

**Identifizierung und rekombinante Herstellung  
von Phospholipase D-Isoenzymen aus Weißkohl  
(*Brassica oleracea* var. capitata)**

**Dissertation**

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

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

von Ines Schöffner (geb. Pannenberg)  
geb. am 20. Januar 1974 in Erlabrunn/Erzgebirge

Gutachterin/Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann
2. Herr Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer
3. Herr PD Dr. Ivo Feußner

Halle (Saale), den 5. Juli 2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Theoretischer Teil</b> .....	<b>8</b>
2.1. Überblick über die PLD-Familie – Vorkommen und Klassifizierung .....	8
2.2. Die Funktion der pflanzlichen PLDs im biologischen System .....	10
2.3. Strukturmerkmale der Enzyme der PLD-Superfamilie .....	13
2.3.1. Bisher bekannte mRNA-Sequenzen .....	13
2.3.2. Das HKD-Motiv .....	16
2.3.3. Die C2-Domäne .....	17
2.4. Der Katalysemechanismus der Endonuklease Nuc als Vertreter der PLD-Superfamilie ...	20
2.5. Charakterisierung von Phospholipase D aus Weißkohl.....	24
2.6. Phospholipase D in der Phospholipidsynthese .....	25
<b>3. Materialien</b> .....	<b>27</b>
3.1. Geräte .....	27
3.2. Antikörper .....	27
3.3. Oligonukleotide.....	28
3.4. Plasmide und Vektoren .....	30
3.5. <i>E. coli</i> -Stämme .....	30
3.6. Kulturmedien .....	30
<b>4. Methoden</b> .....	<b>31</b>
4.1. RNA-Präparation.....	31
4.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Weißkohl.....	31
4.1.2. Isolierung von mRNA aus Weißkohl.....	31
4.2. DNA-Präparation.....	31
4.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Weißkohl.....	31
4.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	31
4.3. Größen- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	32
4.3.1. Größenbestimmung von DNA und RNA.....	32
4.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	32
4.4. Herstellung von Genfragmenten mittels PCR bzw. RT-PCR.....	32
4.5. Klonierungstechniken .....	33
4.6. Sequenzierung von Plasmiden .....	33
4.7. Transformation von Plasmidvektoren in <i>E. coli</i> .....	33
4.8. Anzucht und Kultivierung der <i>E. coli</i> -Stämme.....	34
4.9. Expression der klonierten Gene <i>pld1</i> und <i>pld2</i> in <i>E. coli</i> .....	34
4.9.1. Herstellung löslicher aktiver PLD1 und PLD2 .....	34
4.9.2. Herstellung von PLD1- und PLD2-inclusion bodies .....	34
4.10. Proteinreinigung von PLD1 und PLD2 .....	34
4.10.1. Zellaufschluß und Reinigung von löslicher PLD1 und PLD2.....	34

4.10.2. Isolierung von IB-Material von PLD1 und PLD2.....	35
4.11. Renaturierung von PLD1 und PLD2 inclusion bodies.....	35
4.12. Bestimmungsmethoden .....	37
4.12.1. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	37
4.12.1.1. BCA-Test .....	37
4.12.1.2. Bradford-Test.....	37
4.12.2. Bestimmung der PLD1- und PLD2-Hydrolyseaktivität .....	37
4.12.2.1. Standardtest.....	37
4.12.2.2. Modifizierter Standardtest für die Aktivitätsbestimmung von renaturiertem IB-Material.....	38
4.12.2.3. Einfluß des pH-Wertes und der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration im Reaktionspuffer auf die PLD-Hydrolyseaktivität.....	38
4.12.3. Bestimmung der PLD1- und PLD2-Transphosphatidylierungsaktivität .....	39
4.13. SDS-PAGE.....	39
4.14. Proteinsequenzierung .....	39
4.15. Western-Blot-Techniken.....	40
<b>5. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>41</b>
5.1. Identifizierung und Charakterisierung zweier Isoenzyme von PLD aus Weißkohl .....	41
5.1.1. Bestimmung der Nukleotidsequenz der mRNAs von PLD1 und PLD2.....	41
5.1.2. Ermittlung der Genstruktur von pld1 und pld2.....	44
5.1.3. Vergleich der Genstrukturen der beiden Isoenzyme aus Weißkohl mit denen anderer pflanzlicher PLDαs .....	45
5.1.4. Analyse der Primärstrukturen von PLD1 und PLD2.....	46
5.2. Klonierungs- und Expressionsstudien von PLD1 und PLD2.....	50
5.2.1. Herstellung und Expression von Fusionskonstrukten der PLD1 .....	51
5.2.2. Herstellung und Expression des Tag-freien Konstruktes .....	52
5.2.3. Klonierung und Expression von PLD2.....	54
5.2.4. Optimierung der IB-Erzeugung von PLD1 und PLD2.....	54
5.3. Reinigung der löslichen PLD-Isoenzyme .....	55
5.3.1. Präparation des Bakterien-Rohextraktes .....	55
5.3.2. Ca <sup>2+</sup> -vermittelte hydrophobe Interaktionschromatografie .....	55
5.4. Versuche zur Rückfaltung von PLD1 und PLD2 inclusion bodies .....	58
5.5. Biochemische Charakterisierung der Isoenzyme.....	61
5.5.1. N-terminale Sequenzierung von PLD1 und PLD2.....	61
5.5.2. Ermittlung der spezifischen Hydrolyseaktivität von PLD1 und PLD2.....	62
5.5.3. Bestimmung der Hydrolyseaktivität von PLD1 und PLD2 in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	62
5.5.4. Ermittlung der Transphosphatidylierungspotenz von PLD1 und PLD2.....	64
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>I-X</b>

## Abkürzungen

A	Adenin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
BICIN	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion V
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CDP	Cytidindiphosphat
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IB	inclusion body (Einschlußkörper)
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRD800	Fluoreszenz-Farbstoff zur Sequenzierung von DNA
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Kulturmedium
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, NIH Bethesda, MD, USA
OD <sub>xnm</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG 6000	Polyethylenglycol mit molekularer Masse von ca. 6000 g/mol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PI	Phosphatidylinositol
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PLA <sub>1</sub> , PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>1</sub> , Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pNP	para-Nitrophenol
PpNP	Phosphatidyl-para-nitrophenol
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“ (Amplifikation von cDNA-Enden)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	PCR nach mRNA-abhängiger Reverstranskriptase-Reaktion
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
T	Thymidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transfer-Ribonukleinsäure)
U	unit (Einheit), 1 U = 1 µmol/min
Vol.	Volumenteile

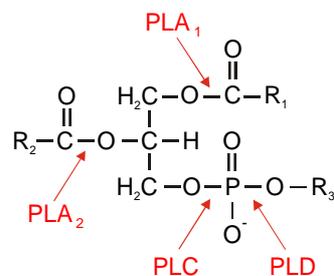
### Ein- und Dreibuchstaben-Code für proteinogene Aminosäuren

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

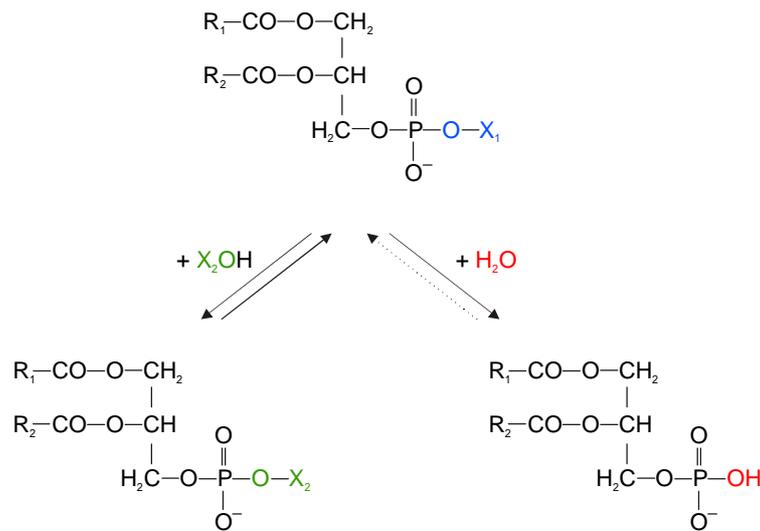
## 1. Einleitung

Phospholipasen (PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLC und PLD) gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen. Sie katalysieren die enzymatische Spaltung der Esterbindungen in natürlich vorkommenden Glycerophospholipiden an verschiedenen Positionen (Abb. 1.1). In der Natur sind sie weit verbreitet und haben unterschiedliche Funktionen. Manche von ihnen sind Verdauungsenzyme, während andere wichtige Komponenten von Signalwandlungssystemen darstellen. In der Biotechnologie werden einige Phospholipasen als Biokatalysatoren für die Gewinnung von Phospholipiden verwendet. Darüber hinaus sind sie prädestiniert als Werkzeug zur Untersuchung biologischer Membranen und ihrer Lipidkomponenten in der Grundlagenforschung.

**Abb. 1.1. Wirkungsspezifität der verschiedenen Phospholipasen.**



Innerhalb der Phospholipasen nimmt PLD (EC 3.1.4.4.) eine Sonderstellung ein, da dieses Enzym neben der von allen Phospholipasen katalysierten Hydrolyse auch eine Umesterung durchführen kann. Diese als Transphosphatidylierung bezeichnete Reaktion wurde in Pflanzen erstmalig von Ferrari und Benson (1961) entdeckt und spielt insbesondere bei der auch kommerziell angewandten Synthese von Phospholipiden eine große Rolle (Review in Servi, 1999). Dabei wird der im Verlauf der Enzymkatalyse gebildete Phosphatidylrest anstelle von Wasser auf einen primären oder sekundären Alkohol übertragen (Abb. 1.2)

**Abb. 1.2. Hydrolyse und Transphosphatidylierung von Phospholipiden durch PLD.**

Während man für die Umesterung früher vor allem PLD aus Weißkohl nutzte, wird heute industriell meist PLD aus Mikroorganismen, insbesondere *Streptomyces species*, verwendet, da ihre Transphosphatidylierungspotenz gegenüber der Hydrolyse weitaus höher ist als beim Weißkohl-Enzym. Jüngste Arbeiten zeigten jedoch, daß der Einsatz von PLD aus Weißkohl in einigen Fällen vorteilhaft ist, weil dieses Enzym im Gegensatz zu den mikrobiellen PLDs eine relativ geringe Substratspezifität besitzt. So ist es in der Lage, Alkylphosphatester, die als Cytostatica Bedeutung haben, umzuestern (Aurich et al., 1997). Es liegt daher nahe, durch gentechnologische Methoden die Transphosphatidylierungspotenz der PLD aus Weißkohl zu erhöhen, um das Enzym für industrielle Anwendungen interessanter zu gestalten. Nachteilig wirkten sich jedoch die noch immer geringen Kenntnisse zur Struktur und zum Mechanismus dieses Enzym aus. Im Gegensatz zu PLA<sub>2</sub> und PLC, von denen die Proteinstruktur, die enzymatische Funktion *in vivo* und der Katalyse-Mechanismus schon relativ früh aufgeklärt werden konnten (Reviews in Rebecchi und Pentylala, 2000, Six und Dennis, 2000, Ulbrich-Hofmann, 2000), erfolgte der Durchbruch bei der Erforschung der PLD erst vor kurzem. Nachdem man die Bedeutung dieses Enzyms bei der Signaltransduktion in Tieren und auch in Pflanzen erkannte, wuchs das Interesse, das Protein zu charakterisieren und seine Struktur aufzuklären. Viele mRNA-Sequenzen wurden seitdem veröffentlicht. Für die Kristallisation der PLD ist die Gewinnung des Enzyms aus den pflanzlichen und tierischen Organismen in ausreichenden Mengen und in hoher Reinheit erforderlich. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, PLD aus Weißkohl als ihre traditionelle Quelle (*Brassica oleracea* var. capitata) in ausreichenden Mengen zu isolieren, um die molekularbiologischen Grundlagen für die Gewinnung ausreichender Mengen an PLD sowie für ihre gentechnologische Veränderung, z. B. durch Punktmutationen im katalytischen Zentrum oder in der regulatorischen C2-Domäne, zu erarbeiten. Dazu

sollte das entsprechende Gen kloniert und zur heterologen Expression in *E. coli* gebracht werden. Zunächst war es erforderlich, das kodierende Gen zu isolieren und dessen Nukleotidsequenz zu ermitteln. Nach der Aufklärung der Genstruktur war das ORF (open reading frame, offener Leserahmen) in einen geeigneten Plasmidvektor einzubauen und die DNA stabil im Wirtsorganismus *E. coli* zu integrieren. Durch die Optimierung der *pld*-Expression sollte die PLD-Ausbeute maximiert werden, um so die günstigsten Voraussetzungen für die Reinigung des Enzyms zu schaffen. Nach erfolgter Reinigung des Enzyms sollten schließlich einige besonders interessante enzymatische Eigenschaften der rekombinanten PLD, wie das Verhältnis von Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsgeschwindigkeit und die Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Abhängigkeit vom pH-Wert, ermittelt werden.

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1. Überblick über die PLD-Familie – Vorkommen und Klassifizierung

Wie eine Fülle von Literaturdaten zeigt, kommen PLDs in allen Organismenreichen vor. PLD-Aktivität konnte in Mikroben (Arcano-, Corynebakterien, *Vibrio damsela*, vielen *Streptomyces*-Arten, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptoverticillium cinnamoneum* u. a.), in tierischen Organismen (u. a. Taufliege, Fadenwurm, Ratte, Maus, Hamster, Rind, Mensch) und in Pflanzen (Ackerschmalwand, Karotte, verschiedenen Kohlsorten, Erdnuß, Rizinus, Reis, Mais, Tabak, Tomate, Baumwolle, Soja u. a.) nachgewiesen werden (Reviews in Heller, 1978, Dennis, 1983, Waite, 1987). In einigen Lebewesen wurden sogar mehrere Isoenzyme entdeckt, die man in verschiedenen Entwicklungsstadien oder auf bestimmte Gewebetypen begrenzt findet (Dyer et al., 1994, Dyer et al., 1996) und die sich in ihren Eigenschaften hinsichtlich Molekularmasse, pH-Optimum oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit und in ihrer Regulation unterscheiden.

In Mikroorganismen wurde mit Ausnahme von Hefe (Review in Rudge und Engebrecht, 1999) und *Streptomyces cinnamoneum* (Ogino et al., 2001) jeweils nur eine PLD-Form gefunden. Die von Hefe gebildete PLD1, deren Aminosäuresequenz keine Homologien zu anderen Mitgliedern der PLD-Familie aufweist, ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und kann, wie die meisten anderen bisher bekannten PLDs, Transphosphatidylierungsreaktionen ausführen (Waksman et al., 1996). PLD2, die strukturell nicht verwandt ist mit PLD1, benötigt dagegen  $0,1 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  und ist, wie die kürzlich identifizierte Metallionen-unabhängige PLD2 aus *Streptoverticillium cinnamoneum* (Ogino et al., 2001), nicht in der Lage, Umesterungen durchzuführen (Waksman et al., 1997). Man vermutet deshalb, daß diese Enzyme Vertreter einer neuartigen PLD-Familie sein könnten.

Bei den tierischen Vertretern (z. B. Ratten-, Maus- oder menschliche PLD) findet man zwei Isoenzymentypen, die jeweils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) als Cofaktor benötigen. PLD1 hat meist eine niedrige Basalaktivität, kann aber durch Proteinkinase C, ADP-ribosylierungsfaktor (ARF), Rho, Rac und Cdc42 synergistisch aktiviert werden (Hammond et al., 1995, Colley et al., 1997a). PLD2 besitzt *in vitro* ohne Aktivierung durch oben genannte Faktoren ihre volle Aktivität, *in vivo* jedoch liegt sie inhibiert vor (Colley et al., 1997b). Aus diesen beiden sequenz-homologen Typen, die sich nur durch das Vorkommen einer 116 Aminosäure langen loop-Region in der PLD1-Form unterscheiden, gehen durch alternatives Spleißen weitere Isoenzyme hervor. So enthält hPLD1a (h von *human*, NCBI-Accession-Nr. siehe Tab. 2.1. in Kapitel 2.3.1) im

Vergleich zu hPLD1b im zweiten Drittel ein zusätzliches Exon aus 38 Aminosäuren bei ansonsten identischen Sequenzen. hPLD2a ist bis auf 11 zusätzliche Aminosäuren identisch zu hPLD2b.

Diese Numerierung der PLD-Typen wurde für Maus-PLDs übernommen. mPLD1 und mPLD2 (m von *murine*) sind zu 60 % identisch, und auch hier existieren weitere Spleißvarianten. mPLD1 kommt, wie im Falle der hPLD1, in den beiden Varianten mPLD1a und mPLD1b vor (Colley et al., 1997a, Redina und Frohman, 1998b), wobei wiederum mPLD1a um das 38 Aminosäuren umfassende Exon größer ist als mPLD1b. Von mPLD2 wurden 4 alternativ gespleißte Isoenzyme gefunden (mPLD2, mPLD2si-a, mPLD2si-b und mPLD2si-c, Redina und Frohman, 1998a), die bis auf die Deletion von teilweise mehreren aufeinanderfolgenden Exonbereichen identisch sind. Die erst kürzlich gefundene mPLD3 (Pedersen et al., 1998) weist nur geringe Homologien zu mPLD1 und mPLD2 auf.

Im Gegensatz dazu sind die pflanzlichen PLDs in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Typen unterteilt. Diese Definition wurde von der Arbeitsgruppe von X. Wang (Manhattan KS, USA) eingeführt, die sich mit PLD-Isoenzymen aus der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) beschäftigt und beim Durchsuchen einer genomischen DNA-Bank des Arabidopsis-Genomprojektes bisher mindestens 7 verschiedene Isoenzyme gefunden hat, von denen mindestens 5 tatsächlich in der Pflanze exprimiert werden (Dyer et al., 1995, Pappan et al., 1997, Qin et al., 1997, Qin et al., 1999). Die erste identifizierte Form wurde mit PLD $\alpha$  bezeichnet. Sequenzvergleiche zeigen, daß alle bis dahin gefundenen pflanzlichen PLDs (Mais, Reis und Rizinus) und viele weitere neu sequenzierte PLDs (z. B. aus Pimpinelle, Craterostigma, Tomate oder Tabak) in diese Gruppe eingeordnet werden können (Tab. 2.1). Alle diese Enzyme zeichnen sich durch den sehr hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Bedarf (20-100 mM) *in vitro* und ein im sauren Bereich liegendes pH-Optimum aus (pH 4,5-5,5, Pappan und Wang, 1999b). Bei der Isolierung von PLD aus Reis und Rizinus stellte man fest, daß in Abhängigkeit von Wachstums- und Entwicklungsbedingungen verschiedene Varianten des PLD $\alpha$ -Typs auftreten können, die mit PLD $\alpha$ 1, PLD $\alpha$ 2 und PLD $\alpha$ 3 bezeichnet wurden (Dyer et al., 1994, Young et al., 1996). PLD $\alpha$ 1 war meist in keimenden Samen und in jungen Blättern lokalisiert. PLD $\alpha$ 2 trat in allen Wachstumsstadien auf und war am häufigsten vertreten, während PLD $\alpha$ 3 nur im Stadium der Seneszenz nachgewiesen werden konnte.

Kurze Zeit später identifizierte man die zweite PLD in Arabidopsis, die nur 40 % Aminosäure-Identität zum  $\alpha$ -Typ aufwies. Diese neue Form ( $\beta$ -Typ) unterscheidet sich auch in den enzymatischen Eigenschaften vom  $\alpha$ -Typ. So liegt z.B. das pH-Optimum bei pH 7,0-7,5, und die für die Aktivität optimale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beträgt nur 50  $\mu\text{M}$  (Qin et al., 1997). Die beiden nächsten Isoenzyme, wegen ihrer hohen Sequenz-

Übereinstimmung von 87 % PLD $\gamma$ 1 und PLD $\gamma$ 2 benannt, sind mit 66 % Identität der  $\beta$ -Form am nächsten verwandt (nur 41 % Identität zur  $\alpha$ -Form) und haben auch ähnliche Eigenschaften. Sie benötigen wie PLD $\beta$  PIP<sub>2</sub> als Cofaktor und erreichen ihre höchste Aktivität bei einem neutralen pH-Wert und in Gegenwart von 50  $\mu$ M Kalziumionen (Qin et al., 1997, Qin et al., 1999). Inzwischen wurden noch drei weitere Isoenzyme in *Arabidopsis thaliana* entdeckt (Wang, 2000). Ihre Bezeichnung (PLD $\gamma$ 3, PLD $\delta$ 1 und PLD $\delta$ 2) richtete sich nach dem Grad der Homologie zu den bereits bekannten Isoenzymen. Pflanzliche PLDs, die nicht dem  $\alpha$ -Typ angehören, konnten auch in Reis, Baumwolle und Tabak identifiziert werden (Tab. 2.1). Sie ließen sich jedoch nicht eindeutig dem  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Typ zuordnen.

## 2.2. Die Funktion der pflanzlichen PLDs im biologischen System

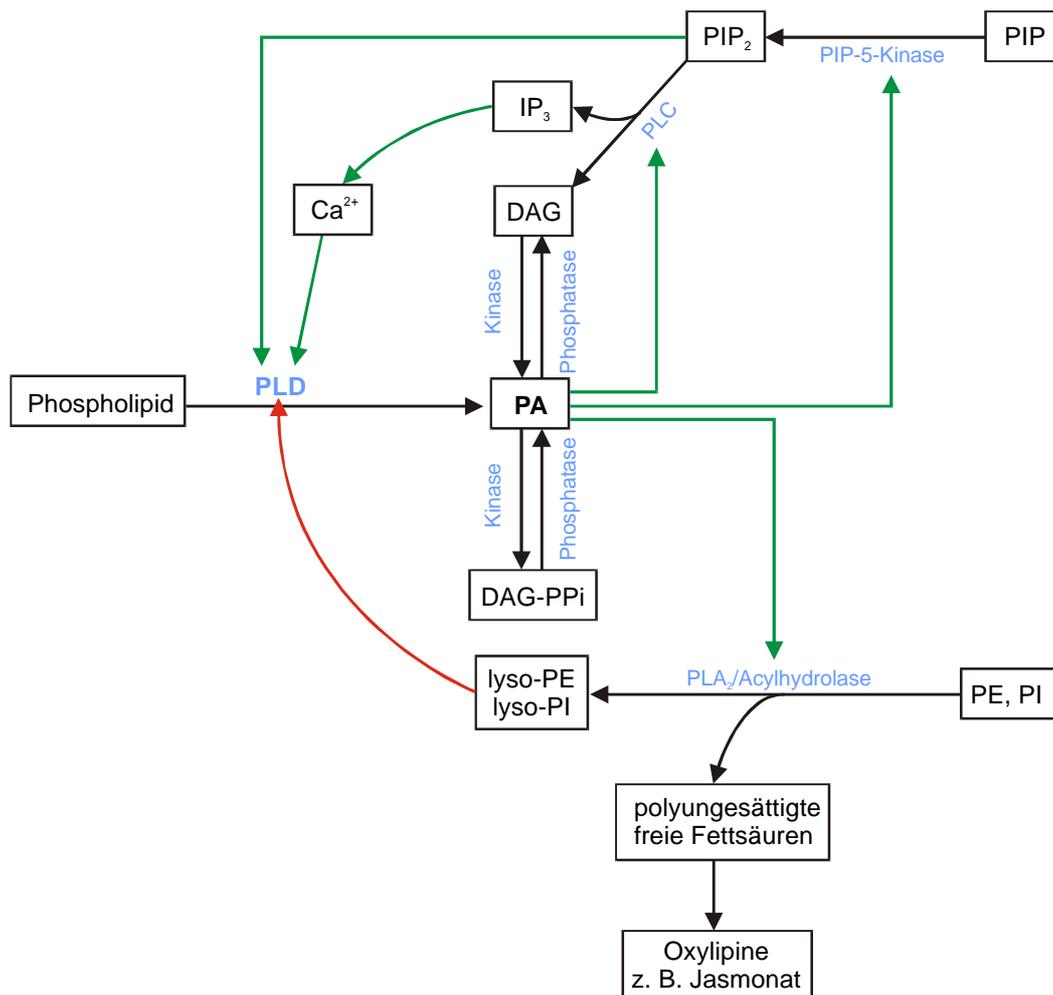
Die sehr große Isoenzym-Vielfalt weist bereits auf die Möglichkeit der Beteiligung an verschiedensten Funktionen der PLD in Pflanzen hin. Generell werden drei Bereiche diskutiert, in denen die PLD eine wichtige Rolle spielt (Review in Wang, 2000):

1. Lipidabbau auf Grund der Hydrolyseaktivität des Enzyms, 2. Beteiligung an zellulärer Regulation, z. B. Signaltransduktion, und 3. Membranumgestaltung durch Transphosphatidylierungsreaktionen. Während insbesondere die Rolle der PLD beim Lipidabbau während des Membranalters oder durch äußere Streßfaktoren schon sehr früh erkannt und untersucht wurde, zog die zweite Funktion erst in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit auf sich, nachdem in den Säugerzellen ein ähnlicher Mechanismus der Signaltransduktion aufgeklärt werden konnte. Für die Funktion der PLD bei der Regenerierung von Membranen lieferten verschiedene Arbeitsgruppen erste Hinweise. Der starke Lipidabbau bei der Zerkleinerung und Homogenisierung von Reiskleie (Contardi und Ercoli, 1932) und Möhrengewebe (Hanahan und Chaikoff, 1947) führte überhaupt zur Entdeckung von PLD-Aktivität. Dies waren die ersten Hinweise auf die Aktivierung von PLD unter streßinduzierten Bedingungen (mechanische Verwundung von Pflanzengewebe). Später wurde der Einfluß weiterer Streßfaktoren, wie z.B. Insektenbefall, Pathogenangriff (Young et al., 1996), Gefrierschock oder osmotischer Streß (Chetal et al., 1982, Frank et al., 2000) auf die PLD-Hydrolyseaktivität analysiert. In allen Fällen stieg der PLD-Gehalt im betroffenen Gewebe und auch in naher Umgebung davon an, was auf eine interne Signalweiterleitung schließen läßt. Diese streßinduzierte Membranzerstörung läßt sich folgendermaßen erklären: Durch mechanische Verwundung von Zellen oder Frosteinfluß wird die Membran porös und somit durchlässig für Ca<sup>2+</sup>, das aus seinem Speicherreservoir in die Zellen einströmt.

Ein steigender Kalziumspiegel erhöht die PLD-Aktivität, und durch erhöhte Hydrolyse von Phospholipiden entsteht Phosphatidsäure (PA), die einen wichtigen Signalmetabolit sowohl in Pflanzen als auch in Tieren darstellt (Abb. 2.1).

**Abb. 2.1. Bedeutung der Phosphatidsäure (PA) im Netzwerk der PLD-Aktivierung.**

Grüne Pfeile bedeuten Aktivierung, rote Pfeile Inhibierung, und schwarze Pfeile stehen für chemische Reaktionen. DAG-PPi, Diacylglycerolpyrophosphat; IP<sub>3</sub>, Inositol-1,4,5-trisphosphat; PE, Phosphatidylethanolamin; PI, Phosphatidylinositol; PIP, Phosphatidylinositol-4-phosphat (nach Wang, 1999)

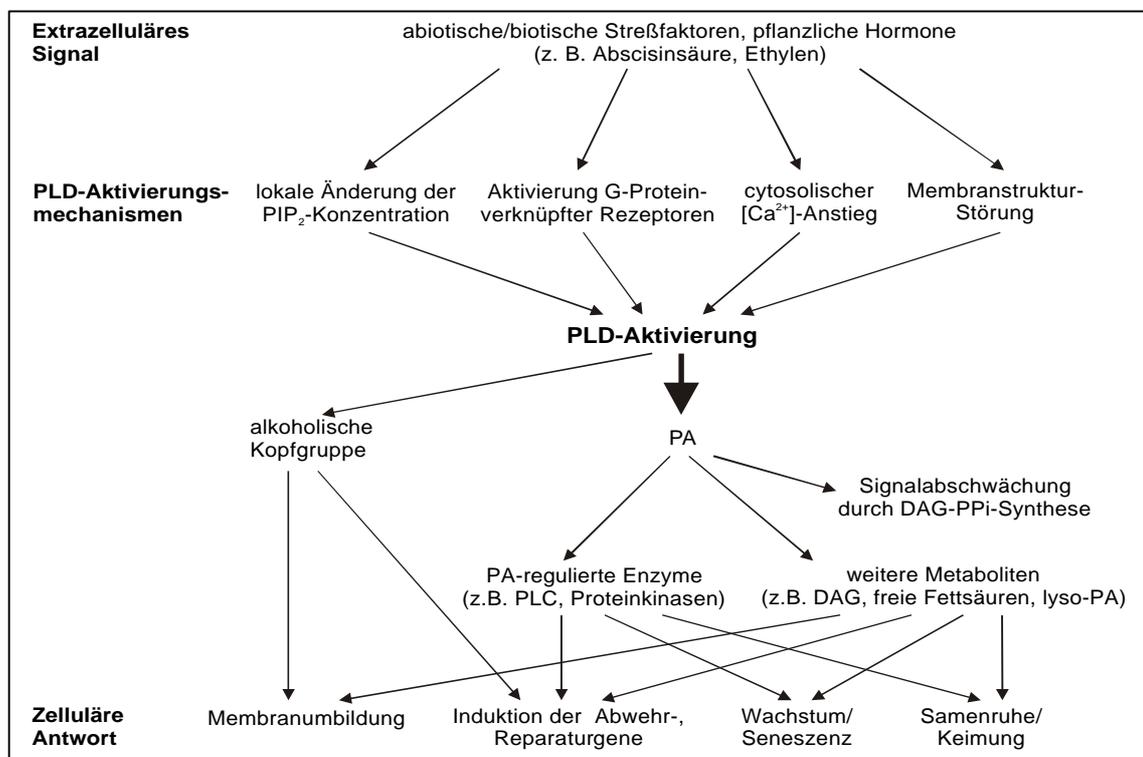


PA bildet in Membranen bei Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen bevorzugt hexagonale Phasen aus (Cullis et al., 1986). Deren Einlagerung in noch funktionsfähige Membranen bewirkt eine Destabilisierung der Bilayer – in einigen Fällen bis hin zu deren Zerstörung - und erhöht deren negative Ladung, was zu Veränderungen im Ionenstrom führen kann. Weiteres Ca<sup>2+</sup> dringt in die Zellen ein und aktiviert wiederum PLD. Dies stellt einen effektiven Weg zur Signalamplifikation dar. PA kann auch durch PA-Phosphatase dephosphoryliert werden zu Diacylglycerol (DAG), einem weiteren wichtigen Signalstoff.

Dieser wird durch einige Vertreter der PLAs oder unspezifischer Acylhydrolase abgebaut, die beide ebenfalls durch PA aktiviert werden können (Abb. 2.1) und lyso-PA und langkettige ungesättigte Fettsäuren freisetzen (Lee et al., 1997). Diese gehen anschließend in den Oxylin-Signalweg ein (Munnik et al., 1998). Als Resultat dieser Signalkaskaden entstehen dann die bekannten Stressantworten, wie z. B. Membran-Seneszenz und -abbau bis hin zum Zelltod (Abb. 2.2). Die gleichen Reaktionen werden auch bei der Behandlung von Pflanzenblättern mit Abscisinsäure und Ethylen beobachtet (Fan et al., 1997, Lee et al., 1998), was auf eine Beteiligung der PLD bei der Antwort auf den Phytohormon-induzierten Stress schließen lässt (Abb. 2.2).

### Abb. 2.2. Mechanismen der PLD-Aktivierung und Signalbeantwortung in Pflanzen.

(nach Pappan und Wang, 1999a, bearbeitet)



Diese Beteiligung der PLD bei der Signaltransduktion spielt auch im tierischen Organismus eine wichtige Rolle. Hier übernimmt die Proteinkinase C, die durch PA aktiviert werden kann, die DAG-Synthese. Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase synthetisiert daraus PIP<sub>2</sub>, einen potentiellen Aktivator aller bisher gefundener PLD-Isoenzyme (Liscovitch et al., 1994).

An dieser Stelle soll die mögliche Rolle von PLD bei der Membrangestaltung und -reorganisation erwähnt werden. Wie bereits oben beschrieben, entstehen bei der Hydrolyse PA und eine freie Kopfgruppe. PA hat eine sehr kurze Lebensdauer und wird entweder dephosphoryliert zu DAG, das als Intermediat zur Herstellung von Phosphatidylcholin (PC), PE und Triacylglycerol dient, oder PA fungiert als Substrat der

CDP-Diacylglycerol-Synthase, die daraus CDP-DAG herstellt, einen wichtigen Ausgangsstoff für die Synthese der sauren Phospholipide, wie z. B. Phosphatidylglycerol, PI, Phosphatidylserin und Cardiolipin (Kent, 1995). Die dafür benötigten Kopfgruppen werden entweder neu synthetisiert, was einen hohen Aufwand bedeutet, oder sie können aus der oben genannten PLD-katalysierten Hydrolyse weiterverwendet werden (Abb. 2.2). Auch die Transphosphatidylierungsreaktion der PLD, die in Pflanzen noch nicht direkt nachgewiesen werden konnte, kann vermutlich die zeit- und energieaufwendige Neusynthese von Phospholipiden vermeiden helfen. Dies alles führt zu einer schnellen Veränderung der Membranzusammensetzung, die vor allem bei Zellwachstum, -Differenzierung oder Streßbeantwortung benötigt wird (Wang, 2000). Daß bei diesen biologischen Mechanismen tatsächlich PLD beteiligt ist, konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Junges und schnell wachsendes Gewebe in Rizinus weist eine gesteigerte PLD $\alpha$ -Expression auf (Xu et al., 1997). Auch keimende und wachsende Samen aus Reis (Ueki et al., 1995) und Rizinus (Xu et al., 1997, Ryu und Wang, 1998) zeigen eine hohe PLD $\alpha$ -Aktivität. Deshalb wird eine mögliche Beteiligung der PLD an der Lipidmobilisierung bei der Samenkeimung diskutiert. Zien et al. (2001) lieferten durch umfangreiche Studien über die Lipidzusammensetzung vor und nach induziertem Verwundungsstreß in PLD $\alpha$ -unterdrückten bzw. nicht-genmanipulierten Arabidopsis-Pflanzen weitere Hinweise für die Rolle der PLD $\alpha$  bei der Membranlipid-Umgestaltung.

