

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Organismen

3.1.1 Moose:

Ceratodon purpureus: Wildtyp wt4 (Hartmann *et al.* 1983); ptr116 und ptrP14. Diese Phototropismus-Mutanten wurden aus dem genannten wt durch UV-Mutagenese (ptr116; Lamparter *et al.* 1996) bzw. Protoplastierung (ptrP14, Esch 1998) hergestellt.

Physcomitrella patens. Wildtypen DC (Ashton & Cove 1977) und TG (Girke *et al.* 1998).

Ceratodon purpureus und *Physcomitrella patens* Wildtypen wurden in mit Parafilm umschlossenen Petrischalen auf Festmedium oder in Flüssigkulturen bei 20°C oder 25°C in einem 8 h Nacht und 16 h Tag-Rhythmus (Phillips MCFE *weiß*, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) kultiviert. Für *Physcomitrella*-Flüssigkulturen wurde der Hals des Erlenmeyerkolbens mit einem Wattestopfen (Roth), durch den eine 10 ml Glaspipette geführt war, die bis fast zum Kolbenboden reichte, verschlossen und mit Aluminiumfolie umwickelt. Auf das Ende der Pipette wurde das Ende eines *ca.* 25 cm langen Silikonschlauches geschoben und dessen anderes Ende mit einem Sterilfilter oder zunächst mit Aluminiumfolie verschlossen. Die Belüftungsapparatur wurde so autoklaviert und unter einer Reinluftarbeitsbank geöffnet, mit Medium und Mooskulturen versehen und sofern noch notwendig mit einem Sterilfilter versehen. Für die Belüftung der Kulturen wurde über eine Membranpumpe (Vacuubrand) Wasser-gesättigte Luft durch den Sterilfilter geblasen. Alle 2 bis 4 Wochen (*Ceratodon*) bzw. 4-8 Tage (*Physcomitrella*) wurden die Kulturen geerntet, in sterilem MilliQ-Wasser aufgenommen, 10-30 sek. zerkleinert (Ultraturrax KGL2, 9.500 min^{-1} ; Einsätze S25KG und S25N-18G; IKA Labortechnik) und auf/in frisches Medium überführt.

3.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli K12; DH5 α MCR (Stratagene, Heidelberg). Dieser *strain* erlaubt in Kombination mit geeigneten Plasmiden wie pBluescript oder pTAdvantage ein *blue/white screening* mittels α -Komplementierung (Sambrook & Russell 2001). Er ist ein *amber*-Suppressor sowie rekombinationsdefizient (keine unerwünschten Rekombinations-Ereignisse innerhalb/zwischen Plasmid-Sequenzen) und eignet sich sehr gut für das Klonieren methylierter DNA.

3.2 Feinchemikalien & Materialien

Feinchemikalien stammten, sofern nicht explizit anders ausgewiesen von Sigma oder Roth.

3.3 Lösungen & Puffer

Alle nachstehenden Medien und Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser (Millipore) hergestellt; diese Wasser-Qualität ist ausnahmslos gemeint, wenn im Folgenden der Begriff **Wasser** verwendet wird. Die ggf. zur Einstellung des pH-Werts verwendete Base oder Säure ist i. A. nach dem Pufferreagenz angegeben.

3.3.1 Medien für Moosanzucht

3.3.1.1 Standardmedium BCE205 und modifiziertes Medium mit Glucose: BCE225:

Als Standardmedium wurde für beide Moose BCE205 verwendet. Es bietet relativ hohe Konzentrationen von Stickstoff-Quellen (Ammonium) und Calcium, so dass ein verglichen mit dem Medium 1b (3.3.1.2) relativ langes unlimitiertes Wachstum möglich ist. Für physiologische Untersuchungen, die ein Wachstum im Dunkeln erforderten, wurde die Modifizierte Version dieses Mediums, BCE225, mit einem Zusatz von 0,2 % (w/v) Glucose eingesetzt:

Stammlösung	Komponente	Endkonzentration
B	MgSO ₄	1 mM
C	KH ₂ PO ₄ pH 6,5 (KOH)	2 mM
E	KNO ₃	10 mM
	C ₆ H ₅ O ₇ Fe	0,05 mM
2	CaCl ₂	2 mM
	Glucose (nur in BCE225)	0,2 % (w/v)
5	C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5 mM

Spurenelemente nach Hoagland wurden aus einer 1000x konzentrierten Stammlösung vor dem Autoklavieren zugegeben (angegeben sind die Endkonzentrationen): 0,2 mM CuSO₄, 0,2 mM ZnSO₄, 10 mM H₃BO₄, 2,0 mM MnCl₂, 0,2 mM CoCl₂, 0,2 mM KJ, 0,1 mM Na₂MoO₄. Flüssigkulturen wurden in 500-2000 ml Erlenmeyerkolben gehalten; für Platten wurde 1,2 % (w/v) Agar (Sigma) vor dem Autoklavieren zugegeben.

Die Stammlösungen B, C und E sowie die Spurenelemente wurden mit MilliQ-Wasser gemischt autoklaviert. CaCl₂ und Di-Ammoniumtartrat ("2" bzw. "5") wurden getrennt autoklaviert und ebenso wie die ggf. benötigten Antibiotika (Hygromycin B, 25 µg/l Endkonzentration, aus 2000x wässriger Stammlösung; G418, 30 µg/l Endkonzentration, aus 1000x wässriger Stammlösung; sterilfiltriert) den Medien nach Abkühlen auf ca. 50 °C zugegeben.

3.3.1.2 Medium 1b und 3

Von allen Kulturen wurden jeweils Aliquots auf Medium 3 gehalten, das hervorragende Wachstumsbedingungen bietet – weniger für die Moose, als für pro- und eukaryontische Mikroorganismen. Damit ist dieses Medium sehr geeignet, frühzeitig Kontaminationen der

Mooskulturen zu erkennen. Das Medium 1b ist eine Alternative für BCE225 bei physiologischen Untersuchungen gewesen.

Komponente	Endkonzentration
KNO ₃	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
MgSO ₄	40 µM
C ₆ H ₅ O ₇ Fe	10 µM
C ₆ H ₁₂ O ₆	27 mM
Hefeextrakt (nur in Medium 3)	0,3 % (w/v)
Agar	1,2 % (w/v)

Von allen gelösten Komponenten (1000x) wurde je 1 ml zu einer entsprechenden Menge Wasser gegeben, der pH-Wert auf 5,8 mit KOH justiert, dann wurden Glucose, Hefeextrakt, Spurenelemente (wie bei BCE205) und Agar zugegeben und das Medium autoklaviert.

3.3.1.3 Medien für die Moos-Transformation

8% (w/v) D-mannitol Lösung

D-mannitol 80 g/l
Sterilisiert durch Autoklavieren.

Driselase Lösung

Driselase-Lösung für eine Transformation mit 16 Ansätzen wurde hergestellt, indem 300 mg Driselase (Fluka) in 30 ml 8% D-mannitol-Lösung durch vorsichtiges Mischen und Inkubation für 15 min. bei RT gelöst wurden [1% (w/v)]; nach einer Zentrifugation für 5 min. bei 2500x g wurde der ÜS in Petrischalen sterilfiltriert.

D-mannitol/MgCl₂/MES Lösung

D-mannitol 910 mg
MilliQ-Wasser 8,85 ml
Sterilisiert durch Autoklavieren.
Am Tag der Verwendung zugeben:
1M MgCl₂ 150 µl
1% MES pH5.6 (KOH) 1 ml
Steril-filtrieren.

1M MgCl₂

MgCl₂·6H₂O 203,3 g
MilliQ-Wasser 1 l
Sterilisiert durch Autoklavieren.

1% MES pH 5.6

1% (w/v) 2-[N-morpholino] ethanesulphonic acid) in Wasser;
pH-Wert auf 5.6 mit 0.1M KOH justiert.
Sterilisiert durch Autoklavieren.

PEG für Transformation (PEGT)

PEG 6000 2g
Autoklaviert in einem Glass-Scintillationsröhrchen. Am Tag der Benutzung wurde das PEG in einem Mikrowellengerät geschmolzen und 5 ml D-mannitol/Ca(NO₃)₂ zugegeben. Nach zügigem und vollständigem Mischen mittels einer 5000- oder 10.000 µl-Kolbenhubpipette wurde das PEGT vor Gebrauch für mindestens 2 – besser 3 – Stunden abgedeckt unter der clean bench gelagert, damit der pH-Wert sich stabilisieren konnte.

D-mannitol/Ca(NO₃)₂

8% (w/v) D-Mannitol 9 ml
1M Ca(NO₃)₂ 1 ml
1M Tris Puffer, pH 8.0 100 µl
steril-filtriert.

1M Ca(NO₃)₂

Ca(NO₃)₂·4 H₂O 236.1 g/l
Sterilisiert durch Autoklavieren.

Recovery-Lösung

B, C und E (3.3.1.1) einfach konzentriert
D-Mannitol 8% (w/v)
CaCl₂ 10 mM
D-Glucose 0.5% (w/v)
(NH₄)₂-tartrat 5 mM

Protoplast Regenerationsmedien:

Bottom layer (PRMB)

BCD medium	1 l
D-Mannitol	60 g
di-Ammonium(+)tartrate	5mM
Agar	10 g

Sterilisiert durch Autoklavieren.

CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 10 mM vor Gebrauch durch Sterilfiltration zugegeben.

Top layer (PRMT)

BCD medium	1 l
D-Mannitol	80 g
di-Ammonium(+)tartrat	5mM
Agar	10 g

Sterilisiert durch Autoklavieren.

CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 10 mM vor Gebrauch durch Sterilfiltration zugegeben.

3.3.2 *E.coli* Medien

LB (Luria Bertani):

Tryptone	10g/l
Hefeextrakt	5g/l
NaCl	10g/l

RB (Rich Broth):

Glucose	2g/l
Trypton	10g/l
Hefeextrakt	5g/l
NaCl	5g/l

pH 7.6 wurde mit NaOH eingestellt, dann 20 min. autoklaviert; für plates Zugabe von Bacto-Agar (1,5 % (w/v), Sigma A9799). Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (1 mM) und X-Gal (1 mM) wurden aus sterilen Stammlösungen nach Abkühlen auf ca. 50 °C zugegeben.

SOC

Trypton	20 g/l	KCl	2,5 mM
Hefeextrakt	5 g/l	MgCl ₂	10 mM*
NaCl	10 mM	MgSO ₄	10 mM*
Glucose	0,4 % (w/v)		

* nach dem Autoklavieren durch Sterilfilter zugegeben.

3.3.3 Lösungen für DNA-Extraktion aus Moos

2x CTAB-Extraktionspuffer:

CTAB	2% (w/v)
Tris/Cl; pH: 8,0	100 mM
EDTA (pH 8,0)	20 mM
NaCl	1,4 M
PVP MW 40.000	1% (w/v)

1 (*Ceratodon*) bzw. 1.5 % (v/v) (*Physcomitrella*) β-Mercaptoethanol (β-ME) wurde frisch vor Gebrauch zugegeben.

1x CTAB-Extraktionspuffer:

1:1 Mischung von 2x CTAB-Extraktionspuffer mit MilliQ Wasser

10x CTAB

CTAB	10% (w/v)
NaCl	700 mM

CTAB-Präzipitationspuffer:

CTAB	1% (w/v)
Tris/Cl, pH 8,0	50 mM
EDTA, pH 8,0	10 mM

HS-TE:

Tris/Cl, pH 8,0	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM
NaCl	1 M

20% PEG-Lösung:

PEG 8000 20% (w/v)
NaCl 2 M

Chl./IAA:

24 Vol Chloroform
1 Vol Isoamylalkohol

3.3.4 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese & Southern blotting**10x TE**

Tris/HCl, pH 8,0 100 mM
EDTA, pH 8,0 10 mM

10x SLB

Glycerol 50 % (v/v)
Xylene cyanol 2.5 µg/ml
Bromophenol blue 2.5 µg/ml

5x TBE

Tris-Base 54 g/l
Borsäure 27,5 g/l
EDTA, 0,5 M, pH 8 20 ml/l

Natriumacetat

NaC₂O₂H₃, pH 5,5 3 M

50x TAE

Tris-Base 242 g/l
Essigsäure 57,1 ml/l
EDTA, 0,5 M, pH 8 100 ml/l

20x SSC

NaCl 3 M
Natriumcitrat, pH 7,0 300 mM

Stringenz-Waschlösung 1 ("1st Wash")

2x SSC
SDS 0,1 % (w/v)

Stringenz-Waschlösung 2 ("2nd Wash")

0,2x SSC
SDS 0,1 % (w/v)

Denaturierungslösung

NaOH 0,4 M
NaCl 1,0 M

10x DIG1

Maleinsäure/NaOH pH 7,5 1 M
NaCl 1,5 M

50 % Formamid

mit AG 501-X8 resin (Biorad) deionisiertes
Formamid, 1:1 verdünnt mit TE

DIG2 (Blockierungs-Puffer)

1x DIG1
2 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche)

DIG-Waschpuffer

1x DIG1
Tween 20 0,3 % (w/v)

DIG3 (Detektionspuffer)

Tris/HCl, pH 9,5 100 mM
NaCl 100 mM

Detektions-Lösung

DIG3 mit CDP-Star (1:100)

Stripping Lösung zum Entfernen von Sonden vor erneuter Hybridisierung

NaOH 0,2 M
SDS 0,1 % (w/v)

3.3.5 Lösungen für PAGE und Western blotting**3x SLB**

6 % (w/v) SDS, 300 mM DTT, 30% Glycerin, 48 % (v/v) Sammelgelpuffer, 0.01% Bromophenol blau

Detektionsreagenz

BCIP Stammlösung 50 mg/ml BCIP in DMF
NBT-Stammlösung 50 mg/ml NBT in DMF
Gebrauchslösung: 15 µl BCIP- und 30 µl NBT-Stammlösung pro 5 ml DIG3

Ammoniumpersulfat-LösungAmmoniumpersulfat_{aq} 10 % (w/v)**TEMED-Stammlösung**N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin in H₂O 40 % (w/v)**Sammelgelpuffer (4x)**Tris/HCl, pH 6,8 0,5 M
SDS 0,6 % (w/v)**Trenngelpuffer (4x)**Tris/HCl, pH 8,8 1,5 M
SDS 0,6 % (w/v)**Laufgelpuffer**Tris 25 mM
Glycin 192 mM
SDS 0,15% (w/v)**Transferpuffer**Tris 20 mM
Glycin 160 mM
SDS 0,15% (w/v)
Methanol 20 % (v/v)**Acryl/Bisacrylamid-Lösung**Acrylamid 30 % (w/v)
Bisacrylamid 0,8 % (w/v)**4 % Sammelgel**Acryl/Bisacrylamid-Lsg. 1 ml
Sammelgelpuffer (4x) 1,8 ml
Wasser 4,7 ml
TEMED-Stammlösung 9 µl
Ammoniumpersulfat-Lsg. 24 µl**7.5 % Trenngel**Acryl/Bisacrylamid-Lsg. 4 ml
Trenngelpuffer (4x) 4 ml
Wasser 8 ml
TEMED-Stammlösung 20 µl
Ammoniumpersulfat-Lsg. 80 µl**Waschpuffer**Tris/HCl, pH 7,4 10 mM
NaCl 0,9 % (w/v)
Tween-20 0,05% (w/v)**Waschpuffer mit BSA**

Waschpuffer plus BSA 0,3 % (w/v)

Coomassie-FärbelösungBrillant Blue R 0,04 % (w/v)
Methanol 40 % (v/v)
Essigsäure 10 % (v/v)**Entfärbelösung:**

Methanol 40 % (v/v)

3.3.6 eingesetzte Plasmide

Als Klonierungsvektoren wurden hauptsächlich pBluescript (Stratagene), pTAdvantage (Clontech) verwendet. Die Phagemiden der pBluescript-Reihe zeichnen sich – soweit hier in ihrer Funktion als *high copy* Klonierungsvektoren von Interesse – neben der geringen Größe, durch ein Ampicillin-Resistenz-Gen sowie das vom lac-Promotor getriebene lacZα Fragment, das ein *blue/white*-Screening erlaubt, aus. Die MCS wird flankiert von T7 bzw. T3 Promotoren, die in der *in vitro run off transcription* Verwendung finden. Für die Klonierung von Standard-PCR-Produkten mit A-Überhängen wurde pBluescript II SK- nach (Marchuk *et al.* 1991) modifiziert: mit dem in der MCS blunt schneidenden Enzym *EcoRV* (698; s.o.) wurde das Plasmid linearisiert und durch Inkubation mit der thermostabilen Taq-Polymerase in PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ in Anwesenheit von dTTP bei 72 °C matrizen-unabhängig mit 3'-T-Überhängen versehen. Dadurch war eine einfache und kostengünstige Klonierung von PCR-Produkten, die mehrheitlich komplementäre A-Überhänge tragen, möglich. pT-Advantage ist ein kommerzieller TA-Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten, die 3'-A-Überhänge besitzen. Er ist gegenüber pBluescript um *ca.* 1/3 größer und zeichnet sich durch eine zusätzliche Resistenz gegen Kanamycin aus. Alternativ wurden die mit 2713 bp noch kleineren *high copy* Klonierungsvektoren pNEB193 (NEB) oder pUC18/19 (2686 bp) verwendet.

3.3.6.1 pGL2, pHP23 / pHP23 Δ SaII

pGL2 wurde von Pietrzak *et al.* (1986) zur Untersuchung der Transformierbarkeit von Pflanzen entwickelt und enthält in einem pUC-Rückgrat eine Hygromycin-Resistenz-Cassette, die aus dem exklusiv in pflanzlichen Nuklei aktiven (Seki *et al.* 1995) Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV) 35S-Promotor, einem Hygromycin-Phospho-Transferase-Gen (*hpt*), sowie den 35S-Terminationssequenzen besteht.

