

„Transformation von Phospholipiden durch Phospholipasen A₁ und Phospholipasen D“

Kumulative 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 Martin Dippe

geboren am 3. August 1981 in Wernigerode (Harz)

Gutachter:

1. Prof. Renate Ulbrich-Hofmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Ingo Heilmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Uwe T. Bornscheuer (Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Halle (Saale), den 08. Dezember 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	2
1 Einleitung und Zielstellung	3
2 Theoretischer Teil	5
2.1. Phospholipide – Molekularer Bau, Verwendung und chemische Synthese....	6
2.2. Phospholipase-vermittelte Modifizierung von Phospholipiden	8
2.3. PLD-Enzyme.....	10
2.3.1. Funktion und Mechanismus	10
2.3.2. Kopfgruppenaustausch durch Transphosphatidylierung.....	11
2.4. PLA-Enzyme.....	14
2.4.1. Vorkommen, Einteilung und Katalyse	14
2.4.2. Biokatalytische Anwendung	16
2.5. Gewinnung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften.....	17
2.6. Literaturverzeichnis.....	21
3 Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups	27
Artikel: Chem. Phys. Lipids 152 (2008) 71 – 77	28
4 Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity	35
Artikel: Anal. Biochem. 392 (2009) 169 – 173	36
5 A spectrophotometric microtiterplate assay to determine the transphosphatidylation potential of phospholipase D	41
Artikel: J. Am. Oil Chem. Soc. 87 (2010) 1005 – 1011	42
6 Phospholipases A₁ from the fungus <i>Armillaria ostoyae</i> provide insight into the substrate recognition of α/β-hydrolases	49
Manuskript: eingereicht bei FEBS J. (2011)	50
7 Phospholipid acylhydrolases trigger membrane degradation during fungal sporogenesis	85
Artikel: Fungal Genet. Biol. (2011), im Druck	86
8 Zusammenfassung	96
Anhang	99
Publikationsliste.....	99
Darlegung des Eigenanteils an den verwendeten Publikationen.....	100
Erklärung.....	101
Curriculum vitae	102

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. ostoyae</i>	Dunkler Hallimasch (<i>Armillaria ostoyae</i>)
DAG	Diacylglycerol
E.C.	<u>E</u> nzyme <u>C</u> ommission number
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
PA	Phosphatidsäure; <u>p</u> hosphatidic <u>a</u> cid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PLA	Phospholipase A
PLA ₁	Phospholipase A ₁
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
<i>sn</i>	<u>s</u> tereospecific <u>n</u> umbering
v _H	Hydrolysegeschwindigkeit
v _T	Transphosphatidylierungsgeschwindigkeit

Standardabkürzungen für Aminosäurereste:

D	Asparaginsäure
H	Histidin
K	Lysin
S	Serin

Kapitel 1

Einleitung und Zielstellung

Phospholipide bilden die ubiquitär vorkommenden Hauptbestandteile biologischer Membranen und besitzen vielfältige Anwendungen in der Forschung und der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie. Ihre Herstellung auf chemischem Wege erfordert jedoch oft schwierige mehrstufige Synthesen. Eine Alternative stellen enzymatische Verfahren dar, in denen reaktions- und regiospezifische Enzyme eine Umsetzung unter milden Reaktionsbedingungen und unabhängig von Schutzgruppen bewirken. Insbesondere Phospholipasen sind zu wertvollen Werkzeugen in der präparativen Synthese von definierten Phospholipiden avanciert. So ermöglichen Phospholipasen D (PLDs) die Einführung verschiedener Kopfgruppenalkohole, während eine Entfernung oder Modifizierung von Fettsäure-Resten durch Phospholipasen A (PLAs) katalysiert wird. Den Vorteilen einer solchen enzymvermittelten Synthese steht jedoch häufig das begrenzte Substratspektrum der Enzyme entgegen, so dass deren Anwendbarkeit zumeist auf die Herstellung bestimmter Verbindungen limitiert ist. Daher besteht großes Interesse an Enzymen mit neuartigen Eigenschaften, wie beispielsweise einer veränderten Substratspezifität. Einerseits können solche Enzyme durch Verbesserung bereits bekannter Proteine gewonnen werden, indem durch genetische Manipulation erzeugte Enzymvarianten mit einem geeigneten Assay-System auf entsprechende Eigenschaften selektiert werden (*Screening*). Alternativ ist auch die Auffindung völlig neuartiger Enzyme möglich, indem bisher nicht als Enzymquellen genutzte Organismen auf die gewünschte Aktivität untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit werden ausgewählte Aspekte beider Strategien zur Gewinnung neuer Phospholipasen aufgegriffen.

Ein Teil der Studien befasst sich dabei mit der Optimierung von PLD-Enzymen. Der von PLD katalysierte Kopfgruppenaustausch wurde für die Reaktion von Phosphatidylcholin mit Ethanolamin-Derivaten eingehend charakterisiert und zur präparativen Darstellung von Phospholipiden mit entsprechenden Kopfgruppen genutzt. Nachfolgend wurde ein auf dieser Umsetzung basierender spektroskopischer Assay entwickelt, welcher zur Selektion von PLDs mit hoher Austausch-Effizienz geeignet ist und zum *Screening* von PLD-Varianten dienen kann.

Ein zweiter Teil der Arbeit war der Gewinnung neuer PLA-Enzyme gewidmet. Während vor allem niedere Pilze als Produzenten industriell relevanter PLAs genutzt werden, stellen auch die bisher kaum auf PLA-Produktion untersuchten höheren Pilze (Basidiomyceten) ein potentielles Reservoir derartiger Enzyme dar. Durch ein gezieltes *Screening* wurden verschiedene Basidiomyceten als PLA-Produzenten identifiziert und die durch besonders hohe Enzymaktivität gekennzeichnete Spezies *Armillaria ostoyae* zur Isolierung des entsprechenden Enzyms ausgewählt. Ziel der Reinigung war eine proteinchemische, enzymatische und funktionelle Charakterisierung der endogenen PLA-Aktivität.

Kapitel 2

Theoretischer Teil

2.1. Phospholipide – Molekularer Bau, chemische Synthese und Verwendung

Biologische Membranen bestehen aus einem komplexen Gemisch von Lipiden, welches neben Glycolipiden, Sphingolipiden und Sterolen hauptsächlich Phospholipide enthält. Für die herausragende biologische Bedeutung der Phospholipide ist insbesondere ihre amphiphile Molekülstruktur verantwortlich. Die in Membranen am häufigsten auffindbaren Phospholipide stellen die Glycerophospholipide (Abb. 1A) dar, deren hydrophober Teil von einem 1,2-Diacylglycerol-Rest gebildet wird. Die *sn*-3-Position ist von einem geladenen Phosphodiester besetzt. Teil der Phosphodiester-Struktur ist ein hydrophiler Kopfgruppenalkohol, der eine Einteilung der in der Natur vorkommenden Glycerophospholipide (Abb. 1B) in verschiedene Klassen ermöglicht.

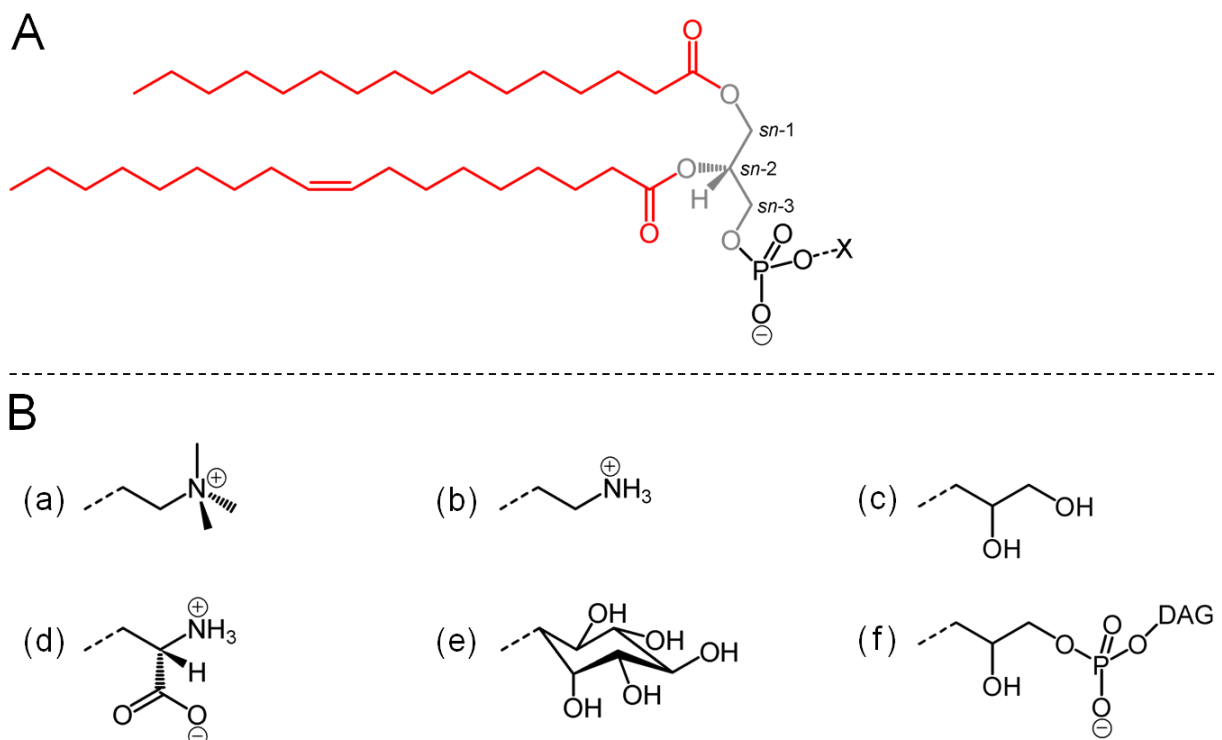


Abb. 1. Aufbau von Glycerophospholipiden. (A) Strukturformel eines 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoesters als Beispiel eines Glycerophospholipids mit heterogener Fettsäure-Zusammensetzung. Der hydrophobe Diacylglycerol-(DAG)-Teil besteht aus den Acylresten (rot) und dem Glycerol-Rückgrat (grau). Die hydrophile Kopfgruppe wird von einem Phosphat- und einem Alkoholrest (X) gebildet. (B) Kopfgruppenalkohole (X) von natürlich vorkommenden zwitterionischen (Phosphatidylcholin [PC; a], Phosphatidylethanolamin [PE; b]) und anionischen Glycerophospholipiden (Phosphatidylglycerol [c], -L-serin [d], -inositol [e], Cardiolipin [f]).

Einen Sonderfall stellt Phosphatidsäure (PA) dar, die keinen Kopfgruppenalkohol besitzt ($X = H$) und daher potentiell zweifach negativ geladen ist.

Aufgrund ihrer Struktur besitzen Phospholipide ausgezeichnete emulgierende Eigenschaften. Daher werden aus natürlichen Quellen wie Sojaöl gewonnene Vertreter in großem Maßstab in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie eingesetzt (Hernandez und Quezada, 2008). Zudem sind Phospholipide zur Selbstorganisation befähigt und bilden in wässrigen Medien spontan Liposomen oder hexagonale Phasen, die sich zur Verpackung pharmazeutischer Wirkstoffe eignen (Chonn und Cullis, 1995). Zur Herstellung derartiger Aggregate werden meist Spezies mit einheitlicher chemischer Struktur verwendet, da diese aufgrund ihrer festgelegten Eigenschaften den aus natürlichen Quellen isolierten Vertretern mit heterogener Fettsäure-Zusammensetzung überlegen sind (Ulrich, 2002).

Eine Synthese von Phospholipiden auf rein chemischem Wege gestaltet sich aufgrund der Vielzahl an funktionellen Gruppen schwierig und macht den Einsatz von Schutzgruppen erforderlich. Ausgehend vom häufig verwendeten Edukt 1,2-Isopropyliden-*sn*-glycerol ist eine derartige Reaktionsfolge in Abbildung 2 beispielhaft dargestellt.

