

**Aktivität und Regulation von Phospholipase A₂ in der Plasmamembran von
*Eschscholzia californica***

Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

von Herrn Diplombiochemiker Batsuch Dordschbal
geb. am 16.12.1969 in Ulangom (Mongolei)

Gutachter:

- 1.Prof. Dr. Werner Roos Halle/Saale
- 2.Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hoffmann Halle/Saale
- 3.Prof. Dr. Günther Scherer Hannover

Halle/Saale, Dezember 2002

verteidigt am 20.03.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005293

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005293>]

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	IV
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Signaltransfer bei der Auslösung der pflanzlichen Pathogenabwehr	1
1.2.	Spezifität der Phospholipasen und ihre Vorkommen in Pflanzen	3
1.3.	Phospholipasen im Signaltransfer der pflanzlichen Pathogenabwehr	5
1.3.1.	Phospholipase A ₂	6
1.3.2.	Phospholipase C	7
1.3.3.	Phospholipase D	8
1.4.	Das Modellsystem der vorliegenden Arbeit: Suspensionszellkultur von <i>Eschscholzia californica</i> /Hefeelicitator	9
1.5.	Zielstellung der vorliegenden Arbeit	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1.	Kultivierung der Zellsuspensionen von <i>Eschscholzia californica</i>	11
2.2.	Präparation von Plasmamembranvesikeln	12
2.2.1.	Ernte von Zellsuspensionen	12
2.2.2.	Präparation des mikrosomalen Pellets (MP)	12
2.2.3.	Plasmamembranreinigung durch die Verteilung im wässrigen Zweiphasensystem	12
2.2.4.	Pufferlösungen für die Präparation der Plasmamembranvesikel	13
2.2.5.	Saccharosegradientenzentrifugation	14
2.3.	Markerenzyme für die Charakterisierung von Plasmamembranen	15
2.3.1.	Bestimmung von ATPase-Aktivitäten	15
2.3.2.	Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidaseaktivität	15
2.3.3.	Bestimmung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität	15
2.4.	Fluorometrische Bestimmung der PLA ₂ -Aktivität	16
2.5.	Analytische und quantitative Dünnschichtchromatographie	16
2.5.1.	Herstellung von fluoreszenzmarkierten Phospholipase-digests	17
2.5.2.	Extraktion der Phospholipide für die HPTLC	17
2.5.3.	Detektion fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC	18
2.5.4.	Quantifizierung fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC	18
2.5.5.	Ermittlung der optimalen Substratkonzentration für die Messung der PLA ₂ -Aktivität in Zellsuspensionen	19
2.5.6.	Detektion postchromatographisch gefärbter, genuiner Phospholipide	20

2.6.	Ermittlung der Massenspektren von Phospholipiden	20
2.6.1.	Phospholipidextraktion für die Analyse mit MALDI-TOF- MS	21
2.6.1.1.	Phospholipidextraktion aus den Plasmamembranvesikeln	21
2.6.1.2.	Phospholipidextraktion aus Zellsuspensionen nach Elicitor-Behandlung	21
2.6.1.3.	Gewinnung einer Lysophospholipid-Fraktion aus der Plasmamembran	21
2.7.	Sonstige Methoden	22
2.7.1.	Proteinbestimmung	22
2.7.2.	Bestimmung der Vesikelgröße	22
2.7.3.	Bestimmung von Benzophenanthridin-Alkaloiden	22
2.7.4.	Einschluß von Glutathion in den Vesikeln durch Elektroporation	22
2.7.5.	Bestimmung von Glutathion	23
2.8.	Chemikalien und Geräte	24
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
3.1.	Übersicht der verwendeten Methoden zur Reinigung der Plasmamembranen	25
3.1.1.	Optimierung der Reinigung der Plasmamembranen im wässrigen Zweiphasensystem	26
3.2.	Charakterisierung von Plasmamembranen	28
3.2.1.	Markerenzymaktivitäten	28
3.2.1.1.	H ⁺ -ATPase der Plasmamembranen (P-ATPase)	28
3.2.1.2.	Cytochrom-c-Oxidase	31
3.2.1.3.	Antimycin-insensitive NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	32
3.2.2.	Bewertung der Markerenzymaktivitäten der im Zweiphasensystem gereinigten Plasmamembranvesikel	32
3.2.3.	Saccharosegradienten	33
3.2.4.	Versuche zur Erhöhung der Reinheit der Plasmamembran	34
3.2.4.1.	Kombination der Saccharosegradienten und des Zweiphasensystems	34
3.2.4.2.	Wechsel des Osmotikums im Zweiphasensystem	34
3.2.5.	Bestimmung der Größe von Plasmamembranvesikeln	36
3.3.	Identifizierung von PLA ₂ -Aktivität	37
3.3.1.	Übersicht der verwendeten Substrate und Meßverfahren	37
3.3.2.	Aktivitätsmessungen der PLA ₂ mit fluorogenen BODIPY-Phospholipiden	41
3.3.2.1.	Effekte von Lösungsmitteln auf die Struktur des Substrates in Lösung	41
3.3.2.2.	Einfluß der Detergenzien auf die BPC-Fluoreszenz	42
3.3.2.3.	Einfluß von 0.05% Brij 58 auf die BPC-Fluoreszenz	43
3.3.2.4.	Nicht enzymatisch ausgelöste Änderungen der Fluoreszenz von BODIPY- Substraten durch Vesikel	44

