

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Biochemikalien und Geräte

Handelsübliche Chemikalien in p. A.-Qualität wurden von den Firmen Appli Chem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), VWR (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Biochemikalien und Enzyme stammten von Boehringer (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), VWR, New England Biolabs (Frankfurt/Main), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich oder Stratagene (Amsterdam, NL).

Für Zentrifugationen kleiner Volumina bei Raumtemperatur (RT) wurde eine Tischzentrifuge der Firma Heraeus (Hanau) Modell Biofuge *pico* verwendet; für Zentrifugationen kleiner Volumina bei 4 °C wurde das Modell Biofuge 28RS, Rotor Nr. 3740 verwendet. Für Zentrifugationen größerer Volumina stand eine Kühlzentrifuge RC-5B Refrigerated Superspeed (Sorvall, Langenselbold) wahlweise mit den Rotoren GS-3 oder GSA zur Verfügung. Zentrifugationen mit einem schwenkbaren Rotor Nr. 11140 wurden mit einer Zentrifuge der Firma Sigma Modell 4K10 durchgeführt.

Das Wachstum der Kulturen und der erfolgte Aufschluß der Zellen wurde mit dem Binokular (Nikon, Düsseldorf) oder mit dem Mikroskop (Zeiss, Jena) untersucht. Fotos wurden mit einer Digitalkamera (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen.

2.1.1 Wasser

Für alle Experimente wurde Reinstwasser verwendet (Vivendi Water Systems, Ransbach). Für Versuche, die unter RNase-freien Bedingungen durchzuführen waren, wurde mit 0,1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetztes, Reinstwasser verwendet, welches nach Zugabe von DEPC für 20 min bei 120 °C autoklaviert wurde (Varioklav Dampfsterilisator, H + P, München).

2.1.2 Ethanol

Zur Desinfektion wurde 70 % Ethanol (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Berlin) benutzt.

2.2 Organismen

2.2.1 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5α mcr^r

Escherichia coli BL21 DE3

Escherichia coli XL-1-Blue

Escherichia coli OneShot TOP10 (Invitrogen)

2.2.2 Hefestamm

Saccharomyces cerevisiae cdc25H

2.2.3 Pflanzenmaterial

Physcomitrella patens Wildtyp WTDC (Ashton und Cove, 1977)

Physcomitrella patens PpPLC1 *knockout*-Mutanten (Repp *et al.*, 2004)

Physcomitrella patens PpPLC2 *knockout*-Mutanten (Repp, 2004 und diese Arbeit)

2.3 Herkunft der verwendeten Sequenzen

Aktin: Act1-Gen AY382282

Phospholipasen C, mRNA-Sequenz :

plc1 AB114834

plc2 AB117760

plc3 Sequenzierung am National Institut of Basic Biology (NIBB) in Okazaki, Japan durchgeführt

plc4 Sequenzierung am NIBB durchgeführt

Phospholipasen C, DNA-Sequenz:

plc1 (Repp, 2004)

plc2 (Repp, 2004)

plc3 Sequenzierungen am NIBB durchgeführt

plc4 (diese Arbeit)

2.4 Moosanzucht

2.4.1 Medien

Für die Kultivierung von *Physcomitrella patens* wurde steriles BCE-Festmedium (pH 6,5) mit folgender Zusammensetzung hergestellt und in 50 mm oder 90 mm-Petrischalen gegossen (Ashton *et al.*, 1979):

Substanz	Endkonzentration
KNO ₃	10,0 mM
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5,0 mM
CaCl ₂	2,0 mM
KH ₂ PO ₄	2,0 mM
MgSO ₄	1,0 mM
C ₆ H ₅ FeO ₇	10,0 µM
H ₃ BO ₄	10,0 µM
MnCl ₂	2,0 µM
CoCl ₂	0,2 µM
CuSO ₄	0,2 µM
KJ	0,2 µM
ZnSO ₄	0,2 µM
Na ₂ MoO ₄	0,1 µM
Agar	1,0 %

Wenn nötig wurden dem Standardmedium nach dem Autoklavieren folgende Substanzen sterilfiltriert zugesetzt:

Substanz	Endkonzentration
Mannitol	50 - 800 mM
Natriumchlorid	50- 600 mM
Glucose	10 mM
Abcisinsäure (ABA)	10- 1000 µM
Benzylaminopurin (BAP)	0,1-100 µM
Indol-2-Essigsäure (IAA)	1- 1000 µM
Hygromycin B (C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₁₃)	57 µM
G418 (C ₂₀ H ₄₀ ON ₄ H ₂ SO ₄)	43 µM

2.4.2 Kultivierung

Die Kultivierung des verwendeten Pflanzenmaterials erfolgte in einer Klimakammer mit einer konstanten Temperatur von 20 °C auf BCE-Festmedium. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren (Philips TL65W/25RS) und die Kulturen wurden pro Tag für 16 h unter Lichtbedingungen von $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, beleuchtet. Um die Reflexion zu verbessern, standen die Petrischalen mit den Kulturen auf einem mit Alufolie bedeckten Tisch. Zur Erhaltung des Protonemastadiums wurden die Kulturen in einem ein- bis zweiwöchigen Abstand mithilfe eines Ultra-Turrax-Stabes T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) etwa 10 s lang in BCE-Flüssigmedium ohne Agar zerkleinert. Anschließend wurden sie auf neues BCE-Festmedium überführt. Die Petrischalen wurden mit luftdurchlässigem *Micropore*-Vliespflaster (3M, Neuss) verschlossen. Für die Behandlung mit o.g. Phytohormonen, NaCl oder Mannitol wurden die Protonemata auf Petrischalen mit Cellophanfolie (Hans Schütt, Halstenbek) gebracht.

Für die Untersuchung des Wachstums im Dunkeln wurden die Protonemata dünn auf einer horizontalen Linie auf cellophanbeschichtetem Medium (mit 0,2 % Glucose) gestrichen. Die Petrischale wurde so in einer Halterung befestigt, dass sie vertikal ausgerichtet war und die Filamente entlang des Mediums wachsen konnten.

2.5 Moostransformation

Die PEG- vermittelte Transformation von *Physcomitrella patens* wurde nach etablierten Bedingungen durchgeführt (Schaefer *et al.*, 1991). Alle benötigten Lösungen wurden vor Beginn der Transformation autoklaviert und sämtliche Arbeiten erfolgten bei RT unter der Sterilbank.

Lösung	Konzentration	Substanz
Mannitollösung:	8 %	D-Mannitol in H ₂ O
Driselaselösung:	2 %	Driselase (1,5 U mg ⁻¹) in 8 %-Mannitol-Lösung Die Lösung wurde für 15 min bei RT inkubiert und hinterher für 5 min bei 5000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert.
MMM-Lösung:	15 mM	MgCl ₂
	8 %	D-Mannitol
	0,1 %	MES pH 5,6
PEG-Lösung:	100 mM	Ca(NO ₃) ₂
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	40 %	PEG 6000
	8 %	D-Mannitol
Recovery-Lösung:	10 mM	CaCl ₂
	5 mM	C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆
	8 %	D-Mannitol in BCE
	0,5 %	Glucose
Protoplasten- Regenerations-Medium, <i>bottom-layer</i> (PRMB):	10 mM	CaCl ₂
	5 mM	C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆
	8 %	D-Mannitol in BCE
	0,8 %	Agar
<i>top-layer</i> (PRMT):	10 mM	CaCl ₂
	5 mM	C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆
	8 %	D-Mannitol in BCE
	0,5 %	Agar

