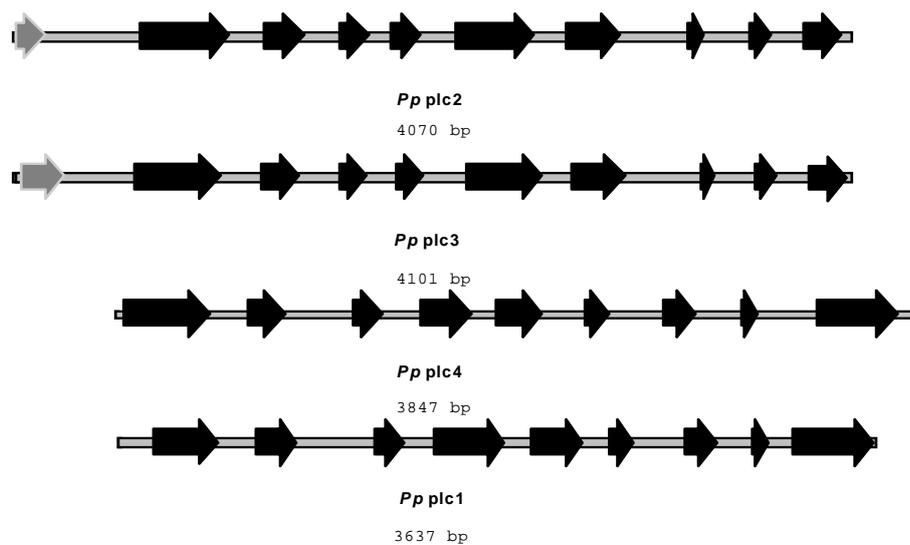


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Sequenzanalysen der plc-Gene in *Physcomitrella patens*

Die DNA-Sequenzen für plc2, plc3 und plc4 wurden im Verlauf der Arbeit ergänzt oder erstellt. Das Gen plc3 wurde am „National Institute for Basic Biology“ sequenziert. Alle nicht annotierten Sequenzen befinden sich im Anhang IV.

Die Sequenz des plc2-Gens wurde im 5'-Bereich stromaufwärts des Startkodons erweitert. Es wurde zwischen der nicht translatierten Region (UTR) und dem Startkodon eine Intronsequenz von etwa 460 bp identifiziert. Auch in dem Gen für PLC3 konnte eine 350 bp lange Intronsequenz zwischen UTR und Startkodon detektiert werden.

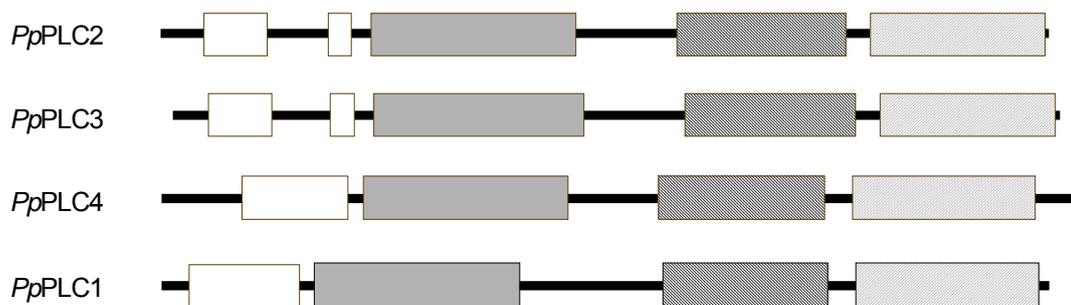


**Abb 3-1: Exon-Intron Organisation der plc-Gensequenzen in *Physcomitrella patens*.** Dabei markieren die schwarzen Pfeile die Exons der Sequenzen, die Striche die Introns. Die grauen Pfeile stehen für transkribierte Bereiche vor dem Translationsstart.

Es zeigt sich, dass die Exon-Intron-Organisation der Gene plc2 und plc3 ähnlich ist. Beide Gene bestehen aus neun Exons, die sich in ihrer Länge nur um wenige Basenpaare unterscheiden (Abb 3-1). Auffällig ist zudem das durch ein Intron abgetrennte Exon in der 5'-UTR-Region. Dieses Exon (im folgenden Exon 0 bezeichnet) überspannt eine Länge von 218 bp bei plc3 und 147 bp bei plc2. In der plc3-Sequenz beinhaltet dieses Exon einen zweiten möglichen Translations-

start im Leseraster. Im Gegensatz hierzu ist in der *plc2*-Sequenz kein zweiter möglicher Translationsstart kodiert. Eine Übersetzung der DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz ergibt in jedem der drei Leseraster mindestens ein Stoppkodon. Für einen Vergleich mit anderen bekannten pflanzlichen *plc*-Genen können die Sequenzen aus Datenbanken eingesehen werden. In keiner anderen der untersuchten pflanzlichen *plc*-Sequenzen lag ein Intron oder ein zweites Startkodon vor dem Translationsstart.

Ein Vergleich der übersetzten Aminosäuresequenzen der nun vorliegenden *plcs* aus *Physcomitrella patens* (*plc1-plc4*) zeigt eine Gruppierung in zwei unterschiedliche Typen, die den von Mikami *et al.* beschriebenen entsprechen (Mikami *et al.*, 2004) (Abb 3-2).



**Abb 3-2: Die Domänenorganisation der PLC-Isoformen in *Physcomitrella patens*.**

Die Lage EF-Hand-Domänen ist durch weiße Kästchen dargestellt, die katalytischen X- und Y-Domänen sind durch graue bzw. schwarz gestreifte Kästchen dargestellt, die C2-Domäne durch grau gestreifte Kästchen.

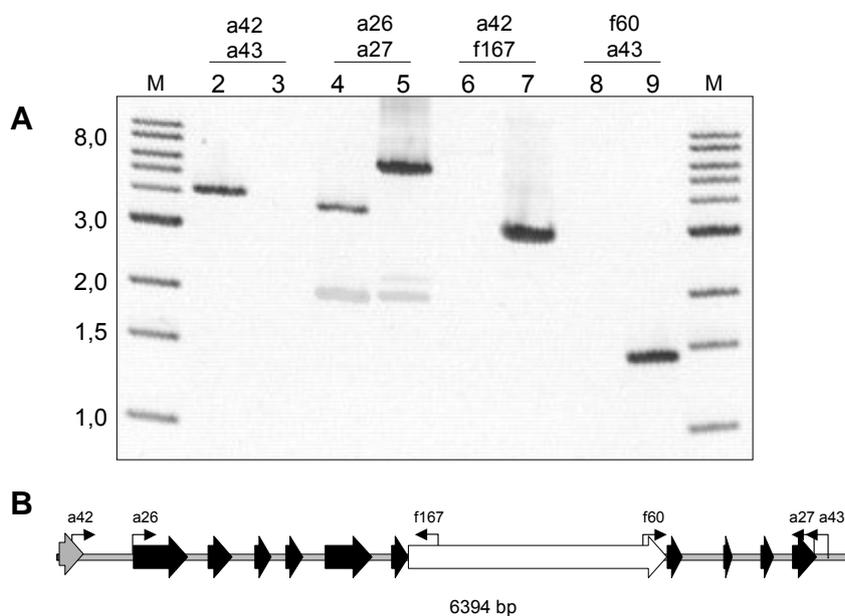
Es gibt zwei PLCs, in denen die beiden EF-Hand-Motive durch eine Zwischensequenz getrennt ist. Neben PLC2 trifft dieses auch für PLC3 von *Physcomitrella patens* zu. Mit Hilfe von BLAST-Recherchen wurden im Pflanzenreich keine weiteren *plc*-Sequenzen gefunden, bei denen dieses zutrifft. Die Sequenzen der EF-Hand-Motive zeigen mit oder ohne Zwischensequenz wenig Ähnlichkeit zu typischen EF-Hand-Motiven aus Pflanzen. In der PFAM-Datenbank wird ein E-Wert angegeben, welcher der Wahrscheinlichkeit für einen zufälligen Treffer entspricht. In der N-terminalen Sequenz von PLC3 wird ein E-Wert von 0,66 für eine EF-Hand-Domäne errechnet. Der N-Terminus von PLC2 wird mit einem E-Wert von 0,44 als eine mögliche EF-Hand-Domäne angegeben. Im Vergleich dazu liegt der E-Wert für die PLC1-Sequenz bei  $9,8 \cdot 10^{-7}$ .



