

### 3 Materialien

#### 3.1 Chemikalien

Acrylamid	Applichem GmbH, Darmstadt
Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Agarose	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Ammoniumsulfat	Applichem GmbH, Darmstadt
Ampicillin, Natriumsalz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
L-Arabinose	Applichem GmbH, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Merck Biosciences, Darmstadt
Caseinhydrolysat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Merck Biosciences, Darmstadt
Coomassie-Brillant-Blau G 250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
dNTP-Mix	Thermo Hybaid GmbH, Ulm
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
D-Glucose	Applichem GmbH, Darmstadt
Glycerin (87 %, 100 %)	Merck Biosciences, Darmstadt
Glycin	Applichem GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
n-Hexan (>99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Kanamycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Kupfersulfat (Pentahydrat)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Milchpulver	Oxoid Ltd., Basingstoke (England)
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Octanol (97 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Octyl-Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Phenyl-Sepharose 6 Fast flow	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Phosphatidyl-p-nitrophenol	synthetisiert von Dr. R. Schöps, MLU Halle-Wittenberg

Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Q-Sepharose Fast flow	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Regenbogenmarker	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Rinderserumalbumin	Pierce, Rockford (USA)
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Applichem GmbH, Darmstadt
Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

### 3.2 Enzyme

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme <i>Ban I</i> , <i>Ban II</i> , <i>Bgl II</i> , <i>BspM I</i> , <i>BstAP I</i> , <i>BstB I</i> , <i>Fsp I</i> , <i>Nco I</i> , <i>Nde I</i> , <i>Nsi I</i> , <i>Hind III</i> , <i>Sal I</i> , <i>Sap I</i> , <i>Sfc I</i> , <i>SnaB I</i> , <i>Tfi I</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNaseOUT™ (40 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Shrimp alkalische Phosphatase (1 U/μl)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
SuperScript™III RT (200 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
T4-DNA-Ligase (200 U/μl; 1 WeissU/μl)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 3.3 Antikörper

Anti-Kohl-PLD2-Antikörper aus Kaninchen	Comenius-Universität Bratislava (Dr. J. Rajcani)
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Esel	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

### 3.4 Phospholipide

Soja-Phosphatidsäure	Lipoid GmbH, Ludwigshafen
Soja-Phosphatidylcholin	Lipoid GmbH, Ludwigshafen
Soja-Phosphatidylglycerol	Lipoid GmbH, Ludwigshafen

### 3.5 Kits

ECL-Plus Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford (USA)
PolyATtract® System 1000	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
PUREGENE® DNA Isolation Kit	Gentra Systems, Minneapolis (USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)
QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)
SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 3.6 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. In den nachfolgend aufgeführten Oligonucleotiden sind die zur Ausgangssequenz veränderten Basen gelb markiert, die dabei eingeführten Restriktionsschnittstellen unterstrichen bzw. die entfernten Restriktionsschnittstellen durch Streichung des entsprechenden Restriktionsenzym dargestellt. Blau gekennzeichnet sind die Plasmide, die in Abweichung zum Wildtyp-Plasmid als Template für die Mutagenese-PCR eingesetzt wurden. Bei den Oligonucleotiden für das QuikChange-Mutagenese-Verfahren wurde nur der *forward*-Primer angegeben. Der *reverse*-Primer ist entsprechend revers komplementär.

#### Primer für die Sequenzbestimmung der Mohn-PLD-Isoenzyme

<b>Start Mohn PLDfw</b>	5´-ATG GCT CAG ATT YYT CTC CAY GGA ACT CTC CA-3´
<b>MohngF3-1rv</b>	5´-ATT AGT AGA GAG AAA GAA GGA TAG AAC-3´
<b>MohngF3-2rv</b>	5´-GAG AAA GAA GGA TAT AAG TAC ATA ACC-3´
<b>MohnPLD2F2rv</b>	5´-CGT ACA TCA TGT CCC AAG TCC-3´

