

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion in Pflanzen

Pflanzen müssen sich als sessile Organismen sowohl kurz- als auch langfristig auf unterschiedliche Umwelteinflüsse einstellen, um in ihrem Habitat möglichst optimale Lebensbedingungen zu besitzen. Veränderungen abiotischer Faktoren (Salz- und Wassergehalt des Bodens, Wind, Temperatur und Licht) sowie biotischer Faktoren (Pathogenbefall oder Verletzung) werden von der Pflanze wahrgenommen und es kann eine spezifische Reaktion darauf erfolgen. Die Wahrnehmung erfolgt z.B. über Osmosensoren, Lichtrezeptoren oder Statolithen, die das Signal sowohl inter- als auch intrazellulär weiterleiten.

Die externen Signale müssen von Rezeptoren auf der Zelloberfläche wahrgenommen und in das Zellinnere geleitet werden. Die Rezeptoren lassen sich anhand der Eigenschaften in G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Ligandengesteuerte Ionenkanäle und Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität wie Rezeptor-ähnliche Kinasen oder Histidinkinasen unterscheiden (Xiong und Zhu, 2001). Intrazellulär kann das Signal über sekundäre Botenstoffe oder Proteinphosphorylierung vermittelt und verstärkt werden, um letztlich bestimmte Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen oder Proteine zu aktivieren, die direkt an der Zellantwort beteiligt sind.

Ubiquitäre Mechanismen zur Signalweiterleitung sind Phosphorylierungskaskaden, über die bestimmte Enzymaktivierungen, Ausschüttungen von Makromolekülen, Proteintransporte oder Proteindegradationen reguliert werden. Die Aktivierung erfolgt über Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen, die durch Übertragung von Pyrophosphat nachfolgende Enzymaktivitäten verändern können. In Pflanzen sind dabei Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) zu nennen, die sich in vier Gruppen (A-D) einteilen lassen (Jonak *et al.*, 2002). Eine weitere Familie stellen die calciumabhängigen Proteinkinasen (CDPK; s.u.) dar, die aus einer Serin/Threonin-Kinase Domäne und einer C-terminalen Calmodulin (CaM)-ähnlichen Domäne mit bis zu vier EF-Hand Motiven bestehen (Harmon *et*

al., 2000). Für die Dephosphorylierung der aktivierten Proteine sind vier Gruppen von Protein-Phosphatasen verantwortlich: PP1, PP2A, PP2B (Calcineurin) und PP2C (Luan, 2003). Die an den Phosphorylierungskaskaden beteiligten Proteine werden zu der direkten Aktivierung/Deaktivierung auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Dazu gehören u.a. Phosphorylierungen und Glycosylierungen (Huber und Hardin, 2004), Ubiquitinierungen zum gezielten Abbau von Proteinen (Ciechanover und Schwartz, 1998) oder auch Lipidmodifikationen wie Myristylierungen zur Verankerung des Proteins in der Zellmembran (Yalovsky *et al.*, 1999).

Die Weiterleitung des externen Signals zum Zellkern durch Phosphorylierungskaskaden muss spezifiziert und verstärkt werden. Das wird meist durch sekundäre Signale wie Phytohormone oder sekundäre Botenstoffe übernommen, die sich in Spezifität, Lokalisation oder zeitlicher Abfolge vom primären Signal unterscheiden können. So kann ein Stimulus auch mehrere sekundäre Signalwege aktivieren oder Interaktionen mit anderen Signalwegen eingehen und es entsteht ein vielfältiges Zusammenspiel zur jeweils geeigneten Zellantwort (Xiong *et al.*, 2002). Einer der bedeutendsten sekundären Botenstoffe ist Calcium, dessen Konzentration in den verschiedenen Zellkompartimenten präzise reguliert ist (Trewavas und Malho, 1998). Die cytosolische Calciumkonzentration liegt bei etwa 100 nM. Nach einem Stimulus wird freies Calcium aus dem extrazellulären Raum oder aus intrazellulären Depots (aus der Vakuole oder dem Endoplasmatischen Retikulum) freigesetzt, in denen eine Calciumkonzentration im millimolaren Bereich vorliegt. Die Ausschüttung von Calcium durch verschiedene Kanäle variiert je nach Signal (Sanders *et al.*, 1999). So öffnet Kältestress oder Trockenheit Calciumkanäle der Vakuole und der Plasmamembran, bei oxidativem Stress werden andere Calciumdepots genutzt (Price *et al.*, 1994). Die Öffnung der Calciumkanäle erfolgt entweder durch die Bindung von Liganden (z.B. Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP₃) oder zyklische ADP-Ribose (cADPR)) oder direkt durch mechanische Veränderungen der Membran z.B. nach einem Kältereiz (Plieth, 1999; Plieth *et al.*, 1999).

Die Calciumkanäle sind je nach Aktivierung, Spezifität oder Lokalisation in Gruppen unterteilt (Sanders *et al.*, 2002). Im Unterschied zu tierischen Calciumkanälen sind die pflanzlichen oft für mehrere bivalente Ionen durchlässig. Sie

befinden sich im Chloroplasten, im ER, in der Plasmamembran oder in der Vakuolenmembran (White, 2000). Auch ATP-abhängige Pumpen oder Transporter sind für die Regulierung der cytosolischen Calciumkonzentration verantwortlich. Calcium-ATPasen (Ca^{2+} -ATPasen) werden in Typ IIA und IIB unterteilt. Typ IIB Ca^{2+} -ATPasen werden durch die Bindung von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ aktiviert (Harper *et al.*, 1998) und durch die Bindung von CDPK oder über Phosphorylierung inhibiert (Hwang *et al.*, 2000), während für Typ IIA Ca^{2+} -ATPasen keine Regulierung bekannt ist (Hetherington und Brownlee, 2004).

