

2 Theoretischer Teil

2.1 Phospholipasen und Phospholipide

Phospholipasen sind ubiquitär in der Natur vorkommende Enzyme, deren natürliche Substrate Glycerophospholipide sind, die neben Glykolipiden, Cholesterol und Proteinen Hauptbestandteil biologischer Membranen sind (**Abbildung 1**). Die Membranen haben eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung, die in **Tabelle 1** für verschiedene Membranen einer Pflanze dargestellt ist.

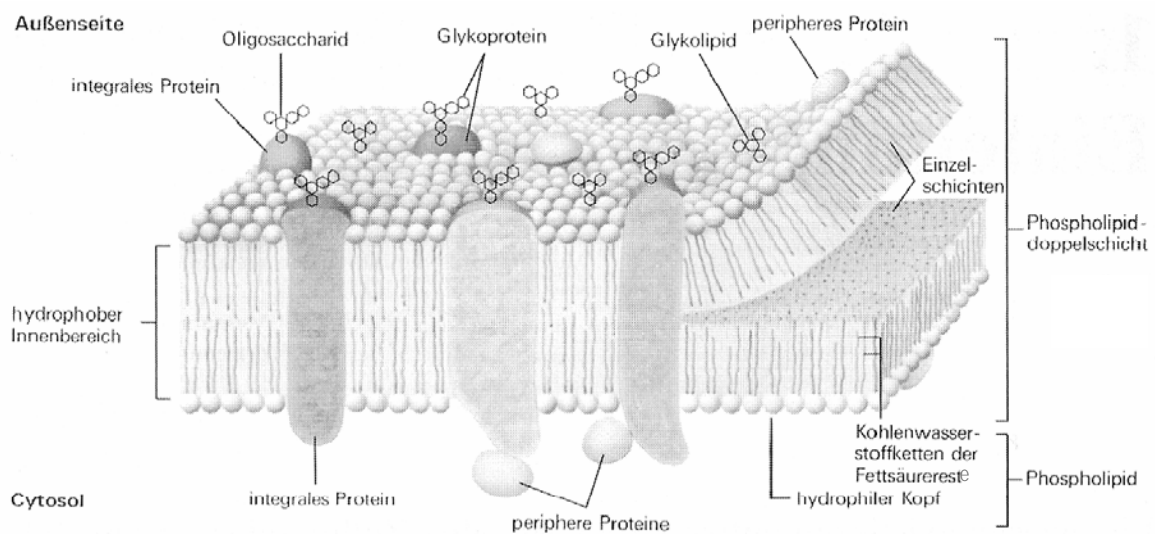


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur einer Biomembran nach dem Flüssigmosaikmodell (*fluid mosaic model*, Singer und Nicolson, 1972; Hanke et al., 1997).

Phospholipide sind je nach Struktur der Kopfgruppe unter physiologischen Bedingungen entweder neutral (Phosphatidylcholin, PC; Phosphatidylethanolamin, PE) oder weisen eine negative Ladung auf (Phosphatidsäure, PA; Phosphatidylglycerol, PG; Phosphatidylserin, PS). Die natürlichen Glycerophospholipide enthalten Glycerol, das in *sn1*- und *sn2*-Position mit Fettsäuren, in *sn3*-Position mit Phosphat verestert ist. Die Fettsäureketten repräsentieren den lipophilen, apolaren „Schwanz“ und das Glycerolgrundgerüst mit dem über die Phosphodiesterbindung gebundenen Alkohol bildet den hydrophilen, polaren Bereich des Moleküls. Die Fettsäurezusammensetzung natürlicher Phospholipide ist heterogen, wobei es allerdings deutliche Präferenzen in Abhängigkeit von der Herkunft der Phospholipide gibt. So werden zum Beispiel für Soja-PC folgende Anteile angegeben: 15,2 % Palmitin-, 7,4 % Öl-, 6,4 % Linolen-, 2,8 % Stearin- und 67,7 % Linolsäure. Dagegen hat Ei-PC eine ungefähre Zusammensetzung von 38,5 % Palmitin-, 31,7 % Öl-, 9,2 % Stearin- und 11,8 % Linolsäure (Gunstone, 1996).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Glycerolipide verschiedener pflanzlicher Membranen (Heldt, 1999).

Glycerolipide	Chloroplasten	Mitochondrien	
	Thylakoidmembran	Innenmembran	Plasmamembran
	[% des Acyllipid-Gesamtgehalts]		
Monogalactosyldiglycerid	51	0	0
Digalactosyldiglycerid	26	0	0
Sulfochinovosyldiglycerid	7	0	0
Phosphatidylcholin	3	27	32
Phosphatidylserin	0	25	0
Phosphatidylethanolamin	0	29	46
Phosphatidylglycerol	9	0	0
Phosphatidylinositol	1	0	19
Cardiolipin	0	20	0

Die Klassifizierung der Phospholipasen in A₁, A₂, B, C und D erfolgt nach ihrer Spezifität hinsichtlich des Angriffsortes am Phospholipid (**Abbildung 2**). Phospholipase A₁ (PLA₁, E.C. 3.1.1.32) katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung in *sn1*-Position, Phospholipase A₂ (PLA₂, E.C. 3.1.1.4) die Hydrolyse der Esterbindung in *sn2*-Position. Phospholipasen, die Glycerophospholipide sowohl in *sn1*- als auch in *sn2*-Position hydrolysieren, werden als Phospholipasen B (PLB, E.C. 3.1.1.5) bezeichnet. Phospholipase C (PLC, E.C. 3.1.4.3) katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung, die dem Glycerolgerüst zugewandt ist, Phospholipase D (PLD, E.C.3.1.4.4) katalysiert die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung.

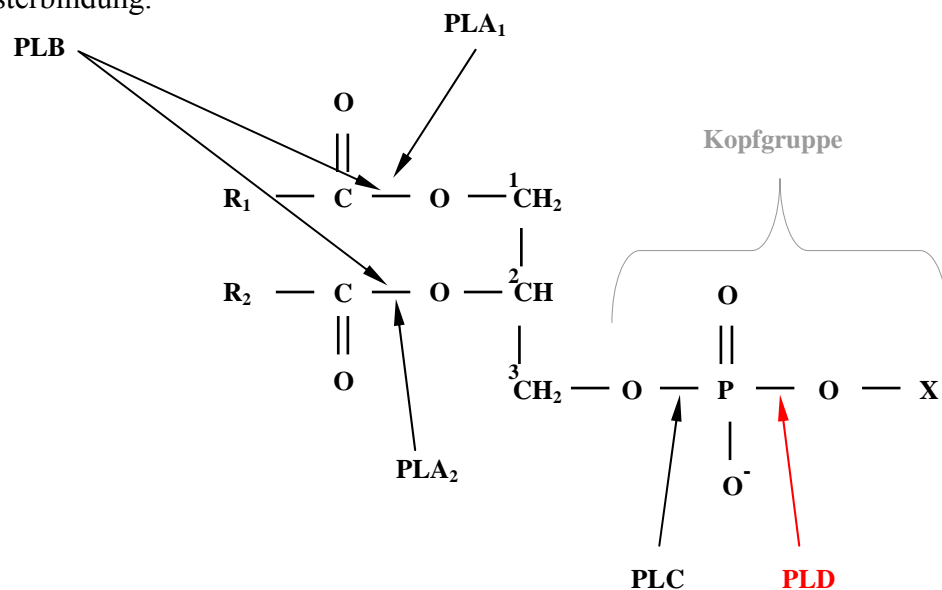


Abbildung 2: Angriffsorte der Phospholipasen an einem Diacylglycerophospholipid. R₁ und R₂, gesättigte bzw. ungesättigte Alkylreste; X, Alkohol.

2.2 PLD in der Phospholipidsynthese

Wie in **Abbildung 2** dargestellt wurde, katalysiert PLD die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung natürlicher und synthetischer Phospholipide (**Abbildung 3**). In Anwesenheit eines geeigneten Akzeptoralkohols ist PLD außerdem in der Lage, diesen anstelle von Wasser auf den Phosphatidylrest zu übertragen (Transphosphatidylierung; **Abbildung 3**). Die Transphosphatidylierung ist die Konkurrenzreaktion zur Hydrolyse, wobei einige PLDs die Transphosphatidylierung gegenüber der Hydrolyse favorisieren und somit die Synthese neuer Phospholipide erlauben. Daher werden PLDs schon seit vielen Jahren zur Modifizierung der polaren Kopfgruppe in Phospholipiden verwendet. Während früher die PLD aus Weißkohl als traditionelle Enzymquelle, meist als Rohsaft oder in partiell gereinigter Form, verwendet wurde (Dawson, 1967; Kovatchev und Eibl, 1978; Juneja et al., 1987), werden heute PLDs aus *Streptomyces sp.* für synthetische Zwecke bevorzugt (D'Arrigo et al., 1994; Takami et al., 1994; Nakajima et al., 1994).

