

**Molekulare Funktionen von Metallionen bei der
Aktivierung pflanzlicher Phospholipase D**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin - Luther - Universität
Halle - Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Lars Dreßler
geboren am 23. Januar 1981 in Ludwigsfelde

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann
2. Prof. Dr. U. Bornscheur
3. PD Dr. habil. R. Golbik

Promotionsgesuch eingereicht am: 27.04.2015

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22.07.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	12
2	Theoretischer Teil	15
2.1	Pflanzliche Phospholipasen D	15
2.1.1	Funktionen pflanzlicher Phospholipasen D	17
2.1.2	Regulation pflanzlicher Phospholipasen D	18
2.1.2.1	Regulation durch Ca^{2+}	18
2.1.2.2	Regulation durch Lipide	19
2.1.2.3	Regulation durch Proteine	19
2.1.2.4	Regulation durch Substratmorphologie	20
2.1.3	Strukturmerkmale der PLD	20
2.1.4	PLD aus <i>B. oleracea</i> var. capitata	22
2.2	Phospholipide	23
2.2.1	Natürliche Phospholipide	23
2.2.2	Bolalipide	25
2.2.3	Detergenzien zur Solubilisierung von Phospholipiden	26
2.3	Ionen der Seltenen Erden als Ersatz für Ca^{2+}	29
2.3.1	Fluoreszenzeigenschaften von Tb^{3+}	30
3	Material und Methoden	32
3.1	Material	32
3.1.1	Chemikalien	32
3.1.2	Lipide	33
3.1.3	Proteine	33
3.1.4	Kits	34
3.1.5	Plasmide	34
3.1.6	Bakterienstämme	35
3.1.7	Kulturmedien	35

3.2	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	35
3.2.2	Größe und Konzentrationsbestimmung von DNA	36
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	36
3.2.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
3.2.5	Ligation des PLD γ -DNA-Fragments in den pET-SUMO-Vektor	37
3.2.6	Plasmidpräparation und Sequenzierung	37
3.2.7	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
3.2.8	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Hitzeschock	38
3.3	Biochemische Methoden	39
3.3.1	Expression des PLD α -Gens und Reinigung löslicher PLD α	39
3.3.1.1	Expression	39
3.3.1.2	Zellaufschluss	39
3.3.1.3	Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie	39
3.3.1.4	Anionenaustauschchromatographie	40
3.3.2	Expression des PLD γ -Gens und Reinigung löslicher PLD γ	40
3.3.2.1	Expression	40
3.3.2.2	Zellaufschluss	41
3.3.2.3	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie	41
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.3.4	<i>Western-blot</i> -Technik	41
3.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
3.3.5.1	Bicininsäure-Assay	42
3.3.5.2	UV-Absorptionsmessung	42
3.3.6	Synthese von Phosphatidyl- <i>p</i> -nitrophenol	42
3.3.7	Bestimmung der PLD Aktivität	43
3.3.7.1	PpNP-Aktivitätstest	43
3.3.7.2	Amplex-Red Aktivitätstest	45
3.4	Biophysikalische Methoden	45
3.4.1	Herstellung von Phospholipidvesikeln	45
3.4.2	Membranbindungs-Assay	45
3.4.3	Fluoreszenzspektroskopie	46
3.4.4	Dynamische Lichtstreuung	48
3.4.5	Röntgenkleinwinkelstreuung	48

4 Ergebnisse	50
4.1 Gewinnung und Charakterisierung der verwendeten PLDs	50
4.1.1 Herstellung löslicher PLD α	50
4.1.2 Herstellung löslicher PLD γ	51
4.1.2.1 Expression des PLD γ -Gens	51
4.1.2.2 Teilreinigung der PLD γ	52
4.1.3 PLD aus <i>Streptomyces</i> sp.	53
4.2 Studien zur Aktivierung verschiedener PLDs	53
4.2.1 Aktivierung von PLD α durch Seltene Erden im Vergleich mit Erdalkali- und Alkaliionen	53
4.2.2 Verdrängung von Ca $^{2+}$ durch Tb $^{3+}$ an PLD α	56
4.2.3 Verdrängung von Ca $^{2+}$ durch Mg $^{2+}$ an PLD α	57
4.2.4 Einfluss von PIP $_2$ auf die Aktivität der PLD α	58
4.2.5 Charakterisierung der teilgereinigten PLD γ mittels Aktivitätstests	60
4.2.6 Charakterisierung der PLD $_{Str}$ mittels Aktivitätstests	61
4.2.6.1 Einfluss von CaCl $_2$ und NaCl auf die Aktivität der PLD $_{Str}$	61
4.2.6.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der PLD $_{Str}$	62
4.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	62
4.3.1 Nachweis der Bindung von Tb $^{3+}$ -Ionen an PLD α	63
4.3.2 Verdrängung von Ca $^{2+}$ durch Tb $^{3+}$ an PLD α	65
4.4 Wechselwirkungen zwischen Metallionen und PLD-Substraten	66
4.4.1 Spektroskopische Bestimmung durch die FeRes-Methode	67
4.4.2 Untersuchung der Metallionenbindungskapazität der Substratmizellen durch die FeRes-Methode	68
4.5 Einfluss von Metallionen und Detergenzien auf die Strukturierung der PLD-Substrate und die Aktivität der untersuchten Phospholipasen	69
4.5.1 Untersuchung mittels Dynamischer Lichtstreuung und Aktivitätsstudien	69
4.5.1.1 Einfluss von SDS	70
4.5.1.2 Einfluss von Triton X-100	72
4.5.1.3 Änderung der Substratkonzentration unter Beibehaltung des Verhältnisses von P ρ NP, SDS und Triton X-100	73
4.5.2 Untersuchung mittels Röntgenkleinwinkelstreuung	74
4.6 Bolalipide als Substrate für PLD	76
4.6.1 PC-C24-PC Bolalipid	76
4.6.1.1 ν -S-Charakteristik für PLD α und PLD $_{Str}$	76

4.6.1.2	Einfluss von SDS auf den hydrodynamischen Radius und die Hydrolyse von PC-C24-PC durch PLD α und PLD $_{Str}$. . .	77
4.6.2	PC-C32-PC Bolalipid	78
4.6.2.1	ν -S-Charakteristik für PLD α und PLD $_{Str}$	78
4.6.2.2	Einfluss von Detergenzien auf die Aktivität der PLD α und PLD $_{Str}$ gegenüber PC-C32-PC	79
5	Diskussion	82
5.1	Metallionenbindung und Aktivierung der PLD	82
5.1.1	Vergleich der Effekte verschiedener Metallionen auf die Aktivität der PLD α	82
5.1.2	Unterschiedliche Aktivierung der PLD α durch Ln $^{3+}$	87
5.1.3	Einfluss von PIP $_2$ auf die Aktivität der PLD α	89
5.1.4	Schlussfolgerungen aus den Fluoreszenzmessungen zur Bindung von Tb $^{3+}$ an PLD α	90
5.1.5	Aktivitätsstudien mit der teilgereinigten PLD γ	93
5.2	Metallionenbindung an Substratvesikel	95
5.3	Zusammensetzung und Morphologie der Substratvesikel in Korrelation zur PLD-Aktivität	96
5.3.1	Schlussfolgerungen aus den DLS-Messungen	96
5.3.1.1	Schlussfolgerungen aus den SAXS-Messungen	98
5.4	Bolalipide als PLD-Substrate	99
5.4.1	PC-C24-PC	99
5.4.2	PC-C32-PC	99
5.5	Zusammenfassende Diskussion zur Aktivierung der PLD α	100
6	Zusammenfassung	103
7	Literaturverzeichnis	105
	Anhang	I

Abbildungsverzeichnis

2.1	Angriffsorte von Phospholipasen an Glycerophospholipiden	15
2.2	PLD katalysierte Reaktionen an Phospholipiden	16
2.3	Primärstrukturen unterschiedlicher PLDs	20
2.4	Raumstruktur von PLD aus <i>Streptomyces</i> sp. PMF	21
2.5	Struktur pflanzlicher Phospholipide der Plasmamembran	23
2.6	Primärstrukturen unterschiedlicher PLDs	24
2.7	Struktur von natürlichen und artifiziellen Bolalipiden	25
2.8	Struktur verschiedener Detergenzien	26
2.9	Die häufigsten Formen von Detergenzaggagaten	27
2.10	Schematische Darstellung einer aus SDP2S bestehen zylindrischen Mizelle . .	28
2.11	Anregungs- und Emissionsspektrum von Tb ³⁺	30
4.1	Reinigung der PLD α	50
4.2	Induktion der Expression des PLD γ -Gens mittels IPTG	51
4.3	Reinigung der PLD γ mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	52
4.4	Reinheitskontrolle der PLD $_{Str}$	53
4.5	Aktivierung der PLD α durch Kationen	54
4.6	Hydrolyse von PC durch PLD α in Anwesenheit von CaCl ₂ bzw. TbCl ₃	56
4.7	Verdrängung von Ca ²⁺ durch Tb ³⁺ an PLD α	57
4.8	Einfluss von MgCl ₂ und auf die Aktivität der PLD α in Ab- und Anwesenheit von PIP ₂	58
4.9	Einfluss von PIP ₂ auf die Aktivität der PLD α	59
4.10	Aktivität der teilgereinigten PLD γ	61
4.11	Charakterisierung von PLD $_{Str}$ mittels Aktivitätstests	62
4.12	Fluoreszenzspektren von Tb ³⁺ in Gegenwart von PLD α	63
4.13	Tb ³⁺ als Fluoreszenzsonde	64
4.14	Fluoreszenzsignal von Tb ³⁺ nach Präinkubation von PLD α mit TbCl ₃ bzw. CaCl ₂ .	65
4.15	Korrigiertes relatives Fluoreszenzsignal der mit 100 mM CaCl ₂ präinkubierten PLD α	66

4.16	Interaktion von Kationen mit PpNP-Mizellen	67
4.17	Einfluss von SDS auf die Metallionenbindungskapazität der Substratmizellen	68
4.18	DLS-Messungen von Substratmizellen	69
4.19	Einfluss von CaCl ₂ auf den hydrodynamischen Radius der Substratmizellen	70
4.20	Einfluss steigender Konzentrationen von SDS auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen und die Aktivität der PLD α und PLD _{Str}	71
4.21	Einfluss steigender Konzentrationen von Triton X-100 auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen und die Aktivität der PLD α und PLD _{Str}	72
4.22	Einfluss veränderter Substratkonzentrationen (unter Beibehaltung des 1:8:1 Verhältnisses von PpNP, Triton X-100 und SDS) auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen und die Aktivität der PLD α und PLD _{Str}	73
4.23	Formabschätzung von Substratmizellen mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen	76
4.24	Hydrolysegeschwindigkeit der PLD α und PLD _{Str} als Funktion der Konzentration von PC-C24-PC	77
4.25	Einfluss von SDS auf PC-C24-PC	78
4.26	Hydrolysegeschwindigkeit der PLD α und PLD _{Str} als Funktion der Konzentration von PC-C32-PC	79
4.27	Einfluss von Detergenzien auf die Hydrolyse von PC-C32-PC durch PLD α	80
4.28	Einfluss von Detergenzien auf die Hydrolyse von PC-C32-PC durch PLD _{Str}	81
5.1	Schematische Darstellung der durch Fluoreszenzspektroskopie und Aktivitätsmessungen erhaltenen Messgrößen der Interaktion von Tb ³⁺ mit PLD α	84
5.2	Schematische Darstellung unterschiedlicher konformationeller Zustände der PLD α	92
5.3	Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktion der PLD α	93

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C2-Domäne	Ca ²⁺ /Phospholipid-bindende-Domäne
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
Da	Dalton
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMBL	The European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FT	Fouriertransformation
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarotspektroskopie
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny-broth</i> -Medium
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MLV	<i>multilamellar vesicles</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin

Abkürzungsverzeichnis

PG	Phosphatidylglycerin
PH	Pleckstrin-Homologie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLD	Phospholipase D
PpNP	Phosphatidyl- <i>p</i> -nitrophenol
PX	Phox-Homologie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SDP2S	Natriumdodecyldioxyethylensulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis	ultraviolett/sichtbarer Bereich
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen

Die in dieser Arbeit verwendeten Anglizismen sind, sofern sie ein fester Bestandteil der biochemischen Terminologie sind, nicht übersetzt. Zur Verdeutlichung sind sie kursiv dargestellt.

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Zahlreiche zelluläre Prozesse wie der Umbau des Zytoskeletts, Vesikeltransport, Signalweiterleitung sowie die Reaktion auf verschiedene biotische und abiotische Umwelteinflüsse stehen in Verbindung mit der Aktivität von Phospholipase D (Phosphatidylcholinphosphatidohydrolase, PLD, E.C. 3.1.4.4). Im Vergleich zu Säugetieren, die zwei und Hefen die nur ein PLD-Gen besitzen, finden sich bei sessilen Pflanzen zahlreiche verschiedene PLD-Gene. Das Genom des vollständig sequenzierten Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* codiert 12 [1], das der Nutzpflanze Reis (*Oryza sativa*) 17 PLD-Gene [2], die wiederum verschiedenen Klassen zugeordnet werden können. PLDs katalysieren die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung von Phospholipiden, wobei es zur Freisetzung von Phosphatidsäure (PA) und dem wasserlöslichen Alkohol der Kopfgruppe kommt. Zusätzlich zur Hydrolyse sind PLDs in Gegenwart passender Akzeptoralkohole in der Lage, die Umesterung der Kopfgruppen zu katalysieren (Transphosphatidylierung). Während es bei der Durchführung einer Transphosphatidylierungsreaktion lange Zeit üblich war, PLD aus nur teilweise gereinigtem Pflanzenextrakt zum Reaktionsansatz zu applizieren [3], werden hierfür heute zunehmend bakterielle PLDs aus *Streptomyces*-Arten verwendet [4].

Die in dieser Arbeit untersuchte PLD aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata) wird, bedingt durch die hohen Ca^{2+} -Konzentrationen, die zur Aktivierung des Enzyms nötig sind, dem α -Typ zugeordnet [5, 6]. Der N-terminal gelegenen C2-Domäne der $\text{PLD}\alpha$ wird nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen die elektrostatische Vermittlung des Substratkontaktes zugeschrieben [7, 8].

Da bei der industriellen Verwendung von Phospholipasen [9, 10] die Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen zu prozesstechnischen Problemen führen kann, kann die genaue Kenntnis der molekularen Regulationsmechanismen zur optimierten Anwendung dieser Enzyme führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ aus Weißkohl sowie die Substratinteraktion des Enzyms näher zu charakterisieren.

Aufgrund ähnlicher physikalischer Eigenschaften mit dem natürlichen PLD α -Aktivator Ca²⁺ [11] sollten verschiedene Ionen der Seltenen Erden (Ln³⁺) auf ihre Fähigkeit untersucht werden das Enzym zu aktivieren. Aufschlüsse über Aktivierungsmechanismus und Katalyse könnte der Vergleich der Dissoziationskonstanten der Ln³⁺ untereinander sowie der bei Zugabe von Ca²⁺ ermittelten Werte ergeben. Die in Abwesenheit umgebender Wassermoleküle zu beobachtende Fluoreszenz von Tb³⁺ [12] sollte bei der Durchführung fluoreszenzspektrometrischer Bindungsanalysen genutzt werden, um Aufklärung über Anzahl und Affinität der Metallionenbindungscentren der PLD α zu erhalten. Aktivitätstests mit dem natürlichen Aktivatorlipid PIP₂ [13] brächten Erkenntnisse über eine mögliche Ca²⁺-unabhängige Katalyse.

Die im Fokus stehende PLD α sollte mit der ebenfalls aus Weißkohl stammenden PLD γ hinsichtlich des Metallionenaktivierungsverhalten verglichen werden. Hierzu sollte das PLD γ -Gen (Genbank Bezeichnung: EU591736) erstmals in *E. coli* exprimiert und das Enzym anschließend gereinigt werden.

Genau wie PLD α aus Weißkohl gehört PLD aus *Streptomyces* (PLD_{Str}) bedingt durch die hochkonservierten katalytischen Bereiche zur PLD-Superfamilie [14]. Da dem Enzym jedoch die für PLD α typische C2-Domäne fehlt, würde die Durchführung vergleichender Aktivitätsstudien die Rolle von Kationen bei der Substratinteraktion und -hydrolyse der PLD α spezifizieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Untersuchungen über die Wechselwirkungen von PLD α und PLD_{Str} mit Substratmizellen stehen, die sich neben dem eigentlichen Substrat aus unterschiedlichen Detergenzien zusammensetzen. Mögliche enzymkinetische Effekte bei der Variation der Detergenzkonzentration würden Rückschlüsse auf den Kontakt von Enzym und Substrat und die darauf folgende Katalyse zulassen. Des Weiteren sollte die Durchführung der FeRes-Methode [15] zum Verständnis für den Zusammenhang zwischen der zur Aktivierung des Enzyms notwendigen Kationenkonzentration und der an den Substratmizellen befindlichen Konzentration von Kationen beitragen. Daran anschließend sollten biophysikalische Untersuchungen zum Einfluss von Detergenzien und Kationen auf die Substratmizellen durchgeführt werden. Die zum Einsatz kommenden Methoden der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) können Informationen zum hydrodynamischen Radius sowie Form und Struktur der Substratmizellen liefern [16].

Die durch beide Methoden ermittelten möglichen Effekte würden durch einen Vergleich mit den aus dem ersten Teil der Arbeit gewonnen Daten der enzymkinetischen Untersuchungen Rückschlüsse auf die enigmatische Rolle von Ca²⁺ bei der Aktivie-

zung der PLD α zulassen, um eine zusammenfassende Theorie zur Funktionsweise des Enzyms zu entwickeln.

2 Theoretischer Teil

2.1 Pflanzliche Phospholipasen D

Die in der gesamten belebten Natur vorkommenden Phospholipasen bilden eine Gruppe von Enzymen, deren Substrate amphiphile Glycerophospholipide sind. Diese sind aus Diacylglycerol, einer Phosphatgruppe und einem polaren Rest zusammengesetzt. Gemeinsam mit Glykolipiden, Proteinen und Cholesterol bilden Glycerophospholipide die Hauptbestandteile biologischer Membranen. Entsprechend ihrem Angriffsort am Phospholipid werden Phospholipasen dem A- (PLA₁ bzw. PLA₂), C- (PLC) oder D- Typ (PLD) zugeordnet.

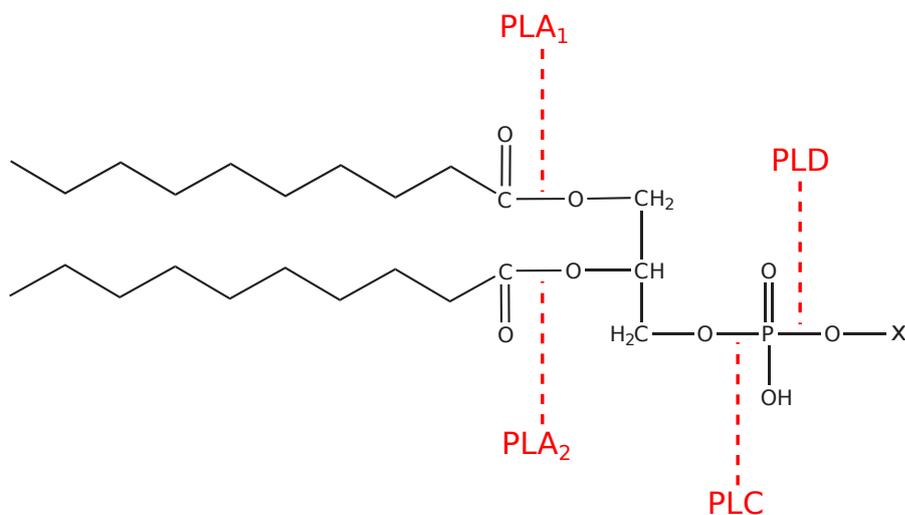


Abbildung 2.1: Angriffsorte von Phospholipasen an Glycerophospholipiden. X - kennzeichnet die Kopfgruppe. Die Hauptkomponenten nicht-plastidärer Membranen sind Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (Abb. 2.5 in Abschnitt 2.2).

Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, katalysiert PLD die Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung in Phospholipiden. Die dabei entstehende Phosphatidsäure (PA) gilt als wichtiges Strukturelement biologischer Membranen, als *second messenger* der Signalweiterleitung sowie als Regulator des Membrantransportes [17, 18]. Neben der

Hydrolysereaktion ist PLD als einzige Phospholipase in der Lage, in Anwesenheit geeigneter Akzeptoralkohole eine Umesterung (Transphosphatidylierung) zu katalysieren (Abb. 2.2). Während diese Reaktion in der Biotechnologie genutzt wird um Phospholipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen zu generieren [19, 20], ist die biologische Bedeutung weiterhin unklar [14].

Da auch die Kopfgruppen von Alkylphosphonocholin [21] und Alkylphosphocholin [22] durch PLD aus Weißkohl ausgetauscht werden können, scheint das Glycerolrückgrat der Phosphodiesterstruktur für die Transphosphatidylierung nicht notwendig zu sein.

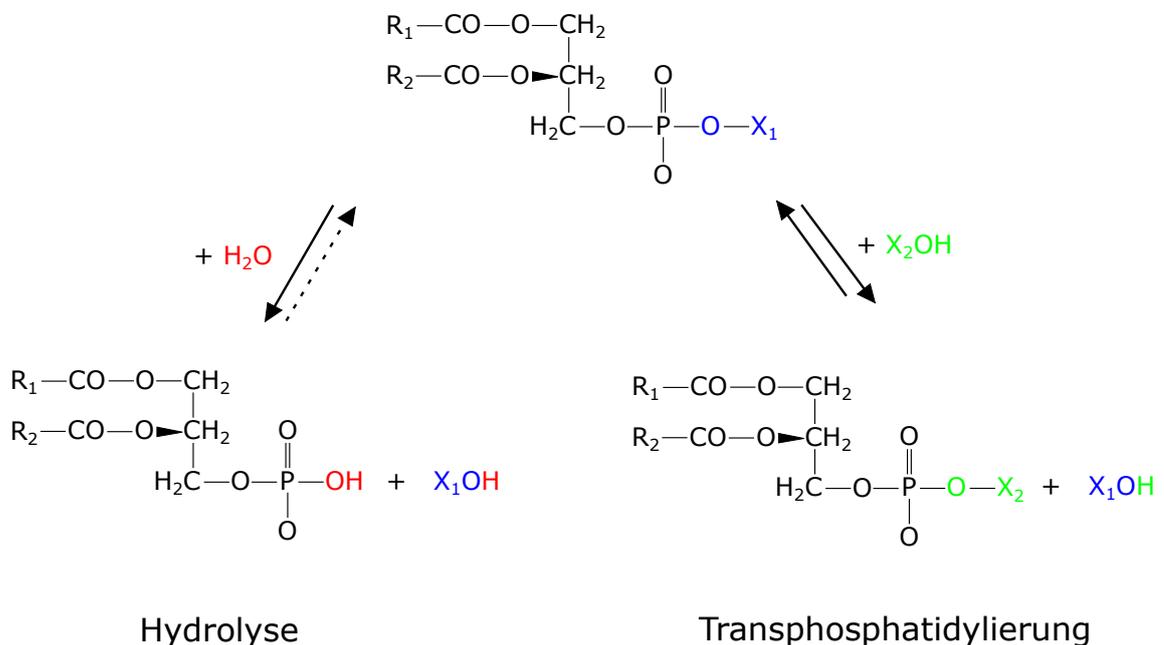


Abbildung 2.2: PLD katalysierte Reaktionen an Phospholipiden. R₁ und R₂ sind gesättigte bzw. ungesättigte Alkylketten. X₁OH und X₂OH kennzeichnen den freigesetzten bzw. den Akzeptoralkohol.

Entsprechend ihrem Bedarf an Aktivatoren im *in-vitro*-System werden pflanzliche PLDs in verschiedene Klassen unterteilt. So benötigt PLD des α -Typs millimolare Konzentrationen an Ca²⁺ (20-100 mM) zur optimalen Aktivierung [23]. Organische Lösungsmittel und Detergenzien stimulieren ebenfalls die Hydrolyse [24]. PLDs des β -, γ - und δ -Typs benötigen mikromolare Ca²⁺-Konzentrationen sowie zusätzlich Phosphatidylinositol zur maximalen Aktivität [25]. Einheitliches Merkmal der PLD γ ist das Vorhandensein einer N-terminal gelegen Myristylierungsstelle (Abb. A.2 im Anhang) die aus den Aminosäuren MGxxxS besteht [26]. Die Myristylierung präsentiert

einen Mechanismus zur reversiblen Membranbindung von Proteinen, wobei der hydrophobe Myristinrest die Interaktion des jeweiligen Proteins mit Lipiden der Zellmembran ermöglicht [27, 28]. Des Weiteren konnten für myristilierte Proteine strukturstabilisierende Effekte nachgewiesen werden [29]. Ca^{2+} -unabhängige PLDs werden dem ζ -Typ zugeordnet [30].

2.1.1 Funktionen pflanzlicher Phospholipasen D

Nachdem die Existenz einer Phospholipase D bereits im Jahre 1933 durch Contardi und Ercoli postuliert wurde [31], gelang der Nachweis von PLD zunächst 1947 in Karottensaft durch Hanahan und Chaikoff [32]. Während sich die Beobachtungen der Entdecker auf den Abbau von Lipiden richteten, werden die Funktionen pflanzlicher PLDs heute im allgemeinen in drei Kategorien eingeteilt: 1. Abbau von Lipiden, 2. Membranumbau und 3. Signaltransduktion [25].

Hinsichtlich Lipidabbau und Membranumbau ließ sich eine gesteigerte PLD-Aktivität während des Wachstums von Pflanzen [33], der Keimung von Samen [34], in alternen Blättern und Samen [33], in Wurzelhärchen [35] sowie in Pollenschläuchen [36] nachweisen. Zur Aktivierung von PLD führte ebenfalls die Reaktion auf biotische (z.B. Befall von Pilzen oder Bakterien) [37, 38] und abiotische (z.B. Wassermangel, Verwundung) Faktoren [39, 40, 41].

Während der Lipidabbau zum Verlust der Membranfunktion und -integrität führt, bezieht sich der durch PLD-Aktivität erfolgte Membranumbau auf die Lipidbiosynthese und die Veränderung der Membranlipidzusammensetzung. Beispielsweise werden so bei Phosphatmangel Phospholipide in nicht-plastidären Membranen durch Lipide ersetzt, die kein Phosphat enthalten. Steht wieder ausreichend Phosphat zur Verfügung, kommt es zur vermehrten Synthese von Phospholipiden und deren Einbau in die entsprechenden Membranen [42, 43, 44].

Die Rolle von PLD bei der Signaltransduktion bezieht sich hauptsächlich auf PA, einem Produkt der Phospholipidhydrolyse. PA, die auch durch Phosphorylierung mittels Diacylglycerolkinase und Alkyltransferase gebildet werden kann, gilt als wichtiger sekundärer Botenstoff innerhalb pflanzlicher Zellen [45]. Die Vielzahl der regulatorischen Prozesse, an denen PA im pflanzlichen Organismus beteiligt ist, reichen von der Verarbeitung biotischer und abiotischer Umwelteinflüsse [40, 39] bis hin zu sämtlichen Entwicklungsprozessen von der Keimung des Samens [34, 46] über das Wachstum der Pflanze [47, 48, 35] bis hin zur Seneszenz der Blätter [43, 39, 49, 50].

2.1.2 Regulation pflanzlicher Phospholipasen D

Die Aktivität der in nahezu allen pflanzlichen Geweben vorhandenen PLD bedarf einer strikten Regulation. Unkontrollierte Enzymaktivität hätte drastische Folgen auf Integrität und Zusammensetzung der Zellmembran. Ein Beispiel für deregulierte PLD-Aktivität ist der Verlust von Phospholipiden während der Homogenisierung von Pflanzenmaterial [32]. Die vielschichtige Regulation der PLD erfolgt über Langzeit- und Kurzzeitmechanismen. Zur Langzeitkontrolle gehören die Aktivität der Genexpression, die Proteinsynthese und der Proteinabbau. So wird bei einer hohen Enzymaktivität oftmals ein erhöhter Anteil an PLD-mRNA nachgewiesen [51, 52, 53]. Da PLD selbst bei mRNA-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze detektiert werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass es sich um ein sehr stabiles Enzym handelt [51]. Direkte Messungen über Synthese und Abbau von PLD liegen nicht vor und erlauben daher keine Aussagen über die *turnover rate*.

Im Folgenden soll auf die Kurzzeitmechanismen der PLD-Regulation eingegangen werden, die mit ihrer Wirkung direkt das Enzym beeinflussen.

2.1.2.1 Regulation durch Ca^{2+}

Ca^{2+} -Ionen sind wichtige *second messenger* pflanzlicher Zellen [54] und gelten als Regulatoren für PLDs. So bildet sich bspw. beim Spitzenwachstum ein Ca^{2+} -Gradient aus, der durch Ca^{2+} -Kanäle aufrecht erhalten wird. Des Weiteren führen Berührungsrreize, Kälteschock und Pathogeneinfluss zu einem starken Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration in Tabakkeimlingen (*Nicotiana plumbaginifolia*) [55, 56]. Allgemein beträgt die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration in unstimulierten Landpflanzen 10^{-7} M. Für den Apoplasten wird eine Konzentration von 10^{-4} - 10^{-3} M angegeben [57, 58].

Die Aktivierung pflanzlicher PLDs durch Ca^{2+} -Ionen ist eng mit der für diese Enzyme typischen N-terminal gelegenen C2-Domäne verbunden (Abschnitt 2.1.3 und Abb. 2.3 bzw. A.2 im Anhang). Dieser aus ca. 130 Aminosäuren bestehende konservierte Bereich wurde erstmals in Isoformen der Proteinkinase C entdeckt [59] und gilt als Bindestelle für Ca^{2+} -Ionen und Phospholipide [60, 61]. An die C2-Domäne gebundene Ca^{2+} -Ionen vermitteln die Bindung von Enzym und Substrat [62]. Zum anderen wird diskutiert, dass die Ca^{2+} -Bindung zu konformationellen Änderungen und damit zur Aktivierung des Enzyms führt [63]. Während bei PLDs des β -, γ - und δ - Typs vermehrt saure Aminosäuren in den Ca^{2+} -Bindestellen der C2-Domäne vorhanden sind

[61, 64], sind diese bei PLD α durch eine basische und eine neutrale Aminosäure ersetzt [64, 1]. Ein Sonderfall stellt PLD ϵ dar, in deren C2-Domäne keine sauren Aminosäuren vorkommen [65]. Die beschriebenen Aminosäureaustausche gelten als Grund für die geringen Affinitäten von PLD α und PLD ϵ gegenüber Ca²⁺ und somit für die hohen Ca²⁺-Konzentrationen, die zur vollständigen Aktivierung der Isoenzyme *in vitro* notwendig sind [61]. Zusätzlich zur C2-Domäne konnte die Bindung von Ca²⁺-Ionen im aktiven Zentrum der PLD α [66] und PLD β [67] nachgewiesen werden.

2.1.2.2 Regulation durch Lipide

Polyphosphoinositide sind im pflanzlichen Organismus am Lipidstoffwechsel, der Membranbildung, der Organisation des Zytoskeletts sowie am Vesikeltransport beteiligt [68]. Ebenso gelten sie als wichtige Cofaktoren für PLDs des β -, γ - und ζ -Typs, bei deren Abwesenheit keine Enzymaktivität nachweisbar ist [1, 61, 69, 70]. Bei optimalen Ca²⁺-Konzentrationen ist PLD α unabhängig von Polyphosphoinositiden, wird jedoch durch diese Lipide bei Ca²⁺-Konzentrationen im mikromolaren Bereich *in vitro* stimuliert [1, 61]. Als wichtigstes Polyphosphoinositid gilt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Abb. 2.5) dessen Bindestelle bei PLD α innerhalb der auch Ca²⁺ bindenden C2-Domäne nachgewiesen wurde [5].

Einen negativen Effekt auf die Enzymaktivität der PLD hat die direkte Bindung von Lysophospholipiden [71]. Neben den erwähnten Lipiden führt ebenfalls die Interaktion mit N-Acetylethanolamin zur Minderung der Enzymaktivität [72].

2.1.2.3 Regulation durch Proteine

Während sich eine Vielzahl von Publikationen mit der Interaktion von PLD aus Säugtieren mit Proteinen beschäftigen [73, 74], sind die Informationen über pflanzliche PLDs auf diesem Gebiet begrenzt.

Dennoch wird ein regulatorischer Einfluss bestimmter Proteine vermutet, da die Bindung pflanzlicher PLD α sowohl aus *Nicotiana tabacum* als auch aus *A. thaliana* an die inaktive GDP-Form der α -Untereinheit von G-Protein die Enzymaktivität *in vitro* unterdrückte. Die Zugabe von GTP führte zur Wiederherstellung der Enzymaktivität [75, 76].

2.1.2.4 Regulation durch Substratmorphologie

Kinetische Studien mit Liposomen oder gemischten Mizellen ergaben, dass es oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) zu einem starken Anstieg der PLD-Aktivität kommt [77, 78, 79]. Zum anderen zeigen Untersuchungen, dass die Änderung der Membranmorphologie durch Bildung von Mikrodomänen [80, 81] mit einer Steigerung der Enzymaktivität von PLD α aus *B. oleracea* sowie PLD β und γ aus *A. thaliana* verbunden ist [25, 82].

2.1.3 Strukturmerkmale der PLD

Die PLD-Superfamilie umfasst Enzyme mit PLD-Aktivität, deren gemeinsames Merkmal das Vorhandensein zweier hoch konservierter Bereiche innerhalb der Primärstruktur ist (Abb. 2.3). Diese sogenannten HKD-Motive bestehen aus der spezifischen Sequenz: **HxKxxxxDxxxxxxG(G/S)** [83].

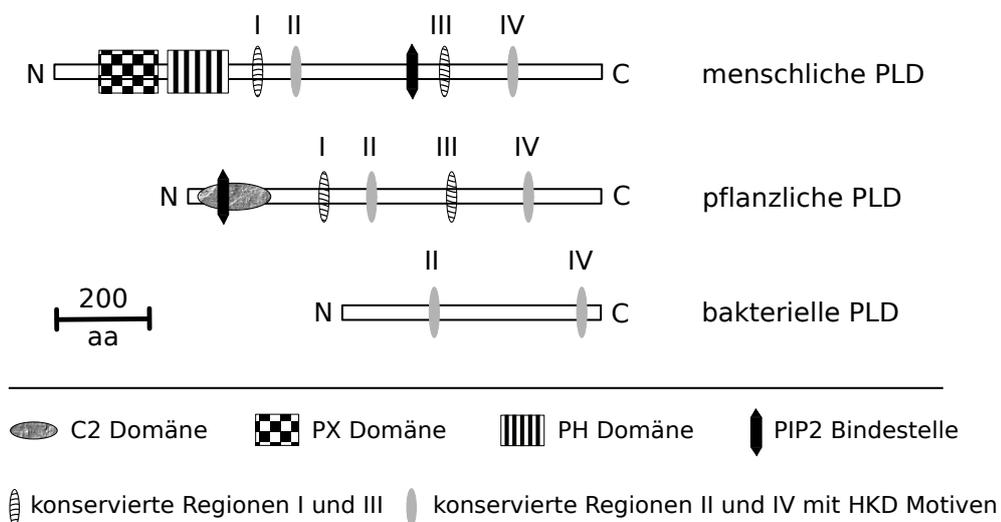


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Primärstrukturen unterschiedlicher PLDs. Verändert nach [14].

Beide Motive, die als homologe Region II und IV definiert sind, bilden das aktive Zentrum der PLD [84, 85, 86, 87] und sind essentiell für deren Aktivität [88]; eine detaillierte Übersicht der Primärstruktur bietet Abb. A.2 im Anhang durch ein *alignment* der Aminosäuresequenzen von PLD α und PLD γ .

Zusätzlich zu den HKD-Motiven weisen PLDs aus Pflanzen, Hefen und Säugern zwei

weitere konservierte Bereiche (definiert als homologe Regionen I und III) auf, deren Funktion jedoch unklar ist [89]. PLDs aus *Streptomyces* besitzen nur die homologen Regionen II und IV sowie Teile der Region I. Regulatorische Bereiche, wie bspw. die N-terminal liegende C2-Domäne pflanzlicher PLDs oder die Phosphatidylinositolphosphate bindenden Phox- (PX) und Pleckstrin-Domänen (PH) von Säuger PLDs, sind bei den extrazellulär vorkommenden bakteriellen PLDs nicht vorhanden. Eine Gemeinsamkeit von PLDs aus Pflanzen [88] und Säugetieren [90, 91] besteht in der absoluten Notwendigkeit eines intakten C-Terminus zur Aktivität, während der C-Terminus von PLD aus *Streptomyces septatus* TH-2 neben Hydrolyse und Transphosphatidylierung zusätzlich Einfluss auf die Substratspezifität nimmt [92, 93, 94].

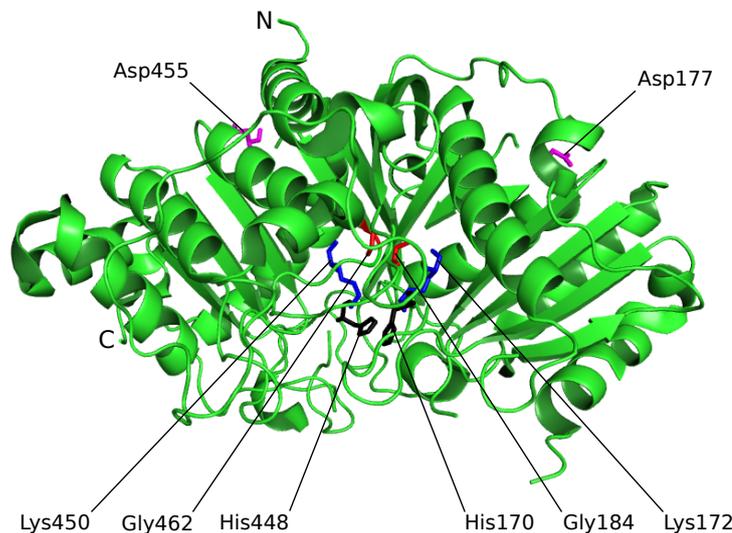


Abbildung 2.4: Raumstruktur von PLD aus *Streptomyces* sp. PMF. Die Aminosäuren der konservierten und das aktive Zentrum bildenden HKD-Motive sind farblich hervorgehoben und beschriftet. Die Struktur (PDB-Nummer: 1F0I) entstammt der Publikation von Leiros *et al.* [86] und wurde mit dem Programm PyMOL bearbeitet.

Bakterielle PLDs werden hauptsächlich aus *Streptomyces*-Arten gewonnen, wobei Kristallstrukturen für PLD aus *Streptomyces* sp. PMF [86] und *Streptomyces antibioticus* [95] publiziert sind. Beide als Monomere vorliegenden Enzyme bestehen aus zwei Domänen mit ähnlicher Topologie, die eine α - β - α - β - α -sandwich-Struktur bilden. Neben den 18 α -Helices bilden neun und acht β -Stränge zwei β -Faltblätter. Die das aktive Zentrum bildenden HKD-Motive liegen an der Grenze beider Domänen. Abbildung 2.4 veranschaulicht dies am Beispiel der Kristallstruktur von *Streptomyces* sp. PMF. Rück-

schlüsse von der Raumstruktur bakterieller PLDs auf die Strukturen von PLDs aus Pflanzen oder Säugern sind durch die Größenunterschiede und das Vorhandensein unterschiedlicher regulatorischer Bereiche an den Enzymen nur eingeschränkt möglich. Dennoch wird, durch die bei allen PLDs vorhandenen hochkonservierten HKD-Motive von einem vergleichbaren aktiven Zentrum ausgegangen [14].

Die auf Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) und CD-Spektroskopie beruhenden Daten zur Struktur von PLD2 aus Weißkohl zeigen eine längliche, fassförmige Struktur mit basal und apikal vorhandenen lockeren Bereichen und ausgeprägten β -strukturellen Elementen [66].

