

4 Methoden

4.1 Keimung der Schlafmohnsamen

In einer Petrischale wurden Samen der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky auf zuvor mit Leitungswasser angefeuchtetem Filterpapier zur Keimung gebracht. Die Petrischalen wurden 4 Tage bei 25°C im Dunkeln aufbewahrt. Die 4 Tage alten Keimlinge wurden mit einer Pinzette vom Endosperm separiert und als Ausgangsmaterial für die Isolierung der genomischen DNA sowie der Gesamt-RNA/mRNA verwendet.

4.2 Präparation von Nucleinsäuren

4.2.1 Isolierung von mRNA aus Schlafmohn

Die Isolierung der mRNA erfolgte direkt aus 4 Tage alten Keimlingen mit dem PolyATtract® System 1000. Dazu wurden 100 mg 4 Tage alte Schlafmohnkeimlinge der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky mittels Mörser und Pistill mit wenig Seesand und flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das dabei entstandene Gewebepulver wurde nach Anleitung des Kit-Herstellers weiter aufgearbeitet. Die mRNA wurde mit 800 µl RNase-freiem Wasser eluiert und nachfolgend durch Ethanolpräzipitation konzentriert (4.2.3).

4.2.2 DNA-Präparation

4.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schlafmohn

Für die Isolierung der genomischen DNA wurden 1000 mg 4 Tage alte Schlafmohnkeimlinge der Sorte *Papaver somniferum* L. Váhovecky als Ausgangsmaterial mittels Mörser und Pistill, Seesand sowie flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die Isolierung erfolgte mit dem PUREGENE® DNA Isolation Kit nach Anleitung des Herstellers.

4.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmide aus der Bakterienkultur erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Anleitung des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde 2 × mit 40 µl Puffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

4.2.2.3 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel

Zur Isolierung der DNA wurde diese mit einem Skalpell aus dem Agarosegel (4.2.5) ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Agarosegelstück nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die DNA wurde $2 \times$ mit $30 \mu\text{l}$ Puffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

4.2.3 Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren

Zur Nucleinsäureprobe wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatpuffer, pH 5,2, zugegeben, gut gemischt und mit dem 2,5-fachen Volumen 100 %igem Ethanol gefällt. Der Fällungsansatz wurde bei -80°C (RNA) oder Raumtemperatur (DNA) 10 min bis 2 h (in Abhängigkeit von der Menge der zu fällenden Nucleinsäure) inkubiert und anschließend zentrifugiert. Durch nachfolgendes Waschen mit einem Volumen 70 %igem Ethanol wurde das mitgefällte Salz größtenteils entfernt. Das Nucleinsäurepellet wurde 2 min an der Luft (RNA) bzw. unter Vakuum (SpeedVac-Savant; LifeScience-International GmbH, Frankfurt am Main; DNA) getrocknet und entsprechend dem weiteren Verwendungszweck im jeweiligen Puffer gelöst.

4.2.4 Konzentrations- und Größenbestimmung von Nucleinsäuren

4.2.4.1 Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren

Die Konzentration von Nucleinsäurelösungen ($>25 \mu\text{g/ml}$) wurde photometrisch in einem Ultrospec 3000 Spektrophotometer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Ein Absorptionswert $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 entspricht $50 \mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, $40 \mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA und $33 \mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA (Sambrook et al., 2001). Die Reinheit der Nucleinsäurelösung wurde durch Bestimmung des Verhältnisses $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ -Wert geprüft. Geringere Konzentrationen können im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel anhand des Molekulargewichtsmarkers abgeschätzt werden.

4.2.4.2 Größenbestimmung der Nucleinsäuren

Die Größenbestimmung der Nucleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards (Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter) im Agarosegel (4.2.5).

4.2.5 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 0,5 bis 2 % ige (w/v) Gele verwendet. Den DNA-Lösungen wurde Probenpuffer zugegeben (10 × DNA-Probenpuffer: 50 % [v/v] 20 × TAE, 49,75 % [v/v] Glycerin, 0,25 % [w/v] Bromphenolblau). Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm Elektrodenabstand mit TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA in einer Ethidiumbromidlösung (1,5 µg/ml in TAE) angefärbt und nach Spülen mit Wasser mittels UV-Licht ausgewertet.

4.3 cDNA-Synthese

1 µl genspezifischer cDNA-Synthese-Primer (2 pmol; MohnG3-1rv für *pld1* bzw. MohnG3-2rv für *pld2*; 3.6), 11 µl mRNA (bis zu 500 ng) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) wurden zur Auflösung von Sekundärstrukturen 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden folgende Reagenzien in angegebener Reihenfolge zupipettiert: 4 µl 5 × Erst-Strang-Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl) und 2 µl SuperScript™III RT (200 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 55°C inkubiert und anschließend durch 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Für die nachfolgende Amplifizierung mittels PCR war es erforderlich, die zur cDNA komplementäre mRNA durch RNase H zu entfernen. Dazu wurden dem inaktivierten cDNA-Synthese-Ansatz 1 µl (2 U) *E. coli* RNase H-Lösung zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert.