## 3.2 Herstellung von *knockout*-Konstrukten und Isolierung von *knockout*-Mutanten

### 3.2.1 Isolierung von *plc2 knockout*-Mutanten

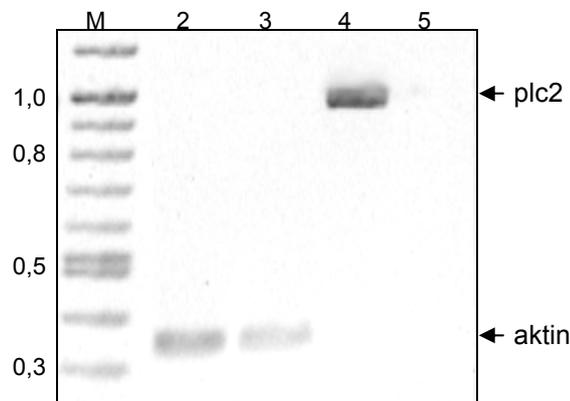
Die erste Isolierung potenzieller *plc2 knockout*-Linien erfolgte von A. Repp (Repp, 2004). Die DNA der potenziellen Mutanten wurde auf den zielgerichteten Einbau des Konstrukts im gewünschten Gen untersucht. Mittels PCR konnten entsprechende Amplifikate einer Linie hergestellt werden. Dabei hybridisierte je ein verwendeter Primer stromauf- oder -abwärts des verwendeten Konstrukts im chromosomalen Bereich der DNA (a42 im 5'-UTR bzw. a43 im 3'-UTR) oder innerhalb des Konstrukts (a26 am 5'-Ende und a27 am 3'-Ende). In Abb 3-3 sind Amplifikate vom 5'-UTR zur Resistenzgenkassette (Primer f167 am 5'-Ende und f60 am 3'-Ende der Resistenzgenkassette) und von dieser zum 3'-UTR von DNA der isolierten Linie (Abb 3-3; Spuren 7 und 9), jedoch nicht von DNA des Wildtyps (Abb 3-3; Spuren 6 und 8) sichtbar.



**Abb 3-3: Agarosegel (A) der PCR-Amplifikate von WT (Spur 2, 4, 6 und 8) und *plc2* (Spur 3, 5, 7, und 9).**

Schematische Darstellung der Primerbindestellen im Gen (B). Verwendete Primer sind über der Gel-Abbildung angegeben. M: Längenstandard (Zahlen in kbp)

Ein Amplifikat mit Primern stromauf- und –abwärts der Resistenzgenkassette kann im WT und in der Mutante synthetisiert werden. Hierbei ist das der Mutante um die Länge der Resistenzgenkassette größer (Abb 3-3; Spuren 4 und 5). Ein Amplifikat mit den beiden Primern des chromosomalen Bereichs kann mit der WT-DNA erstellt werden, eines in der Mutante kann nicht hergestellt werden (Abb 3-3; Spuren 2 und 3). Bei einer einmaligen Insertion des Konstruktes ist dieses bei 6,0 kbp zu erwarten, bei einem konkatemeren Einbau entsprechend größer. Ein Nachweis des *plc2*-Transkriptes ist mittels RT-PCR in der *knockout*-Mutante nicht möglich (Abb 3-4).



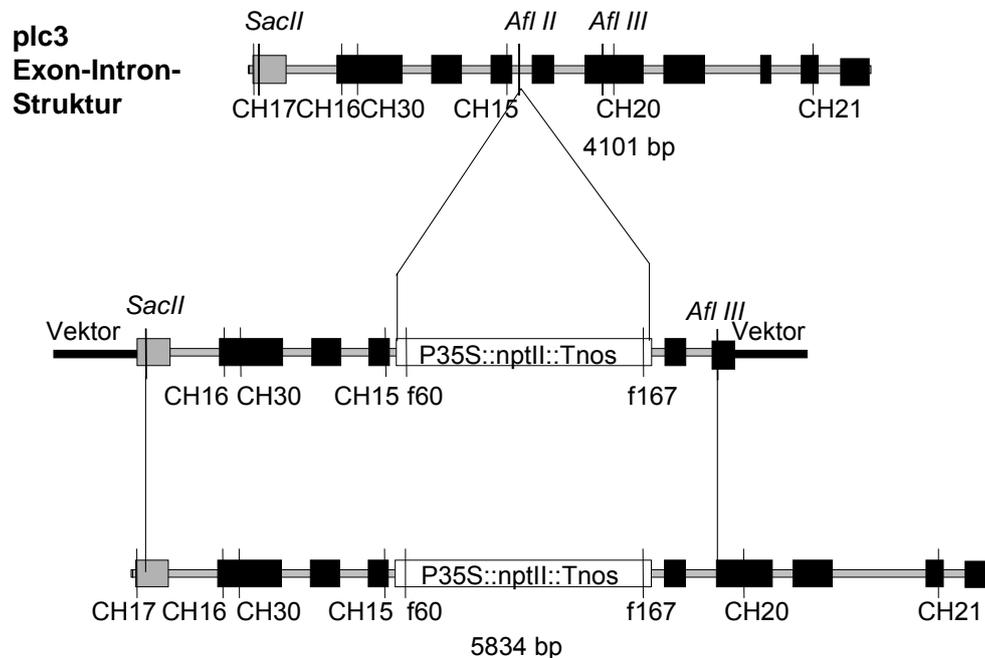
**Abb 3-4: Amplifikation der Transkripte von *plc2* und aktin.**

Amplifiziert wurde cDNA von WT (Spuren 2 und 4) und *plc2* (Spuren 3 und 5) mit Primern für das *plc2*-Transkript (Spuren 4 und 5; Primer CH14 und CH15) oder das aktin-Transkript als Kontrolle (Spuren 2 und 3; Primer a57, a63). M: Längenstandard (Zahlen in kbp).

### 3.2.2 Herstellung eines *plc3 knockout*-Konstruktes

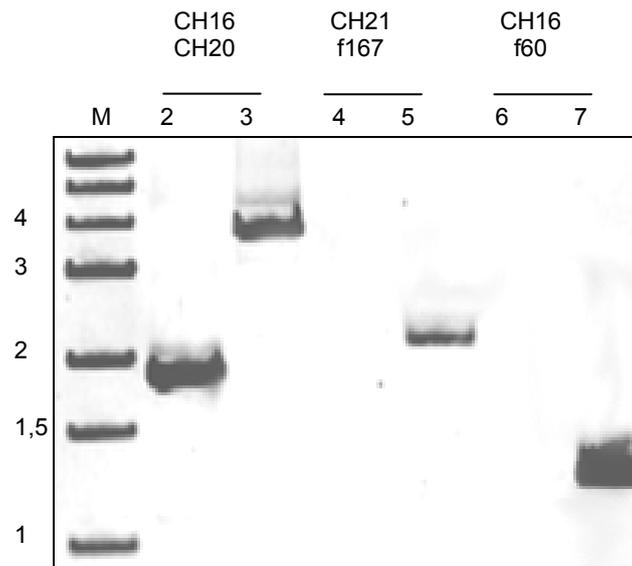
Die Herstellung von *targeting*-Konstrukten für den zielgerichteten *knockout* von *plc3* richtete sich nach dem Schema in Abb 3-5. Der 5'-Bereich der genomischen DNA von *plc3* wurde in einen Vektor kloniert und mit einem Restriktionsenzym inkubiert, dessen Schnittstelle einmal innerhalb der DNA-Sequenz lag. Somit waren geeignete Enden für den Einbau der Resistenzgenkassette vorhanden. Diese konnte in *forward*- oder in *revers*-Richtung integriert werden. Es entstanden zwei mögliche Vektoren für eine Unterbrechung der *plc3*-Sequenz im 5'-Bereich. Nach erfolgreicher Selektion eines *E. coli*-Klons, wurde ein Vektor isoliert, bei dem die Resistenzgenkassette in *revers*-Richtung im Gen lag.

Mit dem Vektor erfolgte die Transformation von *Physcomitrella patens* und eine Selektion auf G418-haltigem Medium. Die resistenten Klone wurden nach drei



**Abb 3-5: Herstellung der verwendeten *targeting*-Konstrukte für den *plc3*-knockout.** Oben: *plc3*-Exon-Intron-Struktur. Dabei sind die Exons als schwarze Kästchen dargestellt (Exon 0 in grau). Weiße Kästchen entsprechen den Sequenzen der Resistenzgenkassette. Verwendete Primer sind unter den Genen dargestellt und die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme über den Genen in kursiver Schrift.