### Primer für die Klonierung der Mohn-PLD-Isoenzyme

#### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

**ΔncoI mohnfw** 5'-GAT TCT GAA ATT GCA ATG GGA GGT TAC-3'

**Δ2ncoI mohnfw** 5'-CAG ATT TCT CTC CAC GGA ACT CTA CAT G-3'

**ΔhindIII mohnfw** 5'-GTT CTT TAG GAA ACT TGT GGA AAA C-3'

#### PCR-Verfahren

**mohn ncofw** 5'-CCG CGA ATT CGT CCC CAT GGC TCA GAT TT-3'

**mohn1hindrv** 5'-AGA GAG AAA GAA GGA AGC TTA CTA TGT TGT GAG AAT AGG-3'

**mohn2hindrv** 5'-AAG AAG GAT ATA AGT AAG CTT ACT ATG TAG TGA GAA TTG-3'

### Primer für die Klonierung der Kohl-PLD2

#### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

**Δncopl2fw** 5'-CTC GTG GCC AGG TTC ATG GGT TCC GTA T-3'

**mutncofw** 5'-GAA GGA GAT ATA CCC ATG GCC CAG CA-3'

**mutxbafw** 5'-CCT TAC AAC TTA ATA GAA TCT AGA ACC GGC TGC TAA  
CAA AG-3'

#### PCR-Verfahren

**pTWIN1 fw** 5'-GTT TAA CTT TAA GAA GGC TCT TCC AAC ATG GC-3'

**pTWIN1 rv** 5'-GCG CAG GAA GAG CTC TAT TAA GTT GTA AGG ATT G-3'

### Primer für die Mutagenese der Kohl-PLD2

#### Enzymvarianten in den katalytischen Motiven

#### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

##### T264Dfw

5'-CTT AAA AAG AAA GCT GAC GAA GGC GTT AG-3'

##### H333Dfw

5'-GCC ATG TTC ACG CAT GAT CAG AAG ATC GTA GTT G-3'

##### K335Rfw

*Sfc I* (G/TRYAG)

5'-GTT CAC GCA CCA CCA ACG TAT AGT AGT TGT GGA CAG C-3'

##### D340Efw

*Tfi I* (G/AWTC)

5'-GAA GAT CGT AGT TGT GGA ATC CGA GGT GCC GAG CCA-3'

##### Q334Sfw

*Bst BI* (TT/CGAA)

5'-CCA TGT TCA CGC ACC ATT CGA AGA TCG TAG TTG TGG AC-3'

##### V339TE342AV343Mfw

*Ban I* (G/GYRCC)

5'-AGA AGA TCG TAG TTA CTG ACA GCG CGA TGC CGA GCC AAG-3'

**H663Dfw***Sal I* (G/TCGAC)5´-CTT CAT GAT CTA CGT CGA CAG CAA AAT GAT GAT TG-3´**ZM K665R/S664Hfw***Bst BI* (TT/CGAA)5´-CAT GAT CTA CGT CCA TTC GAA AAT GAT GAT TGT TGA C-3´**K665Rfw (ZM K665R/S664H)**~~*Bst BI*~~ (TT/CGAA)5´-GAT CTA CGT CCA TTC GCG CAT GAT GAT TGT TGA CG-3´**S664Hfw (ZM K665R/S664H)**~~*Bst BI*~~ (TT/CGAA)5´-CAT GAT CTA CGT CCA CCA CAA AAT GAT GAT TGT TGA C-3´**D670Efw**5´-TGA TGA TTG TTG AGG ATG AGT ACA TTA TC-3´