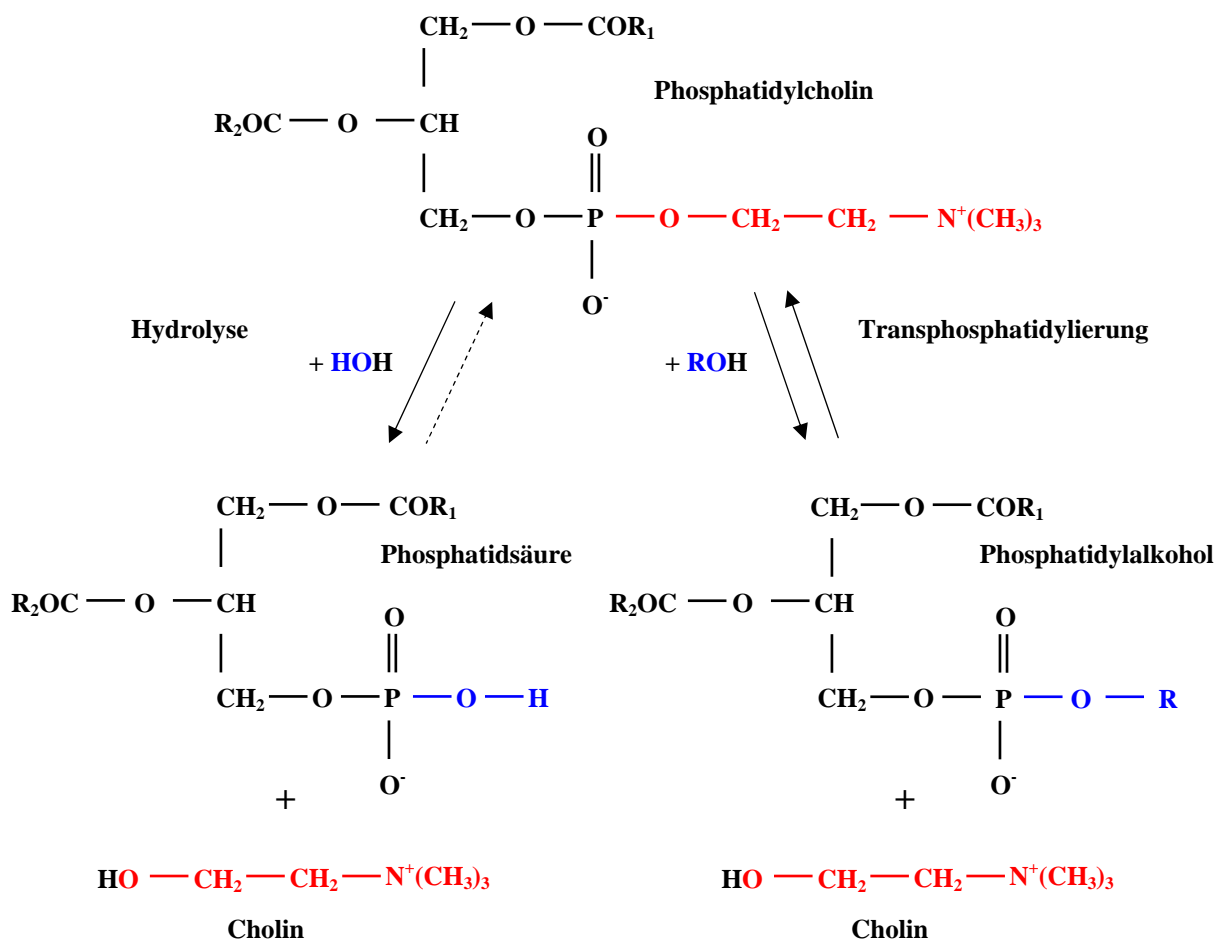


Abbildung 3: PLD-katalysierte Reaktionen mit Phosphatidylcholin als Substrat. R₁ und R₂, gesättigte bzw. ungesättigte Alkylreste.

Die PLDs einiger *Streptomyces*-Stämme scheinen prädestiniert für die Umesterung von Glycerophospholipiden zu sein, wohingegen diese Reaktion durch PLD aus *Streptomyces chromofuscus* nicht katalysiert wird. Die PLD aus Weißkohl nimmt eine Zwischenstellung ein. Das Wasser und der Akzeptoralkohol konkurrieren hier offensichtlich stärker um den Phosphatidylrest und in den meisten Reaktionen muss daher die Bildung von Phosphatidsäure in mehr oder weniger hohem Ausmaß toleriert werden. PLD-katalysierte Reaktionen und Synthesebeispiele sind in Servi (1999) und Ulbrich-Hofmann (2000) ausführlich zusammengestellt. Das Spektrum der chemischen Strukturen der Alkohole, die mittels Transphosphatidylierung eingeführt werden können, ist breit und umfasst neben den natürlicherweise in Phospholipiden vorkommenden Komponenten (Glycerol, Cholin, Ethanolamin, Serin, Inositol) Nucleoside, Peptide, Arsenocholin, *N*-heterocyclische Alkohole und aromatische Verbindungen (Ulbrich-Hofmann, 2003). Generell werden primäre Alkohole besser als Akzeptoralkohole angenommen als sekundäre, eine Einführung tertiärer Alkohole ist nicht bekannt. Der durch die PLD katalysierte Kopfgruppenaustausch wurde auch bei der Verwendung von Lysophospholipiden (Virto et al., 2000) und von Etherphospholipiden (Achterberg et al., 1986; Testet-Lamant et al., 1992) beobachtet. Interessanterweise können auch Alkylphosphocholine (Aurich et al., 2002) und Alkylphosphonocholine (Brachwitz et al., 1997) relativ gut durch PLD aus Weißkohl umgeestert werden, d.h. dass PLD aus Weißkohl im Gegensatz zu den mikrobiellen Enzymen weniger spezifisch in Bezug auf den Rest des Moleküls ist und das Glycerol-Rückgrat in der Phosphodiesterstruktur des Substrates nicht benötigt.

2.3 Vorkommen von PLDs

Die erste PLD wurde von Hanahan und Chaikoff (1947) aus Karotten und Spinatblättern isoliert, nachdem die Existenz eines solchen Enzyms bereits von Contardi und Ercoli (1932) postuliert worden war. Später konnten PLDs auch in tierischen Organismen (z.B. Hamster, Maus, Mensch, Ratte), in Pilzen (z.B. *Aspergillus*), in Hefen und in Bakterien (z.B. *Streptomyces*) nachgewiesen werden (Heller 1978; Frohman et al., 1999; Liscovitch et al., 2000). Das Enzym ist im Pflanzenreich weit verbreitet und wurde unter anderem aus Weißkohlblättern (Davidson und Long, 1958; Dawson und Hemington, 1967; Yang et al., 1967; Allgyer und Well, 1979; Lambrecht und Ulbrich-Hofmann, 1992; Abousalham et al., 1993), aus dem Kallus von Orangen *Citrus sinensis* L. (Witt et al., 1987), aus Reiskleie (Lee, 1989), aus Erdnussamen (Heller et al., 1970; Heller et al., 1974), aus dem Endosperm von Rizinussamen (Wang et al., 1993), aus Sojabohnen-Zellkulturen (Abousalham et al., 1995),

aus Rapssamen (Novotna et al., 1999; Novotna et al., 2000) sowie aus Maiswurzeln (Brauer et al., 1990) isoliert, gereinigt und charakterisiert.

In den letzten 10 Jahren wurde dementsprechend eine Vielzahl von Sequenzen von *pld*-Genen verschiedenster Herkunft aufgeklärt. Die beiden ersten Sequenzen waren die des *pld*-Gens des Bakteriums *Streptomyces antibioticus* (Iwasaki et al., 1994) und des *pld*-Gens der Pflanze *Ricinus communis* (Wang et al., 1994). In **Tabelle 2** sind die Aminosäuresequenzen der derzeit in der NCBI-Genbank hinterlegten *pld*-Gensequenzen, die entsprechend der Definition der PLD-Superfamilie in Besitz zweier HKD-Motive sind (2.4), im Überblick dargestellt.

Tabelle 2: Überblick über bekannte mikrobielle, tierische und pflanzliche PLDs. Aminosäuresequenzen aus der NCBI Genbank.