Etwa 1 g 5-7 Tage alte Protonemata wurden für die Transformation verwendet und in 15 mL Driselaselösung für 45 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert, um die Zellen zu protoplastieren. Dieser Vorgang wurde dabei unter dem Binokular beobachtet. Die gewonnenen Protoplasten wurden durch ein Nylonnetz (Porengröße: 80 µm) von dem restlichen Zellmaterial getrennt und durch Zentrifugation bei 200 g für 3 min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 15 mL 8 % Mannitollösung resuspendiert. Die so gewaschenen Protoplasten wurden erneut für 3 min bei 200 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem Waschvorgang wurde das Pellet in 10 mL 8 % Mannitollösung aufgenommen und die

Protoplastenanzahl unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) bestimmt. Daran schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 200 g für 3 min an. Die pelletierten Protoplasten wurden in MMM-Lösung resuspendiert, wobei das Volumen so gewählt wurde, dass eine Endkonzentration von $1,6 \times 10^6$ Protoplasten pro mL MMM-Lösung erreicht wurde. 30 µg Plasmid-DNA (DNA-Konzentration $1,0\text{-}3,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) wurden in 15 mL Reaktionsgefäßen mit 300 µL PEG sowie 300 µL Protoplasten-MMM-Suspension vermischt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 45 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 x 300 µL und 5 x 1 mL 8 % Mannitollösung im Abstand von 3 min dazugegeben, wobei nach jeder Zugabe der Ansatz vorsichtig gemischt wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 200 g für 3 min. Das Pellet wurde in 5 mL Recovery-Lösung resuspendiert und der Ansatz für 24 h im Dunkeln bei 20 °C inkubiert. Nach 24 h wurde der Ansatz erneut bei 200 g für 3 min zentrifugiert, das Pellet wurde mit 3 mL geschmolzenem PRMT-Medium (42 °C) versetzt und auf mit Folie belegten PRMB-Agarplatten verteilt. Nach 5 Tagen Inkubation im Licht wurden die Folien auf BCE-Petrischalen oder auf Selektivmedium (BCE mit G418 oder Hygromycin) übertragen.

2.6 Fluoreszenz-Mikroskop

Die mit GFP oder GFP-Konstrukten transformierten Mooszellen wurden nach Transfer auf BCE-Festmedium unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Göttingen) beobachtet. Unterschiedliche Filtersysteme sorgten für eine Anregung mit blauem Licht (450–490 nm), um dann die vom GFP-Protein emittierte Fluoreszenz bei 520 nm zu betrachten. Dazu wurde das Filtersystem 1: Anregung: 450–490 nm; Emission: ab 515 nm und das Filtersystem 2: Anregung: 450–490 nm; Emission: 515–565 nm, verwendet.

Die transformierten Mooszellen wurden entweder durch den Boden der Petrischalen im Agar oder nach vorheriger Überführung auf einen Objektträger mit Deckglas bei 100-1000facher Vergrößerung mikroskopiert.

2.7 Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (CLM)

Für eine verbesserte Auflösung der Fluoreszenz von *plc2::GFP*-Fusionsplasmiden wurde die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie eingesetzt. Dabei kam es zu einer Zusammenarbeit mit Dr. B. Wiesner am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, mit dessen Hilfe Aufnahmen angefertigt wurden. Um die GFP-Fluoreszenz zu untersuchen, wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei 543 nm aufgenommen. Zusätzlich wurde bei 560 nm die Fluoreszenz von Chlorophyll aufgenommen, die bei einer Anregung bei 488 nm ebenfalls auftritt.

2.8 DNA-Isolierung/ Hitzeaufschluß

Die DNA aus *Physcomitrella patens* wurde mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) nach (Rogers und Bendich, 1985) isoliert. Dazu wurde etwa 100 mg FG mit 250 µL Extraktionspuffer und etwas Seesand vermischt und mit einem Kunststoff-Pistill in einem Homogenisator (Braun Melsungen, Melsungen) bei 1000 rpm zerkleinert.

Substanz	Konzentration
NaCl	1,0 M
Tris/HCl pH 8,0	100,0 mM
EDTA pH 8,0	20,0 mM
CTAB	1,5 %
PVP (MW 40000)	1,0 %
β-Mercaptoethanol	0,5 %

Das Homogenat wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend mit 200 µL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach einer Isopropanolfällung und Ethanolreinigung mit 70 % Ethanol wurde das Pellet in 20 µL TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert.

Für ein Screening der putativen Transformanten wurde die DNA durch einen Hitzeaufschluß aus den Zellen gelöst und nicht weiter gereinigt (verändert nach Hohe *et al.*, 2004). Dazu wurden 1-5 mg Protonemata in 30 µL Aufschlusspuffer für 30 min bei 45 °C, dann für 10 min bei 68 °C inkubiert. Davon wurden 0,1 µL in einem PCR-Ansatz als Matrize eingesetzt. Der Aufschlusspuffer setzte sich zusammen aus:

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 8,8	750 mM
Ammoniumsulfat	200 mM
Tween 20	0,1 %

2.9 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mithilfe des TRIzol-Reagenzes und den dazugehörigen Protokollen der Firma Invitrogen.

Die Arbeiten wurden mit RNase-freien Lösungen und Materialien durchgeführt. Die Moosproben (ca. 100–200 mg) wurden in einem, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser für ca. 5 min zerkleinert, bis die Zellen einheitlich aufgeschlossen waren. Das Moospulver wurde dann mit 1 mL TRIzol Reagenz gemischt und für 5 min bei RT zur Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 50 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 200 µL Chloroform versetzt, kräftig vermengt, für 10 min bei RT inkubiert und wiederum für 10 min bei 50 000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µL Isopropanol versetzt, vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 min bei 50 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und es folgte ein Waschvorgang mit 1,2 mL 75 % Ethanol, welches dann, nach erneuter Zentrifugation für 5 min, wiederum sorgfältig entfernt wurde. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 50–75 µL DEPC-Wasser bei 68 °C gelöst. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurden durch die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 300 nm im Spektralphotometer Uvikon XS (Bio-Tek-Instruments, Vermont, USA) gemessen. Für eine ausreichende Reinheit liegt der Faktor $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ zwischen 1,8 und 2. Zudem wurde der RNA-Gehalt wie folgt berechnet:

$$E_{260\text{ nm}} - E_{300\text{ nm}} \cdot 40\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{Verdünnung} = \text{RNA-Gehalt (ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}\text{)}$$

Die Zahl 40 stellt einen RNA-spezifischen Faktor dar, der einer Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht, die ungefähr $40\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ RNA enthält. Aufbewahrt wurde die RNA bei -75 °C .

2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für PCR-Amplifikationen von DNA-Fragmenten wurden für 0,6 mL Reaktionsgefäße ein Biometra Trio Thermoblock Thermocycler (Biometra, Göttingen) oder für 0,2 mL Reaktionsgefäße ein Biometra T*Gradient* Thermocycler verwendet. Die Reaktionen wurden mit thermostabiler DNA-Polymerase mit Taq-Exonukleaseaktivität der Firma Roboklon (Berlin) oder ohne Taq-Exonukleaseaktivität, hergestellt nach Perkin Elmer (Rodgau), durchgeführt. Für größere Amplifikate (etwa ab 4 kbp) wurde TaKaRa Ex Taq (TaKaRa; Taufkirchen) mit beiliegendem Puffer verwendet. Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ (Berlin) hergestellt. Die Sequenzen, Annealing-Temperaturen sowie eine kurze Beschreibung der verwendeten Primer befindet sich im Anhang I. Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten eingesetzt:

Stammlösung	20 µL Ansatz	Konzentration im Ansatz
10 x Puffer*	2 µL	
MgCl ₂ , 25 mM	1,4 µL	1,75 mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 2,5 mM	1,6 µL	je 0,2 mM
Oligonukleotid 1 (<i>forward</i>), 100 µM	0,1 µL	0,5 µM
Oligonukleotid 2 (<i>revers</i>), 100 µM	0,1 µL	0,5 µM
Taq-Polymerase, 5 U·µL ⁻¹	0,1 µL	0,5 unit
Matrize		s.u.