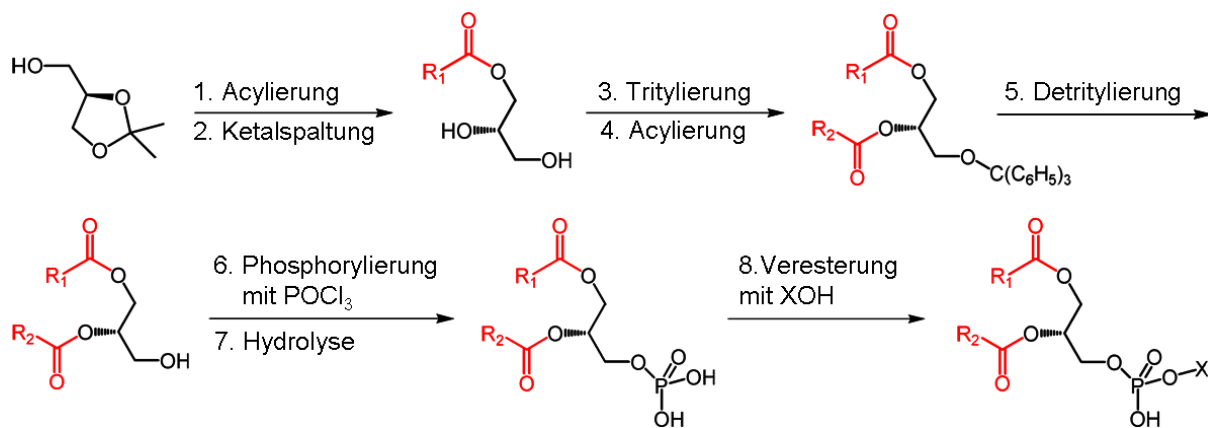


Abb. 2. Synthese eines Phospholipids aus 1,2-Isopropyliden-*sn*-glycerol (nach Paltauf und Hermetter, 1994). Die Blockierung von Hydroxylfunktionen im Edukt und in Zwischenprodukten (3) und eine sequenzielle Abspaltung der entsprechenden Schutzgruppen (2, 5) ermöglicht eine regioselektive Einführung von Acyl- (1, 4) und Phosphorylresten (6). Kopfgruppenalkohole (XOH) mit zusätzlichen reaktionsfähigen Gruppen müssen vor Knüpfung der Esterbindung (8) in den entsprechenden Positionen mit Schutzgruppen derivatisiert werden. Die Acylreste sind rot dargestellt; R_1 und R_2 stellen Alkylketten unterschiedlicher Länge oder Sättigung dar.

Dabei ist insbesondere die Einführung von multifunktionellen Kopfgruppenalkoholen problematisch und an die Verwendung geschützter Derivate geknüpft, um eine selektive Veresterung bestimmter Hydroxylgruppen zu gewährleisten.

Andere Synthesestrategien gehen z.B. von auf Zuckeralkoholen basierenden Edukten wie 3,4-Isopropyliden-D-mannitol (Eibl und Woolley, 1988), von Glycerol-3-phosphat (Gupta et al., 1977) oder – speziell zur Gewinnung von PC – von *sn*-Glycero-3-phosphocholin (Hermetter et al., 1989) aus. Eine Alternative zu den beschriebenen Verfahren stellen enzymkatalysierte Synthesen dar, die im Folgenden näher vorgestellt werden.

2.2. Phospholipase-vermittelte Modifizierung von Phospholipiden

Enzymreaktionen sind durch eine hohe Reaktions-, Regio- und Stereospezifität gekennzeichnet, die eine Modifizierung definierter funktioneller Gruppen der jeweiligen Substrate ermöglicht. In enzymkatalysierten Synthesen entfällt daher die kostenintensive Anwendung schutzgruppen-modifizierter Edukte. Andererseits treten kaum Nebenreaktionen auf, wodurch eine nachfolgende Reinigung der Produkte vereinfacht wird. Einen weiteren Vorteil stellen die milden Reaktionsbedingungen dar, die im Fall von Phospholipiden unerwünschten Oxidations- oder Racemisierungsprozessen entgegenwirken.

In der Phospholipidsynthese werden verschiedene phospholipid-spaltende Enzyme eingesetzt, die spezifisch bestimmte Strukturregionen des Lipids angreifen (Abb. 3). Phospholipasen A (PLAs) katalysieren die hydrolytische Abspaltung der Fettsäurereste und werden nach ihrem Angriffsort in Phospholipasen A₁ (PLA₁s, E.C. 3.1.1.32) oder Phospholipasen A₂ (PLA₂s, E.C. 3.1.1.4) unterschieden. Demgegenüber haben Phospholipasen B (PLBs, E.C. 3.1.1.5) keine ausgeprägte Präferenz für eine der Fettsäurepositionen und sind in der Lage, beide Acylreste des Phospholipids abzuspalten. Die PLA₁- und PLA₂-vermittelte Hydrolyse von Phospholipiden dient zur Darstellung von 1- oder 2-Monoacylphospholipiden (D'Arrigo und Servi, 2010). Diese allgemein als Lysophospholipide bezeichneten Verbindungen sind vielfältig einsetzbare hydrophile

Emulgatoren und werden daher in industriellem Maßstab produziert (Büschelberger, 2004). Zugleich können Lysophospholipide durch chemische Reacylierung (Abb. 3) in Diacylphospholipide überführt werden (Mason et al., 1981; Rosseto und Hajdu, 2005).

Auf diesem Weg lässt sich die Fettsäure-Zusammensetzung in der *sn*-1- und *sn*-2-Position von Phospholipiden auf einfache Weise modulieren. Das Verfahren ist besonders zur Gewinnung von Phospholipiden mit definierter Fettsäurestruktur aus den in großen Mengen verfügbaren Phospholipid-Spezies natürlicher Herkunft geeignet. Zusätzlich zu den

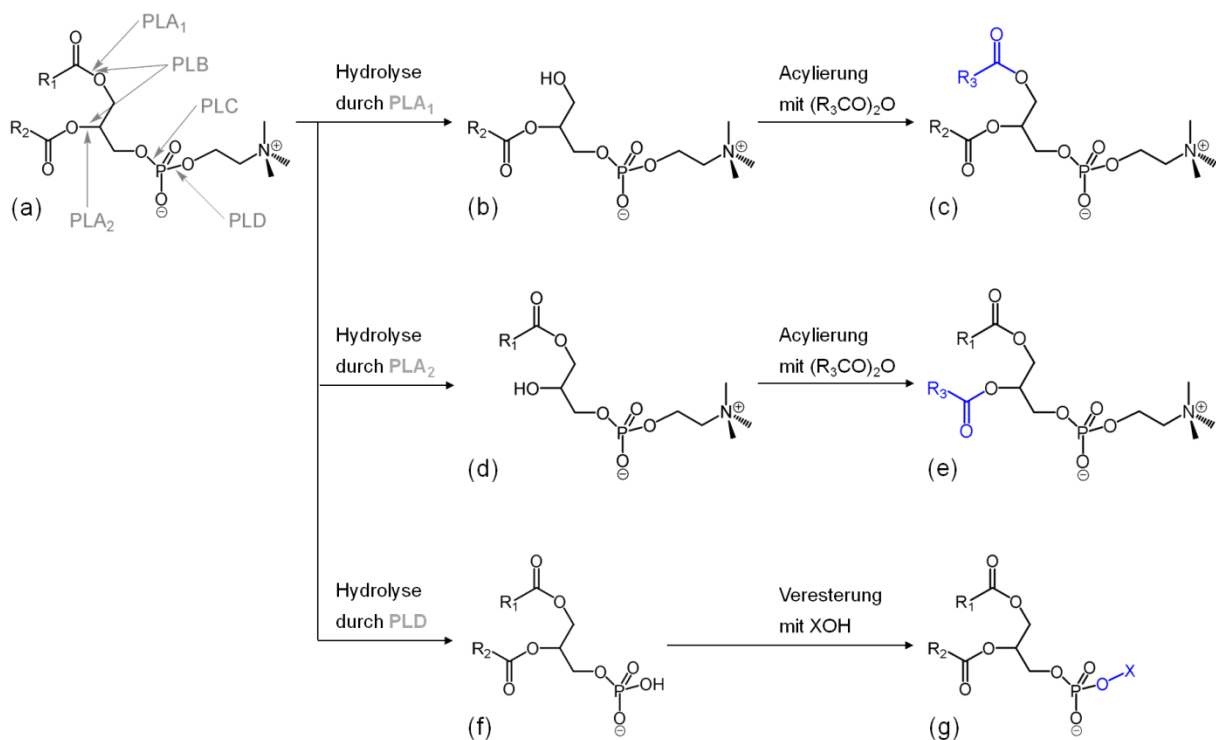


Abb. 3. Nutzung von Phospholipasen zur Modifizierung von Glycerophospholipiden (nach D'Arrigo und Servi, 1997). Am Beispiel von PC (a) ist die regiospezifische Hydrolyse von Phospholipiden durch verschiedene Phospholipasen gezeigt. Die Hydrolyse von Acylresten durch PLA_1 oder PLA_2 führt zur Entstehung von regioisomeren 1-Lyso- (b) oder 2-Lysophosphatidylcholinen (d), aus denen mittels chemischer Reacylierung fettsäure-modifizierte PC-Spezies (c, e) zugänglich sind. Analog werden Phospholipide mit veränderter Kopfgruppe (g) aus PA (f) gewonnen, die durch PLD -vermittelte Hydrolyse erhalten wird und mit dem entsprechenden Alkohol (XOH) umgesetzt werden kann (Burnett et al., 1985; Hostetler et al., 1990). Die modifizierten Reste sind im Endprodukt blau hervorgehoben. R_1 , R_2 und R_3 repräsentieren Alkylreste unterschiedlicher Kettenlänge und Sättigung.

geschilderten zweistufigen Umsetzungen sind PLA₁- und PLA₂-Enzyme in der Lage, den zu modifizierenden Acylrest direkt gegen die gewünschte Fettsäure auszutauschen (Adlercreutz et al., 2003). Diese elegante Methode erübrigt die Isolierung der teilweise zur Umlagerung des Acylrestes (Plückthun und Dennis, 1982) neigenden Lysophospholipide.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Acylhydrolasen greifen Phospholipase C (PLC, E.C. 3.1.4.3) und Phospholipase D (PLD, E.C. 3.1.4.4) die zentrale bzw. die terminale Phosphodiesterbindung von Phospholipiden an (Abb. 3). Insbesondere letztere Reaktion wird seit langem zur Gewinnung von PA herangezogen. Durch Verknüpfung mit unterschiedlichen Alkoholkomponenten können aus PA Phospholipide mit nicht natürlich vorkommenden Kopfgruppen generiert werden (Burnett et al., 1985; Hostetler et al., 1990). In Gegenwart geeigneter Alkohole sind viele PLDs befähigt, neben der Freisetzung von PA bevorzugt die direkte Übertragung des Phosphatidsäurerests auf geeignete Alkohole zu katalysieren (D'Arrigo und Servi, 1997; Ulbrich-Hofmann, 2000).

Aufgrund der herausragenden Bedeutung von PLD- und PLA-Enzymen für biokatalytische Anwendungen wird im Folgenden auf beide Enzymklassen gesondert eingegangen.

2.3. PLD-Enzyme

2.3.1. Funktion und Mechanismus

PLDs sind in der Natur ubiquitär verbreitet und wurden in Bakterien (Uesugi und Hatanaka, 2009), Pflanzen (Wang, 2000), Hefen (Mendonsa und Engebrecht, 2009) und Säugern (Frohm et al., 1999) beschrieben. Sie katalysieren den intrazellulären Abbau von Membranphospholipiden zu PA, welche als *second messenger* in einer Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen involviert ist (Cazzolli et al., 2006). Daher besitzen PLDs eine zentrale Funktion in regulierten Vorgängen wie z.B. der Vesikelfusion (Roth, 2008), der Assemblierung des Cytoskeletts (Rudge und Wakelam, 2009) oder der Verarbeitung von abiotischem Stress (Li et al., 2009).

