

## 6 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollten durch Studien an den PLDs aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata) Strukturelemente identifiziert werden, die für die hydrolytische Aktivität bzw. die Transphosphatidylierungsaktivität verantwortlich sind. Damit sollte die Basis für ein gezieltes Proteindesign zur Erzeugung von PLDs mit einer hohen Transphosphatidylierungsaktivität, geringer Hydrolyseaktivität und einem möglichst breiten Substrat-Spektrum geschaffen werden.

Dazu sollten zunächst die Nucleotidsequenzen der beiden *pld*-Gene aus Mohnkeimlingen, von denen bisher ca. 2/3 bekannt waren (Lerchner, 2001), vollständig aufgeklärt und nachfolgend die rekombinant in *E. coli* gewonnenen Isoenzyme hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften charakterisiert werden. Die Ermittlung der vollständigen Nucleotidsequenzen der mRNA sowie der genomischen DNA aus 4 Tage alten Schlafmohnkeimlingen gelang mittels PCR mit degeneriertem *forward*-Primer in der Region des Start-Codons und genspezifischem *reverse*-Primer. Die mRNA-Nucleotidsequenzen von PLD1 und PLD2 sind im codierenden Bereich zu 96,9 % identisch und weisen ein offenes Leseraster von 813 Aminosäuren auf. In den genomischen DNA-Sequenzen von PLD1 und PLD2 konnte im Gegensatz zu anderen pflanzlichen PLDs von  $\alpha$ -Typ, die meist 2 Introns besitzen, nur eine 360 bp große Intronstruktur ermittelt werden.

Die Primärstrukturen der Mohn-PLD-Isoenzyme sind zu 98,6 % identisch sowie zu 99,2 % ähnlich und weisen den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den pflanzlichen  $\alpha$ -Typ-PLDs aus *Zea mays* und *Nicotiana tabacum* auf. Die aus der Primärstruktur der Mohn-PLD1 sowie Mohn-PLD2 abgeleiteten Massen sind 91,72 kDa und 91,86 kDa, die berechneten isoelektrischen Punkte 5,60 und 5,53. Wie die anderen PLD-Aktivität zeigenden Mitglieder der PLD-Superfamilie besitzen die Mohn-PLD-Isoenzyme die bei allen pflanzlichen PLDs vorkommenden konservierten Sequenzbereiche I bis IV, darunter die zwei katalytischen HKD-Motive. Am N-Terminus beider Isoenzyme befindet sich die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Phospholipidbindung verantwortliche C2-Domäne. Da bei der Analyse der Primärstrukturen beider Mohn-Enzyme keine Signalsequenzen gefunden wurden, ist ein intrazelluläres Vorkommen beider Enzyme und damit ein Vorliegen der SH-Gruppen der Cystein-Reste in reduzierter Form anzunehmen. Im Unterschied zu anderen pflanzlichen PLDs des  $\alpha$ -Typs besitzt Mohn-PLD1 zehn und Mohn-PLD2 neun Cystein-Reste. Bei der Suche funktioneller Motive in den Aminosäuresequenzen der Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 konnten eine Glykosylierungsstelle, sechs Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C und zwei

Phosphorylierungsstellen für Tyrosinkinase, ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der PLD an Regulationsprozessen, gefunden werden.

Das Mohn-*pld1*- sowie das *pld2*-Gen wurden zur heterologen Genexpression in *E. coli* jeweils in den Expressionsvektor pET-28b(+) kloniert. Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 konnten in *E. coli* in löslicher Form im Cytosol exprimiert werden. Nach Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose und anschließender Calcium-vermittelter hydrophober Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose konnten für die Mohn-PLD1 58 % und für die Mohn-PLD2 25 % der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden. Die beiden gereinigten Isoenzyme zeigen gegenüber dem synthetischen Substrat PpNP eine spezifische Hydrolyseaktivität von  $5,03 \pm 0,52$  bzw.  $6,15 \pm 0,12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und gegenüber dem Substrat SPC im n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer-System eine spezifische Hydrolyseaktivität von  $1,26 \pm 0,02$  bzw.  $1,35 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Beide Mohn-PLD-Isoenzyme sind in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen inaktiv. Bei der Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde eine maximale Aktivität bei 200 mM  $\text{CaCl}_2$  erreicht, wohingegen  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen keine Aktivierung bewirkten. Die pH-Optima der Mohn-PLD1 und Mohn-PLD2 liegen im pH-Bereich 5,5 bis 6,0 bei 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , wobei bei Absenkung der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration eine Verschiebung des pH-Optimums in den sauren Bereich erfolgt. Die Messungen der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivitäten der beiden rekombinanten Isoenzyme gegenüber dem Substrat SPC im n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer-System mit Glycerol als Akzeptoralkohol ergaben signifikante Unterschiede. Für die Mohn-PLD1 konnte eine 2,6-fach höhere Umesterungsrate im Vergleich zur Hydrolyserate gemessen werden, während die Mohn-PLD2 gleichermaßen gut hydrolysiert und transphosphatidyliert.