### 2.3. Strukturmerkmale der Enzyme der PLD-Superfamilie

#### 2.3.1. Bisher bekannte mRNA-Sequenzen

Vor Beginn dieser Arbeit waren pflanzliche PLDs aus Rizinus, Reis, Mais und aus Arabidopsis (Tab. 2.1) in *E. coli* kloniert und zumindest die mRNA-Sequenz bestimmt. Später kamen weitere mRNA-Sequenzen pflanzlicher PLDs hinzu, z. B. aus der Wiederauferstehungspflanze, Baumwolle, Tabak, Tomate, Pimpinelle und Kuhbohne (Tab. 2.1). Eine koreanische Arbeitsgruppe publizierte später eine unvollständige mRNA-Sequenz, die der von PLD2 aus Weißkohl dieser Arbeit entspricht.

Auch verschiedene tierische und mikrobielle PLDs wurden in ihrer mRNA-Sequenz aufgeklärt (Tab. 2.1). Dazu gehören PLDs aus der Tauffliege, dem Fadenwurm, Rind, Hamster, Mensch, der Ratte und Maus sowie aus *Arcanobacterium haemolyticum*, *Candida albicans*, verschiedene Corynebakterien, *Saccharomyces cerevisiae*, verschiedene *Streptomyces*-Arten, *Streptoverticillium cinnamoneum* und *Vibrio damsela*.

**Tab. 2.1. Überblick über bereits sequenzierte mikrobielle, pflanzliche und tierische PLDs.**  
Die Daten stammen aus der Genbank des NCBI. Bei PLD-Enzymen ohne Angabe der Isoenzymform steht ein Fragezeichen.

Organismus	Isoenzym	Referenzen	Accession-Nr.
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	PLD	Cuevas & Songer, 1993	L16583
<i>Candida albicans</i>	PLD	Kanoh et al., 1998	AB010810
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	PLD	McNamara et al., 1995	I40839
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	PLD	Songer et al., 1990	AAA64910
	PLD	McNamara et al., 1995	AAA99867
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	PLD	McNamara et al., 1995	L16585
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLD1	Honigberg et al., 1992, Rose et al., 1995, Waksman et al., 1996	P36126
	PLD2	Waksman et al., 1997	NC_001142
<i>Streptomyces acidmyceticus</i>	PLD	Hasegawa et al., 1992	E03429
<i>Streptomyces antibioticus</i>	PLD	Iwasaki et al., 1994	D16444
<i>Streptomyces chromofuscus</i>	PLD	Dinh et al., 1995 (N-term.)	AAB34906
<i>Streptomyces species</i>	PLD	Takahara et al., 1993	E05514
<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	PLD1	Ogino et al., 1999	AB007132
<i>Vibrio damsela</i>	PLD	McNamara et al., 1995	AAA27515
Ackerschmalwand ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	PLD $\alpha$	Dyer et al, 1995	AB017071
	PLD $\beta$	Pappan et al., 1997	U90439
	PLD $\gamma$ 1	Qin et al., 1997	AL161532
	PLD $\gamma$ 2	Qin et al., 1999	AL161532
	PLD $\delta$ ?	nicht publiziert	AF322228
	PLD $\delta$ ?	nicht publiziert	AB031047
Baumwolle ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	PLD $\beta$ / $\gamma$ ?	Cui und Brown, 1999	AF159139
Kuhbohne ( <i>Vigna unguiculata</i> )	PLD $\alpha$	EI Maarouf et al., 1999	AAB51392
		EI Maarouf et al., 2000	
Mais ( <i>Zea mays</i> )	PLD $\alpha$	Ueki et al., 1995	D73410
Pimpinelle ( <i>Pimpinella brachycarpa</i> )	PLD $\alpha$	Cha et al., 1997	U96438
Reis ( <i>Oryza sativa</i> )	PLD $\alpha$	Ueki et al., 1995	AB001920
	PLD?	Ueki et al., 1995	AB001919
Rizinus ( <i>Ricinus communis</i> )	PLD $\alpha$	Wang et al., 1994	AAB37305
Tabak ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	PLD $\alpha$	Lein und Saalbach, 2001	Z84822
	PLD $\gamma$ ?	nicht publiziert (Sequenz unvollständig)	AF195614

Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	PLD $\alpha$	Almquist und Paliyath, 2000	AF201661
	PLD $\alpha$	Whitaker et al., 2001	AF154425
Weißkohl ( <i>Brassica oleracea</i> var. capitata)	PLD $\alpha$ 1*	Pannenberg et al., 1998	AF090445
	PLD $\alpha$ 2*	Pannenberg et al., 1998	AF090444
	PLD $\alpha$ 2	Kim et al., 1999	U85482
Wiederauferstehungspflanze ( <i>Craterostigma plantagineum</i> )	PLD $\alpha$ 1	Frank et al., 2000	AJ133001
	PLD $\alpha$ 2	Frank et al., 2000	AJ133000
Fadenwurm ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	PLD?	Wilson et al., 1994	U55854
	PLD?	nicht publiziert	AB028889
Hamster ( <i>Cricetulus griseus</i> )	PLD1	nicht publiziert	AAB53631
Maus ( <i>Mus musculus</i> )	PLD1	Colley et al., 1997a	AAC84041
	PLD2	Colley et al., 1997b, Redina und Frohman, 1998a und 1998b	AAC24519
	PLD3	Pedersen et al., 1998	NM011116
Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )	PLD1a	Hammond et al., 1995	AAB49031
	PLD1b	Hammond et al., 1995	AAB49031
	PLD2a	nicht publiziert	AF038440
	PLD2b	nicht publiziert	AF038441
	GPI-PLD	Tsang et al., 1992	L11702
	GPI-PLD	Tsang et al., 1992	L11701
	PLD2?	Lopez et al., 1998	NM002663
	PLD2?	Steed et al., 1998	AF033850
Ratte ( <i>Rattus norvegicus</i> )	PLD?	Katayama et al., 1998	BAA24577
	PLD1a	Yoshimura et al., 1996	BAA24076
	PLD1b	Yoshimura et al., 1996	BAA24077
	PLD2	Yoshimura et al., 1996	BAA24078
	PLD2	Yoshimura et al., 1996	P70498
Rind ( <i>Bos taurus</i> )	PLD?	Scallon et al., 1991	M60804
Taufliege ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	PLD?	Adams et al., 2000	AE003784
	PLD?	nicht publiziert	AF228314

\* im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt

### 2.3.2. Das HKD-Motiv

Vergleicht man die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der in Tabelle 2.1 zusammengefaßten bisher sequenzierten PLDs, so stellt man fest, daß die PLDs innerhalb der Organismenreiche sehr hohe, zwischen den Reichen jedoch sehr niedrige Homologien aufweisen. So sind beispielsweise die pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs zu 74–95 % identisch, jedoch nur 10-20 % identisch mit den mikrobiellen oder tierischen PLDs. Trotz dieser zum Teil großen Sequenzunterschiede gibt es Bereiche, die mit wenigen Ausnahmen in allen bisher sequenzierten Proteinen hoch konserviert sind. Diese Homologiebereiche wurden mit I, II, III und IV bezeichnet (Morris et al., 1996, Ponting und Kerr, 1996, Sung et al., 1997). Innerhalb dieser Bereiche sind wiederum hochkonservierte Aminosäuren vorhanden, die man auch in anderen Phospholipid-synthetisierenden Enzymen finden kann, wie z. B. in Cardiolipin-Synthase und Phosphatidylserin-Synthase (Review in Morris et al., 1996). Diese Aminosäuren bilden ein Motiv, das aus den Aminosäuren Histidin, einer beliebigen Aminosäure, Lysin, vier hydrophoben Aminosäuren, einem Aspartatrest, 4 beliebige, 2 hydrophobe Aminosäuren, Glycin und einer kleinen Aminosäure, meist Glycin, Serin oder Threonin, besteht. Da alle PLDs und oben genannte Synthasen dieses sogenannte HKD-Motiv enthalten (mit wenigen Ausnahmen kommt dieses Motiv sogar doppelt vor), wurden diese Enzyme zu einer neuen Familie, der PLD-Superfamilie, zusammengefaßt (Koonin, 1996, Ponting und Kerr, 1996. Waite, 1999). Auch einige Endonukleasen, Toxine (z. B. Ymt aus *Yersinia pestis*) und Pockenvirus-Proteine (envelope proteins) werden wegen der dort ebenfalls vorhandenen HKD-Motive dieser Familie zugeordnet. Die Vermutung, daß diese Aufeinanderfolge von stark konservierten Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Enzymkatalyse spielt, konnten Sung et al. (1997, 1999) durch zielgerichtete Mutationen dieser Reste in der menschlichen PLD1 und Maus-PLD2 bestätigen. Tauscht man die in den beiden HKD-Motiven lokalisierten Aminosäuren gegen ähnliche Reste aus, so läßt sich *in vitro* und *in vivo* keine PLD-Aktivität mehr nachweisen. Die in der Nähe befindlichen Glycin/Serin/Threonin-Reste wurden als wichtig, aber nicht essentiell, für die Katalyse gefunden. Sie spielen wahrscheinlich bei der räumlichen Orientierung anderer Aminosäuren in der Proteinstruktur eine untergeordnete Rolle. Für den Katalysemechanismus wurden zwei Modelle vorgeschlagen: 1.) Jedes HKD-Motiv kann unabhängig vom anderen arbeiten oder 2.) jedes Motiv stellt jeweils eine Hälfte des katalytischen Zentrums dar. Da jedoch eine Punktmutation in einem HKD-Motiv die gesamte PLD-Aktivität zerstörte (Sung et al., 1997), konnte das erste Modell sehr schnell verworfen werden. Einen weiteren Beweis für die Gültigkeit des zweiten Modells lieferten Xie et al. (1998, 2000). Sie fanden durch Deletionsmutationen in der

Rattenhirn-PLD1 heraus, daß einzeln exprimierte N- oder C-terminale PLD-Fragmente, die jeweils nur ein HKD-Motiv enthalten, keine PLD-Aktivität zeigen. Mischt man die beiden exprimierten und gefalteten Fragmente *in vitro*, so läßt sich ebenfalls keine PLD-Aktivität nachweisen. Wurden jedoch beide Fragmente in COS7-Zellen koexprimiert, assoziierten sie zum vollständigen Molekül, das die volle Enzymaktivität aufwies. Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, daß diese Assoziation beider Domänen möglicherweise während der Translation geschieht und bestimmte Faltungsprozesse ermöglicht, die zur Ausbildung der korrekten Struktur führen. Desweiteren wurden von den Autoren die konservierten hydrophoben Aminosäuren (Leucin, Isoleucin und Valin) innerhalb und nahe der beiden HKD-Motive gegen Alanin ausgetauscht und das Transphosphatidylierungsverhalten untersucht. Bei allen Mutanten war die Enzymaktivität niedriger als bei der Wildtyp-PLD. Deshalb wurde auch diesen in allen PLDs hochkonservierten hydrophoben Resten eine Bedeutung für die Katalyse zugeschrieben. Mittels Immunpräzipitation konnte nachgewiesen werden, daß die oben beschriebene Assoziation der beiden Hälften des katalytischen Zentrums in diesen Mutanten nur schwach ist bzw. überhaupt nicht auftritt (Xie et al., 2000).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die konservierten Aminosäurereste in beiden HKD-Motiven essentiell für die katalytische Funktion des Enzyms und für die Interdomänen-Assoziation sind.

### 2.3.3. Die C2-Domäne

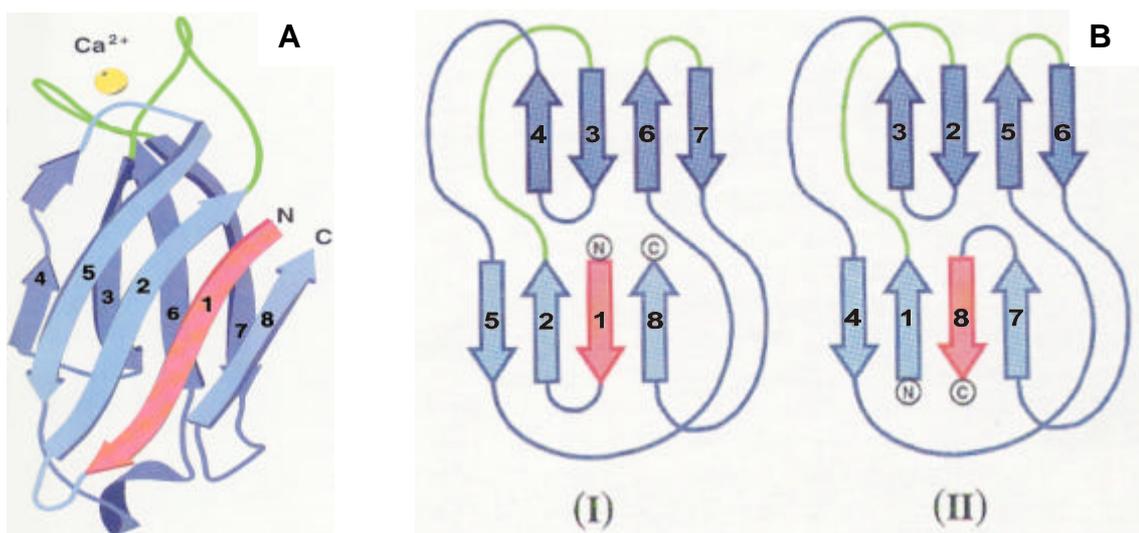
Als eine weitere Gemeinsamkeit in allen eukaryontischen PLDs - außer der Hefe- und menschlichen PLD - ist das Vorkommen einer C2-Domäne zu betrachten (Review in Nalefski und Falke, 1996, Wang, 2000). Diese etwa 115-130 Aminosäuren-umfassende Domäne kommt auch in anderen Phospholipid-bindenden Proteinen vor, die über Kalziumionen reguliert werden und die mit zellulären Membranen interagieren, z. B. in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Isoenzymen der Proteinkinase C ( $\text{PKC}\alpha$ ,  $\text{PKC}\beta$ ,  $\text{PKC}\gamma$ ,  $\text{PKC}\delta$ ,  $\text{PKC}\epsilon$ ,  $\text{PKC}\eta$ ,  $\text{PKC}\theta$ ), Phosphoinositid-spezifische PLCs (PLC- $\beta$  I-IV, PLC- $\gamma$  I-II, PLC- $\delta$  I-IV), PI-3-kinasen, cytosolische  $\text{PLA}_2$  oder Synaptotagmin I-VIII. Die C2-Domäne gehört neben der bereits gut untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden EF-Hand (Helix-Loop-Helix-Motiv, z. B. in Calmodulin, Phosphoinositid-spezifischer PLC und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen) und dem Annexin-Faltungsmotiv (4 Tandem-Repeats, jedes aus 5  $\alpha$ -Helices, bisher nur in Annexinen gefunden) zu den Kalzium-regulatorischen Motiven (Review in Kopka et al., 1998). Die Funktionen dieser C2-Domäne sind vielfältig. Sie vermittelt die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Translokation löslicher Proteine zu den Membranen (z. B. bei cytosolischer

PLA<sub>2</sub> oder PLD), die Ca<sup>2+</sup>- und Phospholipid-abhängige Aktivierung von Enzymen (z. B. bei PKCα/β/γ), und sie unterstützt die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Selbstassoziation (z. B. von Synaptotagmin I). Die ersten durch Kristallisation aufgeklärten Proteine mit C2-Domäne waren Synaptotagmin I und Phosphoinositid-spezifische PLC-δ1. Diese beiden und alle anderen bisher untersuchten C2-Domänen bestehen aus einem 8-strängigen antiparallelen β-Sandwich, das aus einem Paar von 4-strängigen β-Faltblättern zusammengesetzt ist (Abb. 2.3.A). Man unterscheidet aufgrund der unterschiedlichen Reihenfolge der β-Stränge zwei Faltungstopologien (Abb. 2.3.B): die Topologie I (in Synaptotagmin I) und die Topologie II (in PLC-δ1).

**Abb. 2.3. Die Struktur der C2-Domäne.** (nach Nalefski und Falke, 1996)

A) Bänderstruktur der C2-Domäne von Synaptotagmin I.

B) Schematische Darstellung der β-Faltblattanordnungen in den C2-Domänen von Synaptotagmin I (Topologie I) und PLC-δ1 (Topologie II).



Die C2-Domänen der pflanzlichen PLDs können aufgrund ihrer Sequenz-Homologie zu PLC-δ1 dem Faltungstyp II zugeordnet werden. Mittels Kalzium-Bindungsstudien an Punktmutanten der C2-Domänen von Synaptotagmin und PLC-δ1 konnten die Ca<sup>2+</sup>-bindenden Aminosäuren ermittelt werden (Sutton et al., 1995, Shao et al., 1996). Dies sind 4 in den Loopregionen (zwischen den β-Strängen) befindliche Aspartat- oder Glutamat-Reste, von denen nur zwei in den pflanzlichen PLDαs konserviert sind (Nalefski und Falke, 1996). Die anderen beiden wurden evolutionär zu Asparagin und Glutamin umgewandelt (siehe auch Anhang, Seite VIII). Damit entfallen zwei potentielle Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen, und das hat möglicherweise die unter 2.1. erwähnte unterschiedliche Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit von PLDα gegenüber PLDβ, PLDγ1 und PLDγ2 aus *Arabidopsis thaliana* zur Folge.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Phospholipidbindung der C2-Domäne kann durch 2 Modelle beschrieben werden (Review in Nalefski und Falke, 1996, Zheng et al., 2000). Im ersten Modell bindet das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion sowohl an eine saure Aminosäure der C2-Domäne (Aspartat oder Glutamat) als auch an das Phospholipid simultan durch elektrostatische Wechselwirkungen und ohne große Konformationsänderungen, so daß ein Ternärkomplex entsteht. Dieses Modell, auch „bridging  $\text{Ca}^{2+}$ -Modell“ genannt, konnte für die sekretorische  $\text{PLA}_2$  (Scott et al., 1990, Thunnissen et al., 1990) und für Annexin V (Swairjo et al., 1995) bestätigt werden. Das zweite Modell beschreibt eine durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung induzierte Konformationsänderung in der C2-Domäne, so daß funktionelle Gruppen exponiert werden, die eine Membranbindung ermöglichen. Dies können entweder hydrophobe Reste sein, die in die hydrophoben Membranbestandteile eindringen können, oder geladene Seitenketten, die spezifisch an die verschiedenen Kopfgruppen der Phospholipide binden können. Eine solche Konformationsänderung wurde durch Fluoreszenz- und CD-spektroskopische Messungen bei der cytosolischen  $\text{PLA}_2$  (Scott et al., 1990, Thunnissen et al., 1990) und pflanzlicher  $\text{PLD}\alpha/\beta$  (Zheng et al., 2000) nachgewiesen.

Es ist weiterhin bekannt, daß die C2-Domänen von pflanzlichen PLDs außer Kalziumionen auch Phospholipide und  $\text{PIP}_2$  binden können (Zheng et al., 2000). Die separat exprimierte C2-Domäne von  $\text{PLD}\alpha$  bindet PC in Anwesenheit von millimolaren, die von  $\text{PLD}\beta$  hingegen schon bei mikromolaren Konzentrationen an freiem Kalzium, was wiederum durch das Fehlen der 2 von insgesamt 4 sauren Aminosäuren bei  $\text{PLD}\alpha$  erklärt werden kann. Von  $\text{PLD}\beta$  und  $\text{PLD}\gamma_1/\gamma_2$  ist bekannt, daß sie  $\text{PIP}_2$ -abhängig sind (Qin et al., 1997).  $\text{PLD}\alpha$  hingegen kann zwar, wie die anderen Isoenzyme auch, in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen  $\text{PIP}_2$  binden und wird dadurch sogar aktiviert, benötigt es jedoch nicht für die Enzymkatalyse (Qin et al., 1997). Diese Aktivierbarkeit von  $\text{PLD}\alpha$  wird durch ein sogenanntes  $\text{PIP}_2$ -Bindungsmotiv innerhalb der C2-Domäne reguliert. Es besteht aus dem stark basischen Motiv  $\text{B(x)xxxBxBB}$  bzw. der inversen Sequenz  $\text{BBxBxxxxB}$  (B...Arginin oder Lysin, x...jede beliebige Aminosäure) und wurde auch in anderen  $\text{PIP}_2$ -bindenden Proteinen, wie Gelsolin, Villin und PLC, gefunden (Review in Wang, 2000).  $\text{PLD}\beta$  und  $\text{PLD}\gamma_1/\gamma_2$  besitzen in ihrer C2-Domäne kein vollständiges  $\text{PIP}_2$ -Bindungsmotiv. Dennoch kann auch die C2-Domäne von  $\text{PLD}\beta$   $\text{PIP}_2$  binden, das wie bei  $\text{PLD}\alpha$  durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verdrängt wird.

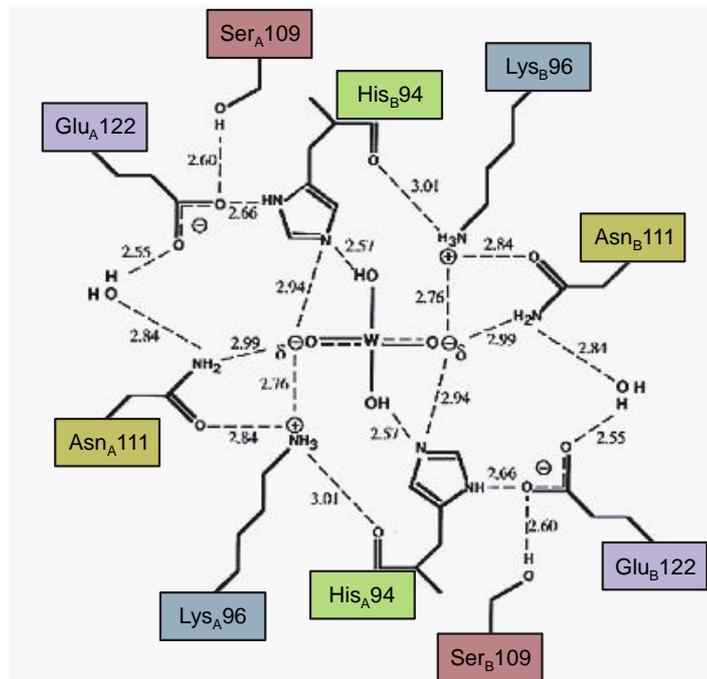
Die C2-Domäne stellt also eine universelle multifunktionelle regulatorische Domäne dar, die es ermöglicht, auf verschiedene zelluläre Veränderungen, wie z. B. verringerte oder erhöhte Kalziumkonzentrationen oder Bildung von second messenger-Molekülen wie  $\text{PIP}_2$  zu reagieren und Enzyme zielgerichtet zu aktivieren.

## 2.4. Der Katalysemechanismus der Endonuklease Nuc als Vertreter der PLD-Superfamilie

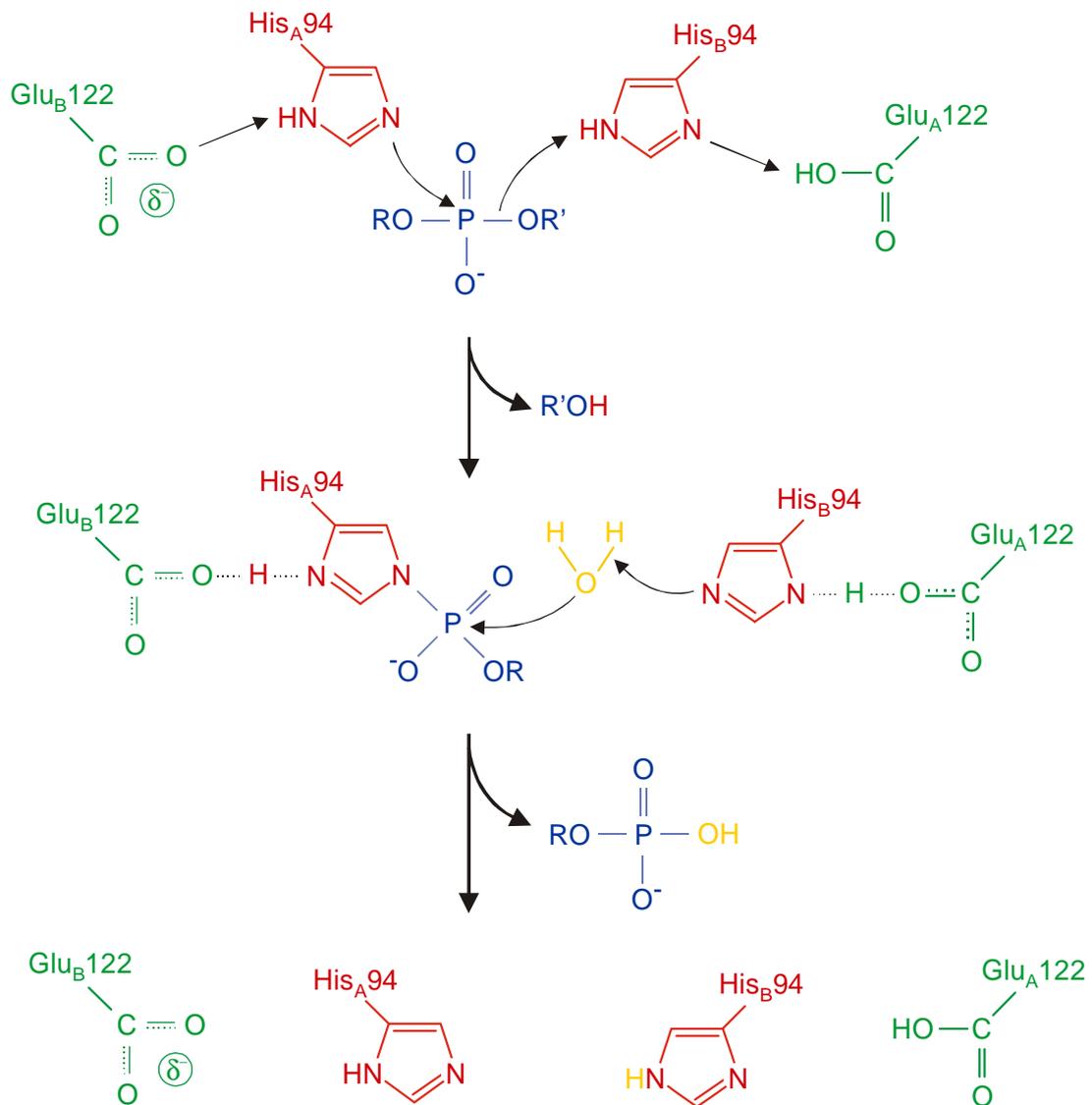
Bereits Stanacev und Stuhnke-Sekalec (1970) konnten durch [<sup>3</sup>H]-markiertes Phosphatidylglycerol zeigen, daß es bei der Herstellung von Cardiolipin durch Phospholipase D aus Weißkohl einen Phosphatidyl-Enzymkomplex geben muß und daß die Reaktion nach einem Ping-Pong-Mechanismus ablaufen könnte. Diese Vermutungen wurden durch Gottlin et al. (1998) bestätigt, die [<sup>32</sup>P]-markiertes Phosphat mit der Endonuklease Nuc aus *Salmonella typhimurium*, einem Vertreter der PLD-Superfamilie, mischten, das entstandene Intermediat in diesem Zustand halten und untersuchen konnten. Durch Zugabe von [<sup>18</sup>O]-markiertem Wasser bei der Hydrolyse von PC durch Phospholipase D aus *Streptomyces chromofuscus* konnten Holbrook et al. (1991) nachweisen, daß statt der C-O- die P-O-Bindung gespalten wird, weil sich <sup>18</sup>O am Ende des Experimentes in der Phosphatidsäure befand und nicht am freigesetzten Cholin.

Obwohl mit Hilfe von Punktmutationen die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren innerhalb der HKD-Motive ermittelt werden konnten, war jedoch noch nicht bekannt, welcher von den konservierten Resten die kovalente Bindung zum Phosphor des Phospholipids eingeht. Hier lieferten Gottlin et al. (1998) durch Punktmutationen in Nuc den Beweis, daß nur Histidin aus dem HKD-Motiv in der Lage ist, den Phosphoenzymkomplex einzugehen. Ersetzt man diese Aminosäure gegen eine andere, so kann das kovalent verknüpfte Intermediat nicht mehr gebildet werden. Ein Jahr später gelang es Stuckey und Dixon (1999), die Endonuklease Nuc in Anwesenheit des Inhibitors Wolframat zu kristallisieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur mittels Röntgenkristallstruktur-Analyse aufzuklären. Das katalytische Zentrum mit allen beteiligten Aminosäuren konnte rekonstruiert werden (Abb. 2.4). Da dieses Enzym nur eines statt zwei HKD-Motiven besitzt, lagern sich zwei Moleküle sattelförmig zu einem Dimer zur Bildung des katalytischen Zentrums zusammen. Neben den beiden Histidinen sind auch die Lysine des HKD-Motivs und in der Nähe befindliche Asparagin-Reste wesentlich an der Bindung des Phosphates beteiligt.

**Abb. 2.4. Einblick in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des katalytischen Zentrums von Nuc aus *Salmonella typhimurium*.** Die gestrichelten Linien geben mögliche Wasserstoffbrücken und ihre Längen in Angström an. Die Indices A und B bezeichnen zwei verschiedene Monomere. (nach Stuckey und Dixon, 1999, bearbeitet)

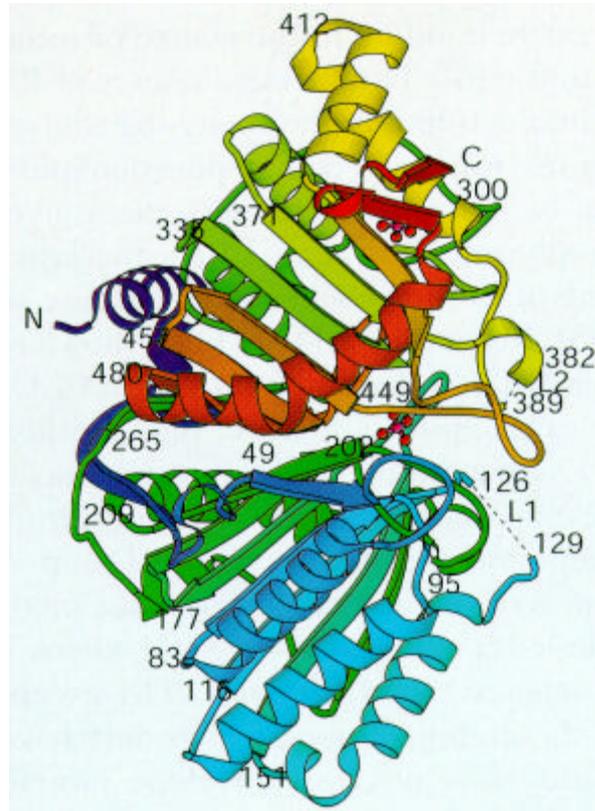


Stuckey und Dixon (1999) schlugen folgenden Katalysemechanismus vor (Abb. 2.5): Im ersten Schritt greift der Imidazol-Stickstoff des Histidins aus Molekül A das Phosphoratom des Substrates nukleophil an, und es entsteht das Phosphoenzym-Intermediat. Das Histidin des Moleküls B fungiert als Säure, die den Sauerstoff des freigesetzten Alkohols protoniert. Im zweiten Schritt des Ping-Pong-Mechanismus wird dieses Intermediat durch ein aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert, und das entstandene Phosphatidat wird vom Enzym freigesetzt. Die in Abb. 2.5 eingezeichneten, den Histidinen benachbarten Glutamat-Reste stabilisieren möglicherweise die ionischen Formen der Histidin-Reste durch Erniedrigung des effektiven  $pK_a$ -Wertes (Stuckey und Dixon, 1999).

