

**Studien zur Gewinnung und gentechnischen Modifizierung  
von Phospholipase D aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.)  
und 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 Alexandra Lerchner

geboren am 25. Juli 1977 in Halle (Saale)

Gutachterin/Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann
2. Herr Prof. Dr. Uwe Bornscheuer
3. Herr Prof. Dr. Claus Wasternack

Halle (Saale), 12. Januar 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000007822**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007822>]

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	2
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE .....	5
1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG .....	7
2 THEORETISCHER TEIL .....	9
2.1 PHOSPHOLIPASEN UND PHOSPHOLIPIDE .....	9
2.2 PLD IN DER PHOSPHOLIPIDSYNTHESE .....	11
2.3 VORKOMMEN VON PLDs .....	12
2.4 STRUKTUR UND ORGANISATION DER PLDs .....	15
2.5 KATALYSEMECHANISMUS UND RAUMSTRUKTUR DER PLDs .....	18
2.6 ZELLULÄRE FUNKTIONEN SOWIE AKTIVIERUNGS- UND REGULATIONSMECHANISMEN PFLANZLICHER PLDs .....	23
2.6.1 Funktion der pflanzlichen PLDs in zellulären Prozessen .....	23
2.6.2 Mögliche Aktivierungsmechanismen der pflanzlichen PLDs .....	25
3 MATERIALIEN .....	28
3.1 CHEMIKALIEN .....	28
3.2 ENZYME .....	29
3.3 ANTIKÖRPER .....	29
3.4 PHOSPHOLIPIDE .....	29
3.5 KITS .....	30
3.6 OLIGONUCLEOTIDE .....	30
3.7 PLASMIDE .....	34
3.8 BAKTERIENSTÄMME .....	35
3.9 KULTURMEDIEN .....	35
3.10 PFLANZENMATERIALIEN .....	36
4 METHODEN .....	37
4.1 KEIMUNG DER SCHLAFMOHNSAMEN .....	37
4.2 PRÄPARATION VON NUCLEINSÄUREN .....	37
4.2.1 Isolierung von mRNA aus Schlafmohn .....	37
4.2.2 DNA-Präparation .....	37
4.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schlafmohn .....	37
4.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	37
4.2.2.3 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel .....	38
4.2.3 Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren .....	38
4.2.4 Konzentrations- und Größenbestimmung von Nucleinsäuren .....	38
4.2.4.1 Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren .....	38
4.2.4.2 Größenbestimmung der Nucleinsäuren .....	38
4.2.5 Agarosegelelektrophorese .....	39
4.3 CDNA-SYNTHESE .....	39
4.4 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) .....	39
4.5 SUBKLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN IN DEN PCR4-TOPO-VEKTOR .....	41
4.6 ORTSGERICHTETE MUTAGENESE .....	42
4.6.1 QuikChange-Mutagenese .....	42
4.6.2 MultiQuikChange-Mutagenese .....	42
4.7 VERDAU MITTELS RESTRIKTIONSENDONUCLEASEN .....	42
4.8 DEPHOSPHORYLIERUNG .....	43