## C-terminale Enzymvarianten

**QuikChange-Mutagenese-Verfahren****Δ 812pRSET5afw***Sna BI* (TAC/GTA)5´-CCT GCC TCC AAT CCT TAC GTA GTA ATA GAA GCT TGA TCC GGC-3´**Δ 812pET-28b(+)**fw*****Sna BI* (TAC/GTA)5´-CCT CCA ATC CTT ACG TAG TAA TAG AAG CTT GC-3´**Δ 808-812fw**~~*Bsp MI*~~ (ACCTGCNNNN/)5´-GAA ACA AAG TAG ACT ACC TCC CT TAAA TCC TTA CAA CTT AAT AGA A-3´**Δ 804-812fw**~~*Bsp MI*~~ (ACCTGCNNNN/)5´-CGT ATC CTC GGA AAC AAA GTA TAA TTC CTG CCT CCA ATC CTT AC-3´**Δ 801-812fw**5´-CGT ATC CTC GGA TAA CAA AGT AGA CTA C-3´**T812Afw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-GCC TCC AAT CCT TAC AGC GTA ATA GAA GCT TGA TCC-3´**T812Cfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GTG CTA ATA GAA GCT TGA T-3´**T812Dfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-ATC CTT ACG GAT TAA TAG AAG CT-3´**T812Ffw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-GCC TCC AAT CCT TAC ATT CTA ATA GAA GCT TGA TCC-3´**T812Gfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GGG CTA ATA GAA GCT TGA T-3´**T812Kfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GAA ATA ATA GAA GCT TGA T-3´**T812Nfw (Δ 812)**~~*Sna BI*~~ (TAC/GTA)5´-TCC AAT CCT TAC GAA CTA ATA GAA GCT TGA T-3´