Abgesehen von einigen phosphatase-ähnlichen Enzymen mit PLD-Aktivität (Ulbrich-Hofmann, 2003) gehören alle bekannten PLDs zur PLD-Superfamilie. Proteine dieser Superfamilie sind durch den Besitz von zwei sogenannten HKD-Sequenzmotiven gekennzeichnet (Ponting und Kerr, 1996). Diese enthalten je einen für die Katalyse unentbehrlichen Histidin-, Lysin- und Asparaginsäurerest und bilden zusammen das aktive Zentrum des Enzyms (Abb. 4A) (Leiros et al., 2000). Der Katalysezyklus (Abb. 4B) umfasst zwei Einzelschritte, an denen einer der oben erwähnten Histidinreste als Nucleophil beteiligt ist: Nach dem Angriff des Imidazol-Stickstoffs an das Phospholipid-Substrat wird unter Abspaltung der Kopfgruppe ein Phosphatidyl-Histidin-Intermediat gebildet, das anschließend hydrolytisch gespalten wird, um das Endprodukt PA freizusetzen (Leiros et al., 2004). In diesem zweiten Reaktionsschritt können geeignete Alkohole die Funktion des angreifenden Wassermoleküls übernehmen, wodurch der entsprechende Alkohol in die Kopfgruppe des Phospholipids eingeführt wird (Abb. 4B). Diese Umesterungsreaktion wird auch als Transphosphatidylierung bezeichnet.

Neben einem katalytisch aktiven Proteinbereich besitzen eukaryontische PLDs zusätzliche regulatorische Domänen die entsprechenden Enzymen bakterieller Herkunft fehlen (Mansfeld und Ulbrich-Hofmann, 2009). Diese Strukturelemente sind für die Abhängigkeit der Säuger-PLDs von Phosphoinositiden (Stahelin et al., 2004) oder der pflanzlichen PLDs von Calcium-Ionen (Zheng et al., 2000) verantwortlich.

2.3.2. Kopfgruppenaustausch durch Transphosphatidylierung

Die PLD-katalysierte Transphosphatidylierung von Phospholipiden (2.3.1) eröffnet die Möglichkeit, ein breites Spektrum von Alkoholkomponenten, sogenannten Akzeptoralkoholen, zur Generierung artifizierender Phospholipide zu nutzen (Übersicht in Ulbrich-Hofmann, 2000). Als Akzeptoralkohole können gesättigte (Yang et al., 1967), ungesättigte (Kovatchev und Eibl, 1978) und mehrwertige (Dawson, 1967) aliphatische Alkohole, Phenole (Takami et al., 1994), natürliche Kopfgruppenkomponenten wie Ethanolamin (Yang et al., 1967), Serin (Comfurius und Zwaal, 1977) und *myo*-Ino-

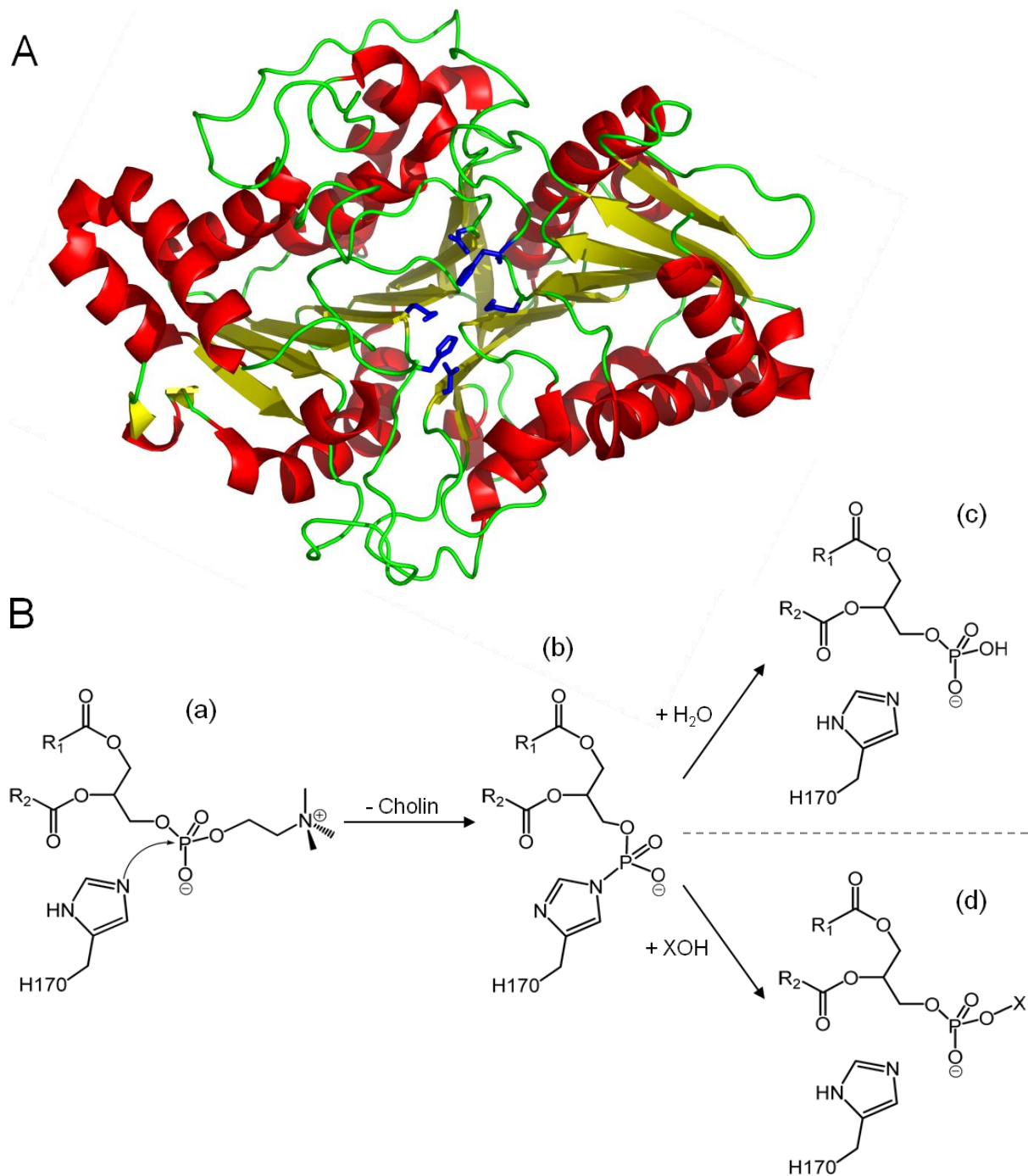


Abb. 4. Struktur und Mechanismus von PLD-Enzymen. (A) Röntgenkristallstruktur der PLD aus *Streptomyces* sp. Stamm PMF (Leiros et al., 2000; Accession-Nr. 1V0S). Die Strukturdaten wurden der PDB-Datenbank (<http://www.pdb.org>) entnommen und mit der Software PyMol (<http://www.pymol.org>) visualisiert. Rot, α -Helices; gelb, β -Faltblatt-Elemente; grün, Loopregionen. Die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste H170, K172, D202, H448, K450 und D473 sind blau dargestellt. (B) Katalysemechanismus der PLD aus *Streptomyces* sp. (nach Leiros et al., 2004). Durch Reaktion des nucleophilen H170 mit dem Phospholipidsubstrat – in diesem Beispiel PC (a) – wird ein Phosphatidyl-Imidazol (b) gebildet, das durch Hydrolyse zu PA (c) oder durch Reaktion mit einem Alkohol (XOH) zum Transphosphatidylierungsprodukt (d) umgewandelt wird.

sitol (Mandal et al., 1980), N-heterozyklische Verbindungen (Hirche et al., 1997) und bioaktive Substanzen wie Ascorbinsäure (Nagao et al., 1991), Tocopherol-Derivate (Koga et al., 1994) und 5-Fluoruridin (Shuto et al., 1995) dienen.

In solchen Transphosphatidylierungsreaktionen verläuft die Umesterung stets in Konkurrenz zur unerwünschten hydrolytischen Bildung von PA. Die Ausbeute des Transphosphatidylierungsprodukts hängt dabei stark vom verwendeten Akzeptoralkohol, der Quelle der PLD und vom Reaktionsmedium ab (Hirche und Ulbrich-Hofmann, 2000). Zum Vergleich unterschiedlicher Umesterungsreaktionen wird entweder das Verhältnis der Transphosphatidylierungs- (v_T) zur Hydrolysegeschwindigkeit (v_H), welches als Transphosphatidylierungspotential (v_T/v_H) bezeichnet wird, oder die Transphosphatidylierungseffizienz ($v_T/(v_T+v_H)$) herangezogen. In Synthesen werden insbesondere bakterielle PLDs eingesetzt, da diese nur geringe Hydrolyseaktivität zeigen (Ulbrich-Hofmann et al., 2005) und deshalb den traditionell verwendeten pflanzlichen Vertretern überlegen sind. Trotz der geringeren Effizienz tolerieren die pflanzlichen Enzyme jedoch größere Veränderungen im hydrophoben Teil des Lipids und können daher zur Transphosphatidylierung phospholipid-analoger Verbindungen angewandt werden. Beispielsweise wird das Enzym aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata) bevorzugt in der Synthese der cytostatisch wirksamen Octadecylphosphoester (Aurich et al., 1997; Aurich et al., 2002) eingesetzt.

Viele nah verwandte PLDs, wie z.B. zwei Isoenzyme aus Schlafmohn (*Papaver somniferum*) zeigen trotz hoher Sequenzidentität (97 %) (Lerchner et al., 2005) starke Unterschiede in der Transphosphatidylierung verschiedener Akzeptoralkohole (Dippe und Ulbrich-Hofmann, 2009). Daraus ist ersichtlich, dass die biokatalytischen Eigenschaften von PLDs von wenigen Aminosäurepositionen determiniert werden. Tatsächlich lässt sich die Transphosphatidylierungseffizienz von pflanzlichen PLDs durch einen gezielten Austausch von Aminosäuren steigern (Lerchner et al., 2006). Daher werden insbesondere gentechnische Verfahren wie die molekulare Evolution (siehe 2.5) als vielversprechende Methoden zur Erzeugung von PLD-Enzymen mit ausschließlicher Transphosphatidylierungsaktivität und breitem Substratspektrum angesehen.

2.4. PLA-Enzyme

2.4.1. Vorkommen, Einteilung und Mechanismus

PLA-Enzyme besitzen vielfältige Funktionen im Stoffwechsel von Phospholipiden (Lambeau und Gelb, 2008; Burke und Dennis, 2009). Neben der Metabolisierung von mit der Nahrung aufgenommenen Membranlipiden sind sie von zentraler Bedeutung für die intrazelluläre Signalverarbeitung und am tierischen Eicosanoid- (Pérez-Chacón et al., 2009) bzw. dem pflanzlichen Octadecanoid-Stoffwechsel (Ryu, 2004) beteiligt. Andere Vertreter bilden die wirksamen Bestandteile von Insekten- und Schlangengiften (Gutiérrez und Ownby, 2003).

Ein Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener PLA-Enzyme zeigt, dass diese eine heterogene Gruppe von Proteinen bilden, die auf mehrere phylogenetische Ursprünge zurückgeht. Enzyme mit PLA₂-Aktivität wurden anhand derartiger Studien in fünf Hauptklassen eingeteilt (Schaloske und Dennis, 2006). Die Gruppe der in extrazellulären Flüssigkeiten vorkommenden sekretorischen PLA₂s weist eine strikte Spezifität für die *sn*-2-Position in Phospholipiden auf. Sekretorische PLA₂s sind durch ein niedriges Molekulargewicht (14 – 18 kDa) charakterisiert. Ihre Raumstruktur (Abb. 5A) zeigt einen hohen Anteil an α -helikalen Strukturelementen und Disulfidverbrückung (Scott und Sigler, 1994). Die Anwesenheit eines Ca²⁺-Ions im aktiven Zentrum ist essentiell für die katalytische Aktivität, da über das Metall-Ion ein reaktives Wassermolekül koordiniert wird. Der Angriff des Wassers auf die zu spaltende Esterbindung wird durch eine katalytische Diade ermöglicht, die aus einem Histidin- und Asparaginsäurerest besteht und im Verlauf des Katalysezyklus als Protonenrelais fungiert (Dijkstra et al., 1981; Yu und Dennis, 1991).

