 5433-5440.

- Shao, X., Fernandez, I., Sudhof, T.C. and Rizo, J.** (1998) Solution structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca²⁺ induce a conformational change? *Biochemistry*, **37**, 16106-16115.
- Shimshick, E.J. and McConnell, H.M.** (1973) Lateral phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry*, **12**, 2351-2360.
- Shoemaker, S.D. and Vanderlick, T.K.** (2003) Calcium modulates the mechanical properties of anionic phospholipid membranes. *J Colloid Interface Sci*, **266**, 314-321.
- Silvius, J.R.** (1990) Calcium-induced lipid phase separations and interactions of phosphatidylcholine/anionic phospholipid vesicles. Fluorescence studies using carbazole-labeled and brominated phospholipids. *Biochemistry*, **29**, 2930-2938.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Sinensky, M.** (1974) Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 522-525.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Snabe, T. and Petersen, S.B.** (2003) Lag phase and hydrolysis mechanisms of triacylglycerol film lipolysis. *Chem Phys Lipids*, **125**, 69-82.
- Sovago, M., Worpel, G.W., Smits, M., Muller, M. and Bonn, M.** (2007) Calcium-induced phospholipid ordering depends on surface pressure. *J Am Chem Soc*, **129**, 11079-11084.
- Stieglitz, K., Seaton, B. and Roberts, M.F.** (1999) The role of interfacial binding in the activation of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D by phosphatidic acid. *J Biol Chem*, **274**, 35367-35374.
- Stumpe, S., Konig, S. and Ulbrich-Hofmann, R.** (2007) Insights into the structure of plant alpha-type phospholipase D. *FEBS J*, **274**, 2630-2640.
- Sung, T.C., Roper, R.L., Zhang, Y., Rudge, S.A., Temel, R., Hammond, S.M., Morris, A.J., Moss, B., Engebrecht, J. and Frohman, M.A.** (1997) Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J*, **16**, 4519-4530.
- Sweede, M., Ankem, G., Chutvirasakul, B., Azurmendi, H.F., Chbeir, S., Watkins, J., Helm, R.F., Finkielstein, C.V. and Capelluto, D.G.** (2008) Structural and membrane binding properties of the prickly PET domain. *Biochemistry*, **47**, 13524-13536.
- Szalontai, B., Nishiyama, Y., Gombos, Z. and Murata, N.** (2000) Membrane dynamics as seen by fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochim Biophys Acta*, **1509**, 409-419.

- Taneva, S., Johnson, J.E. and Cornell, R.B.** (2003) Lipid-induced conformational switch in the membrane binding domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase: a circular dichroism study. *Biochemistry*, **42**, 11768-11776.
- Teruel, M.N. and Meyer, T.** (2000) Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction. *Cell*, **103**, 181-184.
- Thuduppathy, G.R., Craig, J.W., Kholodenko, V., Schon, A. and Hill, R.B.** (2006) Evidence that membrane insertion of the cytosolic domain of Bcl-xL is governed by an electrostatic mechanism. *J Mol Biol*, **359**, 1045-1058.
- Tookey, H.L. and Balls, A.K.** (1956) Plant phospholipase D. I. Studies on cottonseed and cabbage phospholipase D. *J Biol Chem*, **218**, 213-224.
- Torrecillas, A., Laynez, J., Menendez, M., Corbalan-Garcia, S. and Gomez-Fernandez, J.C.** (2004) Calorimetric study of the interaction of the C2 domains of classical protein kinase C isoenzymes with Ca²⁺ and phospholipids. *Biochemistry*, **43**, 11727-11739.
- Uesugi, Y., Arima, J., Iwabuchi, M. and Hatanaka, T.** (2007) C-terminal loop of Streptomyces phospholipase D has multiple functional roles. *Protein Sci*, **16**, 197-207.
- Uesugi, Y. and Hatanaka, T.** (2009) Phospholipase D mechanism using Streptomyces PLD. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbali.2009.01.020
- Ulbrich-Hofmann, R.** (2000) Phospholipases used in Lipid transformations. In: Bornscheuer, U. (Ed.) *Enzymes in Lipid Modification*, Wiley-VCH, Weinheim – New York.
- Ulbrich-Hofmann, R.** (2003) Enzyme-catalysed transphosphatidylation. *Eur J Lipid Sci Technol*, **105**, 305-308.
- Ulbrich-Hofmann, R., Lerchner, A., Oblozinsky, M. and Bezakova, L.** (2005) Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnol Lett*, **27**, 535-544.
- Veatch, S.L. and Keller, S.L.** (2005) Seeing spots: Complex phase behavior in simple membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 172 - 185.
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W.F., Fita, I. and Gomez-Fernandez, J.C.** (1999) Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Cα directly to phosphatidylserine. *EMBO J*, **18**, 6329-6338.
- Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T.A. and Damjanovich, S.** (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8053-8058.
- Verger, R., Mieras, M.C. and de Haas, G.H.** (1973) Action of phospholipase A at interfaces. *J Biol Chem*, **248**, 4023-4034.
- Verger, R., Rietsch, J., Van Dam-Mieras, M.C. and de Haas, G.H.** (1976) Comparative studies of lipase and phospholipase A₂ acting on substrate monolayers. *J Biol Chem*, **251**, 3128-3133.

