

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Phytochromgene in den *Ceratodon* und *Physcomitrella* Wildtypen - Klonierung von PP1-4 und CP3

4.1.1 Klonierung von PP1 gDNA

Die Amplifikation der PP1 gDNA erfolgte mittels PCR auf der Basis der vorhandenen cDNA-Sequenzinformation (Kolukisaoglu *et al.* 1993) mit den Primern mz32 und mz33. Das erhaltene PCR-Produkt, wurde in pBluescript-TA 1.1.1 kloniert (3.5.6) und das Insert der resultierenden Klone pF27.1 und pF27.3 sequenziert (3.5.9).

Ein Teil der 5'-UTR wurde mit den Primern f151→ ←f150 amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab in dieser gDNA 942 gegenüber 780 bp in der cDNA. Der Größenunterschied resultiert aus einem Intron innerhalb der 5'-UTR. Mindestens ein weiteres, weiter *upstream* liegendes Intron ließ sich mittels PCR detektieren: die f78→ ←mz38 PCR, die mit cDNA erwartungsgemäß ein Produkt von 1,7 kb ergibt, liefert mit gDNA ein *ca.* 3,3 kb-Produkt. Abzüglich der Länge des bereits sequenzierten Introns blieben für das/die noch unbekannt(e)n Intron(s) ungefähr 1,6 kb. Introns in der 5'-UTR sind bei Phytochromgenen nicht ungewöhnlich (Quail 1994); daher und wegen der geringen Relevanz der Sequenzinformation dieses/dieser Intron(s) wurde das PCR-Produkt zwar kloniert (Plasmid pF90.1b), auf eine Sequenzierung jedoch vorläufig verzichtet. Eine ungewöhnliche Eigenschaft der genomischen Sequenz von PP1 stellt die Tatsache dar, dass die konservierten Splice-Acceptor und-Donor-Motive ("AG" und "GT") nicht durchgängig zu finden sind. Die genomische PP1-Gesamt-Sequenz mit 5093 bp wurde bei NCBI hinterlegt; die *GenBank Accession Number* ist AY123146.

4.1.2 Klonierung von PP2 cDNA und gDNA

Bei der PCR mit genomischer DNA aus *Physcomitrella* und den Primern mz32 und mz41, die in einem 1,8 kb Produkt resultieren sollten, war – sofern TaKaRa_Ex Taq Polymerase verwendet wurde, also eine Polymerase mit *proof reading* Aktivität – eine deutlich größere Nebenbande sichtbar, die in pBluescript kloniert wurde. Die Sequenzierung des Inserts des resultierenden Plasmids pPP2bwt16 zeigte, dass hier tatsächlich ein Teil eines weiteren Phytochromgens kloniert worden war.

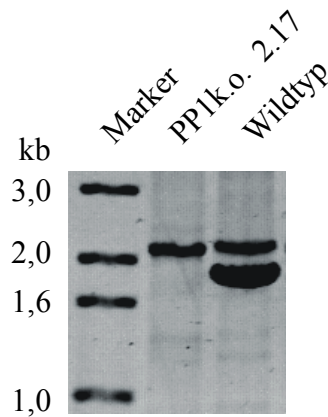


Abbildung 13. Ca. 2,1 kb große Nebenbande bei mz32-mz41-PCR, die zur Klonierung von PP2 diente. Der PP1 *knockout* 2.17 wird in (4.5) näher beschrieben.