4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung des unbekanntes Sequenzbereiches der cDNA bzw. der genomischen DNA und zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für nachfolgende Klonierungen wurde die Polymerasekettenreaktion angewendet.

1. PCR-Ansatz zur Bestimmung der Nucleotidsequenz der mRNA (jeweils 50 µl-Ansatz pro Isoenzym):

- 5 µl 10 × *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Start Mohn PLDfw (10 pmol)
- 1 µl MohnG3-1rv bzw. MohnG3-2rv (jeweils 10 pmol)
- 2 µl cDNA (cDNA der Mohn-*pld1* bzw. der Mohn-*pld2*; 4.3)
- 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase
- 39 µl steriles, deionisiertes Wasser

2. PCR-Ansatz zur Bestimmung der Nucleotidsequenz der genomischen DNA ($8 \times 50 \mu\text{l}$ -Ansätze für Gradienten-PCR):

5 μl $10 \times$ *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
 1 μl dNTP-Mix (10 mM)
 1 μl Start Mohn PLDfw (10 pmol)
 1 μl MohnPLD2F2rv (10 pmol)
 0,5 μl genomische DNA (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 4.2.2.1)
 1 μl *Pfu*-DNA-Polymerase
 40,5 μl steriles, deionisiertes Wasser

Cycle-Profil für 1. und 2. PCR-Ansatz:	Denaturierung	95°C	3 min	} 40 Zyklen
	Denaturierung	95°C	1 min	
	<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Pause	4°C		

Die Gradienten-PCR wurde bei folgenden *Annealing*-Temperaturen durchgeführt: 50,0°C, 51,3°C, 53,5°C, 56,6°C, 61,2°C, 64,5°C, 66,7°C und 68,0°C. Zur Auswertung der PCRs wurde jeweils 1/10 des Volumens des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

3. PCR-Ansatz zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung von *Mohnpld1* sowie *Mohnpld2* in den Vektor pET-28b(+) (50 μl -Ansatz):

5 μl $10 \times$ *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
 1 μl dNTP-Mix (10 mM)
 1 μl mohn ncofw (10 pmol)
 1 μl mohn1hindrv bzw. mohn2hindrv (jeweils 10 pmol)
 1 μl *pld1*pCR4-TOPO bzw. *pld2*pCR4-TOPO ($\Delta\text{ncoI}/\Delta\text{2ncoI}/\Delta\text{hindIII}$; 40 ng)
 1 μl *Pfu*-DNA-Polymerase
 40 μl steriles, deionisiertes Wasser

<i>Cycle-Profil:</i>	Denaturierung	95°C	3 min	
	Denaturierung	92°C	1 min	} 30 Zyklen
	<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Synthese	72°C	6 min	
	Pause	4°C		

4. PCR-Ansatz zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung von *Kohlpld2* in den pTWIN1-Vektor (50 µl-Ansatz):

5 µl 10 × *Taq*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
 2,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
 1 µl pTWIN1fw (50 pmol)
 1 µl pTWIN1rv (50 pmol)
 1 µl *Kohlpld2*pRSET5a (3.7; 40 ng)
 1 µl *Taq*-DNA-Polymerase
 38,5 µl steriles, deionisiertes Wasser

<i>Cycle-Profil:</i>	Denaturierung	95°C	3 min	
	Denaturierung	92°C	1 min	} 30 Zyklen
	<i>Annealing</i>	45°C	1 min	
	Synthese	72°C	5 min	
	Synthese	72°C	5 min	
	Pause	4°C		

4.5 Subklonierung von PCR-Produkten in den pCR4-TOPO-Vektor

Um die bei der Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase entstandenen PCR-Produkte in den pCR4-TOPO-Vektor ligieren zu können, war das Anfügen von 3'-A-Überhängen an die glatten DNA-Enden durch *Taq*-DNA-Polymerase notwendig. Ein typischer *Taq*-Reaktionsansatz (10 µl) enthielt: 5 µl gereinigtes PCR-Produkt, 3 µl steriles, deionisiertes Wasser, 1 µl 10 × *Taq*-Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTPs (10 mM) und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase. Nach einer 15-minütigen Reaktion bei 72°C erfolgte die Subklonierung dieser modifizierten PCR-Produkte in den pCR4-TOPO-Vektor mit dem TOPO TA Cloning Kit for Sequencing nach den Angaben des Herstellers.

4.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese ermöglicht den gezielten Austausch, die gezielte Einführung (Insertion), oder die Entfernung (Deletion) von Aminosäuren. Es werden zwei Primer (Oligonucleotide; 3.6) benötigt, ein *forward*-Primer und ein *reverse*-Primer, die beide die gewünschte Mutation enthalten. Zur Erleichterung des Screenings ist es von Vorteil, in die proteincodierende DNA-Sequenz eine Restriktionsschnittstelle einzufügen bzw. eine vorhandene zu entfernen.

