

4 Diskussion

4.1 Die Charakterisierung der PLC2 und PLC3 anhand von Sequenzvergleichen

Neben den beiden Genen *plc1* und *plc2* aus *Physcomitrella patens* waren zu Beginn der Arbeit Teilsequenzen für die Kodierung zwei weiterer PLC-Isoformen bekannt. Die DNA-Sequenzen und die mRNA-Sequenzen für die Kodierungen von PLC3 und PLC4 wurden im Verlauf der Arbeit sequenziert.

Der Vergleich aller vier *plc*-Sequenzen machte deutlich, dass *plc2* und *plc3* sich auf DNA- und auf Aminosäureebene untereinander strukturell ähneln. Die Gene für die Kodierung von *PpPLC1* und *PpPLC4* ähnelten eher den übrigen untersuchten Sequenzen pflanzlicher PLCs (Abb 3-1; Abb 3-2).

Bei beiden Genen lag zwischen dem nichttranslatierten Bereich (5'-UTR) und dem Startkodon ein Intron. Der 5'-UTR der *plc2*-Sequenz ergab nach der Übersetzung in eine Aminosäuresequenz kein sinnvolles Leseraster. Die Übersetzung der Sequenz im 5'-UTR von *plc3* könnte sogar ein weiteres Exon mit einem zweiten Startkodon im Leseraster darstellen, das durch ein Intron vom zweiten möglichen Startkodon getrennt ist. In einem Vergleich der pflanzlichen PLCs ist erkennbar, dass das zweite Startkodon mit denen der anderen PLCs übereinstimmt. Eine Translation ab dem ersten Startkodon würde ein Protein mit einem N-terminalen Überhang ergeben (Abb 4-1). Von anderen Genen ist bekannt, dass es zwei funktionelle Startkodons für zwei unterschiedliche Ausführungen eines Proteins geben kann. Je nach genutztem Translationsstart wird das Protein in andere Zellkompartimente transportiert. Nukleär kodierte Proteine müssen z.T. in Organellen, Plastiden oder Mitochondrien relokalisiert werden. Dafür sind bestimmte Erkennungssequenzen notwendig, welche die Organellenmembran passieren können. Diese Transitsequenzen sind meist amphiphil und bestehen aus weniger sauren Aminosäuren (Christensen *et al.*, 2005). Bei Eintritt ins Organell wird dieses kurze Peptid entfernt (Soll und Schleiff, 2004). Proteine, die in mehreren Kompartimenten vorkommen, müssen unterschiedliche Transitsequenzen haben. Dieses wird oftmals durch zwei Startkodons auf einem Transkript bewerkstelligt. Umstritten ist, ob natürlicherweise beide Translationsstarts genutzt werden

(Kabeya und Sato, 2005). Kontroverse Aussagen sind zu der dualen Lokalisation einer RNA- Polymerase in *Physcomitrella patens* (Richter *et al.*, 2002) und *Arabidopsis* (Hedtke *et al.*, 2000) gemacht worden (Kabeya und Sato, 2005), die erkennen lassen, dass auch die Umgebung des Startkodons die Translation beeinflussen muss (Christensen *et al.*, 2005). Das Exon 0 der *plc3*-Sequenz in *Physcomitrella patens* scheint eine signifikante Ähnlichkeit zu Chloroplasten-Transitsequenzen zu haben. So könnten auch beide Startkodons von *plc3* funktionell und das Protein dual im Chloroplasten und Cytosol lokalisiert sein. Dieses wird an späterer Stelle diskutiert werden (s. 4.4).

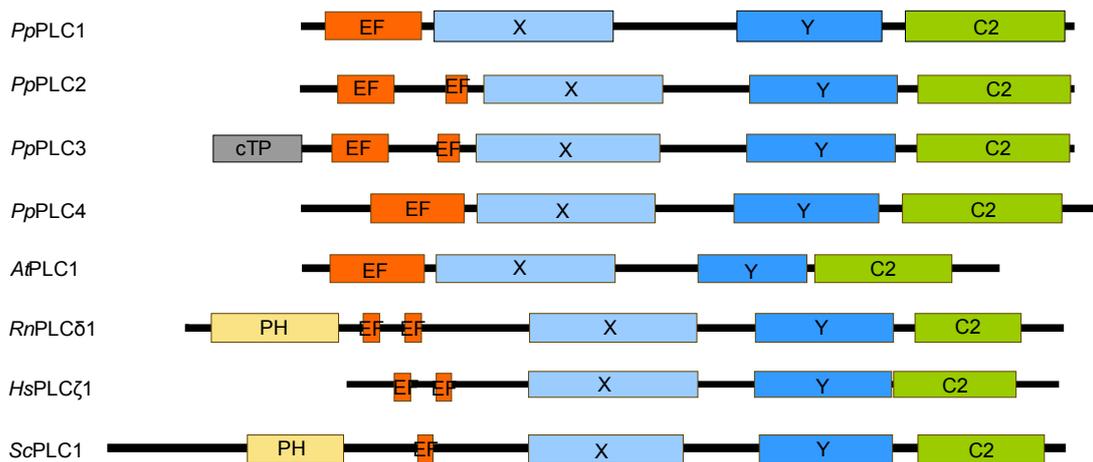


Abb 4-1: Die Domänenorganisation der vier PLC-Isoformen in *Physcomitrella patens* im Vergleich mit einer typischen pflanzlichen PLC (hier *AtPLC1*), zwei tierischen PLCs (hier *RnPLCδ1* und *HsPLCζ1*) und einer PLC aus Hefe (hier *ScPLC1*).

C2: C2-Domäne; cTP: putative chloroplasten Transitsequenz; EF: EF-HandDomäne; X und Y: katalytische Domänen.