Die Dauer und Intensität der Calciumsignale und das Muster von Wiederholungen lassen eine spezifische Kodierung zu, die der Vielfalt an Signalen entsprechen kann (Trewavas und Malho, 1998). Die Calciumströme (Ca^{2+} -*Transients*) werden von Ca^{2+} -bindenden Proteinen wahrgenommen oder regulieren Kanäle, die den Endpunkt des Signalweges darstellen. Die Bindung erfolgt über EF-Hand Motive der Proteine, die sich in drei Klassen einteilen lassen: Calmodulin, Calcium-abhängige Proteinkinasen, Calcineurin B-ähnliche Proteine (CBL) und phosphatidylinositolspezifische Phospholipasen C (PI-PLC) (Sanders *et al.*, 1999).

Sowohl bei manchen Calciumkanälen (z.B. „*slow vacuolar*“-Kanal, SV) als auch bei den Calciumsensoren (z.B. PI-PLC) zeigt sich, dass Calcium selber die Ausschüttung weiteren freien Calciums veranlassen kann (CICR, Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Ausschüttung). Der SV-Kanal wird im Rahmen der Schließzellbewegung genutzt, um Calcium aus der Vakuole zu entlassen. Dieser Kanal wird auch durch CaM und Calcineurin, sowie dem pH-Wert der Zelle reguliert (Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995). Neben Calcium übernehmen Phospholipide als Signalmoleküle die Weiterleitung eines Reizes. Diese sollen im folgenden genauer erläutert werden.

1.2 Glycerophospholipide

Die natürlichen Phospholipide bestehen aus Glycerin, das in *sn1*- und *sn2*-Position mit Fettsäuren, in *sn3*-Position mit Phosphat verestert ist. Die Fettsäureketten repräsentieren den lipophilen, apolaren Bereich und das GlycerinGrundgerüst mit dem über die Phosphodiesterbindung gebundenen Alkohol bildet den hydrophilen, polaren Bereich des Moleküls. Die Vielfalt der Phospholipide ist

besonders in tierischen Zellen intensiv studiert worden. Sie übernehmen neben strukturellen Aufgaben in der Lipiddoppelschicht auch eine wichtige Funktion als Vorläufermoleküle für sekundäre Botenstoffe oder dienen als Membrananker für verschiedene Proteine. Dazu ist es notwendig, sowohl eine Variabilität in der Zusammensetzung der Kopfgruppe, als auch in den Fettsäuren beizubehalten (Berridge und Irvine, 1989). Die Kopfgruppe ist verantwortlich für die Nomenklatur der Phospholipide und sie kann aus einem Cholin-, Ethanolamin-, Glycerin-, Hydroxyl-, Serin-, Inositol- oder Inositolphosphat-Rest bestehen.

Der hydrophobe Bereich der Phospholipide unterscheidet sich ebenfalls. Für die Verankerung von Proteinen besteht er z.B. aus mehr Myristinsäuren, während Vorläufermoleküle für sekundäre Botenstoffe mehr Stearoyl- und Arachidonylkomponenten besitzen. Arachidonsäure und Eicosapentanoinsäure lassen sich im Pflanzenreich nur bei den Moosen finden (Hartmann *et al.*, 1986).

Die Inositolkopfgruppe kann, durch die entsprechenden Phosphatidylinositol (PI) Kinasen, an drei von fünf freien Hydroxylenden phosphoryliert werden. Alle mono- und bisphosphorylierten Kombinationen sind in Pflanzen gefunden worden, jedoch nicht das in tierischen Zellen vorkommende PI_{3,4,5}-Triphosphat (Fruman *et al.*, 1998). Die Derivate übernehmen jeweils unterschiedliche Aufgaben, die wichtigsten werden später noch Beachtung finden. Sie sind entweder direkt an der Weiterleitung des Signals beteiligt oder werden durch Effektorenzyme aktiviert.

Die Effektorenzyme benötigen für die Weiterleitung lipidbindende Domänen. Dazu gehören z.B. FYVE-, PH-, PX-, C2-Domänen. Die FYVE-Domäne, benannt nach den ersten vier Proteinen, in denen sie beschrieben wurde (Fab1, YOTB, Vac1 und EEA1), hat ein konserviertes Motiv aus acht Cysteinen und bindet zwei Zinkionen. FYVE bindet spezifisch an PI_{3P} (Drobak und Heras, 2002). PH (Pleckstrin Homologie)-Domänen gliedern sich in vier Gruppen, die sich in Substratbindung und Spezifität unterscheiden. Interaktionen mit PI_{3,5P₂}, PI_{4,5P₂}, PI_{3P} und Phosphatidsäure (PA) sind bekannt, in tierischen Zellen wird jedoch die spezifische Interaktion mit PI_{3,4,5P₃} häufiger beschrieben, welches in pflanzlichen Zellen nicht vorkommt. Verschiedene Phosphatidylinositole binden auch an die PX (Phagozyten Oxidase)-Domäne; besondere Affinität zeigt diese gegenüber PI_{3P}. Zu den PX-beinhaltenden Enzymen zählen in Pflanzen zwei Phospholipasen D der Gruppe I (Meijer und Munnik, 2003). Die C2-Domäne bindet

Phospholipide bei Anwesenheit von Calcium und vermittelt u.a. die Translokation löslicher Proteine zu Membranen. Auch calciumunabhängige Bindungen an C2-Domänen sind beschrieben worden (Kopka *et al.*, 1998b).