4.9 LIGATION.....	43
4.10 TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA IN E. COLI .....	43
4.10.1 Transformation in chemisch kompetente E. coli-Zellen.....	43
4.10.2 Transformation in elektrokompente E. coli-Zellen.....	43
4.11 ANZUCHT DER E. COLI-STÄMME ZUR PLASMIDPRÄPARATION .....	44
4.12 SEQUENZIERUNG VON PLASMIDEN .....	44
4.13 EXPRESSION.....	45
4.13.1 Expression der Konstrukte im pRSET5a-Vektor.....	45
4.13.2 Expression der Konstrukte im pET-28b(+)-Vektor.....	45
4.14 PROTEINREINIGUNG.....	46
4.14.1 Zellaufschluss.....	46
4.14.2 Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie.....	46
4.14.3 Anionenaustauschchromatographie.....	47
4.14.3.1 Q-Sepharose mit 15 mM Tris/HCl, pH 7,5.....	47
4.14.3.2 Q-Sepharose mit 15 mM Pipes, pH 7,5.....	47
4.14.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose.....	47
4.14.5 Konzentrierung und Dialyse .....	48
4.14.6 Ammoniumsulfatfällung.....	48
4.15 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION.....	48
4.15.1 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay).....	48
4.15.2 Bradford-Assay .....	48
4.15.3 Proteinbestimmung mittels Western-Blot.....	49
4.16 NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGEELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) .....	49
4.17 WESTERN-BLOT-TECHNIK.....	49
4.18 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG .....	50
4.18.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System .....	50
4.18.1.1 Diskontinuierlicher Mikrotiterplattentest .....	50
4.18.1.2 Kontinuierlicher Küvettestest.....	51
4.18.1.3 Einfluss des pH-Wertes und der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität .....	51
4.18.1.4 Einfluss der Ca <sup>2+</sup> -, Mg <sup>2+</sup> - und Zn <sup>2+</sup> -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität .....	51
4.18.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität und der Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem.....	52
4.18.2.1 Kinetische Messungen.....	52
4.18.2.2 Chromatographischer Prozess .....	53
4.18.2.3 Färbung der Phospholipide.....	53
4.18.2.4 Densitometrische Quantifizierung .....	53
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	55
5.1 PLD-ISOENZYME AUS SCHLAFMOHN.....	55
5.1.1 Sequenzbestimmung zweier PLD-Isoenzyme aus Schlafmohn .....	55
5.1.1.1 Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der mRNA von <i>pld1</i> und <i>pld2</i> .....	55
5.1.1.2 Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von <i>pld1</i> und <i>pld2</i> .....	57
5.1.1.3 Analyse der Primärstrukturen von PLD1 und PLD2 .....	59
5.1.2 Klonierung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 .....	62
5.1.3 Expression von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 .....	63
5.1.4 Reinigung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 .....	64
5.1.5 Biochemische Charakterisierung der Mohn-PLD-Isoenzyme.....	68
5.1.5.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System.....	68
5.1.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	69
5.1.5.3 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> -, Mg <sup>2+</sup> - und Zn <sup>2+</sup> -Konzentration.....	70
5.1.5.4 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem.....	72
5.2 KOHL-PLD2 UND KOHL-PLD2-ENZYMARIANTEN.....	76
5.2.1 Design von Kohl-PLD2-Enzymvarianten.....	76
5.2.1.1 Modifizierung der HKD-Motive und der ihnen benachbarten Regionen.....	76
5.2.1.2 Bedeutung des C-Terminus für die Katalyse.....	78
5.2.1.3 Bedeutung der Cystein-Reste für die PLD-Aktivität .....	78
5.2.2 Mutagenese und Expression der Kohl-PLD2-Enzymvarianten.....	79
5.2.3 Klonierungs- und Expressionsstudien von Kohl-PLD2 zur Etablierung eines neuen Expressionssystems.....	80
5.2.3.1 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pBAD22-Vektor .....	80

---

5.2.3.2 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pTWIN I-Vektor.....	81
5.2.3.3 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pET-28b(+)-Vektor und Lactose-Permease-mutierten <i>E. coli</i> -Stämmen .....	83
5.2.4 <i>Reinigung von Kohl-PLD2 sowie der Kohl-PLD2-Enzymvarianten</i> .....	86
5.2.4.1 Reinigung der in <i>E. coli</i> BL21(DE3)+pUBS520 exprimierten Enzyme .....	86
5.2.4.2 Reinigung der in <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS exprimierten Enzyme.....	87
5.2.5 <i>Biochemische Charakterisierung der Kohl-PLD2-Enzymvarianten</i> .....	89
5.2.5.1 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem.....	89
5.2.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System.....	97
6 ZUSAMMENFASSUNG .....	99
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	102
ANHANG.....	114
A1 GENSTRUKTUR VON PLD1 UND PLD2 AUS SCHLAFMOHNKEIMLINGEN .....	114
A2 PRIMÄRSTRUKTUR UND SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE FÜR DIE 2 PLD-ISOENZYME AUS SCHLAFMOHN .....	118
A3 MULTIPLES ALIGNMENT DER PRIMÄRSTRUKTUREN DER MOHN-PLD-ISOENZYME MIT PFLANZLICHEN PLDS DES $\alpha$ -TYPIS MITTELS CLUSTAL W .....	121
A4 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG VON PLD1 UND PLD2 AUS SCHLAFMOHN .....	125
A5 VERGLEICH DER HYDROPHOBIZITÄTSPROFILE.....	126
A6 PRIMÄRSTRUKTUR UND SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE VON KOHL-PLD2 .....	127
DANKSAGUNG .....	129
ERKLÄRUNG .....	130
LEBENS LAUF.....	131

**Abkürzungen und Symbole**

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
C2-Domäne	Ca <sup>2+</sup> /Phospholipidbindende Domäne
Cm	Chloramphenicol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
LB	Luria Bertani-Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie
mRNA	messenger-RNA
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	Pleckstrin-Homologie
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pNP	p-Nitrophenol
PpNP	Phosphatidyl-p-nitrophenol
PX	Phox-Homologie
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sn</i>	stereospecific numbering
SPA	Soja-Phosphatidsäure

SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SPG	Soja-Phosphatidylglycerol
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight

## IUPAC-Codes

A	Adenin	U	Uracil
C	Cytosin	W	Adenin / Thymin
M	Adenin / Cytosin	Y	Cytosin / Thymin / Uracil
G	Guanin	H	Adenin / Cytosin / Thymin / Uracil
R	Adenin / Guanin	K	Guanin / Thymin / Uracil
S	Cytosin / Guanin	D	Adenin / Guanin / Thymin / Uracil
V	Adenin / Cytosin / Guanin	B	Cytosin / Guanin / Thymin / Uracil
T	Thymin	N	Adenin / Cytosin / Guanin / Thymin / Uracil

## Kurzschreibweisen der Aminosäuren

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