

Molekularbiologische Untersuchungen zum  
Phytochromsystem der Moose *Physcomitrella patens* und  
*Ceratodon purpureus*

im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin  
eingereichte Dissertation zum Erlangen des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Franz Mittmann  
Berlin, 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Elmar Hartmann
2. Gutachter: Prof. Jon Hughes

Tag der Disputation: 7.2.2003

für Anke

# Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Phytochrome	1
1.1.1	Phytochrome in <i>Physcomitrella</i> und <i>Ceratodon</i>	3
1.2	Moose als genetische Modellsysteme	4
1.3	Homologe Rekombination / <i>gene targeting</i>	6
1.3.1	<i>gene targeting</i> in Prokaryonten, Hefe und Maus	6
1.3.2	homologe Rekombination / <i>gene targeting</i> in Pflanzen	7
1.4	<i>gene targeting</i> in <i>Physcomitrella</i>	10
1.5	<i>gene substitution</i>	14
1.6	Ziele der Arbeit	15
2	Abkürzungen	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Organismen	18
3.1.1	Moose:	18
3.1.2	Bakterienstämme	18
3.2	Feinchemikalien & Materialien	18
3.3	Lösungen & Puffer	19
3.3.1	Medien für Moosanzucht	19
3.3.2	<i>E.coli</i> Medien	21
3.3.3	Lösungen für DNA-Extraktion aus Moos	21
3.3.4	Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese & Southern blotting	22
3.3.5	Lösungen für Polyacrylamidgelelektrophorese und Western blotting	22
3.3.6	eingesetzte Plasmide	23
3.4	DNA-Isolierung	24
3.4.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus Moos für Southern blotting	24
3.4.2	Gesamt-DNA-Extraktion für Transformantenscreening via PCR	25
3.4.3	Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen	25
3.5	DNA-Analyse	25
3.5.1	Gelelektrophoresen	25
3.5.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	26
3.5.3	RNA-Extraktion	26
3.5.4	3'-RAcE und RT-PCR	27
3.5.5	5'-RAcE	27
3.5.6	Standardklonierungen & Transformation von <i>E. coli</i>	27
3.5.7	Screening von <i>E. coli</i> -Kolonien	28
3.5.8	Plasmid-Minipräparationen aus <i>E. coli</i>	28
3.5.9	Sequenzierungen	28
3.5.10	Detektion spezifischer DNA-Sequenzen via Southern blotting	29
3.5.11	Sequenzanalyse	31
3.6	Transformation von <i>Physcomitrella patens</i>	31
3.6.1	Modifikationen der Standardtechnik	32
3.6.2	Herstellung der <i>knockout</i> -Konstrukte	32
3.6.3	<i>gene substitution</i>	36
3.6.4	Selektion stabil transformierter Linien	36

3.7	Physiologische Untersuchungen	36
3.8	Polyacrylamidgelelektrophorese und Western blotting	37
3.9	Sondenvorstufen für Northern blotting	38
3.10	Herstellung degenerierter Primer für die Suche nach NPH1-/Superchrome-Sequenzen	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Die Phytochromgene in den <i>Ceratodon</i> und <i>Physcomitrella</i> Wildtypen – Klonierung von <i>PP1-4</i> und <i>CP3</i>	39
4.1.1	Klonierung von <i>PP1</i> gDNA	39
4.1.2	Klonierung von <i>PP2</i> cDNA und gDNA	39
4.1.3	Klonierung von <i>PP3</i> cDNA und gDNA	41
4.1.4	Klonierung von <i>PP4</i> cDNA und gDNA	42
4.1.5	Klonierung von <i>CP3</i> cDNA und gDNA	42
4.2	Sequenzanalyse der Moos-Phytochrome	43
4.3	Phylogenetische Analyse ausgewählter Phytochrome	48
4.4	Southern blotting Ergebnisse von <i>CPI-3</i> und <i>PP1-4</i>	48
4.5	<i>gene targeting: knockout</i> von <i>PP1-4</i> aus <i>Physcomitrella</i>	50
4.5.1	PCR-Analyse	50
4.5.2	RT-PCR als Beleg für erfolgten <i>knockout</i>	52
4.5.3	Southern blotting Ergebnisse	53
4.5.4	Physiologische Untersuchung der <i>PP1-knockout</i> -Linie 2.17	56
4.5.5	Western blot mit <i>PP1-knockout</i> 2.17	58
4.5.6	Erste Ergebnisse zum Versuch, Mehrfach-knockout-Linien herzustellen	58
4.6	<i>knockout</i> von <i>PpPLC1</i> aus <i>Physcomitrella</i>	59
4.7	<i>gene substitution</i>	62
4.8	Effizienzen der verschiedenen <i>knockout</i> -Konstrukte	63
4.9	Klonierung von <i>NPH1-</i> / Superchrome-Sequenzen	64
4.10	Klonierung der <i>Ceratodon</i> - und <i>Physcomitrella</i> Häm-Oxygenase-Sequenzen	65
4.10.1	Analyse der <i>CpHO1</i> -Sequenzen der class I Mutanten ptr116 und ptrP14	69
4.11	Gene Targeting in <i>Ceratodon</i>	71
5	Diskussion	73
5.1	DNA-Extraktion für Southern blots	73
5.2	Phytochrome in <i>Ceratodon</i> und <i>Physcomitrella</i>	73
5.2.1	Northern und Western blots	75
5.3	Physiologische Analyse von WT und Phytochrom- <i>knockout</i> -Linien aus <i>Physcomitrella</i>	76
5.4	<i>Gene Targeting</i> in <i>Physcomitrella</i>	79
5.5	<i>Gene Targeting</i> in <i>Ceratodon</i>	81
6	Zusammenfassung und Ausblick	83
7	Literatur	85
8	Anhang	93
9	Danksagung	94