Die Besonderheit der zwei untersuchten *PpPLCs* spiegelt sich auch in dem Vergleich der Aminosäuresequenzen pflanzlicher PLCs wider; die Identität beider Sequenzen zueinander ist 55 % (Tab 3-1), was der Größenordnung der meisten anderen pflanzlichen PLCs untereinander entspricht. Die Aminosäureidentität der *PpPLC2* und *PpPLC3* zu diesen anderen Sequenzen ist deutlich niedriger mit maximal 40 %. Es lassen sich einige Aminosäuren in allen Domänen der beiden *PpPLCs* aufzeigen, die in den anderen PLC-Sequenzen konserviert sind. Welche

davon eine relevante funktionelle und/oder strukturelle Rolle einnehmen, ist unbekannt. Hier kann nur zum Teil auf Daten tierischer PLCs zurückgegriffen werden.

Die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur von *RnPLCδ1* (*Rattus norvegicus* PLCδ1) zeigt elf Aminosäuren, die an der Bindung des Substrats und Calciums beteiligt sind (Essen *et al.*, 1996). Sieben davon sind in allen PI-PLCs vorhanden (His³¹¹, Asn³¹², Glu³⁴¹, Asp³⁴³, His³⁵⁶, Ser⁵²² und Arg⁵⁴⁹. Nummern beziehen sich auf die Aminosäuren der *RnPLCδ1*), während die anderen vier Sequenzen ausgetauscht sein können. Zum Beispiel ist Lys⁴³⁸ in pflanzlichen PLCs durch Ser ersetzt oder Tyr⁵⁵¹ durch Phe in *Arabidopsis*-PLCs (Ellis *et al.*, 1998).

Auffällig in der PLC2- und PLC3-Sequenz aus *Physcomitrella patens* ist der Austausch des konservierten Ser⁵²² zu Asparagin. Offen bleibt, inwiefern dieser Aminosäurerest für die biochemischen Charakteristika verantwortlich ist. Die Mutation von Ser⁵²² zu Alanin in *RnPLCδ1* setzt die Aktivität und die Spezifität gegenüber PIP₂ und PIP als Substrat herab. Es wurde hierbei gezeigt, dass der Serinrest mit der Phosphorylgruppe an C₄ Position interagiert. Die Affinität zu Calcium war bei dieser Mutation nicht beeinträchtigt (Ellis *et al.*, 1998). Da keine weitere PLC-Sequenz aus Pflanzen bekannt ist, die biochemisch dem Typ I entspricht, fehlen weitere Vergleiche. Auch, wenn einige der Aminosäuremutationen zu einem erhöhten Calciumbedarf führten, wird v.a. die EF-Hand-Domäne für die Calciumbindung favorisiert. Punktmutationen wurden mit einer pollenschlauchspezifischen PLC aus *Nicotiana tabacum* durchgeführt. Die veränderten Aminosäuren entsprachen His³¹¹ und Asp³⁴³ der *RnPLCδ1* und zeigten nur schwache Aktivität gegenüber PI4,5P₂ (Helling *et al.*, 2006).

Die Bindung von Calcium ist nicht die alleinige Funktion der EF-Hand Domäne. So besitzt PLCζ vier EF-Hand-Motive, wovon die ersten beiden nicht an der Calciumbindung beteiligt sind. Erst eine Deletion der ersten drei EF-Hand-Motive führt zu einem erhöhten Calciumbedarf. Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Tertiärstruktur für die Calciumsensitivität eine größere Bedeutung hat als die Aminosäuresequenz (Kouchi *et al.*, 2005).

Bei der Analyse der pflanzlichen PLC-Sequenzen wird deutlich, dass die Sequenz weitaus weniger konserviert ist als die anderer Domänen. Ursprünglich wurde diese Domäne auch als N-Domäne bezeichnet (Mueller-Roeber und Pical, 2002).

Die Suche nach Proteinen mit EF-Hand-Domänen in *Arabidopsis* zeigt, dass die pflanzlichen EF-Hand Motive nicht immer mit einem hohen E-Wert in den Datenbanken angegeben werden. Dieses liegt an einer großen Diversität dieser Domäne in pflanzlichen Proteinen (Day *et al.*, 2002). Werden die Sequenzen der pflanzlichen PLCs untereinander verglichen, wird eine Domänenstruktur deutlich. Zudem ist die beschriebene Unterbrechung der EF-Hand-Domäne in PLC2 aus *Physcomitrella patens* erkennbar, die auch in *PpPLC3* vorkommt. Diese beiden Sequenzen lassen in der Datenbank kaum eine Zuordnung zu den EF-Hand-Motiven zu; auch in BLAST-Recherchen wurden keine ähnlichen Sequenzen gefunden. Wie sich diese Insertion auf die Tertiärstruktur auswirkt, ist derzeit noch unbekannt. Es scheint allerdings einen Zusammenhang zwischen der unterbrochenen EF-Hand-Domäne in *PpPLC2* und *PpPLC3* und der Calciumaffinität zu geben, vorausgesetzt, PLC3 entspricht biochemisch dem Typ I der PLCs.

4.2 Die Herstellung und Untersuchung von *plc-knockout* Mutanten

4.2.1 Die Herstellung von *knockout*-Mutanten

Die Aufklärung der physiologischen Funktion der verschiedenen PLC-Isoformen in *Physcomitrella patens* sollte durch *knockout*-Studien deutlich werden. Dieses würde einen Vergleich mit der Funktion von PLC1 aus *Physcomitrella patens* oder auch mit der Funktion anderer pflanzlicher PLCs zulassen.