Organismus	PLD-Typ, Accession-Nr.	Literaturangabe
<i>Bacillus anthracis</i>	PLD (514 AS), NP_655100	Read et al., 2002
	PLD (509 AS), NP_654568	Read et al., 2002
	PLD (397 AS), NP_653807	Read et al., 2002
<i>Nitrosomonas europaea</i>	PLD (385 AS), CAD83979	Chain et al., 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PLD (1099 AS), AAG06875	Stover et al., 2000
<i>Rhizobium species</i>	PLD (526 AS), AAQ87132	Streit et al., 2004
<i>Streptomyces antibioticus</i>	PLD (556 AS), Q53728	Iwasaki et al., 1994
<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	PLD (540 AS), JG0174	Ogino et al., 1999
<i>Streptomyces halstedii</i>	PLD (560 AS), BAB72230	Hatanaka et al., 2002
	PLD (552 AS), BAB92022	Mori et al., 2002
<i>Streptomyces septatus</i>	PLD (542 AS), BAB69062	Hatanaka et al., 2002
<i>Streptomyces species</i>	PLD (553 AS), AAN41662	Moon et al., 2003
<i>Yersinia pestis</i>	PLD (532 AS), CAB55256	Prentice et al., 2001; Parkhill et al., 2001
<i>Aspergillus nidulans</i>	PLD (833 AS), BAC67175	Hong et al., 2003
<i>Candida albicans</i>	PLD (1710 AS), BAA32278	Kanoh et al., 1998
<i>Caenorhabditis elegans</i>	PLD (1427 AS), BAA97571	Nakashima et al., 2000
<i>Drosophila melanogaster</i>	PLD (1278 AS), AAK00727	Crosby et al., 2001
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	PLD (849 AS), CAD26028	Katinka et al., 2001
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLD1 (1380 AS), P36126	Honigberg et al., 1992; Rose et al., 1995; Waksman et al., 1996
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PLD α 1 (809 AS), AAC49274	Dyer et al., 1995
	PLD α 2 (810 AS), Q9SSQ9	Theologis et al., 2000; Fan et al., 1999
	PLD α 3 (762 AS), Q9C888	Theologis et al., 2000
	PLD β 1 (967 AS), P93733	Pappan et al., 1997; Lin et al., 1999; Fan et al., 1999

Fortsetzung Tabelle 2

Organismus	PLD-Typ, Accession-Nr.	Literaturangabe
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PLD β 2 (915 AS), O23078	Mayer et al., 1999; Fan et al., 1999
	PLD γ 1 (858 AS), Q9T053	Qin et al., 1997; Mayer et al., 1999; Fan et al., 1999
	PLD γ 2 (824 AS), Q9T051	Qin et al., 1999; Mayer et al., 1999
	PLD γ 3 (866 AS), Q9T052	Qin et al., 1999; Mayer et al., 1999; Fan et al., 1999
	PLD δ (868 AS), Q9C5Y0	Gardiner et al., 2001; Wang et al., 2001; Katagiri et al., 2001; Mayer et al., 1999; Yamada et al., 2003
	PLD ζ 1 (1096 AS), AAL06337	Qin et al., 2002
	PLD ζ 2 (1039 AS), Q9M9W8	Salanoubat et al., 2000
<i>Arachis hypogaea</i>	PLD (793 AS), AAP50498	Xu et al., 2001
<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	PLD α 1 (810 AS), AAC78487	Pannenberg et al., 1998
	PLD α 2 (812 AS), AAC78486	Pannenberg et al., 1998; Kim et al., 1999
<i>Craterostigma plantagineum</i>	PLD α 1 (807 AS), CAB43063	Frank et al., 2000
	PLD α 2 (807 AS), CAB43062	Frank et al., 2000
<i>Cynara cardunculus</i>	PLD α (713 AS), CAE47482	Simoës et al., 2003
<i>Gossypium hirsutum</i>	PLD β 1b (1162 AS), AAN05431	McHugh et al., 2002
	PLD δ 1a (854 AS), AAN05433	McHugh et al., 2002
	PLD δ 1b (849 AS), AAN05432	McHugh et al., 2002
<i>Lycopersicon esculentum</i>	PLD α 1 (809 AS), AAG45485	Almquist et al., 2000; Laxalt et al., 2001
	PLD α 2 (806 AS), AAG45486	Laxalt et al., 2001; Whitaker et al., 2001
	PLD α 3 (678 AS), AAG50297	Laxalt et al., 2001
	PLD β 1 (847 AS), AAG45487	Laxalt et al., 2001
	PLD β 2 (895 AS), AAG45488	Laxalt et al., 2001
<i>Mirabilis jalapa</i>	PLD (578 AS), AAP03643	Gookin et al., 2003
<i>Nicotiana tabacum</i>	PLD α (808 AS), CAB06620	Lein et al., 1997 und 2001

Fortsetzung Tabelle 2

Organismus	PLD-Typ, Accession-Nr.	Literaturangabe
<i>Oryza sativa</i>	RPLD1 α (812 AS), BAA11136	Ueki et al., 1995 ; Morioka et al., 1997
	RPLD2 α (818 AS), BAA19466	Morioka et al., 1997
	RPLD3 α (832 AS), AAF78754	McGee et al., 2003
	RPLD4 α (842 AS), AAF78755	McGee et al., 2003
	RPLD5 δ (845 AS), AAF78756	McGee et al., 2003
<i>Papaver somniferum</i> *	PLD α 1 (813 AS), AAL48261	Lerchner et al., 2004
	PLD α 2 (813 AS), AAL48262	Lerchner et al., 2004
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	PLD α (808 AS), AAB70463	Cha et al., 1997
<i>Ricinus communis</i>	PLD α (808 AS), AAB04095	Wang et al., 1994
<i>Vigna unguiculata</i>	PLD α (809 AS), O04865	El Maarouf et al., 1999 ;
		El Maarouf et al., 2000
<i>Zea mays</i>	PLD α (812 AS), BAA11135	Ueki et al., 1995
<i>Cricetulus griseus</i>	PLD (1036 AS), T18530	Klaus et al., 2000
<i>Homo sapiens</i>	PLD (1074 AS), AAB49031	Hammond et al., 1995
	PLD2 (933 AS), O14939	Steed et al., 1998; Lopez et al., 1998; Strausberg et al., 2002
<i>Mus musculus</i>	PLD (1035 AS), T42093	Colley et al., 1997
	PLD2 (933 AS), AAC24519	Colley et al., 1997; Redina et al., 1998
<i>Rattus norvegicus</i>	PLD1a (1075 AS), BAA24076	Yoshimura et al., 1996 ; Nakashima et al., 1997
	PLD1b (1037 AS), BAA24077	Yoshimura et al., 1996; Nakashima et al., 1997
	PLD2 (933 AS), BAA24078	Yoshimura et al., 1996; Nakashima et al., 1997

* im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt

2.4 Struktur und Organisation der PLDs

Alle PLD-Isoenzyme weisen zwei konservierte HxKxxxxDxxxxxxGG/S-Sequenzen (Ponting et al., 1996; Koonin, 1996; Morris et al., 1996) auf, die als HKD-Motive bezeichnet werden. Diese sind für die katalytische Aktivität notwendig und definieren die PLD-Superfamilie. Sie sind ebenso in bakteriellen Phospholipidsynthasen, bakteriellen Endonucleasen, in vom Pox-Virus umhüllten Proteinen und im Maus-Toxin aus *Yersinia pestis* (Ponting et al., 1996) vorhanden. PLD-Aktivität aufweisende Mitglieder der PLD-Superfamilie besitzen vier

konservierte Sequenzbereiche (I bis IV; **Abbildung 4**), von denen die Bereiche II und IV die HKD-Motive enthalten (Sung et al., 1997). Die Funktion der Sequenzbereiche I und III ist noch nicht genau bekannt, aber es wird angenommen, dass auch sie an der Katalyse beteiligt sind. Dem IYIENQYFF-Motiv im konservierten Sequenzbereich III, das nur in den eukaryotischen PLDs und in Cardiolipin- und Phosphatidylserinsynthesen zu finden ist, wurde aufgrund der Vielzahl an aromatischen Aminosäuren in dieser Region eine mögliche Rolle bei der Bindung des Cholinanteiles des Phosphatidylcholins zugeordnet (Sung et al., 1997). Diese Annahme resultiert zum einen aus Mutationsstudien von Sung et al. (1997) an humaner PLD1, bei denen sich die Aminosäure Phe784 (**Abbildung 4**) als unentbehrlich für den Erhalt der Aktivität erwies, und zum anderen aus Studien an Acetylcholinesterase, in denen gezeigt werden konnte, dass die Cholin-Interaktion mit dem Enzym über eine aromatische Region aus Phenylalaninen und Tyrosinen erfolgt (Harel et al., 1993; Gilson et al., 1994).