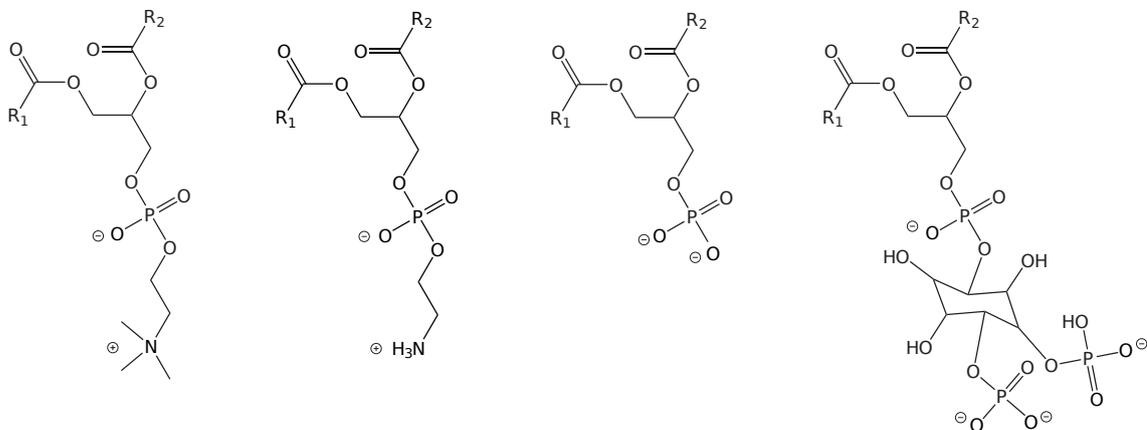
2.1.4 PLD aus *B. oleracea* var. *capitata*

Die im Rohextrakt von Weiß- und Wirsingkohl vorkommende PLD wird seit fast 50 Jahren zur biotechnologischen Synthese von Phospholipiden genutzt [96]. Die in Weißkohl identifizierten Isoenzyme PLD1 und PLD2 konnten dem α -Typ zugeordnet werden und wurden in vorangegangenen Arbeiten sequenziert sowie deren Gene in *E. coli* exprimiert [5]. Die in dieser Arbeit untersuchte PLD2 (im folgenden $PLD\alpha$) besteht aus 812 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 92,1 kDa. Im isolierten Enzym ist der N-Terminus acetyliert [64], während es bei heterologer Expression in *E. coli* zur Abspaltung des N-terminalen Methionins kommt. $PLD\alpha$ benötigt unter *in vitro* Bedingungen Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 10-100 mM und einen sauren pH-Wert zum Erreichen des Aktivitätsoptimums [66]. Da sich 15 Tryptophan-, 30 Tyrosin- und 34 Phenylalaninreste gleichmäßig über das Enzym verteilen, ist es für Untersuchungen mittels Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektroskopie besonders geeignet. Die mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie untersuchte Ca^{2+} -Interaktion ergab Bindungskurven, die hohe Übereinstimmungen mit dem Aktivitätsverlauf von $PLD\alpha$ zeigen [66]. Des Weiteren weisen die ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D) auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Ca^{2+} -Bindestellen am Molekül hin. Das erste Bindungsereignis mit einem K_D von 0,12 mM wurde als Ca^{2+} -Bindung an die C2-Domäne interpretiert, während das zweite Ereignis mit einem K_D von 10,2 mM als Bindung an die katalytischen Domänen des Enzyms diskutiert wurde. Untersuchungen belegten die Steigerung der $PLD\alpha$ -Aktivität durch Natriumdodecylsulfat (SDS) (Abb. 2.8 A) und diskutieren das mögliche Vorhandensein von zwei Substratbindestellen am Enzym [97, 98]. Die stark schwankenden Unterschiede der Enzymaktivität gegenüber *large unilamellar vesicles* (LUV) und *multilamellar vesicles* (MLV) verdeutlichen den Einfluss der Substratmorphologie auf $PLD\alpha$ [97].

2.2 Phospholipide

2.2.1 Natürliche Phospholipide

Basierend auf ihren unterschiedlichen Funktionen besitzt jede Zellmembran eine unterschiedliche Zusammensetzung. Neben Cholesterol und Glykolipiden besteht die Membran zum größten Teil aus Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen und Alkylketten, wobei die Hauptkomponenten nicht-plastidärer Membranen (Abb. 2.5) das zwitterionische Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) sind [99, 100, 101].



Phosphatidylcholin Phosphatidylethanolamin Phosphatidsäure Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Abbildung 2.5: Struktur pflanzlicher Phospholipide der Plasmamembran und deren jeweilige Ladungen unter physiologischen Bedingungen. Die Länge und Sättigungsgrad der mit R₁ und R₂ gekennzeichneten Alkylgruppen ist u.a. abhängig von der Kopfgruppe und der Position innerhalb der Zelle. Verändert nach [102].

Zusätzlich befinden sich zu einem geringeren Teil negativ geladene Lipide in der Membran, aus deren Anwesenheit ein negatives elektrisches Potential über der Membran resultiert. Dies führt zur Bindung von im Zytosol frei beweglichen Gegenionen und damit zur Reduzierung der negativen Ladungsdichte an der Membran. Die Konzentration der Gegenionen ist dadurch an der Oberfläche der Membran um den Faktor 10 größer, und der pH-Wert um eine pH-Einheit niedriger als im Zytosol [102, 103]. Die Gegenwart von mono- oder divalenten Kationen hat großen Einfluss auf die Verteilung der Lipide innerhalb der Membran sowie auf die Funktion von mit der Membran interagierenden Proteinen [102]. So wurden die Ca²⁺- und Mg²⁺-abhängige Bil-

derung von Clustern und Domänen sowie das Entmischen von Membranlipiden für Phosphatidylserin (PS) [104, 105], Phosphatidsäure (PA) [105, 106] und Phosphatidylinositol (PI) [107, 108, 109] beschrieben. Dass die Lipid-Kation-Interaktion nicht nur von der Ladung der Kationen abhängig ist, zeigt die Tatsache, dass bspw. PA und PIP_2 bevorzugt Ca^{2+} im Vergleich zu Mg^{2+} binden [110, 111, 112, 113]. Weitere Unterschiede zeigen sich beim Einfluss von Kationen auf die Domänenstruktur von Phospholipiden (Abb. 2.6).

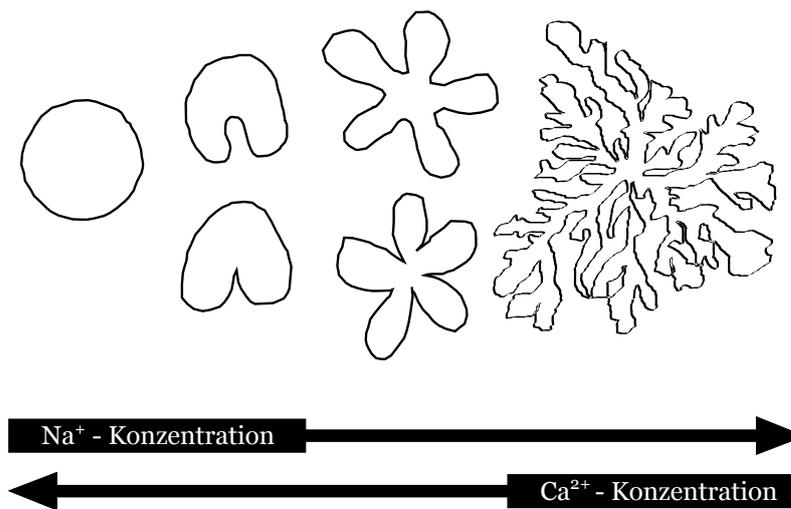


Abbildung 2.6: Domänenstruktur von als Monolayer vorliegender PA in Abhängigkeit von der Na^+ - bzw. Ca^{2+} -Konzentration. Steigende Na^+ -Konzentrationen führten zu mehr verzweigten Konturen, während steigende Konzentrationen von Ca^{2+} zu zirkulären Formen führten. Verändert nach [114].

So konnte mittels Monoschichtexperimenten nachgewiesen werden, dass steigende Na^+ -Konzentrationen zu verzweigten PA-Strukturen führten. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration machte diesen Effekt wieder rückgängig [114]. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Tatsache, dass Ca^{2+} einen stark kondensierenden Effekt auf geladene Monoschichten hat, wohingegen die Anwesenheit von Na^+ zu einer leichten Flächenzunahme in Gegenwart von PIP_2 und PA führt. Diese Lipidexpansion beruht auf der durch die monovalenten Kationen erfolgten Deprotonierung negativ geladener Lipide und der daraus folgenden größeren Abstoßung der Kopfgruppen [114, 115, 116].

2.2.2 Bolalipide

Bolalipide sind bipolare Amphiphile, deren zwei hydrophile Kopfgruppen durch ein oder zwei lipophile Alkylketten miteinander verbunden sind. Die ursprünglich in Archaeen vorkommenden Lipide durchspannen vor allem in Methanogenen und Thermoacidophilen Teile der gesamten Zellmembran und erfüllen somit membranstabilisierende Aufgaben [117, 118]. In beiden Archaeenklassen wurden als Hauptlipide Diphytanylglyceroldiether (Archaeol) und dessen Dimere, die sog. Di-(biphytanyl)-diglyceroltetraether (Caldarchaeol) (Abb. 2.7 A und B) identifiziert [119, 120].

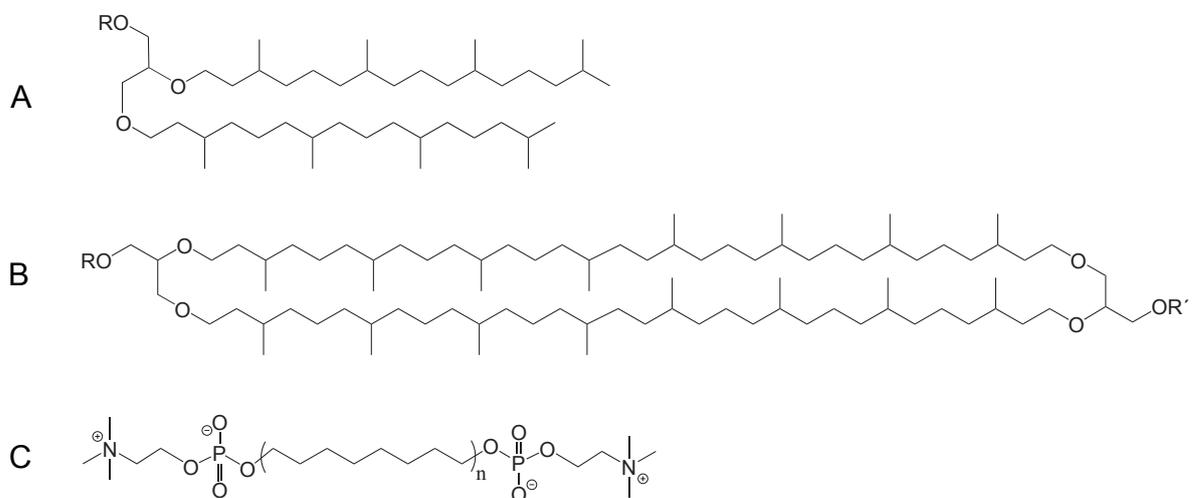


Abbildung 2.7: Struktur von natürlichen und artifiziellen Bolalipiden. A: Archaeol, B: Caldarchaeol, C: Synthetisches Bolalipid. R = H, Zuckerreste, Phosphatreste; R' = H, Polyolreste.

In Anlehnung an die natürlich vorkommenden Bolalipide wurden unter Beibehaltung der wichtigsten natürlichen Eigenschaften, durch zahlreiche Arbeitsgruppen vereinfachte Bolalipide (Abb. 2.7 C) synthetisiert und physiko-chemisch charakterisiert [121, 122, 123]. Die gewonnenen Resultate werden zur Entwicklung von chemisch und mechanisch stabilen Membranstrukturen genutzt, um diese bspw. bei der Anwendung von wirkstofftragenden Vesikeln zum Einsatz bringen zu können [124, 125, 126, 127].

2.2.3 Detergenzien zur Solubilisierung von Phospholipiden

Der Begriff Mizelle (von lat. mica=Krümchen) wurde zuerst 1913 von McBain bei der Beschreibung von Aggregaten aus Seifen und Detergenzien verwendet [128]. Hierbei handelt es sich um amphiphile Aggregate bzw. grenzflächenaktive Substanzen, die sich oberhalb der CMC in wässriger Lösung spontan zusammenlagern. Ähnlich wie bei Phospholipiden ist der hydrophobe Teil dieser Amphiphilen dem Wasser ab- und der hydrophile Teil dem Wasser zugewandt. Die umfangreichen Anwendungsmöglichkeiten mizellärer Systeme finden sich im wissenschaftlichen und technischen Bereich wieder. So wird bspw. das nichtionische Lösungsmittel Triton X-100 (Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]ether) (Abb. 2.8 C) zur Solubilisierung von Lipiden und Membranproteinen [129], DNA-Extraktion [130, 131] und, gemischt mit Phospholipiden, zum Studium von Enzymen des Phospholipidmetabolismus genutzt.

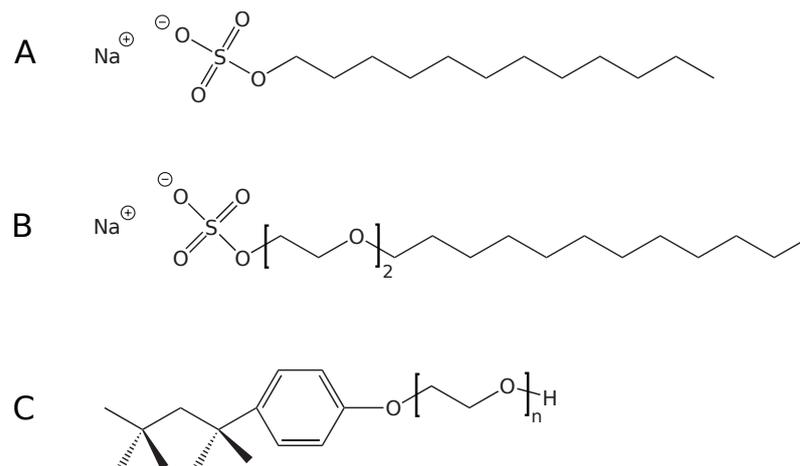


Abbildung 2.8: Struktur verschiedener Detergenzien. A: SDS, B: SDP2S, C: Triton X-100, die durchschnittliche Zahl der hydrophilen Ethylenglycole (n) beträgt 9,5.

Die durch Triton X-100 ermöglichte Mizellisierung erlaubte Aktivitätsstudien mit Phosphatidylcholin (PC) [132], Phosphatidylethanolamin (PE) [133], Phosphatidylinositol (PI) [134], Phosphatidsäure [135], Phosphatidylserin (PS) [136], Cytidindiphosphat-(CDP)-diacylglycerol [137], Diacylglycerol [138], Palmitinsäure [133] und Sphingolipiden [139]. Die Form der Aggregate (Abb. 2.9) und die Anzahl der in ihr befindlichen Moleküle (Aggregationszahl) ist abhängig von der Detergenzkonzentration, der Länge der hydrophoben Ketten [140], der Temperatur und der Anwesenheit

von Elektrolyten [141, 142]. Mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) [143], Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) [144], Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS) [145], NMR [143] und Viskosimetrie [146] wurde die Struktur von Triton X-100-Mizellen, in Abwesenheit von Metallionen, als oblat-ellipsoid bzw. diskusförmig beschrieben. Während die Größe der Mizelle konzentrationsabhängig war, entsprach des Verhältnis von längerer zu kleinerer Achse der ellipsoiden Mizellen jeweils dem Faktor ≈ 2 [147, 148].

Die Mizellgröße ließ sich ebenfalls durch Zugabe monovalenter Kationen ändern. Steigende Konzentrationen von LiCl, NaCl und CsCl führten zu einer Zunahme des hydrodynamischen Radius, wobei der Effekt abhängig von der Hydratisierung des Kationen war [149]. Die Größenzunahme der Triton X-100-Mizellen wird durch die durch Anwesenheit von Kationen erfolgte Auflösung des über Wasserstoffbrücken gebundenen Wassers innerhalb der Polyethylenglycolschicht erklärt, welche die äußeren Hülle der Mizelle bildet. Dies führt wiederum zur Einlagerung von an Kationen gebundenen Wassers in die Polyethylenglycolschicht und damit zum Anstieg des mizellären Radius.

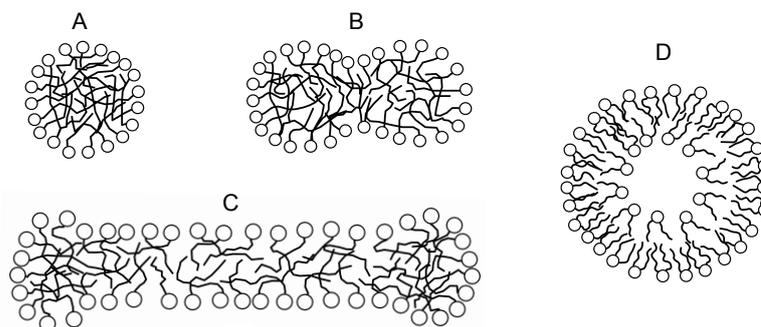


Abbildung 2.9: Die häufigsten Formen von Detergenzaggregaten. A: sphärisch, B: globulär, C: zylindrisch, D: doppelschichtiges Vesikel. Verändert nach [140].

Als weitere mögliche Ursache für den Anstieg des Radius wird die Zunahme der Aggregationszahl diskutiert [150].

Die metallionenunabhängige Größenzunahme von Triton X-100 Mizellen beschrieben die Autoren Dharaiya und Bahadur [151]. Während 1-Naphthol, *p*-Kresol und Phenol den hydrodynamischen Radius auf das bis zu 5-fache des Ausgangswertes von 5,3 nm vergrößerten, zeigte das hydrophilere Brenzcatechin, Hydrochinon und Resorcin keinen Effekt auf die Mizellen. Die Ergebnisse werden durch die verstärkte Interaktion der hydrophoben Phenole mit den Polyoxyethylenketten der Triton X-100-Mizellen

erklärt. Die so gesteigerte Hydrophobizität der Mizelle führt zu einer Absenkung der CMC und somit zum Anstieg der Aggregationszahl. Dies resultiert in der vermehrten Einlagerung von Triton X-100-Molekülen in die Mizellen und damit zu einem Anstieg des Radius. Die Größenzunahme konnte durch Senkung des pH-Wertes bzw. Anhebung der Temperatur noch weiter verstärkt werden [151].

NMR Studien mit gemischten Mizellen aus Triton X-100 und dem anionischen Natriumdodecyldioxyethylensulfat (SDP2S) (Abb. 2.8 B) ergaben bei einer äquimolar konstanten Tensidkonzentrationen von 12 mM sphärische Partikel mit einem hydrodynamischen Radius von 3,6 nm [152]. Ähnlich wie bei Mizellen aus reinem Triton X-100 führte die Anwesenheit von Metallionen zu einem Anstieg des hydrodynamischen Radius der gemischten Mizellen, wobei sich dieser mit zunehmender SDP2S-Konzentration noch weiter steigern ließ. So führten in Anwesenheit von 12 mM AlCl_3 steigende Mengen SDP2S zur Steigerung des hydrodynamischen Radius von 4,2 auf 9,8 nm [152], was als mögliches Indiz für einen Übergang von einer sphärischen zu einer zylindrischen Mizellform diskutiert wurde [153, 154, 155].

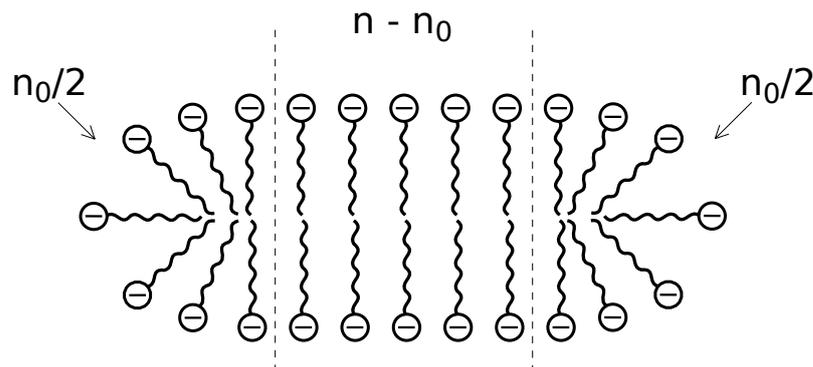


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung einer aus SDP2S bestehenden zylindrischen Mizelle.

n ist die Summe der Detergensmoleküle, n_0 kennzeichnet die Moleküle der abgerundeten Enden. Die hydrophile Kopfgruppe von SDP2S besteht aus zwei Ethylenglycol und einer SO_4^- -Gruppe (Abb. 2.8 B). Verändert nach [155].

Untersuchungen von Alargova *et al.* [155] an SDP2S-Mizellen zeigten, dass in Gegenwart von Ca^{2+} steigende SDP2S-Konzentrationen zum Anstieg des hydrodynamischen Radius und zur Bildung von zylindrischen Aggregaten führten (Abb. 2.10). Um den Übergang von einer sphärischen zu einer zylindrischen Mizellform zu induzieren bedurfte es einer 3-5-fach höheren Ca^{2+} -Konzentration als nötig wäre, um die Oberflächenladung der Mizellen zu neutralisieren. Erklärt wird die Formände-

rung durch die Anlagerung von Ca^{2+} an das anionische Detergens, infolgedessen die Oberflächenladung der Mizelle reduziert wird. Durch die damit verbundene geringere Oberflächenladungsdichte und geringere elektrische Energie pro Monomer ergibt sich für die zylindrischen Aggregate im Vergleich zu sphärischen Mizellen ein energetisch günstiger, und damit bevorzugter Zustand [155].

2.3 Ionen der Seltenen Erden als Ersatz für Ca^{2+}

Ca^{2+} -Ionen sind in allen eukaryotischen Organismen essentiell (Abschnitt 2.1.2.1). Im pflanzlichen System sorgt der Transpirationssog für die Aufnahme von Ca^{2+} über die Wurzeln, dessen Transport über das Xylem und die Verteilung im Apoplast [156]. Innerhalb des Apoplast bindet der größte Teil der aufgenommenen Ca^{2+} -Ionen an die negativ geladenen Carboxylgruppen von Galacturonsäure (Pektin) und Oxalaten [157]. Ungebundenes Ca^{2+} verbleibt im Apoplast und kann bei Bedarf von den Zellen aufgenommen werden [158]. Der Hauptspeicher zellulären Ca^{2+} ist, neben dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), die Vakuole [159, 160]. In pflanzlichen Zellen führen verschiedene Umweltreize zu räumlich und zeitlich begrenzten, aber auch periodisch auftretenden (circadianer Rhythmus) Freisetzung von Ca^{2+} [161, 162, 163].

Der Großteil Ca^{2+} -sensitiver Proteine besitzt als Metallbindestelle das klassische *EF-hand*-Motiv [164], in welchem geladene Aminosäuren eine *helix-loop-helix*-Struktur ausbilden. So codiert bspw. das Genom des am besten untersuchten Pflanzenmodells *A. thaliana* ca. 250 verschiedene *EF-hand*-Proteine [165].

Unabhängig vom *EF-hand*-Motiv benötigen Phospholipasen Ca^{2+} entweder als Cofaktor [166] oder Aktivator [66], um ihre biologischen Funktionen erfüllen zu können. Bedingt durch die elektronischen Übergänge und die Abwesenheit ungepaarter Elektronen, eignen sich Ca^{2+} -Ionen jedoch nicht zur Kernmagnetresonanz- bzw. fluoreszenzspektrometrischen Untersuchung von Metallbindungsstellen an Proteinen.

Der effektive Ionenradius von Ca^{2+} liegt, je nach Koordinationszahl, zwischen 1,00 und 1,34 Å [11]. Die strukturelle Charakterisierung von Metallbindestellen zahlreicher Proteine ergab für gebundene Ca^{2+} eine durchschnittliche Koordinationszahl von 6, was einem effektiven Ionenradius von 1,00 Å entspricht. Die durchschnittliche Koordinationszahl von an *EF-hand*-Motiven gebundenen Ca^{2+} betrug 7 und hatte demzufolge einen effektiven Ionenradius von 1,06 Å [167, 11].

Der effektive Ionenradius der paramagnetischen und teilweise lumineszenten Ionen der Seltenen Erden (Ln^{3+}) nimmt, beginnend beim La^{3+} , mit steigender Kernladungs-

zahl kontinuierlich ab. Dieser als Lanthanoidenkontraktion bezeichnete Effekt wurde erstmals 1925 von Goldschmidt beschrieben [168]. So verringert sich bspw. der effektive Ionenradius vom La^{3+} zum Lu^{3+} von 1,03 auf 0,86 Å für die Koordinationszahl 6 und von 1,16 auf 0,98 Å für die Koordinationszahl 8 [11]. Die durchschnittliche Koordinationszahl von an *EF-hand*-Motiven bindenden Ln^{3+} ist 7,2 und ähnelt damit der des Ca^{2+} [167].

Neben Ionenradius und Koordinationszahl besteht eine weitere wichtige Übereinstimmung der Bindungseigenschaften von Ca^{2+} und Ln^{3+} in der bevorzugten Ausbildung von Atombindungen mit geladenem und ungeladenem Sauerstoff vor der Bindung mit Stickstoff [169, 170].

Da in vielen Fällen die biologische Aktivität in Systemen, in denen Ca^{2+} durch Ln^{3+} ersetzt wurde erhalten blieb [171, 172, 173], eignen sich Ln^{3+} in besonderem Maße zur Charakterisierung der Bindungsstellen Ca^{2+} -bindender Proteine [174, 175].

2.3.1 Fluoreszenzeigenschaften von Tb^{3+}

Aufgrund von unvollständig gefüllten *4f*-Orbitalen besitzen zahlreiche Ln^{3+} spezifische Lumineszenzeigenschaften, wobei der Bereich der absorbierten elektromagnetische Strahlung zwischen 200-900 nm liegt [176].

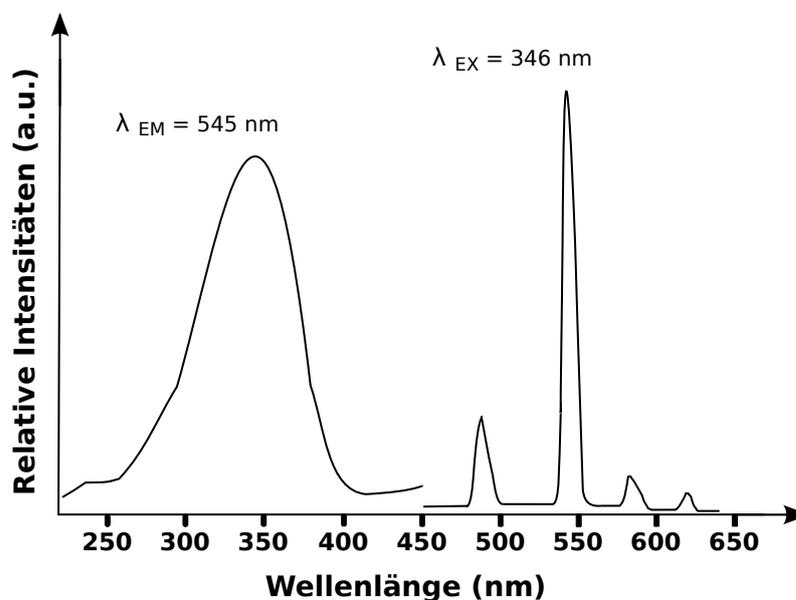


Abbildung 2.11: Anregungs- und Emissionsspektrum von Tb^{3+} . Während der Aufnahme der Spektren war Tb^{3+} innerhalb eines Polymers komplexiert. Verändert nach [177].

Die Emissionsspektren reichen hierbei vom UV- (Gd^{3+}) zum sichtbaren (z.B. Eu^{3+} und Tb^{3+}) bis zum nahen Infrarotbereich (z.B. Ho^{3+} und Er^{3+}) [178]. Allgemein kann diese Lumineszenz zur Untersuchung biologischer *in vitro*-Systeme [170] sowie speziell zur Strukturaufklärung von Proteinen genutzt werden [179, 180].

Aufgrund des relativ starken Emissionssignals und der Fähigkeit in wässriger Lösung zu lumineszieren finden hierbei Tb^{3+} und Eu^{3+} besondere Verwendung [179, 180].

Tb^{3+} -Ionen zeigen ein Absorptionsmaximum zwischen 250 und 400 nm (Abb. 2.11). Die prominenteste der für die Ln^{3+} typisch schmalen Emissionsbanden hat ihr Maximum bei 545 nm [181, 182, 177]. Die Intensität der Emission ist dabei stark vom umgebenden Lösungsmittel abhängig. In wässriger Umgebung lässt sich durch Entfernung der Tb^{3+} umgebenden Hydroxylgruppen, z.B. bei der Interaktion mit Metallbindestellen von Proteinen, die Emission stark erhöhen [12, 183, 184].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose	Eurogentec, Groningen, NL
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Amplex Red-Reagenz	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan (BisTris)	Applichem, Darmstadt
Calciumacetat-Hydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Applichem, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Applichem, Darmstadt
Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure, 96 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 96 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Applichem, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Serva, Heidelberg
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe

Mono Q TM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
2-(N-Morpholino)ethansäure (MES)	Applichem, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Applichem, Darmstadt
Piperazin-1,4bis(2-ethansulfonsäure) (Pipes)	Applichem, Darmstadt
<i>p</i> - Nitrophenol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resorcylsäure (2,6-Dihydroxybenzoesäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Source TM Q15S	GE Healthcare, Chalfont-St Giles, GB
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Applichem, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, USA

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysis*. Es wurde nur deionisiertes Wasser verwendet.

3.1.2 Lipide

PC aus Soja	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
PIP ₂ aus Rinderhirn	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
PpNP	in unserem Labor synthetisiert

3.1.3 Proteine

Alkalische Phosphatase (<i>Pandalus borealis</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA	Roth, Karlsruhe
Cholinoxidase (<i>Alcaligenes</i> sp.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Lysozym (Hühnerei)	Serva, Heidelberg
Peroxidase (Meerrettich)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Phospholipase D (<i>Streptomyces</i> sp.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Restriktionsendonuklease <i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsendonuklease <i>Eco</i> RI	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

3.1.4 Kits

Champion TM pET SUMO Expression System	Invitrogen, Karlsruhe
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
peqGOLD Kit	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

3.1.5 Plasmide

pRSET5a-pld2	Amp ^R , Dr. I. Schäffner [5]
pUBS520	Kan ^R , Dr. I. Schäffner [5]
pET-SUMO-PLD γ	Kan ^R , Ergebnis dieser Arbeit

3.1.6 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Merck, Darmstadt)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> SoluBL21 TM (Genlantis, San Diego, USA)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15</i> Tn10 (Tet ^r)]

3.1.7 Kulturmedien

LB - Agar	1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Agar
LB - Medium	1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt
M9 - Medium	0,1 % NH ₄ Cl, 0,3 % KH ₂ PO ₄ , 0,6 % Na ₂ HPO ₄ , 0,5 % NaCl, 0,4 % Glukose, 1mM MgSO ₄ , pH 7,4
SOC - Medium	0,05 % NaCl, 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 0,8 % Glukose

Alle Prozentangaben sind (falls nicht anders vermerkt) in (w/v). Nach Herstellung und anschließender Dampfdrucksterilisation von Medium bzw. Agar, wurden diese kurz vor ihrer Verwendung mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Endkonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml bzw. Kanamycin 50 µg/ml).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der ursprünglich aus Weißkohl (*B. oleracea* var. *capitata*) stammenden PLDγ-DNA (Genbank Bezeichnung: EU591736; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Olga Valentova, Institut für Chemische Technologie, Prag, Tschechien) erfolgte mittels PCR in einem TGradient Thermoblock (Biometra, Göttingen). Der 100 µl Reaktionsansatz enthielt Reaktionspuffer, 2 mM dNTP-Mix (Hybaid AGS,

Göttingen), parentale DNA, 1 U *Pfu*-DNA-Polymerase sowie 25 pmol der unten aufgeführten Oligonukleotide.

Gamma fw-Primer: 5'-GCG CAT CAT CCA ATT TAC AC-3'

Gamma rv-Primer: 5'-CTA TCA GAT GGT GAG GTT TTC TTG-3'

Die Amplifizierung erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt (1 min 95°C) in 30 Zyklen (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Thermozyklerprogramm der PCR.

Programmschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	1	95	1:00
2	30	95	0:30
		62	1:00
		72	4:00

3.2.2 Größe und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Molekulargewichtsmarker (*1 kb DNA Ladder*, Invitrogen, Karlsruhe) im Agarosegel (Abschnitt 3.2.3). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm ($A_{260}=1$ entspricht ca. $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ doppelsträngiger DNA) unter Verwendung eines Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco Inc., Easton, USA) bestimmt.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1 %igen (w/v) Agarosegelen bei 100 V in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) in einer horizontalen EASY-CASTTM-Gelelektrophoreseapparatur (OWL Separation Systems, Portsmouth, USA). Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in H₂O) inkubiert. Die gefärbten DNA-Banden ließen sich unter UV-Licht (302 nm) im Transilluminator identifizieren.

3.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen dienen zur Spaltung des pET-SUMO-Vektors (Invitrogen, Karlsruhe) und von PLD γ -DNA-Fragmenten. Der Verdau mit den Enzymen *Eco RI* und *Bam HI* erfolgte nach Angaben des Herstellers in den mitgelieferten Puffern. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch 5 min Inkubation bei 80°C.

3.2.5 Ligation des PLD γ -DNA-Fragments in den pET-SUMO-Vektor

Nach dem Verdau des pET-SUMO-Vektors mit den Restriktionsenzymen *Eco RI* und *Bam HI* wurde das 5'-Ende der Plasmid-DNA unter Verwendung von Alkalischer Phosphatase aus *Pandalus borealis* (1U) bei 37°C für 1 h dephosphoryliert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Ansatz anschließend für 3 min auf 60°C erhitzt. Vor der Ligation wurden sowohl der pET-SUMO-Vektor als auch PLD γ -DNA-Fragmente mit dem peqGOLD Kit (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte durch Inkubation beider DNA-Stücke für 1 h bei 25°C in Gegenwart von T4-DNA-Ligase (1U). Fragment und Plasmid wurden in einem Stoffmengenverhältnis von 4:1 eingesetzt. Anschließend wurden 5 μ l des Ligationsansatzes mittels Hitzeschock (Abschnitt 3.2.8) in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert.

3.2.6 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Einzelkolonien von transformierten *E. coli*-Zellen wurden in 5 ml LB-Medium über Nacht angezogen. Anschließend wurden 2 ml der Übernachtskultur sedimentiert. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers.

Zur Überprüfung des hergestellten Konstruktes wurden die Plasmide anschließend mit den folgenden Oligonukleotiden sequenziert (als Service: SeqLab GmbH, Göttingen):

Gamma intern-Primer:	5'-GGT TTA CCATCC GGT TAG-3'
SUMO intern-Primer:	5'-TGA AGA TTT GGA CAT GGA GG-3'
T7 Promotor-Primer:	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

T7 Terminator-Primer: 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor.

3.2.7 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

125 ml SOB-Medium wurden nach Zugabe von 1,25 ml sterilem MgCl₂ (1M) und 1,25 ml MgSO₄ (1M) mit einer Einzelkolonie einer LB-Platte inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Kultur für 20 min auf Eis inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C in der Zentrifuge. Die Kultur wurde in einer Hettich Zentrifuge Rotofix 32 (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen) zentrifugiert (1000 x g, 15 min). Danach wurden das Zellpellet in sterilem TFB-Puffer (10 mM PIPES pH 6,7, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 50 mM MnCl₂) resuspendiert (16 ml pro 50 ml Ausgangsmedium) und nach weiteren 10 min auf Eis erneut zentrifugiert (1000 x g, 10 min). Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt, wobei das Volumen auf 4 ml TFB-Puffer pro 50 ml Ausgangsmedium reduziert wurde. Zur resuspendierten Zelllösung wurden anschließend 0,3 ml DMSO gegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Aliquots a 100 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.8 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Ein Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 µl Plasmid-DNA (30 ng µl⁻¹) gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 45 s auf 42°C erhitzt und abermals für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend kam es zur Zugabe von 200 µl 37°C warmen SOC-Mediums. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C und 400 rpm erfolgte das Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Kan- oder LB-Amp-Agarplatten, um auf transformierte *E. coli*-Zellen zu selektieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Expression des PLD α -Gens und Reinigung löslicher PLD α

3.3.1.1 Expression

Die Herstellung löslicher PLD α orientierte sich an dem von Schöffner etablierten Protokoll [185]. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3), welcher die Plasmide pRSET5a-pld2 und pUBS520 enthielt.

Hierzu wurden 500 ml LB-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kan) mit Bakterienzellen einer Glycerinkultur angeimpft und bei 15°C mit 130 *rpm* für 3 Tage geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von ca. 8 erreicht wurde. Die durch Zentrifugation (6000 x g für 20 min in Avanti J-25, JA-10 Rotor, Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) geernteten Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.1.2 Zellaufschluss

Ein Zellpellet aus 500 ml Expressionsmedium wurde in 40 ml Aufschlusspuffer (30 mM Pipes, pH 6,2, 10 mM EDTA) resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym (1mg/g Zellen) für 30 min rührend auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch einen Hochdruck-Homogenisator (Gaulin Micron Lab40, APV, Lübeck) in 5 Passagen bei ca. 500 bar aufgeschlossen. Nach Entfernen der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (48000 x g für 30 min in Avanti J-25 Zentrifuge, JA-25.50 Rotor, Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) wurden die Überstände aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.1.3 Calcium-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie

Bei der Calcium-vermittelten hydrophoben Interaktionschromatographie bindet PLD α in Gegenwart von Ca²⁺ an Octyl-Sepharose. Das Entfernen der Ca²⁺-Ionen führt zur Elution des Enzyms [78].

Der Rohextrakt wurde mittels 1 M CaCl₂-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 50 mM CaCl₂ eingestellt und anschließend für 10 min bei 6000 x g zentrifugiert. Die Proteinlösung wurde mit einer ÄKTAprime-plus Anlage (General Electric, Fairfield, CT, USA) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine Octyl-Sepharose-Säule (20 ml Octyl-Sepharose Cl-4B, Säulendimension: 300 mm x 15 mm) aufgetragen. Die Säule

wurde zuvor mit 30 mM Pipes, pH 6,2, 50 mM CaCl₂ äquilibriert. Nach dem Waschen der Säule mit demselben Puffer wurde die PLD mit 5 mM Pipes, pH 6,2, 0,1 mM EDTA eluiert. Die Fraktionen wurden elektrophoretisch analysiert (Abschnitt 3.3.3) sowie auf hydrolytische PLD-Aktivität untersucht (Abschnitt 3.3.7.1). PLD-haltige Fraktionen wurden bei -20°C gelagert.

3.3.1.4 Anionenaustauschchromatographie

Nach Umpufferung in 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, wurde die Proteinlösung mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine Source 15Q-Säule (XK 16/20, Betthöhe 30 mm, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Hierzu wurde eine ÄKTA FPLC Anlage (General Electric, Fairfield, CT, USA) genutzt. Die Elution der PLD erfolgte durch einen steigenden NaCl-Gradienten (Laufmittel A: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; Laufmittel B: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 M NaCl). Die Fraktionen wurden wie in Abschnitt 3.3.1.3 beschrieben analysiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden zweimal gegen das hundertfache Volumen mit 10 mM Pipes, pH 7,0 dialysiert (Ausschlussgrenze: 20 kDA, Roth, Karlsruhe), zentrifugiert (30 min, 20000 x g) und anschließend bei -20°C gelagert.

3.3.2 Expression des PLD γ -Gens und Reinigung löslicher PLD γ

3.3.2.1 Expression

Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm SoluBL21. Als Kulturmedium wurde M9 Minimalmedium (50 μ g/ml Kan) verwendet. 500 ml Medium wurden mit 10 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C mit 130 rpm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Genexpression mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Expression erfolgte für 5 Stunden bei 26°C und 130 rpm. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 x g für 20 min in Avanti J-25, JA-10 Rotor, Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2.2 Zellaufschluss

Das Zellpellet aus 500 ml Kulturmedium wurde in 40 ml Aufschlusspuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym (1mg/g Zellen) für 30 min rührend auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellen wie in Abschnitt 3.3.1.2 beschrieben mittels Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen, zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2.3 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Der Rohextrakt wurde mit 1 ml/min auf eine äquilibrierte (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) Ni-NTA-Affinitätssäule (HisTrap HP 5 ml General Electric, Fairfield, CT, USA) aufgetragen. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0 bis 100 % Imidazol (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol) durchgeführt. Das eluierte Protein wurde elektrophoretisch analysiert (Abschnitt 3.3.3) sowie auf PLD γ -Hydrolyseaktivität untersucht (Abschnitt 3.3.7.2).

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde nach Laemmli [186] mittels 0,75 mm dicken, 10% SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Mighty-Small II Electrophoresis Unit (Hoefer, San Francisco, CA, USA) verwendet. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Silber- [187] oder Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Färbelösung: 0,5 g Coomassie-Brilliant-Blau G250, 42,5% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure; Entfärbelösung: 7% (v/v) Essigsäure, 20% Ethanol) detektiert.

3.3.4 Western-blot-Technik

N-terminal mit einem His₆-Tag fusionierte PLD γ wurde mittels *Western-blot*-Technik nachgewiesen. Nach erfolgter Gelelektrophorese (Abschnitt 3.3.3) wurden die Gele in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert und unter Verwendung einer TE 77 PWR Apparatur (General Electric, Fairfield, CT, USA) nach der *semi-dry*-Methode bei 1,2 mA cm² für 1 h auf HybondTM-ECLTM Nitrozellulosemembran (General Electric, Fairfield, CT, USA) transferiert. Die Detektion

der gebundenen Antikörper erfolgte über die gekoppelte Peroxidase unter Verwendung des ECL Plus Western Blotting Detection System (General Electric, Fairfield, CT, USA) nach Angaben des Herstellers (HyperFilm-ECL von General Electric, Fairfield, CT, USA).

3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.5.1 Bicininsäure-Assay (BCA-Assay)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Referenzprotein diente BSA in einem Konzentrationsbereich von 0 - 40 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.5.2 UV-Absorptionsmessung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer gereinigten PLD α -Proteinlösung wurde ein Spektrum von 240 bis 340 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) am Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco Inc., Easton, USA) aufgenommen und die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon=12680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (berechnet mit ProtParam ExPasy, <http://www.expasy.ch/tools/-protparam.html>) wurde mittels Lambert-Beerschem Gesetz die Proteinkonzentration ermittelt.

3.3.6 Synthese von Phosphatidyl-*p*-nitrophenol

Das für die Aktivitätsbestimmung verwendete artifiziellen Substrat Phosphatidyl-*p*-nitrophenol (PpNP), wurde nach dem Protokoll von D'Arrigo *et al.* [188] synthetisiert.

3.3.7 Bestimmung der PLD Aktivität

3.3.7.1 PpNP-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der PLD α -Aktivität wurde ein diskontinuierlicher Test nach D'Arrigo [188] durchgeführt. Hierzu wurden bei 30°C 130 μ l Reaktionspuffer in einer Mikrotiterplatte vorgelegt (100 mM Natriumacetat, pH 5,6, 100 mM CaCl₂) und 50 μ l Enzymlösung zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l Substratlösung (10 mM PpNP, 80 mM Triton X-100, 10 mM SDS) gestartet. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 60 μ l Stopplösung (1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA). Die Absorption wurde bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Synergy HT von Biotek Instruments Inc., Winooski, USA) gemessen. Die Menge an gebildetem *p*-Nitrophenol wurde mit Hilfe einer Kalibrierungskurve im Messbereich von 0 bis 500 μ M ermittelt. Der Messzeitraum befand sich im linearen Bereich der Aktivitätskurve.