Der zielgerichtete Einbau eines *knockout*-Konstruktes über homologe Rekombination in das Genom von *Physcomitrella patens* war im Fall von PLC3 nicht möglich. In den Mutanten, die durch PCR als positiv identifiziert wurden (Abb 3-6), konnte das Transkript für *plc3* nachgewiesen werden. Möglicherweise ist das Konstrukt durch illegitime Rekombination oder nichthomologe Endverknüpfung in das Genom der Transformanten gelangt oder der Vektor ist nach Rezirkularisation in das Genom eingebaut worden (Kamisugi *et al.*, 2006). Dieses würde zwar die Antibiotikaresistenz der falschpositiven Transformanten erklären, aber nicht die entstandenen PCR-Amplifikate. Da bei der Untersuchung des Transkriptes mit Gesamt-RNA gearbeitet wurde, könnte auch eine unspezifische Bindung der

Primer an ein anderes Transkript erfolgt sein, das ein Amplifikat in gleicher Länge ergeben hätte. Dabei kann eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden, da zwischen den Primerbindestellen ein Intron lag und das resultierende Amplifikat deutlich länger gewesen wäre. Eventuell handelte es sich um das plc2-Transkript, an das die Primer unspezifisch gebunden haben oder auch um ein noch unbekanntes Transkript, das der plc3-Sequenz sehr ähnlich ist. Die Synthese des Transkripts wäre durch die homologe Rekombination nicht unterbunden. Nicht auszuschließen sind Genduplikationen, die zu zwei sehr ähnlichen Transkripten führten, bzw. das Amplifikat durch das Gen einer PLC-Isoform entstand, die noch nicht identifiziert wurde. Bekannt sind solche Genduplikationen in vielen Organismen wie in *Arabidopsis* (Hartung und Puchta, 2006), *Lotus japonicus* (Shimada *et al.*, 2003) oder *Oryza sativa* (Wang *et al.*, 2005). Um diese Fragestellung zu klären, müsste das amplifizierte Transkript sequenziert und identifiziert werden.

Zudem wurde versucht, durch gezielten Genaustausch in *Physcomitrella patens* das plc4-Gen funktionslos zu machen. Nach erfolgreicher Erstellung zweier Konstrukte sollten diese in *E. coli*-Zellen gebracht werden (Abb 3-8). Die Transformation wurde mit mehreren *E. coli*-Stämmen durchgeführt (s. 3.2.3). Einige ergaben viele antibiotikaresistente Kolonien. Die untersuchten resistenten Kolonien trugen nicht das gewünschte Konstrukt. Es könnte sein, dass das integrierte Konstrukt für die *E. coli*-Stämme letale Auswirkungen hatte. Warum dennoch resistente Kolonien nach einigen Transformationen auftraten, ist unklar. Es könnte sein, dass die resistenten Kolonien mit dem Rückgrat des Ursprungsplasmids versehen wurden, was durch unvollständiges Schneiden noch im Ligationsansatz vorhanden gewesen sein könnte.

Die Herstellung von Mutanten, bei denen das plc2-Gen durch gezielten Genaustausch ausgeschaltet war, war erfolgreich. Mittels PCR konnte nachgewiesen werden, dass das Konstrukt ins Genom integriert wurde (Abb 3-3). Ein PCR-Produkt von der genomischen Umgebung, welches das gesamte eingebaute Konstrukt überspannt, konnte nicht amplifiziert werden. Dieses legt die Vermutung nahe, dass es sich um einen konkatemeren Einbau des Konstruktes handeln muss. Dieses kommt in *Physcomitrella patens* Mutanten relativ häufig vor (Kamisugi *et*

al., 2006). Aus RT-PCR-Analysen geht hervor, dass trotz konkatermeren Einbaus die Synthese eines funktionellen Transkripts unterbunden ist (Abb 3-4).

Die Auswirkung des knockouts von *plc2* auf das Wachstum und die Entwicklung von *Physcomitrella patens* wurde in weiteren physiologischen und molekularbiologischen Versuchen beobachtet.

4.2.2 Die Untersuchung der *plc2-knockout* Mutante

Die Entwicklung der Protonemata und die Ausbildung von Gametophoren unterschied sich unter Standardbedingungen nicht von der des Wildtyps (Abb 3-9). Eine leichte Verzögerung der Ausbildung von Gametophoren war erkennbar, wurde aber als nicht signifikant bewertet. Auch das Wachstum im Dunkeln war nicht beeinträchtigt (Abb 3-10). Die Mutante wuchs, wie der WT, negativ gravitrop. Unterschiede in der Entwicklung der Mutante wurden durch Zugabe von Phytohormonen zum Medium beobachtet.

Die Bildung von Gametophoren unter Einfluss von Cytokinin war bei dieser Mutante im Gegensatz zu *plc1* nicht gehemmt (Abb 3-11). Es hat sich herausgestellt, dass die *plc2*-Mutante hypersensitiv gegenüber exogener Abscisinsäure (ABA) ist. Es zeigte sich, dass die Gametophorenbildung bei Zugabe von ABA deutlich verzögert ist (Abb 3-12). Im Dunkeln hatte ABA einen stärkeren Einfluss auf die Mutante; das Wachstum war stark gehemmt (Abb 3-13). Es ist seit langem bekannt, dass exogenes ABA die Bildung von Gametophoren in *Funaria hygrometrica* inhibiert (Valadon und Mummery, 1971), was aber nicht auf eine antagonistische Wirkung zu Cytokinin beruht, sondern erst bei nachfolgenden Reaktionen auf die Gametophorenbildung einwirkt (Christianson, 2000).