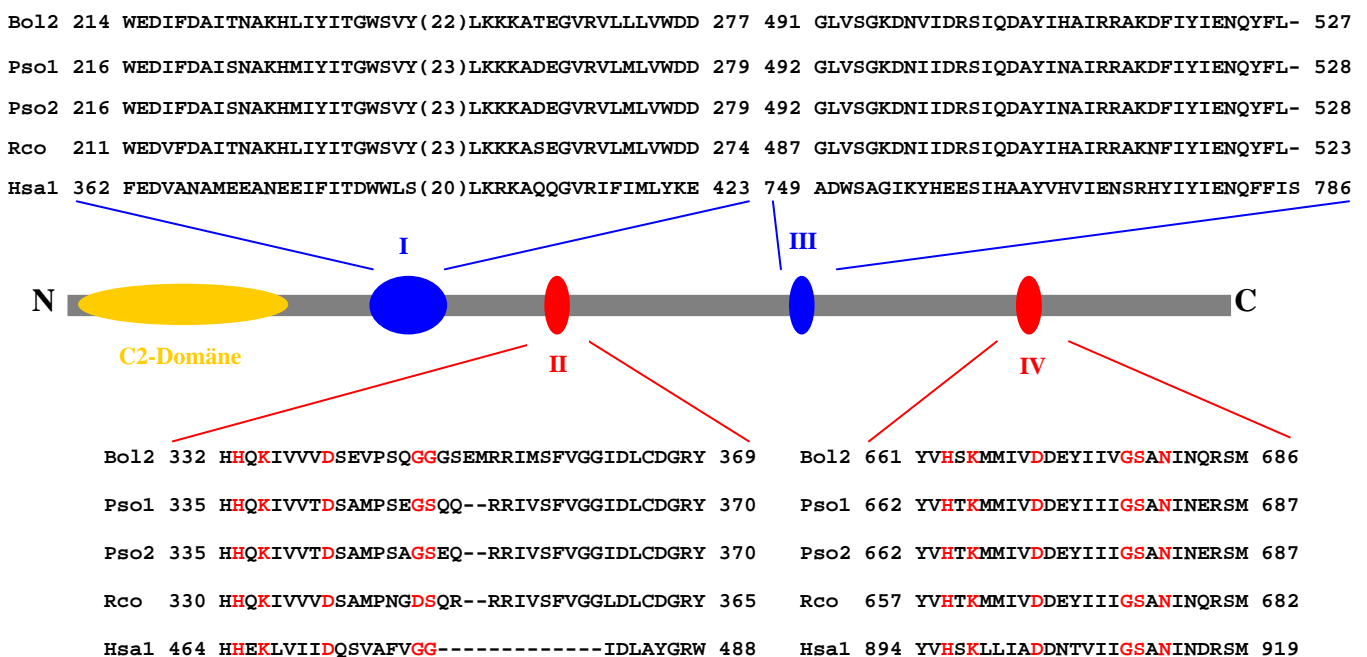


Abbildung 4: Lokalisation der hoch-konservierten Sequenzbereiche der PLD-Superfamilie in PLD2 aus Weißkohl im Vergleich zu einer Auswahl anderer PLDs. Spezies-Kurzformen: *Bol*, *Brassica oleracea*; *Hsa*, *Homo sapiens*; *Pso*, *Papaver somniferum*; *Rco*, *Ricinus communis*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2. Rot, Aminosäuren der katalytischen Motive.

In den N-terminalen Sequenzen von Säuger-, Hefe- und Nematoden-PLDs sowie in den pflanzlichen ζ -PLD-Isoenzymen sind weiterhin Phox-Homologie (PX)- und Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen vorhanden, die weder in den mikrobiellen noch in den pflanzlichen α -, β -, γ - und δ -PLD-Isoenzymen vorkommen (Frohman et al., 1999; Qin et al., 2002). Die letztgenannten pflanzlichen Isoenzyme besitzen dagegen, wie in **Abbildung 4** gezeigt, eine hoch-konservierte C2-Domäne (Qin et al., 2002), auf die im Folgenden noch

näher eingegangen werden soll. Die PX-Domäne ist gewöhnlich in Interaktionen mit anderen Proteinen oder mit 3-Phosphoinositiden involviert, während die PH-Domäne an Membran-Assoziationen beteiligt ist, in denen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) eine Rolle spielen (Exton, 2002). Die PH-Domäne ist ein ca. 100 Aminosäure-Reste umfassendes Strukturmotiv, das in vielen Signalmolekülen wie Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen, Tyrosinkinasen, Isoformen der Phospholipase C (PLC β , γ und δ), in G-Nucleotid-Austauschfaktoren sowie in Proteinen des Cytoskeletts zu finden ist (Krauss, 1997).

Die C2-Domäne (**Abbildung 4**) ist ein Ca²⁺-Bindungsmotiv mit einer Länge von ungefähr 130 Aminosäure-Resten und wurde zuerst für die Ca²⁺-abhängigen Isoformen der Proteinkinase C beschrieben (Coussens et al., 1996; Knopf et al., 1996; Ono et al., 1986a; Ono et al., 1986b; Parker et al., 1996). Einzelne und multiple Kopien von C2-Domänen konnten inzwischen in verschiedenen eukaryotischen Signalproteinen (z.B. Phosphoinositid-spezifischen PLCs, Phosphatidylinositol 3-kinasen, cytosolischen PLA₂s), die mit Zellmembranen interagieren und intrazelluläre Prozesse vermitteln (z.B. Umbau von Membranen, Bildung von sekundären Botenstoffen, Aktivierung von GTPasen und Kontrolle der Proteinphosphorylierung), identifiziert werden (Nalefski und Falke, 1996). Die 3-dimensionalen Strukturen der C2-Domänen des neuronalen Proteins Synaptotagmin, der Phospholipase C δ und die der cytosolischen PLA₂ wurden durch Röntgenkristallstrukturanalyse und kernmagnetische Resonanz (NMR-Messungen) bestimmt (Shao et al., 1996; Essen et al., 1996; Xu et al., 1998). Aufgrund der Anordnung der β -Stränge werden zwei Faltungstopologien, Topologie I (in Synaptotagmin) und Topologie II (in PLC- δ), unterschieden. Die C2-Domänen der pflanzlichen PLDs können aufgrund ihrer Sequenz-Homologie zu PLC- δ dem Faltungstyp II zugeordnet werden. Die Ca²⁺-Bindung erfolgt über vier Aspartat- bzw. Glutamat-Reste, die in den zwischen den β -Faltblättern liegenden *Loop*-Regionen lokalisiert sind (Sutton et al., 1995, Shao et al., 1996). Es wird angenommen, dass zwei in Asparagin bzw. Glutamin umgewandelte Aspartat- bzw. Glutamat-Reste in den pflanzlichen PLDs vom α -Typ (multiples Alignment im **Anhang A3**) für die geringere Affinität zu Ca²⁺-Ionen im Vergleich zu PLD β verantwortlich sind (Zheng et al., 2000). Die Ca²⁺-vermittelte Translokation löslicher Proteine zu den Membranen und die daraus resultierende Phospholipidbindung wird für cytosolische PLA₂, PLD α und PLD β auf eine durch Ca²⁺-Bindung induzierte Konformationsänderung in der C2-Domäne zurückgeführt (Scott et al., 1990; Zheng et al., 2000). Die Konformationsänderung führt zu einer Exposition von hydrophoben oder geladenen Resten, die eine Membranbindung entweder durch

Eintauchen in die hydrophoben Membrankomponenten oder durch spezifische Bindung an die Kopfgruppe der Phospholipide ermöglicht.

PLDs aus Säugetieren, aus Hefen, aus Tetrahymena und einige pflanzliche PLDs benötigen PIP_2 für ihre Aktivität (Qin et al., 2002; Brown et al., 1993; Sciorra et al., 1999; Hodgkin et al., 2000; Wang et al., 2001). In der Literatur werden Cluster basischer Aminosäure-Reste $(\text{K/R})_{\text{xxxx}}\text{Kx}(\text{K/R})(\text{K/R})$ als Bindungsstellen für PIP_2 bei Gelsolin, Vilin und $\text{PLC}\delta$ (Janmey et al., 1992; Yu et al., 1992) und die Motive RxxxxKxRR und seine invertierte Sequenz RKxRxxxxR als Bindungsstellen für PIP_2 bei pflanzlichen $\text{PLD}\beta\text{s}$ (Qin et al., 1997) beschrieben. Obwohl die PH-Domäne PIP_2 binden kann (Hodgkin et al., 2000), wird PIP_2 wahrscheinlich an einer Region zwischen den konservierten Sequenzbereichen II und III gebunden, die auch für die Aktivität erforderlich ist (Sciorra et al., 1999; Zheng et al., 2002). Während PIP_3 ebenso die Aktivität stimulieren kann, haben andere Phospholipide einen geringen bzw. gar keinen Effekt.