Wochen für weitere zwei Wochen auf Standardmedium gebracht und anschließend erneut auf G418-haltigem Medium selektiert. Nur die noch resistenten Klone wurden für ein PCR-Screening eingesetzt, um den erfolgten Einbau des Konstruktes zu überprüfen (Abb 3-6). Bei 23 Klonen, die von vier unabhängigen Transformationen stammten konnte mittels PCR das gewünschte Konstrukt im Genom nachgewiesen werden. Für alle wurde das *plc3*-Transkript in der anschließenden RT-PCR nachgewiesen (nicht gezeigt).



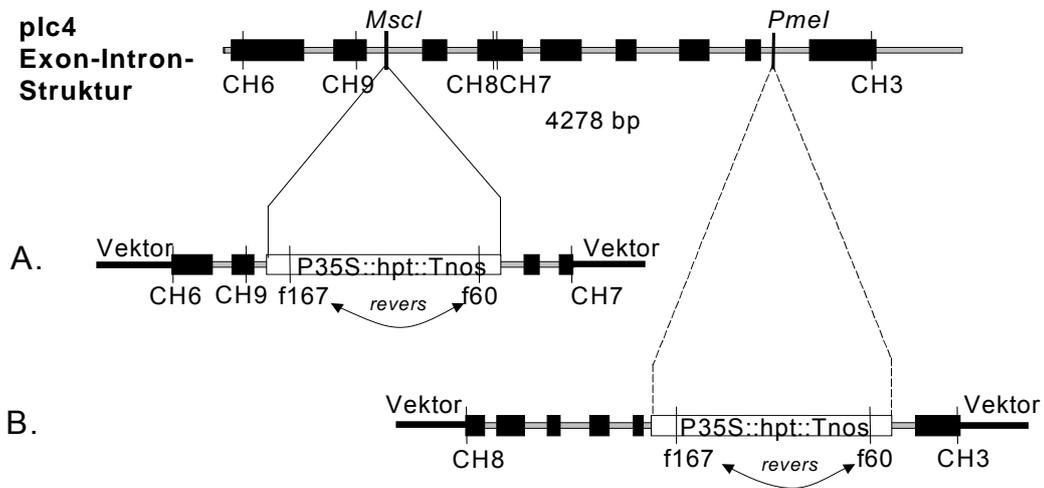
**Abb 3-6: PCR-Screening der potenziellen *plc3-knockout*-Mutanten.**

Banden der putativen *plc3*-Mutante (Spuren 3, 5 und 7) und des WT (Spuren 2, 4 und 6). Verwendete Primer sind über der Gel-Abbildung angegeben. M: Längenstandard (Zahlen in kbp)

### 3.2.3 Herstellung des *plc4 knockout*-Konstrukts

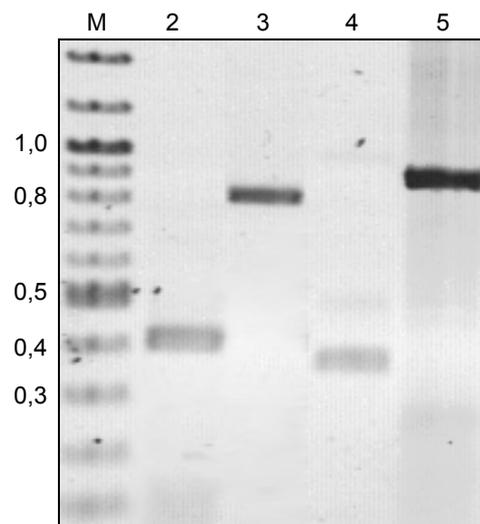
Die Herstellung von *targeting*-Konstrukten für den gerichteten *knockout* von *plc4* richtete sich nach dem Schema in Abb 3-7. Die genomische DNA von *plc4* wurde in zwei Teilen in zwei gleiche Vektoren gebracht und jeweils mit entsprechendem Restriktionsenzym inkubiert, welches die Enden für den Einbau der Resistenzgenkassette lieferte. Diese konnte in *forward*- oder in *revers*-Richtung integriert werden. So entstanden zwei mögliche Konstrukte für eine Unterbrechung der *plc4*-Sequenz im 5'-Bereich (Vektor A. in Abb 3-7) und zwei für eine Unterbrechung im 3'-Bereich (Vektor B. in Abb 3-7).

Die erfolgte Ligation der Resistenzgenkassette in die Vektoren A und B wurde mit geeigneten Primern mittels PCR untersucht (Abb 3-8. Agarosegel für Vektor A. als Beispiel gezeigt). Dabei diente der verdünnte Ligationsansatz als Matritze.



**Abb 3-7: Herstellung der verwendeten *targeting*-Konstrukte für den *knockout* des *plc4*-Gens.**

Dabei sind die Exons als schwarze Kästchen dargestellt, die Sequenzen der Resistenzgenkassette als weiße. Verwendete Primer sind unter den Genen dargestellt und die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme über den Genen in kursiver Schrift. A: Vektor A; B: Vektor B.



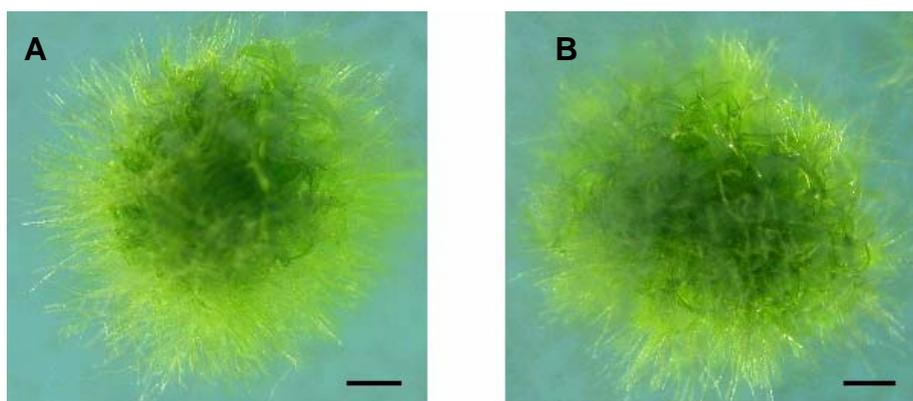
**Abb 3-8: PCR-Amplifikate des Ligationserfolgs für die Erstellung eines *ko*-Konstruktes.** Verwendete Primer: Spur 2: CH9, f167; Spur 3: CH7, f60; Spur 4: CH9, f60; Spur 5: CH7, f167; M: Längenstandard (Zahlen in kbp)

Im Ligationsansatz wurden die erwarteten Amplifikate für einen *forward*-Einbau und auch einen *revers*-Einbau der Resistenzkassette mittels PCR erzeugt. In den Spuren 2 und 3 wurde jeweils ein Fragment vom Gen zur Resistenzkassette amplifiziert, das bei einem Einbau in *forward*-Richtung bei 406 bp und 850 bp erwartet war, in den Spuren 4 und 5 waren die erwarteten Amplifikate für einen *revers*-Einbau bei 370 bp und 890 bp sichtbar. Entsprechend erwartete Fragmentlängen wurden auch für Vektor B erstellt (nicht gezeigt). Eine Transformation in zwei verschiedene *E. coli*-Stämme (XL1-Blue, DH5 $\alpha$ mc $r^{-}$ ) mit einem der beiden Vektoren führte zu ampicillinresistenten Klonen, ein PCR-Screening zeigte bei etwa 3000 (10 Transformationen  $\times$  300) untersuchten Klonen keine Kolonie, die das gewünschte Plasmid enthielt.

### 3.3 Charakterisierung der *plc2* knockout-Mutante

#### 3.3.1 Das Wachstum und die Entwicklung der Mutante im Vergleich zum WT

Eine kleine Menge Protonemafilamente von WT und *plc2* wurde auf Standardmedium gebracht und im Licht für etwa drei Wochen im Abstand von drei Tagen untersucht.

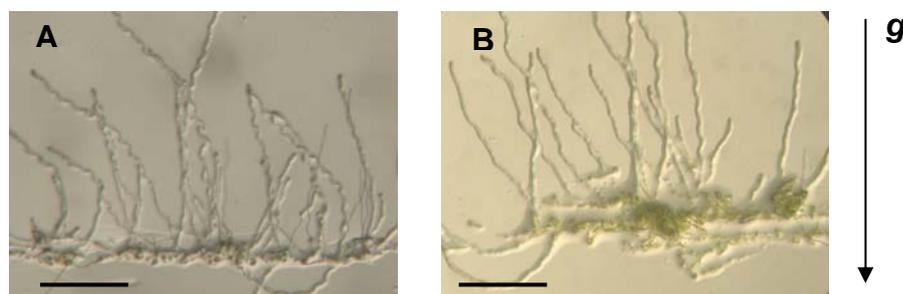


**Abb 3-9: Vergleich des Wachstums von WT (A) und *plc2* (B) nach 14 Tagen.**  
Die Balken entsprechen 2 mm. (Frenck, 2004)

Das Wachstum von *plc2* unterschied sich nach 14 Tagen unter Standardbedingungen nicht von dem des WTs (Abb 3-9). Zudem wurden die Zellgröße,

Zellanzahl, Chloroplastenfarbe, Chloroplastenanzahl, Verzweigungshäufigkeit und Größe der Phylloide als äußerliche Merkmale herangezogen. Es war eine leicht verzögerte Bildung von Gametophoren bei *plc2* festzustellen (Hau, 2005). So bildete der WT nach 15 Tagen erste Gametophoren, während bei *plc2* erst nach 17 Tagen Gametophoren gebildet wurden.

