



Racer-Methode (Gene Racer Kit, Invitrogen), die SMART-Methode (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech), die Terminale Transferase-Strategie (5'-RACE System, Invitrogen), die GAGA-Strategie (Ligation eines DNA-Oligonucleotids) und die Zyklisierungsstrategie (Inverse PCR) verwendet, die jedoch alle nicht zum gewünschten Erfolg führten. Die Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenzen gelang schließlich durch die Anwendung folgender Strategie:

Zunächst wurde die mRNA aus 4 Tage alten Schlafmohnkeimlingen mit einer neuen Methode (PolyATtract® System 1000; 4.2.1) isoliert. Unter Verwendung der genspezifischen *reverse*-Primer MohnGF3-1rv bzw. MohnGF3-2rv und der Reversen Transkriptase SuperScript™III RT wurde die mRNA in die entsprechende cDNA umgeschrieben (4.3). In den sich anschließenden PCRs (4.4; 1. PCR-Ansatz) wurde zur Amplifizierung des unbekannt Sequenzbereichs als *forward*-Primer der degenerierte Primer Start Mohn PLDfw verwendet, der auf der Basis von Alignments mit den 3 bis dahin dem Mohn ähnlichsten *pld*-Sequenzen von *Ricinus communis*, *Zea mays* und *Nicotiana tabacum* in der Region des Start-Codons abgeleitet wurde (**Abbildung 11**).

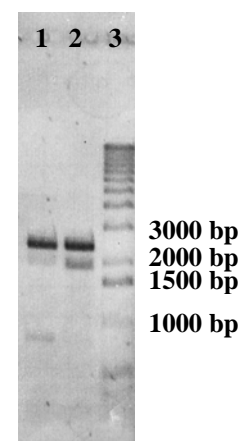
Start Mohn PLDfw	~~~~ATGGCTCAGATTYYTCTCCAYGGAACTCTCCA
<i>Nicotiana tabacum</i>	AAAAATGGCTCAGATTCTGCTCCATGGAACTCTCCATGTC
<i>Ricinus communis</i>	AGAAATGGCGCAGATATCTTTGCACGGAACTCTACATGTA
<i>Zea mays</i>	GGCCATGGCTCAGATCTTGCTCCACGGCACGCTCCACGCC

**Abbildung 11:** Alignment der *pld*-Sequenzen von *Ricinus communis* (NCBI GenBank L33686), *Zea mays* (NCBI GenBank D73410) und *Nicotiana tabacum* (NCBI GenBank Z84822) in der Region des Start-Codons zum Design des degenerierten Primers Start Mohn PLDfw.

Als *reverse*-Primer dienten die schon bei der cDNA-Synthese zum Einsatz gekommenen genspezifischen Primer. Unter Verwendung von *Pfu*-DNA-Polymerase wurde für beide Isoenzyme ein ca. 2500 bp großes PCR-Produkt erhalten (**Abbildung 12**).

**Abbildung 12:** Agarosegel der PCRs zur vollständigen Nucleotidbestimmung der mRNA der Mohn-*pld1* bzw. der Mohn-*pld2*.

- Bahn 1: PCR Mohn-*pld2*
- Bahn 2: PCR Mohn-*pld1*
- Bahn 3: Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter



Die PCR-Produkte wurden in den pCR4-TOPO-Vektor subkloniert, und die Konstrukte in *E. coli* TOP 10-Zellen transformiert (4.5). Die sich anschließende Sequenzierung bestätigte, dass beide Konstrukte das noch fehlende PLD-Fragment am 5'-Ende des *pld1*- bzw. *pld2*-Gens enthalten. Somit konnten für beide Isoenzyme die vollständigen mRNA-Sequenzen vom Start-Codon bis zum 3'-poly(A) identifiziert und in der Datenbank hinterlegt werden (NCBI-Genbank Accession Nr. AF451979 und AF451980; Lerchner et al., 2001, aktualisiert 2004). Die ermittelten vollständigen mRNA-Nucleotidsequenzen von *pld1* und *pld2*, bestehend aus 2679 bzw. 2601 Nucleotiden, sind zusammen mit den genomischen Nucleotidsequenzen (5.1.1.2) im **Anhang A1** aufgeführt. Die Nucleotidsequenzen des *pld1*- und *pld2*-Gens sind im codierenden Bereich zu 96,9 % identisch. Innerhalb dieser Nucleotidsequenzen konnte für beide Isoenzyme ein offenes Leseraster von 813 Aminosäuren gefunden werden (Primärstrukturen im **Anhang A2**).

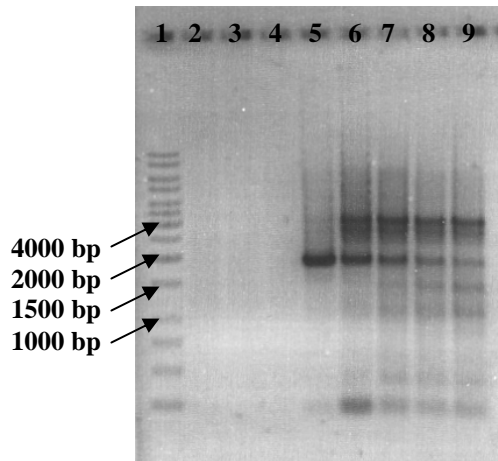
#### **5.1.1.2 Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von *pld1* und *pld2***

Die meisten eukaryotischen Gene sind mosaikartig aus codierenden Sequenzen (exprimierende Sequenzen oder Exons) und intervenierenden Sequenzen (Introns) aufgebaut. Der codierende Bereich eines eukaryotischen Gens ist daher nur ein Teil des gesamten Gens. Sowohl Intron- als auch Exonsequenzen werden in RNA transkribiert. Die Intron-Sequenzen jedoch werden aus der neusynthetisierten RNA durch den Vorgang des RNA-Spleißens entfernt.

Die Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von *pld1* und *pld2* wurde zunächst mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern, mit der Konstruktion einer genomischen DNA-Bank (Genomic cloning and packaging lambda packaging system, Promega), mittels Digoxigenin-RAGE/Supported-PCR und mittels Southern Blotting versucht. Alle diese Methoden führten jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Mit der folgenden Strategie gelang schließlich die Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenzen:

Die genomische DNA wurde aus 4 Tage alten Schlafmohnkeimlingen isoliert (4.2.2.1) und als Template in der Gradienten-PCR zur Amplifizierung des unbekanntes Sequenzbereiches eingesetzt (4.4; 2. PCR-Ansatz). Als *forward*-Primer wurde der degenerierte Primer Start Mohn PLDfw und als *reverse*-Primer MohnPLD2F2rv ein genspezifischer *reverse*-Primer aus dem zentralen Genbereich verwendet. Das entstehende PCR-Produkt sollte eine Größe zwischen 1800 und 2000 bp haben. In **Abbildung 13** ist zu erkennen, dass mit zunehmender *Annealing*-Temperatur PCR-Produkte, die auf eine unspezifische Primer-

Bindung zurückzuführen sind, nicht mehr gebildet werden. Bei einer *Annealing*-Temperatur von 61,2°C (Bahn 5) entstand nur noch das vermeintlich richtige PCR-Produkt (ca. 1900 bp). Dieses PCR-Produkt wurde in den pCR4-TOPO-Vektor subkloniert und die Konstrukte in *E. coli* TOP 10-Zellen transformiert (4.5).



**Abbildung 13: Agarosegel der Gradienten-PCR zur Bestimmung der vollständigen Nucleotidsequenz der genomischen DNA von Mohn-*pld1* und Mohn-*pld2*.**

Bahn 1: Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter

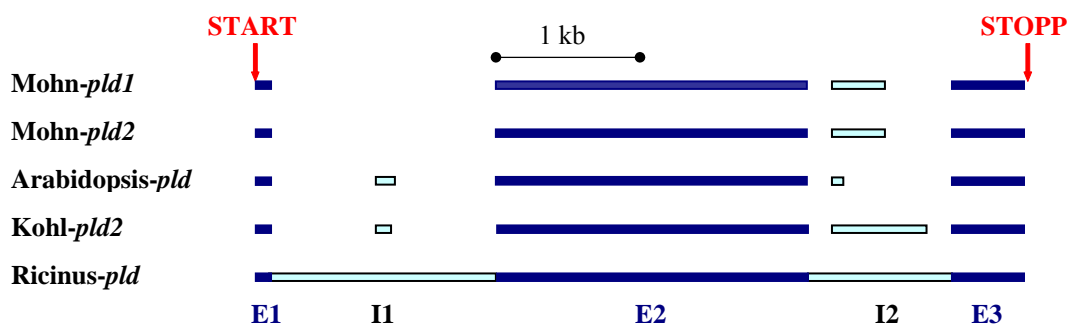
Bahnen 2 bis 9: Gradienten-PCR mit den

*Annealing*-Temperaturen 68,0°C, 66,7°C, 64,5°C,

61,2°C, 56,6°C, 53,5°C, 51,3°C und 50,0°C

Durch Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass in diesen Konstrukten das noch fehlende PLD-Fragment vorhanden ist. Somit liegen für beide Isoenzyme die genomischen DNA-Sequenzen vom Start- bis zum Stopp-Codon vor (NCBI-GenBank Accession Nr. AF451981 und AF451982; Lerchner et al., 2001, aktualisiert 2004).

Die ermittelten vollständigen genomischen DNA-Sequenzen von *pld1* und *pld2* bestehen aus 2829 bzw. 2828 Nucleotiden (**Anhang A1**). Für die genomische DNA beider Mohn-Isoenzyme konnte im Gegensatz zu anderen pflanzlichen PLDs vom  $\alpha$ -Typ, die meist 2 Introns besitzen (**Abbildung 14**), nur eine Intronstruktur (Intron 2 in **Abbildung 14**) ermittelt werden.



**Abbildung 14: Vergleich der Exon/Intron-Struktur ausgewählter pflanzlicher *pld* $\alpha$ -Gene.** Dunkelblau: Exonstrukturen E1-E3, hellblau: Intronstrukturen I1-I2.

Die Intronsequenzen der beiden Mohn-Isoenzyme bestehen aus 360 bp und sind wie auch die Exonstrukturen in hohem Maße ähnlich. Die Positionen des Introns im *pld1*- und *pld2*-Gen sind vergleichbar (**Anhang A1**). Die Länge der Intronbereiche in den verschiedenen pflanzlichen *pld* $\alpha$ -Genen variiert stark in Abhängigkeit von der Pflanzenart. Die Länge von

Intron 1 reicht von 88 (*Kohl-pld2*) bis 1442 bp (*Rizinus-pld*), die von Intron 2 von 84 (*Arabidopsis-pld*) bis 869 bp (*Rizinus-pld*).

### 5.1.1.3 Analyse der Primärstrukturen von PLD1 und PLD2

Für beide Isoenzyme wurde unter Verwendung des Programms BioEdit (Version 6.0.7, 2004) ein offenes Leseraster von 813 Aminosäuren gefunden (Primärstrukturen im **Anhang, A2**). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme unterscheiden sich in 11 Aminosäuren, sie sind somit zu 98,6 % identisch und zu 99,2 % ähnlich. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Massen betragen für PLD1 91,72 kDa und für PLD2 91,86 kDa. Mittels ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) wurden aus der Primärstruktur die isoelektrischen Punkte berechnet, die bei 5,60 für PLD1 und 5,53 für PLD2 liegen.

**Tabelle 4** zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen von PLD1 und PLD2 aus Mohn mit einigen ausgewählten mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen PLDs. Die mittels BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) bestimmten Identitäten und Ähnlichkeiten sind für beide Mohn-PLD-Isoenzyme gleich. Aus **Tabelle 4** lässt sich ein hoher Verwandtschaftsgrad zu anderen pflanzlichen PLDs des  $\alpha$ -Typs erkennen (71 bis 80 %), der durch die phylogenetische Analyse in **Abbildung 15** und das multiple Alignment im **Anhang A3** noch unterstrichen wird. Somit sind die Mohn-PLD-Isoenzyme eindeutig den  $\alpha$ -Typ-PLDs zuzuordnen. Den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den Mohn-PLD-Isoenzymen besitzen die PLDs aus *Zea mays* und *Nicotiana tabacum*. Beim Vergleich der phylogenetischen Daten der betrachteten  $\alpha$ -Typ-PLDs (**Abbildung 15**) fällt auf, dass das Verhältnis der Ähnlichkeiten der PLDs zueinander und deren Einordnung im phylogenetischen Stammbaum der gegenwärtigen Taxonomie der Pflanzenspecies entspricht. Die Pflanzen aus denen die betrachteten  $\alpha$ -Typ-PLDs stammen, gehören innerhalb der Abteilung der Samenpflanzen zur Unterabteilung Bedecktsamer (Magnoliophytina), wo sie wie folgt eingeordnet sind (Jäger et al., 2003):

- *Zea mays*:

2. Klasse Liliopsida (Einkeimblättrige), 3. Unterklasse Commelinidae

- *Papaver somniferum*:

3. Klasse Rosopsida (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige), 1. Unterklasse basale Rosopsida

- *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea* und *Ricinus communis*:

3. Klasse Rosopsida (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige), 2. Unterklasse Rosidae

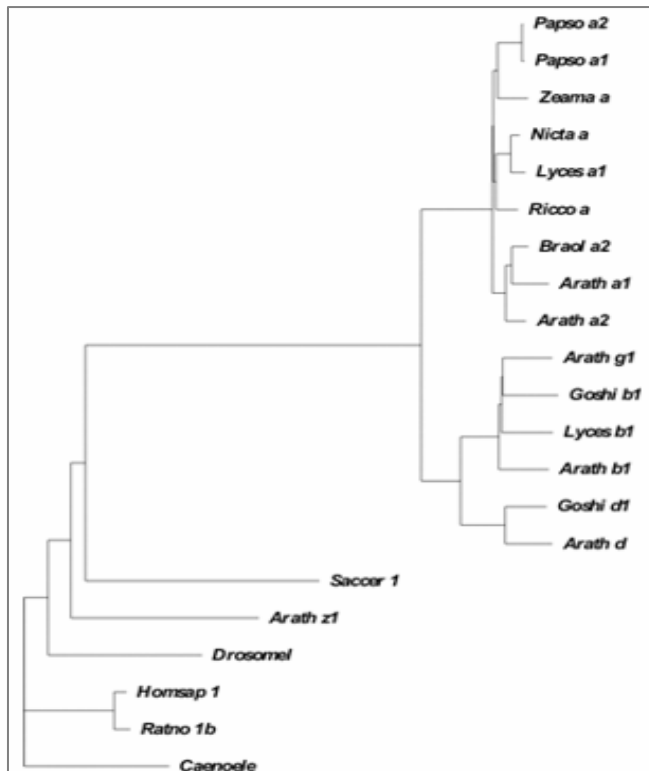
• *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum*:

3. Klasse Rosopsida (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige), 3. Unterklasse Asteridae.

**Tabelle 4: Vergleich der Aminosäuresequenzen von PLD1 sowie PLD2 aus Schlafmohn mit der von mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen PLDs.**

Species, PLD-Typ	Nummer in der NCBI-Genbank	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
<i>Streptomyces antibioticus</i> , PLD	Q53728	keine signifikante Ähnlichkeit	
<i>Streptomyces septatus</i> , PLD	BAB69062	keine signifikante Ähnlichkeit	
<i>Caenorhabditis elegans</i> , PLD	BAA97571	28	44
<i>Drosophila melanogaster</i> , PLD	AAK00727	28	45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , PLD1	P36126	26	43
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\alpha$ 1	AAC49274	71	80
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\alpha$ 2	Q9SSQ9	77	86
<i>Brassica oleracea</i> , PLD $\alpha$ 2	AAC78486	78	87
<i>Lycopersicon esculentum</i> , PLD $\alpha$ 1	AAG45485	78	87
<i>Nicotiana tabacum</i> , PLD $\alpha$	CAB06620	80	88
<i>Ricinus communis</i> , PLD $\alpha$	AAB04095	79	89
<i>Zea mays</i> , PLD $\alpha$	BAA11135	80	88
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\beta$ 1	P93733	44	61
<i>Gossypium hirsutum</i> , PLD $\beta$ 1	AAN05431	43	61
<i>Lycopersicon esculentum</i> , PLD $\beta$ 1	AAG45487	43	60
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\gamma$ 1	Q9T053	44	61
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\delta$	Q9C5Y0	44	59
<i>Gossypium hirsutum</i> , PLD $\delta$ 1	AAN05432	44	58
<i>Arabidopsis thaliana</i> , PLD $\zeta$ 1	AAL06337	26	37
<i>Homo sapiens</i> , PLD1	AAB49031	29	43
<i>Rattus norvegicus</i> , PLD1b	BAA24077	24	36

Die Sequenzidentitäten zu den pflanzlichen PLDs des  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\zeta$ -Typs sind mit 26 bis 44 % deutlich geringer. Die PLDs eukaryotischer, nicht-pflanzlicher Organismen weisen 24 bis 29 % Sequenzidentität zu den PLDs aus Schlafmohn auf. Die mikrobiellen PLDs dagegen besitzen weder zu den Mohn-PLD-Isoenzymen noch zu anderen pflanzlichen PLDs eine signifikante Ähnlichkeit.



**Abbildung 15: Phylogenetische Analyse der PLD-Familie.** Phylogramm, konstruiert mittels BioEdit (Version 6.0.7, 2004) mit der Distanz-Methode „Fitch phylogenetic tree“ (Fitch et al., 1987) auf der Grundlage eines multiplen Alignments mittels Clustal W (Thompson et al., 1994). Species-Kurzformen: *Arath*, *Arabidopsis thaliana*; *Braol*, *Brassica oleracea*; *Caenode*, *Caenorhabditis elegans*; *Drosomel*, *Drosophila melanogaster*; *Goshi*, *Gossypium hirsutum*; *Homsap*, *Homo sapiens*; *Lyoes*, *Lycopersicon esculentum*; *Nicta*, *Nicotiana tabacum*; *Papso*, *Papaver somniferum*; *Ratno*, *Rattus norvegicus*; *Ricco*, *Ricinus communis*; *Saccor*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Zeama*, *Zea mays*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2.