Wie in **Tabelle 2** gezeigt, gibt es in verschiedenen Pflanzen multiple PLDs, die in fünf Gruppen eingeteilt werden (α , β , γ , δ und ζ ; Qin et al., 2002). $\text{PLD}\alpha$, bezeichnet als konventionelle PLD, ist in Gegenwart millimolarer Ca^{2+} -Konzentrationen aktiv, wohingegen die β - und γ -Isoenzyme PIP_2 -abhängig sind und ihre maximale Aktivität bei mikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen erreichen (Qin et al., 2002). Das δ -Isoenzym wird durch Ölsäure aktiviert, das ζ -Isoenzym enthält eine PX- und eine PH-Domäne, ist Ca^{2+} -unabhängig sowie selektiv für PC (Qin et al., 2002). Im Gegensatz dazu gibt es nur zwei Säuger-*pld*-Gene, deren Proteinprodukte (PLD1 und PLD2) alternativ gespleißt werden und eine Identität der Aminosäuresequenzen von ungefähr 50 % zeigen (Wang et al., 2001; Colley et al., 1997). Die PLD1 wird *in vivo* und *in vitro* durch Proteinkinase C (PKC) und kleine G-Proteine der Rho- und Arf-Familien reguliert (Exton 1997, 1999 und 2002). PLD2 dagegen hat eine hohe Grundaktivität und wird nicht durch PKC, Rho- oder Arf-Proteine *in vitro* beeinflusst (Hammond et al., 1997; Colley et al., 1997; Lopez et al., 1998).

2.5 Katalysemechanismus und Raumstruktur der PLDs

Bereits 1970 postulierten Stanacev und Stuhne-Sekalec, dass die durch PLD-Enzyme katalysierten Reaktionen über ein kovalentes Phosphatidyl-Enzym-Intermediat verlaufen. Studien von Holbrook et al. (1991) zum Einbau von H_2^{18}O im Verlauf der Hydrolyse von Distearoyl-phosphatidylcholin zeigten, dass während der Katalysereaktion der PLD aus *Streptomyces chromofuscus* die P-O-Bindung und nicht die C-O-Bindung gespalten wird. Andere Studien an PLD aus Weißkohl zeigten, dass die Konfiguration am chiralen

Phosphoratom sowohl bei der Hydrolyse als auch bei der Transphosphatidylierung mit verschiedenen radioaktiv markierten Substraten beibehalten wird (Bruzik und Tsai, 1982 und 1984; Jiang et al., 1984). Dies wurde von Raetz et al. (1997) durch radioaktive Markierungsexperimente an Phosphatidylserinsynthase (PSS) aus *E. coli* bestätigt, die wie alle zur PLD-Superfamilie gehörenden Enzyme ein HKD-Motiv besitzt. Bei PSS aus Hefe dagegen, die kein HKD-Motiv besitzt, wird eine Inversion der Konfiguration am Phosphoratom beobachtet (Raetz et al., 1997). Deshalb wurde für alle ein HKD-Motiv enthaltende Mitglieder der PLD-Superfamilie ein Ping-Pong-Mechanismus vorgeschlagen, der über ein Phosphatidyl-Enzym-Intermediat verläuft. Studien an humaner PLD (Sung et al., 1997) und Endonuclease Nuc (Gottlin et al., 1998) zur Identifizierung des an der Bindung des Proteins am Phospholipid beteiligten Aminosäure-Restes zeigten, dass der Histidin-Rest des HKD-Motives kovalent am Phospholipid gebunden und so das Phosphatidyl-Enzym-Intermediat gebildet wird.

Stuckey und Dixon (1999) gelang es, mit der Endonuclease Nuc die erste Kristallstruktur eines Mitgliedes der PLD-Superfamilie aufzuklären und das katalytische Zentrum zu rekonstruieren. Da die Endonuclease Nuc nur über ein HKD-Motiv verfügt, lagern sich zur Bildung des katalytischen Zentrums zwei Moleküle sattelförmig zu einem Dimer zusammen. Neben den beiden Histidin-Resten (His94) sind auch die Lysin-Reste (Lys96) der HKD-Motive und in der Nähe befindliche Asparagin-Reste (Asn111) wesentlich an der Bindung des Phosphates beteiligt. Die den Histidin-Resten benachbarten Glutamat-Reste (Glu122) stabilisieren möglicherweise die ionischen Formen der Histidin-Reste. Daraus wurde folgender Katalysemechanismus abgeleitet: Der Imidazol-Stickstoff des Histidin-Restes eines der beiden HKD-Motive geht mit dem Phosphoratom des Substrates eine kovalente Bindung unter Bildung eines phosphatidylierten Enzym-Intermediats ein, das im Verlaufe des angenommenen Ping-Pong-Mechanismus gespalten wird und im Falle der Hydrolyse Phosphatidsäure bzw. im Falle der Transphosphatidylierung ein modifiziertes Phospholipid freisetzt. Während bei der Endonuclease beide Histidin-Reste gleichberechtigt zur Bildung des Intermediats beitragen, fungiert bei der mikrobiellen PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF (PLD_{PMF}), deren Kristallstruktur im Jahre 2000 von Leiros et al. aufgeklärt wurde (**Abbildung 5**), ausschließlich der Histidin-Rest im N-terminalen HKD-Motiv als Nucleophil.

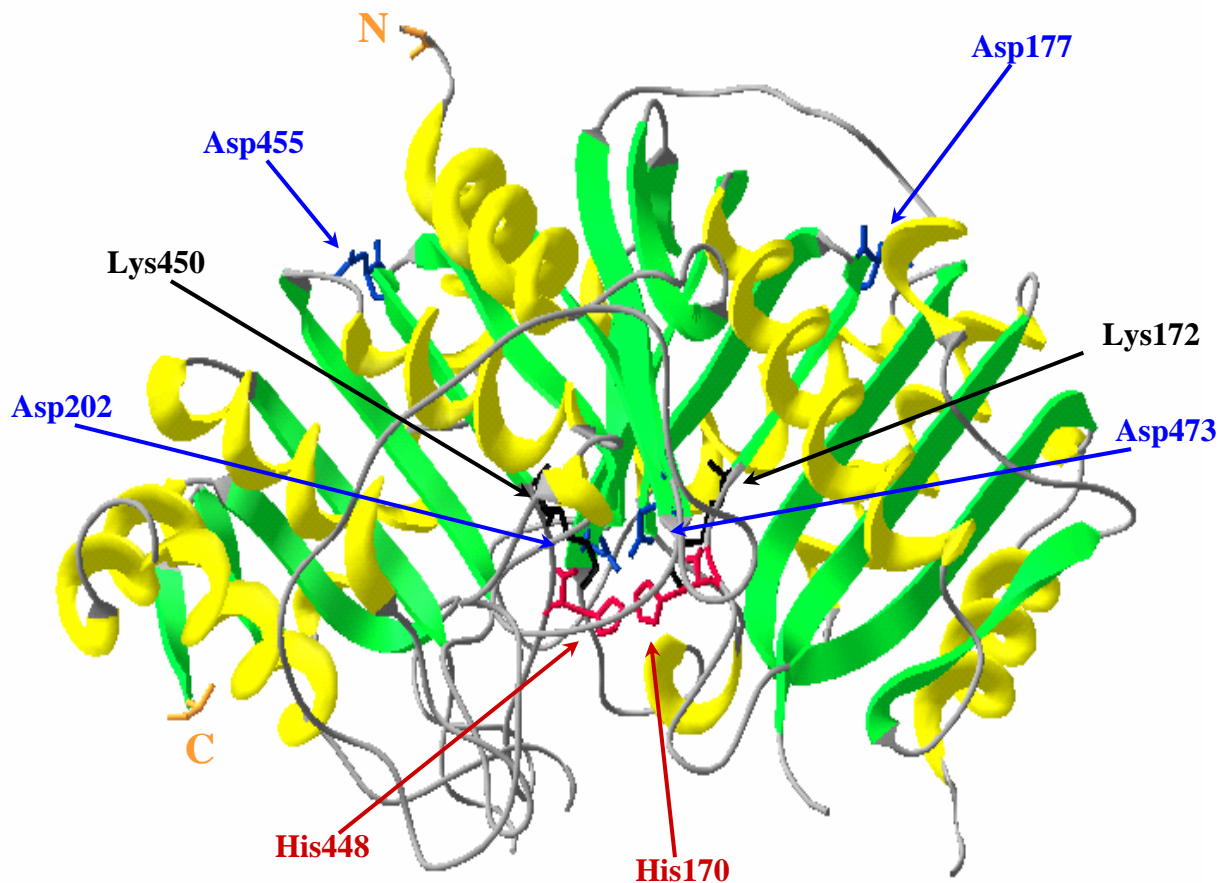


Abbildung 5: Raumstruktur der PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF (PDB Accession-Nr. 1V0S). N, N-Terminus; C, C-Terminus; grün, β -Faltblätter; gelb, α -Helices; rot, Histidin-Reste der HKD-Motive; schwarz, Lysin-Reste der HKD-Motive; blau, Aspartat-Reste (177 und 455) der HKD-Motive und am Katalysemechanismus beteiligte Aspartat-Reste (202 und 473).