Für eine Beobachtung der Entwicklung von WT und *plc2* im Dunkeln wuchsen die Filamente für zehn Tage dünn ausgestrichen auf den Petrischalen, die vertikal positioniert waren.



**Abb 3-10: Wachstum von WT (A) und *plc2* (B) für 10 Tage im Dunkeln.**

Die Gravitation (*g*) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Balken entsprechen 2 mm.

Das Wachstum in anhaltender Dunkelheit auf Standardmedium mit Glucose unterschied sich im Vergleich zum WT ebenfalls nicht (Abb 3-10). WT und *plc2* wuchsen negativ gravitrop und bildeten lange etiolierte Filamente. In weiteren Versuchen wurde *plc2* unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt.

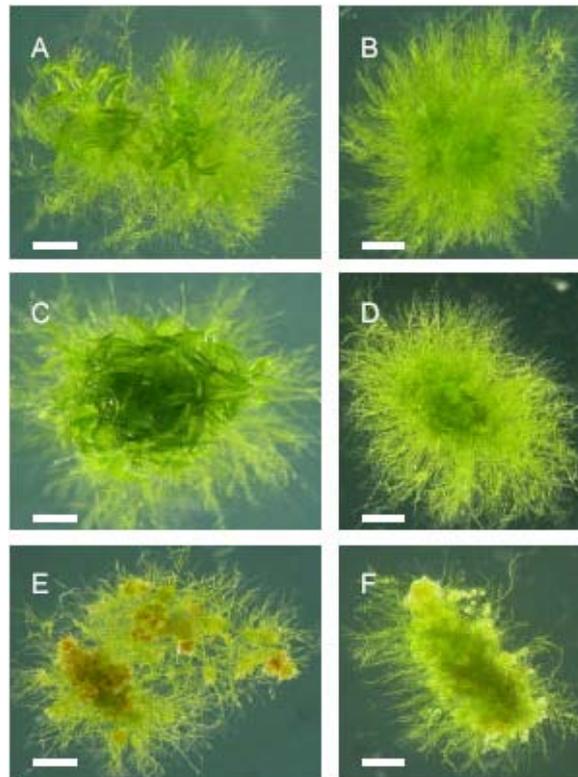
### 3.3.2 Behandlung mit Phytohormonen

Zur physiologischen Untersuchung der *plc2*-Mutante wurden das Medium mit Phytohormonen (Auxin, Cytokinin, Abscisinsäure) versetzt, um dem Moos biotische Faktoren vorzugeben. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Applikation exogenen Phytohormons von der Pflanze nicht von endogen ausgeschüttetem Phytohormon unterschieden werden kann. Somit werden der Pflanze umweltbedingte Schwankungen suggeriert, die mit der Ausschüttung der entsprechenden Phytohormone weitergeleitet würde. Im Abstand von etwa drei Tagen wurde die Entwicklung von *plc2* im Vergleich mit dem WT sowohl makro- als auch mikroskopisch untersucht. Parallel zu einer im Licht wachsenden Kolonie wurde eine Kontrolle im Dunkeln inkubiert.

### 3.3.2.1 Das Wachstum unter Einfluss von Auxin (IAA) oder Cytokinin (BAP)

Bei der Behandlung von *Physcomitrella patens* mit unterschiedlichen IAA-Konzentrationen im Licht war zwischen WT und *plc2* kein Unterschied feststellbar. In beiden Stämmen unterblieb die Entwicklung von Gametophoren bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M IAA. Geringere Konzentrationen führten zu stark gehemmter Gametophorenbildung in *Physcomitrella patens*.

Die Behandlung mit  $10^{-7}$  M BAP führte im WT zu einer frühzeitigen Gametophorenbildung (Abb 3-11; A und B). Im Unterschied dazu war diese bei *plc2* nicht so deutlich. Die Behandlung mit höheren BAP-Konzentrationen führte im WT und in *plc2* zur Kallusbildung (Abb 3-11; C-F).



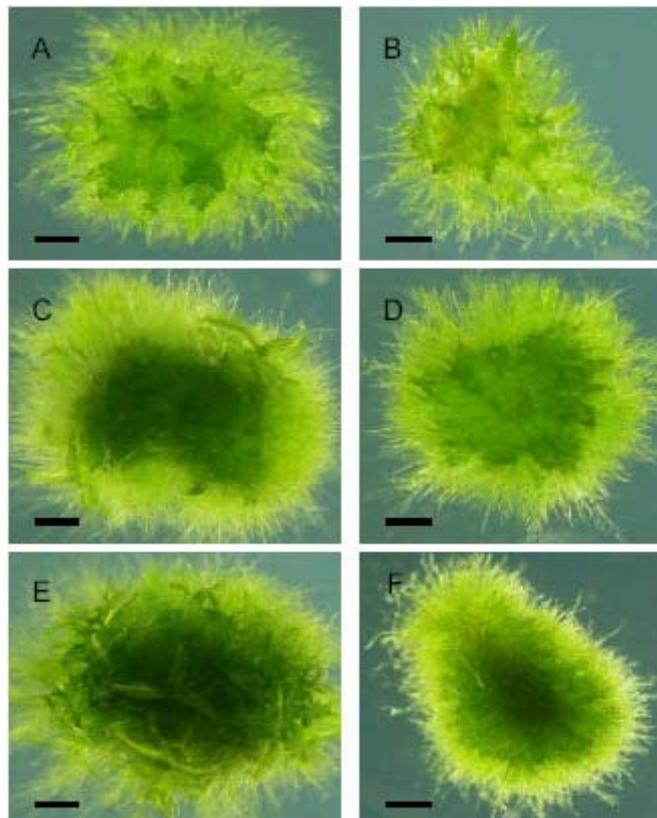
**Abb 3-11: Vergleich von 14 Tage alten Protonemakolonien von WT und *plc2*, die unter Zugabe von unterschiedlichen BAP-Konzentrationen wuchsen.**

WT (A) und *plc2* (B), behandelt mit  $8 \times 10^{-7}$  M BAP, (C) WT und (D) *plc2* mit  $8 \times 10^{-6}$  M BAP. (E) WT und (F) *plc2*, behandelt mit  $8 \times 10^{-5}$  M BAP. Die Balken entsprechen 2 mm. (Frenck, 2004)

### 3.3.2.2 Behandlung des WT und der Mutante mit Abscisinsäure (ABA)

Für eine Behandlung mit Abscisinsäure (ABA) wurden Kolonien mit  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  M ABA für drei Wochen im Licht inkubiert (Abb 3-12).

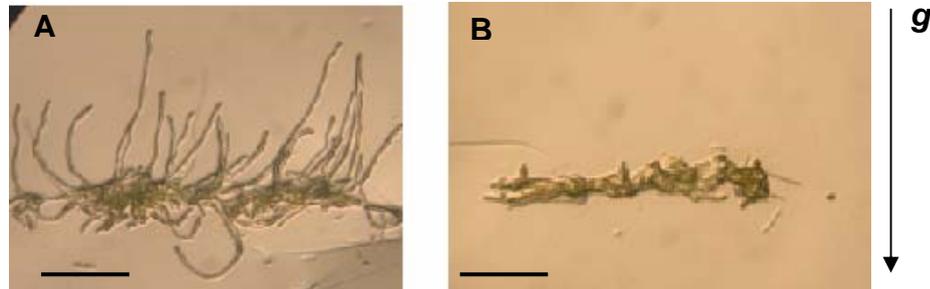
Die Bildung von Gametophoren war bei  $10^{-5}$  M ABA im WT um etwa fünf Tage verzögert, *plc2* bildete nach drei Wochen wenige Gametophoren aus (Abb 3-12; E und F). Bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M ABA unterblieb bei *plc2* die Gametophorenbildung, im WT waren nach drei Wochen wenige Gametophoren sichtbar (Abb 3-12; C und D). Bei  $10^{-3}$  M ABA blieb in beiden Kulturen die Gametophorenbildung aus (Abb 3-12; A und B).