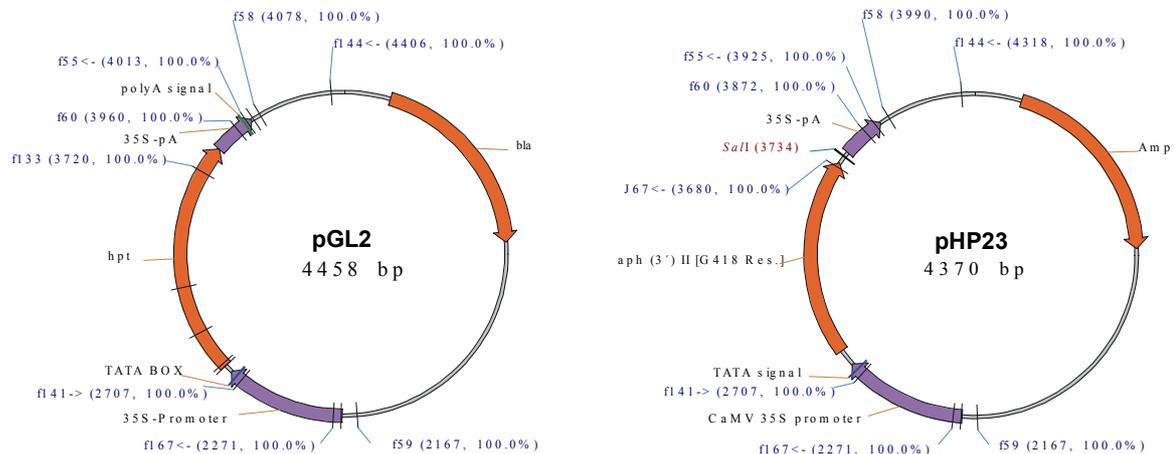


Abbildung 5. pGL2 ist ein Hygromycin-Resistenz vermittelndes Plasmid (Pietrzak *et al.* 1986). pHP23 ist ein G418-Resistenz vermittelndes Plasmid (Paszkowski *et al.* 1988).

pHP23 wurde zur Untersuchung der homologen Rekombination in *Nicotiana tabacum* hergestellt (Paszkowski *et al.* 1988) und unterscheidet sich von pGL2 im Wesentlichen durch das künstliche Resistenzgen, dessen Expression erfolgreich transformierten Pflanzen ein Wachstum auf G418 ermöglicht. In roter Schrift in Abbildung 5, rechts, ist als einzige Schnittstelle die des nur einmal im Plasmid schneidenden Restriktionsenzym *SaII* gezeigt. Bei der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Variante dieses Plasmids pHP23 Δ SaII ist diese Schnittstelle durch Linearisieren, Auffüllen der *sticky ends* und Selbstligation (Zirkularisierung) (siehe 3.5.6) entfernt worden.

3.4 DNA-Isolierung

3.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Moos für *Southern blotting*

DNA-Extraktionen für *Southern blotting* Experimente erfolgten nach einer modifizierten Methode von Rogers und Bendich (1985, 1988). In aller Kürze beschrieben wurden hierbei 5-20 g Protonemen (Frischgewicht) zusammen mit 1 Vol. 2x CTAB Extraktionspuffer in flüssigem Stickstoff gemörsert und vollständig aufgeschlossen. Das Pulver wurde zu *ca.* dem doppelten Volumen 65 °C warmen 1x CTAB-Extraktionspuffers gegeben, gemischt und nur wenige Minuten bei 65C inkubiert. Nach einer Chlorophormextraktion wurde 1/10 Vol. 10x CTAB-Puffer zugegeben, eine zweite Chlorophormextraktion durchgeführt und der Überstand mit 1 Vol. Präzipitationspuffer versetzt. Nach einer Fällung bei 65 °C für 15-45 min. (Ausubel *et al.* 1988) wurden die Nukleinsäuren pelletiert, in reichlich HS-TE gelöst und unmittelbar mit 2 Vol. Ethanol gefällt, mit der umgeschmolzenen Spitze einer Pasteurpipette aus der Lösung gefischt

(Sambrook & Russell 2001), in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in TE gelöst. Der Lösung wurde RNase A (1 µg/ml Endkonz.) zugegeben und 10 min. bei RT inkubiert. Nach einer selektiven Fällung mit 1 Vol. 20 %-PEG-Lösung (Sambrook & Russell 2001), dem Lösen des DNA-Pellets in TE, einer Chlorophormextraktion, einem letzten Fällen mit Natrium-Acetat und Ethanol (Sambrook & Russell 2001) und Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol sowie kurzem Trocknen wurde die DNA in TE gelöst. Die durchschnittliche Molekülgröße wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (3.5.1), die Reinheit der DNA durch Aufnahme der Absorptionsspektren (200 bis 300 nm) bestimmt. Die Konzentration C wurde nach $C (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times [\text{Verd.-Faktor}]$ (Sambrook & Russell 2001) ermittelt.

3.4.2 Gesamt-DNA-Extraktion für Transformantenscreening via PCR

Diese im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Variante der unter (3.4.1) beschriebenen, CTAB-basierten DNA-Extraktionsmethode sollte ein preisgünstiges, schnelles Screenen einer größeren Zahl von Moos-Transformanten ermöglichen und die Gefahr einer Kontamination mit DNA anderer Klone ausschließen, wie es bei der Verwendung von Mörser und Pistill zu erwarten wäre. Die DNA sollte hinreichende Qualität aufweisen, um die Herstellung von *ca.* 3 kb-PCR-Produkten zu erlauben. Diese Methode ist wegen der zeitsparenden aber wenig selektiven Präzipitation mit Isopropanol mehr an Doyle & Doyle (1990) angelehnt. 10-100 mg der Moose wurden bei RT in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 250 µl 2x CTAB Extraktionspuffer mit Hilfe eines für das Resuspendieren von Pellets ausgelegten Einweg-Kunststoff-Pistills (Fisher Scientific), sowie einer geringen Menge sterilen Seesands für *ca.* 2 min. aufgeschlossen. Hierzu wurde der Pistill mit einer handelsüblichen Bohrmaschine angetrieben. Nach 5 min. Inkubation bei 65 °C, einer Chlorophormextraktion und einer anschließenden Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurden vom klaren Überstand 200 µl abgenommen und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 150 µl Isopropanol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20-50 µl TE für 5 min im 65 °C-Wasserbad gelöst. 1-2 µl der Lösung wurden pro PCR eingesetzt.

3.4.3 Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen

DNA, die für weitere Verwendungen gereinigt oder umgepuffert werden sollte, wurde – abhängig von der Menge – entweder nach Sambrook & Russel (2001) einer oder mehrerer Phenol- und einer Chlorophormextraktion(en) unterzogen, mit Natriumacetat/Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in geeignetem Puffer oder Wasser gelöst oder – bei geringen DNA-Mengen – über Säulenchromatographie mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gereinigt und in verdünntem Puffer (2 mM Tris/Cl, pH 8.5) eluiert.

3.5 DNA-Analyse

3.5.1 Gelelektrophoresen

Eine Untersuchung der Produkte von DNA-Extraktionen (3.4.1), Polymerase-Ketten-Reaktionen (3.5.2) und von DNA-Fragmentierungen mittels Restriktionsendonukleasen

(3.5.6) erfolgte nach Aufnahme in Gelauftragspuffer (1.1.1) durch Auftrennung in Agarosegelen mit 1x-TBE-Puffer (1.1.1). Die Konzentration der Agarose (BRL) wurde in Abhängigkeit der Größe der interessierenden DNA-Moleküle zwischen 0,7 und 2,0 % (w/v) gewählt. Präparative Gele wurden mit Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE; 1.1.1) und mit bei niedriger Temperatur schmelzender Agarose (LMP-Agarose; BRL) - ebenfalls mit Konzentrationen zwischen 0,7 und 2 % (w/v) - hergestellt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in einer Lösung von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid im jeweiligen Puffer 20 min. gefärbt und die DNA mit Hilfe eines UV-B-Transilluminators (UV-Products) visualisiert und mit dem Easy-System (Herolab) dokumentiert. Isolierung von DNA-Molekülen aus Gelstücken erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Das Herausschneiden aus dem Gel erfolgte mit minimaler UV-Bestrahlung auf dem UV-B-Transilluminator.

3.5.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Durchführungen der PCRs orientierten sich im Wesentlichen an Gassen *et al.* (1994) und Newton & Graham (1997), inverse PCRs an Gassen & Schrimpf (1999). Verwendet wurden ein Biometra Trio Thermoblock für drei mal 20 0,5 ml Reaktionsgefäße und ein Biometra TGradient Thermocycler für 96x 0,2 ml Reaktionsgefäße. Für Routine-PCRs sowie für das Arbeiten mit Inosin enthaltenden Primern wurde Taq-DNA-Polymerase mit zugehörigem Puffer und MgCl₂ (Invitrogen) eingesetzt; für die Herstellung größerer PCR-Produkte wurde vorzugsweise TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) verwendet.

Als Standardbedingungen wurden folgende Mengen bzw. Konzentrationen gewählt:

- Desoxynukleotide: 200 µM je dNTP (Perkin Elmer Cetus; GeneAmp dNTPs)
- 0,2 unit DNA-Polymerase/20 µl Reaktionsansatz (Standardvolumen)
- Magnesiumkonzentration: 1,5 - 3,0 mM
- Primerkonzentration: je 0,5 µM
- template-DNA: 10 - 100 ng pflanzlicher Gesamt-DNA oder 1-10 pg Plasmid-DNA
- 30 Reaktionszyklen (25 im Falle von *E. coli*-Kolonie-PCRs)

Ein typisches Temperaturprogramm umfasste eine anfängliche Denaturierung der eingesetzten DNA für 2-3 min. bei 96 °C, 25 - 30 cycles mit einer anfänglichen Denaturierung bei 94 °C für 30 sek., 1 min bei der Anealing-Temperatur (T_{an}) und einer sich nach der gewünschten Produktlänge orientierenden Extensions-Zeit bei 68 °C (t_{ex} , s.u.). Die Extensionsphase des letzten Cyclus' wurde um weitere 5 min. (bei 68 °C) verlängert. Schließlich folgte eine Abkühlung auf 4 °C bis zur Probenentnahme. Geeignete Anealing-Temperaturen wurden nach der Formel

$$T_{an} = 4x (G + C) + 2x (A + T)$$

(Baldino *et al.* 1989) für jeden Primer gesondert bestimmt. Dabei bezeichnen A, T, G und C die Anzahl der jeweiligen Nukleotide des verwendeten Primers. Im Falle von Primerpaaren mit unterschiedlichen Anealing-Temperaturen wurde der niedrigere Wert berücksichtigt. Als Extensionszeit wurden *ca.* 60 sek. pro 1000 bp des erwarteten PCR-Produkts veranschlagt. Die Komponenten wurden soweit möglich in Form eines Master-Mix zusammengestellt, der im Anschluss auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt und ggf. komplettiert wurde.