Die Aminosäurezusammensetzung beider Isoenzyme ist im **Anhang A4** dargestellt. Beide PLDs enthalten die in den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs hoch-konservierten 8 Cystein-Reste (multiples Alignment im **Anhang A3**). Zudem sind die Mohn-PLDs in Besitz eines weiteren Cystein-Restes in Position 144, wo sich interessanterweise bei den bisher sequenzierten  $\alpha$ -Typ-PLDs ein Serin-Rest befindet (**Anhang A3**). Die Mohn-PLD1 verfügt in Position 414 noch über einen zehnten Cystein-Rest.

Mit dem Programm SignalP (Bendtsen et al., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) konnten ausgehend von den Primärstrukturen der Mohn-PLD-Isoenzyme keine Signalpeptide für den Transport in den Zellkern, die Mitochondrien, Peroxisomen sowie Chloroplasten vorhergesagt werden. Es wird daher vermutet, dass beide Mohn-PLD-Isoenzyme intrazellulär vorkommen und damit die SH-Gruppen der Cystein-Reste in reduzierter Form vorliegen (Fahey et al., 1977). Für die PLD2 aus Weißkohl konnte das Vorliegen der Cystein-Reste in reduzierter Form gezeigt werden (Hwang et al., 2001).

Aus der Aminosäurezusammensetzung beider Isoenzyme (**Anhang A4**) geht weiterhin hervor, dass in beiden Mohn-PLD-Isoenzymen ein hoher Prozentsatz an hydrophoben Aminosäuren existiert (Ala, Val, Phe, Pro, Met, Ile und Leu: 38,5 % für PLD1 bzw. 39,98 % für PLD2). Der hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren ist vermutlich notwendig, um die Funktionen des Membranabbaus bzw. der Membranumgestaltung erfüllen zu können. Dabei sind für eine temporäre Bindung an die Zellmembran oberflächenexponierte hydrophobe Aminosäuren erforderlich. Glycin erhöht innerhalb von Proteinstrukturen durch das Fehlen

einer Seitenkette die lokale Flexibilität (Mount, 2001). Insofern ist es sehr interessant, dass Glycin mit 8,00 % bzw. 7,87 % die häufigste Aminosäure der Mohn-PLD1 sowie der Mohn-PLD2 darstellt.

Wie alle PLD-Aktivität zeigenden Mitglieder der PLD-Superfamilie (2.4, **Abbildung 4**) besitzen beide Mohn-PLD-Isoenzyme vier konservierte Sequenzbereiche, inklusive der 2 HKD-Motive. Am N-Terminus beider Isoenzyme befindet sich die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Phospholipidbindung verantwortliche C2-Domäne (multiples Alignment im **Anhang A3**). Die C2-Domäne von PLD1 und PLD2 aus Mohn enthält wie andere pflanzliche PLDs vom  $\alpha$ -Typ zwei konservierte saure Aminosäure-Reste (Glu42 und Asp101). In beiden Mohn-PLDs sind zwei mögliche  $\text{PIP}_2$ -Bindungsmotive vorhanden (multiples Alignment im **Anhang A3**). Sie sind zum einen in der C2-Domäne (KxxxxRxRK) und zum anderen in der Region zwischen dem ersten und zweiten HKD-Motiv (RxRxxxxK) lokalisiert.

In den Aminosäuresequenzen der Mohn-PLD1 und der Mohn-PLD2 wurden mit Prosite (Hofmann et al., 1999; <http://www.expasy.ch/prosite/>) eine Asn-Glykosylierungsstelle, sechs Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C sowie zwei Phosphorylierungsstellen für Tyrosinkinase gefunden. Das weist auf eine Beteiligung der PLDs an Regulationsprozessen hin.

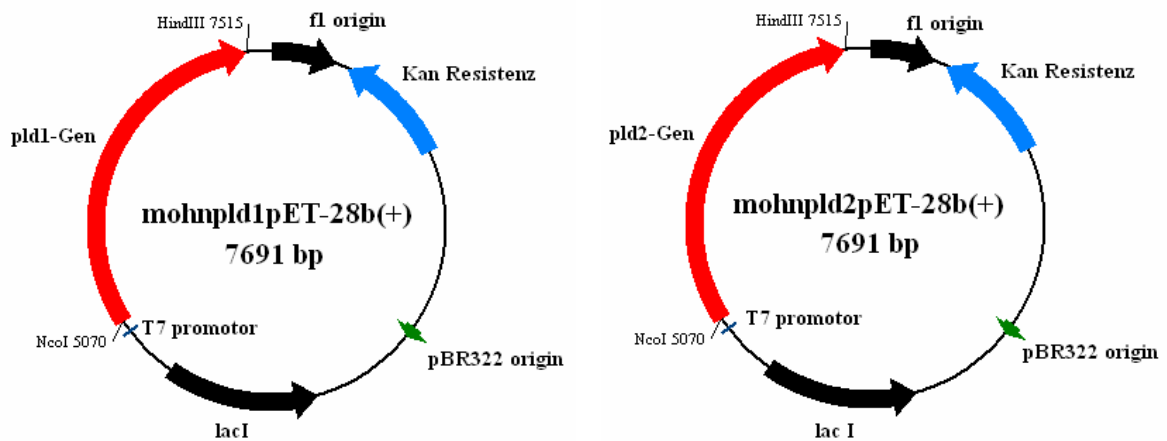
### 5.1.2 Klonierung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2

Beide Mohn-PLD-Isoenzyme sollten in Analogie zur Kohl-PLD2 mit einem neu etablierten Expressionssystem (pET-28b(+)-Vektor, *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS, 5.2.3.3) exprimiert werden, da aufgrund der hohen Identität der Primärstrukturen von Mohn-PLD1, Mohn-PLD2 und Kohl-PLD2 (**Tabelle 4**) die Vermutung nahe lag, dass sich die beiden Mohn-PLD-Isoenzyme bei der heterologen Expression in *E. coli* ähnlich verhalten.

Um eine Klonierung in den Vektor pET-28b(+) mit den Restriktionsenzymen *Nco I/Hind III* zu ermöglichen, wurden zunächst zwei im *pld1*- und *pld2*-Gen befindliche *Nco I*-Schnittstellen und eine *Hind III*- Schnittstelle in den Plasmiden *pld1*pCR4-TOPO bzw. *pld2*pCR4-TOPO (5.1.1.1) durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt (Primer  $\Delta\text{ncol mohn fw/rv}$ ,  $\Delta\text{2ncol fw/rv}$ ,  $\Delta\text{hindIII fw/rv}$ , 3.6). Die so veränderten Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. In einer sich anschließenden PCR (4.4; 3. PCR-Ansatz) wurden durch die flankierenden Primer *mohn ncofw* und *mohn1hindrv/mohn2hindrv* (3.6) die für die Klonierung erforderlichen Restriktionsschnittstellen angefügt. Nach Isolierung der PCR-Produkte aus einem Agarosegel und Restriktionsverdau mit *Nco I* und *Hind III* wurde das *pld1*- bzw. das *pld2*-Gen in den mit *Nco I* und *Hind III* linearisierten, dephosphorylierten



Vektor pET-28b(+) ligiert (4.9) und in *E. coli* XL1-Blue transformiert (4.10.1). Eine Selektion positiver Klone erfolgte durch Restriktionsverdau der erhaltenen Plasmide mit *Nco*I und *Hind*III und Analyse im Agarosegel. Die korrekte DNA-Sequenz der Expressionskonstrukte *pld1*pET-28b(+) und *pld2*pET-28b(+) wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Expressionskonstrukte (**Abbildung 16**) wurden nachfolgend in den *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS transformiert.



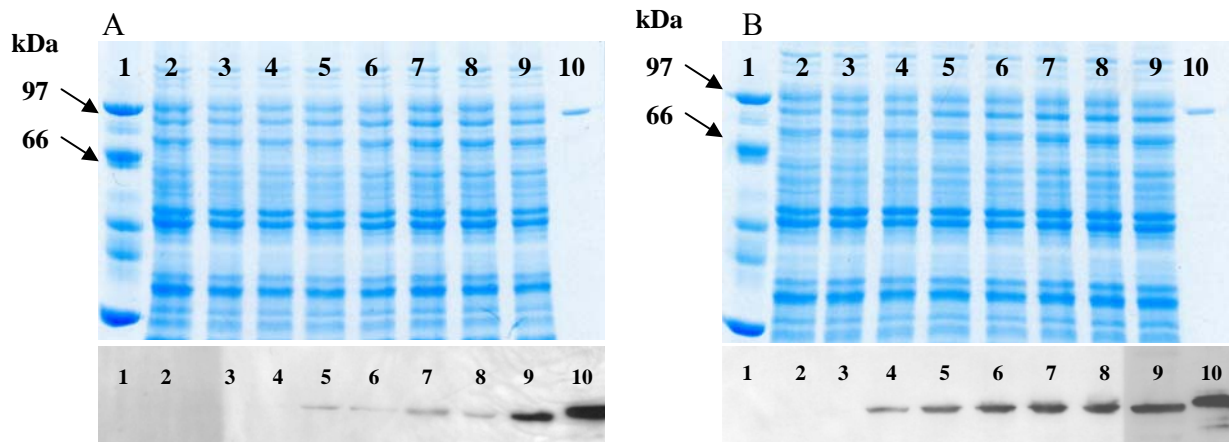
**Abbildung 16:** Expressionskonstrukte Mohn*pld1*pET-28b(+) und Mohn*pld2*pET-28b(+).

### 5.1.3 Expression von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2

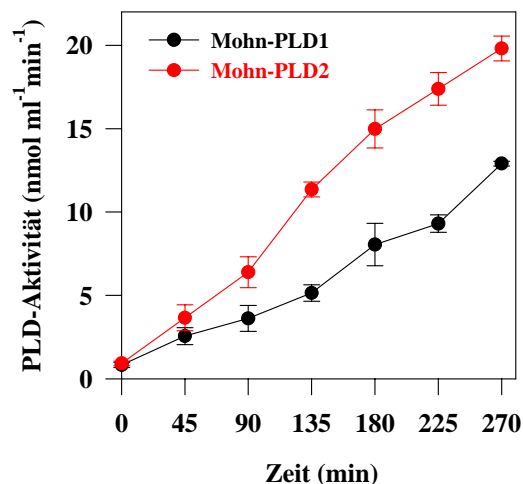
Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2 konnten erfolgreich mit Hilfe der Expressionskonstrukte *pld1*pET-28b(+) und *pld2*pET-28b(+) in *E. coli* löslich im Cytosol exprimiert werden. Eine Expression der beiden Isoenzyme in löslicher Form wurde angestrebt, da es bisher nicht gelungen ist, PLD aus Weißkohl aus *inclusion bodies* zurückzufalten. Die Expression der beiden Enzyme erfolgte in Analogie zur Kohl-PLD2 mit einem neu etablierten Expressionssystem (5.2.3.3).

Zur Verfolgung des Expressionsverlaufes wurden entnommene Zellproben mit Zellysepuffer (B-PERII Bacterial Protein Extraction Reagent, Pierce) aufgeschlossen. Der lösliche Proteinanteil wurde auf PLD-Aktivität getestet und die exprimierte Mohn-PLD1 bzw. Mohn-PLD2 mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Technik mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern nachgewiesen. Im SDS-PAGE-Gel (**Abbildung 17**, oben) sind die Expressionsbanden bei einer Größe von 91,8 kDa nur schwach zu erkennen, was bei einer löslichen Proteinexpression jedoch nicht ungewöhnlich ist. Der entsprechende Western-Blot (**Abbildung 17**, unten) mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern zeigt, dass die Bande der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme mit zunehmender Induktionszeit deutlich zunimmt. In Übereinstimmung damit konnte auch für beide Mohn-PLD-Isoenzyme im Verlauf der

Expression eine zunehmende hydrolytische PLD-Aktivität gemessen werden (**Abbildung 18**). Verglichen mit Mohn-PLD2 wird Mohn-PLD1 in etwas geringeren Mengen exprimiert, was sich auch in der hydrolytischen PLD-Aktivität der Mohn-Isoenzyme widerspiegelt.



**Abbildung 17: Verlauf der Expression von Mohn-PLD1 (A) bzw. Mohn-PLD2 (B).** SDS-PAGE-Gel (oben) und Western-Blot (unten): Bahn 1: LMW-Marker; Bahn 2: Expression des Vektors pET-28b(+) ohne *pld*-Gen (Negativkontrolle); Bahnen 3 bis 9: Expression der Mohn-PLD1 (A) bzw. Expression der Mohn-PLD2 (B) 0, 45, 90, 135, 180, 225 und 270 min nach Induktion; Bahn 10: 0,5 µg Kohl-PLD2 (Positivkontrolle).

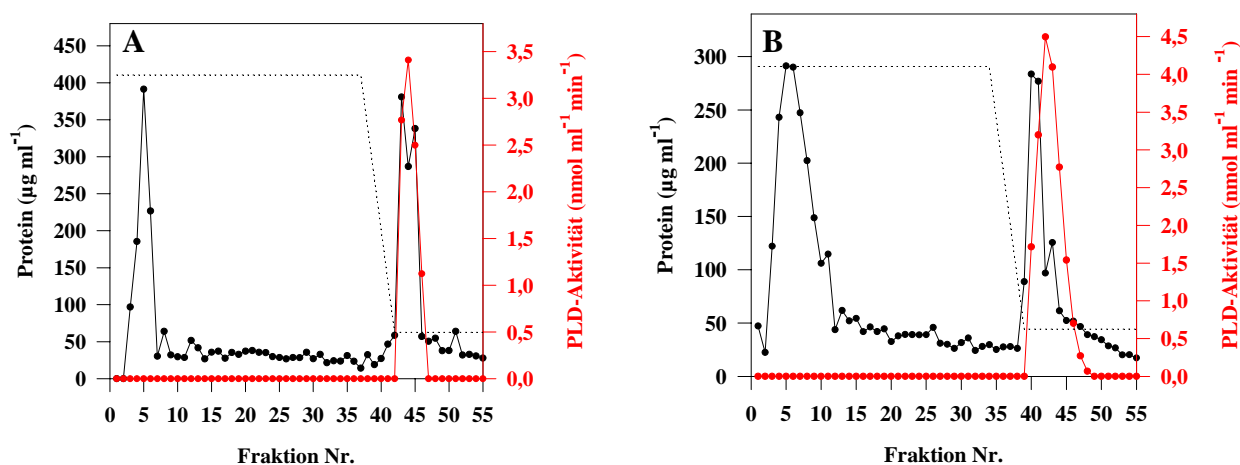


**Abbildung 18: Hydrolyseaktivität von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 im Verlauf der Expression.** Expressionsstamm: Rosetta(DE3)pLysS; Induktion: 25 µM IPTG bei  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ ; Kultivierungstemperatur 25°C. Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

### 5.1.4 Reinigung von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2

Zur Reinigung der löslich exprimierten Mohn-PLDs wurden die *E. coli*-Zellen mit einem Homogenisator aufgeschlossen (4.14.1). Die nach Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation erhaltenen Rohextrakte wurden zunächst einer hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) an Phenyl-Sepharose unterworfen (4.14.4). Zur Auftragung wurde eine geringe  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration (0,4 M) gewählt, da unter diesen

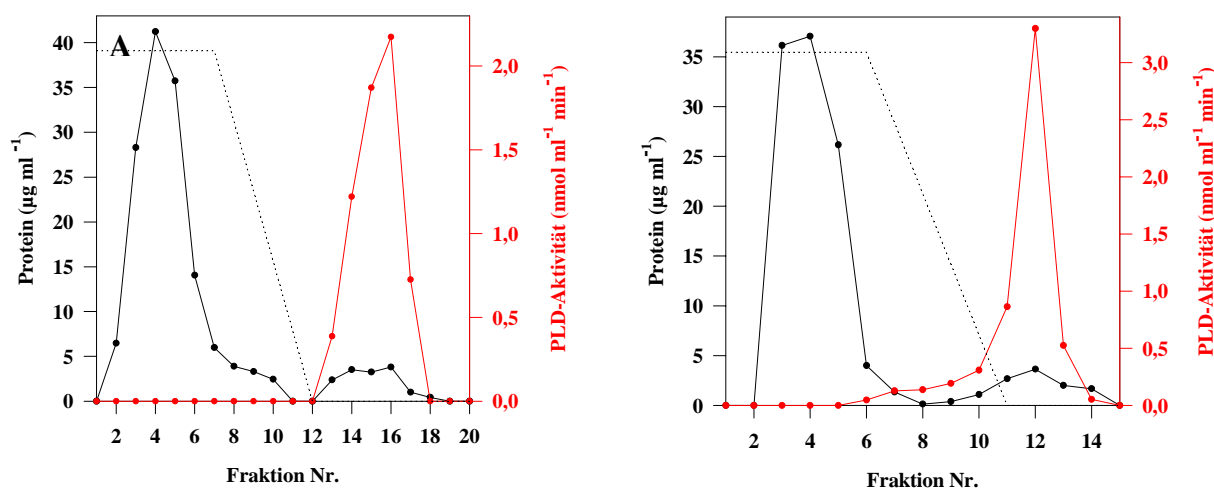
Bedingungen die Bindung der Mohn-PLD-Isoenzyme an das Säulenmaterial unter Erhalt ihrer Aktivität gewährleistet ist und ein großer Teil der Fremdproteine nicht an das Säulenmaterial bindet (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19: Reinigungsprofil für Mohn-PLD1 (A) und für Mohn-PLD2 (B) an Phenyl-Sepharose.** Schwarz, Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay; rot, Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Assay; gestrichelt,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradient (oberes Niveau: 0,4 M, unteres Niveau: 0 M).