*Puffer (nach Perkin Elmer): 100 mM Tris/HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine
 oder Puffer (nach Roboklon): 100 mM Tris/HCl pH 9,1; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,1 % Triton X-100

Für das Screening von Bakterienkolonien wurde als Matrize mit einem Zahnstocher in die Kolonie und dann in den Reaktionsansatz gestochen. Von gereinigten Plasmiden wurden etwa 1 ng DNA als Matrize verwendet, von DNA-Gemischen etwa 100 ng DNA.

Die Länge der Elongationszeit (t_E) richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die geeignete Annealing-Temperatur (T_m) wurde für die verwendeten Primer mithilfe der Formel

$$T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)$$

berechnet (Wallace *et al.*, 1979).

Die benutzten PCR-Programme liefen folgendermaßen ab:

PCR-Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vordenaturierung	96 °C	180 s	1
Denaturierung	96 °C	30 s	
Annealingphase	T_m °C	30 s	30
Elongationsphase	68 °C	t_E s	
Nachelongation	68 °C	300 s	1

2.11 Reinigung von DNA-Fragmenten

Wenn nötig wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mit einem Kit der Firma Qiagen (QiAquick) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Mit diesem Kit wurden auch die Reinigungen nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dieses war bei großen Mengen DNA nötig, z.B. nach Inkubation eines Plasmides mit einem Restriktionsenzym (s.u.).

Das präparative Agarosegel bestand aus 1 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0) und $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromid. Es wurde nach Verflüssigung in die Gelkammer gegeben, bis zum Erstarren abgekühlt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Probe wurde mit 10 x Probenpuffer (8 mM Xylencyanol FF; 6 mM Bromphenolblau; 60 % Glycerin in TE-Puffer) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für etwa 1,5 h bei 80 V. Das gewünschte DNA-Fragment wurde auf einem UV_B-Transilluminator identifiziert, aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend gereinigt (s.o.).

2.12 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte, Restriktionsverdauung und RT-PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese auf deren Größe und Reinheit überprüft. Es wurde 1–2 % Agarose in TBE-Puffer (450 mM Tris/HCl pH 8,0, 450 mM Borsäure, 10 mM EDTA) erhitzt und in einer Gelkammer bis zum Erstarren abgekühlt. Das Gel wurde in einer Gelkammer mit TBE-Puffer bedeckt. Der Auftrag wurde mit 10 x Probenpuffer (s.o.) versehen und in die Geltaschen pipettiert. Die Gellaufzeit betrug etwa eine Stunde bei einer Spannung von 180–200 V. Das Gel wurde anschließend in einer $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und mit Hilfe eines UV_B-Transilluminators (UV-Apparatur und Kamera von raytest, Straubenhardt) fotografiert.

2.13 Bestimmung der Bandenstärke in einem Agarosegel

Zur Bestimmung der relativen Expression der Gene in *Physcomitrella patens*, wurde nach erfolgter RT-PCR und anschließender gelelektrophoretischer Trennung die Bandenstärke gemessen. Dieses wurde am NIBB in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Hasebe durchgeführt. Die Leuchtkraft der durch Ethidiumbromid gefärbten Bande wurde durch Bestimmung der Pixelzahl mittels eines Laserscanners (FMBIO II Multi View, Hitachi, Tokio, Japan) gemessen.

2.14 Synthese von cDNA

Bei dieser Methode wurde ein Oligo(dT)-Nukleotid (J 62) eingesetzt, das im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisiert. Die durch die RNA-Extraktion erhaltene mRNA wird dadurch aus der Gesamt-RNA selektiv in cDNA umgeschrieben.

Es wurde 1–5 μg isolierter RNA mit 2 pmol Oligonukleotid J62 (s. Anhang I) versetzt. Mit DEPC-Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 6 μL aufgefüllt. Dabei wurden immer die gleichen Gesamt-RNA Mengen umgeschrieben. Es folgte der Schmelzvorgang:

Temperatur	Zeit
70 °C	60 s
80 °C	30 s
4 °C	30 s
70 °C	180 s

Danach wurden die Proben auf Eis aufbewahrt, bevor dann folgende Substanzen nacheinander hinzugefügt wurden:

Stammlösung	10 µL Ansatz	Konzentration im Ansatz
5x Puffer*	2,0 µL	
DTT 0,1 M	1,0 µL	10 mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 10 mM	0,5 µL	je 0,5 mM
M-MLV RT H(-) Point Mutant 200 U·µL ⁻¹	1,0 µL	20 U
RNase Inhibitor 40 U·µL ⁻¹	0,5 µL	20 U

* 5 x Puffer (nach Promega): 250 mM Tris/HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM DTT

Der Ansatz wurde bei 42 °C für 50 min inkubiert. Danach folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 15 min. Die gewonnene cDNA konnte nun als Matrize in PCRs verwendet werden.

2.15 Northern Blot

Zur weiteren Quantifizierung von mRNA in *Physcomitrella patens* wurden im Rahmen der Staatsexamensarbeit von D. Rußmann und der Diplomarbeit von S. Klare erste Versuche zur Erstellung von Northern Blots unternommen (Klare, 2006; Rußmann, 2006). In beiden Arbeiten konnte die nötige Optimierung der Methode nicht erreicht werden, um diese zur Bestätigung der RT-PCR-Analysen zu verwenden. Für methodische Details wird auf diese Arbeiten verwiesen.

2.16 Sequenzanalysen

Die Suche nach Genen, zu denen die Sequenzen oder Sequenzabschnitte von Interesse Homologien aufweisen, erfolgte *via* Internet in der NCBI-Datenbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) über das Suchprogramm BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“, (Altschul *et al.*, 1997)). Die Sequenzvergleiche können dabei auf Nukleotidebene (BLASTn) oder auf Aminosäureebene (BLASTx und BLASTp) durchgeführt werden, wobei die eingegebene Sequenz mit den Sequenzen der Datenbank verglichen wird. Die Angabe über die Höhe der Homologie erfolgt entsprechend als Anzahl gleicher Nukleotide bzw. identischer und ähnlicher Aminosäuren in bezug auf den homologen Sequenzabschnitt. Die Homologie der beiden Sequenzen (Such- und Treffersequenz) wird anhand von Score und E-Wert definiert. Der Score gibt die Qualität der Übereinstimmung an, ist aber nicht normiert und somit abhängig von der eingegebenen Sequenzlänge. Der E-Wert berechnet sich aus dem Score und der Länge der Sequenz. Er gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die gefundene Sequenz nur zufällig mit der vorgegebenen Sequenz übereinstimmt. Je kleiner also der E-Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit dass zwei Sequenzen miteinander verwandt sind.

Für einen Vergleich mehrerer Sequenzen untereinander (Multiples Sequenzalignment) wurden die Aminosäuresequenzen im Server des Bioinformatik Centers der Universität Kyoto (<http://align.genome.jp/>) mit dem ClustalW-Programm analysiert. Anhand des multiplen Alignments werden die identischen Aminosäuren von je zwei Sequenzen in Prozent angegeben und es lassen sich homologe Bereiche und Lücken aller Sequenzen zueinander erkennen. Graphisch kann so ein Dendrogramm erstellt werden, in dem die Sequenzen nach ihrer relativen Identität in Gruppen dargestellt werden.