- Wagner, K. and Brezesinski, G.** (2007) Phospholipase D activity is regulated by product segregation and the structure formation of phosphatidic acid within model membranes. *Biophys J*, **93**, 2373-2383.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F. and Wang, X.** (2000) Involvement of Phospholipase D in Wound-Induced Accumulation of Jasmonic Acid in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**, 2237-2246.
- Wang, X.** (1997) Molecular analysis of phospholipase D. *Trends Plant Sci*, **2**, 261-266.
- Wang, X.** (1999) The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiol*, **120**, 645-652.
- Wang, X.** (2000) Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog Lipid Res*, **39**, 109-149.
- Wang, X.** (2001) Plant Phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **52**, 211-231.
- Wang, X.** (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 329-336.
- Wells, M.A.** (1974) The mechanism of interfacial activation of phospholipase A2. *Biochemistry*, **13**, 2248-2257.
- White, P.J. and Broadley, M.R.** (2003) Calcium in plants. *Ann Bot*, **92**, 487-511.
- Xu, L., Zheng, S., Zheng, L. and Wang, X.** (1997) Promoter analysis and expression of a phospholipase D gene from castor bean. *Plant Physiol*, **115**, 387-395.
- Yeagle, P.L.** (1989) Regulation of membrane function through composition, structure, and dynamics. *Ann N Y Acad Sci*, **568**, 29-34.
- Young, S.A., Wang, X. and Leach, J.E.** (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, C.H., Liu, S.Y. and Panagia, V.** (1996) The transphosphatidylase activity of phospholipase D. *Mol Cell Biochem*, **157**, 101-105.
- Zhai, X., Li, J., Brezesinski, G., He, Q., Mohwald, H., Lai, L., Liu, Y., Liu, L. and Gao, Y.** (2003) Direct observations of the cleavage reaction of an L-DPPC monolayer catalyzed by phospholipase A2 and inhibited by an indole inhibitor at the air/water interface. *Chembiochem*, **4**, 299-305.
- Zhang, X. and Keiderling, T.A.** (2006) Lipid-induced conformational transitions of beta-lactoglobulin. *Biochemistry*, **45**, 8444-8452.
- Zhang, X., Rizo, J. and Südhof, T.C.** (1998) Mechanism of Phospholipid Binding by the C2A-Domain of Synaptotagmin I. *Biochemistry*, **37**, 12395-12403.
- Zhao, J. and Wang, X.** (2004) Arabidopsis phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **279**, 1794-1800.

-
- Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M. and Wang, X.** (2000) Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase dalpha and beta. *J Biol Chem*, **275**, 19700-19706.
- Zheng, L., Shan, J., Krishnamoorthi, R. and Wang, X.** (2002) Activation of Plant Phospholipase D α by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate: Characterization of Binding Site and Mode of Action. *Biochemistry* **41**, 4546-4553.

Publikationen, Tagungsbeiträge und Poster

Publikationen

Kuppe, K., Kerth, A., Blume, A. and Ulbrich-Hofmann, R. (2008) Calcium-induced membrane microdomains trigger plant phospholipase D activity. *Chembiochem*, **9**, 2853-2859.

Lerchner, A., Mansfeld, J., **Kuppe, K.** and Ulbrich-Hofmann, R. (2006) Probing conserved amino acids in phospholipase D (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for their importance in hydrolysis and transphosphatidylolation activity. *Protein Eng Des Sel*, **19**, 443-452.