Der Reinheitsgrad betrug 15 für Mohn-PLD1 bzw. 14 für Mohn-PLD2. 90 % der eingesetzten Aktivität konnten mit einem abnehmenden  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten eluiert werden. Eine Reinigung mittels Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie nach Lambrecht et al. (1992) war im ersten Schritt nicht möglich, da bei Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  eine starke Copräzipitation der PLD mit anderen cytosolischen Proteinen zu verzeichnen war, in deren Folge die Aktivität vollständig verloren ging. Die für die Präzipitation verantwortlichen Komponenten konnten mittels der beschriebenen HIC an Phenyl-Sepharose abgetrennt werden.

Die mit Hilfe von Phenyl-Sepharose teilgereinigte Proteinlösung wurde anschließend mittels Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie gereinigt (4.14.2). Bei Auftragung der teilgereinigten Proteinlösung in Gegenwart von 50, 100 oder 150 mM  $\text{CaCl}_2$  wurden weder Mohn-PLD1 noch Mohn-PLD2 am Säulenmaterial gebunden. Erst bei einer Konzentration von 200 mM  $\text{CaCl}_2$  ist es gelungen, Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2 an Octyl-Sepharose zu binden und diese durch Entfernen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen selektiv und konzentriert zu eluieren. **Abbildung 20** zeigt die Reinigungsprofile für Mohn-PLD1 (A) sowie Mohn-PLD2 (B) an Octyl-Sepharose mit 200 mM  $\text{CaCl}_2$ . Bei der Reinigung von Mohn-PLD2 konnte eine teilweise vorzeitige Elution dieses Enzyms aufgrund einer vermutlich schwächeren Bindung an Octyl-Sepharose in Gegenwart von 200 mM  $\text{CaCl}_2$  nicht unterbunden werden. Das verursachte einen höheren Aktivitätsverlust (65 %) bei der Reinigung von Mohn-PLD2 an Octyl-Sepharose im Vergleich zur Mohn-PLD1 (32 %).



**Abbildung 20: Reinigungsprofil für Mohn-PLD1 (A) und für Mohn-PLD2 (B) an Octyl-Sepharose mit 200 mM  $\text{CaCl}_2$ .** Schwarz, Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay; rot, Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Assay; gestrichelt,  $\text{CaCl}_2$ -Gradient (oberes Niveau: 200 mM, unteres Niveau: 0 mM).

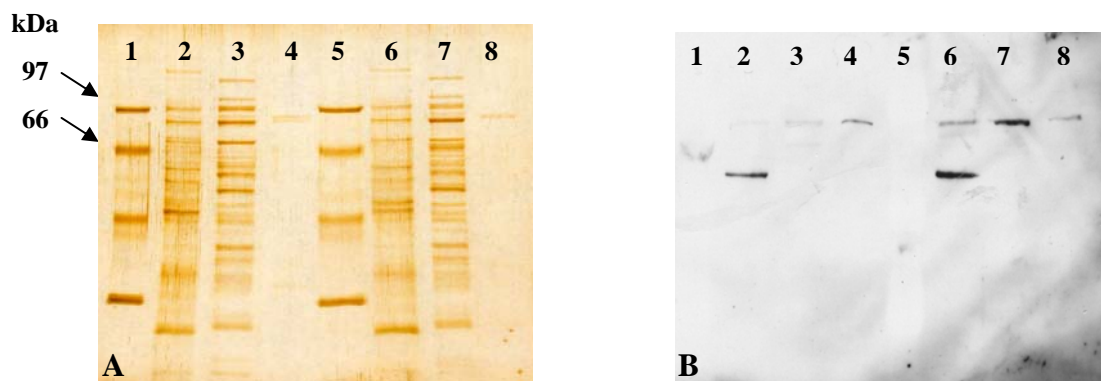
Das Prinzip der Calcium-vermittelten hydrophoben Interaktionschromatographie ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass die für die Adsorption an die hydrophoben Liganden der stationären Phase verantwortlichen unpolaren Regionen des Enzyms durch eine Calcium-induzierte Konformationsänderung an der Oberfläche des Proteins präsentiert werden. Abgeleitet aus Erfahrungen mit Reinigungsversuchen von inaktiven Kohl-PLD2-Varianten (5.2.4.1 und 5.2.4.2) an Octyl-Sepharose wird vermutet, dass das zu reinigende Enzym in seiner aktiven Konformation vorliegen muss, um mit dem Säulenmaterial interagieren zu können. Da die Bindung der Mohn-PLD-Isoenzyme an Octyl-Sepharose erst bei einer Konzentration von 200 mM  $\text{CaCl}_2$  erfolgreich war, ist anzunehmen, dass diese Enzyme eine in diesem Bereich liegende  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration für ihre Aktivität benötigen. Dies konnte durch die Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestätigt werden (5.1.5.3). Worauf der Unterschied zwischen Mohn-PLD2 und Mohn-PLD1 im Bindungsvermögen an Octyl-Sepharose zurückzuführen ist, bleibt jedoch unklar. Die Annahme, dass eine Abweichung im hydrophoben Charakter innerhalb einer spezifischen Region der Mohn-PLD2 verglichen mit Mohn-PLD1 der Grund sein könnte, wird durch die nahezu identischen Hydrophobizitätsprofile beider Enzyme (**Anhang A5**) nicht gestützt.

Aus 200 ml Expressionskultur konnten mit der in der **Tabelle 5** zusammengefassten Reinigungsprozedur 70 µg Mohn-PLD1 bzw. 50 µg Mohn-PLD2 in aktiver und elektrophoretisch einheitlicher Form isoliert werden.

**Tabelle 5: Quantifizierung der Reinigungsprozedur für Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2.** Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Ausbeute (%)	Reinheitsgrad
<b>Mohn-PLD1</b>					
Rohextrakt	86,838	0,0545	$6,276 \cdot 10^{-4}$	100	1
Phenyl-Sepharose	5,312	0,0490	$9,224 \cdot 10^{-3}$	90	15
Octyl-Sepharose	0,070	0,0319	0,456	58	726
<b>Mohn-PLD2</b>					
Rohextrakt	85,320	0,1038	$1,217 \cdot 10^{-3}$	100	1
Phenyl-Sepharose	5,170	0,0942	0,0182	90	14
Octyl-Sepharose	0,050	0,0252	0,504	25	397

In **Abbildung 21A** ist die Zunahme der Reinheit der Proteinlösungen während des Reinigungsprozesses gelelektrophoretisch dokumentiert. Zusätzlich wurde der Reinigungsverlauf mittels Western-Blot (**Abbildung 21B**) verfolgt.



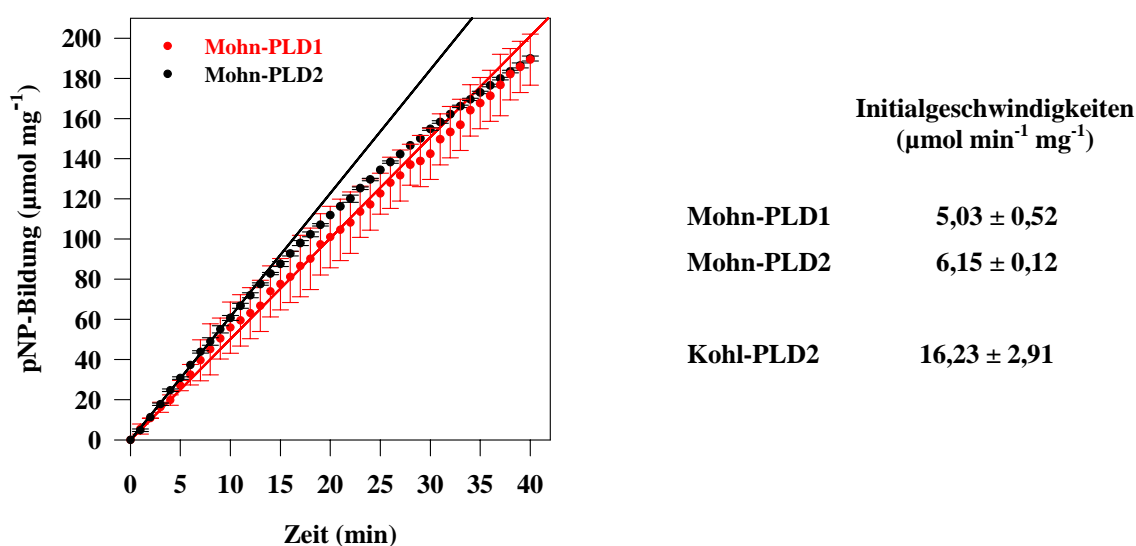
**Abbildung 21: Reinigung der Mohn-PLD-Isoenzyme.** SDS-PAGE-Gel (A) und Western-Blot (B): Bahn 1: LMW-Marker; Bahn 2: Rohextrakt der Mohn-PLD1; Bahn 3: Mohn-PLD1 nach Phenyl-Sepharose; Bahn 4: Mohn-PLD1 nach Octyl-Sepharose; Bahn 5: LMW-Marker; Bahn 6: Rohextrakt der Mohn-PLD2; Bahn 7: Mohn-PLD2 nach Phenyl-Sepharose; Bahn 8: Mohn-PLD2 nach Octyl-Sepharose.

### 5.1.5 Biochemische Charakterisierung der Mohn-PLD-Isoenzyme

Die rekombinant gewonnenen Mohn-PLD-Isoenzyme bildeten die Grundlage für die weitere biochemische Charakterisierung der beiden Isoenzyme, die im Rahmen dieser Arbeit vor allem auf die Ermittlung ihrer Hydrolyse- sowie Transphosphatidylierungseigenschaften gerichtet war.

#### 5.1.5.1 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System

Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System erfolgte mit einem kontinuierlichen Küvettentest (4.18.1.2), bei dem die durch die pNP-Bildung aus PpNP als Substrat hervorgerufene Absorptionsänderung kontinuierlich bei 360 nm gemessen wurde. Der verwendete Reaktionspuffer wurde in Analogie zu dem der wässrigen Phase in dem von Hirche et al. (1997) etablierten Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer gewählt, um die Ergebnisse der verschiedenen Aktivitätsassays besser miteinander vergleichen zu können, da auch die Aktivitätsmessungen für Kohl-PLD2 und die Kohl-PLD2-Varianten unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. In **Abbildung 22** ist der zeitliche Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten pNP-Bildung dargestellt.



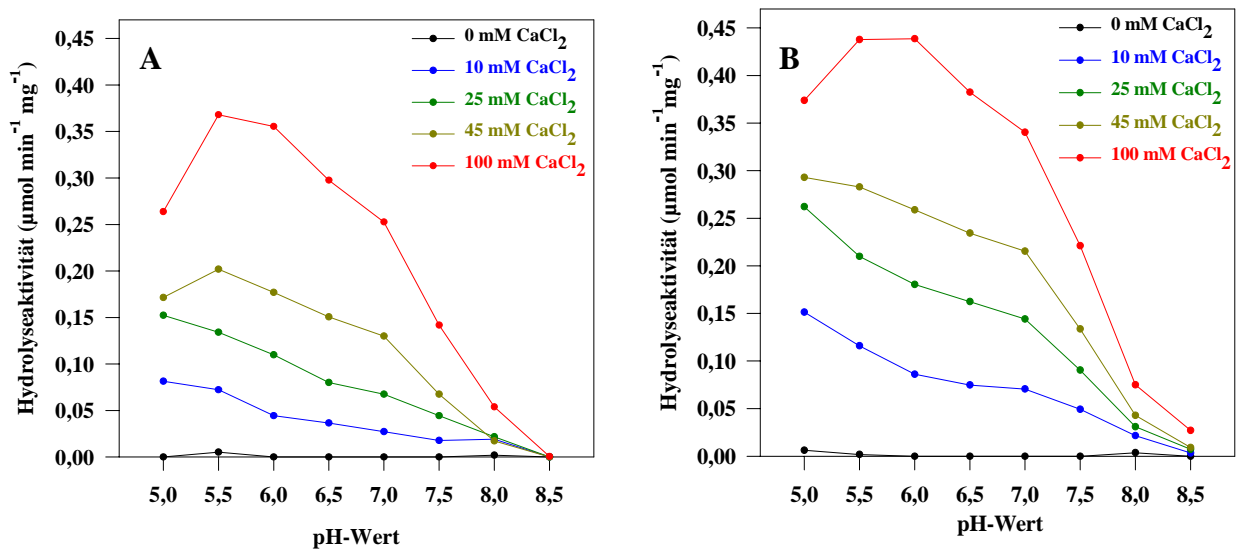
**Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten pNP-Bildung im micellaren System.** Durchgezogene Linien; lineare Regression zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten. Die gezeigten Messdaten wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten von PLD1 und PLD2 betragen  $5,03 \pm 0,52$  bzw.  $6,15 \pm 0,12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Demnach besitzen beide Enzyme bei der Verwendung des synthetischen Substrates PpNP eine vergleichbare hydrolytische Aktivität, die im Vergleich mit der hydrolytischen Aktivität der Kohl-PLD2 ( $16,23 \pm 2,91 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , 5.2.5.2) um den Faktor 3,2 bzw. 2,6 geringer ist.

### 5.1.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme in Abhängigkeit vom pH-Wert und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sollte zum einen Aufschluss über das pH-Optimum sowie die optimale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geben. Zum anderen sollte geprüft werden, ob eine in der Literatur kontrovers diskutierte Verschiebung des pH-Optimums pflanzlicher  $\alpha$ -Typ-PLDs in den sauren Bereich bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Allgyer et al., 1979; Abousalham et al., 1993) bzw. bei Absenkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Pappan und Wang, 1999) zu beobachten ist.

Die Aktivitäten der Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 wurden im pH-Bereich von 5,0 bis 8,5 und im Konzentrationsbereich von 20 bis 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , der für die  $\alpha$ -Typ-PLDs als optimal gilt (Wang, 2000), mit dem modifizierten diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.3) unter Verwendung von PpNP als Substrat bestimmt. Die höchste Hydrolyseaktivität wurde für beide Isoenzyme zwischen pH 5,5 und 6,0 in Gegenwart von 100 mM  $\text{CaCl}_2$  gemessen (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Einfluss des pH-Wertes und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität.** A, Mohn-PLD1; B, Mohn-PLD2. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Für beide Mohn-PLDs konnte in Gegenwart von 10 und 25 mM  $\text{CaCl}_2$  im untersuchten pH-Bereich 5,0 bis 8,5 das Aktivitätsoptimum noch nicht erreicht werden. Es wird daher vermutet, dass die Mohn-PLDs unter sauren Bedingungen bei physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aktiv sind. Beide Mohn-PLD-Isoenzyme zeigen eine Verschiebung des pH-Optimums der Hydrolyseaktivität bei einer Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den



sauren Bereich. Dieser Befund stimmt mit dem von Pappan und Wang (1999) für Rizinus-PLD gefundenen Resultaten überein. Zudem konnten Pappan und Wang (1999) zeigen, dass sich die Rizinus-PLD $\alpha$ -Aktivität im sauren Bereich durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat bzw. Phosphatidylinositol-4-phosphat stimulieren ließ. Wie bereits unter Punkt 5.1.1.3 erwähnt, besitzen die Mohn-PLDs zwei potentielle PIP<sub>2</sub>-Bindungsstellen. Bei weiterführenden Aktivitätsstudien mit den Mohn-PLD-Isoenzymen wäre es daher sehr interessant, einen möglichen aktivierenden Effekt von PIP<sub>2</sub> bzw. PIP zu prüfen. In engem Zusammenhang damit steht der Befund von Zheng et al. (2000), der zeigt, dass PIP<sub>2</sub> an die C2-Domäne von pflanzlicher PLD $\alpha$  in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen sehr gut gebunden, jedoch bei Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen verdrängt wird. Die PIP<sub>2</sub>-Bindung wird dabei konzentrationsabhängig durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen (> 0,6 mM für den PLD $\alpha$ -C2-Komplex) inhibiert. Die Erhöhung der PLD-Aktivität *in vitro* durch unphysiologische, millimolare Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen resultiert wahrscheinlich aus den artifiziellen Aktivitäts-Assay-Bedingungen.

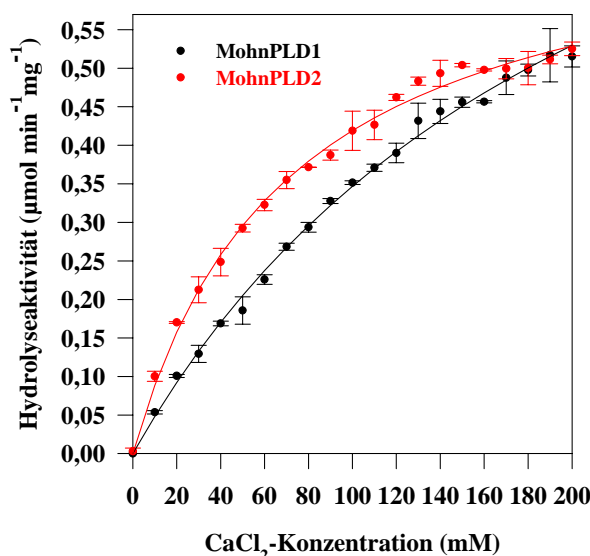
#### **5.1.5.3 Bestimmung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Konzentration**

Durch die Bestimmung der Hydrolyseaktivität der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Konzentration sollte der von Oblozinsky et al. (2003) beschriebene Metallioneneffekt geprüft werden. Bei Untersuchungen an einem aus Mohnkeimlingen isolierten PLD-Isoenzym mit PpNP als Substrat konnte dabei eine um den Faktor 4 höhere Aktivität in Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Ionen (optimale Konzentration: 5 mM) im Vergleich zur Aktivität bei Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen (optimale Konzentration: 10 mM) gemessen werden.

