

**Aktivität und Regulation von Phospholipase A<sub>2</sub> in der Plasmamembran von  
*Eschscholzia californica***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

von Herrn Diplombiochemiker Batsuch Dordschbal  
geb. am 16.12.1969 in Ulangom (Mongolei)

Gutachter:

- 1.Prof. Dr. Werner Roos Halle/Saale
- 2.Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hoffmann Halle/Saale
- 3.Prof. Dr. Günther Scherer Hannover

Halle/Saale, Dezember 2002

verteidigt am 20.03.2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000005293**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005293>]

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	Signaltransfer bei der Auslösung der pflanzlichen Pathogenabwehr	1
1.2.	Spezifität der Phospholipasen und ihre Vorkommen in Pflanzen	3
1.3.	Phospholipasen im Signaltransfer der pflanzlichen Pathogenabwehr	5
1.3.1.	Phospholipase A <sub>2</sub>	6
1.3.2.	Phospholipase C	7
1.3.3.	Phospholipase D	8
1.4.	Das Modellsystem der vorliegenden Arbeit: Suspensionszellkultur von <i>Eschscholzia californica</i> /Hefeelicitator	9
1.5.	Zielstellung der vorliegenden Arbeit	10
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1.	Kultivierung der Zellsuspensionen von <i>Eschscholzia californica</i>	11
2.2.	Präparation von Plasmamembranvesikeln	12
2.2.1.	Ernte von Zellsuspensionen	12
2.2.2.	Präparation des mikrosomalen Pellets (MP)	12
2.2.3.	Plasmamembranreinigung durch die Verteilung im wässrigen Zweiphasensystem	12
2.2.4.	Pufferlösungen für die Präparation der Plasmamembranvesikel	13
2.2.5.	Saccharosegradientenzentrifugation	14
2.3.	Markerenzyme für die Charakterisierung von Plasmamembranen	15
2.3.1.	Bestimmung von ATPase-Aktivitäten	15
2.3.2.	Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidaseaktivität	15
2.3.3.	Bestimmung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktaseaktivität	15
2.4.	Fluorometrische Bestimmung der PLA <sub>2</sub> -Aktivität	16
2.5.	Analytische und quantitative Dünnschichtchromatographie	16
2.5.1.	Herstellung von fluoreszenzmarkierten Phospholipase-digests	17
2.5.2.	Extraktion der Phospholipide für die HPTLC	17
2.5.3.	Detektion fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC	18
2.5.4.	Quantifizierung fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC	18
2.5.5.	Ermittlung der optimalen Substratkonzentration für die Messung der PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Zellsuspensionen	19
2.5.6.	Detektion postchromatographisch gefärbter, genuiner Phospholipide	20

---

2.6.	Ermittlung der Massenspektren von Phospholipiden	20
2.6.1.	Phospholipidextraktion für die Analyse mit MALDI-TOF- MS	21
2.6.1.1.	Phospholipidextraktion aus den Plasmamembranvesikeln	21
2.6.1.2.	Phospholipidextraktion aus Zellsuspensionen nach Elicitor-Behandlung	21
2.6.1.3.	Gewinnung einer Lysophospholipid-Fraktion aus der Plasmamembran	21
2.7.	Sonstige Methoden	22
2.7.1.	Proteinbestimmung	22
2.7.2.	Bestimmung der Vesikelgröße	22
2.7.3.	Bestimmung von Benzophenanthridin-Alkaloiden	22
2.7.4.	Einschluß von Glutathion in den Vesikeln durch Elektroporation	22
2.7.5.	Bestimmung von Glutathion	23
2.8.	Chemikalien und Geräte	24
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>25</b>
3.1.	Übersicht der verwendeten Methoden zur Reinigung der Plasmamembranen	25
3.1.1.	Optimierung der Reinigung der Plasmamembranen im wässrigen Zweiphasensystem	26
3.2.	Charakterisierung von Plasmamembranen	28
3.2.1.	Markerenzymaktivitäten	28
3.2.1.1.	H <sup>+</sup> -ATPase der Plasmamembranen (P-ATPase)	28
3.2.1.2.	Cytochrom-c-Oxidase	31
3.2.1.3.	Antimycin-insensitive NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	32
3.2.2.	Bewertung der Markerenzymaktivitäten der im Zweiphasensystem gereinigten Plasmamembranvesikel	32
3.2.3.	Saccharosegradienten	33
3.2.4.	Versuche zur Erhöhung der Reinheit der Plasmamembran	34
3.2.4.1.	Kombination der Saccharosegradienten und des Zweiphasensystems	34
3.2.4.2.	Wechsel des Osmotikums im Zweiphasensystem	34
3.2.5.	Bestimmung der Größe von Plasmamembranvesikeln	36
3.3.	Identifizierung von PLA <sub>2</sub> -Aktivität	37
3.3.1.	Übersicht der verwendeten Substrate und Meßverfahren	37
3.3.2.	Aktivitätsmessungen der PLA <sub>2</sub> mit fluorogenen BODIPY-Phospholipiden	41
3.3.2.1.	Effekte von Lösungsmitteln auf die Struktur des Substrates in Lösung	41
3.3.2.2.	Einfluß der Detergenzien auf die BPC-Fluoreszenz	42
3.3.2.3.	Einfluß von 0.05% Brij 58 auf die BPC-Fluoreszenz	43
3.3.2.4.	Nicht enzymatisch ausgelöste Änderungen der Fluoreszenz von BODIPY- Substraten durch Vesikel	44

---

3.3.3.	PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Plasmamembranvesikeln	46
3.3.3.1.	Identifizierung der PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Plasmamembranvesikeln mittels DC	47
3.3.3.2.	Lokalisation der PLA <sub>2</sub> -Aktivität in den Membranen	47
3.3.3.3.	Einfluß von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die PLA <sub>2</sub> -Aktivität	48
3.3.3.4.	Charakterisierung der PLA <sub>2</sub> durch Hemmstoffe	49
3.3.3.5.	Einfluss von Detergenzien auf die PLA <sub>2</sub> -Aktivität	50
3.3.3.6.	Stimulation der PLA <sub>2</sub> in Plasmamembranvesikeln durch einen Hefeelictor	50
3.3.3.7.	Regulation der PLA <sub>2</sub> durch G-Proteine	51
3.3.3.7.1.	Beeinflussung der PLA <sub>2</sub> -Aktivität durch Antikörper gegen die G-Proteinuntereinheiten	52
3.3.3.7.2.	Einfluß von Mastoparan auf die PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Plasmamembranvesikeln	53
3.3.3.8.	Wirkungen von Antioxidanten auf die PLA <sub>2</sub> -Aktivität	53
3.3.3.8.1.	PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Plasmamembranvesikeln aus Zellen nach Zugabe eines externen Elektronenakzeptors	54
3.3.3.8.2.	Einfluß von Glutathion auf die PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Plasmamembranvesikeln	55
3.3.3.8.3.	Einschlußversuche von Glutathion in den PM-Vesikeln durch Elektroporation	56
3.3.4.	Aktivität von PLA <sub>2</sub> in Zellsuspensionen von <i>Eschscholzia californica</i>	58
3.3.4.1.	LPC-Abbau durch Zellen	58
3.3.4.2.	Messungen der PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Zellsuspensionen mit BEPC	60
3.3.4.3.	Stimulation der PLA <sub>2</sub> -Aktivität durch Elicitorkontakt	61
3.3.5.	Die Dynamik des endogenen LPC nach Elicitorkontakt	63
3.3.5.1.	Methodische Grundlagen zur Detektion extrahierter Phospholipide und Lysophosphatidylcholine mit MALDI-TOF	64
3.3.5.2.	Nachweis von Phospholipiden und Lysophospholipiden in Zellen und Plasmamembranvesikeln von <i>Eschscholzia californica</i>	65
3.3.5.3.	Änderungen des LPC-Gehaltes nach Elicitorkontakt	66
3.3.5.4.	DAG in Zell- und PM-Vesikelextrakten	68
3.3.6.	Andere Phospholipaseaktivitäten in Plasmamembranen	69
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

B-DAG	Diacylglycerol von BPC
BE-DAG	Diacylglycerol von BEPC
BELPC	Lyso-Phosphatidylcholin von BEPC
BE-PA	Phosphaditsäure von BEPC
BEPC	1-(O-(11-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl)amino)undecyl)-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
BFS	BODIPY-Fettsäure(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undecansäure)
BLPC	Lyso-Phosphatidylcholin von BPC
B-PA	Phosphaditsäure von BPC
BPC	1,2-Bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin
Brij 58	Polyoxyethylen-20-cetylerther
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propane-sulfonate
CMC	kritische Micellkonzentration (critical micell concentration)
CTAB	Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (Ethylendiaminetetraaceticacid)
Em.	Emission
EtOH	Ethanol
ETYA	5,8,11,14-Eicosatetrainsäure
Ex.	Excitation
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HBI	Hexabromoiridat

---

HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (high Performance Thin Layer-chromatography)
kD	kilo Dalton
LDH	Lactatdehydrogenase
LPA	Lyso-Phosphatidsäure
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
LPE	Lyso-Phosphatidylethanolamin
LPS	Lyso-Phosphatidylserin
LS	Nährlösung (modifiziert nach Linsmaier und Skoog)
MCB	Monochlorbiman
MG	Molekulargewicht
MP	mikrosomale Fraktion
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
OP	Oberphase im wässrigen Zweiphasensystem
PA	Phosphatidsäure
PAF	platelet-activating factor
PC	Phosphatidylcholin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PLA <sub>1</sub>	Phospholipase A <sub>1</sub>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PM	Plasmamembran
PVP	Polyvinylpyrrolidin
R <sub>f</sub> -Wert	Retentionsfaktor
RH	Rohhomogenat
ROS	reactive oxygen spezies
RSA	Rinderserumalbumin
SL	Stammlösung
UP	Unterphase im wässrigen Zweiphasensystem

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Signaltransfer bei der Auslösung der pflanzlichen Pathogenabwehr

In den letzten Jahren ist sichtbar geworden, dass Phospholipasen nicht nur in tierischen, sondern auch in pflanzlichen Zellen eine Signalfunktion bei vielen entwicklungs- und stressabhängigen Reaktionen haben. Sie reichen von der Wirkung des Hormons Auxins (z.B. Scherer et al., 1995) über die Vermittlung osmotischer Signale (z.B. Meijer et al., 2001) und mechanischer Verwundung (z.B. Ryu et al., 1998) bis zu ihrer Beteiligung an einigen Reaktionen der pflanzlichen Pathogenabwehr (Munnik, 1998; Wang, 2001; Roos et al., 1999).

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Rolle einer Phospholipase A<sub>2</sub> an der Auslösung eines wesentlichen Zweiges der pflanzlichen Pathogenabwehr, der Biosynthese von Phytoalexinen, zu charakterisieren.

Hauptelemente der pflanzlichen Pathogenabwehr, die durch Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen oder Elicitoren ausgelöst werden können, sind:

- a) die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (oxidative burst), gefolgt von der hypersensitiven Reaktion (HR), einer Form der Apoptose
- b) die Verstärkung der Zellwand durch Vernetzung prolinreicher Proteine und durch Lignifizierung
- c) die Produktion von Enzymen zur Lyse mikrobieller Zellwände, z.B. Chitinasen, sowie zahlreicher weiterer "pathogenesis related proteins"
- d) die Bildung von Salicylaten und weiteren Signalen, die zur Ausbildung von "systemic acquired resistance" in benachbarten Geweben führen
- d) die Produktion von o.g. Phytoalexinen, d.h. speziestypischer Sekundärstoffe.

Unter dem Begriff "Phytoalexine" versteht man niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Verbindungen, die nach Kontakt mit Mikroorganismen von der Wirtspflanze synthetisiert werden (Kuc, 1995; Hammerschmidt, 1999; Harborne, 1999). Es wurden über 350 verschiedene Phytoalexine aus 30 Pflanzenfamilien wie z.B. *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Convolvulaceae*, *Gramineae* und *Compositae* chemisch charakterisiert. Die größte Anzahl an Phytoalexinen (ca. 130) wurde aus der Familie *Fabaceae* isoliert. In dieser Familie findet man u.a. Isoflavonoide, Isoflavane, Isoflavanone, Isoflavone, Pterocarpane und Coumestane (Kuc, 1995). Bei den *Solanaceae* kommen u.a. Phenylpropane, Norsesqui- und Sesquiterpene sowie Polyacetylene vor (Kuc, 1995).

Die Induktion der Phytoalexinbiosynthese bei der Pathogenabwehr tritt meist koordiniert mit dem o.g. Reaktionen der Pathogenabwehr (z.B. "oxidative burst", Lignifizierung und Expression von "pathogenesis-related proteins") auf. Während in einigen Objekten diese Kopplung relativ eng erscheint (Bolwell, 1997; Jabs, 1999; Lamb & Dixon, 1997; Scheel, 1998), kann in einigen Zellkulturen eine Induktion der Phytoalexinbiosynthese unabhängig von "oxidative burst" und HR erfolgen: z.B. in *Eschscholzia californica* (Roos et al., 1998) und *Nicotiana tabacum* (Lapous et al., 1998).

Diese Kulturen, zu denen auch das Objekt der vorliegenden Arbeit gehört, bieten daher günstige Bedingungen für die Aufklärung distinkter Signalschritte, ihrer Module und deren Verknüpfung. Die Struktur und Verknüpfungen dieser Elemente sind oft unbekannt und unterscheiden sich offenbar zwischen den Signalketten zur Auslösung der Phytoalexinbiosynthese und den zur hypersensitiven Reaktionen führenden Zwischenschritten.

Frühe Signalereignisse nach Elicitorkontakt sind:

- a) die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, u.a. Superoxidanionen,  $H_2O_2$ , Hydroxidradikale oder singulett-Sauerstoff. Diese wirken einerseits selbst antimikrobiell, andererseits sind sie sekundäre Signale zur Induktion von pathogenesis-related proteins (Baker et al., 1995; Lamb & Dixon, 1997)
- b) Ionenfluxe durch die Plasmamembran, vor allem Efflux von  $K^+$ , Einstrom von  $Ca^{2+}$ , und von  $H^+$  (Alkalisierung des Außenmediums) (Amano et al., 1997; Bach, 1993; Ebel et al., 1998; Romeis, 2001; Nürnberger, 1999)
- c) intrazelluläre Ionenfluxe: in *Eschscholzia californica* wurde z.B. nach Elicitorkontakt die transiente Freisetzung von  $H^+$  aus der Vakuole gemessen (Roos et al., 1998).

Zu den unmittelbar nach Elicitorkontakt aktivierten Proteinen gehören Elicitor-Rezeptoren (Hahn, 1996; Nürnberger, 2000), G-Proteine (Causier & Millner, 1996; Bischoff et al., 1999; Roos et al., 1999), Ionenkanäle (Amano et al., 1997; Ebel et al., 1995) und Phospholipasen (Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

Spätere Signalereignisse (vor der Genaktivierung) sind die Aktivierung von Proteinkinasen, von denen bisher vor allem MAP-Kinasen und weitere  $Ca^{2+}$ -abhängige Kinasen charakterisiert wurden, welche meist eine Thr-Ser-Phosphorylierung der Zielproteine katalysieren (Ligternik et al., 1997; Hirt, 1997; Romeis, 2001).

Die Rolle von Phospholipasen (PL) in diesen Signalkaskaden wird belegt durch a) den Nachweis von Signalfunktionen ihrer Spaltprodukte ( $IP_3$ , Fettsäuren, PA, LPA und LPC) (Chandra et al., 1996; Munnik et al., 1998; van der Luit et al., 2000; Wang, 2001)

b) die Wirkung spezifischer Effektoren und Hemmstoffe (Mastoparan, Neomycin, ETYA) auf den Signaltransfer (Munnik et al., 1998; Scherer et al., 1995; Scherer et al., 1997; Wang, 2001)

## 1.2. Spezifität der Phospholipasen und ihr Vorkommen in Pflanzen

Phospholipasen sind wesentlich am Metabolismus von Phospholipiden beteiligt. Sie kommen in allen Organismen sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vor. Die Phospholipasen unterteilt man entsprechend ihrer enzymatischen Spaltstellen am Phospholipid in Acylhydrolasen (Phospholipase  $A_1$  und Phospholipase  $A_2$ ) und Phosphodiesterasen (Phospholipase C und Phospholipase D) (Dennis, 1994) (s. Abb. 1.).

**Phospholipase A** spaltet eine Fettsäure aus dem Phospholipidmolekül ab.  $PLA_1$  hydrolysiert die Bindung an der *sn-1*-Position des Glycerols,  $PLA_2$  an der *sn-2*-Position. Als Reaktionsprodukte entstehen das  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Lysophospholipid und die freie Fettsäure. Der am häufigsten gefundene Typ der Acylhydrolasen in Pflanzen ist die  $PLA_2$ ; es gibt nur wenige Berichte über das  $PLA_1$ -Vorkommen in Pflanzen, so in Tonoplasten aus *Acer pseudoplatanus* (Tavernier et al., 1995).  $PLA_2$ -Aktivität wurde in Suspensionszellkulturen von *Glycine max* (Paul et al., 1998), *Nicotiana tabacum* (Roy et al., 1995), *Petroselinum crispum L* (Scherer et al., 2000), im Hypokotyl von *Cucurbita pepo* (Andre et al., 1991) und *Helianthus annuus* (Scherer et al., 1995), sowie in embryonalem Gewebe von *Brassica nabus*, in Wurzeln von *Triticum aestivum* (Banas et al., 1992) und im Mesokarp von *Persea gratissima* (Bafor et al., 1991) nachgewiesen. Membrangebundene  $PLA_2$ -Aktivitäten wurden in Plasmamembranvesikeln aus Wurzeln von *Avena sativa* (Palmgren et al., 1989) und in mikrosomalen Membranfraktionen von *Ricinis communis* (Bafor et al., 1991) gemessen.

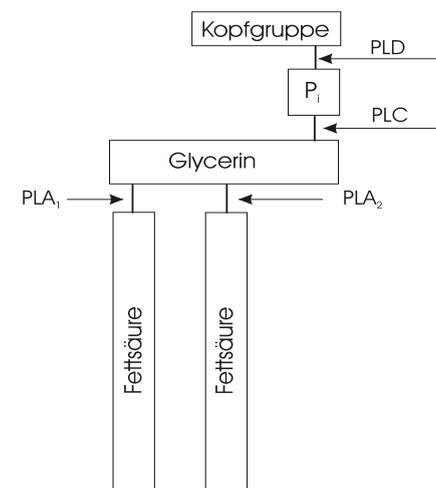


Abb.1. Schema der Hydrolyse von Phospholipiden durch Phospholipasen

Bislang wurde nur eine membrangebundene PLA<sub>2</sub> gereinigt. Es handelt sich dabei um ein 48 kDa Enzym aus *Vicia faba* (Jung et al., 2000). Lösliche PLA<sub>2</sub>-Enzyme sind eine 40 kDa PLA<sub>2</sub> aus Knollen von *Solanum tuberosum*, die Patatin genannt wird, eine 70 kDa, Ca<sup>+2</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub> und eine Ca<sup>+2</sup>-abhängige 14 kDa PLA<sub>2</sub> jeweils aus *Vicia faba* (Senda et al., 1996; Kim, 1994). Eine weitere 14 kDa PLA<sub>2</sub> wurde aus den Wurzeln von *Ulmus glabra* gereinigt und vollständig sequenziert (Stahl et al., 1998).

**Phospholipase C** hydrolysiert die Phosphatesterbindung am C<sub>3</sub>-Kohlenstoff des Glycerolgrundkörpers, so dass die phosphorylierte Alkoholgruppe und Diacylglycerol als Reaktionsprodukte entstehen. PLCs aus Pflanzen können bezüglich ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt werden: phosphoinositidspezifische PLC (PI-PLC), phosphoinositid-unspezifische PLC, die in der Lage sind PC bzw andere Phospholipide zu spalten (PC-PLC) und glycosylphosphatidyl-inositolspezifische PLC (GPI-PLC) (Wang, 2001). Die bisher am häufigsten gefundene pflanzliche PLC ist die PI-PLC. Aus Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (Hirayama et al. 1995; Hirayama et al. 1997), *Glycine max* (Shi et al., 1995) und *Solanum tuberosum* (Kopka et al., 1998) gereinigte PI-PLCs zeigen relativ weitgehende Sequenzhomologien mit der tierischen PI-PLC<sub>δ</sub> (Wang, 2001). PC-PLC-Aktivität wurde in verschiedenen Pflanzenspezies gefunden. Jedoch sind diese Befunde wegen der hohen Aktivität von PLD und möglicher Umwandlung der Produkte von PLC und PLD durch Kinasen und Phosphatasen mit Vorsicht zu behandeln (Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

Eine PLC katalysierte Freisetzung von Diacylglycerol (DAG), gefolgt von einer DAG-Kinase-katalysierten Phosphorylierung zu Phosphatidsäure (PA) bzw. zu DAG-Pyrophosphat, wurde in Suspensionszellkulturen von *Lycopersicon esculentum* beobachtet (van der Luit et al., 2000).

Eine GPI-spaltende Aktivität einer PLC konnte z.B. in Samen von *Arachis hypogaea* nachgewiesen werden (Butikofer et al., 1993).

**Phospholipase D** hydrolysiert die Bindung zwischen Phosphat und Alkoholgruppe, so dass Phosphatidsäure und die freie Kopfgruppe entstehen. Phosphatidsäure ist das Ausgangsmaterial für die Synthese aller Glycerolipide. Eine spezifische Eigenschaft der PLD ist ihre Fähigkeit zur Transphosphatidylierung, d.h. das Enzym katalysiert neben der Hydrolyse von Phospholipiden bei Anwesenheit geeigneter Alkohole auch Umesterungen mit kurzkettigen Alkoholen (Munnik, 2001). In Pflanzen wurden mehrere Isoenzyme der PLD entdeckt, die man in verschiedenen

Entwicklungsstadien oder auf bestimmte Gewebetypen begrenzt findet und die sich in ihren Eigenschaften und ihrer Regulation unterscheiden, z.B. in *Arabidopsis thaliana* wurden 7 verschiedene Isoenzyme identifiziert (Pappan et al., 1999).

Die pflanzlichen PLDs sind in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Typen unterteilt. PLD $\alpha$  zeichnet sich durch einen sehr hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf (20-100 mM *in vitro*) und ein im sauren Bereich liegendes pH-Optimum aus (Wang, 2001). PLD $\alpha$ -Enzyme werden in weitere Subtypen PLD  $\alpha$ 1, PLD  $\alpha$ 2 und PLD  $\alpha$ 3 unterteilt. PLD  $\beta$  weist eine 40%-ige Aminosäurehomologie zum  $\alpha$ -Typ auf und besitzt ein pH-Optimum bei pH 7.0-7.5 und braucht für ihre Aktivität Calciumionen nur in mikromolaren Bereich. PLD $\gamma$  weist eine 66%-ige Homologie zum  $\beta$ -Typ auf. All diese Isoformen haben unterschiedliche Substratspezifität bezüglich der Phospholipidkopfgruppen (Pappan et al., 1999; Wang 2001).

### 1.3. Phospholipasen in der Signaltransduktion der pflanzlichen Pathogenabwehr

In Analogie zu tierischen Zellen stellen Produkte Phospholipase-katalysierter Reaktionen häufig in Pflanzen Signalmoleküle dar oder können als Ausgangsverbindungen zur Synthese von biologisch aktiven Substanzen dienen. In letzter Zeit häufen sich experimentelle Befunde über eine Funktion von Hydrolyseprodukten der Phospholipasen als potentielle Botenmoleküle bei zellulären Signaltransduktionsprozessen in Pflanzen (Munnik, 1998; Munnik, 2001; Wang 2001). Arachidonsäure (C20: 3), ein Spaltprodukt der PLA<sub>2</sub> in tierischen Organismen, ist die Ausgangsverbindung für die Synthese biologisch wirksamer Substanzen, die als Eicosanoide bezeichnet werden, u.a. Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene (Samuelsson, 1987).

Ein analoges PLA<sub>2</sub>-Spaltprodukt in der Pflanze ist die Linolensäure (C18: 3). Sie ist der Ausgangspunkt der Octadecanoidkaskade und der Isoprostane (Müller et al., 1993; Blechert et al., 1995; Parchmann et al., 1997; Imbusch et al., 2000).

Lyso-PC, ein Produkt der PLA<sub>2</sub>, dient in tierischen Zellen u.a. als Ausgangsverbindung für den sogenannten „platelet-activating factor“ (PAF) (Tjoelker et al., 1995). In den pflanzlichen Zellen ist LPC als Aktivator der Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase (Palmgren et al., 1989) und der Proteinkinasen (Martiny-Baron et al., 1989) bekannt. Ein weiteres Beispiel ist IP<sub>3</sub>, ein Spaltprodukt der PLC, das einen Einstrom von Calcium aus intrazellulären Speichern in das Cytosol bewirkt und dadurch die Aktivität von zahlreichen calciumabhängigen Enzymen reguliert. Die Aktivierung von Phospholipasen erfolgt vermutlich wie in tierischen Organismen über

rezeptorvermittelte G-Proteine. In tierischen Zellen etablierte G-Proteinaktivatoren wie Mastoparan, primäre Alkohole wie Ethanol und Choleratoxin aktivieren auch die pflanzliche PLC, PLD und PLA<sub>2</sub> (Chandra et al., 1996; Munnik et al., 1995; van Himbergen et al., 1999; Scherer et al., 1995; Roos et al., 1999).

### 1.3.1. Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

Zahlreiche regulatorische Effekte der PLA<sub>2</sub> oder ihrer Produkte wurden in Pflanzen beobachtet. Die durch PLA<sub>2</sub> freigesetzten C<sub>18</sub>-Fettsäuren dienen in Pflanzen u.a. als Substrat der Lipoxygenasen. So werden aus Linolensäure hochreaktive Hydroperoxide (13-Hydroperoxy-octadecatriensäuren) gebildet, deren weitere enzymatische Umwandlung zur Biosynthese von Jasmonsäure führt. Jasmonsäure, ihr Precursor 12-Oxophytodiensäure, sowie ihre Derivate sind in Pflanzen multifunktionelle Signalmoleküle (Noehringer et al., 2000; Parcmann et al., 1997; Wasternack et al., 1997).

Diese Verbindungen können die Expression von Abwehrgenen stimulieren. Die Aktivierung der PLA<sub>2</sub> bei Pflanze-Pathogen-Interaktionen wurde in verschiedenen Pflanzenspezies gefunden. Die durch PLA<sub>2</sub>-Aktivität aus den Phospholipiden freigesetzten Fettsäuren können eng mit der Regulation der Phytoalexinbildung verbunden sein, wie durch Li et al. (1991) gezeigt wurde. Sie fanden, dass Blätter von *Oryza sativa*, die mit dem Pathogen *Pyricularia oryzae* infiziert waren, 13-Hydroperoxide und 13-Hydroxide der Linolen- und Linolsäure akkumulierten, noch bevor es zur Bildung der Phytoalexine (Momilactone und Oryzalexin D) kam (Li et al., 1991). Inhibitoren der PLA<sub>2</sub> und Lipoxygenase unterdrückten sowohl die Hydroperoxidbildung als auch die Bildung dieser Phytoalexine. Aufgrund dieser Ergebnisse werden die Fettsäureperoxide und Fettsäureoxide als endogene Signalmoleküle der Phytoalexinbildung angesehen.

Weiterhin konnte eine Linolensäureakkumulation und Jasmonsäure-Akkumulation nach Elicitorbehandlung in Suspensionszellkulturen von *Eschscholzia californica* beobachtet werden (Blechert et al., 1995).

Der Einfluß von Hydrolyseprodukten der PLA<sub>2</sub> auf die Aktivität plasmamembranständiger H<sup>+</sup>-ATPasen wurde vielfach belegt (Palmgren et al., 1989). Es ist bekannt, dass das PLA<sub>2</sub>-Produkt Lysophosphatidylcholin eine Aktivierung der plasmamembrangebundenen ATPase bewirkt (Gomes et al., 1996; Luo et al., 1999).

Der Effekt ist nicht nur auf die Lysoverbindungen beschränkt, auch die durch PLA<sub>2</sub> freigesetzten Fettsäuren können eine ATPase Aktivierung auslösen (Yi et al., 1996). Diese Aktivierungsvorgänge verlaufen möglicherweise über eine Aktivierung membranständiger Proteinkinasen, die ihrerseits wiederum die H<sup>+</sup>-ATPasen aktivieren (Yi et al., 1996).

Die Behandlung einer Suspensionszellkultur von *Glycine max* mit einem Elicitor aus *Verticillium dahliae* oder *Erwinia amylovora* aktivierte die PLA<sub>2</sub> und löste einen "oxidative burst" aus. Hingegen löste ein anderer Elicitor (Oligogalacturonsäure) zwar einen "oxidative burst", jedoch keine Aktivierung der PLA<sub>2</sub> aus. (Chandra et al., 1996).

Aus diesem Befund schließen die Autoren, dass die PLA<sub>2</sub> nicht für die Auslösung des „oxidative burst“ sondern für andere, noch unbekannte Signalvorgänge benötigt wird. Die Beteiligung der PLA<sub>2</sub> an der Signaltransduktionskaskade des Auxins in Pflanzen ist aufgrund von Hemmstoffversuchen vermutet worden (Scherer & Andre, 1989). Auxin fördert das Streckungswachstum von Pflanzenzellen, welches durch die Ansäuerung des Apoplasten infolge der Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembran erreicht wird (Paul et al., 1998). Inhibitoren tierischer PLA<sub>2</sub> hemmen das auxininduzierte Wachstum von etiolierten Hypokotylen von *Cucurbita pepo* (Scherer & Arnold 1997).

### 1.3.2. Phospholipase C (PLC)

Die Beteiligung der phosphoinositolspezifischen PLC an der Aktivierung des "oxidative burst" in neutrophilen Granulocyten ist eines der bekanntesten Beispiele für den Phospholipase-abhängigen Signaltransfer in tierischen Organismen. Durch die Aktivierung des Enzyms werden zwei Signalmoleküle, Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) gebildet. Das ins Cytosol freigesetzte IP<sub>3</sub> bewirkt einen Einstrom von Calcium aus intrazellulären Speichern in das Cytosol und reguliert dadurch die Aktivität von zahlreichen calciumabhängigen Enzymen. DAG aktiviert u.a. die Proteinkinase C (PKC) und steuert damit verschiedene Enzyme. Diese aktivieren z.B. die NADH-Oxidase über ihren Phosphorylierungsstatus (Alberts et al., 1995; Streyer, 1994). Die NADH-Oxidase ist das Schlüsselenzym für den "oxidative burst", d.h. sie katalysiert die Bildung von ROS. Viele Komponenten der PI-PLC-Signalkaskade der Pflanzen haben strukturelle oder funktionelle Ähnlichkeiten mit denen in Tieren (Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

Untersuchungen mit Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* zeigten, dass die Behandlung der

Zellen mit Elicitor oder Mastoparan, zur Akkumulation von  $IP_3$  und auch zur Auslösung des “oxidative burst” führte (Legendre, 1993). Damit zeigt sich eine Analogie im Signalweg des “oxidative burst” zwischen pflanzlichen Zellen und den neutrophilen Granulocyten der Tiere (Dwyer et al., 1996). Allerdings ist die NADPH-oxidase der Neutrophilen nicht mit dem analogen Enzym der pflanzlichen ROS-Bildung identisch.

Auch die Behandlung von Suspensionszellkulturen weiterer Pflanzenspezies wie *Caucalis platycarpos* (Kurosaki et al., 1987), *Nicotiana tabacum* (Kamada et al., 1994), *Pisum sativum* (Toyoda et al., 1992), mit Elicitor führten zur Akkumulation von  $IP_3$  als Folge der Aktivierung von PI-PLC. Eine Beteiligung der PI-PLC am pflanzlichen Signaltransfer wurde nicht nur bei der Pathogen-Interaktion, sondern auch in Prozessen wie osmotischen Streß, Abscisinwirkung und Lichtperception gefunden (Arz et al., 1994; Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

### **1.3.3. Phospholipase D (PLD)**

Es wird vermutet, dass PLDs in Pflanzen bei vielfältigen Entwicklungs- und Stressabwehr-Prozessen wie Keimung, Alterung, Kältestreß, Trockenstreß, Verwundung und Nahrungsmangel beteiligt sind bzw. aktiviert werden (van der Luit et al., 2000; Pappan et al., 1999; Munnik 1998; Wang, 2001). Die durch die Aktivierung von Phospholipase D entstandene Phosphatidsäure führt zur Aktivierung von Proteinkinasen oder dient als Ausgangsstoff für andere Botenstoffe wie z.B. Lysophosphatidsäure.