**Abb. 2.5. Der Zweischnitt-Katalysemechanismus.** (nach Stuckey und Dixon, 1999, bearbeitet)

Da die HKD-Motive in allen Vertretern der PLD-Superfamilie sehr stark konserviert sind, ist dieser Reaktionsmechanismus - mit kleineren Variationen - auf alle diese Enzyme übertragbar. Dies zeigten kürzlich Leiros et al. (2000), denen es gelang, die bisher erste PLD (aus *Streptomyces sp.*, PMF) zu kristallisieren (Abb. 2.6) und das aktive Zentrum näher zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, daß statt des Glu<sub>B</sub>122 in Abb. 2.5 ein Aspartat-Rest die Wasserstoffbrücke zum Imidazol-Stickstoff ausbildet. Das zweite Asp ist zu weit entfernt und erlaubt keine Verbrückung mit dem zweiten Histidin. Im Unterschied zur Endonuklease, wo beide Histidin-Reste aufgrund der Dimerbildung gleichberechtigt sind, ist das Nukleophil in der PLD aus *Streptomyces species* ausschließlich das Histidin des N-terminalen HKD-Motivs, während es bei der PLD aus *Streptomyces antibioticus* das Histidin der C-terminalen Domäne ist (Iwasaki et al., 1999).

**Abb. 2.6. Proteinstruktur der PLD aus *Streptomyces sp.*, PMF.** Das Molekül ist in der Reihenfolge der Aminosäuren von dunkelblau bis rot gefärbt. L1 und L2 bezeichnen zwei flexible Loopregionen in räumlicher Nähe der Andockstellen des Enzyms an die Membran. (nach Leiros et al., 2000)



Erst kürzlich erschien die erste Kristallstruktur einer pflanzlichen PLD aus Kuhbohnen (*Vigna unguiculata*), die rekombinant in Insektenzellen hergestellt und isoliert werden konnte (Abergel et al., 2001). Die Kristallisation weiterer Vertreter der PLD-Superfamilie wird weitere Einsichten in den Katalysemechanismus ermöglichen.

## 2.5. Charakterisierung von Phospholipase D aus Weißkohl

Bei der Untersuchung der Phospholipidzusammensetzung und des –stoffwechsels in Pflanzen beobachteten Contardi und Ercoli (1932) erstmalig einen PC-Abbau in Reiskleie. Das dafür verantwortliche Enzym, Phosphatidylcholinphosphatidohydrolase oder kurz Phospholipase D, fand man später auch in anderen Pflanzen, unter anderem in Sojabohnen, Mais, Reis, Gerste, Weizen, Rizinus, Raps, Karotten, Wirsing- und Weißkohl (Hanahan und Chaikoff, 1947, Davidson und Long, 1958, Chetal et al., 1982, Wang et al., 1993b, Ueki et al., 1995, Novotna et al., 1999). Im Folgenden soll die PLD aus Weißkohl näher betrachtet werden.

Dieses Enzym konnte erstmalig mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter Affinitätschromatografie an Octylsepharose und Anionenaustauschchromatografie aus Weißkohlgewebe in hoher Reinheit isoliert werden (Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992). Die Molekülmassen von 87 (Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992) bzw. 90,2 kDa (Abousalham et al., 1993) wurden mittels SDS-PAGE bestimmt. Das Enzym liegt als Monomer vor und besteht, wie bereits unter 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben, aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne. Im Gegensatz zu *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* wurden in Weißkohl bisher nur Isoenzyme des  $\alpha$ -Typs nachgewiesen. Diese PLD wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im millimolaren Bereich und durch einen sauren pH-Wert aktiviert. In Anwesenheit der optimalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 40-45 mM liegt das ermittelte pH-Optimum der PLD bei pH 5,5-5,7 (Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992). Abousalham et al. (1993) beschrieben eine Verschiebung des pH-Optimums in den neutralen Bereich bei einer Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 10 mM. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,7 (Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992, Abousalham et al., 1993). Weitere potentielle Aktivatoren sind anionische Amphiphile, z. B. SDS, Triphosphoinositide, Monocetylphosphat (Dawson und Hemington, 1967), PA (Jung et al., 1989), 1,3-Diacylglycero-2-sulfat und 1,3-Diacylglycero-2-phosphat (Dittrich et al., 1998). Inhibierend auf die PLD wirkten neben EDTA Cholin, Ethanolamin, Protaminsulfat (Dawson und Hemington, 1967), 1,3-Diacylglycero-2-phosphocholin (Dittrich et al., 1998, Haftendorn et al., 2000), Lyso-PE (Ryu et al., 1997), Alkylphosphatester (Dittrich et al., 1996, 1998) und Aluminiumfluorid (Li und Fleming, 1999). Die Zugabe von 4-Chlormercuribenzoat (Yang et al., 1967), Diethylpyrocarbonat (Lee et al., 1989, Secundo et al., 1996) oder 4-Bromphenacylbromid (Lee et al., 1989) führten zur Inaktivierung des Enzyms, woraus die Autoren auf eine mögliche Anwesenheit von freien Cystein-Sulfhydrylgruppen, Histidin- und Lysinresten im aktiven Zentrum schlossen. Wie neuere Arbeiten zeigten, wird das aktive Zentrum aus 2 HKD-Motiven gebildet (2.3.2).

Das Substratspektrum der PLD aus Weißkohl reicht von PC, PE, PG und PS über Phosphatidylinositiden, Cardiolipin, Plasmalogen (Heller, 1978) bis hin zu Alkylphosphatestern, z. B. Hexadecylphosphocholin (Dittrich et al., 1996, 1998). Bei der Transphosphatidylierungsreaktion werden bevorzugt primäre Alkohole, z.B. Glycerol oder Methanol, aber auch sekundäre und N-heterozyklische Alkohole akzeptiert (Aurich et al., 1997, Hirche et al., 1997).

Die bei der sekretorischen PLA<sub>2</sub> beschriebene Grenzflächenaktivierung (Review in Scott und Sigler, 1994) tritt auch bei den PLDs auf. Das bedeutet, daß das Enzym durch ein in aggregierter Form vorliegendes Substrat aktiviert wird (Dittrich et al., 1998). Die Enzymkatalyse wird entweder in wäßrigen Puffersystemen oder an der Grenzfläche zwischen Pufferphase und organischem Lösungsmittel (z. B. Diethylether, Ethylacetat oder n-Hexan) durchgeführt. In biphasischen Systemen spielt der Grenzflächendruck, der mit der Packungsdichte der PC-Aggregate korreliert (Hirche und Ulbrich-Hofmann, 1999), eine große Rolle. Da die Enzymaktivität nicht nur von der Art des Substrates und von der Enzymkonzentration abhängig ist, sondern auch von der physikalischen Gestalt des Substrates - die wiederum vom verwendeten organischen Lösungsmittel beeinflusst wird - und insbesondere von der Struktur und Dynamik der Grenzfläche, ist es schwierig, allgemeine kinetische Daten, wie z. B.  $K_m$ ,  $V_{max}$  o. ä., anzugeben. Eine kinetische Analyse der PLD für verschiedene Substrate zeigte, daß das Hill-Modell zur Beschreibung der v/S-Kurven gut geeignet ist (Dittrich et al., 1998).

## 2.6. Phospholipase D in der Phospholipidsynthese

Aufgrund ihrer ausgeprägten Transphosphatidylierungsfunktion (Abb. 1.1) wird PLD schon seit vielen Jahren zur Modifizierung der polaren Kopfgruppe in Phospholipiden verwendet. Dabei stellte PLD aus Weißkohl, meist als Rohsaft oder in partiell gereinigter Form angewandt, die traditionelle Enzymquelle dar (Dawson, 1967; Kovatchev und Eibl, 1978; Juneja et al., 1987), während in jüngerer Zeit PLDs aus *Streptomyces species*, von denen einige eine höhere Transphosphatidylierungsaktivität aufweisen, bevorzugt werden (Tab. 2.2). Eine ausführliche Zusammenstellung der durch PLD katalysierten Reaktionen und Synthesebeispiele sind in Servi (1999) und Ulbrich-Hofmann (2000) zu finden. In jüngerer Zeit hat PLD aus Weißkohl wiederum erneut Aufmerksamkeit auf sich gezogen, weil sich ihr Reaktionsspektrum auch auf Alkylphospholipide (Aurich et al., 1997) ausdehnen läßt.

**Tabelle 2.2. In 1,2-Diacyl-*sn*-glycerophospholipide durch PLD eingeführte Kopfgruppen.**

(nach Ulbrich-Hofmann, 2000, ausgewählte Beispiele)

Eingeführte Kopfgruppe	PLD-Quelle	Referenz
Aliphatische primäre Alkohole	<i>Streptomyces sp.</i>	Okahata et al., 1995
	Weißkohl	Dawson, 1967 Eibl und Kovatchev, 1981 Sale et al., 1989
	Wirsingkohl	Yang et al., 1967
Aliphatische sekundäre Alkohole	<i>Streptomyces sp.</i>	D'Arrigo et al., 1994
Ethylenglycol	Weißkohl	Dawson, 1967
Alkandiole	Weißkohl	Kovatchev und Eibl, 1978
Glycerol	Weißkohl	Dawson, 1967 Lee et al., 1985 Juneja et al., 1987
	Wirsingkohl	Yang et al., 1967
Dihydroxyaceton	<i>Streptomyces sp.</i>	Takami und Suzuki, 1994
Phosphatidylglycerol	<i>Streptomyces sp.</i>	D'Arrigo et al., 1996
	Weißkohl	Stanacev et al., 1973
Zyklische nichtaromat. Alkohole	<i>Streptomyces sp.</i>	D'Arrigo et al., 1994
Ethanolamin	<i>Streptomyces mediocidicus</i> , <i>Streptoverticillium cinnamoneum</i> , <i>S. hachijoense</i>	Nakajima et al., 1994
	Weißkohl, <i>Streptomyces chromofuscus</i> , <i>S. prunicolor</i> u. a. <i>S. sp.</i>	Juneja et al., 1988
	Weißkohl	Dawson, 1967 Smith et al., 1978
	Wirsingkohl	Yang et al., 1967
D- und L-Serin	<i>Streptomyces chromofuscus</i>	Diaz et al., 1998
	<i>Streptomyces prunicolor</i>	Sakai et al., 1996
	<i>Streptomyces sp.</i>	Okahata et al., 1995
	Weißkohl, <i>Streptomyces chromofuscus</i> , <i>S. prunicolor</i> u. a. <i>S. sp.</i>	Juneja et al., 1989
	Wirsingkohl	Comfurius und Zwaal, 1977
Nucleoside	<i>Streptomyces sp.</i>	Shuto et al., 1987, 1995, 1996 Wang et al., 1993a
	<i>Actinomadura sp.</i>	Kokusho et al., 1993
Saccharide	<i>Streptomyces sp.</i>	Wang et al., 1993a
	<i>Streptomyces sp.</i>	Wang et al., 1993a
Peptide	<i>Streptomyces sp.</i>	Wang et al., 1993a Okahata et al., 1995
	<i>Streptomyces lydicus</i> u. a.	Nagao et al., 1991
Arsenocholin	Weißkohl, <i>Streptomyces sp.</i>	Hirche et al., 1997
N-heterozyklische Alkohole	Weißkohl, <i>Streptomyces sp.</i>	Hirche et al., 1997
	<i>Streptomyces sp.</i>	D'Arrigo et al., 1996

### 3. Materialien

#### 3.1. Geräte

Die folgende Liste enthält allgemein verwendete Geräte, die nicht zu speziellen Methoden zugeordnet werden konnten.

Eppendorf (Hamburg):	Thermomixer 5436 und compact
H+P Labortechnik (Oberschleißheim):	Dampfsterilisator Varioklav
Heidolph (Kelheim):	Horizontalschüttler unimax 1010
Heraeus (Hanau):	Sicherheitswerkbank HERAsafe, Zentrifuge Biofuge pico
Hettich (Tuttlingen):	Rotofix 32 Zentrifuge
Janke & Kunkel IKA-Labortechnik:	Horizontalschüttler KS250 basic, Vibrofix VF1 Electronic Vortex
Medizin & Labortechnik (Hamburg):	Dampfsterilisator GTA 50
Metrohm (Filderstadt):	pH-Meter 691 mit variomag Elektronik- Rührer
Sartorius (Göttingen):	Analysenwaage
Sigma (Deisenhofen):	Kühlzentrifuge 2K15

#### 3.2. Antikörper

- Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (IBA, Göttingen)
- QIAexpress Anti-His Antikörper aus der Maus (Qiagen, Hilden)
- Anti-Maus-IgG aus Esel (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Anti-PLD1-Antiserum aus Kaninchen (Eurogentec, Niederlande)
- Anti-Kaninchen-IgG aus Esel (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

### 3.3. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt und HPLC-gereinigt.

#### *Primer für cDNA-Synthese:*

cDNA-Bank: oligo(dT)<sub>18</sub> (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)  
 Fragment 1 (s.u.): 5'-Primer: 5'-AGA AGA ACG TGT AAG G-3'  
 Fragmente 2 und 3 (s.u.): Oligo(dT)<sub>18</sub> (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)  
 Fragment 4 (s.u.): Oligo dT-3sites Adapter Primer (aus 3'-RACE Kit von TaKaRa, Kyoto, Japan)

#### *Herstellung der PCR-Produkte für die Sequenzierung der cDNAs:*

Fragment 1: F1fw 5'-GAT CGT TGC GTA SAG CTG TGT T-3'  
 F1rv 5'-AAG ATY CAC GTS AAR CTC CAG TAC TT-3'  
 Fragment 2: F2fw 5'-ACT TTN CAY GCT ACC ATC TAT GA-3'  
 F2rv 5'-CAT CAG GGT TAC GAG GAC AGA G-3'  
 Fragment 3: F3fw 5'-AAG ATC CAT GTG AAR CTB CAG TAC TT-3'  
 F3rv 5'-CGG AAR CCA TGG ATC TG-3'  
 Fragment 4: F4fw 5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C-3'  
 F4rv 5'-GGG AGG CTA CCA ACC ACA TCA C-3'

#### *Herstellung der PCR-Produkte für die Sequenzierung der genomischen DNA:*

PLD1: PLD1pre 5'-CTC TGA CCA CCG ACT CCG AT-3'  
 PLD1post 5'-ACC ACA CCA ACG ACC AAC TTA T-3'  
 F1rv, F2fw, F2rv, F3 fw, F3rv, F4fw: siehe oben  
 PLD2: PLD2pre 5'-CAC CAC CGA TTT AGT TTC AAG G-3'  
 PLD2post 5'-GCA GCA GCA ATG TAG AGA CAG T-3'  
 F1rv, F2fw, F2rv, F3 fw, F3rv, F4fw: siehe oben

#### *Herstellung der PLD1- und PLD2-Matrizen:*

PLD1: PLD1pre 5'-CTC TGA CCA CCG ACT CCG AT-3'  
 PLD1post 5'-ACC ACA CCA ACG ACC AAC TTA T-3'  
 PLD2: PLD2pre 5'-CAC CAC CGA TTT AGT TTC AAG G-3'  
 PLD2post 5'-GCA GCA GCA ATG TAG AGA CAG T-3'

*Herstellung der PLD1- und PLD2-Inserts für die Klonierung in pRSET5a*

PLD1: Iso1fw 5'-GGA ATT CCA TAT GGC TCA GCA TCT GCT GCA TGG-3'

Iso1rv 5'-CCC AAG CTT TCA TTA GGT TGT CAG GAT TGG C-3'

PLD2: Iso2fw 5'-GGA ATT CCA TAT GGC CCA GCA TCT GTT ACA CGG-3'

Iso2rv 5'-CCC AAG CTT CTA TTA AGT TGT AAG GAT TGG AGG CA-3'

*Herstellung des PLD1-Inserts für die Klonierung in pASK-IBA6 und -IBA7*

N-IBA-6/7 5'-AGC TCG GAA GAC CTG CGC GCG CAG CAT CTG CTG

CAT GGT ACT TTG CAC GCT A-3'

C-IBA-6/7 5'-TAT GCG GAA GAC CTT ATC ATT AGG TTG TCA GGA TTG

GCG GCA AGT AGT CAG A-3'

*Herstellung des PLD1-Inserts für die Klonierung in pET20b(+) (mit His-tag)*

HisPrime fw 5'-ATT ATC TAG AGA AGG AGA TAT ACA TAT GGC GCA GCA TCT-

GCT GCA T-3'

HisPrime rv 5'-CCC AAG CTT TCA TTA GGT TGT CAG GAT TGG C-3'

*Herstellung des PLD1-Inserts für die Klonierung in pGEX4T-2*

GSTprime fw 5'-GAA GAT CTC AGC ATC TGC TGC ATG GTA C-3'

GSTprime rv 5'-GCG AAT TCT CAT TAG GTT GTC AGG ATT GG-3'

*Herstellung des C-terminalen PLD1-Fragmentes (für Immunisierung)*

C-Term-fw 5'-GGA ATT CCA TAT GGC TCA GGG CTT AGA GG-3'

C-Term-rv 5'-CCC AAG CTT TCA TTA GGT TGT CAG GAT TGG C-3'

*Sequenzierungsprimer:*

Alle Sequenzierungsprimer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt, am 5'-Ende mit IRD800 modifiziert und HPLC-gereinigt.

M13 universal: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

M13 reverse: 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

KS: 5'-TCG AGG TCG ACG GTA TC-3'

T7 Promotor: 5'-CGA AAT TAA TAC GAC GAC TCA-3'

T7 Terminator: 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'

IBA6/7 forward: 5'-GAG TTA TTT TAC CAC TCC CT-3'

IBA6/7 reverse: 5'-ACG CAG TAG CGG TAA ACG-3'

Sonde 2 forward: 5'-GAG CAG AGA TGG AGA AAG CA-3'  
 Sonde 2 reverse: 5'-TTA CCA CCY TGC TTT CTC CAT CTC TG-3'

### 3.4. Plasmide und Vektoren

pASK-IBA6 / pASK-IBA7	Amp <sup>r</sup> (IBA Göttingen)
pCR-Script Amp SK(+)	Amp <sup>r</sup> (Stratagene, Heidelberg)
pET20b(+)	Amp <sup>r</sup> (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach)
pGEX 4T-2	Amp <sup>r</sup> (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
pRSET5a	Amp <sup>r</sup> (modifiziert, Dr. T. Schmidt, IBA Göttingen)
pUBS520	Kan <sup>r</sup> (Dr. U. Brinkmann, Epidauros Biotechnology Bernried)

### 3.5. *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> XLI blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> ΔM15(lacZ) Tn10 (tet<sup>r</sup>)</i> ] (Stratagene, Heidelberg)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F <i>dcm ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal I</i> (DE3) (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach)

### 3.6. Kulturmedien

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium (1 % NaCl [Merck, Darmstadt], 1 % Trypton und 0,5 % Hefeextrakt [Difco GmbH, Augsburg]) bzw. in 2 x YT (1 % NaCl, 2 % Trypton, 1 % Hefeextrakt) unter den im Methodenteil angegebenen Kultivierungsbedingungen.

## **4. Methoden**

### **4.1. RNA-Präparation**

#### 4.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Weißkohl

Die Gesamt-RNA aus Weißkohl konnte unter Verwendung des RNeasy Plant Kits (Qiagen, Hilden) gewonnen werden. Ausgehend von 2 g grob zerkleinertem, jungem Weißkohlgewebe (Weißkohl, Sorte Lennox, vom Wochenmarkt Halle) wurde zunächst durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und Mörsern feines Pulver hergestellt, das nach Anleitung des Kit-Herstellers weiterverarbeitet wurde. Alle verwendeten Glas- und Plastikgeräte wurden vor Benutzung mit 0,1 %igem DEPC-Wasser (DEPC von Sigma, Deisenhofen) gespült, um RNase-Kontaminationen zu verhindern.

#### 4.1.2. Isolierung von mRNA aus Weißkohl

Aus der bereits gewonnenen Gesamt-RNA aus Weißkohl (siehe 4.1.1.) wurde unter Verwendung des Oligotex mRNA Midi Kits (Qiagen, Hilden) mRNA isoliert. Alle verwendeten Glas- und Plastikgeräte wurden vor Benutzung mit 0,1 %igem DEPC-Wasser gespült, um RNase-Kontaminationen zu verhindern.

### **4.2. DNA-Präparation**

#### 4.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Weißkohl

Um die genomische DNA aus Weißkohl zu isolieren, wurden 2 g inneres Blattgewebe mit einer Schere grob zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe mit wenig feinem Seesand gemischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Mörser und Pistill zu Puder gerieben. Danach folgten Zellaufschluß, Proteinpräzipitation und DNA-Isolierung unter Verwendung des Puregene DNA-Isolierungs-Kits (Gentra, Minneapolis, USA).

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

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden).

### 4.3. Größen- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 4.3.1. Größenbestimmung von DNA und RNA

Zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren wurde die Agarosegelelektrophorese nach Ausubel et al. (1987ff, Stand 2001) verwendet (:Consort E 321 power supply und Easy Cast Elektrophoresesystem von AGS, Heidelberg, Agarose von Eurogentec, Belgien, Bromphenolblau von Serva, Heidelberg). Als Größenstandards dienten die Molekulargewichtsmarker 1kb-Leiter (GIBCO BRL, Eggenstein) und 100 bp-DNA-Leiter (New England Biolabs, Frankfurt/M.).

#### 4.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Neben der Agarosegelelektrophorese nach Ausubel et al. (1987ff, Stand 2001), die unter Verwendung der 1kb-Leiter (GIBCO BRL, Eggenstein) zur Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration diente, wurde eine Absorptionsmessung bei 260 nm durchgeführt ( $A_{260} = 1 \approx 40 \mu\text{g/ml}$  Einzelstrang-RNA,  $A_{260} = 1 \approx 50 \mu\text{g/ml}$  Doppelstrang-DNA, Spectrophotometer DU 7400 von Beckmann, München).

### 4.4. Herstellung von Genfragmenten mittels PCR bzw. RT-PCR

Die isolierte mRNA wurde mit Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Eggenstein) und unter Verwendung des Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) in eine einzelsträngige cDNA übersetzt (dNTPs von Hybaid-AGS, Heidelberg). Diese cDNA diente als Matrize für die anschließenden PCR-Untersuchungen, die mit Pfu-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und den sequenzspezifischen Primern F2fw, F2rv für Fragment 2 sowie F3fw und F3rv für Fragment 3 (Primersequenzen unter 3.3.) durchgeführt wurden (TRIO-Thermoblock von Biometra, Göttingen). Für die Herstellung der cDNA von Fragment 1 (dem 5'-Ende der mRNA) wurde der Primer 5'-AGA AGA ACG TGT AAG G-3' eingesetzt. Nach der Zyklisierung dieser cDNA mittels T4-RNA-Ligase (5'-RACE-Kit, TaKaRa, Kyoto, Japan) wurde eine PCR mit Pfu-DNA-Polymerase und den Primern F1fw und F1rv durchgeführt. Zur Herstellung der cDNA von Fragment 4 (entspricht dem 3'-Ende der mRNA) diente wiederum die isolierte mRNA als Matrize und der Primer Oligo dT-3sites-Adapter des 3'-RACE-Kits (TaKaRa, Kyoto, Japan). Bei der anschließenden PCR wurden die Primer F4fw und F4rv verwendet. Alle entstandenen PCR-Produkte wurden

quantitativ über eine Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Bei der Herstellung der vier analogen Fragmente für die Sequenzierung der genomischen DNA wurde ähnlich verfahren, wobei die isolierte genomische DNA als Matrize bei der PCR eingesetzt wurde. Die verwendeten Primer sind unter 3.3. aufgeführt.

#### **4.5. Klonierungstechniken**

Alle Standardtechniken, wie Restriktionsschnitte von PCR-Produkten und von Plasmidvektoren (Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs, Frankfurt/M. und Hybaid-AGS, Heidelberg), Reinigung der entstandenen DNA-Fragmente (mittels Ethanol-fällung oder gelelektrophoretischer Trennung) und Ligationsreaktionen (Shrimp Alkalische Phosphatase von USB, Cleveland, USA, T4-DNA-Ligase von GIBCO BRL, Eggenstein), erfolgten nach Ausubel et al. (1987ff, Stand 2001). Nach jedem Klonierungsschritt wurden die Plasmide sequenziert.

#### **4.6. Sequenzierung von Plasmiden**

Nach der Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmide wurden 200 fmol der zu sequenzierenden DNA entnommen und mittels SequiTherm EXCEL II DNA-Sequencing Kit (Epicentre, Madison, USA) vorbereitet (Omn-E PCR Cycler von Hybaid-AGS, Heidelberg). Die Nukleotidsequenz der entstandenen DNA wurde schließlich im LiCor 4000 DNA-Sequenzierer (LiCor, Lincoln, NE) ermittelt.

#### **4.7. Transformation von Plasmidvektoren in *E. coli***

Die Transformation der Plasmidvektoren in *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation im Gene Pulser II (BioRad, München). Anschließend wurden die transformierten Bakterienzellen auf LB-Agarplatten (SELECT Agar von Gibco BRL, Eggenstein) mit entsprechenden Antibiotika (Ampicillin und Kanamycin von ICN, Meckenheim) als Selektionsmarker verteilt und bei 37 °C inkubiert (Brutschrank Kelvitron von Heraeus, Hanau).

#### 4.8. Anzucht und Kultivierung der *E. coli*-Stämme

LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (80 µg/ml Ampicillin / 50 µg Kanamycin) wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie einer bei 37 °C inkubierten LB-Agarplatte beimpft und bei 180 rpm und 37 °C über Nacht geschüttelt (Multitron-Schüttelinkubator HT von Infors, Bottmingen, Schweiz). Diese Flüssigkultur diente zur Isolierung von Plasmid-DNA oder als Vorkultur für Expressionsversuche.

#### 4.9. Expression der klonierten Gene *pld1* und *pld2* in *E. coli*

##### 4.9.1. Herstellung löslicher aktiver PLD1 und PLD2

Die Hauptkultur (2 x YT mit 80 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin) wurde 1:50 mit einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21 (DE3), die die Plasmide pUBS520 und pRSET5a-pld1 bzw. pRSET5a-pld2 enthielt, beimpft und bei 15 °C mit 180 rpm 3 bis 4 Tage lang geschüttelt, bis die OD<sub>600nm</sub> ca. 8 erreichte (Spectrophotometer U-1100 von Hitachi, Tokio, Japan).

##### 4.9.2. Herstellung von PLD1- und PLD2-inclusion bodies

2 x YT-Medium mit 80 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin wurde 1:50 mit einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21 (DE3), die die Plasmide pUBS520 und pRSET5a-pld1 bzw. pRSET5a-pld2 enthielt, beimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 30 °C mit 180 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-1 geschüttelt, mit 0,5 mM IPTG (Roth GmbH, Karlsruhe) induziert und 2 bis 3 Tage bei 15 °C weiterschüttelt, bis die OD<sub>600nm</sub> ca. 8 erreichte.

#### 4.10. Proteinreinigung von PLD1 und PLD2

##### 4.10.1. Zellaufschluß und Reinigung von löslicher PLD1 und PLD2

Die Zellen wurden durch 10 minütiger Zentrifugation bei 8000 g und 4 °C geerntet (Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus von Kendro, Hanau). Das Pellet wurde in Aufschlußpuffer (30 mM PIPES [Merck, Darmstadt], pH 6,5 und 5 mM EDTA [Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg]) resuspendiert (Ultraturrax T25 von Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) und durch Hochdruck aufgeschlossen (GAULIN

Homogenisator von APV, Lübeck). Nach Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 30 000 g und 4 °C wurde der Überstand mit einer 1 M CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung (Serva, Heidelberg) bis zu einer Endkonzentration von 50 mM Ca<sup>2+</sup> versetzt und bei 6000 g erneut zentrifugiert. Die Proteinlösung wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min auf eine Octylsepharose-Säule (20 ml Octylsepharose CL-4B von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Säulenabmessungen: Durchmesser 20 mm, Höhe 350 mm) aufgetragen (Peristaltik-Pumpe P-1 von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), die vorher mit 30 mM PIPES-Puffer, pH 6,5 / 50 mM CaCl<sub>2</sub> äquilibriert wurde. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer und anschließend mit 10 mM PIPES-Puffer / 30 mM CaCl<sub>2</sub> wurde das Protein mit 5 mM PIPES-Puffer / 0,1 mM EDTA eluiert. Alle Fraktionen wurden mittels Bradford-Test (Kapitel 4.12.1.2) auf den Proteingehalt und mit dem Standardtest (Kapitel 4.12.2.1) auf PLD-Aktivität untersucht.

#### 4.10.2. Isolierung von IB-Material von PLD1 und PLD2

Die Präparation von IB-Material erfolgte nach Rudolph et al. (1996) Nach Zellernte durch Zentrifugation wurde das Pellet in Aufschlußpuffer 1 (0,1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA) resuspendiert und mit Lysozym (Merck, Darmstadt) versetzt. Nach Zellaufschluß durch Hochdruck wurde DNase I (RNase-frei, von Hybaid-AGS, Heidelberg) zugegeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 0,5 Volumen Aufschlußpuffer 2 (60 mM EDTA, 6 % Triton X-100, 1,5 M NaCl pH7) 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation der IBs bei 30 000 g und 4 °C folgten 4 Waschschriffe mit 0,1 M Tris-HCl pH 7 und 20 mM EDTA. Die isolierten IBs wurden im festen Zustand bei -20 °C gelagert.

#### 4.11. Renaturierung von PLD1 und PLD2 inclusion bodies

Nach 2 stündigem Rühren von 0,5 g IBs in 10 ml Solubilisierungspuffer (6 M GdnHCl [NIGU Chemie GmbH Waldkraiburg] oder 8 M Harnstoff [ICN Meckenheim]), 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M DTT [Sigma, Deisenhofen] und 1 mM EDTA) bei 24 °C und Zentrifugation bei 10 000 g wurde die Proteinkonzentration der Lösung durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt (Ultrospec 3000 von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Zur Reduzierung des störenden Einflusses von DTT wurden die Lösungen 1:5 mit 8 M Harnstoff verdünnt. Als Blindwert diente der entsprechende Solubilisierungspuffer derselben Verdünnung. Als Extinktionskoeffizienten wurden die

mittels ProtParam (<http://expasy.ch/tools/protparam.html>) aus der Primärsequenz abgeleiteten Werte von  $1,335 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für PLD1 und  $1,346 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für PLD2 verwendet. Zur Optimierung des Renaturierungsprozesses wurden Natriumacetatpuffer pH 5,5, MES-Puffer pH 6,5, Tris-HCl-Puffer pH 6,9-7,4, HEPES-Puffer pH 7,5 und BICIN-Puffer pH 9,0 (alle Puffersubstanzen von Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von jeweils 50 mM getestet, die jeweils 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 M Arginin (Ajinomoto Co., Inc. Tokyo, Japan) sowie 5 mM DTT enthielten.

Eine Proteinlösung mit je 60  $\mu\text{g}$  Protein wurde mit 2 ml der oben genannten Puffer bzw. der Renaturierungspuffer aus Tabelle 4.1 verdünnt und bis zu 7 Tage bei  $8^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Nach 2, 5 und 7 Tagen wurde die PLD-Aktivität mittels modifiziertem Standardtest (siehe unter 4.12.2.2.) untersucht.

**Tabelle 4.1. Zusammensetzung der verwendeten Renaturierungspuffer für die Rückfaltung von PLD1- und PLD2-IBs.** Der Basispuffer enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7,1 (bei  $8^\circ\text{C}$ ), 10 mM DTT, 1 mM EDTA und 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Zusatz	verwendete Konzentration
DTT*	0-20 mM
GSSG / GSH (Serva, Heidelberg)	1 mM / 5 mM
PEG 6000 (Merck, Darmstadt)	0,1-0,4 g/l
Glycerol	10-40 % (v/v)
Arginin-Hydrochlorid	0,2-1,0 M
Triton X-100 (Merck, Darmstadt)	5-20 mM
Tween 20 (Serva, Heidelberg)	0,005-0,05 % (v/v)
$\text{CaCl}_2$	5-100 mM
Harnstoff	0,3-1,2 M
GdnHCl	0,2-1,0 M
Tris-HCl	0,4-1,0 M
1 mg/ml Triton X-100 und PC (aus Hühnereiern, Lipoid GmbH, Ludwigshafen)	0,1-0,4 mg/ml

\* Herstellung von Basispuffer ohne DTT

## 4.12. Bestimmungsmethoden

### 4.12.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Mehrzahl der Proteinbestimmungen wurde mit dem BCA-Test durchgeführt. Da dieser Test jedoch durch reduzierende oder chelatbildende Komponenten gestört wird, wurde für EDTA- oder DTT-haltige Proteinlösungen der Bradford-Test eingesetzt.

#### 4.12.1.1. BCA-Test

Hierzu wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, USA) verwendet. Diese Methode beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis eines Bicinchoninsäure/ $\text{Cu}^+$ -Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht (Smith et al., 1985). Als Referenzprotein wurde BSA (Pierce, Rockford, USA) im Konzentrationsbereich 0-1 mg/ml genutzt.

#### 4.12.1.2. Bradford-Test

Dieser Test basiert auf der Methode nach Bradford (1976), bei der Proteine durch Coomassie-Brillantblau-Einlagerung kolorimetrisch nachgewiesen werden können (Bradford-Reagens von Sigma, Deisenhofen). Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich 0-75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verwendet.

### 4.12.2. Bestimmung der PLD1- und PLD2-Hydrolyseaktivität

#### 4.12.2.1. Standardtest

Dieser Aktivitätsbestimmung liegt der bereits etablierte PLD-Test von D'Arrigo et al. (1995) zugrunde, bei dem aus PpNP freigesetztes pNP bei 405 nm bestimmt werden kann. Folgende Komponenten waren im Test enthalten:

- 20  $\mu\text{l}$  Substrat (10 mM PpNP [hergestellt von Frau Dr. R. Schöps, Institut für Biotechnologie Halle, nach D'Arrigo et al. (1995)], 10 % Triton X-100, 10 mM SDS)

- 50 µl Enzymlösung
- 156 µl 100 mM Natriumacetatpuffer pH 5.5 / 77 mM Kalziumchlorid  
(Endkonzentration im Test: 65 mM Natriumacetat pH 5.5, 50 mM CaCl<sub>2</sub>)
- 14 µl bidest. H<sub>2</sub>O.