PI4,5P₂ ist sowohl ein Vorläufermolekül der sekundären Botenstoffe Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG), nimmt aber auch eine eigenständige Rolle bei der Regulation der Cytoskelettorganisation, beim Vesikeltransport und dem Ionentransport ein. Es wird durch PI-Monophosphat-Kinasen aus PI4P (PIPK Typ II) oder PI5P (PIPK Typ I) synthetisiert. Beide Kinasen phosphorylieren *in vitro* auch PI3P, was für die Synthese von PI3,4P₂ und PI3,5P₂ verantwortlich sein könnte (Stevenson *et al.*, 2000). Bei osmotischem Stress steigt je nach Pflanzenart der Gehalt an PI3,5P₂ oder an PI4,5P₂. PI3,5P₂ kann bei Hyperosmose die Vakuolenoberfläche aufrechterhalten, indem es in Hefezellen die Vakuole fragmentiert (Yamamoto *et al.*, 1995). Die unterschiedliche Lokalisation der PIP-Kinasen in der Zelle ist verantwortlich für verschiedene PIP₂-Depots. Die Lokalisation der PIP-Kinasen wird von MORN-Motiven (*Membrane Occupation and Recognition Nexus*) in den Enzymen vermittelt, welche die Enzyme an die Plasmamembran verankern (Ma *et al.*, 2006). Durch unterschiedliche PIP₂-Konzentrationen in der Zelle kann auch die IP₃-Konzentration innerhalb einer Zelle variieren. Dieses ist eine wichtige Voraussetzung für das gerichtete Wachstum einer Zelle. Zu den kurzzeitigen Konzentrationsveränderungen können auch langfristige IP₃-Konzentrationserhöhungen beim Spitzenwachstum von Zellen oder beim gravitropen Wachstum Signale vermitteln (Franklin-Tong *et al.*, 1996; Perera *et al.*, 1999). In tierischen Zellen sind drei Isoformen eines IP₃-Rezeptors bekannt, die sich in ihrer Affinität zu IP₃ oder in der Calciumregulation unterscheiden (Patel *et al.*, 1999). In Pflanzen konnte bisher kein Gen identifiziert werden, das zu bekannten IP₃-Rezeptoren Homologien aufweist. Es wurde eine IP₃-induzierte Calciumausschüttung gemessen und diese Aktivität weiter lokalisiert. Es scheint einen IP₃-Rezeptor in Pflanzen zu geben, der in den meisten untersuchten Pflanzen in der Vakuolenmembran vorkommt (Krinke *et al.*, 2006). Der Abbau von IP₃ geschieht über Hydrolysierung durch eine Inositolpolyphosphat 1-Phosphatase (Brearley *et al.*, 1997). Im Unterschied zu tierischen Zellen scheinen Pflanzen auch durch IP₆ zur Calciumausschüttung veranlasst zu werden (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003).

Neben Inositolphosphaten übernimmt auch Phosphatidsäure (PA) eine wichtige Funktion bei der Weiterleitung von Signalen. Die Synthese von PA kann durch die Aktivierung der Phospholipase D oder auch durch Aktivierung der DAG-Kinase erfolgen. Je nach Stimulus wird nur einer oder beide Wege beschritten. PA wird bei verschiedenen osmotischen Stresssituationen, bei Temperaturschwankungen oder Pathogenbefall ausgeschüttet. Noch ist in Pflanzen wenig über die Aktivierung von Enzymen durch PA bekannt. ABI1 (*ABA insensitive 1*) und PDK1 (Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1) werden von PA beeinflusst (Anthony *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004); auch die Bindung weiterer Proteine wie der PEP-Carboxylase in *Arabidopsis* wird vermutet (Testerink und Munnik, 2005). ABI1 gehört zu den Protein Phosphatasen 2C und ist am Abscisinsäure (ABA)-induzierten Signalweg beteiligt. Durch ABA steigt die Konzentration an PA und ABI1 transloziert nach Bindung von PA zur Plasmamembran. Neben der Rolle bei der Proteinverankerung an die Membran, übernimmt PA weitere Aufgaben. Dazu gehört die Funktion als Botenstoff, bei dem es alleine aber auch zusammen mit anderen Molekülen Enzyme beeinflussen kann (Karathanassis *et al.*, 2002; Rizzo *et al.*, 1999) oder es kann als Substrat für die Synthese anderer Regulatoren wie Lyso-PA oder DAG dienen (Wang, 2004). Phosphatidsäure kann auch weiter zu Diacylglycerin-Pyrophosphat (DGPP) phosphoryliert werden (Munnik *et al.*, 1996). In Makrophagen aktiviert DGPP Phospholipase A₂ und hemmt so die Prostaglandinsynthese (Balboa *et al.*, 1999). Auch in Pflanzen wirkt DGPP als sekundärer Botenstoff, besonders im ABA-Signalweg (van Schooten *et al.*, 2006; Zalejski *et al.*, 2006). Die DGPP-Konzentration wird durch eine DGPP-Phosphatase erniedrigt. Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) sind verantwortlich für die Dephosphorylierung von DGPP zu PA und von PA zu DAG. In *Arabidopsis* sind vier Gene für LPPs gefunden worden. AtLPP1 wird bei genotoxischem Stress (UV_B-Strahlung, oxidativer Stress) v.a. in Blättern exprimiert (Pierrugues *et al.*, 2001), während AtLPP2 als Negativregulator bei der ABA-Signalkaskade in Keimlingen wirkt (Katagiri *et al.*, 2005).

Phospholipide können verändert oder durch Phospholipasen hydrolysiert und dadurch aktiviert werden. Die Funktion der Phospholipide spiegelt die Vielfalt der Prozesse bei der Signalweiterleitung wider.

1.3 Phospholipasen

Eine Übersicht der Reaktionen der verschiedenen Phospholipasen in Pflanzen liefert Abb 1-1. Die Vielfalt der physiologischen Auswirkungen an denen die Signalweiterleitung über Phospholipasen abläuft kann nur als grobes Schema dargestellt werden.