Die Zugabe von ABA hat vielfältige Effekte, ist aber v.a. maßgeblich an der Verhinderung des Wasserverlustes in Pflanzen beteiligt. Zum einen bewirkt die Ausschüttung von ABA den Stomataverschluß. Eine längerfristige Wirkung hat es bei langanhaltender Trockenheit auf die Regulation der Genexpression (s.u.). Daher wird ABA auch häufig als Stresshormon bezeichnet. Osmotischer Stress, wie Wasserverlust oder veränderter Salzgehalt kann aber auch unabhängig von ABA als Botenstoff verlaufen (Riera *et al.*, 2005).

ABA hat auch bei *Physcomitrella patens* bei der Weiterleitung von Temperaturveränderungen oder osmotischem Stress eine Funktion als Botenstoff. Hier entfällt

zwar die Regulation der Stomata, die in *Physcomitrella patens* nicht vorhanden sind, die zellulären Auswirkungen auf das ABA-Signal sind den Spermatophyten allerdings sehr ähnlich (Knight *et al.*, 1995). Auffällig sind kleinere Chloroplasten mit einer geringeren Anzahl Stärkekörner nach einem Tag ABA-Behandlung. Weiterhin erhöht sich der Anteil von löslichen Kohlenhydraten in den Protonemata und die Vakuole wird fragmentiert (Nagao *et al.*, 2005).

In der *plc2*-Mutante scheint die leicht verzögerte Gametophorenbildung mit der Hypersensitivität gegenüber endogenem ABA zusammenzuhängen. Diese Signalkette ist jedoch unabhängig von der Wirkung auf die Chloroplasten, da unter Standardbedingungen kein Unterschied in der Erscheinungsform der Chloroplasten vom WT und *plc2* feststellbar war.

Die Erhöhung des cytosolischen Zuckergehalts nach Anstieg des ABA-Levels in der Zelle, muss eine osmotische Schutzfunktion bei Salzstress oder Trockenheit übernehmen (Nagao *et al.*, 2005; Oldenhof *et al.*, 2006). Im Unterschied zu manchen anderen Moosen wie *Ceratodon purpureus* ist das Wachstum von *Physcomitrella patens* im Dunkeln nur bei Zugabe exogener Kohlenhydrate möglich. Es könnte sein, dass die *plc2*-Mutante bei ABA-Behandlung die Glucose im Medium nicht verwerten kann und das Wachstum unterbunden wird. Durch Akkumulation löslichen Zuckers als Osmoprotektant würde dieser nicht mehr als nötige Energiequelle für das Wachstum im Dunkeln zur Verfügung stehen.

Auch Kältestress wird in Spermatophyten über ABA als sekundären Botenstoff signalisiert. Der Anstieg des ABA-Levels induziert die Expression verschiedener Gene, u.a. LEA (*Late Embryogenesis Abundant*)-Gene. Die LEA-Proteine stabilisieren Membranen bei Einfluss von Trockenheit. Andere COR(*cold regulated*)-Gene werden bei Kälte induziert (Wang und Altman, 2003). Kürzlicher durchgeführte Untersuchungen belegen, dass sich die endogene ABA-Konzentration in *Physcomitrella patens* bei der Kälte-Adaptation unverändert ist (Minami *et al.*, 2005). Folglich muss in *Physcomitrella patens*, im Unterschied zu anderen untersuchten Pflanzen, einen ABA-unabhängigen Signalweg zur Weiterleitung des Kältestresses geben.

Das Wachstum bei osmotischem Stress war in *Physcomitrella patens* WT und in der *plc2*-Mutante langsamer als unter Standardbedingungen. Die Behandlung mit höheren Konzentrationen Salz (NaCl) oder Mannitol führte zum Wachstums-

stillstand und zum Verblässen der Kultur. Mannitol ist eine osmotisch wirksame Substanz, die nicht mit anderen Stoffwechselwegen interagiert und häufig zur Simulation von allgemeinen osmotischen Stress in Experimenten verwendet wird (Shen *et al.*, 1997). Nach Umsetzung auf Standardmedium regenerierte ein Großteil der Kolonie. Die hohe Regenerationsfähigkeit von Moosen ist oftmals beschrieben worden. *Physcomitrella patens* ist ein Moos, das sich an vielfältige Stresssituationen adaptieren kann, aber nicht unter extremen Bedingungen leben kann. Eine langsame Adaptation an die Situation oder eine Vorbehandlung mit ABA oder hyperosmotischem Stress kann in *Physcomitrella patens* die Toleranz zusätzlich erhöhen (Minami *et al.*, 2003). In einigen anderen Moosen ist sogar eine Kälteresistenz (Robinson *et al.*, 2003) oder Trocknungsresistenz (Oliver *et al.*, 2000) beschrieben worden, welche die Besiedlung extremer Habitats möglich macht.

Physcomitrella patens kann sich nach Behandlung bis zu einer Konzentration von 0,3 M NaCl regenerieren. Bei einer langsamen Adaptation kann es sogar bei einer Salzkonzentration von bis zu 0,6 M NaCl wachsen. Diese starke Toleranz ist auf das Vorhandensein einer ursprünglichen Natriumpumpe (Na^+ -Pumpe-ATPase) zurückzuführen, die auch in Prokaryoten und Pilzen vorkommt. In höher entwickelten Pflanzen fehlt diese Pumpe durch weitere Anpassung an das Landleben und sie können nur über eine Na^+/K^+ -ATPase im Austausch mit Kalium, Natrium aus der Zelle transportieren (Benito und Rodriguez-Navarro, 2003).