Auch eine Bedeutung der PLD an der Pflanzen-Pathogen-Interaktion deutet sich an; die PLD katalysierte Hydrolyse von N-Acyl-Phosphatidylethanolamin wurde in Zellen von *Nicotiana tabacum* infolge von Elicitorbehandlung festgestellt. Das freigesetzte N-Acyl-Ethanolamin kann transmembranale Ionenströme beeinflussen und die Expression von Abwehrgenen aktivieren (Chapman et al., 1998; Chapman, 2000).

#### **1.4. Das Modellsystem der vorliegenden Arbeit: Suspensionszellkultur von *Eschscholzia californica*/Hefeelicitor**

Die Behandlung einer Suspensionszellkultur von *Eschscholzia californica* mit einem Elicitorpräparat (Glycoproteinfraktion aus Backhefe) führt zur Induktion der Biosynthese der Benzophenanthridin-Alkaloide vor allem Macarpin und Chelirubin (Roos et al., 1998; Fachini, 2001).

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interkalation in der DNA sind diese Alkaloide wirksame Phytoalexine (Schmeller et al., 1997; Wolf et al., 1993).

Wenige Minuten nach dem Elicitorkontakt wurde in den Zellen ein transienter Abfall des cytosolischen pH-Wertes mit Hilfe der konfokalen pH-Topographie nachgewiesen (Roos et al., 1998).

Dieser pH-Shift ist für die Auslösung der Alkaloidbiosynthese essentiell:

-die künstliche Ansäuerung des Cytoplasmas mit Buttersäure führte ebenfalls zur Induktion der Alkaloidbiosynthese;

-nach dem Verlust des vakuolären Protonengehaltes durch Behandlung mit Methylamin ist keine Alkaloidbiosynthese durch Elicitorkontakt mehr auslösbar (Roos et al., 1998).

Auch in anderen Zellkulturen wurde nach Elicitorkontakt eine Ansäuerung des Cytoplasmas nachgewiesen, welche in Zusammenhang mit der Induktion einiger Enzyme der Pathogenabwehr steht (Mathieu et al., 1996; Kuchitsu et al., 1997; He et al., 1998). Jedoch unterscheidet sich der Mechanismus zur Auslösung des pH-Shiftes in diesen Fällen grundsätzlich von der obengenannten Elicitierungsreaktion in *Eschscholzia californica*. Die im Zusammenhang mit der Phenylalaninammoniumlyase (PAL)-Induktion gemessenen pH-Shift in Zellkulturen von *Oryza sativa* und *Nicotiana tabacum* kommen unter Beteiligung von Serin/Threonin-Proteinkinasen durch den Einstrom externer Protonen zustande und führen zu einer meßbaren Alkalisierung des Außenmediums (Lapous et al., 1998; He et al., 1998). Pathogenabwehrmechanismen, welche zur Hypersensitivitätsreaktion führen, sind meist mit einer Alkalisierung des Außenmediums verbunden. Sie widerspiegeln einen Einstrom der Protonen aus der Umgebung der Zellen (Lapous et al., 1998; He et al., 1998).

Dagegen stammen die Protonen, welche nach dem Elicitorkontakt in das Cytoplasma von *Eschscholzia californica* einströmen, aus der Vakuole (Roos et al., 1998).

Es stellte sich die Frage, auf welche Weise der Kontakt des Elicitors mit der Zelloberfläche ein Signal zur Auslösung der vakuolären Protonenfluxe erzeugt. Bei der Suche nach sehr früheren Ereignissen nach Elicitorkontakt, d.h. vor dem gemessenen pH-Shift, wurde die Aktivierung einer PLA<sub>2</sub> als möglicher Kandidat entdeckt (Roos et al., 1999).

An *in situ*-Vakuolen wurde gezeigt, dass LPC, ein Produkt dieser PLA<sub>2</sub>, tatsächlich einen pH-Shift auslöst (Viehweger et al., 2002).

### **1.5. Zielstellung der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sind Experimente zur analytischen und zellbiologischen Charakterisierung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität von *Eschscholzia californica* und ihre Aktivierung nach Elicitorkontakt dargestellt.

Zunächst war zu klären, ob und mit welchen Methoden sich eine PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Suspensionszellkulturen von *Eschscholzia californica* nachweisen lässt und ob diese auf eine Elicitorstimulation reagiert. Wenn die PLA<sub>2</sub> als Signalezym für den Elicitorkontakt fungiert, wäre eine Lokalisation des Enzyms in der Plasmamembran anzunehmen. Um dies zu prüfen, war es notwendig, möglichst reine Plasmamembranvesikel zu präparieren und auf PLA<sub>2</sub>-Aktivität zu untersuchen.

Weiterhin sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Stellung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität innerhalb der Signalkette zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese geleistet werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Kultivierung der Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*

112 ml LS-Nährlösung in 300 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 38 ml Zellsuspension (meist aus einer 9 d-oder 10 d-Kultur) gemischt und im Dauerlicht (ca.  $7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) bei 23-24°C auf Rundschüttlern (120 U/min) kultiviert.

#### *Nährmedien*

Für die Kultivierung und Stammhaltung von *Eschscholzia californica* wurde folgendes Nährmedium (Tab.1.) nach Linsmaier/Skoog in modifizierter Form verwendet. Die hergestellte Nährlösungen wurden in 300 ml-Erlenmeyerkolben je 112.5 ml eingefüllt.

Die Kolben wurden mit Aluminiumfolie verschlossen und bei 121°C 20 min autoklaviert.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20.6 mmol/l
KNO <sub>3</sub>	18.8 mmol/l
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	3 mmol/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,5 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 mmol/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100 $\mu\text{mol/l}$
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{mol/l}$
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	30 $\mu\text{mol/l}$
KJ	5 $\mu\text{mol/l}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	1 $\mu\text{mol/l}$
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.1 $\mu\text{mol/l}$
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,15 $\mu\text{mol/l}$
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	0.2 mmol/l
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.1 mmol/l
Thiamin-HCl (Vitamin B1)	1.2 $\mu\text{mol/l}$
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	1.2 $\mu\text{mol/l}$
Naphthylessigsäure	1 $\mu\text{mol/l}$
myo-Inosit	0.55 mmol/l
Saccharose	87.6 mmol/l
Ad 1 Liter dest.Wasser pH 6.0 mit 1 N KOH einstellen (osmotischer Druck 176 mOsm/kg)	

Tab. 1. Zusammensetzung des Nährmediums für die Suspensionskultur von *Eschscholzia californica*

## **2.2. Präparation von Plasmamembranvesikeln**

### **2.2.1. Ernte von Zellsuspensionen**

300 ml Zellsuspensionen (2 Kolben, a 150 ml) wurde rasch durch ein Papierfilter gesaugt (Wasserstrahl-Vakuum), zweimal auf dem Filter mit Wasser gewaschen, die Zellen in eine Aluminiumfolie gewickelt und sofort im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Zellpellets wurden in einer Kühltruhe bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.2.2. Präparation des mikrosomalen Pellets (MP)**

Eingefrorene Zellen wurden mit Trockeneis in einer Zelmühle (ZM 1000, Firma Retsch) bei 15000 U/min aufgeschlossen. Nach dem Abdampfen des Trockeneises wurden die fein zermahlene Zellen (60-120 g FM) in 120 ml Homogenisationspuffer von 4°C aufgenommen und mit einem Glashomogenisator bei 4°C weiter homogenisiert. Anschließend wurde das Rohhomogenat bei 1000 x g 15 min zentrifugiert (Zentrifuge K23 D) und der Überstand einer weiteren Zentrifugation bei 13000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 9500 U/min, 12 min) unterworfen. Der Überstand wurde erneut bei 50000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 30000 U/min, 1 h) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet (MP bzw. mikrosomale Fraktion) wurde mit 2 ml Suspensionspuffer gewaschen, in 9 ml resuspendiert und wurde weiter in Zweiphasensystem bzw. im Saccharosegradienten fraktioniert.

### **2.2.3. Plasmamembranreinigung durch die Verteilung im wässrigen Zweiphasensystem**

Die Vesikelsuspension des mikrosomalen Pellets (s.o.) wurde auf das vorbereitete Zweiphasensystem gegeben (9 ml Vesikelsuspension auf ein 36 g-System, s. Tab.2) und geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 500 x g 10 min, um die Phasen-Trennung in Ober-(OP<sup>1</sup>) und Unterphase (UP<sup>1</sup>) zu beschleunigen. Es werden mindestens 2 Systeme benötigt (in 2 Zentrifugationsgläsern) von denen zunächst nur eine mit Vesikeln beschichtet wird. Die erste Oberphase (OP<sup>1</sup>) mit Vesikeln wurde nun auf die frische Unterphase (UP<sup>2</sup>) mit Puffer, zur Unterphase (UP<sup>1</sup>) wurde frische Oberphase (OP<sup>2</sup>) gegeben, geschüttelt und einer erneuten Zentrifugation bei 500 x g unterworfen. Anschließend wurden die Oberphasen OP<sup>1</sup> und OP<sup>2</sup> vereinigt (s.Abb.3).

Nach der Verdünnung der Oberphasen mit Suspensionspuffer im Verhältnis 1:2 erfolgte eine Zentrifugation bei 100000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 35000 U/min, 1 h). Das gewonnene Pellet sollte aus Plasmamembranvesikeln bestehen. Es wur-

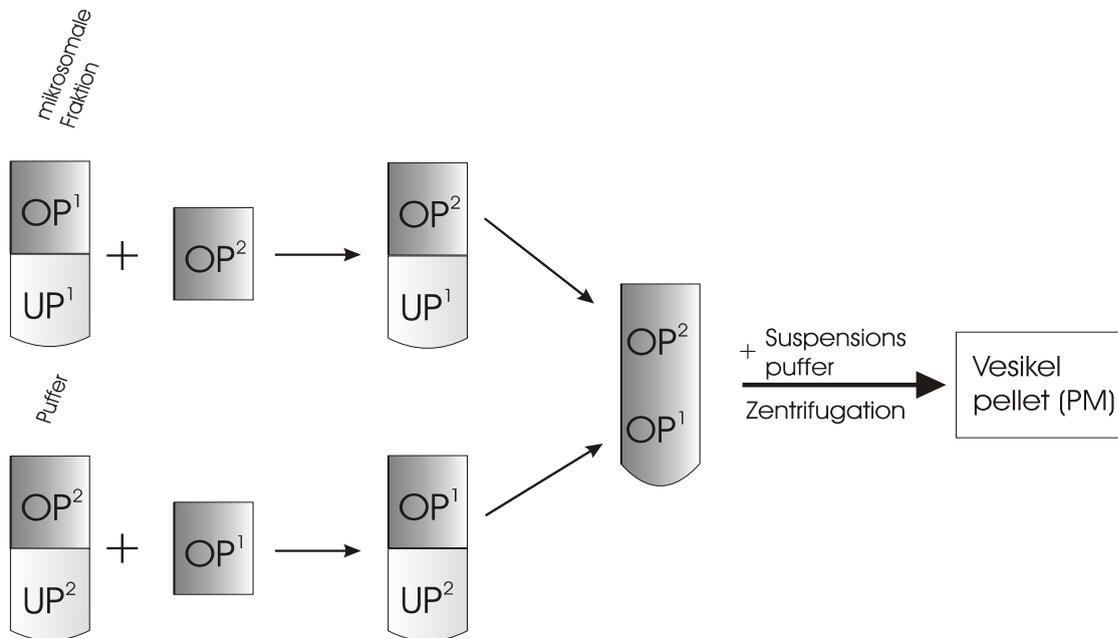


Abb.2. Schema der Reinigung von Plasmamembranvesikeln über Zweiphasensystem

de im entsprechenden Meßpuffer resuspendiert, in dem Markerenzymaktivitäten bzw. Phospholipase-Aktivitäten bestimmt wurden.

#### 2.2.4. Pufferlösungen für die Präparation der Plasmamembranvesikel

##### **Homogenisationspuffer:**

- 330 mM Saccharose
- 50 mM MOPS-KOH pH 7.5
- 5 mM EDTA, 5 mM DTE (frisch zusetzen)
- 5 mM Ascorbinsäure (frisch zusetzen)
- 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Stammlösung 100 mM in Isopropanol)
- 0.6% PVP wasserunlöslich (Polyclar AT)
- 0.2% RSA, 2% Cholin

##### **Suspensionspuffer**

- 5 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7.8
- 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTE
- 330 mM Saccharose

### ***Herstellung der Zwei-Phasen-Systeme zur Isolation von Plasmamembranvesikeln***

Aufgrund der hohen Viskosität der Polymerlösungen lassen sich kaum volumetrisch exakte Maßangaben machen, deshalb erfolgten alle Konzentrationsangaben in Gewichtseinheiten. Die Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O dest. Auf das berechnete Gewicht aufgefüllt.

	36 g-System		24 g-System		Endkonz. (w/w)
	Betain	Saccharose	Betain	Saccharose	
Dextran T-500 20 %	11.7 g	11.7 g	7.8 g	7.8 g	6.5%
PEG 3350 40%	5.85 g	5.85 g	3.9 g	3.9 g	6.5%
Saccharose		3.05 g		2.03 g	330 mM
Betain	1.2 g		0.8 g		330 mM
200 mM PO <sub>4</sub> -Puffer pH-7.8	0.675 ml	0.675 ml	0.45 ml	0.45 ml	5 mM
200 mM KCl	0.675 ml	0.675 ml	0.45 ml	0.45 ml	5 mM
10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA	0.27 ml	0.27 ml	0.18 ml	0.18 ml	0.1 mM
DTE 100 mM	0.27 ml	0.27 ml	0.18 ml	0.18 ml	1 mM
H <sub>2</sub> O			4.2 g	2.97 g	
End	27 g	27 g	18 g	18 g	
Probe oder Suspensionspuffer	9 g	9 g	6 g	6 g	

Tab. 2. Die Zusammensetzung der Zweiphasensysteme am Beispiel von 6.5 %-iges 36 g bzw. 24 g System

#### **2.2.5. Saccharosegradientenzentrifugation**

Die benötigten Saccharoselösungen wurden mit Suspensionspuffer hergestellt.

Der Saccharosegradient bestand aus Schichten mit folgenden Konzentrationen:

25 %, 30 %, 34 %, 38 % 45 % (w/w)

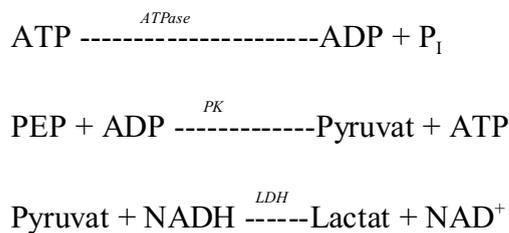
Das Beschichten der Gradienten erfolgte manuell kurz vor der Zugabe der mikrosomalen Fraktion. Nach der Zugabe der mikrosomalen Fraktion (3 ml Vesikelsuspension auf 15 ml Gradient) erfolgte eine Zentrifugation (1h, mit *sw-41* oder *sw-28* Rotor bei 21500 U/min). Nach der Zentrifugation wurden die Banden abgenommen, mit Suspensionspuffer verdünnt und mit einem *Ti-70* Rotor bei 30000 U/min, 30 min zentrifugiert. Alle Zentrifugations- und Verteilungsschritte erfolgten bei 4°C, das Resuspendieren und Homogenisieren der Vesikel im Eisbad.

### 2.3. Markerenzyme für die Charakterisierung von Plasmamembranen

#### 2.3.1. Bestimmung von ATPase-Aktivitäten

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte nach Palmgren (1990). Die ATP-Spaltung wurde über eine enzymatische Kopplung von Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) anhand des Abfalls der NADH-Konzentration (OD bei 340 nm), in einem Spektrometer Ultraspec 3000 (Pharmacia) bestimmt. Die Initialgeschwindigkeit diente als Maß für die ATPase Aktivität.

Messprinzip:



Messansatz:

-1 mM ATP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 140 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mg/ml RSA, 1 mM DTE, 0.25 mM NADH, 1 mM PEP, Lactatdehydrogenase, Pyruvatkinase, Probe und Puffer (10 mM MOPS-BTP pH 7, 330 mM Saccharose)

#### 2.3.2. Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidaseaktivität

Die Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidaseaktivität erfolgte nach Cooperstein (1950). Die Abnahme der Extinktion von Cytochrom c (bei 550 nm) innerhalb einer Minute diente als Maß für die Enzymaktivität.

Messansatz:

-10 µl 1 mM Cytochrom c  
 -5 µl Membranprotein (ca. 10 µg)  
 -85 µl Puffer (50 mM Tris-acetat pH 7.4)

#### 2.3.3. Bestimmung der NADPH-Cytochrom-c-Reductaseaktivität

Die Bestimmung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase-Aktivität erfolgte mit folgendem Messansatz:

10 µl 2 mM NADPH, 2 µl 50 mM KCN, 10 µl 1 mM Cytochrom c (oxidiert), 5 µl Membranprotein (ca. 10 µg) und 73 µl Puffer 50 mM Tris-acetat pH-7.0

Es wurde die Extinktionszunahme von Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt. Die Extinktionsdifferenz pro Minute diente als Maß für die Enzymaktivität.

#### 2.4. Fluorometrische Bestimmung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität

Die Bestimmung des Fluoreszenz-Anstieges bei der Inkubation einer Vesikelsuspension mit dem fluorogenen Substrat bis-BODIPY-FL-C<sub>11</sub>-Phosphatidylcholin (BPC) erfolgte kontinuierlich unter Rühren am Fluorometer. Die Anstieg der Fluoreszenz wurde kontinuierlich verfolgt. Die Messungen wurden in einem Fluormeter Shimadzu RF-5000 (Excitationswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 515 nm).

Messansatz:	Stammlösung
-10 µl Vesikel	1.2-1.5 mg/ml
-1-10 µl BPC	10 µM-100 µM verdünnt aus 1 mM (DMSO)
	Stammlösung mit Suspensionspuffer
-89-80 µl Puffer	Suspensionspuffer

Die Zunahme der Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 1-2 Minuten verfolgt.

Der Anstieg der Geraden aus der Fluoreszenzzunahme pro Zeit wurde berechnet und kann unter definierten Umständen als Maß der Enzymaktivität angesehen werden.

#### 2.5. Analytische und quantitative Dünnschichtchromatographie

Die Umsetzung der Phospholipide wurde an Hand ihrer Hydrolyseprodukte nach HPTLC-Trennung verfolgt. Die Proben wurden mit Hilfe eines AS 30 TLC-Applikators (Desaga, Deutschland) auf HPTLC-Platten ( Kieselgel-60, 10 x 10 cm, bzw 5 x 5 cm Merck, Deutschland ) aufgetragen. Auf den 10 x 10 cm-Platten wurden pro Seite 20-bis 22 Proben, auf 5 x 5 einseitig 10 Proben mit einem Länge von 2 mm und mit 4 mm Abstand aufgetragen. Nach dem Auftragen der letzten Probe wurden die Platten luftgetrocknet. Die Trennung der Proben auf der 10 x 10 cm-Platten erfolgte in einer Horizontalkammer (Camag, Schweiz) in der Sandwichkonfiguration, 5 x 5 cm-Platten in einer Horizontalkammer (Merck, Deutschland) mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser 65+25+4. Dabei betrug die Laufstrecke 43 mm für die Proben. Anschließend wurden die Platten unter dem Abzug getrocknet.

### 2.5.1. Herstellung von fluoreszenzmarkierten Phospholipase-digests

Alle imfolgenden beschriebenen Ansätze wurden 30 min bei 30°C inkubiert und daraus die Phospholipide, wie in 2.5.2. beschrieben, extrahiert. Die unteren Chloroformphasen wurden entnommen und unter Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde in 96%-igem Ethanol aufgenommen und anschließend zur Analyse verwendet.

#### *Produkte von PLA<sub>2</sub> (Lyso-PC plus Fettsäure)*

- 150 µl 50 mM MOPS-KOH pH 6.5
- 20 µl CaCl<sub>2</sub> (SL 100 mM)
- 20 µl BPC/ BEPC (SL 1 mM)
- 10 µl PLA<sub>2</sub> (SL 1u/µl) aus *Apis mellifera* (Sigma P 9279)

#### *Produkte von PLC (fluoresz. DAG)*

- 150 µl 50 mM MOPS-KOH pH 6.5
- 20 µl CaCl<sub>2</sub> (SL 100 mM)
- 20 µl BPC/ BEPC (SL 1 mM)
- 10 µl PLC (SL 0.25u/µl) aus *C. perfringens* (Sigma P 7633)

#### *Produkte von PLD (fluoresz. PA)*

- 150 µl 50 mM MOPS-KOH pH-6.5
- 20 µl CaCl<sub>2</sub> (SL 100 mM)
- 20 µl BPC/ BEPC (SL 1 mM)
- 10 µl PLD (SL 0.5 u/µl) aus Weißkohl (Sigma P 7758)

### 2.5.2. Extraktion der Phospholipide für die HPTLC

Die Phospholipidextraktion erfolgte modifiziert nach Bligh & Dyer (1959). Dazu wurden die Proben mit dem dreifachen Probenvolumen Methanol:Chloroform (2:1 v/v) versetzt und gründlich geschüttelt (Vortex). Etwa nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu den Proben das gleiche Volumen reines Chloroform und das gleiche Volumen 150 mM NaCl-Lösung zugegeben. Um eine schärfere Phasentrennung herbeizuführen, wurden die Proben dann in den Kühlschrank bei 4°C gestellt. Nach der Phasentrennung wurden die Proben von der unteren Chloroformphase vorsichtig entnommen und zur Dünnschichtchromatographie verwendet.

### 2.5.3. Detektion fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC

Die Platten, auf denen fluorogene Phospholipide aufgetragen waren, wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers Storm 860 (Molecular Dynamics, USA) im Modus Chemoblue-Fluoreszenz bei einer Spannung von 950 V gescannt und die Fluoreszenzintensität der Banden mit der Image Quant-Software quantifiziert.

### 2.5.4. Quantifizierung fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC

Die maschinelle Probenauftragung auf die Dünnschichtplatte ermöglicht es eine quantitative Auswertung der Chromatogramme durchzuführen. Aus 1 mM BEPC und BPC Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich von 5-100 nM in Ethanol hergestellt. Von den Verdünnungsreihen wurde je 2 µl Probe auf dem Chromatogramm mit Hilfe eines Applikators (s. Kap.2.5.) aufgetragen. Nach der Auftrennung in der Chromatographie wurde die Fluoreszenz der Proben aus der Verdünnungsreihe mit Hilfe des o.g. Phospho-Imagers gemessen, indem die fluoreszierenden Flächeneinheiten der Phospholipide quantifiziert wurden. BEPC wurde als Standard für alle Metabolite, die 1 fluoreszierende Fettsäure tragen, verwendet, die Verdünnungsreihe von BPC diente als Standard für alle Metabolite mit zwei fluoreszierenden Fettsäuren. Aus der graphischen Auftragung der Fluoreszenzeinheiten gegen die Mengen auf der DC-Platte wurden folgende Anstiege ermittelt:  $K_{BPC}=308.6$ ,  $1/K_{BPC}=0.003241$  und  $K_{BEPC}=121.7$ ,  $1/K_{BEPC}=0.008218$  bei PMT 950 V (s.Abb. 3.b.) sowie  $K_{BPC}=71.96$ ,  $1/K_{BPC}=0.0139$  und  $K_{BEPC}=29.42$ ,  $1/K_{BEPC}=0.03399$  bei PMT 800 V (s.Abb.3.a). Die starke Abhängigkeit der Anstiege von der verwendeten PMT-Spannung macht es notwendig, die Versuche bei konstanten Geräteparameter durchzuführen. In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenz von BEPC und BPC ausschließlich bei einer PMT von 950 V gemessen. Zur Bestimmung der jeweiligen Substanzmenge wurde gemessene Fluoreszenzwert mit dem zugehörigen 1/K-Wert ( $K$ =Anstieg der Kalibrier-Kurve) multipliziert.

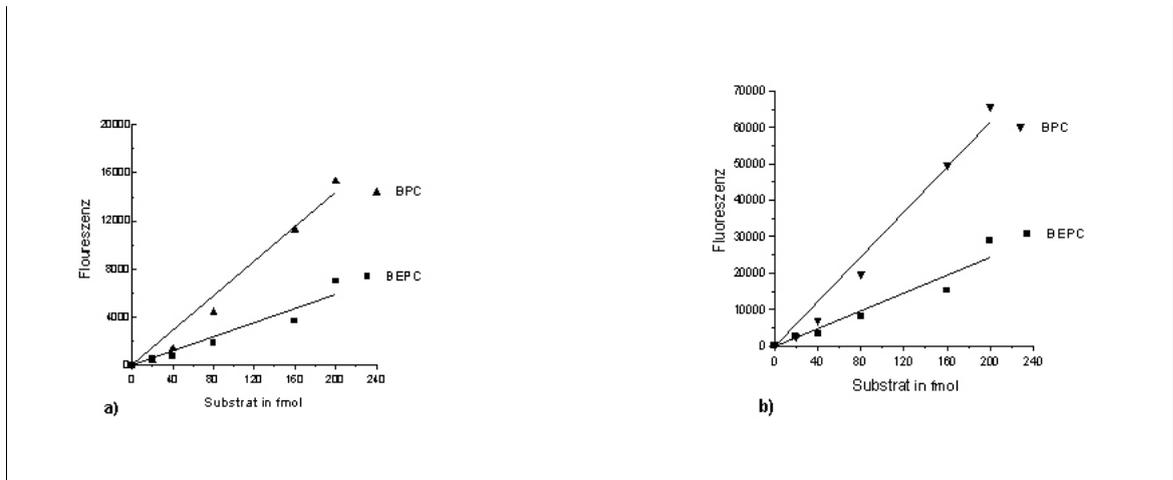


Abb.3. Eichkurve zur Quantifizierung der fluorogenen Phospholipidsubstrate. BEPC und BPC auf Kieselgelplatten a) ermittelt bei 800 V b) bei 950 V

### 2.5.5. Ermittlung der optimalen Substratkonzentration für die Messung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Zellsuspensionen

Bei Untersuchungen mit einer zu hohen BEPC-Konzentration könnten zellschädigende Effekte durch aus dem Substrat gebildeten Produkte auftreten. Um dies zu minimieren, wurde eine minimale Substratkonzentration ermittelt, bei der sich die Aktivität der PLA<sub>2</sub> in Zellen gut messen läßt. Es wurde End-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  BEPC getestet. Das zuvor mit Ultraschall behandelte Substrat im Nährmedium wurde zu den Zellen zugesetzt und nach 2, 5, 10 und 20 min Inkubation wurden die Aliquots entnommen. Das Auftreten der PLA<sub>2</sub>-Hydrolyseprodukte konnte bei allen o.g. BEPC-Konzentrationen gut detektiert werden. Die Menge der gebildeten BE-LPC pro Zeiteinheit war direkt proportional den verwendeten Konzentrationen an BEPC (s.Abb.4.). Anhand dieser Daten und unter Berücksichtigung der Streuung der Meßwerte wurde die Aktivität der PLA<sub>2</sub> in Zellsuspensionen bei einer BEPC-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  gemessen.

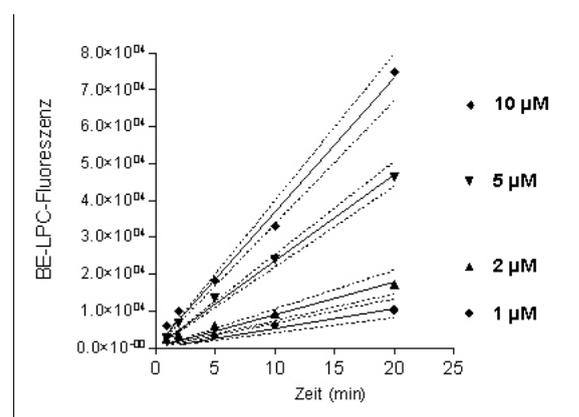


Abb. 4. Kinetik der Freisetzung von BE-LPC aus BEPC bei verschiedener Konzentration durch die PLA<sub>2</sub> der Zellen von *Eschscholzia californica*.

### **2.5.6. Detektion postchromatographisch gefärbter genuiner Phospholipide**

Wegen des Fehlens von chromophoren Gruppen im natürlichen Phospholipidmolekül besteht die Notwendigkeit zur Sichtbarmachen dieser Verbindungen mit speziellen Farbreagenzien.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die postchromatische Färbung mit einer Mischung aus Kupfersulfat/Phosphorsäure (modifiziert nach Touchstone et al., 1983). Die DC-Platten wurden 2 min lang bei 120° C erwärmt und nach dem Abkühlen in eine Färbelösung (0.626 M Kupfersulfatpentahydrat mit 8%-iger Phosphorsäure) getaucht. Anschließend wurden diese Platten erneut auf einer Thermoplatte auf eine Temperatur von ~160-170°C für 2-4 min erhitzt. Die Quantifizierung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe eines Densitometers CD 60 (Desaga, Deutschland) im Extinktionsmodus bei einer Wellenlänge von 390 nm.

Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage der ermittelten Peakfläche in Bezug zu den aufgetragenen Standards.

### **2.6. Ermittlung der Massenspektren von Phospholipiden**

Die Ermittlung der Massenspektren von Phospholipidmetaboliten erfolgte (Kooperation: M. Petkovic, Dr. Arnhold, Leipzig) nach Müller et al. (2001) über MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Zunächst wurden die Extrakte (Chloroform/Methanol) in einem Exsikkator getrocknet und mit der Matrixlösung (0.5 M 2,5-dihydroxybenzeonsäure in Methanol mit 0.1% Trifluoressigsäure) resuspendiert. Das Volumen der Matrixlösung entspricht dem Probenvolumen vor dem Eindampfen. 1.8 µl Proben-Matrix-Gemisch wurde dann auf den Probenhalter gebracht und unter Zufuhr von warmer Luft getrocknet.

Das Trocknen führt zu einer homogenen Kristallisation auf dem Probenhalter. Die MS-Messungen erfolgten an einem Voyager Biospektrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Dieses System besitzt einen Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm. Der Druck in der Ionenkammer betrug zwischen  $1 \times 10^{-7}$  und  $4 \times 10^{-7}$  Torr. Die Extraktion der Ionen erfolgte im verzögerten Modus bei einer Spannung von 20 kV. Bei diesem Modus gelangen die Ionen nach der Beschleunigung in die feldfreie Flugstrecke von 2 m bis zum Reflektor. Die Proben wurden bei jeder Messung 128 mal mit Laser beschossen, mit einer Bestrahlungsstärke, die mit 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylinositol als Standard geeicht wurden war.

## **2.6.1. Phospholipidextraktion für die Analyse mit MALDI-TOF-MS**

### **2.6.1.1. Phospholipidextraktion aus den Plasmamembranvesikeln**

50 µl gereinigte Plasmamembranvesikel in Suspensionspuffer wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten mit 100 µl Chloroform/Methanol-Mischung 1:4 versetzt. Nach 30 min Schütteln wurde 50 µl 150 mM NaCl und 80 µl Chloroform zugesetzt. Danach wurden die Proben 20 min lang bei 4°C aufbewahrt, um eine Phasentrennung zu erreichen.

Die untere organische Phase der Proben wurde entnommen und unter Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde in 50 µl Chloroform aufgenommen und anschließend zur Messung eingesetzt.

### **2.6.1.2. Phospholipidextraktion aus Zellsuspensionen nach Elicitor-Behandlung**

Für die Analyse der Zellextrakte mit MALDI-TOF-MS wurden 4-5-Tage alte Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen mit 100 mM Sorbitol gewaschen und anschließend in einer phosphatfreien, 75%-igen Nährlösung resuspendiert. Zu 2 ml Zellsuspensionen mit einer Frischmasse von 50 mg/ml im Kolben wurde 2 µg/ml Elicitor zugesetzt. Nach 2 min, 5min, 10 min und 20 min wurden jeweils 500 µl Zellsuspension entnommen und mit 1.0 ml Stopplösung (Chloroform/Methanol 1:4) versetzt. Nach 30 min wurde 500 µl 150 mM NaCl-Lösung, und nach weiteren 20 min 800 µl Chloroform zugesetzt. Um eine gute Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben dann für 20 min bei 4°C aufbewahrt. Von den unteren Chloroformphasen wurde mit Hilfe einer Spritze 1 ml entnommen und unter Stickstoffzufuhr abgedampft. Das Resuspensionsvolumen betrug ein Zehntel des Extraktionsvolumens der Zellen (50 µl Chloroform).