3.5.3 RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde mit dem TriStar-Reagenz nach Herstellerangaben (Angewandte Gentechnologische Systeme GmbH, Heidelberg)) isoliert. Abweichend erfolgte der Aufschluss des Moores nicht im TriStar-Reagenz, sondern vor Reagenzzugabe durch Mörsern in fl. Stickstoff. Eine Quantifizierung der erhaltenen RNA wurde spektralphotometrisch nach

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times [\text{Verd.-Faktor}]$$

(Sambrook & Russell 2001) durchgeführt; eine Bestätigung, dass die isolierte RNA nicht degradiert war, erfolgte durch Gelelektrophorese nach (3.5.1).

3.5.4 3'-RACE und RT-PCR

1st strand cDNA wurde angelehnt an Lessard *et al.* (1997) hergestellt. 1 µg Gesamt-RNA aus hell-gewachsenen *Ceratodon* bzw. *Physcomitrella* Protonemen wurden auf Eis mit 500 ng Oligonukleotid J62 (lock-docking oligo-dT-Primer mit 5'-header; siehe 8) gemischt und mit Wasser auf 11,5 µl aufgefüllt, mit 2 Tropfen Mineralöl versetzt und zum Aufschmelzen der Sekundärstrukturen für 1 min. bei 70 °C, dann 30 sek. für 80 °C erwärmt, für 30 sek. auf 4 °C abgekühlt und wieder für 3 min. auf 70 °C erwärmt und zügig auf Eis gestellt. Nun wurden 4 µl 5x 1st strand buffer (BRL), 2 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl RNase-Inhibitor (USB/Amersham) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) zugegeben und sanft gemischt. Nach Inkubation bei 42 °C für 2 min. wurden 200 units RT (Moloney Murine Leukemia Virus RNase H⁻ Reverse Transcriptase *Superscript* II; BRL) zugegeben und der Ansatz für 45 min. bei 42 °C inkubiert. Nach Verdünnen mit TE (1:2) wurde je 1 µl für einen RACE- oder RT-PCR-Ansatz eingesetzt. Hierbei wurden ein genspezifischer *sense*-Primer und einer der zwei leicht versetzt angeordneten *anti-sense*-Primer J63 oder J86 (Primer mit der *header*-Sequenz von J62) für eine RACE-PCR oder zwei genspezifische (*sense* und *anti-sense*) Primer für eine RT-PCR nach 3.5.2 eingesetzt.

3.5.5 5'-RACE

Die Klonierung unbekannter cDNA-Abschnitte *upstream* bereits bekannter Sequenzen erfolgte mit dem SMART-Kit von Clontech. Zur Herstellung der 1st strand cDNA wurden die poly(A)-Abschnitte der mRNA-Moleküle mit einem oligo d(T) Primer hybridisiert und die Erststrangsynthese durchgeführt. Die hier einsetzbaren Reversen Transcriptasen fügen nun dem 3'-Ende der 1st strand cDNAs der vollständig aufgefüllten DNA::RNA-Hybride matrizen-unabhängig einige wenige d(C)-Reste hinzu. Mit diesem Überhang hybridisiert nun das aus einigen Guanosin-Resten bestehende 3'-Ende eines zusätzlich im Reaktionsansatz vorhandenen Oligonukleotids, das damit die RNA-Matrize verlängert, die von der Reversen Transcriptase daraufhin weiter in cDNA umgeschrieben wird. Das 3'-Ende **jedes** cDNA-Moleküls besitzt nun eine definierte Nukleotidsequenz. Hierzu existieren zwei (gestaffelt angeordnete) komplementäre *sense*-Primer, die zusammen mit den jeweiligen Gen-spezifischen *anti-sense*-Primern in der eigentlichen Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt werden. Die 1st strand cDNA für 5'-RACE wurde mit je 1 µg Gesamt-RNA genau nach Herstellerangaben mit MMLV Reverser Transcriptase *Superscript* II, RNaseH⁻ (BRL), jedoch mit dem unter (3.5.4) aufgeführten Temperaturprogramm zum Aufschmelzen der Sekundärstrukturen der RNA hergestellt.

3.5.6 Standardklonierungen & Transformation von *E. coli*

Die Verwendung der Standard-Enzyme T4 DNA-Ligase für die enzymatische Verknüpfung von DNA-Molekülen, CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) für Dephosphorylierungen von Vektor-DNA, T4-Polynukleotidkinase für die Phosphorylierung der 5'-Enden von PCR-Produkten, des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, der Vent-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase für die Herstellung glatter DNA-Enden ("blunten") sowie verschiedenster Restriktionsenzyme zum spezifischen Schneiden der DNA-Moleküle erfolgte jeweils nach Sambrook & Russell (2001) und Herstellerangaben (NEB).

Transformationen erfolgten nach Dower *et al.* (1988) mit einem Easyject PLUS Elektroporator (Peqlab) und Polycarbonat-Elektroporationsküvetten mit Aluminiumelektroden mit 2 mm Elektrodenabstand (Peqlab) bei einer Spannung von 2000 V, einer Pulsdauer von 5 msek., einem Widerstand von 200 Ω sowie einer Kapazität von 25 μ F. Die Herstellung elektrokompetenter Zellen, mit denen sich Transformationseffizienzen von *ca.* 10^8 cfu/ μ g Plasmid erzielen ließen, erfolgte im Wesentlichen nach Sambrook & Russell (2001) durch Wachsen der Zellen bis zur mittel-logarithmischen Phase und exzessives Waschen der *E. coli* mit eiskaltem Wasser sowie Resuspendieren in 7% DMSO in Wasser (die kompetenten Zellen wurden freundlicherweise von Sabine Buchert für diese Arbeit hergestellt). Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Für eine Transformation wurden 40 μ l der Zellen, 1 μ l Ligationsansatz und 700 μ l SOC-Medium eingesetzt. Auf LB-Platten mit geeigneten Antibiotika wurden jeweils 10 und 90 % der Transformationsansätze ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

3.5.7 Screening von *E. coli*-Kolonien

Das Screenen von Kolonien erfolgte via PCR. Kleine Mengen von 1-3 *E. coli*-Kolonien dienten hierbei als Quelle der template-DNA in je 10 oder 20 μ l eines PCR-Master-Mix mit zwei geeigneten Primern.

3.5.8 Plasmid-Minipräparationen aus *E. coli*

Für Plasmid-Minipräparationen aus *E. coli* wurden *ca.* 2-4 ml-Kulturen (LB- oder RB-Medium) mit den jeweiligen *E. coli*-Kolonien angeimpft und nach Wachsen über Nacht (bei 37 °C auf einem Schüttler mit *ca.* 200 rpm) in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Plasmidisolierung erfolgte entweder mit Hilfe des QIAGEN Miniprep-Kits nach Herstellerangaben oder angelehnt an Sambrook & Russell (2001) ("alkalische Lyse"), gefolgt von einer zusätzlichen Reinigung durch PEG-Fällung (Sambrook & Russell 2001).

3.5.9 Sequenzierungen

Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem ABI Prism-Dye-Terminator-System (Big Dye / FS-Kit, Perkin Elmer) und einem Trio Thermoblock (Biometra) durchgeführt. Die Analyse der Sequenzierungsreaktionen und zu großen Teilen bereits deren Durchführung erfolgte durch Martin Meixner (DLMBC, Berlin). Das Prism-Dye-Terminator-System

basiert auf der Dideoxy-Terminations-Sequenzierungs-Reaktion nach Sanger *et al.* (1977); jedoch sind hier die vier Dideoxynukleotide und damit die Terminationsprodukte mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (also nicht-radioaktiv) markiert. Zur Sequenzierung wurden entweder PCR-Produkte (nach einer Reinigung wie unter 3.4.3 beschrieben) oder (vorzugsweise linearisierte) Plasmide eingesetzt. DNA-Mengen und das Temperatur-Programm orientierten sich an den Herstellerangaben. In der Regel wurden beide Stränge sequenziert. Die Analyse der Sequenzierdaten erfolgte hauptsächlich mit Hilfe der Programme Chromas sowie VectorNTI sowie BLASTN, BLASTP und BLASTX auf dem NCBI-Server.

3.5.10 Detektion spezifischer DNA-Sequenzen via *Southern blotting*

Southern blots (Southern 1975) wurden unter Verwendung des Roche Digoxigenin (DIG)-Systems durchgeführt (Boehringer Mannheim 1995). Dabei eingesetzte Sonden sind dadurch markiert, dass während der Synthese ein partieller Einbau von DIG-11-dUTP statt dTTP erfolgte. Digoxigenin ist das Hapten der zu diesem System gehörenden polyklonalen Anti-DIG-Antikörper, die mit Alkalischer Phosphatase verknüpft sind (Anti-Digoxigenin-AP-Konjugate, Fab-Fragmente). Hybride aus geblotteter DNA und DIG-DNA-Sonden können durch Chemilumineszenz-Reaktionen detektiert werden. Das verwendete Chemolumineszenzsubstrat CDP-Star (Tropix Inc. USA) zerfällt nach enzymatischer Dephosphorylierung in ein Adamantanon und ein metastabiles, angeregtes (substituiertes) Phenolat-Anion, das beim Wechsel in den Grundzustand Licht ($\lambda_{\max} = 466 \text{ nm}$) emittiert, das mittels Röntgenfilm detektiert werden kann. Die Vorteile dieses Systems gegenüber radioaktiven Sonden sind die langjährige Haltbarkeit der einmal produzierten Sonden, der Verzicht auf die Risiken und Sicherheitsmaßnahmen, die mit dem Einsatz von ^{32}P -markierten Sonden verbunden sind und die bei (mindestens) gleicher Sensitivität deutlich kürzeren Film-Expositionszeiten (Karchner 1994).