Die Hydrolyseaktivität der beiden rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme wurde im micellaren System in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Ionen mit PpNP als Substrat bestimmt (4.18.1.4). Beide Mohn-PLD-Isoenzyme sind bei pH 5,5 in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen inaktiv, wie bereits in **Abbildung 23** gezeigt. Durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen wurde die Aktivität der Mohn-PLD-Isoenzyme deutlich erhöht und eine maximale Aktivität bei 200 mM CaCl<sub>2</sub> erreicht (**Abbildung 24**). Im Vergleich dazu erreicht die rekombinante Kohl-PLD2 ihre maximale Hydrolyseaktivität bereits bei 45 mM CaCl<sub>2</sub> (Schäffner et al., 2002). Andere bisher bekannte pflanzliche  $\alpha$ -Typ-PLDs benötigen CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 20 und 100 mM (Wang, 2000) für ihre optimale katalytische Aktivität. Eine Aktivierung der rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme durch Mg<sup>2+</sup>- oder Zn<sup>2+</sup>-Ionen konnte bei Konzentrationen zwischen 0 und 100 mM bzw. 0 und 50 mM nicht festgestellt werden. Diese



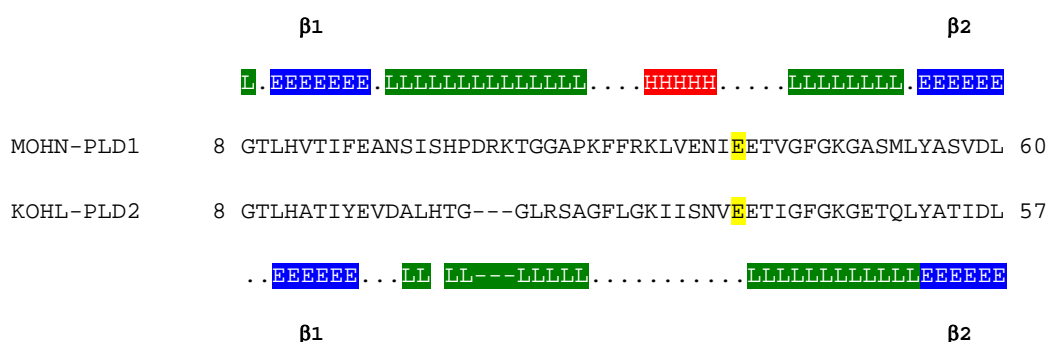
Ergebnisse liefern daher keinerlei Indiz dafür, dass das von Oblozinsky et al. (2003) beschriebene  $Zn^{2+}$ -aktivierbare PLD-Isoenzym mit einer der beiden rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme identisch ist.



**Abbildung 24: Einfluss der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Reaktionspuffer auf die Mohn-PLD1- und Mohn-PLD2-Hydrolyseaktivität.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Der sehr hohe  $Ca^{2+}$ -Bedarf für das Erreichen einer optimalen Aktivität spiegelt sich auch in der Reinigung beider Mohn-PLD-Isoenzyme mittels  $Ca^{2+}$ -vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie (5.1.4) wider, wo eine Bindung der beiden Enzyme erst bei 200 mM  $CaCl_2$  erfolgreich war. Eine Erklärung für den höheren  $Ca^{2+}$ -Bedarf im Vergleich mit anderen pflanzlichen PLDs kann nur in strukturellen Unterschieden innerhalb der C2-Domäne zu suchen sein. Die zwei für die  $Ca^{2+}$ -Bindung bei pflanzlichen PLDs des  $\alpha$ -Typs verantwortlichen sauren Aminosäure-Reste Glu42 und Asp101 sind auch, wie in 5.1.1.3 bereits beschrieben, in der C2-Domäne von Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 enthalten. Möglicherweise ist der Aminosäure-Rest Glu42 jedoch so in einer Helix-Struktur involviert, dass er für eine Bindung von  $Ca^{2+}$  nicht zur Verfügung steht und demzufolge die  $Ca^{2+}$ -Bindung nur über den sauren Aminosäure-Rest Asp101 mit stark verminderter Affinität erfolgen kann. Die Gründe für diese Annahme ergeben sich aus dem Vergleich der Sekundärstrukturvorhersagen für die Mohn-PLD-Isoenzyme mit der für die Kohl-PLD2 und aus dem Vergleich der Hydrophobizitätsprofile dieser Enzyme (**Anhang A5**). Die Sekundärstrukturen wurden für die Mohn-PLD-Isoenzyme sowie für die Kohl-PLD2 mittels PHD (predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks; Rost, 1996; <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>) mit einer durchschnittlichen Genauigkeit

von > 82 % vorhergesagt (**Anhang A2** bzw. **A6**). Der Vergleich der Hydrophobizitätsprofile von Mohn-PLD1 und Kohl-PLD2 (**Anhang A5**) zeigt, dass die Region zwischen den Aminosäuren 20 bis 40 bei Mohn-PLD1 stark hydrophil ist, während diese Region bei der Kohl-PLD2 hydrophob ist. Dieser Befund wird durch eine in diesem Bereich für beide Mohn-PLD-Isoenzyme vorhergesagte Helix-Struktur gestützt (**Abbildung 25**), da  $\alpha$ -Helices im Allgemeinen an der Oberfläche von Proteinen liegen und tendenziell nur jede dritte oder vierte Aminosäure hydrophob ist (Mount, 2001). Diese helikale Struktur im Bereich der Aminosäure Glu42 (Glu39 bei der Kohl-PLD2) wurde für das Weißkohl-Enzym nicht vorhergesagt (**Abbildung 25**).



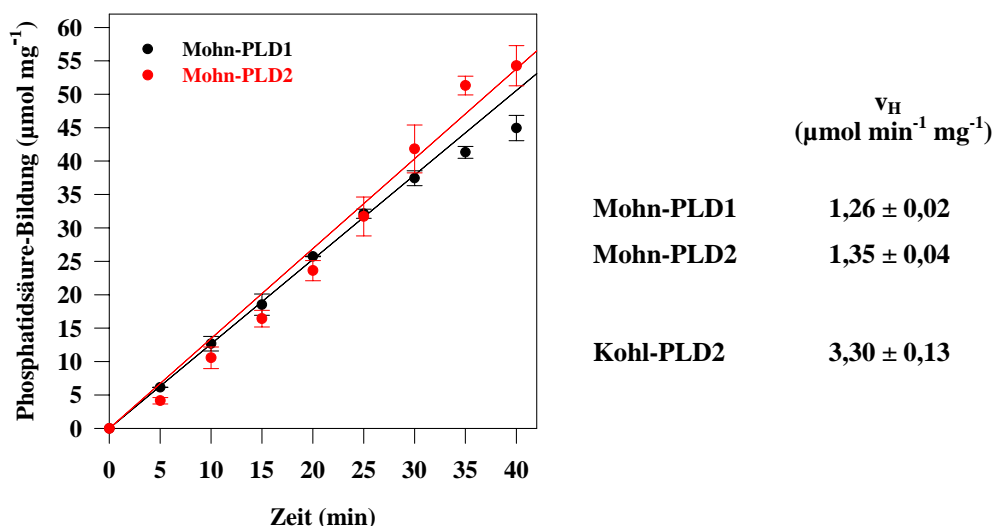
**Abbildung 25: PHD-Sekundärstrukturvorhersage für die Mohn-PLD1 bzw. die Kohl-PLD2 im Aminosäurebereich 8 bis 60 bzw. 57.** H, Helix; E, Faltblatt; L, Loop und andere Strukturelemente; gelb markiert, in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung involvierte Aminosäure Glu42 bzw. Glu39;  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2,  $\beta$ -Faltblätter der C2-Domäne.

#### 5.1.5.4 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem

Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität und der Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer erfolgte nach Hirche et al. (1997) mit SPC als Substrat und mit Glycerol als Akzeptoralkohol (4.18.2). Aus dem zeitlichen Verlauf der PA-Bildung in Abwesenheit von Glycerol bzw. der PG- und PA-Bildung in Gegenwart von Glycerol wurden die Initialgeschwindigkeiten für die Hydrolyse ( $v_H$ ), für die Transphosphatidylierung ( $v_T$ ) und für die Hydrolyse als Konkurrenzreaktion ( $v_{HK}$ ) ermittelt. Das Transphosphatidylierungspotential ( $v_T/v_{HK}$ ) wurde aus den Quotienten der Transphosphatidylierungsaktivität ( $v_T$ ) und der hydrolytischen Konkurrenzreaktion ( $v_{HK}$ ) berechnet.

In **Abbildung 26** ist der zeitliche Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten Hydrolyse in Abwesenheit von Glycerol dargestellt. Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse ( $v_H$ ) von PLD1 und PLD2 betragen  $1,26 \pm 0,02$  bzw.  $1,35 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Beide Enzyme besitzen, wie auch bei der Verwendung des synthetischen Substrates

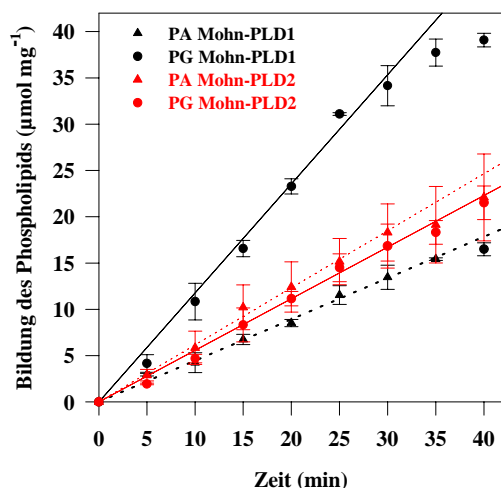
PpNP im micellaren System (5.1.5.1) gezeigt, eine vergleichbare hydrolytische Aktivität. Vergleicht man die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse der Mohn-PLDs mit der der Kohl-PLD2 ( $v_H = 3,30 \pm 0,13 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), sind diese ähnlich dem micellaren System mit PpNP als Substrat (5.1.5.1) um den Faktor 2,6 bzw. 2,5 geringer.



**Abbildung 26:** Zeitlicher Verlauf der durch die Mohn-PLD-Isoenzyme katalysierten Bildung von Phosphatidsäure im Zweiphasensystem in Abwesenheit von Glycerol. Durchgezogene Linien; lineare Regression zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Für das aus Mohnkeimlingen isolierte PLD-Isoenzym wurde von Oblozinsky et al. (2003) im Zweiphasensystem Diethylether/Acetat-Puffer mit PC als Substrat eine Hydrolyseaktivität  $v_H = 0,342 \pm 0,051 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  gemessen. Ein direkter Vergleich der Daten ist jedoch nicht zulässig, da die Wahl der organischen Phase des Zweiphasensystems erhebliche Änderungen der PLD-Aktivitäten zur Folge hat (Hirche et al., 1997).

**Abbildung 27** zeigt den zeitlichen Verlauf der durch die rekombinanten Mohn-PLDs katalysierten Transphosphatidylierung und Hydrolyse in Anwesenheit von Glycerol. Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Mohn-PLD-Isoenzyme für die Transphosphatidylierung ( $v_T$ ) und die Hydrolyse ( $v_{HK}$ ) zeigen unerwartet signifikante Unterschiede, die sich im Transphosphatidylierungspotential widerspiegeln. Für Mohn-PLD1 konnte eine 2,6-fach höhere Umesterungsrate im Vergleich zur Hydrolyserate gemessen werden. Die Mohn-PLD2 dagegen hydrolysiert und transphosphatidyliert SPC gleichermaßen gut, obwohl sie sich in nur 11 Aminosäuren von Mohn-PLD1 unterscheidet.



	$v_T$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$v_{HK}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$v_T/v_{HK}$
Mohn-PLD1	$1,18 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,01$	$2,62 \pm 0,12$
Mohn-PLD2	$0,56 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,05$
Kohl-PLD2	$3,11 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,43$

**Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Bildung von Phosphatidylglycerol und Phosphatidsäure durch die Mohn-PLD-Isoenzyme im Zweiphasensystem.** Durchgezogene bzw. gestrichelte Linien; lineare Regression zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten der PG- bzw. der PA-Bildung. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den berechneten Initialgeschwindigkeiten für Kohl-PLD2  $v_T = 3,11 \pm 0,19 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und  $v_{HK} = 1,55 \pm 0,24 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  sowie deren Umesterungspotenz  $v_T/v_{HK} = 2,01 \pm 0,43$ , so ergeben sich die folgenden Aussagen: Die Transphosphatidylierungsaktivität der Mohn-PLD1 ist 2,6-fach geringer als die von Kohl-PLD2. Dies stimmt mit den Hydrolyseaktivitätsbestimmungen im micellaren und im Zweiphasensystem überein (5.1.5.1 und **Abbildung 26**), und lässt auf eine geringere spezifische Aktivität des Mohn-Enzyms schließen. Durch eine verhältnismäßig gering ausgeprägte Hydrolysereaktion in Anwesenheit von Glycerol ergibt sich für Mohn-PLD1 ein um den Faktor 1,3 verbessertes Transphosphatidylierungspotential im Vergleich zur Kohl-PLD2.

In Bezug auf die reduzierte Transphosphatidylierungsaktivität der Mohn-PLD2 im Vergleich zur Mohn-PLD1 wird vermutet, dass die bei den beiden Isoenzymen voneinander abweichenden Aminosäure-Reste in Position 349 (Glu bzw. Ala) und 352 (Gln bzw. Glu) innerhalb des ersten verlängerten HKD-Motives dabei eine Rolle spielen könnten.

Von Oblozinsky et al. (2003) wurde im Zweiphasensystem Diethylether/Acetat-Puffer mit PC als Substrat und Glycerol als Akzeptoralkohol für das aus Mohnkeimlingen isolierte PLD-Isoenzym eine Transphosphatidylierungsaktivität  $v_T = 4,86 \pm 0,05 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  gemessen, wohingegen unter diesen Bedingungen eine Hydrolyseaktivität nicht detektiert werden konnte. Durch die Differenz in der Zusammensetzung der organischen Phase ist ein Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Aktivitäten der rekombinanten Mohn-PLDs nicht möglich. Es lässt sich aber dennoch sagen, dass die von Oblozinsky et al. (2003) gemessene hohe Transphosphatidylierungsaktivität in den rekombinant gewonnenen Mohn-PLDs nicht

beobachtet werden konnte. Es handelt sich bei dem von Oblozinsky et al. (2003) untersuchten Enzym offenbar nicht um eines der beiden rekombinanten Mohn-PLD-Isoenzyme. Dafür sprechen auch die bereits unter Punkt 5.1.5.3 beschriebenen differierenden Hydrolyseaktivitäten in Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration. Ein experimenteller Nachweis mittels tryptischen Verdaus und anschließender massenspektrometrischer Analyse ist bisher an der nicht reproduzierbaren Gewinnung dieses Mohn-PLD-Enzyms aus Mohnkeimlingen nach Oblozinsky et al. (2003) gescheitert.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich aber ableiten, dass Differenzen im Transphosphatidylierungspotential pflanzlicher PLDs auf geringfügigen Aminosäureaustauschen beruhen. Unter dem biosynthetischen Gesichtspunkt bedeutet das, dass die gentechnische Modulation des Transphosphatidylierungspotentials von PLDs relativ einfach zu bewerkstelligen sein sollte.

## 5.2 Kohl-PLD2 und Kohl-PLD2-Enzymvarianten

### 5.2.1 Design von Kohl-PLD2-Enzymvarianten

Mit der Etablierung eines Verfahrens zur Gewinnung rekombinanter PLDs aus Weißkohl (Schäffner et al., 2002) war die Voraussetzung für Struktur-Funktionsstudien gegeben. Aufbauend auf multiplen Alignments, Sekundärstrukturvorhersagen und Hydrophobizitätsvergleichen sollten mit Hilfe von Deletionen, Insertionen und gezielten Aminosäureaustauschen Strukturelemente lokalisiert werden, die für die katalytische Aktivität der PLD, insbesondere für die Transphosphatidylierungsaktivität funktionsbestimmend sind. Für die durchgeführten Mutationsstudien wurde die rekombinante PLD2 aus Weißkohl verwendet, da sie der aus dem Weißkohl isolierten PLD entspricht (Schöps et al., 2002). Unter Berücksichtigung der Sekundärstrukturvorhersage wurden die verschiedenen Enzymvarianten der rekombinanten PLD2 aus Kohl vor allem auf der Grundlage von Sequenzvergleichen mit ausgewählten nicht-pflanzlichen Vertretern der PLD-Superfamilie (*E. coli*-Phosphatidylserinsynthase, *E. coli*-Cardiolipinsynthase, humane PLD1 sowie den PLDs aus *Streptomyces antibioticus* und *Streptomyces species*), etablierten pflanzlichen PLDs (*Nicotiana tabacum*, *Ricinus communis*, *Zea mays*) sowie durch den Vergleich der PLD2-Sequenz mit denen der beiden Mohn-PLD-Isoenzyme, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden, abgeleitet. Darauf aufbauend wurden die Bereiche des ersten und zweiten HKD-Motives, der bei pflanzlichen PLDs hoch-konservierte C-Terminus sowie die 8 in pflanzlichen PLDs ebenfalls hoch-konservierten Cystein-Reste für Mutationen ausgewählt. Von diesen Regionen wurde ein Einfluss auf die Aktivität insbesondere auf die Transphosphatidylierungsaktivität erwartet.

#### 5.2.1.1 Modifizierung der HKD-Motive und der ihnen benachbarten Regionen

Wie bereits im Abschnitt 2.4 erwähnt, haben pflanzliche PLD-Isoenzyme wie alle zur PLD-Superfamilie gehörenden Mitglieder zwei konservierte HKD-Motive, die für die katalytische Aktivität verantwortlich gemacht werden. Die Notwendigkeit der HKD-Motive auch für die katalytische Aktivität der pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs sollte durch die Punktmutationen H333D, K335R und D340E im ersten HKD-Motiv und die Punktmutationen H663D, K665R und D670E im zweiten HKD-Motiv bestätigt werden.

Die drei Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/ $\Delta$ 351/ $\Delta$ 352/M356V, bei denen der Aminosäureaustausch in den angrenzenden Regionen des ersten HKD-Motives der Kohl-PLD2 vorgenommen wurde, wurden aufgrund sequentieller Besonderheiten der Mohn-PLDs im Vergleich mit etablierten

pflanzlichen PLDs in Form eines multiplen Alignments abgeleitet (**Abbildung 28**). Dabei war nur der Bereich des ersten HKD-Motives interessant, da dieser im Vergleich zum Bereich des zweiten HKD-Motives nicht so hoch-konserviert ist (multiples Alignment im **Anhang A3**). Diese Enzymvarianten wurden in der Annahme entwickelt, dass die rekombinanten Mohn-PLDs über eine sehr ausgeprägte Transphosphatidylierungsaktivität verfügen, wie das von Oblozinsky et al. (2003) für eine aus Mohnkeimlingen isolierte PLD beschrieben worden ist.