Das Fehlen von PLC2 in *Physcomitrella patens* wirkt sich nicht auf das Wachstum unter Hyperosmose (induziert durch Mannitol-Zugabe) aus, wenn dieses im Licht-Dunkel-Rhythmus stattfindet. Bei zusätzlich anhaltender Dunkelheit allerdings, hat die Mutante ein deutliches Wachstumsdefizit bei Behandlung mit Mannitol im Vergleich zum Wildtyp (Abb 3-10). Wie bei der Zugabe von ABA scheint auch der Einfluss von Hyperosmose die Glucoseverwertung im Dunkeln zu beeinträchtigen. Veränderte Genexpression bei osmotischem Stress ist sehr intensiv untersucht. Weniger bekannt ist die Signalwahrnehmung und -weiterleitung. Einen sekundären Botenstoff für osmotischen Stress stellt Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphat (PI3,5P_2) dar. Dieses wird in Hefen und Pflanzen bei Hyperosmose angereichert. Die Bildung erfolgt durch Phosphorylierung von PI3P mittels einer PI3P 5-OH Kinase. In *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces*

pombe führt die Anreicherung von PI3,5P₂ nach einem hyperosmotischen Schock zur Vakuolenfragmentation. So wird es der Zelle ermöglicht, das Vakuolenvolumen zu verringern und gleichzeitig die Oberfläche aufrechtzuerhalten (Bone *et al.*, 1998; Dove *et al.*, 1997). PI3,5P₂ reichert sich an Endosomen und Lysosomen an und ist an der Sortierung membranständiger Proteine beteiligt (Cooke, 2002). Ob die beobachtete Fragmentation in *Physcomitrella patens* nach ABA-Behandlung auch mit einem Anstieg des PI3,5P₂-Levels zusammenhängt, ist nicht geklärt. Die Anreicherung von PI3,5P₂ in manchen Pflanzen bei Hyperosmose ist ebenfalls beschrieben worden (Meijer *et al.*, 1999). So wird PI3,5P₂ in *Chlamydomonas* allgemein bei osmotischem Stress gebildet, während die Ausschüttung von PI4,5P₂ abhängig vom Signal ist. Salz induziert diese, während der Gehalt bei Mannitolbehandlung konstant ist (Munnik und Meijer, 2001). In *Arabidopsis* ist die Bildung von PI4,5P₂ Stimulus-unspezifisch. Der Gehalt an PI3,5P₂ wurde nicht untersucht (Pical *et al.*, 1999). Über die Beteiligung von PLCs an der Hydrolyse von PI3,5P₂ und ein daraus resultierendes verringertes Signal wird spekuliert und bisher noch keine Daten publiziert worden (Cooke, 2002). Hier könnte die Funktion von *Pp*PLC2 liegen. Durch das Ausbleiben der Hydrolyse von PI3,5P₂ würde der Reiz nicht abgebaut werden. Angenommen, das natürliche Substrat für *Pp*PLC2 wäre PI3,5P₂, so führte das Ausbleiben der Hydrolyse durch den PLC2-*knockout* zur Anhäufung von PI3,5P₂. Der anhaltende Reiz würde zur Hypersensitivität gegenüber osmotischem Stress, evtl. auch gegenüber ABA führen. So könnte auch ein Zusammenhang zwischen der Ausschüttung von ABA und PI3,5P₂ hergestellt werden, was bisher nicht näher untersucht wurde.

4.3 Die Expressionsänderung von PLC2 und PLC3

Die Expression der untersuchten *plc*-Gene in *Physcomitrella patens* wurde quantifiziert (Abb 3-15). Dabei zeigte sich, dass *plc1* wie auch Aktin stark exprimiert werden. Die Expression von *plc2* und *plc3* ist verhältnismäßig schwach (30 % und 50 % von *plc1*). Mittels semiquantitativer RT-PCR war eine Erhöhung des *plc2*-Transkripts bei Behandlung mit Salz oder Mannitol und zusätzlicher Dunkelheit messbar (Abb 3-17; Abb 3-18). Dabei wurde eine konstitutive Expression von Aktin unter diesen Bedingungen angenommen. Der osmotische

Stress hat vermutlich keine direkte Expressionssteigerung zur Folge. Vielmehr scheint für eine längerfristige Adaptation an die Situation eine erhöhte Menge Enzym nötig zu sein.

Im Gegensatz zu der Induktion durch osmotischem Stress, hatte ABA keine Auswirkung auf die Expression von *plc2*. Dieses könnte mit einer unterschiedlichen Wirkung von exogenem und endogenem ABA auf *Physcomitrella patens* korrelieren, wie es auch für die schützende Wirkung von ABA bei Frost beschrieben wurde (Minami *et al.*, 2005). Es ist aber anzunehmen, dass osmotischer Stress ebenfalls in *Physcomitrella patens* ABA-unabhängig weitergeleitet werden kann, wie es für Kältestress bekannt ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Expression von Aktin in gleichem Maße durch ABA erhöht wird, so dass kein Unterschied im *plc2*-Transkript erkennbar wäre.

Die Expression von *plc3* wurde bei osmotischem Stress nicht erhöht. Vielmehr zeigte sich, dass der Einfluss von Auxin PLC3 induziert (Abb 3-16). Dieses liefert einen ersten Hinweis auf die Rolle von PLC3 im Auxin-Signalweg.

Eine Bestätigung der Ergebnisse aus den RT-PCR-Studien sollten durch Northern Blot Analysen stattfinden. Erste Versuche, diese Methode zu etablieren wurden in zwei Arbeiten durchgeführt (Klare, 2006; Rußmann, 2006). Es konnte dort keine spezifische Anfärbung der Transkripte erzielt werden. Weitere Optimierungsversuche wurden nicht durchgeführt. Die Northern Blot Methode für die Anfärbung der RNA aus *Physcomitrella patens* scheint allgemein eine nicht häufig verwendete Methode zu sein. Zukünftige Arbeiten sollten sich auf die Etablierung dieser Methode konzentrieren.