Die erfolgreiche Amplifikation des PP2-Abschnitts in der oben gezeigten PCR verwundert, da zwei Fehlpaarungen am extremen 3'-Ende des Oligos in jedem PCR-Zyklus von der Polymerase entfernt werden mussten:

```

Primer mz32          5' GGGAAAGATGTCGACTCCCAAGAAG 3' →
PP1   ...CTTCAAACCTAAATTTTTTGAGTAATTTAGCAAGATGTCGACTCCCAAGAAGACATACTCCTCA...
PP2   ...TTGCTGAGGAGGAGGGCGAGTAATAGTATGCAAGATGTCGACTCCCAAGTTGGCTTACTCGTCA...
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

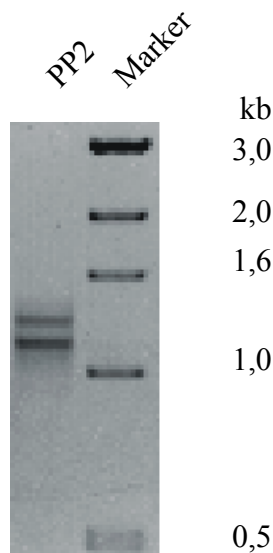


Abbildung 14. PP2 5'-RACE mit Primern SUP→ und f163←

Der Größenunterschied zum PP1-PCR-Produkt resultiert aus einem zusätzlichen Intron von 326 bp, das das Exon I bereits nach 1556 bp enden lässt.

Der fehlende 5'- Abschnitt von PP2 wurde zunächst aus cDNA mittels 5'-RACE (3.5.5) unter Verwendung des SMART-Kits (Clontech) und des SUP (SMART Universal

Primer) sowie des sequenzspezifischen *antisense*-Oligos f163← amplifiziert und kloniert (s. Abbildung 14). Hier konnte nur die untere der zwei Banden mit rund 1,2 kb Größe kloniert werden – die Bedeutung der oberen Bande musste mithin unbekannt bleiben.

Die Sequenzierung der erhaltenen Klone (pF164.2/5/8/12/15) ergab 859 bp vor dem putativen Start-Codon. Eine PCR mit gDNA und sequenzspezifischen Primern f172→ (extremer 5'-Bereich) und f163← zeigte, dass keine zusätzlichen Intronsequenzen vorhanden sind. Die fehlenden 3'-Abschnitte wurden mittels 3'-RAcE (3.5.4) mit den Primern f42→ und J86← amplifiziert und kloniert (pF59.1a und ~2a). Diese zwei Klone unterscheiden sich durch zwei verschiedene, *ca.* 150 bp voneinander entfernt liegende Polyadenylierungsstellen. Auf der Basis der so gewonnenen cDNA-Sequenzen konnte PP2 auch aus gDNA amplifiziert und kloniert werden. Klon pF59g11 enthält 3258 bp von PP2, die vom Ende der pPP2bwt14/16-Sequenz bis in die 3'-UTR reichen. Die genomische PP2-Gesamt-Sequenz mit 6508 bp, der 4643 bp für die cDNA entsprechen, wurde bei NCBI hinterlegt; die *GenBank Accession Number* ist AY123147.

4.1.3 Klonierung von PP3 cDNA und gDNA

Die Sequenzierung eines von Alexander Repp zufällig unter Verwendung von *Ceratodon*-Phytochrom-2-spezifischen Primern f19→ und f22← aus *Physcomitrella* gDNA amplifizierten und daraufhin in pBluescript-TA-Vektor klonierten 1160 bp großen DNA-Abschnitts (pAR11.9/11/17) zeigte, dass es sich um einen Teil eines weiteren Phytochromgens handelte.

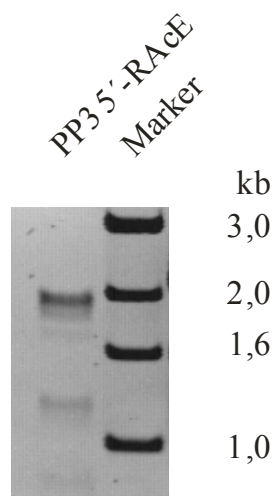


Abbildung 15. PP3 5'-RAcE mit den Primern SUP→ und f129←