**Abb 3-12: Drei Wochen alte Protonemakolonien von WT und *plc2*, die mit verschiedenen ABA-Konzentrationen unter Standardbedingungen wuchsen.**

WT (A) und *plc2* (B) wuchsen mit  $10^{-3}$  M ABA, WT (C) und *plc2* (D) mit  $10^{-4}$  M ABA und WT (E) und *plc2* (F) mit  $10^{-5}$  M ABA. Die Balken entsprechen 2 mm. (Frenck, 2004)

Das Wachstum im Dunkeln war bei *plc2* unter Einfluss von  $10^{-5}$  M ABA im Vergleich zum WT gehemmt (Abb 3-13). In manchen Ansätzen waren bei *plc2* wenige wachsende Filamente zu erkennen.



**Abb 3-13: Das Wachstum von WT (A) und die Hemmung des Wachstums bei *plc2* (B).** Die Filamente wuchsen für 10 Tage im Dunkeln mit  $10^{-5}$  M ABA. Die Balken entsprechen 2 mm.

### 3.3.3 Das Wachstum unter osmotischem Stress (Salz und Mannitol)

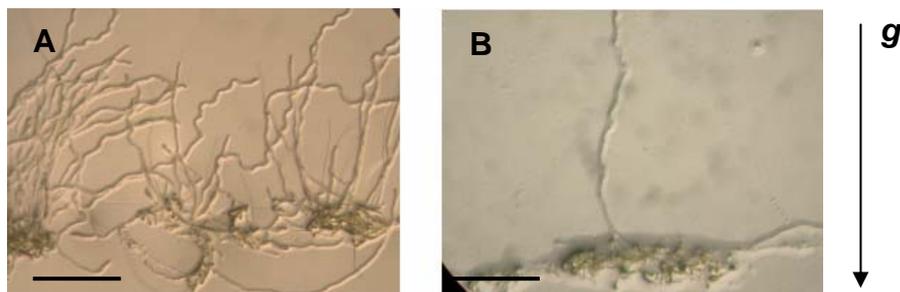
Das Verhalten auf salzhaltigem Medium hing von der Größe der inokulierten Kolonie ab. Eine kleine Kolonie WT und *plc2* verblasste innerhalb von 14 Tagen bei Zugabe von 0,3 M NaCl und regenerierte auf Standardmedium nicht. Größere Kolonien behielten stellenweise grüne Filamente, die nach Übertragung auf Standardmedium wieder wuchsen.

Für weitere Versuche wurden etwa gleich große Kolonien eingesetzt. Bei einer Salzkonzentration von 0,15 M NaCl war das Wachstum der Kolonie sowohl im Licht als auch im Dunkeln unterbunden, die Filamente waren jedoch weiterhin grün und nach Umsetzung auf Standardmedium wuchsen die Filamente weiter. Bei einer Konzentration von 0,2 M NaCl waren die am Medium liegenden Filamente weiß, weiter aus dem Medium herausragende Filamente grün. Die Kolonie regenerierte sich nach Umsetzung auf Standardmedium. Bei einer Konzentration von 0,4 M NaCl unterblieb auch die Regeneration auf Standardmedium im WT und in *plc2*.

Die Behandlung mit Mannitol als osmotisch wirksame Substanz führte zu einem ähnlichen Wachstumsverhalten. 0,1 M Mannitol hemmten die Ausbildung von Gametophoren, ab 0,2 M Mannitol wuchsen die Filamente nicht mehr und aggregierten. Die Zellen waren kurz und rundlich. Während bei 0,7 M Mannitol nur

die substratnahen Filamente weißlich waren, bewirkte die Behandlung mit 0,8 M Mannitol eine reversible Farbänderung der gesamten Kolonie. WT und *plc2* verhielten sich bei Zugabe von Mannitol und Inkubation im Licht gleich.

Das Wachstum im Dunkeln bei Zugabe von 0,2 M Mannitol führte im WT zu gewellt negativ gravitrop wachsenden Filamenten, in *plc2* unterblieb das Wachstum fast vollständig (Abb 3-14).



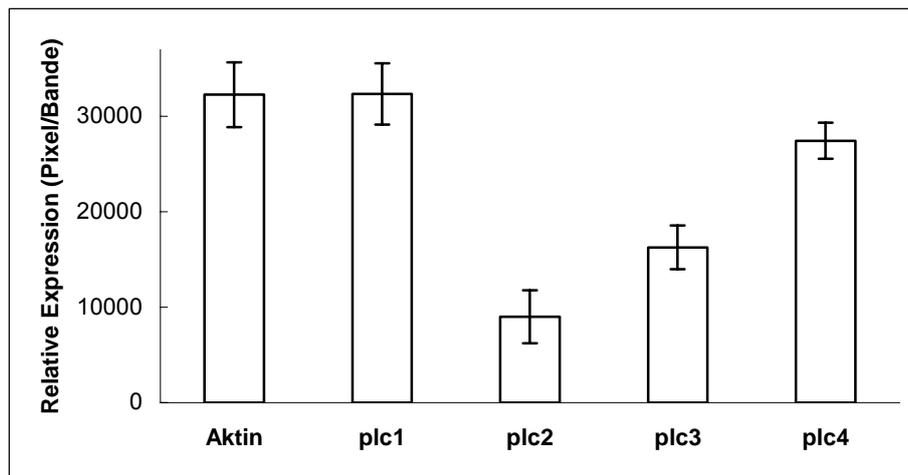
**Abb 3-14: Das Wachstum von WT (A) und die Wachstumshemmung bei *plc2* (B).** Die Filamente wuchsen für 10 Tage im Dunkeln mit 0,2 M Mannitol. Die Balken entsprechen 2 mm.

### 3.4 Die Expression von *plc2* und *plc3* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

#### 3.4.1 Die Expression bei Wachstum auf Standardmedium

Die Expression der *plc*-Gene in *Physcomitrella patens* bei Wachstum unter Standardbedingungen wurde untersucht. Dazu konnte mit geeigneten Primern das jeweilige Transkript aus der gleichen Menge Gesamt-RNA amplifiziert werden. Als interner Standard wurde das Aktin-Transkript herangezogen. Die Bandenstärke wurde mit einem Laserscanner gemessen und in relativen Werten angegeben (Pixel). Die Originaldaten befinden sich im Anhang II.

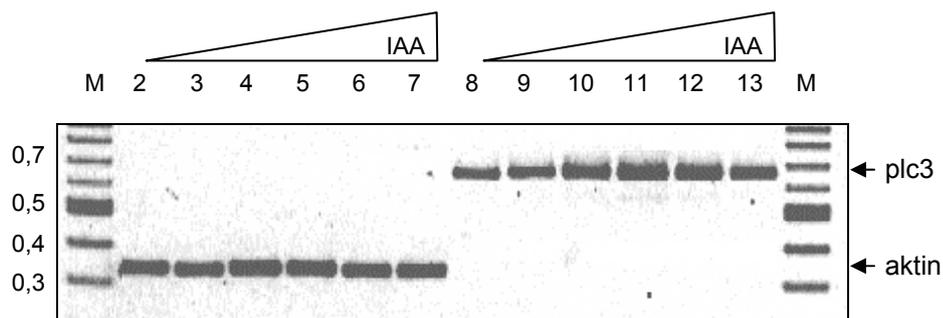
Die Expression des Aktin- und *plc1*-Gens ist unter Standardbedingungen von den untersuchten Genen am stärksten (Abb 3-15). Die Expression des *plc2*-Gens liegt bei 28 % des *plc1*-Gens, *plc3* bei 50 % und *plc4* bei 85 %. In folgenden Versuchen wurden die Bandenstärken etwas ausgeglichen, indem ein unterschiedliches Volumen der PCR-Ansätze für jedes untersuchte Gen auf das Agarosegel aufgetragen wurde.



**Abb 3-15:** Die relative Expression der plc-Gene und des Aktins in *Physcomitrella patens* bei Wachstum unter Standardbedingungen. n=6.

### 3.4.2 Die Expression von plc2 und plc3 nach Behandlung mit Phytohormonen

Nach vorangegangener Beobachtung der Effekte von Phytohormonen und osmotischem Stress auf die Entwicklung von *Physcomitrella patens* und der *plc2*-Mutante, wurde die Expression von *plc2* und *plc3* mittels semiquantitativer RT-PCR unter diesen Bedingungen untersucht. Hierbei zeigte sich eine Erhöhung des *plc3*-Transkripts nach Behandlung mit  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M und  $5 \cdot 10^{-4}$  M IAA (Abb 3-16).