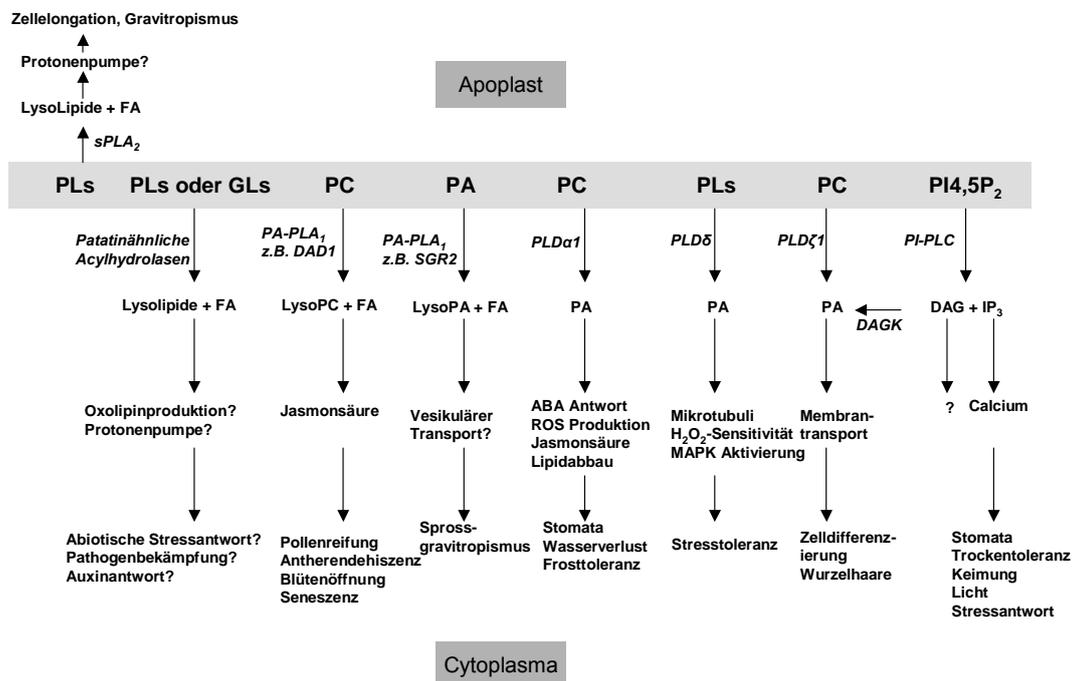


Abb 1-1: Die Reaktionen der Phospholipasen in Pflanzen und deren physiologische Effekte.

Die Substrate können an der Plasmamembran oder an anderen Membranen gebunden sein. Abk.: ABA: Abscisinsäure; DAD1: *Defender Against Apoptotic Death1*; DAG: Diacylglycerin; DAGK: DAG-Kinase; FA: Fettsäure; GL: Galactolipide; IP₃: Inositol 1,4,5-Triphosphat; PA: Phosphatidsäure; PC: Phosphatidylcholin; PI: Phosphatidylinositol; PI4,5P₂: Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat; PL: Phospholipide; PLA: Phospholipase A; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D, SGR2: *Shoot Gravitropism 2*. (Verändert nach Wang, 2004)

1.3.1 PLA

Phospholipasen A werden als PLA₁ (EC 3.1.1.32) oder PLA₂ (EC 3.1.1.4) bezeichnet, je nachdem, ob sie die Acylkette an der *sn1*- oder *sn2*-Position des

Phospholipids hydrolysieren. Können sie beide Acylketten angreifen, werden sie allgemein als Acylhydrolasen (EC 3.1.1.5, auch Phospholipase B) bezeichnet.

PLAs hydrolysieren Phospholipide zu freien Fettsäuren und Lysophospholipid. Freie Fettsäuren sind neben der Funktion als sekundäre Botenstoffe auch als Vorläufer von z.B. Jasmonsäure bekannt. Lysophospholipid fungiert ebenso als sekundärer Botenstoff und aktiviert H⁺-ATPasen in der Plasmamembran oder im Tonoplasten (Lee *et al.*, 2005a).

Eine Hydrolysierung von Phosphatidylcholin (PC) führt durch DAD1 (*Defender Against Apoptotic Death 1*), einem PLA₁-ähnlichen Enzym, zu Linolensäure, einem Vorläufermolekül der Jasmonsäure. Ein weiteres PLA₁-ähnliches Protein, SGR2 (*shoot gravitropism 2*) ist in Pflanzen bekannt. Dieses bevorzugt Phosphatidsäure als Substrat und dient dem Vesikeltransport (Wang, 2004).

Die PLA₂ in tierischen Zellen werden in drei Gruppen unterteilt. Dazu zählen die sekretorischen PLA₂ (sPLA₂), die calciumabhängigen PLA₂ (cPLA₂) und die intrazellulären calciumunabhängigen PLA₂ (iPLA₂). Zu zwei Gruppen wurden in Pflanzen Äquivalente gefunden. In *Arabidopsis* wurde eine sPLA₂ näher untersucht, die an der Zellelongation und dem gravitropen Wachstum beteiligt ist (Lee *et al.*, 2003).

Pflanzliche iPLA₂ ähneln den Patatinen. Diese haben eine unspezifische Acylhydrolase-Aktivität und werden bei Pathogenbefall aktiviert. Patatin-ähnliche Enzyme werden auch bei Trockenheit, Kälte, Salzstress und vielen anderen Stresssituationen induziert (Narusaka *et al.*, 2003). Ähnlichkeiten zu cPLA₂ sind in Pflanzen nicht bekannt.