Die Enzymlösung wurde 5 min bei 30 °C vortemperiert und nach Zusatz von 20 µl Substrat (s.o.) 10 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurde der Test durch Zugabe von 60 µl Stopplösung (1 M Tris-HCl pH 8,0 und 0,1 M EDTA) abgestoppt und die Extinktion  $E_1$  bei 405 nm gemessen (Ultrospec 3000 von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg und Mikrotiterplatten-Lesegerät MR7000 von Dynatech, Denkendorf). Als Blindwert  $E_0$  diente der gleiche Ansatz, der jedoch sofort gestoppt und gemessen wurde. Die Extinktionsänderung  $\Delta E = E_1 - E_0$  ist dabei proportional zur eingesetzten Enzymmenge und liegt im linearen Bereich der Progreßkurve.

Für die Erstellung der Eichreihe wurden statt der Enzymlösung 50 µl pNP-Lösung (Sigma, Deisenhofen) im Konzentrationsbereich 0-1 mM verwendet.

Eine Einheit (1 U) Enzym hydrolysiert 1 µmol PpNP bei 30 °C in einer Minute.

#### 4.12.2.2. Modifizierter Standardtest für die Aktivitätsbestimmung von renaturiertem IB-Material

Da die Renaturierung von IBs bisher mit geringen Renaturierungsraten erfolgte, wurde die Inkubationszeit des oben beschriebenen Standardtests von 10 auf 180 min verlängert. Als Blindwert diente der Meßwert, der durch Verwendung des Renaturierungspuffers anstelle der Enzymlösung erhalten wird.

#### 4.12.2.3. Einfluß des pH-Wertes und der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Reaktionspuffer auf die PLD-Hydrolyseaktivität

Um die Abhängigkeit der PLD-Hydrolyseaktivität vom pH-Wert und von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu bestimmen, wurde anstelle des im oben genannten Standardtests verwendeten Reaktionspuffers ein Puffer mit 60 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumacetat, 20 mM Glycin eingesetzt, dessen pH-Wert im Bereich von 5,0 bis 8,5 mit Essigsäure oder Natronlauge eingestellt wurde, und dem 0-100 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt wurde (Abousalham et al., 1993).

#### 4.12.3. Bestimmung der PLD1- und PLD2-Transphosphatidylierungsaktivität

Die Transphosphatidylierungsaktivität der beiden PLDs im Bakterienrohextrakt wurde nach Hirche et al. (1996) im Zweiphasensystem Diethylether/Acetatpuffer bestimmt. Als Substrat diente DO-PC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) und als Akzeptoralkohol Glycerol (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Das Reaktionsmedium bestand aus Diethylether (Ethanol-frei, Sigma Deisenhofen), Natriumacetatpuffer, pH 5,6, und CaCl<sub>2</sub>. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe des Enzyms wurden nach 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min der organischen Phase Proben entnommen und mittels HPTLC (HPTLC-Platten: Silicagel 60 von Merck, Darmstadt, TLC Applicator AS 30 von Desaga, Wiesloch, Laufmittel: Chloroform:Methanol:Ammoniak=70:40:10, pH 12, Chloroform und Methanol von Sigma, Deisenhofen, Ammoniak von Roth GmbH, Karlsruhe) und Densitometrie ausgewertet (CD60 Densitometer von Desaga, Wiesloch). Als Standards dienten DO-PC, DO-PG (Sigma, Deisenhofen) und DO-PA (Sigma, Deisenhofen) in unterschiedlichen Konzentrationen.

#### 4.13. SDS-PAGE

Die Proteinlösungen wurden, je nach Bedarf, durch Fällung mit Natriumdesoxycholat und Trichloressigsäure (nach Arnold und Ulbrich-Hofmann, 1999, Natriumdesoxycholat von Sigma, Deisenhofen, Trichloressigsäure von Roth GmbH, Karlsruhe), Waschen mit Ethanol und Lösen in Probenpuffer (4 % (v/v) Glycerin, 23 mg/ml SDS [Roth GmbH, Karlsruhe], 12,5 % (v/v) Sammelgelpuffer und 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol [FERAK Laborat GmbH, Berlin]) konzentriert und nach Laemmli (1970) gelelektrophoretisch getrennt (Mighty Small II SE250/SE260-Elektrophoresekammer von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung von Merck, Darmstadt). Die Gele wurden eine Stunde in Coomassielösung (Serva, Heidelberg) gefärbt und 2 x 5 min mit Entfärbelösung 1 (5 Vol. bidest. Wasser, 1 Vol. 100 %ige Essigsäure [Roth GmbH, Karlsruhe] und 4 Vol. Ethanol) sowie nach Bedarf in Entfärbelösung 2 (91 Vol. bidest. Wasser, 7 Vol. Essigsäure und 2 Vol. Glycerol) entfärbt.

#### 4.14. Proteinsequenzierung

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele in Blotting-Puffer (50 mM Borat [Roth GmbH, Karlsruhe], pH 9,0, 20 % Methanol) äquilibriert. Das Blotting auf Selex 20 Blot-Membranen (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) erfolgte mit demselben Puffer unter

Verwendung einer Fast Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen) bei  $5 \text{ mA/cm}^2$  für 3 Stunden.

Nach kurzem Färben mit Coomassielösung (enthält 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) und Entfärben mit 40 % (v/v) Methanol und 10 % Essigsäure wurden die zu sequenzierenden Banden durch Dr. Rücknagel (Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle) ausgeschnitten, entfärbt und N-terminal sequenziert.

#### **4.15. Western-Blot-Techniken**

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine, wie unter 4.14. beschrieben, auf Nitrozellulose-Membranen (Sartorius, Göttingen) geblottet und kurz mit PBS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Membran in folgenden Lösungen bei Raumtemperatur inkubiert:

- PBS mit 4 % Milchpulver (Blocklösung, Skim Milchpulver von Unipath Ltd., Basingstoke, England), 1 h
- primärer AK in Blocklösung (Verdünnung nach Anleitung des Herstellers), 2 h
- PBS, 5 mal je 5 min
- Blocklösung, 1 h
- sekundärer AK in Blocklösung, 1,5 h
- PBS + 0,05 % Tween 20, 3 mal je 5 min
- PBS, 3 mal je 5 min

Aufgrund ihrer Enzymaktivität (meist Meerrettich-Peroxidase) konnten die gebundenen sekundären AK mittels ECL-Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nachgewiesen werden (Röntgenfilme HyperFilm-ECL von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Entwickler/Fixierer von Sigma, Deisenhofen).

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1. Identifizierung und Charakterisierung zweier Isoenzyme von PLD aus Weißkohl

Wie einleitend dargestellt, war das primäre Ziel dieser Arbeit die rekombinante Herstellung von PLD aus Weißkohl. Voraussetzung für die Klonierung des kodierenden Genbereiches ist jedoch eine genaue Kenntnis der Nukleotidsequenz und des Aufbaus des pflanzlichen PLD-Gens. Sequenzdaten-Recherchen im Internet (NCBI GenBank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vor Beginn der Arbeiten ergaben keinerlei Hinweise auf bereits identifizierte PLD-Gene aus Weißkohl. Deshalb mußte zunächst das entsprechende Gen gefunden und vollständig sequenziert werden.

Bei der Analyse der mRNA-Sequenz der PLD nach Sequenzierung verschiedener Teilfragmente stellte sich schließlich heraus, daß in Weißkohl zwei strukturell sehr ähnliche Isoenzyme vorhanden sind, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit PLD1 und PLD2 bezeichnet wurden.

#### 5.1.1. Bestimmung der Nukleotidsequenz der mRNAs von PLD1 und PLD2

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz der mRNAs für PLD1 und PLD2 wurde zunächst die Gesamt-RNA von inneren Blättern eines Weißkohl-Kopfes der Sorte Lennox isoliert, aus der anschließend die mRNA gewonnen wurde. Die mRNA wurde dann unter Verwendung von Reverstranskriptase und Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern in eine komplementäre DNA (cDNA) übersetzt (Abb. 5.1). Das Design der degenerierten Primer (F2fw, F2rv, F3fw und F3rv) für die anschließenden PCRs wurde auf der Basis der bereits bekannten Nukleotidsequenzen der PLD-Gene aus *Zea mays* (Mais), *Oryza sativa* (Reis) und *Ricinus communis* (Rizinus) mittels Suche nach homologen Bereichen vorgenommen. Es zeigte sich, daß die zwei davon abgeleiteten Primerpaare zwar genspezifisch banden, aber immer zwei unterschiedlich lange PCR-Produkte lieferten. Die Sequenzierung der erhaltenen zentralen Genfragmente 2 und 3 (Abb. 5.1) nach Subklonierung in den pCR-Script Amp SK(+)-Vektor ergab erste Hinweise auf das Vorhandensein zweier Isoenzyme in Weißkohl. Die noch fehlenden nichtkodierenden 3'- und 5'-Bereiche der mRNAs wurden unter Verwendung von RACE-Methoden (rapid amplification of cDNA ends) vervollständigt. Hierzu wurde das 5'-Ende der mRNA (Fragment 1, Abb. 5.1) mit Reverstranskriptase und einem im Fragment 2 bindenden Primer in eine cDNA umgeschrieben, mittels T4 RNA-Ligase zyklisiert und in der

darauffolgenden PCR als Matrize verwendet. Das 3'-Ende der mRNA (Fragment 4, Abb. 5.1) konnte unter Verwendung eines 3'-RACE Kits und einem in Fragment 3 bindenden Primer amplifiziert werden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden ebenfalls in den pCR-Script Amp SK(+)-Vektor subkloniert und das Konstrukt in *E. coli* XL1 blue transformiert.

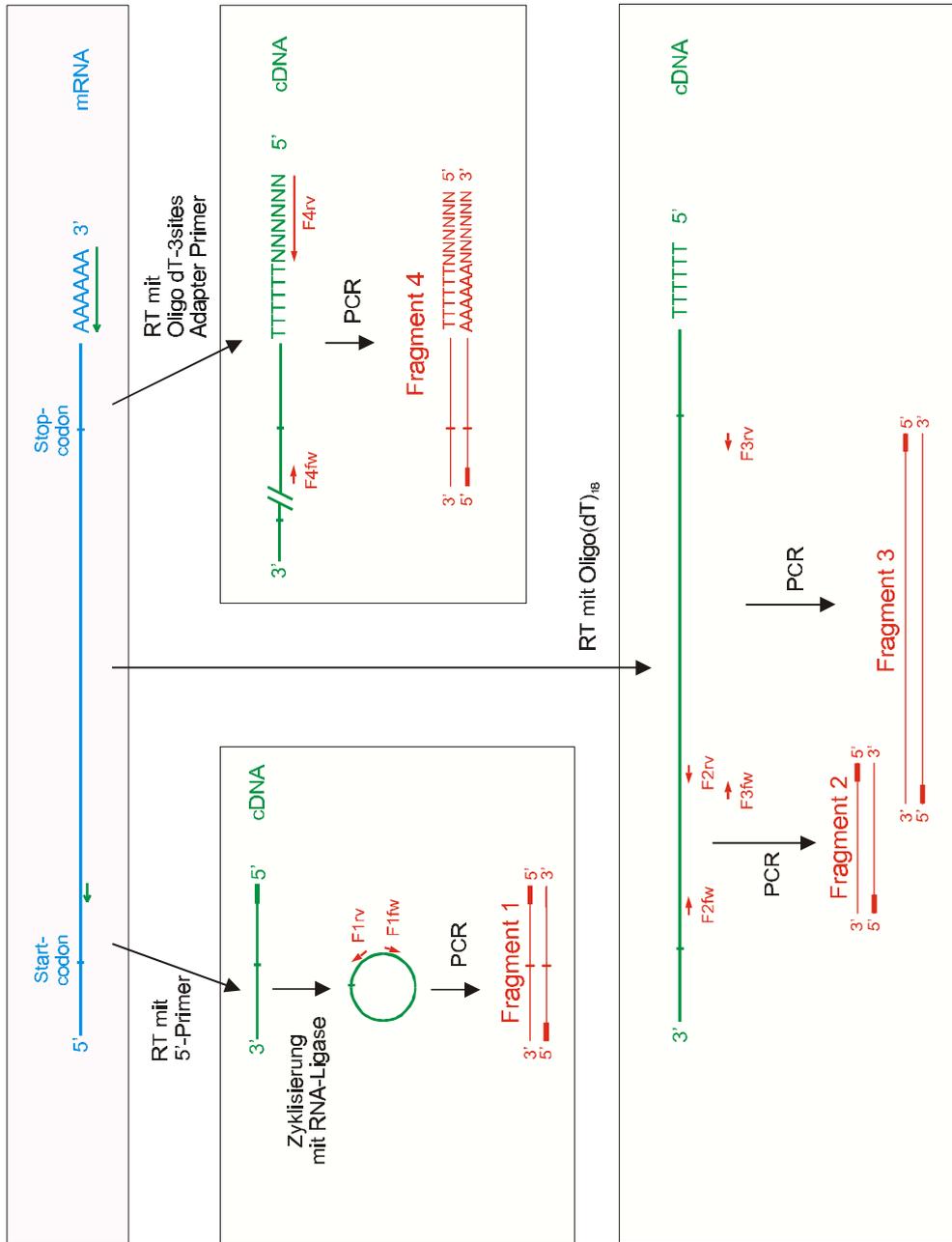


Abb. 5.1. Schematische Darstellung der Reaktionsschritte von der mRNA bis zu den vier PCR-Fragmenten. (RT...Reverstranskription)

Die durch Sequenzierung der 4 Fragmente ermittelten mRNA-Sequenzen von PLD1 und PLD2 wurden in der Genbank von NCBI veröffentlicht (Accession Nr. **AF090444** und **AF090445**). Sie können folgendermaßen charakterisiert werden:

Die mRNA von PLD1 besteht aus 2793 Nukleotiden. Das ORF kodiert für ein Protein mit 810 Aminosäuren. Die mRNA von PLD2 enthält 2702 Nukleotide mit einem ORF für ein aus 812 Aminosäuren bestehendes Protein. Die Nukleotid-Sequenzen von PLD1 und PLD2 sind im kodierenden Bereich zu 87,5 % identisch. In den nichtkodierenden 3'- und 5'-Bereichen konnten keine Sequenzidentitäten festgestellt werden. Die ermittelten mRNA-Nukleotidsequenzen von PLD1 und PLD2 sind zusammen mit der Genstruktur im Anhang aufgeführt (Seiten I-VI).

### 5.1.2. Ermittlung der Genstruktur von *pld1* und *pld2*

Eukaryontische Gene enthalten im Gegensatz zu den prokaryontischen Genen Exon- und Intronstrukturen. Da die Introns bei der mRNA-Synthese posttranskriptional herausgespleißt werden, ist für ihre Sequenzierung die Gewinnung genomischer DNA erforderlich. Diese wurde aus Weißkohlgewebe isoliert und als Matrize für die darauffolgenden PCRs verwendet. Aufgrund der Kenntnis der in den nichtkodierenden 3'- und 5'-Enden der beiden Gene stark voneinander abweichenden Nukleotidsequenzen konnten in diesen Bereichen bindende *pld1*- und *pld2*-genspezifische Primer (PLD1pre und -post; PLD2pre und -post, siehe 3.3.) verwendet und die entsprechenden PCR-Produkte für PLD1 und PLD2 getrennt hergestellt werden. Die so erhaltenen PCR-Produkte dienten wiederum als Matrizen für die darauffolgenden PCRs mit den Primern PLD1pre + F1rv, F2fw + F2rv, F3fw + F3rv, F4fw + PLD1post für die PLD1-Fragmente 1-4 und PLD2pre + F1rv, F2fw + F2rv, F3fw + F3rv, F4fw + PLD2post für die PLD2-Fragmente 1-4. Diese Gen-Fragmente wurden in pCR-Script Amp (SK+) subkloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten (siehe Anhang, Seiten I-VI) wurden in der Genbank des NCBI veröffentlicht (Accession-Nr. **AF113918** und **AF113919**) und sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt. Beide Isoenzyme enthalten in ihrer Gensequenz 3 Introns. Intron 1 liegt upstream vom Startcodon, die Introns 2 und 3 befinden sich innerhalb des kodierenden Bereiches. Alle drei Introns der beiden Isoenzyme besitzen eine unterschiedliche Sequenz, nur die Exonsequenzen von *pld1* und *pld2* untereinander sind in hohem Maße homolog. Die Positionen der Introns 2 und 3 innerhalb der *pld1*- und *pld2*-Gene sind vergleichbar. Intron 2 beginnt hinter dem Triplet AAG, das für ein konserviertes Lysin kodiert (Lys32 bei PLD1). Intron 3 unterbricht das für ein konserviertes Valin (Val667 bei PLD1) kodierende Triplet GTT hinter G.

**Tabelle 5.1. Sequenzdaten von pld1 und pld2 aus Weißkohl.**

	<b>pld1</b>	<b>pld2</b>
Länge der genomischen DNA (bp)	3449	3614
Intron-Regionen		
Intron 1	bp 27 - bp 367	bp 33 - bp 456
Intron 2	bp 472 - bp 663	bp 560 - bp 647
Intron 3	bp 2567 - bp 2970	bp 2554 - bp 3154

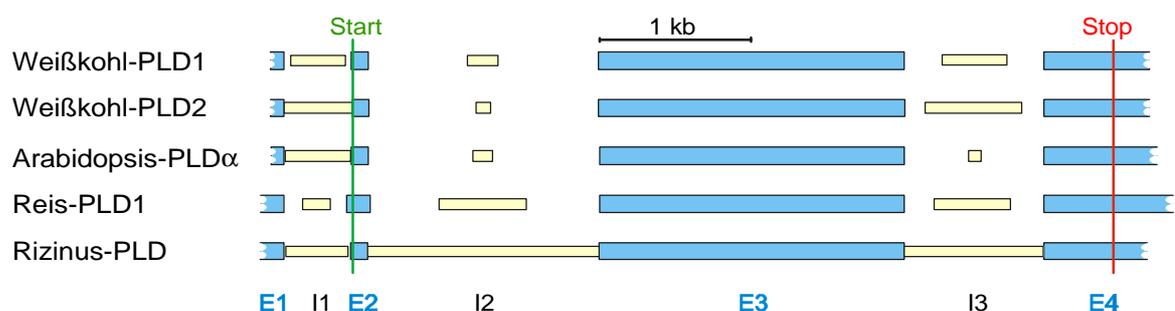
### 5.1.3. Vergleich der Genstrukturen der beiden Isoenzyme aus Weißkohl mit denen anderer pflanzlicher PLD $\alpha$ s

Neben den hier ermittelten Weißkohl-Gensequenzen für PLD1 und PLD2 sind inzwischen noch weitere Gensequenzen pflanzlicher PLDs bekannt (Abb. 5.2): für PLD aus Reis, Rizinus und PLD $\alpha$  aus Arabidopsis im Rahmen des Genomprojektes. Vergleicht man die Genstrukturen miteinander, so lassen sich folgende Aussagen treffen:

1. Alle fünf PLD-Gene enthalten drei Introns.
2. Die Positionen der Introns im Gen sind konserviert. Intron 1 liegt bei allen Genen upstream vom Startcodon, Intron 2 und 3 liegen innerhalb des ORF.
3. Alle Intronbereiche haben unterschiedliche Längen in den verschiedenen Pflanzengenen. Intron 2 besteht aus 88 (Weißkohl-PLD2) bis 1442 bp (Rizinus-PLD), während Intron 3 zwischen 84 (*Arabidopsis*-PLD $\alpha$ ) und 869 Basenpaare (Rizinus-PLD) enthält.

**Abb. 5.2. Vergleich der Exon/Intron-Struktur verschiedener pflanzlicher PLD-Gene.**

(blau: Exonstrukturen E1-E4, gelb: Intronstrukturen I1-I3. Die Positionen von Start- und Stopcodon sind eingezeichnet)



#### 5.1.4. Analyse der Primärstrukturen von PLD1 und PLD2

Von der ermittelten Nukleotidstruktur der ORFs von PLD1 und PLD2 wurden unter Verwendung des Programmes GeneRunner (Hastings Software) die beiden Protein-Primärstrukturen abgeleitet (Anhang, Seite VII). Die Aminosäuresequenz für PLD1 enthält neben dem Startmethionin 809 Aminosäuren. PLD2 ist um 2 Aminosäuren länger. Beide Sequenzen sind zu 91 % identisch, und die Homologie, die auch chemisch ähnliche Aminosäuren einbezieht, liegt bei 96 %. Die Sequenzvergleiche wurden mit <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331> vorgenommen. Die mittels ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) abgeleiteten Molekularmassen von 91,8 und 92,1 kDa kommen den experimentell ermittelten Daten von 87 (Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992) bzw. 90,2 kDa (Abousalham et al., 1993) nahe und zeigen, daß es sich hier um zwei sehr große Proteine mit vermutlich komplexer Sekundär- und Tertiärstruktur handelt. Die aus Weißkohl isolierte PLD hat in der SDS-PAGE die gleiche molekulare Masse wie die rekombinante PLD2 (Dr. R. Schöps, unveröffentlichte Daten). Die Aminosäurezusammensetzung beider Isoenzyme ist in Tabelle 5.2. dargestellt.

**Tabelle 5.2. Aminosäurezusammensetzung von PLD1 und PLD2 aus Weißkohl.**(berechnet mittels ProtParam unter <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

Aminosäure	PLD1	PLD2
Alanin	50 (6.2 %)	48 (5.9 %)
Arginin	48 (5.9 %)	45 (5.5 %)
Asparagin	24 (3.0 %)	28 (3.5 %)
Asparaginsäure	65 (8.0 %)	64 (7.9 %)
Cystein	8 (1.0 %)	8 (1.0 %)
Glutamin	33 (4.1 %)	28 (3.5 %)
Glutaminsäure	53 (6.6 %)	57 (7.0 %)
Glycin	64 (7.9 %)	63 (7.8 %)
Histidin	32 (4.0 %)	31 (3.8 %)
Isoleucin	61 (7.5 %)	58 (7.2 %)
Leucin	58 (7.2 %)	60 (7.4 %)
Lysin	40 (4.9 %)	42 (5.2 %)
Methionin	18 (2.2 %)	19 (2.3 %)
Phenylalanin	35 (4.3 %)	34 (4.2 %)
Prolin	41 (5.1 %)	43 (5.3 %)
Serin	48 (5.9 %)	46 (5.7 %)
Threonin	33 (4.1 %)	36 (4.4 %)
Tryptophan	15 (1.9 %)	15 (1.8 %)
Tyrosin	29 (3.6 %)	30 (3.7 %)
Valin	54 (6.7 %)	56 (6.9 %)

Beide PLDs enthalten, wie auch andere pflanzliche, tierische und auch mikrobielle Vertreter der PLD-Superfamilie, eine große Anzahl an Cysteinen. Da die Suche mittels PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>) keine Hinweise auf N-terminale Signal-Sequenzen und andere Targetsequenzen für den Transport in den Zellkern, die Mitochondrien, Peroxisomen, Chloroplasten oder Vakuolen für PLD1 und PLD2 ergab, wurde vermutet, daß beide Isoenzyme auch in den Pflanzen intrazellulär vorkommen und die SH-Gruppen deshalb in reduzierter Form vorliegen sollten (Fahey et al., 1977). Diese Vermutung konnte für unsere PLD2 inzwischen bestätigt werden (Hwang et al., 2001). Aus Tabelle 5.2. geht weiterhin hervor, daß in beiden PLDs ein hoher Prozentsatz an aliphatischen hydrophoben Aminosäuren existiert (Leu, Val, Ile: 21,4 %). Sind diese Proteine tatsächlich im Cytosol der Weißkohlzellen lokalisiert, sollten ihre hydrophoben Aminosäuren im Inneren des Proteins verborgen sein. Das hätte eine sehr kompakte Struktur zur Folge. Andererseits wird jedoch vermutet, daß die Proteine zumindest temporär an der Zellmembran gebunden sein müssen, um die Funktion des

Membranabbau oder der Membranumbildung erfüllen zu können. Dafür wäre ein hoher Anteil an oberflächenexponierten hydrophoben Proteinbereichen erforderlich.

Die isoelektrischen Punkte beider Isoenzyme konnten mittels ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) aus der Primärstruktur ermittelt werden und liegen bei pH 5,6 und 5,4 für PLD1 bzw. PLD2. Diese relativ niedrigen Werte resultieren aus dem hohen Anteil saurer Aminosäuren, der in PLD1 und PLD2 bei ca. 15 % (Asp + Glu) liegt. Dem stehen nur 11 % basische Aminosäuren (Lys + Arg) gegenüber. Da die beiden isoelektrischen Punkte lediglich aus der Primärstruktur von PLD1 und PLD2 berechnet und somit der Einfluß von sterischen Abschirmungen der Ladungen vernachlässigt wurde, ist es nicht verwunderlich, daß die Werte von dem experimentell ermittelten Wert von 4,7 (Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992, Abousalham et al., 1993) für PLD aus Weißkohl abweichen.

Vergleicht man die PLD-Primärstrukturen von PLD1 und PLD2 mit denen anderer pflanzlicher (Anhang, Seiten VIII-X), tierischer oder mikrobieller PLDs (Tab. 5.3), so läßt sich ein hoher Verwandtschaftsgrad zu den pflanzlichen Vertretern des  $\alpha$ -Typs erkennen (74-95 %). Weniger hohe Sequenzidentitäten werden beim Vergleich mit den pflanzlichen PLDs des  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Typs festgestellt (39-68 %). Tierische oder mikrobielle PLDs weisen mit 12-20 % den geringsten Verwandtschaftsgrad zu PLD1 und PLD2 aus Weißkohl auf.

**Tabelle 5.3. Vergleich der Aminosäuresequenzen von PLD1 und PLD2 aus Weißkohl mit der anderer pflanzlicher, tierischer und mikrobieller PLDs.**

Organismus	Sequenzidentität zu PLD1 [%]	Sequenzidentität zu PLD2 [%]	Acc. Nr. (NCBI)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PLD $\alpha$ )	95	92	AB017071
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PLD $\beta$ )	40	39	U90439
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PLD $\gamma$ 1)	41	41	AL161532
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PLD $\gamma$ 2)	44	44	AL161532
<i>Nicotiana tabacum</i> (PLD $\alpha$ )	80	80	Z84822
<i>Oryza sativa</i> (PLD $\alpha$ )	77	77	AB001920
<i>Oryza sativa</i> (PLD $\beta$ oder $-\gamma$ )	68	68	AB001919
<i>Pimpinella brachycarpa</i> (PLD $\alpha$ )	74	74	U96438
<i>Ricinus communis</i> (PLD $\alpha$ )	81	80	L33686
<i>Vigna unguiculata</i> (PLD $\alpha$ )	82	81	U92656
<i>Zea mays</i> (PLD $\alpha$ )	77	77	D73410
<i>Homo sapiens</i> (GPI-PLD)	17	18	L11701
<i>Rattus norvegicus</i> (PLD2)	20	20	P70498
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	13	12	L16583
<i>Candida albicans</i>	14	15	AB010810
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	13	12	L16586
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	12	13	L16585
<i>Streptomyces acidmyceticus</i>	16	18	E03429
<i>Streptomyces antibioticus</i>	18	17	BAA03913
<i>Streptomyces species</i>	17	17	E05514
<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	17	16	AB007132
<i>Vibrio damsela</i>	17	18	L16584

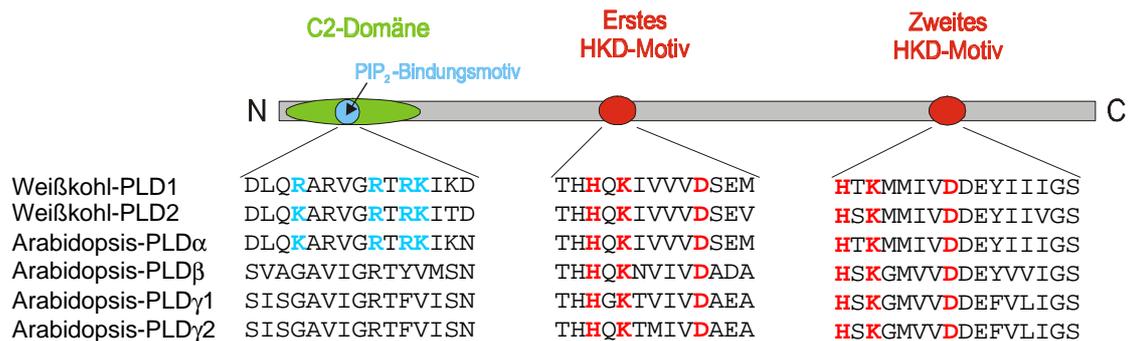
Wie alle anderen bereits bekannten PLDs (Kapitel 2.3.1) haben auch PLD1 und PLD2 aus Weißkohl das duplizierte HKD-Motiv (Abb. 5.3 und Anhang, Seiten IX und X), das für die PLD-Aktivität essentiell ist (Kapitel 2.3.2). Im N-Terminus beider Isoenzyme befindet sich die aus ca. 130 Aminosäuren bestehende C2-Domäne (Abb. 5.3 und Anhang, Seite VIII), die für die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Phospholipidbindung verantwortlich ist (Kapitel 2.3.3).

Die C2-Domäne von PLD1 und PLD2 aus Weißkohl enthält wie die anderen pflanzlichen PLDs vom  $\alpha$ -Typ statt der beim  $\beta$ - und  $\gamma$ -Typ üblichen vier nur zwei der konservierten sauren Aminosäurereste (Glu38 und Asp97 in PLD1; Glu39 und Asp98 in PLD2). Wie bereits unter 2.3.3 erwähnt, sind die unterschiedlichen Ca<sup>2+</sup>-Bindungsaffinitäten von PLD $\alpha$  gegenüber PLD $\beta$ - oder PLD $\gamma$  wahrscheinlich darauf zurückzuführen.

Wie in einigen wenigen pflanzlichen PLDs des  $\alpha$ -Typs (PLD $\alpha$  aus *Arabidopsis* und aus Tabak) liegt in der C2-Domäne von PLD1 und PLD2 aus Weißkohl ein PIP<sub>2</sub>-Bindungsmotiv mit der konservierten Sequenz K/RxxxxRxRK (Abb. 5.3 und Anhang, Seite VIII).

**Abb. 5.3. Struktur motive der PLDs aus Weißkohl und Arabidopsis.**

Die Sequenzen stammen aus der NCBI-Genbank. (Tab. 2.1)



## 5.2. Klonierungs- und Expressionsstudien von PLD1 und PLD2

Aufgrund der hohen Homologien im N- und C-terminalen Bereich der *pld1*- und *pld2*-Gene wurden zunächst, wie bereits unter 5.1.2. beschrieben, mit Hilfe der *pld1*- und *pld2*-genspezifischen Primerpaare (PLD1pre und PLD1post sowie PLD2pre und PLD2post) aus der cDNA Isoenzym-spezifische Matrizen hergestellt. Diese wurden bei der abschließenden PCR (5.2.1. und 5.2.2.) zur Einfügung der entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in das gewünschte Expressionssystem verwendet.

Aufgrund der sehr starken Homologie der Primärstrukturen von PLD1 und PLD2 kann davon ausgegangen werden, daß sich beide Isoenzyme bei der heterologen Expression in *E. coli* ähnlich verhalten. Deshalb wurden zur Ermittlung des optimalen Expressionssystems für die Expression von *pld1* und *pld2* nur für PLD1 verschiedene Konstrukte hergestellt. Zur Vereinfachung der anschließenden Reinigung von PLD1 wurden zunächst Fusionsproteine mit N- und C-terminalen Tags konstruiert (5.2.1.). Darüberhinaus wurde auch ein Tag-freies Konstrukt für die Expression von PLD1 gewählt (5.2.2.). Die entsprechenden Expressionssysteme sind in Tabelle 5.4 dargestellt und charakterisiert.

**Tabelle 5.4. Charakterisierung der Expressionsvektoren für PLD1.**

Vektor	Resistenz	Promotor	Expression	Charakterisierung des Tags
pRSET5a	Amp	T7	cytosolisch	kein Tag
pASK-IBA6	Amp	Tetracyclin	periplasmatisch	StrepII-tag, N-terminal
pASK-IBA7	Amp	Tetracyclin	cytosolisch	StrepII-tag, N-terminal
pET20b(+)	Amp	T7	cytosolisch	His-tag, C-terminal
pGEX 4T-2	Amp	tac	cytosolisch	GST-tag, N-terminal

### 5.2.1. Herstellung und Expression von Fusionskonstrukten der PLD1

Als Reinigungsmodule wurden StrepII-, His- und GST-Fusionstags verwendet (Tab. 5.4). Im Falle des N-terminalen StrepII-tags wurden bei der PCR die bereits hergestellte und oben erwähnte Isoenzym 1-spezifische Matrize, Pfu-DNA-Polymerase und die beiden Primer N-IBA-6/7 und C-IBA-6/7 eingesetzt. Das PCR-Produkt sowie die beiden Vektoren pASK-IBA7 bzw. pASK-IBA6 für cytosolische oder periplasmatische Expression wurden nach der Reinigung mittels Agarosegel-Elektrophorese und Gelextraktionskit mit *Bsal* geschnitten, mit Ethanolfällung gereinigt und konzentriert, ligiert und in *E. coli* XL1 blue transformiert. Ungewollte Punktmutationen bei der PCR konnten durch die Sequenzierung des Inserts ausgeschlossen werden.