4.4 Die Lokalisation von PLC2 und PLC3 in der Zelle

Die Klassifizierung in Typ I- und Typ II-PLCs in Pflanzen ist angelehnt an die Erkenntnisse tierischer PLC δ . Die verschiedenen PLC δ -Isoenzyme unterscheiden sich im pH-Wert Optimum, in benötigter Calciumkonzentration und/oder der Substratpräferenz (Griendling *et al.*, 1991). Zumeist sind PI-hydrolysierende PLCs mit einem millimolaren Calciumbedarf in der cytosolischen Fraktion und PIP₂-bevorzugende PLCs mit mikromolarem Calciumbedarf in der Membranfraktion beschrieben worden. Allerdings besteht auch in einigen Organismen die

Möglichkeit, dass ein Enzym beide Substrate hydrolysieren oder zwischen den Kompartimenten transloziert werden kann. *RnPLC δ 1* ist unter normalen Bedingungen durch die PH-Domäne an die Membran verankert. Wird ein hypo-osmotischer Schock ausgelöst, dissoziiert das Enzym von der Membran (Fujii *et al.*, 1999).

In Pflanzen wäre es möglich, dass PLC vom Typ I nicht ausschließlich cytosolisch vorliegt. Eine schwächere Bindung, wie sie später noch diskutiert wird (s. 4.5), könnte für die Aktivität verantwortlich sein, die in der löslichen Fraktion gefunden wurde. Über ein biphasisches Verhalten, wie es für PLC δ 1 beschrieben wurde, kann spekuliert werden. In Pollenschläuchen von *Petunia* wird ebenfalls eine Dissoziation der PLC1 am Apex bei hohen Calciumkonzentrationen angenommen (Dowd *et al.*, 2006). Ein Calciumgradient vom Apex zur Basis wurde auch beim Spitzenwachstum von *Ceratodon purpureus*-Moosprotonema oder Pollenschläuchen von *Lilium longiflorum* gemessen (Hartmann und Weber, 1988; Reiss *et al.*, 1983). Dieser ist vermutlich für ein gerichtetes Spitzenwachstum nötig.

Mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie-Studien konnte das PLC2-GFP Fusionsprotein in zwei unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert werden. Zum einen wurde GFP-Fluoreszenz am Chloroplasten festgestellt (Abb 3-19), zum anderen akkumulierte das Protein im Cytosol (Abb 3-20). Die unterschiedlichen Lokalisationen ergaben sich abhängig von der Inkubationstemperatur der transformierten Protoplasten. Durch ein verlangsamtes Wachstum bei 12 °C könnten die beiden Lokalisationen aber auch altersabhängig auftreten. Es ist zudem nicht geklärt, ob die Fluoreszenz innerhalb oder außerhalb des Chloroplasten auftrat. Möglich wäre auch eine Akkumulation des Proteins zwischen beiden Chloroplastenmembranen. Entgegen der Wahrscheinlichkeit einer chloroplastidären Lokalisation durch einen Vergleich mit bekannten Chloroplastenproteinen anderer Pflanzen, könnte PLC2 durch Transporter der äußeren und inneren Chloroplastenmembran geschleust werden. Die Veränderung der Membranfluidität und der benötigten Transporter bei 12 °C könnte eine Translokation durch die Chloroplastenmembran verhindern und das Protein würde im Cytosol akkumulieren. Auch ein biphasisches Verhalten des Enzyms ist denkbar. Kälte beeinflusst viele Enzyme, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind. Häufig laufen die Signalwege von Salz, Trockenheit und Kälte zusammen (Xiong *et al.*, 2002). Weiterhin könnte eine Veränderung während der

Entwicklung von *Physcomitrella patens* ursächlich sein. Bei *Ricinus communis* findet sich eine solche altersabhängige Translokation der PLD. In jungen Blättern sind manche PLD-Isoformen löslich, die sich in älteren Blättern in Mikrosomen befinden (Xu *et al.*, 1996). Eine Bestätigung der beiden Lokalisationen von PLC2 durch eine andere Methode ist notwendig. Dazu wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, einen polyklonalen Antikörper herstellen zu lassen. Dieser hätte für weitere Methoden zum Nachweis der Lokalisation von PLC3, z.B. für eine immun-histochemische Färbung, zur Verfügung stehen sollen. Bereits eine Sequenzanalyse der bekannten plc-Sequenzen aus *Physcomitrella patens* zeigte, dass wahrscheinlich weder eine genetische Immunisierung, noch eine Immunisierung mit dem rekombinanten Protein erfolgreich wäre. Die Tertiärstrukturen von PLC2 und PLC3 sind vermutlich zu ähnlich, so dass ein polyklonaler Antikörper Epitope beider Proteine erkennen würde.

Um die vorangegangene Vermutung einer dualen Lokalisierung von PLC3 zu überprüfen, wurden mehrere GFP-Fusionsplasmide generiert. Diese beinhalteten entweder das Gen mit dem ersten Startkodon (Exon 0 + plc3-GFP), mit dem zweiten Startkodon (plc3-GFP) oder nur die Sequenz vor dem zweiten Startkodon (Exon 0-GFP). Anschließend hätten Mutationen der putativen Transitsequenz durchgeführt werden können, um die Funktion dieser zu überprüfen. Aber weder die Fusionsplasmide mit einem vorgeschalteten Aktin-Promotor aus Reis, noch die mit einem 35 S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus erbrachten eine sichtbare Fluoreszenz der transient transformierten Protoplasten. Möglicherweise sind beide verwendete Promotoren ungeeignet und lassen das Protein in zu niedriger oder zu hoher, toxischer Konzentration transkribieren. Denkbar wäre auch, dass zusätzliche Faktoren für eine erfolgreiche Translation fehlen, die in der 5'-UTR-Sequenz liegen. Um derartige Probleme zu umgehen, sollte versucht werden, stabile Transformanten herzustellen, bei denen die natürliche Genumgebung erhalten bliebe. So würde auch deutlich werden, ob ein duales Targeting vorliegt oder eventuell nur ein Startkodon genutzt wird. Auch in diesem Fall könnte ein Antikörper Aufschluss über die Lokalisation von PLC3 geben.