Das aktive Zentrum der PLD_{PMF} (**Abbildung 6a**) ist ähnlich dem der Endonuclease Nuc (Leiros et al., 2004) aufgebaut. Der größte Unterschied besteht darin, dass die zwei Aspartat-Reste (Asp202 und Asp473), die im aktiven Zentrum der PLD_{PMF} starke Wasserstoffbrückenbindungen zu den zwei Histidinen ausbilden, in Endonuclease Nuc als Glutamat-Reste vorliegen. Besonders interessant ist das aktive Zentrum der Phosphat-inhibierten Struktur der PLD_{PMF} (**Abbildung 6b**). His170 dreht sich in Anwesenheit von Phosphat in Richtung des „Einganges“ des aktiven Zentrums und überführt dadurch das Seitenketten-Sauerstoffatom des negativ geladenen Asp473 in den ungebundenen Zustand. His170 befindet sich demnach in einer „äußeren“ und wahrscheinlich inaktiven Konformation, während im aktiven Zustand His170 weiter innen lokalisiert ist.

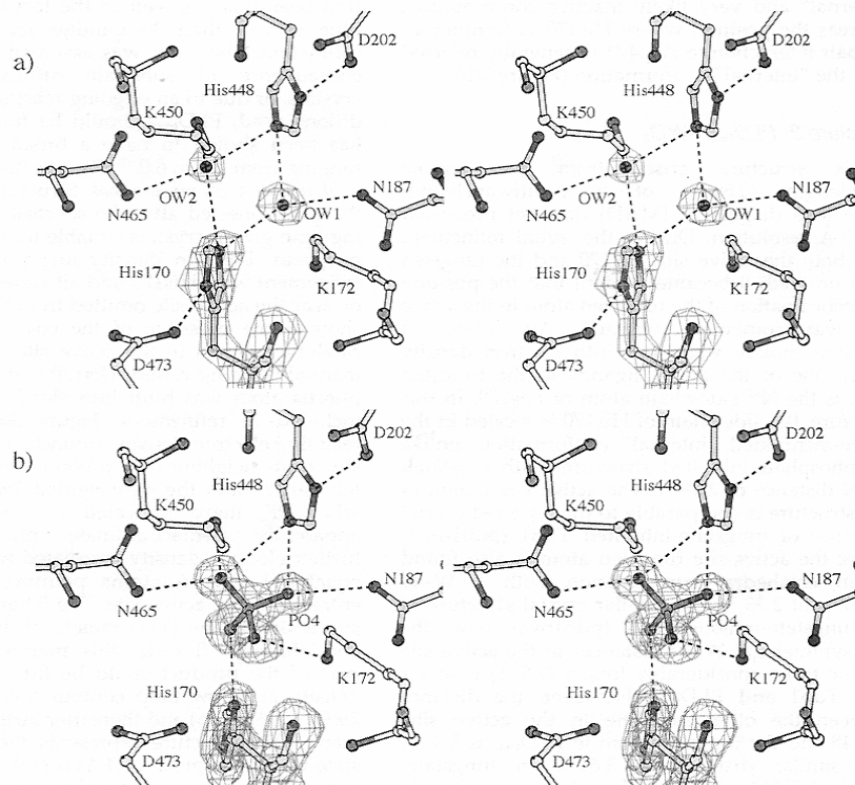


Abbildung 6: Aktives Zentrum der PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF (Leiros et al., 2004).
 a) Nativer Zustand. Zwei Wassermoleküle (OW1 und OW2) besetzen die Bindungsstellen des Phosphatanteils des Substrates b) Phosphat-inhibierte PLD_{PMF}.

Die seit kurzem vorliegenden Kristallstrukturen der PLD_{PMF} mit kurzkettigem Substrat oder Produkt (Leiros et al., 2004) gestatten nähere Einblicke in den Katalysemechanismus. Mit diesen Kristallstrukturen konnte eindeutig bewiesen werden, dass den beiden Histidin-Resten des aktiven Zentrums bei der Katalyse verschiedene Aufgaben zukommen (**Abbildung 7**). Der Imidazol-Stickstoff des N-terminalen His170 greift das Phosphoratom des Phospholipid-Substrates nucleophil an. Diesem nucleophilen Angriff folgt die Bildung eines penta-kordinierten, instabilen Phosphat-Intermediates, bevor das C-terminale His448 als Säure fungiert, die den Sauerstoff des freigesetzten Cholins protoniert. Dies führt zur Bildung eines stabilen tetrahedralen Reaktionsintermediates mit einer kovalenten P-N-Bindung zum His170. His448 ist nun in der Lage, das Wassermolekül zu deprotonieren und Phosphatidsäure freizusetzen.

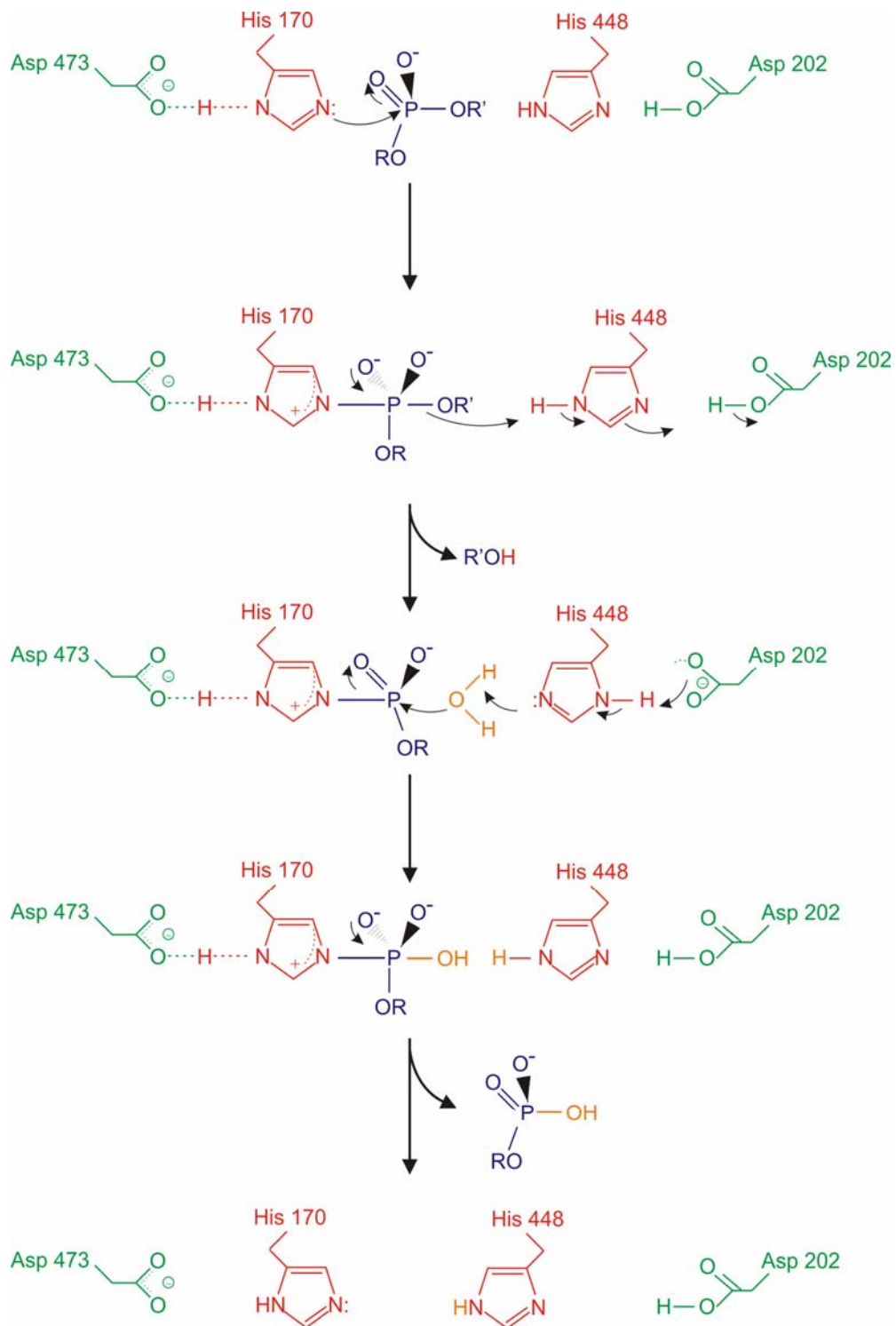


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus für PLD aus *Streptomyces* sp. Stamm PMF mit Phosphatidylcholin als Substrat (nach: Leiros et al., 2004). R, Diacylglycerol; R', Cholin.