### **2.6.1.3. Gewinnung einer Lysophospholipid-Fraktion aus der Plasmamembran**

Zu 50 µl Plasmamembranvesikeln in Suspensionspuffer wurden 50 µl MOPS-KOH pH 7.5 und 10 µl PLA<sub>2</sub>-Lösung (PLA<sub>2</sub> aus *Apis mellifera*, 1.225 U/mg, 2.4 U/µl) zugesetzt, und 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Chloroform/Methanol-Mischung 1:4 gestoppt. Nach 30 min Schütteln wurden 100 µl 150 mM NaCl und 160 µl Chloroform zugesetzt. Danach wurden die Proben 20 min bei 4°C aufbewahrt. Die untere organische Phase wurde mit Hilfe eines TLC-TLC-Applikators auf Kieselgel-60-Platte aufgetragen. Danach erfolgte die Trennung der Proben in einer

Horizontalkammer mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser 65+25+4. Eine Spur (ca. 2 cm) der Platte wurde mit dem Kupfersulfat-Reagenz (Kap.2.5.6) angefärbt.

Die Abschnitte mit gleichem  $R_f$ -Wert wie die angefärbte LPC-Bande wurden von dem Rest der Platte mit Hilfe einer Rasierklinge ausgekratzt, in Methanol aufgenommen und 30 min lang geschüttelt, anschließend 20 min lang bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Stickstoff abgedampft. Der getrocknete Rest wurde in 96 % Ethanol resuspendiert.

## **2.7. Sonstige Methoden**

### **2.7.1. Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinproben erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Das Ablesen der Extinktion bei 590 nm erfolgte in einem Photometer Ultrospec-3000 (Pharmacia). Die Auswertung der Messungen erfolgte auf der Basis von Eichkurven mit Rinderserumalbumin.

### **2.7.2. Bestimmung der Vesikelgröße**

Die Vesikelgröße in Suspensionen wurde mittels Laserinterferometrie in einem *Zetasizer-4* (Malvern Instruments Ltd.) bestimmt.

### **2.7.3. Bestimmung von Benzophenanthridin-Alkaloiden**

Zu 0.5 ml Zellsuspension wurden 0.5 ml Extraktionsmittel (100 ml Methanol+720  $\mu$ l 5N HCl) zugegeben und 20 min bei 40°C im Thermomixer geschüttelt. Nach der Extraktion wurden die Proben 15 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Überstandes in einem Spektrofluorophotometer RF-5000 (Shimadzu) bei einer Excitationswellenlänge von 460 $\pm$ 5 nm, Emission 570 $\pm$ 10 nm gemessen. Die Auswertung der Messungen erfolgte auf Basis einer Eichkurve mit Sanguinarin.

### **2.7.4. Einschluß von Glutathion in den Vesikeln durch Elektroporation**

Die Membranvesikel wurden in Elektroporationspuffer (10 mM MOPS-BTP pH 7.0 mit 330 mM Saccharose ohne KCl und DTE) aufgenommen, die Vesikelmenge über die optische Dichte bei 550 nm ermittelt und durch entsprechendes Verdünnen auf einen konstanten Wert (OD=1.6) gebracht. Die Vesikelsuspension wurde mit 20 mM GSH-Lösung (im gleichen

Puffer) im Verhältnis 3:1 gemischt. Von der Mischung wurden 90  $\mu\text{l}$  Probe entnommen und in Elektroporationsküvetten (1mm Elektrodenabstand) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gerät der Firma Biotechnologies & Experimental Research INC bei 50  $\mu\text{F}$ , 720 Ohm und unterschiedlichen, jeweils optimierten Spannungen.

Nach der Elektroporation wurden die OD der Proben bei 550 nm gemessen. Dann wurden 80  $\mu\text{l}$  in Eppendorffubes gegeben, mit Elektroporationspuffer 1:20 verdünnt, 15 min bei 15400 U/min zentrifugiert und anschließend die Pellets nochmals in 1ml Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets in 80  $\mu\text{l}$  Elektroporationspuffer resuspendiert.

### 2.7.5. Bestimmung von Glutathion

Die Bestimmung von Glutathion (GSH) erfolgte in einer modifizierten Form nach Coleman (1997) unter Verwendung von Monochlorobiman (MCB) (s. Abb. 5.), welches mit GSH ein fluoreszierendes Konjugat bildet. Diese Reaktion wird durch Zusatz von Glutathion-S-Transferase gestartet.

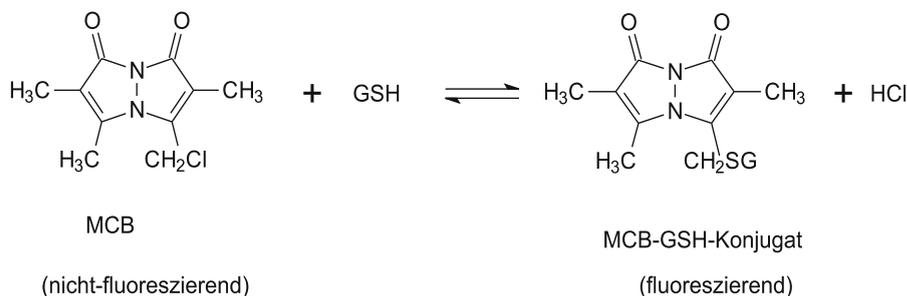


Abb.5. Reaktion zwischen Monochlorobiman und Glutathion (GSH)

Messansatz:

-16  $\mu\text{l}$  Monochlorobiman (1 mM), 2  $\mu\text{l}$  Glutathion-S-Transferase (0.1 u/ $\mu\text{l}$ ), 62  $\mu\text{l}$  Puffer, 80  $\mu\text{l}$  Probe Der Puffer ist 10 mM MOPS-BTP pH 7.0 mit 330 mM Saccharose ohne DTE. Die Reaktion wurde 15 min lang bei 37°C unter Schütteln durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60  $\mu\text{l}$  10 %-iger Essigsäure gestoppt. Dann wurde die Fluoreszenz der Proben bei einer Excitationswellenlänge von 395 $\pm$ 5 nm und bei Emissionswellenlänge von 470 $\pm$ 10 nm, gemessen (Shimadzu RF-5000). Die für eine Quantifizierung von GSH notwendige MCB-Konzentration wurde an Hand einer Eichreihe ermittelt.

Die Abb.6 zeigt, dass Glutathion im Konzentrationsbereich von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  mit 100  $\mu\text{M}$  MCB vollständig umgesetzt werden kann, wie aus dem linearen Verlauf der Fluoreszenz- intensität mit steigender GSH- Konzentration abgeleitet werden kann.

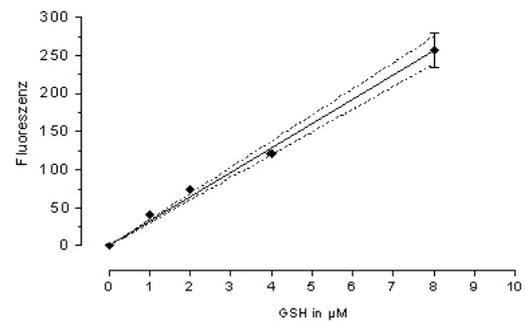


Abb.6. Eichkurve für die Quantifizierung von GSH. Der Anstieg der Geraden ( $k= 32.05\pm 2.235$ ) diente als Faktor zur Berechnung des GSH-Gehaltes.

## 2.8. Chemikalien und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die von anderen Firmen bezogenen besonderen Chemikalien und Geräte sind nachfolgend aufgeführt:

### *Chemikalien und Geräte*

BPC

BEPC

Monochlorobiman

Elektroporationsküvetten mit 1mm Abstand

HBI (Hexabromoiridat (V))

HTPLC-Kieselgel-60 Platten

5 × 5 cm Horizontallaufkammer

10 × 10 cm Horizontallaufkammer

Zeta-Sizer-4

Elektro ECM 600

Spektrofluorometer RF-5000

### *Herkunft*

Molecular Probes

-----//-----

-----//-----

Eppendorff

Alfa (Johnsen Mathy GmH)

Merck (Deutschland)

-----//-----

Camag (Schweiz)

Malvern Instruments Ltd

Biotechnologies & Experimental  
Research INC (USA)

Shimadzu (Japan)

### 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1. Übersicht der verwendeten Methoden zur Reinigung der Plasmamembranen

Das erste Ziel dieser Arbeit war, hochreine Plasmamembranen aus kultivierten Zellen von *Eschscholzia californica* zu isolieren und zu charakterisieren.

Bis jetzt verwendete man in der Praxis drei Methoden für die Isolierung von Plasmamembranen aus Pflanzenmaterial:

- die Verteilung in einem wässrigen Zweiphasensystem aus den Polymeren Polyethylenglykol und Dextran (Briskin et al., 1987; Larsson et al., 1987),
- die Dichtegradienten-Zentrifugation mit Saccharose oder Sorbitol,
- die Trennung mittels free-flow-Elektrophorese (Sandelius et al., 1990).

Biologische Membranen unterscheiden sich voneinander hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, „sidedness“ und Funktion. Die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften, besonders die Hydrophatit der Proteine der Plasmamembranen im Vergleich zu anderen intrazellulären Membranen (Tonoplast, Golgimembran, Endoplasmatisches Reticulum), ermöglichen eine differenzierte Verteilung im wässrigen Zweiphasensystem (Larsson et al., 1987).

Bei der Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten beruht das Reinigungsprinzip dagegen auf den unterschiedlichen Dichten von Membranen verschiedener Zellorganellen (s.Tab.3).

Jedoch erschweren oft die geringen Unterschiede dieser Membranen die Gewinnung von Membranfraktionen hoher Reinheit.

Organellen	Dichte g/cm <sup>3</sup>
Plasmamembran	1.14-1.17
Mitochondrialmembran	1.18-1.2
Golgimembran	1.12-1.15
Rauhes Endoplasmatisches Reticulum	1.15-1.17
Thylakoide	1.16-1.18

Tab.3. Dichte verschiedener zellulärer Membranen nach Larsson (1987)

Das Trennprinzip der apparativ aufwendigen “free-flow” Elektrophorese, die in dieser Arbeit nicht verwendet wurde, beruht auf der elektrophoretischen Beweglichkeit von Membranvesikeln in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Ladungszustandes (Sandelius et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Isolierung von Plasmamembranen aus den Zellen der

Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica* die Verteilung im wässrigen Zweiphasensystem und die Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose angewandt und hinsichtlich ihrer Reinigungseffizienzen verglichen.

### **3.1.1. Optimierung der Reinigung der Plasmamembranen im wässrigen Zweiphasensystem**

Die Mischung der wasserlöslichen Polymere PEG 3500 und Dextran 500 führt zur Bildung eines Zweiphasensystems, bestehend aus einer PEG-reichen Oberphase und einer Dextran-reichen Unterphase. Durch die Zugabe verschiedener Puffer und Salze kann man diese Phasen mit unterschiedlichem osmotischen Potential ausstatten um die Trennung (Fraktionierung) von Protoplasten, Organellen und Membranen weiter zu verfeinern. Im Gegensatz zu den intrazellulären Membranen hat die Plasmamembran eine höhere Bindungsaffinität zur PEG-reichen Phase (Oberphase).

Die effiziente Verteilung von biologischen Membranen im Zweiphasensystem findet nur in einem sehr engen Bereich genau definierten Polymerkonzentrationen statt. Dieser liegt im Bereich zwischen 5.5-6.5 %, wobei beide Polymerkonzentrationen den gleichen prozentualen Wert haben müssen. Neben den Polymerkonzentrationen können auch die Salzkonzentrationen variiert werden. Bei der Optimierung können einerseits niedrigere Polymerkonzentration (5.5-5.9%) mit höheren Salzkonzentrationen (>5 mM KCl) kombiniert werden, andererseits kann auch durch höhere Polymerkonzentrationen (6.5%) in Verbindung mit niedrigen Salzkonzentrationen (<5 mM KCl) die Separation der Plasmamembranen erreicht werden.

Es gibt inzwischen Arbeiten, bei denen Zweiphasensysteme für die Reinigung von Plasmamembranvesikeln aus verschiedenen pflanzlichen Spezies verglichen werden können. Die dabei verwendeten Systeme hatten unterschiedliche Polymer- und Salzkonzentrationen. Aus den Blättern von *Vicia faba* wurden Plasmamembranvesikel durch ein Zweiphasensystem mit der Polymerkonzentration 6.2 % sowie mit einer Salzkonzentration von 4 mM KCl gereinigt (Sandalius et al. 1990). Dagegen konnte Blum et al. (1988) Plasmamembranen aus dem Mesophyll der gleichen Pflanze durch ein Zweiphasensystem mit einer niedrigeren Polymerkonzentration (5.6 %), kombiniert mit einer hohen Salzkonzentration von 17.5 mM KCl, reinigen. Für die hier durchgeführte Plasmamembranpräparation aus den Zellen *Eschscholzia californica* hat sich ein Zweiphasensystem mit einer Polymerkonzentration von 6.5 % und einer Salzkonzentration

von 5 mM KCl als optimal erwiesen. Die Ausbeute an Membranen (gemessen an Hand ihrer Proteine), welche aus dem mikrosomalen Pellet (alle Membranen der Zelle ohne Mitochondrien) nach der Zweiphasenverteilung in die Oberphase übergangen, lag bei 3-5% (s. Abb.7a). Dies entspricht etwa den in der Literatur angegebenen Werten (Sandelius et al.,1990). In weiteren Experimenten hat sich ergeben, dass bei Verwendung höherer Polymerkonzentrationen (>6.5%) kaum mehr Membranen in der PEG-Phase erhalten werden können. Bei niedrigeren Polymerkonzentrationen als 6.5% erhöht sich die Ausbeute an „Plasma-Membran“ gemessen als Konzentration von Membranproteinen, (s. Abb. 7b) jedoch muß befürchtet werden, dass damit auch unerwünschte Membranen (Tonoplast, Golgimembran, Endoplasmatisches Reticulum) in die Oberphase übergehen (Larsson, 1987; Widell, 1990). Die aus dem Zweiphasensystem mit einer Polymerkonzentration von 6.5 % erhaltenen Vesikel wurden durch Markerenzyme charakterisiert.

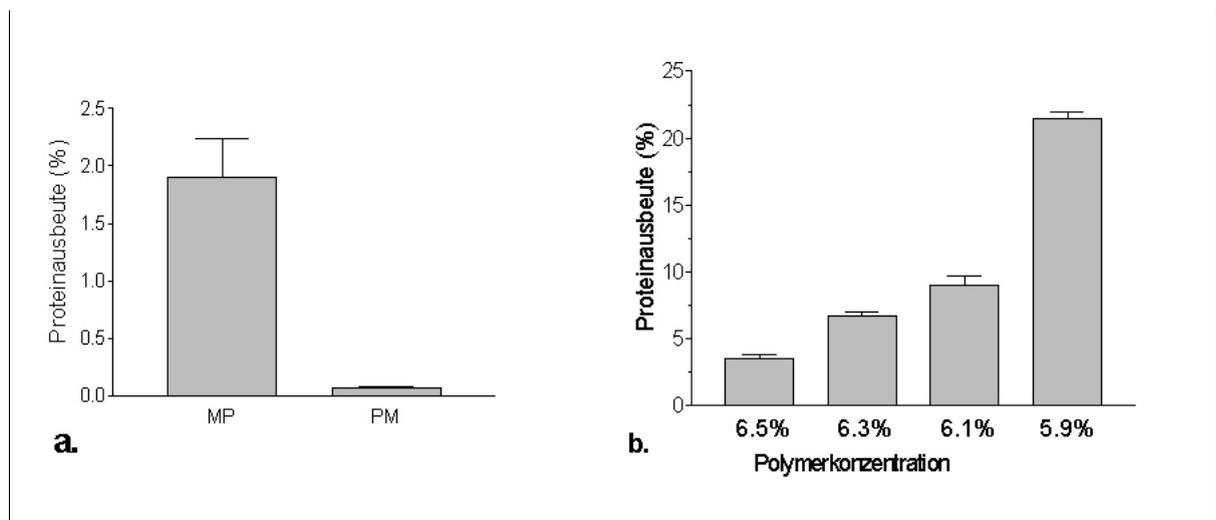


Abb.7. **a)** Prozentuale Ausbeute an Membran-Proteinen bei der Reinigung der Plasmamembranen von *Eschscholzia californica*, bezogen auf den Proteingehalt des Rohhomogenates (RH). Dargestellt sind der Proteingehalt im mikrosomalen Pellet (MP) sowie der Plasmamembranen (PM) mit einer Polymerkonzentration von 6.5% erhalten wurden.

**b)** Die prozentuale Proteinausbeute von Plasmamembranen aus dem mikrosomalen Pellet (MP). Der Proteinwert von MP ist als 100% gesetzt. Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar.

## 3.2. Charakterisierung der gereinigten Plasmamembranen

### 3.2.1. Markerenzymaktivitäten

Zur Beurteilung der Reinheit von Plasmamembranen (PM) sind Messungen spezifischer Markerenzym-Aktivitäten erforderlich. Es gibt leider kein Markerenzym, welches nur an einer einzigen Membrankomponente gefunden wird und eine spezifische, gut messbare enzymatische Aktivität besitzt. Bei der Charakterisierung der Plasmamembranen ergeben sich Probleme aus der Tatsache, dass einerseits gut messbare Enzyme wie z.B. die P-ATPasen in verschiedenen Membranfraktionen der Zelle gefunden werden, andererseits PM-spezifische Enzymaktivitäten wie z.B. die Glucansynthase nicht einfach gemessen werden können. Deshalb wurden Messungen der Aktivitäten der membranspezifischen ATPasen zur Charakterisierung der Plasmamembran benutzt und die Selektivität durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren verbessert. Ergänzend zu Messungen der ATPase-Aktivitäten wurden Markerenzymaktivitäten anderer Membrankomponenten gemessen, um Verunreinigungen der PM-Vesikel mit anderen Membranen ermitteln zu können. Tab.4 zeigt eine Übersicht der benutzten Markerenzyme.

Organell (Membrankomponente)	Enzymaktivität	Referenz
Mitochondrien	Cytochrom c-Oxidase	Widell et al., 1990
Plasmamembran	Erythrosin B -hemmbare P-H <sup>+</sup> -ATPase	Cocuchi, 1986
Endoplasmatisches Retikulum	NADPH-Cytochrom c-Reductase	Widell et al., 1990
Tonoplast	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -hemmbare V-ATPase	Serrano, 1990

Tab.4. Spezifische Enzymaktivitäten, die für verschiedene zelluläre Membranen charakteristisch sind

#### 3.2.1.1. H<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembranen (P-ATPase)

Die Benutzung der H<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembranen als Markerenzym ist problematisch, weil die Zellen zahlreiche weitere ATP-hydrolysierende Enzyme besitzen. Zur Verbesserung der Selektivität bei der Aktivitätsmessung müssen daher spezifische pH-Optima, Ionenbedürfnisse und Inhibitoren der zellulären ATPase beachtet werden. Die H<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembranen der Pflanzen hat ein pH-Optimum zwischen 6-7, sie ist Mg<sup>2+</sup>-Ionen abhängig, Ca<sup>2+</sup>-Ionen unabhängig und braucht K<sup>+</sup>-Ionen für ihre volle Aktivität (Sze, 1985; Serrano, 1990). Bei der Messung der ATPase-Aktivität in Membranvesikeln muß berücksichtigt werden, dass die Lipiddoppelschicht eine Permeabilitätsschranke gegen den freien Austausch von ATP darstellt und asymmetrisch

aufgebaut ist. Nach dem Zellaufschluß bzw. während der Homogenisation bilden Membranfragmente spontan Vesikel, die oft eine Mischung aus „rightside-out“ (die in der Zelle dem Cytosol zugewandte Seite zeigt nach innen) und „inside-out“ (ehemals cytosolische Seite zeigt nach außen) Orientierung darstellen. Wenn bei den Messungen Detergenzien wie Triton X-100 zugesetzt werden, führt dies meist zu einer Erhöhung der ATPase-Aktivität von Plasmamembranen. Dies deutet darauf hin, dass ein großer Teil der Plasmamembranvesikel die ATP-Spaltstelle auf der cytosolischen Seite hat, d.h. wie sie in der Zelle orientiert ist. Die Innenseite dieser „rightside-out“-Vesikel wird erst nach Membranzerstörung durch die Detergenzien zugänglich. Alternativ kann die „rightside-out“-Struktur durch die Zugabe des neutralen Detergens Brij-58 (Johansson et al., 1995). Um die gesamte ATPase-Aktivität zu erfassen, wurde die ATPase-Aktivität in Anwesenheit von 0.01 % Triton X-100 bzw. 0.05 % Brij-58 verfolgt. Aus der Differenz der meßbaren ATPase-Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Brij 58 bzw. Triton X-100 kann geschlossen werden, dass die von uns gereinigten Plasmamembranvesikel einen Anteil von 25-30% an „inside-out“-Vesikeln besitzen.(s. Tab. 5). Die in den folgenden Graphiken dargestellten Angaben über die H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivitäten in den Membranfraktionen beziehen sich immer auf die gesamte ATPase-Aktivität der Proben, welche nach Brij-58 Zusatz ermittelt wurde.

#### ***Anreicherung der ATPase-Aktivität in den Plasmamembranen***

Unter den von uns gewählten Messbedingungen nach Palmgren (1990) wurde dabei in der Plasmamembran-Fraktion eine 6-fache Erhöhung der Aktivität, verglichen zum Rohhomogenat und eine ca. 30%-ige Erhöhung im Vergleich zum mikrosomalen Pellet ermittelt (s.Abb.8). Dies ist ein Hinweis, dass eine Anreicherung der Plasmamembranfraktion im Zweiphasensystem stattgefunden hat. Die weitere Charakterisierung der PM-Vesikel-fraktion erfolgte über die Wirkung von Hemmstoffen unterschiedlicher Spezifität.

#### ***Erythrosin B-sensitive H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität***

Erythrosin B ist ein wirksamer Hemmstoff der PM-ATPase mit höher Spezifität (Serrano, 1990). Für die gereinigte PM-ATPase aus *Raphanus sativus* wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1 µM ermittelt. Eine vollständige Inhibierung der Aktivität wurde mit 30 µM Erythrosin B erreicht (Gocucci,

1986). In den von uns gereinigten PM-Vesikeln von *Eschscholzia californica* ergab sich  $IC_{50}$ -Wert von  $43 \mu M$ , im mikrosomalen Pellet ein  $I_{50}$ -Wert von  $120 \mu M$  (s. Abb.9).

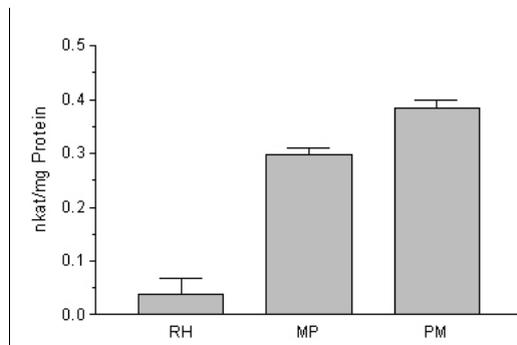


Abb.8. Spezifische ATPase-Aktivitäten vom Rohhomogenat (RH), des mikrosomalen Pellet (MP) und der Plasmamembranen (PM). Die Ergebnisse stellen Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dar.

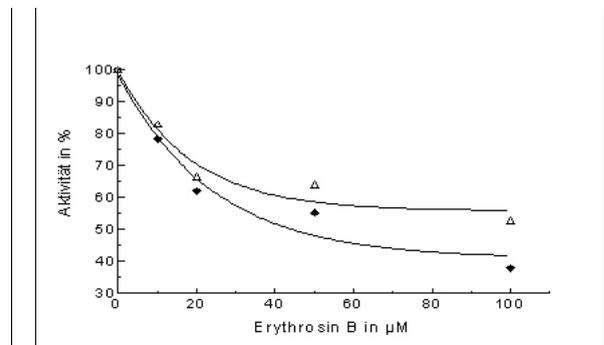


Abb.9. Erythrosin B-sensitive ATPase-Aktivität im mikrosomalen Pellet (-Δ-) und in Plasmamembranen (-◆-). Die Aktivität in Abwesenheit von Erythrosin B als 100% gesetzt.

### ***Nitratsensitive ATPase-Aktivität***

Der  $NO_3$ -hemmbare Anteil der gesamten ATPase-Aktivität kann als Maß der ATPase-Aktivität des Tonoplasten geschätzt werden. Bei einer Konzentration von 50 mM Nitrat sollte nach den in der Literatur beschriebenen Angaben eine vollständige Hemmung der Tonoplasten-ATPase erreicht werden (Larsson, 1987; Serrano, 1990). gemessen). In der mikrosomalen Fraktion von *Eschscholzia californica* konnte durch 50 mM  $KNO_3$  eine 35-bis 40 %-ige Reduktion der ATPase-Aktivität festgestellt werden (s. Abb.10), in der gereinigten Plasmamembranfraktion wurde noch eine Reduktion von 15-19 % gefunden. Dies kann bedeuten, dass eine Verunreinigung mit Tonoplastenmembranen in den Plasmamembranvesikeln vorliegt. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, dass auch in den Plasmamembranen eine geringe V-ATPase-Aktivität vorliegt, deren biologische Funktion noch unklar ist (Ratajczak & Wilkins, 2000), so dass die Verunreinigung mit Tonoplasten geringer als 15 % sein sollte.

### ***Azid-sensitive ATPase-Aktivität***

Die ATPasen der Mitochondrien und der Thylakoide ( $F_0/F_1$ -Typ) lassen sich durch 1 mM Azid praktisch vollständig hemmen (Gallagher et al., 1982; Serrano, 1990). Die ATPase der Thylakoide sollte in unserer Zellkultur keine Rolle spielen, da die Zellen unter den Kultivierungsbedingungen

nicht ergrünen und Thylakoid-ATPase höchstens in Proplastiden vorhanden sein könnte. Dagegen ist die Prüfung auf mitochondriale ATPase sinnvoll. In unseren Versuchen verursachte Natriumazid, ein Hemmstoff der mitochondrialen  $F_0F_1$ -ATPase, keine Hemmung der ATPase-Aktivität in den Plasmamembranpräparaten (s. Abb. 11). Es konnte auch kein Hemmeffekt des Azids auf die ATPase-Aktivität im mikrosomalen Pellet gefunden werden. Dies bedeutet, dass bereits die gereinigte Membranfraktion keine Verunreinigung durch Mitochondrien und Thylakoiden besitzen, insbesondere die Mitochondrien vollständig abgetrennt wurden. Dies wurde durch Messungen der Cytochrom c Oxidase, einem weiteren Markerenzym der inneren Mitochondrienmembran, verifiziert.

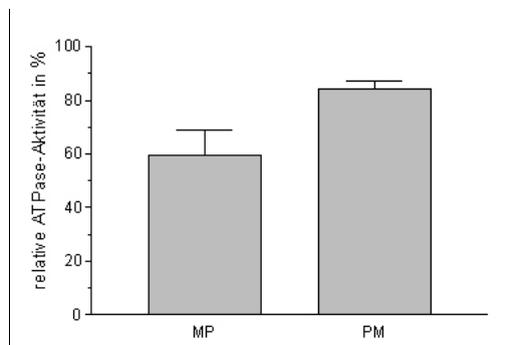


Abb.10. Nitratsensitive ATPase-Aktivität im mikrosomalen Pellet (MP) und in Plasmamembranen (PM). Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar. Die Aktivität in Anwesenheit von 50 mM KCl wurde als 100% gesetzt.

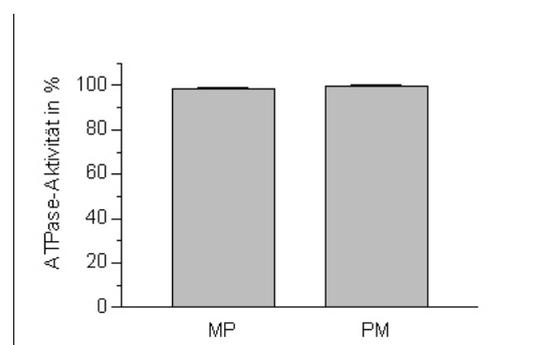


Abb. 11. Azidsensitive ATPase-Aktivität in MP und in PM. Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar. Die Aktivität in Anwesenheit von 50 mM KCl wurde als 100% gesetzt.

### 3.2.1.2. Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität

Die Cytochrom-c-Oxidase ist einer der Marker, die in der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert sind. Auf Grund ihrer hohen Dichte lassen sich die Mitochondrien schon bei 10000 x g pelletieren, somit können sie von den Membranen der mikrosomalen Fraktion abgetrennt werden (Widell et al., 1990). Bei unseren Versuchen wurden in der mikrosomalen Fraktion eine 4.5-fache und in der Plasmamembranfraktion eine 34-fache Erniedrigung der Cytochrom c Oxidase Aktivität Indem der MP-Gewinnung vorgelagerten Zentrifugationsschritt werden die Mitochondrien effizient abgetrennt, somit wird eine sehr hohe Cytochrom-c-Oxidase Aktivität

im  $10^4 \times$  g Pellet gefunden gegenüber der  $10000 \times$  g-Membranfraktion, welche die Mitochondrien enthalten sollte, gemessen (s. Abb. 12). Dies bestätigt, dass bereits bei der Gewinnung der mikrosomalen Fraktion der größte Teil der Mitochondrienmembranen effektiv abgetrennt wird. Die noch verbleibenden Mitochondrienmembranen werden im Zweiphasensystem fast vollständig mit hoher Effizienz abgetrennt.

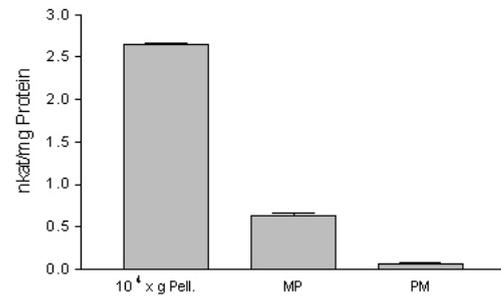


Abb.12. Spezifische Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität in verschiedenen Membranfraktionen. Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar.

### 3.2.1.3. Antimycin-insensitive NADPH-Cytochrom-c-Reductase

Die Antimycin-insensitive NADPH-Cytochrom-c-Reductase wird oft als Markerenzym des Endoplasmatischen Retikulums verwendet (Widell et al., 1990). In unseren Experimenten wurde die Aktivität des Enzyms in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  Antimycin gemessen. Diese Aktivität war im Rohhomogenat um das 3-fache und in den Plasmamembranvesikeln um das 6-fache, verglichen mit dem mikrosomalen Pellet erniedrigt (s. Abb.13). Die geringe Restaktivität in Plasmamembranvesikeln ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die NADPH-Cytochrom c-Reductase auch in Plasmamembranen vorkommt, wie auch in anderen Membranen (Lundborg et al., 1981). Die Ergebnisse zeigen zunächst eine Aufkonzentrierung der NADPH-Cyt-c-Red-Aktivität bei der Gewinnung des mikrosomalen Pellets (MP), bei der Reinigung im Zweiphasensystem wird ER-ständige Enzymaktivität effizient abgebaut.

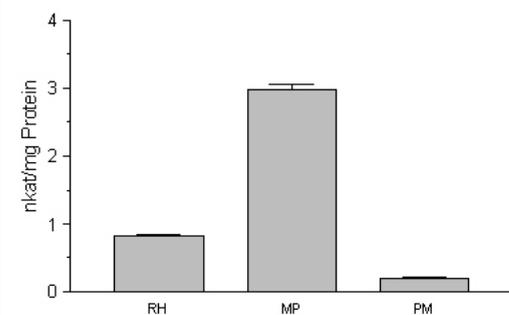


Abb.13. Spez. NADPH-Cyt-c-Reductase-Aktivität in verschiedenen Fraktionen. Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar.