Zur Konstruktion der PCR-Produkte für die His-tag-Fusion wurden die Primer HisPrime fw und HisPrime rv (Schnittstellen für *Xba* I und *Hind* III), für die GST-Fusion die Primer GSTprime fw und GSTprime rv (Schnittstellen für *Bam*H I and *Eco*R I) verwendet. Die PCR-Produkte und die zugehörigen Vektoren (Tab. 5.4) wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und mittels Ethanolfällung gereinigt und konzentriert. Nach Ligation und Transformation in *E. coli* XL1 blue wurde die Insertsequenz wiederum durch Sequenzierung überprüft. Auch hier konnten keine Punktmutationen festgestellt werden.

Bei allen beschriebenen Expressionskonstrukten wurden die Plasmide mit *pld1*-Insert in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert, der bereits das Plasmid pUBS520 für die Bereitstellung der zwar in Eukaryonten recht häufigen, jedoch in Prokaryonten seltenen tRNAs für die Arginin-kodierenden Triplets AGA und AGG enthielt (Brinkmann et al., 1989). Nach Anzucht der Transformanten auf Agarplatten wurden Übernacht-Kulturen angesetzt. Diese Flüssigkulturen dienten als Vorkulturen und wurden zum Beimpfen der Hauptkultur verwendet.

Um die Expression der Fusionskonstrukte zu optimieren, wurde zunächst die Induktorkonzentration variiert. Nach Erreichen einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 wurden im Falle

der Plasmide pGEX-4T-2-pld1 und pET20b(+)-pld1 0-2 mM IPTG zugesetzt. Im Falle der Plasmide pASK-IBA6-pld1 und pASK-IBA7-pld1 wurde die Anhydrotetracyclin-Konzentration zwischen 0 und 200 µg/l variiert. In allen Fällen wurden Proben entnommen und die Zellen mit Proteinextraktionspuffer aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf PLD-Aktivität getestet bzw. die Proteinextrakte mittels SDS-PAGE analysiert. Alle PLD1-tag-Fusionskonstrukte zeigten bei allen Induktorkonzentrationen keine PLD-Hydrolyseaktivitäten sowie kaum erkennbare Banden entsprechender Größe im Acrylamid-Gel bzw. im Western-Blot (AK gegen StrepII-tag und His-tag, nicht gezeigt).

Da ein Absenken der Kultivierungstemperatur und der damit verbundenen Anpassung der Faltungsbedingungen und Herabsetzung der Proteolysegeschwindigkeit in *E. coli* auch Verbesserungen bei der Expression erzielen kann (Schein und Noteborn, 1988), wurde im nächsten Schritt die Temperatur zwischen 15 und 37 °C variiert. Auch dies brachte nicht den gewünschten Erfolg. Es wird vermutet, daß N- oder C-terminale Tags die Ausbildung der räumlichen Struktur des Enzyms negativ beeinflussen.

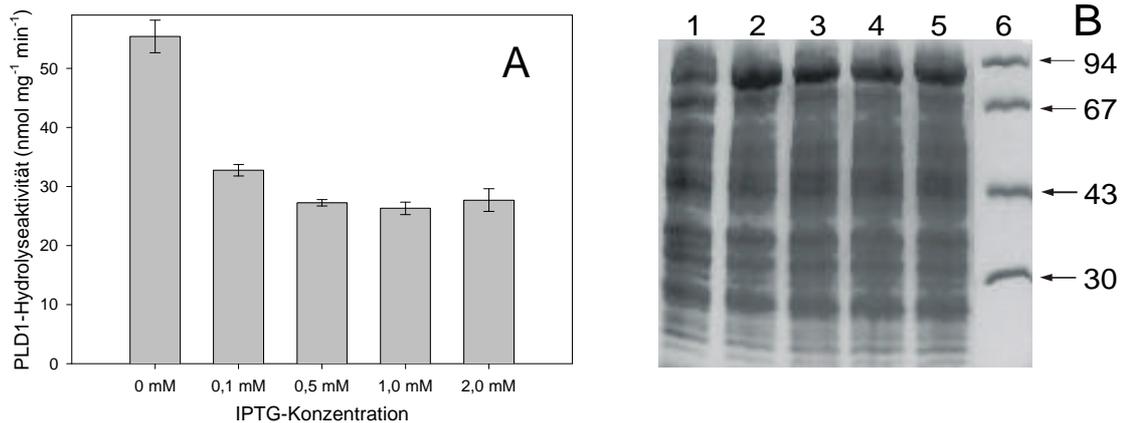
#### 5.2.2. Herstellung und Expression des Tag-freien Konstruktes

Zur Herstellung des Tag-freien Konstruktes wurden bei der PCR die bereits genannte Isoenzym 1-spezifische Matrize, die beiden Primer Iso1fw und Iso1rv sowie Pfu-DNA-Polymerase verwendet. Nach Reinigung des PCR-Produktes durch Ethanolfällung und Restriktionsverdau mit *Nde* I und *Hind* III wurde die DNA in den mit *Nde* I und *Hind* III linearisierten Vektor pRSET5a (Tab. 5.4) kloniert und in *E. coli* XL1 blue transformiert. Nach der Plasmidpräparation konnten Punktmutationen mittels Sequenzierung des Inserts ausgeschlossen werden.

Auch dieses Plasmid wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert, der bereits das Plasmid pUBS520 enthielt. Zur Optimierung der Expression des Tag-freien pld1-Gens wurde, wie unter 5.2.1. beschrieben, die Induktorkonzentration zwischen 0 und 2 mM variiert. Im Gegensatz zu den Fusionskonstrukten konnte hier bei niedrigen IPTG-Konzentrationen PLD-Aktivität gemessen werden (Abb. 5.4 A). Mit Erhöhung der Induktorkonzentration verringerte sich die PLD-Aktivität, aber die Zunahme der PLD1-Banden im SDS-Polyacrylamid-Gel mit steigender IPTG-Konzentration (ab 0,1 mM) deutet auf die zunehmende Bildung von falsch gefaltetem inaktiven Protein in Form von IBs hin (Abb. 5.4 B).

**Abb. 5.4. Einfluß der IPTG-Konzentration bei der Induktion auf die PLD1-Menge und Aktivität.** (pRSET5a-pld1 und pUBS520 in *E. coli* BL21(DE3), Kultivierungstemperatur: 20 °C, Medium: 2xYT mit 80 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin, Probenahme bei maximaler OD<sub>600nm</sub> nach Induktion, PpNP-Test)

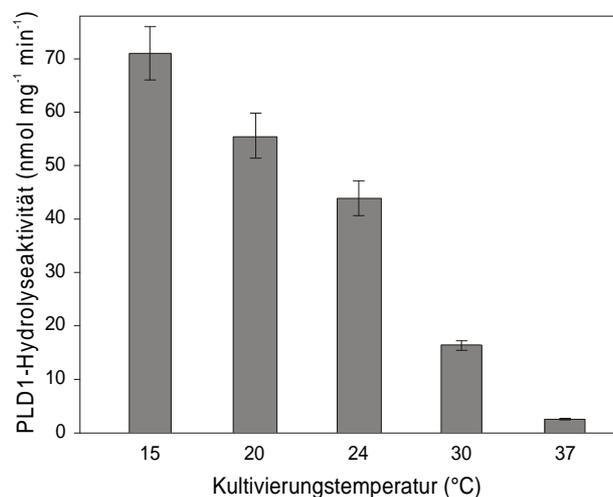
**A:** PLD1-Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Test; **B:** SDS-PAGE der Proben, IPTG-Konzentrationen: 0 mM (Bahn 1), 0,1 mM (Bahn 2), 0,5 mM (Bahn 3), 1 mM (Bahn 4) und 2 mM (Bahn 5) sowie Molekulargewichtsstandard (Bahn 6).



Im nächsten Schritt wurde die Temperatur zwischen 15 und 37 °C variiert, ohne die Expression durch IPTG-Zugabe zu induzieren. Hier zeigte sich, daß bei niedrigen Temperaturen eine höhere PLD-Aktivität erhalten werden konnte (Abb. 5.5). Im gewählten Temperaturbereich war bei 15 °C die PLD1-Ausbeute maximal.

**Abb. 5.5. Einfluß der Kultivierungstemperatur auf die PLD1-Aktivität.**

(pRSET5a-pld1 und pUBS520 in *E. coli* BL21(DE3), Medium: 2xYT mit 80 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin, Probenahme bei maximaler OD<sub>600nm</sub>, PLD-Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Test)



Die Variation des pH-Wertes des Kulturmediums zwischen pH 5,5 und 7,5 und die Zugabe von bis zu 10 mM Kalziumchlorid zum Medium erbrachte keine weitere Erhöhung der Expressionsrate.

Die optimierten Bedingungen für die Expression von PLD1 in aktiver, löslicher Form lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Kulturmedium: 2xYT pH 7,0
- Kultivierung bei 15 °C bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 6-8 (ca. 3 Tage)
- keine Induktion.

### 5.2.3. Klonierung und Expression von PLD2

Da sich alle Fusionsvarianten bei der Klonierung und Expression von PLD1 als ungeeignet erwiesen, wurde bei der Klonierung von PLD2 auf jegliche Fusionskonstrukte verzichtet und nur das Tag-freie Konstrukt von PLD2 hergestellt.

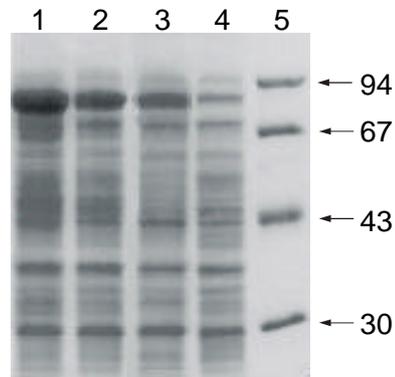
Wie einleitend in Abschnitt 5.2 dargelegt, wurde auch hier zunächst eine PCR mit den Primern PLD2pre und PLD2post, die das am 3'- und 5'-Ende verlängerte ORF von PLD2 amplifizierte, durchgeführt. Darauf folgte die abschließende PCR mit den Primern Iso2fw und Iso2rv, die der Einführung der Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Hind* III in das PCR-Produkt diente. Nach dem Restriktionsverdau des PCR-Produktes und des Vektors pRSET5a mit *Nde* I und *Hind* III folgten Reinigung durch Ethanol-fällung, Ligation, Transformation und Sequenzüberprüfung, wie bereits bei PLD1 beschrieben.

Aufgrund der bereits optimierten Expression von *pld1* wurde hier auf eine erneute umfangreiche Untersuchung verzichtet, da keine großen Unterschiede zu erwarten waren. Nur die IPTG-Konzentration und die Kultivierungstemperatur wurden, wie bei PLD1 beschrieben, variiert. Wie vermutet, wurden auch hier die gleichen Ergebnisse erzielt. Ohne Induktion und bei 15 °C konnte die höchste PLD-Aktivität erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

### 5.2.4. Optimierung der IB-Erzeugung von PLD1 und PLD2

Wie bei der unter 5.2.2 beschriebenen Optimierung der *pld1*-Expression festgestellt wurde, entstanden bei der Zugabe von mindestens 0,1 mM IPTG unlösliche und inaktive IBs. Die Expressionsrate wurde jedoch trotz Erhöhung der IPTG-Konzentration im Kulturmedium (1 bzw. 2 mM) nicht wesentlich gesteigert (Abb. 5.4.B). Wie bei der Produktion der löslichen, aktiven Enzyme konnte die IB-Ausbeute durch das Absenken der Kultivierungstemperatur auf 15 °C beträchtlich gesteigert werden (Abb. 5.6).

**Abb. 5.6. Einfluß der Kultivierungstemperatur auf die IB-Menge von PLD1 bei Induktion mit 0,5 mM IPTG.** SDS-PAGE der Proben bei Kultivierungstemperaturen von 15 °C (Bahn 1), 24 °C (Bahn 2), 30 °C (Bahn 3), 37 °C (Bahn 4) und Molekulargewichtsmarker (Bahn 5). (pRSET5a-pld1 und pUBS520 in *E. coli* BL21 (DE3), LB mit 80 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin, Probennahme bei maximaler OD<sub>600nm</sub>).



### 5.3. Reinigung der löslichen PLD-Isoenzyme

#### 5.3.1. Präparation des Bakterien-Rohextraktes

Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurden die PLD1- oder PLD2-enthaltenden Bakterien in Aufschlußpuffer homogenisiert und unter Hochdruck mechanisch aufgeschlossen. In der löslichen Fraktion wurden zunächst die PLD-Aktivität und die Proteinkonzentration bestimmt. Dabei wurden Enzymaktivitäten für PLD1 bis zu 37,5 µmol min<sup>-1</sup>, für PLD2 bis zu 62,5 µmol min<sup>-1</sup> je Liter Bakterienkultur erhalten. Die sich anschließende chromatografische Reinigung machte den Zusatz von Kalziumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 50 mM erforderlich. Der dabei entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Da dieses Pellet auch PLD enthielt, wurde die Enzymaktivität noch einmal im Überstand bestimmt. Der Verlust an PLD1 bzw. PLD2 bei diesem Verfahren betrug 38,8 bzw. 27,8 % (Tab. 5.5).

#### 5.3.2. Ca<sup>2+</sup>-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatografie

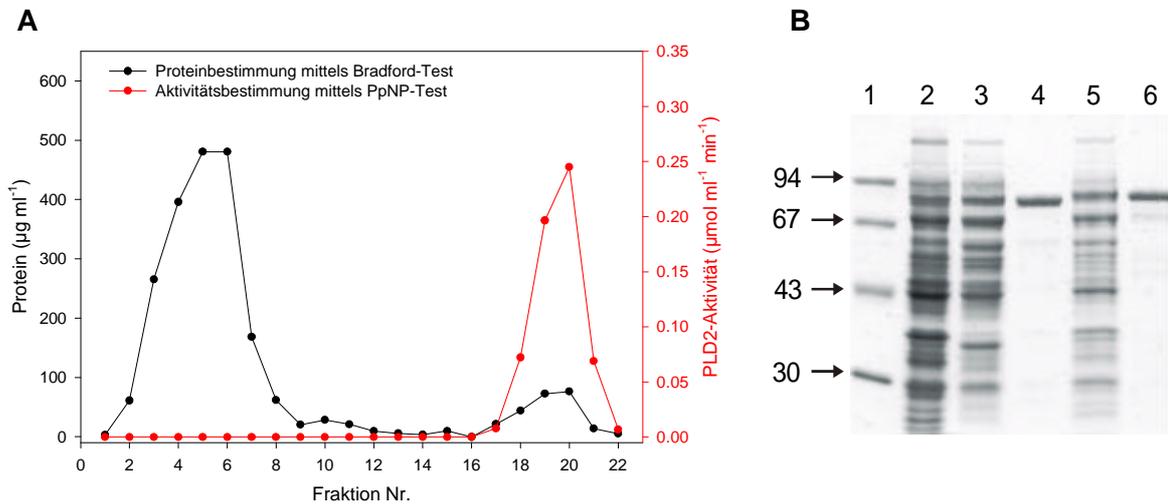
Die sehr effiziente Reinigung von PLD in nur einem Schritt wurde von Lambrecht und Ulbrich-Hofmann (1992) entwickelt. Diese Reinigungsmethode beruht auf der Bindung von PLD aus Weißkohl an hydrophoben Materialien in Anwesenheit von hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen (ca. 50 mM). Zur Elution des gebundenen Enzyms werden dem Protein Kalziumionen durch Zugabe geringer Mengen an EDTA entzogen. Diese elegante Reinigungsmethode erwies sich auch für die Gewinnung der rekombinanten PLD

geeignet und wurde ohne Änderungen sowohl für die Reinigung von PLD1 als auch PLD2 angewandt. In beiden Fällen konnte eine sehr hohe Reinheit (bis zu 90 % bezogen auf die Proteinkonzentration) erzielt werden. In Abbildung 5.7.A ist das Reinigungsprofil der Affinitätschromatografie an Octylsepharose am Beispiel der PLD2 dargestellt. Die meisten Proteine wurden unter den gewählten Bedingungen nicht an das Säulenmaterial gebunden. Sowohl Durchlauf (Fraktionen 1-9) als auch Waschfraktionen (Fraktionen 10-16) enthalten keine PLD-Aktivität. Nur in den Elutionsfraktionen 17-22 konnte aktives Protein nachgewiesen werden. Abbildung 5.7.B zeigt eine typische Reinigung von PLD1 und PLD2. Bei den gereinigten Proben (Bahnen 4 und 6) sind nur wenige verunreinigende bakterielle Proteinbanden zwischen 67 und 94 kDa zu erkennen. Als Negativkontrolle wurde der Rohextrakt aufgetragen, der die Expression von Vektor pRSET5a ohne pld1- oder pld2-Inserts in BL21 (DE3) zeigt. Aus der Abbildung 5.7 B ist ersichtlich, daß in der Position der PLD-Banden auch einige bakterielle Proteine zu finden sind. Aufgrund der gewünschten Nicht-Induktion durch IPTG-Zugabe nahmen die PLD1- und PLD2-Banden im Rohextrakt im Verlauf der Kultivierung nicht sichtbar zu. Der Versuch des Nachweises der PLD-Banden im Rohextrakt mittels Western-Blot scheiterte, da die Herstellung von geeigneten Antikörpern nicht erfolgreich war. Ein eigens für diese Zwecke erzeugtes C-terminales PLD1-Fragment (Aminosäurereste 606-809), hergestellt durch PCR unter Verwendung der beiden Primer C-Term-fw und C-Term-rv, Subklonierung in pRSET5a und Gewinnung der IBs, lieferte nach Immunisierung von Kaninchen nicht den gewünschten Antikörper. Ein Antikörper, der gegen ein N-terminales Peptid (Aminosäurereste 37-52 der PLD1 aus Weißkohl) gerichtet war, erwies sich als wenig stabil und mit vielen Kreuzreaktionen behaftet. Ein von Prof. Dr. Verger und Mitarbeitern (Laboratoire de Lipolyse Enzymatique, Marseille Cedex, Frankreich) entwickelter und uns zur Verfügung gestellter Antikörper gegen PLD aus Sojabohnen führte ebenfalls nicht zum Erfolg.

**Abb. 5.7. Reinigung der PLD1- und PLD2-Isoenzyme mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter Affinitätschromatografie.**

**A) Reinigungsprofil der Affinitätschromatografie von PLD2 an Octylsepharose.**

**B) SDS-PAGE von PLD1 und PLD2.** Bahn 1: Molekulargewichtsmarker, Bahn 2: Expression des Vektors ohne pld1 und pld2 (Negativkontrolle), Bahn 3: Bakterien-Rohextrakt mit PLD1, Bahn 4: gereinigte PLD1, Bahn 5: Bakterien-Rohextrakt mit PLD2, Bahn 6: gereinigte PLD2.



In Tabelle 5.5 sind die Reinigungsfaktoren und Enzymausbeuten bei der Reinigung dargestellt. Obwohl die Zellen nicht durch Zugabe von IPTG induziert wurden, konnten bei der Expression beachtliche Mengen an PLD1 und PLD2 in aktiver, löslicher Form gebildet werden. Die spezifischen Hydrolyseaktivitäten der Rohextrakte übersteigen mit 0,06-0,11 U/mg für PLD1 bzw. 0,12-0,15 U/mg für PLD2 den in der Literatur angegebenen Wert von 5 mU/mg für ein Fusionsprotein von PLD2 aus Weißkohl mit Glutathion-S-Transferase (Kim et al., 1999) um ein Vielfaches, obwohl das hier verwendete Substrat 1,2-Di-[1-<sup>14</sup>C]-palmitoyl-PC wesentlich besser umgesetzt werden sollte als das von uns verwendete synthetische Substrat PpNP.

Die für die Reinigung an Octylsepharose notwendige  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe zum Rohextrakt bewirkte allerdings eine Reduzierung der PLD-Menge durch Bildung eines Präzipitates, so daß die Ausbeuten nach diesem Schritt nur noch 61,2 % für PLD1 bzw. 72,2 % für PLD2 betragen. Bei der sich anschließenden Affinitätschromatografie konnten 75,0 % (PLD1) bzw. 62,5 % (PLD2) der aufgetragenen Aktivität wieder eluiert werden. Für die Enzymausbeute des gesamten Reinigungsverfahrens ergeben sich demzufolge 45,9 % für PLD1 bzw. 45,0 % für PLD2.

Aus einem Liter Kultur konnten somit 7,5 mg PLD1 bzw. 6,25 mg PLD2 im Rohextrakt erhalten werden, von denen bis zu 3,4 mg bzw. 2,8 mg Protein in reiner Form isoliert werden konnten.

**Tabelle 5.5. Ausbeute von PLD1 und PLD2 bei der Reinigung aus dem Bakterien-Rohextrakt.**

Reinigungsschritt	spezifische PLD-Aktivität (U/mg)		Reinigungsfaktor		PLD-Aktivitätsausbeute (%)	
	PLD1	PLD2	PLD1	PLD2	PLD1	PLD2
Bakterien-Rohextrakt	0,06-0,11	0,12-0,15	1	1	100	100
Überstand nach CaCl <sub>2</sub> -Zugabe und Zentrifugation	0,05-0,09	0,10-0,12	ca. 0,8	ca. 0,8	61,2	72,2
Ca <sup>2+</sup> -vermittelte hydrophobe Chromatografie	5,0-8,8	10,0-12,5	ca. 83	ca. 83	45,9	45,0

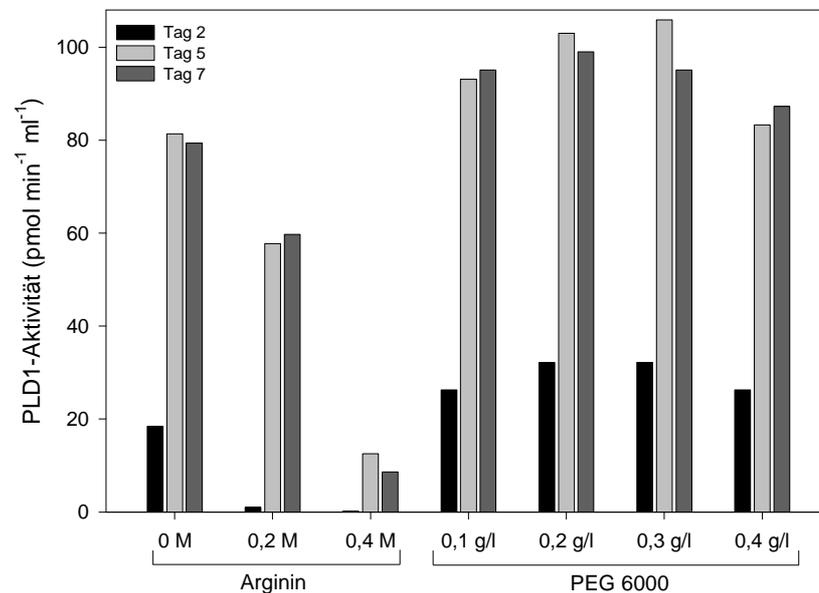
#### 5.4. Versuche zur Rückfaltung von PLD1 und PLD2 inclusion bodies

Wie bereits unter 5.2. dargestellt, wurden bei Verwendung von 0,5 mM IPTG zur Induktion der Expression PLD1 und PLD2 überwiegend in Form von IBs gebildet. Diese wurden nach Zellernte durch Zentrifugation, Homogenisierung der Bakterien in Aufschlußpuffer und nach mechanischem Zellaufschluß mittels Hochdruck nach Rudolph et al. (1996) präpariert. Anschließend wurden die IBs in DTT-haltigem GdnHCl- bzw. Harnstoff-Solubilisierungspuffer gelöst und die Enzymkonzentration bestimmt. Alle Versuche zur Renaturierung der Enzyme blieben bisher unbefriedigend. Trotzdem sollen sie im folgenden kurz beschrieben werden. Die Renaturierungsversuche wurden jeweils bei 8 °C durchgeführt. Bei der Renaturierung wurden den Renaturierungsansätzen nach 2, 5 und 7 Tagen Proben entnommen, die mittels modifiziertem PpNP-Test auf ihre PLD-Aktivität hin untersucht wurden. Zur Optimierung des Renaturierungsprozesses wurde zunächst der pH-Wert des Puffers zwischen 5,5 und 9,0 variiert. Die Messungen ergaben eine Optimumskurve. Die Verwendung von Tris/HCl-Puffer pH 7,1 erwies sich dabei als optimal (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde versucht, die optimalen Reduktions-/Oxidationsbedingungen durch Zusatz von DTT bzw. einem GSSG/GSH-Gemisch als Redoxsystem einzustellen. Während die PLD-Aktivität im Glutathion-haltigen Puffer auch nach 5-7 Tagen sehr gering blieb, stieg sie im DTT-haltigen Puffer über einen Zeitraum von 5 Tagen stetig an, wonach sie ein Plateau erreichte (Daten nicht gezeigt). Diese Begünstigung der Faltung des Proteins unter reduzierenden Bedingungen ist neben der Feststellung, daß keine Signalsequenzen existieren, ein weiterer Hinweis darauf, daß das aktive Enzym im Cytosol vorliegt und keine Disulfidbrücken enthält. Im Gegensatz dazu wurde von der PLD aus *Streptomyces antibioticus* berichtet, daß dieses extrazelluläre Enzym Disulfidbrücken enthält, die

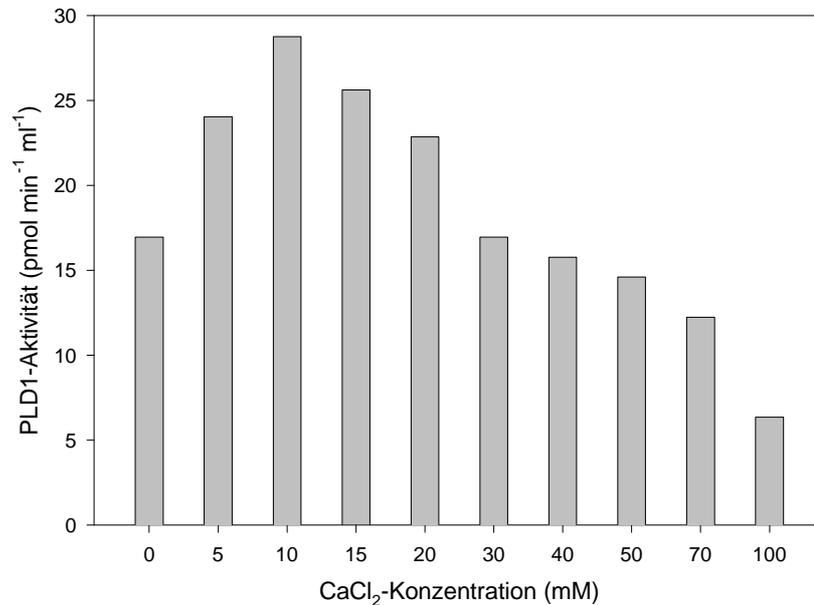
essentiell sind für die Bildung der Tertiärstruktur und deren Ausbildung ein frühes Stadium der korrekten Proteinfaltung beeinflusst (Iwasaki et al., 2000).

Desweiteren wurde der Einfluß verschiedenster Medienzusätze auf die Renaturierungsausbeute untersucht. Hierzu wurden dem Basispuffer, der in den meisten Fällen 50 mM Tris-HCl, pH 7,1 (bei 8 °C), 10 mM DTT, 1 mM EDTA und 10 mM CaCl<sub>2</sub> enthielt, stabilisierende Zusätze wie PEG 6000 (0,1-0,4 g/l, siehe Abb. 5.8), Glycerol (0-40 % (v/v)) und L-Arg (0-1 M, Abb. 5.8), Detergenzien, wie z. B. Triton X-100 (0-20 mM) und Tween 20 (0,005-0,05 % (v/v)), destabilisierende Substanzen, z. B. Harnstoff (0-1,2 M) und GdnHCl (0-1 M), aber auch andere Zusätze, wie z. B. CaCl<sub>2</sub> (0-100 mM, siehe Abb. 5.9), Tris-HCl (bis zu 1M), 1 mg/ml Triton X-100 kombiniert mit Ei-PC (0,1-0,4 mg/ml) und das reduzierende Agens DTT (bis zu 20 mM) (Review in Rudolph et al., 1996), zugefügt.

**Abb. 5.8. Einfluß von L-Arginin und PEG 6000 auf die Renaturierung von solubilisierten PLD1-IBs.** Der Basispuffer enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7,1 (8 °C), 10 mM DTT, 1 mM EDTA und 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Die IBs wurden in 8 M Harnstoff mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8, 0,1 M DTT und 1 mM EDTA solubilisiert (30 µg/ml Protein, Rückfaltung bei 8 °C, Probenahme nach 2, 5 und 7 Tagen).



**Abb. 5.9. Einfluß der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration auf die Renaturierung von solubilisierten PLD1-IBs.** Der Basispuffer enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7,1 (8 °C), 10 mM DTT, und 1 mM EDTA. Die IBs wurden in 6 M GdnHCl mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8, 0,1 M DTT und 1 mM EDTA solubilisiert und anschließend gegen 4 M GdnHCl dialysiert (50 µg/ml Protein, Rückfaltung bei 5 °C, Probennahme nach 2 Tagen).



Grundsätzlich wurden bei allen Renaturierungsversuchen nur sehr geringe PLD-Aktivitäten gemessen, so daß die Inkubationszeit des Standardtests auf 3 bzw. 5 Stunden ausgedehnt werden mußte, um meßbare Extinktionsänderungen zu erhalten. Geringe Verbesserungen der Faltung des Proteins brachten der Zusatz an PEG 6000 (0,2 g/l, Abb. 5.8), Glycerol (10-20 %) und Detergenz (Tween 20 und Triton X-100). Auch die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  im Bereich 10-15 mM zeigte eine geringe Aktivitätssteigerung (Abb. 5.9). Alle anderen Substanzen verbesserten die Faltung nur unwesentlich oder verschlechterten sie sogar (z. B. Harnstoff, GdnHCl oder Arginin). Die Ausbeute lag bei allen Versuchen bei maximal nur 0,06 % bezogen auf die spezifische Hydrolyseaktivität des löslichen Enzyms. Da durch Renaturierung von PLD1-IBs mit allen getesteten Substanzen keine befriedigende Enzymausbeute erzielt werden konnte, wurde auf weitere Versuche zur Renaturierung der IBs verzichtet und der Expression ohne Induktion der Vorrang gegeben, zumal in diesem Fall das Enzym in aktiver, reiner Form isoliert werden konnte.

## 5.5. Biochemische Charakterisierung der Isoenzyme

Die rekombinant gewonnenen Isoenzyme bilden die Grundlage für weiterführende biochemische Charakterisierungen der PLD. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits einige ausgewählte Versuche zur Beantwortung besonders interessanter Fragen durchgeführt.

### 5.5.1. N-terminale Sequenzierung von PLD1 und PLD2

Beide Isoenzyme wurden nach der Reinigung an Octylsepharose mittels SDS-PAGE durch Blotten auf eine Mikrosequenzierungsmembran übertragen und durch Dr. Rücknagel (Max-Planck-Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung", Halle) N-terminal sequenziert. Bei beiden Isoenzymen stimmten die ermittelten Sequenzen Ala-Gln-His-Leu-Leu mit der von der Gensequenz abgeleiteten Methionin-freien N-terminalen Aminosäuresequenz, die für PLD1 und PLD2 identisch ist, überein. Das läßt die Schlußfolgerung zu, daß für die Entfaltung der vollen Enzymaktivität bis auf die Methionin-Abspaltung keine posttranslationalen Prozessierungen am N-Terminus notwendig sind. Dies steht im Widerspruch zu den Angaben von Abousalham et al. (1993), die aus Weißkohl gereinigte PLD ansequenzierten. Aus unseren Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die von Abousalham et al. untersuchte PLD um 36 N-terminale Aminosäuren verkürzt war. Es wird vermutet, daß diese PLD-Präparation mit kürzeren Fragmenten verunreinigt war und der vollständige N-Terminus möglicherweise wegen einer Blockierung nicht bestimmt werden konnte. Diese Vermutung wird durch eigene Befunde in der Arbeitsgruppe (R. Schöps, unveröffentlicht) gestützt. Bisher ist es nicht gelungen, den N-Terminus des aus Weißkohl isolierten Enzyms (aufgrund des Laufverhaltens in der SDS-PAGE vermutlich die Isoform 2) aufgrund einer Blockierung zu bestimmen. Auch von Novotna et al. (1999) wird eine N-terminale Blockierung der Raps-PLD berichtet.

### 5.5.2. Ermittlung der spezifischen Hydrolyseaktivität von PLD1 und PLD2

Die spezifische Hydrolyseaktivität der gereinigten PLD1- und PLD2-enthaltenden Eluate der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten hydrophoben Interaktionschromatografie wurde durch Messung der PLD-Aktivität und der Proteinkonzentration bestimmt. Zur Ermittlung der hydrolytischen Aktivität wurde der PpNP-Test verwendet, bei dem Phosphatidyl-p-nitrophenol als Substrat diente und die Menge an freigesetztem p-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt wurde. Dieser Test wurde ursprünglich von D'Arrigo et al. (1995) entwickelt, um die PLD-Aktivität aus verschiedenen Mikroorganismen (*Streptomyces species*, *S. chromofuscus*) und aus Wirsingkohl zu bestimmen. Der PpNP-Test ließ sich jedoch auch auf die PLD aus Weißkohl übertragen, da diese in Übereinstimmung mit Hirche et al. (1997) ebenso Substrate mit sekundären Alkoholen akzeptiert.