Für eine Suche von bekannten Proteindomänen oder Motiven in den PLC-Sequenzen wurde die PFAM-Datenbank des Sanger Institut-Servers (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>) genutzt. Für die Vorhersage einer möglichen Lokalisation der Proteine in der Zelle haben folgende Datenbanken gedient: TargetP und ChloroP vom Centes for Biological Sequence Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>), Predotar (<http://urgi.infobiogen.fr/~predotar/predotar.html>) und iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>).

2.17 Herstellung von Vektoren

2.17.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden bei der Herstellung von Vektoren

Für molekularbiologische Arbeiten wurden folgende Enzyme nach Herstellerangaben verwendet:

- T4 DNA-Ligase für die enzymatische Verknüpfung von DNA-Molekülen,
- CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) für Dephosphorylierungen von DNA-Enden,
- Klenow-Fragment und verschiedene Restriktionsenzyme zum spezifischen Schneiden von DNA.

2.17.2 Verwendete Plasmide

Für die Herstellung geeigneter Vektoren wurden folgende Plasmide verwendet:

Name	Modifikation	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pBlueskript KS ⁻	<i>EcoRV</i> ; T-Tailing	Standard-Plasmid für die Ligation mit Adenosin-Überhängen	Ampicillin	Stratagene
pBAS-GFP	<i>NcoI</i>	Plasmid mit Aktin-Promotor und GFP-Sequenz	Ampicillin	(Zeidler <i>et al.</i> , 1999)
pET28b	<i>NcoI/XhoI</i>	Plasmid mit Poly-CAT	Kanamycin	Novagen
pGFP	<i>NcoI</i>	Plasmid mit 35S-Promotor und GFP-Sequenz	Ampicillin	(Zeidler <i>et al.</i> , 1999)
pYFP	<i>NcoI</i>	Plasmid mit 35S-Promotor und YFP-Sequenz	Ampicillin	(Zeidler <i>et al.</i> , 1999)
pGL2		Plasmid mit Hygromycin Resistenzgenkassette		(Pietrzak <i>et al.</i> , 1986)
pHP23		Plasmid mit G418 Resistenzgenkassette		(Paszkowski <i>et al.</i> , 1988)

2.17.3 Die Herstellung von *knockout* Konstrukten

2.17.3.1 Replacement-Konstrukt für *plc3*

Als Basis-Plasmid diente pBlueskript SK⁻, in welches das *plc3*-Gen aus *Physcomitrella patens* eingebracht wurde (Abb 2-1). Das Gen (amplifiziert mit den Primern CH17 und CH18 aus gereinigter DNA) wurde mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *AflIII* inkubiert, gereinigt und in das Plasmid ligiert. Als Selektionsmarker wurde eine G418-Resistenzgenkassette in das spätere Leseraster des Gens eingebracht. Die Resistenzgenkassette wurde mit *EcoRI* vom restlichen pHP23-Plasmid getrennt. Das *plc3*-Plasmid wurde mit *AflIII* inkubiert und das Resistenzgen in diese Schnittstelle ligiert. Die entstandenen Konstrukte wurden vor der Transformation in *Physcomitrella patens* mit den Restriktionsenzymen *AflIII* und *SacII* inkubiert, um das *Targeting*-Konstrukt vom restlichen Plasmid zu trennen.

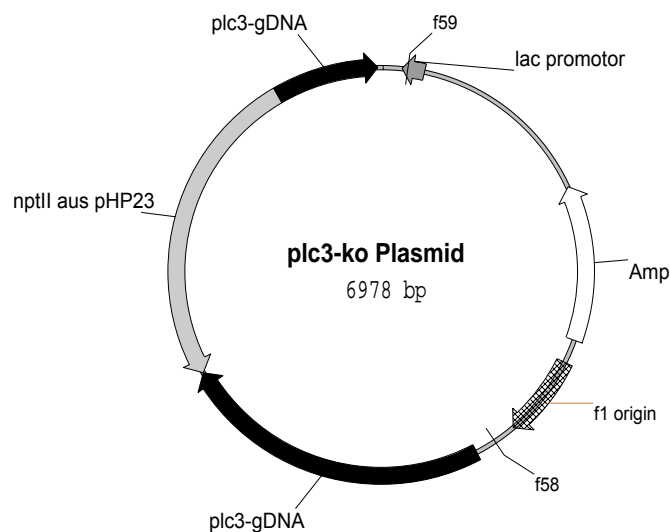


Abb 2-1: Schematische Darstellung des *knockout*-Konstruktes von *plc3*.
Verwendete Abkürzungen: nptII: Gen für Neomycin PhosphotransferaseII-G418-Resistenzgenkassette. Amp: Gen für β -Lactamase-Ampicillin-Resistenzgenkassette.

2.17.3.2 Replacement-Konstrukt für *plc4*

Die DNA des *plc4*-Gens wurde mit den Primern CH6 und CH7 (für den 5'-Bereich) oder CH8 und CH3 (für den 3'-Bereich) amplifiziert, gereinigt und in das pBlueskript SK Plasmid gebracht. Eine Inkubation des pGL2-Plasmides mit *PvuII* lieferte die Hygromycin-Resistenzgenkassette, die in die beiden *plc4*-Plasmide integriert wurden (Abb 2-2). Dazu wurde das „5'-*plc4*-Plasmid“ mit *MscI* inkubiert und diese Schnittstelle für die Integration der Hygromycin-Resistenzgenkassette verwendet (in 3.2.3. als Vektor A bezeichnet). Das „3'-*plc4*-Plasmid“ wurde mit *PmeI* inkubiert und mit der Hygromycin-Resistenzgenkassette fusioniert (Vektor B).

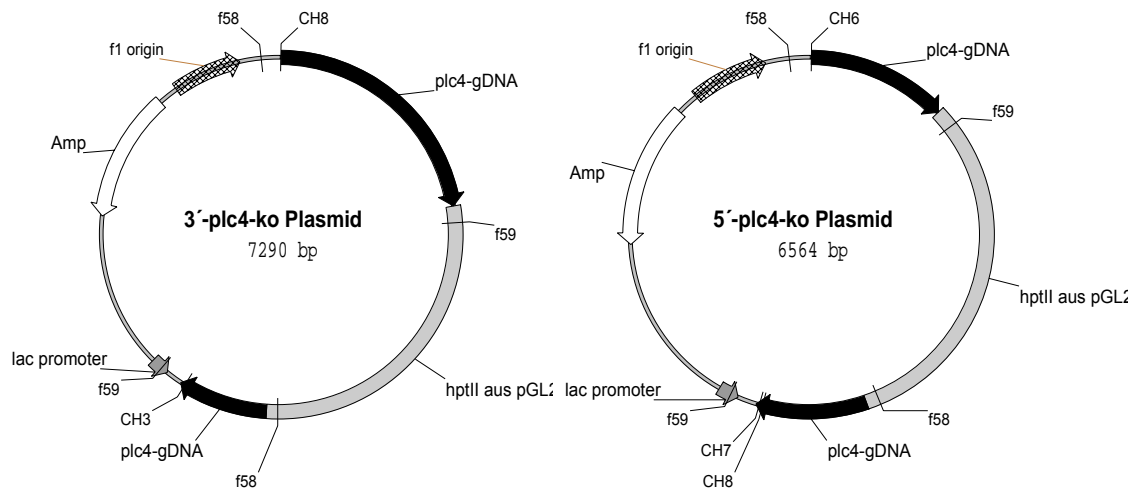


Abb 2-2: Schematische Darstellung der *knockout*-Konstrukte von *plc4*.

Verwendete Abkürzungen: hptII, Gen für Hygromycin Phosphotransferase II-Hygromycin-Resistenzgenkassette. Amp, Gen für β -Lactamase-Ampicillin-Resistenzgenkassette.