Leider ist noch keine dreidimensionale Struktur einer pflanzlichen PLD bekannt, obwohl die Kristallisation einer PLD α aus *Vigna unguiculata* gelungen ist (Abergel et al., 2001). Da die pflanzlichen PLDs wesentlich größer als die mikrobiellen PLDs sind und der Grad der Übereinstimmung der Sequenzen gering ist (< 20 %), können diese Ergebnisse der PLD_{PMF} nicht ohne weiteres auf die pflanzlichen PLDs übertragen werden, obwohl zu erwarten ist,

dass zumindest der Reaktionsmechanismus prinzipiell gleich verläuft. Diese Erwartung wird gestützt durch eine erst kürzlich veröffentlichte, durch molekulare Modellierung basierend auf der Struktur der PLD_{PMF}, abgeleitete Struktur der katalytischen Region der Säuger-PLD1 (Exton, 2004; **Abbildung 8**).

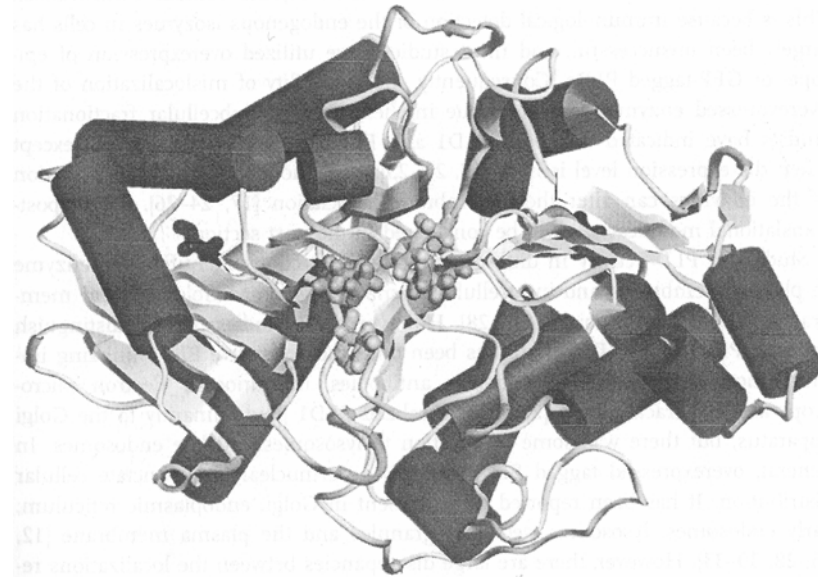


Abbildung 8: Modellerte katalytische Region der PLD1 (Exton, 2004). Die Strukturen im Zentrum stellen die Histidin- und Lysin-Reste der HKD-Motive dar.

2.6 Zelluläre Funktionen sowie Aktivierungs- und Regulationsmechanismen pflanzlicher PLDs

2.6.1 Funktion der pflanzlichen PLDs in zellulären Prozessen

Eine Beteiligung der PLD an Signalwegen von Phytohormonen (Abscisinsäure, Ethylen), beim verletzungsinduzierten Lipidabbau, bei der Pflanzen-Pathogen-Interaktion, bei der Stress-induzierten Membranumgestaltung, bei den Prozessen der Seneszenz und Alterung und der Membranlipid-Umgestaltung sowie der Proliferation in Pflanzen wird diskutiert (Wang, 2000; **Abbildung 9**). Die Funktion der PLD in diesen Prozessen wird nachfolgend im Einzelnen dargestellt.

Durch verschiedene Methoden konnte nachgewiesen werden, dass die PLD α eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung des Abscisinsäure-Signals und der Ausprägung der Wirkung spielt. So kann zum Beispiel die Stimulation der Seneszenz in *Arabidopsis thaliana* infolge von Abscisinsäure-Gabe durch Unterdrückung der Expression des *pld α* -Gens vermindert werden (Fan et al., 1997). Es konnte weiterhin durch Nachweis einer erhöhten PLD α -Promotor-Aktivität und mRNA-Menge (Fan et al., 1997; Ryu et al., 1995; Xu et al., 1997) gezeigt werden, dass die Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit Abscisinsäure zu einer

erhöhten PLD α -Genexpression führt, die einen verstärkten Membranabbau, einen niedrigeren Gehalt an Chlorophyll, eine reduzierte Photosyntheseleistung und einen höheren Verlust an Ionen verursacht. Auch bei der Behandlung von Aleuronzellen des Endosperms der Gerste mit Abscisinsäure (Ritchie und Gilroy, 1998) wurde eine erhöhte PLD-Aktivität gemessen. Das macht eine Beteiligung der PLD an der Signalisierung der durch Abscisinsäure regulierten Samenruhe und Samenkeimung wahrscheinlich. Darüber hinaus ist die PLD auch in die Signalkaskade eines zweiten Phytohormons, des Ethylens, einbezogen, das ebenfalls bei der Stressantwort und der Regulation der Seneszenz eine Rolle spielt.

Der erste spezifische zelluläre Prozess, mit dem die PLD in Verbindung gebracht wurde, ist der verletzungsinduzierte Lipidabbau, wie er beispielsweise bei der Zerkleinerung und Homogenisierung von frischem Möhrengewebe (Hanahan und Chaikoff, 1947) beobachtet wurde. Verwundungen und Verletzungen können Pflanzen durch Insektenfraß, Wind- und Frosteinflüsse und Pathogenbefall zugefügt werden. Eine Korrelation zwischen dem PLD-Expressionsmuster und dem Befall von *Oryza sativa*-Blättern mit *Xanthomonas oryzae* weist ebenfalls auf eine Beteiligung der PLD an Pflanzen-Pathogen-Interaktionen hin (Young et al., 1996).

Ein erhöhter Abbau von Membranphospholipiden spielt auch unter Stressbedingungen eine Rolle, wie zum Beispiel nach Exposition mit Kälte, Trockenheit, γ -Strahlung sowie gasförmigen Schadstoffen (z.B. SO₂) oder in Folge von Nahrungsmangel (Willemot, 1983; Voisine et al., 1993; Wang, 2000).

Da Membranen während der Seneszenz und des Alterns ihre Integrität verlieren und dies mit einer fortschreitenden Abnahme des Membranphospholipidgehaltes und einer korrelierenden Erhöhung des Gehaltes an freien Fettsäuren und Sterolen verbunden ist (Thompson, 1988), wird vermutet, dass der PLD-vermittelte Lipidabbau eine Rolle beim Membranabbau von sich in der Seneszenz befindlichen Geweben und bei Alterungsprozessen von Samen spielt. Diese Annahme wird gestützt durch den Nachweis einer erhöhten PLD-Aktivität und PA-Bildung in Nelkenblüten, Bohnenkotelydonen, Tomatenfrüchten, Kohlblättern und Brokkoliblüten (Thompson, 1988; Voisine et al., 1993; Samama und Pearce, 1993).

Aber auch in jungen, schnell wachsenden Geweben, wie denen des Sprossmeristems, des Hypokotyls und der axialen Zonen der Knospenbildung, wo der Membranumgestaltung und den Proliferationsprozessen eine große Bedeutung zukommt, wurde ein erhöhtes PLD-Aktivitätsniveau beobachtet (Xu et al., 1997). Die Beschleunigung des Zellwachstums und der Proliferation erfolgt vermutlich über die Erzeugung mitoseauslösender Signale und die Synthese von Intermediaten für die Membranlipidsynthese und Membranumgestaltung.

Weiterhin wurde ein erhöhtes PLD-Expressionsniveau in den Verbindungsregionen zwischen Haupt- und Seitenwurzeln und den Streckungs- und Differenzierungszone der Wurzeln beobachtet. Auch hier müssen die Zellen den Änderungen und/oder Schädigungen, die aus Gewebeexpansionen und Zelldifferenzierungen resultieren, gewachsen sein.