4.6.1 QuikChange-Mutagenese

Der QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit wurde für die ortsgerichtete Mutagenese einzelner bzw. benachbarter Aminosäuren verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Mutagenese-PCR mit dem Primerpaar 5'-GAG GTG CCG AGC GAA GGA AGC CAA CAG AGG AGG ATC GTG AGC TTT GTC GGA-3' (Primerbezeichnung Q346E/G348S/G349Q/S350Q/M356V) wurde aufgrund der Länge der Primer das Protokoll für eine Zwei-Stufen-PCR von Wang et al. (1999) verwendet.

4.6.2 MultiQuikChange-Mutagenese

Um den gleichzeitigen Austausch zweier nicht unmittelbar benachbarter Aminosäuren zu ermöglichen, wurde die Mutagenese nach Angaben des Herstellers mit dem QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt.

4.7 Verdau mittels Restriktionsendonucleasen

Der Restriktionsverdau wurde zum einen für die Analyse der nach Subklonierung, Klonierung sowie Mutagenese erhaltenen Kolonien und zum anderen für Insert- sowie Vektorpräparationen in Vorbereitung der Klonierung verwendet. In einem 10 µl Ansatz (1 µl 10 × Reaktionspuffer; 0,2 bis 1 µg Plasmid; 1 bis 10 U Restriktionsenzym; 0,1 µl BSA [100 µg/ml], Zugabe abhängig vom Enzym) wurden die aus den Kolonien isolierten Plasmide (4.2.2.2) mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen 1 bis 2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur verdaut und agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Die Insert- und Vektorpräparationen wurden in einem 100 µl-Ansatz (10 µl 10 × Reaktionspuffer; 10 bis 40 µg PCR-Produkt, Plasmid bzw. Leervektor; 30 bis 60 U Restriktionsenzym; 10 µl BSA [100 µg/ml], bei *Xba I* erforderlich) mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen 12 bis 20 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme durch 20-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die Fragmente

wurden mittels Agarosegel getrennt und die gewünschten Fragmente, das *pld*-Gen sowie der linearisierte Vektor aus dem Gel isoliert (4.2.2.3).

4.8 Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, wurde die mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen verdaute Vektor-DNA an den 5'-Enden durch eine einstündige Inkubation mit Shrimp alkalischer Phosphatase (1 U für 100 µl-Ansatz) bei 37°C dephosphoryliert. Durch eine nachfolgende 20-minütige Inkubation bei 65°C erfolgte die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase.

4.9 Ligation

Die Ligation des *pld*-Gens in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor erfolgte in einem 20 µl-Ansatz (2 µl 10 × Reaktionspuffer; 2,5 mM ATP; 2 U [Weiss] T4-DNA-Ligase; 100 ng Insert und Vektor im molaren Verhältnis 5: 1) für 2 Stunden bei 25°C. Der gesamte Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert.

4.10 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

4.10.1 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

100 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue; ER 2566) wurden mit der zu transformierenden DNA (20 µl-Ligationsansatz oder 4 ng Plasmid-DNA) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 40 Sekunden bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert und 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden diese 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einem selektiven Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.10.2 Transformation in elektrokompente *E. coli*-Zellen

50 µl elektrokompente *E. coli*-Zellen (BL21(DE3); Rosetta(DE3); Rosetta(DE3)pLysS; XL1-Blue) wurden mit 4 ng Plasmid-DNA gemischt. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation im Gene Pulser II (BioRad, München). Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf einem selektiven Medium ausplattiert sowie über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.11 Anzucht der *E. coli*-Stämme zur Plasmidpräparation

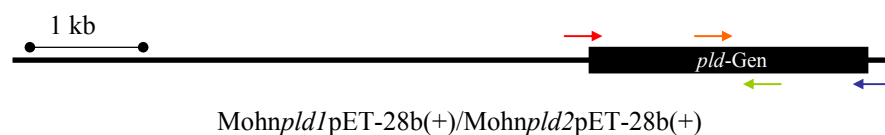
5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Amp bzw. Kan) wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte (mit Antibiotikum) beimpft und für 12 h bei 37°C, 180 rpm inkubiert.

4.12 Sequenzierung von Plasmiden

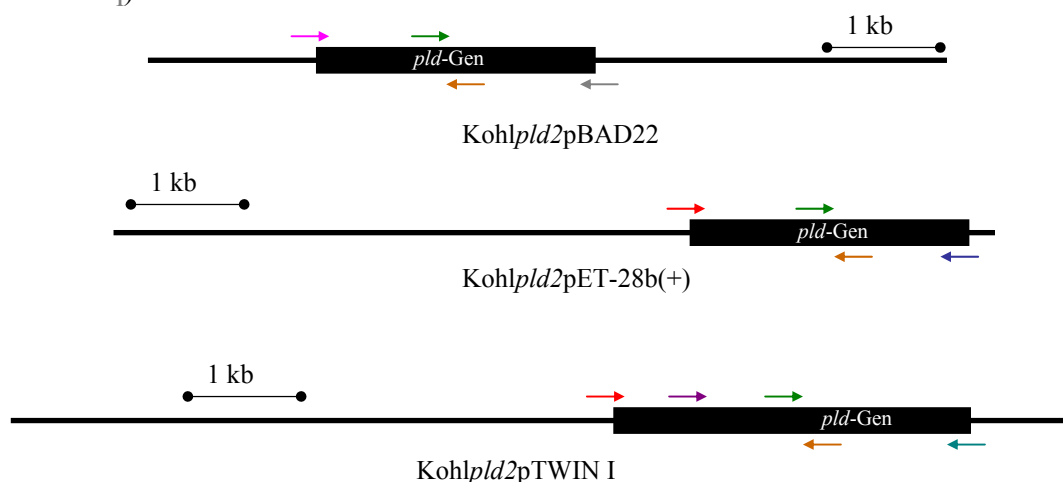
Die Sequenzierung erfolgte mit dem SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC nach dem Didesoxy-Verfahren (Sanger et al., 1977) unter Verwendung eines Li-Cor DNA Sequencer 4000 (MWG Biotech, Ebersberg). Für die Sequenzierungsreaktionen wurden jeweils 200 fmol Plasmid-DNA sowie am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markierte Primer (2 pmol/μl; Sequenzierungsprimer 3.6) genutzt.