1.3.2 PLD

Die Phospholipase D (EC 3.1.4.4) hydrolysiert Phospholipide an der terminalen Phosphodiesterbindung. So entsteht PA und eine freie Kopfgruppe. Im Gegensatz zu tierischen Zellen, nimmt PA in Pflanzen als Botenstoff eine weitaus bedeutendere Rolle als Diacylglycerin (DAG) ein. So erscheint es schlüssig, dass auch die Isoformen der PLDs in Pflanzen vielfältiger sind. Die Funktion von DAG als sekundärer Botenstoff in Pflanzen ist nicht nachgewiesen. Durch eine DAG-Kinase wird vermutlich das meiste DAG direkt zu PA phosphoryliert (Munnik, 2001). Zusätzlich zu den PLDs der Gruppe I, die im N-terminalen Bereich eine PX-

und eine PH-Domäne besitzen, haben Pflanzen PLDs, die anstelle derer eine C2-Domäne haben. Diese werden je nach Substratbindung und benötigter Calciumkonzentration in die Gruppen α - δ eingeteilt. Schon eine mikromolare Konzentration an Calcium induziert PLD β , γ und δ , die Aktivität von PLD α hingegen benötigt eine millimolare Calciumkonzentration (Pappan und Wang, 1999). Hierbei wird die Calciumabhängigkeit von der C2-Domäne vermittelt. PLD ζ , die zu den PLDs der Gruppe I zählt, wird von Calcium nicht beeinflusst (Qin und Wang, 2002).

PLDs sind an der Weiterleitung vieler abiotischer und biotischer Signale beteiligt. Die Regulation der PLD α 1 erfolgt über eine direkte Interaktion mit G-Proteinen (Lein und Saalbach, 2001). Diese Isoform ist in Pflanzen am häufigsten vertreten und ist bei der Weiterleitung der durch Abscisinsäure vermittelten Stresssituationen (Frost, Trockenheit) beteiligt (Wang, 2005). PLD β 1, γ 1 und γ 2 werden bei Verwundung exprimiert und leiten das Signal an eine MAP-Kinase weiter (Lee *et al.*, 2001).

1.3.3 PLC

Bei den Phospholipasen C wird zwischen den PC-Phospholipasen C und den phosphatidylinositolspezifischen PLCs (PI-PLC; EC 3.1.4.11) unterschieden, wobei im weiteren Verlauf auf die PI-PLCs näher eingegangen wird.

PI-PLCs hydrolysieren die dem Glyceringerüst zugewandte Phosphodiesterbindung von PI, PI 4 P und PI $4,5$ P $_2$, mit Präferenz zu Polyphosphatidylinositolen. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird das Substrat zu DAG und zyklischem Inositol 1,2-Phosphat gespalten, dann dieses zu azyklischem Inositolphosphat konvertiert (Katan, 1998). Viele PLCs sind spezifisch für Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PI $4,5$ P $_2$) und generieren Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP $_3$) und DAG (Meijer und Munnik, 2003). Die Aktivierung erfolgt über membranständige GTP-bindende Proteine (G-Proteine) oder durch Tyrosinkinasen (Rhee, 2001). In Hefe ist eine direkte Interaktion mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren bekannt (Ansari *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften werden in tierischen Zellen PI-PLCs in die Gruppen β , γ , δ , ϵ und ζ unterteilt (Rhee, 2001; Saunders *et*

al., 2002). Pflanzliche PLCs ähneln strukturell dem PLC ζ -Typ, wurden aber bis zur Entdeckung dieser Gruppe zu den PLC δ gezählt (Rebecchi und Pentylala, 2000). PLC δ bestehen aus einer PH-Domäne, bis zu vier EF-Hand Motiven, zwei katalytischen Domänen (X und Y) und einer C2-Domäne. Die PH-Domäne fehlt dem PLC ζ -Typ und allen bekannten pflanzlichen PLCs.

PLC ζ sind spermien- und embryospezifische Enzyme, die durch IP $_3$ -Freisetzung Ca $^{2+}$ -Oszillationen hervorrufen. Die Möglichkeit, PLC ζ durch eine, um die PH-Domäne gekürzte PLC δ zu ersetzen, führt nicht zu den erwarteten Ca $^{2+}$ -Oszillationen. Dafür scheint ein Aspartatrest in der katalytischen Domäne erforderlich zu sein (Saunders *et al.*, 2002).

Die PH-Domäne und die C2-Domäne der PLCs sind für die Membranverankerung verantwortlich (Essen *et al.*, 1996). Die PH-Domäne bindet an ein membranständiges PI4,5P $_2$ und verankert so das Protein in der Membran. Dieses PI4,5P $_2$ wird nicht hydrolysiert (Yagisawa *et al.*, 1998). Eine kompetitive Bindung von IP $_3$ kann PI4,5P $_2$ verdrängen und so dissoziiert PLC δ 1 von der Membran (Ananthanarayanan *et al.*, 2002). Dadurch wird eine *feedback*-Inhibierung der PLC ermöglicht (Rhee, 2001). Da auch pflanzlichen PLCs diese Domäne fehlt, muss die Membranbindung durch andere Interaktionen, möglicherweise durch alleinige Bindung der C2-Domäne an Membrankomponenten, vollzogen werden (Otterhag *et al.*, 2001).

C2-Domänen sind allgemein für eine calciumabhängige Membranbindung verantwortlich. Die C2-Domäne der PLC β interagiert jedoch nicht mit Membranbestandteilen, sondern direkt mit α -Untereinheiten von G-Proteinen (Rhee, 2001). EF-Hand Motive können ebenfalls Calciumionen binden. Dadurch kann die Bindung von PIP $_2$ an die PH-Domäne gestärkt werden. Die EF-Hand stellt auch eine flexible Verbindung zwischen der PH-Domäne und dem restlichen Enzym her. In pflanzlichen PLCs wird eine EF-Hand-ähnliche Domäne oft als N-Domäne bezeichnet. Diese entspricht dem dritten und vierten EF-Hand Motiv tierischer PLC-Strukturen. Den N-Domänen der pflanzlichen PLCs wird eher eine katalytische als eine lipidbindende Funktion zugesprochen, da bei Deletion der ersten 36 Aminosäuren der PLC2-Isoform in *Arabidopsis* die PIP $_2$ -Hydrolyse ausbleibt (Otterhag *et al.*, 2001).