Die Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen wurde mittels Bradford-Test bestimmt. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten von PLD1 und PLD2 betragen, wie in Tabelle 5.5 angegeben, 5,0-8,8 bzw. 10,0-12,5  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Demnach besitzt PLD2 eine höhere katalytische Wirkung.

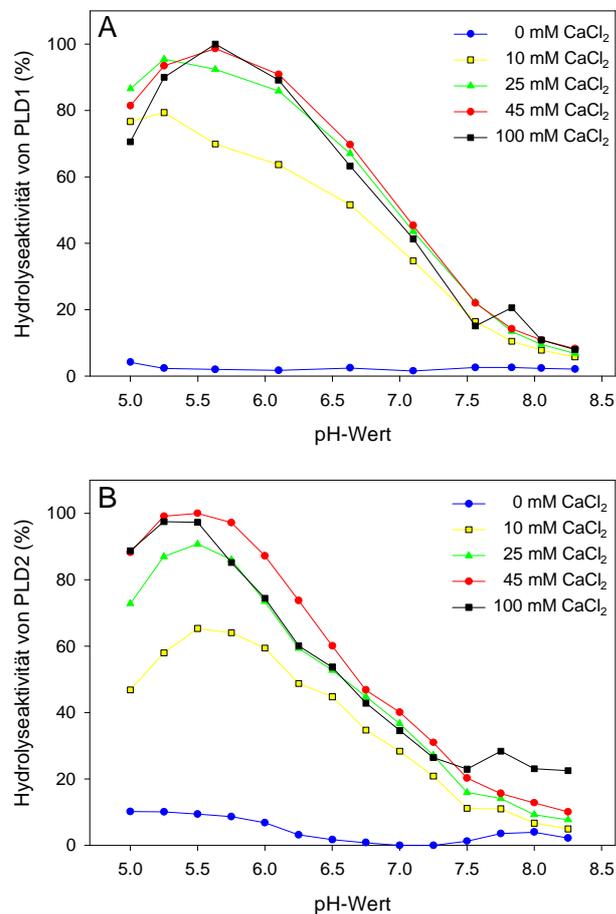
### 5.5.3. Bestimmung der Hydrolyseaktivität von PLD1 und PLD2 in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Bereits 1953 bestimmte Kates das pH-Optimum der Hydrolyseaktivität von PLD aus Weißkohl, das bei pH 5,0-5,8 lag (Kates, 1953). Davidson und Long (1958) beschrieben eine Aktivierung der PLD aus Wirsingkohl durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Abousalham et al. (1993) berichteten, daß das pH-Optimum der PLD aus Weißkohl in den sauren Bereich verschoben wird, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge im Test erhöht wird. In Gegenwart von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  lag das Optimum bei pH 7,5. Bei Anwesenheit von 25 mM  $\text{CaCl}_2$  wurde ein pH-Optimum von 6,0 gefunden. Die höchste Aktivität wurde bei 45 mM  $\text{CaCl}_2$  gemessen, wobei sich das pH-Optimum unter diesen Bedingungen bei pH 5,5 befand. Die Untersuchung der Aktivität der beiden rekombinanten Isoenzyme in Abhängigkeit vom pH und der Kalziumkonzentration sollte Aufschluß darüber geben, ob diese Verschiebungen durch die beiden von uns identifizierten PLD-Isoenzyme verursacht werden. PLD1 und PLD2 wurden einzeln bei verschiedenen pH-Werten (pH 5,0-8,3) und  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen (10-100 mM) inkubiert und ihre Aktivitäten bestimmt (Abb. 5.10). Es konnte gezeigt werden, daß PLD1 und PLD2 unabhängig von der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration im Aktivitätstest das gleiche pH-Optimum für die Hydrolyseaktivität von pH 5,5-5,6 haben. Die höchste Aktivität wurde in Gegenwart von 45 mM Kalziumchlorid

erreicht. Bei höheren Konzentrationen stieg sie nicht weiter an. In Abwesenheit von Kalziumionen betrug die Aktivität beider Isoenzyme weniger als 10 % der Aktivität beim pH-Optimum.

Die von Abousalham et al. (1993) gefundene Abhängigkeit des pH-Optimums von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konnte weder mit PLD1 noch mit PLD2 bestätigt werden. Es muß jedoch betont werden, daß sich der hier verwendete Aktivitätstest mit PpNP als Substrat von dem von Abousalham et al. durchgeführten Test unterschied, so daß mögliche Einflüsse des pH-Wertes oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die Substratbeschaffenheit (Oberflächenladung, Struktur o. ä.) nicht ausgeschlossen werden können. Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Anwesenheit von bisher beim Weißkohl noch unbekanntem PLD-Isoenzymen des  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Typs ähnlicher Größe sein, da eine amerikanische Arbeitsgruppe für die PLD $\beta$ - und PLD $\gamma$ -Isoenzyme aus *Arabidopsis thaliana* ein pH-Optimum im neutralen Bereich angegeben hat (Qin et al., 1997, Pappan und Wang, 1999a).

**Abb. 5.10. Abhängigkeit der Hydrolyseaktivität von PLD1 (A) und PLD2 (B) vom pH-Wert und von der Kalziumkonzentration im PpNP-Test.**



#### 5.5.4. Ermittlung der Transphosphatidylierungspotenz von PLD1 und PLD2

Bis auf die höhere spezifische Hydrolyseaktivität von PLD2 konnten bisher noch keine weiteren Unterschiede zwischen PLD1 und PLD2 festgestellt werden. Um das Verhalten der Isoenzyme bei der Katalyse der Transphosphatidylierungsreaktion zu untersuchen, wurde der von Hirche et al. (1996) entwickelte Aktivitätstest, der in Anwesenheit von DO-PC und Glycerol im Diethylether/Acetatpuffer-Zweiphasensystem durchgeführt wird, verwendet. Nach der Dünnschichtchromatografie wurden die nach Entwicklung der HPTLC-Platten erhaltenen Banden densitometrisch ausgewertet und die Initialgeschwindigkeiten für Transphosphatidylierung ( $v_T$ ) und Hydrolyse ( $v_H$ ) berechnet. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 5.6 dargestellt. Das Verhältnis dieser beiden Parameter ( $v_T/v_H$ ) ist ein Maß für die Transphosphatidylierungspotenz der PLD. Betrachtet man dieses Verhältnis für beide Isoenzyme, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Sowohl für PLD1 als auch für PLD2 war die Umesterungsrate zweimal höher als die Hydrolyserate, d. h. ein Drittel des DO-PC wurde zu DO-PA hydrolysiert, wohingegen die restlichen zwei Drittel zu DO-PG umgesetzt wurden. Dagegen hat PLD2, wie bei der unter 5.4.2. ermittelten Hydrolyseaktivität, auch hier eine höhere Transphosphatidylierungsaktivität als PLD1.

**Tabelle 5.6. Initialgeschwindigkeiten der Transphosphatidylierung ( $v_T$ ) und Hydrolyse ( $v_H$ ) von DO-PC in Anwesenheit von Glycerol für PLD1 und PLD2 im Diethylether/Puffer Zweiphasensystem.**

Isoenzym aus Weißkohl	Initialgeschwindigkeit ( $\text{nmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )		$v_T/v_H$
	$v_T$	$v_H$	
PLD1	$23,0 \pm 0,7$	$12,7 \pm 1,9$	$1,8 \pm 0,3$
PLD2	$33,9 \pm 7,3$	$18,2 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,4$

## 6. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollten die molekularbiologischen Grundlagen für die Aufklärung der Proteinstruktur und für die gentechnologische Veränderung der enzymatischen Eigenschaften von Phospholipase D aus Weißkohl geschaffen werden. Um das für industrielle Synthesen neuartiger Phospholipide noch nicht ausreichend erforschte Enzym proteinchemisch besser charakterisieren zu können, sollte ein Verfahren zur Gewinnung dieses Enzyms in größeren Mengen und hoher Reinheit entwickelt werden. Die Klonierung des zugehörigen Gens und dessen heterologe Expression in einem geeigneten Mikroorganismus, vorzugsweise *E. coli*, erschienen dabei als das Mittel der Wahl. Aufgrund fehlender Informationen über die PLD-Genstruktur in Weißkohl wurden zunächst Datenbankrecherchen durchgeführt, um pflanzliche, strukturell ähnliche PLDs zu finden, aus denen Primerstrukturen abgeleitet werden konnten, die für die Herstellung von Genfragmenten mittels PCR und deren Sequenzierung notwendig waren.

Bei der Analyse der ermittelten Nukleotidsequenz einiger Fragmente zeigte sich, daß in Weißkohl zwei strukturell sehr ähnliche *pld*-Gene exprimiert werden, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit *pld1* und *pld2* bezeichnet wurden. Beide Gene enthalten 3 Introns, von denen eines upstream vom Startcodon liegt, die anderen beiden befinden sich im ORF an vergleichbaren Positionen. *pld1* codiert für ein Protein mit 810 Aminosäuren, *PLD2* ist um zwei Aminosäuren länger. Beide Primärstrukturen sind zu 91 % identisch (und zu 96 % ähnlich) und weisen hohe Homologien zu anderen pflanzlichen PLD-Vertretern auf. Da beide Isoenzyme dem  $PLD\alpha$ -Typ aus *Arabidopsis thaliana* am stärksten ähneln – bei dieser Pflanze entdeckte man auch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Typen – wurden sie den  $PLD\alpha$ s zugeordnet. Wie bei allen anderen pflanzlichen PLDs wurden auch in *PLD1* und *PLD2* aus Weißkohl die beiden hoch konservierten, für die Aktivität essentiellen HKD-Motive und die für die Kalziumbindung verantwortliche C2-Domäne im N-Terminus der Proteine gefunden. Es wurde angenommen, daß es sich bei beiden Isoenzymen um intrazelluläre Enzyme handelt, da mittels Signalsequenzrecherche kein Hinweis auf das Vorhandensein einer Signalsequenz gefunden wurde. Das steht im Widerspruch zu Literaturbefunden (Abousalham et al., 1993), die für das Weißkohlenzym eine um 36 Aminosäuren verkürzte Sequenz nach N-terminaler Proteinsequenzierung als die aktive Enzymspezies ansehen und die zusätzliche Sequenz als Propeptid betrachten.

Die Expression beider *pld*-Gene in *E. coli* gelang mittels Klonierung in den Vektor pRSET5a. Dieser Vektor, der weder N- noch C-terminale Tags enthält, hat sich als

vorteilhaft erwiesen, da alle anderen Konstrukte, die eine Fusion mit C- oder N-terminalen Tags zur Vereinfachung der Reinigung enthielten (StrepII-, His- und GST-Tag), keine oder nur eine sehr geringe Expressionsrate aufwiesen.

Mit den in pRSET5a klonierten Genen für PLD1 und PLD2 gelang es, nach Optimierung der Expressionsbedingungen PLD-Hydrolyseaktivitäten von  $37,5 \mu\text{mol min}^{-1}$  für PLD1 und  $62,5 \mu\text{mol min}^{-1}$  für PLD2 im Bakterien-Rohextrakt pro Liter Kultur anzureichern. Dabei hat sich die Kultivierung der *E. coli*-Zellen bei einer Temperatur von  $15^\circ\text{C}$  und bei einem pH von 7,0 als optimal erwiesen. Während ohne Induktion mittels IPTG die Expression der beiden Gene in Form des aktiven löslichen Enzyms in den genannten Aktivitätsausbeuten gelang, wurde nach Induktion mittels IPTG die Expression in Form von inclusion bodies beobachtet. Bisher ist jedoch die Renaturierung nur mit unbefriedigenden Ausbeuten verlaufen.

Beide in löslicher, aktiver Form aus dem Rohextrakt isolierten Isoenzyme konnten mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Affinitätschromatografie an Octylsepharose gereinigt werden. Da aufgrund der für die Reinigung benötigten Kalziumchlorid-Zugabe jedoch große Mengen an PLD1 und PLD2 kopräzipitierten (38,8 bzw. 27,8 %), lag die Enzymausbeute bezogen auf die Aktivität bei insgesamt nur 45,9 und 45,0 %. Der Reinigungsfaktor betrug ca. 83 für beide Isoenzyme. Die beiden gereinigten Isoenzyme zeigen gegenüber dem synthetischen Substrat PpNP eine spezifische Hydrolyseaktivität von 5,0-8,8 bzw.  $10,0-12,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Diese Werte stimmen mit dem der aus Weißkohl isolierten PLD gut überein. Auch die gelelektrophoretischen Eigenschaften sind vergleichbar. Das deutet darauf hin, daß auch in der Pflanze keine Signalsequenzabspaltung und keine größenverändernden, posttranslationalen Modifizierungen erfolgen. Die Proteinsequenzierung der N-Termini ergab den bereits vom ORF abgeleiteten, jedoch Met-freien N-Terminus.

Beide Isoenzyme entfalten ihre höchste Aktivität in Anwesenheit von ca. 45 mM  $\text{CaCl}_2$ . Ohne Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beträgt die Hydrolyseaktivität weniger als 10 %. Die pH-Optima der PLD1 und PLD2 liegen bei pH 5,5-5,6, unabhängig von der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration im PpNP-Test. Dies steht im Widerspruch zu Literaturangaben (Abousalham et al., 1993), wo für eine PLD-Präparation aus Weißkohl ein weiteres pH-Optimum bei pH 7,5 in Anwesenheit von 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  angegeben wird.

Der Vergleich der Messung der Transphosphatidylierungsaktivitäten der beiden rekombinanten Isoenzyme ergab keine gravierenden Unterschiede. Die im Diethylether/Acetattuffer-Zweiphasensystem gemessene Transphosphatidylierungsrate von Hühnerei-PC in Anwesenheit von Glycerol und Wasser war etwa doppelt so hoch wie die Hydrolyserate. In Bezug auf die Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität zeigte PLD2 eine höhere Katalyserate als PLD1.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß beide Isoenzyme nach dem beschriebenen Verfahren in ausreichender Menge und Reinheit für weiterführende Struktur- und Funktionsuntersuchungen bereitgestellt werden können. Darüber hinaus erlauben die gewonnenen molekularbiologischen Erkenntnisse zu PLD1 und PLD2 gezielte Veränderungen der Proteinstruktur zur Modifizierung ihrer Stabilitäts- und Katalyseeigenschaften.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abergel C, Abousalham A, Chenivresse S, Riviere M, Moustacas-Gardies AM, Verger R (2001) Crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 320-322
- Abousalham A, Riviere M, Teissere M, Verger R (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim. Biophys. Acta* 1158, 1-7
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor Miklos GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng

- XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195
- Almquist KC, Paliyath G (2000) Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for phospholipase D alpha (Accession No. AF201661) from tomato (PGR 00-013). *Plant Physiol.* 122, 292
- Arnold U, Ulbrich-Hofmann R (1999) Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal. Biochem.* 271, 197-199
- Aurich I, Dürschmidt P, Hirche F, Ulbrich-Hofmann R (1997) Transesterification of alkylphosphate esters by phospholipase D. *Biotechnol. Lett.* 19, 875-879
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K (Hrsg., 1987ff, Stand 2001) Current Protocols in Molecular Biology. *Wiley & Sons*, Cambridge
- Bradford MM (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
- Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 85, 109-114
- Cha YY, Lee K-W, Kim JC, Han TJ, Lee WS, Cho SH (1997) Nucleotide sequence of a cDNA encoding phospholipase D (Accession No. U96438) from *Pimpinella brachycarpa* (PGR 97-092). *Plant Physiol.* 114, 1135
- Chetal S, Wagle DS, Nainawatee HS (1982) Phospholipase D activity in leaves of water-stressed wheat and barley. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 177, 92-96
- Colley WC, Altshuller YM, Sue-Ling CK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Branch KD, Tsirka SE, Bollag RJ, Bollag WB, Frohman MA (1997a) Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem. J.* 326, 745-753

- Colley WC, Sung T-C, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuler Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA (1997b) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol.* 7, 191-201
- Comfurius P, Zwaal RFA (1977) The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 488, 36-42
- Contardi A, Ercoli A (1932) Über die enzymatische Spaltung der Lecithine und Lysocithine. *Biochem. Z.* 261, 275
- Cuevas WA, Songer JGL (1993) Arcanobacterium haemolyticum phospholipase D is genetically and functionally similar to Corynebacterium pseudotuberculosis phospholipase D. *Infect. Immun.* 61, 4310-4316
- Cui X, Brown RM Jr (1999) Molecular cloning of a phospholipase D gene from cotton fibers (Accession No. AF159139). (PGR99-119). *Plant Physiol.* 120, 1207
- Cullis PR, Hope MJ, Tilcock CPS (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem. Phys. Lipids* 40, 127-144
- D'Arrigo P, de Ferra L, Pedrocchi-Fantoni G, Scarcelli D, Servi S, Strini A (1996) Enzyme-mediated synthesis of two diastereomeric forms of phosphatidylglycerol and of diphosphatidylglycerol (cardiolipin). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2657-2660
- D'Arrigo P, de Ferra L, Piergianni V, Ricci A, Scarcelli D, Servi S (1994) Phospholipase D from *Streptomyces* catalyses the transfer of secondary alcohols. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 14, 1709-1710
- D'Arrigo P, de Ferra L, Piergianni V, Selva A, Servi S, Strini A (1996) Preparative transformation of natural phospholipids catalyzed by phospholipase D from *Streptomyces*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2651-2656
- D'Arrigo P, Piergianni V, Scarcelli D, Servi S (1995) A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Anal. Chimica Acta* 304, 249-254

- Davidson FM, Long C (1958) The structure of the naturally occurring phosphoglycerides: Action of cabbage-leaf phospholipase D on ovoidicithin and related substances. *Biochem. J.* 69, 458-466
- Dawson RMC (1967) The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D. *Biochem. J.* 102, 205-210
- Dawson RMC, Hemington N (1967) Some properties of purified phospholipase D and especially the effect of amphipathic substances.. *Biochem. J.* 102, 76-86
- Dennis EA (1983) Phospholipases, in P. Boyer, ed., *The enzymes*. Vol. 16, 307-353, Academic Press, New York
- Diaz C, Balasubramanian K, Schroit AJ (1998) Synthesis of disulfide-containing phospholipid analogs for the preparation of head group-specific lipid antigens: generation of phosphatidylserine antibodies. *Bioconjug. Chem.* 9, 250-254
- Dinh TT, McClure GD, Kennerly DA (1995) Purification and N-terminal sequence analysis of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107, 69-71
- Dittrich N, Haftendorn R, Ulbrich-Hofmann R (1998) Hexadecylphosphocholine and 2-modified 1,3-diacylglycerols as effectors of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 265-272
- Dittrich N, Nössner G, Kutscher B, Ulbrich-Hofmann R (1996) Alkylphosphate esters as inhibitors of phospholipase D. *J. Enzyme Inhibition* 11, 67-75
- Dyer JH, Ryu SB, Wang X (1994) Multiple forms of phospholipase D following germination and during leaf development of castor bean. *Plant Physiol.* 105, 715-724
- Dyer JH, Zheng L, Wang X (1995) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding phospholipase D from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 109, 1497-1499
- Dyer JH, Zheng S, Wang X (1996) Structural heterogeneity of phospholipase D in 10 dicots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 31-36

- Eibl H, Kovatchev S (1981) Preparation of phospholipids and their analogs by phospholipase D. *Methods Enzymol.* 72, 632-639
- El Maarouf H, Carriere F, Riviere M, Abousalham A (2000) Functional expression in insect cells, one-step purification and characterization of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Eng.* 13, 811-817
- El Maarouf H, Zuily-Fodil Y, Gareil M, d'Arcy-Lameta A, Pham-Thi AT (1999) Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp. differing in drought tolerance. *Plant Mol. Biol.* 39, 1257-1265
- Fahey RC, Hunt JS, Windham GC (1977) On the cysteine and cystine content of proteins. Differences between intracellular and extracellular proteins. *J. Mol. Evol.* 10, 155-160
- Fan L, Zheng S, Wang X (1997) Antisense suppression of phospholipase D $\alpha$  retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest arabidopsis leaves. *Plant Cell* 9, 2183-2196
- Ferrari RA, Benson AA (1961) The path of carbon in photosynthesis of the lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 185-192
- Frank W, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F, Bartels D (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12, 111-123
- Gottlin EB, Rudolph AE, Zhao Y, Matthews HR, Dixon JE (1998) Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9202-9207
- Haftendorn R, Schwarze G, Ulbrich-Hofmann R (2000) 1,3-Diacylglycerol-2-phosphocholines – synthesis, aggregation behaviour and properties as inhibitors of phospholipase D. *Chem. Phys. Lipids* 104, 57-66

- Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem.* 270, 29640-29643
- Hanahan DJ, Chaikoff IL (1947) A new phospholipid-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J. Biol. Chem.* 169, 699-705
- Hasegawa M, Ota N, Aisaka K (1992) Production of Phospholipase D-K. Patent: JP 1992088981-A 1 (23-MAR-1992) Kyowa Hakko Kogyo CO LTD
- Heller M (1978) Phospholipase D. *Adv. Lipid Res.* 16, 267-326
- Hirche F, Koch MHJ, König S, Wadewitz T, Ulbrich-Hofmann R (1996) The influence of organic solvents on phospholipid transformations by phospholipase D in emulsion systems. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 1-9
- 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 (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
- Holbrook PG, Pannell LK, Daly JW (1991) Phospholipase D-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine occurs with P-O bond cleavage. *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 155-158
- Honigberg SM, Conicella C, Esposito RE (1992) Commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the SPO14 gene. *Genetics* 130, 703-716

- Hwang I-S, Park S-J, Roh T, Choi M-U, Kim HJ (2001) Investigation of sulfhydryl groups in cabbage phospholipase D by combination of derivatization methods and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 110-115
- Iwasaki Y, Horiike S, Matsushima K, Yamane T (1999) Location of the catalytic nucleophile of phospholipase D of *Streptomyces antibioticus* in the C-terminal half domain. *Eur. J. Biochem.* 264, 577-581
- Iwasaki Y, Nakano H, Yamane T (1994) Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 290-299
- Iwasaki Y, Nishiyama T, Kawarasaki Y, Nakano H, Yamane T (2000) Importance of disulfide bridge formation on folding of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 506-508
- Juneja LR, Hibi N, Inagaki N, Yamane T, Shimizu S (1987) Comparative study on conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylglycerol by cabbage phospholipase D in micelle and emulsion systems. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 350-354
- Juneja LR, Kazuoka T, Goto N, Yamane T, Shimizu S (1989) Conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylserine by various phospholipases D in the presence of L- and D-serine. *Biochim. Biophys. Acta* 1003, 277-283
- Juneja LR, Kazuoka T, Yamane T, Shimizu S (1988) Kinetic evaluation of conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine by phospholipase D from different sources. *Biochim. Biophys. Acta* 960, 334-341
- Jung K, Koh E, Choi M-U (1989) Catalytic properties of phospholipase D using phosphatidic acid as an activator. *Bull. Korean Chem. Soc.* 10, 595-600
- Kanoh H, Nakashima S, Zhao Y, Sugiyama Y, Kitajima Y, Nozawa Y (1998) Molecular cloning of a gene encoding phospholipase D from the pathogenic and dimorphic fungus, *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 359-364

- Katayama K, Kodaki T, Nagamachi Y, Yamashita S (1998) Cloning, differential regulation and tissue distribution of alternatively spliced isoforms of ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D from rat liver. *Biochem. J.* 329, 647-652
- Kates M (1953) Lecithinase activity of chloroplasts. *Nature* 172, 814-815
- Kent C (1995) Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 315-343
- Kim D-U, Roh T, Lee J, Noh J, Jang Y-J, Hoe K-L, Yoo H-S, Choi M-U (1999) Molecular cloning and functional expression of a phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Biochim. Biophys. Acta* 1437, 409-414
- Kokusho Y, Tsunoda A, Kato S, Machida H, Iwasaki S (1993) Production of various phosphatidylsaccharides by phospholipase D from *Actinomadura* sp. strain No. 362. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1302-1305
- Koonin EV (1996) A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope proteins. *Trends In Biochemical Sciences* 21, 242-243
- Kopka J, Pical C, Hetherington AM, Müller-Röber B (1998) Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding C2 domain in multiple plant proteins: novel components of the calcium-sensing apparatus. *Plant Mol. Biol.* 36, 627-637
- Kovatchev S, Eibl H (1978) The preparation of phospholipids by phospholipase D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 101, 5221-5226
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lambrecht R, Ulbrich-Hofmann, R (1992) A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 81-88
- Lee H, Choi M-U, Koh E-H (1989) Purification and characterization of the active site of phospholipase D. *Korean Biochem. J.* 22, 487-493

- Lee S, Hibi N, Yamane T, Shimizu S (1985) Phosphatidylglycerol synthesis by phospholipase D in a microporous membrane bioreactor. *J. Ferment. Technol.* 63, 37-44
- Lee S, Suh S, Kim S, Crain RC, Kwak JM, Nam H-G, Lee Y (1997) Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J.* 12, 547-556
- Lee SH, Chae HS, Lee TK, Kim SH, Shin SH, Cho BH, Cho SH, Kang BG, Lee WS (1998) Ethylene-mediated phospholipid catabolic pathway in glucose-starved carrot suspension cells. *Plant Physiol.* 116, 223-229
- Lein W, Saalbach G (2001) Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 172-183
- Leiros I, Secundo F, Zambonelli C, Servi S, Hough E (2000) The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure Fold. Des.* 8, 655-667
- Li L, Fleming N (1999) Aluminium fluoride inhibition of cabbage phospholipase D by a phosphate-mimicking mechanism. *FEBS Lett.* 461, 1-5
- Liscovitch M, Chalifa V, Pertile P, Chen C-S, Cantley LC (1994) Novel function of phosphoinositole 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 269, 21403-21406
- Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD (1998) Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J. Biol. Chem.* 273, 12846-12852
- McNamara PJ, Cuevas WA, Songer JG (1995) Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene* 156, 113-118
- Morris AJ, Engebrecht J, Frohman MA (1996) Structure and regulation of phospholipase D. *TIPS* 17, 182-185

- Munnik T, Irvine RF, Musgrave A (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1389, 222-272
- Nagao A, Ishida N, Terao J (1991) Synthesis of 6-phosphatidyl-L-ascorbic acid by phospholipase D. *Lipids* 26, 390-394
- Nakajima J, Nakashima T, Shima Y, Fukuda H, Yamane T (1994) A facile transphosphatidylation reaction using a culture supernatant of actinomycetes directly as a phospholipase D catalyst with a chelating agent. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1193-1198
- Nalefski EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Science* 5, 2375-2390
- Novotná Z, Ká J, Daussant J, Sajdok J, Valentová O (1999) Purification and characterization of rape seed phospholipase D. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 531-537
- Ogino C, Negi Y, Daido H, Kanemasu M, Kondo A, Kuroda S, Tanizawa K, Shimizu N, Fukuda H (2001) Identification of novel membrane-bound phospholipase D from *Streptoverticillium cinnamoneum*, possessing only hydrolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 23-31
- Ogino C, Negi Y, Matsumiya T, Nakaoka K, Kondo A, Kuroda S, Tokuyama S, Kikkawa U, Yamane T, Fukuda H (1999) Purification, characterization, and sequence determination of phospholipase D secreted by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *J. Biochem.* 125, 263-269
- Okahata Y, Niikura K, Ijio K (1995) Simple transphosphatidylation of phospholipids catalysed by a lipid-coated phospholipase D in organic solvents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 919-925
- Pannenberg I, Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R (1998) Identification of two isoenzymes (Acc. Nos. AF090444 and AF090445) of phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Plant Physiol.* 118, 1102

- Pappan K, Qin W, Dyer JH, Zheng L, Wang X (1997) Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLD $\beta$ , from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 272, 7055-7061
- Pappan K, Wang X (1999a) Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 151-166
- Pappan K, Wang X (1999b) Plant phospholipase D $\alpha$  is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 347-353
- Pedersen KM, Finsen B, Celis JE, Jensen NA (1998) Expression of a novel murine phospholipase D homolog coincides with late neuronal development in the forebrain. *J. Biol. Chem.* 273, 31494-31504
- Ponting CP, Kerr ID (1996) A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Science* 5, 914-922
- Qin W, Dyer JH, Zheng L, Wang X (1999) Isolation and nucleotide sequence of the fourth phospholipase D (Accession No. AF138281), PLD- $\gamma$ 2, from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120, 635
- Qin W, Pappan K, Wang X (1997) Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): Cloning of PLD $\gamma$  and regulation of plant PLD $\gamma$ , - $\beta$ , and - $\alpha$  by polyphosphoinositides and calcium. *J. Biol. Chem.* 272, 28267-28273
- Rebecchi MJ, Pentylala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Reviews* 80, 1291-1335
- Redina OE, Frohman MA (1998a) Organization and alternative splicing of the murine phospholipase D2 gene. *Biochemistry* 331, 845-851
- Redina OE, Frohman MA (1998b) Genomic analysis of murine phospholipase D1 and comparison to phospholipase D2 reveals an unusual difference in gene size. *Gene* 222, 53-60

- Rose K, Rudge SA, Frohman MA, Morris AJ, Engebrecht J (1995) Phospholipase D signaling is essential for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 12151-12155
- Rudge SA, Engebrecht J (1999) Regulation and function of PLDs in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 167-174
- Rudolph R, Böhm G, Lilie H, Jaenicke R (1996) Folding proteins. in Creighton TE, ed.; *Protein Function: A practical approach*. University Press, Oxford
- Ryu SB, Karlsson BH, Özgen M, Palta JP (1997) Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12717-12721
- Ryu SB, Wang X (1998) Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 1393, 193-202
- Sakai M, Yamatoya H, Kudo S (1996) Pharmacological effects of phosphatidylserine enzymatically synthesized from soybean lecithin on brain functions in rodents. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 42, 47-54
- Sale MFO, Cestaro B, Mascherpa A, Monti D, Masserini M (1989) Enzymatic synthesis and thermotropic behaviour of phosphatidylethanol. *Chem. Phys. Lipids* 50, 135-142
- Scallon B, Fung WJ, Tsang C, Li S, Kado-Fong H, Huang KS, Kochan JP (1991) Primary structure and functional activity of phosphatidylinositolglycan specific phospholipase D. *Science* 252, 446-448
- Schein CH, Noteborn MHM (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* 3, 151-154
- Scott DL, Sigler PB (1994) Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A<sub>2</sub>. *Adv. Protein Chem.* 45, 53-88
- Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB (1990) Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. *Science* 250, 1541-1546

- Secundo F, Carrea G, D'Arrigo P, Servi S (1996) Evidence for an essential lysyl residue in phospholipase D from *Streptomyces* sp. by modification with DEPC and pyridoxalphosphate. *Biochemistry* 35, 9631-9636
- Servi S (1999) Phospholipases as synthetic catalysts. *Topics in Current Chemistry* 200, 127-158
- Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Südhof TC, Rizo J (1996) Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C<sub>2</sub> domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* 273, 248-251
- Shuto S, Awano H, Fujii A, Yamagami K, Matsuda A (1996) Nucleosides and nucleotides .155. Synthesis, antitumor effects, and possible enzymatic activation mechanism of 5'-phosphatidyl-2'-deoxy-2'-methylenecytidine (DMDC). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 2177-2182
- Shuto S, Itoh H, Sakai A, Nakagami K, Imamura S, Matsuda A (1995) Nucleosides and nucleotides. 137. 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
- Shuto S, Ueda S, Imamura S, Fukukawa K, Matsuda A, Ueda T (1987) A facile one-step synthesis of 5'-phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction. *Tetrahedron Lett.* 28, 199-202
- Six DA, Dennis EA (2000) The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 1-19
- Smith GA, Montecucco C, Bennett JP (1978) Isotopic labeling of phosphatidylcholine in the choline moiety. *Lipids* 13, 92-94
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85
- Songer JG, Libby SJ, Iandolo JJ, Cuevas WA (1990) Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 58, 131-136

- Stanacev NZ, Stuhne-Sekalec L (1970) On the mechanism of enzymatic phosphorylation. Biosynthesis of cardiolipin catalyzed by phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 210, 350-352
- Stanacev NZ, Stuhne-Sekalec L, Domazet Z (1973) Enzymatic formation of cardiolipin from phosphatidylglycerol by the transphosphatidyltransfer mechanism catalyzed by phospholipase D. *Can. J. Biochem.* 51, 747-753
- Steed PM, Clark KL, Boyar WC, Lasala DJ (1998) Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J.* 12, 1309-1317
- Stuckey JA, Dixon JE (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nature Struct. Biol.* 6, 278-284
- Sung T-C, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Temel R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engebrecht J, Frohman MA (1997) Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a *trans*-golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.* 16, 4519-4530
- Sung T-C, Zhang Y, Morris AJ, Frohman MA (1999) Structural analysis of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* 274, 3659-3666
- Sutton RB, Davletov BA, Berghuis AM, Südhof TC, Sprang SR (1995) Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I. A novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929-938
- Swairjo MA, Concha NO, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton BA (1995) Ca<sup>2+</sup>-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nature Struct. Biol.* 2, 968-974
- Takahara M, Houriyou K, Imamura S (1993) DNA having genetic information of phospholipase D-P and its use. Patent: JP 1993252935-A 1 (05-OCT-1993); Shokuhin Sangyo Kousho Kinou Henkan Gijutsu Kenkyu Kumiai
- Takami M, Suzuki Y, (1994) Synthesis of novel phosphatidylhydroxyacetone via transphosphatidyltransfer reaction by phospholipase D. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 2136-2139