Sondenherstellung und -test

DIG-DNA-Sonden für *Southern blotting* wurden unter Verwendung von Taq-Polymerase mittels PCR (3.5.2) hergestellt. Zunächst wurden die PCR-Bedingungen für die spezifische Amplifikation durch Variation von T_{an} , Mg^{2+} -Konzentration, *template*-Menge optimiert, woraufhin die PCR parallel mit dNTP-Mix bzw. *labeling*-Mix (eine Mischung von jew. 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1.3 mM dTTP, 0.7 mM DIG-11-dUTP, alkali-labil; Roche) wiederholt wurde. Das Ergebnis hierbei sollte aussehen, wie es in Abbildung 6 exemplarisch gezeigt ist. Als *template* dienten vorzugsweise verdünnte PCR-Produkte, die ihrerseits aus Plasmiden mit sequenzierten Inserts hergestellt wurden. Auf diese Weise konnte effektiv die Amplifikation und dabei die Markierung unspezifischer Sequenzen verhindert werden. Von den zur Sondenherstellung genutzten Plasmiden, einer heterologen Vergleichs-DNA und (in manchen Fällen) einer Digoxigenin-markierten Vergleichs-DNA bekannter Konzentration, wurden Verdünnungsreihen auf markierte Felder einer positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer Mannheim) pipettiert. Pro Sonde wurden je drei Teststreifen dieses Typs hergestellt und nach einer Quervernetzung der DNA mit einer UV-C-Handlampe (4 W, $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$, 3 min. Bestrahlung mit 7 cm Abstand; UVP;) mit verschiedenen Sondenkonzentrationen hybridisiert. Nach der Detektionsreaktion wurde diejenige Sondenkonzentration für die eigentlichen *Southern blotting* Versuche ausgewählt, die die beste Nachweisgrenze bei günstigstem Signal-

Rausch-Verhältnis zeigte. Aliquots der Sonden wurde vor Gebrauch 50 µl 50 % Formamid zugesetzt; eine Denaturierung erfolgte durch Kochen für 5 min.

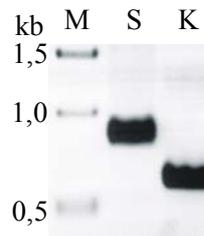


Abbildung 6. Beispiel für *Southern blot*-Sonden-Herstellung via PCR. M = Marker, S = Sondenherstellung (PP3, Primer f107, f185), K = Kontrolle mit dNTP-Mix und denselben Primern. Aufgrund des effektiven Einbaus von DIG-dUTP übersteigt die apparente Sondenlänge die des PCR-Produktes (ca. 600 bp) deutlich.

Southern blots

3-5 µg genomischer DNA wurden nach Restriktion über Nacht mit 3-5 units der jeweils ausgewählten Endonuklease(n) pro Mikrogramm DNA einer Phenol- sowie einer Chlorophorm/IAA-Extraktion unterworfen, mit Natriumacetat und Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 8 µl Gel-Auftragspuffer (1x-SLB) bei 65 °C gelöst. Elektrophorese (0,6 %-Agarosegele mit TBE-Puffer) und Dokumentation der aufgetrennten DNA erfolgten wie unter 3.5.1 beschrieben. Nach einer Denaturierung der DNA im Gel (3x 20 min.) erfolgte der Transfer der DNA auf positiv geladene Nylonmembran (Roche) über Nacht in einem Kapillartransfer-Apparat nach (Southern 1975) mit neutraler Hochsalz-Transferlösung (20x-SSC). Die Fixierung der DNA erfolgte nach kurzem Waschen in 2x SSC-Puffer durch UV-*crosslinking*.

Stringente Hybridisierungen

Die optimale Hybridisierungstemperatur (T_{opt}) wurde bei Verwendung der Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb nach Herstellerangaben (Roche) mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - (600/l) \quad l = \text{Länge des Hybrids in bp}$$

$T_{opt} = T_m - (20 \text{ bis } 25 \text{ } ^\circ\text{C})$, maximal jedoch 42 °C; dieser Wert wurde mit allen verwendeten Sonden erreicht.

Nach einer Prähybridisierung in DIG Easy Hyb (Roche) bei 42 °C für mindestens zwei Stunden erfolgten stringente Hybridisierungen bei 42 °C über Nacht mit frischem Prähybridisierungs-Puffer, dem die optimierte Menge frisch denaturierter Sonde pro Milliliter Hybridisierungslösung (s. o.) zugesetzt waren. Die Membranen wurden 2x 5 min. in 1st wash bei RT sowie 2x 15 min bei 68 °C in 2nd wash gewaschen (Stringenzwaschschritte).

Detektionsreaktion

Detektionsreaktionen erfolgten nach Herstellerangaben (Boehringer Mannheim 1995). Hierbei wurden unspezifische Bindungsstellen der Nylonmembranen für mindestens 1 h mit DIG2 blockiert, der *blot* für 30 min. mit verdünnter Antikörperlösung inkubiert und anschließend dreimal für 15 min. mit Waschpuffer gewaschen. Nach einem

Äquilibrierungsschritt mit alkalischem Detektionspuffer DIG3 wurde der *blot* mit *ca.* 500 µl Detektionslösung benetzt und für 5 min inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit Kodak X-OMAT AR- sowie Kodak BioMax MR-Filmen bei Expositionszeiten von 3 min. bis 16 Stunden aufgenommen.

Das Entfernen von Sonden (*Stripping*) von jenen *blots*, die rehybridisiert werden sollten, erfolgte angelehnt an Ausubel *et al.* (1988): Inkubation für mindestens 2x 45 min. bei 45 °C in *Stripping*-Lösung unter häufigem Schütteln mit anschließender Neutralisierung in 2x SSC.

3.5.11 Sequenzanalyse

Computer-unterstützte Analysen von Nukleotidsequenzen erfolgten mit Hilfe der Programme CLUSTAL X (EMBL), VNTI (Informax Inc.), MACAW (NCBI), BioEdit (North Carolina State University) auf Arbeitsplatzrechnern, sowie BLAST (NCBI und EBI), InterProScan (EBI), PredictProtein (EBI), ChloroP und SignalP (Center for Biological Sequence Analysis; Technical University of Denmark) (Verwendung der Zentralrechner der jeweils in Klammern genannten Institutionen). Die Hinterlegung der Gesamtsequenzen in den NCBI- bzw. EBI-Datenbanken erfolgte mit Hilfe der Programme Sequin und Webin (EBI).

3.6 Transformation von *Physcomitrella patens*

Die Transformation von *Physcomitrella patens* erfolgte angelehnt an Schaefer *et al.* (1991), Schaefer *et al.* (1994) und Schaefer & Zryd (1997). In Kürze beschrieben wurden hierzu reine Protonemen-Kulturen verwendet, die spätestens 5 Tage vor der Transformation letztmals zur Erhöhung der Zahl der Verzweigungen mittels Ultraturrax (3.1.1) gehackt worden waren. *Ca.* 1-3 g Protonemen wurden in Petrischalen bei 25 °C unter gelegentlichem sanften Schwenken in Driselaselösung inkubiert, bis mindestens 95 % der Zellen protoplastiert waren. Die Protoplasten wurden durch ein Sieb mit 80 µm Maschenweite gegeben, viermal gewaschen durch Pelletieren (200x g, RT, Zentrifuge Sigma 4K10) und anschließendes vorsichtiges Resuspendieren in wenigen Millilitern frischer Mannitollösung und Verdünnen auf das jeweilige Ausgangsvolumen mit Mannitollösung. Die Quantifizierung der Protoplasten erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach Herstellerangaben. Die Protoplasten wurden wieder pelletiert und in soviel MMM-Lösung resuspendiert, dass eine Konzentration von $1,6 \times 10^6$ / ml resultierte. Je 0,3 ml hiervon wurden zu vorgelegten 30 µg steriler DNA in 15 ml-Röhrchen gegeben und sanft gemischt, gefolgt von einer Zugabe von 0,3 ml PEGT-Lösung. Nach sanftem Mischen wurden die Protoplasten einem Hitzeschock von 3 bis 7 Minuten bei 45 °C ausgesetzt. Nach weiteren 5 min. bei RT wurde das die Protoplasten umgebende Medium innerhalb einer halben Stunde in fünf Schritten a' 0,3 ml und fünf weiteren Schritten a' 1 ml mit Mannitollösung verdünnt. Die Protoplasten wurden nun erneut pelletiert und in 5 ml "Recovery"-Lösung aufgenommen und ü. N. im Dunkeln bei 25 °C belassen. Nach 24 h wurden die Protoplasten wieder pelletiert und in 2,5 ml geschmolzenen und auf 42 °C abgekühlten PRMT-Agar aufgenommen und auf Cellophanbeschichtete PRMB-Platten gegossen. Nach *ca.* 7 Tagen wurden die bereits regenerierenden Protoplasten mit Hilfe der Cellophanfolie auf Platten mit Antibiotikum

überführt, woraufhin eine Identifikation und Isolierung (stabil oder transient) transformierter Klone nach *ca.* 2 weiteren Wochen möglich war.