2.17.4 Die Herstellung von GFP-Konstrukten

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von PLC2 wurde die cDNA mit der codierenden Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert. Die GFP-Sequenz wurde von (Chalfie *et al.*, 1994) aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert. Zwei unterschiedliche Plasmide wurden für das Einbringen der *plc*-Sequenz verwendet. Das war zum einen das pBAS-GFP-Plasmid, in dem das zukünftige Fusionskonstrukt durch einen Aktin-Promotor (aus *Oryza sativa*) reguliert war und zum anderen ein pGFP-Plasmid, bei dem ein 35S-Promotor (aus

dem Blumenkohl-Mosaik-Virus) die Translation regulieren sollte. In *Physcomitrella patens* zeigt der Aktin-Promotor eine deutlich höhere Aktivität als der 35S-Promotor (Horstmann *et al.*, 2004). Die Plasmide wurden mit *NcoI* inkubiert und in diese Schnittstelle die gewünschte plc-Sequenz eingebracht.

Für die Integration des plc2-Gens in die beiden Plasmide wurde die cDNA mit den Primern a26 und a28 amplifiziert und mit ebenfalls mit *NcoI* inkubiert. So konnte die Sequenz im Leseraster in das Plasmid eingebaut werden (Abb 2-3). Zur Überprüfung, in welcher Richtung sich das Gen in dem Plasmid befand, wurden verschiedene PCRs oder Inkubationen mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Der erfolgte Einbau wurde durch Sequenzierung überprüft.

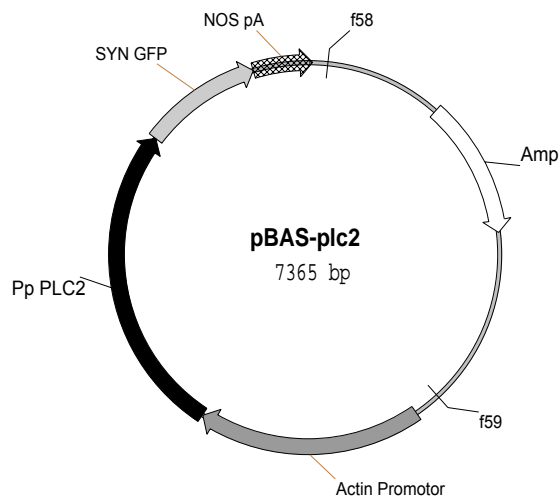


Abb 2-3: Schematische Darstellung des Konstruktes für eine plc2::GFP-Fusion.

Verwendete Abkürzungen: NOS pA: Gen für Nopalisynthase Terminator. Amp: Gen für β -Lactamase, Ampicillin-Resistenzgenkassette.

Ähnlich wurde für ein plc3::GFP-Konstrukt vorgegangen. Die plc3-cDNA-Sequenz wurde mit den Primern CH24 und CH25 amplifiziert und in das Plasmid gebracht (Abb 2-4, oben). Um den Einfluss des Exons 0 (s. Abb 3-1) auf die intrazelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurde zudem ein Konstrukt (plc3+Exon 0::GFP, Abb 2-4, unten links) erstellt, welches das Exon 0 enthielt. Die plc3-cDNA-Sequenz wurde mit den Primern CH44 und CH25 amplifiziert. Des Weiteren wurde nur das Exon 0 im Leseraster von GFP eingebracht (Exon 0::GFP, Abb 2-4, unten rechts).

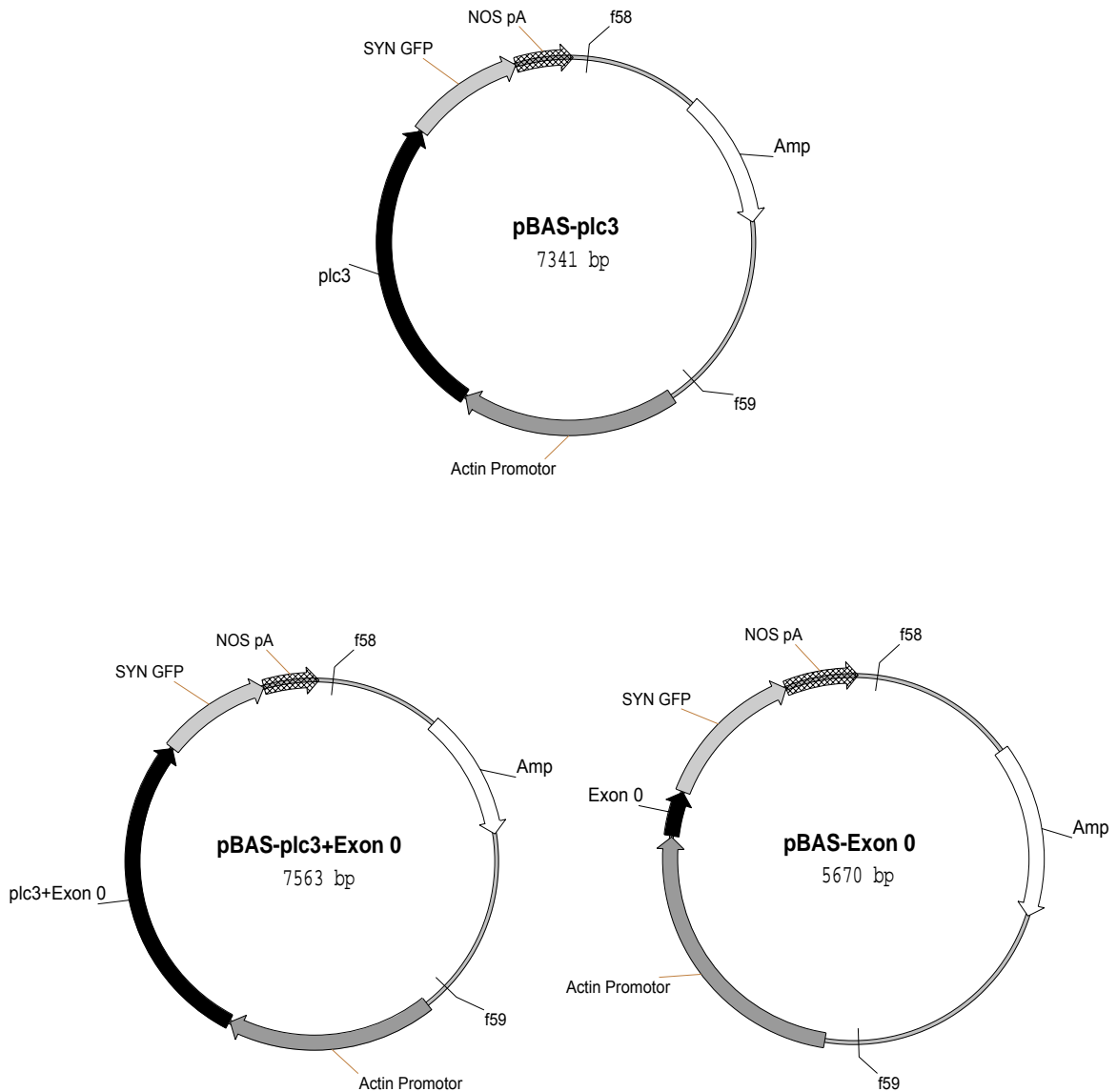


Abb 2-4: Schematische Darstellung der Konstrukte für eine plc3::GFP-Fusion, eine plc3+Exon 0::GFP-Fusion und eine Exon 0::GFP-Fusion.

Verwendete Abkürzungen: NOS pA: Gen für Nopalisynthase Terminator.

Die GFP-Konstrukte wurden zur transienten Transformation von *Physcomitrella patens* zirkulär verwendet.