4.5 Biochemische Charakterisierung der PLC-Isoformen

Die pflanzlichen Typ I Phospholipasen C waren bisher nur biochemisch beschrieben. Einige Hinweise auf die Funktion und Reaktion dieser PLC-Gruppe können bei bakteriellen PLCs gesucht werden. Die Hydrolyse von PI liefert DAG und zyklisches IP (Irvine *et al.*, 1980). Diese Gruppe der PI-hydrolysierenden PLCs wird als eigenständiges Enzym (EC 4.6.1.13) beschrieben. Die bakteriellen PLCs sind unspezifisch gegenüber PI oder PIP₂ oder sie hydrolysieren ausschließlich PI, wenn sie sekretiert werden (Zhou *et al.*, 1997). Sie sind mit etwa 30 kDa kleiner als PLCs anderer Organismen und lediglich die katalytische X-Domäne scheint zu eukaryotischen PLCs Ähnlichkeit zu haben.

Die Reaktion der PIP₂-hydrolysierenden PLCs in Pflanzen wird als eine zweistufige Reaktion dargestellt, bei der im ersten Schritt DAG und zyklisches IP₃ gebildet wird. Diese Teilreaktion greift demnach nur die Phosphoesterbindung an, die zweite Teilreaktion dann das restliche Inositolphosphat. Die Typ I-PLCs scheinen den zweiten Reaktionsschritt, die Dezyklisierung, nicht katalysieren zu können. Möglicherweise fehlt dazu ein Cofaktor, der sich in der Membran befinden könnte. Die Hydrolyse von PI_{4,5}P₂ findet in den Typ I-PLCs nicht statt. Die katalytische Domäne, besonders das beschriebene Fehlen des Ser⁵²²-Restes in der aktiven Bindestelle des Enzyms, das bei tierischen PLCs für eine Interaktion mit der Phosphorylgruppe an C₄ Position interagiert, könnte durch sterische Interaktionen eine Bindung von PI_{4,5}P₂ verhindern. Denkbar ist auch eine stattfindende Bindung des Substrats, aber eine ausbleibende Hydrolyse. Es wird eine PI-hydrolysierende PLC aus *Oryza sativa* beschrieben, die PI_{4,5}P₂ nach Zugabe von Membranfraktion hydrolysieren kann (Yotsushima *et al.*, 1993). Somit könnte auch ein membranständiger Cofaktor für die diversen biochemischen Eigenschaften der Typ I- und Typ II-PLCs verantwortlich sein.

Anhand der Substratbindungs-Assays wurde gezeigt, dass eine Bindung von monophosphoryliertem PI bei PLC2 aus *Physcomitrella patens* stattfinden kann, auch wenn der Phosphorylrest in C₄-Position gebunden war (Abb 3-22). Das fehlende Ser⁵²² kann nicht alleine für die fehlende Hydrolyse von PI_{4,5}P₂ verantwortlich sein. Möglich wäre wiederum, dass PI_{3,5}P₂ als natürliches Substrat dient. Die Hydrolyse von PI_{3,5}P₂ oder anderer Phosphatidylinositolen durch Typ I-

PLCs wurde bisher nicht getestet. Die Hydrolyse von PI ist verhältnismäßig schwach und es erscheint schlüssig, dass das natürliche Substrat nicht PI ist.

PLC4 entspricht vermutlich dem Typ II pflanzlicher PLCs. Die Bindung an monophosphorylierte Substrate findet nur bei PI5P statt. Eventuell benötigen Typ II-PLCs für die Aktivierung beide Phosphorylgruppen.

Die Funktion einiger Phosphoinositole besteht in der Verankerung von Proteinen an Membranen. Auch diese Möglichkeit besteht als Aufgabe von monophosphorylierten Substraten bei der Bindung an PLCs. Während Typ II-PLCs PI3P oder PI4P fest gebunden haben könnten und somit bei der Reinigung nicht von der Membran gelöst würden, wäre die Bindung der Typ I-PLCs an PI3P oder PI4P schwächer, so dass sie bei der Reinigungsprozedur von der Membran diffundieren würden. Ähnliche Unterschiede finden sich auch in anderen Enzymgruppen, bei denen einige Untergruppen Cofaktoren kovalent, andere nicht-kovalent gebunden haben (Denger *et al.*, 2001). In PLC ζ hat die Bindung von PI3P oder PI5P an die C2-Domäne eine inhibierende Wirkung auf die Reaktion (Kouchi *et al.*, 2005). Von einer cytosolischen PLC, die aus der Milz gereinigt wurde, ist bisher bekannt, dass sie nur in der cytosolischen Form aktiv ist und nach Bindung an die Membran in einer inaktiven Form vorliegt (Roy *et al.*, 1991). Eine Bindung von PLC2 an die Membran könnte auch in *Physcomitrella patens* die biochemischen Eigenschaften verändern.