3.3.3.	PLA ₂ -Aktivität in Plasmamembranvesikeln	46
3.3.3.1.	Identifizierung der PLA ₂ -Aktivität in Plasmamembranvesikeln mittels DC	47
3.3.3.2.	Lokalisation der PLA ₂ -Aktivität in den Membranen	47
3.3.3.3.	Einfluß von Ca ²⁺ -Ionen auf die PLA ₂ -Aktivität	48
3.3.3.4.	Charakterisierung der PLA ₂ durch Hemmstoffe	49
3.3.3.5.	Einfluss von Detergenzien auf die PLA ₂ -Aktivität	50
3.3.3.6.	Stimulation der PLA ₂ in Plasmamembranvesikeln durch einen Hefeelictor	50
3.3.3.7.	Regulation der PLA ₂ durch G-Proteine	51
3.3.3.7.1.	Beeinflussung der PLA ₂ -Aktivität durch Antikörper gegen die G-Proteinuntereinheiten	52
3.3.3.7.2.	Einfluß von Mastoparan auf die PLA ₂ -Aktivität in Plasmamembranvesikeln	53
3.3.3.8.	Wirkungen von Antioxidanten auf die PLA ₂ -Aktivität	53
3.3.3.8.1.	PLA ₂ -Aktivität in Plasmamembranvesikeln aus Zellen nach Zugabe eines externen Elektronenakzeptors	54
3.3.3.8.2.	Einfluß von Glutathion auf die PLA ₂ -Aktivität in Plasmamembranvesikeln	55
3.3.3.8.3.	Einschlußversuche von Glutathion in den PM-Vesikeln durch Elektroporation	56
3.3.4.	Aktivität von PLA ₂ in Zellsuspensionen von <i>Eschscholzia californica</i>	58
3.3.4.1.	LPC-Abbau durch Zellen	58
3.3.4.2.	Messungen der PLA ₂ -Aktivität in Zellsuspensionen mit BEPC	60
3.3.4.3.	Stimulation der PLA ₂ -Aktivität durch Elicitorkontakt	61
3.3.5.	Die Dynamik des endogenen LPC nach Elicitorkontakt	63
3.3.5.1.	Methodische Grundlagen zur Detektion extrahierter Phospholipide und Lysophosphatidylcholine mit MALDI-TOF	64
3.3.5.2.	Nachweis von Phospholipiden und Lysophospholipiden in Zellen und Plasmamembranvesikeln von <i>Eschscholzia californica</i>	65
3.3.5.3.	Änderungen des LPC-Gehaltes nach Elicitorkontakt	66
3.3.5.4.	DAG in Zell- und PM-Vesikelextrakten	68
3.3.6.	Andere Phospholipaseaktivitäten in Plasmamembranen	69
4.	ZUSAMMENFASSUNG	71
5.	LITERATURVERZEICHNIS	73

Abkürzungsverzeichnis

B-DAG	Diacylglycerol von BPC
BE-DAG	Diacylglycerol von BEPC
BELPC	Lyso-Phosphatidylcholin von BEPC
BE-PA	Phosphaditsäure von BEPC
BEPC	1-(O-(11-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl)amino)undecyl)-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
BFS	BODIPY-Fettsäure(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undecansäure)
BLPC	Lyso-Phosphatidylcholin von BPC
B-PA	Phosphaditsäure von BPC
BPC	1,2-Bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin
Brij 58	Polyoxyethylen-20-cetylerther
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl) dimetylammonio)-1-propane-sulfonate
CMC	kritische Micellkonzentration (critical micell concentration)
CTAB	Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (Ethylendiaminetetraaceticacid)
Em.	Emission
EtOH	Ethanol
ETYA	5,8,11,14-Eicosatetrainsäure
Ex.	Excitation
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HBI	Hexabromoiridat

HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (high Performance Thin Layer-chromatography)
kD	kilo Dalton
LDH	Lactatdehydrogenase
LPA	Lyso-Phosphatidsäure
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
LPE	Lyso-Phosphatidylethanolamin
LPS	Lyso-Phosphatidylserin
LS	Nährlösung (modifiziert nach Linsmaier und Skoog)
MCB	Monochlorbiman
MG	Molekulargewicht
MP	mikrosomale Fraktion
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
OP	Oberphase im wässrigen Zweiphasensystem
PA	Phosphatidsäure
PAF	platelet-activating factor
PC	Phosphatidylcholin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PLA ₁	Phospholipase A ₁
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PM	Plasmamembran
PVP	Polyvinylpyrrolidin
R _f -Wert	Retentionsfaktor
RH	Rohhomogenat
ROS	reactive oxygen spezies
RSA	Rinderserumalbumin
SL	Stammlösung
UP	Unterphase im wässrigen Zweiphasensystem