2.17.5 Die Herstellung von Konstrukten für die Expression von PLC-Histidin Proteinen

Zur Expression von rekombinantem Protein in *E. coli* wurden die plc-cDNA-Sequenzen in das Expressionsplasmid pET28 gebracht. Das Plasmid wurde mit *NcoI* und *XhoI* inkubiert und mit der plc-Sequenz fusioniert.

Das plc3-Transkript wurde mit den Primern CH24 und CH26 amplifiziert und die gereinigte cDNA ebenfalls mit den o.g. Restriktionsenzymen inkubiert. Dabei wurde *XhoI* in unzureichender Konzentration zugegeben, da dieses Enzym eine weitere Schnittstelle in der cDNA-Sequenz hatte. Mit einer Agarosegel-Reinigung wurde anschließend das gewünschte Fragment isoliert und in das Plasmid ligiert (Abb 2-5).

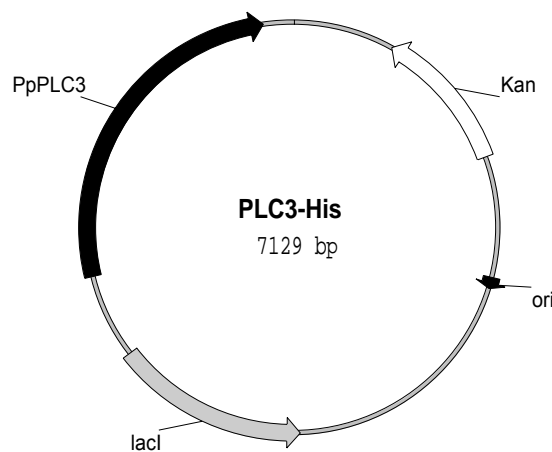


Abb 2-5: Schematische Darstellung des Konstruktes für eine Expression von histidin-markiertem PLC3. Verwendete Abkürzungen: Kan: Gen für Kanamycinresistenz.

Für ein Konstrukt mit plc4 wurde dieses Transkript mit den Primern CH1 und CH3 amplifiziert, mit den beiden o.g. Restriktionsenzymen inkubiert und in das Plasmid integriert (Abb 2-6).

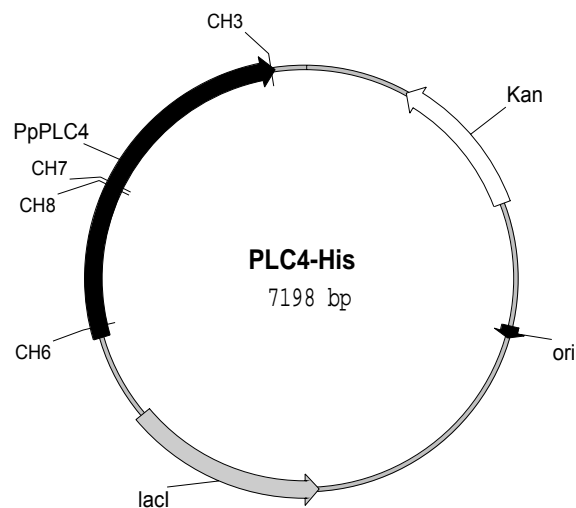


Abb 2-6: Schematische Darstellung des Konstruktes für eine Expression von histidinmarkiertem PLC3. Verwendete Abkürzungen: Kan: Gen für Kanamycinresistenz.

2.18 Transformation von *E. coli*

2.18.1 Elektroporation

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden folgende Medien verwendet:

Lösung	Konzentration	Substanz
LB-Medium; pH 7,6:		
	1,0 g·L ⁻¹	Trypton
	1,0 g·L ⁻¹	NaCl
	0,5 g·L ⁻¹	Hefeextrakt
SOC-Medium		
	20 g·L ⁻¹	Trypton
	5 g·L ⁻¹	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	2,5 mM	KCl
	0,4 %	Glucose

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach (Dower *et al.*, 1988) mit einem Easyject PLUS Elektroporator (Peqlab) und Elektroporationsküvetten mit Aluminiumelektroden, die 2 mm Elektrodenabstand hatten. Für alle *E. coli*-Stämme wurde eine Spannung von 2500 V, eine Pulsdauer von 5 ms und einer Kapazität von 25 µF gewählt. Die Herstellung elektrokompeter Zellen erfolgte anhand vorliegender Protokolle (Sambrook und Russell, 2001). Für eine

Transformation wurden 50 μL Zellen mit 2 μL Ligationsansatz und 1 mL SOC-Medium eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C ü.N. inkubiert.

2.18.2 Hitzeschock-Transformation

Die Transformation mit Vektoren für das Zweihybrid-System (s.u.) geschah mittels Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli* OneShot TOP 10-Zellen. Dazu wurden 2 μL des Vektors mit 50 μL chemisch kompetenten Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 s bei 42 °C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Die erkalteten Zellen wurden mit 250 μL SOC-Medium (RT) gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C belassen.

2.19 Plasmidpräparation

Für eine Plasmidvermehrung und anschließende Isolierung wurde die *E. coli*-Kolonie von einer Glycerinkultur zunächst auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Nach Inkubation ü.N. bei 37 °C wurde eine Kolonie mit einer Impföse abgenommen und in LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben. Aus dieser Kultur wurde das Plasmid gereinigt.

2.19.1 Minipräparation

Kleine Mengen Plasmid wurden mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert. Eingesetzt wurden 3 mL einer dicht gewachsenen LB-Kultur.

2.19.2 Maxipräparation

2.19.2.1 Material und Lösungen

Lösung	Konzentration	Substanz
Salz-TE:	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl; pH 8.0
	1 mM	EDTA; pH 8.0
Sol I:	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris/HCl; pH 8.0
	10 mM	EDTA; pH 8.0
Sol II :	0.2 M	NaOH
	1 %	SDS
Sol III :	3 M	Kaliumacetat
	115 mM	Eisessig
Lysozymlösung:	10 mg·mL ⁻¹	Lysozym
	10 mM	Tris/HCl; pH 8.0
TE:	10 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	1 mM	EDTA; pH 8,0
Weitere Chemikalien:		Chloroform/IAA (24:1)
	70 %	Ethanol
	100 %	Ethanol
	100 %	Isopropanol
	5 M	LiCl
	1.6 M	NaCl
	10 M	NH ₄ Ac
	13 %	PEG
	100 %	Phenol
	50 µg·mL ⁻¹	Proteinase K
	10 µg·mL ⁻¹	RNase

2.19.2.2 Vorbereitung der Bakterien für die Plasmid-Großaufarbeitung

Die Vermehrung der bakteriellen Klone erfolgte in 1 L LB-Medium mit 100 µg·L⁻¹ Ampicillin über Nacht bei 37 °C und stetigem Schütteln (ca. 225 rpm) mit einem Inokulum von 0,2 % (v/v).

Die Kultur wurde bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1,5 bei 4000 g und 4 °C in einer Sorvall-Zentrifuge (GSA Rotor) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 mL kaltem Salz-TE homogenisiert. Danach wurde erneut bei 3000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen.

2.19.2.3 Alkalische Lyse

Für die alkalische Lyse wurde das Pellet in 36 mL Sol I resuspendiert und mit 4 mL Lysozymlösung versetzt. Anschließend erfolgten je 10 min Inkubation mit 80 mL Sol II bei RT und 40 mL Sol III bei 4 °C. Zur Trennung der Zelltrümmer von kleineren Bestandteilen wurde wiederum bei 3000 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glaswolle filtriert. Um eine Präzipitation der Nukleinsäuren zu bewirken, wurden 0.6 Volumenanteile Isopropanol zugegeben und erneut für 15 min bei 4000 g (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 5 mL TE bei 65 °C gelöst. Es folgte eine Inkubation mit 50 µL Proteinase K bei 37 °C für etwa 30 min.