3.6.1 Modifikationen der Standardtechnik

Gegenüber der Standarddurchführung (Schaefer & Zryd 1997) wurde versucht, höhere Transformationseffizienzen durch die Variation einiger Parameter zu erzielen. Zum einen wurde zur Isolierung der für die Moos-Transformation einzusetzenden Plasmid-DNA aus *E. coli* der Endofree Plasmid Maxi-Kit von QIAGEN verwendet, der lipopolysaccharid-, also endotoxin-freie Plasmid-DNA liefern sollte, die sich in vielen Fällen bei der Transformation tierischer Zellen als effizienzsteigernd erwiesen hatte (Weber *et al.* 1995). Daneben wurde die Dauer des Hitzeschocks von 3-7 min. variiert. Schließlich wurde versucht, Protonemen aus Flüssigkulturen für Transformationen einzusetzen.

3.6.2 Herstellung der *knockout*-Konstrukte

Für den *knockout* der vier Phytochromgene sowie des Gens für die Phospholipase C1 wurden sowohl Insertions-*knockout*-Konstrukte, wie sie erstmals in *Physcomitrella* von Schaefer & Zryd (1997) eingesetzt wurden, als auch *replacement knockout*-Konstrukte, wie sie von Girke *et al.* (1998) beschrieben wurden, verwendet. Von einigen Genen wurden *knockout*-Linien mit unterschiedlichen Resistenzen (Hygromycin-, G418-Resistenzen) bzw. verschiedenen (*replacement*- und Insertions-) Konstrukt-Typen hergestellt.

3.6.2.1 PP1-*knockout*-Konstrukt

Für PP1 wurde mit den Primern mz32→ mz41← ein *ca.* 1.8 kb PCR-Produkt aus *Physcomitrella* gDNA hergestellt, mit *HindIII*-verdaut und das zentrale 1,2 kb *HindIII*-*HindIII*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pUC18 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde über inverse PCR (3.5.2) mit den Primern f35→ mz35← mit Deep Vent (NEB) amplifiziert, die Enden mit Polynukleotidkinase (NEB, nach Herstellerangaben) phosphoryliert und mit T4-DNA-Ligase selbst-ligiert (Plasmid pF37.35). Der Primer mz35 führte in dieser *site directed mutagenesis* zu einer zusätzlichen *NcoI* Erkennungsstelle rund 360 bp nach Beginn des Inserts. Das so veränderte 1,2 kb große Insert wurde mit *HindIII* wieder freigesetzt und in die entsprechende Klonierungsstelle des Plasmids pGL2 (Abbildung 5) kloniert (Plasmid pF57.35a). Dieses Plasmid erlaubt es, PP1 durch Insertionsmutagenese nach Schaefer & Zryd (1997) zu zerstören und stabile Transformanten über eine Hygromycinresistenz zu selektieren. Ein Screening ist durch die *site directed mutagenesis* erleichtert: Primer f43→ bindet mit seinem 3'-Ende ausschließlich dann hinreichend gut, um von der Taq-Polymerase verlängert werden zu können, sofern nicht die Wildtyp-Sequenz, sondern die mutierte Version vorliegt. In Kombination mit Primer f81←, der jenseits der für die Herstellung des *knockout*-Konstrukts verwendeten *HindIII*-Stelle im PP1-Gen bindet, ergibt Primer f43→ ein Produkt von *ca.* 850 bp. Die zusätzliche *NcoI*-Schnittstelle ermöglicht zudem eine einfache Enzymwahl beim für den Nachweis des *gene targeting* notwendigen *Southern blotting*.

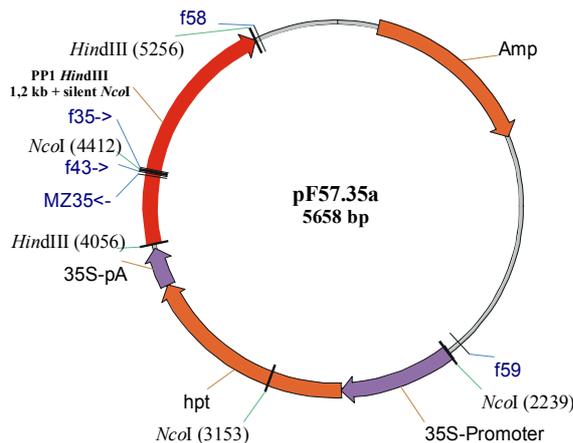


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Plasmids pF57.35a, dem PP1-*knockout*-Konstrukt.

3.6.2.2 PP2-*knockout*-Konstrukte

Für die Herstellung dieses *replacement knockout*-Konstrukts wurde das Plasmid pPP2bwt14, das in (4.1.2) näher beschrieben ist, verändert. Es enthält *ca.* 2,2 kb genomischer DNA von PP2 – beginnend etwa mit dem Start-Codon. In die etwa 800 bp nach Beginn des Inserts liegende *EcoRV* site wurde die mittels *PvuII* aus dem Plasmid pGL2 (Abbildung 5) isolierte Hygromycin-Resistenz-Cassette kloniert. Ein Verdau des resultierenden Plasmids pF56a.P2 mit *XhoI* und *StuI* setzt das eigentliche *knockout*-Konstrukt frei. Dieses enthält jedoch an einem Ende etwa 30 bp des Plasmidrückgrats, da die *XhoI*-Schnittstelle Teil der ursprünglichen MCS ist (siehe: Abbildung 8, links).

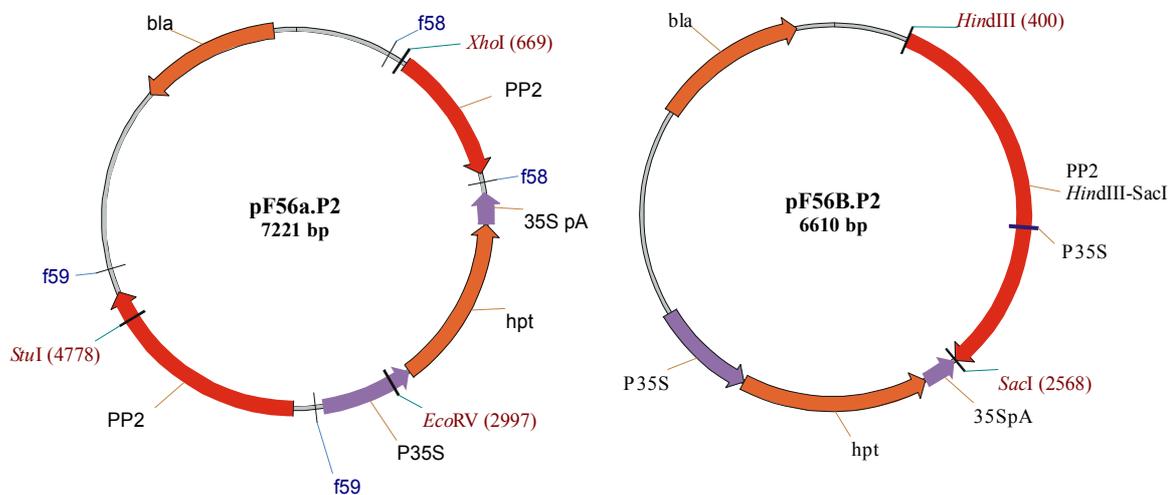


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Plasmide pF56a.P2, aus dem das PP2-*replacement knockout*-Konstrukt durch *StuI-XhoI*-Doppelverdau gewonnen wurde und pF56B.P2, ein Insertions-*knockout*-Konstrukt.

Alternativ war parallel versucht worden, PP2 mit einem Insertions-*knockout*-Konstrukt zu zerstören. Hierzu wurde ein *ca.* 2,2 kb großes *HindIII-SacI*-Restriktionsfragment von PP2, das aus dem Plasmid pPP2bwt16 (siehe 4.1.2) gewonnen wurde, in das *HindIII-SacI*-verdaute pGL2 (3.3.6.1) kloniert. das resultierende Plasmid hieß pF56B.P2 (siehe: Abbildung 8, rechts).

3.6.2.3 PP3-*knockout*-Konstrukte

Zur Herstellung von PP3 *knockout*-Konstrukten wurde das Plasmid pF131gPP3 verwendet, ein pTAdvantage-Derivat (1.1.1), das 5,1 kb eines PP3-gDNA-PCR-Produkts enthält, das mit den Primern f132→ f127← amplifiziert worden war. Ein Verdau mit *EcoRI*, das beidseitig der Klonierungsstelle in der MCS schneidet und *AflIII*, das innerhalb des Inserts, 2,7 kb nach f132→schneidet, setzt diese 2,7 kb zuzüglich kleiner Abschnitte aus der MCS frei. Die Enden wurden mit Klenow geglättet und in *SacI*-*EcoRI*-verdautes pNEB193, dessen Enden ebenfalls geglättet und zudem dephosphoryliert wurden, kloniert. Da im pNEB193-Rückgrat die *SacI*-Erkennungsstelle zerstört war, konnte nun die ungefähr in der Mitte des Inserts gelegene *SacI*-site zum Öffnen des Plasmids verwendet werden. Die Enden wurden geglättet und dephosphoryliert. Daraufhin wurde eine G418- bzw. Hygromycin-Resistenz-Cassette hineinkloniert, die aus dem Plasmid pHP23 durch *EcoRI*-Verdau und Glätten der Enden mit Klenow bzw. aus pGL2 durch *PvuII*-Verdau gewonnen wurde. Das eigentliche *knockout*-Konstrukt wurde in beiden Fällen mit einem *BsmI*-Verdau freigesetzt.