Mit Hilfe der in (3.10) abgeleiteten konservierten Phytochromabschnitte waren die degenerierten Primer f64→D und f65→D (siehe: 3.10 und 8) bestellt worden, mit denen nun – jeweils in Kombination mit dem PP3-sequenzspezifischen *antisense*-Primer f107← - zwei weiter in 5'-Richtung (*upstream*) liegende Abschnitte zunächst aus cDNA amplifiziert und in pBluescript II KS'-TA-Vektor kloniert wurden (pF93.64 und pF93.65C4 mit 1461 bzw. 1827 bp Inserts). Ausgehend von der von beiden Plasmiden abgedeckten Sequenzinformation wurde mit Hilfe des SMART-Kits (Clontech) und dem *antisense*-Oligonukleotid f129← sowie dem SUP (SMART universal Primer) eine 5'-

RACE durchgeführt und das resultierende 1889 bp große Produkt (siehe: Abbildung 15) in pTAdvantage kloniert (pF120.PP3.10).

Der fehlende 3'-Abschnitt wurde über 3'-RACE (3.5.4) mit dem genspezifischen Primer f115→ und dem 3'-*antisense*-Oligo J86 amplifiziert und kloniert. Das resultierende Plasmid pF98b.5 enthielt 690 bp des PP3-3'-Endes bis zum Beginn des Polyadenylierungspunktes. Via PCR konnte auch die PP3-gDNA amplifiziert und direkt sequenziert werden. Die genomische PP3-Gesamt-Sequenz mit 5331 bp, der 4282 bp für die cDNA entsprechen, wurde bei NCBI hinterlegt; die *GenBank Accession Number* ist AY123148.

4.1.4 Klonierung von PP4 cDNA und gDNA

Im Zuge der Herstellung eines PP2 *knockout*-Konstrukts wurde das Plasmid pF87P2 hergestellt (3.6.2), indem das PCR-Produkt, das mit gDNA aus *Physcomitrella* und den Primern f70→ und f61b← mit TaKaRa_Ex Taq erhalten worden war und eine erwartete Größe von 2,2 kb aufwies, in pBluescript TA-Vektor kloniert wurde. Ein Ansequenzieren des Inserts des ausgewählten Klons ergab jedoch, dass fälschlich ein Abschnitt eines weiteren, vierten Phytochromgens kloniert worden war. Dessen fehlender 5'-Abschnitt wurde mittels inverser PCR amplifiziert. Hierzu wurde gDNA mit *Hind*III-verdaut, in verdünnter Lösung selbst-ligiert und mit den Primern f34← und f32→ in einer PCR als *template* eingesetzt. Hierbei wurde eine einzige scharfe, etwa 1 kb große Bande erhalten, kloniert (pF42.34) und sequenziert. Auf diesem Wege konnten der Bereich um das Start-Codon sowie weitere 225 bp davor (*upstream*) liegende Nukleotide bestimmt werden.

Der fehlende 3'-Abschnitt ließ sich über 3'-RACE (Primer f160→ und J86←) amplifizieren und in pTAdvantage klonieren. Das resultierende Plasmid pF163.20 enthält ein Insert von 1874 bp.