		1. HKD-Motiv			
Arath a1	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	SRGGSEM--RRIVS	354
Arath a2	260	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	SGGSR--RRIVS	354
Braol a1	260	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	SRGGSQM--RRIVS	355
Braol a2	261	KKATEGV (65)	HHQRIVVVDSEV	PSQGGSEMRRIMS	357
Crapl a1	259	KKASEGV (65)	HHQRIIVVDS	LDLPSGGSDK--RRIVS	353
Crapl a2	259	KKANEGV (65)	HHQRIIVVDS	LDLPSGGSDK--RRIVS	353
Lyces a1	260	KKASEGV (65)	HHQRIIVVDS	ALPSGESEK--RRILS	354
Nicta a	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDSELP	SGESEK--RRIVS	353
Orysa a1	263	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDHEL	PNQGSQ--RRIVS	357
Papso a1	264	KKADEGV (65)	HHQRIVVVDS	AMPSEGSQ--RRIVS	358
Papso a2	264	KKADEGV (65)	HHQRIVVVDS	AMPAGSEQ--RRIVS	358
Pimbr a	259	KKADEGV (65)	HHQRIVVVDSEMP	TSGSEN--RRVVS	353
Ricco a	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDS	AMPNGDSQR--RRIVS	353
Vigun a	259	KKASEGV (65)	HHQRIVVVDS	ALPGGGSDK--RRIVS	354
Zeama a	263	RKASEGV (65)	HHQRIVVVDHE	MNPQGSQ--RRIVS	357

**Abbildung 28: Ausschnitt des multiplen Alignments (Anhang A3) mit Primärstrukturen pflanzlicher PLDs im Bereich des 1. HKD-Motives.** Blau, identische und ähnliche Aminosäuren; rot markiert, HKD des katalytischen Motives; schwarz, differierende Aminosäuren; gelb markiert, Positionen der Aminosäureaustausche T264D, V339T/E342A/V343M und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V. Species-Kurzformen: *Arath*, *Arabidopsis thaliana*; *Braol*, *Brassica oleracea*; *Crapl*, *Craterostigma plantagineum*; *Lyces*, *Lycopersicon esculentum*; *Nicta*, *Nicotiana tabacum*; *Orysa*, *Oryza sativa*; *Papso*, *Papaver somniferum*; *Pimbr*, *Pimpinella brachycarpa*; *Ricco*, *Ricinus communis*; *Vigun*, *Vigna unguiculata*; *Zeama*, *Zea mays*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2.

Aus dem Sequenzvergleich von Kohl-PLD2 und *Streptomyces species*-PLD wurden die Enzymvarianten Q334S (Aminosäureaustausch innerhalb des ersten HKD-Motives) und S664H (Aminosäureaustausch innerhalb des zweiten HKD-Motives) abgeleitet (**Abbildung 29**).

		1. HKD-Motiv	2. HKD-Motiv
Braol a2	332	HHQRIVVVDS (321)	VHSKMMIVDD 671
Stran	214	NSKLLVVDG (265)	LHHKLVSVDD 497
Strsp	169	NSKLLVVDG (269)	QHHKLVSVDS 456

**Abbildung 29: Alignment der PLD-Primärstrukturen von *Brassica oleracea*, *Streptomyces antibioticus* und *Streptomyces species* innerhalb des 1. und 2. HKD-Motives.** Blau, identische und ähnliche Aminosäuren; rot markiert, HKD der katalytischen Motive; schwarz, differierende Aminosäuren; gelb markiert, Positionen der Aminosäureaustausche Q334S und S664H. Species-Kurzformen: *Braol*, *Brassica oleracea*; *Stran*, *Streptomyces antibioticus*; *Strsp*, *Streptomyces species*. Nummern in der NCBI-Genbank siehe Tabelle 2.

Die Bereiche der beiden HKD-Motive sind die einzigen Regionen der Primärstrukturen pflanzlicher und *Streptomyces*-PLDs, die sich in Form eines Alignments miteinander vergleichen lassen. Ansonsten ist der Grad der Übereinstimmung zwischen diesen Sequenzen sehr gering (< 20 %). Dieser Vergleich ist von besonderem Interesse, da zum einen nur von der PLD aus *Streptomyces species* eine Kristallstruktur vorhanden ist und zum anderen *Streptomyces*-PLDs prädestiniert für die Umesterung von Glycerophospholipiden zu sein scheinen. Dies zeigen auch vergleichende Studien zwischen Kohl-PLD und *Streptomyces species*-PLD von Hirche und Ulbrich-Hofmann (2000), die zum Beispiel im Zweiphasensystem Diethylether/Acetat-Puffer mit PC als Substrat und Glycerol als Akzeptoralkohol eine Transphosphatidylierungsaktivität  $v_T = 1,12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  für Kohl-PLD und  $v_T = 32,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  für *Streptomyces species*-PLD messen konnten.

### 5.2.1.2 Bedeutung des C-Terminus für die Katalyse

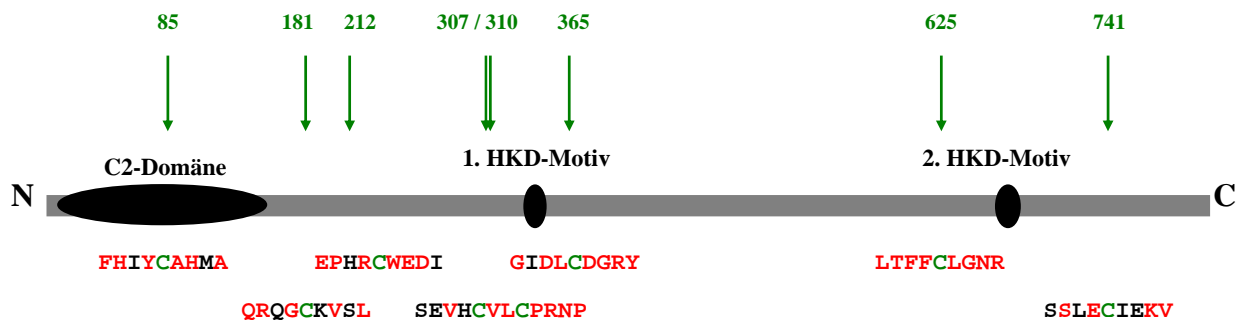
Mutationsstudien an Säuger-PLDs wiesen auf eine wesentliche Bedeutung des C-terminalen Bereiches, insbesondere der C-terminalen Aminosäure, bei der Stabilisierung der funktionellen Konformation des aktiven Zentrums hin (Sung et al., 1999; Xie et al., 2000 und Liu et al., 2001). Aufgrund der hohen Konservierung des C-Terminus innerhalb der tierischen PLDs und auch innerhalb der pflanzlichen PLDs (multiples Alignment im **Anhang A3**) im Gegensatz zu den mikrobiellen PLDs war es von Interesse, die Bedeutung des C-Terminus pflanzlicher  $\alpha$ -Typ-PLDs für deren Aktivität zunächst durch systematische Deletion des C-Terminus sowie durch Anfügen einer zusätzlichen Aminosäure zu überprüfen. Daraus ergaben sich die Deletionsmutanten  $\Delta 812$ ,  $\Delta 808-812$ ,  $\Delta 804-812$  und  $\Delta 801-812$  sowie die Enzymvariante PLD2+S. Um Aufschluss über den Charakter der Wechselwirkungen des C-Terminus mit dem aktiven Zentrum zu erhalten, wurde die C-terminale Aminosäure gegen Gly, Ala, Val, Ser, Cys, Asp, Asn, Lys, Arg, Phe bzw. Tyr ausgetauscht (T812G, T812A, T812V, T812S, T812C, T812D, T812N, T812K, T812R, T812F und T812Y).

### 5.2.1.3 Bedeutung der Cystein-Reste für die PLD-Aktivität

Eine bisher in der Literatur kaum beachtete Gemeinsamkeit der pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs ist die Präsenz von 8 hoch-konservierten Cystein-Resten (multiples Alignment im **Anhang A3**). Indem die einzelnen Cystein-Reste der Kohl-PLD2 (**Abbildung 30**) durch Serin-Reste ausgetauscht wurden, sollte eine mögliche Bedeutung der Cystein-Reste für die enzymatische Aktivität ermittelt werden. Der Austausch der Cystein- durch Serin-Reste wurde gewählt, da Serin dem Cystein strukturell sehr ähnlich ist und vorhandene Wasserstoffbrückennetzwerke im Gegensatz zu einer Substitution durch Alanin nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Die



daraus resultierenden Enzymvarianten sind C85S, C181S, C212S, C307S, C310S, C365S, C625S und C741S.



**Abbildung 30: Überblick über die Cystein-Reste der PLD2 aus Weißkohl.** Grün, Positionen der Cystein-Reste; rot, den Cystein-Resten benachbarte, in den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs konservierte Aminosäure-Reste; schwarz, den Cystein-Resten benachbarte, in den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs differierende Aminosäure-Reste.

### 5.2.2 Mutagenese und Expression der Kohl-PLD2-Enzymvarianten

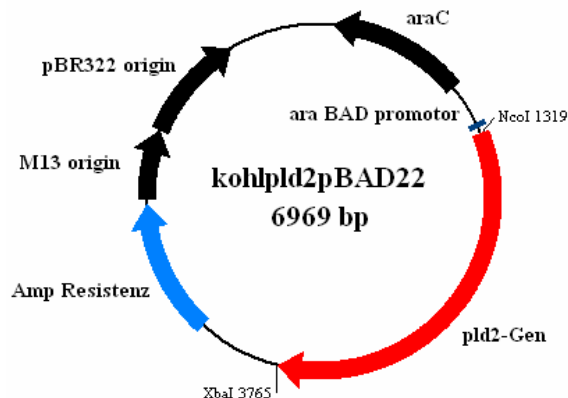
Als Matrize zur Einführung der Mutationen diente in Abhängigkeit vom gewählten Expressionssystem das Plasmid Kohl $pld2$ pRSET5a (Wildtyp-Plasmid; 3.7) bzw. das Plasmid Kohl $pld2$ pET-28b(+) (Wildtyp-Plasmid; 5.2.3.3). Die Verwendung von den Wildtyp-Plasmiden abweichenden Plasmiden ist unter Punkt 3.6 vermerkt. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde wie unter 4.6 beschrieben mit den unter 3.6 angegebenen Oligonucleotiden durchgeführt. Alle erzeugten Varianten wurden durch Sequenzierung des kompletten  $pld2$ -Gens überprüft (4.12). Die PLD2-Enzymvarianten im pRSET5a-Vektor wurden anschließend im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)+pUBS520 in Analogie zum Wildtyp-Enzym exprimiert (4.13.1; Schäffner et al., 2002), die PLD2-Enzymvarianten im pET-28b(+) Vektor im *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS entsprechend des neu etablierten Expressionssystems (4.13.2; neues Expressionssystem unter 5.2.3.3). Die Wahl eines neuen Expressionssystems (5.2.3) war nach unerwarteten Schwierigkeiten bei der Expression einiger Kohl-PLD2-Enzymvarianten im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)+pUBS520 notwendig geworden. Aufgrund einer ungenügenden Stabilität des  $pld2$ -tragenden Plasmids kam es zum einen immer wieder zu Problemen bei der Anzucht der Vor- und Hauptkulturen und zum anderen zur Produktion von aktivem und inaktivem Protein ein- und derselben Enzymvariante.

## 5.2.3 Klonierungs- und Expressionsstudien von Kohl-PLD2 zur Etablierung eines neuen Expressionssystems

### 5.2.3.1 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pBAD22-Vektor

Der pBAD22-Vektor, konstruiert von Guzman et al. (1995), enthält den schwach transkribierenden *araBAD*-Promotor des Arabinoseoperons und sein regulatorisches Gen *araC*. Die Transkriptionsrichtung von *araC* verläuft entgegengesetzt zu der von *araBAD*.

Die Klonierung des Kohl-*pld2*-Gens in den pBAD22-Vektor erfolgte mit den Restriktionsendonucleasen *Nco I* und *Xba I*. Zur Herstellung des Expressionskonstruktes *Kohlpld2pBAD22* wurde in dem Plasmid *Kohlpld2pRSET5a* mittels ortsgerichteter Mutagenese die sich im Gen befindliche *Nco I*-Schnittstelle entfernt und N-terminal die für die Klonierung notwendige *Nco I*-Schnittstelle bzw. C-terminal die *Xba I*-Schnittstelle erzeugt ( $\Delta$ *ncopl**pld2* fw/rv, *mutnco* fw/rv, *mutxba* fw/rv, 3.6). Nach Sequenzierung des so veränderten Plasmids wurde es ebenso wie der pBAD22-Vektor mit den Restriktionsendonucleasen *Nco I* und *Xba I* verdaut. Das *pld2*-Gen wurde wie unter 4.9 beschrieben in den linearisierten, dephosphorylierten pBAD22-Vektor ligiert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Im Anschluss an die Sequenzierung des so erhaltenen Expressionskonstruktes *Kohlpld2pBAD22* (**Abbildung 31**) wurde es in den *E. coli*-Stamm TOP 10 transformiert.



**Abbildung 31: Expressionskonstrukt *Kohlpld2pBAD22*.**

Für die Expression des Konstruktes *Kohlpld2pBAD22* wurden die folgenden Parameter variiert:

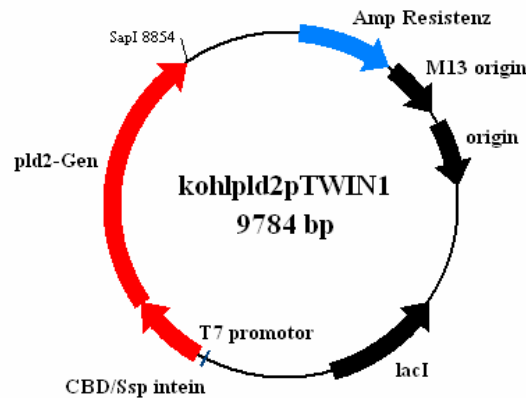
- Temperatur (25°C; 37°C)
- Induktorkonzentration (L-Arabinose: 0,00002 bis 0,2 %)
- Induktionszeitraum (0 bis 12 h)
- Repression mit D-Glucose (0,1 %ig).

Die anderen Expressionsparameter wurden konstant gehalten (Expressionsstamm *E. coli* TOP10; Kulturmedium: LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin; Induktionszeitpunkt OD<sub>600nm</sub>: 0,6). Zur Kontrolle des Expressionsverlaufes wurden Proben entnommen und die Zellen mit Zellysepuffer (B-PERII Bacterial Protein Extraction Reagent, Pierce) aufgeschlossen. Der lösliche Proteinanteil wurde mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Technik mit Anti-Kohl-PLD2-Antikörpern analysiert und auf PLD-Aktivität getestet. Lediglich bei einer Expressionstemperatur von 25°C und einer Induktion mit 0,2 % L-Arabinose wurde Kohl-PLD2 in aktiver Form exprimiert. Da bei Zusatz von 0,1 % D-Glucose zum Medium unter ansonsten gleichen Expressionsbedingungen kein Protein mit PLD-Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist die oben beschriebene Expression der Kohl-PLD2 vermutlich auf eine Basalexpression zurückzuführen. Auch alle anderen Expressionskulturen lieferten kein Protein mit PLD-Hydrolyseaktivität sowie keine erkennbaren Banden entsprechender Größe im SDS-PAGE-Gel bzw. im Western-Blot.

#### 5.2.3.2 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pTWIN I-Vektor

Die Fusion eines hydrophoben, zur Bildung von *inclusion bodies* neigenden Proteins mit einem hydrophilen Protein verhindert oftmals die Aggregation. Der pTWIN1-Vektor erlaubt die translationale Fusion eines Intein-tags am N- und/oder C-Terminus des Zielproteins. An jedes Intein ist zudem eine Chitin-Bindungsdomäne fusioniert, die für eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie genutzt werden kann. Das Ziel-Protein kann durch pH- bzw. Temperaturänderung (N-terminales Fusionsprotein) bzw. durch niedermolekulare Thiolverbindungen (C-terminales Fusionsprotein) vom Intein abgespalten werden.

Zur Herstellung des Expressionskonstruktes Kohl*pld2*pTWIN1 wurden die zwei für die Klonierung erforderlichen *Sap I*-Restriktionsschnittstellen mittels PCR (4.4; 4. PCR-Ansatz) mit dem Plasmid Kohl*pld2*pRSET5a als Template unter Verwendung der flankierenden Primer pTWIN1 fw und pTWIN1 rv angefügt. Nach Isolierung des PCR-Produktes aus dem Agarosegel und Restiktionsverdau mit *Sap I* wurde das *pld2*-Gen in den mit *Sap I* linearisierten, dephosphorylierten Vektor pTWIN1 ligiert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Eine Selektion positiver Klone erfolgte durch Restiktionsverdau der erhaltenen Plasmide mit *Sap I* unter Berücksichtigung der Tatsache, dass durch die Klonierung eine der zwei *Sap I*-Schnittstellen eliminiert wurde. Bei Verwendung dieser Klonierungsstrategie ist nur die translationale Fusion eines Intein-tags am N-Terminus der PLD möglich. Die korrekte DNA-Sequenz des Expressionskonstruktes Kohl*pld2*pTWIN1 (**Abbildung 32**) wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Das Konstrukt wurde nachfolgend in die entsprechenden *E. coli*-Stämme transformiert.