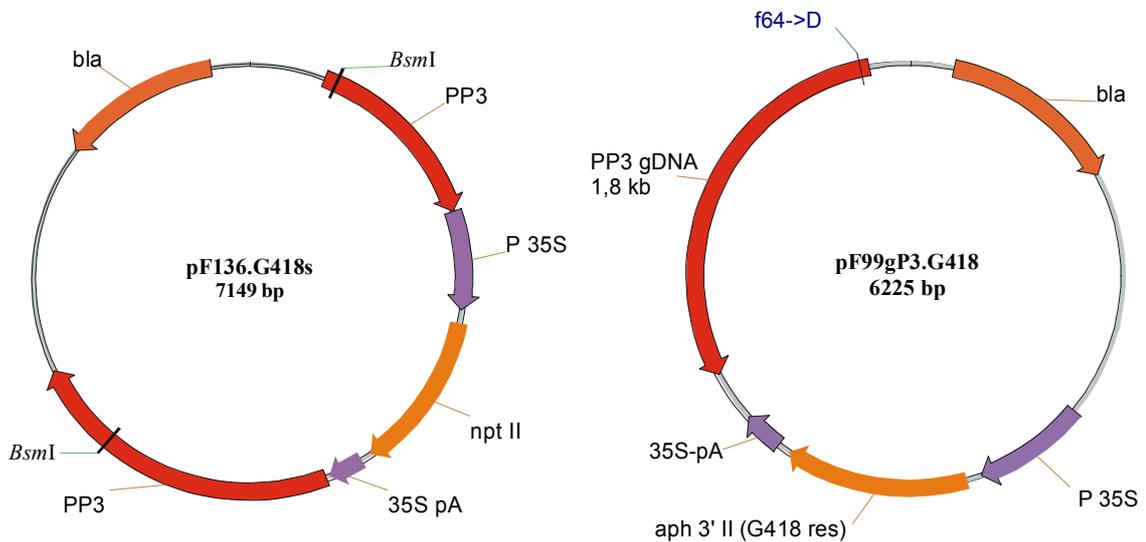


Abbildung 9. Schematische Darstellung der Plasmide pF136.G418s (links), aus dem das PP3-*replacement-knockout*-Konstrukt durch *BsmI*-Verdau gewonnen wurde und des Integrations-*knockout*-Konstrukts pF99gP3.G418 (rechts)

Alternativ war zuvor in zwei Schritten ein Insertions-*knockout*-Konstrukt hergestellt worden, indem über PCR mit den Primern f64→D f107← ca. 1,9 kb von PP3 aus gDNA amplifiziert und in pTAdvantage kloniert wurde (pF99gP3). Der größte Teil des Inserts (ca. 1,8 kb) wurde mit *EcoRV* wieder herausgeschnitten und in mit *NdeI* linearisiertes und geglättetes pHP23 kloniert (pF99gP3.G418).

3.6.2.4 PP4-*knockout*-Konstrukt

Zur Herstellung des PP4-*knockout*-Konstrukts wurde ein Abschnitt genomischer PP4-DNA mit den Primern f77→ und f61b← amplifiziert (siehe 4.1.4) und in pBluescript-TA-Vektor kloniert. Mit *EcoRV* wurde aus dem ca. 2,2 kb Insert ein etwa 200 bp großer Teil herausgeschnitten, der Plasmidrest dephosphoryliert und die wie in (3.6.2.3) aus pHP23 gewonnene und mit geglätteten Enden versehene G418-Resistenz-Cassette hineinkloniert.

Das eigentliche *knockout*-Konstrukt - ohne terminale Anteile des Plasmidrückgrats – wurde mit einem *StuI*-*SalI*-Doppelverdau freigesetzt.

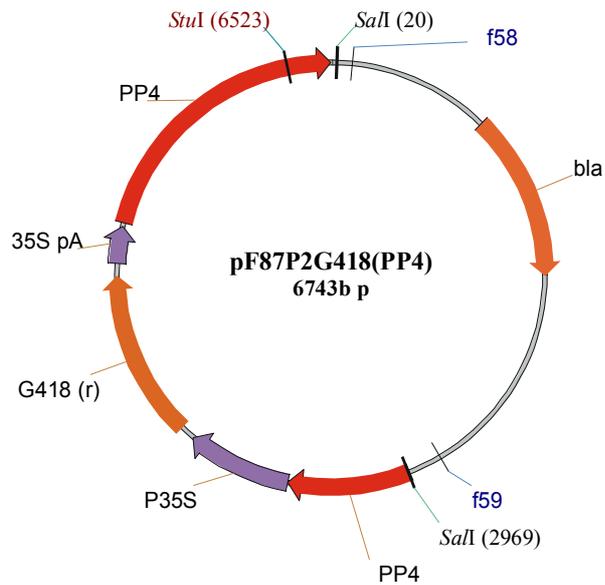


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Plasmids pF87P2G418(PP4), aus dem das PP4-*knockout*-Konstrukt durch *StuI*-*SalI*-Doppelverdau gewonnen wurde. Die *SalI*-Schnittstelle befindet sich bereits in der PP4-DNA

3.6.2.5 PpPLC1-*knockout*

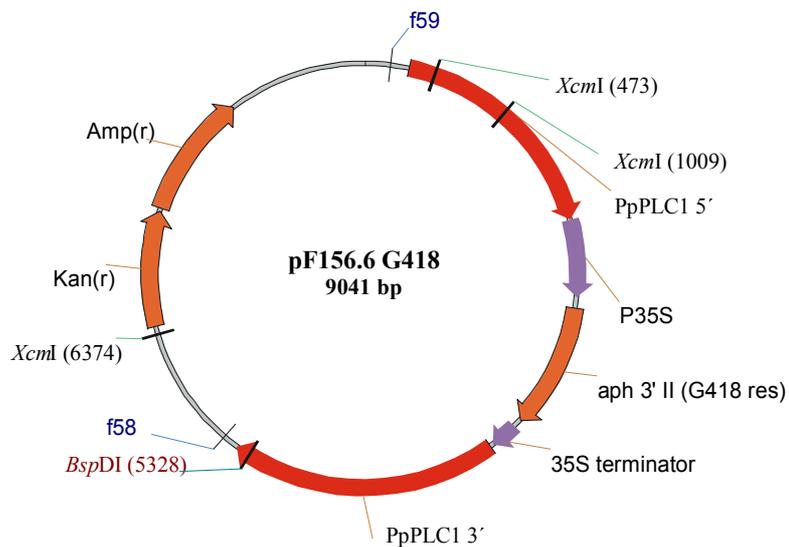


Abbildung 11. Schematische Darstellung des Plasmids pF156.6 G418, aus dem die PpPLC1-*knockout*-Konstrukte durch *XcmI*-Einzel- oder *XcmI*-*BspDI*-Doppelverdau gewonnen wurden.

Das PpPLC1-*knockout*-Konstrukt basiert auf pF156.10, der mit den Primern a06→ und a07← amplifizierten, vom Start- bis zum Stopcodon reichenden genomischen PpPLC1-DNA (3,15 kb), die in pTAdvantage kloniert worden war. Das Plasmid wurde mit dem etwa mittig im Insert schneidenden Enzym *HincII* geöffnet und dephosphoryliert und eine wie in (3.6.2.3) präparierte G418-Resistenz-Cassette hineinkloniert. Das eigentliche

knockout-Konstrukt wurde mit *XcmI* alleine oder mit *XcmI*-*BspDI*-Doppelverdau (ohne Plasmidrückgrat-Anteile) freigesetzt.

3.6.3 *gene substitution*

Das in Abbildung 7 gezeigte *knockout*-Konstrukt pF57.35a war in erster Linie deswegen mit der zusätzlichen *NcoI*-Erkennungssequenz hergestellt worden, um es für einen *gene substitution*-Ansatz nutzen zu können. Hierbei sollte das Plasmid vor der Protoplasten-Transformation mit *HindIII* verdaut werden. Dadurch wurde der modifizierte 1,2 kb große PP1-Genabschnitt, der nach wie vor von *HindIII*-Erkennungsstellen flankiert wird, wieder freigesetzt. Daraus resultiert neben dem PP1-*HindIII*-Fragment mit der zusätzlichen *NcoI*-Schnittstelle ein lineares DNA-Molekül, das eine eukaryontische Hygromycin-Resistenz-Cassette trägt. Im Zuge eines Doppel-*cross over* war zu erwarten, dass der PP1-locus durch DNA-Austausch modifiziert würde. Die Co-Transformation von *gene substitution*-Konstrukt und Resistenz-Cassette sollte das Problem lösen, dass die geplante *silent mutation* nicht mit einer selektierbaren Veränderung verknüpft wäre. Hier sollten nur Hygromycin-resistente Linien weiter untersucht werden, da bei ihnen angenommen werden konnte, dass sie neben der Resistenz-Cassette auch das eigentliche *gene substitution*-Konstrukt aufgenommen hatten.

Neben dem Plasmid pF57.35a war ein weiteres Konstrukt – pF57.36 – hergestellt und eingesetzt worden. Die Plasmide unterscheiden sich darin, dass bei pF57.36 in unmittelbarer Nähe der zusätzlichen *NcoI*-site das Codon für das den Chromophor tragende Cystein gegen eines für Alanin ausgetauscht ist. Diese Mutation würde die Bildung eines photoreversiblen, mithin eines funktionalen Phytochroms PP1 unmöglich machen.