Der PpNP-Aktivitätstest ist der in dieser Arbeit verwendete Standardaktivitätstest. Falls nicht anders vermerkt, wurde er für alle Aktivitätsbestimmungen verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels modifizierter Hill-Gleichung:

$$A = \frac{A_{max} \cdot L_0^n}{K_{0,5}^n + L_0^n} \quad (3.1)$$

in der A die Aktivität, A_{max} die maximale Aktivität, L_0 die Konzentration des Metallions und n der Hill-Koeffizient sind.

Die Abhängigkeit der PLD α -Aktivität von der eingesetzten Ln³⁺-Konzentration als anorganisches Komplement zeigte einen sigmoiden Charakter. Zur Auswertung der Daten wurde daher zusätzlich ein Modell verwendet, dass eine Aktivierung des Enzyms durch die Bindung von zwei Ln³⁺-Ionen zum Erreichen der enzymatischen Aktivität in vorgelagerten Gleichgewichten im Sinne einer positiven Kooperativität berücksichtigt. Grundlage des verwendeten mathematischen Modells bilden Studien zur Substrataktivierung von Pyruvatdecarboxylasen (PDCs) [189, 190, 191, 192].

$$K_a^1 = \frac{[E] \cdot [L_0]}{[E - L_0]} \quad K_a^2 = \frac{[E - L_0] \cdot [L_0]}{[E - L_0^2]}$$

$$[E_0] = [E] + [E - L_0] + [E - L_0^2]$$

$$[E_0] = \frac{K_a^1 \cdot [E - L_0]}{[L_0]} + \frac{K_a^2 \cdot [E - L_0^2]}{[L_0]} + [E - L_0^2]$$

$$[E] = \frac{K_a^1 \cdot K_a^2 \cdot [E - L_0^2]}{[L_0]^2}$$

(3.2)

$$[E_0] = \frac{K_a^1 \cdot K_a^2}{[L_0]^2} \cdot [E - L_0^2] + \frac{K_a^2}{[L_0]} \cdot [E - L_0^2] + [E - L_0^2]$$

$$[E_0] = [E - L_0^2] \cdot \left(\frac{K_a^1 \cdot K_a^2}{[L_0]^2} + \frac{K_a^2}{L_0} + 1 \right)$$

$$[E - L_0^2] = \frac{E_0}{\frac{K_a^1 \cdot K_a^2}{[L_0]^2} + \frac{K_a^2}{[L_0]} + 1}$$

$$v = k_{cat}^* \cdot [E - L_0^2] = \frac{k_{cat}^* \cdot [E_0]}{\frac{K_a^1 \cdot K_a^2}{[L_0]^2} + \frac{K_a^2}{[L_0]} + 1} = \frac{k_{cat}^* \cdot [E_0] \cdot [L_0]^2}{K_a^1 \cdot K_a^2 + K_a^2 \cdot [L_0] + [L_0]^2} \quad (3.3)$$

In Ableitung 3.2 und der daraus resultierenden Gleichung 3.3 sind K_a^1 und K_a^2 die Aktivierungskonstanten der Tb^{3+} -abhängigen Enzymaktivierung, E_0 die eingesetzte Enzymkonzentration, E Enzym ohne gebundenes Tb^{3+} , $E - L_0$ Enzym mit einem gebundenen Tb^{3+} , $E - L_0^2$ Enzym mit zwei gebundenen Tb^{3+} -Ionen, L_0 die Konzentration der Tb^{3+} -Ionen, v ist die Reaktionsgeschwindigkeit und k_{cat}^* die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wirksame Geschwindigkeitskonstante (da es sich um mizelläres Substrat handelte, konnte nicht unter Bedingungen der Substratsättigung gearbeitet werden).

3.3.7.2 Amplex-Red Aktivitätstest

Das während der Hydrolyse durch PLD freigesetzte Cholin wurde mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Nachweisverfahrens detektiert. Hierbei wird das freigesetzte Cholin durch Cholinoxidase zu Betain und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert. In Anwesenheit von Meerrettichperoxidase reagiert H_2O_2 mit Amplex-Red-Reagenz (10-Acetyl-3,7-dihydrophenoxazin), wobei das fluoreszierende Resorufin gebildet wird. Die Resorufinfluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Synergy HT von Biotek Instruments Inc., Winooski, USA) detektiert. Zur Aktivitätsbestimmung diente der lineare Bereich einer Eichreihe (Cholinkonzentration von 0 - 400 μM).

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 Herstellung von Phospholipidvesikeln

Aus einer in Chloroform gelösten 50 mM PC enthaltenen Stammlösung wurde entsprechende Mengen Lipid/Chloroformgemisch entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Der nach Trocknung an der Luft entstandene Lipidfilm wurde in 110 mM PIPES pH 7,0 aufgenommen. Anschließend wurde das Gemisch mit Ultraschallpulsen von 5 s Länge und 5 s Pause für 3 min behandelt, bis eine klare Lösung vorlag.

Sollten Phospholipidvesikeln hergestellt werden die eine Mischung aus PC und PIP_2 enthielten, wurde im ersten Schritt das in Chloroform gelöste PIP_2 aus einer 7,5 mM Stocklösung mit adäquaten Mengen PC/Chloroformlösung gemischt und anschließend an der Luft getrocknet. Die weiteren Abläufe erfolgten wie oben beschrieben.

3.4.2 Membranbindungs-Assay (FeRes-Assay)

Zur Quantifizierung der Interaktion von Kationen mit negativ geladenen PpNP und anderen Komponenten des mizellären PLD-Substrats (Abschnitt 3.3.7.1) wurde ein spektrophotometrischer Assay verwendet [15]. Hierzu wurden 40 μl Substrat (2,5 mM PpNP, 2,5 mM SDS, 20 mM Triton X-100) zusammen mit dem 40 μl Reaktionspuffer (200 mM MES, pH 5,6) in eine Mikrotiterplatte gegeben. Der Reaktionspuffer enthielt

das entsprechende Kation (0-30 mM LnCl_3 bzw. 0-300 mM CaCl_2 oder MgCl_2). Nach Zugabe von 100 μl Fe-Res-Lösung (1 mM FeCl_3 und 6 mM Natrium- γ -Resorzylat in 100 mM MES, pH 5,6) und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die Absorption bei 490 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Synergy HT von Biotek Instruments Inc., Winooski, USA) gemessen.

Die Auswertung der erhaltenen Messpunkte erfolgte mittels Hill-Gleichung.

3.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Alle Messungen wurden bei 30°C in einem FluoroMax4 (Horiba Jobin Yvon, München) unter Verwendung einer 10 x 4 mm Fluoreszenzküvette (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Folgende Parameter wurden bei den Untersuchungen berücksichtigt: Anregungs- und Emissionsspalt - 5 nm, Schrittweite - 1 nm, Integrationszeit - 1 s. Die Anregung erfolgte bei 373 nm. Die Emissionsspektren wurden im Wellenlängenbereich von 500 bis 600 nm aufgezeichnet.

Die Terbiumfluoreszenz wurde in Gegenwart von 2,3 μM PLD und TbCl_3 -Konzentrationen im Bereich von 0,008 bis 50 mM verfolgt. Als Puffer wurde 100 mM MES, pH 5,6 verwendet. Die Analyse erfolgte hinsichtlich der maximalen Emissionswellenlänge und der maximalen Fluoreszenzintensität.

Zur Auswertung der Fluoreszenzspektrum mussten die durch unspezifische Wechselwirkung hervorgerufenen Hintergrundsignale von den originalen Messpunkten abgezogen werden. Als Hintergrund wurde ein relativ schwacher Anstieg der Fluoreszenz bei geringen TbCl_3 -Konzentrationen identifiziert. Die Korrektur erfolgte durch Anwendung der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung:

$$F = \frac{F_0}{1 + m \cdot L_0} \quad (3.4)$$

wobei F die korrigierte relative Fluoreszenz, F_0 die gemessene relative Fluoreszenz, m der Anstieg des Hintergrundsignals und L_0 die eingesetzte TbCl_3 -Konzentration ist. Die korrigierten Fluoreszenzdaten wurden als Funktion der TbCl_3 -Konzentration dargestellt. Aus den so erhaltenen Bindungskurven konnten, in Anlehnung an die Publikation von Reich *et al.* [193], durch Anwendung von Gleichung 3.5 die Dissoziationskonstanten des Tb^{3+} - PLD α Komplexes ermittelt werden.

$$\Delta F_1 = \frac{(L_0 + E_0 + K_D) - \sqrt{(L_0 + E_0 + K_D)^2 - 4L_0 \cdot E_0}}{2} \quad (3.5)$$

ΔF_1 in Gleichung 3.5 ist die Änderung der korrigierten relativen Fluoreszenz, L_0 ist die eingesetzte TbCl_3 -Konzentration, E_0 ist die eingesetzte $\text{PLD}\alpha$ -Konzentration und K_D ist die Dissoziationskonstante des Tb^{3+} - $\text{PLD}\alpha$ -Komplexes.

Die Bindungsisotherme von Tb^{3+} und $\text{PLD}\alpha$ wurden zudem mit Formel 3.6 ausgewertet [194], da die Dissoziationskonstanten der Bindung der zwei Ln^{3+} -Ionen um Größenordnungen verschieden sind und in den Änderungen der Fluoreszenzintensitäten als separate Ereignisse erkennbar sind. Die so ermittelten Dissoziationskonstanten wurden anschließend mit den aus den partiellen *Fits* der Bindungsisothermen mit Gleichung 3.5 verglichen.

$$\Delta F_2 = 1 - \frac{m_1 \cdot L_0}{K_{D1} + L_0} + \frac{m_2 \cdot L_0}{K_{D2} + L_0} \quad (3.6)$$

ΔF_2 in Gleichung 3.6 ist die Änderung der korrigierten relativen Fluoreszenz, L_0 ist die eingesetzte TbCl_3 -Konzentration, m_1 ist die maximale Amplitude des ersten Übergangs, m_2 ist die maximale Amplitude des zweiten Übergangs, K_{D1} und K_{D2} sind die Dissoziationskonstanten des ersten und zweiten Bindungsereignisses.

Zur Anpassung des in Gleichung 3.6 dargestellten Rechenmodells war es notwendig, den in Abbildung 4.13 B abgebildeten Messbereich zwischen 5 und 45 mM TbCl_3 zunächst separat mit Gleichung 3.7 auszuwerten und die so erhaltene Bindungskonstante (K_{D2}) anschließend in Gleichung 3.6, zur Berechnung der Bindungskonstante K_{D1} , einzusetzen.

$$F = \frac{F_{max} \cdot L_0}{K_{D2} + L_0} \quad (3.7)$$

F in Gleichung 3.7 ist die Fluoreszenzintensität, F_{max} ist die maximale Fluoreszenzintensität, L_0 ist die eingesetzte TbCl_3 -Konzentration, K_{D2} ist die Dissoziationskonstante.

3.4.4 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) wird zur Größenbestimmung von kolloiden, sphärischen Partikeln genutzt. Das an der Probe gestreute Licht eines Lasers wird für die Zeit des Experiments in einem bestimmten Winkel gemessen. Aufgrund der BROWNSchen Molekularbewegung der Teilchen ändert sich im Laufe der Messzeit die Zahl der gestreuten Photonen. Aus der Fluktuation des Streulichtsignals wird die Korrelationsfunktion berechnet [195]. Der *Fit* dieser Funktion mit der Stokes-Einstein-Gleichung:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_h} \quad (3.8)$$

ermöglicht die Bestimmung des hydrodynamischen Radius der Partikel [16]. D ist der Diffusionskoeffizient, η die Viskosität, k_B die Boltzmann-Konstante und r_h der hydrodynamische Radius.

Die DLS-Experimente wurden in einem ALV-NIBS/-HPPS Spektrometer (ALV-Laser-Vertriebsgesellschaft m.b.H., Langen, Deutschland) durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte in verschleißbaren Quarzglas-Küvetten (HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland). Die Streuintensitäten wurden für jeweils 30 s akkumuliert. Jede Messung erfolgte dreifach; aus den erhaltenen Daten wurde die Standardabweichung ermittelt. Alle Versuche wurden bei 30°C durchgeführt. Die eingestrahlte Wellenlänge betrug 632,8 nm, der Streuwinkel 173°. Die gesammelten Daten wurden mit der ALV-Korrelator-Software ausgewertet.

3.4.5 Röntgenkleinwinkelstreuung

Zur Abschätzung von Form und Struktur des mizellären PLD-Substrates wurden Röntgenkleinwinkelstreuexperimente (SAXS) mit Synchrotronstrahlung durchgeführt. Die Messungen und anschließende Datenauswertung erfolgte freundlicherweise von PD Dr. Stephan König (MLU-Halle). Die Experimente wurden an der *beamline* P12 der Speicherring-Röntgenstrahlungsquelle PETRA III des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL- in der Außenstelle Hamburg) im HASYLAB am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) bei 10°C, einer Wellenlänge von 0,154 nm und einer Kameralänge von 2,7 m ausgeführt. Es wurde ein Pilatus 300K-W Detektor (DECTRIS

Ltd., Baden, Schweiz) mit einer Fläche von $254 \times 33.5 \text{ mm}^2$ verwendet. Mizellen unterschiedlicher PpNP-, Triton X-100- und SDS-Konzentrationen wurden in An- und Abwesenheit von 100 mM CaCl_2 bei pH 5,6 in 100 mM Na-Acetat untersucht. Die Messzeit jeder Probe betrug 1 s in 20 frames zu je 50 ms .

4 Ergebnisse

4.1 Gewinnung und Charakterisierung der verwendeten PLD α s

4.1.1 Herstellung löslicher PLD α

Expression und Reinigung löslicher PLD α aus Weißkohl (*B. oleracea* var. capitata) erfolgte wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Hierbei konnte auf Konstrukte zurückgegriffen werden, die das Ergebnis früherer Arbeiten unserer Gruppe waren [5]. Im ersten Reinigungsschritt erfolgt die Anreicherung der PLD α aus dem Rohextrakt mittels Ca²⁺-vermittelter HIC an Octylsepharose. Für die anschließende Anionenaustauschchromatographie wurde das Säulenmaterial SourceQTM 15S verwendet. Ein typisches Chromatogramm des zweiten Reinigungsschrittes ist in Abb. 4.1 A dargestellt. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.1 B).

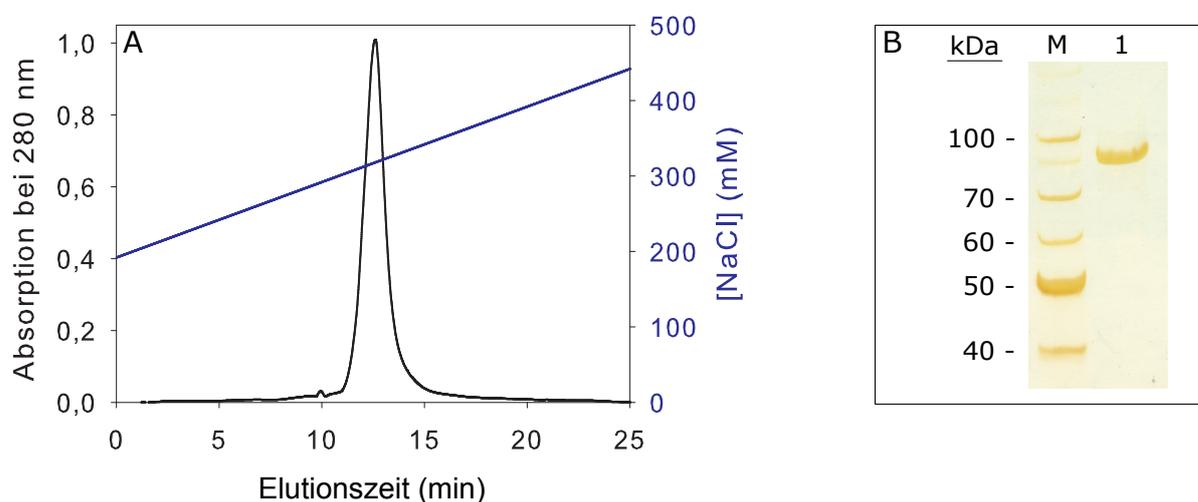


Abbildung 4.1: Reinigung der PLD α . **A:** Elutionsprofil der Reinigung von PLD α mittels Anionenaustauschchromatographie. **B:** Reinheitskontrolle mittels 10 % SDS-PAGE-Gel (Silberfärbung). M kennzeichnet die Markerbahn, 1 die Bahn mit PLD α .

4.1.2 Herstellung löslicher PLD γ

Die aus Weißkohl (*B. oleracea* var. capitata) stammende DNA der PLD γ wurde mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 3.2.1). Nach der Ligation des resultierenden PCR-Produktes mit dem pET-SUMO Expressionsvektor erfolgte die Transformation des Konstruktes in Zellen des *E. coli*-Stamms XL1-Blue (Abschnitte 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.8). Kanamycin-resistente Klone wurden mittels Kolonie-PCR und Plasmidverdau untersucht. Zur endgültigen Überprüfung der Aminosäuresequenz wurden Plasmide mit schneidbarem *insert* sequenziert (Abschnitt 3.2.6).

4.1.2.1 Expression des PLD γ -Gens

Zur Expression des N-terminal mit einem SUMO-His₆-tag versehenen PLD γ -Gens wurde das pET-SUMO-PLD γ Plasmid in den *E. coli*-Expressionsstamm SoluBL21TM transformiert. Die Transformation wurde wie unter Abschnitt 3.2.8 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der mittels IPTG induzierten Expression des ca. 110 kDa schweren Konstruktes (PLD γ 95,7 und SUMO-His₆-tag 13 kDa) erfolgte durch *Western blot* (Abschnitt 3.3.4). Mit gegen den His-tag gerichteten Antikörpern konnten in den löslichen Zellaufschlussfraktionen zwei unterschiedliche große Proteinbanden bei 45 und 100 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A und B).

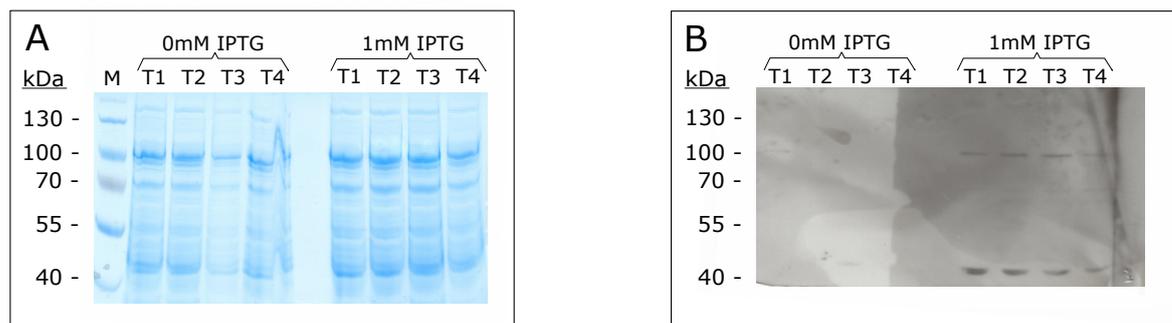


Abbildung 4.2: Induktion der Expression des PLD γ -Gens mittels IPTG. **A:** Lösliche Fraktionen von induzierten und nicht induzierten SoluBL21TM-Zellen im Coomassie gefärbten 10 % SDS-PAGE-Gel nach erfolgtem Zellaufschluss. **B:** *Western blot* der löslichen Fraktionen von induzierten und nicht induzierten SoluBL21TM-Zellen. M kennzeichnet die Markerbahn, die unterschiedlichen Zeitpunkte der Expressionsproben sind T1=1h, T2=2h, T3=3h und T4=6h.

4.1.2.2 Teilreinigung der PLD γ

Nach der erfolgreichen Expression der mit einem SUMO-His₆-tag verknüpften PLD γ wurde zur anschließenden Proteinreinigung eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Abschnitt 3.3.2.3) mit den löslichen Fraktionen des, wie im Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, erhaltenen Zelllysates durchgeführt. Trotz des relativ scharf verlaufenden Elutionsprofils (Abb. 4.3 A), zeigten sich beim Auftragen der zwischen 20 und 29 min gesammelten Elutionsfraktionen neben der zu erwartenden Bande bei 110 kDa noch starke Verunreinigungen im mit Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gel. (Abb. 4.3 B).

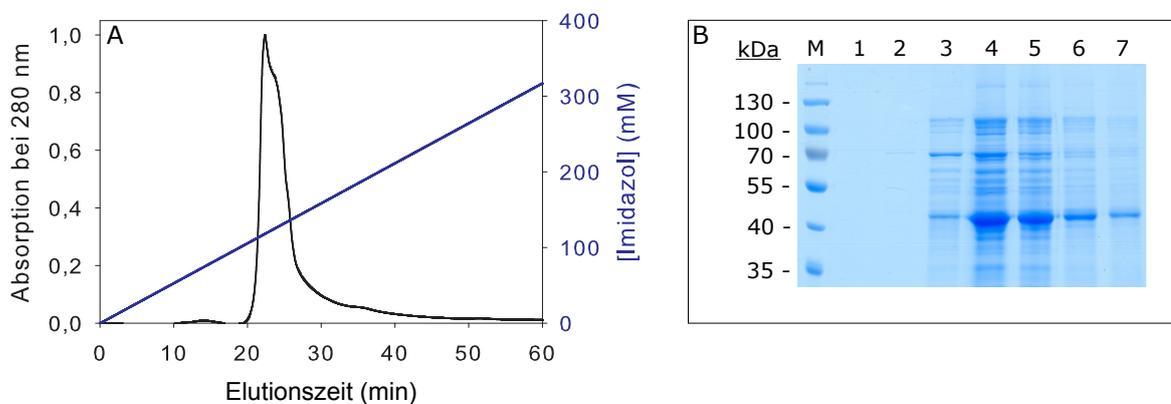


Abbildung 4.3: Reinigung der PLD γ mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. A: Elutionsprofil der Reinigung von PLD γ . **B:** Coomassie gefärbtes 10 % SDS-PAGE-Gel gesammelter Fraktionen der Elutionszeiten zwischen 20 und 29 min. Die Entnahme der einzelnen Fraktionen erfolgte in 1,5 min Schritten.

4.1.3 PLD aus *Streptomyces* sp.

Neben den zu charakterisierenden Enzymen PLD α und PLD γ sollten vergleichende Studien mit bakterieller PLD aus *Streptomyces* sp. (PLD $_{Str}$) durchgeführt werden. Diesem Enzym aus der PLD-Superfamilie fehlen regulatorische Untereinheiten, aber nicht die zur Phospholipidhydrolyse notwendigen hochkonservierten katalytischen Motive (Abschnitt 2.1.3). PLD $_{Str}$ besitzt ein Molekulargewicht von 53,6 kDa und wurde bereits gereinigt von Sigma-Aldrich bezogen (Abb. 4.4). Das Lyophilisat wurde in 10 mM Na-Pipes, pH 7,0 gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

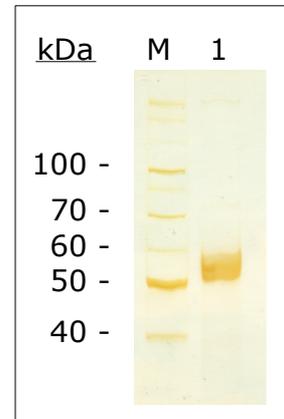


Abbildung 4.4: Reinheitskontrolle der PLD $_{Str}$. Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel. M kennzeichnet die Markerbahn, 1 die Bahn mit PLD $_{Str}$.

4.2 Studien zur Aktivierung verschiedener PLDs

4.2.1 Aktivierung von PLD α durch Seltene Erden im Vergleich mit Erdalkali- und Alkaliionen

Da durch zahlreiche Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, dass Metalle der Seltenen Erden in der Lage sind Ca $^{2+}$ zu ersetzen (Abschnitt 2.3), wurden Ce $^{3+}$, La $^{3+}$, Tb $^{3+}$ und Y $^{3+}$ (zusammengefasst als Ln $^{3+}$) auf ihre Fähigkeit untersucht PLD α zu aktivieren. Das Enzym erreichte die höchste Aktivität bei Ca $^{2+}$ -Konzentration oberhalb 90 mM. Die Zugabe von Mg $^{2+}$ führte zu keiner Aktivierung (Abb. 4.5). Bei der Verwendung von Sr $^{2+}$ und Ba $^{2+}$ konnte ebenfalls kein Substratumsatz nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

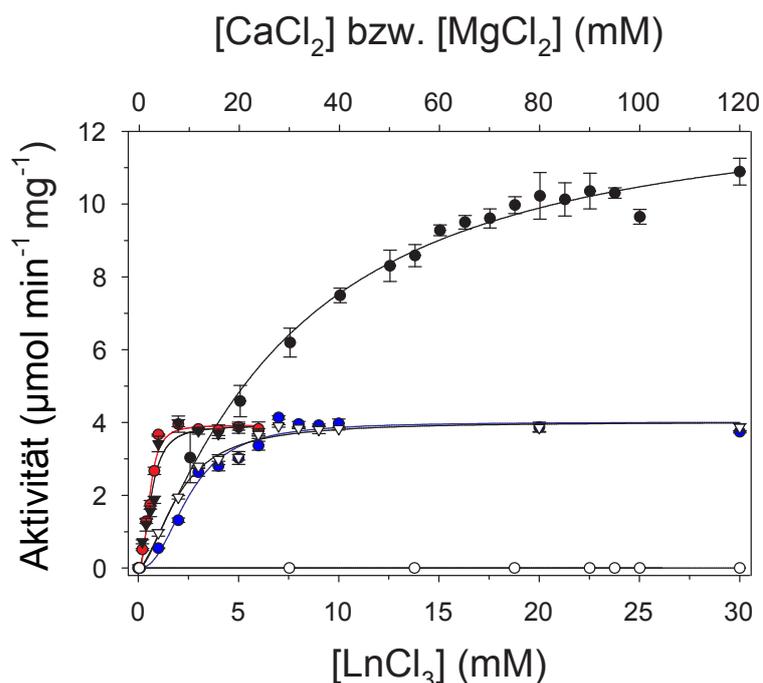


Abbildung 4.5: Aktivierung der PLD α durch Kationen. Aktivität der PLD α als Funktion der Kationenkonzentration. CaCl $_2$ (●), MgCl $_2$ (○), CeCl $_3$ (●), LaCl $_3$ (▼), TbCl $_3$ (●), YCl $_3$ (▽). Die Messansätze enthielten 1 mM PpNP, 1 mM SDS, 8 mM Triton X-100 in 100 mM Na-Acetat pH 5,6 bei 30°C. Die Auswertung der Datenpunkte erfolgte mittels modifizierter Hill-Gleichung (Gl. 3.1). Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Im Gegensatz dazu wurde bei den untersuchten Ln $^{3+}$ eine effektive Aktivierung der PLD α bei wesentlich geringeren Ionenkonzentrationen nachgewiesen. Unabhängig von der Durchführung des Experiments (Präinkubation des Enzyms bzw. Substrats mit Metallionen), erreichte die Aktivierung mit Ln $^{3+}$ nur eine Hydrolysegeschwindigkeit von ca. 30 % des unter Verwendung von Ca $^{2+}$ erreichten Wertes (Abb. 4.5 und Tab. 4.1). Aus den erhaltenen Messpunkten wurden mittels modifizierter Hill-Gleichung (Gl. 3.1) die $K_{0,5}$ -Werte ermittelt (Tab. 4.1). Diese lagen für die untersuchten Ln $^{3+}$ -Ionen um bis zum 54-fachen unter dem ermittelten $K_{0,5}$ für Ca $^{2+}$. Die Hill-Koeffizienten der Bindungen lagen für Ca $^{2+}$ bei 1,22 und für die Ln $^{3+}$ zwischen 1,80 und 2,64.

Tabelle 4.1: Die Analyse der Daten aus Abb. 4.5 erfolgte mittels modifizierter Hill-Gleichung (Gl. 3.1).

Kation	$K_{0,5}$ (mM)	A_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Hill-Koeffizient
Ca^{2+}	$30,0 \pm 3,77$	$12,9 \pm 0,84$	$1,22 \pm 0,14$
Tb^{3+}	$2,55 \pm 0,19$	$4,01 \pm 0,15$	$2,37 \pm 0,40$
Y^{3+}	$2,00 \pm 0,14$	$4,02 \pm 0,12$	$1,80 \pm 0,22$
La^{3+}	$0,64 \pm 0,08$	$3,92 \pm 0,22$	$2,15 \pm 0,60$
Ce^{3+}	$0,56 \pm 0,04$	$3,93 \pm 0,13$	$2,64 \pm 0,49$

Zur näheren Quantifizierung der Aktivierung von PLD α durch Ln $^{3+}$, wurden die in Abbildung 4.5 dargestellten Tb $^{3+}$ -Messpunkte zusätzlich mit Gleichung 3.3 ausgewertet, die die positive Kooperativität bei der Enzymaktivierung durch zwei Bindungsergebnisse von Tb $^{3+}$ berücksichtigt.

Für die Berechnung der Aktivierungskonstanten wurde für K_a^2 ein Wert von 0,03 mM TbCl $_3$ in Formel 3.3 eingesetzt. Der mit dieser Formel ermittelte Wert für K_a^1 beträgt 214 mM TbCl $_3$.

Um zu überprüfen, ob die im Vergleich zum Ca $^{2+}$ beobachtete schwächere Aktivierung der PLD α durch Ln $^{3+}$ vom Substrat abhängig ist, wurden anschließend Untersuchungen mit natürlich vorkommenden Phosphatidylcholin (PC) aus Soja (*Glycine max*) durchgeführt. Hierbei wurde bei Verwendung von CaCl $_2$ die maximale Aktivität der PLD α ebenfalls bei hohen mM-Konzentrationen gemessen (Abb. 4.6). Beim Einsatz von TbCl $_3$ reichte ca. 1/10 der Ionenkonzentration des CaCl $_2$ aus, um die maximale Hydrolysegeschwindigkeit des Enzyms zu erreichen. Dennoch betrug diese nur 54,7 % des unter Verwendung von CaCl $_2$ erreichten maximalen Wertes.

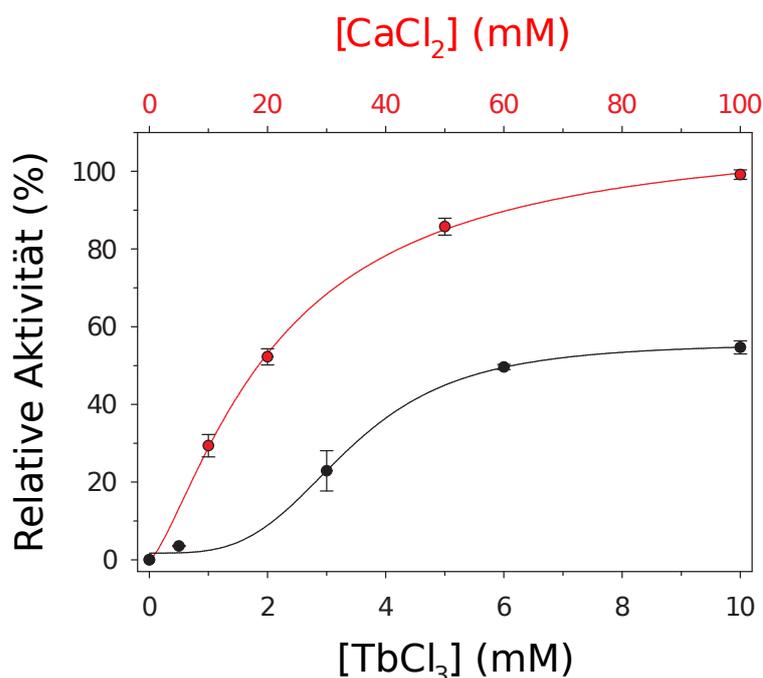


Abbildung 4.6: Hydrolyse von PC durch PLD α in Anwesenheit von CaCl₂ (●) bzw. TbCl₃ (●). Die Substratzellen bestanden aus 1 mM PC, 8 mM Triton und 1 mM SDS. Die Hydrolysereaktionen wurden in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 30°C durchgeführt. Der Cholin nachweis erfolgte mittels Amplex-Red Test (Abschnitt 3.3.7.2). Die Verbindung der Messpunkte erfolgte auf Basis der modifizierten Hill-Gleichung (Gl. 3.1).

4.2.2 Verdrängung von Ca²⁺ durch Tb³⁺ an PLD α

Der große Unterschied in der Bindungsstärke von Ca²⁺ und Tb³⁺ an PLD α wird ebenfalls in Verdrängungsexperimenten deutlich. Wurde PLD α für 2 min mit 6 mM TbCl₃ und anschließend mit 100 mM CaCl₂ versetzt, zeigte dies keinen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit. Die Aktivität blieb auf dem Niveau, das ohne Zugabe von CaCl₂ herrschte (Abb. 4.7). Wird das Enzym jedoch zuerst mit 100 mM CaCl₂ inkubiert und anschließend 6 mM TbCl₃ zugegeben, sinkt die Aktivität auf das Niveau, welches bei alleiniger Anwesenheit von 6 mM Tb³⁺ gemessen wurde.

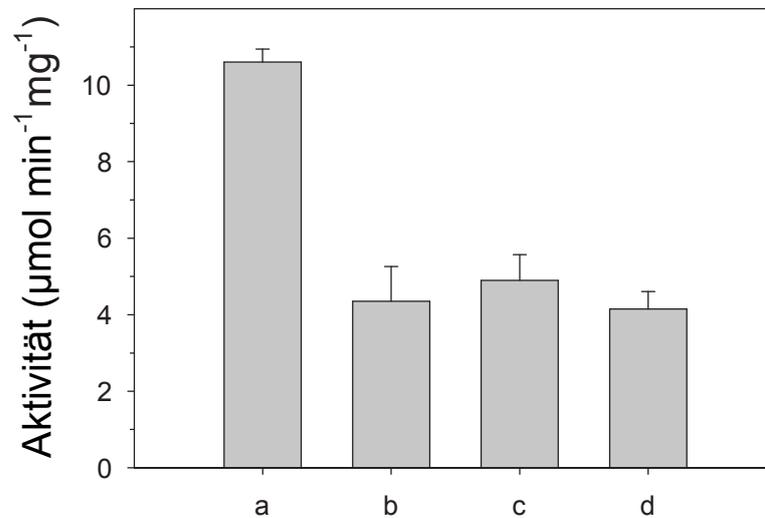


Abbildung 4.7: Verdrängung von Ca^{2+} durch Tb^{3+} an $\text{PLD}\alpha$. Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ in Abhängigkeit von der 2 min Präinkubation mit CaCl_2 bzw. TbCl_3 . **a:** 100 mM CaCl_2 , **b:** 6 mM TbCl_3 , **c:** 100 mM CaCl_2 danach Zugabe von 6 mM TbCl_3 , **d:** 6 mM TbCl_3 danach Zugabe von 100 mM CaCl_2 . Die Messansätze enthielten 1 mM PpNP , 1 mM SDS , 8 mM Triton X-100 in 100 mM Na-Acetat pH 5,6 bei 30°C.

4.2.3 Verdrängung von Ca^{2+} durch Mg^{2+} an $\text{PLD}\alpha$

Die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ ließ sich ebenfalls, unabhängig von der Ionenstärke, durch Zugabe von MgCl_2 senken (Abb. 4.8 A). Hierzu wurde das Enzym für 1 min mit 20 mM CaCl_2 inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe steigender Mengen MgCl_2 . Bei Anwesenheit von 100 mM MgCl_2 hatte sich die Aktivität um 64 % verringert (Abb. 4.8 A). Steigende Mengen NaCl zeigten keinen Effekt auf die Enzymaktivität (Abb. 4.8 A). Wurde bei Durchführung des Experiments BaCl_2 bzw. SrCl_2 anstelle von MgCl_2 verwendet, kam es zu keiner Verringerung der Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die Präinkubation des Enzyms mit CaCl_2 -Konzentrationen im μM -Bereich und die daran anschließende Zugabe mM-Konzentrationen MgCl_2 , BaCl_2 bzw. SrCl_2 hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise führten steigende Konzentrationen MgCl_2 zu keiner Verringerung der Enzymaktivität, wenn das Substrat mit 0,02 mM PIP_2 versetzt war (Abb. 4.8 B).

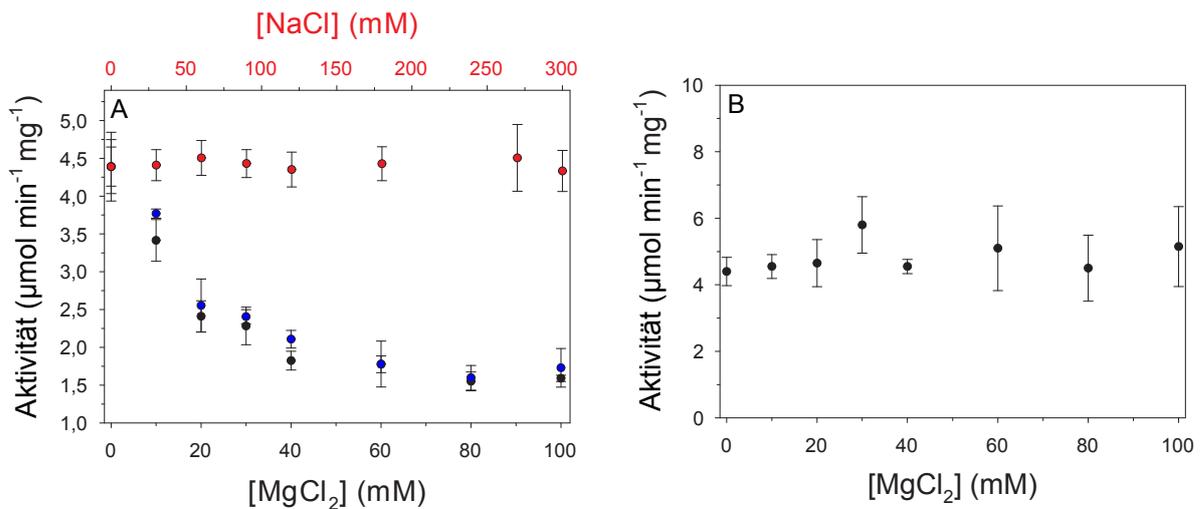


Abbildung 4.8: Einfluss von MgCl_2 auf die Aktivität der PLD α in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von PIP_2 . PLD α wurde für 1 min mit 20 mM CaCl_2 inkubiert. Nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen MgCl_2 wurde die Aktivität bestimmt. In A wurde der Einfluss von NaCl (●) und MgCl_2 (●) bzw. MgCl_2 (●) mit Ionenstärkeausgleich (mit NaCl) auf $I=360 \text{ mM}$ auf die Enzymaktivität miteinander verglichen. B: Einfluss von MgCl_2 auf die Enzymaktivität in Anwesenheit von $0,02 \text{ mM PIP}_2$. Die Messansätze enthielten 1 mM PpNP , 1 mM SDS , $8 \text{ mM Triton X-100}$ in 100 mM Na-Acetat , $\text{pH } 5,6$ bei 30°C .

4.2.4 Einfluss von PIP_2 auf die Aktivität der PLD α

Obwohl PIP_2 zur Aktivierung nicht notwendig ist, gelten diese Moleküle bedingt durch die in der C2-Domäne vorhandene PIP_2 -Bindestelle (Abb. A.2 im Anhang), als effektive Aktivatoren pflanzlicher PLD α [26]. In Gegenwart von 20 mM CaCl_2 führten steigende Mengen PIP_2 bis zu einer Konzentration von $0,002 \mu\text{M}$ zu einer Aktivitätssteigerung von $26,6 \%$ (Abb. 4.9 A). Weiter steigende Konzentrationen PIP_2 zeigten keinen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit.

Ein zusätzlicher Effekt von PIP_2 auf die PLD α -Aktivität zeigte sich beim pH-Optimum der Hydrolysereaktion, welche bei Verwendung der Standardsubstratzusammensetzung (Abschnitt 3.3.7.1) in Abwesenheit von PIP_2 bei $\text{pH } 5,6$ liegt. So führte die Anwesenheit von $0,02 \mu\text{M PIP}_2$ im Substrat zu einer Verschiebung des Aktivitätsmaximum hin zu $\text{pH } 5,0$ (Abb. 4.9 B). In Abb. 4.9 C sind zusammenfassend die Aktivierungskurven der PLD α bei verschiedenen pH-Werten, in An- bzw. Abwesenheit von PIP_2 sowie bei unterschiedlichen CaCl_2 -Konzentrationen dargestellt. Die Auswertung der Messpunkte erfolgte mittels modifizierter Hill-Gleichung (Gl. 3.1).