Pflanzliche PLCs unterteilen sich in Typ I und Typ II Phospholipasen C (Drobak, 1992). Eine Gruppierung lässt sich aufgrund der biochemischen Eigenschaften vornehmen, die sich hinsichtlich Substrataffinität, Calciumabhängigkeit und Lokalisation unterscheiden (Irvine *et al.*, 1980). Dieses Modell ist angelehnt an das Modell tierischer PLCs, bei denen sich cytosolische und membranständige PLCs in Substratbindung und im Calciumbedarf unterscheiden. Typ I PLCs hydrolysieren bevorzugt PI und benötigen millimolare Calciumkonzentrationen. Sie wurden in der löslichen Proteinfraction mehrerer Pflanzen (*Allium cepa*, *Apium graveolens*, *Glycine max*, *Narcissus* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum*) gefunden (Irvine *et al.*, 1980; Melin *et al.*, 1987; Pfaffmann *et al.*, 1987). Typ II PLCs präferieren PI_{4,5}P₂ und benötigen mikromolare Calciumkonzentrationen. Die Aktivität dieser Enzyme liegt überwiegend in der Membran. Einige Ausnahmen von dieser Klassifizierung sind bekannt. In der cytosolischen Komponente von *Glycine max* konnten neben PI-hydrolysierenden Fraktionen auch Aktivitäten gegenüber PIP und PIP₂ gemessen werden (Park *et al.*, 2002; Pfaffmann *et al.*, 1987). Nur teilweise gereinigtes Protein der Membranfraktion von *Oryza sativa* zeigt Aktivität bei der Hydrolyse von PIP und PIP₂, vollständig gereinigtes Enzym allerdings verliert diese Aktivität und hydrolysiert PI (Yotsushima *et al.*, 1993).

An welchen Signalwegen PLCs in Pflanzen beteiligt sind und wie diese reguliert und aktiviert werden, ist noch nicht ausreichend geklärt. Ob eine Aktivierung der pflanzlichen PLCs auch durch G-Proteine möglich ist, ist nicht nachgewiesen. In *Arabidopsis* lassen sich Gene für GCR1 (ein Homolog der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)), GPA1 (eine mögliche G α -Untereinheit) und AGB1 (eine mögliche G β -Untereinheit) finden. Eine Interaktion dieser Proteine im Zusammenhang mit Phospholipasen wurde noch nicht gezeigt (Apone *et al.*, 2003).

Gene für PLCs sind in vielen Pflanzen gefunden worden. Einige wurden heterolog exprimiert und biochemisch charakterisiert. Dazu zählen u.a. AtPLC1, AtPLC2 und AtPLC6 aus *Arabidopsis* (Hirayama *et al.*, 1995; Otterhag *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2004), *Glycine max* (Shi *et al.*, 1995), *Nicotiana tabacum* (Helling *et al.*, 2006), *Pisum sativum* (Venkataraman *et al.*, 2004) oder drei PLC-Isoformen von *Solanum tuberosum* (Kopka *et al.*, 1998a). Sie hydrolysieren PI_{4,5}P₂ bei mikromolaren Calciumkonzentrationen und bei millimolaren Konzentrationen in geringerer

Menge auch PI. Eine Ausnahme ist die PLC aus *Pisum sativum*, die keines der beiden Substrate hydrolysiert.

Arbeiten der letzten Jahre zu PI-PLCs haben die molekularbiologische Ebene näher charakterisiert. Die Genexpression der PLCs aus *Brassica napus* (Das *et al.*, 2005), *Vigna radiata* (Kim *et al.*, 2004) oder *Zea mays* (Zhai *et al.*, 2005) wurde näher untersucht. Einige der Gene werden konstitutiv exprimiert (*AtPLC2*, *StPLC3*, *VrPLC1*, *VrPLC2*), während andere bei verschiedenen Stresssituationen induziert werden (z.B. *AtPLC1*, *AtPLC6*, *BnPLC2*, *StPLC1*, *StPLC2*, *VrPLC3*, *ZmPLC*). Auch gewebespezifische Expressionen sind möglich (Kopka *et al.*, 1998a; Venkataraman *et al.*, 2004).

Pflanzliche PLCs scheinen mit verschiedenen physiologischen Prozessen in Verbindung zu stehen. Häufig sind sie an der Weiterleitung von Signalen beteiligt, bei denen ABA als Stresshormon ausgeschüttet wird. Dazu gehören osmotische Veränderungen und Temperaturschwankungen. Die durch ABA regulierte Schließzellbewegung geht mit der Aktivierung einer PLC einher (Hirayama *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Sanchez und Chua, 2001). Auch Lichtveränderungen und Verwundung werden zum Teil über Expressionserhöhung mancher PLC-Isoformen vermittelt (Kopka *et al.*, 1998a; Venkataraman *et al.*, 2004).

Neben den Messungen des Expressionsanstiegs der PLCs bei Umweltschwankungen konnte auch die Bestimmung der Reaktionsprodukte oder Inhibitorstudien einen indirekten Nachweis zur Beteiligung von PLCs liefern. Der Anstieg von IP_3 und Calcium nach Behandlung mit Salz (Dewald *et al.*, 2001) wurde gemessen oder die Beteiligung von PLCs beim Pollenschlauchwachstum (Franklin-Tong *et al.*, 1996), bei der Wurzelknöllchenbildung (den Hartog *et al.*, 2001), bei Blaulichtantworten (Harada *et al.*, 2003) und beim Gravitropismus (Perera *et al.*, 2001) durch Behandlung mit dem PLC-Inhibitor U73122 postuliert.