Zur Bestimmung der Nucleotidsequenzen der in den pCR4-TOPO-Vektor subklonierten Mohn-PLD-Fragmente der genomischen DNA bzw. der cDNA wurden mindestens 5 Plasmide pro Fragment mit den Sequenzierungsprimern M13fw sowie M13rv sequenziert.

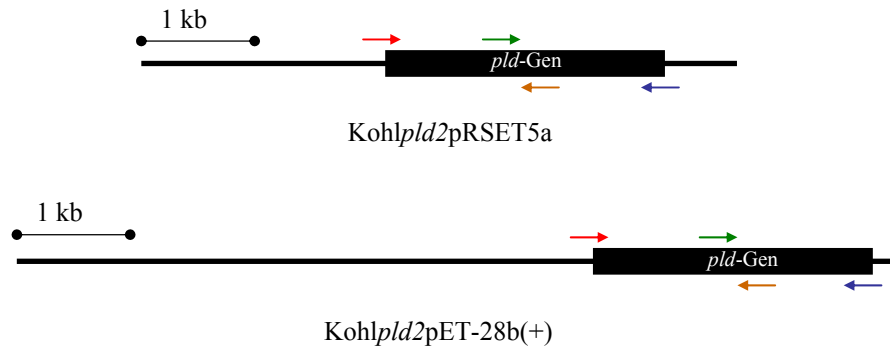
Zu der den kompletten Genbereich umfassenden Sequenzprüfung wurden für die Expressionskonstrukte Mohn*pld1*pET-28b(+) bzw. Mohn*pld2*pET-28b(+) pro Plasmid 4 Teilsequenzierungen mit den Sequenzierungsprimern **T7promotor**, **Mohnseqfw**, **Mohnseqrv** und **T7terminator** durchgeführt.



Die Expressionskonstrukte Kohl*pld2*pBAD22, Kohl*pld2*pET-28b(+) wurden in 4 bzw. das Expressionskonstrukt Kohl*pld2*pTWIN I in 5 Teilsequenzierungen überprüft (**T7promotor**, **PLD2midfw**, **Sonde2rv**, **T7terminator**, **SspDnaBinteinfw**, **MxeInteinrv**, **pBAD22fwseq**, **pBAD22rvseq**).



Zur Kontrolle der Kohl-PLD2-Enzymvarianten wurde ebenfalls der gesamte Genbereich in 4 Teilsequenzierungen (T7promotor, PLD2midfw, Sonde2rv, T7terminator) pro Plasmid sequenziert.



Die Gelelektrophorese wurde, wie in der Sequenzierbroschüre von MWG Biotech angegeben, durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE verwendet (5 × TBE: 0,45 M Tris/HCl, 0,45 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0).

Die primären Sequenzierungsdaten wurden mit BaseImagIR (Version 4, 1997) ausgewertet. Des Weiteren wurden für die Auswertung der Sequenzdaten die Programme MACAW (Version 2.0.5 Win32i, 1995), Gene Runner (Version 3.04, 1994), BioEdit (Version 5.0.6, 2001 und Version 6.0.7, 2004) sowie die GenBank des National Center for Biotechnology Information (Washington, DC; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) genutzt.

4.13 Expression

4.13.1 Expression der Konstrukte im pRSET5a-Vektor

Die Expression der Kohl-PLD2 sowie der Kohl-PLD2-Varianten erfolgte nach dem von Schöffner etablierten Expressionsprotokoll (Schöffner, 2001). Zur Expression der im pRSET5a-Vektor erzeugten Kohl-PLD2-Varianten sowie der Kohl-PLD2 im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)+pUBS 520 wurden 500 ml 2 × YT-Medium (50 µg/ml Amp und 25 µg/ml Kan) mit 10 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium; 50 µg/ml Amp und 25 µg/ml Kan) inokuliert und bei 15°C mit 180 rpm 3 bis 4 Tage lang geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von ca. 8 bis 10 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5000×g, 10 min) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.13.2 Expression der Konstrukte im pET-28b(+)-Vektor