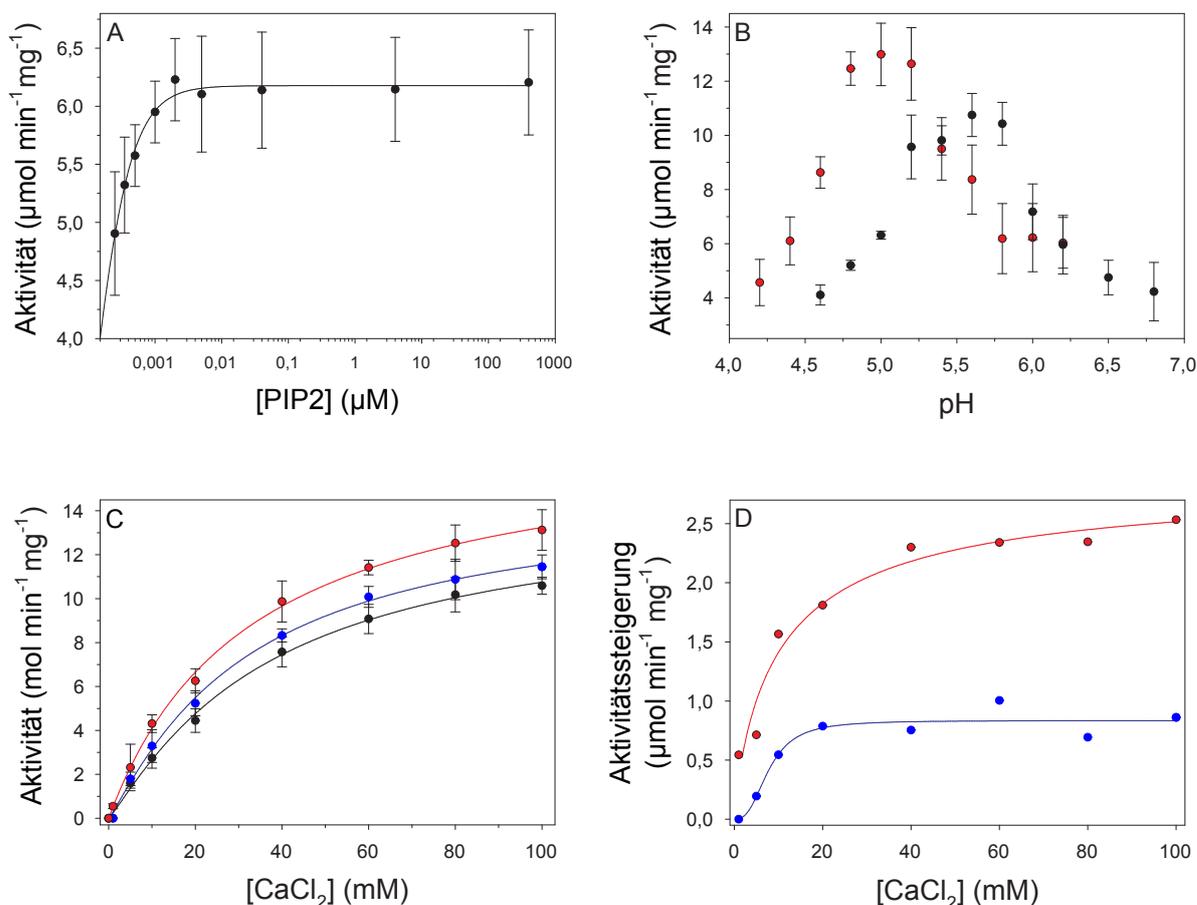


Abbildung 4.9: Einfluss von PIP $_2$ auf die Aktivität der PLD α . **A:** PLD α -Aktivität in Abhängigkeit von der PIP $_2$ -Konzentrationen in Gegenwart von 20 mM CaCl $_2$. **B:** PLD α -Aktivität als Funktion des pH-Wertes bei Ab- (●) und Anwesenheit (●) von 0,02 μM PIP $_2$ in Gegenwart von 100 mM CaCl $_2$ in 100 mM Na-Acetat (pH 4,2-5,0), 100 mM MES (pH 5,2-6,2) bzw. 100 mM PIPES (pH 6,2-6,8). **C:** Aktivität der PLD α als Funktion der CaCl $_2$ -Konzentration: ohne Zugabe von PIP $_2$ bei pH 5,6 (●), in Anwesenheit von 0,02 μM PIP $_2$ bei pH 5,6 (●), in Anwesenheit von 0,02 μM PIP $_2$ bei pH 5,0 (●). **D:** Beruhend auf den Daten aus 4.9 C: Aktivitätssteigerung der PLD α in Gegenwart von 0,02 μM PIP $_2$ bei pH 5,6 (●) und 5,0 (●) im Vergleich zur Standardsubstratzusammensetzung bei pH 5,6. Die Auswertung der Datenpunkte erfolgte mittels modifizierter Hill-Gleichung (Gl. 3.1). Die Messansätze enthielten 1 mM PpNP, 1 mM SDS, 8 mM Triton X-100 und wurden, wenn nicht anders beschrieben, in 100 mM Na-Acetat, pH=5,6 bei 30°C durchgeführt.

Im Vergleich zur Standardsubstratzusammensetzung (Abschnitt 3.3.7.1) stieg bei Zugabe von 0,02 μM PIP $_2$ zum Substrat bei einem pH-Wert von 5,6 die berechnete maximale Hydrolysegeschwindigkeit um 0,50 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ auf 14,74 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \pm 0,89$. Wurde, ebenfalls in Anwesenheit von 0,02 μM PIP $_2$, die Aktivität in Abhängigkeit von der CaCl $_2$ -Konzentration bei pH 5,0 bestimmt, ergab dies eine Steigerung der

maximalen Hydrolyse um $3,16 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ auf $17,58 \pm 1,13 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Beruhend auf den Daten aus 4.9 C sind in Abb. 4.9 D die Aktivitätssteigerungen im Vergleich zur Standardsubstratzusammensetzung (Abschnitt 3.3.7.1) in Anwesenheit von PIP_2 bei pH 5,0 und 5,6 dargestellt. Bei pH 5,6 und in Anwesenheit von $0,02 \mu\text{M PIP}_2$ lag, im Vergleich zur Standardsubstratzusammensetzung (Abschnitt 3.3.7.1), nach einem stetigen Anstieg die Aktivitätssteigerung konstant bei ca. $0,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Abb. 4.9 D).

Eine deutlichere Aktivitätssteigerung durch $0,02 \mu\text{M PIP}_2$ wurde bei einem pH-Wert von 5,0 gemessen. So war bereits bei Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 eine messbare Aktivität von $0,54 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ vorhanden, obwohl im Vergleich dazu $\text{PLD}\alpha$ bei pH 5,6 keine Aktivität zeigte (Abb. 4.9 C und D). Weiter steigende CaCl_2 -Konzentrationen führten im Vergleich zur Standardsubstratzusammensetzung ebenfalls zu einer stetigen Zunahme der Aktivitätssteigerung.

4.2.5 Charakterisierung der teilgereinigten $\text{PLD}\gamma$ mittels Aktivitätstests

Im Gegensatz zu $\text{PLD}\alpha$ benötigen Phospholipasen des γ -Typs zum Erreichen ihrer maximalen Aktivität mikromolare Konzentrationen an Ca^{2+} und sind zusätzlich auf die Gegenwart von PIP_2 angewiesen.

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden mit der wie unter Abschnitt 4.1.2.2 beschrieben erhaltenen, teilgereinigten $\text{PLD}\gamma$ mit PC als Substrat (Abschnitt 3.4.1) durchgeführt. Die Aktivität wurde mittels Amplex-Red Test bestimmt (Abschnitt 3.3.7.2).

Erste Hinweise auf die Aktivierung der $\text{PLD}\gamma$ liefern die in Abbildung 4.10 zusammengestellten Ergebnisse. Es wird deutlich, dass ohne die Gegenwart von PIP_2 und CaCl_2 keine PLD -Aktivität in der teilgereinigten Proteinlösung detektierbar war. Die höchste Enzymaktivität wurde in Anwesenheit von $0,02 \text{ mM PIP}_2$ sowie $20 \mu\text{M CaCl}_2$ gemessen. Eine Steigerung der PIP_2 - bzw. der CaCl_2 -Konzentration führte zu einer verminderten Hydrolysegeschwindigkeit (Abb. 4.10).

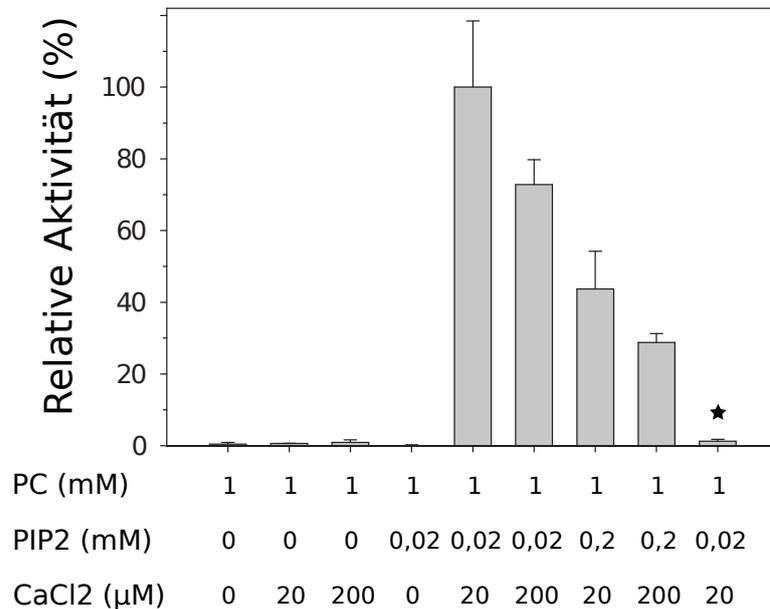


Abbildung 4.10: Aktivität der teilgereinigten PLD γ bei unterschiedlichen Substratzusammensetzungen und CaCl $_2$ -Konzentrationen. Die Inkubation der teilgereinigten PLD γ -Proteinlösung mit den jeweiligen Substratkomponenten erfolgte für 6 h in 100 mM PIPES pH 7,0 bei 30°C. Der mit ★ gekennzeichnete Aktivitätstest wurde mit Zellextrakt aus nicht induzierten *E. coli*-Zellen durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde mit dem Amplex-Red Test bestimmt (Abschnitt 3.3.7.2).

4.2.6 Charakterisierung der PLD $_{Str}$ mittels Aktivitätstests

Die folgenden Experimente wurden mit bakterieller PLD aus *Streptomyces* sp. durchgeführt. Im Gegensatz zu PLD α und PLD γ fehlen der extrazellulären PLD $_{Str}$ regulatorische Untereinheiten, aber nicht die zur Katalyse notwendigen und allen bei Mitgliedern der PLD-Superfamilie vorhandenen HKD-Motive (Abschnitt 2.1.3).

4.2.6.1 Einfluss von CaCl $_2$ und NaCl auf die Aktivität der PLD $_{Str}$

Sowohl steigende Konzentration CaCl $_2$ als auch NaCl führten im Standardaktivitätstest (Abschnitt 3.3.7.1) zu einer schrittweisen Verringerung der PLD $_{Str}$ -Aktivität. Aus Abb. 4.11 A wird deutlich, dass die Anwesenheit von CaCl $_2$ hierbei einen stärker negativen Effekt hatte. So liegt trotz gleicher Ionenstärke bei 300 mM NaCl noch eine Enzymaktivität von 50 % des Ausgangswertes vor, bei 100 mM CaCl $_2$ jedoch nur 25 % (Abb. 4.11 A).

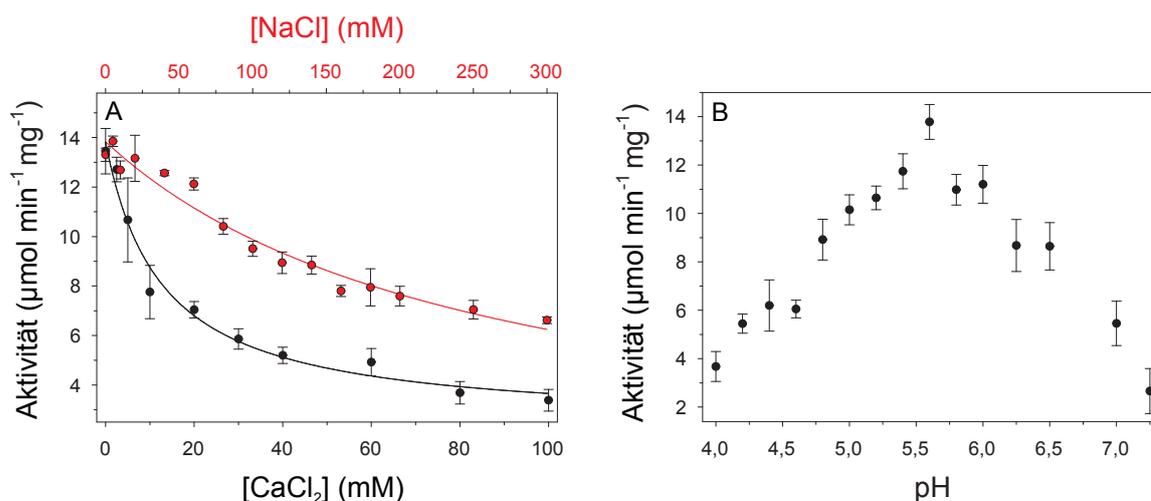


Abbildung 4.11: Charakterisierung der PLD_{Str} mittels Aktivitätstests. **A:** Einfluss von CaCl_2 (•) und NaCl (•) auf die Aktivität der PLD_{Str} . **B:** Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der PLD_{Str} in 100 mM Na-Acetat (pH 4,0- 5,0), 100 mM MES (pH 5,2-6,5) und 100 mM PIPES (pH 7-7,25). Die Messansätze enthielten 1 mM PpNP, 1 mM SDS, 8 mM Triton X-100 und wurden, wenn nicht anders beschrieben, in 100 mM Na-Acetat pH 5,6 bei 30°C durchgeführt.

4.2.6.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der PLD_{Str}

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der PLD_{Str} wurde im Bereich zwischen pH 4,0 und 7,25 mittels Standardaktivitätstest (Abschnitt 3.3.7.1), jedoch ohne Zugabe von Metallionen, untersucht. Wie in Abb. 4.11 B dargestellt, führten steigende pH-Werte bis zu einem Wert von pH 5,6 zu einer Steigerung der Enzymaktivität, die hier ihr Maximum mit $13,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ erreichte. Die weitere Erhöhung des pH-Wertes führte zur schrittweisen Reduzierung der Hydrolysegeschwindigkeit, welche bei pH 7,25 nur noch 19,8 % des Maximalwertes hatte.

4.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Bedingt durch einen ähnlichen Ionenradius und ähnliche Koordinationszahlen werden die dreiwertigen Ionen der Seltenen Erden seit Langem zur Charakterisierung Ca^{2+} - und Mg^{2+} - bindender Proteine genutzt. Die lumineszenten Eigenschaften von Tb^{3+} und Eu^{3+} bieten hierbei zusätzlich die Möglichkeit fluoreszenzspektrometrische Bindungsstudien in wässriger Lösung durchzuführen [174].

4.3.1 Nachweis der Bindung von Tb^{3+} -Ionen an $PLD\alpha$

Im Gegensatz zum nicht fluoreszenten Ca^{2+} konnten Tb^{3+} -Ionen zum Nachweis einer Bindung an $PLD\alpha$ genutzt werden. So zeigte Tb^{3+} in Abwesenheit von $PLD\alpha$ bei einer Anregungswellenlänge von 373 nm kein Fluoreszenzsignal. War jedoch $PLD\alpha$ vorhanden, zeigte sich ein Emissionsmaximum bei 544 nm, dass mit steigender Tb^{3+} -Konzentration anstieg (Abb. 4.12).

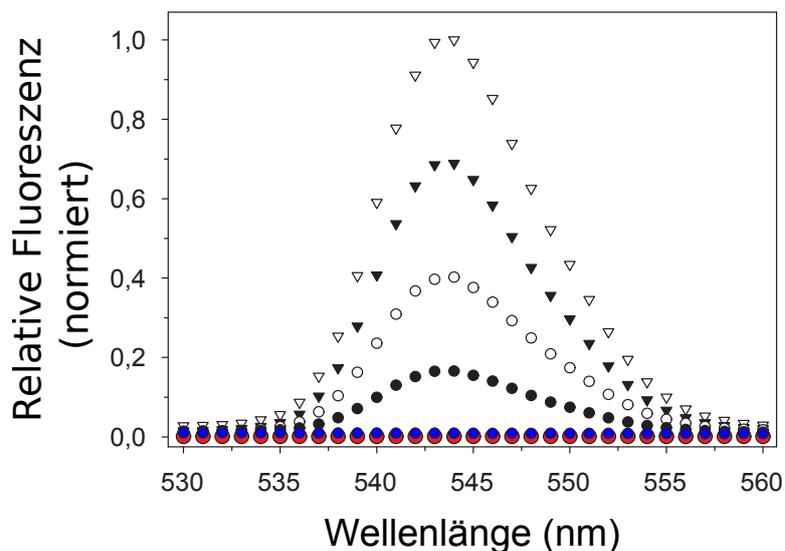


Abbildung 4.12: Fluoreszenzspektren von Tb^{3+} in Gegenwart von $PLD\alpha$. 100 mM $TbCl_3$ (●), $PLD\alpha$ (●), $PLD\alpha$ und 4 mM $TbCl_3$ (●), $PLD\alpha$ und 6 mM $TbCl_3$ (○), $PLD\alpha$ und 8 mM $TbCl_3$ (▼), $PLD\alpha$ und 10 mM $TbCl_3$ (▽). Die Proteinkonzentration betrug $2,3 \mu M$. Mit einer Anregungswellenlänge von 373 nm wurden alle Messungen in 100 mM MES pH 5,6 und $30^\circ C$ durchgeführt.

Das Emissionsmaximum bei 544 nm wurde genutzt, um die Bindung von $PLD\alpha$ und Tb^{3+} zu analysieren. Hierzu wurden die originalen Messdaten (Abb. 4.13 A) mit Hilfe der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 3.4) vom Hintergrundsignal befreit (Abb. 4.13 B). Die sich im Anhang befindende Abbildung A.1 vergrößert den als Hintergrundsignal identifizierten Bereich der Fluoreszenzspektren zwischen 1,5 und 4,5 mM $TbCl_3$.

Die Auswertung der Daten ergab zwei Dissoziationskonstanten mit $K_{D1}=0,0065$ mM und $K_{D2}=6,46$ mM (Abb. 4.13 C und D).

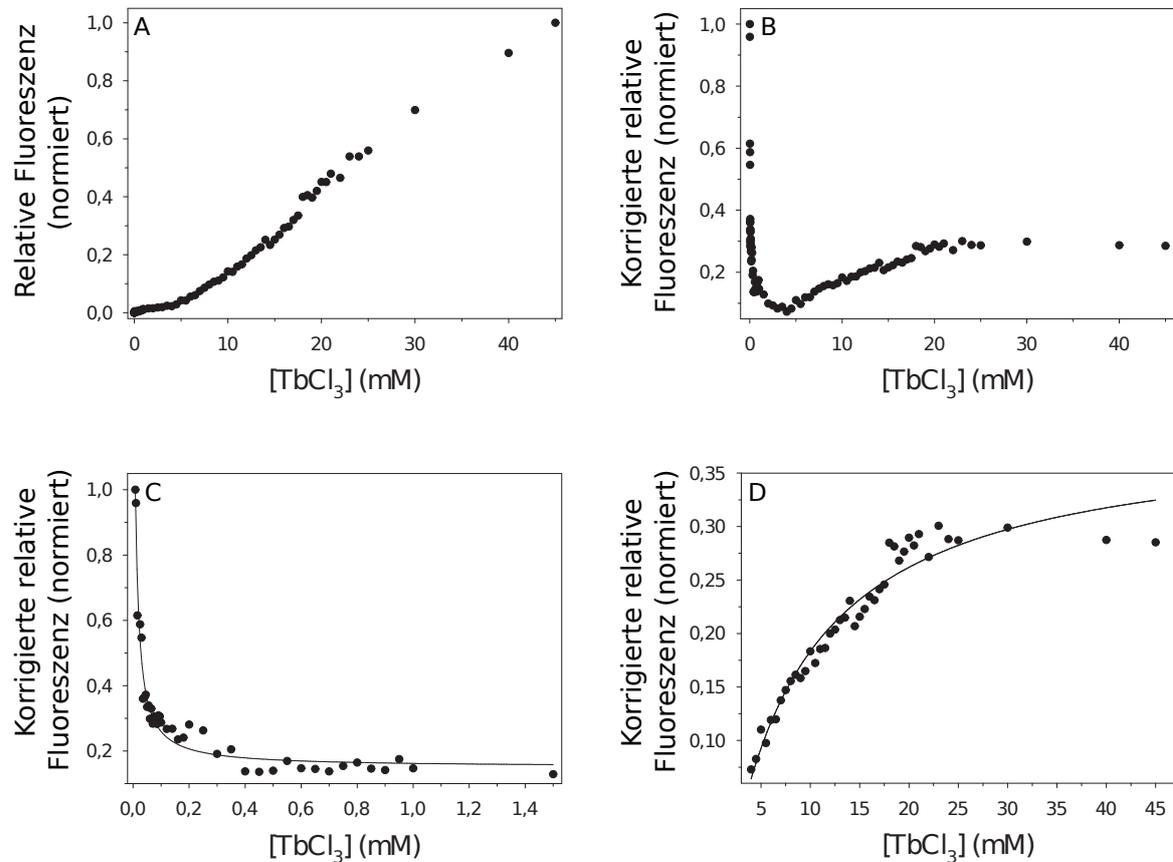


Abbildung 4.13: Fluoreszenz von Tb^{3+} in Gegenwart von $PLD\alpha$ als Funktion der Tb^{3+} -Konzentration. **A:** Fluoreszenzsignal der Bindung von $PLD\alpha$ in Abhängigkeit der $TbCl_3$ -Konzentration. Abbildung A.1 im Anhang stellt eine Vergrößerung des Messbereiches zwischen 0-5 mM $TbCl_3$ dar. **B:** Korrigiertes Fluoreszenzsignal. Aus den Daten aus Abb. 4.13 A wurden durch Anwendung der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung unspezifische Bindungssignale eliminiert. **C:** Vergrößerung des aus Abb. 4.13 B erhaltenen Bereiches des Fluoreszenzsignals, der zur Bestimmung der ersten Dissoziationskonstante (K_{D1}) genutzt wurde. **D:** Vergrößerung des aus Abb. 4.13 B erhaltenen Bereiches des Fluoreszenzsignals der zur Bestimmung der zweiten Dissoziationskonstante (K_{D2}) genutzt wurde. Die Proteinkonzentration betrug $2,3 \mu M$. Die Messung wurde bei einer Anregungswellenlänge von 373 nm und einer Emissionswellenlänge von 544 nm in 100 mM MES pH 5,6 und $30^\circ C$ durchgeführt.

Das in Abbildung 4.13 B dargestellte korrigierte relative Fluoreszenzspektrum wurde zusätzlich mit Gleichung 3.6 analysiert. Zur Untersuchung des zweiten Bindungsereignisses wurden die Kurve zwischen 5 und 45 mM $TbCl_3$ (Abb. 4.13 B bzw. D) zunächst separat mit Gleichung 3.7 ausgewertet. Der hierbei erhaltene K_{D2} von 13 mM wurde anschließend in Gleichung 3.6 eingesetzt. Die im Anschluss durchgeführte Berechnung ergab für das erste Bindungsereignis ein K_{D1} von $0,034 \pm 0,002$ mM.

4.3.2 Verdrängung von Ca^{2+} durch Tb^{3+} an $\text{PLD}\alpha$

Die in den Aktivitätsstudien deutlich gewordenen unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von Ca^{2+} und Tb^{3+} an $\text{PLD}\alpha$ (Abschnitt 4.2.2) ließen sich auch durch Fluoreszenzmessungen nachweisen. So ließ sich das durch Bindung von 6 mM Tb^{3+} an $\text{PLD}\alpha$ verursachte Emissionssignal bei 544 nm durch steigende CaCl_2 -Konzentration nicht in seiner Intensität schwächen (Abb. 4.14 A). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe steigender Mengen TbCl_3 zu mit 100 mM CaCl_2 präinkubierter $\text{PLD}\alpha$ zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals bei 544 nm (Abb. 4.14 B).

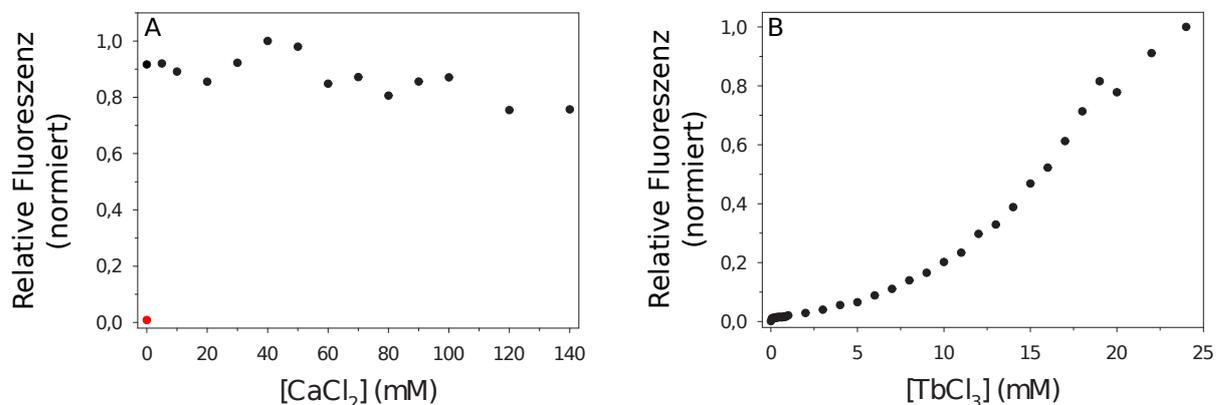


Abbildung 4.14: Fluoreszenzsignal von Tb^{3+} nach Präinkubation von $\text{PLD}\alpha$ mit TbCl_3 (A) bzw. CaCl_2 (B). A: $\text{PLD}\alpha$ (in Abwesenheit von TbCl_3 (•)) wurde mit 6 mM TbCl_3 inkubiert und anschließend mit CaCl_2 versetzt. B: $\text{PLD}\alpha$ wurde mit 100 mM CaCl_2 und anschließend mit steigenden Mengen TbCl_3 versetzt. Die Proteinkonzentration betrug $2,3 \mu\text{M}$. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 373 nm und einer Emissionswellenlänge von 544 nm in 100 mM MES, pH 5,6 und 30°C durchgeführt.

Die Auswertung der in Abbildung 4.14 B dargestellten Fluoreszenzdaten des Verdrängungsexperiments erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.3 beschrieben mit der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 3.4) und führte zu dem in Abbildung 4.15 dargestellten korrigiertem Fluoreszenzspektrum. Die vom Hintergrundsignal befreiten Fluoreszenzdaten ließen zwei Bindungsereignisse erkennen. Die im Anschluss mit Gleichung 3.5 durchgeführte Auswertung ergab zwei Dissoziationskonstanten mit $K_{D1}=0,11 \pm 0,01 \text{ mM}$ und $K_{D2}=32,1 \pm 0,93 \text{ mM}$ TbCl_3 , des mit 100 mM CaCl_2 präinkubierten Tb^{3+} - $\text{PLD}\alpha$ Komplexes erkennen.

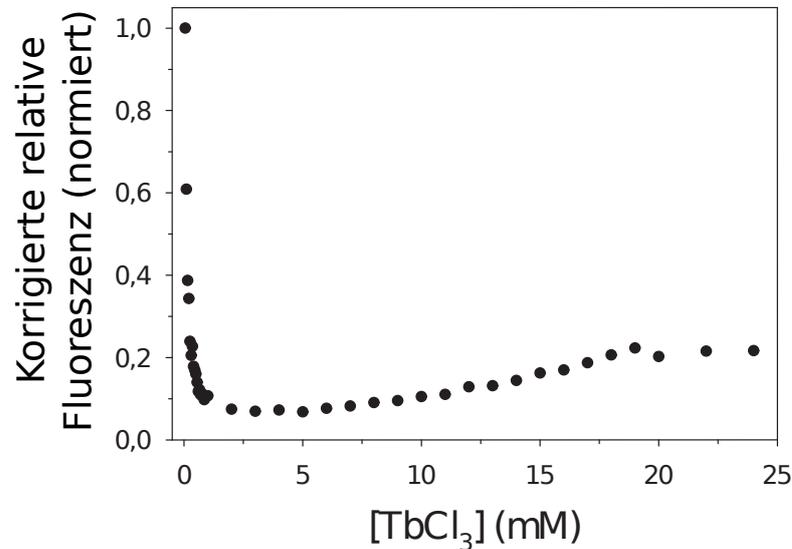


Abbildung 4.15: Korrigiertes relatives Fluoreszenzsignal der mit 100 mM CaCl₂ präinkubierten PLD α . Aus den Daten aus Abb. 4.14 B wurde mit Hilfe der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 3.4) unspezifische Bindungssignale eliminiert und anschließend die Dissoziationskonstanten berechnet.

Die Analyse des in Abb. 4.15 dargestellten korrigierten Fluoreszenzspektrums erfolgte zusätzlich mit Gleichung 3.6. Die so berechneten Dissoziationskonstanten betragen für $K_{D1}=0,11 \pm 0,01$ und $K_{D2}=32,3 \pm 5,21$ mM TbCl₃.

4.4 Wechselwirkungen zwischen Metallionen und PLD-Substraten

Neben der Interaktion der verwendeten PLDs mit deren Substraten sollte auch die Wechselwirkung des Substrats mit den in den Aktivitätstest eingesetzten Metallionen untersucht werden. Zum einen sollte die Interaktion von Kationen und negativ geladenen Substratzellen und zum anderen ein möglicher Effekt der Kationen auf die Substratstruktur untersucht werden.

4.4.1 Spektroskopische Bestimmung durch die FeRes-Methode

Bedingt durch den anionischen Charakter des Mizellären Substrates kann davon ausgegangen werden, dass Metallionen an die Oberfläche der Substratzellen binden und dadurch der Kontakt von PLD α und Substrat vermittelt wird.

Die relativen Bindungskapazitäten von Metallionen an Phospholipidvesikel oder Mizellen können mit der Fe(III)-Resorcyilatmethode (FeRes-Methode) analysiert werden [15]. Diese basiert auf der Interaktion von Phospholipid und dem im violett-farbenen Eisen(III)- γ -Resorcyilatkomplex gebundenen Eisen in Konkurrenz mit anderen Kationen.

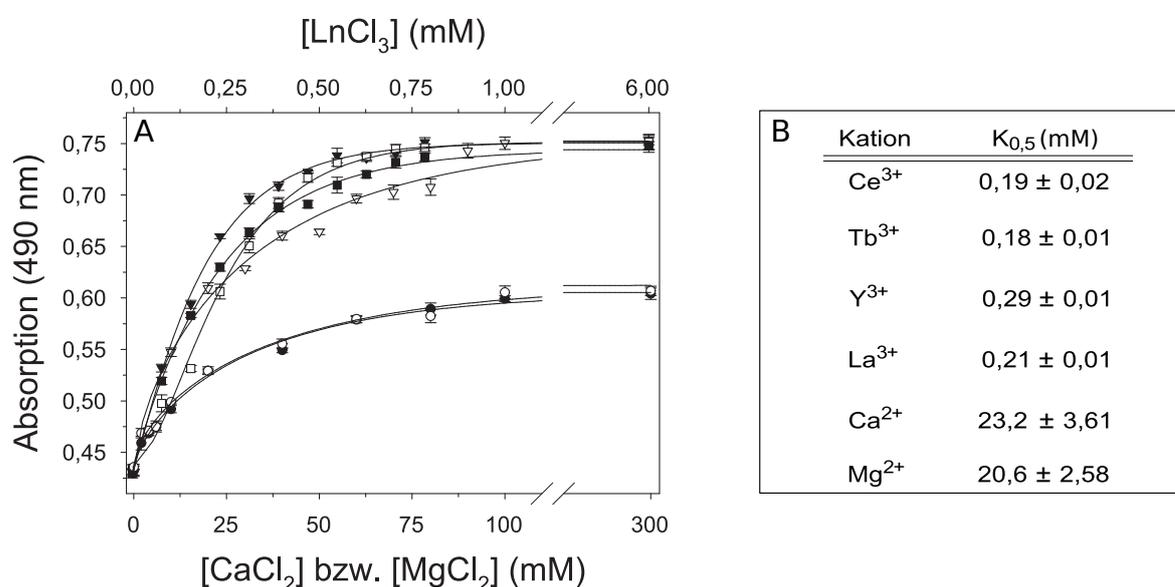


Abbildung 4.16: Interaktion von Kationen mit PpNP-Mizellen. A: Bindungskurven. Die aus 1 mM PpNP, 8 mM Triton X-100 und 1 mM SDS bestehenden Mizellen wurden mit verschiedenen Kationen unterschiedlicher Konzentrationen und FeRes inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 490 nm. $CaCl_2$ (○), $MgCl_2$ (●), YCl_3 (□), $LaCl_3$ (■), $CeCl_3$ (▽), $TbCl_3$ (▼). **B:** $K_{0,5}$ -Werte für die Komplexbildung von Kation und Mizelle. Die $K_{0,5}$ -Werte wurden aus den Daten aus Abb. 4.16 A mit der modifizierten Hill-Gleichung (Gl. 3.1) ermittelt. Die Messungen wurden in 100 mM MES, pH 5,6 bei RT durchgeführt.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von Erdalkalimetallen und Ln^{3+} zum Substrat wurde die Absorption des Eisen(III)- γ -Resorcyilatkomplex mit steigenden Kationenkonzentrationen bei 490 nm bestimmt.

Die Auswertung der Messpunkte erfolgte mittels modifizierter Hill-Gleichung (Gl. 3.1). Die so erhaltenen Bindungskurven für verschiedene Ln^{3+} unterschieden sich

in den $K_{0,5}$ -Werten ca. um den Faktor 10 von denen der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (Abb. 4.16).

4.4.2 Untersuchung der Metallionenbindungskapazität der Substratmizellen durch die FeRes-Methode

Um den Einfluss der negativen Ladungen der Substratmizellen auf die Metallionenbindungskapazität zu untersuchen, wurden das Standardsubstratgemisch (Abschnitt 3.3.7.1) bei einer konstanten CaCl_2 -Konzentration von 20 mM mit steigenden Mengen SDS versetzt. Die Anwendung der FeRes-Methode zeigte, dass sich die Fähigkeit der Substratmizellen zur Bindung von Kationen in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration änderte.

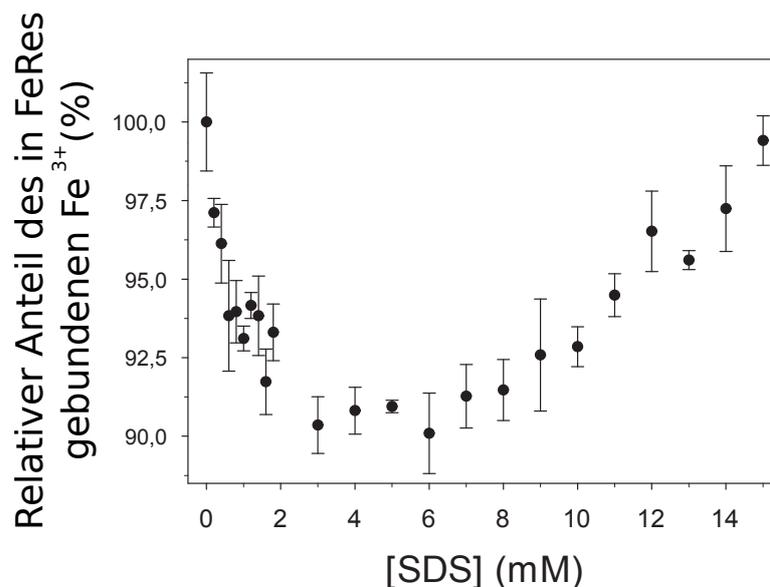


Abbildung 4.17: Einflusses von SDS auf die Metallionenbindungskapazität von Substratmizellen. Die Mizellen setzten sich aus 1 mM PpNP, 8 mM Triton X-100 sowie steigenden Konzentrationen SDS zusammen. Die Messungen wurden in 100 mM MES, pH 5,6 bei RT und einer CaCl_2 -Konzentration von 20 mM durchgeführt.

Steigende Mengen SDS führten bis zu Konzentrationen zwischen 3 und 6 mM zur verstärkten Bindung von Metallionen an die Mizellen (Abb. 4.17). Die weitere Erhöhung der SDS-Konzentration führte jedoch zu einem Anstieg der Absorption, was auf eine verringerte Bindung von Ionen an die Oberfläche der Mizellen schließen lässt.

4.5 Einfluss von Metallionen und Detergenzien auf die Strukturierung der PLD-Substrate und die Aktivität der untersuchten Phospholipasen

4.5.1 Untersuchung mittels Dynamischer Lichtstreuung und Aktivitätsstudien

Ausgangspunkt der Untersuchungen mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bildete die Beobachtung, dass die Änderung der Substratzusammensetzung bzw. die An- und Abwesenheit von Metallionen einen unmittelbaren Einfluss auf die Größe der Substratzellen hatte. So lag bei einer Substratzusammensetzung von 1 mM PpNP, 8 mM Triton X-100 und 2 mM SDS der hydrodynamische Radius des Substrates ohne Zugabe von CaCl_2 bei 2,43 nm. In Gegenwart von 100 mM CaCl_2 betrug dieser jedoch 6,35 nm (Abb. 4.18).

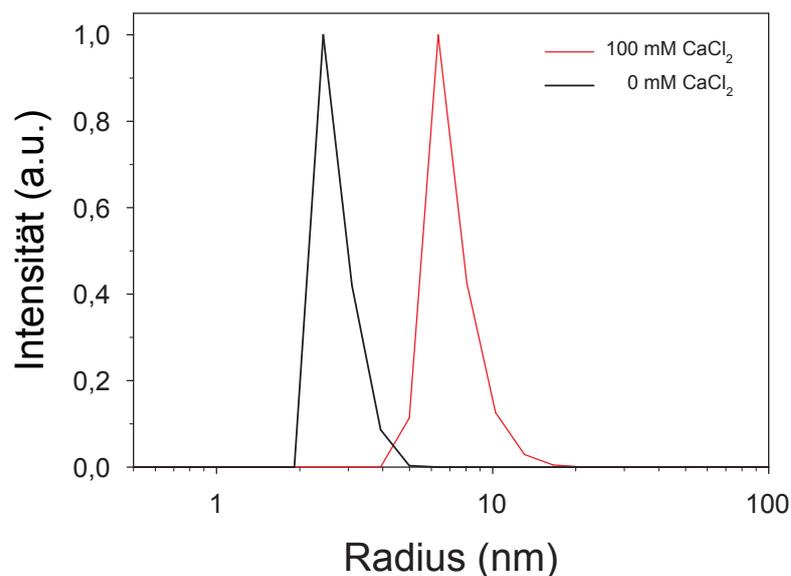


Abbildung 4.18: DLS-Messungen von Substratzellen. Die Mizellen bestanden aus 1 mM PpNP, 8 mM Triton X-100, 2 mM SDS und wurden in An- bzw. Abwesenheit von 100 mM CaCl_2 wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben vermessen. Die Untersuchungen erfolgten in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 30°C.

Demgegenüber steht die Beobachtung, dass die Änderung der CaCl_2 -Konzentration bei Verwendung der Standardsubstratzusammensetzung (1 mM PpNP, 8 mM Tri-

ton X-100 und 1 mM SDS) keinen Einfluss auf den hydrodynamischen Radius der Substratzellen hatte (Abb. 4.19).

Zur enzymkinetischen Charakterisierung der PLDs war es notwendig die Substratzusammensetzung zu variieren. Da die beobachteten Änderungen des hydrodynamischen Radius indirekt die Aktivität der PLDs beeinflussen könnte, wurden die aus den Untersuchungen zur Aktivität und zum hydrodynamischen Radius erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Hierbei wurden die Daten von PLD_{α} und von PLD_{Str} , die sich in ihrer Ca^{2+} -Abhängigkeit grundlegend voneinander unterscheiden, gegenübergestellt.

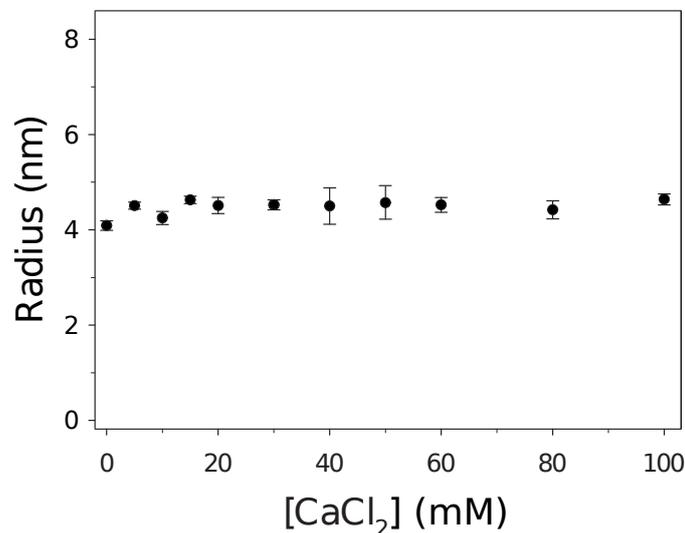


Abbildung 4.19: Einfluss von $CaCl_2$ auf den hydrodynamischen Radius der Substratzellen.
Die Mizellen bestanden aus 1 mM PpNP, 8 mM Triton X-100 und 1 mM SDS in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 30°C.

4.5.1.1 Einfluss von SDS

Der mittels DLS ermittelte hydrodynamischen Radius des PLD Substrates lag für die Standardsubstratzusammensetzung (1 mM PpNP, 8 mM Triton X-100, 1 mM SDS) unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration bei durchschnittlich $4,52 \pm 0,16$ nm (Abb. 4.19). Die Änderung der Substratzusammensetzung hatte jedoch unterschiedliche Effekte auf den hydrodynamischen Radius des Substrates. So führte die Steigerung der SDS-

Konzentration in Gegenwart von 100 mM CaCl_2 zu einem Anstieg des Radius auf bis zu 7,5 nm bei 2,5 mM SDS (Abb. 4.20 A). Bei einer Konzentration von 3 mM SDS kam es wiederum zur Verringerung des hydrodynamischen Radius auf 2,6 nm. Weiter steigende SDS-Konzentrationen führten zu einer Streuung der gemessenen Radien zwischen 3,7 und 2,1 nm.