2.19.2.4 Plasmidreinigung durch PEG

Die RNA wurde mit 5 mL 5 M LiCl (4 °C) gefällt und bei 5300 g und 4 °C in einer Sigma-Zentrifuge (Rotor: 11140) für 10 min zentrifugiert. Dann wurden mit 10 mL Isopropanol die Nukleinsäuren des Überstandes gefällt und erneut bei 5300 g (RT) für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 0,5-1 mL TE gelöst. Es folgte eine Inkubation mit 1 µL RNase A bei 37 °C für 30 min. Dann wurde das gleiche Volumen PEG/NaCl-Lösung (1,6 M NaCl/13 % PEG 8000) zur Probe hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Die Probe wurde für 30 min bei 50 000 g in einer Heraeus-Zentrifuge (Rotor: 3740) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µL TE bei 65 °C gelöst und anschließend dreimal extrahiert (Phenol, Phenol/Chloroform+IAA (1:1) und Chloroform+IAA (24:1)). Dabei wurde jedes Mal die oberer wässrige Phase vorsichtig entfernt. Die Probe wurde mit 10 M NH_4Ac ($\frac{1}{4}$ des Volumens) und 2 Volumenteilen 100 % Ethanol (-20 °C) 20 min bei -20 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 10000 g (RT) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Die nun saubere

Plasmid-DNA wurde vom Rest-Ethanol befreit, für 15 min getrocknet und in 100 μL sterilem TE bei 65 °C gelöst. Für die Bestimmung der DNA-Menge und –Reinheit wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 300 nm spektralphotometrisch bestimmt und mit folgender Formel errechnet:

$$E_{260\text{ nm}} - E_{300\text{ nm}} \cdot 50\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{Verdünnung} = \text{DNA-Gehalt (ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}\text{)}$$

Die Zahl 50 stellt einen spezifischen Faktor für doppelsträngige DNA dar, der einer Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht, die ungefähr $50\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dsDNA enthält. Das Verhältnis $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ sollte für reine DNA bei 2 liegen. Nach Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde erneut mit geeigneten Restriktionsenzymen die Isolierung des gewünschten Plasmides überprüft. Die Plasmid-DNA wurde sofort verwendet oder bei –20 °C gelagert.

2.20 Sequenzierungen

Sequenzierungen zur Ermittlung genomischer DNA-Abschnitte oder zur Überprüfung der Sequenz der hergestellten Vektoren wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Noch nicht annotierte plc-Sequenzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, befinden sich im Anhang IV.

2.21 Biochemische Methoden

2.21.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Nach der Transformation der gewünschten Expressionsvektoren in *E. coli* BL21 DE3-Zellen und Selektion der Klone erfolgte die Expression nach dem Protokoll zu pET-Vektoren (Novagen). Der geeignete Klon wurde in einer Vorkultur von 3 mL LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C vermehrt und in 500 mL LB-Medium mit Ampicillin bei 18 °C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ von 0,4-0,6 angezogen. Durch die Zugabe von 0,5 mL IPTG wurde die Expression induziert. Zudem wurde eine zweite Kultur als Kontrolle nicht induziert. Die Zellen wuchsen weitere 14-16 h bei 18 °C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ von 1,0-1,6.

2.21.2 Herstellung von zellfreien Extrakten

Die Zellen wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Die Kultur wurde in 250 mL-Zentrifugenbecher überführt und in einer Sorvall-Zentrifuge in einem GSA-Rotor bei 3000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 mL Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6; 300 mM NaCl) aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 3 mL Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 10 % Glycerin; 1,4 mM β -Mercaptoethanol) mit 10 mM Imidazol aufgenommen. Über einen Schlauch wurde die Zellsuspension in eine gekühlte French-Pressure-Zelle (Aminco, Silver Spring, USA) gesogen und bei 140 MPa durch 4 Passagen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 50 000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert.

2.21.3 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Zur Isolierung der heterolog exprimierten Proteine aus dem zellfreien Extrakt wurde dieser auf eine äquilibrierte Nickel-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Säule (Qiagen) aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 x 5 mL Extraktionspuffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 10 x 500 μ L Extraktionspuffer mit 250 mM Imidazol. Der Erfolg der Chromatographie wurde durch SDS-PAGE (s. 2.21.5) und Western Blot (s. 2.21.6) überprüft.

2.21.4 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in zellfreien Extrakten und in den Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Als Standard wurde 0-150 μ g \cdot mL⁻¹ Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

2.21.5 Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Gelen durchgeführt, die aus Sammelgel mit 4 % und Trenngel mit 10 % Polyacrylamid bestanden (Laemmli, 1970). Abweichend vom Protokoll betrug die SDS-Konzentration 0,15 %. Die Proben (zellfreie Extrakte,

lösliche Fraktion und Pellet jeweils 30 µg Protein; Fraktionen nach der Ni-NTA-Säulenchromatographie jeweils maximal 5 µg Protein) wurden vor dem Auftragen 5 min mit Auftragspuffer (60 mM Tris/HCl pH 6,75; 100 mM DTT; 2 % SDS; 10 % Glycerin; 0,001 % Bromphenolblau in Sammelgelpuffer) gekocht. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem vertikalen Elektrophoresesystem der Firma Biorad (München) bei 120 V für 1 h in Laufpuffer (25 mM Tris; 190 mM Glycin; 5 mM SDS). Als Molekulargewichtsmarker wurde das Proteingemisch SDS 6H der Firma Sigma verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder im Western Blot weiterverarbeitet oder über Nacht in einer Coomassie-Blau-Färbelösung (0,02 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in 50 % Methanol und 20 % Eisessig) gefärbt und anschließend 3 h in 40 % Methanol entfärbt.

Die Gele wurden zwischen zwei Cellulosemembranen eingespannt und über Nacht getrocknet. Die molekularen Massen der denaturierten Proteine wurden anhand der Eichproteine im Gel ermittelt.

2.21.6 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine wurden auf eine PVDF Membran (Millipore Immobilon) transferiert. Die für den Western Blot benötigten Lösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Lösung	Konzentration	Substanz
TGM:	160 mM	Glycin
	20 mM	Tris
	20 %	Methanol
	0,15 %	SDS
TBS :	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
TBST:	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	0,05 % (v/v)	Tween-20
Block-Puffer:	2 %	BSA in TBS

AP-Puffer :	100 mM	NaCl
	100 mM	Tris/HCl pH 9,5
	5 mM	MgCl ₂
BCIP:	50 mg·mL ⁻¹	BCIP in H ₂ O
NBT:	50 mg·mL ⁻¹	NBT in
	70 %	Dimethylformamid
Ponceau-Lösung:	0,2 %	Ponceau
	0,15 %	Sulfosalicylsäure
	0,15 %	Trichloressigsäure
	0,01 % (v/v)	Essigsäure
Färbelösung:	10 mL	AP-Puffer
	15 µL	BCIP
	30 µL	NBT

Dazu wurde die Membran kurz mit Methanol benetzt und für mindestens 15 min in TGM inkubiert. Auf einen *Semi-dry* Blotter (BioRad) wurden zwischen jeweils zwei Lagen mit TGM getränktem Whatman 3MM Filterpapier, die Membran und das Gel gelegt und in die Apparatur gespannt. Bei einem konstanten Strom von 5 mA·cm⁻² Gelfläche wurden die Proteine für 1 h auf die Membran transferiert.

Zum Anfärben der transferierten Proteine wurde die Membran in einer 0,2 % Ponceau-Lösung für 5-10 min geschwenkt, anschließend mit Wasser gewaschen. So konnte der Erfolg des Transfers überprüft werden.