Zur Produktion der rekombinanten Mohn-PLD1, Mohn-PLD2, Kohl-PLD2 sowie von einigen Kohl-PLD2-Varianten wurden 200 ml LB-Medium (25 µg/ml Cm und 10 µg/ml Kan) mit 4 ml einer Übernachtskultur (mit gleicher Medienzusammensetzung) von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-Zellen, die die entsprechenden sich im pET-28b(+)-Vektor befindlichen

Expressionskonstrukte enthielten, inokuliert und bei 37°C mit 180 rpm geschüttelt. Bei einer OD_{600nm} von 1 wurde die Expression mit 25 μ M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach Induktion wurde für 4 h bei 25°C mit 180 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 \times g, 10 min) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.14 Proteinreinigung

4.14.1 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde in 40 ml Zellysepuffer (30 mM Pipes, pH 6,2, 10 mM EDTA) resuspendiert (Ultraturrax T25 von Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) und nach Zugabe von Lysozym (1,5 mg/g Zellen) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit einem Homogenisator (GAULIN Homogenisator von APV, Lübeck, 2 Passagen, 1200 bar). Nach Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (30000 \times g, 20 min) wurde der Überstand (Rohextrakt) aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.14.2 Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie

Bei der Calcium-vermittelten hydrophoben Interaktionschromatographie wird die PLD in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an Octyl-Sepharose gebunden und durch Entfernen der Ca^{2+} -Ionen selektiv eluiert (Lambrecht et al., 1992).

Die zu reinigende Proteinlösung (Rohextrakt oder mittels Q-Sepharose bzw. Phenyl-Sepharose teilgereinigte Proteinlösung), jeweils in 30 mM Pipes, pH 6,2 vorliegend, wurde mit einer 1 M $CaCl_2$ -Stammlösung auf eine Endkonzentration von 50 mM $CaCl_2$ (Kohl-PLD2/Kohl-PLD2-Varianten) bzw. von 200 mM $CaCl_2$ (Mohn-PLD1/Mohn-PLD2) eingestellt und gegebenenfalls bei 5000 \times g 10 min zentrifugiert. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine Octyl-Sepharose-Säule (20 ml Octyl-Sepharose CL-4B, Säulendimensionen: 300 mm \times 15 mm), die mit einer LC-Anlage, bestehend aus Peristaltik-Pumpe P-1, Detektor Uvicord SII, Schreiber REC 102 und Fraktionssammler Frac-100 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verbunden war, aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 30 mM Pipes, pH 6,2, 50 mM bzw. 200 mM $CaCl_2$ äquilibriert. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde die PLD anschließend mit 5 mM Pipes, pH 6,2, 0,1 mM EDTA eluiert. In den Fraktionen wurde zum einen die Proteinkonzentration (Bradford-Assay; 4.15.2) und zum anderen die hydrolytische PLD-Aktivität (4.18.1.1)

bestimmt. In den Peakfraktionen wurde die Reinheit des erhaltenen Proteins elektrophoretisch (SDS-PAGE; 4.16) überprüft.

4.14.3 Anionenaustauschchromatographie

4.14.3.1 Q-Sepharose mit 15 mM Tris/HCl, pH 7,5

Die zu reinigende Proteinlösung (Octyl-Sepharose teilgereinigt, dialysiert und umgepuffert in 15 mM Tris/HCl, pH 7,5) wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine Q-Sepharose-Säule (20 ml Q-Sepharose, Säulendimensionen: 300 mm × 15 mm) aufgetragen, die zuvor mit 15 mM Tris/HCl, pH 7,5 äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde anschließend die PLD mit einem NaCl-Stufengradienten 15 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,2 M sowie 0,3 M NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden, wie unter Punkt 4.14.2 beschrieben, analysiert.

4.14.3.2 Q-Sepharose mit 15 mM Pipes, pH 7,5

Die zu reinigende Proteinlösung (Rohextrakt in 15 mM Pipes eingestellt auf pH 7,5 und filtriert [0,45 µm Filter, Roth]) wurde mit einer Flussrate von 0,8 ml/min auf eine Q-Sepharose-Säule (20 ml Q-Sepharose, Säulendimensionen: 60 mm × 35 mm) aufgetragen, die zuvor mit 15 mM Pipes, pH 7,5, äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde anschließend die PLD mit einem NaCl-Stufengradienten 15 mM Pipes, pH 7,5, 0,15 M sowie 0,2 M NaCl eluiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte wie unter Punkt 4.14.2 beschrieben.

4.14.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie adsorbieren die unpolaren Oberflächenregionen eines Proteins bei hohen Salzkonzentrationen an die schwach hydrophoben Liganden der stationären Phase.

Die zu reinigende Proteinlösung (Rohextrakt) in 30 mM Pipes, pH 6,2, vorliegend wurde mit einer 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung auf eine Endkonzentration von 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und filtriert (0,45 µm Filter, Roth). Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0,6 ml/min auf eine Phenyl-Sepharose-Säule (20 ml Phenyl-Sepharose, Säulendimensionen: 300 mm × 15 mm) aufgetragen, die vorher mit 30 mM Pipes, pH 6,2, 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde anschließend die PLD mit 30 mM Pipes, pH 6,2, eluiert. Die Fraktionen wurden, wie unter Punkt 4.14.2 beschrieben, analysiert.