Obwohl die Präinkubation der $\text{PLD}\alpha$ mit SDS bzw. Triton X-100 keinen Effekt auf die anschließend gemessene Aktivität hatte (Tab. A.1 im Anhang), beeinflussten steigende Konzentrationen SDS im mizellärem Substratgemisch die Enzymaktivität. So nahm der Substratumsatz mit steigenden Mengen SDS zu und erreichte ihren höchsten Wert bei 3 mM SDS (Abb. 4.20 A). Weiter steigende Konzentrationen führten zu einer schrittweisen Verringerung der Enzymaktivität.

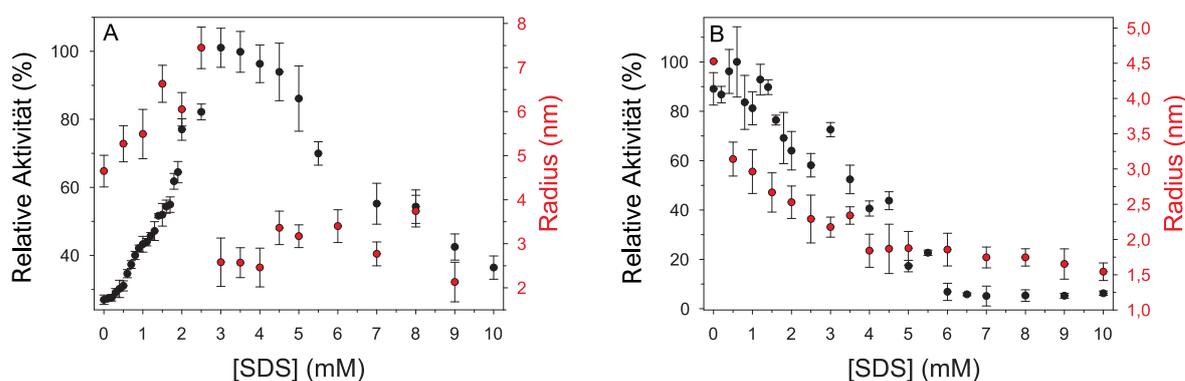


Abbildung 4.20: Einfluss steigender Konzentrationen SDS auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen und die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ und PLD_{Str} . A: Relative Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ und hydrodynamischer Radius des Substrates in Anwesenheit von 100 mM CaCl_2 . B: Relative Aktivität der PLD_{Str} und hydrodynamischer Radius des Substrates ohne Zugabe von CaCl_2 . Der Messansatz enthielt 1 mM PpNP , 8 mM Triton X-100 und unterschiedliche SDS-Konzentration in 100 mM N-Acetat, pH 5,6 bei 30°C.

Ähnliche Schwankungen im hydrodynamischen Radius des mizellären Substrates ließen sich ohne Zugabe von CaCl_2 beobachten. Ausgehend von 4,5 nm bei 0 mM SDS verringerten steigende Mengen SDS schrittweise den Radius des Substrates bis zu einer Konzentration von 4 mM SDS (Abb. 4.20 B). Die weitere Zugabe von SDS führte in verringertem Umfang zu einer weiteren Reduzierung des hydrodynamischen Radius. Ähnlich $\text{PLD}\alpha$ zeigte auch die Inkubation von PLD_{Str} mit SDS bzw. Triton X-100 keinen Effekt auf einen im Anschluss durchgeführten Aktivitätstest (Tab. A.1 im An-

hang). Jedoch führten steigende Mengen an SDS im Substrat über den gesamten Messbereich zu einer Senkung der Enzymaktivität (Abb. 4.20 B).

4.5.1.2 Einfluss von Triton X-100

Im folgenden Versuch wurden Substratgemische aus unterschiedlichen Mengen Triton X-100 unter Beibehaltung einer Konzentration von 1 mM PpNP, jedoch ohne Anwesenheit von SDS, hinsichtlich des hydrodynamischen Radius und der PLD-Aktivität untersucht.

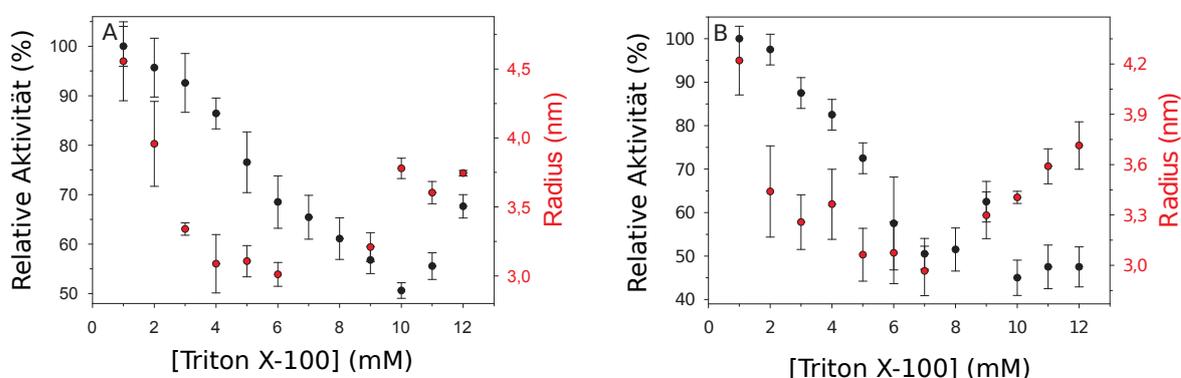


Abbildung 4.21: Einfluss steigender Konzentrationen Triton X-100 auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen und die Aktivität der PLD α und PLD $_{Str}$ **A:** Relative Aktivität der PLD α und hydrodynamischer Radius des Substrates in Anwesenheit von 100 mM CaCl $_2$. **B:** Relative Aktivität der PLD $_{Str}$ und hydrodynamischer Radius des Substrates ohne Zugabe von CaCl $_2$. Der Messansatz enthielt 1 mM PpNP und verschiedene Triton X-100-Konzentrationen in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 30°C.

Beginnend bei 4,56 nm in Anwesenheit von 100 mM CaCl $_2$ und 4,22 nm ohne Zugabe von CaCl $_2$ sanken in beiden Ansätzen die hydrodynamischen Radien bis zu einer Konzentration von 6 bzw. 7 mM Triton X-100 (Abb. 4.21 A und B). Weiter steigende Mengen an Triton X-100 führten in beiden Ansätzen zur Vergrößerung der hydrodynamischen Radien.

Die mit den jeweiligen Substratgemischen durchgeführten Aktivitätstests zeigten sowohl für PLD α (in Anwesenheit von 100 mM CaCl $_2$) als auch für PLD $_{Str}$ (ohne Zugabe von CaCl $_2$) bei steigenden Triton X-100 Mengen ein Absinken der Aktivität. Während es bei der PLD α ab einer Triton X-100 Konzentration von 11 mM wieder zu einer Ak-

tivitätszunahme kam (Abb. 4.21 A), stabilisierte sich die Aktivitätsabnahme bei der PLD_{Str} ab einer Konzentration von ca. 10 mM Triton X-100 (Abb. 4.21 B).

4.5.1.3 Änderung der Substratkonzentration unter Beibehaltung des Verhältnisses von PpNP, SDS und Triton X-100

Anschließend wurde der hydrodynamischen Radius des Substrates sowie die Aktivität der PLDs bei Erhöhung der Substratkonzentration, aber unter Beibehaltung des ursprünglichen Verhältnisses der Substratzusammensetzung (PpNP : Triton X-100 : SDS im Verhältnis 1 : 8 : 1) untersucht.

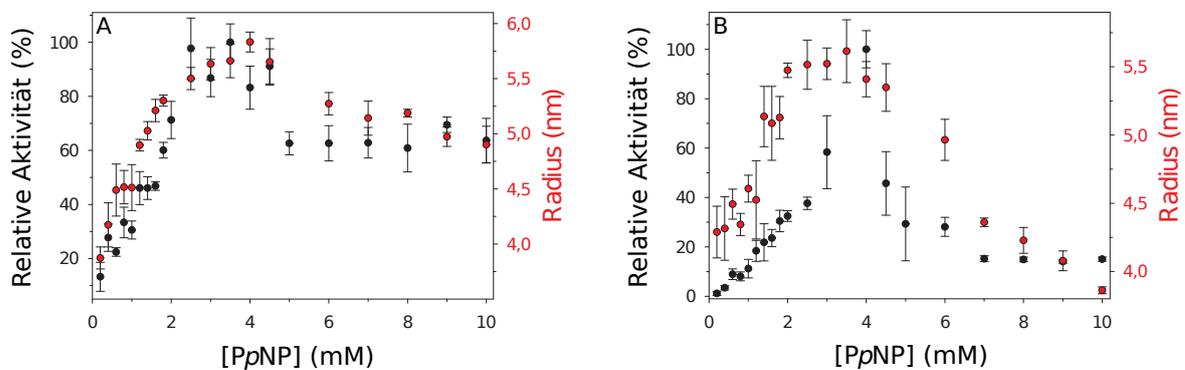


Abbildung 4.22: Einfluss veränderter Substratkonzentrationen (unter Beibehaltung des 1:8:1 Verhältnisses von PpNP, Triton X-100 und SDS) auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen und die Aktivität der $PLD\alpha$ und PLD_{Str} **A:** Relative Aktivität der $PLD\alpha$ und hydrodynamischer Radius des Substrates in Anwesenheit von 100 mM $CaCl_2$. **B:** Relative Aktivität der PLD_{Str} und hydrodynamischer Radius des Substrates ohne Zugabe von $CaCl_2$. Die Messansätze enthielten unterschiedliche Konzentrationen an PpNP, Triton X-100 und SDS mit einem Verhältnis von 1:8:1 in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 30°C.

Aus Abb. 4.22 A wird ersichtlich, dass der hydrodynamische Radius des Substrates in Anwesenheit von 100 mM $CaCl_2$ mit steigenden Konzentration an Substrat und Detergenzien bis zu einer Konzentration von 4 mM PpNP, 32 mM Triton X-100 und 4 mM SDS auf einen Wert von 5,8 nm anstieg. Eine weitere Konzentrationserhöhung der Komponenten führte zur Abnahme des hydrodynamischen Radius bis dieser bei 10 mM PpNP, 80 mM Triton X-100 und 10 mM SDS einen Wert von 4,9 nm erreichte. Unter den gleichen Messbedingungen stieg die Aktivität der $PLD\alpha$ mit steigenden Konzentrationen an Substrat und Detergenzien bis zu einem Bereich zwischen 2,5 mM

PpNP, 20 mM Triton X-100, 2,5 mM SDS und 3,5 mM PpNP, 28 mM Triton X-100, 3,5 mM SDS (Abb. 4.22 A). Weiter steigende Konzentrationen führten zur Verminderung der Enzymaktivität. Bei 10 mM PpNP, 80 mM Triton X-100 und 10 mM SDS lag diese nur noch bei 63 % des maximalen Wertes.

Ohne Zugabe von CaCl_2 kam es mit steigenden Substrat- und Detergenzkonzentrationen ebenfalls zu einem Anstieg des hydrodynamischen Radius (Abb. 4.22 B). Dieser erreichte seinen höchsten Wert bei einer Konzentration von 3,5 mM PpNP, 28 mM Triton X-100 und 3,5 mM SDS. Die ebenfalls steigende Aktivität der PLD_{Str} hatte ihr Maximum bei 4 mM PpNP, 32 mM Triton X-100 und 4 mM SDS. Eine weitere Erhöhung der Detergenz- und Substratkonzentration führte zur drastischen Abnahme des hydrodynamischen Radius und der Hydrolysegeschwindigkeit.

4.5.2 Untersuchung mittels Röntgenkleinwinkelstreuung

Das mizelläre PLD-Substrat wurde in unterschiedlichen Zusammensetzungen sowie in An- bzw. Abwesenheit von 100 mM CaCl_2 mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. Einen Überblick über die verwendeten Proben sowie die daraus erhaltenen Parameter liefert Tabelle 4.2.

Die untersuchten Proben zeigten sowohl hinsichtlich Streuintensität (I_0) als auch Gyrationradius (R_G) große Unterschiede. So führten in Anwesenheit von 100 mM CaCl_2 steigende Mengen SDS zu einer Abnahme des R_G bis zu einer Konzentrationen von 2 mM SDS. Weiter steigende Mengen SDS führten zu einem Anstieg des R_G auf bis zu 11,04 nm bei 8 mM SDS.

Ohne Zugabe von CaCl_2 blieben sowohl die Streuintensitäten als auch der Gyrationradius der untersuchten Proben nahezu konstant. Zu einer Verringerung des R_G kam es erst ab SDS-Konzentrationen ≥ 3 mM. Die nach Abzug des Puffers erhaltenen Streukurven und Abstandsverteilungsfunktion sind auf den Seiten VI und VII im Anhang für jede Probe zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.2: Mittels SAXS erhaltene Streuparameter von Mizellen mit verschiedener Substratzusammensetzung. Die Messungen wurden in An- und Abwesenheit von 100 mM CaCl₂ in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 10°C durchgeführt.

Probe	[PpNP] (mM)	[Triton] (mM)	[SDS] (mM)	CaCl ₂ (mM)	I(0)	R _G (nm)
1	1	8	-	100	3,12	6,03
2	1	8	1	100	2,40	5,33
3	1	8	2	100	1,93	4,59
4	1	8	3	100	4,33	6,86
5	1	8	8	100	8,45	11,04
6	1	8	-	-	1,28	3,21
7	1	8	1	-	1,26	3,21
8	1	8	2	-	1,30	3,20
9	1	8	3	-	1,27	3,19
10	1	8	8	-	1,36	3,05

Mit Hilfe des Programms DAMMIN [196] konnten Strukturmodelle von Mizellen unterschiedlicher Substratzusammensetzung berechnet werden. Abbildung 4.23 zeigt die berechneten Modelle der jeweiligen Mizellen in An- (A) und Abwesenheit (B) von 100 mM CaCl₂ bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen. Die sphärischen und nicht vollständig geschlossenen Mizellen verloren bei Anwesenheit von 100 mM CaCl₂ ihre ursprüngliche Gestalt hin zu einer zylindrischen Form mit einem deckelähnlichen Bereich. Die Zugabe von SDS führte ab einer Konzentration von 3 mM zu einer Verschmälerung der Mizellen (Abb. 4.23 A 4 und 5).

Ohne Zugabe von CaCl₂ zeigte sich erst bei hohen SDS-Konzentrationen eine Verringerung des Radius (R_G in Tab. 4.2). Die sphärische Form der Mizellen blieb hierbei über den gesamten Messbereich unverändert (Abb. 4.23 B).

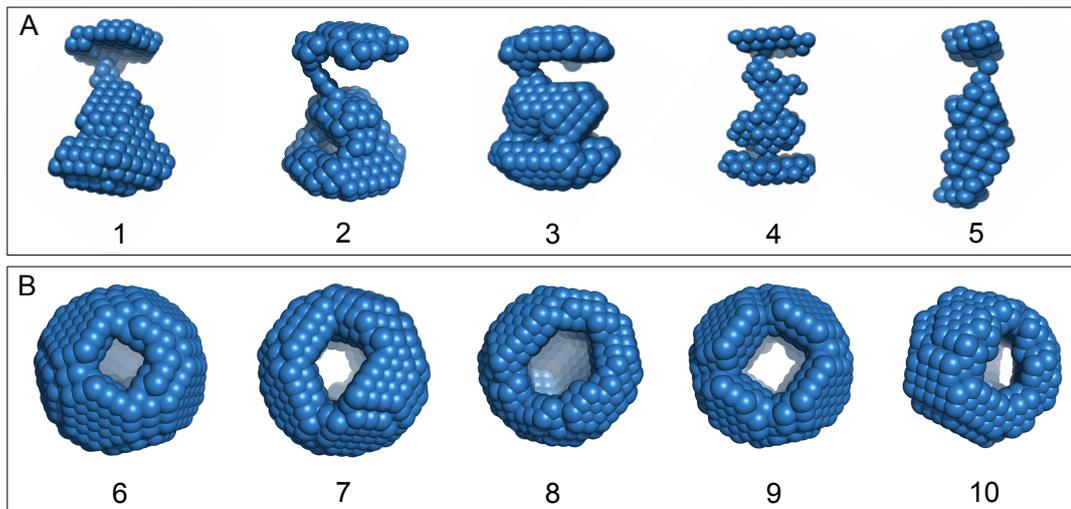


Abbildung 4.23: Formabschätzung von Substratzellen mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen. Dargestellt sind Strukturmodelle des mizellären PLD-Substrates bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen in An- (**A**) bzw. Abwesenheit (**B**) von 100 mM CaCl_2 . Die Substratzusammensetzungen und erhaltenen Messparameter sind zusammenfassend in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Formabschätzung erfolgte mit dem Programm DAMMIN, die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt.

4.6 Bolalipide als Substrate für PLD

Bipolare Amphiphile (sog. Bolalipide), deren Kopfgruppen über unterschiedlich lange Alkylketten miteinander verbunden sind (Abschnitt 2.2.2), sollten hinsichtlich ihrer Hydrolysefähigkeit durch PLD_α und PLD_{Str} untersucht werden. Die Kopfgruppen der hier untersuchten Bolalipide bestand aus Phosphocholin, die dazwischen befindliche Alkylkette aus 24 bzw. 32 Kohlenstoffatomen. Die Durchführung des Cholin-nachweises erfolgte mittels Amplex Red-Test (Abschnitt 3.3.7.2).

4.6.1 PC-C24-PC Bolalipid

4.6.1.1 *v*-S-Charakteristik für PLD_α und PLD_{Str}

Bei den oberhalb einer Temperatur von 20°C als Mizellen vorliegenden PC-C24-PC Bolalipiden [197], kam es sowohl durch PLD_α als auch PLD_{Str} zur Abspaltung von Cholin. Abbildung 4.24 verdeutlicht, dass steigende Lipidkonzentrationen bei PLD_α

und PLD_{Str} zu einer gesteigerten Aktivität führten. Mittels Michaelis-Menten-Gleichung ließ sich für PLD_{α} ein K_M von $0,0036 \pm 0,0017$ mM und für PLD_{Str} ein K_M von $0,077 \pm 0,013$ mM PC-C24-PC ermitteln.

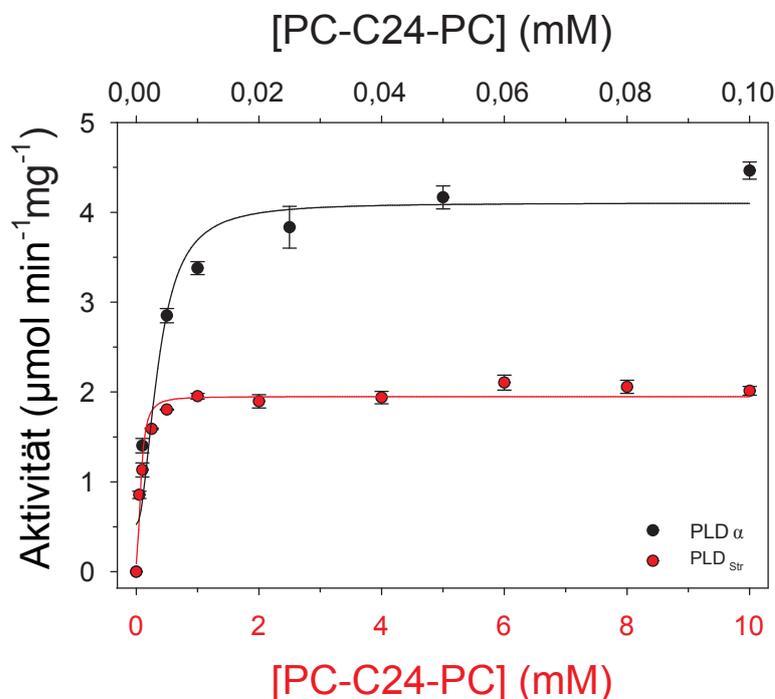


Abbildung 4.24: Hydrolysegeschwindigkeit der PLD_{α} (●) und PLD_{Str} (●) als Funktion der Konzentration von PC-C24-PC. Die Aktivität wurde im Falle der PLD_{α} in Anwesenheit von 100 mM $CaCl_2$ sowie bei PLD_{Str} ohne Zugabe von $CaCl_2$ ermittelt. Die Messungen erfolgten in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 30°C. Der Cholinachweis erfolgte mittels Amplex-Red Test (Abschnitt 3.3.7.2).

4.6.1.2 Einfluss von SDS auf den hydrodynamischen Radius und die Hydrolyse von PC-C24-PC durch PLD_{α} und PLD_{Str}

Im folgenden Versuch sollte der Effekt von Detergenzien auf die Hydrolyse und den hydrodynamischen Radius von PC-C24-PC untersucht werden. Hierzu wurde ein Substratgemisch aus 6 mM PC-C24-PC, 8 mM Triton X-100 und unterschiedlichen SDS-Konzentrationen verwendet. Der hydrodynamische Radius und der Nachweis der Cholinfreisetzung durch PLD_{α} und PLD_{Str} erfolgten in An- und Abwesenheit von 100 mM $CaCl_2$.

In Gegenwart von 100 mM $CaCl_2$ führte die Zugabe von 1 mM SDS zum Substrat-

gemisch zu einem Anstieg des hydrodynamischen Radius von 2,8 auf 5,0 nm (Abb. 4.25 A). Nachdem der hydrodynamische Radius des Substratgemisches durch die weitere Zugabe von SDS relativ konstant blieb, kam es bei einer SDS-Konzentration von 8 mM zum Absinken des Radius auf 1,98 nm.

Im gesamten Messbereich wurde die Aktivität der PLD α gegenüber dem Substratgemisch aus 6 mM PC-C24-PC und 8 mM Triton X-100 durch steigende Mengen SDS kontinuierlich gesenkt (Abb. 4.25 A).

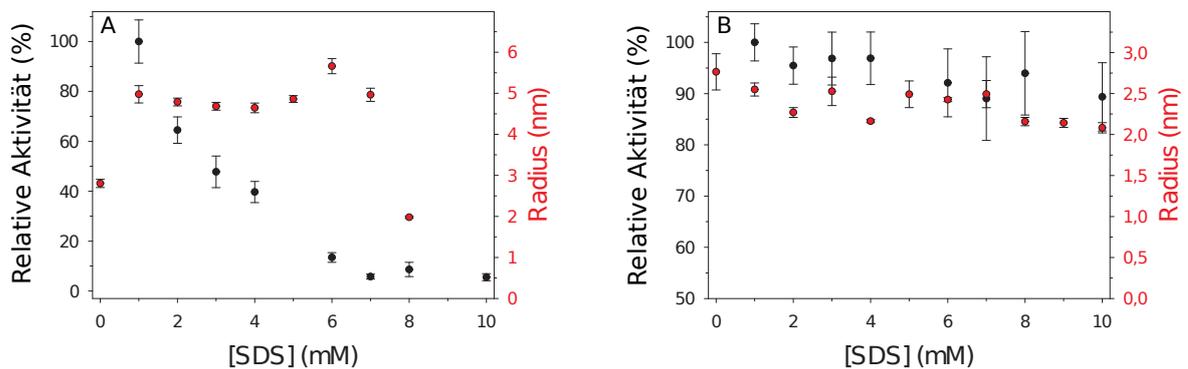


Abbildung 4.25: Einfluss von SDS auf den hydrodynamischen Radius und die Hydrolyse von PC-C24-PC durch PLD α (A) und PLD $_{Str}$ (B). Im Falle von PLD α erfolgten die Messungen in Gegenwart von 100 mM CaCl $_2$, während bei der Untersuchung der PLD $_{Str}$ kein CaCl $_2$ zugegeben wurde. Die Messungen wurden in 100 mM Na-Acetat pH 5,6 bei 30°C durchgeführt. Die Mizellen bestanden aus 6 mM PC-C24-PC und 8 mM Triton. Der Cholinachweis erfolgte mittels Amplex-Red Test (Abschnitt 3.3.7.2).

Ohne Zugabe von CaCl $_2$ zeigten steigende SDS-Konzentrationen sowohl auf den hydrodynamischen Radius als auch auf die Hydrolyse des Substratgemisches durch PLD $_{Str}$ keinen signifikanten Effekt (Abb. 4.25 B).

4.6.2 PC-C32-PC Bolalipid

4.6.2.1 *v*-S-Charakteristik für PLD α und PLD $_{Str}$

PC-C32-PC Bolalipide lagern sich aufgrund der VAN-DEr-WAALS-Wechselwirkungen und dem daraus resultierenden hydrophoben Effekt in wässriger Lösung zu Fasern zusammen. Selbst in hohen Verdünnungen ($c < 5$ mg/ml) ermöglichen die Nanofasern die Ausbildung eines viskosen, transparenten Hydrogels [198].

Sowohl bei Verwendung von PLD_{α} als auch PLD_{Str} führten steigende PC-C32-PC-Konzentrationen zur verstärkten Freisetzung von Cholin (Abb. 4.26). Jedoch wurde bei den verwendeten Substratkonzentrationen die Sättigung der enzymatischen Reaktion weder für PLD_{α} noch für PLD_{Str} erreicht, da es ab Konzentrationen $\geq 1,5$ mM PC-C32-PC zur Ausfällung des Substrates kam.

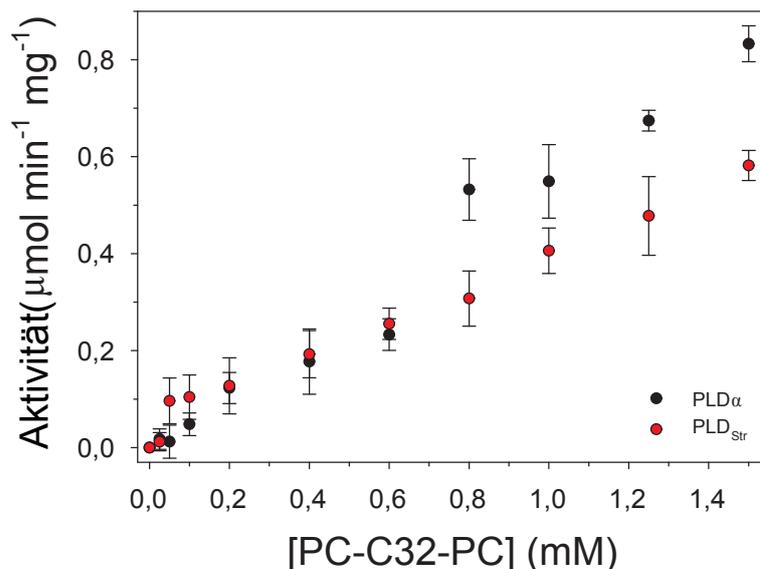


Abbildung 4.26: Hydrolysegeschwindigkeit der PLD_{α} (●) und PLD_{Str} (●) als Funktion der Konzentration von PC-C32-PC. Die Aktivität wurde im Falle von PLD_{α} in Anwesenheit von 100 mM CaCl_2 sowie bei PLD_{Str} ohne Zugabe von CaCl_2 ermittelt. Die Messungen erfolgten in 100 mM N-Acetat, pH 5,6 bei 30°C . Der Cholinnachweis erfolgte mittels Amplex-Red Test (Abschnitt 3.3.7.2).

4.6.2.2 Einfluss von Detergenzien auf die Aktivität der PLD_{α} und PLD_{Str} gegenüber PC-C32-PC

Die folgenden Aktivitätsstudien mit PLD_{α} und PLD_{Str} wurden in An- und Abwesenheit von 100 mM CaCl_2 mit einer Lipidlösung von 0,24 mM PC-C32-PC ($\hat{=}$ 0,2 mg/ml) durchgeführt. Bei beiden Enzymen hatte die Anwesenheit von Detergenzien unterschiedliche Effekte auf die Abspaltung von Cholin von PC-C32-PC (Abb. 4.27 und 4.28). So ließ sich die Aktivität der PLD_{α} durch Zugabe von 5 mM Triton X-100 sowie eine Kombination aus 0,005 mM Triton X-100 und 0,005 mM SDS zum Reaktionsansatz um den Faktor 3,3 bzw. 2,9 steigern (Abb. 4.27). Andere Konzentrationen

an Triton X-100 und SDS führten zu einer geringeren Aktivitätssteigerung bzw. zur Verringerung der ursprünglichen Hydrolysegeschwindigkeit.

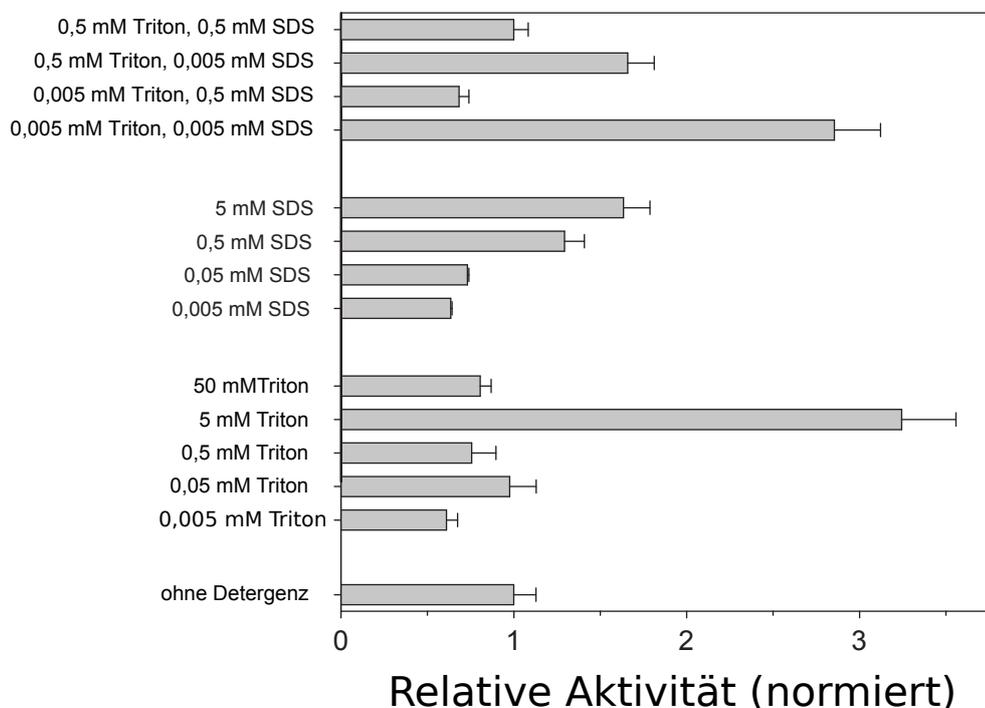


Abbildung 4.27: Einfluss von Detergenzien auf die Hydrolyse von PC-C32-PC durch PLD α .

Als Basis der Skalierung wurden die ohne Zugabe von Detergenzien gemessene Aktivität auf 1 normiert. Die Hydrolysereaktionen wurden in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 bei 30°C in Anwesenheit von 100 mM CaCl₂ durchgeführt. Der Cholinnachweis erfolgte mittels Amplex-Red Test (Abschnitt 3.3.7.2).

Die Hydrolyse von PC-C32-PC durch PLD_{Str} ließ sich bei Anwesenheit von Detergenzien im Reaktionsansatz ebenfalls steigern. Die größten Aktivitätssteigerungen ließen sich durch Zugabe von 0,5 mM Triton X-100, 5 mM Triton X-100 sowie bei einer Kombination von 0,5 mM Triton X-100 und 0,005 mM SDS bzw. 0,5 mM Triton X-100 und 0,5 mM SDS beobachten (Abb. 4.28). Die Verwendung anderer Konzentrationen an Triton X-100 und SDS führten zu einer geringeren Aktivitätssteigerung bzw. zur Verringerung der ursprünglichen Hydrolysegeschwindigkeit.

4 Ergebnisse

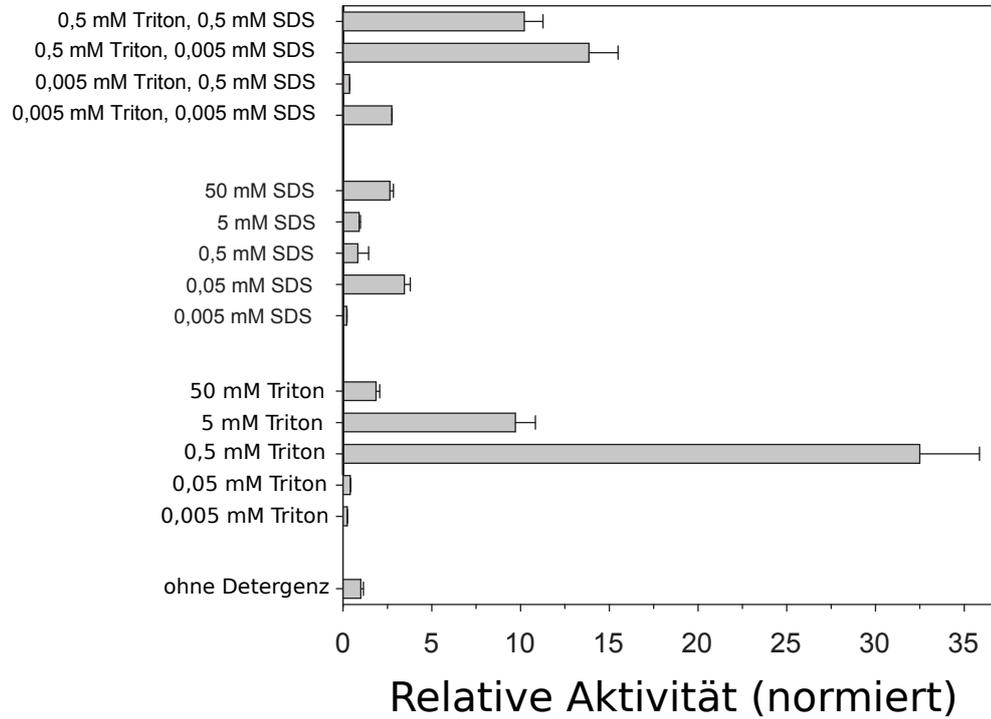


Abbildung 4.28: Einfluss von Detergenzien auf die Hydrolyse von PC-C32-PC durch PLD_{Str}. Als Basis der Skalierung wurden die ohne Zugabe von Detergenzien gemessene Aktivität auf 1 normiert. Die Hydrolysereaktionen wurden in 100 mM Na-Acetat pH 5,6 bei 30°C durchgeführt. Der Cholinachweis erfolgte mittels Amplex-Red Test (Abschnitt 3.3.7.2).

5 Diskussion

Um die Rolle der Ca^{2+} -Ionen bei der Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ zu spezifizieren wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene methodische Ansätze verfolgt:

1. Ersatz der Ca^{2+} -Ionen durch andere Metallionen, insbesondere Ln^{3+} -Ionen, die aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften direkte Bindungsstudien der Interaktion von Metallion und $\text{PLD}\alpha$ erlauben.
2. Untersuchungen des Einflusses der Substratvesikelzusammensetzung auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$.
3. Charakterisierung der Substratvesikel durch DLS- und SAXS-Messungen.

Dabei wurde die im Fokus stehende $\text{PLD}\alpha$ mit $\text{PLD}\gamma$ aus Weißkohl, die erstmalig exprimiert, teilgereinigt und charakterisiert wurde, bzw. mit mikrobieller PLD_{Str} verglichen, da von $\text{PLD}\gamma$ ein differentes Metallionenaktivierungsverhalten erwartet wurde und von PLD_{Str} keine spezifischen Regulationsmechanismen bekannt sind. Des Weiteren wurde die Aktivität von $\text{PLD}\alpha$ und PLD_{Str} gegenüber Bolalipiden untersucht.

5.1 Metallionenbindung und Aktivierung der PLD

5.1.1 Vergleich der Effekte verschiedener Metallionen auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$

Verschiedene Ionen aus der Gruppe der dreiwertigen Seltenen Erden wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Ca^{2+} im Hinblick auf die Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ zu ersetzen. Wie erwartet zeigte $\text{PLD}\alpha$ in Abwesenheit von Metallionen sowie bei Verwendung von Mg^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} keine Aktivität. Zur Erlangung der maximalen Enzymaktivität waren Ca^{2+} -Konzentrationen von über 80 mM nötig. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die untersuchten Ln^{3+} in der Lage waren, $\text{PLD}\alpha$ bei sehr viel geringeren Konzentrationen zu aktivieren (Abb. 4.5). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass eine stärkere Bindung der Ln^{3+} an das Enzym erfolgte. Verglichen mit Ca^{2+} erreichte

die Enzymaktivität jedoch nur 30 % des Maximalwertes. Da die ermittelten Hill-Koeffizienten der Bindungen für Ca^{2+} bei 1,22 und für die Ln^{3+} zwischen 1,80 und 2,64 lagen (Tab. 4.1), kann davon ausgegangen werden, dass mindestens zwei Ca^{2+} - bzw. zwei Ln^{3+} -Ionen an der Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ beteiligt sind. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit den ein bis drei Ca^{2+} -Ionen, die in der C2-Domäne der α -Typ PLD von *A. thaliana* nachgewiesen wurden [63] sowie den schon früher postulierten zwei Ca^{2+} -Bindestelle der $\text{PLD}\alpha$ [66].

Die Untersuchung der $\text{PLD}\alpha$ -Aktivierung durch Ln^{3+} mit natürlichem Substrat erbrachte vergleichbare Ergebnisse wie die unter Verwendung des artifiziellen PpNP ermittelten Daten. Zwar wurde bei Anwesenheit von Tb^{3+} als Aktivator ein ähnlicher $K_{0,5}$ -Wert ermittelt, jedoch erreichte das Enzym mit ca. 55 % des Maximalwertes eine deutlich höhere Aktivität (Abb. 4.6) als mit dem artifiziellen Substrat PpNP . Da innerhalb des breiten Substratspektrums der $\text{PLD}\alpha$ [199] natürlich vorkommende Phospholipide bessere Substrate für das Enzym sind, könnte dies auch der Grund für die im Vergleich zum artifiziellen PpNP höhere Hydrolysegeschwindigkeit gegenüber PC sein.

Durch Anwendung von Gleichung 3.3 war es möglich, die kooperative Auswirkung der Bindung von Tb^{3+} an $\text{PLD}\alpha$ auf die Aktivität des Enzyms näher zu quantifizieren. Hierbei lag der als Berechnungsgrundlage festgelegte Wert für K_a^2 bei 0,03 mM TbCl_3 . Bei festgelegten größeren Werten (0,3 bzw. 3 mM TbCl_3) weicht der *Fit* vom Datensatz ab und ist dadurch nicht realistisch. Anzumerken ist, dass die Menge der Datenpunkte in den kritischen Bereichen der geringen Konzentration relativ klein ist. Fehler in der Auswertung der Progresskurven sind nicht berücksichtigt. Der mit Gleichung 3.3 berechnete Wert für K_a^1 betrug 214 mM TbCl_3 (Abschnitt 4.2.1).

Der erste Ligand wird mit relativ hoher Affinität an $\text{PLD}\alpha$ gebunden (durch Fluoreszenzspektroskopie ermittelter kleiner Wert von K_{D1} (Abschnitt 4.3.1)). Die dadurch induzierte Konformationsänderung hat aber nur einen geringen Aktivitätsgewinn zur Folge (großer Wert von K_a^1). Bei positiven Kooperativitäten erleichtert die Konformationsänderung infolge der Bindung des ersten Liganden einen Aktivitätsgewinn durch die Bindung des zweiten Liganden (kleiner Wert von K_a^2). Diese Werte sind nicht direkt mit den Dissoziationskonstanten (K_{D1} und K_{D2}) der Ln^{3+} mit $\text{PLD}\alpha$ ohne Substrat vergleichbar, die aus den Bindungskurven mittels Fluoreszenzspektroskopie erhalten wurden (Abschnitt 4.3.1).

Aktivitätsmessungen berücksichtigen die oder sind Ausdruck der durch Liganden induzierten Konformationen auf die katalytische Effizienz (Substratbindung bei Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und Substratumsatz durch die Bildung des

transition state). Durch die aus der Bindung des ersten Ln^{3+} -Ions resultierenden Konformationsänderung erreicht das Enzym noch nicht die volle Aktivität bzw. hat in dem vorgeschlagenen Modell (Abb. 5.1) keine Aktivität (ausgedrückt durch einen großen Wert von K_a^1 - das Gleichgewicht liegt auf der Seite des freien Enzyms). Jedoch wird die Bildung der katalytisch kompetenten Konformation bei Bindung des zweiten Ln^{3+} -Ions durch das erste Bindungsereignis im Sinne einer Isomerisierung oder Konformationsänderung erleichtert (ausgedrückt durch einen kleinen Wert von K_a^2 - das Gleichgewicht liegt auf der Seite des komplementierten Enzyms).

Eine schematische Darstellung der Bindung von Ln^{3+} an $\text{PLD}\alpha$ und der anschließenden Aktivierung des Enzyms bietet Abbildung 5.1; die ermittelten Gleichgewichtskonstanten sind zusammenfassend in Tabelle 5.1 dargestellt.