Eine Übersicht über die unterschiedlichen Funktionen der PLC-Isoformen einer Pflanze liefert *Arabidopsis*, in deren Genom neun plc-kodierende Gene gefunden wurden (*AtPLC1-AtPLC9*). *AtPLC1* wird bei vielen Stresssituationen (Kälte, Salzstress, Trockenheit) induziert und ist an dem durch ABA induzierten Signalweg beteiligt (Hirayama *et al.*, 1995; Sanchez und Chua, 2001). *AtPLC2* und *AtPLC3* dagegen werden konstitutiv exprimiert (Hunt *et al.*, 2004; Otterhag *et al.*, 2001). *AtPLC6* wird v.a. durch Kälte induziert, eine leichte Expressionssteigerung

ist auch durch exogenes ABA, Salz und Hitze messbar (Xu *et al.*, 2004). Die Sequenz für *AtPLC7* scheint eine Mutation zu beinhalten, die zu einem gekürzten Protein führen würde und ist noch nicht weiter charakterisiert (Hunt *et al.*, 2004). Durch den Verlust konservierter Aminosäuren, die für die PLC-Aktivität verantwortlich sind, scheinen *AtPLC8* und *AtPLC9* für inaktive Enzyme zu kodieren (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Dennoch scheinen auch diese Gene gewebespezifisch reguliert zu werden und *AtPLC1-AtPLC6* auch funktionelle Proteine zu kodieren (Hunt *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). In *Physcomitrella patens* sind zwei PLC-Isoformen (*PpPLC1* und *PpPLC2*) genauer untersucht worden (Repp, 2004).

1.4 Das Modellsystem *Physcomitrella patens*

Physcomitrella patens gehört bei den Bryophyta (Laubmoosen) zu den Funariaceae und weist einen heteromorphen heterophasischen Generationswechsel auf (Abb 1-2).

Die dominierende haploide Gametophytengeneration bietet einen einfachen Zugang für genetische Arbeiten, was *Physcomitrella patens* zum beliebten Modellorganismus macht (Cove *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 1991). Der Einbau von Fremd-DNA in das Genom von *Physcomitrella patens* erfolgt über homologe Rekombination, so dass sich gezielt Gene oder Bereiche im Genom verändern lassen (Schaefer und Zryd, 1997). Gerichteter Genaustausch über homologe Rekombination tritt in *Physcomitrella patens* im Vergleich mit illegitimer Rekombination wesentlich häufiger auf als in anderen Pflanzen, so dass ein gezieltes Ausschalten von Genen möglich ist (Schaefer, 2001). So konnten in vergangener Zeit zahlreiche Funktionen einzelner Gene aufgeklärt werden (Imaizumi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005b; Sakakibara *et al.*, 2003; Strepp *et al.*, 1998; Thelander *et al.*, 2004).

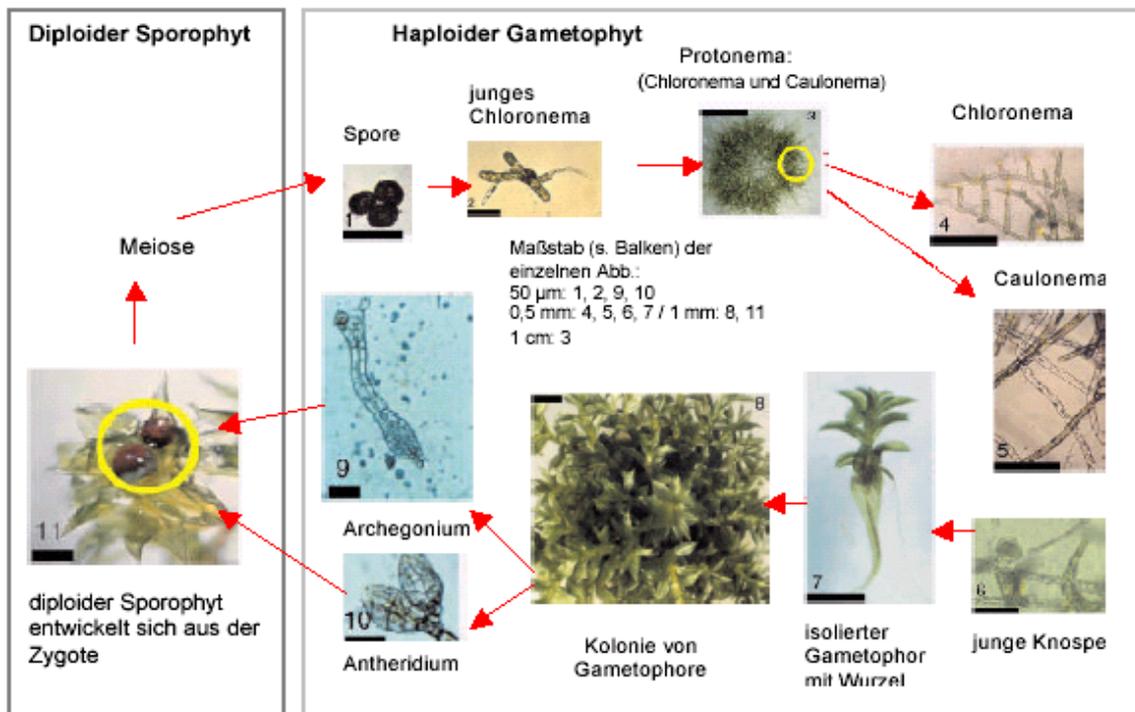


Abb 1-2: Der Generationswechsel von *Physcomitrella patens*.