Zum Anfärben der Proteine mit mehrfachen Histidinen wurde die Membran zunächst mit Block-Puffer für 1 h inkubiert. Anschließend wurde ein primärer Antikörper (Tetra-His Antikörper, Qiagen) mit einer Verdünnung von 1:2000 in Block-Puffer über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti-Maus Antikörper (Sigma) mit einer Verdünnung von 1:7000 in Block-Puffer eingesetzt. Die Membran wurde mit Färbelösung so lange inkubiert, bis die Banden sichtbar waren und dann mit H₂O gewaschen.

2.21.7 Bindung der Proteine an verschiedene Phospholipide

Die gereinigten Proteine wurden auf eine Membran gegeben, an der verschiedene Phospholipide gekoppelt waren (PIP Strips, Invitrogen). Eine schematische Übersicht der Phospholipide ist Abb 2-7 gegeben.

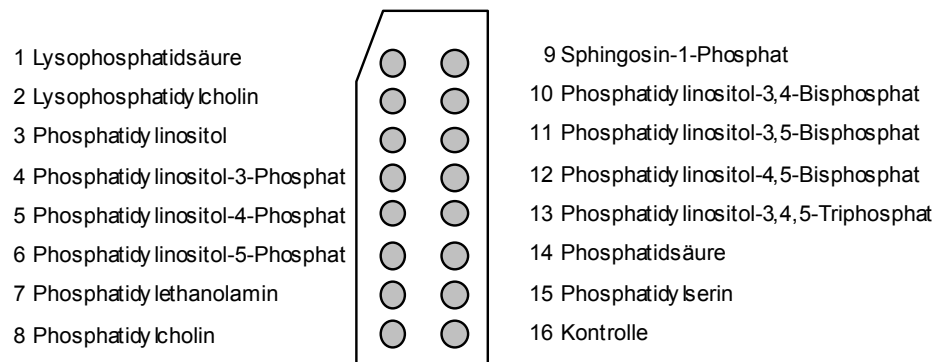


Abb 2-7: Schematische Darstellung der gekoppelten Phospholipide auf der Membran.

Nach dem Blocken der Membran für 1 h bei RT in 3 % fettsäurefreiem BSA in TBST, wurde das Protein in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ über Nacht bei 4°C inkubiert. Ein immunologischer Nachweis des Proteins erfolgte mit einem anti-His-Antikörper (s. 2.21.6) und anschließender Chemilumineszenz-Färbung. Dazu wurde die Membran mit Detektionspuffer (0,1 M Diethanolamin, 1 mM MgCl_2 , pH 8,5) gespült und mit CDP-Star (Applied Biosystems; 1:100 in Detektionspuffer) beschichtet. Die Chemilumineszenz wurde mit einem Kodak X-OMAT UV-Film bei einer Expositionszeit von 30 min sichtbar gemacht. Die Filme wurden mit Kodak RP X-Omat EX entwickelt und mit Kodak RP X-Omat LO fixiert.

2.21.8 Herstellung polyklonaler Antikörper

Um einen spezifischen Nachweis von PLC2 erreichen zu können, wurde geprüft, ob sich ein polyklonaler Antikörper herstellen lassen konnte. Dazu wurden alle bekannten plc-Sequenzen in *Physcomitrella patens* von der Firma Genovac

(Freiburg) analysiert. Es wurden DNA- und Aminosäuresequenzen mit bekannten pflanzlichen Proteinen verglichen, die Sequenzen in *Physcomitrella patens* untereinander verglichen und wahrscheinliche Proteinfaltungen vorhergesagt. Bereits die *in silico*-Untersuchung ergab, dass sich sowohl mit genetischer Immunisierung, als auch mit der Immunisierung des rekombinanten Proteins Kreuzreaktionen wahrscheinlich sind. Dieses hängt mit der hohen Ähnlichkeit zwischen den DNA- und Aminosäuresequenzen von plc2 und plc3 zusammen.

2.22 Hefe-Zweihybrid System

Mit dem Zweihybrid System in Hefezellen lassen sich Interaktionen zwischen zwei Proteinen *in vivo* nachweisen. Am *Institut for Basic Biology* (NIBB) wurden erste Versuche zur Etablierung der Methode für Interaktionen verschiedener PLCs von *Physcomitrella patens* durchgeführt. Dafür wurde das CytoTrap-Vektor Kit von Stratagene verwendet.

Dieses System beruht auf einer Mutation im CDC25-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm *cdc25H*). CDC25 in Hefe ist homolog zum Sos in *Homo sapiens*. Es kodiert einen Guanyl Nukleotid Austauschfaktor, der an Ras bindet und den Ras-Signalweg einleitet und Zellwachstum ermöglicht. Der Stamm *cdc25* kann aufgrund der Mutation nicht bei 37 °C wachsen. Eine Komplementation mit *HsSos* führt wieder zum Wachstum der Mutante bei 37 °C.

Eines der beiden zu untersuchenden Proteine wird als Köderprotein bezeichnet und in den pSos Vektor gebracht. Somit wird ein Köder-HsSos-Fusionsprotein erstellt. Das zweite Protein (Zielprotein) wird in einen pMyr-Vektor eingebracht und so ein Zielprotein mit einer Myristylierungs-Sequenz erstellt, welches das erste Protein mit der Plasmamembran verankern kann. Nur durch diese Verankerung ist es möglich, den Ras-Signalweg zu aktivieren.

In *Physcomitrella patens* wurde eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu GCR1 (*G-Protein Coupled Receptor 1*; At1G48270.1) aus *Arabidopsis thaliana* gefunden.

Mögliche Interaktionen zwischen PLC1-PLC4 aus *Physcomitrella patens* und dem GCR1-ähnlichen Protein aus *Physcomitrella patens* sollten untersucht werden. Dazu wurde jeweils eine plc-Sequenz in die multiple Klonierungsstelle des pSos-Plasmides kloniert und der Vektor in *E. coli* transformiert. Eine geeignete Kolonie

wurde mittels PCR selektiert. Die *PpGCR1*-Sequenz wurde in das pMyr-Plasmid kloniert und wiederum eine Kolonie gewählt, die das gewünschte Konstrukt enthielt.

Nach der Isolierung beider Vektoren wurde der *cdc25H*-Hefestamm cotransformiert. Zusätzlich wurden Kontrolltransformationen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.22.1 Transformation von *cdc25*-Hefezellen

Der Hefestamm wurde ü.N. in 300 mL YPAD-Medium bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,4-0,5 bei 30 °C vermehrt. Das YPAD-Medium setzte sich folgendermaßen zusammen:

Substanz	Konzentration
Pepton	2 %
Dextrose	2 %
Hefeextrakt	1 %
Adenin Hemisulfat	160 μM

Etwa 3 h vor der Transformation wurden die Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 mit frischem Medium gemischt. Die anschließende Zellernte erfolgte bei einer Zentrifugation von 4000 *g* für 5 min bei RT. Das Pellet wurde in 10 mL H₂O aufgenommen und erneut bei 5000 *g* für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL Lithiumlösung (100 mM Lithiumacetat in TE-Puffer, pH 7,5) resuspendiert. Nach Zugabe der beiden Vektoren zu 200 μL Zellsuspension wurde 1,2 mL PEG-Lösung (Lithiumlösung mit 5 % PEG 4000) in den Ansatz gegeben und 30 min bei 30 °C geschüttelt. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 25 min und eine kurze Zentrifugation. Das Pellet wurde in 200 μL TE-Puffer resuspendiert und auf YPAD-Festmedium ausgestrichen. Das Wachstum der transformierten Zellen bei 37 °C wurde nach einer Woche täglich beobachtet.