### 3.2.2. Bewertung der Markerenzymaktivitäten der im Zweiphasensystem gereinigten Plasmamembranvesikel

Die Bewertung der Messungen der Markerenzymaktivitäten in Plasmamembranvesikeln ergab, dass die Plasmamembranen weniger als 15 % mit Tonoplasten-Membranen verunreinigt sind. Andere Membranenzymaktivitäten, wie z.B. für ER-Membranen, Mitochondrien und Chloroplasten-membranständige Enzymaktivitäten wurden nicht gefunden (s Tab.5.).

Marker	Rohhomogenat	mikrosomale Fraktion	PM-Vesikel
spezifische ATPase Aktivität in nkat/mg Protein	0.067-0.008	0.28- 0.31	0.367-0.4
Erythrosin B-sensitive ATPase-Aktivität IC <sub>50</sub> -Werte	n.D	ca. 120 µM	43 µM
nitratsensitive ATPase Aktivität in %	n.D	31-50	37274
azid-sensitive ATPase Aktivität in %	n.D	2	0
NADPH-Cytochrom c Reductase in nkat/mg	847	305	197
Cytochrom c Oxidase in nkat/mg	2.62-2.67	0.61-0.67	0.05-0.078
Latente ATPase-Aktivität in %	n.D	35-50	30-35
Protein in mg/ 300 ml Suspension	664-700	37179	0.45-0.49

Tab. 5. Eigenschaften der Plasmamembranvesikel, die durch Zweiphasensystem gereinigt worden sind. Dargestellt sind die ATPase-Aktivitäten, die für verschiedene Membranfraktionen charakteristisch sind und als Maß für die mögliche Verunreinigung der PM-Präparation mit diesen Membranen untersucht wurden.

### 3.2.3. Saccharosegradienten

Die Zentrifugation von Saccharosegradienten wurde als alternative Methode zur Reinigung der Plasmamembranen verwendet. Beim Auftragen der mikrosomalen Fraktionen auf dem von uns verwendeten Saccharosegradienten erhält man fünf Banden (B<sub>1</sub> bis B<sub>5</sub> in Abb.14). Nach Sandelius et al. (1990) sollten sich die angereicherten Plasmamembranen an der Grenzfläche zwischen der 45- und 38 %-Schicht (B<sub>1</sub>) und z.T. zwischen der 38- und 34 %-Schicht (B<sub>2</sub>) befinden. Die Banden B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> wurden vereinigt und die anderen drei Banden hinsichtlich der Markerenzymaktivitäten separat untersucht. Zunächst wurde die Hemmung der ATPase-Aktivität dieser Banden in Anwesenheit von 50 µM Erythrosin B und 50 mM KNO<sub>3</sub> gemessen. In den Banden B<sub>1-2</sub> wurde eine 40 %-ige Hemmung durch Erythrosin B und ca. 20 % Hemmung durch KNO<sub>3</sub> gemessen. In der Bande B<sub>3</sub> wurde weder mit Erythrosin B noch mit Nitrat eine Hemmung erzielt.

Möglicherweise befinden sich in dieser Fraktion Membranen des Endoplasmatischen Retikulums. In den Banden  $B_4$  und  $B_5$  wurde eine 25-30 % Hemmung mit Erythrosin B erreicht. Der Nitrat-hemmbarer Anteil betrug 20-25% (s. Abb. 15). Aus diesen Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, dass Vesikel, welche durch Saccharosegradienten-Zentrifugation gereinigt wurden, eine etwas geringere Reinheit besitzen, als die durch Verteilung im Zweiphasensystem erhaltenen Vesikel. Aus diesem Grund wurden die Messungen weiterer Markerenzymaktivitäten unterlassen.

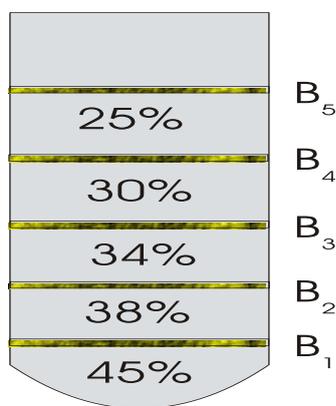


Abb. 14. Schematische Darstellung der Banden bei der Saccharosedichtegradientenzentrifugation.

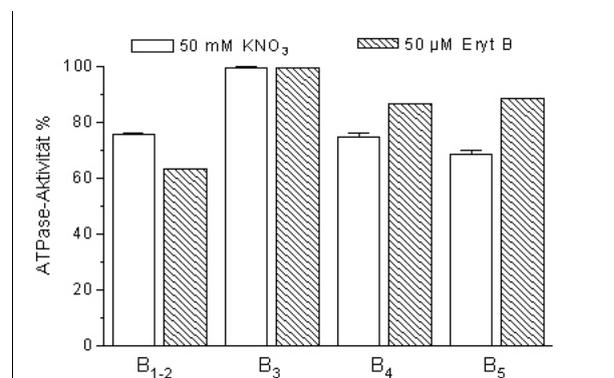


Abb. 15. Prozentualer Anteil der Nitrat- und Erythrosin B sensitiven ATPase-Aktivitäten in den Saccharosegradienten-Banden. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte von einer Dreifachbestimmung dar. Die Aktivität in Anwesenheit von 50 mM KCl wurde als 100% gesetzt.

### 3.2.4. Versuche zur Erhöhung der Reinheit der Plasmamembranen

#### 3.2.4.1. Kombination der Saccharosegradienten und des Zweiphasensystems

Um die Reinheit der Plasmamembranen zu erhöhen, insbesondere einen stärkeren Ausschluss von Tonoplastenmembranen zu erreichen, wurde geprüft, ob im Saccharosegradienten vorgereinigte Plasmamembranfraktionen eine höhere Reinheit bei der Verteilung im Zweiphasensystem erreichen. Zu diesem Zweck wurden die Banden  $B_1$  und  $B_2$  des Saccharosegradienten vereinigt (s. Abb. 14) und dann ins Zweiphasensystem eingebracht.

Die resultierende Fraktion zeigte für Erythrosin B einen  $IC_{50}$ -Wert von  $50 \mu\text{M}$  und eine 35-39 % Hemmung der ATPase-Gesamtaktivität, d.h. die Vorreinigung der mikrosomalen Fraktion durch Saccharosegradienten-Zentrifugation führte zu keiner Verbesserung der Reinheit der Plasmamembranvesikel.

### 3.2.4.2. Wechsel des Osmotikums im Zweiphasensystem

Weitere Untersuchungen sollten prüfen, ob der Wechsel des Osmotikums zu einer besseren Trennung im Zweiphasensystem führt. Zu diesem Zweck wurde Betain als Ersatz für das Osmotikum Saccharose im Zweiphasensystem getestet. Ein weiterer Grund dafür war, dass Betain im Vergleich zu Saccharose keine Oxidation mit Hexabromoiridat (HBI) zeigte, eine Verbindung,

die in einigen Versuchen als extrazellulärer, nicht permeabler Elektronenakzeptor benutzt wurde (Kap.3.3.3.8.1). Betain besitzt ein niedrigeres MG (135.2 g/mol) als Saccharose (342.3 g/mol) und eine deutlich geringere Dichte. Die PM-Vesikel werden im Zweiphasensystem vermutlich durch die Wechselwirkung mit der PEG-Oberphase und aufgrund ihres Auftriebs entgegen der Gravitationskraft bewegt bzw. gehalten (s.Tab.6.) Deshalb wurde zunächst bezweifelt, ob Betain als Komponente im Zweiphasensystem überhaupt geeignet ist.

Betainsystem (330 mM Betain)		Saccharosesystem (330 mM Saccharose)	
Dichte der Oberphase	Dichte der Unterphase	Dichte der Oberphase	Dichte der Unterphase
1.02-1.025 (g/ml)	1.08 (g/ml)	1.04 (g/ml)	1.12 (g/ml)

Tab.6. Dichten der Ober-und-Unterphasen der Betain-und Saccharosezweiphasensysteme, die bei der Polymerkonzentration von 6.5 % und der KCl-Konzentration von 5mM mit entsprechenden Suspensionspuffern hergestellt wurden.

Zunächst wurden Betain- Zweiphasensysteme mit Polymerkonzentrationen zwischen 5.7-6.5 % hergestellt und die mikrosomale Fraktion zugesetzt. Die Dichteverteilung dieser Systeme ähnelte dem Saccharose-Zweiphasensystem. Je höher die Polymerkonzentration, desto geringer wurde

die Ausbeute an Membranproteinen. Eine vergleichbare Menge an Plasmamembranvesikeln wie bei dem 6.5%-igen Saccharose-Zweiphasensystem wurde im Betain-Zweiphasensystem erst bei der Polymerkonzentration von 6.3 % mit 5 mM KCl erhalten. Anschließend wurden die durch das Betain-Zweiphasensystem gereinigten Vesikel auf ihre Hemmbarkeit mit Erythrosin B getestet und

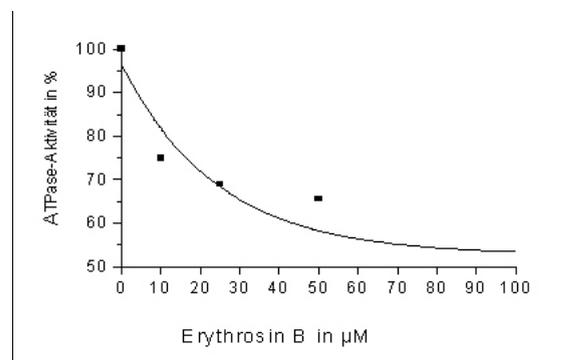


Abb.16. Erythrosin B-Hemmung der ATPase-Aktivität in Betain-Vesikeln. Die Aktivität in Abwesenheit von Erythrosin B als 100% gesetzt.

mit Vesikeln aus dem Saccharose- Zweiphasensystem verglichen. Es wurde festgestellt, dass sich die ATPase-Aktivität in Vesikeln aus dem Betain-Zweiphasensystem weniger hemmen lässt, als in den Vesikeln aus dem Saccharose-Zweiphasensystem. Sie wurde in diesen Vesikeln in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  Erythrosin B zu 50 % gehemmt. Das bedeutet einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 100  $\mu\text{M}$  (s. Abb. 16). Daraus wurde abgeleitet, dass ein Austausch von Saccharose gegen Betain zu einer Veränderung des Verteilungsmusters führt, jedoch zu keiner Verbesserung der Reinheit der PM-Vesikel.

### 3.2.5. Bestimmung der Größe von Plasmamembranvesikeln

Membranvesikel entstehen bei der Homogenisation des Zelllysats durch Fusion der vorhandenen Membranbruchstücke, wobei Membranen der gleichen "Familie": d.h mit ähnlicher Phospholipid- Zusammensetzung bevorzugt fusionieren (Larsson, 1987). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde geprüft, ob die Vesikel während der Präparation ihre Stabilität bewahren und ob sich die Vesikelgröße durch die Veränderung des umgebenden Mediums auch verändert. Hierzu wurden interferometrische Messungen am "Zeta-Sizer" vorgenommen. Es zeigte sich, dass die Vesikelgröße bei der Zugabe von 50 mM KCl um 10 % zunahm. Durch Zugabe von Detergenzien entstanden ebenfalls Größenveränderungen, und der Zusatz von 0.2 % Brij 58 bewirkte eine Verkleinerung der Vesikel. Möglicherweise führen die Detergenzien zur Veränderung der Oberflächenspannung der Vesikel und damit zur Veränderung der Vesikelgröße. Die Energiezufuhr mit Ultraschall bewirkte eine Vergrößerung der Vesikel, was eine Fusion der Vesikel andeutet.

Bedingungen	Durchmesser
5 mM Phosphatpuffer pH-7.8 mit 330 mM Saccharose 5 mM KCl	100-110 nm
5 mM Phosphatpuffer pH-7.8 mit 330mM Saccharose, 52 mM KCl	130-150 nm
5 mM Phosphatpuffer pH-7.8 mit 330 mM Saccharose, 52 mM KCl und 0.02 % Brij 58	50-60 nm
10 mM MOPS-KOH pH-7.5 mit 250 mM Saccharose und 100 mM KCl	110-120 nm
10 mM MOPS-KOH pH-7.5 mit 250 mM Saccharose und 100 mM KCl Ultraschallbehandelt	240-270 nm

Tab.7. Größenverteilung von Plasmamembranvesikeln in verschiedenen Puffern und deren Änderung unter Einwirkung von Detergens-bzw. nach Ultraschallbehandlung. Die Vesikelgröße wurde mittels Laserinterferometrie in einem "Zeta Sizer" ermittelt.

### 3.3. Identifizierung von PLA<sub>2</sub>-Aktivität

#### 3.3.1. Übersicht der Substrate und der Meßverfahren

Bis vor wenigen Jahren wurde Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität fast ausschließlich mittels chromatografischer Trennung und radiometrischer Detektion der Hydrolyseprodukte untersucht. Ferner ist die postchromatografische Anfärbung nichtmarkierter Substrate und Produkte

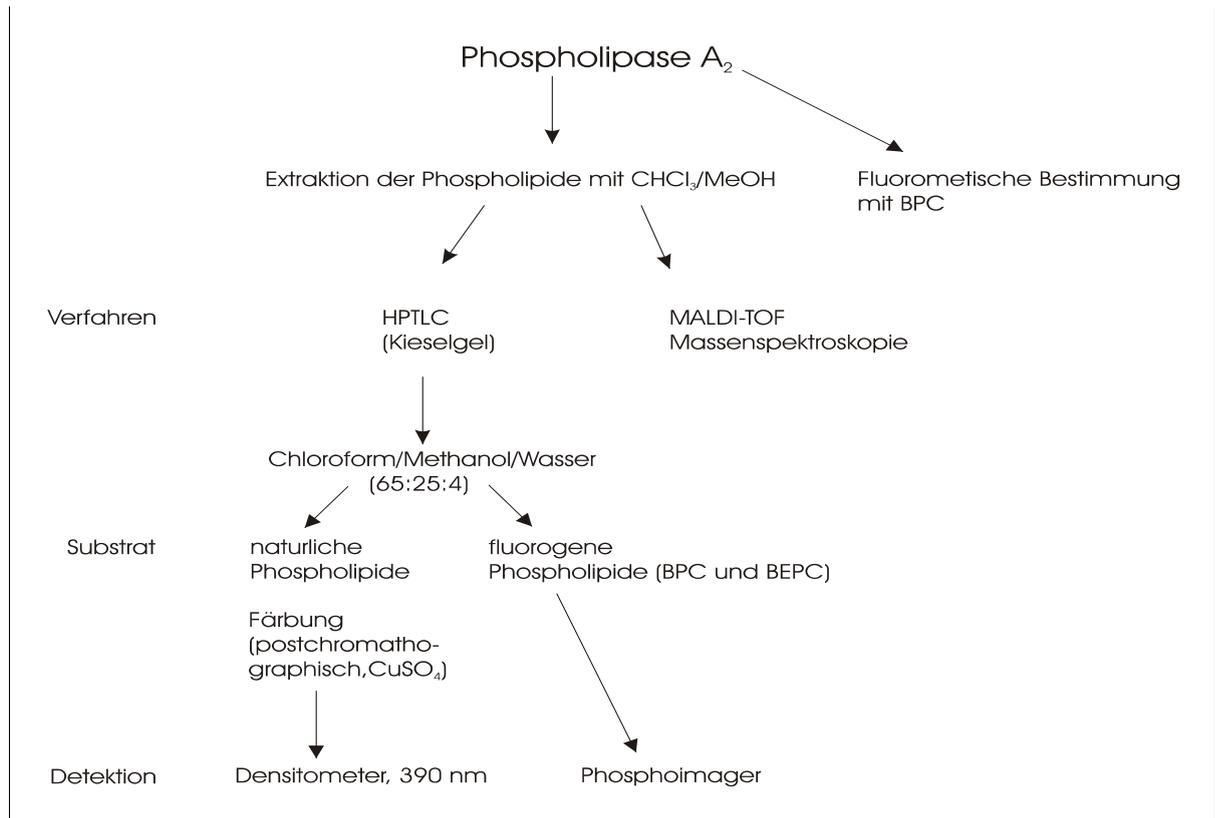


Abb. 17. Übersicht der Verfahren, die zur Bestimmung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität verwendet wurden.

beschrieben, am häufigsten durch Jodfärbung (Hirke, 1998).

Inzwischen gibt es neue methodische Möglichkeiten zur Bestimmung der Hydrolyseprodukte der PLA<sub>2</sub>. Die Verfügbarkeit von synthetischen Phospholipiden mit fluorogenen Substituenten an den Fettsäureresten ermöglicht u.a eine kontinuierliche Bestimmung der Aktivität der PLA in einem Fluorometer bzw. eine diskontinuierliche Fluoreszenzdetektion auf DC-Platten nach chromatographischer Trennung. Ein Vertreter dieser fluorogene Substrate ist das Phospholipid bis-BODIPY-FL-C<sub>11</sub>-PC (BPC) (Abb.18), welches erstmals von E. Simons (1992) synthetisiert

und als Substrat für PLA-Aktivitätsbestimmungen verwendet wurde. Es enthält zwei fluoreszierende Chromophore vom BODIPY-Typ, die jeweils an einer der Fettsäuren kovalent gebunden sind. Durch die Wechselwirkung der beiden BODIPY-Fluorophore entsteht ein

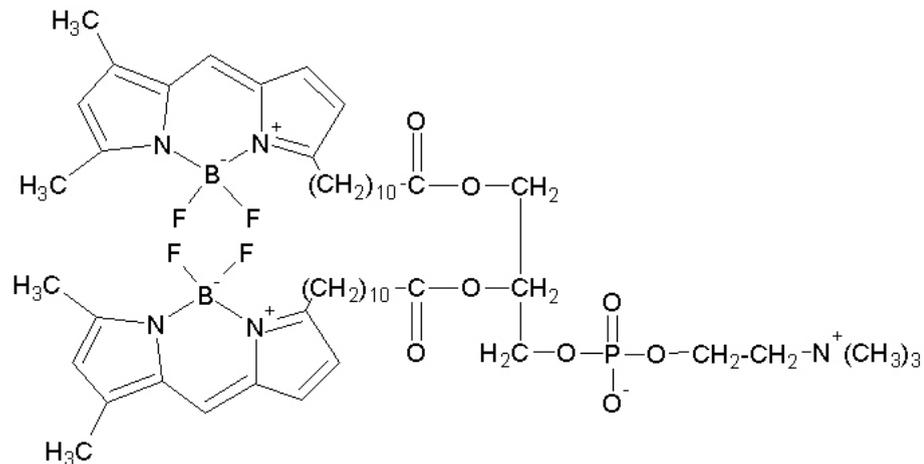


Abb.18. Strukturformel von BPC (1,2-Bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin)

Quench-Effekt, der nahezu die gesamte Fluoreszenz auslöscht. Wenn dieser Quench-Effekt durch die Abspaltung einer der beiden Fettsäuren aufgehoben wird, erhöht sich drastisch die Intensität der Fluoreszenz.

Die Zunahme der Fluoreszenz bei der Umsetzung von BPC kann die Folge der Abspaltung der Fettsäure sowohl in  $sn_1$ -Position als auch  $sn_2$ -Position sein.

Eine Unterscheidung zwischen der Fettsäure-Abspaltung an  $sn-1$  oder  $sn-2$  erlauben z.B. Substrate, bei denen der Alkylrest an  $C_1$  nicht als Ester, sondern als Ether gebunden ist: die Etherbindung ist gegenüber Phospholipasen ziemlich stabil, so dass eine Spaltung nur an  $sn-2$ , also nicht durch  $PLA_1$  erfolgen kann. Ein solches Substrat wurde mit BEPC (s.Abb. 19) gefunden. BEPC wird von authentischer  $PLA_2$  z.B. aus *Apis mellifera* umgesetzt. Da dieses Substrat jedoch eine permanente Fluoreszenz aufweist, kann die Abspaltung des fluorogenen Fettsäurerestes nicht über den Anstieg der Fluoreszenz verfolgt werden.

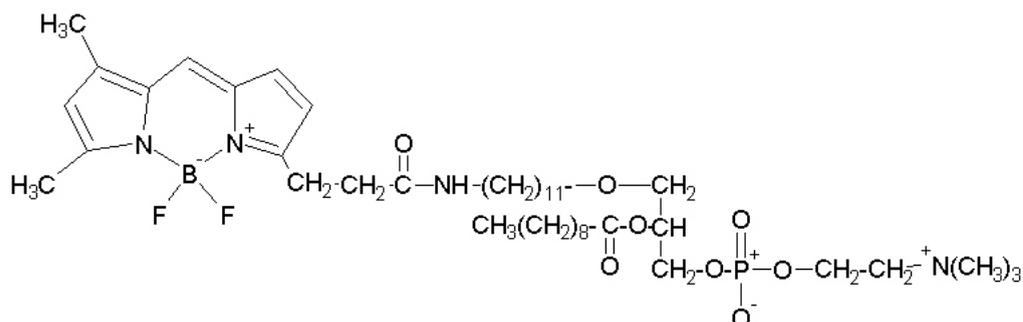


Abb.19. Strukturformel des PLA<sub>2</sub>-Substrates BEPC (1-(O-(11-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl)amino)undecyl)-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin). Die Etherbindung in *sn*-1-Position dieses synthetischen Substrates verhindert eine Spaltung durch PLA<sub>1</sub>-Aktivität.

Folgende Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht und verwendet:

*-Quantitative und qualitative Bestimmung der Umsatzprodukte mittels HPTLC*

Ein klassisches Verfahren zur Verfolgung der Phospholipidhydrolyse ist die chromatographische Trennung der Substrate und Hydrolyseprodukte aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität und anschließende Quantifizierung.

Da in den Zellen und in Organellen mehrere Phospholipaseaktivitäten vorkommen können, die verschiedene fluoreszierende Produkte liefern, kann die Analyse der einzelnen Hydrolyseprodukte auch Hinweise auf das Verhältnis dieser Enzymaktivitäten liefern.

Zur Identifizierung der Hydrolyseprodukte von Phospholipasen in Zellen bzw. in Proben auf den Chromatogrammen diente der R<sub>f</sub>-Wert im Vergleich mit authentischen bzw. vorgereinigten fluoreszenten Phospholipiden (s.Tab.8). Als geeignetes Laufmittel erwies sich ein Chloroform/Methanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis von 65:25:4. Die BEPC-Metabolite besitzen kleinere R<sub>f</sub>-Werte als die BPC-Metabolite. Dies widerspiegelt wahrscheinlich die Zahl der BODIPY-Chromophore (1 in BEPC, 2 in BPC).

B-LPC	BE-LPC	BPC	BEPC	B-DAG	BE-DAG	B-PA	BE-PA	BOODIPY-Fettsäure (BFS)
0.119	0.107	0.31	0.26	0.804	0.774	0.62	0.59	0.744

Tab.8.R<sub>f</sub>-Werte der Phospholipidsubstrate von BEPC, BPC und der Hydrolyseprodukte Lysophosphatidylcholin (B-LPC), Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure (PA). Für BPC ist weiterhin der R<sub>f</sub>-Wert der abgespaltenen fluorogenen Fettsäure angegeben.

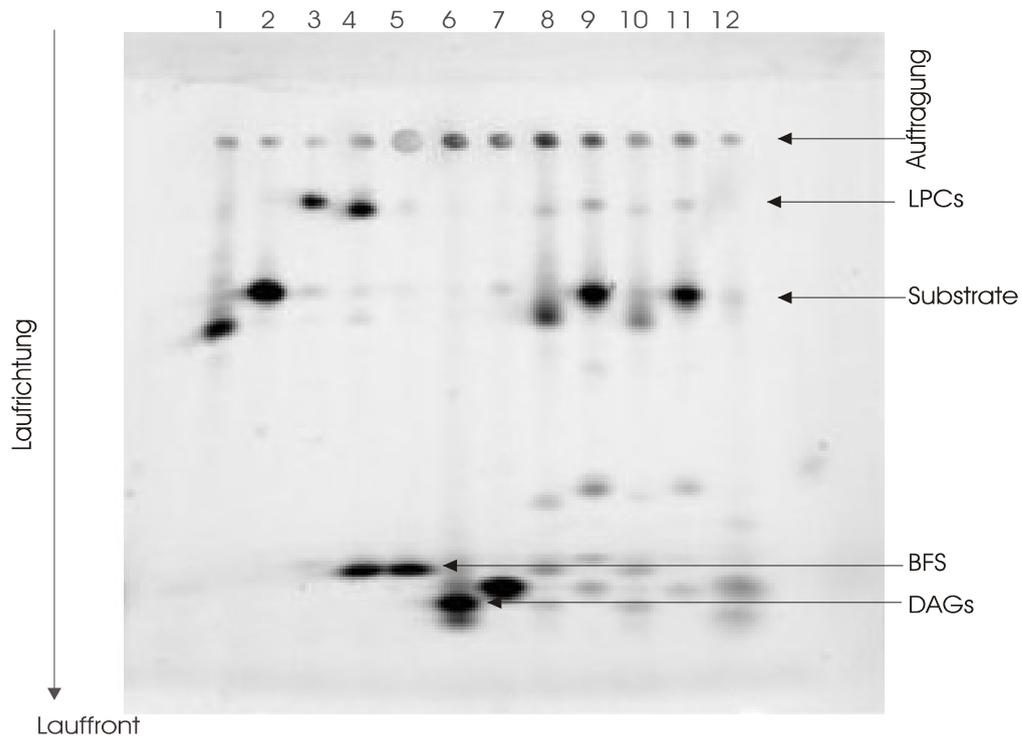


Abb.20. Dünnschichtchromatographische Trennung von BODIPY-markierten Phospholipidsubstraten sowie deren Hydrolyseprodukte nach Spaltung mit verschiedenen Phospholipasen. Die enzymatische Hydrolyse erfolgte nach Kap. 2.5.1. und die Detektion der Fluoreszenz am Storm-Imager.

1) BPC 2) BEPC 3) BEPC+PLA<sub>2</sub> 4) BPC+PLA<sub>2</sub> 5) BFS 6) BPC+PLC 7) BEPC+PLC 8) BPC+PLD+Ethanol 9) BEPC+PLD+Ethanol 10) BPC+PLD 11) BEPC+PLD 12) Alkaloidextrakt aus den Zellen

#### *-Kontinuierliche fluorometrische Aktivitätsbestimmung mit künstlichen Substraten*

Der Anstieg der Fluoreszenz erlaubt kinetische Messungen (z.B. Fluoreszenzanstieg pro Minute als Maß für die Enzymaktivität), jedoch keine Aussage über die Identität der Spaltprodukte. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die enzymatische Reaktion direkt und kontinuierlich verfolgt werden kann und erlaubt eine präzise mathematische Auswertung der Daten. Sie ist weniger zeitaufwendig als HPTLC und erreicht eine Empfindlichkeit, die der radiometrischen Detektion vergleichbar ist.

#### *-Detektion der genuinen Substrate mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie*

Bei der MALDI-TOF MS handelt es sich um eine massenspektrometrische Methode, bei der eine "schonende" Desorption und Ionisation der Analytmoleküle durch einen Laserimpuls auf

ein kristallines Analyt-Matrix-Gemisch erfolgt. Die Analytenmoleküle werden während der Desorption und Ionisierung nicht fragmentiert.

Das  $m/z$ - Verhältnis (Masse/Ladung) der gebildeten Ionen kann aus der Zeit, die diese benötigen, einen Weg definierter Länge im Flugrohr zurückzulegen, berechnet werden.

Der Einsatz der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry) zur Identifizierung von Phospholipaseprodukten bietet mehrere Vorteile:

-native Molekülspezies sind genau identifizierbar

-liefert zusätzliche Aussagen über die Struktur der umgesetzten Phospholipide wie z.B. deren Fettsäurereste und Kopfgruppen. Alle Daten können meist aus demselben Massenspektrum abgelesen werden.

### **3.3.2. Aktivitätsmessungen der PLA<sub>2</sub> mit fluorogenen BODIPY-Phospholipiden**

#### **3.3.2.1. Effekte von Lösungsmitteln auf die Struktur des Substrates in Lösung**

Phospholipide sind amphiphile Moleküle. Die Fettsäureketten repräsentieren den lipophilen, apolaren Molekülteil und das Glycerolgerüst mit dem über die Phosphodiesterbrücke gebundenen Alkohol bildet den hydrophilen, polaren, auch als Kopfgruppe bezeichneten Bereich des Moleküls. Phospholipide und strukturell ähnliche Verbindungen sind in Wasser wenig löslich. Das bis-BODIPY-markierte BPC ist, wie alle Phospholipide, sehr gut in organischen Lösungsmitteln löslich. Beim Lösen dieses Substrates in Ethanol, Methanol und Chloroform wurde ein starker Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der wässrigen Lösung, der nicht durch Hydrolyse bedingt war, festgestellt (s.Tab.9). Dies zeigt, dass eine Fluoreszenzzunahme nicht notwendigerweise an die Spaltung der Esterbindung von BPC gekoppelt ist, sondern dass der Fluoreszenzquench bereits beim Auflösen in organischen Lösungsmitteln aufgehoben werden kann. Im organischen Lösungsmittel bilden Phospholipide reverse Mizellen, wobei die polaren Kopfgruppen nach innen, die Fettsäure-Reste nach außen gerichtet sind (Hirke, 1998). Die somit größeren Abstände zwischen den Fettsäure-gebundenen Fluorophoren könnte wahrscheinlich die Aufhebung des Quencheffektes bedingen. Die meßbare Fluoreszenz kann also durch die Erhöhung der Abstände zwischen den beiden Fettsäureresten zustande kommen, ohne sie vom Glycerolgerüst abzuspalten. Um bei der fluorometrischen Bestimmung der PLA<sub>2</sub> unter Verwendung von BPC die Löslichkeit

des Substrats zu gewährleisten, muß jedoch ein Minimum eines organischen Lösungsmittels zugesetzt werden (meist 0.1 % Ethanol oder 1 % DMSO).

Lösungsmittel	10 nM BPC	100 nM BPC	1 µM BPC
Wasser	3±1	4±2	6±1
Ethanol	7±1	46±3	353±5
Methanol	5±1	35±2	289±4
Chloroform	12±1	59±2	501±6

Tab. 9. Fluoreszenz des BPC in verschiedenen organischen Lösungsmitteln. Die Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge 485 nm angeregt (Bandbreite 5 nm) und bei 515 nm (Bandbreite 10 nm) detektiert.

### 3.3.2.2. Einfluß der Detergenzien auf die BPC-Fluoreszenz

Bedingt durch ihren Molekulaufbau bilden Phospholipide Aggregate, für die eine in sich geschlossene Lipiddoppelschicht an Grenzflächen typisch ist. Diese Strukturen können bedingen, daß die zu hydrolysierenden Bindungen für das Enzym nicht optimal zugänglich sind. Ein Zusatz von geeigneten Detergenzien sollte die dicht gepackte Lipidstruktur auflösen, die Löslichkeit verbessern und somit den Umsatz der Substrate erhöhen. Wenn der Fluoreszenzquench strukturbedingt ist, sollten Detergenzien bzw. oberflächenaktive Stoffe in der Lage sein, die Fluoreszenz von BPC zu beeinflussen. Die in Tab.8 aufgeführten Detergenzien wurden in Konzentrationsbereichen, die unterhalb deren CMC lagen, untersucht. Zunächst wurde der Einfluß der BPC-Konzentration auf die Fluoreszenz in Gegenwart verschiedener Detergenzien untersucht. Bei der in den Messungen meist verwendeten BPC-Konzentrationen von 10 nM und 1 µM wurden festgestellt, dass alle Detergenzien die BPC-Fluoreszenz in unterschiedlichen Maßen erhöhen. Bei der BPC-Konzentration von 1 µM bewirkte z.B. CHAPS zwar eine ca. 3-fache Erhöhung, aber bei 10 nM eine ca. 20-fache Erhöhung der BPC-Fluoreszenz (s.Tab.10). Diese Untersuchungen zeigten, dass die Fluoreszenz von BPC stark von der Art des Detergenz und vom BPC/Detergenz Verhältnis beeinflusst wird. Dies bedeutet, falls die Detergenzien zur Messung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität angewendet werden, müssen diese unspezifischen Fluoreszenzerhöhungen von den spezifischen (enzymatischen) unterschieden werden.