**Abbildung 32: Expressionskonstrukt Kohlpld2pTWIN1.** CBD, Chitin-Bindungsdomäne von *Bacillus circulans*; Ssp intein, Intein von *Synechocystis sp.*

Die folgenden Parameter wurden bei der Überexpression des Konstruktes Kohlpld2pTWIN1 variiert:

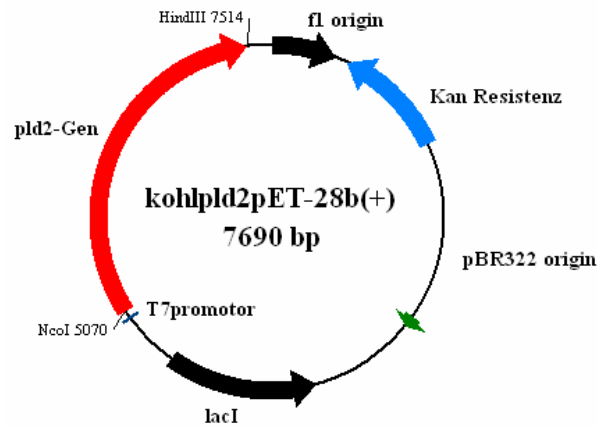
- Induktorkonzentration (IPTG: 25 bis 500  $\mu\text{M}$ )
- Induktionszeitraum (0 bis 20 h)
- *E. coli*-Expressionsstamm (ER 2566; BL21(DE3); BL21(DE3)+pUBS520; Rosetta(DE3)pLysS).

Die anderen Expressionsparameter wurden konstant gehalten (Kulturmedium: LB-Medium, 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin, 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin bei pUBS520, 25  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol bei pLysS; Induktionszeitpunkt  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ : 0,6; Temperatur: 15°C). Zur Verfolgung des Verlaufes der Expression wurden Zellproben entnommen und mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Technik analysiert und auf PLD-Aktivität getestet. Unabhängig vom Expressionsstamm wurde in allen Expressionskulturen Kohl-PLD2 ohne N-terminales Intein in geringen Mengen in löslicher Form exprimiert. Das Fusionskonstrukt Intein-PLD2 konnte weder im SDS-PAGE-Gel noch mittels Western-Blot detektiert werden. Das spricht für eine *in-vivo*-Spaltung, deren optimale Bedingungen für das N-terminale Intein mit einem pH-Wert von 7 und einer Temperatur von 25°C vom Hersteller angegeben sind. Die gemessenen sehr geringen PLD-Hydrolyseaktivitäten lagen im Fehler der Methode.

### 5.2.3.3 Expression von Kohl-PLD2 mit dem pET-28b(+)-Vektor und Lactose-Permease-mutierten *E. coli*-Stämmen

Die Expression in den Lactose-Permease-mutierten *E. coli*-Stämmen Rosetta(DE3) und Rosetta(DE3)pLysS ermöglicht die Kontrolle des Expressionsniveaus durch die Induktorkonzentration. Durch die lacY1-Mutation wird der aktive Transport von Lactose in die Zellen unterbunden. Aufgrund der so erhöhten Sensitivität dieser Stämme gegenüber Lactose im Medium ist eine gleichmäßigere Aufnahme von IPTG in die Zellen einer Population gegeben. Die Rosetta-*E. coli*-Stämme ermöglichen zudem die Expression von eukaryotischen Proteinen, die selten in *E. coli* verwendete Codons enthalten (Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Kane, 1995; Kurland et al., 1996), indem sie die tRNAs für die Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA mittels eines kompatiblen, eine Chloramphenicolresistenz vermittelnden Plasmid liefern. Diese Expressionsstämme werden bevorzugt mit pET-Expressionsvektoren, konstruiert von Studier und Mofatt (1986), Studier et al. (1990) sowie Rosenberg et al. (1987), verwendet (pET: plasmid for expression by T7 RNA polymerase). Bei der Wahl des pET-Expressionsvektors wurde auf eine Kanamycin-Resistenz geachtet, da die Selektion mit Ampicillin in Expressionskulturen nicht so effizient ist, weil die von den Zellen sekretierte  $\beta$ -Lactamase sowie der pH-Abfall während des Expressionsverlaufes zum Abbau des Ampicillins führen. In Kan-pET-Vektoren ist außerdem die Transkriptionsrichtung des Resistenzgens entgegengesetzt zum T7-Promotor, so dass bei Induktion des T7-Promotors keine Erhöhung des Kan-Gen-Produktes erfolgt. In den meisten Amp-pET-Vektoren liegt das  $\beta$ -Lactamase-Gen downstream und in derselben Orientierung wie der T7-Promotor.

Um das Kohl-*pld2*-Gen über *Nco I*/*Hind III*-Schnittstellen in den pET-28b(+)-Vektor klonieren zu können, wurde im Plasmid Kohl*pld2*pRSET5a zunächst durch ortsgerichtete Mutagenese die sich im Gen befindliche *Nco I*-Schnittstelle entfernt und N-terminal die für die Klonierung notwendige *Nco I*-Schnittstelle erzeugt ( $\Delta$ ncopl*d2* fw/rv, mut*nco* fw/rv, 3.6). Nach Sequenzierung des so veränderten Plasmids wurde es ebenso wie der pET-28b(+)-Vektor mit den Restriktionsendonucleasen *Nco I* und *Hind III* verdaut. Nach Isolierung des *pld2*-Gens sowie des linearisierten Vektors aus dem Agarosegel wurde der Vektor dephosphoryliert und anschließend die Insert-DNA in den Vektor, wie unter 4.9 beschrieben, ligiert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Das Expressionskonstrukt Kohl*pld2*pET-28b(+) (**Abbildung 33**) wurde nach Bestätigung der korrekten DNA-Sequenz durch Sequenzierung in die entsprechenden *E. coli*-Expressionsstämme transformiert.



**Abbildung 33: Expressionskonstrukt Kohlpld2pET-28b(+).**

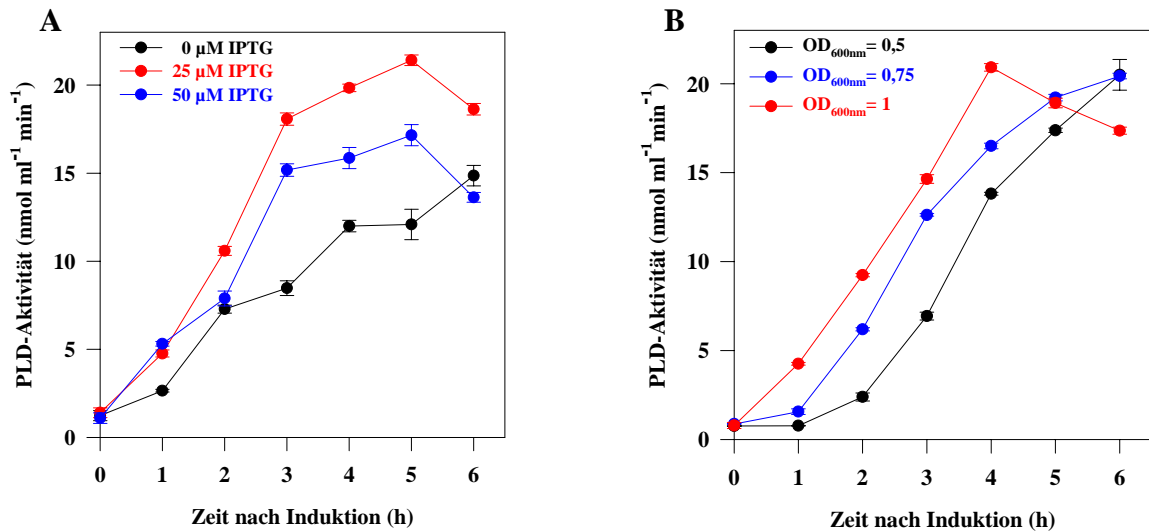
Zur Optimierung der Überexpression des Konstruktes Kohlpld2pET-28b(+) wurden folgende Parameter variiert:

- Temperatur (25°C, 37°C)
- Induktorkonzentration (IPTG: 25 bis 500 µM)
- Induktionszeitraum (0 bis 6 h)
- Induktionszeitpunkt (OD<sub>600</sub>: 0,5 bis 1)
- *E. coli*-Expressionsstamm (Rosetta(DE3); Rosetta(DE3)pLysS).

Das Kulturmedium (LB-Medium, 10 µg/ml Kan, 25 µg/ml Cm) wurde für alle Expressionsversuche gleich gewählt. Zur Verfolgung des Expressionsverlaufes wurden Zellproben mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Technik analysiert und auf hydrolytische PLD-Aktivität getestet.

In den bei 37°C angezogenen Expressionskulturen ist die PLD in Form von *inclusion bodies* akkumuliert worden. Nach Schein et al. (1988) ist es möglich, durch eine Temperaturniedrigung die Ausbeute an löslichen rekombinanten Proteinen zu verbessern. Auch in diesem Fall konnte durch ein Absenken der Kultivierungstemperatur von 37°C auf 25°C die Kohl-PLD2 erfolgreich in löslicher Form im Cytosol von Rosetta(DE3)-Zellen exprimiert werden. Die Induktion der Expression erfolgte dabei mit 25 bzw. 50 µM IPTG, aber auch ohne Induktion wurde Kohl-PLD2 gebildet. Eine weitere Erhöhung der IPTG-Konzentration führte zu einer Bildung von *inclusion bodies*. Durch Verwendung des *E. coli*-Stammes Rosetta(DE3)pLysS wurde versucht, die beobachtete Basalexpression zurückzudrängen, da das in diesem Stamm vorhandene, die Chloramphenicolresistenz vermittelnde Plasmid pLysS geringe Mengen an T7-Lysozym, einem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase (Mofatt et al., 1987; Studier, 1991) liefert. **Abbildung 34A** zeigt, dass

sich die Basalexpression auch in diesem Stamm nur zum Teil unterdrücken ließ. Eine IPTG-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  erwies sich als optimal für die Expression von Kohl-*pld2*-pET-28b(+) in Rosetta(DE3)pLysS bei 25°C. Der Induktionszeitpunkt besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Expression der Kohl-PLD2 (**Abbildung 34B**). Das PLD-Aktivitätsmaximum ist bei allen 3 gezeigten Expressionskulturen ähnlich, die höchste Expressionsrate wird jedoch bei den bei einer höheren optischen Dichte induzierten Zellen schon nach 4 Stunden erreicht.

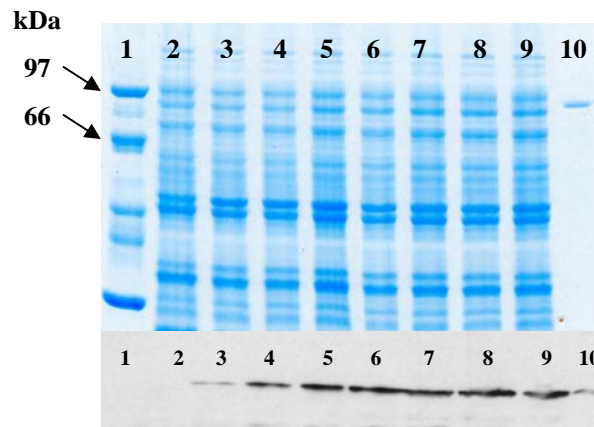


**Abbildung 34: Hydrolyseaktivität der Kohl-PLD2 im Verlauf der Expression von Kohl-*pld2*-pET-28b(+) in Rosetta(DE3)pLysS bei 25°C.** A: Einfluss der IPTG-Konzentration (Induktion bei  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,8$ ); B: Einfluss des Induktionszeitpunktes (Induktion mit 25  $\mu\text{M}$  IPTG). Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

Die optimierten Bedingungen für das neu etablierte Expressionssystem zur Expression von Kohl-PLD2 in aktiver, löslicher Form lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (4.13.2):

- Expressionsvektor: pET-28b(+)
- Expressionsstamm: Rosetta(DE3)pLysS
- Kulturmedium: LB-Medium, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kan, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cm
- Kultivierungstemperatur: 25°C
- Induktion: mit 25  $\mu\text{M}$  IPTG bei  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$  für einen Zeitraum von 4 h.

In **Abbildung 35** ist der Verlauf der Expression der Kohl-PLD2 im neu etablierten Expressionssystem anhand des SDS-PAGE-Geles (oben) bzw. des entsprechenden Western-Blots (unten) gezeigt.



**Abbildung 35: Verlauf der Expression der Kohl-PLD2.** SDS-PAGE-Gel (oben) und Western-Blot (unten): Bahn 1: LMW-Marker; Bahn 2: Expression des Vektors pET-28b(+) ohne *pld*-Gen (Negativkontrolle); Bahnen 3 bis 9: Expression der Kohl-PLD2 0, 45, 90, 135, 180, 225 und 270 min nach Induktion; Bahn 10: 0,5 µg Kohl-PLD2 (Positivkontrolle).

#### 5.2.4 Reinigung von Kohl-PLD2 sowie der Kohl-PLD2-Enzymvarianten

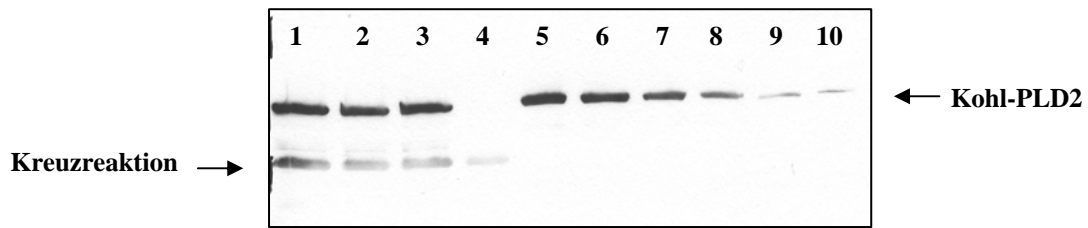
In Abhängigkeit von der gewählten Expressionsmethode und der Aktivität des Enzyms wurden für die Reinigung der Kohl-PLD2 und deren Varianten verschiedene Methoden angewendet, die im Folgenden näher dargestellt werden.

##### 5.2.4.1 Reinigung der in *E. coli* BL21(DE3)+pUBS520 exprimierten Enzyme

Nach Zellaufschluss (4.14.1) und Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurden die Kohl-PLD2 sowie die Kohl-PLD2-Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M, S664H, T812A, T812C, T812N, T812S, T812V, C85S, C181S, C212S, C307S, C310S, C365S und C741S mittels Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie (4.14.2) und anschließender Anionenaustauschchromatographie (4.14.3.1) bis zur Homogenität gereinigt (Standardreinigungsprotokoll). Die Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Assay (4.15.1) bestimmt.

Die Kohl-PLD2-Enzymvarianten K335R, D340E, Q334S, H663D, K665R, D670E, Δ808-812, Δ804-812, Δ801-812, T812D, T812F, T812G, T812K, T812R und T812Y konnten aufgrund ihrer Inaktivität bzw. äußerst geringen Aktivität nicht mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie gereinigt werden, da inaktive Enzymvarianten nicht in der Lage sind, in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Octyl-Sepharose zu binden, wie bereits unter Punkt 5.1.4 diskutiert. In diesem Fall wurde der Rohextrakt für die Aktivitätsbestimmungen verwendet. Um auch für diese Enzymvarianten eine spezifische Aktivität angeben zu können, wurden die Proteinkonzentrationen im Rohextrakt mittels Western-Blot bestimmt (4.15.3). In **Abbildung 36** ist exemplarisch der Western-Blot für die Kohl-PLD2-Enzymvariante Δ808-812 dargestellt.

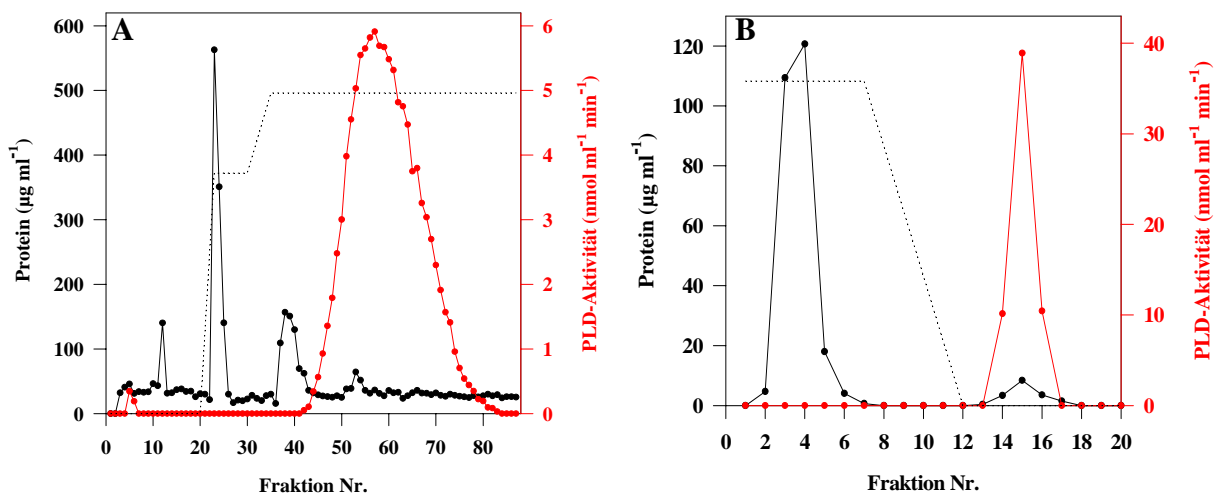




**Abbildung 36: Western-Blot zur Proteinbestimmung der Kohl-PLD2-Variante  $\Delta 808-812$ .** Bahnen 1-3: Rohextrakt von  $\Delta 808-812$ ; Bahn 4: Rohextrakt pRSET5a (Negativkontrolle); Bahnen 5 bis 10: Kohl-PLD2-Standard 3  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 1,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,2  $\mu\text{g}$ .