- Thunnissen MMGM, Ab E, Kalk KH, Drenth J, Dijkstra BW, Kuipers OP, Dijkman R, de Haas GH, Verheij HM (1990) X-ray structure of phospholipase A<sub>2</sub> complexed with a substrate-derived inhibitor. *Nature* 347, 689-691
- Tsang TC, Fung W-JC, Levine J, Metz CN, Davitz MA, Burns DK, Huang K-S, Kochan JP (1992) Isolation and expression of two human glycosylphosphatidylinositol phospholipase D (GPI-PLD) cDNAs, *FASEB J.* 6, 1922
- Ueki J, Morioka S, Komari T, Kumashiro T (1995) Purification and characterization of phospholipase D from rice and cloning of cDNA for phospholipase D from rice and maize. *Plant Cell Physiol.* 36, 903-914
- Ulbrich-Hofmann R (2000) Phospholipases. In U Bornscheuer, ed, *Enzymes in Lipid Modification*, Wiley-VCH, Weinheim, 219-262
- Virto C, Svensson I, Adlercreutz P (2000) Hydrolytic and transphosphatidylolation activities of phospholipase D from savoy cabbage towards lysophosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* 106, 41-51
- Waite M (1987) The phospholipases. *Handbook of Lipid Research*, Vol. 5, Plenum Press, New York
- Waite M (1999) The PLD superfamily: insights into catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 187-197
- Waksman M, Eli Y, Liscovitch M, Gerst JE (1996) Identification and characterization of a gene encoding phospholipase D activity in yeast. *J. Biol. Chem.* 271, 2361-2364
- Waksman M, Tang X, Eli Y, Gerst JE, Liscovitch M (1997) Identification of a novel Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatidylethanolamine- hydrolyzing phospholipase D in yeast bearing a disruption in *PLD1*. *J. Biol. Chem.* 272, 36-39
- Wang P, Schuster M, Wang YF, Wong CH (1993a) Synthesis of phospholipid inhibitor conjugates by enzymatic transphosphatidylolation with phospholipase D. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10487-10491

- Wang X (1999) The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiol.* 120, 645-651
- 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, Dyer JH, Zheng L (1993b) Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 486-494
- Wang X, Xu L, Zheng L (1994) Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* 269, 20312-20317
- Whitaker BD, Smith DL, Green KC (2001) Cloning, characterization, and functional expression of a phospholipase D $\alpha$  cDNA from tomato fruit. *Physiol. Plantarum*, in press
- Wilson R, Ainscough R, Anderson K, Baynes C, Berks M, Bonfield J, Burton J, Connell M, Copsey T, Cooper J, Coulson A, Craxton M, Dear S, Du Z, Durbin R, Favello A, Fulton L, Gardner A, Green P, Hawkins T, Hillier L, Jier M, Johnston L, Jones M, Kershaw J, Kirsten J, Laister N, Latreille P, Lightning J, Lloyd C, McMurray A, Mortimore B, O'Callaghan M, Parsons J, Percy C, Rifken L, Roopra A, Saunders D, Shownkeen R, Smaldon N, Smith A, Sonnhammer E, Staden R, Sulston J, Thierry-Mieg J, Thomas K, Vaudin M, Vaughan K, Waterston R, Watson A, Weinstock L, Wilkinson-Sproat J, Wohldman P (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32-38
- Xie Z, Ho W-T, Exton JH (1998) Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 273, 34679-34682
- Xie Z, Ho W-T, Exton JH (2000) Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 275, 24962-24969
- Xu L, Zheng S, Zheng L, Wang X (1997) Promoter analysis and expression of a phospholipase D gene from castor bean. *Plant Physiol.* 115, 387-395

- Yang SF, Freer S, Benson AA (1967) Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 242 (3): 477-484
- Yoshimura S, Nakashima S, Ohguchi K, Sakai H, Shinoda J, Sakai N, Nozawa Y (1996) Differential mRNA expression of phospholipase D (PLD) isozymes during cAMP-induced differentiation in C6 glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 494-499
- Young SA, Wang X, Leach JE (1996) Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Cell* 8, 1079-1090
- Zheng L, Krishnamoorthi R, Zolkiewski M, Wang X (2000) Distinct  $\text{Ca}^{2+}$  binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D $\alpha$  and  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 275, 19700-19706
- Zien CA, Wang C, Wang X, Welti R (2001) In vivo substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLD $\alpha$ , to wound-induced metabolism of lipids in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 236-248



		Intron 2	
mRNA	PLD1	-----	179
DNA	PLD1	tttatTTTTTtgattcctttgttcaagtcattcctttgggtctctccccacgtggaaatgaa	589
mRNA	PLD2	-----	155
DNA	PLD2	ttgatcctttatTTTctgtattaact-----	642
mRNA	PLD1	-----	179
DNA	PLD1	tgttgatgcttattattcatgaagttgtcacactctagagttaatttttaacctttttaa	649
mRNA	PLD2	-----	155
DNA	PLD2	-----	642
		Exon 3	
mRNA	PLD1	-----ATTCTGGCTAATGTAGAAGAGACCATTGGTGTGGCAAAGGAGAAA	225
DNA	PLD1	aaaaaaaaattcagATTCTGGCTAATGTAGAAGAGACCATTGGTGTGGCAAAGGAGAAA	709
mRNA	PLD2	-----ATTATATCAAATGTTGAAGAGACAATTGGTTTCGGCAAAGGAGAAA	201
DNA	PLD2	-----tccagATTATATCAAATGTTGAAGAGACAATTGGTTTCGGCAAAGGAGAAA	693
mRNA	PLD1	CACAGCTGTACGCAACGATCGATCTCAAAGAGCCAGAGTTGGTCGAAACAAGAAAGATCA	285
DNA	PLD1	CACAGCTGTACGCAACGATCGATCTCAAAGAGCCAGAGTTGGTCGAAACAAGAAAGATCA	769
mRNA	PLD2	CACAGCTCTACGCAACGATCGATCTACAAAAGCTAGAGTTGGTAGAACCCAGGAAGATCA	261
DNA	PLD2	CACAGCTCTACGCAACGATCGATCTACAAAAGCTAGAGTTGGTAGAACCCAGGAAGATCA	753
mRNA	PLD1	AGGACGAAGCCAAAAACCCAAAATGGTACGAGTCCCTTTCACATCTACTGCGCCCACTTGG	345
DNA	PLD1	AGGACGAAGCCAAAAACCCAAAATGGTACGAGTCCCTTTCACATCTACTGCGCCCACTTGG	829
mRNA	PLD2	CAGACGAGCCCAAGAACCCAAAGTGGTATGAGTCCCTTTCACATCTACTGTGCCACATGG	321
DNA	PLD2	CAGACGAGCCCAAGAACCCAAAGTGGTATGAGTCCCTTTCACATCTACTGTGCCACATGG	813
mRNA	PLD1	CTTCCGACATCATCTTCACCGTCAAGGACGACAACCCCATCGGCGCCACCCTCATCGGAA	405
DNA	PLD1	CTTCCGACATCATCTTCACCGTCAAGGACGACAACCCCATCGGCGCCACCCTCATCGGAA	889
mRNA	PLD2	CTTCAGACATCATCTTCACCGTTAAAGACGATAACCCCATAGGAGCCACACTCATCGGGA	381
DNA	PLD2	CTTCAGACATCATCTTCACCGTTAAAGACGATAACCCCATAGGAGCCACACTCATCGGGA	873
mRNA	PLD1	GAGCCTACGTCCCCGTGACCAAGTTCATCCACGGCGAGGAAGTCGACCAGTGGGTTGAGA	465
DNA	PLD1	GAGCCTACGTCCCCGTGACCAAGTTCATCCACGGCGAGGAAGTCGACCAGTGGGTTGAGA	949
mRNA	PLD2	GAGCGTACGTCCCTGTGACGAAAGTTCATCAACGGCGAGGAAGTAGAAAAATGGGTTGAGA	441
DNA	PLD2	GAGCGTACGTCCCTGTGACGAAAGTTCATCAACGGCGAGGAAGTAGAAAAATGGGTTGAGA	933
mRNA	PLD1	TATTAGACAACGACAGAAACCCCATCCACGGAGGGTCCAAGATCCACGTGAAGCTCCAGT	525
DNA	PLD1	TATTAGACAACGACAGAAACCCCATCCACGGAGGGTCCAAGATCCACGTGAAGCTCCAGT	1009
mRNA	PLD2	TCCTGGACGACGACAGGAACCCAATCCACGGAGAGTCCAAGATTCACGTCAAACCTCCAGT	501
DNA	PLD2	TCCTGGACGACGACAGGAACCCAATCCACGGAGAGTCCAAGATTCACGTCAAACCTCCAGT	993
mRNA	PLD1	ACTTCGGCGTTCGAGCGGATCGTAACTGGAACCAAGGTATCAAGAGCGCTAAGTTCCTTG	585
DNA	PLD1	ACTTCGGCGTTCGAGCGGATCGTAACTGGAACCAAGGTATCAAGAGCGCTAAGTTCCTTG	1069
mRNA	PLD2	ACTTCGCGGTTGAGGCGGATCGAAACTGGAACATGGGAGTCAAAGCGCTAAGTTCCTTG	561
DNA	PLD2	ACTTCGCGGTTGAGGCGGATCGAAACTGGAACATGGGAGTCAAAGCGCTAAGTTCCTTG	1053
mRNA	PLD1	GAGTCCCTTACACGTTCTTCTCCAGAGGCAGGGATGCAAAGTCTCTCTCTACCAAGACG	645
DNA	PLD1	GAGTCCCTTACACGTTCTTCTCCAGAGGCAGGGATGCAAAGTCTCTCTCTCTACCAAGACG	1129
mRNA	PLD2	GAGTGCCTTACACGTTCTTCTCCAGAGACAGGGCTGCAAAGTTTCTTTGTACCAAGGCG	621
DNA	PLD2	GAGTGCCTTACACGTTCTTCTCCAGAGACAGGGCTGCAAAGTTTCTTTGTACCAAGGCG	1113
mRNA	PLD1	CTCACATTCCGGACAACCTTCGTCCCAGGATCCCTCTCGCTGGAGGGAAGAACTACGAGC	705
DNA	PLD1	CTCACATTCCGGACAACCTTCGTCCCAGGATCCCTCTCGCTGGAGGGAAGAACTACGAGC	1189
mRNA	PLD2	CTCATGTTCCGGATAAATTCGTCCCCAAGATTCTCTCGCTGGTGGGAAGAACTACGAGC	681
DNA	PLD2	CTCATGTTCCGGATAAATTCGTCCCCAAGATTCTCTCGCTGGTGGGAAGAACTACGAGC	1173
mRNA	PLD1	CTCAGAGGTGCTGGGAGGATATTTTCGACGCGATAAGCAACGCGCAGCATATGATCTACA	765
DNA	PLD1	CTCAGAGGTGCTGGGAGGATATTTTCGACGCGATAAGCAACGCGCAGCATATGATCTACA	1249
mRNA	PLD2	CTCACAGATGCTGGGAGGATATTTTCGACGCGATAACCAACGCGAAACATTTGATCTACA	741
DNA	PLD2	CTCACAGATGCTGGGAGGATATTTTCGACGCGATAACCAACGCGAAACATTTGATCTACA	1233
mRNA	PLD1	TCACTGGATGGTCTGTGTATACTGAGATTGCCTTGGTTAGAGACTCCAGGAGGCCGAAGC	825
DNA	PLD1	TCACTGGATGGTCTGTGTATACTGAGATTGCCTTGGTTAGAGACTCCAGGAGGCCGAAGC	1309
mRNA	PLD2	TTACTGGATGGTCTGTTTACTGAGATCACTTTGGTGAGAGACTCGAGGAGGCCATAAC	801
DNA	PLD2	TTACTGGATGGTCTGTTTACTGAGATCACTTTGGTGAGAGACTCGAGGAGGCCATAAC	1293

## Exon 3

mRNA PLD1	CTGGAGGAGACGTGACCGTTGGCGAGCTGCTTAAAAAGAAAGCTAGCGAAGGTGTTAGGG	885
DNA PLD1	CTGGAGGAGACGTGACCGTTGGCGAGCTGCTTAAAAAGAAAGCTAGCGAAGGTGTTAGGG	1369
mRNA PLD2	CAGGAGGTGATATGACTCTCGCGAGTTACTTAAAAAGAAAGCTACCGAAGCGTTAGGG	861
DNA PLD2	CAGGAGGTGATATGACTCTCGCGAGTTACTTAAAAAGAAAGCTACCGAAGCGTTAGGG	1353
mRNA PLD1	TTCTTCTCCTTGTGTGGGATGATAGAACATCCGTCGATGTGTTGAAGAAAGACGGTCTCA	945
DNA PLD1	TTCTTCTCCTTGTGTGGGATGATAGAACATCCGTCGATGTGTTGAAGAAAGACGGTCTCA	1429
mRNA PLD2	TTCTGTTACTTGTGTGGGACGACAGAACCTCCGTTGATGTTTTAAAAAAGACGGTCTCA	921
DNA PLD2	TTCTGTTACTTGTGTGGGACGACAGAACCTCCGTTGATGTTTTAAAAAAGACGGTCTCA	1413
mRNA PLD1	TGGCTACTCATGATGAAGAAACGGAGAATTTCTTCAGAGGAAGCGACGTTTCATTGTATTTC	1005
DNA PLD1	TGGCTACTCATGATGAAGAAACGGAGAATTTCTTCAGAGGAAGCGACGTTTCATTGTATTTC	1489
mRNA PLD2	TGGCTACTCACGATGAAGACACTGAGAACTACTTCAACGGTAGCGAAGTGCATTGTGTGT	981
DNA PLD2	TGGCTACTCACGATGAAGACACTGAGAACTACTTCAACGGTAGCGAAGTGCATTGTGTGT	1473
mRNA PLD1	TCTGTCTCTCGTAACCCCTGATGACGGTGGTAGCATAGTCCAGAACTTGCAGGTCTCAGCCA	1065
DNA PLD1	TCTGTCTCTCGTAACCCCTGATGACGGTGGTAGCATAGTCCAGAACTTGCAGGTCTCAGCCA	1549
mRNA PLD2	TGTGTCCACGTAACCCCTGACGACGGTGGTAGCATAGTCCAAAACCTGCAAGTCTCAGCCA	1041
DNA PLD2	TGTGTCCACGTAACCCCTGACGACGGTGGTAGCATAGTCCAAAACCTGCAAGTCTCAGCCA	1533
mRNA PLD1	TGTTACGCACCCATCAGAAGATCGTTGTTGTGGACAGCGAGATGCCGAGCC---GAGGAG	1122
DNA PLD1	TGTTACGCACCCATCAGAAGATCGTTGTTGTGGACAGCGAGATGCCGAGCC---GAGGAG	1606
mRNA PLD2	TGTTACGCACCCACCAGAAGATCGTAGTTGTGGACAGCGAGGTGCCGAGCCAAGGAGGAG	1101
DNA PLD2	TGTTACGCACCCACCAGAAGATCGTAGTTGTGGACAGCGAGGTGCCGAGCCAAGGAGGAG	1593
mRNA PLD1	GTTACAGATGAGGAGGATCGTGAGTTTTGTTGGTGGGATCGATCTCTGTGATGGACGTT	1182
DNA PLD1	GTTACAGATGAGGAGGATCGTGAGTTTTGTTGGTGGGATCGATCTCTGTGATGGACGTT	1666
mRNA PLD2	GGTCGGAGATGAGGAGGATCATGAGCTTTGTTCGGAGGTATTGATCTCTGCGACGGACGTT	1161
DNA PLD2	GGTCGGAGATGAGGAGGATCATGAGCTTTGTTCGGAGGTATTGATCTCTGCGACGGACGTT	1653
mRNA PLD1	ACGACACTCCTTTCCACTCCTTGTTCAGGACGTTGGACACTGTCCACCACGACGACTTCC	1242
DNA PLD1	ACGACACTCCTTTCCACTCCTTGTTCAGGACGTTGGACACTGTCCACCACGACGACTTCC	1726
mRNA PLD2	ACGACACTCCTTTCCACTCCTTGTTCAGGACGTTGGACACGGTGCACCACGATGACTTCC	1221
DNA PLD2	ACGACACTCCTTTCCACTCCTTGTTCAGGACGTTGGACACGGTGCACCACGATGACTTCC	1713
mRNA PLD1	ACCAGCCTAACTTCACCGGCGCCGCCATACCCAAAGGCGGGCCGAGGGAGCCTTGGCAGC	1302
DNA PLD1	ACCAGCCTAACTTCACCGGCGCCGCCATACCCAAAGGCGGGCCGAGGGAGCCTTGGCAGC	1786
mRNA PLD2	ATCAGCCTAACTTCACCGGTGCTTCGATACCCAAAGGTGGTCCTAGGGAGCCTTGGCAGG	1281
DNA PLD2	ATCAGCCTAACTTCACCGGTGCTTCGATACCCAAAGGTGGTCCTAGGGAGCCTTGGCAGG	1773
mRNA PLD1	ACATCCACTCTCGCCTCGAAGGTCCCATCGCTTGGGATGTTTTGTACAACCTTCGAGCAGA	1362
DNA PLD1	ACATCCACTCTCGCCTCGAAGGTCCCATCGCTTGGGATGTTTTGTACAACCTTCGAGCAGA	1846
mRNA PLD2	ACATCCACTCTCGTCTCGAAGGTCCAATCGCTTGGGATGTTTTGTACAACCTTCGAGCAGA	1341
DNA PLD2	ACATCCACTCTCGTCTCGAAGGTCCAATCGCTTGGGATGTTTTGTACAACCTTCGAGCAGA	1833
mRNA PLD1	GGTGGAGCAAGCAAGGTGGTAAAGACATTCTCGTTAAGCTGAGGGAGCTTAGTGATATCA	1422
DNA PLD1	GGTGGAGCAAGCAAGGTGGTAAAGACATTCTCGTTAAGCTGAGGGAGCTTAGTGATATCA	1906
mRNA PLD2	GATGGAGCAAGCAAGGTGGTAAAGACATTCTCGTTAAGTTGAGAGAGCTTAGTGATATTA	1401
DNA PLD2	GATGGAGCAAGCAAGGTGGTAAAGACATTCTCGTTAAGTTGAGAGAGCTTAGTGATATTA	1893
mRNA PLD1	TCATCACACCTTCTCCCGTTATGTTCCAAGAGGATCACGACGTGTGGAATGTGCAGCTGT	1482
DNA PLD1	TCATCACACCTTCTCCCGTTATGTTCCAAGAGGATCACGACGTGTGGAATGTGCAGCTGT	1966
mRNA PLD2	TCATCACTCCTTCTCCTGTTATGTTCCAAGAGGATCACGACGTGTGGAACGTCCAGCTCT	1461
DNA PLD2	TCATCACTCCTTCTCCTGTTATGTTCCAAGAGGATCACGACGTGTGGAACGTCCAGCTCT	1953
mRNA PLD1	TTAGATCCATCGACGGTGGAGCTGCTGCTGGGTTCCCTGAGTCGCCTGAAGCTGCTGCTG	1542
DNA PLD1	TTAGATCCATCGACGGTGGAGCTGCTGCTGGGTTCCCTGAGTCGCCTGAAGCTGCTGCTG	2026
mRNA PLD2	TTAGATCTATAGACGGTGGAGCTGCCGCTGGGTTCCCTGATTACCTGAAGTAGCTGCTG	1521
DNA PLD2	TTAGATCTATAGACGGTGGAGCTGCCGCTGGGTTCCCTGATTACCTGAAGTAGCTGCTG	2013
mRNA PLD1	AAGCTGGTCTTGTGAGTGGTAAGGATAACATCATTGATAGAAGCATCCAAGATGCTTACA	1602
DNA PLD1	AAGCTGGTCTTGTGAGTGGTAAGGATAACATCATTGATAGAAGCATCCAAGATGCTTACA	2086
mRNA PLD2	AAGCTGGTTTTGGTAAAGTGGTAAGGACAATGTCATTGACAGGAGTATCCAAGACGCTTACA	1581
DNA PLD2	AAGCTGGTTTTGGTAAAGTGGTAAGGACAATGTCATTGACAGGAGTATCCAAGACGCTTACA	2073
mRNA PLD1	TTCACGCTATCCGTCGCGCTAAAGACTTCATCTACATTGAGAATCAGTACTTCCTTGAA	1662
DNA PLD1	TTCACGCTATCCGTCGCGCTAAAGACTTCATCTACATTGAGAATCAGTACTTCCTTGAA	2146
mRNA PLD2	TTCACGCCATAAGACGTGCTAAAGACTTCATCTATATCGAGAACCAGTACTTCCTTGAA	1641
DNA PLD2	TTCACGCCATAAGACGTGCTAAAGACTTCATCTATATCGAGAACCAGTACTTCCTTGAA	2133

## Exon 3

mRNA PLD1	GCTCTTTTGCTTGGGCAGCTGATGGTATCACTCCTGAGGACATCAACGCTCTGCACTTGA	1722
DNA PLD1	GCTCTTTTGCTTGGGCAGCTGATGGTATCACTCCTGAGGACATCAACGCTCTGCACTTGA	2206
mRNA PLD2	GCTCCTTTGGCTTGGGCTGCTGATGGTATCACTCCTGAAGACATCAATGCCCTGCATCTGA	1701
DNA PLD2	GCTCCTTTGGCTTGGGCTGCTGATGGTATCACTCCTGAAGACATCAATGCCCTGCATCTGA	2193
mRNA PLD1	TCCCAAAGAGCTGTCCTTAAAGATCGTTAGCAAGATTGAGAAGGGAGAGAAGTTCAGGG	1782
DNA PLD1	TCCCAAAGAGCTGTCCTTAAAGATCGTTAGCAAGATTGAGAAGGGAGAGAAGTTCAGGG	2266
mRNA PLD2	TCCCAAAGGAGTTGTCTCTCAAGATCGTTGACAAGATCGAGAAAGGAGAGAAGTTTAGGG	1761
DNA PLD2	TCCCAAAGGAGTTGTCTCTCAAGATCGTTGACAAGATCGAGAAAGGAGAGAAGTTTAGGG	2253
mRNA PLD1	TTTATGTTGTGGTGCCGATGTGGCCGGAAGGTCTCCGGAGAGTGCATCAGTGCAAGCTA	1842
DNA PLD1	TTTATGTTGTGGTGCCGATGTGGCCGGAAGGTCTCCGGAGAGTGCATCAGTGCAAGCTA	2326
mRNA PLD2	TTTATGTTGTGGTTCCGATGTGGCTGAAGGTATCCCGGAGAGTGCATCGGTGCAAGCTA	1821
DNA PLD2	TTTATGTTGTGGTTCCGATGTGGCTGAAGGTATCCCGGAGAGTGCATCGGTGCAAGCTA	2313
mRNA PLD1	TATTGGATTGGCAGAGGAGGACCATGCAGATGATGTACAAGGATATTGTTCAAGCTCTTA	1902
DNA PLD1	TATTGGATTGGCAGAGGAGGACCATGCAGATGATGTACAAGGATATTGTTCAAGCTCTTA	2386
mRNA PLD2	TATTGGATTGGCAGAGGAGGACCTTGGAGATGATGTACAAGGATGTTACTCAGGCTCTCA	1881
DNA PLD2	TATTGGATTGGCAGAGGAGGACCTTGGAGATGATGTACAAGGATGTTACTCAGGCTCTCA	2373
mRNA PLD1	GGGCTCAGGGCTTAGAGGAAGATCCTAGAAACTATCTGACGTTCTTCTGCTTAGGAAACC	1962
DNA PLD1	GGGCTCAGGGCTTAGAGGAAGATCCTAGAAACTATCTGACGTTCTTCTGCTTAGGAAACC	2446
mRNA PLD2	GGGCTCAGGGGTTGGAGGAAGATCCTAGAAACTATCTGACGTTCTTCTGCTTAGGAAACC	1941
DNA PLD2	GGGCTCAGGGGTTGGAGGAAGATCCTAGAAACTATCTGACGTTCTTCTGCTTAGGAAACC	2433
mRNA PLD1	GTGAGGTTAAGAAAGAAGGAGAGTATGAGCCAGCAGAGAGACCAGACGCTGACTCGAGCT	2022
DNA PLD1	GTGAGGTTAAGAAAGAAGGAGAGTATGAGCCAGCAGAGAGACCAGACGCTGACTCGAGCT	2506
mRNA PLD2	GCGAGGTTAAGAAAGAAGGAGAGTATGAGCCTGCGGAGAGACCAGACCCTGACACAGACT	2001
DNA PLD2	GCGAGGTTAAGAAAGAAGGAGAGTATGAGCCTGCGGAGAGACCAGACCCTGACACAGACT	2493
mRNA PLD1	ATATGAAGGCACAAGAAGCAGCTCGCTTCATGATCTACGTCCACACCAAATGATGATCG	2082
DNA PLD1	ATATGAAGGCACAAGAAGCAGCTCGCTTCATGATCTACGTCCACACCAAATGATGATCG	2566
mRNA PLD2	ATATGAGGGCGCAAGAGGCACGTCGCTTCATGATCTACGTCCATAGCAAATGATGATTG	2061
DNA PLD2	ATATGAGGGCGCAAGAGGCACGTCGCTTCATGATCTACGTCCATAGCAAATGATGATTG	2553
	<b>Intron 3</b>	
mRNA PLD1	-----	2082
DNA PLD1	gtaagtttactaattcattaataaaaaaacatatctcctaaatagcaattttttctcttttc	2626
mRNA PLD2	-----	2061
DNA PLD2	gtaagtttacatacaaatcttcaatagacctggcgctttttaaccaattccgaaaaaacca	2613
mRNA PLD1	-----	2082
DNA PLD1	aaaatagcatctattaattaataaaaccactaaattattttgcattataactaaactaa	2686
mRNA PLD2	-----	2061
DNA PLD2	aaatacagatttgaacatagcataaatgctaggtacttttgggtttggtacagcccgaacc	2673
mRNA PLD1	-----	2082
DNA PLD1	ctctagtttaataattcaaaatagaattttattaatcaataaaaaaattaaattattttaca	2746
mRNA PLD2	-----	2061
DNA PLD2	gaatccaaagtaagatccgattatatacctaaattatttaaatctaataaatattttaaca	2733
mRNA PLD1	-----	2082
DNA PLD1	ttctaaaccaattctaattctcatcttctaaacattaaactctaaactttaaccagtaaac	2806
mRNA PLD2	-----	2061
DNA PLD2	tatttcaaggtaatttatatattatgtgggttattttagagaattttgtagtttgcatat	2793
mRNA PLD1	-----	2082
DNA PLD1	tccaaactaactaaaaacagtttaaaaaaatttaaatgctaatttttgggttttctctct	2866
mRNA PLD2	-----	2061
DNA PLD2	tgaattttgttttggtattttcaaatattttttagttaatttagatagtttaacaagttttt	2853
mRNA PLD1	-----	2082
DNA PLD1	attttttttctttgaaaaacttgatttagtgctatccaatggtttttttaaaaaaaa	2926
mRNA PLD2	-----	2061
DNA PLD2	aatcatattttggtaagtttatatattttgaaatatattttctgtagtttcattagttt	2913

		<b>Intron 3</b>	
mRNA	PLD1	-----	2082
DNA	PLD1	<b>ttggataaatgcatgtgtgatttacttgacgtctcac</b> -----	2963
mRNA	PLD2	-----	2061
DNA	PLD2	<b>tttttctaggtttttggatgattttaaacattggttataaacttgatccgaactaaaccag</b>	2973
mRNA	PLD1	-----	2082
DNA	PLD1	-----	2963
mRNA	PLD2	-----	2061
DNA	PLD2	<b>gaaggaatcgaagtgaacccgatctaaaattagtaaaaccccaaatagaacttatgcatg</b>	3033
mRNA	PLD1	-----	2082
DNA	PLD1	-----	2963
mRNA	PLD2	-----	2061
DNA	PLD2	<b>gtgccgaaaattcgaacaaccaaactgaacacccaagcctactcttcggttataaaac</b>	3093
mRNA	PLD1	-----	2082
DNA	PLD1	-----	2969
mRNA	PLD2	-----	2061
DNA	PLD2	<b>ctagagagtttttgcataatataatgctgtgtgtgactcacttgacctatttga</b>	3153
mRNA	PLD1	-TTGACGATGAATATATCATCATTTGGATCTGCTAACATCAACCAGAGGTCGATGGATGGT	2141
DNA	PLD1	<b>g</b> TTGACGATGAATATATCATCATTTGGATCTGCTAACATCAACCAGAGGTCGATGGATGGT	3029
mRNA	PLD2	-TTGACGATGAGTACATTATCGTCGGGTCTGCTAACATCAACCAGAGGTC AATGGATGGT	2120
DNA	PLD2	<b>g</b> TTGACGATGAGTACATTATCGTCGGGTCTGCTAACATCAACCAGAGGTC AATGGATGGT	3213
		<b>Exon 4</b>	
mRNA	PLD1	GCGAGGGACTCTGAGATTGCAATGGGAGGCTACCAACCACATCACTTGTACATAGACAA	2201
DNA	PLD1	GCGAGGGACTCTGAGATTGCAATGGGAGGCTACCAACCACATCACTTGTACATAGACAA	3089
mRNA	PLD2	GCAAGGGACTCTGAGATAGCAATGGGAGGGTATCAACCACATCACTTGTACATAGACAA	2180
DNA	PLD2	GCAAGGGACTCTGAGATAGCAATGGGAGGGTATCAACCACATCACTTGTACATAGACAA	3273
mRNA	PLD1	CCAGCTCGTGGACAGATCCATGGGTTCCGCATGTCACTCTGGTACGAACACCTAGGAATG	2261
DNA	PLD1	CCAGCTCGTGGACAGATCCATGGGTTCCGCATGTCACTCTGGTACGAACACCTAGGAATG	3149
mRNA	PLD2	CCAGCTCGTGGCCAGGTCCATGGGTTCCGTATGTCACTCTGGTACGAACACTTGGGAATG	2240
DNA	PLD2	CCAGCTCGTGGCCAGGTCCATGGGTTCCGTATGTCACTCTGGTACGAACACTTGGGAATG	3333
mRNA	PLD1	CTCGATGAGACCTTCTCGATCCATCAAGCGTGGAAATGCATTGAGAAAAGTTAACCGCATT	2321
DNA	PLD1	CTCGATGAGACCTTCTCGATCCATCAAGCGTGGAAATGCATTGAGAAAAGTTAACCGCATT	3209
mRNA	PLD2	CTCGACGAGACGTTCTTAGATCCCTCGAGCTTGGAAATGCATTGAGAAAAGTTAACCGCATT	2300
DNA	PLD2	CTCGACGAGACGTTCTTAGATCCCTCGAGCTTGGAAATGCATTGAGAAAAGTTAACCGCATT	3393
mRNA	PLD1	TCTGACAAGTATTGGGACTTATACTCGAGCGAGTCACTTGAACATGACCTTCCCGGTCAC	2381
DNA	PLD1	TCTGACAAGTATTGGGACTTATACTCGAGCGAGTCACTTGAACATGACCTTCCCGGTCAC	3269
mRNA	PLD2	GCTGATAAGTACTGGGACTTTTACTCAAGCGAGTCACTGGAACATGACCTTCTGGTCAC	2360
DNA	PLD2	GCTGATAAGTACTGGGACTTTTACTCAAGCGAGTCACTGGAACATGACCTTCTGGTCAC	3453
mRNA	PLD1	TTGCTACGCTACCCTGTTGATGTAGACGGTGAAGGTGACGTCCTGAGTTTCCCGGATTT	2441
DNA	PLD1	TTGCTACGCTACCCTGTTGATGTAGACGGTGAAGGTGACGTCCTGAGTTTCCCGGATTT	3329
mRNA	PLD2	TTGCTGCGCTACCCGATTAGTGTGGACAATGAAGGTAATATCACTGAGCTTCCAGGATTT	2420
DNA	PLD2	TTGCTGCGCTACCCGATTAGTGTGGACAATGAAGGTAATATCACTGAGCTTCCAGGATTT	3513
mRNA	PLD1	GAGTTCTTCCCTGACACAAAGGCTCGTATCCTTGAACCAAATCTGACTACTTGCCTCCA	2501
DNA	PLD1	GAGTTCTTCCCTGACACAAAGGCTCGTATCCTTGAACCAAATCTGACTACTTGCCTCCA	3389
mRNA	PLD2	GAGTTCTTCCAGACTCAAAGGCCCGTATCCTCGGAAACAAAGTAGACTACCTGCCTCCA	2480
DNA	PLD2	GAGTTCTTCCAGACTCAAAGGCCCGTATCCTCGGAAACAAAGTAGACTACCTGCCTCCA	3573
		<b>Stop</b>	
mRNA	PLD1	ATCCTTACAACCTAGgtttcacttgggtatgccttaacaatgaacttctctgtctttgaa	2561
DNA	PLD1	ATCCTTACAACCTAGgtttcacttgggtatgccttaacaatgaacttctctgtctttgaa	3449
mRNA	PLD2	ATCCTTACAACCTAAgctcactgtctctacattgctgctgcagtagctttgaaataattg	2540
DNA	PLD2	ATCCTTACAACCTAAgctcactgtctctacattgctgctgc-----	3614
mRNA	PLD1	taaactgagtgctgtgtctacttttagaactaataagttggtcgttggtgtggtatggt	2621
DNA	PLD1	-----	3449
mRNA	PLD2	agtgtctctctctctactactcttttagatcctaataagttggtgtgatgataagcac	2600
DNA	PLD2	-----	3614