Die vier weiteren Klassen von PLA₂s, die fast ausschließlich durch intrazelluläre und membranständige Proteine repräsentiert werden, weisen keine Sequenzhomologie zu den sekretorischen Enzymen auf und unterscheiden sich demzufolge auch in ihrer Tertiärstruktur. Die katalytische Domäne entsprechender Enzyme besteht aus einem zentralen mehrsträngigen β -Faltblatt, das von α -Helices umgeben ist (Abb. 5B) (Dessen et al., 1999; Samanta und Bahnson, 2008).

Ähnliche Faltungsmotive sind auch bei anderen Enzymen mit Acylhydrolase-Aktivität wie PLA₁s (Aoki et al., 2007), PLBs (Jones et al., 2007), Triglycerid-Lipasen und Carboxypeptidasen (Holmquist, 2000) zu finden, die dementsprechend zur Superfamilie der α/β -Hydrolasen zusammengefasst werden. Ein weiteres Merkmal solcher α/β -Hydrolasen ist die metallunabhängige Katalyse über ein nucleophiles Serin, das zusammen mit einer sauren Aminosäure (und einem Histidin) eine katalytische Diade (Triade) bildet. Bei der Hydrolyse einer Esterbindung durch PLA₂s des α/β -Hydrolase-Typs (Abb. 6) wird der abgespaltene Acylrest auf das katalytische Serin transferiert. Der entstandene Serinester wird anschließend zur freien Fettsäure hydrolysiert.

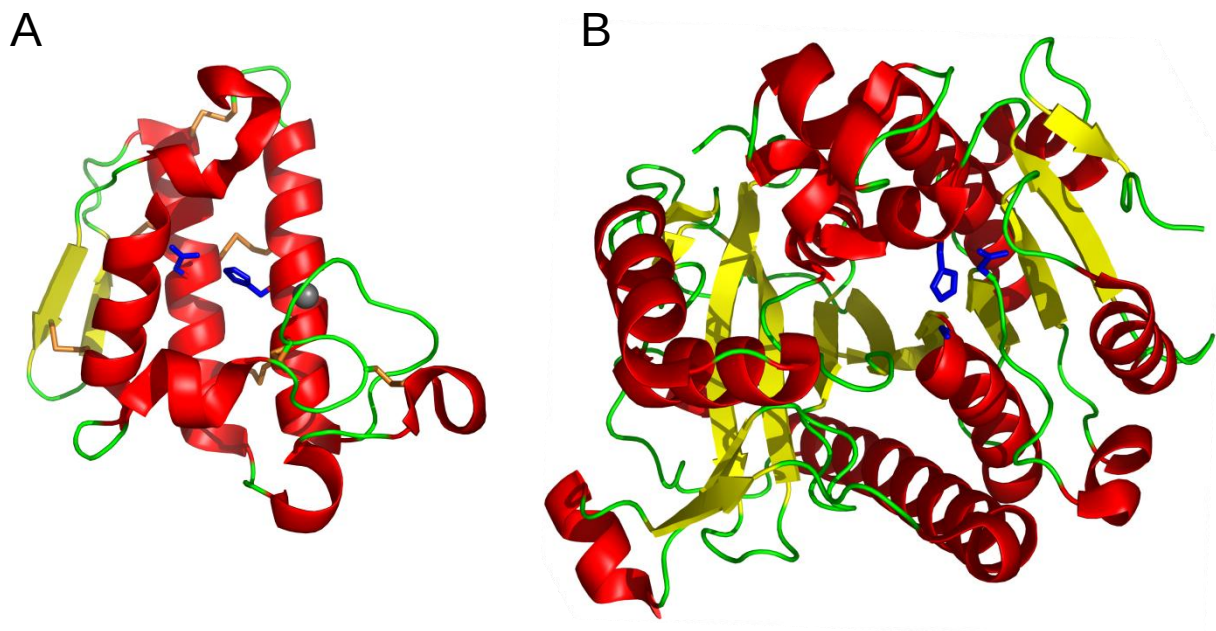


Abb. 5. Röntgenkristallstrukturen von PLA₂-Enzymen. Die Strukturdaten wurden der PDB-Datenbank (<http://www.pdb.org>) entnommen und mit der Software PyMol (<http://www.pymol.org>) visualisiert. Rot, α -Helices; gelb, β -Faltblatt-Elemente; grün, Loopregionen; orange, Disulfidbrücken. (A) Sekretorische PLA₂ aus Schweinepankreas (Finzel et al., 1991; Accession-Nr. 4P2P). Das aktive Zentrum wird durch die Aminosäurereste H48 und D99 (blau) und ein gebundenes Calcium-Ion (grau) gebildet. (B) Humane Plättchenaktivierender Faktor (PAF)-Acetylhydrolase (Samanta und Bahnson, 2008; Accession-Nr. 3D5E). Das zur Gruppe der α/β -Hydrolasen gehörende Enzym besitzt eine katalytische Triade aus den Aminosäureresten S273, H351 und D296 (blau).

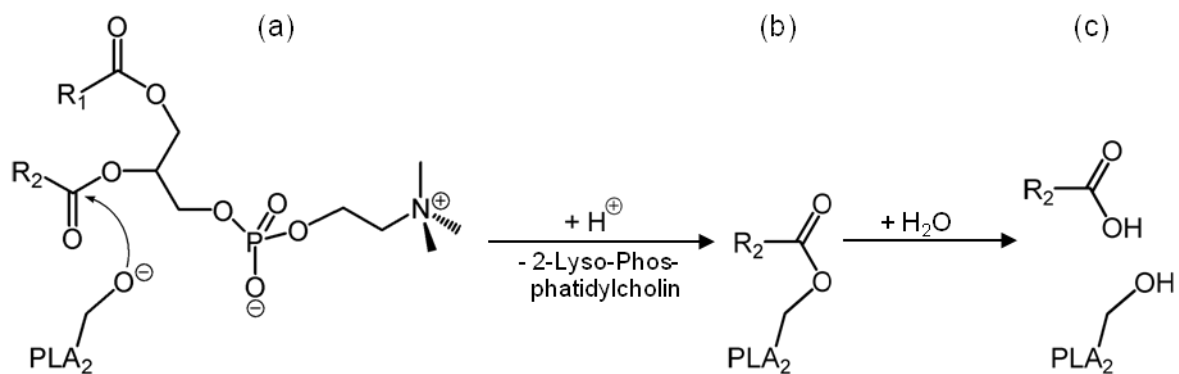


Abb. 6. Katalysemechanismus von PLA₂s des α/β-Hydrolase-Typs (nach Ghosh et al., 2006). Durch Reaktion des reaktiven Serinrests mit dem Substrat PC (a) wird ein Acylserin (b) gebildet. Die Hydrolyse der entstandenen Esterbindung führt zur Freisetzung der Fettsäure (c).

Die Regiospezifität vieler phospholipid-umsetzender α/β-Hydrolasen ist weniger strikt ausgeprägt als bei sekretorischen PLA₂s. Da manche Enzyme mit PLA₁- oder PLA₂-Aktivität in geringem Maße auch die jeweils andere Fettsäure-Position angreifen (Robinson und Waite, 1983; Loo et al., 1997; Shinozaki and Waite, 1999), ist eine deutliche Abgrenzung zu den PLB-Enzymen oft schwer möglich. Zudem besitzen einige Vertreter ein breites Substratspektrum und sind in der Lage, neben Phospholipiden auch Lysophospholipide (Oishi et al., 1999; Lio und Dennis, 1998) und neutrale Glyceride (Simons et al., 1996) umzusetzen.

2.4.2. Biokatalytische Anwendung

Die Hydrolyse von Phospholipiden durch PLA₁- und PLA₂-Enzyme dient nicht nur zur Herstellung der korrespondierenden Lysophospholipide (2.2), sondern wird auch zur Raffination von Pflanzenölen genutzt. Während dieser als *degumming* bezeichneten Aufarbeitung werden die enthaltenen Phospholipide enzymatisch in Lysolipide umgewandelt, die leicht extrahiert werden können (Buchold, 1993). Eine Entfernung der Phospholipide ist für die weiterführende Veredlung der pflanzlichen Triglyceride z.B. zu Biokraftstoffen unerlässlich.

Die Abspaltung der Acylreste von Phospholipiden ist auch durch enzymatische Alkoholyse möglich. Bei Phospholipasen des α/β -Typs können einwertige Alkohole oder Glycerol die Funktion des Wassermoleküls bei der Spaltung des kovalenten Intermediats (2.4.1, Abb. 6) übernehmen. Als Reaktionsprodukte werden dementsprechend Fettsäurealkylester (Pinsirodom und Parkin, 2000) oder Monoglyceride (Hanel und Gelb, 1995) gebildet. Nach dem gleichen Prinzip katalysieren verschiedene PLA-Enzyme die Bildung von Phospholipiden aus Lysophospholipiden. In dieser Transacylase-Reaktion wird die freie Hydroxylgruppe eines Lysophospholipid-Moleküls als Akzeptor für den Acylrest eines zuvor gespaltenen Lysophospholipids genutzt (Hirano et al., 2004).

In formaler Umkehr der Hydrolysereaktion sind PLA-Enzyme zudem zur Veresterung von Lysophospholipiden mit Carbonsäuren befähigt (Pernas et al., 1990). Gemäß dem Massenwirkungsgesetz werden solche Reaktionen in Reaktionssystemen mit reduziertem Wasseranteil durchgeführt (Mingarro et al., 1994; Egger et al., 1997). Insbesondere die chemisch labilen polyungesättigten Fettsäuren werden auf diesem Weg in Phospholipide inkorporiert (Hosokawa et al., 1995). Auf einer derartigen Veresterungsreaktion basiert auch ein Teilschritt der Acidolyse von Phospholipiden, d.h. des direkten Austauschs eines Acylrests. Dabei wird das Phospholipid-Substrat zuerst hydrolytisch gespalten. Anschließend katalysiert das verwendete Enzym die Umsetzung des intermediären Lysophospholipids mit einer zugesetzten Fettsäure (Hosokawa et al., 1998). Anstelle von PLAs werden bei derartigen Acyltransfer-Reaktionen häufig Triglycerid-Lipasen (E.C. 3.1.1.3) eingesetzt, deren breites Substratspektrum auch Phospholipide umfasst. Vor allem die schwer zugänglichen PLA₁s sind z.B. durch die *sn*-1,3-spezifischen Lipasen aus *Rhizomucor* (Haraldsson und Thorarensen, 1999) oder *Rhizopus*-Arten (Svensson et al., 1992) ersetzbar.

2.5. Gewinnung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften

Der Einsatz von Enzymen in biokatalytischen Prozessen ist häufig durch die natürliche Reaktions- und Substratspezifität der eingesetzten Proteine limitiert. So werden phospholipase-vermittelte Umesterungen meist durch eine unerwünschte hydrolytische

Spaltung des Substrats begleitet (siehe 2.3.2 und 2.4.2). Zudem ist eine Einführung vieler artifizieller Akzeptoralkohole oder Fettsäuren in Phospholipide durch natürlich vorkommende PLD- oder PLA-Enzyme nicht möglich. Weitere kritische Parameter sind die geringe Aktivität der verwendeten Biokatalysatoren oder deren mangelnde Stabilität gegenüber thermischer oder chemischer Denaturierung. Insbesondere Phospholipid-Transformationen werden meist in wässrig-organischen Zweiphasensystemen durchgeführt (Ulbrich-Hofmann, 2000), da sich die Phospholipide in solchen Reaktionssystemen hauptsächlich in der organischen, wasserunlöslichen Phase befinden, so dass eine leichte Abtrennung der Produkte sowie eine Wiederverwendung der Enzymlösung gewährleistet ist. Einer derartigen Prozessführung steht jedoch die oftmals unzureichende Aktivität und Stabilität der Enzyme in Gegenwart organischer Lösungsmittel entgegen (Hudson et al., 2005).