#### 5.2.4.2 Reinigung der in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS exprimierten Enzyme

Für die Reinigung der im *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS exprimierten Kohl-PLD2 konnte das unter 5.2.4.1 beschriebene Standardreinigungsprotokoll nicht zur Anwendung gebracht werden, da bei der für die chromatographische Reinigung an Octyl-Sepharose erforderlichen Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zum Rohextrakt die PLD-Aktivität durch Copräzipitation der PLD mit cytosolischen Fremdproteinen verloren ging. Es wurde deshalb versucht, durch Anionenaustauschchromatographie (4.14.3.2) die für die starke Präzipitation bei der  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe verantwortlichen Substanzen abzutrennen. Das Chromatogramm (**Abbildung 37A**) zeigt, dass durch diesen Schritt ein wesentlicher Reinigungseffekt erzielt werden konnte. Die aktiven Elutionsfraktionen wurden vereinigt, konzentriert und dialysiert (4.14.5).



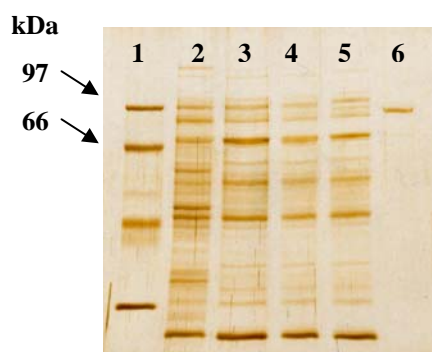
**Abbildung 37: Reinigung von Kohl-PLD2 mittels Q-Sepharose (A) und Octyl-Sepharose (B).** Schwarz, Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay; rot, Aktivitätsbestimmung mittels PpNP-Assay; A: gestrichelt, NaCl-Gradient (unteres Niveau: 0 M, mittleres Niveau: 0,15 M, oberes Niveau: 0,2 M); B: gestrichelt,  $\text{CaCl}_2$ -Gradient (oberes Niveau: 50 mM, unteres Niveau: 0 mM).

Nach diesem Schritt konnte der teilgereinigten Proteinlösung  $\text{CaCl}_2$  für die nachfolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie zugegeben werden (4.14.2), ohne dass durch Präzipitation bzw. Copräzipitation ein erheblicher Aktivitätsverlust auftrat (**Tabelle 6**). Das Reinigungsprofil der sich anschließenden hydrophoben Interaktionschromatographie in **Abbildung 37B** zeigt die erwartete selektive und konzentrierte Elution

von Kohl-PLD2 nach Entfernung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. **Abbildung 38** dokumentiert den Verlauf der Reinigung in einem SDS-PAGE-Gel. Aus 200 ml Expressionskultur konnten mit der in **Tabelle 6** zusammengefassten Reinigungsprozedur 22  $\mu\text{g}$  Kohl-PLD2 in aktiver und elektrophoretisch einheitlicher Form isoliert werden.

**Tabelle 6: Quantifizierung der Reinigungsprozedur für Kohl-PLD2.** Die Enzymaktivitäten wurden aus zwei unabhängigen Messungen mit dem diskontinuierlichen Mikrotiterplattentest (4.18.1.1) bestimmt.

	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Ausbeute (%)	Reinheitsgrad
Rohextrakt	97,370	0,5963	$6,124 \cdot 10^{-3}$	100	1
Q-Sepharose	12,517	0,5502	0,0439	92	7
Konz./ Dialyse	8,589	0,4732	0,0551	79	9
$\text{CaCl}_2$ -Zugabe	7,135	0,4453	0,0624	75	10
Octyl-Sepharose	0,022	0,2971	13,5	50	2204



**Abbildung 38: SDS-PAGE-Gel der Reinigung von Kohl-PLD2.**

Bahn 1: LMW-Marker  
 Bahn 2: Rohextrakt  
 Bahn 3: nach Q-Sepharose  
 Bahn 4: nach Konzentrierung/Dialyse  
 Bahn 5: nach  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe  
 Bahn 6: nach Octyl-Sepharose

Die Kohl-PLD2-Enzymvarianten C625S und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/ $\Delta$ 351/ $\Delta$ 352/M356V wurden in Analogie zu Kohl-PLD2 nach der obigen Reinigungsprozedur gereinigt. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Assay (4.15.1) bestimmt.

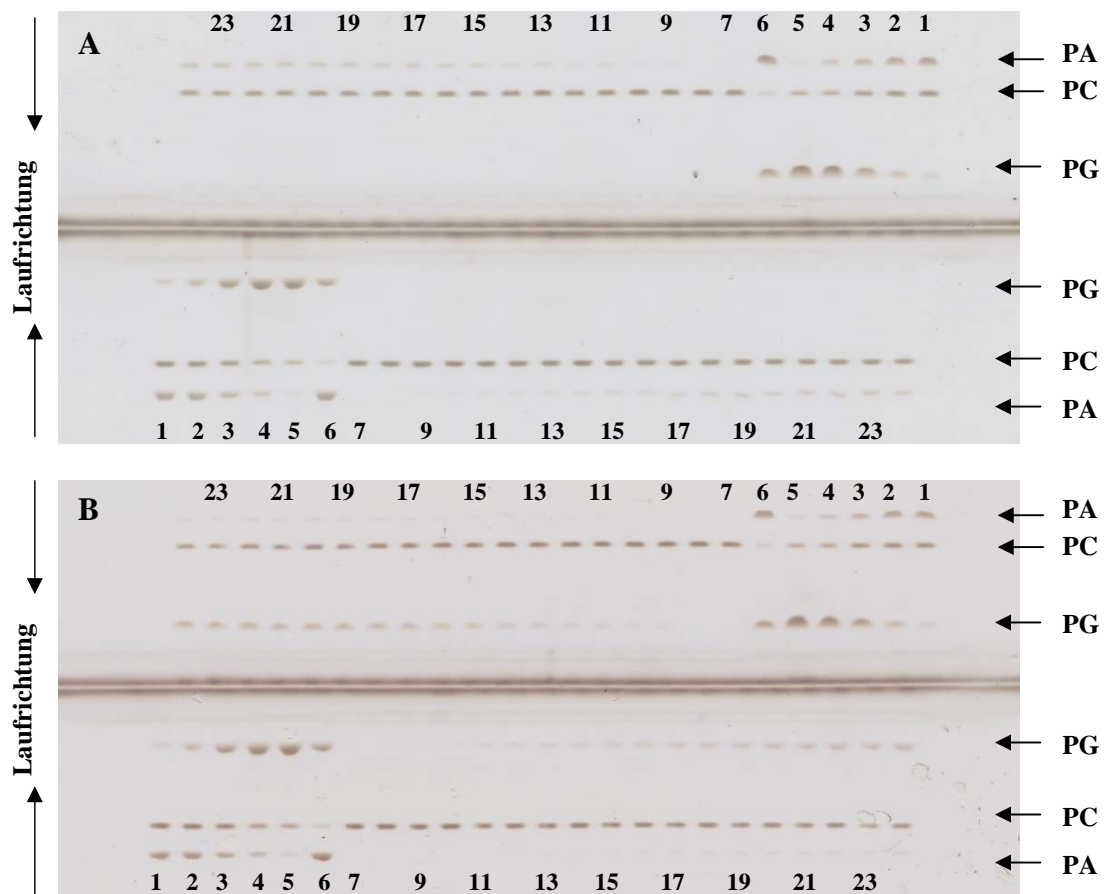
Da die Rohextrakte der inaktiven bzw. gering aktiven Kohl-PLD2-Enzymvarianten H333D,  $\Delta$ 812 und PLD2+S, die ebenfalls in Rosetta(DE3)pLysS-Zellen zur Expression gebracht wurden, aufgrund des oben beschriebenen Calcium-Copräzipitationseffektes nicht direkt für die Aktivitätsmessungen, die in Anwesenheit von 120 mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt werden, eingesetzt werden konnten, wurden die störenden Verunreinigungen mittels Ammoniumsulfatfällung (4.14.6) erfolgreich abgetrennt. Nach Dialyse standen die

Proteinlösungen sowohl für die Bestimmung der Aktivitäten als auch der Proteinkonzentrationen mittels Western-Blot (4.15.3) zur Verfügung.

## 5.2.5 Biochemische Charakterisierung der Kohl-PLD2-Enzymvarianten

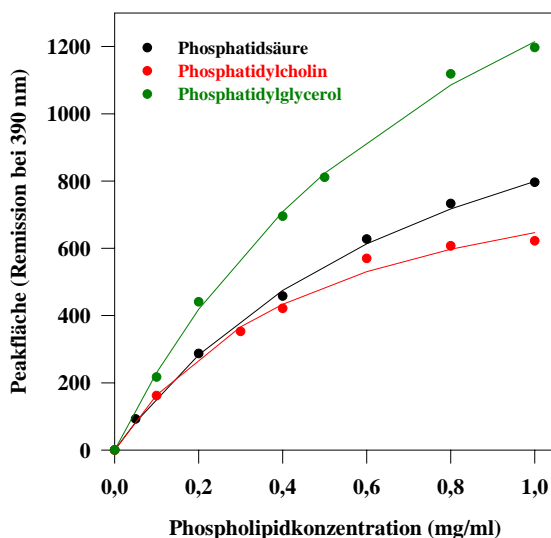
### 5.2.5.1 Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität im Zweiphasensystem

Die Bestimmung der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität von Kohl-PLD2 und der Kohl-PLD2-Varianten erfolgte nach Hirche et al. (1997) im Zweiphasensystem n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer mit SPC als Substrat und mit Glycerol als Akzeptoralkohol (4.18.2). **Abbildung 39** zeigt exemplarisch die Verfolgung von Hydrolysereaktionen in Abwesenheit von Glycerol (**A**) und von Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsreaktionen in Anwesenheit von Glycerol (**B**) auf einer HPTLC-Platte für die durch die Kohl-PLD2 katalysierten Reaktionen.



**Abbildung 39: Verfolgung von Hydrolyse- und von Transphosphatidylierungsreaktionen auf einer HPTLC-Platte.** A: Hydrolyse in Abwesenheit von Glycerol; B: Hydrolyse und Transphosphatidylierung in Anwesenheit von Glycerol. Doppelbestimmung mit Kohl-PLD2; Bahnen 1 bis 6: Standardmischungen 1 bis 6 (4.18.2.2); Bahnen 7 bis 24: Hydrolysereaktion (A) bzw. Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsreaktion (B) [7/ 8: 0 min; 9/10: 5 min; 11/12: 10 min; 13/14: 15 min; 15/16: 20 min; 17/18: 25 min; 19/20: 30 min; 21/22: 35 min; 23/24: 40 min].

Anhand der Standardmischungen 1 bis 6 (4.18.2.2) wurden für jede HPTLC-Platte Eichfunktionen (densitometrisch bestimmte Peakflächen versus Phospholipidkonzentrationen) zur Auswertung der Hydrolyse- bzw. Transphosphatidierungsreaktionen erstellt (**Abbildung 40**).



**Abbildung 40: Abhängigkeit der densitometrisch bestimmten Peakfläche von der Phospholipidkonzentration.** Die Anpassung erfolgte entsprechend der Gleichung  $y = a x / (b + x)$ .

Im Folgenden soll die Darstellung der mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse und deren Diskussion gegliedert nach den veränderten Regionen erfolgen, d.h. die Bereiche des ersten und zweiten HKD-Motives (5.2.1.1; rot), der hoch-konservierte C-Terminus (5.2.1.2; blau) und die 8 ebenfalls hoch-konservierten Cystein-Reste (5.2.1.3; grün) werden separat betrachtet.

In **Tabelle 7** (Bereiche der HKD-Motive), **Tabelle 8** (C-Terminus) und **Tabelle 9** (Cystein-Reste) sind die ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse- und Transphosphatidierungsreaktionen der Kohl-PLD2-Varianten für die Hydrolyse in Abwesenheit von Glycerol ( $v_H$ ), für die Transphosphatidierung ( $v_T$ ) und für die Hydrolyse als Konkurrenzreaktion ( $v_{HK}$ ) sowie das Transphosphatidierungspotential ( $v_T/v_{HK}$ ) angegeben.

#### *Bereiche des ersten und zweiten HKD-Motives*

Der vollständige Aktivitätsverlust der Enzymvarianten **H333D**, **K335R**, **D340E**, **H663D**, **K665R** und **D670E** (**Tabelle 7**) zeigt, dass beide HKD-Motive auch für die katalytische Aktivität der pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs erforderlich sind. Unter der Annahme, dass das aktive Zentrum der Kohl-PLD2 ähnlich dem der PLD aus *Streptomyces species* (2.5) aufgebaut ist, wurde in der Enzymvariante H333D durch die Substitution des Histidins durch Aspartat wahrscheinlich der nucleophile Angriff des Imidazol-Stickstoffs am Phosphoratom des

Phospholipid-Substrates unterbunden, bei der Enzymvariante H663D kann durch den Austausch vermutlich die Funktion als Säure bei der Protonierung des Sauerstoffs zur Freisetzung der polaren Kopfgruppe nicht mehr gewährleistet werden. Die Lysin-Reste (335 und 665) und die Aspartat-Reste (340 und 670) der beiden HKD-Motive sind vermutlich an der Stabilisierung der Konformation des aktiven Zentrums beteiligt. Trotz Erhalts der positiven Ladung bei den Enzymvarianten K335R und K665R bzw. der negativen Ladung bei den Enzymvarianten D340E und D670E kommt es wahrscheinlich in Folge der Änderung der Orientierung und Distanz zum Proteinrückgrat zu einem vollständigen Aktivitätsverlust.

**Tabelle 7: Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse und Transphosphatidylierung für die Kohl-PLD2-Varianten im Bereich des ersten und zweiten HKD-Motives.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Initialgeschwindigkeiten ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )			
	$v_H$	$v_T$	$v_{HK}$	$v_T / v_{HK}$
Kohl-PLD2	$3,30 \pm 0,13$	$3,11 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,43$
<b>T264D</b>	<b><math>6,80 \pm 0,48</math></b>	<b><math>3,27 \pm 0,55</math></b>	<b><math>1,10 \pm 0,06</math></b>	<b><math>2,97 \pm 0,66</math></b>
<b>H333D</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>Q334S</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>K335R</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>D340E</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>V339T/E342A/V343M</b>	<b><math>3,51 \pm 0,38</math></b>	<b><math>3,19 \pm 0,13</math></b>	<b><math>0,90 \pm 0,05</math></b>	<b><math>3,54 \pm 0,34</math></b>
<b>V339T/E342A/V343M/Q346E/ G348S/G349Q/S350Q/<math>\Delta</math>351/ <math>\Delta</math>352/M356V</b>	<b><math>4,19 \pm 0,32</math></b>	<b><math>4,57 \pm 0,35</math></b>	<b><math>1,36 \pm 0,07</math></b>	<b><math>3,36 \pm 0,43</math></b>
<b>H663D</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>S664H</b>	<b><math>8,77 \pm 1,04</math></b>	<b><math>3,71 \pm 0,21</math></b>	<b><math>1,04 \pm 0,02</math></b>	<b><math>3,57 \pm 0,27</math></b>
<b>K665R</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>
<b>D670E</b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b><math>0,00 \pm 0,00</math></b>	<b>–</b>

Wie oben diskutiert, sind beide Histidin-Reste (333 und 663) der HKD-Motive am Katalysemechanismus beteiligt. Gestützt auf die Untersuchungen von Leiros et al. (2004) an PLD aus *Streptomyces species* Stamm PMF wird vermutet, dass auch bei der Kohl-PLD2 der Imidazol-Stickstoff des N-terminalen His333 für den nucleophilen Angriff am Phosphoratom des Phospholipid-Substrates verantwortlich ist. Dass der richtigen Orientierung und Distanz zu den an der Katalyse beteiligten Aminosäure-Resten des ersten HKD-Motives eine größere Bedeutung zukommt als denen des zweiten HKD-Motives, wird durch die Enzymvarianten **Q334S** und **S664H** nahe gelegt. Die substituierten Aminosäure-Reste sind zwischen dem

Histidin-Rest und dem Lysin-Rest des ersten bzw. des zweiten HKD-Motives laut der Sekundärstrukturvorhersage für Kohl-PLD2 (**Anhang A6**) jeweils in einer *Loop*-Region lokalisiert. Auch in der verfügbaren Kristallstruktur von *Streptomyces species* Stamm PMF befinden sich die beiden Aminosäure-Reste in einer *Loop*-Region. Durch die beiden aus dem Sequenzvergleich mit *Streptomyces*-PLDs abgeleiteten Substitutionen Q334S und S664H wurden vermutlich Änderungen der Struktur und Ladung erreicht, die sich bei der Enzymvariante Q334S in einem vollständigen Aktivitätsverlust äußerten (**Tabelle 7**). Die Enzymvariante S664H hingegen hat eine dem Wildtyp gegenüber um den Faktor 2,6 erhöhte Hydrolyseaktivität bzw. um den Faktor 1,2 erhöhte Transphosphatidylierungsaktivität (**Tabelle 7**). Die Hydrolyse in Konkurrenz zur Umesterung ist im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzt, das Transphosphatidylierungspotential ist dementsprechend erhöht.

Die Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M und V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V, bei denen der Aminosäureaustausch aufgrund sequentieller Besonderheiten der Mohn-PLDs im Vergleich mit etablierten pflanzlichen PLDs und unter der Annahme einer sehr ausgeprägten Transphosphatidylierungsaktivität der rekombinanten Mohn-PLDs, wie bereits unter Punkt 5.2.1.1 beschrieben, vorgenommen wurde, besitzen eine wildtypähnliche (V339T/E342A/V343M), eine 1,3-fach (V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V) bzw. eine 2-fach (T264D) erhöhte Hydrolyseaktivität in Abwesenheit von Glycerol (**Tabelle 7**). Bei der Umesterung zeigen die Enzymvarianten T264D sowie V339T/E342A/V343M wildtypähnliche Aktivitäten, bei der Hydrolyse in Anwesenheit von Glycerol jedoch eine verminderte Aktivität. Die Enzymvariante V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V weist hinsichtlich dieser Reaktion eine wildtypähnliche Aktivität auf, besitzt aber bei der Umesterungsreaktion eine um den Faktor 1,5 erhöhte Aktivität. So ist es bei allen 3 Enzymvarianten gelungen, das Transphosphatidylierungspotential geringfügig zu erhöhen. Das zeigt die Bedeutung der sich in unmittelbarer Nähe des ersten HKD-Motives befindlichen Aminosäuren für die Katalyse. Die Umgebung des ersten katalytischen Motives, wie im multiplen Alignment im **Anhang A3** zu sehen, ist wesentlich schwächer konserviert als die Umgebung des zweiten katalytischen Motives. Ogino et al. (2003) konnten anhand von Mutationsstudien an PLD aus *Streptomyces cinnamoneus* zeigen, dass durch Substitution der beiden Glycin-Reste des ersten verlängerten HKD-Motives (HxKxxxxDxxxxxxGG) durch Serin-Reste die Transphosphatidylierungsaktivität gesteigert werden kann. Interessant ist, dass die rekombinanten Mohn-PLDs im ersten verlängerten HKD-Motiv anstelle des zweiten Glycin-Restes schon über einen Serin-Rest verfügen. Diese Mutation zeigte bei der PLD aus

*Streptomyces cinnamoneus* eine 16-fach höhere Transphosphatidylierungsaktivität (Ogino et al., 2003). Bei der Enzymvariante V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/ $\Delta$ 351/ $\Delta$ 352/M356V, wo das gesamte erste verlängerte HKD-Motiv der rekombinanten Mohn-PLD1 übernommen wurde, konnte die Transphosphatidylierungsaktivität, wie bereits oben erwähnt, um den Faktor 1,5 erhöht werden.