Detergenzien	CMC in %	Endkonzentration im Ansatz	10 nM BPC	1 $\mu$ M BPC
Kontrolle	0	0.0 %	6 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.8
Triton X-100	0.013-0.585	0.01 %	49 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1
CTAB	335	0.02 %	43 $\pm$ 0.5	307 $\pm$ 3
Pluronic	948	0.02 %	32 $\pm$ 1	19.4 $\pm$ 0.6
SDS	2	0.1 %	n.D	358 $\pm$ 8
CHAPS	0.369-0.61	0.2 %	125	16 $\pm$ 0.4
Deoxycholat	0.083-0.207	0.04 %	40 $\pm$ 1	8.95 $\pm$ 0.35

Tab.10. Detergenzien, deren Einfluß auf die Fluoreszenz von BPC in wässrigen Puffern untersucht wurden. Die Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt (Bandbreite 5 nm) und bei 515 nm (Bandbreite 10 nm) detektiert.

### 3.3.2.3. Einfluß von 0.05%Brij 58 auf die BPC-Fluoreszenz

Die genaue Lokalisation der PLA<sub>2</sub> in der Plasmamembran sowie die Orientierung des aktiven Zentrums des Enzyms sind bislang unbekannt. Vermutlich liegt das aktive Zentrum des Enzyms auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran. Um diese Frage zu beantworten, müssen Experimente mit “right-side-out” und “in-side-out” Vesikeln durchgeführt werden. Wenn PLA<sub>2</sub>-enthaltende PM-Vesikel in einer geschlossenen Liposomenform mit “right-side-out” Orientierung vorliegen, müssen die Substrate durch die Membran diffundieren, falls sich die Substratbindungsstelle auf der Innenseite der Membran befindet. In diesem Falle könnte die Diffusionsgeschwindigkeit des Substrates die enzymatische Umsetzung limitieren, d.h. die Umsetzung würde langsamer ablaufen als in “in-side-out” Vesikeln. Mit Hilfe des Detergenz Brij-58 (0.05 %) kann man “in-side-out” orientierte Vesikel herstellen (Larsson et al., 1995). Das aktive Zentrum des Enzyms sollte in diesem Fall nach außen zeigen und somit einen direkten Zugang zum Substrat haben. Um die Anwendbarkeit von Brij 58 für die PLA<sub>2</sub>-Aktivitätsmessungen zu testen, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Da es bekannt war, dass die BPC-Fluoreszenz stark vom BPC/Detergenz-Verhältnis beeinflusst wird, wurde die BPC Fluoreszenz bei verschiedenen Konzentrationen (10-100 nM) in Anwesenheit von 0.05% Brij-58 gemessen. Es zeigte sich, dass nach Zusatz der genannten Konzentration von Brij 58 zu BPC-Lösungen im Inkubationspuffer eine gut meßbare Fluoreszenz auftritt (s.Abb.21), die durch authentische PLA<sub>2</sub> (aus Bienengift, s.Materiall und Methodenteil) nicht weiter erhöht wird. Letzteres kann zwei mögliche Ursachen haben. Zum einen wäre eine sehr schnelle Inaktivierung der PLA<sub>2</sub> nach Zugabe zum Reaktionsansatz durch das Detergenz denkbar, andererseits könnte das Detergenz den internen

Fluoreszenzquench im Substratmolekül soweit vermindert haben, dass durch die Abspaltung der Fettsäure keine weitere Erhöhung der Fluoreszenzintensität mehr möglich ist. Um diese Hypothesen zu prüfen, wurde eine DC-Trennung des Reaktionsansatzes durchgeführt. Dabei zeigte sich im PLA<sub>2</sub>-Ansatz eine deutliche

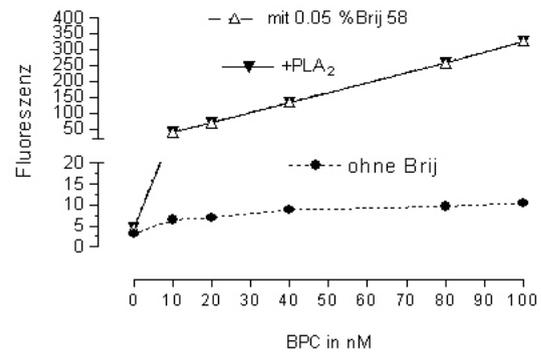


Abb.21. Einfluß von 0.05%-iger Brij-58 auf die BPC-Fluoreszenz bei verschiedenen Konzentrationen des fluorogenen Substrats. Die Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt (Bandbreite 5 nm) und bei 515 nm (Bandbreite 10 nm) detektiert.

Zunahme der Spaltprodukte, auch im Gegenwart von Brij 58, was die Möglichkeit einer schnellen Enzyminaktivierung ausschließt. Die Wirkung von Brij-58 auf die

Fluoreszenz von BPC beruht also auf einer Veränderung der Substratstruktur, welche mit der Solubilisierung dieser Verbindung einhergeht. Die dabei erreichte Neuorientierung der Substratmoleküle führt zur völligen Aufhebung des Nachbarschafts-Quench und erreicht daher die gleiche Fluoreszenz wie die vollständige Spaltung durch PLA<sub>2</sub> (Abb.21). In Gegenwart von Brij 58 kann BPC also nicht als PLA<sub>2</sub>-Substrat in fluorometrischen Messungen verwendet werden.

#### 3.3.2.4. Nicht enzymatisch ausgelöste Änderungen der Fluoreszenz von BODIPY-Substraten durch Vesikel

Nach Zugabe von PM-Vesikel zu BPC wurden starke Fluoreszenzerhöhungen beobachtet, die nicht auf eine Enzymaktivität zurückgeführt werden konnten. Dies wird erst deutlich beim Vergleich der Fluoreszenzänderungen, die durch authentische PLA<sub>2</sub> von *Apis mellifera* und PM-Vesikel ausgelöst waren (s.Abb.22). Bei der eingesetzten Menge von authentischer PLA<sub>2</sub> sollten die Fluoreszenzerhöhungen von BPC stärker sein, als die durch die PM-Vesikel ausgelöst waren. Bei der Interpretation des Fluoreszenzverhaltens des BPC ist zu bedenken, dass auch die Phospholipide der Plasmamembran selbst Detergenz-Charakter aufweisen. In Untersuchungen mit enzymatisch inaktiven Vesikeln (autoklaviert) wurde beobachtet, dass die Fluoreszenzerhöhungen viel stärker waren als die mit enzymatisch aktiven PM-Vesikel. (s.Abb. 22). Dies war ein weiterer Hinweis auf das "Detergenz"-Verhalten der Vesikel.

Dies bedeutet, dass bei der fluorometrischen Messung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Membranfraktionen nur ein Teil der gemessenen Fluoreszenzänderung durch die Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität hervorgerufen wird, der andere Teil durch die Strukturierung des Phospholipid-BPC Gemisches bedingt ist. Dies wurde bei folgenden Experimenten verifiziert. Es wurde die BPC-Fluoreszenz innerhalb einer Konzentrationsreihe von Sojalecithin (PC) gemessen (s. Abb. 23). Bei Verwendung von Phosphatidylcholin als Test-„Detergenz“ wurden Fluoreszenzunterschiede bis zu einem Faktor von 15 gefunden. Dabei traten deutliche Fluoreszenz-Maxima um 1 µM und um 1 mM PC auf. Diese starke Abhängigkeit vom Sojalecithin/BPC-

Verhältnis weist auf strukturdynamische Prozesse hin, die in enger Abhängigkeit zum Detergenz/BPC-Verhältnis stehen und die Orientierung der Fettsäureketten von BPC wesentlich beeinflussen. Es ist daher vorstellbar, dass die Einstellung eines neuen Phospholipid (Detergenz)-BPC Gleichgewichtes, z.B. nach Zusatz der Membranpräparationen zu einem neuen Fluoreszenz-Niveau führt. Dies macht es notwendig bei der fluorometrischen Messungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Membranfraktionen ein Vesikel/BPC-Verhältnis zu finden, bei dem keine unspezifische Fluoreszenzerhöhung stattfindet. Dies kann man durch Verdünnung der Membranfraktion mit einem geeigneten Puffer erreichen (welcher keine Wechselwirkungen mit BPC zeigt).

Zusätzlich sollte man bei den Fluoreszenzmessungen enzymatischer Aktivitäten in Gegenwart von Inhibitoren zu messen (vorausgesetzt der zugegebene Effektor besitzt nicht auch Detergenz-Eigenschaften). Die dabei gemessenen Inhibitionskurven sollten bei maximaler Hemmung nicht

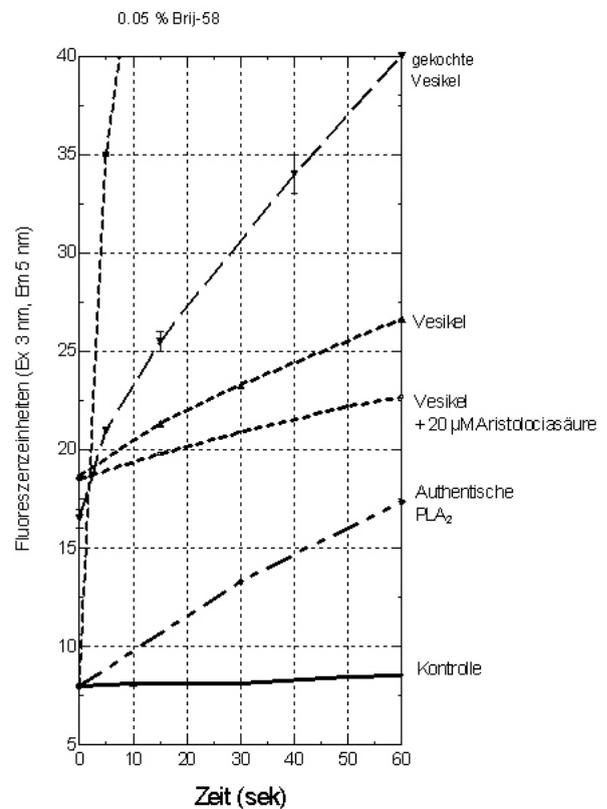


Abb. 22. Ein Vergleich der Änderungen der BPC-Fluoreszenz in Anwesenheit von 0.05% Brij 58, authentischer PLA<sub>2</sub>, Aristolociasäure und PM-Vesikel.

gegen Null gehen, sondern einen "offset" aufweisen, der den nichtenzymatischen Anteil des Fluoreszenzsignals widerspiegelt. Derartige Messungen wurden in der vorliegenden Arbeit durchgeführt sind im Kapitel 3.3.3.5. dargestellt. Neben der Enzyminhibierung ist auch die Enzymaktivierung fluorometrisch meßbar, wie an Hand der Mastoparan bedingten Aktivierung der vesikulären PLA<sub>2</sub> gezeigt wurde (s. Kap.3.3.3.8.2. Einfluß von Mastoparan auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb bei der Bestimmung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität, auch die Quantifizierung der Hydrolyseprodukte nach HPTLC-Trennung verwendet.

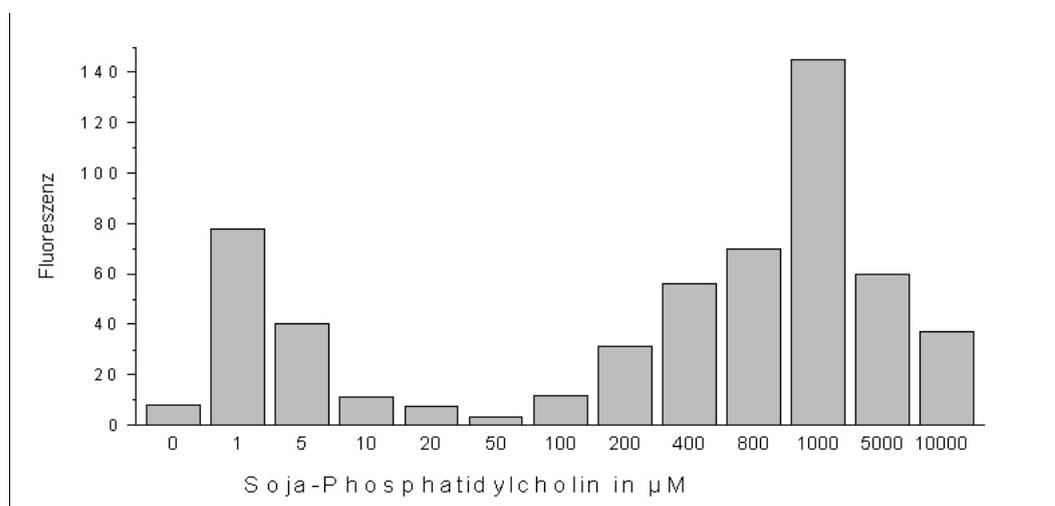


Abb.23. Die Veränderung der Fluoreszenz von 1 µM BPC im Suspensionspuffer nach Zugabe steigender Konzentration von Sojalecithin. Es wurde BPC-Lösung mit Soja-Lecithin-Lösung in Suspensionspuffer gemischt und Ultraschall behandelt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt (Bandbreite 5 nm) und bei 515 nm (Bandbreite 10 nm) detektiert.

### 3.3.3. PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln

Die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln wurde zunächst mit den künstlichen fluorogenen Substraten BPC und BEPC ermittelt. Hierfür verwendete Plasmamembranvesikel waren zuvor durch das Zweiphasensystem (6.5%) gereinigt und charakterisiert (s.Kap.3.2.2.). Dabei wurden BPC fluorometrische Messungen (Quenchaufhebung), vor allem aber DC-Untersuchungen (Quantifizierung der Hydrolyseprodukte) durchgeführt.

### 3.3.3.1. Identifizierung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln mittels HPTLC

Unter Verwendung des fluorogenen Substrats BEPC wurde die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembran-vesikeln nach Trennung der Hydrolyseprodukte in der Dünnschichtchromatographie detektiert. Neben der erwarteten BELPC-Bande und BEPC-Bande traten drei zusätzliche Banden auf. Diese Banden wurden an Hand von Standards (s. Kap.3.3.1) als Diacylglycerol, Phosphatidsäure und Phosphatidylethanol (PA-EtOH)

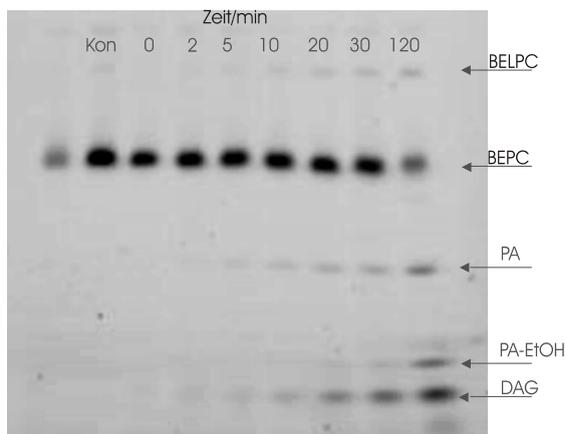


Abb.24. HPTLC-Trennung von BEPC und der durch PM-Vesikel freigesetzten Hydrolyseprodukte.

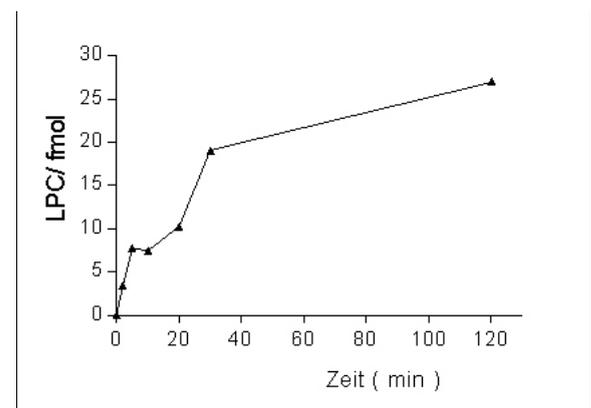


Abb.25. Darstellung der zeitabhängigen Bildung von BELPC aus BEPC, katalysiert durch die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in PM-Vesikeln.

identifiziert. Letzteres ist sehr wahrscheinlich ein Produkt der Transphosphatidierungsaktivität der PLD. Diese Daten zeigen, dass die Vesikelpräparate neben PLA<sub>2</sub> auch PLC und PLD Aktivitäten aufweisen (s. Abb. 24). Die weiteren Messungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität der Plasmamembranvesikel wurden über Quantifizierung des gebildeten LPC-Derivats (BELPC) durchgeführt (s. Meth. Teil 2.5). Bei den folgenden Ergebnissen wird auf eine bildliche Darstellung der Original-Original-Chromatogramme verzichtet, stattdessen sind die am Phospho-Imager gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten der BELPC Bande dargestellt (s. z.B. Abb.25).

### 3.3.3.2. Lokalisation der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in den Membranen

Falls die PLA<sub>2</sub> ein Elicitor-stimulierbares Enzym ist, sollte sie in der Plasmamembran lokalisiert sein, da auch andere Glycoprotein-Elicitor-Rezeptoren in der Plasmamembran nachgewiesen wurden (Nürnberg, 1999). Um dies zu prüfen, mußte die spezifische PLA<sub>2</sub>-Aktivität in verschiedenen Zellfraktionen nach dem Aufschluß gemessen werden, und zwar im

Rohhomogenat, in der mikrosomalen Fraktion und in der PM-Fraktion (s. Abb. 26). Die Ergebnisse bestätigten unsere Vermutung; die spezifische Aktivität in der PM-Fraktion war um das 2,5-fache höher als in der mikrosomalen Pellet. Dies spricht dafür, dass diese PLA<sub>2</sub> ein plasmamembranständiges Enzym ist.

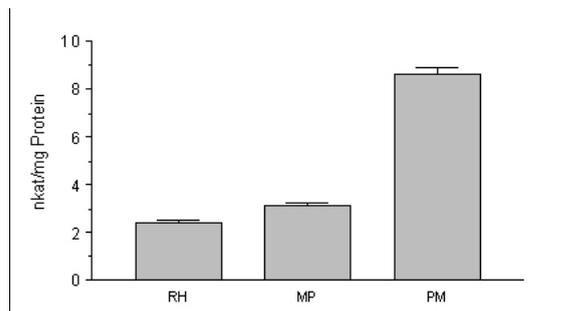


Abb. 26. PLA<sub>2</sub>-Aktivität im Rohhomogenat (RH), im mikrosomalen Pellet (MP) und in PM. Die Proben wurden mit 5 µM BEPC bei RT 30 min inkubiert. Nach anschließender Trennung der Produkte mittels HTPLC erfolgte die Quantifizierung von BELPC. Die Daten stellen die Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

### 3.3.3.3. Einfluß von Ca<sup>2+</sup>-Ionen auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität

Charakteristisch für viele Phospholipasen ist, daß sie für ihre Aktivität Ca<sup>2+</sup>-Ionen benötigen. Jedoch gibt es Phospholipasen die Ca<sup>2+</sup> unabhängig sind. Dies sind meistens PAF (platelet-activating-factor)-spaltende PLA<sub>2</sub> in tierischen Zellen (Murakami et al., 1997; Six et al., 2000). Auch in Pflanzen wurden Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub>-Enzyme gefunden, z.B. PLA<sub>2</sub> in *Vicia Faba* (Kim, 1994). Die in den von uns gereinigten Plasmamembranvesikeln, identifizierte PLA<sub>2</sub>-Aktivität erwies sich ebenfalls als Ca<sup>2+</sup> unabhängig (s. Abb. 27). Neben der PLA<sub>2</sub> kommen in untersuchten PM-Vesikeln allerdings auch andere Phospholipasen vor, die in der Lage sind, das synthetische Phospholipid zu hydrolysieren (z.B. PLC und PLD) (s. Kap. 3.3.3.6.). Alle bisher bekannten Phospholipasen C und D brauchen für ihre Aktivität Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Damit bot sich die Möglichkeit, durch den Entzug von Ca<sup>2+</sup>, diese Aktivitäten zu verhindern und damit PLA<sub>2</sub>-Aktivität ohne Störungen durch andere Phospholipasen zu vermessen. Deshalb wurden alle Messungen zur Ermittlung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Puffern durchgeführt, die 0,1 mM EDTA enthielten.

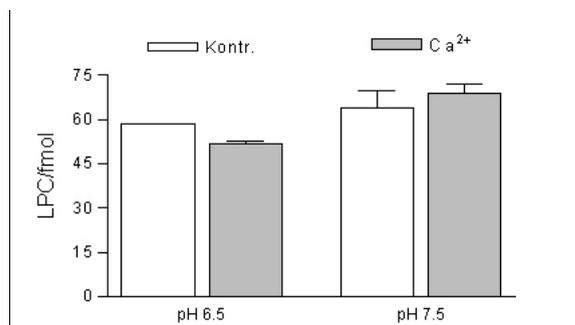


Abb. 27. BELPC-Freisetzung von BEPC durch PM-Vesikel in Ab- und Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> bei pH Werten 6,5 und 7,5. PM-Vesikel wurden mit 5 µM BEPC bei RT, 30 min inkubiert. Die Daten stellen Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

### 3.3.3.4. Charakterisierung der PLA<sub>2</sub> durch Hemmstoffe

In tierischen Organismen sind verschiedene PLA<sub>2</sub>-Formen bekannt, die sich durch ihre Empfindlichkeiten gegen Inhibitoren charakterisieren und z.T. unterscheiden lassen. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung von 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA) und Aristolochiasäure auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln getestet. ETYA ist eine vierfach ungesättigte 20 C-Fettsäure, wobei die in der Arichidonsäure vorliegenden Doppel-Bindungen durch Dreifachbindungen ersetzt sind. ETYA ist als ein Inhibitor des tierischen Eicosanoid-Stoffwechsels und der Lipoxygenase beschrieben. (Scherer et al., 1997).

10-Nitrophenantren-1-carbonsäure, auch unter der Bezeichnung Aristolochiasäure bekannt, kommt in Pflanzen aus der Familie der *Aristolochiaceae* vor. Es wurde gefunden, dass die Aristolochiasäure in Hypokotylen von *Cucurbita pepo* die PLA<sub>2</sub>-Aktivität und eine Beziehung zur gleichfalls gefundene Hemmung des auxininduzierten Wachstums und der Phytoalexinproduktion vermutet (Scherer & Arnold 1997). In der hier verwendeten Plasmamembranvesikel von *Eschscholzia californica* wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Phospholipase-A<sub>2</sub> von der Inhibitorkonzentration untersucht. Beide Inhibitoren zeigten eine Hemmung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in PM-Vesikeln mit IC<sub>50</sub>-Werten von 8 µM für ETYA und von 12 µM für Aristolochiasäure (s.Abb.27).

Bei Konzentrationen 40 µM ETYA und 60 µM Aristolochiasäure trat keine Sättigung des Hemmeffekts ein. Die verbleibende "Restfluoreszenz" ist identisch

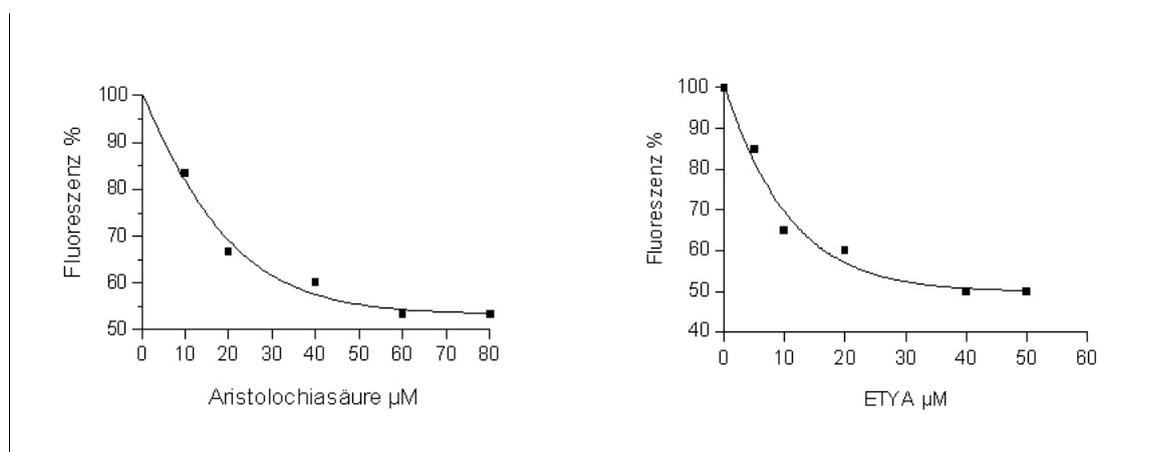


Abb.28. Inhibierung der PLA-Aktivität in Plasmamembranvesikeln durch ETYA und Aristolochiasäure. Dargestellt ist die Restaktivität ( $\Delta F I / \text{min}$ ) in Gegenwart verschiedener Inhibitorkonzentration. Die Aktivität in Abwesenheit von Inhibitoren wurde als 100% gesetzt. Die Meßwerte wurden mit BPC fluorometrisch ermittelt. Aus den Meßdaten wurden durch nicht lineare Regression die IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt, für Aristolochiasäure 12 µM, für ETYA 8µM.

mit der unspezifischen, durch die Wechselwirkung von BPC mit den Plasmamembranvesikeln ausgelösten Fluoreszenz; Dieser Anteil betrug 47-bis 50% der gemessenen Gesamtfluoreszenz.

### 3.3.3.5. Einfluss von Detergenzien auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität

Bei der PLA<sub>2</sub>-Aktivitätsmessung von PM-Vesikeln über DC-Trennung der Hydrolyseprodukte von BEPC wurden testweise verschiedene Detergenzien unterhalb ihrer Micellbildungskonzentrationen verwendet. Einige Detergenzien bewirkten eine starke, andere nur eine geringfügige Zunahme der PLA<sub>2</sub>-katalysierten Hydrolyse. Detergenzien, welche bei der fluorometrischen Messung (s.Kap. 3.3.2.2.) eine starke unspezifische Erhöhung der BPC-Fluoreszenz bewirkten, stimulierten die Hydrolyse-Aktivität der PLA<sub>2</sub> in PM-Vesikeln; Detergenzien, welche eine geringe unspezifische Fluoreszenzerhöhung des Substrates bewirkten, verursachten eine Hemmung der Spaltung von BEPC (s. Abb.29). Die Erhöhung der PLA-

Aktivität durch die Detergenzien ist also sehr wahrscheinlich auf Veränderungen der Substratstruktur zurückzuführen. Dies schließt natürlich noch nicht aus, dass zugleich Detergenz-Enzym-Wechselwirkungen stattfinden. Für eine Solubilisierung des Enzyms aus der PM sind

hier verwendeten Konzentrationen zu gering, zumindest werden für eine vollständige Solubilisierung von Membranproteinen routinemäßig Konzentrationen deutlich über CMC verwendet.

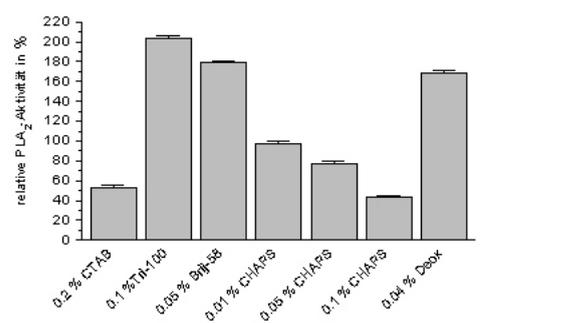


Abb.29. Prozentuale Änderung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in PM in Anwesenheit einiger Detergenzien. Die Aktivität in Abwesenheit von Detergenzien wurde als 100% gesetzt. Die Meßwerte wurden durch die Quantifizierung von BELPC mittels HPTLC ermittelt. Die Daten stellen Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

### 3.3.3.6. Stimulation der PLA<sub>2</sub> in Plasmamembranvesikeln durch einen Hefe-Elicitor

Die Erhöhung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität gehört zu den ersten Ereignissen beim Kontakt von Zellen mit dem Hefeelicitor (Roos et al., 1999; Viehweger et al., 2002). Es war deshalb von besonderem Interesse, ob die elicitor-ausgelöste Stimulation auch nach der Isolation der PM erhalten bleibt. Dazu wurde die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Anwesenheit verschiedener Elicitorkonzentrationen gemessen. Bei den Messungen wurde festgestellt, daß bei der Elicitorkonzentration von 2 µg/ml

eine Erhöhung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität um 45%, und bei 5 µg/ml um 25 %, bei 10 µg/ml jedoch keine Änderung der PLA-Aktivität auftritt (s. Abb.30). Das Ergebnis zeigt, dass bei einer, zur Auslösung der Alkaloidantwort ausreichenden Elicitorkonzentration (2 µg) auch in der isolierten Plasmamembran die PLA<sub>2</sub> stimuliert wird. Zugleich wird klar, dass nicht nur die Stimulierbarkeit des Enzyms, sondern auch andere Komponenten, die zur Signalweitergabe von einem (angenommenen) Elicitor-Rezeptor zur Phospholipase benötigt werden, (s. folgendes Kapitel) in der isolierten PM vorhanden sein müssen. Für die fallende Stimulation der PLA-Aktivität bei höheren Elicitorkonzentrationen gibt es z.Z. keine plausible Erklärung. Eine unspezifische Hemmung des Enzyms durch im Hefeelicitor enthaltene Komponenten kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist weiterhin vorstellbar, dass bei hohen Elicitorkonzentrationen eine Aktivierung der anderen Phospholipasen (PLC und PLD) stattfindet und damit eine Konkurrenz um das Substrat auftritt. Aus den Untersuchungen mit den Zellen von *Eschscholzia californica* weiß man, dass mit 10 µg/ml Elicitorkonzentration ein "oxidative burst" ausgelöst wird (Roos et al., 1998). Dieser Signalweg zum "oxidative burst" könnte eine PLC oder eine PLD-Aktivität enthalten, wie in anderen Pflanzen gefunden wurde (Legendre, 1993; Munnik, 1998).

### 3.3.3.7. Regulation der PLA<sub>2</sub>-Aktivität durch G-Proteine

Es gibt zahlreiche Befunde, dass G-Proteine an den Signaltransduktionskaskaden pflanzlicher Zellen beteiligt sind (Valster et al., 2000; Millner, 2001). Die Bindung der Elicitoren an spezifische Plasmamembran-komponenten bzw. Rezeptoren wird als eine Voraussetzung für die Induktion der Pathogenantwort angesehen. Wie diese extrazellulären Signale in das Zellinnere weitergeleitet werden, ist nur unvollständig aufgeklärt. Von tierischen Zellen weiß man, dass zahlreiche Rezeptoren über G-Proteine an Zielenzymen z.B. Adenylatcyclase und Phospholipase C gekoppelt sind (Alberts et al., 1995). Heterotrimere G-Proteine haben eine Struktur aus drei verschiedenen Untereinheiten, die als  $G_{\alpha}$  und  $G_{\beta\gamma}$  bezeichnet werden. Bei der Aktivierung der G-

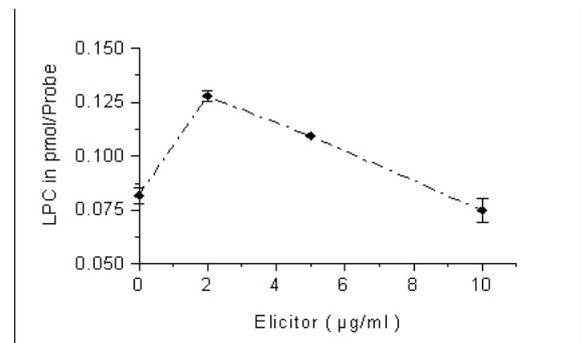
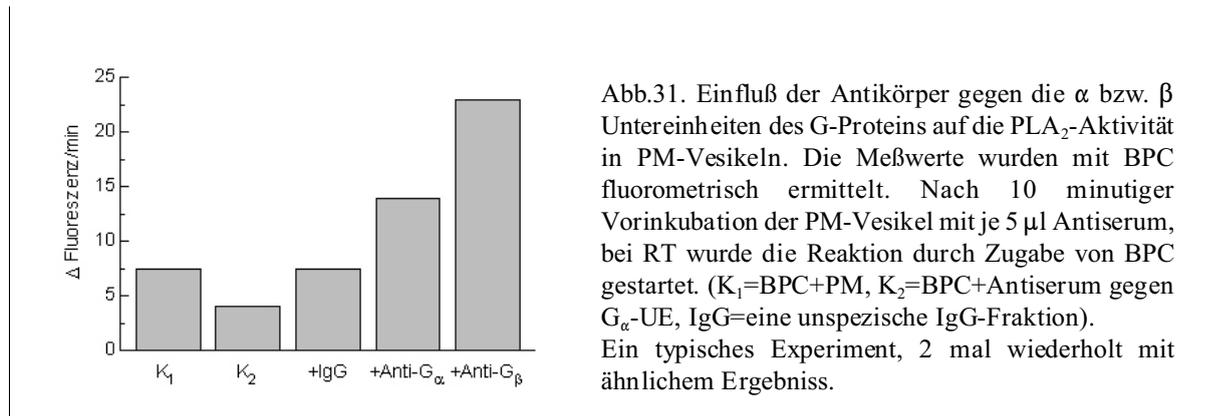


Abb.30. Änderung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Anwesenheit verschiedener Elicitorkonzentrationen. PM wurden mit 5 µM BEPC bei RT, 30 min inkubiert. Nach anschließender Trennung der Produkte mittels HTPLC erfolgte die Quantifizierung von BELPC. Die Daten stellen Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

Proteine durch den Rezeptor erfolgt eine Abspaltung von gebundenem GDP und eine Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit. Diese  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert dann vom heterotrimeren Komplex. Die dissoziierten Proteine, meist die  $\alpha$ -Untereinheit, aber auch der  $\beta\gamma$ -Komplex, sind in der Lage, die Aktivität benachbarter Enzyme zu beeinflussen. In tierischen Zellen etablierte G-Protein-Aktivatoren wie Mastoparan, Ethanol sowie Cholera toxin aktivieren sowohl  $PLA_2$  als auch PLC und PLD in Pflanzenzellen (Munnik et al., 1998). Auch Untersuchungen an verschiedenen pflanzlichen Zellen zeigen eine Stimulation von  $PLA_2$ -Aktivität durch Mastoparan, GTP und Cholera toxin (Senda et al., 1998; Scherer et al., 1995) und weisen damit ebenfalls auf die Regulation durch G-Proteine hin.