4.14.5 Konzentrierung und Dialyse

Die Proteinlösungen wurden mittels Viva-Spin-Concentratoren (5 kDa Cut-off; Vivascience AG, Hannover) bzw. Microcon-Concentratoren (Microcon YM-50; 50 kDa Cut-off; Millipore Corporation, Bedford [USA]) konzentriert. Um die Puffer- und Salzkonzentrationen im Ansatz zu senken, wurde die Proteinlösung gegen den entsprechend benötigten Puffer dialysiert (Dialyseschlauch: 8 kDa Cut-off; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg).

4.14.6 Ammoniumsulfatfällung

Die Proteinlösungen (Rohextrakte „inaktiver“ in Rosetta(DE3)pLysS exprimierter Kohl-PLD2-Varianten) wurden 1:1 mit einer 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung versetzt und für 1 h auf Eis stehen gelassen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei $21000\times g$ wurde der Überstand 2×2 h gegen 5 mM Pipes, pH 6,2, dialysiert (1 ml Proteinlösung pro 600 ml Puffer).

4.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.15.1 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der bis zur Homogenität gereinigten Enzyme wurde der Micro BCA Protein Assay Reagent Kit verwendet. Diese Methode beruht auf dem sensitiven colorimetrischen Nachweis eines BCA/ Cu^+ -Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu^{2+} -Ionen und anschließende Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht (Smith et al., 1985), bei einer Wellenlänge von 550 nm. Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich 0 bis 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genutzt.

4.15.2 Bradford-Assay

Dieser Assay basiert auf der Methode nach Bradford (1976), bei der Proteine durch Coomassie-Brillant-Blau-Einlagerung colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm nachgewiesen werden. Für den Bradford-Test im Mikrotiterplattenmaßstab wurden 50 μl Proteinlösung und 200 μl Bradford-Reagenz eingesetzt. Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich 0 bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Da sich der Bradford-Assay gegenüber den anderen Proteinbestimmungsmethoden als am wenigsten aufwendig erwies und der Einfluss störender Substanzen geringer ist, wurde dieser Assay für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Verlauf der Proteinreinigung genutzt.

4.15.3 Proteinbestimmung mittels Western-Blot

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration derjenigen Kohl-PLD2-Varianten, die nicht bis zur Homogenität gereinigt werden konnten, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch getrennt. Als Standard in der SDS-PAGE wurden Kohl-PLD2-Proben definierter Proteinkonzentration auf das Gel aufgetragen. Nach dem sich anschließenden Proteinblotting und der Immundetektion mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern (3.3) erfolgte die Quantifizierung der Proteinbanden mit dem Programm Aida (Version 2.00, 1997).

4.16 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde, wie in der Literatur beschrieben (Laemmli, 1970), in einer Mighty Small II SE250/SE260 Elektrophoresekammer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt. Es wurden 10 %ige Trenngele verwendet. Anschließend wurden die Proteinbanden durch Silber- (Blum et al. 1987) oder Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Färbe-Lösung: 0,5 g Coomassie-Brilliant-Blau G 250, 42,5 % [v/v] Ethanol, 5 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure; Entfärbungslösung: 7 % [v/v] Essigsäure, 20 % [v/v] Ethanol) detektiert.

4.17 Western-Blot-Technik

Nach SDS-PAGE wurde das Gel in einem Transfer-Puffer (50 mM Borat/NaOH, pH 9,0, 20 % [v/v] Methanol bzw. 25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 150 mM Glycin, 10 % [v/v] Methanol) äquilibriert. Unter Verwendung einer Fast Blot-Apparatur (Biometra GmbH, Göttingen) wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Hybond ECL Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) transferiert. Das Blotting erfolgte in 50 mM Borat/NaOH, pH 9,0, 20 % (v/v) Methanol bei 5 mA/cm² für 4 h oder in 25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol bei 2,7 mA/cm² für 2 h 45 min.

Vor der Reaktion mit den Antikörpern wurde die Blotmembran über Nacht bei 4°C mit 4 % Milchpulver in PBS-Puffer (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) blockiert. Anschließend wurde die Membran in folgenden Lösungen bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert:

- Anti-Kohl-PLD2-Antikörper aus Kaninchen (1:400 verdünnt in PBS-Puffer mit 4 % Milchpulver), 120 min
- PBS mit 0,05 % Tween 20, 3 × 10 min
- PBS mit 2 % Milchpulver, 20 min
- Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Esel (1:10000 verdünnt in PBS-Puffer mit

2 % Milchpulver), 80 min

- PBS mit 0,05 % Tween 20, 3 × 10 min.

Mit Hilfe des gebundenen, Peroxidase-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers konnten die Kohl-PLD2, die Kohl-PLD2-Varianten und die Mohn-PLD-Isoenzyme mittels ECL-Plus Western Blotting Detection Kit nachgewiesen werden, da die Peroxidase die Oxidation von Luminol katalysiert und so eine Chemilumineszenz ausgelöst wird. Das dabei entstehende Licht wurde auf einen Röntgenfilm (HyperFilm-ECL von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg; Entwickler/Fixierer von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) übertragen.