### C-Terminus

Aus den Ergebnissen der Mutationen am C-Terminus (**Tabelle 8**) kann geschlossen werden, dass die konservierten C-terminalen Aminosäuren pflanzlicher PLDs für die enzymatische Aktivität ebenfalls essentiell sind.

**Tabelle 8: Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse und Transphosphatidylierung für die Kohl-PLD2-Varianten am hoch-konservierten C-Terminus.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Initialgeschwindigkeiten ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )			
	$v_H$	$v_T$	$v_{HK}$	$v_T / v_{HK}$
Kohl-PLD2	$3,30 \pm 0,13$	$3,11 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,43$
$\Delta$ 812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
$\Delta$ 808-812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
$\Delta$ 804-812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
$\Delta$ 801-812	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812D	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812K	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812R	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812F	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812Y	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812G	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
PLD2+S	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	–
T812N	$2,47 \pm 0,23$	$3,31 \pm 0,20$	$0,99 \pm 0,06$	$3,34 \pm 0,40$
T812S	$2,19 \pm 0,11$	$2,89 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,02$	$4,25 \pm 0,23$
T812C	$1,88 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$4,00 \pm 0,46$
T812A	$0,93 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	$2,64 \pm 0,17$
T812V	$8,64 \pm 1,74$	$3,78 \pm 0,64$	$1,48 \pm 0,10$	$2,55 \pm 0,60$

Schon die Entfernung der letzten Aminosäure Threonin in der Enzymvariante  $\Delta$ 812 führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Der C-Terminus scheint im Inneren des Proteins verborgen zu sein. Dafür spricht der vollständige Aktivitätsverlust bei der Einführung von



geladenen Aminosäuren (T812D, T812K und T812R), von aromatischen Aminosäuren (T812F und T812Y), der räumlich kleineren Aminosäure Glycin (T812G) sowie einer zusätzlichen Aminosäure (PLD2+S). Polare, ungeladene Aminosäuren (T812N und T812S) senken die hydrolytische Aktivität, wohingegen die Aktivität in der Umesterungsreaktion nicht so stark herabgesetzt wird. Daraus ergibt sich ein deutlich gesteigertes Transphosphatidylierungspotential. Ein drastischer Aktivitätsverlust ist allerdings bei der Umesterung der Enzymvariante T812C zu verzeichnen. Die Einführung der unpolaren, aliphatischen Aminosäure Alanin (T812A) hatte eine drastische Senkung sowohl der Hydrolyse- als auch der Transphosphatidylierungsaktivität zur Folge. Zu einer deutlichen Steigerung der hydrolytischen Aktivität führte die Einführung der unpolaren, aliphatischen Aminosäure Valin als C-terminale Aminosäure (T812V). Die in der Umesterung gemessenen Aktivitäten dagegen sind mit denen des Wildtyps, der Kohl-PLD2, vergleichbar.

Gestützt auf die oben genannten Ergebnisse kann angenommen werden, dass der C-Terminus pflanzlicher  $\alpha$ -Typ-PLDs eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der funktionellen Konformation des aktiven Zentrums wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen spielt, wie bereits für die Säuger-PLDs von Liu et al. (2001) vorgeschlagen wurde. Durch die deutliche Herabsetzung der hydrolytischen Aktivität bei der Enzymvariante T812S ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur Steigerung des Transphosphatidylierungspotentials der PLD gefunden worden.

### *Cystein-Reste*

Der Austausch von einem Cystein-Rest gegen einen Serin-Rest führte in keinem Fall zum völligen Verlust der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität (**Tabelle 9**). Die Aktivität der Enzymvarianten C85S und C307S ist jedoch stark vermindert. Das könnte mit der Integration der Cystein-Reste 85 und 307 in jeweils einer  $\beta$ -Faltblattstruktur (laut Sekundärstrukturvorhersage, **Anhang A6**) zusammenhängen. Die Cysteinvarianten C365S und C741S zeigen sowohl in den Hydrolyse- als auch in Transphosphatidylierungsreaktionen beide dem Wildtyp-Enzym gegenüber verminderte Aktivitäten. Da die PA-Bildung als Resultat der Konkurrenzreaktion sehr gering ist, führt dies zu einem deutlich erhöhten Umesterungspotential. Die Enzymvarianten C181S und C212S weisen ebenfalls ein dem Wildtyp-Enzym gegenüber erhöhtes Transphosphatidylierungspotential auf, das in diesem Fall auf einer verminderten hydrolytischen Aktivität gegenüber einer wildtypähnlichen Umesterungsaktivität beruht. Eine Steigerung der Gesamtaktivität, mit leichter Präferenz für die Umesterungsaktivität, ist bei den Cysteinvarianten C310S und C625S gelungen. Es sind

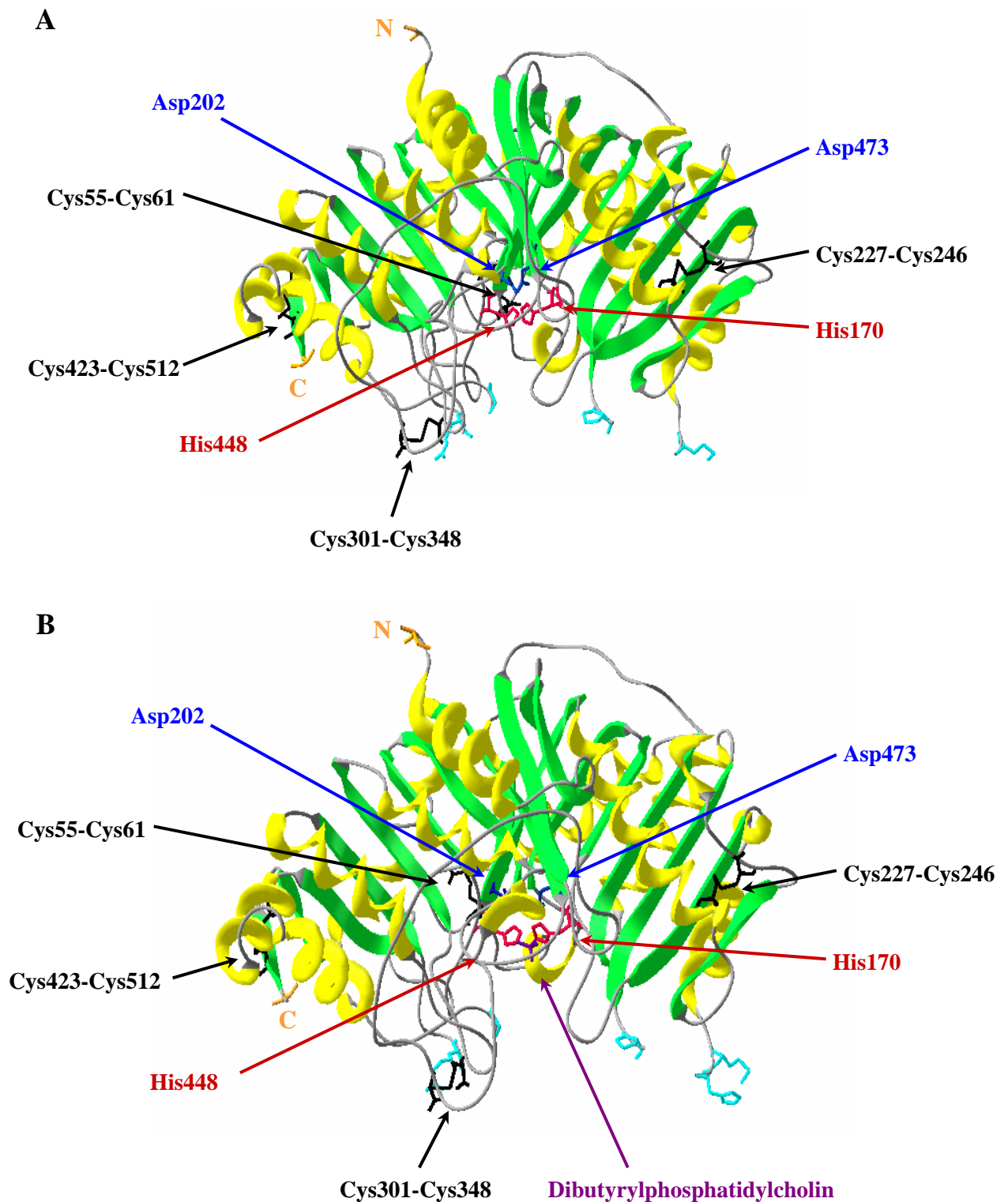


überraschenderweise die Cystein-Reste, die bezogen auf die Primärstruktur den beiden katalytischen HKD-Motiven (333-340 sowie 663-670) am nächsten liegen und deren Regionen zudem am stärksten konserviert sind (**Abbildung 28**). Bei C625S konnte das Transphosphatidylierungspotential um einen Faktor von 2,8 erhöht werden.

**Tabelle 9: Initialgeschwindigkeiten der Hydrolyse und Transphosphatidylierung für die Kohl-PLD2-Cysteinvarianten.** Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Initialgeschwindigkeiten ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )			
	$v_H$	$v_T$	$v_{HK}$	$v_T / v_{HK}$
Kohl-PLD2	3,30 ± 0,13	3,11 ± 0,19	1,55 ± 0,24	2,01 ± 0,43
C85S	0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,04 ± 0,01	5,25 ± 1,63
C181S	2,07 ± 0,10	2,25 ± 0,15	0,68 ± 0,03	3,31 ± 0,37
C212S	2,61 ± 0,06	3,12 ± 0,10	0,68 ± 0,02	4,59 ± 0,28
C307S	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,08 ± 0,01	2,38 ± 0,43
C310S	4,58 ± 0,28	5,93 ± 0,95	1,63 ± 0,04	3,64 ± 0,67
C365S	1,16 ± 0,04	1,17 ± 0,10	0,24 ± 0,01	4,88 ± 0,63
C625S	6,77 ± 0,66	8,70 ± 0,63	1,54 ± 0,09	5,65 ± 0,74
C741S	1,05 ± 0,02	2,02 ± 0,09	0,40 ± 0,01	5,05 ± 0,36

Aufgrund der durch den Austausch der Cystein-Reste gegen Serin-Reste erzielten signifikanten Effekte, wird eine mögliche Rolle der Cystein-Reste bei der Substrat- bzw. Akzeptorbindung in Betracht gezogen. Dies soll am Beispiel der verfügbaren Kristallstrukturen der PLD aus *Streptomyces species* Stamm PMF (Leiros et al., 2004) verdeutlicht werden, die wie die Kohl-PLD2 und die anderen *Streptomyceten*-PLDs in Besitz von 8 Cystein-Resten ist. Diese sind in *Loop*-Regionen an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert und bilden im Gegensatz zu den in reduzierter Form vorliegenden Cystein-Resten der Kohl-PLD2 (Hwang et al., 2001) vier Disulfidbrücken aus (**Abbildung 41A**). **Abbildung 41B** zeigt die Position dieser 4 Disulfidbrücken in der Kristallstruktur der PLD<sub>PMF</sub> mit dem Substrat Dibutyrylphosphatidylcholin. Durch die Substratbindung kommt es zu lokalen Änderungen der Struktur, die sich vor allen in den *Loop*-Regionen widerspiegeln. Die bisher in der Literatur nicht diskutierte Bedeutung der Cystein-Reste der PLDs basiert vermutlich auf der Stabilisierung der PLD-Struktur während der durch die Substratbindung bzw. Bindung des Wassers oder Akzeptoralkohols hervorgerufenen Konformationsänderung des Enzyms.



**Abbildung 41: Die vier Disulfidbrücken der PLD aus *Streptomyces sp.* Stamm PMF.** A: Struktur ohne Substrat (PDB Accession-Nr. 1V0S); B: Struktur mit dem Substrat Dibutylphosphatidylcholin (PDB Accession-Nr. 1V0W). N, N-Terminus; C, C-Terminus; grün,  $\beta$ -Faltblätter; gelb,  $\alpha$ -Helices; rot, Histidin-Reste der HKD-Motive; blau, Aspartat-Reste; violett, Substrat Dibutylphosphatidylcholin; schwarz, Disulfidbrücken; türkis, flexible Loops zur Einbettung des Enzyms in die Membran Pro126 bis His129/Met130 und Arg382 bis Gly389.

### 5.2.5.2 Bestimmung der Hydrolyseaktivität im micellaren System

Die Hydrolyseaktivitäten der Kohl-PLD2-Enzymvarianten T264D, V339T/E342A/V343M, V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V, S664H, T812N, T812S, T812V, C181S, C212S, C310S und C625S wurden aufgrund ihrer wildtypähnlichen bzw. erhöhten hydrolytischen Aktivität im Zweiphasensystem mit SPC als natürlichem Substrat zusätzlich zum Vergleich im micellaren System mit dem künstlichen Substrat PpNP bestimmt. Die Bestimmung der Hydrolyseaktivität erfolgte mit einem kontinuierlichen Küvettentest (4.18.1.2), bei dem die durch die pNP-Bildung hervorgerufene Absorptionsänderung kontinuierlich bei 360 nm gemessen wurde. Die berechneten Initialgeschwindigkeiten der Hydrolysereaktionen der Kohl-PLD2 und der Kohl-PLD2-Varianten sind in **Tabelle 10** dargestellt.

**Tabelle 10: Initialgeschwindigkeiten der Kohl-PLD2 und ausgewählter Kohl-PLD2-Varianten der Hydrolyse von PpNP im micellaren System.** Die gezeigten Messdaten wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

Enzym	Hydrolyse ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
<b>Kohl-PLD2</b>	<b>16,23 ± 2,91</b>
<b>T264D</b>	<b>6,27 ± 0,46</b>
<b>V339T/E342A/V343M</b>	<b>10,93 ± 0,60</b>
<b>V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/ G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V</b>	<b>46,80 ± 4,57</b>
<b>S664H</b>	<b>34,69 ± 2,25</b>
<b>T812N</b>	<b>7,92 ± 0,29</b>
<b>T812S</b>	<b>3,94 ± 0,34</b>
<b>T812V</b>	<b>47,98 ± 3,51</b>
<b>C181S</b>	<b>3,73 ± 0,25</b>
<b>C212S</b>	<b>11,05 ± 0,51</b>
<b>C310S</b>	<b>27,52 ± 2,14</b>
<b>C625S</b>	<b>17,77 ± 1,20</b>

Die Hydrolyseaktivitäten der Enzymvarianten **V339T/E342A/V343M/Q346E/G348S/G349Q/S350Q/Δ351/Δ352/M356V**, **S664H**, **T812N**, **T812V**, **C212S** und **C310S** im micellaren System mit dem synthetischen Substrat PpNP sind mit den im Zweiphasensystem bestimmten Hydrolyseaktivitäten ( $v_H$  in **Tabelle 7, 8** bzw. **9**) vergleichbar.

Die Kohl-PLD2-Enzymvarianten **T264D**, **V339T/E342A/V343M**, **T812S**, **C181S** und **C625S** dagegen zeigen im Vergleich zum Wildtyp, eine stark verminderte hydrolytische Aktivität im PpNP-Assay verglichen mit den Aktivitäten im Zweiphasensystem. Der Unterschied zwischen den beiden verwendeten Substraten PpNP im wässrig micellaren System und SPC im Zweiphasensystem besteht in der Kopfgruppe. Die im PpNP enthaltene Kopfgruppe pNP ist gegenüber dem Cholin der Kopfgruppe des Substrates SPC strukturell größer. Die Unterschiede in den hydrolytischen Aktivitäten im wässrig micellaren System und im Zweiphasensystem könnten daher auf eine unterschiedliche Akzeptanz der Kopfgruppe des Substrates bei dessen Bindung im aktiven Zentrum, bedingt durch die eingeführte Mutation bzw. indirekt durch die Beteiligung der entfernten Aminosäuren an der Substratbindung, zurückgeführt werden. Allerdings spielt bei den PLDs die supramolekulare Substratstruktur, wie sie bei Phospholipiden sowohl in Micellen als auch im Zweiphasensystem vorhanden ist, eine wichtige Rolle für die beobachtete Enzymaktivität (Hirche und Ulbrich-Hofmann, 1999). Eine Interpretation der Aktivitätsdaten hinsichtlich der molekularen Substratstruktur ist daher nur unter Vorbehalt möglich.

Insgesamt aber lässt sich aus den Mutationsstudien der Kohl-PLD2 ableiten, dass die untersuchten Strukturbereiche (HKD-Motive, C-Terminus, Cystein-Reste) auf Aminosäureaustausche sehr sensibel reagieren. In Hinblick auf die weiterführenden Untersuchungen mit biotechnologischen Zielstellungen sind besonders die Mutationen interessant, bei denen sich eine Aktivitätserhöhung, insbesondere eine Erhöhung der Transphosphatidylierungsaktivität, abzeichnet.