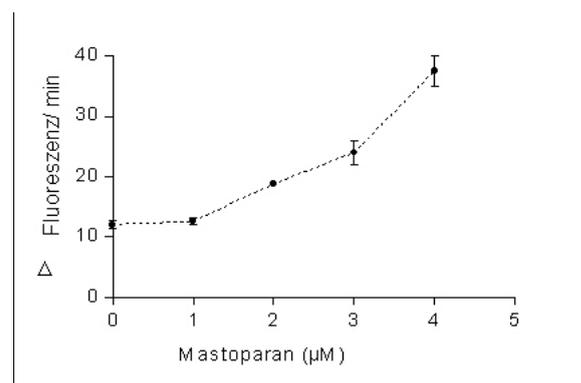
#### **3.3.3.7.1. Beeinflussung der $PLA_2$ -Aktivität durch Antikörper gegen die G-Protein-untereinheiten**

In Plasmamembranvesikeln von *Eschscholzia californica* konnte die Existenz von Membranproteinen, die mit anti-G-Protein-Antikörpern reagieren, im Westernblott gezeigt werden. Zur Detektion wurden polyklonale Antikörper, die gegen das Peptid vom C-terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* und Antikörper, die gegen die  $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins aus *Nicotiana tabacum* gerichtet waren, verwendet. Das apparente Molekulargewicht der detektierten G  $\alpha$ -Untereinheit betrug 44 kDa, für die G  $\beta$ -Untereinheit wurde ein Wert von 41 kDa ermittelt (Roos et al., 1999). Sofern die  $PLA_2$ -Aktivität über G-Proteine reguliert wird, kann nach Bindung von Antikörpern an G-Protein-Untereinheiten eine Veränderung der  $PLA_2$ -Aktivität erwartet werden. In unseren Experimenten wurden Plasmamembranvesikel 10 Minuten mit den o.g. Antikörpern vorinkubiert und anschließend die  $PLA_2$ -Aktivität gemessen. Der Antikörper, welcher gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* gerichtet war, bewirkte eine Verdopplung der  $PLA_2$ -Aktivität, der Anti-G- $\beta$ -Antikörper (gegen die UE von *Nicotiana tabacum*) eine ca. dreifach erhöhte Aktivität gegenüber dem Kontrollansatz. Die Zugabe "fremder Antikörper", z.B. anti-IgG bewirkte keine Veränderung der  $PLA_2$ -Aktivität (s. Abb. 31). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein heterotrimeres G-Protein und die  $PLA_2$  in der Plasmamembran räumlich benachbart sind und Änderungen der Struktur des G-Proteins auf die  $PLA_2$ -einwirken.



### 3.3.3.7.2. Einfluß von Mastoparan auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln

Mastoparan, ein bekannter G-Protein-Aktivator (Higashijima et al., 1988) wurde verwendet, um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von G-Proteinen an der Kontrolle der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Plasmamembran zu erhalten. Die Untersuchungen an Plasmamembranvesikeln ergaben eine deutliche Stimulation der PLA<sub>2</sub>-Aktivität. 4  $\mu$ M Mastoparan bewirkten eine 4-fache Erhöhung der Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse (s.Abb.32). Unspezifische Wechselwirkungen zwischen Mastoparan und mit dem Substrat BPC wurden in den Messungen nicht festgestellt. Dies zeigt, dass PLA<sub>2</sub> durch G-Proteine stimuliert werden können.



### 3.3.3.8. Wirkungen von Antioxidanten auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität

Es gibt biochemische und physiologische Belege für die Existenz von Transmembran-Redoxsystemen an den Plasmamembranen von pflanzlichen und tierischen Zellen. Diese Redoxsysteme werden in der Regel über die Reduktion künstlicher, extrazellulär zugesetzter undimpermeabler Elektronenakzeptoren, wie z.B. Hexacyanoferrat-(III) nachgewiesen (Böttger et al., 1991; Döring et al., 1996). Die Frage nach den zellulären Elektronendonatoren für das

Redoxsystem kann nicht in jedem Fall exakt beantwortet werden. Es werden sowohl Glutathion (Lüthen & Böttger, 1993) NADH, NADPH (Graig & Crane, 1981; Böttger et al., 1991) oder Ascorbat (Böttger et al., 1991) diskutiert. Natürliche Elektronenrezeptoren der Transplasmamembran-Redoxsysteme sind in einigen Fällen bekannt. Es kommen dafür sowohl Sauerstoff (Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Sauerstoffradikalen), Nitrat ( $\text{NO}_3^+$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ), als auch Semihydroascorbat in Frage (Döring et al., 1996; Rubinstein & Luster, 1993). Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, daß die Redoxsysteme der Plasmamembran an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist die Bereitstellung reaktiver Sauerstoffspezies für die Pathogenabwehr und für die Polymerisierung von Bausteinen, die für die Ligninbildung benötigt werden (Rubinstein & Luster, 1993).

#### **3.3.3.8.1. PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln aus Zellen nach Zugabe eines externen Elektronenakzeptors**

Die in dieser Arbeit verwendeten, kultivierten Zellen von *Eschscholzia californica* sind in der Lage, nicht permeable Elektronenakzeptoren wie Ferricyanid (HCF) oder Hexabromoiridat (HBI V) mit hoher Rate zu reduzieren. Bei einer üblichen Frischmase (FM) von ca. 50 mg/ml wird z.B. eine 1mM HBI-Lösung innerhalb von 15 min vollständig reduziert. Eine solche Vorbehandlung der Zellsuspension mit den o.g. Schwermetallkomplexen führte zu einer drastischen Erniedrigung der Elicitorwirkung auf die Alkaloidbiosynthese. Nach einer anschließenden zwei-bis dreistündiger Kultivation im Nährmedium in Abwesenheit der Schwermetallkomplexe wurde die Reaktion auf den Elicitor wiederhergestellt (Roos et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob der Ausfall der Elicitorwirkung sich auch in der PLA<sub>2</sub>-Aktivität widerspiegelt. Dazu wurden PM-Vesikel aus Zellen, die mit HBI vorbehandelt waren, hergestellt und deren PLA<sub>2</sub>-Aktivität mit der Aktivität von PM-Vesikeln aus unbehandelten Zellen verglichen. Die PLA<sub>2</sub>-Aktivität von Plasmamembranen aus den Zellen, die mit HBI vorbehandelt waren, erwies sich als ca. 50 % niedriger gegenüber der von nichtvorbehandelten Zellen (s. Abb. 33). Ein Teil der HBI-vorbehandelten Zellen wurde in frisches Medium zurückgeführt und inkubiert. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellen eingefroren und aus ihnen PM-Vesikel hergestellt. Auch in diesen zeigte die PLA<sub>2</sub>-Aktivität noch das erniedrigte Niveau (s. Abb.33). Dieses Ergebniss spricht dafür, dass die PLA<sub>2</sub> der PM eine oxidationsempfindliche Komponente besitzt,

die entweder von außen zugänglich ist, oder (mit größerer Wahrscheinlichkeit) auf die Erniedrigung des intrazellulären Redox-Status durch externes HBI (Hollstein, 2000) reagiert.

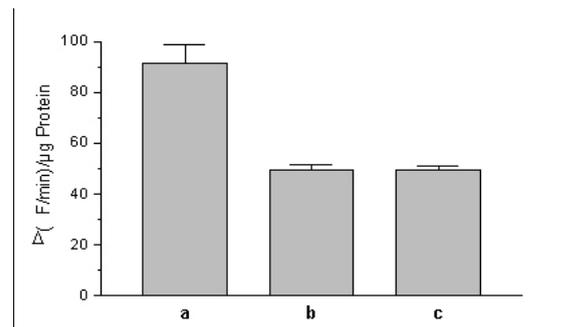


Abb.33. PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln aus den Zellen a) ohne HBI Behandlung b) nach 20 min mit 500 μM HBI Vorbehandlung c) nach 20 min mit 500 μM HBI-Vorbehandlung anschließender Rekultivierung im Nährmedium für 2 Stunden. Die Meßwerte wurden mit BPC fluorometrisch ermittelt. Die Daten stellen Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

### 3.3.3.8.2. Einfluß von Glutathion auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Plasmamembranvesikeln

Die Inkubation der Zellen von *Eschscholzia californica* mit Schwermetallsalzen wie HBI und HCF führt zu einer Reduktion dieser Verbindungen als Folge der transmembranalen Redox-Aktivität der Zellen. Während dieser Inkubation findet ein deutlich erkennbares Absinken des Glutathion (GSH)-Gehaltes im Cytosol statt (Hollstein, 2000). Alle hier untersuchten Agentien, die zu einer Erniedrigung des GSH-Gehaltes im Cytosol führen, bewirken auch eine verminderte PLA<sub>2</sub>-Aktivität. Dagegen führten die bekannten PLA<sub>2</sub>-Hemmstoffe (Aristolochiasäure, ETYA) nicht zu einer Erniedrigung des GSH-Spiegels im Cytosol (Hollstein, 2001). Die Wirkung externer Elektronenakzeptoren auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität intakter Zellen weist darauf hin, daß möglicherweise die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Plasmamembran von *Eschscholzia californica* vom GSH-Gehalt des umgebenden Cytoplasmas kontrolliert wird. Deshalb wurden Untersuchungen zur Wirkung von GSH auf die PLA-Aktivität in Plasmamembranvesikeln durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die Zugabe von externen GSH (3-5 mM) eine klare Aktivierung der PLA<sub>2</sub> bewirkten, z.B. um 50 % durch 5 mM GSH (s. Abb.34). Es kann noch nicht entschieden werden, ob das zugesetzte GSH direkt auf die PLA<sub>2</sub> von "inside-out"-orientierte Vesikeln wirkt oder ob es durch die Plasmamembran ins Innere der Vesikel aufgenommen wird. Um Plasmamembranvesikel mit GSH zu füllen, und die Wirkung vom internen GSH auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität zu testen, wurden Elektroporationsversuche durchgeführt (s.u.).

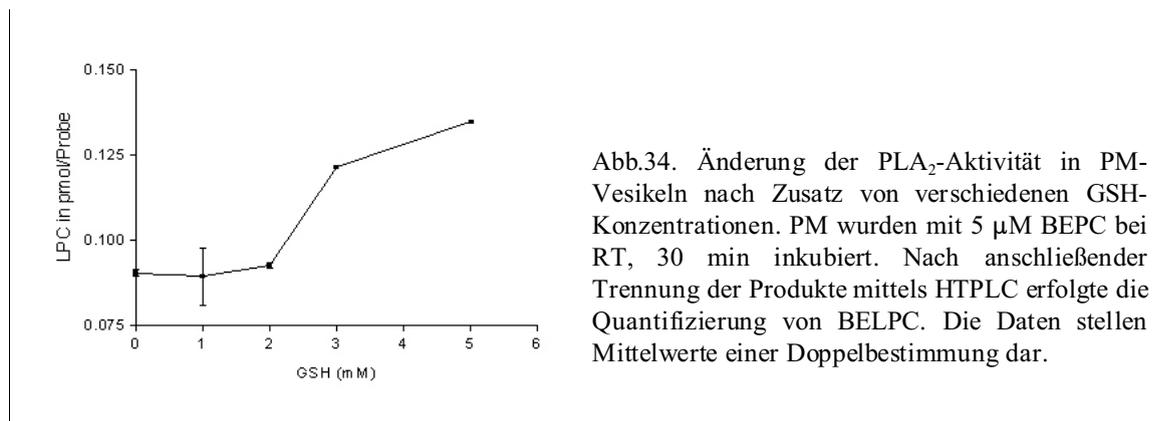


Abb.34. Änderung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in PM-Vesikeln nach Zusatz von verschiedenen GSH-Konzentrationen. PM wurden mit 5  $\mu$ M BEPC bei RT, 30 min inkubiert. Nach anschließender Trennung der Produkte mittels HTPLC erfolgte die Quantifizierung von BELPC. Die Daten stellen Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

### 3.3.3.8.3. Einschlußversuche von Glutathion in den PM-Vesikeln durch Elektroporation

GSH ist ein Tripeptid ( -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin) das bei vielen zellulären Prozessen als Reduktionsmittel und Konjugationspartner dient, u.a. bei Entgiftungsprozessen nach Herbizid- oder Schwermetallaufnahme in Pflanzen. In unseren Experimenten wurde versucht, GSH als potentiellen Elektronendonator in die PM-Vesikel einzuschließen um seinen Einfluß auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität zu untersuchen. Nach dem Aufschluß der Zellen im Homogenisationsmedium schließen Membranstücke sich zu Vesikeln zusammen. Das Innere des Vesikels besitzt den gleichen Inhalt wie das umgebende Medium. Dies kann man ausnutzen, um bestimmte Substrate in den Vesikeln einzuschließen, z.B. Elektronendonoren. Askerlund et al.(1991) konnten z.B. Plasmamembranvesikel aus *Beta vulgaris* gewinnen, und diese mit Ascorbat, das man dem Homogenisationsmedium zugesetzt hatte, beladen. Die Ascorbataufnahme in die Vesikel wurde indirekt an Hand der Reduktion von Ferricyanid, Eisen III-citrat und 2,6 Dichlorphenolindophenol-3-sulfonat gemessen (Askerlund et al., 1991). In der Praxis ist die mit der Zellhomogenisation einhergehende Vesikel-Beladung jedoch schwierig, da neben den gewünschten Substraten auch andere Komponenten, z.B. Bestandteile des Zellplasmas, mit geladen werden. Eine alternative Methode, um Vesikel zu beladen, ist die Elektroporation. In isolierten Plasmamembranvesikel von *Zea mays* konnten Böttger et al. (1989) die Reduktionsmittel Ascorbat und NADH mit Hilfe der Elektroporation einbringen. Diese Methode erschien uns geeignet, Plasmamembranvesikel selektiv mit GSH zu beladen. Die Elektroporation beruht auf strukturellen, reversiblen Änderungen der Zellmembranen, die durch einen kurzen elektrischen Stromstoß nach vorübergehendem Aufbau eines elektrischen Feldes stattfinden.

Dadurch werden in den Membranen Poren erzeugt, durch die der Austausch von äußeren und intrazellulären Medien stattfinden kann. Zwei Kriterien müssen bei der Elektroporation beachtet werden, einerseits soll eine möglichst hohe Beladung mit dem Substrat erreicht werden, andererseits aber die natürliche Struktur der Membran im Vesikel erhalten bleiben. Um Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen dem vesikulären GSH-Gehalt und der PLA<sub>2</sub>-Aktivität ziehen zu können, ist eine möglichst exakte Bestimmung des GSH-Gehaltes der Vesikel notwendig. Es gibt zahlreiche Protokolle zur Elektroporation von Zellen, jedoch wenig Angaben über die Elektroporation von PM-Vesikeln. Die Hauptparameter, die bei unseren Elektroporationsversuchen optimiert wurden, waren Pulslänge und elektrische Feldstärke. Bei hohen Pulslängen wurde festgestellt, dass dabei eine hohe thermische Energie entsteht und die Gefahr einer Denaturierung der Proteine bestand. Es erwies sich, dass bei hohen Feldstärken der Einschluß von GSH in den Vesikeln erfolgreich war. In Tab. 11 sind einige erfolgreiche Experimente wiedergegeben.

	U (Volt)	E (kV/cm)	Pulslänge (msek)	GSH-Konzentration in Vesikeln(μM)
Kontrolle	0	0	0	0
Probe1	800	8	4.06	0.312
Probe 2	1000	10	3.3	1.03
Probe 3	1200	12	2.4	1.22

Tab.11 Ausgewählte Geräteparameter für die Versuche zum Einschluß von GSH in Plasmamembranvesikeln mittels Elektroporation. Nach Variieren der Parameter beim Einschluß von GSH in den Vesikeln. C= 50 μF und R=720

Mit Vesikeln, in denen GSH eingeschlossen wurden, wurde dann die PLA<sub>2</sub>-Aktivität gemessen. Vorher wurde die GSH-Konzentration der Vesikel durch ein fluorometrisches Verfahren bestimmt (s. Kap.2.7.5.). Es konnte in diesen Vesikeln keine Veränderung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität festgestellt werden. Die physiologische Konzentration von GSH in Cytoplasma der Zellen ist relativ hoch und liegt in millimolaren Bereich. Möglicherweise konnte deshalb die niedrige Konzentration an Glutathion keinen meßbaren Einfluß auf PLA<sub>2</sub>-Aktivität ausüben.

### 3.3.4. Aktivität von PLA<sub>2</sub> in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*

Nach dem erfolgreichen Nachweis der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in PM-Vesikeln und ihrer Stimulierung durch Elicitorkontakt stellte sich die Frage, ob mit der verwendeten Methode, d.h. der DC-Trennung und Quantifizierung eines Hydrolyseprodukts des Substrats BEPC, auch in der intakten Zelle die Aktivität von PLA<sub>2</sub> und ihre Stimulation durch die Elicitorkontakt nachgewiesen werden können. Dies war deshalb von Bedeutung, weil diese Enzymaktivität mit einer alternativen, mikroskopischen Methode der elicitor-stimulierte Fluoreszenzanstieg nach Kontakt von Einzelzellen mit den fluorogenen Substrat BPC in Einzelzellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in unserer Arbeitsgruppe mehrfach nachgewiesen wurde (Roos et al., 1999; Hollstein, 2001; Nitzsche, 2001; Schwartze, 2001; Viehweger et al., 2002).

Die im folgenden vorgestellten Experimente hatten daher das Ziel:

- die o.g. PLA<sub>2</sub>-Messungen in Einzelzellen durch den Nachweis der Hydrolyseprodukte zu verifizieren
- erste Hinweise auf einen Metabolismus der Hydrolyseprodukte in Ganzzellen zu finden
- die mit Hilfe der künstlichen Substrate gewonnenen Daten mit Veränderungen der genuinen Phospholipide und deren Hydrolyseprodukten zu vergleichen

Bei den im folgenden vorgestellten Experimenten wurden die Substrate BPC bzw. BEPC im Kulturmedium mit Hilfe einer Ultraschall-Behandlung vollständig gelöst. (Dies wurde inzwischen durch Ultrafiltration verifiziert, W.Schwartze persönliche Mitteilung).

#### 3.3.4.1. LPC-Abbau durch intakte Zellen

Bei der Bestimmung der PLA<sub>2</sub>-Hydrolyseprodukte des fluorogenen Substrats BPC wurde festgestellt, dass die nachweisbare Menge an LPC viel geringer war als die der freien Fettsäuren. Bei der enzymatischen Spaltung sollten beide jedoch in äquivalenten Mengen entstehen. Es wurde deshalb vermutet, dass das Lyso-PC von den Zellen weiter umgesetzt wird. Um dies zu prüfen, wurden LPCs aus den Substraten BPC und BEPC mit Hilfe der PLA<sub>2</sub> aus *Apis mellifera* hergestellt und durch präparative DC isoliert und gereinigt. Diese BODIPY-markierten LPCs wurden mit Zellen bzw. Plasmamembranvesikeln inkubiert, anschließend dünnschichtchromatographisch analysiert. LPC wurde in Zellsuspensionen metabolisiert, aber nicht von Plasmamembranvesikeln. Nach Zusatz von B-LPC entstand rasch ein neue fluoreszierende Bande, mit einem R<sub>F</sub>-Wert vergleichbar dem Substrat BPC. (s.Abb.35).

Im Falle des Ether-Derivats BELPC entstand ebenfalls eine neue Verbindung, jedoch mit sehr viel geringerer Bildungsrate. Wegen der Ähnlichkeit der  $R_f$ -Werte der Metabolisierungsprodukte sind sie den BODIPY-Phospholipiden sehr ähnlich (s.Abb.35.), daher liegt es nahe, eine Reacylierung des LPCs mit natürlichen Fettsäuren anzunehmen. Das neu gebildete "Phospholipid" wurde nach Erreichen einer bestimmten Konzentration abgebaut, parallel dazu nahm die BLPC-Menge zu (s.Abb.36). Bei der Neubildung eines BODIPY-Phospholipides wäre in der Tat die (nachgewiesene) Hydrolyse durch die  $PLA_2$  zu erwarten.

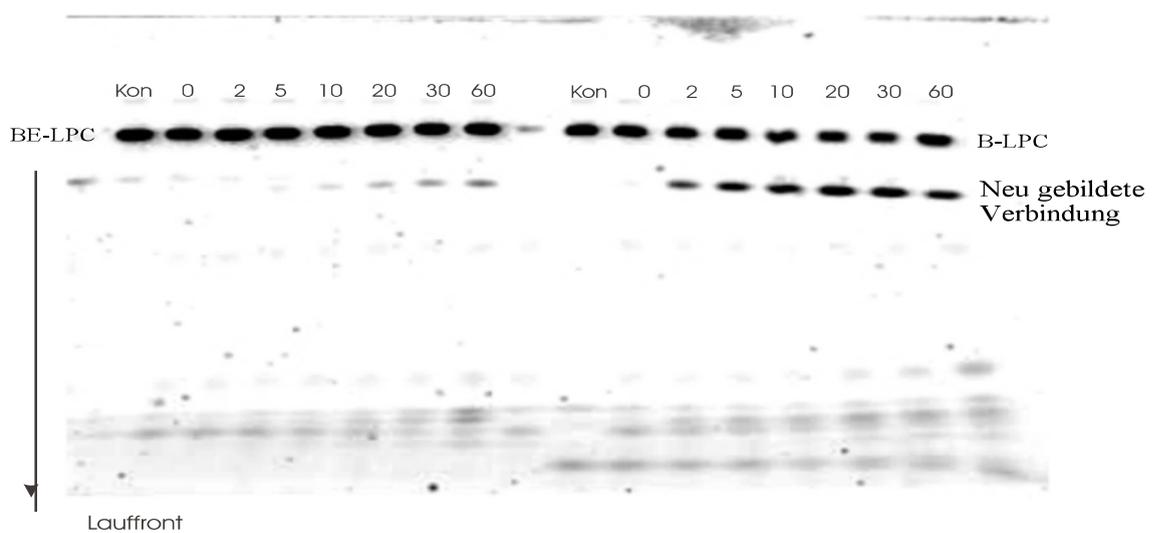


Abb.35. Umwandlung der  $PLA_2$ -Hydrolyseprodukte BELPC und BLPC durch die Zellen von *Eschscholzia californica*. Das Chromatogramm zeigt die zeitabhängige Bildung eines neuen Substrats mit einem  $R_f$ -Wert von 0.3.

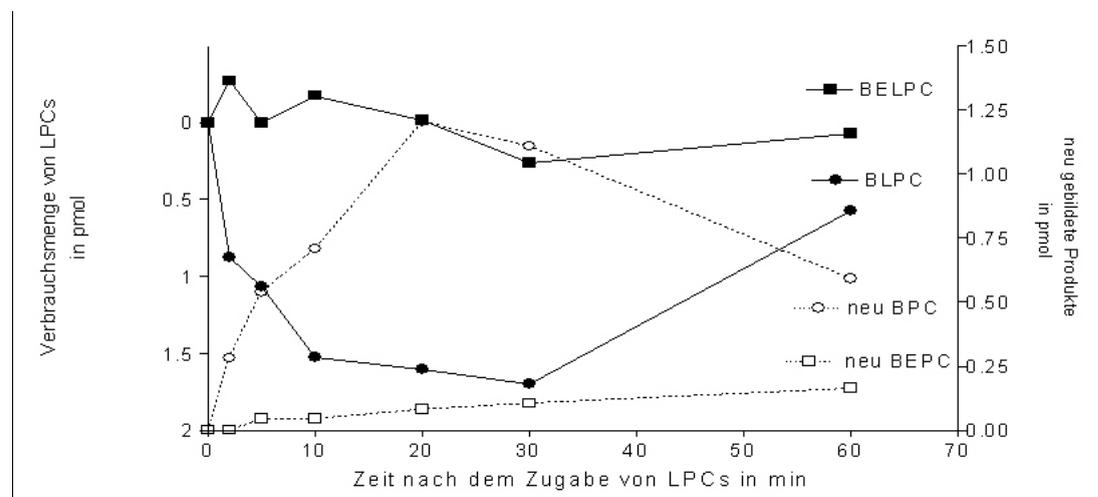


Abb.36. Umwandlung der fluoreszierenden BODIPY-Lysophosphadithylcholine BLPC und BELPC durch die Zellen von *Eschscholzia californica*. Die Chromatogramme von Abb.35 wurden quantifiziert und graphisch dargestellt.

Die Daten aus Abb.35 und 36 sprechen also für eine Phospholipid-Natur des Metaboliten. Die Identifizierung des neugebildeten Metaboliten mit MALDI-TOF-MS gelang jedoch nicht, da die Störungen der Messsignale durch die natürlichen Phospholipide, die den gleichen  $R_f$ -Wert wie diese neue Produkte haben, sehr groß waren. In Weiterführung dieser Arbeiten konnte W.Schwartz (2001) inzwischen zeigen, dass das isolierte "Phospholipid" mit authentischer  $PLA_2$  gespalten wird und ein mit dem eingesetzten BLPC  $R_f$ -gleiches Produkt bildete. Es besteht deshalb wenig Zweifel an der Phospholipid-Natur des Metaboliten, d.h. es muss eine Reacylierung stattgefunden haben. Aus tierischen Zellen gibt es zahlreiche Hinweise für eine rasche Reacylierung gebildeter Lysophospholipide: In der Makrophagenzelllinie P388D<sub>1</sub> wurde z.B. festgestellt, dass die Lysophospholipide durch eine CoA-abhängiger Acyltransferase zu einem Phospholipid reacyliert werden können (Balsinde et al.,1995). Für die Lokalisation der Reacylierungskapazität in unserem Objekt ist der Befund wesentlich, dass die Umwandlung von LPC-Derivaten nur mit Zellen, nicht aber in der PM-Fraktion (welche die  $PLA_2$ -Aktivität enthält) gefunden wurde. Dies weist daraufhin, dass der Reacylierungsvorgang nicht an der Plasmamembran abläuft.

### 3.3.4.2. Messungen der $PLA_2$ -Aktivität in Zellsuspensionen mit BEPC

Da BELPC von Zellsuspensionen kaum reacyliert wurde (s.Abb.36), erfolgten die Messungen der  $PLA_2$ -Aktivität in den Zellen mit BEPC. Die Suspensionszellkulturen von *Eschscolzia californica* zeigen eine deutlich messbare Grundaktivität an  $PLA_2$  nach dem Zusatz von BEPC. In Abb.37 ist ein charakteristisches Chromatogramm der Hydrolyse von BEPC durch Zellen von *Eschscolzia californica* dargestellt. Neben dem hier zu untersuchenden  $PLA_2$ -Produkt BELPC wird möglicherweise auch das Hydrolyseprodukt der Phospholipase C, BODIPY-DAG gebildet, wie aus der  $R_f$ -Ähnlichkeit mit authentischem DAG vermutet werden kann. Im Gegensatz zu der Umsetzung des BEPC in PM-

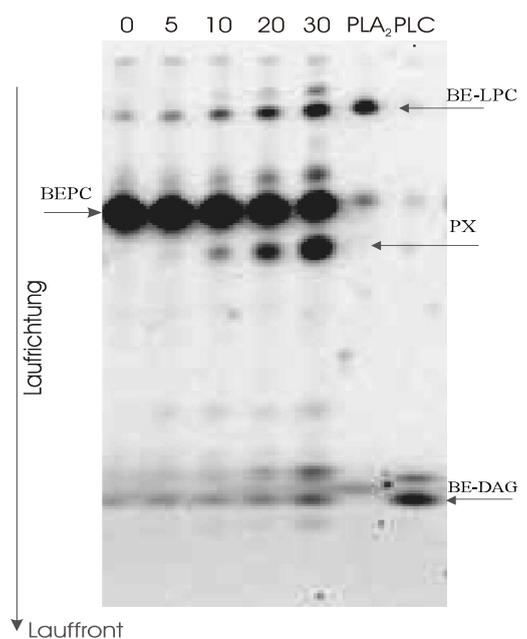


Abb.37. Darstellung eines typischen Chromatogramms der BEPC-Hydrolyse durch Zellen. Die Quantifizierung erfolgte an Hand einer Eichkurve im Kap.2.5.4.

Vesikeln (s.Abb. 25), erscheint bei den Zellen eine zusätzliche Bande (PX), die nicht identifiziert werden konnte.

### 3.3.4.3. Stimulation von PLA<sub>2</sub>-Aktivität durch Elicitorkontakt

Das Hydrolyseprodukt der PLA<sub>2</sub>-Aktivität, BELPC konnte nach DC-Trennung gut quantifiziert werden (s. Kalibrations-Kurve Kap.2.5.4.). Damit konnte die Elicitor-Aktivierung der PLA<sub>2</sub> verifiziert werden, die in mehreren Experimenten unserer Arbeitsgruppe als Anstieg der Fluoreszenz von BPC bei fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen nachgewiesen wurde (Roos et al., 1999; Hollstein, 2000; Nitzsche, 2001; Schwartze, 2001). Die Trennung des PLA-spezifischen Fluoreszenz-Anstiegs von den möglichen Einflüssen amphiphiler Verbindungen auf die Substratstruktur (s.Kap.3.3.2.2.) erfolgte dabei über die Kinetik des Fluoreszenzanstiegs, den Vergleich zwischen kontroll-und elicitorausgelöster Aktivität in der gleichen Zelle (Weiß, 2000; Schwartze, 2001). und den Einsatz von PLA<sub>2</sub>-Hemmstoffen (Hollstein, 2000; Nitzsche, 2001). Es war deshalb wesentlich, einen erwarteten Anstieg der PLA<sub>2</sub> nach Elicitorkontakt durch die Quantifizierung eines Hydrolyseprodukts zu verifizieren.

Wie aus Abb. 38 hervorgeht, konnte in der Zellkultur ein gut erkennbarer Anstieg von BE-LPC nach Elicitorkontakt festgestellt werden. Dieser Anstieg war transient, d.h. er erreichte ein Maximum nach 5 min und war nach 10-15 min nicht mehr vorhanden.

Die Wirkung des Elicitors auf die BELPC-Bildung war sehr vom Kulturalter der Zellen abhängig. Der stärkste Effekt wurde bei den 4-5 Tage alten Zellen festgestellt. Dies wird deutlich wenn man die BELPC-Menge nach Elicitorkontakt auf die Bildungsrate von Kontrollzellen bezieht und diese Verhältnisse im Kulturverlauf untersucht (s.Abb.39).

Am 4.-5. Kulturtag wurde eine 18-20-fache Erhöhung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in den elicitierten Zellen gegenüber Kontrollzellen nach 5 min Elicitorkontakt gefunden.