**Abb 3-16:** Vergleich der RT-PCRs von unbehandelten und mit Auxin-behandelten *Physcomitrella*-Zellen.

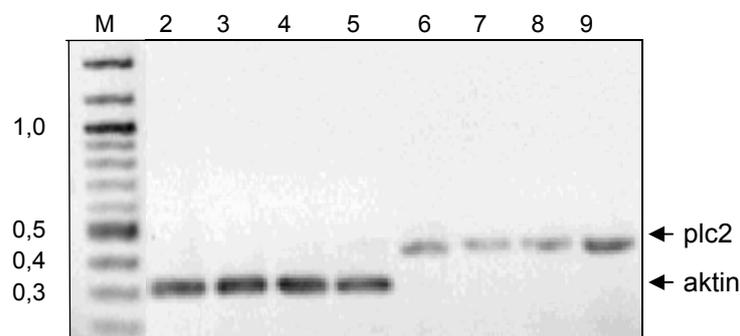
Auf dem Agarosegel sind die Amplifikate der Gene für Aktin (Spuren 2–7) und *plc3* (Spuren 8–13), jeweils von unbehandelten (Spuren 2 und 8) und mit  $10^{-6}$  M IAA (3 und 9),  $10^{-5}$  M IAA (4 und 10),  $10^{-4}$  M IAA (5 und 11),  $5 \cdot 10^{-4}$  M IAA (6 und 12) und  $10^{-3}$  M IAA (7 und 13) behandelten Moosproben, abgebildet; M: Längenstandard (Zahlen in kbp) (Klare, 2006).

Die Amplifikate des *plc2*-Transkripts zeigten nach erfolgter RT-PCR bei unterschiedlichen IAA-Konzentrationen keine Unterschiede in ihrer Stärke zwischen den unbehandelten Proben und den mit Auxin behandelten Proben (nicht gezeigt). Bei einer Behandlung mit Cytokinin oder Abscisinsäure zeigte sich bezüglich der Expression von *plc2* oder *plc3* keinen Effekt.

### 3.4.3 Die Expression nach Behandlung mit osmotisch wirksamen Substanzen

#### 3.4.3.1 Die Expression von *plc2* und *plc3* bei Behandlung mit Salz

*Physcomitrella patens* wurde 0,15 M NaCl ausgesetzt und im Licht oder im Dunkeln für 24 h inkubiert. Erneut wurde die Expression von *plc2* und *plc3* im Vergleich mit Aktin mittels RT-PCR analysiert (Abb 3-17).



**Abb 3-17: Vergleich der Expression von *plc2* und Aktin in unbehandeltem und mit NaCl-behandeltem Moos.**

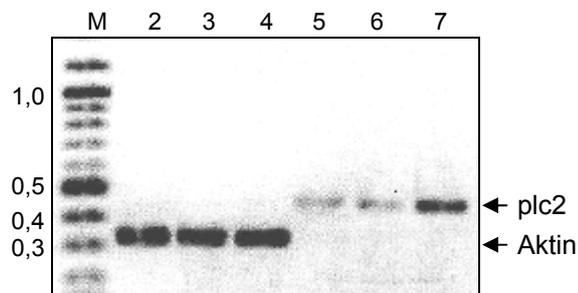
Auf dem Agarosegel sind die Amplifikate der Gene für Aktin (Spuren 2 - 5) und *plc2* (Spuren 6 - 9), jeweils von unbehandeltem (Spuren 2, 6), mit 0,05 M NaCl (Spuren 3, 7), mit 0,15 M NaCl (Spuren 4, 8) und mit 0,15 M NaCl und Dunkelheit (Spuren 5, 9) behandeltem Moos aufgetragen. M: Längenstandard (Zahlen in kbp).

Nach Behandlung mit Salz im Dunkeln erhöhte sich die Expression des *plc2*-Gens im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abb 3-17; Spuren 6 und 9), während eine Behandlung mit NaCl im Licht keine Transkriptionsänderung erzielte (Abb 3-17; Spuren 4 und 8). Eine Erhöhung der Expression war nach 12 h bereits erkennbar,

nach 24 h deutlicher, was dann in den Experimenten als Inkubationszeit festgesetzt wurde.

### 3.4.3.2 Die Expression von *plc2* und *plc3* bei Behandlung mit Mannitol

Die Behandlung mit Mannitol führte zu einem ähnlichen Ergebnis (Abb 3-18). Die Expression von *plc2* im Vergleich mit der Expression von Aktin war erhöht, wenn das Moos 0,2 M Mannitol und Dunkelheit ausgesetzt war (Abb 3-18; Spuren 7 und 4). Alleinige Behandlung mit Mannitol führte im Vergleich mit Aktin zu keiner erhöhten Expression (Abb 3-18; Spuren 6 und 3).



**Abb 3-18: Vergleich der Transkription von *plc2* und Aktin in unbehandeltem und mit Mannitol behandeltem Moos.**

Auf dem Agarosegel sind die Amplifikate der Gene für Aktin (Spuren 2 - 4) und *plc2* (Spuren 5 - 7), jeweils von unbehandeltem (Spuren 2 und 5), mit 0,2 M Mannitol (Spuren 3 und 6) und mit 0,2 M Mannitol und Dunkelheit (Spuren 4 und 7) behandeltem Moos zu sehen. M: Längenstandard (Zahlen in kbp) (Rußmann, 2006).

## 3.5 Intrazelluläre Lokalisation von PLC2 und PLC3

### 3.5.1 Bioinformatische Studien zur Lokalisation von *plc2* und *plc3*

Als ersten Anhaltspunkt für eine mögliche Lokalisation von *plc2* und *plc3* wurden die Aminosäuresequenzen mit anderen in den Datenbanken vorhandenen Sequenzen verglichen. Konsensussequenzen allgemeiner und speziell pflanzlicher Signal- oder Transitsequenzen wurden dafür herangezogen und die Wahrscheinlichkeit einer Lokalisation angegeben (Tab 3-2).

**Tab 3-2: Voraussagen über eine mögliche Lokalisation von PLC2, PLC3 und PLC3 mit Exon 0 durch verschiedene Datenbank-Vergleiche.**

Datenbanken für voraussichtliche Lokalisationen pflanzlicher Proteine waren TargetP, ChloroP, Predotar und iPSORT.

<b>PLC2</b>	<b>Score-Werte der verschiedenen Lokalisationen</b>				<b>Wahrscheinliche Lokalisation</b>
<b>TargetP 1.1 Server</b>	Chloroplastidär 0.032	Mitochondrial 0.249	Signalpeptid 0.174	Andere 0.565	-
<b>ChloroP 1.1 Server</b>	0.449				Nicht chloroplastidär
<b>Predotar v. 1.03</b>	Chloroplastidär 0,09	Mitochondrial 0.26	ER 0,02	Andere 0,66	Möglicherweise mitochondrial
<b>iPSORT</b>	keine Angaben				Mitochondrial

<b>PLC3</b>					
<b>TargetP 1.1 Server</b>	Chloroplastidär 0.303	Mitochondrial 0.044	Signalpeptid 0.063	Andere 0.664	-
<b>ChloroP 1.1 Server</b>	0.456				Nicht chloroplastidär
<b>Predotar v. 1.03</b>	Chloroplastidär 0.01	Mitochondrial 0.01	ER 0.00	Andere 0.98	-
<b>iPSORT</b>	keine Angaben				Nicht mitochond., nicht plastidär

<b>PLC3+Exon 0</b>					
<b>TargetP 1.1 Server</b>	Chloroplastidär 0.923	Mitochondrial 0.033	Signalpeptid 0.003	Andere 0.225	Chloroplastidär
<b>ChloroP 1.1 Server</b>	0.580				Chloroplastidär
<b>Predotar v. 1.03</b>	Chloroplastidär 0.01	Mitochondrial 0.01	ER 0.00	Andere 0.98	-
<b>iPSORT</b>	keine Angaben				Chloroplastidär

Die PLC2-Sequenz zeigt in zwei Datenbanken eine mögliche mitochondriale Lokalisation. Die Score-Werte sind für sichere Aussagen zu niedrig. Die PLC3-Sequenz ohne Exon 0 hat keine Abfolge, die auf eine bestimmte Lokalisation hindeutet. Die PLC3-Sequenz mit der Exon 0-Sequenz wird von drei Datenbanken als ein chloroplastidäres Protein angegeben. Die Transitsequenz zur Chloroplastenlokalisierung wird für den Bereich zwischen Aminosäure 1 und 73 vorhergesagt, welche genau dem Exon 0-Bereich entsprechen (ChloroP).

