

5 Zusammenfassung

In *Physcomitrella patens* waren bisher zwei Gene für die Kodierung von Phospholipasen C bekannt (plc1 und plc2). Zusätzlich wurden zwei plc-Gene (plc3 und plc4) aus *Physcomitrella patens* isoliert und sequenziert. Ein Vergleich der vier Sequenzen macht eine Unterteilung in zwei strukturell unterschiedliche Gruppen deutlich bei denen sich die plc2- und plc3-Sequenzen in wichtigen Aspekten von den anderen bekannten pflanzlichen plc-Sequenzen unterscheiden. Interessanterweise ist der 5'-UTR-Bereich von plc2 und plc3 durch ein Intron vom restlichen Gen getrennt. Dieser ergibt in der Sequenz von plc3 ein sinnvolles Leseraster mit einem zweiten möglichen Translationsstart. Die Übersetzung in eine Aminosäuresequenz weist eine Ähnlichkeit zu bekannten pflanzlichen Chloroplasten-Signalsequenzen auf.

Eine Unterbrechung der EF-Hand Domäne, wie sie in der Sequenz von PLC2 vorhanden ist, ist auch in der Sequenz von PLC3 zu finden. Es sind in beiden Sequenzen im Vergleich mit anderen pflanzlichen PLCs konservierte Aminosäuren ausgetauscht. Die Aminosäureidentität zueinander ist mit 55 % am höchsten, die Identitäten zu anderen PLCs liegen bei maximal 30 %. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu PLC2 wird angenommen, dass auch PLC3 dem Typ I pflanzlicher PLCs angehört.

Es wurden Konstrukte für einen zielgerichteten *knockout* von PLC2, PLC3 und PLC4 generiert, welche mittels homologer Rekombination in das Genom von *Physcomitrella patens* integriert werden sollten. Nach der Transformation wurde eine *plc2-knockout*-Mutante isoliert, um die Auswirkungen des fehlenden Enzyms physiologisch zu beobachten.

Die Mutante verhält sich unter Standardbedingungen wie der Wildtyp. Ein Wachstum auf abscisinäurehaltigem Medium verzögert die Gametophorenbildung der Mutante stärker als im Wildtyp. Wird zusätzlich Licht entzogen, bleibt das Wachstum der Mutante aus. Zugabe von Mannitol als osmotisch wirksame Substanz hemmt das Wachstum der Mutante in Dunkelheit stark. Die Expression von PLC2 ist bei Behandlung mit Mannitol oder Salz im Dunkeln erhöht. Osmotischer Stress wird in Pflanzen häufig über die Ausschüttung von Abscisin-

säure vermittelt. PLC2 übernimmt in *Physcomitrella patens* wahrscheinlich eine Rolle bei der durch Abscisinsäure vermittelten Stressantwort. Die Expression von PLC3 ändert sich bei diesen Bedingungen nicht.

Die Lokalisation von PLC2 wurde durch GFP-Fusionsproteine untersucht. Es zeigte sich eine cytoplasmatische und eine plastidäre Lokalisation von PLC2 in Abhängigkeit vom Alter des Protonemas oder der Inkubations-Temperatur. PLC3-GFP wurde nicht detektiert. Antikörper, die zu dieser Fragestellung hätten Aufschluss bringen können, konnten wegen wahrscheinlicher Kreuzreaktionen mit anderen PLC-Isoformen nicht hergestellt werden.

Um die biochemischen Eigenschaften der bisher unbekanntenen PLC3- und PLC4-Isoform aus *Physcomitrella patens* näher zu analysieren, wurden diese als rekombinante Proteine isoliert. Die Substratbindung verschiedener Phospholipide an PLC2, PLC3 und PLC4 wurde überprüft. Eine Bindung von Phosphatidylinositol oder Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat war für keine PLC nachweisbar. Eine Affinität aller drei Proteine zu Phosphatidsäure und Phosphatidylinositol-5-Phosphat wurde dagegen gezeigt. Eine Bindung von monophosphorylierten Phosphatidylinositolen wurde zusätzlich bei PLC2 und PLC3 nachgewiesen.

Summary

To date, two genes were known to code for Phospholipases C in *Physcomitrella patens* (plc1 and plc2). Additionally, two other genes for phospholipase C in *Physcomitrella patens* (plc3 and plc4) were now cloned and sequenced. *Ppplc2* and *Ppplc3* show different structural characteristics compared to several known plant plc-sequences. In both genes, 5'-untranslated regions are disrupted by an intron-sequence. Interestingly, the 5'-UTR of plc3 provides an open reading frame with a second startcodon upstream of the putative transcription start. Translation of this N-terminal region into an amino acid sequence reveals significant homology to plant chloroplast target sequences. Another structural feature is a disruption of the EF-hand domain which can be found in PLC2 and PLC3 and

some conserved aminoacids in plant PLC sequences are substituted in both isoforms.

Aligning several known PLC-sequences, PLC2 and PLC3 show highest identity at 55 % to each other, but to other plant PLCs about 30 %. Dued to this distinctive features, it seems likely that in addition to PLC2, also PLC3 belongs to plant type I PLCs.

To further characterize the physiological role of PLC-Isoforms in *Physcomitrella patens*, gene replacement constructs of *plc2*, *plc3* and *plc4* were generated. Using gene replacement via homologous recombination, a single disruptant of *plc2* was isolated.

The knockout of *PpPLC2* has no obvious phenotype under standard growth conditions. However, treatment with stress mediating substances like abscisic acid (ABA) or mannitol results in delayed growth particularly in continuous dark. The expression of *plc2* increases under darkness and additional stress conditions like mannitol or salt. It seems that PLC2 mediates stress tolerance in an ABA-dependent manner. In contrast to *plc2* transcription of *plc3* is not affected by osmotic stress.

By dint of GFP-fusion proteins the intracellular localisation of *PpPLC2* was investigated. In conclusion, PLC2 is apparently dual targeted to chloroplast or to cytosol dependent on age of protonema or on temperature. PLC3-GFP constructs could not be detected. A generation of specific antibodies which help to localize PLC2 or PLC3 failed dued to proper cross reactions.

To further characterize *PpPLC3* and *PpPLC4* biochemically, recombinant proteins were isolated and further analysed. Subsequently, affinity of PLC2, PLC3 and PLC4 to several phospholipids was investigated. Binding of all three isoforms affords to phosphatidic acid and phosphatidylinositol 5-phosphate, but not to hydrolysed substrates phosphatidylinositol or phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Moreover PLC2 and PLC3 isoforms binds to other mono-phosphorylated substrates.