4.18 Aktivitätsbestimmung

4.18.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System

Dieser Aktivitätsbestimmung liegt der von D'Arrigo et al. (1995) etablierte PLD-Test zugrunde. Das aus Phosphatidyl-p-nitrophenol (PpNP) freigesetzte p-Nitrophenol (pNP) wird durch Messung der Absorptionsänderung bei geeigneter Wellenlänge photometrisch detektiert, entweder kontinuierlich bei 360 nm (pH 5,5) oder diskontinuierlich durch Abstoppen der Reaktion mit 1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA bei 405 nm.

4.18.1.1 Diskontinuierlicher Mikrotiterplattentest

Der diskontinuierliche Mikrotiterplattentest wurde zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität bei den Expressionsstudien sowie bei der Verfolgung der Proteinreinigungen verwendet. In einer Mikrotiterplatte wurden bei 30°C 170 µl Reaktionspuffer vorgelegt (100 mM NaAcetat, pH 5,5, 50 mM CaCl₂ für Kohl-PLD2 bzw. Kohl-PLD2-Varianten oder 150 mM CaCl₂ für Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2) und 50 µl Enzymlösung zugegeben. Durch Zugabe von 20 µl Substratstammllösung (10 mM PpNP, 10 % Triton X-100, 10 mM SDS) wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubationszeit bei 30°C wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Aktivität der Enzymlösung zwischen 10 und 120 min gewählt. Durch Zugabe von 60 µl Stopplösung (1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA) wurde die Reaktion abgestoppt und die Absorption wurde bei 405 nm gemessen (Microplatereader Dynatech MR7000, Cheminst, Berlin). Die Menge an gebildetem pNP wurde mit Hilfe einer Eichkurve, für deren Erstellung statt der Enzymlösung 50 µl pNP-Standardlösungen im Konzentrationsbereich 0 bis 1 mM verwendet wurden, berechnet. Eine Enzymeinheit (1 U) entspricht der Freisetzung von einem µmol pNP pro Minute bei 30°C.

4.18.1.2 Kontinuierlicher Küvettentest

Der kontinuierliche Küvettentest wurde für die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität bei 30°C der bis zur Homogenität gereinigten Enzyme (Kohl-PLD2, Kohl-PLD2-Varianten, Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2) verwendet. In einer reduzierten Glasküvette (Lichtweg 1 cm) wurden 400 µl Reaktionspuffer (300 mM NaAcetat, pH 5,6, 120 mM CaCl₂) und 50 µl Substratstammlösung (10 mM PpNP, 10 % Triton X-100, 10 mM SDS) im Photometer auf 30°C (Photometer U-2000 Hitachi, Tokio [Japan]) vortemperiert. Zum Start der Hydrolyse des PpNP wurden 50 µl Enzymlösung zugegeben und gut gemischt. Die durch die pNP-Bildung hervorgerufene Absorptionsänderung wurde über einen Zeitraum von 20 bis 40 min (abhängig von der enzymatischen Aktivität) bei 360 nm kontinuierlich gemessen. Die pNP-Konzentrationen wurden mit Hilfe einer entsprechenden Eichkurve, für deren Erstellung statt der Enzymlösung 50 µl pNP-Standardlösungen im Konzentrationsbereich 0 bis 1 mM verwendet wurden, berechnet. Eine Enzymeinheit (1 U) entspricht der Freisetzung von einem µmol pNP pro Minute bei 30°C.

4.18.1.3 Einfluss des pH-Wertes und der Ca²⁺-Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität

Um die Abhängigkeit der PLD-Hydrolyseaktivität vom pH-Wert und von der Ca²⁺-Konzentration zu bestimmen, wurde der diskontinuierliche Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) modifiziert. In eine Mikrotiterplatte wurden 170 µl Reaktionspuffer (60 mM Tris/HCl, 20 mM NaAcetat, 20 mM Glycin) vorgelegt, dessen pH-Wert im Bereich von 5,0 bis 8,5 mit Essigsäure oder Natronlauge eingestellt wurde und dem 0, 10, 25, 45 bzw. 100 mM CaCl₂ zugesetzt wurden. Nach Zugabe von 50 µl Mohn-PLD1 bzw. Mohn-PLD2 wurde die Reaktion mit 20 µl Substratstammlösung (10 mM PpNP, 10 % Triton X-100, 10 mM SDS) gestartet. Die Reaktion wurde nach 90 min durch Zugabe von 1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA abgestoppt und die Absorption bei 405 nm gemessen.

4.18.1.4 Einfluss der Ca²⁺-, Mg²⁺- und Zn²⁺-Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität

Zur Bestimmung des Einflusses der Ca²⁺-, Mg²⁺- und Zn²⁺-Konzentration auf die PLD-Hydrolyseaktivität wurde der diskontinuierliche Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) verwendet. Dazu wurden dem Reaktionspuffer (100 mM NaAcetat, pH 5,5) 0 bis 200 mM CaCl₂, 0 bis 100 mM MgCl₂ bzw. 0 bis 50 mM ZnCl₂ zugesetzt.