### 3.5.2 Lokalisationsuntersuchung mit GFP-Fusionsproteinen

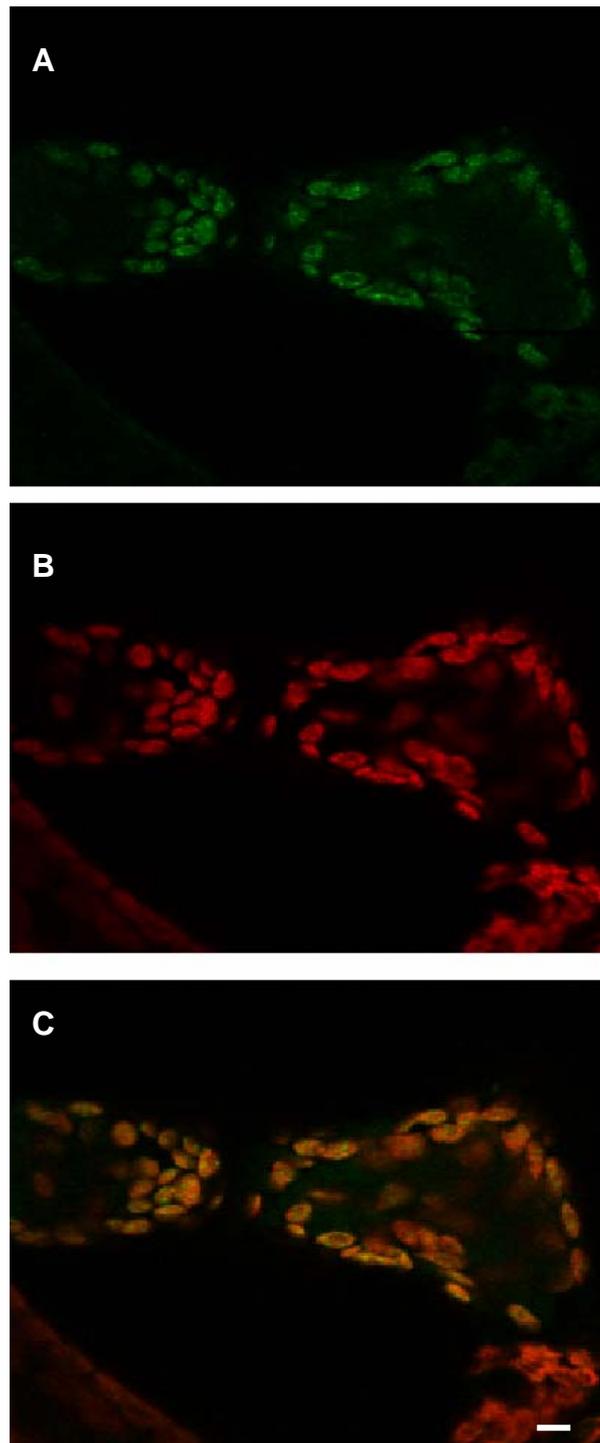
#### 3.5.2.1 *Protoplastentransformation mit einem plc2-GFP-Fusionsplasmid*

Zur Untersuchung der Lokalisation von PLC2 und PLC3 im Moosprotonema wurden chimäre GFP-Fusionsproteine verwendet. Dazu wurde die GFP-Sequenz in das Leseraster der plc-cDNA-Sequenz kloniert und in *Physcomitrella patens* mittels transienter Transformation eingebracht. Die austreibenden Protoplasten wurden am Fluoreszenzmikroskop oder am Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM) untersucht.

Die Transformation mit dem plc2::GFP-Konstrukt führte zu zwei unterschiedlichen GFP-Mustern. GFP akkumulierte in den Chloroplasten oder auch an der cytosolischen Seite der Chloroplasten (Abb 3-19). Wurde das Moos bei 12 °C inkubiert, zeigte sich eine GFP-Fluoreszenz im Cytosol (Abb 3-20).

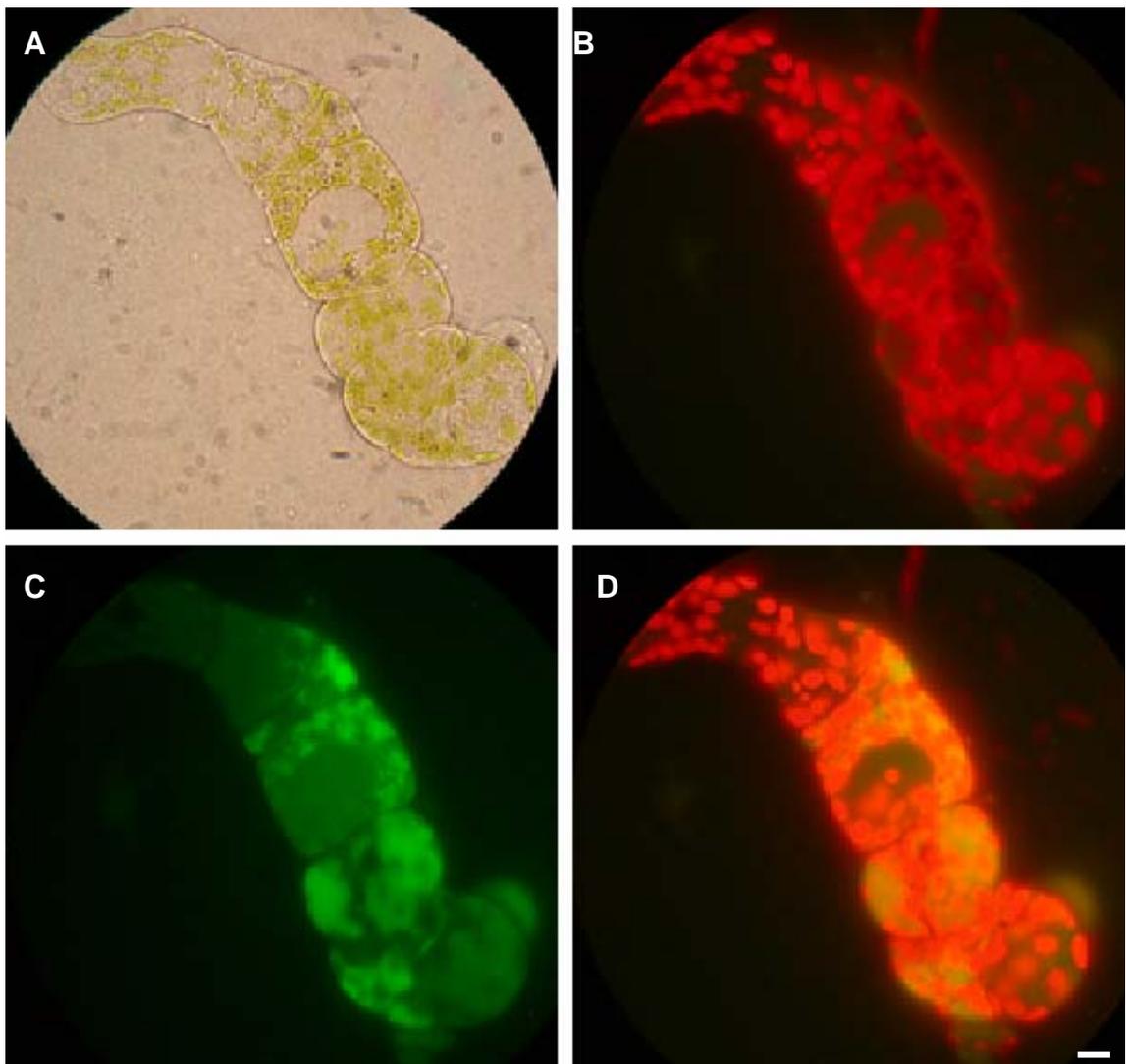
#### 3.5.2.2 *Protoplastentransformation mit plc3-GFP-Fusionsplasmiden*

Nach der Transformation mit einem plc3::GFP-Konstrukt, plc3+Exon 0::GFP-Konstrukt oder einem Exon 0::GFP-Konstrukt war keine GFP-Fluoreszenz sichtbar. Der Beobachtungszeitraum überspannte drei Wochen, die Transformationen wurden mit den ersten beiden Konstrukten zehnmals durchgeführt, mit dem letzten Konstrukt fünfmal. Die plc3- und plc3+Exon 0 wurden zudem in einem Vektor gebracht, der an Stelle der Sequenz für einen Aktinpromotor eine Sequenz für einen 35S-Promotor beinhaltet. Nach drei unabhängig durchgeführten Transformationen war auch bei diesen beiden Konstrukten keine GFP-Fluoreszenz erkennbar.



