

Funktion von Isoformen der Phospholipase C im
Laubmoos *Physcomitrella patens* bei der Wahrnehmung
abiotischer Umwelteinflüsse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Chantal Brüggemann
Berlin, Februar 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Romeis

Disputation am 17.04 2007

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Elmar Hartmann, bei dem ich mich für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung bedanken möchte.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Frau Prof. Dr. Tina Romeis dankbar.

Mein Dank gilt Koji Mikami für die Zusammenarbeit und die Möglichkeit des Forschungsaufenthalts am NIBB in Okazaki, Japan. Allgemein möchte ich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Mitsuyasu Hasebe, besonders Tomomichi Fujita für die Unterstützung und Beratung bei der Arbeit am NIBB danken.

Ich bedanke mich bei Dr. B. Wiesner für die Bereitstellung des Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops und bei seinen Mitarbeitern für die geduldige und bereitwillige Zusammenarbeit.

Ich danke Alexander Repp für die Unterstützung in der ersten Zeit sowie die Vorarbeiten, die zu dieser Arbeit geführt haben.

Vivien Frenck, Michaela Hau, Sabrina Klare und Denise Rußmann danke ich für ihren Beitrag zu dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der AG Hartmann und AG Lamparter danke ich für die Hilfe und die angenehme Zeit. Insbesondere danke ich Doris Matzkuhn für die organisatorische Hilfe, Sabine Buchert für die technische Assistenz sowie Isabel Molina und Inga Oberpichler für das Interesse an dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Cornelia Görick für die Hilfe und Unterstützung bei dieser Arbeit, für die Fehlersuche und für den Spaß im Laboralltag.

Für die Freude, den Rückhalt und für alle fachfremden Gespräche danke ich allen Freunden, besonders Uwe Ness und Monika Petersson sowie meiner Familie. Ihr seid großartig.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Signaltransduktion in Pflanzen	9
1.2 Glycerophospholipide.....	11
1.3 Phospholipasen.....	15
1.3.1 PLA.....	15
1.3.2 PLD	16
1.3.3 PLC	17
1.4 Das Modellsystem <i>Physcomitrella patens</i>	21
1.5 Zielsetzung.....	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien, Biochemikalien und Geräte	25
2.1.1 Wasser	25
2.1.2 Ethanol	25
2.2 Organismen	26
2.2.1 Bakterienstämme.....	26
2.2.2 Hefestamm	26
2.2.3 Pflanzenmaterial.....	26
2.3 Herkunft der verwendeten Sequenzen.....	26
2.4 Moosanzucht.....	27
2.4.1 Medien.....	27
2.4.2 Kultivierung.....	28
2.5 Moostransformation	28
2.6 Fluoreszenz-Mikroskop	30
2.7 Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (CLM)	31
2.8 DNA-Isolierung/ Hitzeaufschluß	31
2.9 Isolierung von Gesamt-RNA	32
2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	33
2.11 Reinigung von DNA-Fragmenten	34
2.12 Agarose-Gelelektrophorese	35
2.13 Bestimmung der Bandenstärke in einem Agarosegel	35
2.14 Synthese von cDNA	35
2.15 Northern Blot.....	36
2.16 Sequenzanalysen.....	36
2.17 Herstellung von Vektoren.....	38
2.17.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden bei der Herstellung von Vektoren.....	38
2.17.2 Verwendete Plasmide.....	38
2.17.3 Die Herstellung von <i>knockout</i> Konstrukten.....	39
2.17.3.1 <i>Replacement</i> -Konstrukt für <i>plc3</i>	39
2.17.3.2 <i>Replacement</i> -Konstrukt für <i>plc4</i>	40
2.17.4 Die Herstellung von GFP-Konstrukten.....	40

2.17.5	Die Herstellung von Konstrukten für die Expression von PLC-Histidin Proteinen.....	43
2.18	Transformation von <i>E. coli</i>	44
2.18.1	Elektroporation	44
2.18.2	Hitzeschock-Transformation	45
2.19	Plasmidpräparation	45
2.19.1	Minipräparation.....	45
2.19.2	Maxipräparation.....	46
2.19.2.1	Material und Lösungen.....	46
2.19.2.2	Vorbereitung der Bakterien für die Plasmid-Großaufarbeitung....	46
2.19.2.3	Alkalische Lyse.....	47
2.19.2.4	Plasmidreinigung durch PEG	47
2.20	Sequenzierungen	48
2.21	Biochemische Methoden.....	48
2.21.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	48
2.21.2	Herstellung von zellfreien Extrakten	49
2.21.3	Ni-NTA-Affinitätschromatographie	49
2.21.4	Proteinbestimmung.....	49
2.21.5	Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.21.6	Western Blot.....	50
2.21.7	Bindung der Proteine an verschiedene Phospholipide	52
2.21.8	Herstellung polyklonaler Antikörper	52
2.22	Hefe-Zweihybrid System	53
2.22.1	Transformation von <i>cdc25</i> -Hefezellen	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Sequenzanalysen der <i>plc</i> -Gene in <i>Physcomitrella patens</i>	55
3.2	Herstellung von <i>knockout</i> -Konstrukten und Isolierung von <i>knockout</i> -Mutanten.....	58
3.2.1	Isolierung von <i>plc2 knockout</i> -Mutanten	58
3.2.2	Herstellung eines <i>plc3 knockout</i> -Konstruktes.....	59
3.2.3	Herstellung des <i>plc4 knockout</i> -Konstrukts.....	61
3.3	Charakterisierung der <i>plc2 knockout</i> -Mutante.....	63
3.3.1	Das Wachstum und die Entwicklung der Mutante im Vergleich zum WT	63
3.3.2	Behandlung mit Phytohormonen	64
3.3.2.1	Das Wachstum unter Einfluss von Auxin (IAA) oder Cytokinin (BAP).....	65
3.3.2.2	Behandlung des WT und der Mutante mit Abscisinsäure (ABA) .	66
3.3.3	Das Wachstum unter osmotischem Stress (Salz und Mannitol).....	67
3.4	Die Expression von <i>plc2</i> und <i>plc3</i> unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.....	68
3.4.1	Die Expression bei Wachstum auf Standardmedium	68
3.4.2	Die Expression von <i>plc2</i> und <i>plc3</i> nach Behandlung mit Phytohormonen	69
3.4.3	Die Expression nach Behandlung mit osmotisch wirksamen Substanzen.....	70
3.4.3.1	Die Expression von <i>plc2</i> und <i>plc3</i> bei Behandlung mit Salz	70
3.4.3.2	Die Expression von <i>plc2</i> und <i>plc3</i> bei Behandlung mit Mannitol .	71
3.5	Intrazelluläre Lokalisation von PLC2 und PLC3	71

