

4. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der Arbeit bestand in der Charakterisierung der Aktivität und der Lokalisation von Phospholipase A₂ in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* sowie ihrer potentiellen Beteiligung an der Induktion der Phytoalexin-Biosynthese.

1. Nach Zellaufschluß wurden mit Hilfe des Dextran/PEG-Zweiphasensystems Vesikelpräparationen mit einem hohen Anteil (ca. 85 %) an Plasmamembran erhalten. In diesen Plasmamembran-Vesikeln wurde mit den fluoreszenzmarkierten Phospholipase- Substraten BPC (ein doppelt BODIPY- substituiertes Phospholipid) und BEPC (ein einfach BODIPY- substituiertes Ether-Phospholipid) die Aktivität von PLA₂ nachgewiesen. Dies erfolgte hauptsächlich durch die Extraktion und Identifizierung der Hydrolyseprodukte nach DC-Trennung. Die Messung der Fluoreszenzintensität der BODIPY-markierten Lysophosphatidylcholine (BELPC bzw. BLPC) auf der DC-Platte erlaubte eine empfindliche Quantifizierung der PLA₂-Aktivität. Im Falle des an beiden Fettsäuren substituierten Substrats BPC kann auch der Fluoreszenzanstieg infolge der Aufhebung des Nachbarschafts-Quench zur Aktivitätsmessung benutzt werden, allerdings nur bei Abwesenheit störender Detergentien, welche wahrscheinlich die Substratstruktur in der Vesikelsuspension beeinflussen.

2. MALDI-TOF-MS wurde erstmals zur Identifizierung und Quantifizierung genuiner Phospholipide und Lysophospholipide in pflanzlichen Extrakten eingesetzt. In den Plasmamembranen sind vorwiegend die Lysophosphatidylcholine (LPC) 18:2, 18:1 und 16:0 nachweisbar. In Ganzzellen ist LPC 18:1 das dominierende Lysophospholipid.

3. Die Aktivität der PLA₂ in der Plasmamembran ist unabhängig von Ca²⁺. Sie wird durch die aus tierischen Zellen bekannten Inhibitoren wie Aristolochiasäure und ETYA gehemmt. Die Aktivität des Enzyms in Plasmamembranvesikeln ist durch Glutathion stimulierbar, was auf eine Redoxkontrolle seiner Aktivität hinweist.

4. Während in der Vesikelsuspension sowohl das fluoreszenzmarkierte Phospholipid als auch das Ether-Phospholipid zu Lysophospholipiden umgesetzt wurde, konnte in Zellsuspensionen nur mit dem Ether-Substrat eine Substratspaltung durch PLA₂ nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist sehr wahrscheinlich die rasche Metabolisierung (vermutlich Reacylierung) des gebildeten LPC-Derivats. Letzteres konnte mit BODIPY-markiertem LPC in Zellsuspensionen nachgewiesen werden. Die PLA₂ Aktivität der Zellsuspension zeigte eine starke Abhängigkeit vom Kulturalter. BODIPY-markiertes LPC wird von den Zellen, nicht aber von PM-Vesikeln,

rasch metabolisiert, wobei ein Produkt entsteht, welches mit dem BODIPY-Phospholipid R_f-gleich ist, d.h. es wird recycelt.

5. Nach Kontakt mit einem Elicitorpräparat (Glykoproteinmischung aus Hefe, ca. 20-40 kD) wurde in Plasmamembranvesikeln ein starker Anstieg des PLA₂-Hydrolyseprodukts LPC nachgewiesen. Dies gelang sowohl mit dem BODIPY-markiertem Substrat BEPC, als auch bei der Detektion der genuinen Lysophospholipide, welche mit MALDI-TOF-MS bestimmt wurden. Den stärksten elicitor-ausgelösten Anstieg zeigte LPC 18:2.

6. In den Zellen verursacht der Kontakt mit dem Hefe-Elicitor einen (im Unterschied zu den Plasmamembran-Vesikeln) transienten Anstieg von LPC mit einem Maximum bei 1-2 min nach Elicitorkontakt. Dies gilt sowohl für das künstliche Ether-Substrat als auch für das genuine Moleküle LPC 18:2. Dies deutet auf ein Gleichgewicht zwischen LPC-Produktion durch die PLA₂ und der nachfolgenden Metabolisierung von LPC hin. Der transiente Peak von LPC nach Elicitorkontakt steht in guter Übereinstimmung mit der in unserer Arbeitsgruppe gefundenen Rolle von LPC als Signalmolekül für die Auslösung eines pH-Shifts im Rahmen des Signaltransfers zur Alkaloidbiosynthese (Roos et al., 1999; Viehweger et al., 2002).

7. Unter den solubilisierten Proteinen der Plasmamembran lassen sich G-Proteine (sowohl G_α als auch G_β) immunologisch nachweisen (Roos et al. 1999). Die für diesen Nachweis benutzten Antikörper bewirkten bei der Inkubation mit isolierten Plasmamembranen eine Aktivierung der PLA₂. Dies ist ein Hinweis auf eine räumliche Nachbarschaft von PLA₂ und einem heterotrimeren G-Protein und impliziert eine G-Protein-abhängige Regulation dieser Phospholipase. Hierfür spricht auch ihre Aktivierung durch Mastoparan.

8. Neben der Aktivität von PLA₂ konnte mit den o.g. fluoreszenzmarkierten Substraten auch die Aktivität von PLC und PLD (sowohl in PM-Vesikeln als auch in Zellen) gezeigt werden. Bei der PLC-Aktivität handelt es es sich offenbar um eine in Pflanzen selten nachgewiesene, Phosphatidylcholin-spaltende Aktivität. Sie wird offenbar nicht wie PLA₂ durch Elicitorkontakt stimuliert.