Ein weiterer Prozess, der mit einem schnellen Membranumbau und einer Proliferation verbunden ist, stellt die Keimung von Samen sowie das Keimlingswachstum dar.

2.6.2 Mögliche Aktivierungsmechanismen der pflanzlichen PLDs

In **Abbildung 9** sind mögliche Aktivierungsmechanismen für pflanzliche PLDs dargestellt, die hier kurz erörtert werden sollen.

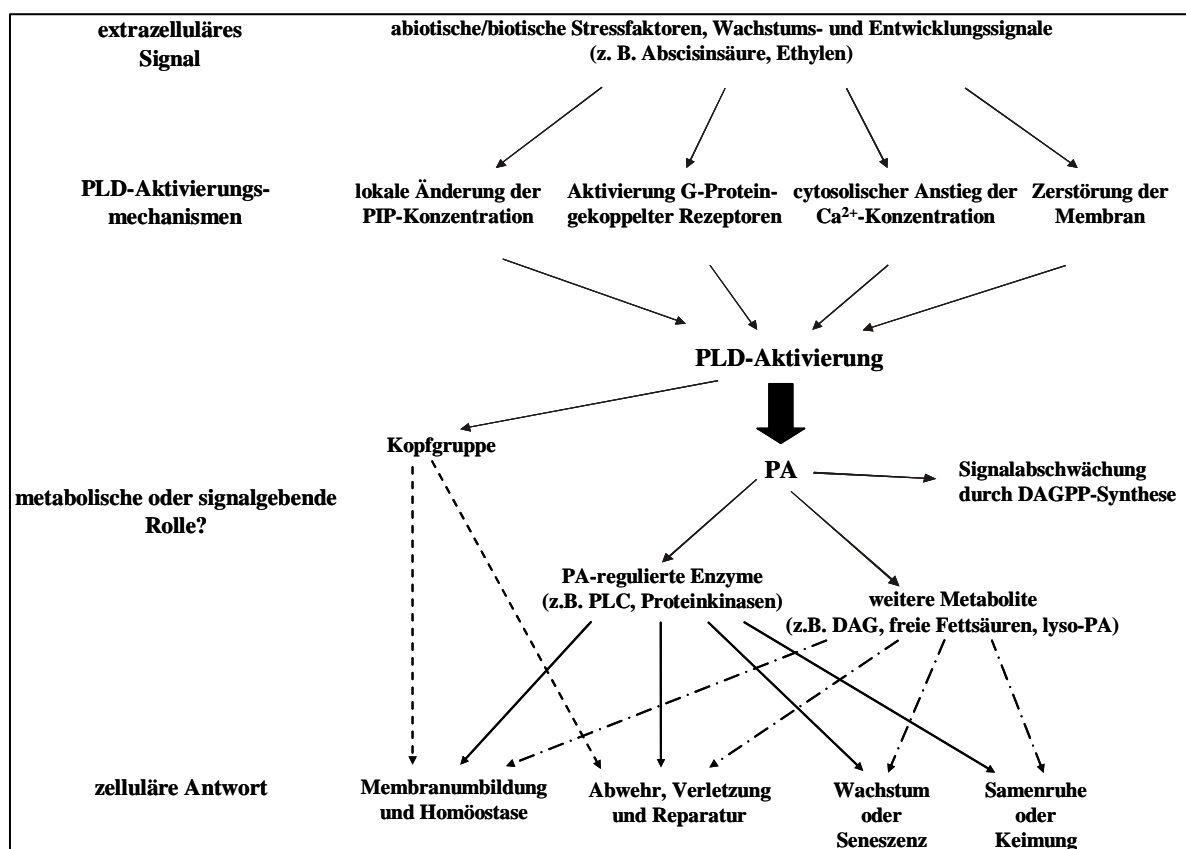


Abbildung 9: Mögliche Mechanismen der Aktivierung und Rolle pflanzlicher PLD im Metabolismus und im Signalweg (nach: Pappan und Wang, 1999). DAG, Diacylglycerol; DAGPP, Diacylglycerolpyrophosphat; PA, Phosphatidsäure; PIP, Phosphatidylinositphosphat; PLC, Phospholipase C; PLD, Phospholipase D.

Extrazelluläre Signale werden von Membranrezeptoren registriert und über Kaskaden gekoppelter Reaktionen ins Zellinnere weitergeleitet. Die Signalübertragung durch G-Proteine verläuft in enger Assoziation mit der inneren Seite der Zellmembran. Pflanzliche PLDs werden aller Wahrscheinlichkeit nach durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert.

Ca^{2+} -Ionen als einem wichtigen *second messenger* in pflanzlichen Zellen wird eine aktivierende und regulatorische Wirkung auf pflanzliche PLDs zugeschrieben. Die Konzentration des freien Ca^{2+} im Cytosol ist sehr niedrig und liegt bei 100 nM. Im Extrazellulärbereich liegt die Ca^{2+} -Konzentration dagegen im millimolaren Bereich. An der Regulation sind die folgenden Prozesse beteiligt: die Freisetzung aus Ca^{2+} -Speichern, der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum über verschiedene membranständige Ca^{2+} -Kanäle sowie der Rücktransport in die Ca^{2+} -Speicher. Bei Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle steigt die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf ca. 1 μM . Unter diesen Bedingungen arbeiten die Ca^{2+} -Transportsysteme sehr effizient. Bei einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf 10 μM , z.B. infolge einer Zellschädigung, wird ein für die Zelle kritischer Wert erreicht, und Ca^{2+} wird mit Hilfe von Ca^{2+} -Transportern der inneren Mitochondrienmembran in die Mitochondrien eingeschleust.

Ein weiteres wichtiges Regulationselement ist die Phosphatidsäure (PA), die durch PLD-katalysierte Hydrolyse gebildet wird und metabolisch instabil ist, da sie der Cytidindiphosphodiacylglycerol-Synthase als Substrat für die Herstellung von Cytidindiphosphodiacylglycerol (CDP-DAG) dient. CDP-DAG ist ein wichtiger Ausgangsstoff für die Synthese der sauren Phospholipide (Kent, 1995). Die dafür benötigten Kopfgruppen werden entweder neu synthetisiert, oder es wird die bei der PLD-katalysierten Hydrolyse freigesetzte Kopfgruppe wiederverwendet. Die PLD-katalysierte Transphosphatidylierung konnte bisher in Pflanzen nicht direkt nachgewiesen werden. Die regulatorische Wirkung von PA in Pflanzenzellen beruht zum einen darauf, dass PA in Membranen bei Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen bevorzugt hexagonale Phasen bildet (Cullis et al., 1986), deren Einlagerung in intakte Membranen eine Destabilisierung der Bilayerstruktur bewirkt und zu einer Erhöhung der negativen Ladung führt, in deren Folge noch mehr Ca^{2+} in die Zellen eindringen kann. Zum anderen kann durch Dephosphorylierung mit Hilfe einer Phosphohydrolase Diacylglycerol (DAG) aus PA gebildet werden. DAG ist ein wichtiger *second messenger*, der primär über die Stimulierung der Proteinkinase C wirkt. Durch die PLA_2 kann PA des Weiteren zu Lysophospholipiden und freien Fettsäuren umgesetzt werden, die anschließend über den Octadecanoid-Weg zu biologisch aktiven Molekülen, wie z.B. Jasmonsäure, metabolisiert werden (Munnik et al., 1998). Jasmonsäure und ihre Methylester sind hormonähnliche Signalsubstanzen, die unter anderem wie auch die Abscisinsäure die Seneszenz auslösen.

Weiterhin aktiviert das durch die PLD-katalysierte Hydrolyse freigesetzte PA auch die Phosphatidylinositol-5-phosphat-Kinase, die PKC sowie die PLC, die von besonderer

regulatorischer Bedeutung für die Spaltung von Inosit-haltigen Phospholipiden ist und die Freisetzung von DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) katalysiert. PIP_2 wird aus Phosphatidylinositol (PI) durch die Phosphorylierung des Inosit-Restes in 4' und 5'-Stellung mittels spezifischer Kinasen gebildet. PIP_2 kann auch durch die Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat-Kinase weiter zu Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat, einem membranständigen Botenstoff, phosphoryliert werden. Die beiden *second messenger* IP_3 und DAG lösen weitere spezifische Reaktionsketten aus. IP_3 aktiviert die Freisetzung von Ca^{2+} , während DAG, wie bereits oben erwähnt, primär über die Stimulierung der PKC wirkt. Aus DAG kann durch die Diacylglycerolkinase wiederum PA gebildet werden. Durch die Bildung von Diacylglycerolpyrophosphat infolge der Phosphorylierung von PA kommt es hingegen zu einer Abschwächung der Signalgebung (Munnik et al., 1998).