

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die große Familie der Phospholipasen spielt im Lipidstoffwechsel der Zellen, bei der Regulation der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Seneszenz und dem Zelltod eine wichtige Rolle. Phospholipasen D (PLDs), die Gegenstand dieser Arbeit sind, haben sehr viel Interesse auf sich gezogen, da neben ihrer Bedeutung bei der Membranumgestaltung und beim Membranabbau ihre Beteiligung an Regulationsprozessen als immer wahrscheinlicher angesehen wird (Wang, 2000).

PLD (Phosphatidylcholin-phosphatidohydrolase, E.C. 3.1.4.4) katalysiert die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung in Glycerophospholipiden unter Freisetzung von Phosphatidsäure und dem Alkohol der polaren Kopfgruppe. PLDs werden aufgrund ihrer Fähigkeit, in Glycerophospholipiden auch den Austausch der polaren Kopfgruppe zu katalysieren, vor allem zur Synthese von selten oder gar nicht in der Natur vorkommenden Phospholipiden oder Phospholipidanalogen genutzt. Dabei ist es von entscheidendem Vorteil, PLD-Vertreter zu finden, die diese Transphosphatidierungsreaktion im Vergleich zur konkurrierenden Hydrolysereaktion favorisieren, wobei vor allem pflanzlichen PLDs aufgrund ihrer geringen Substratspezifität eine große Bedeutung zukommt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch Studien zur Gewinnung und gentechnischen Modifizierung von PLD aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata) Strukturelemente identifiziert werden, die für die hydrolytische Aktivität bzw. die Transphosphatidierungsaktivität verantwortlich sind, um damit die Basis für ein gezieltes Proteindesign zu schaffen und Enzyme mit einer hohen Transphosphatidierungsaktivität, einer geringen bzw. im Idealfall keiner Hydrolyseaktivität und einem möglichst breiten Substrat-Spektrum erzeugen zu können.

Zunächst sollten die Nucleotidsequenzen der beiden *pld*-Gene aus Mohnkeimlingen, die bereits teilweise sequenziert wurden (Lerchner, 2001), vollständig aufgeklärt werden. Nach anschließender Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektor sollten die Mohn-*pld*-Gene in *E. coli* exprimiert und nach Erarbeitung effizienter Isolierungs- und Reinigungsmethoden die PLD-Isoenzyme bis zur Homogenität gereinigt werden. Die enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme sollte im Vergleich mit den Befunden der slowakischen Kooperationspartner der Comenius-Universität Bratislava erfolgen, die ein PLD-Isoenzym mit einer bevorzugten Transphosphatidierungsaktivität aus Mohnkeimlingen isolieren konnten (Bezakova et al., 2000; Oblozinsky et al., 2003).

---

Weiterhin sollten mit Hilfe von Deletionen, Insertionen und gezielten Aminosäureaustauschen an rekombinanter PLD2 aus Weißkohl (Schäffner et al., 2002), die der aus dem Weißkohl isolierten PLD entspricht (Schöps et al., 2002), Informationen bezüglich der Struktur-Funktionsbeziehungen pflanzlicher PLDs erhalten werden. Die verschiedenen Enzymvarianten der rekombinanten PLD2 aus Kohl sollten dabei auf der Grundlage von Sequenzvergleichen ausgewählter nicht-pflanzlicher Vertreter der PLD-Superfamilie, etablierter pflanzlicher PLDs sowie durch den Vergleich der PLD2-Sequenz mit den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme abgeleitet werden. Die präparierten Kohl-PLD2-Enzymvarianten sollten in Analogie zu Schäffner et al. (2002) in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Die Charakterisierung der Enzymvarianten hinsichtlich der hydrolytischen und der Transphosphatidylierungsaktivitäten sollte im Vergleich zum Wildtyp-Enzym durchgeführt werden.