Die Abhängigkeit der Elicitorwirkung auf die PLA<sub>2</sub> vom Kulturalter zeigt deutliche Parallelitäten zur Wirkung des Elicitors auf die Alkaloidbiosynthese: auch die Bildungsrate der Benzophenanthrine zeigte am 4.-5. Kulturtag die stärkste Stimulation durch 1 µg/ml Hefeelicitor (Hieke, Schwartze, Roos, unveröffentlicht). Diese Korrelation liefert einen weiteren Hinweis auf die Einbeziehung der PLA<sub>2</sub> in die Signalkette zur Alkaloidbiosynthese.

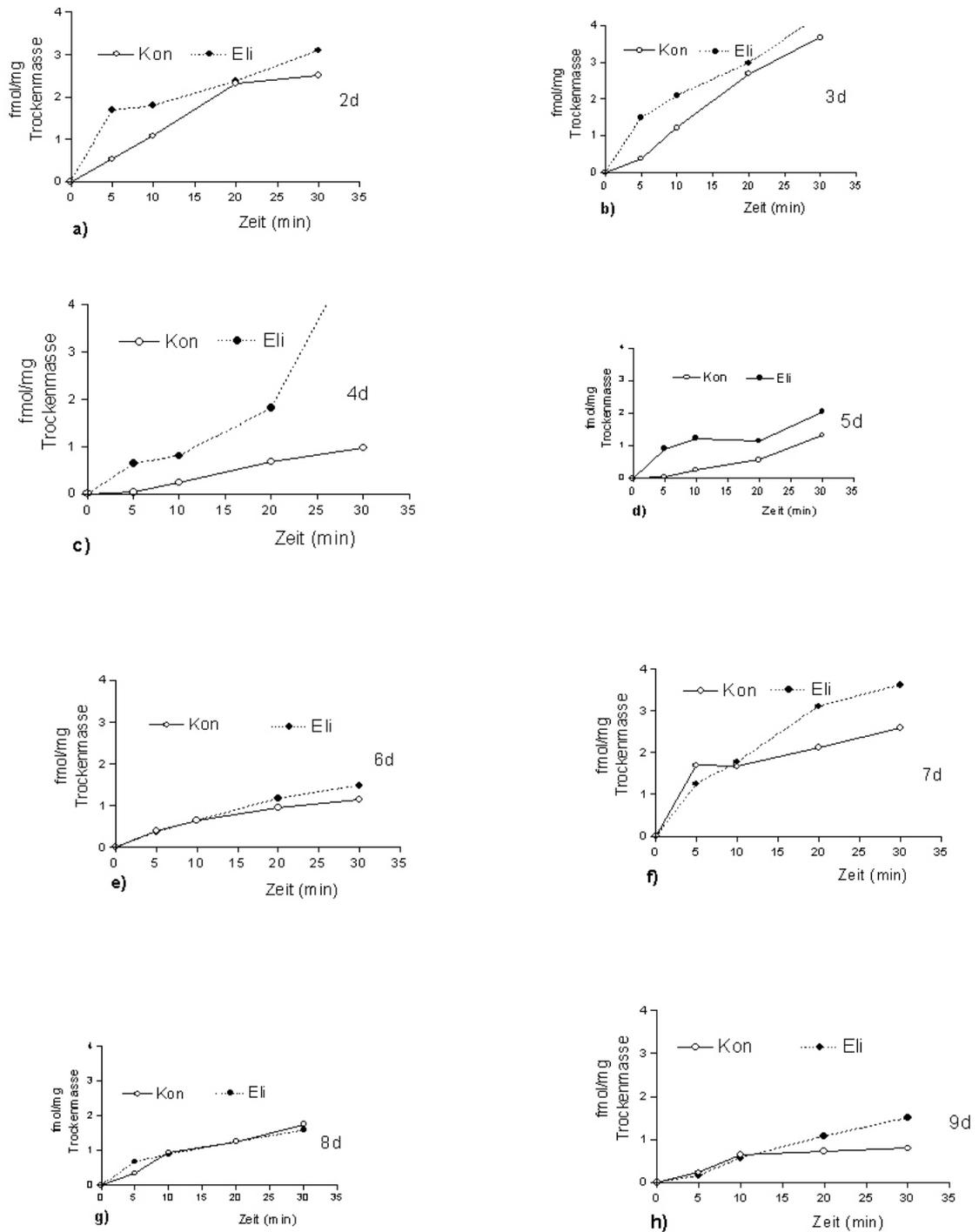


Abb. 38. PLA<sub>2</sub>-Aktivität in unterschiedlich alten Zellen in An- und Abwesenheit des Elicitors. Gemessen wurde die Kinetik der LPC-Freisetzung aus dem Substrat BEPC

a) 2-tage alte Zellen b) 3-tage alte Zellen c) 4-tage alte Zellen d) 5-tage alte Zellen e) 6-tage alte Zellen f) 7-tage alte Zellen g) 8-tage alte Zellen h) 9-tage alte Zellen

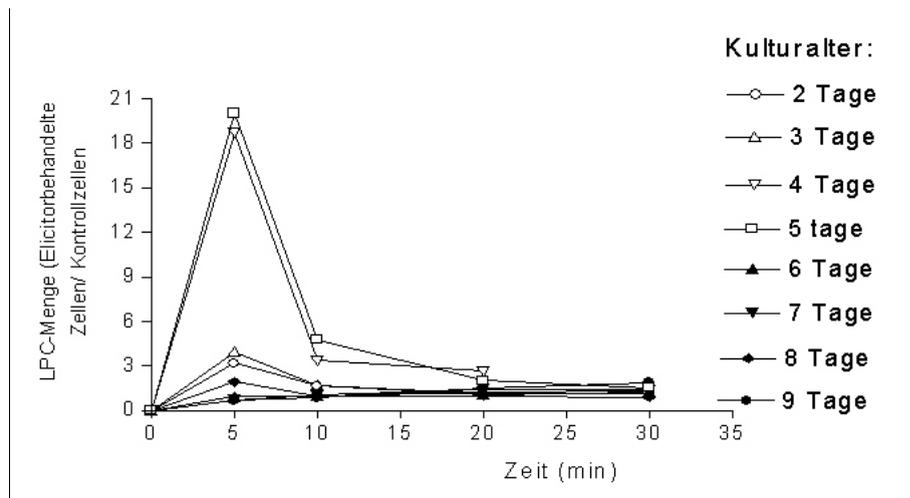


Abb.39. Transiente Erhöhung der LPC-Menge nach Elicitorkontakt in unterschiedlich alten Zellen von *Eschscholzia californica*. Dargestellt sind die Verhältnisse der PLA<sub>2</sub>-Aktivitäten zwischen Elicitor-stimulierten Zellen zu nicht stimulierten Zellen

### 3.3.5. Die Dynamik des endogenen LPC nach Elicitorkontakt

In den bisher vorgestellten Experimenten wurde die Aktivität der PLA<sub>2</sub> durch die Identifizierung und Quantifizierung der Spaltprodukte synthetischer fluoreszenzmarkierter Phospholipide nachgewiesen. Diese Substrate sind an den Fettsäure-Seitenketten deutlich gegenüber nativen Phospholipiden verändert (die Kettenlänge beträgt 11 C-Atome, terminal ist der voluminöse BODIPY-Heterocyclus ankondensiert). Es kann deshalb nicht vorausgesetzt werden, dass diese Substrate als Sonden für das Verhalten der genuinen Phospholipide dienen können. Weiterhin ist zu prüfen, ob und wie weit durch den Zusatz externer Substrate die natürlichen zellulären Bedingungen, welche die Aktivität von Phospholipase beeinflussen, verändert werden. Dies betrifft u.a. die intrazelluläre Kompartimierung der Substrate und eine eventuellen Aktivitätsänderung (Aktivierung, Hemmung oder regulatorische Veränderung) des zu messenden Enzyms durch das künstliche Substratanalogen. In den von uns verwendeten Zellen von *Eschscholzia californica* wurde mit mikroskopischen Untersuchungen bereits gezeigt, dass die aus den externen Substraten gebildeten Lysophospholipide sich sehr rasch in den cytoplasmatischen Bereichen der Zelle verteilen, (Viehweger, 2002) so dass zumindest für die Hydrolyseprodukte keine starke Kompartimierung befürchtet werden muß. Es kann jedoch noch nicht bewiesen werden, ob das Substrat in ausreichend hohen Konzentrationen an allen Phospholipase-„Standorten“ der Zelle anwesend ist oder ob etwa die lokale Substratkonzentration die Umsatzrate limitiert.

### 3.3.5.1. Methodische Grundlagen zur Detektion extrahierter Phospholipide und Lysophosphatidylcholine mit MALDI-TOF-Massenspektroskopie

Um die o.g. Unsicherheiten, welche bei der Benutzung externer Substratanaloga notwendigerweise resultieren, einzugrenzen und zugleich einen Einblick in die Identität und Dynamik genuiner Lysophospholipide zu erhalten, wurde im folgenden die Methode der MALDI-TOF-Massenspektrometrie eingesetzt. Diese Methode, die unseres Wissens erstmals zur Analyse pflanzlicher Lysophospholipide eingesetzt wurde, liefert zugleich qualitative Angaben zur Identifizierung der Lipidmoleküle und zumindest halbquantitative Angaben über deren Gehalt. Diese massenspektrometrische Methode erlaubt eine "schonende" Desorption und Ionisation der Analytenmoleküle durch einen Laserimpuls auf ein kristallines Analyt-Matrix-Gemisch.

Das  $m/z$  Verhältnis der gebildeten Ionen kann aus der Zeit, die diese benötigen, einen Weg definierter Länge im Flugzeit-Analysator zurückzulegen, berechnet werden. Der Vorteil bei dieser Methode besteht darin, dass die Analytenmoleküle während der Desorption und Ionisierung nicht fragmentiert werden. Ein spezifischer Vorteil für die Anwendung in der Lipidanalytik ist, dass sowohl die Matrix als auch die zu untersuchenden Lipide in organischen Lösungsmitteln gut löslich sind, deshalb der Lipid-Matrix-Komplex, (im Gegensatz zu wasserlöslichen Substraten wie Peptiden) eine gute homogene Kristallisation auf dem Probeneller zeigt. Dies führt zu einer hohen Reproduzierbarkeit der Desorption und des Massensignals. Deshalb ist, im Unterschied zum Einsatz der Peptid-Sequenz-Analyse, eine Quantifizierung möglich, welche über die Kalibrierung der Signalhöhe der Peaks mit der Konzentration des Analyten erfolgt.

Bei der MALDI-MS können die Signale der zu untersuchenden Phospholipidmetabolite im negativen oder positiven Ionenmodus ermittelt werden. Wir haben die Spektren der Lipidmetabolite im positiven Ionenmodus detektiert.

Die Quantifizierung der Mengen von Phospholipidverbindungen erfolgte aus den Verhältnissen von Signalhöhe ( $S_H$ ) der Peaks und der Höhe des Rausch-Signals ( $N_{pp}$ ).

Von Müller et al. (2001) wurde aus empirischen Daten folgende Formel zur Ermittlung des Signal/noise-ratio gefunden:  $S/N=2.5*(S_H-0.5N_{pp})/N_{pp}$

Aus der Auftragung der  $S/N$ -Verhältnisse gegen definierte Mengen der Phospholipide kann man Eichkurven erhalten. Die Phospholipide lassen sich in der MALDI-TOF-MS mit unterschiedlicher Empfindlichkeit detektieren. Dies wird ersichtlich, wenn man die  $S/N$ -

Verhältnisse verschiedener Phospholipide untereinander vergleicht. Müller et al. ermittelten einen Wert von  $S/N=5$  bei Verwendung folgender Phospholipidmengen pro Meßprobe: für PC bei  $3\pm 1$  pmol, für PI bei  $67.5\pm 11$  pmol und für PIP bei  $143\pm 38$  pmol (Müller et al., 2001). Deshalb ist für die Quantifizierung einzelner Phospholipide jeweils eine entsprechende individuelle Eichkurve notwendig. Cholin-haltige Moleküle werden am empfindlichsten detektiert und können im Überschuß den Nachweis anderer Moleküle maskieren (Müller et al., 2001).

### 3.3.5.2. Nachweis von Phospholipiden und Lysoverbindungen in Zellen und Plasmamembranvesikeln von *Eschscholzia californica*

Als Nächstes sollte untersucht werden, welche Phospholipide und Lysoverbindungen in Extrakten unbehandelter PM-Vesikel bzw. der intakten Zellen detektierbar sind.

Voruntersuchungen mit Vesikeln ergaben, dass eine dünnschichtchromatographische Vorreinigung der Lysoverbindungen nach der Extraktion mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  nicht notwendig war, da keine Überlagerung der Massensignale anderer Verbindungen mit den hier interessierenden Signalen gefunden wurde. Charakteristisches MALDI-TOF-Spektren sind in Abb.40 dargestellt. In diesen Proben wurden Signale gefunden, die eindeutig bestimmten Lysoverbindungen und Phospholipiden zugeordnet werden können. In den Massenspektren der Vesikelextrakte (Abb.40 a) wurden Signale der  $\text{H}^+$  und  $\text{Na}^+$ -Addukte von LPC (16:0) und LPC

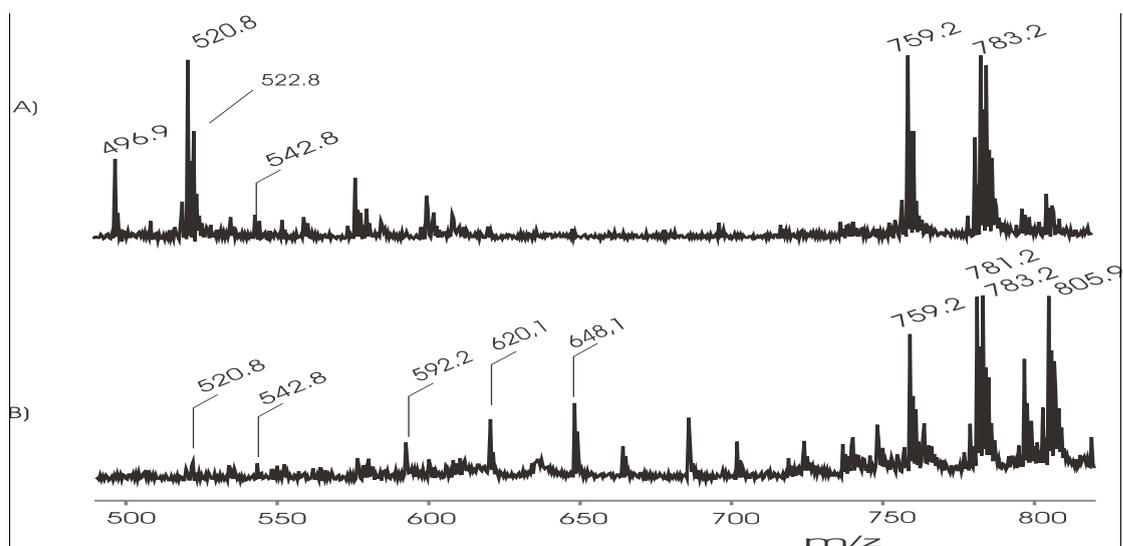


Abb.40. Massenspektren der Lysoverbindungen und Phospholipide aus A) Plasmamembranextrakten und B) Zellextrakten von *Eschscholzia californica*.

(18:2) und von LPC (18:1) gefunden. Hiermit wurde erstmals gezeigt, dass die PLA<sub>2</sub> in der Lage ist, membranständige Phospholipide zu hydrolysieren, und dass die Spaltprodukte direkt aus den Vesikelextrakten heraus analysiert werden können. Die Massenspektren der Phospholipidextrakte von Zellen unterschieden sich von den Massenspektren der Plasmamembranvesikel (Abb.40b). In den Massenspektren der Zellextrakte wurde im Bereich der LPC-Spezies nur 1 gut messbares Signal gefunden. Dieses befindet sich bei einem m/z-Verhältnis von 542.8 und repräsentiert das Natriumaddukt von LPC (18:2), das entsprechende H<sup>+</sup>Addukt von LPC (18:2) liefert ein schwaches Signal bei m/z=520.8.

Die anderen Peaks von LPC-Spezies, die man bei Plasmamembranextrakten fand, wurden hier nicht detektiert (s.Tab.11).

Verbindungen	Massenpeaks		in Zellen	in Plasmamembran
	+H <sup>+</sup> -Addukt	+Na <sup>+</sup> -Addukt		
LPC (16:0)	4968	5188		+++
LPC (18:2)	5208	5428	++	+++
LPC (18:1)	5228	5448	+	+++
PC (16:0+18:2)	7592	7812	+++	+++
PC (16:0+18:1)	7613	7832	+++	+++
DAG (16:0+16:0)		5922	++	+
DAG (16:0+18:0)		6201	++	+
DAG (18:0+18:0)		6481	++	

Tab.11. Übersicht der durch MALDI-TOF-MS gut detektierbaren Phospholipide in den Extrakten von PM und Ganzzellen von *Eschscholzia californica*.(+++-stark, ++mittel und +schwach)

### 3.3.5.3. Änderungen des LPC-Gehalts nach Elicitorkontakt

Aus bisher gezeigten Daten geht hervor, dass sowohl die Identifizierung als auch die Quantifizierung von LPCs und anderen Hydrolyseprodukten der Phospholipide in Chloroform/Methanol-Extrakten von *Eschscholzia californica* möglich ist. Damit war die Voraussetzung geschaffen, vermutete Änderungen des Gehalts an PLA<sub>2</sub>-Produkten nach Elicitorkontakt exakter zu bestimmen. Zunächst wurden Plasmamembranvesikel untersucht, da inzwischen gezeigt war, dass LPC und DAG an der Vakuolenmembran in situ einen pH-Shift auslösen (Viehweger, 2002), und daher potentiellen Signalstoffe darstellen.

Im Kapitel 3.3.3.6. wurde bereits gezeigt dass in Plasmamembranvesikeln eine elicitoraktivierte PLA<sub>2</sub> nachweisbar ist. Da in den PM-Vesikeln eine Reacylierung der gebildeten LPCs nicht erwartet werden muss (Kap.3.3.4.1.), erschienen uns Plasmamembranvesikel besonders geeignet, elicitorabhängige Änderungen des LPC-Gehaltes nachzuweisen. Wie aus Abb.41.

hervorgeht, wurde tatsächlich ein drastischer Anstieg der LPC-Spezies 18:1 und 18:2 beobachtet. Bemerkenswert ist auch dass die einzelne LPC-Spezies nach Elicitorkontakt in unterschiedlicher Maße gebildet werden.

Diese Ergebnisse bestätigen einerseits, die bei der Benutzung der BODIPY-Phospholipide gefundene Elicitorstimulation der PLA<sub>2</sub> (Kap.3.3.3.6.). Gleichzeitig weist es daraufhin, dass in isolierten Plasmamembranen, auch ein Teil der Signalkette zwischen dem Elicitorrezeptor und der PLA<sub>2</sub> vorhanden sein sollte, da eine direkte Einwirkung des Elicitors auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität unwahrscheinlich ist. Als geeigneten Kandidaten haben wir eine heterotrimeres G-Protein identifiziert. Nach Ausschaltung des G-Proteins durch eine stabile antisense-Transformation wurde eine deutlich verminderte Wirkung des Elicitors auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität gefunden (Schumann, Viehweger und Roos unveröffentlicht).

Nach diesen ermutigenden Ergebnissen wurde untersucht, ob auch in intakten Zellen ein Anstieg von LPC nach Elicitorkontakt nachweisbar ist. Abb. 42. zeigt, dass unmittelbar nach

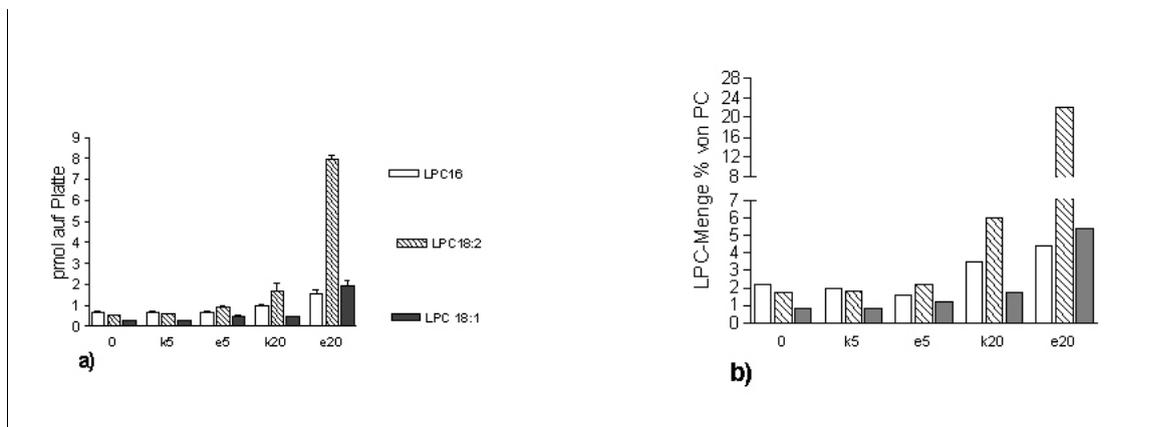


Abb.41. Die Bildung von LPC in PM-Vesikeln, die für 5 min bzw. 20 min mit Elicitor (2 µg/ml) vorbehandelt wurden im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollansätzen. Die Grafik (a) zeigt die Mengen der einzelnen freigesetzten Lysoverbindungen, in (b) ist prozentuelle Anteil der LPC von PC der prozentuale Gesamtumsatz von PC (16:0, 18:1) zu LPC-Menge.

Elicitorkontakt eine rasche Anstieg von LPC in Zellsuspensionen erfolgt. Der Differenz zwischen Elicitor-behandelten Zellen und Kontrollzellen zeigt einen deutlichen Peak ca. 1-2 min nach Elicitorkontakt. Diese Daten bestätigen, dass in den Zellen der Elicitorkontakt zu einer transienten Erhöhung des LPC-Gehaltes führt. Die nachfolgende Verringerung des LPC-Gehaltes in den elicitorbehandelten Zellen gegenüber der Kontrolle unterstützt, die bereits mit den fluorogenen Substraten gefundene Metabolisierung (wahrscheinlich Reacylierung) von LPC. Während in den Zellen im wesentlichen nur die LPC-Spezies 18:2 nachweisbar war und

nach dem Elicitorkontakt transient aufstieg, sind in den PM-Vesikeln neben dem auch hier dominierenden LPC 18:2 auch LPC 16:0 und 18:1 vorhanden und zeigen einen (wenn auch geringeren) Anstieg nach dem Elicitorkontakt.

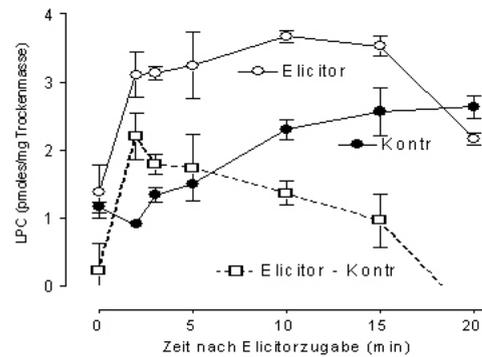


Abb.42. Kinetik der Bildung von LPC (18:2) in den Zellen von *Eschscholzia californica* nach dem Elicitorkontakt im Vergleich zu nichtstimulierten Kontrollzellen. Die gestrichelte Linie gibt die Differenz zwischen elicitierten und nichtelicitierten Zellen an.

### 3.3.5.4. DAG in Zell- und PM-Vesikelextrakten

In Massenspektren der Extrakte sowohl aus den Zellen als auch aus den PM-Vesikeln wurden neben LPC auch DAGs (als  $\text{Na}^+$ -Addukt) detektiert.  $\text{H}^+$ -Addukte von DAG treten, in Übereinstimmung mit Literaturangaben (Zabrouskov et al., 2001) bei dem verwendeten Verfahren praktisch nicht auf. In den Massenspektren der Zellextrakte als auch der PM-Vesikel konnten hohe Signale von DAGs bei  $m/z=592$  (DAG (16:0,16:0)), 620 (DAG (18:0,16:0)) und 648 (DAG (18:0 18:0)) identifiziert werden (s.Tab.11). Nach Elicitorzugabe wurde gegenüber nichtelicitierten Zellen keine Veränderung der DAG-Mengen festgestellt (s.Abb.43). Es ist zu vermuten, dass die hohen Mengen verschiedener DAGs nicht das Produkt der PLC-Aktivität sind. Vielmehr ist von intrazellulären DAG-Speichern auszugehen, da dieses Molekül auch Intermediat der Triglycerid-und Phospholipid-Biosynthese ist, über eine mögliche Signaltransduktion (die bei starker Kompartimierung möglich wäre) kann daher noch nicht entschieden werden.

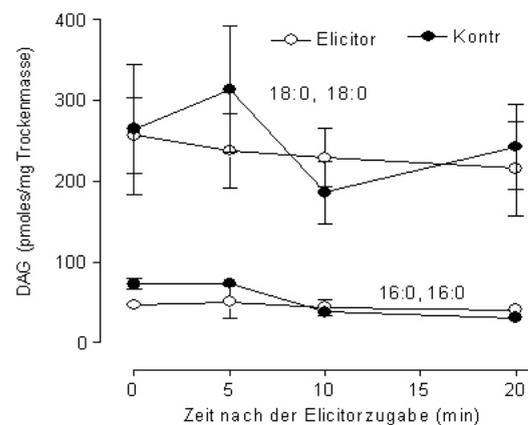


Abb.43. Quantifizierung der DAG-Menge in Zellen von *Eschscholzia californica* nach einer Elicitorbehandlung im Vergleich zu Kontrollzellen

### 3.3.6. Andere Phospholipaseaktivitäten in Plasmamembranvesikeln

Aus den fluoreszenzmarkierten Phospholipiden BPC und BEPC entstanden nach der Inkubation mit Plasmamembranvesikeln nicht nur die typischen Hydrolyseprodukte  $PLA_2$ , sondern auch weitere fluoreszierende Produkte, die an Hand von Standardsubstanzen auf der DC identifiziert wurden. Sie weisen sehr wahrscheinlich auf die Aktivität weiterer Phospholipasen in der Plasmamembranfraktion hin. Die prominenteste dieser Banden erwies sich als BODIPY-Diacylglycerol (BP-DAG). Die Bildung von DAG war  $Ca^{2+}$ -abhängig im Gegensatz zur Bildung von LPC, des Hydrolyseproduktes der  $PLA_2$ . In Anwesenheit von  $1 \mu M$   $Ca^{2+}$ -Ionen wurde eine fünffache Erhöhung der DAG-Menge, bei der  $Ca^{2+}$ -Konzentration von  $100 \mu M$  eine 12-fache und bei der  $Ca^{2+}$ -Konzentration von  $1 mM$  eine 8.5 fache Erhöhung der DAG-Menge gemessen. (s.Abb.44). Bei der massenspektrometrischen Untersuchung der genuinen Phospholipide und Lysolipide wurde bereits daraufhingewiesen, dass Diacylglycerole in relativ hoher Konzentration in den Zellen vorkommen, was im Hinblick auf ihre Funktion als Intermediat der Biosynthese verschiedener Lipide erklärbar ist. Der Nachweis von BODIPY-markierten DAG und seine Bildung aus BPC und BEPC läßt aber vermuten, dass DAG auch aus vorhandenen Phospholipiden gebildet werden kann. Die Bildung von DAG aus den künstlichen Substraten ist durch zwei verschiedene Phospholipasen denkbar:

-durch Phospholipase C (Abspaltung von Phosphocholin) oder

-durch Phospholipase D (Abspaltung des Cholins, Bildung von Phosphatidsäure, letztere müßte durch eine Phosphatase hydrolysiert werden, für die in anderen Pflanzen bereits Hinweise existieren u.a. Munnick, 2001) Die bisherigen Untersuchungen zum Nachweis von

Phospholipase C in Pflanzen haben ausschließlich Enzymaktivitäten gefunden, welche Phosphatidylinositol (4,5) als Substrat akzeptieren und zur Bildung von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und von DAG Anlaß geben. Damit wäre eine Beteiligung dieses Enzyms an der von uns gefundenen Bildung des BODIPY-markierten DAGs nicht möglich. Unsere Untersuchungen haben tatsächlich Hinweise für die Aktivität einer PLD erbracht.

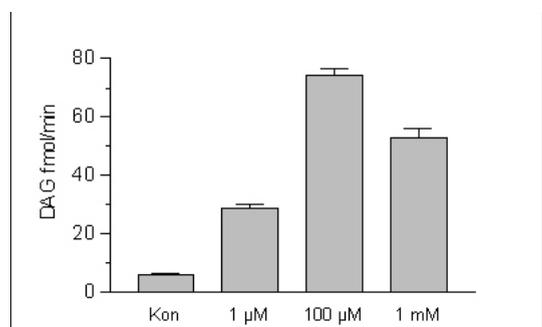


Abb.44 Einfluß von  $Ca^{2+}$ -Ionen auf die Bildung von DAG durch PM-Vesikel. Dargestellt ist die Freisetzung von BE-DAG aus dem Substrat BEPC. Die Daten stellen Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

Die Bildung von Phosphatidsäure, dem typischen Hydrolyseprodukt, konnte allerdings erst nach dem Zusatz von EtOH (1%) auf dem DC nachgewiesen werden, und zwar sowohl in PM-Vesikeln (Abb.45) als auch in Zellsuspensionen. Dieses Enzym hat die besondere Eigenschaft, bei der Hydrolyse der Phosphatesterbindung statt H<sub>2</sub>O auch kurzkettige Alkohole zu akzeptieren, so dass als Hydrolyseprodukt Ester der Phosphatidsäure (Ethyl-, Butyl-) entstehen (Munnik et al., 1998; Munnik, 2001). In unseren Experimenten konnte die Bildung des Ethylesters der Phosphatidsäure nicht detektiert werden. Der Vergleich mit den zitierten Arbeiten aus dem Labor Munnik spricht dafür, dass die von uns zur Messung eingesetzte Ethanol-

Konzentration zu niedrig war: bei der Messung der PLD-Aktivität in *Chlamydomonas eugametos* wurde bis zu einer Konzentration 0.75% Butanol ebenfalls nur die Bildung von Phosphatidsäure gemessen und erst bei höheren Konzentration von Butanol (0.75-2%) konnte die Bildung des Butylesters der Phosphatidsäure festgestellt werden (Munnik et al., 1995). Dies bekräftigt unseren Hinweis auf die Existenz von einer PLD in der Plasmamembran von *Eschscholzia californica*. Dieser Befund erlaubt auch eine Aussage zur Beteiligung von PLC oder PLD an der Bildung von DAG. Die Bildung dieser Verbindung erfolgt bereits ohne EtOH-Zusatz, so dass eine Beteiligung der PLD, also eine zwischenzeitliche Bildung von Phosphatidsäure, unwahrscheinlich ist. Diese

Daten sprechen also eher für eine Phospholipase C, welche entgegen den bisher publizierten Befunden, Phosphatidylcholine wie BPC oder BEPC, umsetzen kann. Weiterhin wurde die Wirkung des Elicitors (2 µg/ml) auf die DAG-Bildung aus BEPC gemessen (s.Abb. 46). Die

Ergebnisse zeigen, dass der Elicitor keinen Einfluß auf die Bildung von BE-DAG hat, somit auch keinen Einfluß auf die PLC-Aktivität.