- (1) Spore,
- (2) lichtabhängige Sporenskeimung,
- (3) 15 Tage alte Protonematakolonie,
- (4) Chloronema,
- (5) Caulonemazellen,
- (6) Erscheinen einer junger Knospe,
- (7) Gametophors,
- (8) Gametophorenkolonie (4 Wochen alt),
- (9) ein Archegonium,
- (10) zwei Antheridien,
- (11) diploider Sporophyt.

Der ganze Lebenszyklus kann unter optimalen Bedingungen in weniger als 12 Wochen ablaufen. (Verändert nach Schaefer und Zryd, 2001)

Das Arbeiten mit *Physcomitrella patens* birgt weitere Vorteile. Der Lebenszyklus wird in etwa drei Monaten durchlaufen. Beginnend mit einer Spore keimt ein Protonema aus, welches sich in zwei Zelltypen unterscheiden lässt. Zum einen den Chloronemata, chloroplastenreiche etwa 100-250 µm lange Zellen mit geraden Querwänden und zum anderen den Caulonemata, die sich unter Einfluss von Auxin und Licht nach etwa sechs Tagen differenzieren. Die Zellen sind bis zu 400 µm lang mit schrägen Querwänden und haben elliptische, kleinere und weniger Chloroplasten (Schumaker und Dietrich, 1997). Sie sind regelmäßig verzweigt und teilweise entwickeln sich Moosknospen, aus denen nach Bildung

einer dreischneidigen Scheitelzelle Moospflanzen (Gametophoren) entstehen. Darauf wird später der Sporophyt ausgebildet. Die Wirkung von Phytohormonen bei *Physcomitrella patens* ähnelt in vielerlei Hinsicht der bei Spermatophyten (Schumaker und Dietrich, 1997). Dadurch lassen sich hilfreiche Schlussfolgerungen auf das komplexe Zusammenspiel von Hormonen bei Pflanzen ziehen. So wird z.B. die Bildung von Moosknospen durch Cytokinin vermittelt (Bopp und Atzorn, 1992). Inhibitorstudien konnten zeigen, dass Calcium eine Rolle bei dieser Induktion der Moosknospe spielt (Hahm und Saunders, 1991; Schumaker und Gizinski, 1996). Zudem zeigen Untersuchungen an *PpPLC1*, dass durch *knockout* des Gens die durch Cytokinin vermittelte Knospenbildung ausbleibt. Die Mutanten sind auch im gravitropen Wachstum gestört, was auf einen gemeinsamen Signalweg über PLC1 in *Physcomitrella patens* schließen lässt (Repp *et al.*, 2004). Aus *Ceratodon purpureus*, einem weiteren Laubmoos aus der Familie der Ditrichaceae, wurden Untersuchungen an einer membranständigen PLC gemacht. Die Aktivität dieser PLC veränderte sich bei dunkeladaptierten Protonemata, die mit Rotlicht bestrahlt wurden. Auch eine Verschiebung des cytosolischen Calciums hin zur Rotlichtquelle konnte gezeigt werden. So wurde eine Beteiligung der PLC am Phototropismus in Moosen angenommen (Hartmann und Pfaffmann, 1990).

Eine weitere Phospholipase C in *Physcomitrella patens* (*PpPLC2*) wurde identifiziert und rekombinantes Protein isoliert. Biochemisch unterscheiden sich beide Isoformen hinsichtlich Substrataffinität und Calciumbedarf. *PpPLC1* entspricht dem Typ II der pflanzlichen PLCs, während *PpPLC2* PI bei millimolaren Calciumkonzentrationen hydrolysiert und somit dem Typ I pflanzlicher PLCs angehört (Mikami *et al.*, 2004).

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Funktion von PLC2 aus *Physcomitrella patens*. Dieses Enzym ist das erste rekombinante Protein, das biochemisch dem Typ I pflanzlicher PLCs entspricht. Ein direkter Bezug zwischen diesem Typ und der dazugehörigen Sequenz anderer Pflanzen wurde nicht hergestellt. Umgekehrt wurde bisher auch kein rekombinantes Protein gereinigt, das biochemisch dem Typ I der PLCs entsprach.

Es werden in Datenbanken weitere Typ I PLC-Sequenzen gesucht, um Vergleiche mit anderen Pflanzen herstellen zu können. Möglicherweise kann ein Bezug zu älteren biochemischen Daten mit nachträglich annotierten Sequenzen hergestellt werden.

Da alle bisherigen Typ I PLCs in Pflanzen in der löslichen Fraktion gemessen wurden, ist die Lokalisation von *PpPLC2* in der Zelle von Interesse. Diese soll zunächst mithilfe von GFP-Fusionsproteinen untersucht werden.

Rückschlüsse auf die Rolle des Enzyms können anhand von *knockout*-Mutanten gezogen werden. Diese werden isoliert und anschließend physiologisch untersucht. Dabei sollte geklärt werden, in welcher Weise die Mutanten in Entwicklung und Wachstum beeinträchtigt sind. Die Beteiligung der PLC2 an entsprechenden Signalwegen kann dadurch postuliert werden und weiterhin kann analysiert werden, inwiefern diese Signalwege mit denen der Spermatophyten vergleichbar sind. Durch Expressionsstudien kann eine Induktion der Proteine durch verschiedene abiotische oder biotische Faktoren überprüft werden. Ein weiterer Vergleich zu den Daten von PLC1 aus *Physcomitrella patens* soll stattfinden. Weiterhin werden mögliche Interaktionen mit anderen Enzymen untersucht.

In *Physcomitrella patens* lassen einige EST-Sequenzen auf weitere PLC-Isoformen schließen. Es ist vorgesehen, diese aus der DNA zu isolieren und näher molekularbiologisch zu analysieren. Mit diesen Sequenzen lassen sich rekombinante Proteine herstellen, die mit den bekannten Daten verglichen werden können.