Aufgrund der genannten Nachteile besteht ein großes Interesse an der Auffindung von Enzymen mit erweiterter Substratspezifität und erhöhter Proteinstabilität. Durch gezieltes Sondieren (*Screening*) von verschiedenen Organismen nach den entsprechenden Aktivitäten ist es möglich, bisher nicht als Enzymproduzenten bekannte Spezies als Quelle von neuartigen Biokatalysatoren zu identifizieren. Besonders erfolgversprechend ist das *Screening* von Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen. Speziell Vertreter aus Biotopen mit extremen Lebensbedingungen ermöglichen die Gewinnung von lipid-modifizierenden Enzymen, die tolerant gegenüber denaturierenden Einflüssen wie hohen Temperaturen, extremen pH-Werten oder Lösungsmitteln sind (Demirjian et al., 2001).

Enzymproduzierende Mikroorganismen werden meist auf einfache Weise über das Wachstum auf dem jeweiligen Substrat angereichert und detektiert. Enzyme nicht kultivierbarer Spezies werden durch alternative Verfahren erfasst, die aus Umweltproben isolierte Nukleinsäuren nutzen (*metagenomics*; Uchiyama und Miyasaki, 2009). Potentielle Zielproteine werden dabei entweder auf Genebene über die Homologie zu bekannten Proteinen identifiziert (Kim et al., 2009) oder können nach Übertragung des genetischen Materials in geeignete Expressionssysteme anhand ihrer Enzymaktivität nachgewiesen werden (Rondon et al., 2000; Lämmle et al., 2007.)

Neben der Suche nach hochwertigen Enzymen natürlichen Ursprungs ist es möglich, bereits bekannte Vertreter durch gentechnische Veränderung, d.h. eine Mutagenese der entsprechenden Gensequenz, zu verbessern. Beim sogenannten rationalen Proteindesign wird ein gezielter Austausch einzelner oder mehrerer Aminosäurereste realisiert. Dieses Verfahren erfordert jedoch eine detaillierte Kenntnis der Raumstruktur des jeweiligen Proteins. Beim Fehlen von struktureller Information erfolgt eine Optimierung über molekulare Evolution, die auf Zufallsmutagenese (Labrou, 2010) oder *in vitro*-Rekombination homologer Gensequenzen (*gene shuffling*) (Kaur und Sharma, 2006) beruht. Beide Methoden führen zur Generierung einer großen Vielfalt von Nukleinsäuresequenzen. Die aus einer Expression dieser Sequenzen resultierenden Proteinvarianten müssen anschließend auf die gewünschten Eigenschaften selektiert oder gescreent werden. Ähnlich wie beim *metagenomics*-basierten *Screening* ist für einen solchen Analyseprozess – bedingt durch die Vielzahl an Einzelmessungen – ein Verfahren notwendig, das einen hohen Durchsatz (*high-throughput*) von Proben gestattet. In jüngerer Zeit werden für die Optimierung von Proteinen zunehmend kombinatorische Techniken wie die Sättigungsmutagenese genutzt (Reetz et al., 2009), die ein rationales Proteindesign mit molekularer Evolution verbinden. Derartige Ansätze ermöglichen eine Reduktion der Größe der Nukleinsäure-Bibliotheken und der damit verbundenen Analyseschritte (Kazlauskas und Bornscheuer, 2009).

Zur Umwandlung der Nukleinsäure- in Proteinsequenzen werden verschiedene Strategien genutzt. Die Selektion von ligandenbindenden Proteinen erfolgt häufig über Ribosomen- und Ribonukleinsäure-Displays, die auf der *in vitro*-Translation an isolierten Ribosomen beruhen (Yan und Xu, 2006; Takahashi et al., 2003). Ebenso wie bei der Expression individueller Proteinvarianten auf der Oberfläche einzelner Viruspartikel (Phagen-Display) (Pande et al., 2010) ist das Protein dabei direkt an seinen zugehörigen genetischen Informationsträger gekoppelt. Die Isolierung von Nukleinsäuren, die Proteinvarianten mit hoher Affinität kodieren, ist so leicht möglich, indem entsprechende Konstrukte auf Bindung an immobilisierte Liganden selektiert werden. Somit wird eine Wiederholung des Mutagenese-Zyklus, welche zur weiteren Verbesserung der Bindungsspezifität und -affinität oftmals erforderlich ist, erheblich erleichtert.

Zur Evolution von Proteinen mit Enzymaktivität wird hingegen meist eine Expression des Zielproteins auf der Oberfläche oder im Cytosol von Zellen favorisiert, da aktive Varianten eine Selektion der Wirtszellen auf Indikatormedien ermöglichen. Häufig werden intrazelluläre Expressionssysteme auch zur Charakterisierung der rekombinanten Enzyme herangezogen, da deren Aktivität nach dem Zellaufschluß quantitativ gemessen werden kann (Leemhuis et al., 2009).

2.6. Literaturverzeichnis

- Adlercreutz** P., Lyberg A.-M., Adlercreutz D. (2003). Enzymatic fatty acid exchange in glycerophospholipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 638 – 645.
- Aoki** J., Inoue A., Makide K., Saiki N., Arai H. (2007). Structure and function of extracellular phospholipase A₁ belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89, 197 – 204.
- Aurich** I., Dürrschmidt P., Hirche F., Ulbrich-Hofmann R. (1997). Transesterification of alkylphosphate esters by phospholipase D. *Biotechnol. Lett.* 19, 875 – 879.
- Aurich** I., Dürrschmidt P., Ulbrich-Hofmann R. (2002). Production of octadecylphospho-L-serine by phospholipase D. *Biotechnol. Lett.* 24, 585 – 590.
- Buchold** H. (1993). Enzymatische Phosphatidentfernung aus Pflanzenölen. *Fat. Sci. Technol.* 95, 300 – 304.
- Burke** J.E., Dennis E.A. (2009). Phospholipase A₂ structure/function, mechanism and signaling. *J. Lipid Res.* 50, S237 – 242.
- Burnett** B.K., Robson R.J., Takagaki Y., Radhakrishnan R., Khorana H.G. (1985). Synthesis of phospholipids containing photoactivatable carbene precursors in the headgroups and their crosslinking with membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 815, 57 – 67.
- Büschelberger** H.-G. (2004). Lecithins, in: Whitehurst R.J. Emulsifiers in food technology. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom, Seiten 1 – 39.
- Cazzolli** R., Shemon A.N., Fang M.Q., Hughes W.E. (2006). Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life* 58, 457 – 461.
- Chonn** A., Cullis P.R. (1995). Recent advantages in liposomal drug-delivery systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 698 – 708.
- Comfurius** P., Zwaal R.F.A. (1977). The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 488, 36 – 42.
- D'Arrigo** P., Servi S. (1997). Using phospholipases for phospholipid modification. *Trends Biotechnol.* 15, 90 – 96.
- D'Arrigo** P., Servi S. (2010). Synthesis of lysophospholipids. *Molecules* 15, 1354 – 1377.
- Dawson** R.M.C. (1967). The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D. *Biochem. J.* 102, 205 – 210.
- Demirjian** D.C., Morís-Varas F., Cassidy C.S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 144 – 151.
- Dessen** A., Tang J., Schmidt H., Stahl M., Clark J.D., Seehra J., Somers W.S. (1999). Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 97, 349 – 360.
- Dijkstra** B.W., Kalk K.H., Hol W.G., Drenth J. (1981). Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 147, 97 – 123.

Dippe M., Ulbrich-Hofmann R. (2009). Substrate specificity in phospholipid transformations by plant phospholipase D isoenzymes. *Phytochemistry* 70, 361 – 365.

Egger D., Wehtje E., Adlercreutz P. (1997). Characterization and optimization of phospholipase A₂ catalyzed synthesis of phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1343, 76 – 84.

Eibl H., Woolley P. (1988). Synthesis of enantiomerically pure glyceryl esters and ethers. II. Methods employing the precursor 3,4-isopropylidene-D-mannitol. *Chem. Phys. Lipids* 47, 47 – 53.

Finzel B.C., Ohlendorf D.H., Weber P.C., Salemme F.R. (1991). An independent crystallographic refinement of porcine phospholipase A₂ at 2.4 Å resolution. *Acta Crystallogr. B* 47, 558 – 559.

Frohman M.A., Sung T.C., Morris A.J. (1999). Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 175 – 186.

Ghosh M., Tucker D.E., Burchett S.A., Leslie C.C. (2006). Properties of the Group IV phospholipase A₂ family. *Prog. Lipid Res.* 45, 487 – 510.

Gupta C.M., Radhakrishnan R., Khorana H.G. (1977). Glycerophospholipid synthesis: improved general method and new analogs containing photoactivable groups. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 74, 4315 – 4319.

Gutiérrez J.M., Ownby C.L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 42, 915 – 931.

Hanel A.M., Gelb M.H. (1995). Multiple enzymatic activities of the human cytosolic phospholipase A₂: hydrolytic reactions and acyl transfer to glycerol. *Biochemistry* 34, 7807 – 7818.

Haraldsson G.G., Thorarensen A. (1999). Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1143 – 1149.

Heller M. (1978). Phospholipase D. *Adv. Lipid Res.* 16, 267 – 326.

Hermetter A., Stütz H., Franzmair R., Paltauf F. (1989). 1-O-Trityl-*sn*-glycero-3-phosphocholine: a new intermediate for the facile preparation of mixed-acid 1,2-diacylglycerophosphocholines. *Chem. Phys. Lipids* 50, 57 – 62.

Hernandez E., Quezada N. (2008). Uses of phospholipids as functional ingredients, in: Gunstone F.D. Phospholipid technology and applications. The Oily Press, Bridgwater, United Kingdom, Seiten 83 – 94.

Hirano K., Matsui H., Tanaka T., Matsuura F., Satouchi K., Koike T. (2004). Production of 1,2-didocosahexaenoyl phosphatidylcholine by bonito muscle lysophosphatidylcholine/transacylase. *J. Biochem.* 136, 477 – 483.

Hirche F., Schierhorn A., Scherer G., Ulbrich-Hofmann R. (1997). Enzymatic introduction of N-heterocyclic and As-containing head groups into glycerophospholipids. *Tetrahedron Lett.* 38, 1369 – 1370.

- Hirche F.**, Ulbrich-Hofmann R. (2000). The interdependence of solvent, acceptor alcohol and enzyme source in transphosphatidylation by phospholipase D. *Biocatal. Biotrans.* 18, 343 – 353.
- Holmquist M.** (2000). α/β -Hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1, 209 – 235.
- Hosokawa M.**, Takahashi K., Hatano M., Egi, M. (1995). Phospholipase A₂-mediated synthesis of phosphatidylethanolamine containing highly unsaturated fatty acids. *Int. J. Food Sci. Technol.* 29, 721 – 725.
- Hosokawa M.**, Ito M., Takahashi K. (1998). Preparation of highly unsaturated fatty acid-containing phosphatidylcholine by transesterification with phospholipase A₂. *Biotechnol. Technol.* 12, 583 – 586.
- Hostetler K.Y.**, Stuhmiller L.M., Lenting H.B., van den Bosch H., Richman D.D. (1990). Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. *J. Biol. Chem.* 265, 6112 – 6117.
- Hudson E.P.**, Eppler R.K., Clark D.S. (2005). Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 637 – 643.
- Jones P.M.**, Turner K.M., Djordjevic J.T., Sorrell T.C., Wright L.C., George A.M. (2007). Role of conserved active site residues in catalysis by phospholipase B1 from *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry* 46, 10024 – 10032.
- Kaur J.**, Sharma R. (2006). Directed evolution: an approach to engineer enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 165 – 195.
- Kazlauskas R.J.**, Bornscheuer U.T. (2009). Finding better protein engineering strategies. *Nat.Chem. Biol.* 5, 526 – 529.
- Kim E.Y.**, Oh K.H., Lee M.H., Kang C.H., Oh T.K., Yoon J.H. (2009). Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal of a new family of bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 257 – 260.
- Koga T.**, Nagao A., Terao J., Sawada K., Mukai K. (1994). Synthesis of a phosphatidyl derivative of vitamin E and its antioxidant activity in phospholipid bilayers. *Lipids* 29, 83 – 89.
- Kovatchev S.**, Eibl H. (1978). The preparation of phospholipids by phospholipase D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 101, 5221 – 5226.
- Labrou N.E.** (2010). Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 91 – 100.
- Lambeau G.**, Gelb M.H. (2008). Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 495 – 520.
- Lämmle K.**, Zipper H., Breuer M., Hauer B., Buta C., Brunner H., Rupp S. (2007). Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J. Biotechnol.* 127, 575 – 592.
- Leemhuis H.**, Kelly R.M., Dijkhuizen L. (2009). Directed evolution of enzymes: library screening strategies. *IUBMB Life* 61, 222 – 228.
- Leiros I.**, Secundo F., Zambonelli C., Servi S., Hough E. (2000). The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* 8, 655 – 667.