3.6.4 Selektion stabil transformierter Linien

Klone, die nach 3-4 Wochen Wachsen auf einem Medium mit Antibiotikum ein nicht-eingeschränktes Wachstum zeigten, wurden auf frische Antibiotikum-enthaltende Platten mit nummerierten Feldern überführt. Nach einem Wechsel auf Medium ohne Antibiotikum sollten transient (nicht-stabil) transformierte Linien die Fremd-DNA und damit die Antibiotika-Resistenz verlieren. Für die Suche nach Linien, in denen das Zielgen durch homologe Rekombination ausgeschaltet war, wurden vorzugsweise solche Transformanten eingesetzt, die über einen längeren Zeitraum (mehrere Wochen, besser Monate) trotz mehrfachen Wechsels zwischen Medien ohne und solchen mit Antibiotikum keinen Verlust ihrer Resistenz zeigten. Sofern vorhanden wurde in der Regel von 20 oder 40 Transformanten nach (3.4.2) DNA extrahiert und ein Screening via PCR (3.5.2) durchgeführt. Um sicherzustellen, dass für folgende Untersuchungen ein Klon vorläge, wurde von positiven Linien ein einzelnes Pflänzchen oder Protonema auf eine neue Platte überführt und mit einigem Abstand hiermit das Screening wiederholt.

3.7 Physiologische Untersuchungen

Da als leicht screenbarer Phytochromeffekt von Spitzenzellen dunkeladaptierter Protonemen in *Ceratodon* der Phototropismus bekannt ist (Hartmann *et al.* 1983), sollte auch in der ersten *knockout*-Linie des ersten Phytochromgens (PP1; Linie 2.17) von

Physcomitrella dieser Effekt mit dem des Wildtyps verglichen werden. Die Möglichkeit, die phototrope Reaktion der Spitzenzellen dunkeladaptierter *Physcomitrella*-Caulonemata auf seitliches Rotlicht zu untersuchen, ist von (Brücker 2003) entwickelt worden:

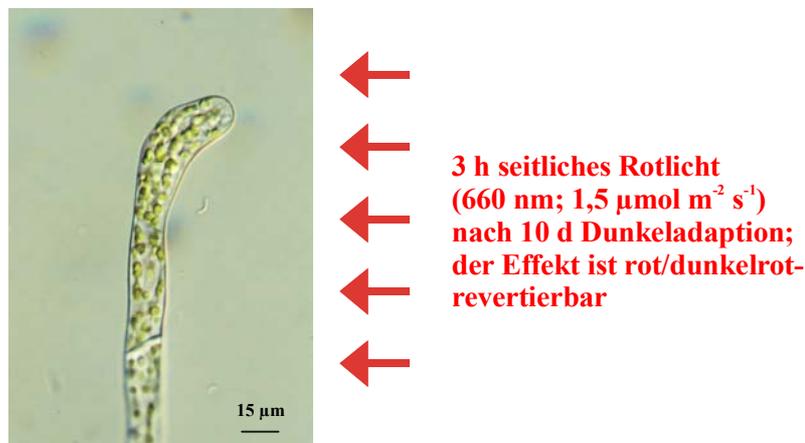


Abbildung 12. Positiver Phototropismus bei *Physcomitrella* nach seitlicher Rotlichtbestrahlung. Deutlich sichtbar ist die primäre Caulonemata auszeichnende, schräggestellte Zellwand. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Gerhard Brücker zur Verfügung gestellt.

im Falle von *Ceratodon* ist es hinreichend, geringe Mengen der Protonemen mit Hilfe einer Pinzette als schmale horizontale Linie auf Cellophanbeschichtete und Glucosehaltige Agar-Platten zu plazieren, die Platten senkrecht für 5 Tage in vollständiger Dunkelheit zu belassen und sie anschließend für 12 h mit seitlichem Rotlicht zu bestrahlen. Während der 5 Tage in Dunkelheit wachsen die Protonemen coparallel negativ gravitrop; die Spitzenzelle wird dann nach seitlicher Rotlichtbestrahlung positiv phototropes Wachstum zeigen. Demgegenüber verhält sich *Physcomitrella* bei entsprechender Behandlung so, dass das Wachstum der mehrheitlich chloronematischen Spitzenzellen im Dunkeln vollständig eingestellt wird und dadurch kein phototropes Wachstum nach Wechsel in das seitliche Rotlicht bestimmbar ist (Jenkins & Cove 1983c). Im Falle von *Physcomitrella* funktioniert diese Untersuchung nur, sofern die Protonemen, nachdem sie auf die Folien aufgetragen wurden, für etwa 4 Tage in derselben Position, mit der sie später im Dunkeln und anschließend im Rotlicht ausgerichtet werden, zunächst im Weißlicht inkubiert werden. Auf diese Weise wurde die phototrope Reaktion der PP1-*knockout*-Linie 2.17 bei verschiedenen Fluenzraten seitlichen Rotlichts (660 nm +/-20 nm; zwischen 0,03-3 µmol m⁻² s⁻¹) mit der des Wildtyps verglichen.

3.8 Polyacrylamidgelelektrophorese und *Western blotting*

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Hierbei werden Proteine denaturiert und als Polyanionen (DTT, SDS) im elektrischen Feld durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix in erster Näherung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Verwendet wurden das diskontinuierliche Lämmli-System mit saurem Sammelgel mit Tris-Glycin-Puffer und 4 % Acrylamid und basischem Tris-Glycin-gepufferten Trenngel (7,5 % Acrylamid) mit dem Protean II Mini-Gel-System (Biorad) mit 5 W pro Gel nach Herstellerangaben. Als

Marker wurden der Prestained Marker und der *High Molecular Weight* Marker von Sigma eingesetzt.

Die Protein-Extraktion aus Moosprotonemen erfolgte wie beschrieben (Zeidler 1999), die Quantifizierung nach Bradford (1976). Das Färben der Gele erfolgte ü. N. in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler, gefolgt von mehreren Waschschrinen in Entfärbelösung.

Das Blotten der Proteine auf PVDF-Membranen (Millipore Immobilon P) erfolgte mit einer Semidry *blotting*-Apparatur (Biorad) wie von Repp (2000) beschrieben. Zum Nachweis wurde der polyklonale Anti-Phytochrom-Antikörper APC1 (1:1000) verwendet (Lamparter *et al.* 1995), der nach Immunisierung mit der in *E. coli* überexprimierten konservierten N-terminalen Hälfte des ersten Phytochromgens aus *Ceratodon*, CP1 (Thümmeler *et al.* 1992), erhalten wurde. Als sekundärer Antikörper wurde ein Anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist (Sigma). Die Färbung erfolgte mit dem chromogenen Substrat NBT/BCIP.

3.9 Sondenvorstufen für *Northern blotting*

Für den weiter unten (5.1) diskutierten *Northern blot*, der aus Zeitgründen nicht von mir, sondern von Mathias Zeidler durchgeführt worden ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit von allen *Physcomitrella*-Phytochromgenen die am weitesten in 3'-Richtung liegenden bekannten 500 bp – also im Wesentlichen die 3'-UTR und wechselnde Anteile des letzten Exons – via PCR (3.5.2 oben) amplifiziert und in pBluescript II SK-TA-Vektor kloniert. Hierbei wurden solche Klone beim PCR-Screening der Transformanten ausgewählt (3.5.7), deren Inserts mit dem jeweiligen 3'-Ende dem Promotor der T7-RNA-Polymerase zugewandt waren. Identität und Orientierung der Inserts der ausgewählten Klone wurden durch Sequenzierung (3.5.9) bestätigt. Nach einem Verdau der Plasmide mit dem Restriktionsenzym *Bss*HII, das beidseitig der MCS jeweils jenseits der T7- bzw. T3-RNA-Polymerase-Promotoren, nicht jedoch in den jeweiligen Inserts schneidet, konnten einheitlich mit der T7-RNA-Polymerase ³²P-markierte RNA-Sonden durch *in vitro run off transcription* (Sambrook & Russell 2001) hergestellt werden.

3.10 Herstellung degenerierter Primer für die Suche nach NPH1-/Superchrome-Sequenzen

Für die Suche nach solchen Genen in *Ceratodon* und *Physcomitrella*, die Homologe von *Arabidopsis* NPH1 und *Adiantum*_PHY3 darstellen, wurde ein *Alignment* der genannten sowie weiterer NPH1-ähnlicher Sequenzen durchgeführt. Dabei konnten konservierte Abschnitte identifiziert und die Primer f66→ (LOV2-Domäne) sowie f68→ und f67← (beide Kinasedomäne) bestellt werden. Parallel wurde ein *Alignment* von *Adiantum*_PHY3 und allen vorhandenen Phytochromsequenzen aus niederen Pflanzen erstellt und die Primer f64→ und f65→ (beide aus der Chromophor-bindenden Domäne) bestellt. Mit diesen Primern wurde versucht, aus cDNA und gDNA von *Ceratodon* und *Physcomitrella* *Adiantum*_PHY3-spezifische sowie *Adiantum*_PHY3 oder NPH1-homologe Sequenzen zu amplifizieren. Die mit den Primer-Bindungsstellen korrespondierenden Aminosäure-Abschnitte sind in Abbildung 44 hervorgehoben; die Primersequenzen sind in Abschnitt 8 aufgeführt.