**Abb 3-19: CLS-Mikroskopie der Transformation von *Physcomitrella patens* mit einem *plc2*-GFP-Fusionsplasmid.**

Die transformierten Protoplasten wurden für 20 Tage bei 20 °C inkubiert. Die Grünfluoreszenz (A) entspricht der GFP-Fluoreszenz, die Rotfluoreszenz (B) der Eigenfluoreszenz des Chlorophylls. C: Mischfluoreszenz aus A und B. Der Balken entspricht 3 µm. (Klare, 2006)



**Abb 3-20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der transformierten Protoplasten von *Physcomitrella patens* mit einem *plc2*-GFP-Fusionsplasmid.**

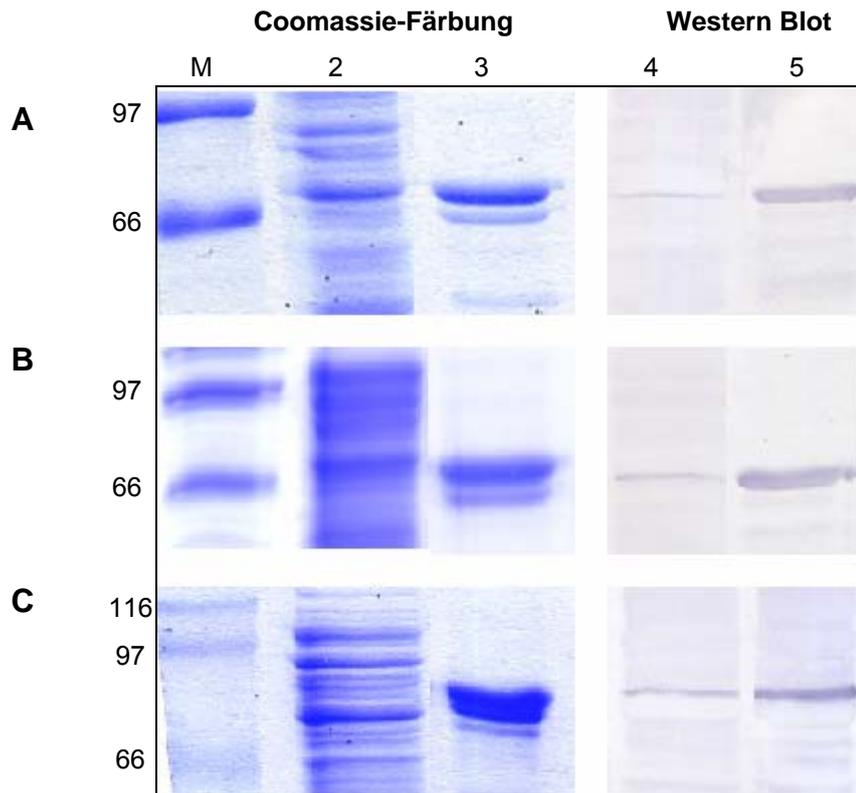
Die transformierten Protoplasten wurden für 5 Tage bei 12 °C inkubiert. A zeigt die WL-Aufnahme des Protoplasten, in B ist die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls zu sehen. C zeigt die GFP-Fluoreszenz und in D sind B und C überlappend dargestellt. Der Balken entspricht 3 µm.

## 3.6 Biochemische Untersuchungen der PLC-Isoformen

### 3.6.1 Heterologe Expression und Reinigung von PLC2 , PLC3 und PLC4

Die Phospholipasen C 2, 3 und 4 wurden heterolog exprimiert und für biochemische Analysen als rekombinante Proteine aus *E. coli* gereinigt. Hierfür wurde das Expressionssystem auf Basis eines pET-Vektors gewählt. Die entsprechende plc-cDNA wurde dadurch mit fünf aufeinanderfolgenden CAC-Triplets im 3'-Bereich gekoppelt, so dass das rekombinante Protein fünf Histidine als Erkennungssequenz erhielt. Die markierten Proteine wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und die Reinheit der Fraktionen durch SDS-PAGE ermittelt. Western Blot-Analysen geben Aufschluss über die Reinheit des Proteins.

In Abb 3-21 sind jeweils die Gesamtproteinextrakte und das gereinigte Protein zu sehen. Die Coomassie-Färbung zeigte, dass die gereinigten Proteine der jeweils erwarteten Größe entsprachen. Diese lag für PLC2 bei 72 kDa, für PLC3 bei 72 kDa und für PLC4 bei 74 kDa. Der Western Blot zeigte, dass die histidin-markierten Proteine selektiv angefärbt werden. Die ausreichend gereinigten Proteine wurden für die anschließende Untersuchung verwendet.



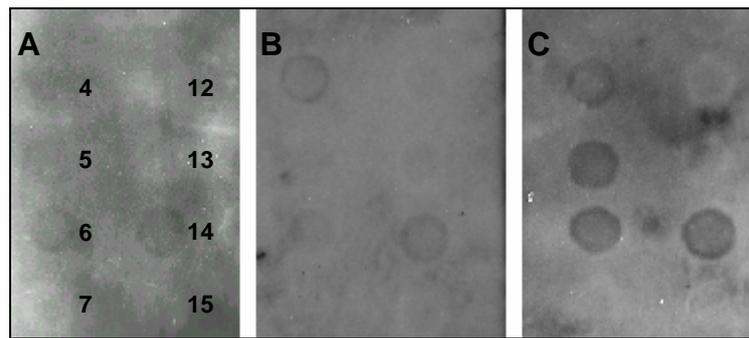
**Abb 3-21: Reinigung der rekombinanten PLC2 (A), PLC3 (B) und PLC4 (C).**

Die erfolgreiche Expression wurde mit SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts) überprüft. In den Spuren 2 und 4 sind die Überstände aufgeschlossener Extrakte gezeigt, in den Spuren 3 und 5 das gereinigte Protein nach der Chromatographie. M: Molekulargewichtsmarker (Zahlen in kDa).

### 3.6.2 Untersuchung der Substratspezifität

Die Spezifität der gereinigten Proteine auf verschiedene Substrate wurde getestet, indem sie auf eine Membran gebracht wurden, an der verschiedene Phosphoinositide gekoppelt waren. Der Nachweis des gebundenen Proteins erfolgte immunologisch mit einem Histidin-Antikörper.

In Abbildung Abb 3-22 ist zu erkennen, dass die Bindung an die PIP-Strip Membranen allgemein sehr schwach war. Dennoch sind Unterschiede in den Substratbindungen der verschiedenen PLCs aus *Physcomitrella patens* erkennbar. Der Nachweis einer Bindung von PLC4 an den dargebotenen Substraten erfolgte ausschließlich an PI5P (Spot 6, links) und PA (Spot 14, rechts). Zusätzlich band PLC3 an PI3P (Spot 4). PLC2 war zudem noch an PI4P (Spot5) nachweisbar.



**Abb 3-22: Immunhistologischer Nachweis der Bindung von PLC4 (A), PLC3 (B) und PLC2 (C) an verschiedene Phospholipide.**

Die dargestellten Punkte entsprechen den Spots für PI3P, PI4P, PI5P und PE auf der linken Seite, bzw. PI4,5P<sub>2</sub>, PI3,4,5P<sub>3</sub>, PA und PS auf der rechten Seite (s.a. Abb 2-7).

### 3.7 Interaktionen der *Pp*PLCs mit *Pp*GCR1

Am NIBB wurden erste Versuche zum Nachweis möglicher Interaktionspartner der PLCs aus *Physcomitrella patens* durch Hefe-Zweihybrid Systeme durchgeführt. Es konnte vor Beginn der Arbeit in *Physcomitrella patens* ein homologes Gen für GCR1 (*G-Protein Coupled Receptor 1*) aus *Arabidopsis* sequenziert werden. Dieses sollte für eine erste Untersuchung zur Interaktion mit den vier bekannten PLCs als Zielprotein dienen und wurde in den pMyr Vektor kloniert. Die vier plc-Sequenzen wurden erfolgreich in den pSos Vektor kloniert und dienten jeweils als Köderprotein.

Nach der Cotransformation in den Hefestamm wurde das Wachstum für eine Woche beobachtet. Bei einer Interaktion der beiden Proteine (*Pp*GCR1 mit jeweils PLC1, PLC2, PLC3 oder PLC4) hätten positive Transformanten bei 37 °C wachsen können. Lediglich die Kontroll-Transformanten wuchsen bei dieser Temperatur. *Pp*GCR1 interagiert nicht direkt mit einer der PLCs aus *Physcomitrella patens*. Weitere Untersuchungen wurden in der Zeit des Aufenthalts nicht durchgeführt.