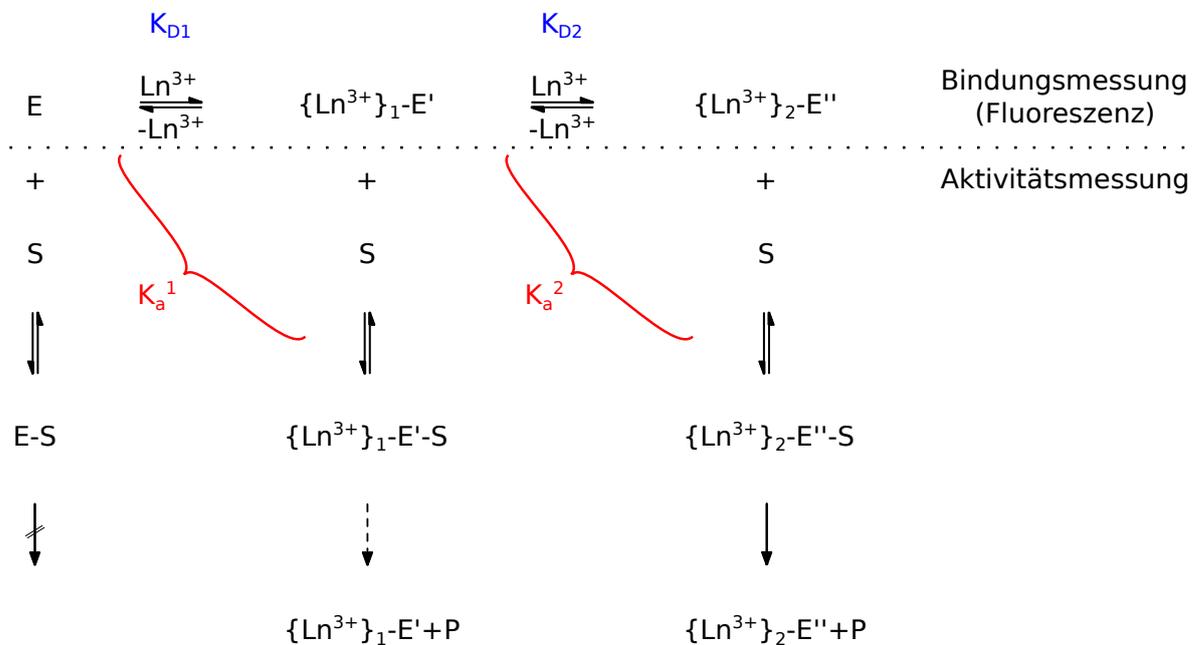


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der durch Fluoreszenzspektroskopie und Aktivitätsmessungen erhaltenen Parameter der Interaktion von Tb^{3+} mit $\text{PLD}\alpha$. Mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Dissoziationskonstanten der Bindung von Tb^{3+} an die Metallionenbindestellen der $\text{PLD}\alpha$ (K_{D1} und K_{D2}), Aktivierungskonstanten der Tb^{3+} -abhängigen $\text{PLD}\alpha$ -Aktivierung (K_a^1 und K_a^2), $\text{PLD}\alpha$ (E), Substrat (S), Produkt (P), Terbiumionen (Ln^{3+}), Enzym-Substrat-Komplex (E-S), durch Besetzung der ersten Metallionenbindestelle mit Tb^{3+} aktiviertes Enzym ($\{\text{Ln}^{3+}\}_1\text{-E}'$, weiter folgend kennzeichnen daran S und P den Enzym-Substratkomplex bzw. das daraus resultierende Produkt), durch Besetzung der ersten und zweiten Metallionenbindestelle mit Tb^{3+} aktiviertes Enzym ($\{\text{Ln}^{3+}\}_2\text{-E}''$ weiter folgend kennzeichnen daran S und P den Enzym-Substratkomplex bzw. das daraus resultierende Produkt).

Die mechanistische Interpretation dieser Ergebnisse führt zu dem Schluss, dass eine effektive Aktivierung der PLD α nur durch die Besetzung beider Metallionenbindestellen mit mM-Konzentrationen von Ln³⁺ erfolgen kann.

Tabelle 5.1: Gleichgewichtskonstanten verschiedener Messmethoden zur Untersuchung der Interaktion von Metallionen mit PLD α und dessen Substrat.

¹ Berechnet mittels modifizierter Hill-Gleichung (Gl. 3.1)

² Berechnet unter Berücksichtigung der Kooperativität mit Gleichung 3.3

³ Berechnet mit Gleichung 3.5

⁴ Berechnet mit Gleichung 3.6

^A Entspricht den mit Gleichung 3.7 analysierten Fluoreszenzwerten

* Die Daten entstammen der Publikation von Stumpe *et al.* [66]

Methode	Metallion	ermittelte Werte (mM)
Aktivitätsmessung ¹	Ca ²⁺	$K_{0,5} = 30,0 \pm 3,77$
	Tb ³⁺	$K_{0,5} = 2,55 \pm 0,19$
Aktivitätsmessung ²	Tb ³⁺	$K_a^1 = 214$
	"	$K_a^2 = 0,03$
Fluoreszenzspektroskopie ³	Tb ³⁺	$K_{D1} = 0,0065$
	"	$K_{D2} = 6,46$
Fluoreszenzspektroskopie ⁴	Tb ³⁺	$K_{D1} = 0,034$
	"	$K_{D2} = 13^A$
Nah-UV-CD-Spektroskopie*	Ca ²⁺	$K_{D1} = 0,12$
	"	$K_{D2} = 10,2$
FeRes-Methode	Ca ²⁺	$K_{0,5} = 23,2 \pm 3,61$
	Tb ³⁺	$K_{0,5} = 0,18 \pm 0,02$

Zusätzlich zu den geringen Ln³⁺-Konzentrationen, die ausreichten um PLD α zu aktivieren, zeigten die Ergebnisse der Verdrängungsexperimente die im Vergleich zu Ca²⁺ stärkere Interaktion dreiwertiger Ln³⁺ mit dem Enzym. So war es durch Zugabe steigender Ca²⁺-Konzentrationen weder möglich die Enzymaktivität der mit 6 mM TbCl₃ präinkubierten PLD α zu steigern (Abb. 4.7), noch das Fluoreszenzsignal signifikant zu senken (Abb. 4.14 A). Andererseits führte die Zugabe von TbCl₃ zu mit hohen CaCl₂-Konzentrationen präinkubierten Enzyms zur sofortigen Reduzierung der Enzymaktivität bzw. zum Anstieg der Tb³⁺-Fluoreszenz und damit zur Verdrängung der an PLD α gebundenen Ca²⁺-Ionen (Abb. 4.7 und 4.14 B).

Die Auswertung der in Abbildung 4.14 B dargestellten Fluoreszenzdaten des Verdrängungsexperimentes erfolgte wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben mit der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung und resultierte in dem in Abbildung 4.15 dargestellten korrigiertem relativen Fluoreszenzspektrum. Die im Anschluss durchgeführte Analyse der Bindungskurven mit Gleichung 3.5 und Gleichung 3.6 erbrachte mit $K_{D1} = 0,11$ mM und $K_{D2} = 32$ mM TbCl_3 jeweils die gleichen Ergebnisse, woraus geschlossen wird, dass beide Formeln zur Analyse Ln^{3+} -induzierter Fluoreszenz an $\text{PLD}\alpha$ verwendet werden können.

Im Vergleich mit den mit beiden Gleichungen ermittelten durchschnittlichen Bindungskonstanten die in Abwesenheit von CaCl_2 berechnet wurden, ergibt sich für das mit 100 mM CaCl_2 präinkubierte Enzym für die erste Bindestellen eine ca. 6-fach und für die zweite Bindestellen eine ca. 3-fach höhere Dissoziationskonstante.

Eine ebenfalls größere Bindungsstärke von Ln^{3+} an die Ca^{2+} -Bindestelle des dem eukaryotischen *EF-hand*-Motiv ähnlichen *E. coli*-Rezeptor für D-Galaktose und D-Glukose wurde von Snyder *et al.* beschrieben, bei denen Yb^{3+} und Lu^{3+} mit 20-fach höherer Affinität als Ca^{2+} gebunden wurden [200]. Zusätzlich finden sich Beispiele für Calmodulin aus *Drosophila melanogaster* [201], calmodulinabhängigen Kaliumkanälen aus *Xenopus laevis* [202] sowie verschiedene Proteine aus *Bacillus subtilis* [203, 204] bei denen eine im Vergleich zum Ca^{2+} stärkere Interaktion dreiwertiger Ln^{3+} mit Metallbindestellen nachgewiesen wurde. Auch wurden bei der Aktivierung einer Phosphorylase-Kinase durch Ln^{3+} nur 60-70 % des unter Verwendung von Ca^{2+} ermittelten Aktivitätswertes erreicht [171].

Bei der Interaktion von Aminosäureresten der Metallbindestelle mit den jeweiligen Metallionen sind elektrostatische Wechselwirkungen von besonderer Bedeutung [205, 206]. Da die Kationenbindestelle aus negativ geladenen Aminosäureresten besteht und diese sich gegenseitig abstoßen, wird angenommen, dass die Bindung von Kationen der Abstoßung entgegenwirkt [200]. Bei einer Vielzahl Ca^{2+} -bindender Proteine wird die Metallionenbindestelle durch sieben Sauerstoffatome gebildet, die zusammen in einer pentagonalen Bipyramide vorliegen [207, 208]. Mg^{2+} besitzt hauptsächlich die Koordinationszahl sechs, was einem Ionenradius von 0,72 Å entspricht, und geht bevorzugt Bindungen mit Stickstoff ein [11, 209, 210]. Dies könnte, neben dem geringeren Ionenradius, ein Grund für die fehlende Interaktion mit der Ca^{2+} -Bindestelle der $\text{PLD}\alpha$ sein.

Aufgrund des im Vergleich zum Ca^{2+} sehr ähnlichen Ionenradius (Tab. 5.2) und der Fähigkeit, der negativen Ladung der Aminosäurereste besser entgegenzuwirken, kommt es zur bevorzugten Bindung der dreiwertigen Ln^{3+} an Proteine mit Ca^{2+} -

Bindestellen [200, 202]. Ähnlich dem *E. coli*-Rezeptor für D-Galaktose und D-Glukose kann auch hier geschlussfolgert werden, dass Ca^{2+} selektiv gebunden wird, weil besser bindende Metallionen während des evolutionären Entwicklungsprozesses der Bindestellen nicht im biologischen System vorkamen. Aus Mangel an dreiwertigen Kationen konnten sich Ca^{2+} -Bindestellen entwickeln, die eine Unterscheidung zwischen den allgegenwärtigen monovalenten und weiteren divalenten Kationen wie bpsw. Mg^{2+} ermöglichten [200].

5.1.2 Unterschiedliche Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ durch Ln^{3+}

Bei den untersuchten Ln^{3+} gibt es signifikante Unterschiede in den ermittelten $K_{0,5}$ -Werten (Tab. 4.1). Es lassen sich zwei Gruppen bilden, bei denen Ce^{3+} und La^{3+} einen niedrigeren sowie Tb^{3+} und Y^{3+} einen höheren $K_{0,5}$ -Wert der $\text{PLD}\alpha$ -Aktivierung aufweisen. Da ladungsbedingte Unterschiede in der Interaktion der dreiwertigen Ln^{3+} mit den Metallbindestellen der $\text{PLD}\alpha$ auszuschließen sind, könnte eine mögliche Ursache der unterschiedlich starken $\text{PLD}\alpha$ -Aktivierung in den unterschiedlichen effektiven Ionenradien der Ln^{3+} liegen (Tab. 5.2).

Die Anzahl der die Metallbindestelle der $\text{PLD}\alpha$ bildenden Aminosäurereste ist, genau wie die Koordinationszahl des natürlichen Aktivators Ca^{2+} , nicht bekannt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden kann, dass Ca^{2+} und Ln^{3+} mit der gleichen Koordinationszahl mit den Metallbindestellen Ca^{2+} -bindender Proteine interagieren [167]. Bedingt durch die niedrigen $K_{0,5}$ -Werte von Ce^{3+} und La^{3+} und deren im Unterschied zu Tb^{3+} und Y^{3+} ähnlicheren effektiven Ionenradien mit Ca^{2+} kann geschlussfolgert werden, dass bei der Interaktion von Kationen mit der Metallbindestelle der $\text{PLD}\alpha$ der Ionenradius von entscheidender Bedeutung ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Snyder *et al.*, die bei der Untersuchung des dem eukaryotischen *EF-hand*-Motiv ähnlichen *E. coli*-Rezeptor für D-Galaktose und D-Glukose, Radius- und Ladungsabhängige Interaktionen unterschiedlicher ein-, zwei- und dreiwertiger Ionen mit dem Rezeptor nachweisen konnten [200].

Weitere Hinweise auf die Interaktion von Metallionen mit der Metallbindestelle der $\text{PLD}\alpha$ lieferten Verdrängungsexperimente, bei denen das Enzym mit 20 mM CaCl_2 präinkubiert wurde. Da es bei der anschließenden Zugabe divalenter Kationen nur durch steigende Mg^{2+} -Konzentrationen möglich war, die Enzymaktivität signifikant zu reduzieren (Abb. 4.8 A), kann daraus abgeleitet werden, dass Mg^{2+} mit den spezi-

fischen Metallionenbindestellen interagiert ohne jedoch das Enzym zu aktivieren. Bei den durchgeführten Verdrängungsexperimenten zeigten Sr^{2+} und Ba^{2+} keinen Effekt auf die Enzymaktivität. Ähnlich den ermittelten unterschiedlichen $K_{0,5}$ -Werten der Ln^{3+} -Aktivitätsstudien, können ladungsbedingte Unterschiede bei der Interaktion von Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} mit den Metallbindestellen der $\text{PLD}\alpha$ ausgeschlossen werden. Da Sr^{2+} und Ba^{2+} mit der gleichen Koordinationszahl wie Ca^{2+} an die Metallbindestellen von Proteinen binden [211], Mg^{2+} jedoch hauptsächlich mit der Koordinationszahl sechs [209], könnte für die Interaktion divalenter Kationen mit $\text{PLD}\alpha$, ähnlich den dreiwertigen Ln^{3+} , der Ionenradius das entscheidende Ausschlusskriterium sein. Aufgrund des geringeren effektiven Ionenradius scheint eine Interaktion von Mg^{2+} mit den Metallbindestellen der $\text{PLD}\alpha$ möglich, während der größere effektive Ionenradius von Sr^{2+} und Ba^{2+} eine Interaktion verhindert (Tab. 5.2). Es war nicht möglich, die Enzymaktivität durch Zugabe von Na^+ zu senken, welches bei unterschiedlichen Koordinationszahlen einen ähnlichen effektiven Ionenradius wie Ca^{2+} hat (Abb. 4.8 A und Tab. 5.2). Ähnlich den Ln^{3+} , die bedingt durch die im Vergleich zum Ca^{2+} zusätzliche Ladung eine erhöhte Affinität zur

Tabelle 5.2: Ionenradius verwendeter Kationen in Abhängigkeit von der Koordinationszahl. [11].

Kation	Ordnungszahl	Ionenradius (Å)		
		Koordinationszahl		
		6	7	8
Na^+	11	1,02	1,12	1,18
Mg^{2+}	12	0,72	-	0,89
Ca^{2+}	20	1,00	1,06	1,12
Sr^{2+}	38	1,18	1,21	1,26
Ba^{2+}	56	1,35	1,38	1,42
Y^{3+}	39	0,90	0,96	1,02
La^{3+}	57	1,03	1,10	1,16
Ce^{3+}	58	1,01	1,07	1,14
Tb^{3+}	65	0,92	0,98	1,04

$\text{PLD}\alpha$ haben, ist es beim Na^+ durch nur eine positive Ladung nicht möglich, mit der Metallbindestelle der $\text{PLD}\alpha$ zu interagieren und die Enzymaktivität zu beeinflussen. Bei Anwesenheit von 0,02 mM PIP_2 im mizellären Substrat war es durch steigende Mg^{2+} -Konzentrationen nicht mehr möglich, die Aktivität der mit 20 mM präinkubierten $\text{PLD}\alpha$ zu senken (Abb. 4.8 B). Anders als bei vielen anderen PLD s [26, 212] liegt die PIP_2 -Bindestelle der $\text{PLD}\alpha$ (Abb. A.2 im Anhang) innerhalb der auch Metallionen bindenden C2-Domäne [5]. Die gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bindung von PIP_2 konformationelle Änderungen am Enzym induziert, die einer anschließenden Interaktion von Mg^{2+} mit der Metallbindestelle entgegenstehen bzw.

die Selektivität der Metallbindestelle für den natürlichen Aktivator Ca^{2+} erhöht.

5.1.3 Einfluss von PIP_2 auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$

Steigende Mengen PIP_2 wirkten in Gegenwart von 20 mM CaCl_2 bis zu einer Konzentration von 0,002 μM (\cong 0,0002 mol%) aktivitätssteigernd auf $\text{PLD}\alpha$ (Abb. 4.9 A). Andere PLD s des γ -Typs zeigten erst ab einer PIP_2 -Konzentration von 0,1 mol% hydrolytische Aktivität [69]. Da jedoch Phosphoinositide weniger als 0,05 % des Phospholipidanteils pflanzlicher Membranen ausmachen [213], spricht dies für die Bildung von Phosphoinositidclustern innerhalb der Membran, deren PIP_2 -Konzentration für eine Aktivierung von PLD ausreichend ist (Abschnitt 2.2).

Angesichts der geringen PIP_2 -Konzentration, bei denen eine Aktivitätssteigerung der $\text{PLD}\alpha$ beobachtet wurde, können strukturelle Änderungen der Mizellen als Ursache für die Aktivitätssteigerung ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint es zu einer, wie auch im vorangegangenen Abschnitt vermuteten, direkten Interaktion zwischen PIP_2 und der C2-Domäne des Enzyms zu kommen (Abb. A.2 im Anhang).

Eine mögliche Ursache für das in Gegenwart von 0,02 μM PIP_2 beobachtete Absinken des pH-Optimums der $\text{PLD}\alpha$ -Aktivität von pH 5,6 zu pH 5,0 (Abb. 4.9 B) könnte mit der physiologischen Rolle der $\text{PLD}\alpha$ begründet werden. Die Verwundung von Pflanzen, bei der eine verstärkte $\text{PLD}\alpha$ -Aktivität nachgewiesen wurde [40], geht oft mit der Zerstörung der intrazellulären Vakuole einher. Die Zerstörung dieses sauren Ca^{2+} -Reservoirs führt zu einem lokalen Absinken des pH-Wertes und zu einem Konzentrationsanstieg der aus Vakuole und zusätzlich aus dem Apoplasten stammenden Ca^{2+} -Ionen [160]. Die durch die Gegenwart des in pflanzlichen Membranen natürlich vorkommenden $\text{PLD}\alpha$ -Aktivators PIP_2 beobachtete Verschiebung des pH-Optimums der Hydrolysereaktion bestätigt die biologische Funktion der $\text{PLD}\alpha$ bei der Reaktion auf die Verwundung pflanzlicher Zellen.

Weitere Hinweise auf die Aktivierung von $\text{PLD}\alpha$ lieferte die Analyse des Ca^{2+} -Bedarfs bei unterschiedlichen pH-Werten sowie in An- und Abwesenheit von 0,02 μM PIP_2 . Hierbei zeigte sich die absolute Notwendigkeit der Anwesenheit von Ca^{2+} bei der Hydrolysereaktion, da sich auch unter günstigeren Reaktionsbedingungen (Anwesenheit von PIP_2 und pH 5,0) die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ erst in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen detektieren ließ (Abb. 4.9 C und D). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeiten von Dr. Konstantin Kuppe, bei denen bei Verwendung von natürlichem Substrat in Abwesenheit von CaCl_2 ebenfalls keine $\text{PLD}\alpha$ -Aktivität detektierbar war [214]. Im

Vergleich zu den Standardreaktionsbedingungen (pH 5,6, ohne Zugabe von PIP₂) erfolgte die stärkste Aktivitätssteigerung bei pH 5,0, hohen Ca²⁺-Konzentration und in Gegenwart PIP₂.

Die, im Gegensatz zu den Standardreaktionsbedingungen, bei pH 5,0 und Anwesenheit von 0,02 μM PIP₂ ermittelte Aktivitätssteigerung von 18 % (Abb. 4.9 B) lässt sich ebenfalls mit den Ergebnissen aus der Dissertation von Dr. Konstantin Kuppe vergleichen. Dessen Untersuchungen an aus PC bestehenden *small unilamellar vesicles* (SUV) führten in Gegenwart von 2 mol% PIP₂ (≅ 20 μM) zur Verdoppelung der PLD α -Aktivität [214].

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich nur wenige Studien, die die Interaktion von Phospholipasen mit PIP₂ thematisieren. Hierbei handelt es sich um Daten zur separat exprimierten C2-Domäne [62], um Phospholipasen des C-Typs [215] sowie um PLDs, deren PIP₂-Bindestelle in der Nähe des aktiven Zentrums liegt [26]. Dadurch ist es wenig sinnvoll, Parallelen zur Aktivierung der PLD α zu ziehen, deren PIP₂-Bindestelle sich innerhalb der N-terminalen C2-Domäne befindet (Abb. A.2 im Anhang). Dennoch ist erwähnenswert, dass PLD γ aus *A. thaliana* [26] und PLC aus Säugern [216] nur sensitiv gegenüber Phosphoinositiden waren, wenn die Untersuchungen in Gegenwart physiologischer Ca²⁺-Konzentrationen durchgeführt wurden, wohingegen es bei der untersuchten PLD α bei Ca²⁺-Konzentrationen im hohen mM-Bereich zur stärksten Aktivierung durch PIP₂ gekommen ist (Abb. 4.9 C und D).

5.1.4 Schlussfolgerungen aus den Fluoreszenzmessungen zur Bindung von Tb³⁺ an PLD α

Bedingt durch die lumineszenten Eigenschaften von Tb³⁺ konnte die Interaktion von Tb³⁺ mit PLD α auch mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden (Abschnitt 4.3.1).

Die Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgte mit Gleichung 3.5 und zusätzlich mit Gleichung 3.6. Die so ermittelten Bindungsparameter unterschieden sich für das erste Bindungsereignis mit $K_{D1} = 0,0065$ mM TbCl₃ (Gleichung 3.5) und $K_{D1} = 0,034$ mM TbCl₃ (Gleichung 3.6) ca. um den Faktor 5 und liegen somit im gleichen Größenbereich. Der für das zweite Bindungsereignis ermittelte Parameter (K_{D2}) aus Gleichung 3.5 betrug 6,46 mM TbCl₃. Ein Vergleich dieses Wertes mit einem Bindungsparameter aus Gleichung 3.6 ist nicht möglich, da zur Anpassung dieser Gleichung der

K_{D2} separat mit Gleichung 3.7 berechnet wurde (die so ermittelte Dissoziationskonstante betrug 13 mM TbCl_3).

Da die mit den Gleichungen 3.5 und 3.6 bestimmten Dissoziationskonstanten für das erste Bindungsereignis im gleichen Messbereich liegen, bestätigt dies die weiter oben gemachte Aussage, dass beide verwendeten Gleichungen zur Analyse der Ln^{3+} -induzierten Fluoreszenz an $\text{PLD}\alpha$ verwendet werden können.

Auffällig ist, dass eine der mit Gleichung 3.5 ermittelten Dissoziationskonstanten ($K_{D1}=6,50 \mu\text{M}$ und $K_{D2}=6,46 \text{ mM}$) mit dem Wert für die Interaktion von Ca^{2+} und $\text{PLD}\alpha$ vergleichbar ist. Die von Stumpe *et al.* mit Hilfe der Nah-UV-CD-Spektroskopie bestimmten Werte betragen für $K_{D1}=123 \mu\text{M}$ und für $K_{D2}=10,24 \text{ mM}$ [66]. Trotz der im Vergleich zum Ca^{2+} scheinbar stärkeren Interaktion der dreiwertigen Ln^{3+} mit $\text{PLD}\alpha$ (Abschnitte 4.2.1, 4.2.2 und 4.3.2), welches sich u.a. in der Aktivierung des Enzym bei geringen Ln^{3+} -Konzentrationen widerspiegelt, unterscheiden sich die Bindungsparameter nur für K_{D1} um den Faktor 19, während sie für das zweite Bindungsereignis in der gleichen Größenordnung liegen (Tab. 5.1). Hieraus wird geschlussfolgert, dass für die Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ die Besetzung der ersten Metallionenbindestelle mit Kationen entscheidend ist.

Ein weiteres Indiz für die herausragende Bedeutung der ersten Metallionenbindestelle für die Aktivierung des Enzyms ist die Tatsache, dass sich die relativ geringe Aktivität des mit 6 mM TbCl_3 präinkubierten Enzyms durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration nicht steigern ließ (Abschnitt 4.2.2). Da die zweite Metallbindestelle sowohl zu Ca^{2+} und Tb^{3+} die gleiche Affinität besitzt, wird diese Bindestelle bei steigenden Ca^{2+} -Konzentrationen, nach Verdrängung der gebundenen Tb^{3+} -Ionen, auch von Ca^{2+} besetzt. Hätte die zweite Metallbindestelle mit dem höheren K_D -Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität, wäre dies nach Bindung von Ca^{2+} in einer Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit sichtbar geworden.

Da sich die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ nach Inkubation mit CaCl_2 -Konzentrationen im hohen μM -Konzentrationsbereich (Besetzung der ersten Metallionenbindestelle) und der darauf folgenden Zugabe hoher MgCl_2 -, BaCl_2 - bzw. SrCl_2 -Konzentrationen nicht steigern ließ, kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Bindung der Kationen gekommen ist und somit auch die Metallionenbindung an die zweite Bindestelle selektiv erfolgt.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass für die anfängliche Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ die affinere Metallionenbindestelle mit dem niederen K_D -Wert von entscheidender Bedeutung ist, während die zweite Bindestelle mit den ebenfalls selektiv gebundenen Kationen der Aktivierung und zusätzlich der Vermittlung des Kontaktes von Enzym

und Substrat dient.

Dennoch hätte es bei den im Fluoreszenzspektrometer durchgeführten Verdrängungs-experimenten (Abschnitt 4.3.2), bei denen PLD α mit 6 mM TbCl $_3$ präinkubiert wurde, nach Zugabe steigender Mengen CaCl $_2$ zur Verringerung des Fluoreszenzsignals kommen müssen, wenn die an der zweiten Metallbindestelle befindlichen Tb $^{3+}$ -Ionen durch Ca $^{2+}$ verdrängt worden wären. Diese theoretische Verringerung der Fluoreszenzintensität konnte jedoch nicht beobachtet werden.

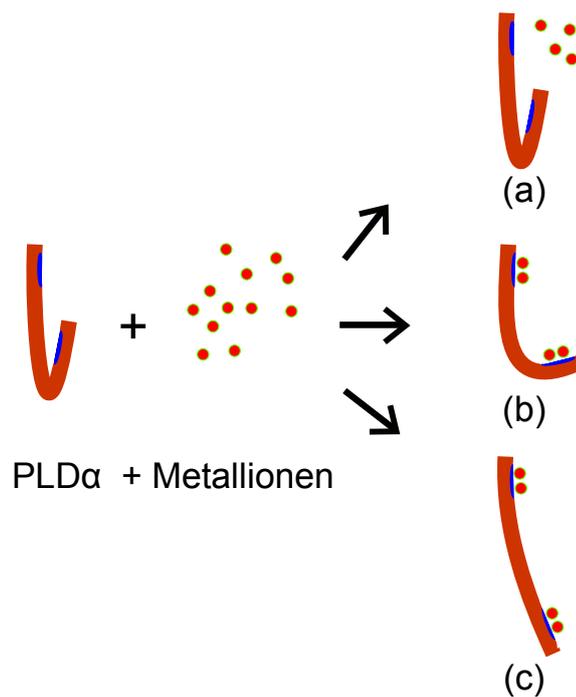


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung unterschiedlicher konformationeller Zustände der PLD α vor und nach der Inkubation mit verschiedenen Metallionen. Keine Konformationsänderung durch Mg $^{2+}$ (a), Ln $^{3+}$ induzieren eine suboptimale Konformationsänderung und Aktivierung (b), Ca $^{2+}$ -Ionen führen zur vollständig aktivierten Enzymkonformation (c).

Dies liegt möglicherweise an der durch die Bindung von Tb $^{3+}$ induzierten Konformationsänderung der PLD α , welche die Aktivierung des Enzyms nach sich zieht. So kann Tb $^{3+}$ das Enzym zwar aktivieren, bedingt durch die zusätzliche Ladung der Ionen gegenüber dem natürlichen Aktivator Ca $^{2+}$ würde aber nur eine unvollständige Konformationsänderung induziert werden, welches sich in der verminderten Enzymaktivität äußert (Abb. 5.2). Die durch Tb $^{3+}$ -Bindung eingenommene Konformation der PLD α könnte die Bindung von Ca $^{2+}$ -Ionen an beiden Metallbindestellen inhibieren. Hierdurch wäre Ca $^{2+}$ nicht in der Lage, das Fluoreszenzsignal durch Verdrän-

gung von Tb^{3+} zu senken bzw. die Aktivität des Enzyms zu steigern.

Ähnliche Beobachtungen wurden für die verschiedenen Bindestellen des Ca^{2+} -abhängigen Na^+/Ca^{2+} -Austauschprotein NCX1 gemacht, bei dem die nachgewiesene Interaktion von Mg^{2+} mit der Ca^{2+} -Bindestelle ohne Induzierung der sonst üblichen konformationellen Änderungen des Proteins stattfand [217]. Die aber dennoch beobachtete Affinitätssteigerung der zweiten Ca^{2+} -Bindestelle von NCX1 wird mit der Neuausrichtung der Ca^{2+} -bindenden Gruppen begründet. Analog dazu könnte die Tb^{3+} -Bindung an $PLD\alpha$ zu einem gegenteiligen Effekt führen.

Die bei der Verwendung aller Ln^{3+} beobachtete geringere Enzymaktivität könnte ihre Ursachen jedoch auch in den mechanistischen Eigenschaften der $PLD\alpha$ haben. Da alle untersuchten Ln^{3+} mit höherer Affinität an $PLD\alpha$ binden (Tab. 4.1), könnte es zur Ausbildung eines Enzym- Ln^{3+} -Substrat-Intermediats (ES' in Abb. 5.3) kommen,

dessen Freie Energie geringer ist als die Freie Energie des Enzym-Substrat-Intermediats bei Verwendung von Ca^{2+} . Hierdurch wird das Erreichen des Übergangszustands (maximale Hydrolysegeschwindigkeit) unwahrscheinlicher und die Enzymaktivität bliebe auf dem beobachteten, im Vergleich zum Ca^{2+} , niedrigen Niveau (Abb. 5.3).

5.1.5 Aktivitätsstudien mit der teilgereinigten $PLD\gamma$

Die Ergebnisse der zum Vergleich mit $PLD\alpha$ hergestellten $PLD\gamma$ haben im Rahmen dieser Arbeit nur orientierenden Charakter.

Die ermittelten Daten zeigen, dass das erstmals exprimierte Gen des anschließend teilgereinigten Enzyms der Klassifizierung als typische PLD des γ -Typs entspricht [25]. Da die höchsten Aktivitätswerte bei Anwesenheit von 0,02 mM PIP_2 und 20 μ M $CaCl_2$

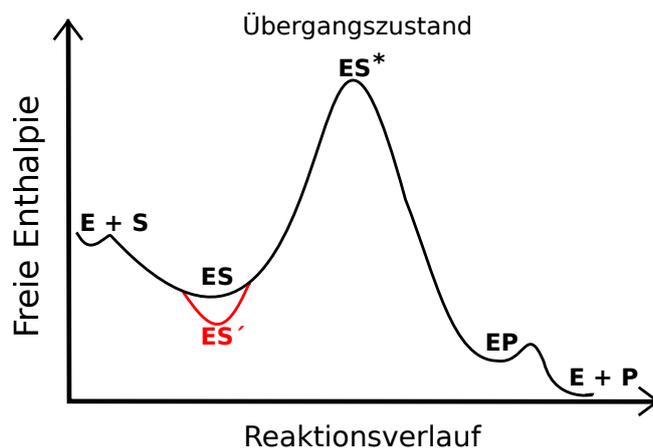


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktion der $PLD\alpha$. Enzym (E), Substrat (S), Produkt (P), Enzym-Substrat-Komplex bei Anwesenheit von Ca^{2+} (ES), Enzym-Substrat-Komplex bei Anwesenheit von Ln^{3+} (ES'), aktivierter Enzym-Substrat-Komplex (ES^*), Enzym-Produkt-Komplex (EP).

gemessen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass höhere Konzentration beider Effektoren inhibierend auf das teilgereinigte Enzym wirken. Ähnliche Ergebnisse erzielten Qin *et al.* [26], die nachwies, dass bei Ca^{2+} -Konzentration über $100 \mu\text{M}$ die Interaktion von radioaktiv markiertem PIP_2 mit $\text{PLD}\gamma$ aus *A. thaliana* inhibiert wurde.

Die Notwendigkeit der Ca^{2+} - und PIP_2 -Bindung für die Aktivität der $\text{PLD}\gamma$ zeigt, dass Ca^{2+} als positiver und negativer Regulator für dieses Enzym agiert und somit die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb einer Zelle zur differentiellen Steuerung unterschiedlicher PLD s dienen kann.

Zum Nachweis von zwei Enzymen des $\text{PLD}\gamma$ -Typs ($\text{PLD}\gamma 1$ und $\text{PLD}\gamma 2$) in den Plasmamembranfraktionen von Weißkohl kam es durch Novotná *et al.* [218]. Da die Zugabe von saurer Phosphatase zu einer deutlichen Minderung der PLD -Aktivität in den Plasmamembranfraktionen führte und mittels Massenspektrometrie potentielle Phosphorylierungsstellen an $\text{PLD}\gamma 1$ nachgewiesen wurden (Abb. A.3 im Anhang), kann davon ausgegangen werden, dass $\text{PLD}\gamma 1$ durch Phosphorylierung reguliert wird.

Aufgrund der unvollständigen Primärstrukturdaten von $\text{PLD}\gamma 1$ und $\text{PLD}\gamma 2$ (Abb. A.3 im Anhang) kann nicht mit genauer Sicherheit festgestellt werden, ob die in dieser Arbeit untersuchte $\text{PLD}\gamma$ mit einem der beiden nachgewiesenen Enzyme identisch ist.

Die durch Novotná *et al.* nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen an $\text{PLD}\gamma 1$ [218] sind mit der gleichen Aminosäurenabfolge auch an der in dieser Arbeit untersuchten $\text{PLD}\gamma$ vorhanden (Abb. A.3 im Anhang). Da jedoch in der vorliegenden Arbeit auch ohne Phosphorylierung eine Aktivierung von $\text{PLD}\gamma$ nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.10), könnte dies eine durch Anwesenheit von Ca^{2+} und PIP_2 ausgelöste basale Aktivität sein, die sich durch eine Phosphorylierung des Enzyms weiter steigern würde.

Bei den von Novotná *et al.* durchgeführten Aktivitätstests wurden PLD -haltige angereicherte Plasmamembranfraktionen verwendet und nicht isolierte Enzyme. Daher besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass die durch Zugabe von saurer Phosphatase beobachtete Aktivitätsverringerng durch andere Enzyme mit PLD -Aktivität verursacht wurde und die Dephosphorylierung keinen Einfluss auf $\text{PLD}\gamma 1$ hatte.

5.2 Metallionenbindung an Substratvesikel

Durch die mit der FeRes-Methode [15] ermittelten großen Unterschiede in den $K_{0,5}$ -Werten wird die ladungsabhängige Wechselwirkung von di- und trivalenten Kationen mit den Substratmizellen deutlich (Abschnitt 4.4.1). Ähnliche ladungsbedingte Unterschiede wurden bei der Interaktionen von Kationen mit verschiedenen anderen Glycerophospholipiden wie PC oder PA im wässrigen System nachgewiesen [15].

Auffällig ist, dass sowohl der $K_{0,5}$ -Wert des Mizell- Ca^{2+} -Komplexes (23,2 mM) als auch das Halbmaximum der Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ ($K_{0,5}=30,0$ mM) bei ähnlichen Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgte (Abb. 4.16 und Tab. 4.1). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass der Grad der Sättigung des Substrates mit Kationen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ haben könnte. Hierdurch wären die unphysiologisch hohen Ca^{2+} -Konzentrationen erklärbar, die zur vollständigen Aktivierung des Enzyms *in vitro* notwendig sind.

Die halbmaximale Sättigung der Substratmizellen mit Tb^{3+} wurde hingegen schon bei einer Konzentration von 0,18 mM erreicht. Zum Erreichen der halbmaximalen Aktivität war hingegen eine TbCl_3 -Konzentration von 2,55 mM notwendig. Da bei einer Konzentration 0,18 mM TbCl_3 nur die erste Metallionenbindestelle der $\text{PLD}\alpha$ mit Tb^{3+} besetzt ist ($K_{D1}=6,5$ μM , Abschnitt 4.3.1), jedoch die zweite ($K_{D2}=6,46$ mM) weitgehend frei von Ionen ist, widerspricht dies gemeinsam mit dem $K_{0,5}$ der Tb^{3+} -Aktivierung der oben genannten Vermutung, dass die Sättigung des Substrats mit Kationen einen Effekt auf die Aktivierung des Enzyms hat.

Über die durch die Ln^{3+} -Ionen induzierten konformationellen Effekte, die möglicherweise für den Substratkontakt des Enzyms nicht optimal sind und daher im Vergleich zum Ca^{2+} eine verminderte Aktivität nach sich ziehen, können bei jetzigem Erkenntnisstand nur Vermutungen geäußert werden (Abschnitt 5.1.4). Aus den ermittelten Konstanten zu Metallionenbindestellen [66] sowie Aktivierung und Sättigung der Membran mit Ca^{2+} scheint es dennoch sehr wahrscheinlich, dass die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ nicht nur von den am Enzym gebundenen, sondern auch von den am Substrat vorhandenen Ca^{2+} -Ionen beeinflusst wird. Erst diese vermitteln die für die Hydrolyse notwendige Interaktion von Enzym und Substrat.

Mit der FeRes-Methode konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Kationenbindungskapazität der Mizellen in Gegenwart von 20 mM CaCl_2 stark von der SDS-Konzentration abhängig ist (Abb. 4.17). Dass das Aktivitätsoptimum der $\text{PLD}\alpha$ bei SDS-Konzentrationen zwischen 2 und 5 mM SDS liegt (Abb. 4.20 A), könnte somit

auf die maximale Anzahl der an der Mizelle gebundenen Kationen zurückzuführen sein, welche die Interaktion des aktivierten Enzyms mit dem Substrat besonders begünstigen.

5.3 Zusammensetzung und Morphologie der Substratvesikel in Korrelation zur PLD-Aktivität

Da sich in der Literatur Hinweise auf die Beeinflussung der Größe und Form von Mizellen fanden (Abschnitt 2.2.3) sollten DLS- und SAXS-Messungen Aufklärung über eine mögliche indirekte Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Substratmizellen liefern.

5.3.1 Schlussfolgerungen aus den DLS-Messungen

Der aktivierende Effekt von Detergenzien auf PLD α ist seit längerem bekannt [24]. So führte bspw. die equimolare Steigerung der Triton X-100- und SDS-Konzentration im mizellärem System zu einer 6-fachen Aktivitätssteigerung von PLD α aus Sonnenblume (*Helianthus annuus*) [219].

Während die Steigerung der SDS-Konzentration des Standardsubstratgemisches (Abschnitt 3.3.7.1) die Aktivität der PLD α anfänglich steigerte (Abb. 4.20 A), führte die Erhöhung der Triton X-100-Konzentration bei gleichzeitiger Abwesenheit von SDS zu einem kontinuierlichen Verlust der Enzymaktivität (Abb. 4.21 A). Da die Präinkubation der PLD α mit SDS bzw. Triton X-100 und ein anschließend durchgeführter Aktivitätstest keine Beeinflussung des Enzyms zeigte (Tab. A.1 im Anhang), konnten denaturierende Effekte beider Detergenzien auf das Enzym ausgeschlossen werden.

Die durchgeführten DLS-Experimente zeigten, dass die schrittweise Konzentrationsänderung der im Standardsubstratgemisch verwendeten Komponenten einen unmittelbaren Einfluss auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen hatte (Abschnitt 4.5.1). Ähnliche Veränderungen der hydrodynamischen Radien wurden bereits für Mizellen aus ionischen und nicht-ionischen Detergenzien beschrieben und mit zahlreichen biophysikalischen Methoden untersucht (Abschnitt 2.2.3). Des Weiteren finden sich Publikation, die sich mit der Berechnung und Vorhersage der CMC, Größe und Form von Mizellen beschäftigen [220, 221].

Der Vergleich der aus Aktivitäts- und DLS-Experimenten gewonnenen Daten zeigt, dass die durch die Erhöhung der SDS-, Triton X-100- und PpNP-Konzentration (Abb. 4.22 A) induzierten Änderungen der Aktivität der PLD α im Wesentlichen mit den beobachteten Änderungen des hydrodynamischen Radius korrelieren. Bei allen durchgeführten Messungen führte die Steigerung bzw. Verringerung des hydrodynamischen Radius auch zum Anstieg bzw. zur Abnahme der PLD α -Aktivität. Einzig die Steigerung der SDS-Konzentration führte ab einer Konzentration von 3 mM SDS zur kontinuierlichen Verringerung der Enzymaktivität. Währenddessen sank der hydrodynamische Radius der Mizellen ab einer Konzentration von 2,5 mM SDS abrupt ab und lässt sich von da an nicht mehr mit Aktivitätswerten korrelieren (Abb. 4.20 A). Da jedoch der Umschwung der Aktivitäts- und Radiuswerte bei der gleichen SDS-Konzentration erfolgte, wird auch hier ein Zusammenhang zwischen beiden Messparametern vermutet.

Die Korrelation des hydrodynamischen Radius mit der Enzymaktivität wurde ebenfalls bei PLD $_{Str}$ beobachtet (Abb. 4.20 B, 4.21 B und 4.22 B), wobei die Aktivitäts- und die DLS-Messungen ohne Zugabe von CaCl $_2$ durchgeführt wurden.

Auffallend ist, dass allein die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 100 mM CaCl $_2$ bei steigenden SDS-Konzentrationen gegenteilige Effekte auf den hydrodynamischen Radius der Mizellen hatte (Abb. 4.20 A und B). Vergleichbar sind diese Ergebnisse mit den Arbeiten von Molina-Boliávar *et al.*, bei denen die Zugabe von 2 M KCl zu Triton X-100 Mizellen zu einem Anstieg des hydrodynamischen Radius von 3,7 auf 7,4 nm führte [150].