3.5.1	Bioinformatische Studien zur Lokalisation von <i>plc2</i> und <i>plc3</i>	71
3.5.2	Lokalisationsuntersuchung mit GFP-Fusionsproteinen	73
3.5.2.1	Protoplastentransformation mit einem <i>plc2</i> -GFP-Fusionsplasmid.....	73
3.5.2.2	Protoplastentransformation mit <i>plc3</i> -GFP-Fusionsplasmiden.....	73
3.6	Biochemische Untersuchungen der PLC-Isoformen	76
3.6.1	Heterologe Expression und Reinigung von PLC2 , PLC3 und PLC4..	76
3.6.2	Untersuchung der Substratspezifität.....	77
3.7	Interaktionen der <i>Pp</i> PLCs mit <i>Pp</i> GCR1	78
4	Diskussion.....	79
4.1	Die Charakterisierung der PLC2 und PLC3 anhand von Sequenzvergleichen	79
4.2	Die Herstellung und Untersuchung von PLC- <i>knockout</i> Mutanten	82
4.2.1	Die Herstellung von <i>knockout</i> -Mutanten.....	82
4.2.2	Die Untersuchung der <i>plc2-knockout</i> Mutante.....	84
4.3	Die Expressionsänderung von PLC2 und PLC3	87
4.4	Die Lokalisation von PLC2 und PLC3 in der Zelle.....	88
4.5	Biochemische Charakterisierung der PLC-Isoformen	90
4.6	Die Beteiligung der PLC-Isoformen von <i>Physcomitrella patens</i> an verschiedenen Signalwegen	93
4.7	Ausblick.....	94
5	Zusammenfassung/Summary	95
6	Literatur	98
	Curriculum Vitae.....	112
Anhang	I
I.	Primerliste.....	I
II.	Messdaten für die Expression der PLC-Isoformen	III
III.	Aminosäuresequenzen von PLC3 und PLC4.....	IV
	PLC3-Sequenz.....	IV
	PLC4-Sequenz.....	V
IV.	DNA-Sequenzen.....	VI
	<i>plc2</i> -DNA-Teilsequenz	VI
	<i>plc3</i> DNA-Sequenz.....	VII
	<i>plc4</i> DNA-Sequenz.....	X

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	N ⁶ -Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	centi 10 ⁻¹
ca.	circa
cDNA	<i>copy</i> DNA, durch Reverse Transkription aus RNA entstandene komplementäre DNA
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGPP	Diacylglycerinpyrophosphat
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
<i>et al.</i>	und andere ([lat.]: et alii)
F	Farad
FA	Fettsäure
FG	Frischgewicht
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G418	Antibiotikum G418
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GL	Galaktolipid
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hyg	Antibiotikum Hygromycin B
IAA	Indol-3-Essigsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP ₆	Inositol Hexaphosphat
IPTG	Isopropyl-Thiogalactopyranosid
k	Kilo 10 ³
kb	Kilobase(n)
ko	<i>knockout</i>
L	Liter
μ	Mikro 10 ⁻⁶
LB	Luria Bertani (Medium)
M	Molar (mol·L ⁻¹)
M	Mega 10 ⁶
m	Meter
m	Milli 10 ⁻³
MG	Molekulargewicht

min	Minute
mol	Mol
n	Nano 10^{-9}
OD	optische Dichte
p	Pico 10^{-12}
Pa	Pascal
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung (<i>Photosynthetic Active Radiation</i> , 400–700 nm)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI	Phosphatidylinositol
PI(3/4/5)P	Phosphatidylinositol 3, 4 oder 5-Phosphat
PI ₃ ,5P ₂	Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphat
PI ₄ ,5P ₂ oder PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PI ₃ ,4,5P ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat
PL	Phospholipid
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
plc	Gen für Phospholipase C
<i>plc1</i>	<i>Physcomitrella patens</i> Phospholipase C1 <i>knockout</i> -Mutante
<i>plc2</i>	<i>Physcomitrella patens</i> Phospholipase C2 <i>knockout</i> -Mutante
(<i>Pp</i>)PLC	<i>Physcomitrella patens</i> Phospholipase C
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR: Synthese von cDNA aus RNA, von der anschließend eine PCR zum Nachweis des Transkripts dient.
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
t_E	Elongationszeit
T_m	Annealingtemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
u.a.	unter anderem
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UTR	nicht translaterter Bereich (<i>untranslated region</i>)
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
WT(DC)	Wildtyp von <i>Physcomitrella patens</i>
z.B.	zum Beispiel