Die endgültige Sequenzierung der genomischen PP4-DNA Sequenz erfolgte mit Hilfe des Inserts des Plasmids pF167.P4.A2. Dies ist ein pTAdvantage-Derivat, das die gesamte mit den Primern f77→ und f176← (Anfang und Ende der bekannten cDNA-Sequenz) amplifizierte genomische PP4-DNA mit einer Länge von 5857 bp enthält. Die korrespondierende cDNA-Sequenz wurde durch direktes Sequenzieren von RT-PCR-Produkten bestimmt. Die genomische PP4-Gesamt-Sequenz mit 5863 bp, der 3730 bp für die cDNA entsprechen, wurde bei NCBI hinterlegt; die *GenBank Accession Number* ist AY123145.

4.1.5 Klonierung von CP3 cDNA und gDNA

Mit der *GenBank Accession Number* AW098271 wurden von Quatrano *et al.* des UNIVERSITY OF LEEDS/WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE MOSS EST PROJECTS 355 bp eines EST-Klons mit Homologie zum letzten Exon von CP2 in der *GenBank* Datenbank hinterlegt. Mit Hilfe einer RT-PCR mit dem sequenzspezifischen *antisense*-Primer f80← sowie dem degenerierten *sense*-Primer SH1 (freundlicherweise von Üner Kolukisaoglu zur Verfügung gestellt) wurde ein 1832 bp großes PCR-Produkt amplifiziert und in pBluescript-TA-Vektor kloniert (pF86.1 und ~3). Um den nächsten Abschnitt weiter in 3'-Richtung liegender Sequenz zu erhalten, wurde wieder der in (4.1.3) verwendete degenerierte Primer f65→ eingesetzt sowie der sequenzspezifische

Primer f85←. Das erwartete Produkt von ca. 1 kb wurde in pBluescript-TA-Vektor kloniert – die Sequenzierung des resultierenden Plasmids pF86C3.33 ergab ein Insert von 967 bp.

Um die noch fehlenden ca. 700 bp der kodierenden Sequenz zu erhalten, wurde nun eine 5'-RAcE – wieder mit dem SMART-Kit, dem SUP, sowie dem sequenzspezifischen Primer f100← durchgeführt. Hier konnten nun 1160 bp von CP3 amplifiziert werden (Plasmid pF92.6.1). Die insgesamt von CP3 erhaltene Sequenzinformation beginnt lediglich 8 bp vor dem putativen Startcodon, die 5'-RAcE ist jedoch nicht wiederholt worden, da die interessierende CDS bereits vollständig vorlag. Für die abschließenden Sequenzierungen wurden verschiedene PCR-Produkte der c- und gDNA eingesetzt. Die genomische CP3-Gesamt-Sequenz mit 4512 bp, der 3545 bp für die cDNA entsprechen, wurde bei NCBI hinterlegt; die *GenBank Accession Number* ist AY123149

4.2 Sequenzanalyse der Moos-Phytochrome

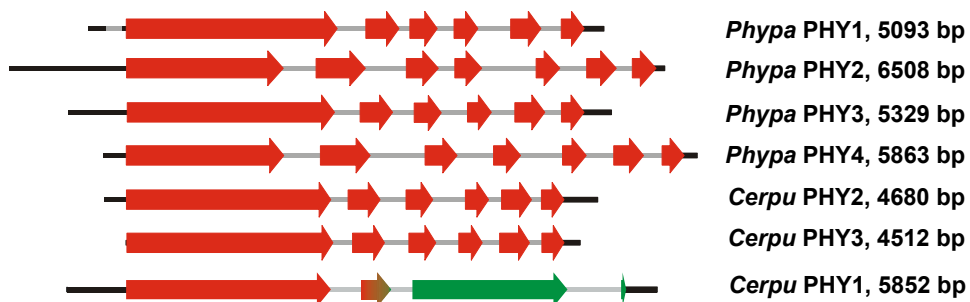


Abbildung 16. Vergleich der gDNA Sequenzen; Intron/Exon-Struktur der Phytochromgene aus *Ceratodon* und *Physcomitrella*

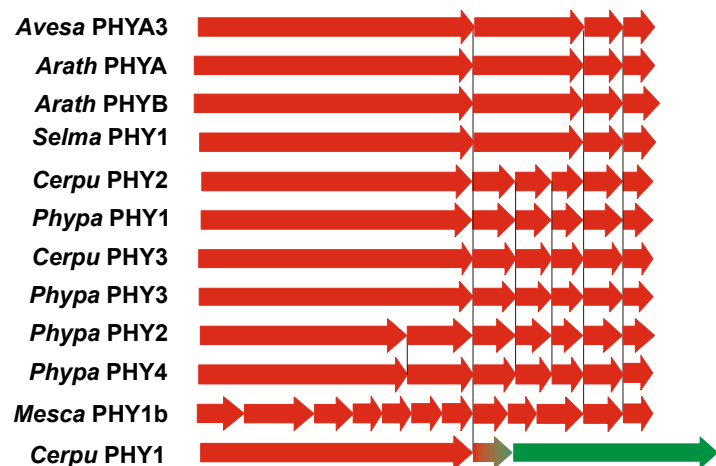


Abbildung 17. Homologe Intronpositionen innerhalb der kodierenden Sequenz in Phytochromgenen (durch schwarze senkrechte Linien hervorgehoben)