Tagungsbeiträge

Kuppe, K., Blume, A. and Ulbrich-Hofmann, R. (2008) Calcium induced lateral phase separation triggers phospholipase D activity. Ausgewählter Vortrag, *48th International Conference on the Bioscience of Lipids*, Turku, Finland, 04.09-08.09.2007

Kuppe, K. (2007) Calcium induced lateral phase separation triggers phospholipase D activity. Vortrag, *Fall Meeting – Graduiertenkolleg 1026*, Wittenberg, 06.–08.09.2007

Kuppe, K. (2007) Working at the interface - phospholipase D studies. Vortrag, *Spring Meeting – Graduiertenkolleg 1026*, Oppurg, 08.03.–10.03.2007

Kuppe, K. (2006) How do membrane properties affect phospholipase D activity? Vortrag, *Spring Meeting – Graduiertenkolleg 1026*, Weimar, 17.–19.03.2006

Kuppe, K. (2005) Studies on the interfacial activation of phospholipase D. Vortrag, *Fall Meeting – Graduiertenkolleg 1026*, Wittenberg, 02.–04.09.2005

Poster

Kuppe, K. and Ulbrich-Hofmann, R. (2007) Activation of a plant phospholipase D by phosphatidic acid. *Membrane interacting peptides and proteins – International Bunsen Discussion Meeting*, Halle, 28.03.-31.03.2007

Kuppe, K. and Ulbrich-Hofmann, R. (2007) Phospholipase D activation by calcium induced phase separation. *6th European Biophysics Congress*, London, UK, 14.07.-18.07.2007

Lebenslauf

Name: Kuppe
Vorname: Konstantin
Geburtsdatum: 08. Juli 1979
Geburtsort: Halle (Saale)
Wohnanschrift: Franz-Andres-Straße 15, 06108 Halle (Saale)
Familienstand: Verheiratet, 2 Söhne
Staatsangehörigkeit: Deutsch

1998 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife,
Landesgymnasium Latina August Hermann Francke, Halle/Saale

1998-1999 Zivildienst

1999-2000 Studium der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2000-2004 Studium der Biologie, Universität Leipzig

04-12/2004 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie,
Potsdam-Golm
Thema: Die interne und externe Unterdrückung der Photorespiration bei Arabidopsis thaliana

04/2005 Beginn der Promotion in der Abteilung „Technische Enzymologie“ am Institut
bis 09/2007 für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs 1026 „Conformational transitions in macromolecular interactions“

seit 10/2007 Umweltreferendar am
Ministerium für Landwirtschaft und Umwelt des Landes Sachsen-Anhalt

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die auf ihre Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann möchte ich dafür danken, mir dieses äußerst interessante und vielschichtige Thema übertragen zu haben. Das rege Interesse am Fortgang der Experimente, die anregenden Diskussionen sowie die relative Freiheit bei der Ausgestaltung der Thematik haben mich stets motiviert.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Alfred Blume, welcher mir den Zugang zur DSC- und Filmwaagetechnik ermöglicht und entscheidende Hinweise für die Planung der Experimente gegeben hat.

Für die unerlässliche Hilfe bei der Durchführung der Messungen sowie die Diskussion der Ergebnisse möchte ich Herrn Dr. Andreas Kerth, Herrn Dr. Christian Schwieger und Herrn Dr. Ahmad Arouri aus dem Institut für Physikalische Chemie danken.

Herrn Dr. Hagen Hofmann danke ich für die sehr konstruktiven Gespräche, welche dem Gelingen der Arbeit in vielerlei Hinsicht zuträglich waren.

Dank gebührt auch dem Rest der Abteilung Technische Enzymologie, insbesondere Frau Dipl. Biochem. Frau Cindy Schulenburg, Frau Dr. Franziska Leich, Herrn Dipl. Biochem. Martin Dippe und Frau Christa Kuplens, für die angenehme Atmosphäre während und zwischen und nach der Arbeit.

Den Mitgliedern des Graduiertenkolleg 1026 danke ich für die produktiven Seminare und die unkomplizierte Hilfe bei technischen Problemen.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken. Meine Frau Friederike hat mich in allen Phasen der Arbeit unterstützt und mir die nötige Kraft gegeben. Meine Söhne Lennart und Eugen sorgen beständig dafür, die Verhältnismäßigkeit der Dinge zu erkennen. Meinen Eltern und meiner Schwester Kordula danke ich für die unablässige Unterstützung und das Vertrauen.

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 diese 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 noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), den

Konstantin Kuppe