Aufbauend auf multiplen Alignments, Sekundärstrukturvorhersagen und Hydrophobizitätsvergleichen wurden gezielt Aminosäuren der HKD-Motive und benachbarter Regionen sowie am C-Terminus der rekombinanten Kohl-PLD2 ausgetauscht, Aminosäuren am C-Terminus entfernt bzw. eingefügt und die 8 hoch-konservierten Cystein-Reste einzeln durch Serin-Reste substituiert, um Informationen bezüglich der Struktur-Funktionsbeziehungen pflanzlicher PLDs zu erhalten. Alle 35 erzeugten Kohl-PLD2-Enzymvarianten konnten nach Etablierung eines neuen Expressionssystems in löslicher Form im Cytosol exprimiert werden. Die Reinigung der Kohl-PLD2 und der Kohl-PLD2-Enzymvarianten erfolgte in Abhängigkeit von der gewählten Expressionsmethode und der Aktivität des Enzyms. Die Messungen der Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivitäten der Kohl-PLD2-Enzymvarianten im n-Hexan/2-Octanol/Acetat-Puffer-System mit SPC als Substrat lassen die folgenden Interpretationen zu:

1. Beide HKD-Motive sind notwendig für die katalytische Aktivität. Es wird angenommen, dass der Imidazol-Stickstoff des N-terminalen His333 für den nucleophilen Angriff am Phosphoratom des Phospholipid-Substrates verantwortlich ist.
2. Die Mutationen der C-terminalen Aminosäure Thr812 legen die Vermutung nahe, dass der C-Terminus, der mit hoher Wahrscheinlichkeit im Inneren des Proteins verborgen ist, die funktionelle Konformation des aktiven Zentrums über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert.
3. Die Cystein-Reste 181, 212, 365 und 741 sind vermutlich in die Bindung des Wassers bzw. des Akzeptoralkohols involviert, da durch ihre Substitution die hydrolytische Aktivität deutlich gesenkt wurde. Die Cystein-Reste 310 und 625, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den beiden HKD-Motiven befinden, spielen dagegen sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Substratbindung und der Bindung des Wassers bzw. des Akzeptoralkohols, da durch ihre Substitution die Gesamtaktivität mit Präferenz der Transphosphatidylierungsaktivität gesteigert werden konnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Mohn-PLD-Isoenzyme in ausreichender Menge und Reinheit für weiterführende Struktur- und Funktionsuntersuchungen bereitgestellt werden können. Obwohl sich die rekombinanten Mohn-PLDs in nur 11 Aminosäuren voneinander unterscheiden, wurden für die Hydrolyse und die Transphosphatidylierung im Zweiphasensystem bei Anwesenheit von Glycerol stark differierende Aktivitäten zwischen beiden Isoenzymen gemessen. Als Strukturelemente, die einen signifikanten Einfluss auf die hydrolytische Aktivität bzw. die Transphosphatidylierungsaktivität haben, konnten mit der vorliegenden Arbeit neben der Bestätigung der Bedeutung der HKD-Motive für den Katalysemechanismus, der C-Terminus sowie die hoch-konservierten Cystein-Reste identifiziert werden. Bei den erzeugten Kohl-PLD2-Enzymvarianten C212S, C365S, C625S, C741S und T812S ist es gelungen, eine deutliche Steigerung des Transphosphatidylierungspotentials zu erreichen.