4.18.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität und der Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem

Die Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität erfolgte im Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer nach Hirche et al. (1997), mit Soja-Phosphatidylcholin (SPC) als Substrat und Glycerol als Akzeptoralkohol. Detektiert wurde die Bildung von Phosphatidsäure (Hydrolyse) bzw. die Bildung von Phosphatidylglycerol (Transphosphatidylierung) mittels HPTLC (high performance thin layer chromatography; 4.18.2.1).

4.18.2.1 Kinetische Messungen

Die Umsetzung der Phospholipide wurde mittels HPTLC verfolgt. Als Standardsystem wurden 620 µl organische Phase (n-Hexan, 0,23 mmol 2-Octanol, 1,3 µmol [1 mg] SPC) und 80 µl wässrige Phase (300 mM NaAcetat, pH 5,6, 120 mM CaCl₂, Enzym [0,05 bis 10 µg], 108 µM Glycerol [Akzeptoralkohol]) in 1,5 ml-Probefläschchen, die mit Butyl-Teflon-Septen verschlossen wurden, verwendet. Die Ansätze wurden bei 30°C geschüttelt (300 min⁻¹, Horizontalschüttler GLG 3006, GFL). Der Start der Reaktion erfolgte durch die Injektion der wässrigen Phase in das die organische Phase enthaltende Probefläschchen. Zum Zeitpunkt 0 sowie nach 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 min nach dem Reaktionsstart wurde eine Probe aus der organischen Phase entnommen, wobei der entsprechende Ansatz vor der Probeentnahme für 30 s nicht geschüttelt wurde. Mit Hilfe eines TLC-Applicators AS 30 (Desaga, Wiesloch) wurden diese Proben auf HPTLC-Platten (Kieselgel 60, Merck Biosciences, Darmstadt) aufgetragen. Die folgenden Parameter wurden für das Plattenformat 100 mm × 200 mm genutzt:

- 24 Bahnen; zentrierte Ausrichtung
- strichförmige Auftragung; 3 mm Länge; 6 mm Abstand; Randabstand 28 mm
- 1 µl Auftragevolumen bei 3 s/µl.

Die organische Phase enthält den Hauptteil der Phospholipide (nahezu 100 %; Hirche, 1997). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die aus der organischen Phase entnommene Probe repräsentativ ist.

4.18.2.2 Chromatographischer Prozess

Zur Quantifizierung der Phospholipide wurden die Proben auf 100 mm × 200 mm HPTLC-Platten aufgetragen. Pro Seite wurden 6 Mischungen mit Standardkonzentrationen Soja-Phosphatidsäure (SPA), SPC sowie Soja-Phosphatidylglycerol (SPG) aufgetragen (**Tabelle 3**). Nach Auftragung der letzten Probe wurden die Platten für 30 min bei einer relativen Luftfeuchte von 35 % getrocknet. Die Entwicklung erfolgte in einer Horizontalkammer (Camag, Muttenz) mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol-Ammoniak 70 : 40 : 10 (v/v/v). Anschließend wurden die Platten unter dem Abzug getrocknet und die Phospholipide mit Kupfersulfat/Phosphorsäure angefärbt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Standardmischungen 1 bis 6 aus SPA, SPC und SPG in Chloroform-Methanol 2: 1.

	1	2	3	4	5	6
SPA, mM	1,12	0,84	0,56	0,28	0,07	1,40
SPC, mM	1,31	1,05	0,79	0,53	0,40	0,13
SPG, mM	0,13	0,26	0,66	1,05	1,31	0,53
Σ, mM	2,56	2,15	2,01	1,86	1,78	2,06

4.18.2.3 Färbung der Phospholipide

Die luftgetrockneten Platten wurden auf einer Glasplatte für 3 min bei 120°C (Thermoplate S, Desaga, Wiesloch) belassen und nach Abkühlen in eine Färbelösung von 15,64 % (w/v) Kupfersulfat (Pentahydrat) in 8 % (v/v) Phosphorsäure getaucht. Danach wurden die Platten wieder auf die Thermoplate gelegt und auf 170°C erhitzt (Touchstone et al., 1983). Nach dem Eintreten der Färbung wurden die Platten auf Raumtemperatur abgekühlt und konnten densitometrisch vermessen werden.

4.18.2.4 Densitometrische Quantifizierung

Die nach 4.18.2.3 gefärbten Platten wurden mit Hilfe des Densitometers CD 60 (Desaga, Wiesloch) im Extinktionsmodus unter Verwendung folgender Parameter vermessen:

- Spalt 0,2 mm × 4 mm
- Wellenlänge 390 nm, Remission
- Auflösung 0,1 mm, 8 Messungen pro Punkt.

Die Konzentration der entsprechenden Phospholipide wurde unter Verwendung der ermittelten Peakflächen der aufgetragenen Standards nach Kufner et al. (1979) mit Hilfe einer Gleichung vom Typ Michaelis-Menten berechnet. Für die mathematische Behandlung, insbesondere für lineare und nichtlineare Regressionen und die Ermittlung der Standardabweichungen wurde das Programmpaket SigmaPlot (Scientific graphing software, Version 2.01, 1994) genutzt.