- Leiros** I., McSweeney S., Hough E. (2004). The reaction mechanism of phospholipase D from *Streptomyces* sp. strain PMF. Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product. *J. Mol. Biol.* 339, 805 – 820.
- Lerchner** A., Mansfeld J., Schäffner I., Schöps R., Beer H.K., Ulbrich-Hofmann R. (2005). Two highly homologous phospholipase D isoenzymes from *Papaver somniferum* L. with different transphosphatidylation potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1737, 94 – 101.
- Lerchner** A., Mansfeld J., Kuppe K., Ulbrich-Hofmann R. (2006). Probing conserved amino acids in phospholipase D (*Brassica oleracea* var. capitata) for their importance in hydrolysis and transphosphatidylation activity. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 443 – 452.
- Li** M., Hong Y., Wang X. (2009). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 927 – 935.
- Lio** Y.C., Dennis E.A. (1998). Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 . *Biochim. Biophys. Acta* 1392, 320 – 332.
- Loo** R.W., Conde-Friesboes K., Reynolds L.J., Dennis E.A. (1997). Activation, inhibition, and regiospecificity of the lysophospholipase activity of the 85-kDa group IV cytosolic phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 272, 1914 – 1919.
- Mandal** S.B., Sen P.C., Chakrabarti P. (1980). *In vitro* synthesis of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine by phospholipase D. *Phytochemistry* 19, 1661 – 1663.
- Mansfeld** J., Ulbrich-Hofmann R. (2009). Modulation of phospholipase D activity in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 913 – 926.
- Mason** J.T., Broccoli A.V., Huang C. (1981). A method for the synthesis of isomerically pure saturated mixed-chain phosphatidylcholines. *Anal. Biochem.* 113, 96 – 101.
- Mendonsa** R., Engebrecht J. (2009). Phospholipase D function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 970 – 974.
- Mingarro** I., Abad C., Braco L. (1994). Characterization of acylating and deacylating of an extracellular phospholipase A_2 in a water-restricted environment. *Biochemistry* 33, 4652 – 4660.
- Nagao** A., Ishida N., Terao J. (1991). Synthesis of 6-phosphatidyl-L-ascorbic acid by phospholipase D. *Lipids* 26, 390 – 394.
- Oishi** H., Morimoto T., Watanabe Y., Tamai Y. (1999). Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis*, and cloning of phospholipase B gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 83 – 90.
- Paltauf** F., Hermetter A. (1994). Strategies for the synthesis of glycerophospholipids. *Prog. Lipid Res.* 33, 239 – 328.
- Pande** J., Szewczyk M.M., Grover A.K. (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol. Adv.* 28, 849 – 858.
- Pérez-Chacón** G., Astudillo A.M., Balgoma D., Balboa M.A., Balsinde J. (2009). Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A_2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 1103 – 1113.

Pernas P., Olivier J.L., Legoy M.D., Bereziat G. (1990). Phospholipid synthesis by extracellular phospholipase A₂ in organic solvents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 644 – 650.

Pinsirodom P., Parkin K.L. (2000). Selectivity of celite-immobilized patatin (lipid acyl hydrolyase) from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers in esterification reactions As influenced by water activity and glycerol analogues as alcohol acceptors. *J. Agric. Food Chem.* 48, 155 – 160.

Plückthun A., Dennis E.A. (1982). Acyl and phosphoryl migration in lysophospholipids: importance in phospholipid synthesis and phospholipase specificity. *Biochemistry* 21, 1743 – 1750.

Ponting C.P., Kerr I.D. (1996). A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci.* 5, 914 – 955.

Reetz M.T., Kahakeaw D., Sanchis J. (2009). Shedding light on the efficacy of laboratory evolution based on iterative saturation mutagenesis. *Mol. Biosyst.* 5, 115 – 122.

Robinson M., Waite M. (1983). Physical-chemical requirements of the catalysis of substrates by lysosomal phospholipase A₁. *J. Biol. Chem.* 258, 14371 – 14378.

Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossmann T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2541 – 2547.

Rosseto R., Hajdu J. (2005). A rapid and efficient method for migration-free acylation of lysophospholipids: synthesis of phosphatidylcholines with *sn*-2-chain-terminal reporter groups. *Tetrahedron Lett.* 46, 2941 – 2944.

Roth M.G. (2008). Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* 9, 1233 – 1239.

Rudge S.A., Wakelam M.J. (2009). Inter-regulatory dynamics of phospholipase D and the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 856 – 861.

Ryu S.B. (2004). Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends Plant Sci.* 5, 229 – 235.

Samanta U., Bahnson B.J. (2008). Crystal structure of human platelet-activating factor acetylhydrolase: structural implication to lipoprotein binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* 283, 31617 – 31624.

Schaloske R.H., Dennis E.A. (2006). The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1246 – 1259.

Scott D.L., Sigler P.B. (1994). Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂. *Adv. Protein Chem.* 45, 53 – 88.

Shinozaki K., Waite M. (1999). A novel phosphatidylglycerol-selective phospholipase A₂ from macrophages. *Biochemistry* 38, 1669 – 1675.

- Shuto S.**, Itoh H., Sakai A., Nakagami K., Imamura S., Matsuda A. (1995). Nucleosides and nucleotides – CXXXVII. Antitumor phospholipids with 5-fluorouridine as a cytotoxic polar-head: synthesis of 5'-phosphatidyl-5-fluorouridines by phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation. *Bioorg. Med. Chem.* 3, 235 – 243.
- Simons J.W.**, Adams H., Cox R.C., Dekker N., Götz F., Slotboom A.J., Verheij H.M. (1996). The lipase from *Staphylococcus aureus*. Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. *Eur. J. Biochem.* 242, 760 – 769.
- Stahelin R.V.**, Ananthanarayanan B., Blatner N.R., Singh S., Bruzik K.S., Murray D., Cho W. (2004). Mechanism of membrane binding of phospholipase D1 PX domain. *J. Biol. Chem.* 279, 54918 – 54926.
- Svensson I.**, Adlercreutz P., Mattiasson B. (1992). Lipase-catalyzed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 986 – 991.
- Takahashi T.T.**, Austin R.J., Roberts R.W. (2003). mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 28, 159 – 165.
- Takami M.**, Hidaka N., Suzuki Y. (1994). Phospholipase D-catalyzed synthesis of phosphatidyl aromatic compounds. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 2140 – 2144.
- Uchiyama T.**, Miyasaki K. (2009). Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 616 – 622.
- Uesugi Y.**, Hatanaka T. (2009). Phospholipase D mechanism using *Streptomyces* PLD. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 962 – 969.
- Ulbrich-Hofmann R.** (2000). Phospholipases used in lipid transformations, in: Bornscheuer U.T. Enzymes in lipid modification. Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, Seiten 242 – 245.
- Ulbrich-Hofmann R.** (2003). Enzyme-catalysed transphosphatidylation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 305 – 307.
- Ulbrich-Hofmann R.**, Lerchner A., Oblozinsky M., Bezakova L. (2005). Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnol. Lett.* 27, 535 – 544.
- Ulrich A.S.** (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci. Rep.* 22, 129 – 150.
- 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.
- Yan X.**, Xu Z. (2006). Ribosome-display technology: applications for directed evolution of functional proteins. *Drug Discov. Today* 11, 911 – 916.
- Yang S.F.**, Freer S., Benson A.A. (1967). Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 242, 477 – 484.
- Yu L.**, Dennis E.A. (1991). Critical role of a hydrogen bond in the interaction of phospholipase A₂ with transition-state and substrate analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 9325 – 9329.
- Zheng L.**, Krishnamoorthi R., Zolkiewski M., Wang X. (2000). Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β . *J. Biol. Chem.* 275, 19700 – 19706.

Kapitel 3

Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids

with polar head groups

publiziert in

Chemistry and Physics of Lipids

152 (2008), 71 – 77

Einordnung der Studie in den Kontext

In dieser Studie wurde der durch PLD katalysierte Austausch des Cholinrestes in PC gegen verschiedene Ethanolamin-Derivate untersucht. Die hier verwendeten Derivate leiten sich vom Ethanolamin durch Einführung polarer Hydroxymethyl- und Hydroxyethylreste ab. Unter physiologischen Bedingungen weisen sie durch eine Protonierung der Stickstoffatome eine positive Nettoladung auf. Während die Substituenten nicht den hydrophilen Charakter der verwendeten Akzeptoralkohole verändern, so beeinflussen sie jedoch deren molekulares Volumen. Daher können die Derivate genutzt werden, um eine Abhängigkeit der Transphosphatidylierungseffizienz bakterieller und pflanzlicher PLDs von sterischen Parametern zu sondieren. Die enzymatische Transphosphatidylierung wurde zudem zur präparativen Gewinnung der entsprechenden neuartigen PE-Derivate mit polaren, voluminösen Kopfgruppen herangezogen.

Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups

Abstract

A series of new phospholipids with polar head groups have been synthesized by enzymatic transphosphatidylation of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerophosphocholine and identified by ^1H NMR and MALDI-TOF-MS. The acceptor alcohols were N- or C2-substituted derivatives of ethanolamine (diethanolamine, triethanolamine, serinol, Tris, BisTris). Phospholipases D from cabbage (PLD_{cab}) and *Streptomyces* sp. (PLD_{Str}) were compared with respect to product yield and purity as well as the initial rates in transphosphatidylation and competing hydrolysis. In all reactions, PLD_{Str} showed a remarkably higher transphosphatidylation activity than PLD_{cab}. However, higher yields of the phospholipids with diethanolamine, triethanolamine, and serinol were obtained by PLD_{cab} because PLD_{Str} resulted in the additional formation of diphosphatidyl derivatives. In the synthesis of the Tris and BisTris derivatives, PLD_{Str} was much more appropriate because voluminous head group alcohols ($>129 \text{ \AA}^3$) are poorly converted by PLD_{cab}. With BisTris as acceptor alcohol two regioisomeric forms of phosphatidyl-BisTris were obtained.

Keywords: Phospholipase D; Transphosphatidylation; Ethanolamine derivatives; Diphosphatidyl compounds; Serinol; BisTris

Kapitel 4

Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity

publiziert in
Analytical Biochemistry
392 (2009), 169 – 173

Einordnung der Studie in den Kontext

Zur Ermittlung der Transphosphatidylierungseffizienz verschiedener PLD-Enzyme fehlen bisher geeignete spektroskopische Assays, welche die von PLD katalysierte Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsreaktion simultan messen. Die vorliegende Arbeit stellt einen Teilaspekt der Entwicklung eines solchen Assays dar. Zur Messung der Hydrolysereaktion wurde ein neuartiges Verfahren erarbeitet, welches - im Gegensatz zu anderen spektrophotometrischen Methoden - auf der quantitativen Bestimmung der entstehenden PA basiert. Grundlage ist die bevorzugte Bindung von Fe^{3+} durch PA. Die Methode ist sowohl zur einfachen Messung der PLD-Aktivität als auch zur Bestimmung der Spezifität von PLD-Enzymen gegenüber Phospholipid-Substraten mit unterschiedlichen Kopfgruppen geeignet.

Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity

Abstract

The ability of negatively charged phosphatidates to form complexes with Fe^{3+} ions was used to design a simple spectrophotometric assay for the quantitative determination of phosphatidic acid (PA). In the reaction with the purple iron(III)–salicylate, PA extracts Fe^{3+} ions and decreases the absorbance at 490 nm. Lower competition with salicylate for Fe^{3+} ions was observed with single negatively charged phosphatidates such as phosphatidylglycerol (PG), whereas neutral phosphatidates such as phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) showed no influence on the absorbance of the iron(III) complex. The detection limit of the method on a microplate scale was 10 μM PA. Based on these results, an assay for determining the activity of phospholipase D (PLD) toward natural phospholipids such as PC, PE, and PG was developed. In contrast to other spectroscopic PLD assays, this method is able to determine PLD activity toward different lipids or even lipid mixtures.

Keywords: Hydrolysis of glycerophospholipids; Iron(III)–salicylate; Phosphatidic acid; Phospholipase D activity; Spectrophotometric assay

Kapitel 5

A spectrophotometric microtiterplate assay to determine
the transphosphatidylation potential of phospholipase D

publiziert in

The Journal of American Oil Chemists' Society

87 (2010), 1005 – 1011

Einordnung der Studie in den Kontext

In der vorliegenden Studie wird ein spektroskopischer Assay für die Messung der Transphosphatidylierungseffizienz von PLD-Enzymen beschrieben. Das Verfahren ermöglicht die simultane Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsgeschwindigkeiten bei der Umsetzung von PC mit Ethanolamin. Die Hydrolyse wird dabei mit dem in Kapitel 4 beschriebenen Verfahren quantifiziert. In Kombination mit einer enzymatischen Bestimmung von Cholin, welches bei beiden PLD-katalysierten Reaktionen freigesetzt wird, kann die Transphosphatidylierung quantitativ ermittelt werden. Das Verfahren ist kompatibel mit einer vorangehenden Anzucht PLD-exprimierender *E. coli*-Zellen. Da alle Schritte in Mikrotiterplatten ausgeführt werden können, ist der etablierte Assay für *high-throughput*-Anwendungen geeignet und leistet damit einen wesentlichen Beitrag zur Gewinnung verbesserter PLD-Enzyme.

A spectrophotometric microtiterplate assay to determine the transphosphatidylation potential of phospholipase D

Abstract

In addition to the hydrolysis of the terminal phosphate ester bond in glycerophospholipids, phospholipases D (PLDs) are able to catalyze the exchange of the polar head group. The biocatalytic potential of PLDs strongly depends on the ratio of the transphosphatidylation to hydrolysis rate which, therefore, is an important criterion in the screening for efficient PLDs from natural sources or combinatorial DNA libraries. Here, we present a fast spectrophotometric assay that allows the determination of the rate of both hydrolysis and transphosphatidylation of PLD-containing solutions including cell extracts in one microtiterplate. The assay is based on the reaction of phosphatidylcholine solubilized in Triton X-100 micelles with ethanolamine and the determination of phosphatidic acid (PA) and choline. PA is determined via Fe(III) complexation and represents hydrolysis, while choline is determined by the conventional choline oxidase/peroxidase assay and yields the total conversion. The difference between both values corresponds to the transphosphatidylation product. The method is suitable for measuring reactions rates as well as product yields after defined time periods. As shown for *E. coli* cells expressing PLD from cabbage, the assay can be applied to extracts of cells grown and lysed in microtiterplates.

Keywords: Cabbage; Choline oxidase; High-throughput screening; Iron(III) salicylate; Phosphatidic acid; Phospholipase D; Phospholipid transformation; Poppy; *Streptomyces*; Transphosphatidylation

Kapitel 6

Phospholipases A₁ from the fungus *Armillaria ostoyae*

provide insight into the substrate recognition of α/β -hydrolases

Manuskript eingereicht bei

FEBS Journal

am 22.06.2011

Einordnung der Studie in den Kontext

Obwohl bereits verschiedene industriell angewandte PLAs aus niederen Pilzen isoliert wurden, ist der Kenntnisstand über das Vorkommen solcher Enzyme in Großpilzen bisher gering. Das schnelle Wachstum - insbesondere der Pilzfruchtkörper – erfordert jedoch einen entsprechend schnellen Neuaufbau sowie eine Reorganisation von Membransystemen. Da an derartigen Prozessen mit hoher Wahrscheinlichkeit Phospholipasen beteiligt sind, stellen Großpilze wie die evolutionär hochentwickelten Basidienpilze (Basidiomyceten) eine potentielle Quelle solcher Enzyme dar. In einem *Screening* von Fruchtkörpern verschiedener Basidiomyceten (siehe Kapitel 7) wurde insbesondere im Dunklen Hallimasch (*Armillaria ostoyae*) hohe PLA-Aktivität detektiert. Die vorliegende Studie beschreibt die Isolierung von vier PLA-Proteinen aus *A. ostoyae* und deren Charakterisierung hinsichtlich ihrer proteinchemischen Eigenschaften und Substratspezifität. Die Präferenz der Enzyme für bestimmte Lipidsubstrate wird dabei im Hinblick auf deren molekularen Aufbau diskutiert.

Phospholipases A₁ from the fungus *Armillaria ostoyae*
provide insight into the substrate recognition of α/β -hydrolases

Abstract

Four enzymes with phospholipase A₁ (PLA₁) activity were purified from the fruiting bodies of the basidiomycete *Armillaria ostoyae*. The enzymes (PLA₁-1, -2, -3 and -4) showed similar isoelectric points (4.3, 3.9, 4.0 and 4.0) and apparent molecular masses in the range of 35 – 47 kDa. Mass spectrometric analyses of proteolytic fragments revealed sequences homologous to α/β -hydrolases. The enzymes share one conserved region with fungal phospholipases B and the active site sequence with bacterial esterases and PLA₁s. PLA₁-1 cleaves phospholipids and lysophospholipids with an optimum activity at pH 5.3. In contrast, PLA₁-2, -3 and -4 are characterized by broad pH optima in the slightly acidic to neutral range and are additionally capable of hydrolyzing mono- and diglycerides as well as fatty acid methyl esters. All enzymes favor glycerol-based lipids with a single medium-sized fatty acid moiety in *sn*-1 position but show reduced activity towards the corresponding 1,2-diacyl derivatives with bulky long-chain or inflexible saturated fatty acid moieties in *sn*-2 position. The enzymes prefer zwitterionic phospholipid substrates and are unable to hydrolyze triglycerides. From the selectivity of these broad-spectrum α/β -hydrolases towards the different classes of their substrates a regiospecific steric hindrance and a head group recognition are concluded.

Keywords: *Armillaria ostoyae*; fatty acid specificity; α/β -hydrolase; phospholipase A₁; substrate selectivity

Kapitel 7

Phospholipid acylhydrolases trigger phospholipid degradation during fungal sporogenesis

zur Publikation akzeptiert bei
Fungal Genetics and Biology
(2011), im Druck
(doi: 10.1016/j.fgb.2011.05.008)

Einordnung der Studie in den Kontext

Pilzfruchtkörper stellen reproduktive Organe dar, die zur Produktion und anschließenden Freisetzung von Sporen dienen. Die den Fruchtkörper aufbauenden Gewebe werden aus hochspezialisierten Hyphen gebildet, die spezifische Proteine exprimieren. Das Vorhandensein von hoher PLA-Aktivität in den Fruchtkörpern von *A. ostoyae* lässt daher eine Funktion der entsprechenden Proteine im Reproduktionsprozeß vermuten. Im vorliegenden Manuskript wird die Bedeutung der in Kapitel 6 charakterisierten Enzyme für den Phospholipid-Metabolismus von *A. ostoyae* beschrieben. Ein PLA-vermittelter Abbau endogener Phospholipide korreliert mit der gleichzeitigen Bildung von Speicherlipiden in den entstehenden Sporen.

Phospholipid acylhydrolases trigger phospholipid degradation during fungal sporogenesis

Abstract

Armillaria ostoyae is a phytopathogen infecting coniferous trees. Fruiting bodies of this basidiomycete contain high phospholipase A₁ (PLA₁) activity. In this paper, the role of phospholipid-deacylating activity, which was also detected in fruiting bodies of other basidiomycetes, in the fungal lipid metabolism is elucidated. For *A. ostoyae* the occurrence of PLA₁ activity is shown to be restricted to the late reproductive phase, correlating with the release of mature spores. Specific expression in the spore-producing tissue provides evidence for the involvement of PLA₁ in spore formation. Based on lipid analysis, the degradation of membrane phospholipids in this tissue can be ascribed mainly to PLA₁ activity because other enzymes such as phospholipases C and D, triglyceride lipase and phosphatidic acid phosphatase had only low activities. A concomitant increase in the concentration of fatty acids and their anabolites (di- and triglycerides), which are used as storage lipids in the developing fungal spore cells, was observed. Therefore, PLA₁ contributes to the formation of spores by providing membrane constituents as a source of fatty acids.

Keywords: *Armillaria ostoyae*, Basidiomycete, Phospholipase A₁, Phospholipid degradation, Sporogenesis

Kapitel 8

Zusammenfassung

Phospholipasen ermöglichen aufgrund ihrer Reaktions- und Regiospezifität eine selektive Modifizierung bestimmter Strukturelemente von Phospholipiden und haben daher eine bedeutende Rolle in der Lipidsynthese erlangt. Die vorliegende Dissertationsschrift trägt in Form von Publikationen bzw. zur Publikation vorgesehenen Manuskripten zur Charakterisierung solcher enzymvermittelter Phospholipid-Transformationen bei. Zudem werden – entsprechend dem Bedarf an derartigen Enzymen - neue Ansätze zur Auffindung von Phospholipasen mit erweitertem biokatalytischem Potential vorgestellt.

Ein Teilgebiet der Arbeit stellen durch PLD-Enzyme katalysierte Transphosphatidylierungsreaktionen dar. Ausgangspunkt bildet die Umsetzung von PC mit N- und C2-substituierten Derivaten des Ethanolamins ([Dippe et al. \(2008\) Chem. Phys. Lipids 152, 71 – 77](#)). Diese sind zur Untersuchung der Spezifität gegenüber Akzeptoralkoholen besonders geeignet, da sie ähnliche physikochemische Eigenschaften besitzen, aber substitutionsbedingt steigendes molekulares Volumen aufweisen. Es zeigte sich, dass die Transphosphatidylierungseffizienz vom Molekularvolumen der Akzeptoralkohole und der Herkunft der verwendeten PLD-Enzyme abhängig ist. Neben einer verschiedenartig ausgeprägten Größenselektivität weist insbesondere die nur beim Enzym aus *Streptomyces* sp. auftretende Produktion von Diphosphatidylverbindungen auf Unterschiede in der Topographie der aktiven Zentren hin. Zudem ermöglichte die enzymatische Einführung der Ethanolamin-Derivate eine präparative Darstellung der entsprechenden Phospholipide, welche aufgrund ihrer voluminösen Kopfgruppen sowohl für die Grundlagen- als auch für die anwendungsorientierte Forschung interessant sein dürften.

Die Transphosphatidylierung von PC mit Ethanolamin bildet auch die Grundlage eines spektroskopischen Assays, der zur Messung der Transphosphatidylierungseffizienz von PLD-Enzymen erstellt wurde. Ein solcher Assay erfordert die simultane Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsraten. Zur Messung der hydrolytischen Teilreaktion wurde dabei eine neue Methode zur spektrophotometrischen Detektion des Produkts PA etabliert (Dippe et al. (2009) *Anal. Biochem.* 392, 169 – 173). Das vorgestellte Verfahren nutzt die Interaktion von Fe^{3+} -Ionen mit negativ geladenen Phospholipiden. Insbesondere PA zeigt eine hohe Affinität zu Fe^{3+} und kann dieses aus dem als Nachweisreagenz dienenden Fe^{3+} -Salicylat-Komplex herauslösen. Anhand der Konzentrationsverringerung des violettfarbenen Komplexes ist die Bestimmung der PA-Konzentration in Phospholipid-Vesikeln quantitativ möglich. Die Reaktion wurde für eine Messung der Hydrolyse-Aktivität von PLD-Enzymen im Mikrotiterplatten-Maßstab optimiert und ist auf Phospholipide mit verschiedenen Kopfgruppen anwendbar.