Zusätzlich ist eine Bindung aller untersuchten PpPLC-Isoformen an PA gezeigt worden (Abb 3-22). PA stimuliert die PI-PLC-Reaktion (Irvine *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1986). Die Bildung von PA durch die Reaktion der PLD wird z.B. bei Trockenheit oder Hyperosmose gefördert. Allerdings wird die Stresstoleranz erniedrigt, da PA auf Zellmembranen destabilisierend wirkt (Wang, 1999). Die Hydrolyse von PIP₂ zu IP₃ und DAG wird also auf zwei Wegen zusätzlich aktiviert. Einmal entlässt IP₃ Calcium, welches das Enzym für die Hydrolyse benötigt, zum anderen wird die PLC von PA, dem Folgeprodukt von DAG, aktiviert. Die Aktivitätssteigerung der PLC vom Typ I hätte zur Folge, dass PI noch vor der Phosphorylierung zu PIP oder PIP₂ durch PI-Kinasen hydrolysiert wird. Je mehr Calcium vorliegt, desto mehr wird die Bildung des Substrats für die PIP₂-hydrolysierende PLC unterbunden. Das PA-Signal kann durch die Reaktion von PA mit Cytidin-triphosphat (CTP) zu CDP-DAG und Pyrophosphat abgebaut

werden. Diese Reaktion wird von der CDP-DAG-Synthase (CDS) katalysiert. CDP-DAG dient als Vorstufe von PI durch die Reaktion der PI-Synthase (Kopka *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 2000). Unabhängig von einer direkten Stimulierung der PLC durch PA würde die o.g. Reaktion das Substrat für die Typ I-PLC liefern.

Eine Bindung an die hydrolysierbaren Substrate wurde in keinem der Proteine festgestellt. Möglicherweise fehlt für die Bindung ein Cofaktor. Da alle sichtbaren Bindungen schwach waren, könnte auch die Optimierung der Versuchsbedingungen weitere Bindungen deutlich machen. Es könnten Veränderungen des Protein-Substrat-Verhältnis oder Veränderungen bei der immunologische Färbung durchgeführt werden.

4.6 Die Beteiligung der PLC-Isoformen von *Physcomitrella patens* an verschiedenen Signalwegen

Die vorangegangenen Analysen zeigen, dass *Physcomitrella patens* alle drei bisher untersuchten PLCs für unterschiedliche Signalwege benötigt. PLC1 ist für die Weiterleitung des Reizes bei der Gametophorenbildung verantwortlich, die durch Cytokinin vermittelt wird. Zudem ist PLC1 an dem gravitropen Verhalten von *Physcomitrella patens* beteiligt, was durch die Untersuchung einer *knockout*-Mutante deutlich wurde (Repp *et al.*, 2004).

Die sich strukturell sehr ähnlichen PLC2 und PLC3 Isoformen in *Physcomitrella patens* sind an zwei unterschiedlichen Signalwegen beteiligt. Während *plc3* durch Auxin verstärkt exprimiert wird (Abb 3-16), ändert sich die Expression von *plc2* bei osmotischem Stress und Dunkelheit (Abb 3-17; Abb 3-18). In Spermatophyten sind häufig Untersuchungen an der Beteiligung von PLCs bei der Bewältigung von osmotischem Stress gemacht worden, während der Einfluss von Cytokinin oder Auxin eher auf die Isoformen der PLDs bezogen wurde. In *Physcomitrella patens* ist nicht bekannt, inwiefern PLD bei den Signalwegen von Auxin oder Cytokinin beteiligt ist. Bisher sind vier Gene für die Kodierung von PLDs in *Physcomitrella patens* gefunden worden, die noch nicht charakterisiert wurden (Elias *et al.*, 2002). Die PLC-Isoformen in *Physcomitrella patens* scheinen an vielfältigeren Entwicklungsprozessen oder Stresssituationen beteiligt zu sein als die PLCs höher

entwickelter Pflanzen, werden v.a. die Daten von *Arabidopsis* als Vergleich herangezogen. Im Laufe der Evolution könnte als eine weitere Anpassung an das Landleben eine Spezialisierung der PLC auf osmotische Stresssituationen stattgefunden haben. Dieses könnte auch einen möglichen Verlust im Laufe der Evolution der strukturell so abweichenden PLC2 und PLC3 aus *Physcomitrella patens* erklären.

4.7 Ausblick

Die beiden untersuchten Isoformen in *Physcomitrella patens* unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von den übrigen pflanzlichen PLC-Isoformen. Es wäre von großem Interesse, inwiefern sich diese Merkmale in anderen Pflanzen wiederfinden lassen oder ob sie einzig auf die Laubmoose oder gar nur auf *Physcomitrella patens* bezogen werden können. Dazu müsste in anderen Laubmoosarten, z.B. *Ceratodon purpureus* nach ähnlichen Genen für PLCs gesucht werden. Biochemische Untersuchungen mit diesen PLCs und mit *Pp*PLC3 sollten in Zukunft durchgeführt werden.

Besondere Beachtung muss auf die Etablierung der Northern Blot Technik bei *Physcomitrella patens* gerichtet sein, da diese Daten zur Bestätigung der erstellten Expressionsmuster unerlässlich sind.

In weiteren Arbeiten scheint es zudem sinnvoll, durch Zweihybriden Systeme nach möglichen Interaktionspartnern der PLCs zu suchen. Die ersten Studien dazu zeigten, dass diese Methode dafür gut geeignet ist. Noch fehlen Hinweise auf weitere Proteine, die bei der Signalweiterleitung direkt stromaufwärts oder – abwärts des PLC-Signals liegen könnten. Die Sequenzierung des Genoms von *Physcomitrella patens*, das noch in diesem Jahr annotiert werden soll, wird die Suche danach entscheidend vereinfachen.