## Exon 4

mRNA	PLD1	gcattttcaccctttggttttaattcgtgcaatgacatggtgagaatgtagctttgtg	2681
DNA	PLD1	-----	3449
mRNA	PLD2	tttgtactccttaatttggtttatggttcgtacaatgacatggtgatgatgtagcttt	2660
DNA	PLD2	-----	3614
mRNA	PLD1	atctttatttatttaccttcttttggttggtatgcatcttgaacttatgaacctata	2741
DNA	PLD1	-----	3449
mRNA	PLD2	gtgatctttatctaccttctttatggttcgaaaaaaaaaaaaa-----	2702
DNA	PLD2	-----	3614
mRNA	PLD1	tttgatattttgttttttattaattgaacatcgtgccaaaaaaaaaaaaaaaa	2793
DNA	PLD1	-----	3449
mRNA	PLD2	-----	2702
DNA	PLD2	-----	3614

## Primärstruktur von PLD1 und PLD2 aus Weißkohl

blau: identische Aminosäuren

gelb: Sequenzunterschiede

PLD1	MAQHLLHGTLHATIYEVDLHTGGLRS-GFFGKILANVEETIGVGKGETQLYATI	54
PLD2	MAQHLLHGTLHATIYEVDALHTGGLRSAGFLGKIISNVEETIGFGKGETQLYATI	55
PLD1	DLQARAVGRTRKIKDEAKNPKWYESFHIYCAHLASDIIFTVKDDNPIGATLIGRA	109
PLD2	DLQKARVGRTRKITDEPKNPKWYESFHIYCAHMASDIIFTVKDDNPIGATLIGRA	110
PLD1	YVPVDQVIHGEEVDQWEILDNDRNPIHGGSKIHKVLYFYFVEADRNNWQGIKSA	164
PLD2	YVPVDEVINGEEVEKWEILDDDRNPIHGESKIHKVLYFYFAVEADRNNWGMVKSAA	165
PLD1	KFPGVPYTFFSQRQGCQVSLYQDAHVPDNFVPRIPLAGGKNYEPQRCWEDIFDAI	219
PLD2	KFPGVPYTFFSQRQGCQVSLYQGAHVDPDNFVPKIPLAGGKNYEPHRCWEDIFDAI	220
PLD1	SNAQHMIYITGWSVYTEIALVDRSRRPKPGGDVTVGELLKKKASEGVRVLLLVD	274
PLD2	TNAKHLIYITGWSVYTEITLVRDSRRPKPGGDMTLGELLKKKATEGVRVLLLVD	275
PLD1	DRTSVDVLKKGDLMAHDEETENFFRGS DVHCILCPRNPDDGGSIVQNLQVSAMF	329
PLD2	DRTSVDVLKKGDLMAHDEEDTENYFNGSEVHCVLCPNPDDGGSIVQNLQVSAMF	300
PLD1	THHQKIVVVDSEMPSR-GGSQMRRIVSFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHH	383
PLD2	THHQKIVVVDSEVPSQGGSEMRRIMSFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHH	385
PLD1	DDFHQPNTGAAITKGGPREPWHDIIHSRLEGPIAWDVLYNFEQRWSKQGGKDILV	438
PLD2	DDFHQPNTGASITKGGPREPWQDIHSRLEGPIAWDVLYNFEQRWSKQGGKDILV	440
PLD1	KLRELSDIIITPSPVMFQEDHDVWNVQLFRSIDGGAAAGFPESPEAAAEAGLVSG	493
PLD2	KLRELSDIIITPSPVMFQEDHDVWNVQLFRSIDGGAAAGFPD SPEVAAAEAGLVSG	495
PLD1	KDNIIIDRSIQDAYIHAIIRAKDFIYIENQYFLGSSFAWAADGITPEDINALHLIP	548
PLD2	KDNVIDRSIQDAYIHAIIRAKDFIYIENQYFLGSSFAWAADGITPEDINALHLIP	550
PLD1	KELSLKIVSKIEKGEKFRVYVVVPMWPEGLPESASVQAILDWQRRTMOMMYKDIV	603
PLD2	KELSLKIVDKIEKGEKFRVYVVVPMWPEGIPEASVQAILDWQRRTLEMMYKDIV	605
PLD1	QALRAQGLEEDPRNYLTFCLGNREVKKEGEYEPAPERDADSSYMKAQEARRFMI	658
PLD2	QALRAQGLEEDPRNYLTFCLGNREVKKEGEYEPAPERDPTDYMRAQEARRFMI	660
PLD1	YVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMDGARDSEIAMGGYQPHHLSHRQPARGQIH	713
PLD2	YVHSKMMIVDDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGGYQPHHLSHRQPARGQVH	715
PLD1	GFRMSLWYEHGLMDETFLDPSSVEECIEKVNRI SDKYWDLYSSESLEHDLPGHLL	768
PLD2	GFRMSLWYEHGLMDETFLDPSSLEECIEKVNRIADKYWDFYSSESLEHDLPGHLL	770
PLD1	RYPVDVDGEGDVTEFPGFEFFPDTKARILGTKSDYLPPILTT	810
PLD2	RYPISVDNEGNITELPGFEFFPDSKARILGNKVDYLPPILTT	812

## Aminosäuresequenzen bisher bekannter pflanzlicher PLDs vom **a**-Typ

grün:  $\beta$ -Faltblattstrukturen in der C2-Domäne (übernommen aus Pappan et al., 1997)

gelb: saure  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Aminosäuren

blau:  $\text{PIP}_2$ -bindendes Motiv, rot: HKD-Motive

		$\beta 1$		$\beta 2$		$\beta 3$			
Weißkohl-PLD1	MAQHLLHG	GTLHATIYEV	DDLHTGGLRS	----	GFFGKILANV	ETIGVGKGET	TQLYATIDL 56		
Weißkohl-PLD2	MAQHLLHG	GTLHATIYEV	DALHTGGLRSA	----	GFLGKIISNVE	ETIGFGKGET	TQLYATIDL 57		
Arabidopsis	MAQHLLHG	GTLHATIYEV	DALHG GGVVRQ	----	GFLGKILANV	ETIGVGKGET	TQLYATIDL 56		
Crat.-PLD1	MAQILLHG	GTLHVTIYEV	DQLHSGGGGN	----	FFTCLKANIE	ETVGFVGKGT	PKIYASIDL 55		
Crat.-PLD2	MARILLHG	GTLHVTIYEV	DRLHAGGGGN	----	IFSKLRANIE	EKVGFGKGT	PKIYASIDL 55		
Mais	MAQILLHG	GTLHATIFEAESL	SNPHRATGGAPK	FIRKLV	EGIEDTVGVGKGA	TKIYATVDL	60		
Pimpinella	MAKTLHG	GTLHVTIFEVD	HDKAGSVVVFSE	SLRRTLKPLV	----	LAKGTPKIYAS	IDL 55		
Reis	MAQMLLHG	GTLHATIFEASL	SNPHRASGSAPK	FIRKFVE	EGIEDTVGVGKGA	TKVYSTIDL	60		
Rizinus	MAQISLHG	GTLHVTIYEV	DKLHSGGGPH	----	FFRKLVENIE	ETVGFVGKGV	SKLYATIDL 55		
Tabak	MAQILLHG	GTLHVTIYEV	DNLQKEGGGH	----	FFSKIKEHVE	ETIGFGKGT	PAIYATVDL 55		
Tomate	MAQIQLHG	GTLHVTIFEVD	NLQGE E EGG	----	HFFSKIKQHF	EETVIGIGKGT	PKLYATIDL 56		
Vigna	MAQILLHG	GTLHATIYEV	DELHG GGGG	----	NFFSKLKQNI	EETVIGIGKV	TKLYATIDL 55		
		$\text{PIP}_2 \beta 4$		$\beta 5$		$\beta 6$			
Weißkohl-PLD1	Q	ARVGRTRK	IKDEAKNPKWY	ESFHIYCAHLAS	DIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYVPVDQV 116		
Weißkohl-PLD2	Q	ARVGRTRK	ITDEPKNPKWY	ESFHIYCAHMAS	DIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYVPVDEV 117		
Arabidopsis	Q	ARVGRTRK	IKNEPKNPKWY	ESFHIYCAHLAS	DIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYIPVDQV 116		
Crat.-PLD1	E	KARVGRTRM	I EHEPNNPRWY	ESFHIYCAHMAS	NVIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYIPVQEI 115		
Crat.-PLD2	E	KARVGRTRM	I EHEPTNPRWY	ESFHIYCAHLAS	NVIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYIPVRDV 115		
Mais	E	KARVGRTRM	ISNEPVNPRWY	ESFHIYCAHMA	ADVIFTVK	IDNSIGAS	LIGRAYLAVQDL 120		
Pimpinella	D	KARVGRTRM	I ENEPNNPKWNE	SFHIYCGHPS	TNVIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYLPVHEL 115		
Reis	E	KARVGRTRM	ITNEPINPRWY	ESFHIYCAHMAS	NVIIFTVK	IDNP	IGATNIGRAYLPVQEL 120		
Rizinus	E	KARVGRTR	ILENEQSNPRWY	ESFHVYCAHQ	ASNVIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYVPVEEL 115		
Tabak	E	KARVGRTRK	IKNEPNNPRWY	ESFHIYCAHMAS	NVIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYVPVEEL 115		
Tomate	E	KARVGRTR	I I ENEPKNPRWY	ESFHIYCAHMAS	NVIIFTIK	DDNPF	GASLIGRAYVPVEEL 116		
Vigna	E	KARVGRTR	I I ENETTNPKNWNE	SFHIYCGHLAS	NVIIFTVK	DDNP	IGATLIGRAYVPVSEV 115		
		$\beta 8$							
Weißkohl-PLD1	I	HGEEVDQWVE	ILDNDRNP	IHGGSKIHV	KLQYFV	EADR	NWNQGIKSAKFP	GPVPTFFSQ 176	
Weißkohl-PLD2	I	NGEEVEKQWVE	ILDDDRNP	IHGESKIHV	KLQYFA	VEADR	NWNMGVKS	SAKFP	GPVPTFFSQ 177
Arabidopsis	I	NGEEVDQWVE	ILDNDRNP	IQGGSKIHV	KLQYFV	EEDR	NWNMGIKSAKFP	GPVPTFFSQ 176	
Crat.-PLD1	L	DGEEIDRWVE	ILDNDKNP	ISGESKIHV	KLQYFD	VTRDL	NWNRGIKSVKYP	GPVPTFFAQ 175	
Crat.-PLD2	L	DGEEIDRWV	ELDNNKNP	IRGESKIHV	KLQYFD	VARDL	NWNRGIKSIKYP	GPVPTFFAQ 175	
Mais	L	GGEIDKWVE	ILSDENREP	VD-SKIHV	KLQYFD	VGKDR	NWARGVR	STKYP	GPVPTFFSQ 179
Pimpinella	L	LEGEEVDKWVE	ILDEDKNP	ISEGSKIHV	KLQYFD	ITQDR	NWAHGIR	SSKFP	GPVPTFFSQ 175
Reis	L	NGEEIDRWV	ELCDNNRES	VG-SKIHV	KLQYFD	VSKDR	NWARGVR	STKYP	GPVPTFFSQ 179
Rizinus	L	DGEEIDRWVE	ILDEDKNP	VHSGSKIHV	KLQYFE	VTKDR	NWQGGIR	SSKYP	GPVPTFFSQ 175
Tabak	L	LEGEEIDKWVE	ILDREMNP	IAEGSKIHV	KLQYFD	VSRDP	NWGER	IRSSKYP	GPVPTFFAQ 175
Tomate	L	LEGEEIDKWVE	ILMDKEMNP	TAEGSKIHV	KLQYFD	VSRDP	NWGRGIR	SSRYP	GPVPTFFAQ 176
Vigna	L	DGHEIDKWVE	ILDTEKNP	IEGGSKIHV	RLQYFD	VLDKDR	NWARGIR	SPKYP	GPVPTFFSQ 175
Weißkohl-PLD1	R	QGCKVSLYQ	DAHVPDNFV	PRIPLAGGK	NYEPQRC	WEDIFDAI	SNAQHMIY	ITGWSVYTE 236	
Weißkohl-PLD2	R	QGCKVSLYQ	GAVPDNFP	PKIPLAGGK	NYEPHRC	WEDIFDAI	TNAKHLIY	ITGWSVYTE 237	
Arabidopsis	R	QGCKVSLYQ	DAHVPDNFV	PRIPLAGGK	NYEPQRC	WEDIFDAI	SNAKHLIY	ITGWSVYAE 236	
Crat.-PLD1	R	TGCKVSLYQ	DAHVPDSF	IPDIPLSGS	NNYDPHRC	WEDV	DAISNAKHLIY	ITGWSVYTE 235	
Crat.-PLD2	R	KGCKVTLYQ	DAHVPDNFI	PEIPLSGS	NSYSPHRC	WEDV	DAISNAKHLIY	ITGWSVYTE 235	
Mais	R	QGCKVTLYQ	DAHVPDNFP	RIQLADGK	NYEPHRC	WEDIFDAI	SKAQHLIY	ITGWSVYTE 239	
Pimpinella	R	PGCRISLYQ	DAHVPDNFP	PKIPLSGGK	FYEPHRC	WEDV	DAITNAKHFIY	ITGWSVYTE 235	
Reis	R	QGCKVTLYQ	DAHVPDNFI	PKIPLADGK	NYEPHRC	WEDIFDAI	SNAQHLYIY	ITGWSVYTE 239	
Rizinus	R	QGCKVSLYQ	DAHVPDP	QIPLAGG	NYEPHRC	WEDV	DAITNAKHLIY	ITGWSVYTE 235	
Tabak	R	TGCRVSLYQ	DAHVPDNFI	PKIPLSGGK	YYPHRC	WEDIFDAI	INAKHLIY	ITGWSVYTE 235	
Tomate	R	PGSRVSLYQ	DAHVPDNFI	PKIPLSGGK	YYPHRC	WEDIFDAI	TNAKHLIY	ITGWSVYTE 236	
Vigna	R	QGCKVFLYQ	DAHVPDNFP	PKIPLAGGK	NYEAHRC	WEDIFDAI	TNAKHLIY	ITGWSVYTE 235	

Weißkohl-PLD1	IALVRDSRRPKPGGDVTVGELLKKKASEGVRVLLLVWDDRTSVDVLKKDGLMATHDEETE	296
Weißkohl-PLD2	ITLVRDSRRPKPGGDMTLGELLKKKATEGVRVLLLVWDDRTSVDVLKKDGLMATHDEDTE	297
Arabidopsis	IALVRDSRRPKPGGDVTVGELLKKKASEGVRVLLLVWDDRTSVDVLKKDGLMATHDEETE	296
Crat.-PLD1	ITLIRDSRREKPGGDITLGELLKKKASEGVNMLMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETE	295
Crat.-PLD2	IPLIRDSRREKPGGEITLGELLKKKANEGVNMLMLVWDDRTSVGLLKKRDGLMATHDEETQ	295
Mais	ITLVRDTNRPKPGGDVTVGELLKKKASEGVRVLMMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETA	299
Pimpinella	FALIRDTRRPKPGGDIMLGELLKKKKADEGVRVLMMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDQETE	295
Reis	ITLVRDSNRPKPGGDVTVGELLKKKASEGVRVLMMLVWDDRTSVGLLKKRDGLMATHDEETE	299
Rizinus	ISLIRDSRRPKPGGDITLGELLKKKASEGVRVLMMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETE	295
Tabak	ITLVRDSRRQKPGGDITLGELLKKKASEGVKVLMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDQETE	295
Tomate	IALVRDSRRQKPGGDIMLGELLKKKASEGVKVLMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDQETE	296
Vigna	ISLIRDSRRPKAGGDQITGELLKKKASEGVRVLMMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETE	295

## 1. HKD-Motiv

Weißkohl-PLD1	NFFRGSVDVHCILCPRNPDDGGSIVQNLQVSAMFTHH <b>QK</b> IVVVDSEMP-SR-GGSQMRRIV	354
Weißkohl-PLD2	NYFNGSEVHCVLCPRNPDDGGSIVQNLQVSAMFTHH <b>QK</b> IVVVDSEVP-SqgGGSEMRRIM	356
Arabidopsis	NFFRGSVDVHCILCPRNPDDGGSIVQSLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDSEMP-SR-GGSEMRRIM	354
Crat.-PLD1	HYFQGTDVHCVLCPRNPDDGGSFVQDLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDSDLP-S--GGSDKRRIV	352
Crat.-PLD2	NYFQGTDVHCILCPRNPDDGGSFVQDLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDSDLP-S--GGSDKRRIV	352
Mais	NYFHGTDVNCVLCPRNPDDSGSFVQDLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDHEMP-N--QGSQRRIV	356
Pimpinella	EYFRDSNVHCVLCPRNPDDGGGI IQGLTISTIFTHH <b>QK</b> IVVVDSEMPtS---GSENRVIV	352
Reis	NYFHGSDVNCVLCPRNPDDSGSIVQDLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDHELP-N--QGSQRRIV	356
Rizinus	FFFQNTDVHCVLCPRNPDDGGSFVQDLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDSEMP-N--GDSQRRIV	352
Tabak	QFFQGTDVNCVLCPRNPDDGGSIVQDLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDSELP-S--GESEKRRIL	352
Tomate	QYFQGTDVNCVLCPRNPDDGGSFVQDIQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDSELP-S--GELEKRRIL	353
Vigna	QFFRDTDVHCVLCPRNPDDGGSIVQDLQISTMFTHH <b>QK</b> IVVVDSELP-S--GGSDKRRIV	353

Weißkohl-PLD1	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHHDDFHQPNFTGAAITKGGPREPWHDIHSRLEG	414
Weißkohl-PLD2	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHHDDFHQPNFTGASITKGGPREPQDIHSRLEG	416
Arabidopsis	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHHDDFHQPNFTGAAITKGGPREPWHDIHSRLEG	414
Crat.-PLD1	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFTGAAITKGGPREPWHDIHSRLEG	412
Crat.-PLD2	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFTGAVIAKGGPREPWHDIHSRLEG	412
Mais	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTVHHDDFHQPNFEGGSIKGGPREPWHDIHSRLEG	416
Pimpinella	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFEGAAITKGGPREPWHDIHSRLEG	412
Reis	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTSTHHDDFHQPNFATASIKGGPREPWHDIHSRLEG	416
Rizinus	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTSAHDDFHQPNFAGASIEKGGPREPWHDIHSRLEG	412
Tabak	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFPDGAITKGGPREPWHDIHSRLEG	412
Tomate	SFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFADGSITKGGPREPWHDIHSRLEG	413
Vigna	SFVGGIDLCDGRYDTAFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFPGAAITKGGPREPWHDIHSRLEG	413

Weißkohl-PLD1	PIAWDVLNFQERWSKQGGKIDILVKLRELSDIITPSPVMFQEDHDVWVWVQLFRSIDGGA	474
Weißkohl-PLD2	PIAWDVLNFQERWSKQGGKIDILVKLRELSDIITPSPVMFQEDHDVWVWVQLFRSIDGGA	476
Arabidopsis	PIAWDVNFQERWSKQGGKIDILVKLRDLSDIITPSPVMFQEDHDVWVWVQLFRSIDGGA	474
Crat.-PLD1	PIAWDVLNFQERWKKQGGKIDVLLNREIDD-IIPPTSVTYHDDPETWVWVQLFRSIDGGA	471
Crat.-PLD2	PIAWDVLNFQERWKKQAGRDLLINLREIED-IIPPTPVTYDDQETWVWVQLFRSIDGGA	471
Mais	PIAWDVLNFQERWRKQGGKIDVLLVLRDLDPDIIPSPVMFPEDRETWVWVQLFRSIDGGA	476
Pimpinella	PVAWDVLNFQERWRKQGGKIDVLLNRELDQVVIIPSPVTFPDDDETWVWVQLFRSIDGGA	472
Reis	PIAWDVLNFQERWRKQGGKIDVLLQLRDLSDTIIPSPVMFPEDRETWVWVQLFRSIDGGA	476
Rizinus	PIAWDVLNFQERWRKQGGKIDVLLQLRELEDVIIPSPVMFPDDFEAWVWVQLFRSIDGGA	472
Tabak	PIAWDVLNFQERWRKQGGKIDVLVNFRLEDVIIPSPVMHLDDESETWVWVQLFRSIDGGA	472
Tomate	PIAWDVLNFQERWRKQGGKIDVLVNFRLEDVIIPSPVMFPDDHETWVWVQLFRSIDGGA	473
Vigna	PIAWDVLNFQERWRKQGGKIDVLLAPLRELEDVIIPSPVTFPDDHETWVWVQLFRSIDGGA	473

Weißkohl-PLD1	AAGFPESPEAAAAEAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKDFIYIENQYFLGSSFAWAAD	534
Weißkohl-PLD2	AAGFPDSPEVAAEAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKDFIYIENQYFLGSSFAWAAD	536
Arabidopsis	AAGFPESPEAAAAEAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKDFIYIENQYFLGSSFAWAAD	534
Crat.-PLD1	AFGFPDTPPEAAKAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIQAIRRAKNFIYIENQYFLGACFGWDSN	531
Crat.-PLD2	AFGFPETPEEAAKAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIQAIRRAKNFIYIENQYFLGGCFGWDSN	531
Mais	AFGFPETPEEAAAGLVSGKDQIIDRSIQDAYVNAIRRAKNFIYIENQYFLGSSYGWKPE	536
Pimpinella	AFGFPQTPPEAAKAGLVSGKNIIDRSIQDAYIHAIRGPKFIYIENQYFLGSSYFVWNS	532
Reis	AFGFPDTPPEAAKAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKNFIYIENQYFLGSSYAWKPE	536
Rizinus	AFGFPETPEDAPEAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKNFIYIENQYFLGSSYFVWNS	532
Tabak	AFGFPETPEDAAKAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKNFIYIENQYFLGSSYDQWSD	532
Tomate	AFGFPDTPEDAAKAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKNFIYIENQYFLGSCADWQCD	533
Vigna	AFGFPDTPEDAAKAGLVSGKDNIIDRSIQDAYIHAIRRAKNFIYIENQYFLGSSYFVWNS	533

Weißkohl-PLD1	GITPEDINALHLIPKELSLKIVSKIEKGEKFRVYVVVPMWPEGLPESASVQAILDWQRRT	594
Weißkohl-PLD2	GITPEDINALHLIPKELSLKIVDKIEKGEKFRVYVVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRT	596
Arabidopsis	GITPEDINALHLIPKELSLKIVSKIEKGEKFRVYVVVPMWPEGLPESGSVQAILDWQRRT	594
Crat.-PLD1	DIKVEDV GALHLIPKELSMKIVSKIEAGERFTVYIVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRT	591
Crat.-PLD2	DIKVEDV GALHLIPKELSLKIVSKIEAGERFAVYVVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRT	591
Mais	GIKPEEIGALHLIPKELSLKIVSKIEAGERFTVYVVVPMWPEGVPEASVQAILDWQRRT	596
Pimpinella	DIKDEDIGALHLIPKELSLKIVSKIEAGKRFTVYVVVPMWPEGIPESGSVQAILDWQRRT	592
Reis	GIKPEDIGALHLIPKELALKIVSKIEAGERFTVYVVVPMWPEGVPEASVQAILDWQRRT	596
Rizinus	GIKPEDINALHLIPKELSLKILSKIAAGERFTVYIVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRT	592
Tabak	DIKVEDIGALHVIPKELALKIVSKIEAGERFTVYVVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRT	592
Tomate	DVKVEDIGALHLIPKELALKIVSKIEAGERFTVYVVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRT	593
Vigna	DIKREEIGALHLIPKELSLKIVSKIEAGERFAVYVVVPMWPEGIPESSSVQAILDWQRRT	593

Weißkohl-PLD1	MQMMYKDIVQALRAQGLEEDPRNYLTFCCGNREVKKKEGEYEP AERP DADSSYMKAQEAR	654
Weißkohl-PLD2	LEMMYKDV TQALRAQGLEEDPRNYLTFCCGNREVKKKEGEYEP AERP DDPD TDMRAQEAR	656
Arabidopsis	MEMMYKDIVQALRAQGLEEDPRNYLTFCCGNREVKKDGEYEP AERP DDPD TDMRAQEAR	654
Crat.-PLD1	MDMMYKDVVQALQAKGIEEDPRNYLTFCCGNREVKKSGEYEP SEQPEPDSY LKAQEAR	651
Crat.-PLD2	MDMMYKDVVQALRAKGI EEDPRNYLTFCCGNREVKKSGEYEP TEQPEPDSY LRAQQAR	651
Mais	MEMMYTDIAQALEANGIEANPKDY LTFCCGNREVKKGEYEP EEPHPEPDTDY IRAQEAR	656
Pimpinella	MEMMYKDI I QALQANGIEEDPRNYLTFCCGNREVKKR DGEYEP SEKPPDPTDY SRAQESR	652
Reis	MEMMYTDITEALQAKGIEANPKDY LTFCCGNREVKKQAGEYQPEEQPEADTYSRAQEAR	656
Rizinus	MEMMYKDIVQALKANGIEEDPRNYLTFCCGNREVKKSGEYEP AERP DDPD TDMRAQEAR	652
Tabak	MEMMYKHIVQALNAKGI EEDPRNYLTFCCGNREVKKSGAYEP SEPEPDSY IRAQEAR	652
Tomate	MEMMYKCI VQAMNAKGI EEDPRNYLTFCCGNREVKKSGEYEP SEPEPDSY NMR AQEAR	653
Vigna	IEMMYKDVVQALRAKGSDEEDPRNYLTFCCGNREVKKSGEYEP AERP DDPD TDMRAQEAR	653

## 2. HKD-Motiv

Weißkohl-PLD1	RFMIYVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGGYQPHHLSHRQPARGQIHG	714
Weißkohl-PLD2	RFMIYVHSKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGGYQPHHLSHRQPARGQVHG	716
Arabidopsis	RFMIYVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGGYQPHHLSHRQPARGQIHG	714
Crat.-PLD1	RFMIYVHAKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGAYQPYHLNTRNRARGQIHG	711
Crat.-PLD2	RFMIYVHAKLMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGAYQPYHLNTRNRARGQIHG	711
Mais	RFMIYVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGAYQPYHLATRPARGQIHG	716
Pimpinella	RFMIYVHAKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGAYQPHHLSHRQPARGQIHG	712
Reis	RFMIYVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGGYQPYHLATRPARGQIHG	716
Rizinus	RFMIYVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGAYQPHHLSHRQPARGQIHG	712
Tabak	RFMIYVHSKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGAYQPHHLSHRQPARGQIHG	712
Tomate	RFMIYVHSKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGAYQPYHLATSKPARGQVHG	713
Vigna	RFMIYVHTKMMIVDDEYIIIGSANINQRSMGDGARDSEIAMGGYQPYHLANTQPARGQVYG	713

Weißkohl-PLD1	FRMSLWYEH LGMLDETFLDPSSVEECIEKVNRIADKYWDLYSSESL EHDLP GHLLRYPVDV	774
Weißkohl-PLD2	FRMSLWYEH LGMLDETFLDPSSLEECIEKVNRIADKYWDFYSSESL EHDLP GHLLRYPISV	776
Arabidopsis	FRMSLWYEH LGMLDETFLDPSSLEECIEKVNRIADKYWDFYSSESL EHDLP GHLLRYPIGV	774
Crat.-PLD1	FRMALWYEH LGMLDETFLDPSEECV RKNVHVADKYWDLYASEELEKDLPGHLLRYPIGI	771
Crat.-PLD2	FRMALWYEH LGMLDEAFLEPENECCV RKNVNIADRYWELYASEELENDLP GHLLRYPVEI	771
Mais	FRMSLWYEH LGMLDDEVFQRPESVECVQK VNEVAEKYWDLYSDDLEQDLPGHLLSYPIGV	776
Pimpinella	FRMSLWYEH LGMLDDTLALPESVDCVQK VNTVADKYWDLYSSETLENDLP GHLLRYP IAV	772
Reis	FRMALWYEH LGMLDDVFQRPESLEECVQK VNR IAEKYWDMYSDDLQDLPGHLLSYPIGV	776
Rizinus	FRMSLWYEH LGMLDESFLNPESEECV RKNVQMAEKYWDLYSSETLEHDLP GHLLRYP IGV	772
Tabak	FRMALWYEH LGMLDETFLHPSEECV SKVNR MADKYWDLYSSESLERDLPGHLLRYP IGV	772
Tomate	FRMALWYEH LGMLDETFLHPSEECV RKNVNIADKYWDLYSSESLERDLPGHLLRYP IGV	773
Vigna	FRMSLWYEH LGMLHDTFQRPESSEECINKVNIADKYWDLYSSESLERDLPGHLLRYP IGV	773

Weißkohl-PLD1	DGEDVTELP GF EFPDTPDKARILG TKS DYLP I LTT	810
Weißkohl-PLD2	DNEGNITELP GF EFPDTPDKARILGNKV DYLP I LTT	812
Arabidopsis	ASEGDITELP GF EFPDTPDKARILG TKS DYLP I LTT	810
Crat.-PLD1	SSDGEVTELP GF EFPDTPDKARVLG TKS DYLP I LTT	807
Crat.-PLD2	AGDGGVTELP GA EFPDTPDKARVLG AKS DYLP I LTT	807
Mais	TADGSVTELP GMENFPDTRARVLGNKSDYLP I LTT	812
Pimpinella	ASEGNVTELP GF EFPDTPDKARVLG AKS DYLP I LTT	808
Reis	ASDGVVTELP GM EFPDTRARVLG AKS DYMP I LTT	812
Rizinus	ASEGDVTELP GF EFPDTPDKARVLG AKS DYLP I LTT	808
Tabak	ASEGDVTELP GA EFPDTPDKARVLG TKS DYLP I LTT	808
Tomate	ASEGDITELP GF EFPDTPDKARVLG TKS DYLP I LTT	809
Vigna	ASEGEVTELP GF EFPDTPDKARILG AKADYLP I LTT	809

## Danksagung

*Die vorliegende Arbeit wurde vom 1. Oktober 1997 bis 28. Februar 2001 am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe Technische Enzymologie bei Frau Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann angefertigt.*

*Frau Prof. Renate Ulbrich-Hofmann möchte ich ganz herzlich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, ihr großes Interesse am Fortgang der Arbeiten und die vielen hilfreichen Diskussionen danken. Auch wenn sie mir nicht immer bei den besonders hartnäckigen molekularbiologischen Problemen helfen konnte, so war sie dennoch sehr verständnisvoll, geduldig und aufmunternd.*

*Frau Dr. Johanna Mansfeld danke ich für die Einführung in die molekularbiologischen Methoden, ihre unermüdliche Unterstützung während der experimentellen Durststrecken sowie die guten Tips zur Erstellung dieser Arbeit.*

*Danken möchte ich auch Frau Dr. Regina Schöps für die Bereitstellung des PpNP-Substrates und die wertvollen Informationen zur PLD aus Weißkohl.*

*Herr Dr. Rücknagel half mir bei der N-terminalen Sequenzierung der Proteine. Herr Dr. Ulrich Brinkmann stellte unserem Institut das Plasmid pUBS520 zur Verfügung. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Verger lieferte den Antikörper gegen PLD aus Sojabohnen.*

*Mein Dank gilt ebenso der gesamten Arbeitsgruppe für die vielen anregenden Diskussionen und dem angenehmen Arbeitsklima.*

*Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meinen Mann Jörg, meine Eltern und meine Schwester, die mich in allen Lebenslagen tatkräftig unterstützten und mir immer hilfsbereit zur Seite standen.*

## Lebenslauf

Name: Ines Schöffner, geb. Pannenberg  
Geburtsdatum: 20. Januar 1974  
Geburtsort: Erlabrunn/Erzgebirge  
Familienstand: verheiratet seit 1999 mit Jörg Schöffner  
Wohnsitz: Schillerplatz 12, 06198 Salzmünde

Schulbildung:  
1980-1988 Besuch der Oberschule in Grünhain  
1988-1992 Besuch der Spezialschule mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung in Chemnitz  
Abschluß: allgemeine Hochschulreife

Studienzeit:  
1992-1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema "Versuche zur Klonierung von Phospholipase D aus *Brassica oleracea*" in der Arbeitsgruppe Technische Enzymologie am Institut für Biotechnologie bei Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann

Oktober 1997 – März 2000 Anfertigung der Promotionsarbeit zum Thema "Identifizierung und rekombinante Herstellung von Phospholipase D-Isoenzymen aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*)" am Institut für Biotechnologie bei Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann, AG Technische Enzymologie mit einem Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt

seit April 2000 Fortsetzung der Promotionsarbeit im Rahmen eines DFG-Projektes (Nr. MA 2033/3-1) in der gleichen Arbeitsgruppe

Auszeichnungen:  
- Forschungsstipendium der Max-Buchner-Stiftung (Mai 1998 - Mai 2000)  
- DECHEMA-Studentenpreis 1998

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 5. Juli 2001