Wie bereits erwähnt ist die Fe^{3+} -basierte Methode auch zur Charakterisierung der Hydrolyseraten in Transphosphatidylierungsreaktionen, so z. B. in der Umsetzung von PC-Vesikeln mit Ethanolamin geeignet (Dippe et al. (2010) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 1005 – 1011). Durch nachfolgende enzymatische Bestimmung des aus der Hydrolyse als auch Transphosphatidylierung stammenden Cholins ist eine Berechnung des Gesamtumsatzes und damit der Transphosphatidylierungseffizienz möglich. Es zeigte sich, dass hinsichtlich der Transphosphatidylierungseigenschaften bakterieller und pflanzlicher PLDs eine grundlegende Übereinstimmung zu den im Zweiphasensystem erhaltenen Daten (Dippe et al. (2008) *Chem. Phys. Lipids* 152, 71 – 77) gegeben ist. Da der vorgestellte Assay zur Selektion molekularbiologisch erzeugter Enzymvarianten angewendet werden soll, wurde der Kompatibilität mit einer rekombinanten Proteinproduktion besondere Beachtung geschenkt. Die Transphosphatidylierungseffizienz von gereinigter PLD und von Zellextrakten, die nach Kultivierung und Lyse rekombinanter *E. coli*-Zellen in Mikrotiterplatten erhalten wurden, war vergleichbar. Daher ist die Methode für Anwendungen geeignet, die eine Anzucht von Bakterien unter *high-throughput*-Bedingungen erfordern.

Neben der Charakterisierung von PLDs stellt die Gewinnung neuartiger PLA-Enzyme einen weiteren zentralen Aspekt der vorliegenden Arbeit dar. Ein *Screening* der bisher kaum auf PLA-Produktion untersuchten Basidienpilze - insbesondere ihrer schnellwachsenden Fruchtkörper - erschien aufgrund des seit langem bekannten Vorkommens solcher Enzyme in filamentösen Pilzen vielversprechend. Tatsächlich wurde in Fruchtkörpern mehrerer Arten hohe PLA-Aktivität gefunden (Dippe et al. (2011), *Fungal Genet. Biol.*, im Druck). Aus der als besonders guter Enzymproduzent identifizierten Spezies *A. ostoyae* konnten vier entsprechende Enzyme gereinigt werden (Dippe et al. (2011), eingereicht bei *FEBS Journal*). Diese Enzyme, welche spezifisch die *sn*-1-Position in Phospholipiden angreifen und daher als PLA₁s zu bezeichnen sind, konnten aufgrund massenspektrometrischer Fragmentanalysen der Proteinfamilie der α/β -Hydrolasen zugeordnet werden. Im Gegensatz zu ähnlichen, aus Pilzen isolierten Phospholipasen dieses Typs sind die Enzyme aus *A. ostoyae* jedoch durch ein außergewöhnlich breites Substratspektrum gekennzeichnet, welches sie im Hinblick auf eine biokatalytische Anwendung besonders interessant macht. Neben Phospholipiden und Lysophospholipiden können durch drei der Enzyme auch Mono- und Diglyceride sowie einfache Fettsäureester gespalten werden. Für die unterschiedliche Aktivität der Enzyme gegenüber den verschiedenen Lipidklassen wurde – in Analogie zu anderen α/β -Hydrolasen – eine selektive Erkennung bestimmter Bereiche der Substrate, insbesondere des Acylrests in *sn*-2-Position und der Kopfgruppe verantwortlich gemacht.

In vivo sind die PLA₁-Enzyme am Umsatz von Membranphospholipiden beteiligt (Dippe et al. (2011), *Fungal Genet. Biol.*, im Druck). Aufgrund ihrer spezifischen Expression im sporenproduzierenden Gewebe wird die PLA₁-Aktivität mit einem gleichartig zeit- und gewebespezifischen Abbau der Phospholipide in Verbindung gebracht. Offensichtlich trägt dieser Abbau zur Akkumulation von Fettsäuren und deren Folge-Metaboliten in den entstehenden Sporen von *A. ostoyae* bei. Diese bisher nicht beschriebene Reaktion stellt einen neuen Aspekt im Energiemetabolismus von pilzlichen Keimzellen dar.

Publikationsliste

1. Miersch O., Neumerkel J., **Dippe** M., Stenzel I., Wasternack C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* 177, 114 - 127
2. **Dippe** M., Mrestani-Klaus C., Schierhorn A., Ulbrich-Hofmann R. (2008). Phospholipase D-catalyzed synthesis of phospholipids with polar head groups. *Chem. Phys. Lipids* 152, 71 – 77
3. **Dippe** M., Ulbrich-Hofmann R. (2009). Substrate specificity in phospholipid transformations by plant phospholipase D isoenzymes. *Phytochemistry* 70, 361 - 365
4. **Dippe** M., Ulbrich-Hofmann R. (2009). Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity. *Anal. Biochem.* 392, 169 -173
5. **Dippe** M., Ulbrich-Hofmann R. (2010). A spectrophotometric microtiterplate assay to determine the transphosphatidylation potential of phospholipase D. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 1005 - 1011
6. **Dippe** M., Ulbrich-Hofmann R. (2011). Phospholipid acylhydrolases trigger membrane degradation during fungal sporogenesis. *Fungal Genet. Biol.*, im Druck
7. **Dippe** M., Müller MQ., Ulbrich-Hofmann R. (2011). Phospholipases A₁ from the fungus *Armillaria ostoyae* provide insight into the substrate recognition of α/β -hydrolases. (eingereicht am 22.06.2011 bei FEBS Journal)
8. Müller A., **Dippe** M., Mrestani-Klaus C., Ulbrich-Hofmann R. (2011). Production of cardiolipin-analogous phospholipids by transphosphatidylation with phospholipase D. (in Vorbereitung)
9. **Dippe** M., Ulbrich-Hofmann R. (2011). Iron(III) complexes as spectrophotometric probes for the interaction of phospholipids with metal ions and amines. (in Vorbereitung)

Darlegung des Eigenanteils an den verwendeten Publikationen

Dippe M., Mrestani-Klaus C., Schierhorn A., Ulbrich-Hofmann R. (2008). Phospholipase D-catalyzed synthesis of phospholipids with polar head groups. *Chem. Phys. Lipids* 152, 71 – 77

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente ausgenommen der massenspektrometrischen Analyse (Dr. Angelika Schierhorn) und der NMR-Spektroskopie (Dr. Carmen Mrestani-Klaus) (Anteil: 60 %). Bearbeitung des Manuskripts und Anfertigung aller Abbildungen (Anteil: 50 %).

Dippe M., Ulbrich-Hofmann R. (2009). Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity. *Anal. Biochem.* 392, 169 - 173

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente (Anteil: 95 %). Anfertigung und Bearbeitung des Manuskripts und aller Abbildungen (Anteil: 70 %).

Dippe M., Ulbrich-Hofmann R. (2010). A spectrophotometric microtiterplate assay to determine the transphosphatidylolation potential of phospholipase D. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 1005 – 1011

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente (Anteil: 90 %). Anfertigung und Bearbeitung des Manuskripts und aller Abbildungen (Anteil: 70 %).

Dippe M., Müller MQ., Sinz A., Ulbrich-Hofmann R. (2011). Phospholipases A₁ from the fungus *Armillaria ostoyae* provide insight into the substrate recognition of α/β -hydrolases. Manuskript eingereicht am 22.06.2011 bei *FEBS Journal*.

Eigenanteil: Planung und Durchführung aller Experimente, ausgenommen der massenspektroskopischen Analyse der PLA₁-Enzyme (Mathias Q. Müller, Prof. Dr. Andrea Sinz), Auswertung aller Experimente (Anteil: 90 %). Anfertigung und Bearbeitung des Manuskripts und aller Abbildungen. Korrespondierender Autor (Anteil: 75 %).

Dippe M., Ulbrich-Hofmann R. (2011). Phospholipid acylhydrolases trigger membrane degradation during fungal sporogenesis. *Fungal Genet. Biol.*, im Druck

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente (Anteil: 90 %). Anfertigung und Bearbeitung des Manuskripts und aller Abbildungen. Korrespondierender Autor (Anteil: 80 %).

Martin Dippe & Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann

Halle (Saale), den 08. Dezember 2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich bewerbe mich mit dieser Dissertationsschrift erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades.

Martin Dippe

Halle (Saale), 08. Dezember 2011

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Martin Dippe
Geburtstag und –ort: 3. August 1981 in Wernigerode (Harz)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Uhlandstraße 5
06114 Halle (Saale)

Ausbildung

04/2007 – 03/2011 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Ulbrich-Hofmann am Institut für Biochemie / Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Transformation von Phospholipiden durch Phospholipasen A₁ und Phospholipasen D
10/2006 – 05/2007 wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. Wasternack am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle
Thema: Genexpression durch Jasmonsäure-Derivate in Tomate
07/2006 Diplom in Biochemie
Thema: Substratspezifität von Phospholipase D - Isoenzymen
10/2001 – 07/2006 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2000 – 2001 Grundwehrdienst
1992 – 2000 Hochharz-Gymnasium Elbingerode (Harz), Abitur
1988 – 1992 Grundschule Elbingerode (Harz)

Stipendien

04/2007 – 03/2009 Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
01/2008 – 03/2011 assoziiertes Mitglied des DFG-Graduiertenkollegs 1026
04/2009 – 06/2009 Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs 1026

Martin Dippe

Halle (Saale), den 08. Dezember 2011

Danksagung

Ich danke Frau Professor Renate Ulbrich-Hofmann für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Durch großzügige Freiheiten, das immerwährende Interesse an allen biochemischen und biologischen Fragestellungen und das in meine Arbeit gesetzte Vertrauen ermöglichte sie mir die Entwicklung meiner wissenschaftlichen Interessen. Darüber hinaus möchte ich ihr für stetige materielle und moralische Unterstützung, die Förderung von Tagungsteilnahmen und nicht zuletzt für ihre Hilfe und konstruktive Kritik beim Publizieren und bei der Entstehung dieses Manuskripts danken.

Meinen Dank möchte ich zudem allen anderen aussprechen, die direkt oder indirekt zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt Frau Christa Kuplens für die Bereitstellung der kleinen Dinge des Laboralltags und das unermüdliche Auffüllen der PLD-Vorräte, und Katja Fröhlich, welche als Praktikantin und wissenschaftliche Hilfskraft bei der Synthese von Lipiden und beim *Screening* mitgewirkt hat.

Frau Dr. Carmen Mrestani-Klaus, Frau Dr. Angelika Schierhorn und Herrn Mathias Müller möchte ich für die NMR- und massenspektrometrischen Analysen und wertvolle Diskussionen danken. Bei Micha Schöpfel bedanke ich mich für die Hilfe bei der Proteinkristallisation, und bei Frau PD Ute Lechner für die Bereitstellung des Phasenkontrast-Mikroskops. Großer Dank gilt zudem Herrn Dr. Gerd Hause für den faszinierenden Exkurs in die Fluoreszenzmikroskopie.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Technische Enzymologie und der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Ingo Heilmann bedanke ich mich für stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere Cindy, Franzi und Konstantin sei für die freundliche Aufnahme gedankt. Zusammen mit Janine, Anna, Lars, Sabine, Anett, Sabrina, Steffi, Jenny und Franziska haben sie während der letzten Jahre viele Arbeitstage und Abende bereichert.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Land Sachsen-Anhalt und dem Graduiertenkolleg 1026, welches zugleich wertvolle Möglichkeiten zum fachlichen Austausch bot.

Meinen Freunden danke ich für ihre langanhaltende Freundschaft und die schöne Zeit in den vergangenen Jahren.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die nicht nur immer für mich da ist und mich in jeder Hinsicht unterstützt, sondern auch für die Beschaffung des Pilzmaterials unermüdlich tätig war.

Und schließlich noch ein großes Dankeschön an Schatzi für genaues Korrekturlesen dieser Arbeit und für die viele indirekte und mentale Unterstützung, Verständnis, Geduld und die Bereicherung meines Lebens.