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass trotz Abwesenheit regulatorischer Untereinheiten am Enzym, die PLD $_{Str}$ -Aktivität indirekt durch die Größe der Substratmizellen beeinflussbar ist.

Die Berechnung des hydrodynamischen Radius erfolgt im Fall der DLS-Messungen auf der Basis der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 3.8). Da hierbei von einer sphärischen Form der zu messenden Vesikel ausgegangen wird, kann der hydrodynamische Radius von Vesikeln mit abweichender Gestalt nur ungenau wiedergegeben werden. Hierdurch könnte sich die in Abbildung Abb. 4.20 A ab einer SDS-Konzentration von 2,5 mM beobachtete Diskrepanz zwischen der PLD α -Aktivität und dem gemessenen scheinbaren hydrodynamischen Radius erklären.

Zur genaueren Untersuchung der Substratstruktur wurden daher SAXS-Messungen mit ausgewählten Substratzusammensetzungen in An- und Abwesenheit von 100 mM CaCl $_2$ durchgeführt.

5.3.1.1 Schlussfolgerungen aus den SAXS-Messungen

Die sich in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration und der nur in Anwesenheit von 100 mM CaCl_2 mittels SAXS nachgewiesenen Strukturänderungen der Substratmizellen (Abb. 4.23) entsprechen denen in der Literatur für ionische Lösungsmittel beschriebenen Beobachtungen. So beschreiben bspw. Missel *et al.* [222] und Alargova *et al.* [223], dass sich die mit steigenden Detergenzkonzentrationen induzierten Umwandlungen anfänglich sphärischer SDS- bzw. SDP2S-Mizellen hin zu zylindrischen Formen nur in Gegenwart von Kationen beobachten lassen.

Bei den mit SAXS an SDS-Mizellen durchgeführten Untersuchungen von Teixeira *et al.* führten steigende Mengen an 1-Decanol auch ohne Zugabe von Kationen zum Übergang von sphärischen zu zylindrischen Formen [224]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit, ähnlich wie bei Teixeira *et al.*, gemischte Mizellen untersucht wurden, entsprechen die beobachteten Formveränderungen in ihrer Abhängigkeit von der CaCl_2 -Konzentration somit eher den Ergebnissen von Missel *et al.* [222] und Alargova *et al.* [223], die mit Mizellen aus reinen Detergenzien arbeiteten.

Die mittels SAXS gewonnenen Daten bestätigen und erweitern die Ergebnisse der DLS-Messungen. Es zeigte sich, dass die mittels DLS erhaltenen Ergebnisse zum hydrodynamischen Radius des Substrats nur ohne Zugabe von CaCl_2 uneingeschränkt gültig sind, da das Substrat nur hier eine sphärische Form besaß (Abschnitt 4.5.2).

Im Unterschied zur DLS-Messung (Abb. 4.20 B) ließ sich mittels SAXS die Verringerung des hydrodynamischen Radius in Abwesenheit von CaCl_2 erst ab SDS-Konzentrationen ≥ 3 mM nachweisen (R_G in Tab. 4.2). Die dennoch eindeutige Abnahme des hydrodynamischen Radius, bei gleichzeitiger Beibehaltung der sphärischen Mizellform, bestätigt die aus den DLS-Messungen erhaltenen Daten und verifiziert die Abhängigkeit der PLD_{Str} -Aktivität von der Größe der Substratmizellen (Abb. 4.20 B). Aufgrund der Ausbildung zylindrischer Strukturen die in Anwesenheit von 100 mM CaCl_2 beobachtet wurden, bestätigt sich die im letzten Teil des Abschnitts 5.3.1 geäußerte Vermutung. Durch die CaCl_2 -abhängige Strukturänderung geben die DLS-Messungen nur ein ungefähres Bild des hydrodynamischen Radius der Mizellen wieder. Die bei einigen Messungen beobachtete scheinbare Diskrepanz zwischen Mizellradius und Enzymaktivität (Abb. 4.20 A) würde bei einem zukünftig durchgeführten Vergleich von SAXS- und Aktivitätsmessreihen die in dieser Arbeit postulierte Abhängigkeit von hydrodynamischen Radius bzw. Form der Substratmizellen und Enzymaktivität bestätigen.

5.4 Bolalipide als PLD-Substrate

5.4.1 PC-C24-PC

Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass sowohl $PLD\alpha$ als auch PLD_{Str} in der Lage sind, artifizielle Bolalipide mit unterschiedlichen Kettenlängen und PC als Kopfgruppe zu hydrolysieren.

Die höhere Affinität der $PLD\alpha$ gegenüber PLD_{Str} bei Verwendung von PC-C24-PC als Substrat zeigt sich in einem um den Faktor 21 geringeren K_M -Wert und in einer doppelt so hohen Maximalgeschwindigkeit (Abb. 4.24). Die Untersuchung des Einflusses von Detergenzien auf Aktivität der $PLD\alpha$ und PLD_{Str} sowie auf den hydrodynamischen Radius der PC-C24-PC-Mizellen hatte nicht die gleichen eindeutigen Ergebnisse, wie sie für das Standardsubstratgemisch erhalten wurden (Abschnitt 4.5.1). Zwar führte in Abwesenheit von 100 mM $CaCl_2$ die Steigerung der SDS-Konzentration weder zur Beeinflussung der PLD_{Str} -Aktivität, noch änderte sich der hydrodynamische Radius der Mizellen (Abb. 4.25 B). Dennoch blieb in Gegenwart von 100 mM $CaCl_2$ der hydrodynamische Radius der Mizellen bei steigenden SDS-Mengen über einen weiten Konzentrationsbereich relativ konstant, während sich die Aktivität der $PLD\alpha$ kontinuierlich verringerte (Abb. 4.25 A).

Da die Erhöhung der SDS-Konzentration allein keinen inhibierenden Effekt auf die $PLD\alpha$ -Aktivität hatte (Tab. A.1 im Anhang), liegt die Vermutung nahe, dass es, wie schon weiter oben beschrieben, zu strukturellen Änderungen der Mizellen gekommen ist, die die Enzymaktivität beeinflussten und mittels DLS-Messungen nicht nachgewiesen werden konnten.

5.4.2 PC-C32-PC

Die v - S -Charakteristik der PC-C32-PC-Lipide konnte in An- und Abwesenheit von 100 mM $CaCl_2$ nur bis zu einer Konzentration von 1,5 mM PC-C32-PC durchgeführt werden, da weiter steigende Konzentration zur Ausfällung des Lipides führten. Die bis zu dieser Konzentration durchgeführten Messungen ließen keine eindeutige Unterscheidung in der Präferenz von $PLD\alpha$ und PLD_{Str} für PC-C32-PC erkennen (Abb. 4.26).

Die Aktivitäten der $PLD\alpha$ und PLD_{Str} ließen sich in An- und Abwesenheit von 100 mM $CaCl_2$ durch Zugabe von SDS und/oder Triton X-100 zu PC-C32-PC sowohl steigern

als auch senken (Abb. 4.27 und 4.28). Es wird daher wie auch schon in den vorangegangenen Abschnitten vermutet, dass sich bedingt durch die Detergenzien die Form bzw. Anordnung des Substratgemisches änderte, wodurch eine bessere Hydrolyse durch die Enzyme ermöglicht wurde.

5.5 Zusammenfassende Diskussion zur Aktivierung der PLD α

Um die Funktion von Ca²⁺-Ionen bei der Aktivierung der PLD α zusammenfassend zu diskutieren wurden fünf verschiedene Thesen aufgestellt, die die aktivierenden Eigenschaften von Ca²⁺ erklären könnten:

- a) Ca²⁺-Ionen sind als Teil des aktiven Zentrums am Katalysemechanismus beteiligt
- b) Ca²⁺-Ionen sind unspezifisch an der Oberfläche der PLD α gebunden und vermitteln den Kontakt zu den negativ geladenen Substratmolekülen
- c) der Kontakt zu den Phospholipiden der Membran wird durch Ca²⁺-Ionen vermittelt, die spezifisch an PLD α binden
- d) Ca²⁺-Ionen induzieren konformationelle Änderungen an PLD α , die den anschließenden Kontakt mit den Membranlipiden ermöglichen
- e) Ca²⁺-Ionen beeinflussen die Struktur der Membran, wodurch die Bindung der PLD α indirekt begünstigt wird

Als Mitglieder der PLD-Superfamilie benötigen weder PLDs aus Bakterien noch aus Säugetieren Ca²⁺ für ihre Aktivität. Es konnte nachgewiesen werden, dass steigende Ca²⁺-Konzentrationen inhibierend auf die mikrobielle PLD_{Str} wirkt (Abb. 4.11 A). Ebenfalls zeigt die Kristallstruktur bakterieller PLD kein Ca²⁺ im aktiven Zentrum des Enzyms [86], wodurch geschlossen werden kann, dass Ca²⁺ nicht am Katalysemechanismus beteiligt ist [225, 226, 227].

Es scheint daher wahrscheinlich, dass Ca²⁺ auch bei der pflanzlichen PLD α nicht an der Katalyse beteiligt ist und somit Hypothese (a) nicht zutrifft.

Der Bedarf pflanzlicher PLD α nach Ca²⁺-Ionen ist durch das ebenfalls zweiwertige Mg²⁺ nicht zu ersetzen (Abb. 4.5). Da sich Ca²⁺ und Mg²⁺ nicht in ihren Bindungsaffinitäten gegenüber gemischten Mizellen unterscheiden (Abb. 4.16 A) kann Hypo-

these (b), welche den Kontakt durch Enzym und Substrat durch die unspezifische Bindung von Ca^{2+} an $\text{PLD}\alpha$ postuliert, ausgeschlossen werden.

Obwohl Mg^{2+} nicht in der Lage ist $\text{PLD}\alpha$ zu aktivieren, vermögen die Ionen Ca^{2+} von $\text{PLD}\alpha$ zu verdrängen und damit die Enzymaktivität zu senken (Abb. 4.8 A). Beide Ionen binden somit an die gleiche Metallionenbindestelle. Während die Bindung von Ca^{2+} zu einer aktiven Konformation des Enzyms führt, unterbleibt diese bei der Bindung von Mg^{2+} . Daraus folgt, dass Hypothese (d) wahrscheinlicher ist als Hypothese (c).

Die Aktivierung von $\text{PLD}\alpha$ durch Ln^{3+} liegt in dem im Vergleich zum natürlichen Aktivator Ca^{2+} ähnlichen Ionenradius und der mit Ca^{2+} gemeinsam bevorzugten Ausbildung von Bindungen mit geladenem und ungeladenem Sauerstoff vor Stickstoff begründet. Aufgrund der höheren Ladung der Ln^{3+} erfolgt eine stärkere Interaktion mit $\text{PLD}\alpha$. Da die ermittelten Hill-Koeffizienten zwischen 1,2 und 2,6 liegen (Tab. 4.1) kann davon ausgegangen werden, dass wenigstens zwei Ca^{2+} - bzw. zwei Ln^{3+} -Ionen an der Aktivierung beteiligt sind.

Die mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesene Bindung von Tb^{3+} an $\text{PLD}\alpha$ erbrachte zwei Bindungskonstanten, die sich um den Faktor 1000 voneinander unterscheiden (Abschnitt 4.3.1). Die zweite Metallionenbindestelle hat zu Ca^{2+} [66] eine ähnliche Affinität wie zu Tb^{3+} . Da sich bei Verwendung von Tb^{3+} nur an der ersten Metallionenbindestelle ein geringerer K_D nachweisen ließ, wird davon ausgegangen, dass die ersten Metallionenbindestelle entscheidend für die Aktivierung des Enzyms ist, während die zweite im wesentlichen der Vermittlung des Enzym-Substratkontaktes dient.

Verglichen mit Ca^{2+} erreichte die Enzymaktivität bei Verwendung der Ln^{3+} nur ca. 30% des Maximalwertes (Abb. 4.5). Für Hypothese (d) spricht, dass trotz höherer Affinität zur ersten Metallionenbindestelle die zusätzliche positive Ladung der Ln^{3+} eine enzymaktivierende Konformationsänderung zu induzieren scheint, die für die Katalyse weniger optimal ist (Abb 5.2).

Die durch DLS- und SAXS-Messungen nachgewiesenen Einflüsse von Größe und Struktur der Substratmizellen auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$ (Abschnitt 4.5) bestätigen Richtigkeit von Hypothese (e). Zusätzlich scheinen in Abhängigkeit von Kationen- und SDS-Konzentration Mizellstrukturen zu existieren, die eine gesteigerte Akkumulati-

on von Kationen an der Oberfläche der Mizelle ermöglichen (Abschnitt 4.4.2) und so wiederum Einfluss auf die Aktivität der PLD α nehmen.

Die Beeinflussung der Enzymaktivität durch Änderung der Substratstruktur konnte sowohl bei PLD α als auch bei PLD $_{Str}$ nachgewiesen werden, der jegliche regulatorische Untereinheiten fehlen. Hierdurch kann von einer indirekten Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Substratstruktur ausgegangen werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass der die PLD α aktivierende Effekt durch Ca $^{2+}$ auf zwei Bindungsereignissen beruht. Zunächst ist eine Konformationsänderung erforderlich, die durch Ca $^{2+}$ -Konzentrationen im μ M-Bereich induziert wird. Zur Entfaltung der Aktivität müssen weitere Ca $^{2+}$ -Ionen an das Enzym gebunden werden, wobei hierfür Konzentrationen im mM-Bereich erforderlich sind (Abb. 5.2).

Während Mg $^{2+}$ -Ionen zwar um die Bindungsplätze am Enzym konkurrieren, aber keine Konformationsänderung zur kompetenten Enzymform herbeiführen können, binden Ln $^{3+}$ mit höherer Affinität an PLD α als Ca $^{2+}$. Hierdurch kommt es ebenfalls zur Überführung in eine aktive Enzymform, die allerdings nicht die maximale Aktivität entfalten kann (Abb. 5.2).

Außer dem Effekt von Ca $^{2+}$ und anderen Kationen auf die Enzymkonformation beeinflussen Metallionen und Detergenzien die Struktur der Substrataggregate (Ladung, Größe, Gestalt) und modulieren somit indirekt die Enzymaktivität.

6 Zusammenfassung

Pflanzliche Phospholipasen sind bedingt durch ihr breites Substratspektrum wichtige Hilfsmittel zur industriellen Herstellung artifizierlicher Phospholipide sowie zur Modifikation von Phospholipiden bei der Produktion von Lebensmitteln und Biodiesel aus Pflanzenölen (*degumming*).

Aufgrund der hohen Ca^{2+} -Konzentrationen, die zur vollständigen Aktivierung von Phospholipasen des α -Typs notwendig sind, kann jedoch die Verwendung solcher Enzyme zu prozesstechnischen Problemen führen. Die genaue Kenntnis der molekularen Regulationsmechanismen kann somit ein Schlüssel für die erfolgreiche industrielle Anwendung dieser Enzyme sein.

Um die Aktivierung von Phospholipase D ($\text{PLD}\alpha$) aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*) zu verstehen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Ca^{2+} -Ionen bei der Interaktion des Enzyms mit dessen Substrat untersucht. Zur Erreichung dieses Zieles wurden folgende Aspekte genauer untersucht:

- Einfluss verschiedener Kationen und Detergenzien auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$
- Bindungsverhalten von Kationen an Substratmizellen
- Einfluss verschiedener Kationen und Detergenzien auf den hydrodynamischen Radius und die Struktur der Substratmizellen
- Einfluss des hydrodynamischen Radius und der Struktur der Substratmizellen auf die Aktivität der $\text{PLD}\alpha$

Neben Aktivitätsstudien und Membranbindungsexperimenten wurden zahlreiche biophysikalische Methoden wie Fluoreszenzspektroskopie, Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Röntgenkleinwinkelstreuexperimente (SAXS) durchgeführt.

Um ein differenziertes Bild der $\text{PLD}\alpha$ -Aktivierung zu erlangen, wurden die ebenfalls zu PLD-Superfamilie gehörenden Enzyme $\text{PLD}\gamma$ aus Weißkohl und PLD aus *Streptomyces* (PLD_{Str}) in ausgewählte Experimente einbezogen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen führten zu den folgenden Ergebnissen:

- Ionen der Seltenen Erden (Ln^{3+}) sind die einzigen Metallionen, die Ca^{2+} -Ionen bei der Aktivierung der $\text{PLD}\alpha$ ersetzen können. Wie für Ca^{2+} existieren mindestens zwei Bindungszentren unterschiedlicher Affinität im mikro- und millimolaren Bereich. Trotz der höheren Bindungsaffinität der Ln^{3+} wird nicht die gleiche maximale Aktivität wie beim Ca^{2+} erreicht.
- Mg^{2+} -Ionen konkurrieren um die Ca^{2+} -Bindungsplätze an $\text{PLD}\alpha$, können jedoch nicht die zur Aktivierung erforderliche Konformationsänderung des Enzyms induzieren. Mg^{2+} kann Ca^{2+} auch in Gegenwart von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) nicht ersetzen.
- Neben der Ladung ist der effektive Ionenradius der Kationen entscheidend für die Interaktion mit den Metallbindestellen der $\text{PLD}\alpha$.
- Die Affinität der Ln^{3+} ist im Vergleich zum Ca^{2+} auch gegenüber den anionischen Substratvesikeln um ca. zwei Zehnerpotenzen höher.
- Weder das neutrale Detergenz Triton X-100 (≤ 10 mM) noch das anionische Detergenz SDS (≤ 10 mM) haben einen direkten inaktivierenden Einfluss auf $\text{PLD}\alpha$.
- Detergenzien wie Triton X-100 und SDS verändern die Mizellgröße bzw. -gestalt und beeinflussen hierbei die PLD -Aktivität. Demzufolge muss bei der Interpretation von Aktivitätsdaten, die bei veränderten Substratzusammensetzungen ermittelt wurden, der mögliche Einfluss der Substratstruktur auf die Enzymaktivität berücksichtigt werden.
- Das erstmalig in *E. coli* exprimierte Gen sowie die anschließende Teilreinigung und Charakterisierung der $\text{PLD}\gamma$ aus Weißkohl (*B. oleracea* var. capitata) zeigten, dass durch die Inaktivierung des Enzyms bei hohen μM -Konzentrationen an CaCl_2 und PIP_2 die differentielle Steuerung unterschiedlicher PLDs möglich ist.
- Die erstmals nachgewiesene Hydrolyse bipolarer Amphiphile (sog. Bolalipide) durch PLDs verdeutlicht das breite Substratspektrum dieser Enzyme und bietet die Möglichkeit zur Anwendung im industriellen und medizinischen Bereich.

7 Literaturverzeichnis

- [1] M. Li, Y. Hong, and X. Wang. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1791:927–935, 2009.
- [2] Y. S. Kolesnikov, K. P. Nokhrina, S. V. Kretynin, I. D. Volotovskii, J. Martinec, G. A. Romanov, and V. S. Kravets. Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochemistry (Mosc)*, 77:1–14, 2012.
- [3] S. F. Yang, S. Freer, and A. A. Benson. Transphosphatidylolation by phospholipase D. *J Biol Chem*, 242:477–484, 1967.
- [4] R. Ulbrich-Hofmann, A. Lerchner, M. Oblozinsky, and L. Bezakova. Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnol Lett*, 27:535–544, 2005.
- [5] I. Schöffner, K. P. Rücknagel, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann. Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage. *Eur J Lipid Sci Technol*, 104:79–87, 2002.
- [6] Mark McDermott, Michael J O. Wakelam, and Andrew J. Morris. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*, 82:225–253, 2004.
- [7] W. Cho and R. V. Stahelin. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim Biophys Acta*, 1761:838–849, 2006.
- [8] M. A. Lemmon. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:99–111, 2008.
- [9] S. Cesarini, R. F. Haller, P. Diaz, and P. M. Nielsen. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. *Biotechnol Biofuels*, 7:29, 2014.
- [10] D. Yu, Y. Ma, L. Jiang, E. Walid, S. He, Y. He, Z. Xiaoyu, J. Zhang, and L. Hu. Stability of soybean oil degumming using immobilized phospholipase A(2). *J Oleo Sci*, 63:25–30, 2014.
- [11] R. D. Shannon. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A*, 32:751–767, 1976.

- [12] J. L. Kropp and W. M. Windsor. Enhancement of fluorescence yield of rare-earth ions by heavy water. *J Chem Phys*, 39:2769–2770, 1963.
- [13] P. A. Oude Weernink, M. López de Jesús, and M. Schmidt. Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 374:399–411, 2007.
- [14] J. Mansfeld and R. Ulbrich-Hofmann. Modulation of phospholipase D activity in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1791:913–926, 2009.
- [15] M. Dippe, L. Dressler, and R. Ulbrich-Hofmann. Fe(III)-resorcyate as a spectrophotometric probe for phospholipid-cation interactions. *Anal Biochem*, 445:54–59, 2014.
- [16] R. Winter and F. Noll. Methoden der Biophysikalischen Chemie. *Teubner Verlag*, 1998.
- [17] X. Wang, S. P. Devaiah, W. Zhang, and R. Welti. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 45:250–278, 2006.
- [18] J. Idkowiak-Baldys, A. Baldys, J. R. Raymond, and Y. A. Hannun. Sustained receptor stimulation leads to sequestration of recycling endosomes in a classical protein kinase C- and phospholipase D-dependent manner. *J Biol Chem*, 284:22322–22331, 2009.
- [19] R. Ulbrich-Hofmann. Enzyme-catalysed transphosphatidylation. *Eur J Lipid Sci Technol*, 105:305–307, 2003.
- [20] A. O. Müller, C. Mrestani-Klaus, J. Schmidt, R. Ulbrich-Hofmann, and M. Dippe. New cardiolipin analogs synthesized by phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation. *Chem Phys Lipids*, 165:787–793, 2012.
- [21] H. Brachwitz, M. Oelke, J. Bergmann, and P. Langen. Alkylphospho-L-serine analogues: Synthesis of cytostatically active alkylphosphono derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:1739–1742, 1997.
- [22] I. Aurich, P. Dürschmidt, A. Schierhorn, and R. Ulbrich-Hofmann. Production of octadecylphospho-L-serine by phospholipase D. *Biotechnol. Letters*, 24:585–590, 2002.
- [23] M. Heller. Phospholipase D. *Adv Lipid Res*, 16:267–326, 1978.
- [24] M. Heller, P. Greenzaid, and D. Lichtenberg. The activity of phospholipase D on aggregates of phosphatidylcholine, dodecylsulfate and calcium. *Adv Exp Med Biol*, 101:213–220, 1978.
- [25] X. Wang. Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog Lipid Res*, 39:109–149, 2000.

- [26] W. Qin, K. Pappan, and X. Wang. Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLD γ and regulation of plant PLD γ , - β , and - α by polyphosphoinositides and calcium. *J Biol Chem*, 272:28267–28273, 1997.
- [27] D. R. Johnson, R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll, and J. I. Gordon. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu Rev Biochem*, 63:869–914, 1994.
- [28] P. J. Casey. Protein lipidation in cell signaling. *Science*, 268:221–225, 1995.
- [29] J. Zheng, D. R. Knighton, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, and L. F. Ten Eyck. Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci*, 2:1559–1573, 1993.
- [30] C. Qin and X. Wang. The arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol*, 128:1057–1068, 2002.
- [31] A. Contardi and A. Ercoli. Über die enzymatische Spaltung der Lecithine und Lysolecithine. *Biochem. Z.*, 261:275–302, 1933.
- [32] D.J. Hanahan and I.L. Chaikoff. A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J Biol Chem.*, 169:699–705, 1947.
- [33] X. Wang. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol*, 139:566–573, 2005.
- [34] S. P. Devaiah, X. Pan, Y. Hong, M. Roth, R. Welti, and X. Wang. Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in Arabidopsis. *Plant J*, 50:950–957, 2007.
- [35] Y. Ohashi, A. Oka, R. Rodrigues-Pousada, M. Possenti, I. Ruberti, G. Morelli, and T. Aoyama. Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science*, 300:1427–1430, 2003.
- [36] M. Potocký, M. Eliás, B. Profotová, Z. Novotná, O. Valentová, and V. Zárský. Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. *Planta*, 217:122–130, 2003.
- [37] H. Xue, X. Chen, and G. Li. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Curr Opin Plant Biol*, 10:483–489, 2007.
- [38] J. Qi, G. Zhou, L. Yang, M. Erb, Y. Lu, X. Sun, J. Cheng, and Y. Lou. The chloroplast-localized phospholipases D α 4 and α 5 regulate herbivore-induced direct and indirect defenses in rice. *Plant Physiol*, 157(4):1987–1999, Dec 2011.

- [39] T. Munnik, H. J. Meijer, B. Ter Riet, H. Hirt, W. Frank, D. Bartels, and A. Musgrave. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J*, 22:147–154, 2000.
- [40] Y. Han, P. and Yuan. Lipidomic analysis reveals activation of phospholipid signaling in mechanotransduction of *Taxus cuspidata* cells in response to shear stress. *FASEB J*, 23:623–630, 2009.
- [41] A. Singh, A. Pandey, V. Baranwal, S. Kapoor, and G. K. Pandey. Comprehensive expression analysis of rice phospholipase D gene family during abiotic stresses and development. *Plant Signal Behav*, 7(7):847–855, Jul 2012.
- [42] M. Li, R. Welti, and X. Wang. Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D zeta1 and D zeta2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol*, 142:750–761, 2006.
- [43] A. Cruz-Ramírez, A. Oropeza-Aburto, F. Razo-Hernández, E. Ramírez-Chávez, and L. Herrera-Estrella. Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:6765–6770, 2006.
- [44] H. Tjellström, M. X. Andersson, K. E. Larsson, and A. S. Sandelius. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ*, 31:1388–1398, 2008.
- [45] T. Munnik. Phosphatidic acid: An emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci*, 6:227–233, 2001.
- [46] A. M. Kabachevskaya, G. V. Liakhnovich, M. A. Kisel, and Igor D. Volotovskii. Red/far-red light modulates phospholipase D activity in oat seedlings: Relation of enzyme photosensitivity to photosynthesis. *J Plant Physiol*, 164:108–110, 2007.
- [47] G. Li and H.-W. Xue. *Arabidopsis* PLDzeta2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell*, 19:281–295, 2007.
- [48] B. O. R. Bargmann, A. M. Laxalt, B. T. Riet, E. Schouten, W. van Leeuwen, H. L. Dekker, C. G. de Koster, M. A. Haring, and T. Munnik. Lep1dbeta1 activation and relocalization in suspension-cultured tomato cells treated with xylanase. *Plant J*, 45:358–368, 2006.
- [49] T. Jacob, S. Ritchie, S. M. Assmann, and S. Gilroy. Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:12192–12197, 1999.

- [50] S. Ritchie and S. Gilroy. Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:2697–2702, 1998.
- [51] L. Fan, S. Zheng, and X. Wang. Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. *Plant Cell*, 9:2183–2196, 1997.
- [52] S. B. Ryu and X. Wang. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochim Biophys Acta*, 1303:243–250, 1996.
- [53] L. Xu, S. Zheng, L. Zheng, and X. Wang. Promoter analysis and expression of a phospholipase D gene from castor bean. *Plant Physiol*, 115:387–395, 1997.
- [54] D.S. Bush. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46:95–122, 1995.
- [55] M. R. Knight, S. M. Smith, and A. J. Trewavas. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:4967–4971, 1992.
- [56] P. Schopfer and A. Brennicke. *Pflanzenphysiologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2010.
- [57] T. Björkman and R. E. Cleland. The role of extracellular free-calcium gradients in gravitropic signalling in maize roots. *Planta*, 185:379–384, 1991.
- [58] F.R. Harker and M.A. Venis. Measurement of intracellular and extracellular free calcium in apple fruit cells using calcium-selective microelectrodes. *Plant, Cell and Environment*, 14:525–530, 1991.
- [59] J. Kopka, C. Pical, A. M. Hetherington, and B. Müller-Röber. Ca²⁺/phospholipid-binding (C2) domain in multiple plant proteins: novel components of the calcium-sensing apparatus. *Plant Mol Biol*, 36:627–637, 1998.
- [60] C. P. Ponting and P. J. Parker. Extending the C2 domain family: C2s in PKCs delta, epsilon, eta, theta, phospholipases, GAPs, and perforin. *Protein Sci*, 5:162–166, 1996.
- [61] Y. Hong, W. Zhang, and X. Wang. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environ*, 33:627–635, 2010.
- [62] K. Tiwari and G. Paliyath. Cloning, expression and functional characterization of the C2 domain from tomato phospholipase Dalpha. *Plant Physiol Biochem*, 49:18–32, 2011.
- [63] L. Zheng, R. Krishnamoorthi, M. Zolkiewski, and X. Wang. Distinct Ca(II) binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase Dalpha and beta. *J Biol Chem*, 275:19700–19706, 2000.

- [64] R. Schöps, A. Schierhorn, I. Schäffner, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann. Identification of phospholipase D from cabbage as N-terminally acetylated PLD2. *J Protein Chem*, 21:407–411, 2002.
- [65] Y. Hong, S. P. Devaiah, S. C. Bahn, B. N. Thamasandra, M. Li, R. Welti, and X. Wang. Phospholipase D epsilon and phosphatidic acid enhance Arabidopsis nitrogen signaling and growth. *Plant J*, 58:376–387, 2009.
- [66] S. Stumpe, S. König, and R. Ulbrich-Hofmann. Insights into the structure of plant alpha-type phospholipase D. *FEBS J*, 274:2630–2640, 2007.
- [67] K. Pappan, L. Zheng, R. Krishnamoorthi, and X. Wang. Evidence for and characterization of Calcium-induced binding to the catalytic region of Arabidopsis thaliana phospholipase Dbeta. *J Biol Chem*, 279:47833–47839, 2004.
- [68] T. Ischebeck, S. Seiler, and I. Heilmann. At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma*, 240:13–31, 2010.
- [69] K. Pappan, W. Qin, J. H. Dyer, L. Zheng, and X. Wang. Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLDbeta, from Arabidopsis. *J Biol Chem*, 272:7055–7061, 1997.
- [70] C. Qin, M. Li, W. Qin, S. C. Bahn, C. Wang, and X. Wang. Expression and characterization of Arabidopsis phospholipase Dgamma2. *Biochim Biophys Acta*, 1761:1450–1458, 2006.
- [71] S. B. Ryu, B. H. Karlsson, M. Ozgen, and J. P. Palta. Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:12717–12721, 1997.
- [72] S. L. Austin-Brown and K. D. Chapman. Inhibition of phospholipase D alpha by N-acylethanolamines. *Plant Physiol*, 129:1892–1898, 2002.
- [73] S. Cai and J. H. Exton. Determination of interaction sites of phospholipase D1 for RhoA. *Biochem J*, 355:779–785, 2001.
- [74] C. Subra, D. Grand, K. Laulagnier, A. Stella, G. Lambeau, M. Paillasse, P. De Medina, B. Monsarrat, B. Perret, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, and M. Record. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*, 51:2105–2120, 2010.
- [75] W. Lein and G. Saalbach. Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochim Biophys Acta*, 1530:172–183, 2001.

- [76] J. Zhao and X. Wang. Arabidopsis phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 279:1794–1800, 2004.
- [77] T. T. Allgyer and M. A. Wells. Phospholipase D from savoy cabbage: purification and preliminary kinetic characterization. *Biochemistry*, 18:5348–5353, 1979.
- [78] R. Lambrecht and R. Ulbrich-Hofmann. A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 373:81–88, 1992.
- [79] A. Abousalham, J. Nari, M. Teissère, N. Ferté, G. Noat, and R. Verger. Study of fatty acid specificity of sunflower phospholipase D using detergent/phospholipid micelles. *Eur J Biochem*, 248:374–379, 1997.
- [80] P. R. Cullis, M. J. Hope, and C. P. Tilcock. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids*, 40:127–144, 1986.
- [81] E. E. Kooijman, V. Chupin, N. L. Fuller, M. M. Kozlov, B. de Kruijff, K. N. J. Burger, and P. R. Rand. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry*, 44:2097–2102, 2005.
- [82] K. Kuppe, A. Kerth, A. Blume, and R. Ulbrich-Hofmann. Calcium-induced membrane microdomains trigger plant phospholipase D activity. *Chembiochem*, 9:2853–2859, 2008.
- [83] C. P. Ponting and I. D. Kerr. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci*, 5:914–922, 1996.
- [84] A. Suzuki, K. Kakuno, Y. Iwasaki, T. Yamane, and T. Yamane. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55:317–319, 1999.
- [85] J. A. Stuckey and J. E. Dixon. Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol*, 6:278–284, 1999.
- [86] I. Leiros, F. Secundo, C. Zambonelli, S. Servi, and E. Hough. The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure*, 8:655–667, 2000.
- [87] D. R. Davies, H. Interthal, J. J. Champoux, and W. G. J. Hol. The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Tdp1. *Structure*, 10:237–248, 2002.
- [88] A. Lerchner, J. Mansfeld, K. Kuppe, and R. Ulbrich-Hofmann. Probing conserved amino acids in phospholipase D (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for their importance in hydrolysis and transphosphatidylolation activity. *Protein Eng Des Sel*, 19:443–452, 2006.

- [89] T. C. Sung, R. L. Roper, Y. Zhang, S. A. Rudge, R. Temel, S. M. Hammond, A. J. Morris, B. Moss, J. Engebrecht, and M. A. Frohman. Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J*, 16:4519–4530, 1997.
- [90] Z. Xie, W. T. Ho, and J. H. Exton. Conserved amino acids at the C-terminus of rat phospholipase D1 are essential for enzymatic activity. *Eur J Biochem*, 267:7138–7146, 2000.
- [91] M. Y. Liu, S. Gutowski, and P. C. Sternweis. The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity. *J Biol Chem*, 276:5556–5562, 2001.
- [92] Y. Uesugi, K. Mori, J. Arima, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka. Recognition of phospholipids in streptomyces phospholipase D. *J Biol Chem*, 280:26143–26151, 2005.
- [93] Y. Uesugi, J. Arima, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka. C-terminal loop of Streptomyces phospholipase D has multiple functional roles. *Protein Sci*, 16:197–207, 2007.
- [94] Y. Uesugi, J. Arima, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka. Sensor of phospholipids in Streptomyces phospholipase D. *FEBS J*, 274:2672–2681, 2007.
- [95] A. Suzuki, K. Kakuno, R. Saito, Y. Iwasaki, T. Yamane, and Yamane T. Crystal structure of phospholipase D from Streptomyces antibioticus. *PDB-Nummer 2ZE4*, 2007.
- [96] R. M. Dawson. The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D. *Biochem J*, 102:205–210, 1967.
- [97] K. Jung, E. Koh, and M. U. Choi. Catalytic properties of phospholipase D using phosphatidic acid as an activator. *Bull Korean Chem Soc*, 10:595–600, 1989.
- [98] N. Dittrich, R. Haftendorn, and R. Ulbrich-Hofmann. Hexadecylphosphocholine and 2-modified 1,3-diacylglycerols as effectors of phospholipase d. *Biochim Biophys Acta*, 1391:265–272, 1998.
- [99] J. L. Harwood. *Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis*. The Biochemistry of Plants, vol. 4. Academic Press, New York, 1980.
- [100] J. G. Wallis and J. Browse. Mutants of Arabidopsis reveal many roles for membrane lipids. *Prog Lipid Res*, 41:254–278, 2002.
- [101] I. A. Guschina, J. D. Everard, A. J. Kinney, P. A. Quant, and J. L. Harwood. Studies on the regulation of lipid biosynthesis in plants: Application of control analysis to soybean. *Biochim Biophys Acta*, 1838:1488–1500, 2014.
- [102] D. R. Slochower, Y.-H. Wang, R. W. Tourdot, R. Radhakrishnan, and P. A. Janmey. Counterion-mediated pattern formation in membranes containing anionic lipids. *Adv Colloid Interface Sci*, 208:177–188, 2014.

- [103] B. H. Honig, W. L. Hubbell, and R. F. Flewelling. Electrostatic interactions in membranes and proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 15:163–193, 1986.
- [104] S. Ohnishi and T. Ito. Clustering of lecithin molecules in phosphatidylserine membranes induced by calcium ion binding to phosphatidylserine. *Biochem Biophys Res Commun*, 51:132–138, 1973.
- [105] D. M. Haverstick and M. Glaser. Visualization of Ca(II)-induced phospholipid domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:4475–4479, 1987.
- [106] W. Wang, N. A. Anderson, A. Travasset, and D. Vaknin. Regulation of the electric charge in phosphatidic acid domains. *J Phys Chem B*, 116:7213–7220, 2012.
- [107] Y.-H. Wang, A. Collins, L. Guo, K. B. Smith-Dupont, F. Gai, T. Svitkina, and P. A. Janmey. Divalent cation-induced cluster formation by polyphosphoinositides in model membranes. *J Am Chem Soc*, 134:3387–3395, 2012.
- [108] G. v.d. Bogaart, K. Meyenberg, H. J. Risselada, H. Amin, K. I. Willig, B. E. Hubrich, M. Dier, S. W. Hell, H. Grubmüller, U. Diederichsen, and R. Jahn. Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature*, 479:552–555, 2011.
- [109] W. G. Ellenbroek, Y.-H. Wang, D. A. Christian, D. E. Discher, P. A. Janmey, and A. J. Liu. Divalent cation-dependent formation of electrostatic pip2 clusters in lipid monolayers. *Biophys J*, 101:2178–2184, 2011.
- [110] H. Träuble and H. Eibl. Electrostatic effects on lipid phase transitions: membrane structure and ionic environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71:214–219, 1974.
- [111] E. E. Kooijman, K. M. Carter, E. G. van Laar, V. Chupin, K. N. J. Burger, and B. de Kruijff. What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry*, 44:17007–17015, 2005.
- [112] A.G. Volkov, S. Paula, and D. W. Deamer. Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. *Bioelectrochem Bioenerg*, 42:153–160, 1997.
- [113] M. Y. Kiriukhin and K. D. Collins. Dynamic hydration numbers for biologically important ions. *Biophys Chem*, 99:155–168, 2002.
- [114] M. Lösche and H. Möhwald. Electrostatic interactions in phospholipid membranes: II. Influence of divalent ions on monolayer structure. *Journal of Colloid and Interface Science*, 131:56–67, 1989.

- [115] I. Levental, A. Cebers, and P. A. Janmey. Combined electrostatics and hydrogen bonding determine intermolecular interactions between polyphosphoinositides. *J Am Chem Soc*, 130:9025–9030, 2008.
- [116] I. Levental, P. A. Janmey, and A. Cebers. Electrostatic contribution to the surface pressure of charged monolayers containing polyphosphoinositides. *Biophys J*, 95:1199–1205, 2008.
- [117] M. De Rosa, A. Gambacorta, and A. Gliozzi. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol Rev*, 50:70–80, 1986.
- [118] S. Li, F. Zheng, X. Zhang, and W. Wang. Stability and rupture of archaeobacterial cell membrane: a model study. *J Phys Chem B*, 113:1143–1152, 2009.
- [119] M. Nishihara, H. Morii, and Y. Koga. Structure determination of a quartet of novel tetraether lipids from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biochem*, 101:1007–1015, 1987.
- [120] G. D. Sprott. Structures of archaeobacterial membrane lipids. *J Bioenerg Biomembr*, 24:555–566, 1992.
- [121] T. Benvegnu, M. Brard, and D. Plusquellec. Archaeobacteria bipolar lipid analogous: structure, synthesis and lyotropic properties. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 8:469–479, 2004.
- [122] A. Meister and A. Blume. Self-assembly of bipolar amphiphiles. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 12:138–147, 2007.
- [123] S. Drescher, A. Meister, G. Graf, G. Hause, A. Blume, and B. Dobner. General synthesis and aggregation behaviour of new single-chain bolaphospholipids: variations in chain and headgroup structures. *Chemistry*, 14:6796–6804, 2008.
- [124] G. B. Patel and G. D. Sprott. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol*, 19:317–357, 1999.
- [125] G. B. Patel, B. J. Agnew, L. Deschatelets, L. P. Fleming, and G. D. Sprott. In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *Int J Pharm*, 194:39–49, 2000.
- [126] E. Soussan, A. Pasc-Banu, S. Consola, T. Labrot, E. Perez, M. Blanzat, R. Oda, C. Vidal, and I. Rico-Lattes. New cationic triblock amphiphiles: supramolecular organization of a sugar-derived bolaamphiphile associated with dicarboxylates. *Chemphyschem*, 6:2492–2494, 2005.

- [127] D. Paolino, R. Muzzalupo, A. Ricciardi, C. Celia, N. Picci, and M. Fresta. In vitro and in vivo evaluation of Bola-surfactant containing niosomes for transdermal delivery. *Biomed Microdevices*, 9:421–433, 2007.
- [128] J.W. McBain. Mobility of highly-charged micelles. *Trans Faraday Soc*, 9:99–101, 1913.
- [129] D. Yu, G. Huang, F. Xu, M. Wang, S. Liu, and F. Huang. Triton X-100 as an effective surfactant for the isolation and purification of photosystem I from *Arthrospira platensis*. *Photosynth Res*, 2014.
- [130] M. Altschuler, D. K. Heddens, R. R. jr. Diveley, and G. C. Krescheck. Plasmid DNA isolation utilizing a novel nonionic detergent. *Biotechniques*, 17:434,436, 1994.
- [131] C. Viegas, T. Faria, A Quintal Gomes, R. Sabino, A. Seco, and S. Viegas. Fungal contamination in two portuguese wastewater treatment plants. *J Toxicol Environ Health A*, 77:90–102, 2014.
- [132] D. Lichtenberg, R. J. Robson, and E. A. Dennis. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim Biophys Acta*, 737:285–304, 1983.
- [133] R. J. Robson and E. A. Dennis. Characterization of mixed micelles of phospholipids of various classes and a synthetic, homogeneous analogue of the nonionic detergent Triton X-100 containing nine oxyethylene groups. *Biochim Biophys Acta*, 508:513–524, 1978.
- [134] R. J. Buxeda, JT Nickels, Jr, C. J. Belunis, and G. M. Carman. Phosphatidylinositol 4-kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Kinetic analysis using Triton X-100/phosphatidylinositol-mixed micelles. *J Biol Chem*, 266:13859–13865, 1991.
- [135] Y. P. Lin and G. M. Carman. Kinetic analysis of yeast phosphatidate phosphatase toward Triton X-100/phosphatidate mixed micelles. *J Biol Chem*, 265:166–170, 1990.
- [136] T. G. Warner and E. A. Dennis. Action of the highly purified, membrane-bound enzyme phosphatidylserine decarboxylase *Escherichia coli* toward phosphatidylserine in mixed micelles and erythrocyte ghosts in the presence of surfactant. *J Biol Chem*, 250:8004–8009, 1975.
- [137] G. M. Carman and W. Dowhan. Phosphatidylserine synthase from *Escherichia coli*. The role of Triton X-100 in catalysis. *J Biol Chem*, 254:8391–8397, 1979.
- [138] Y. A. Hannun, C. R. Loomis, and R. M. Bell. Protein kinase C activation in mixed micelles. Mechanistic implications of phospholipid, diacylglycerol, and calcium interdependencies. *J Biol Chem*, 261:7184–7190, 1986.