**T812Rfw (Δ 812)**~~*Sna*~~-*BI* (TAC/GTA)

5′-TCC AAT CCT TAC GCG TTA ATA GAA GCT TGA T-3′

**T812Sfw (Δ 812)**~~*Sna*~~-*BI* (TAC/GTA)

5′-GCC TCC AAT CCT TAC ATC TTA ATA GAA GCT TGA TCC-3′

**T812Vfw (Δ 812)**~~*Sna*~~-*BI* (TAC/GTA)

5′-TCC AAT CCT TAC GGT GTA ATA GAA GCT TGA T-3′

**T812Yfw (Δ 812)**~~*Sna*~~-*BI* (TAC/GTA)

5′-GCC TCC AAT CCT TAC ATA CTA ATA GAA GCT TGA TCC-3′

**PLD2+SpRSET5afw**~~*Hind*~~-*III* (A/AGCTT)

5′-CAA TCC TTA CAA CTT CTT AGC AGC TTG ATC CGG C-3′

**PLD2+SpET-28b(+)*fw***~~*Hind*~~-*III* (A/AGCTT)

5′-CAA TCC TTA CAA CTT CTT AGC AGC TTG CGG CGG-3′

## Cystein-Enzymvarianten

**QuikChange-Mutagenese-Verfahren****C181Sfw***Ban* II (GRGCY/C)

5′-GAG ACA GGG CTC CAA AGT TTC TTT-3′

**ZM C307S/C310Sfw***Bst* *API* (GCANNNN/NTGC)

5′-TAG CGA AGT GCA TTC TGT GCT GT C TCC ACG TAA CCC T-3′

**C307Sfw (ZM C307S/C310S)**~~*Bst*~~ *API* (GCANNNN/NTGC)

5′-GAA GTG CAT TCT GTG TTG TGT CCA CGT AAC CCT-3′

**C310Sfw (ZM C307S/C310S)**~~*Bst*~~ *API* (GCANNNN/NTGC)

5′-GCG AAG TGC ATT GTG TGT TGT CTC CAC GTA AC-3′

**C741Sfw**~~*Nsi*~~ I (ATGCA/T)

5′-CTC GAG CTT GGA ATC CAT TGA GAA AGT TA-3′

**MultiQuikChange-Mutagenese-Verfahren****C85S***Fsp* I (TGC/GCA)

5′-P-CCT TCC ACA TCT ACT CTG CGC ACA TGG CTT CAG-3′

**C212S***Bgl* II (A/GATCT)

5′-P-CTC ACA GAT CTT GGG AGG ATA TT-3′

**C365S**

5′-P-GTA TTG ATC TCT CCG ACG GAC GTT-3′

**C625S**

5′-P-GAC GTT CTT CTC CCT TGG AAA C-3′

Enzymvariante V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V

### QuikChange-Mutagenese-Verfahren

**V339T/E342A/V343Mfw** *Bam*<sup>I</sup> (G/GYRCC)

5´-AGA AGA TCG TAG TTA CTG ACA GCG CGA TGC CGA GCC AAG-3´

**Δ351/352fw (V339T/E342A/V343M)**

5´-CCA AGG AGG AGG GTC GAG GAG GAT CAT GAG C-3´

**Q346E/G348S/G349Q/S350Q/M356Vfw (V339T/E342A/V343M/Δ351/Δ352)**

5´-GAG GTG CCG AGC GAA GGA AGC CAA CAG AGG AGG ATC GTG AGC TTT GTC  
GGA-3´

### Sequenzierungsprimer

**M13fw** 5´-IRD800-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3´

**M13rv** 5´-IRD800-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3´

**T7promotor** 5´-IRD800-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3´

**T7terminator** 5´-IRD800-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3´

**pBAD22fwseq** 5´-IRD800-CTG TTT CTC CAT ACC CGT T-3´

**pBAD22rvseq** 5´-IRD800-GGC TGA AAA TCT TCT CT-3´

**SspDnaBinteinfw** 5´-IRD800-ACT GGG ACT CCA TCG TTT CT-3´

**MxeInteinrv** 5´-IRD800-GGC ACG ATG TCG GCG ATG-3´

**PLD2midfw** 5´-IRD800-GTT CAG GAC GTT GGA CAC-3´

**Sonde2rv** 5´-IRD800-TTA CCA CCY TGC TTT CTC CAT CTC TGC TC-3´

**Mohnseqfw** 5´-IRD800-CAA CTT GAG AGA GCT TTC TGA-3´

**Mohnseqrv** 5´-IRD800-TGC GGT CGA TGA TGT TGT C-3´

### 3.7 Plasmide

pBAD22 Amp<sup>r</sup>, Beckwith Lab., Boston (USA)

pCR4-TOPO Kan<sup>r</sup>, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pET-28b(+) Kan<sup>r</sup>, Merck Biosciences, Darmstadt

Kohl*pld2*pRSET5a Amp<sup>r</sup>, Dr. I. Schäffner (Schäffner et al., 2002)

pUBS520 Kan<sup>r</sup>, Dr. I. Schäffner (Schäffner et al., 2002)

pTWIN I Amp<sup>r</sup>, New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)

### 3.8 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Merck Biosciences)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> ER 2566 (NEB)	F <sup>-</sup> $\lambda$ <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ:: T7 gene 1 gal sulA11 <math>\Delta</math>(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) (Merck Biosciences)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1</i> (DE3) <i>pRARE</i> (Cm <sup>R</sup> )
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS (Merck Biosciences)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1</i> (DE3) <i>pLysSRARE</i> (Cm <sup>R</sup> )
<i>E. coli</i> TOP 10 (Invitrogen)	F <sup>-</sup> <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80 lacZ <math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 deoR araD139 <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galU galK rpsL (str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (tet<sup>R</sup>)]</i>
<i>E. coli</i> XL10-Gold ultrakompetent (Stratagene)	Tet <sup>R</sup> <i><math>\Delta</math>(mcrA)183 <math>\Delta</math>(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (tet<sup>R</sup>) Amy Cm<sup>R</sup>]</i>

### 3.9 Kulturmedien

#### Luria Bertani (LB)-Flüssigmedium:

LB-Flüssigmedium enthält pro Liter 10 g NaCl, 10 g Trypton und 5 g Hefeextrakt.

#### 2 × YeastTrypton (2 × YT)-Flüssigmedium:

2 × YT-Flüssigmedium enthält pro Liter 10 g NaCl, 20 g Trypton und 10 g Hefeextrakt.

#### LB-Agarplatten:

LB-Agarplatten bestehen aus LB-Flüssigmedium, dem 20 g Agar pro Liter zugesetzt wurde.



Den Medien wurden die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (Ampicillin 50 bis 100 µg/ml [Amp], Choramphenicol 25 µg/ml [Cm], Kanamycin 10 bis 50 µg/ml [Kan]).

SOC-Medium:

SOC-Medium enthält pro Liter 10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung und 20 ml 20% (w/v) Glucoselösung.

**3.10 Pflanzenmaterialien**

Die Schlafmohnsamen der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky wurden von Dr. L. Bezakova (Pharmazeutische Fakultät der Comenius-Universität Bratislava) zur Verfügung gestellt.