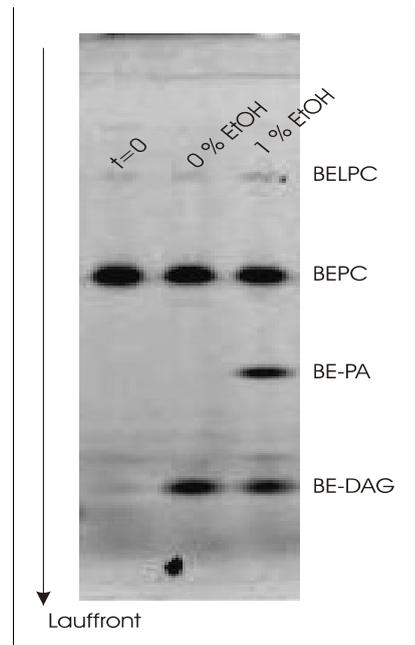


Abb. 45. Bildung von BE-PA aus BEPC durch PM-Vesikel nach Zugabe von 1% EtOH. (PA-Ethylester ist zwischen PA und DAG zu erwarten)

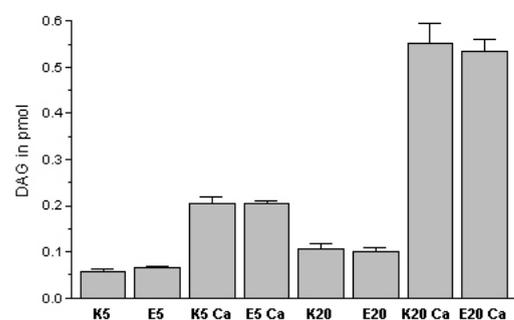


Abb.46. Elicitoreffekt auf die BE-DAG Bildung durch PM-Vesikel. (K=Kontrolle, E=Elicitorbehandelt) Die Zahlen geben die Inkubationszeiten in Minuten an. Die Daten stellen Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der Arbeit bestand in der Charakterisierung der Aktivität und der Lokalisation von Phospholipase A<sub>2</sub> in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* sowie ihrer potentiellen Beteiligung an der Induktion der Phytoalexin-Biosynthese.

1. Nach Zellaufschluß wurden mit Hilfe des Dextran/PEG-Zweiphasensystems Vesikelpräparationen mit einem hohen Anteil (ca. 85 %) an Plasmamembran erhalten. In diesen Plasmamembran-Vesikeln wurde mit den fluoreszenzmarkierten Phospholipase- Substraten BPC (ein doppelt BODIPY- substituiertes Phospholipid) und BEPC (ein einfach BODIPY- substituiertes Ether-Phospholipid) die Aktivität von PLA<sub>2</sub> nachgewiesen. Dies erfolgte hauptsächlich durch die Extraktion und Identifizierung der Hydrolyseprodukte nach DC-Trennung. Die Messung der Fluoreszenzintensität der BODIPY-markierten Lysophosphatidylcholine (BELPC bzw. BLPC) auf der DC-Platte erlaubte eine empfindliche Quantifizierung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität. Im Falle des an beiden Fettsäuren substituierten Substrats BPC kann auch der Fluoreszenzanstieg infolge der Aufhebung des Nachbarschafts-Quench zur Aktivitätsmessung benutzt werden, allerdings nur bei Abwesenheit störender Detergentien, welche wahrscheinlich die Substratstruktur in der Vesikelsuspension beeinflussen.

2. MALDI-TOF-MS wurde erstmals zur Identifizierung und Quantifizierung genuiner Phospholipide und Lysophospholipide in pflanzlichen Extrakten eingesetzt. In den Plasmamembranen sind vorwiegend die Lysophosphatidylcholine (LPC) 18:2, 18:1 und 16:0 nachweisbar. In Ganzzellen ist LPC 18:1 das dominierende Lysophospholipid.

3. Die Aktivität der PLA<sub>2</sub> in der Plasmamembran ist unabhängig von Ca<sup>2+</sup>. Sie wird durch die aus tierischen Zellen bekannten Inhibitoren wie Aristolochiasäure und ETYA gehemmt. Die Aktivität des Enzyms in Plasmamembranvesikeln ist durch Glutathion stimulierbar, was auf eine Redoxkontrolle seiner Aktivität hinweist.

4. Während in der Vesikelsuspension sowohl das fluoreszenzmarkierte Phospholipid als auch das Ether-Phospholipid zu Lysophospholipiden umgesetzt wurde, konnte in Zellsuspensionen nur mit dem Ether-Substrat eine Substratspaltung durch PLA<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist sehr wahrscheinlich die rasche Metabolisierung (vermutlich Reacylierung) des gebildeten LPC-Derivats. Letzteres konnte mit BODIPY-markiertem LPC in Zellsuspensionen nachgewiesen werden. Die PLA<sub>2</sub> Aktivität der Zellsuspension zeigte eine starke Abhängigkeit vom Kulturalter. BODIPY-markiertes LPC wird von den Zellen, nicht aber von PM-Vesikeln,

rasch metabolisiert, wobei ein Produkt entsteht, welches mit dem BODIPY-Phospholipid R<sub>f</sub>-gleich ist, d.h. es wird recycelt.

5. Nach Kontakt mit einem Elicitorpräparat (Glykoproteinmischung aus Hefe, ca. 20-40 kD) wurde in Plasmamembranvesikeln ein starker Anstieg des PLA<sub>2</sub>-Hydrolyseprodukts LPC nachgewiesen. Dies gelang sowohl mit dem BODIPY-markiertem Substrat BEPC, als auch bei der Detektion der genuinen Lysophospholipide, welche mit MALDI-TOF-MS bestimmt wurden. Den stärksten elicitor-ausgelösten Anstieg zeigte LPC 18:2.

6. In den Zellen verursacht der Kontakt mit dem Hefe-Elicitor einen (im Unterschied zu den Plasmamembran-Vesikeln) transienten Anstieg von LPC mit einem Maximum bei 1-2 min nach Elicitorkontakt. Dies gilt sowohl für das künstliche Ether-Substrat als auch für das genuine Moleküle LPC 18:2. Dies deutet auf ein Gleichgewicht zwischen LPC-Produktion durch die PLA<sub>2</sub> und der nachfolgenden Metabolisierung von LPC hin. Der transiente Peak von LPC nach Elicitorkontakt steht in guter Übereinstimmung mit der in unserer Arbeitsgruppe gefundenen Rolle von LPC als Signalmolekül für die Auslösung eines pH-Shifts im Rahmen des Signaltransfers zur Alkaloidbiosynthese (Roos et al., 1999; Viehweger et al., 2002).

7. Unter den solubilisierten Proteinen der Plasmamembran lassen sich G-Proteine (sowohl G<sub>α</sub> als auch G<sub>β</sub>) immunologisch nachweisen (Roos et al. 1999). Die für diesen Nachweis benutzten Antikörper bewirkten bei der Inkubation mit isolierten Plasmamembranen eine Aktivierung der PLA<sub>2</sub>. Dies ist ein Hinweis auf eine räumliche Nachbarschaft von PLA<sub>2</sub> und einem heterotrimeren G-Protein und impliziert eine G-Protein-abhängige Regulation dieser Phospholipase. Hierfür spricht auch ihre Aktivierung durch Mastoparan.

8. Neben der Aktivität von PLA<sub>2</sub> konnte mit den o.g. fluoreszenzmarkierten Substraten auch die Aktivität von PLC und PLD (sowohl in PM-Vesikeln als auch in Zellen) gezeigt werden. Bei der PLC-Aktivität handelt es sich offenbar um eine in Pflanzen selten nachgewiesene, Phosphatidylcholin-spaltende Aktivität. Sie wird offenbar nicht wie PLA<sub>2</sub> durch Elicitorkontakt stimuliert.

## 5. Literaturverzeichnis

- Alberts B.** Bray D. Lewis J. Raff M. Roberts K. Watson JD. (1995). Molekularbiologie der Zelle: Signalübertragung durch G-Protein-gekoppelte Zelloberflächen-Rezeptoren. *VCH Verl.* 869-896
- Alfano JR.** Collmer A. (1996). Bacterial pathogens in plants - life up against the wall. *Plant Cell* 8: 1683-1698
- Amano M.** Toyoda K. Ichinose Y. Yamada T. Shiraishi T. (1997). Association between ion fluxes and defense responses in pea and cowpea tissues. *Plant and Cell Physiol.* 38: 698-706
- Andre B.** Scherer GFE. (1991). Stimulation by auxin of phospholipase A in membrane vesicles from an auxin-sensitive tissue is mediated by an auxin receptor. *Planta* 185: 209-214
- Apostel I.** Heinsteins PF. Low PS. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 109-116
- Arz MC.** Grambow H J. (1994). Polyphosphoinositide phospholipase C and evidence for inositol-phosphate-hydrolysing activities in the plasma-membrane fraction from light-grown wheat (*Triticum aestivum L.*) leaves. *Planta* 195: 57-62
- Askerlund P.** Laurent P. Nakagawa H. Kader JC. (1991). NADH-Ferricyanide reductase of leaf plasma membranes. *Plant Physiol.* 95: 6-13
- Askerlund P.** Larsson C. (1991). Transmembrane electron transport in plasma membrane vesicles loaded with an NADH-generating system or ascorbate. *Plant Physiol.* 96: 1178-1184
- Bach M.** Schnitzler JP. Seitz HU. (1993). Elicitor induced changes in Ca<sup>2+</sup> influx, K<sup>+</sup> influx, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *Daucus carota L.* *Plant Physiol.* 103: 407-412
- Bafor M.** Smith MA. Jonsson L. Stobart K. Stymne S. (1991). Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochem J.* 280: 507-514.
- Baker CJ.** Orlandi EW. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321
- Balsinde J.** Barbour SE. Bionco ID. Dennis EA. (1994). Arachidonic acid mobilization in P388D<sub>1</sub> macrophages is controlled by two distinct Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 11060-11064
- Balsinde J.** Bionco ID. Ackermann EJ. Conde-Frieboes K. Dennis EA. (1995). Inhibition of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D<sub>1</sub> macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8527-8531
- Balsinde J.** Dennis EA. (1997) Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 272: 16069-16072
- Benard S.** Arnhold J. Lehnert M. Schiller J. Arnold K. (1999). Experiments towards quantification of saturated and polyunsaturated diacylglycerols by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chem. Phys. Lipids* 100: 115-125

- Benhamou N.** (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 1: 233-240
- Berczi A.** Brightman AO. (1994). NADH-ferricyanide oxidoreductase is present on both sides of plant plasma membrane. *Plant Science* 97: 47-52
- Bilushi SV.** Shebunin AG. Babakov AV. (1991). Purification and subunit composition of GTP-binding protein from maize root plasma membranes. *FEBS. Lett.* 291: 219-221
- Bischoff F.** Molendijk A. Rajendrakumar CSV. Palme K. (1999). GTP binding proteins in plants. *Cell. & Mol. Life Scien.* 55: 233-256
- Blechert S.** Wilhelm B. Hoelder S. Kammerer L. Kutchan T. Mueller M. Martin J. Zhi-Qiang Xia . Zenk MH. (1995). The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4099-4105
- Bligh EG.** Dyer WJ. (1959). A Rapid Method of total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. of Biochem. and Physiol.* 37: 909-917
- Blum W.** Hinsch KD. Schulz G. Weiler EW. (1988). Identification of GTP-binding Proteins in the plasma membrane of higher plants. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* Vol 156: 954-959
- Boller T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* 46: 189-214
- Bolwell GP.** Buti VS. Davies DR. Zimmerlin A. (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23: 517-532
- Bolwell G P.** Wojtaszek P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence a broad perspective. *Physiol. & Mol. Plant Pathol.* 51: 347-366
- Böttger M.** Lüthje S. (1989). Hexabromoiridate IV as electron acceptor: comparison with hexachloroiridate IV and hexacyanoferrate III. *Biochem. Biophys. Acta* 977: 335-340
- Böttger M.** Barr R. Döring O. Crane FL. Brightman A. Morre DJ. (1992). The effect of calcium and calmodulin inhibitors on NADH oxidation by isolated plasma membrane vesicles preloaded with NADH. *Plant Science* 87: 39-44
- Bradford M.** (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:255-260
- Briskin DP.** Leonard RT. Hodges TK. (1987). Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods in Enzymology* 148: 542-558
- Burgos PA.** Donaire JP. (1996). Phospholipids, free sterols, fluidity, and ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles from sunflower and jojoba roots. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 315-324
- Butikofer P.** Brodbeck U. (1993). Partial purification and characterization of a (glycosyl) inositol phospholipid-specific phospholipase C from peanut. *J. Biol. Chem.* 268: 17794-17802
- Causier BE.** Millner PA. (1996). G protein regulated phospholipase D another piece in the plant cell signalling jigsaw. *Trends in Plant Science* 1: 168-170

- Chandra S.** Heinsteins PF. (1996). Low PS. Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* 110: 979-986
- Chapman KD.** Tripathy S. Venables B. Desouza AD. (1998). N-Acylethanolamines -formation and molecular composition of a new class of plant lipids. *Plant Physiol.* 116: 1163-1168
- Chapman KD.** (2000). Emerging physiological roles for N-acylphosphatidylethanolamine metabolism in plants: signal transduction and membrane protection. *Chem. Phys. Lipids* 108: 221-229
- Cocucci M C.** (1986). Inhibition of plasma membrane and tonoplast ATPases by erythrosin B  
*Plant Science* 47: 21-27
- Coleman J.** Randall R. Blake-Kalff M. (1997). Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vakuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant, Cell, Envir.* 20: 449-460
- Conconi A.** Miquel M. John B. Ryan A. (1996). Clarence A Intracellular levels of free linolenic and linolenic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111: 797-803
- Dennis EA.** (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A-2. *J. Biol. Chem.* 269: 13057-13060
- Döring O.** Lühje S. (1996). Molecular components and biochemistry of electron transport in plant plasma membranes. *Mol. Memb. Biol.* 13: 127-142
- Dwyer SC.** Legendre L. Low PS. Leto TL. (1996). Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1289: 231-7
- Ebel J.** Mithöfer A. (1998). Early events in the elicitation of plant defense. *Planta* 206: 335-348
- Facchini JP.** (2001). Alkaloid Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation and Metabolic Engineering, Applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* 52: 29-66
- Feijo JA.** Sainhas J. Hackett GR. Kunkel JG. Hepler PK. (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J. Cell Biol.* 144: 483-496
- Fernandez-Checa JC.** Kaplowitz N. (1990). The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal. Biochem.* 190: 212-219
- Gallagher SR.** Leonard RT. (1982). Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* 70: 1335-1340
- Giannini JL.** Gildehsoph LH. Briskin DP. (1987). Selective production of sealed plasma membrane vesicles from red beet ( *Beta Vulgaris* L.) storage tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 254: 621-630
- Gomes E.** Venema K. Simonplais F. Milat ML. Palmgren MG. Blein JP. (1996). Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase - is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme. *FEBS Lett.* 398: 48-52

- Hagendoorn MJM.** Poortinga AM. Wong FS. Plas LHW. van der Walraven HS. (1991). Effect of elicitors on the plasmamembrane of *Petunia hybrida* cell suspensions. Role of delta pH in signal transduction. *Plant Physiol.* 96: 1261-1267
- Hahn MG.** (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 387-412
- Hammerschmidt R.** (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 285-306
- Harborne JB.** (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst. & Ecol.* 27: 335-367
- He DY.** Yazaki Y. Nishizawa Y. Takai R. Yamada K. Sakano K. Shibuya N. Minami E. (1998). Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1167-1174
- Heath MC.** (1998). Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 117-124
- Hendrickson HS.** (1994). Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. *Anal Biochem.* 219: 1-8
- Hirabayashi T.** Shimizu T. (2000). Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 124-138
- Hirajama T.** Ohto C. Mizoguchi T. Shinozaki K. (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3903-3907
- Hirajama T.** Mitsukawa N. Shibata D. Shinozaki K. (1997). At PLC2, a gene encoding phosphoinositide-specific Phospholipase C, is constitutively expressed in vegetative and floral tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 34:175-180
- Hirt H.** (1997). Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* 2: 11-15
- Hollstein P.** (2001). Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität und ihre Beziehung zum Glutathion-Gehalt in Einzelzellen von *Eschscholzia californica*. Diplomarbeit, FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
- Huang CH.** Tate B. Crain RC. Cote GG. (1995). Multiple phosphoinositide-specific phospholipases C in oat roots-characterization and partial. *Plant J.* 8: 257-267
- Humphrey TV.** Botella JR. (2001). Re-evaluation of the cytokinin receptor role of the *Arabidopsis* gene GCR1. *J. Plant Physiol.* 158: 645-653
- Imbusch R.** Mueller MJ. (2000). Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducible Dinor Isoprostanes F<sub>1</sub> (Phytprostanes F<sub>1</sub>) in Plants. *Plant Physiol.* 124: 1293-1303

- Jabs T.** Tschöpe M. Colling C. Hahlbrock K. Scheel D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub>- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:4800-4805
- Jakobek J.** Lindgren P B. (1993). Generalized induction of defense responses in beans not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *Plant Cell* 5: 49-56
- Johansson F.** Olbe M. Sommarin M. Larsson C. (1995). Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J.* 7: 165-173
- Jung KM.** Kim DK. (2000). Purification and characterization of a membrane-associated 48-kilodalton phospholipase A<sub>2</sub> in leaves of broad bean. *Plant Physiol.* 123: 1057-1067
- Kamada Y.** Muto S. (1994). Stimulation by fungal elicitor of inositol phospholipid turnover in tobacco suspension culture cells. *Plant & Cell Physiol.* 35: 397-404
- Kim DK.** Lee HJ. Lee YS. (1994). Detektion of two Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activities in leaves of higher plant *Vicia faba* and comparison with mammalian PLA<sub>2</sub>-s. *FEBS Lett.* 343: 213-218
- Kopka J.** Pical C. Gray JE. Müller-Röber B. (1998). Molecular and enzymatic Characterization of three Phosphoinositide-specific Phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol.* 116: 239-250
- Kuc J.** (1995). Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 275-297
- Kuc J.** (1997). Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiol. Plant.* 19: 551-559
- Kuchitsu K.** Yazaki Y. Sakano K. Shibuya N. (1997). Transient cytoplasmic pH-change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by n-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant & Cell Physiol.* 38: 1012-1018
- Kurosaki F.** Tsurusawa Y. Nishi A. (1987). Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Plant Physiol.* 85: 601-604
- Kuzniak E.** Urbanek H. (2000). The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plant.* 22: 195-203
- Lamb C.** Dixon RA. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* 48: 251-275
- Lapous D.** Mathieu Y. Guern J. Lauriere C. (1998). Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspensions. *Planta* 205: 452-458
- Larsson C.** Widell S. Sommarin M. (1988). Inside-out plant plasma membrane vesicles of purity obtained by aqueous two-phase partitioning. *FEBS Lett.* 229: 289-292
- Larsson C.** Widell S. Sommarin M. Widell S. (1994). Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods in Enzymology.* 228: 451- 469

- Larsson C.** Widell S. Kjellbom P. (1987). Preparation of High-Purity Plasma Membranes. *Methods in Enzymology* 148: 558-568
- Legendre L.** Heinsteint PF. Low PS. (1992). Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* 267: 20140-20147
- Legendre L.** Yueh YG. Crain R. Haddock N. Heinsteint PF. Low PS. (1993). Phospholipase C Activation during Elicitation of the Oxidative Burst in Cultured Plant Cells. *J. Biol. Chem.* 268: 24559-24563
- Lein W.** Saalbach G. (2001). Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* 1530: 172-183
- Li WX.** Kodama O. Akatsuka T. (1991). Role of oxygenated fatty acids in rice phytoalexin production. *Agricultural & Biol. Chem.* 55: 1041-1048
- Ligterink W.** Kroj T. Zurnieden U. Hirt H. Scheel D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP-Kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276: 2054-2057
- Lundborg T.** Widell S. Larsson C. (1981). Distribution of ATPases in wheat root membranes separated by phase partition. *Plant Physiol.* 52: 89-95
- Luo H.** Morsomme P. Boutry M. (1999). The two major types of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases show different enzymatic properties and confer differential pH sensitivity of yeast growth. *Plant Physiol.* 119: 627-634
- Martiny-Baron G.** Scherer GFE. (1989) Phospholipid stimulated Protein Kinase in plants. *J. Biol. Chem.* 264: 18052-18059
- Mason MG.** Botella JR. (2000). Completing the heterotrimer: Isolation and characterization of an Arabidopsis thaliana G protein gamma-subunit cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 14784-14788
- Mathieu Y.** Lapous D. Thomine S. Lauriere C. Guern J. (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* 199: 416-424
- McHowat J.** Kell PJ. O'Neil BO. Creer MH. (2001). Endothelial Cell PAF Synthesis following Thrombin Stimulation Utilizes Ca<sup>2+</sup>-Independent Phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem.* 40: 14921 -14931
- Meijer HJ.** Arisz SA. Van Himbergen JA. Musgrave A. Munnik T. (2001). Hyperosmotic stress rapidly generates lyso-phosphatidic acid in Chlamydomonas. *Plant J.* 25:541-548
- Menendez A.** Larsson C. Ugalde U. (1995). Purification of Functionally Sealed Cytoplasmic Side-out Plasma Membrane Vesicles from Saccharomyces cerevisiae. *Anal. Biochem.* 230: 308-314
- Miege C.** Marechel E. (1999). 1,2-sn-Diacylglycerol in plant cells: Product, substrate and regulator. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 795-808
- Mizoguchi T.** Ichimura K. Shinozaki K. (1997). Environmental stress response in plants- the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Biotech.* 15: 15-19
- Morel JB.** Dangl JL. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death & Differentiation* 4: 671-683

- Müller M.** Schiller J. Petkovic M. Oehrl W. Heinze R. Wetzker R. Arnold K. Arnhold J. (2001). Limits for the detection of (poly-)phosphoinositides by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chem. Phys. Lipids* 110: 151-164
- Mueller MJ.** Brodschelm W. Spannagl E. Zenk MH. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci.* 90:7490-7494.
- Munnik T.** Arisz SA. Devrije T. Musgrave A. (1995). G-protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. *Plant Cell* 7: 2197-2210
- Munnik T.** Irvine RF. Musgrave A. (1998). Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1389: 222-272
- Munnik T.** (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science* 6: 227-233
- Murakami M.** Nakatani Y. Atsumi G. Inoue K. Kudo I. (1997). Regulatory functions of phospholipase A<sub>2</sub>. *Crit. Rev. in Immun.* 17: 225-283
- Nitzsche A.** (2001). Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung zellulärer Kontrollmechanismen der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität in *Eschscholzia californica*. Diplomarbeit, FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
- Noehringer C.** Scheel D. Blee E. (2000). Lipoxygenase isoforms in elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Biochem. Soc. Transact.* 28: 827-829
- Nürnberg T.** (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. & Mol. Life Sciences.* 55: 167-182
- Palmer JE.** Dikeman DA. Fujinuma T. Kim B. Jones JJ. Denda M. Martinez-Zapater JM. Cruz-Alvarez M. (2001). A Brassica oleracea gene expressed in a variety-specific manner may encode a novel plant transmembrane receptor. *Plant & Cell Physiol.* 42: 404-413
- Palmgren MG.** Sommarin M. (1989). Lysophosphatidylcholine Stimulates ATP Dependent Proton Accumulation in Isolated Oat Root Plasma Membrane Vesicles. *Plant Physiol.* 90: 1009-1014
- Palmgren MG.** (1990). An H<sup>+</sup>-ATPase Assay: Proton Pumping and ATPase Activity Determined Simultaneously in the Same Sample *Plant Physiol.* 94: 882-886
- Palmgren MG.** Sommarin M. Ulvskov P. Jorgensen PL (1988). Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free acids and phospholipase A<sub>2</sub>. *Physiol. Plantarum* 74: 11-19
- Pappan K.** Wang X. (1999). Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 1439: 151-166
- Parchmann S.** Gundlach H. Mueller MJ. (1997). Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* 115: 1057-1064
- Paul R.** Holk A. Scherer GFE. (1998). Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. rapid activation of phospholipase A<sub>2</sub> activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. *Plant J.* 16: 601-611

- Petkovic M.** Schiller J. Müller J. Müller M. Arnold K. Arnhold J. (2001). The Signal-to-noise ratio as the measure for the quantification of lysophospholipids by matrix-assisted laser desorption/ ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Analyst*. 126: 1042-1050
- Pfüller U.** (1986). Mizellen-Vesikel-Mikroemulsionen: Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie. *Springer-Verl. Berlin*
- Roberts MF.** (1996). Phospholipases structural and functional motifs for working at an interface. *FASEB J.* 10: 1159-1172
- Romeis T.** (2001). Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 407-414
- Romeis T.** Piedras P. Jones JDG. (2000). Resistenc gene-dependent activation of a calcium-dependent protein Kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12: 803-815
- Roos W.** Evers S. Hieke M. Tschöpe M. Schumann B. (1998). Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids phytoalexin biosynthesis in cultured cells of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiol.* 118: 349-364
- Roos W.** Dordschbal B. Steighardt J. Hieke M. Weiss D. Saalbach G. (1999). A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1448: 390-402
- Roy S.** Pounat ML. Caumont C. Cariven C. Prevost MC. Esquerretugaye MT. (1995). Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Science* 107: 17-25
- Rubinstein B.** (1993). Plasma membrane redox activity: Components and Role in Plant Processes. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 44: 131-155
- Ruy SB.** Wang X. (1998). Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 1393: 193-202
- Samuelsson B.** Dahlen SE. Lindgren JA. Rouzer CA. Serhan CN. (1987). Leukotrienes and lipoxins structures biosynthesis and biological effects. *Science* 237: 1171-1176
- Sandelius AS.** Morre DJ. (1990). Plasma Membrane Isolation. *The Plant Plasma Membrane* Springer Verl. 45-75
- Schwartz W.** (2001). Untersuchungen zur Rolle der Phospholipase A<sub>2</sub> und ihrer Katalyseprodukte im Signaltransfer in Einzelzellen von *Eschscholtzia californica*. Diplomarbeit, FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
- Scheel D.** (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 1: 305-310
- Scherer GFE.** Andre B. (1995). Activation of phospholipase A<sub>2</sub> by auxin and mastoparan in hypocotyl segments from zucchini and sunflower. *Plant Physiol.* 145: 483-490
- Scherer GFE.** Arnold B. (1997) Inhibitors of animal phospholipase A enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin induced signal transduction. *Planta* 462-469

- Scherer GFE.** (1996). Phospholipid signalling and lipid-derived second messengers in plants. *Plant Growth Regulation* 18: 125-133
- Scherer GFE.** Paul RU. Holk A. (2000). Phospholipase A(2) in auxin and elicitor signal transduction in cultured parsley cells (*Petroselinum crispum* L.). *Plant Growth Regulation*. 32: 123-128
- Schumacher HM.** Gundlach H. Fiedler F. Zenk MH (1987) Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Rep.* 6: 410-413
- Senda K.** Yoshioka H. Doke N. Kawakita K. (1996). A cytosolic phospholipase A(2) from potato tissues appears to be patatin. *Plant & Cell Physiol.* 37: 347-353
- Senda K.** Yoshioka H. Doke N. Kawakita K. (1998). Effect of Mastoparan on Phospholipase A<sub>2</sub> Activity in Potato Tubers Treated with Fungal Elicitor. *Plant & Cell Physiol.* 39: 1080-1086
- Serhan CN.** Haeggstrom JZ. Leslie CC. (1996). Lipid mediator networks in cell signaling - update and impact of cytokines. *FASEB J.*10: 1147-1158
- Serrano R.** (1990). Plasma Membrane ATPase. *The Plant Plasma Membrane*. Springer Verlag. 127-153
- Simons ER.** Meshulam T. Herscovitz H. Casavant D. Bernardo J. Roman R. Haugland RP. Strohmeier GS. Diamond RD. (1992). Flow cytometric kinetic measurements of neutrophil phospholipase A activation. *J. Biol. Chem.* 267: 21465-21470
- Shi J.** Gonzales RA. Bhattacharyya MK. (1995). Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant J.* 8: 381-390
- Six DA.** Dennis EA. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 1-19
- Shingles R.** McCarty RE. (1995). Production of Membrane Vesicles by Extrusion: Size Distribution, Enzyme Activity, and Orientation of Plasma Membrane and Chloroplast inner-Envelope Membrane Vesicles. *Anal. Biochem.* 229: 92-98
- Staeb MR.** Ebel J. (1987). Effects of Ca on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean. *Arch. Biochem. & Biophys.* 257: 416-423
- Stahl U.** Ek B. Stymne S. (1998). Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase a(2) from developing seeds of elm. *Plant Physiol.* 117: 197-205
- Stahl U.** Lee M. Sjodahl S. Archer D. Cellini F. Ek B. Iannacone R. MacKenzie D. Semeraro L. Tramontano E. Stymne S. (1999). Plant low-molecular-weight phospholipase A(2)s (PLA(2)s) are structurally related to the animal secretory PLA(2)s and are present as a family of isoforms in rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol. Biol.* 41: 481-490
- Stryer L.** (1994). Biochemie: Biologische Membranen. *Spektrum Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, Oxford*
- Sze H.** (1985). H<sup>+</sup>-Translocating ATPases: Advances Using Membrane Vesicles. *Ann.Rev.Plant.Physiol.* 36:175-208

- Tavernier E.** Pugin A. (1995). Phospholipase activities associated with the tonoplast from *Acer pseudoplatanus* cells: Identification of a phospholipase A-1 activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1233: 118-122
- Tjoelker LW.** Eberhardt C. Unger J. Trong HL. Zimmerman GA. McIntyre TM. Stafforini DM. Prescott SM. Gray PW. (1995). Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem.* 270: 25481-25487
- Touchstone JC.** Levin SS. Dobbins MF. und Beers PC. (1983). Analysis of saturated and unsaturated phospholipids in biological fluids. *J. Liq. Chromatogr.* 6: 179-192
- Toyoda K.** Shiraishi T. Yoshioka H. Yamada T. Ichinose Y. Oku H. (1992). Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant & Cell Physiol.* 33: 445-452
- Toyoda K.** Shiraishi T. Tamada T. Ichinose Y. Oku H. (1993). Rapid change in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant & Cell Physiol.* 35: 729-735
- Valster AH.** Hepler PK. Chernoff J. (2000). Plant GTPases: the Rhos in bloom. *Trends in Cell Biol.* 10: 141-146
- van der Luit AH.** Piatti T. van Doorn A. Musgrave A. Felix G. Boller T. Munnik T. (2000). Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123: 1507-1515
- van Himbergen JAJ.** ter Riet B. Meijer HJG. van den Ende H. Musgrave A. Munnik T. (1999). Mastoparan analogues stimulate phospholipase C- and phospholipase D-activity in *Chlamydomonas*: a comparative study. *J. Exper. Botany* 50: 1735-1742
- Narvaez-Vasquez J.** Florin-Christensen J. and Ryan CA. (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* 11: 2249-2260
- Vera-Estrella R.** Higgins VJ. Blumwald E. (1994). Plant defense response to fungal pathogens. *Plant Physiol.* 106: 97-102
- Viehweger K.** Dordschbal B. Roos W. (2002). Elicitor-Activated Phospholipase A<sub>2</sub> Generates Lysophosphatidylcholines That Mobilize the Vacuolar H<sup>+</sup> Pool for pH Signaling via the Activation of Na<sup>+</sup>-Dependent Proton Fluxes. *Plant Cell* 14: 1509-1525.
- Wakelam MJO.** (1998). Diacylglycerol-when is it an intracellular messenger?. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 117-126
- Wang X.** (2001). Plant Phospholipases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 211-231
- Wasternack C.** Parthier B. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2: 302-307
- Weaver J.** Electroporation Theory. *Methods in Molecular Biol.* 55: 3-28
- Widell S.** Larsson C. (1990). A Critical Evaluation of Markers Used in Plasma Membrane Purification. *The Plant Plasma Membrane.* Springer Verl. 17-43

- White IR.** Wise A. Millner PA. (1993). Evidence for G-Protein-linked receptors in higher plants: stimulation of GTP-gamma-S binding to membrane fractions by the mastoparan analogue mas 7. *Planta* 191: 285-288
- Wojtaszek P.** (1997). Oxidative burst - an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692
- Xing Ti.** Higgins VJ. Blumwald E. (1997). Identification of G Proteins mediating fungal elicitor-induced dephosphorylation of host plasma H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Exper. Botany* 48: 229-237
- Yi HJ.** Park D. Lee Y. (1996). In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. *Physiol. Plant* 96: 359-368

## **Eidsstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eidesstatt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind solche kenntlich gemacht.

Halle/Saale, Dezember 2002

## Lebenslauf

Name: Batsuch Dordschbal  
Geburtsdatum: 16.Dezember 1969  
Geburtsort: Ulangom (Mongolei)  
Familienstand: ledig

Anschrift: 06114 Halle/S  
Eichendorffstrasse 20

## Bildungsweg

1987 Abitur an der Mittelschule in Ulangom  
1988-1989 Sprachausbildung in der Sektion Fremdsprachen an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1989-1994 Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1994 Hochschulabschluß mit Diplom

## Berufsweg

1994-1995 Wissenschaftliche Hilfskraft an Institut für Biotechnologie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität  
1995-2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie des Fachbereiches Pharmazie der Martin-Luther-Universität