- [139] D. Sugimori, Y. Matsumoto, Y. Tomita, K. Murayama, and C. Ogino. Kinetic characterization and Mg(II) enhancement of streptomyces griseocarneus sphingomyelinase C produced by recombinant Streptomyces lividans. *Protein Expr Purif*, 81:151–156, 2012.
- [140] N. A. Smirnova. Phase behaviour and self-assembly patterns of surfactant mixtures in solutions. *Russian Chemical Reviews*, 74:129–144, 2005.
- [141] N. A. Mazer and G. B. Benedek. An investigation of the micellar phase of sodium dodecyl sulfate in aqueous sodium chloride solutions using quasielastic light scattering spectroscopy. *J Phys Chem*, 80:1075–1085, 1976.
- [142] T. Odijk. Impact of nonuniform counterion condensation on the growth of linear charged micelles. *Physica A*, 176:201–205, 1991.
- [143] W. Brown, R. Rymdik, J. van Stam, M. Almgren, and G. Svensk. Static and dynamic properties of nonionic amphiphile micelles: Triton X-100 in aqueous solution. *J Phys Chem*, 93:2512–2519, 1989.
- [144] H. H. Paradies. Shape and size of a nonionic surfactant micelle. Triton X-100 in aqueous solution. *J Phys Chem*, 84:599–607, 1980.
- [145] P. S. Goyal, S. V. G. Menon, B. A. Dasannacharya, and P. Thiyagarajan. Small-angle neutron-scattering study of micellar structure and interparticle interactions in Triton X-100 solutions. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 51:2308–2315, 1995.
- [146] A. B. Mandai, S. Ray, A. M. Biswas, and S. P. Moulik. Physicochemical studies on the characterization of Triton X-100 micelles in an aqueous environment and in the presence of additives. *J Phys Chem*, 84:856–859, 1980.
- [147] R. J. Robson and E. A. Dennis. The size, shape, and hydration of nonionic surfactant micelles. Triton x-100. *J. Phys. Chem.*, 81:1075–1078, 1977.
- [148] C. Tanford, Y. Nozaki, and M. F. Rohde. Size and shape of globular micelles formed in aqueous solution by n-alkyl polyoxyethylene ether. *J Phys Chem*, 81:1555–1560, 1977.
- [149] J. A. Molina-Bolívar, J. Aguiar, and C. Carnero Ruiz. Growth and hydration of Triton X-100 micelles in monovalent alkali salts: A light scattering study. *J Phys Chem B*, 106:870–877, 2002.
- [150] J. A. Molina-Bolívar, J. Aguiar, and C. Carnero Ruiz. Light scattering and fluorescence probe studies on micellar properties of Triton X-100 in KCl solutions. *MOLECULAR PHYSICS*, 99:1729–1741, 2001.

- [151] N. Dharaiya and P. Bahadur. Phenol induced growth in Triton X-100 micelles: Effect of pH and phenols hydrophobicity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 410:81–90, 2012.
- [152] P. S. Denkova, L. Van Lokeren, and R. Willem. Mixed micelles of Triton X-100, sodium dodecyl dioxyethylene sulfate, and synperonic L61 investigated by NOESY and diffusion ordered NMR spectroscopy. *J Phys Chem B*, 113:6703–6709, 2009.
- [153] R. Alargova, J. Petkov, D. Petsev, I. B. Ivanov, G. Broze, and A. Mehreteab. Light scattering study of sodium dodecyl polyoxyethylene-2-sulfate micelles in the presence of multivalent counterions. *Langmuir*, 11:1530–1536, 1995.
- [154] R. G. Alargova, K. D. Danov, J. T. Petkov, P. A. Kralchevsky, G. Broze, and A. Mehreteab. Sphere-to-Rod Transition in the Shape of Anionic Surfactant Micelles Determined by Surface Tension Measurements. *Langmuir*, 13:5544–5551, 1997.
- [155] R. G. Alargova, V. P. Ivanova, P. A. Kralchevsky, A. Mehreteab, and G. Broze. Growth of rod-like micelles in anionic surfactant solutions in the presence of Ca²⁺ counterions. *A Colloids Surf A*, 142:201–218, 1998.
- [156] D. T. Clarkson. Calcium-transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant Cell Environ*, 7:449–456, 1984.
- [157] B. Sattelmacher. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol*, 149:167–172, 2001.
- [158] K. D. Hirschi. Expression of arabidopsis CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell*, 11:2113–2122, 1999.
- [159] S. J. Conn, M. Gilliam, A. Athman, A. W. Schreiber, U. Baumann, I. Moller, N. H. Cheng, M. A. Stancombe, K. D. Hirschi, A. A. R. Webb, R. Burton, B. N. Kaiser, S. D. Tyerman, and R. A. Leigh. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by *cax1* regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in arabidopsis. *Plant Cell*, 23:240–257, 2011.
- [160] J. K. Pittman. Vacuolar ca(II) uptake. *Cell Calcium*, 50:139–146, 2011.
- [161] C. H. Johnson, M. R. Knight, T. Kondo, P. Masson, J. Sedbrook, A. Haley, and A. Trevaas. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*, 269:1863–1865, 1995.
- [162] M. R. McAinsh, A. A. R. Webb, J. E. Taylor, and A. M. Hetherington. Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *Plant Cell*, 7:1207–1219, 1995.

- [163] M. C. Martí, M. A. Stancombe, and A. A. R. Webb. Cell- and stimulus type-specific intracellular free Ca(II) signals in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 163:625–634, 2013.
- [164] O. Batistic and J. Kudla. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1820:1283–1293, 2012.
- [165] I. S. Day, V. S. Reddy, G. Shad Ali, and A. S. N. Reddy. Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis. *Genome Biol*, 3:RESEARCH0056, 2002.
- [166] J. E. Burke and E. A. Dennis. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*, 50 Suppl:S237–S242, 2009.
- [167] E. Pidcock and G. R. Moore. Structural characteristics of protein binding sites for calcium and lanthanide ions. *J Biol Inorg Chem*, 6:479–489, 2001.
- [168] V. M. Goldschmidt. Geochemische Verteilungsgesetze der Elemente, Teil V: Isomorphie und Polymorphie der Sesquioxyde. Die Lanthaniden-Kontraktion und ihre Konsequenzen. Oslo, 1925.
- [169] R. B. Martin and F. S. Richardson. Lanthanides as probes for calcium in biological systems. *Quart Rev Biophysics*, 12:181–209, 1979.
- [170] F. S. Richardson. Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chem Rev*, 82:541–552, 1982.
- [171] T. G. Sotiroidis. Lanthanide ions and Cd(II) are able to substitute for Ca(II) in regulating phosphorylase kinase. *Biochem Int*, 13:59–64, 1986.
- [172] M. C. Maurer, C. M. Grisham, and J. J. Sando. Activation and inhibition of protein kinase C isozymes alpha and beta by gd3+. *Arch Biochem Biophys*, 298:561–568, 1992.
- [173] J. P. Reeves and M. Condrescu. Lanthanum is transported by the sodium/calcium exchanger and regulates its activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285:C763–C770, 2003.
- [174] J. D. Walters and J. D. Johnson. Terbium as a luminescent probe of metal-binding sites in protein kinase C. *J Biol Chem*, 265:4223–4226, 1990.
- [175] D. Chaudhuri, WD Horrocks, Jr, J. C. Amburgey, and D. J. Weber. Characterization of lanthanide ion binding to the EF-hand protein S100 beta by luminescence spectroscopy. *Biochemistry*, 36:9674–9680, 1997.
- [176] G. H. Dieke. Spectra and energy levels of rare earth ions in crystals. *Interscience*, New York, 1968.

- [177] L. Guo, B. Yan, J.-L. Liu, K. Sheng, and X.-L. Wang. Coordination bonding construction, characterization and photoluminescence of ternary lanthanide (Eu(III), Tb(III)) hybrids with phenylphenacyl-sulfoxide modified bridge and polymer units. *Dalton Trans*, 40:632–638, 2011.
- [178] S. V. Eliseeva and J.-C. G. Bünzli. Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chem Soc Rev*, 39:189–227, 2010.
- [179] H. G. Brittain, F. S. Richardson, and R. B. Martin. Terbium (iii) emission as a probe of calcium(ii) binding sites in proteins. *J Am Chem Soc*, 98:8255–8260, 1976.
- [180] F. S. Richardson and A. D. Gupta. Spectroscopic studies on the interaction of the antibiotic lasalocid A (x537a) with lanthanide(III) ions in methanol. *J Am Chem Soc*, 103:5716–5725, 1981.
- [181] I. Hemmilä and V. Laitala. Progress in lanthanides as luminescent probes. *J Fluoresc*, 15:529–542, 2005.
- [182] K. Sheng and B. Yan. A new luminescent molecular based terbium hybrid material containing both organic polymeric chains and inorganic silica networks. *J Mater Sci: Mater Electron*, 21:65–71, 2010.
- [183] T. Azumi and K. Matsuza. What does the term vibronic coupling mean? *Photochemistry and Photobiology*, 25:315–326, 1977.
- [184] S. Faulkner, A. Beeby, R. S. Dickins, D. Parker, and J. A. Gareth Williams. Generating a warm glow: Lanthanide complexes which luminesce in the near-IR. *J Fluoresc*, 9:45–49, 1999.
- [185] I. Schöffner. Identifizierung und rekombinante Herstellung von Phospholipase D Isoenzymen aus Weißkohl (brassica oleracea var. capitata). *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001.
- [186] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [187] H. Blum, H. Beier, and J. Gross. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93–99, 1987.
- [188] P. D'Arrigo, V. Piergianni, D. Scarcelli, and S. Servi. A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Analytica Chimica Acta*, 304:249–254, 1995.
- [189] G. Hübner, R. Weidhase, and A. Schellenberger. The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase: a first approach. *Eur J Biochem*, 92:175–181, 1978.

- [190] J. Ermer. Beiträge zur Untersuchung von Transition-State-Strukturen enzymkatalysierter Reaktionen am Beispiel der Pyruvatdecarboxylase. Lösungsmittel-Isotopieeffekte und pL-Abhängigkeit der kinetischen Parameter der Enzymaktivierung und Enzymkatalyse. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1988.
- [191] F. J. Alvarez, J. Ermer, G. Huebner, A. Schellenberger, and R. L. Schowen. Catalytic power of pyruvate decarboxylase. Rate-limiting events and microscopic rate constants from primary carbon and secondary hydrogen isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:8402–8409, 1991.
- [192] A. Dietrich and S. König. Substrate activation behaviour of pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum* cv. Miko. *FEBS Lett*, 400:42–44, 1997.
- [193] S. Reich, R. P. Golbik, R. Geissler, H. Lilie, and S.-E. Behrens. Mechanisms of activity and inhibition of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*, 285:13685–13693, 2010.
- [194] G. Sudlow, D. J. Birkett, and D. N. Wade. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*, 11:824–832, 1975.
- [195] R. Pecora. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2:123–131, 2000.
- [196] D. I. Svergun. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J*, 76:2879–2886, 1999.
- [197] S. Drescher. Synthese und physiko-chemische Charakterisierung einkettiger symmetrischer Bolaamphiphile. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2008.
- [198] K. Köhler, G. Förster, A. Hauser, B. Dobner, U. F. Heiser, F. Ziethe, W. Richter, F. Steiniger, M. Drechsler, H. Stettin, and A. Blume. Self-assembly in a bipolar phosphocholine-water system : The formation of nanofibers and hydrogels. *Angew Chem Int Ed*, 43:245–247, 2004.
- [199] K. Pappan and X. Wang. Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*, 1439:151–166, 1999.
- [200] E. E. Snyder, B. W. Buoscio, and J. J. Falke. Calcium(II) site specificity: effect of size and charge on metal ion binding to an EF-hand-like site. *Biochemistry*, 29:3937–3943, 1990.
- [201] J. Bruno, W.D. Horrocks, Jr, and K. Beckingham. Characterization of Eu(III) binding to a series of calmodulin binding site mutants using laser-induced Eu(III) luminescence spectroscopy. *Biophys Chem*, 63:1–16, 1996.

- [202] W. Li and Aldrich. R. W. Activation of the SK potassium channel-calmodulin complex by nanomolar concentrations of terbium. *PNAS*, 106:1075–1080, 2009.
- [203] J. D. Moore, M. A. Skinner, D. R. Swatman, Hawkins, and K. A. Brown. Reactivation of 3-dehydroquinase synthase by lanthanide cations. *J Am Chem Soc*, 120:7105–7106, 1998.
- [204] D. R. Tomchick, R. J. Turner, R. L. Switzer, and J. L. Smith. Adaptation of an enzyme to regulatory function: structure of bacillus subtilis pyrR, a pyr rna-binding attenuation protein and uracil phosphoribosyltransferase. *Structure*, 6:337–350, 1998.
- [205] Y. C. Sekharudu and M. Sundaralingam. A structure-function relationship for the calcium affinities of regulatory proteins containing EF-hand pairs. *Protein Eng*, 2:139–146, 1988.
- [206] B. J. Marsden, R. S. Hodges, and B. D. Sykes. ¹H-NMR studies of synthetic peptide analogues of calcium-binding site III of rabbit skeletal troponin C: effect on the lanthanum affinity of the interchange of aspartic acid and asparagine residues at the metal ion coordinating positions. *Biochemistry*, 27:4198–4206, 1988.
- [207] N. C. Strynadka and M. N. James. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem*, 58:951–998, 1989.
- [208] A. Kaufman-Katz, J. P. Glusker, S. A. Beebe, and Charles Bock. C. W. Calcium ion coordination: A comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc. *J Am Chem Soc*, 118:5752–5763, 1996.
- [209] M. I. Bernal-Uruchurtu and I. Ortega-Blake. A refined Monte Carlo study of Mg(II) and Ca(II) hydration. *J Chem Phys*, 103:1588–1598, 1995.
- [210] R. C. Dunbar, N. C. Polfer, G. Berden, and J. Oomens. Metal ion binding to peptides: Oxygen or nitrogen sites? *Int J Mass spectrom*, 330–332:71–77, 2012.
- [211] S. Kumar, E. Ahmad, S. Kumar, R. H. Khan, and S. Gourinath. Flexibility of EF-hand motifs: structural and thermodynamic studies of Calcium Binding Protein-1 from *Entamoeba histolytica* with Pb(II), Ba(II), and Sr(II). *BMC Biophys*, 5:15, 2012.
- [212] L. Zheng, J. Shan, R. Krishnamoorthi, and X. Wang. Activation of plant phospholipase Dbeta by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: Characterization of binding site and mode of action. *Biochemistry*, 41:4546–4553, 2002.
- [213] B. K. Drobak. Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol*, 102:705–709, 1993.

- [214] K. Kuppe. Die Modulation der Aktivität von Phospholipase D aus *Brassica oleracea* var. capitata durch die Membraneigenschaften. *Dissertation*, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, 2009.
- [215] S. D. Rupwate and R. Rajasekharan. C2 domain is responsible for targeting rice phosphoinositide specific phospholipase C. *Plant Mol Biol*, 78:247–258, 2012.
- [216] S. G. Rhee and K. D. Choi. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase c isozymes. *J Biol Chem*, 267:12393–12396, 1992.
- [217] L. Boyman, H. Mikhasenko, R. Hiller, and D. Khananshvili. Kinetic and equilibrium properties of regulatory calcium sensors of ncx1 protein. *J Biol Chem*, 284:6185–6193, 2009.
- [218] Z. Novotná, J. Linek, R. Hynek, J. Martinec, M. Potocký, and O. Valentová. Plant PIP2-dependent phospholipase D activity is regulated by phosphorylation. *FEBS Lett*, 554:50–54, 2003.
- [219] S. Abdelkafi and A. Abousalham. Kinetic study of sunflower phospholipase D: Interactions with micellar substrate, detergents and metals. *Plant Physiol Bioch*, 49:752–757, 2011.
- [220] R. Nagarajan. Molecular theory for mixed micelles. *Langmuir*, 1:331–341, 1985.
- [221] G. K. Bourov and A. Bhattacharya. Brownian dynamics of mixed surfactant micelles. *J Chem Phys*, 123:204712, 2005.
- [222] P. J. Missel, N. A. Mazer, G. B. Benedek, and C. Y. Young. Thermodynamic analysis of the growth of sodium dodecyl sulfate micelles. *J Phys Chem*, 84:1044–1057, 1980.
- [223] R. G. Alargova, J. T. Petkov, and D. N. Petsev. Micellization and interfacial properties of alkyloxyethylene sulfate surfactants in the presence of multivalent counterions. *J Colloid Interface Sci*, 261:1–11, 2003.
- [224] C. V. Teixeira, R. Itri, and L. Queiroz do Amaral. Micellar shape transformation induced by decanol: A study by small-angle x-ray scattering (SAXS). *Langmuir*, 16:6102–6109, 2000.
- [225] Y. Iwasaki, H. Nakano, and T. Yamane. Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 42:290–299, 1994.
- [226] E. B. Gottlin, A. E. Rudolph, Y. Zhao, H. R. Matthews, and J. E. Dixon. Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:9202–9207, 1998.

- [227] J. Damnjanovic and Y. Iwasaki. Phospholipase D as a catalyst: Application in phospholipid synthesis, molecular structure and protein engineering. *J Biosci Bioeng*, 116:271–280, 2013.

Anhang

Tabelle A.1: Einfluss von Triton X-100 und SDS auf Aktivität der PLDs. Die PLDs wurden für 5 min mit 10 mM Triton X-100 bzw. 10 mM SDS in 100 mM Na-Acetat, pH 5,6 inkubiert. Anschließend wurde die spezifische Aktivität der Enzyme mit dem PpNP-Aktivitätstest (Abschnitt 3.3.7.1) bestimmt.

Enzym	Detergenz	Aktivität ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
PLD α	-	10,80 \pm 1,55
"	10 mM Triton X-100	9,98 \pm 1,32
"	10 mM SDS	10,17 \pm 1,74
PLD $_{Str}$	-	13,40 \pm 2,58
"	10 mM Triton X-100	11,57 \pm 2,58
"	10 mM SDS	12,41 \pm 2,81

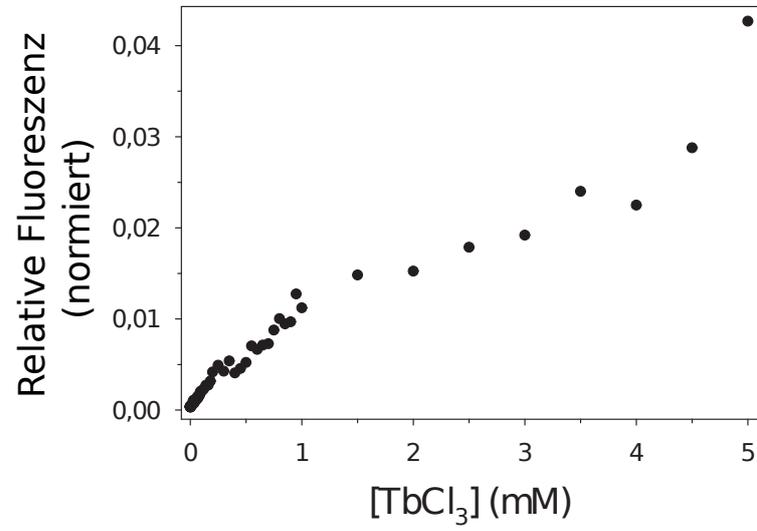


Abbildung A.1: Vergrößerte Darstellung des Messbereiches zwischen 0 und 5 mM TbCl₃ aus [Abbildung 4.13](#). Der relativ schwache Anstieg der Fluoreszenz zwischen 1,5 und 4,5 mM TbCl₃ wurde als Hintergrundsignal identifiziert.

Anhang

PLD α	MAQH-----LHGTLHATIYEVDALHTGG--	24
PLD γ	MAHHPIYTETLSMGGGSSHGFGQQPVPFATSSGFLRVELLHGNLDIWKKEAKHLPNMDGF	60
	:* : **.* : *..* . .	
PLD α	-LRSAGFLGKIIS-NVEETIGFGKGETQLYATIDLQKARVGRTRKLTDEPKNPKWYESFH	82
PLD γ	HNRLGGMLSLTRRNSSKDEKPSKITSDPYVTVSISGAVIGRTFVVISN-SENPVVMQHFD	119
	* .*:*. : * .: . * : : * .*:..* * : : * .*	
PLD α	IYCAHMASDIIFTVKDDNPIGATLIGRAYVPVDEVINGEEVEKWVE	142
PLD γ	VPVAHSAAEVHFVVKSDIIGSQIMGAVGTPTEQLSSGNRIEGFFPILNSSGPKPCKQGAV	179
	: ** *::: *.***.: **: :.* . *.: : .*:.* : . **.. : * : :	
PLD α	IHVKLQYFAVEADRNNWNGVKS-AKFPQVPTFFSQRQCKVSLYQGAHVPDNFVPKIPL	201
PLD γ	LSLSVQYTPVERMRLYQMGVGFNECVGVPPTYFPLRKGGRVTLYQDAHVDDGTLPVSVYL	239
	: :.:** .** * : :*** : ** *:* . ** * : :***.*** * . :*.: *	
PLD α	AGGKNYEPHRCWEDIFDAITNAKHLIYITGWSVYTEITLVRDSRRPKPGDMLTGLLKK	261
PLD γ	DGAQYRHKCWEWMADAIRQARRLVYITGWSVYHPVRLVRRNNDPTDG---TLGDLKA	296
	** :.* : ****: ** * : : :***** : *** .. * . * ***:***	
PLD α	KATEGVRVLLLVWDDRTSVDVL--KKDGLMATHDEDTENYFNGSEVHCVLCPRNPDDGGS	319
PLD γ	KSQEGVRVLLVWDDPTSRSLLGFKTQGMNNTSDEETRRFFKHSSVQVLLCPRSGKGHS	356
	* : *****:***** * * .:* * : : * * * : : * : : * . * : :***** . . * *	
PLD α	IVQNLQVSAMFTHHQKIVVDSEVPSQGGSEMRRIMSFVGGIDLCDGRYDTPFHSLFRT	379
PLD γ	FIKKSEVGTIYTHHQKTVIVDADA-----GQNRKIVAFVGGLDVCNGRFDTPKHPLFRT	411
	: : : : * . : : :***** * : : * : . * : : :***** : * : * : * : * * . * . * . * . *	
PLD α	LDTVHHDDFHQPNTGASITKGGPREPQWDIHSRLEGPIAWDLVLYNFEQRWSKQGGKDI	439
PLD γ	LKTLLHKDDFHNPFL--TTADDGPREPWHDLHDKVDGPAAYDVLANFEERWRKASKSRGL	469
	* . * : *	
PLD α	VKLRELSD-----IITPSPVMFQEDHDVWNVQLFRSIDGAAAGFPDSPEVA	487
PLD γ	GKLRASDDSLLSIERIQDIVGLSEVSSVNENDPETWHAQVFRSIDSSSVKGFPKDPKEA	529
	***. ** : : : . : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PLD α	AEAGLVSGKDNVIDRSIQDAYIHAIRRAKDFIYIENQYFLGSSFAWAADGITPEDINALH	547
PLD γ	TGRNLLCGKNILIDMSIHAAYVKAIRSAQHFIYIENQYFLGSSFNWDSN---KDLGANN	585
	: . * : . * : : * * * : * : : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PLD α	LIPKELSLKIVDKIEKGEKFRVYVVPMWPEGIPESASVQAILDWQRRTLEMMYKDVDTQA	607
PLD γ	LPIEIALKIANKIRAREKFAAYIVIPMWPEGAPTSNPIQRILYWQHKTMMYQTIHKA	645
	*** * : : * * . : * * . * * : : *	
PLD α	LRAQGLE--EDPRNYLTFCLGNREVKK--EGEYEPERP-----DPDTPDMRAQEARF	658
PLD γ	LVEVGLDGQYEPQDFLNFCLGTREVADGTVSVNSPRTPPKSNANANAIQVQALKSRF	705
	* ** : : : : * . * * * . * * * . * : . . * * : : : : * : : * : * * *	
PLD α	MIYVSKMMIVDDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGGYQPHLSHRQPAR--GQVHG	716
PLD γ	MIYVSKGMVVDDEFVLIGSANINQRSLEGTRGTEIAMGGYQPHSWAKKGSRPRGQIFG	765
	***** * : * * * : : : *	
PLD α	FRMSLWYEHGLMDETFLDPSLECIKVNRIADKYWDFYSSSELEHDLPGHLLRYPISV	776
PLD γ	YRMSLWAEHLGFLEQGFEENMECVRVRQLSELNWRQYAAEEVT-EMQGHLLLEYPVQV	824
	: * * * * * * * * : : * * . : * * . : * : : : * * * : * : * : : : * * * * * * * * * * * * *	
PLD α	DNEGNI TELPGFEFFPDSKARILGNKVDYLPPI LTT	812
PLD γ	DRTGKVSSLPGETFPDLGGKIIG-SFLALQENLTI	859
	* . * : : . * * * * * * * . : * : * . . * * *	

Abbildung A.2: Alignment der Aminosäuresequenzen von PLD α und PLD γ aus Weißkohl mit Kennzeichnung wichtiger Domänenstrukturen. Potentielle Myristilierungsstelle (MGxxxS) der PLD γ (■), C2-Domäne (■), PIP₂-Bindestelle (R/KxxxxRxRK) der PLD α (□), HKD-Motive (■). Die Markierung der Domänenstrukturen erfolgte nach [26] und [5]. Das Alignment wurde mit dem Programm *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt.

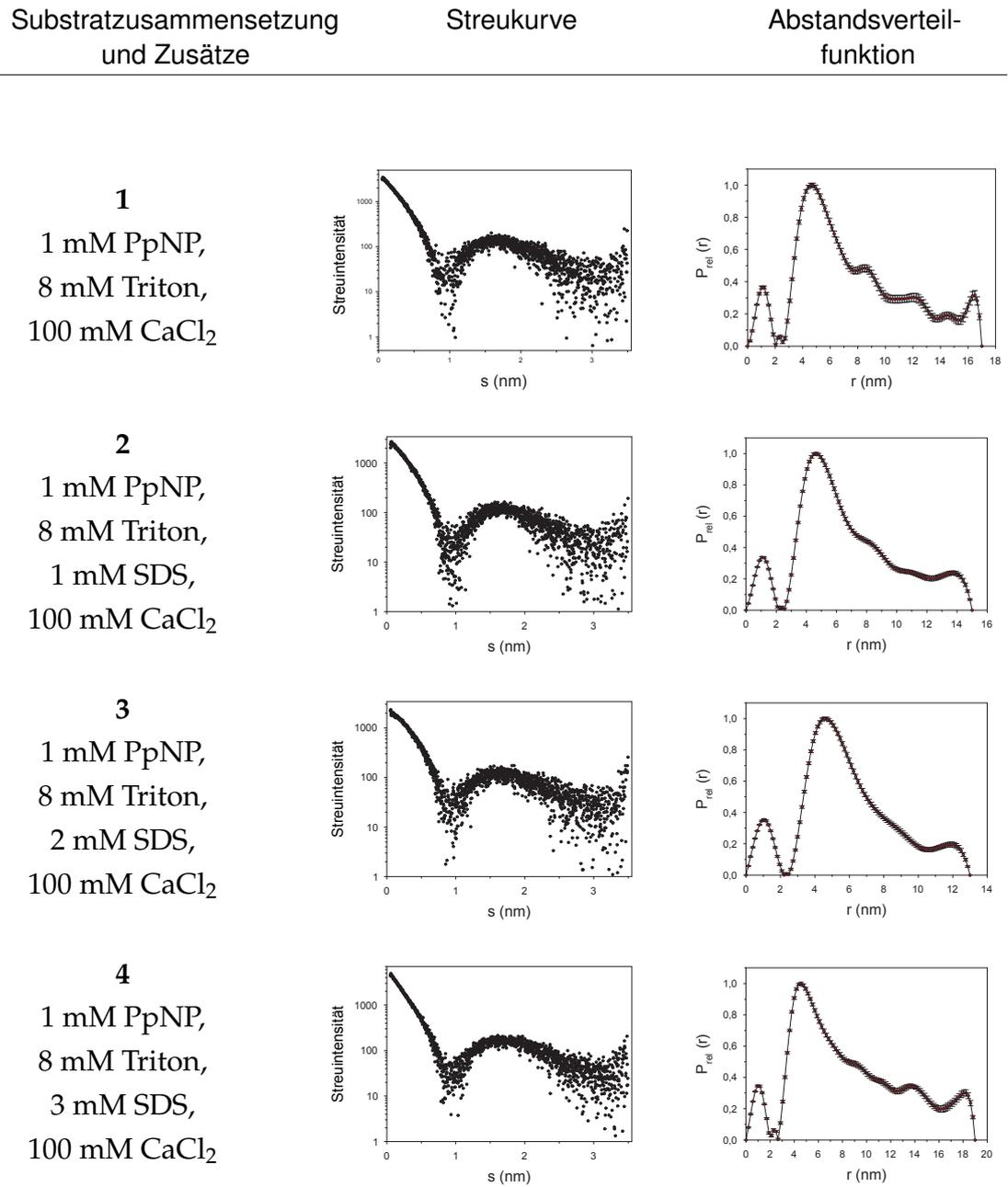
Anhang

PLD γ 2	FVLI G SANINKRSLEGTRDTEIAMGGYQLHHSWAKKGSRPRGQIYGYRMSLWAEHLGFLE	333
PLD γ 1	-----	632
PLD γ	FVLI G SANINQRSLEGTRGTEIAMGGYQPHHSWAKKGSRPRGQIFGYRMSLWAEHLGFLE	779
PLD γ 2	QGFEEPE-MECVRRVRHLSELNWRQYAAEEVTVM T SHLLKYPVQVDRTGKVSSLP G CKTF	392
PLD γ 1	-----	632
PLD γ	QGFEEPENMECVRRVRQLSELNWRQYAAEEVTEMQGHLLLEYPVQVDRTGKVSSLP G CETF	839
PLD γ 2	PDVGGKIGHVLWAGTKPIHLEVTL	416
PLD γ 1	-----	632
PLD γ	PDLGGKIIGSFLALQENLTI----	859

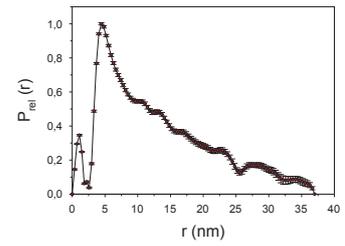
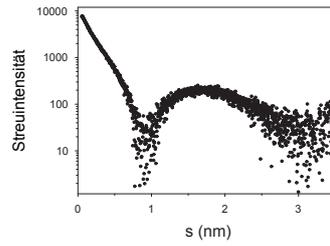
Abbildung A.3: *Alignment* der Aminosäuresequenzen von PLD γ sowie den aus der Publikation von Novotná *et al.* [218] entnommenen Sequenzen der in Weißkohl nachgewiesenen Enzyme PLD γ 1 und PLD γ 2. Mittels Massenspektrometrie detektierte mögliche Phosphorylierungsstellen der PLD γ 1 (■). Das *Alignment* wurde mit dem Programm *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt.

SAXS Daten

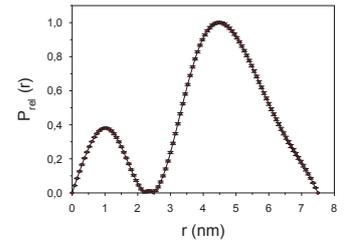
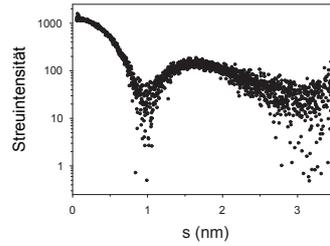
Nachfolgend sind die durch unterschiedliche Substratzusammensetzungen erhaltenen Streudaten der Mizellen, sowie die darauf beruhende Abstandsverteilungsfunktion dargestellt. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Gnom.



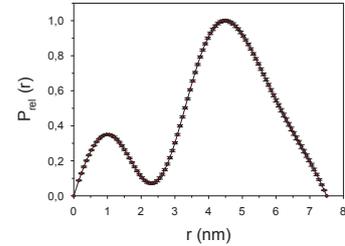
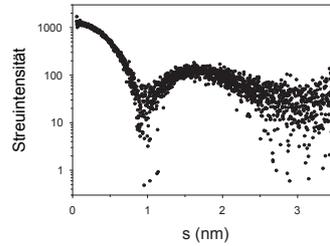
5
 1 mM PpNP,
 8 mM Triton,
 8 mM SDS,
 100 mM CaCl₂



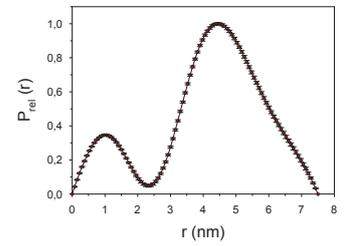
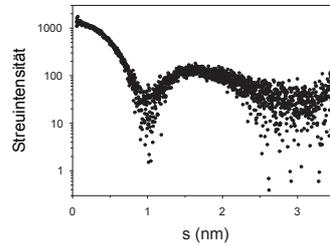
6
 1 mM PpNP,
 8 mM Triton



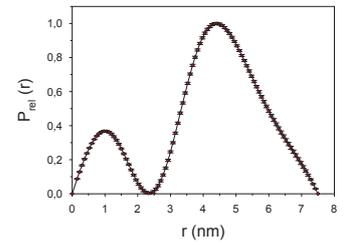
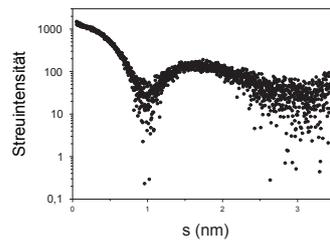
7
 1 mM PpNP,
 8 mM Triton,
 1 mM SDS



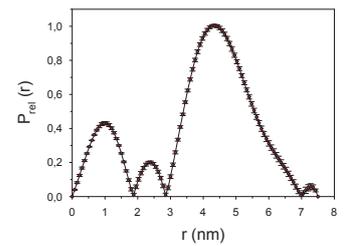
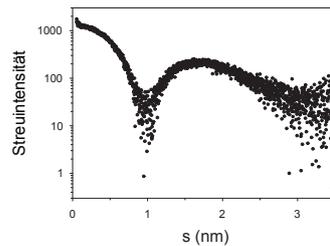
8
 1 mM PpNP,
 8 mM Triton,
 2 mM SDS



9
 1 mM PpNP,
 8 mM Triton,
 3 mM SDS



10
 1 mM PpNP,
 8 mM Triton,
 8 mM SDS



Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Dressler L., Golbik R., Ulbrich - Hofmann R. Lanthanides as substitutes for calcium ions in the activation of plant α -type phospholipase D. *Biol Chem*, 395 (7-8), 791-799, 2014.

Dippe M., **Dressler L.**, Ulbrich - Hofmann R. Fe(III) - resorcyate as a spectrophotometric probe for phospholipid - cation interactions. *Anal Biochem*, 445, 54-59, 2014.

Tagungsbeiträge

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. PLD activity - modulated by calcium ions and anionic detergents. Poster, *3rd International Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 4 - 6 November 2013, Halle/Saale, Deutschland

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. Calcium ions and anionic detergents - enigmatic mediators of phospholipase D. Poster, *9th European Biophysics Congress*, 13 - 17 Juli 2013, Lissabon, Portugal

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. Alternative PLD models for studying the enzyme activation by calcium ions. Vortrag. *Fall Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 1 - 3 Oktober 2012, Naumburg, Deutschland

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. Metall ions as mediators between phospholipase D and its substrate. Vortrag. *Spring Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 23 - 25 Februar 2012, Eisenach, Deutschland

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. Phospholipid - cation interactions in relation to phospholipase D activity. Vortrag. *Fall Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 29 September - 1 Oktober 2011, Spergau, Deutschland

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. Rare earth ions as activators of phospholipase D and fluorescence probe of membrane binding. Poster, *2nd International Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 3 - 5 März 2011, Halle/Saale, Deutschland

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. Lanthanides as activators and fluorescence probes of phospholipase D. Vortrag. *Fall Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 30 September - 2 Oktober 2010, Blankenburg, Deutschland

Dressler L., Dippe M., Ulbrich-Hofmann R. Lanthanides as activators and fluorescence probes of phospholipase D. Poster, *51th International Conference on the Bioscience of Lipids*, 7 - 8 September 2010, Bilbao, Spanien

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. Aggregation of phospholipase D - a challenge in biophysical measurements. Vortrag. *Spring Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 18 - 20 März 2010, Halle, Deutschland

Dressler L., Ulbrich - Hofmann R. The dubious role of calcium ions in the interaction with plant phospholipase D. Vortrag. *Fall Meeting Graduiertenkolleg 1026*, 1 - 3 Oktober 2009, Dessau, Deutschland

Sonstiges

Teilnahme am 64. Mosbacher Kolloquium, *Membranes In Motion*, 4 - 6 April 2013, Mosbach, Deutschland

08/2009 - 11/2013 Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs 1026:
 „Conformational transitions in macromolecular interactions“

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lars Dreßler
Geburtsdatum: 23.01.1981
Geburtsort: Ludwigsfelde
Wohnsitz: Schillerstr. 41 in 06114 Halle/Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

2000 Abitur, Marie-Curie-Gymnasium in Ludwigsfelde
2000 - 2001 Wehrdienst
2002 - 2008 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität
01-10/2008 Diplomarbeit bei der Scanbec GmbH in Halle/Saale
Thema: „Entwicklung molekularbiologischer Schnelltests zum Nachweis von *Phytophthora*“
seit 08/2009 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, AG Technische Enzymologie, Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, sowie keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde zuvor von mir weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Halle/Saale, den

Lars Dreßler

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe Technische Enzymologie am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann angefertigt. In besonderem Maße möchte ich mich bei ihr für die exzellente wissenschaftliche Betreuung während der gesamten Promotionszeit bedanken.

Besonderer Dank gilt ebenfalls PD. Dr. habil. Ralph Golbik, dem es u. a. gelang „einen Biologen“ für die Vorzüge der Fluoreszenzspektroskopie zu sensibilisieren und der durch seine erquickende Art wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke ganz herzlich Dr. Johanna Mansfeld die nicht nur im Hinblick auf molekularbiologische Belange stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir mit Rat und Tat zu Seite stand.

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ingo Heilmann, der es mir gestatte in den von ihm übernommenen Laboren der AG Technische Enzymologie bis zum Schluss meiner Arbeit zu experimentieren.

Ich danke ganz herzlich Prof. Dr. Alfred Blume und der AG Biophysikalische Chemie (besonders: Dr. Andreas Kerth, Anja Huster, Sebastian Finger und Andre Hädicke) für die Einweisung und Nutzung der Messgeräte sowie die daran anschließende stete Diskussionsbereitschaft zur kritischen Auslegung der Ergebnisse.

Besonderer Dank gilt ebenfalls PD. Dr. habil. Stephan König für die Durchführung der SAXS-Messungen und die anschließend durchgeführten Berechnungen zur Struktur der Lösungsmittelaggregate.

Für die sehr gute Zusammenarbeit rund um das Thema Bolalipide bedanke ich mich sehr herzlich bei Dr. Simon Drescher aus dem Fachbereich Pharmazie.

Für die, gerade am Anfang, erfolgte Einweisung und Einarbeitung sowie Hilfe zur Selbsthilfe danke ich ganz besonders Dr. Martin Dippe der mir durch seine ruhige und gütliche Art einen guten Start in die Promotionszeit möglich machte.

Für die hervorragende technische Unterstützung bedanke ich mich ganz herzlich bei Christa Kuplens und Marion Sonntag.

Für die gemeinsam verbrachte schöne Zeit im Labor sowie den Gesprächsrunden bei den „Hofpausen“ (die in jeder Argumentation einen Haken fanden) bedanke ich mich bei Dr. Hafeeza Khatoon, Dr. Christian Ursel, Dr. Michael Schöpfel, Dr. Annett Weidner, Tobias Heinz, Dr. Mario Träger, Marten Villmow, Dr. Jennifer Lerche, Franziska Hempel, Dr. Stephanie Werner, Anna Müller, Dr. Lydia Beyer, Dr. Johannes Taubert und Dr. Mareike Heilmann.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgesellschaft in Form des Graduiertenkolleg 1026 „*Conformational transitions in macromolecular interactions*“ unter dem Sprecher Prof. Dr. Milton T. Stubbs sowie den Koordinatoren PD. Dr. habil. Ulrich Arnold und Martina Richter.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner kleinen Familie bedanken. Isabell, Ronja, Arvid und Fritz ließen mich bei aller Arbeit stets die Verhältnismäßigkeit der Dinge erkennen.