Für alle Phytochromgene aus *Ceratodon* und *Physcomitrella* wurden, soweit nicht schon vorliegend (CP1: Thümmeler *et al.* (1992); CP2: Hughes *et al.* (1996)), die c- und gDNA-Sequenzen (Abbildung 16) und damit die Exon/Intron-Übergänge bestimmt. Hierbei zeigte sich (Abbildung 17), dass die Introns an durchweg konservierten Positionen innerhalb der kodierenden Sequenz zu finden sind – mit der Ausnahme des zusätzlichen

jeweils ersten Introns in den *Physcomitrella*-Phytochromen 2 und 4. Keine außergewöhnliche Zahl oder Größe der Introns waren zu finden, wie es im Falle von *Mesotaenium*-Phytochrom-1 der Fall ist (Lagarias *et al.* 1995). Introns in der 5'-UTR fanden sich nur in PP1: mindestens zwei, von denen jedoch nur das der CDS am nächsten liegende sequenziert wurde. Ebenfalls ist jedoch ein Intron in dem mit PP1 verwandtesten Gen aus *Ceratodon* – CP2 – zu finden (Jon Hughes, unveröffentlicht), jedoch nicht in die Abbildung integriert. Für die übrigen Gene ist die Aussage, dass keine Introns identifiziert wurden unter dem Vorbehalt zu sehen, dass teilweise nur wenig Sequenzinformation *upstream* des Startcodons (bei CP3: nur 8 bp) vorliegt. Zudem ist es auch **wegen der verwendeten 5'-RACE-Technik** keineswegs zwingend, dass vollständige 5'-Abschnitte der cDNAs kloniert wurden. Introns in der 5'-UTR finden sich auch in Phytochromgenen einiger höherer Pflanzen, z.B. Hafer phyA, Reis phyA und Mais phyA1 (Quail 1994).

Die für Phytochrome des B- und D-Typs höherer Pflanzen übliche N-Terminale Extension von *ca.* 30 AS fehlt in allen Phytochromen niederer Pflanzen – also auch in den Produkten der hier erstmals klonierten Gene (Abbildung 18).

Phytochromtypische Motive sowie Motive, die in Homologie zu bakteriellen zwei-Komponenten-Systemen gewöhnlich in Phytochrom-C-Termini identifizierbar sind (Hoch & Silhavy 1995), sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

	"epylg1"	(Pos.)	Chromophor	(Pos.)
CP2	epylg1	258-263	vslagstlraphgchaqymgnmgsiaslv	306-334
CP3	epylg1	263-268	islagstlraphgchaqymgnmgsvasvt	311-339
PP1	epylg1	260-265	vslagstlrsphgchaqymgnmgsiaslv	308-336
PP2	epylg1	261-266	islagstlraphgchaqymgnmnsiaslv	309-337
PP3	epylg1	259-264	vslagstlrsphgchaqymgnmgsissiv	307-335
PP4	epylg1	261-266	islagstlraphgchaqymgnmnsiaslv	309-337
Arath PHYA	epylg1	262-267	ltlcgstlraphschlqymanmndsiaslv	310-338
Arath PHYB	epylg1	297-301	mclvgstlraphgchsqymanmgsiasla	344-372
Selma PHY1	epylg1	263-268	islagstlraphgchaqymgnmgsvaslv	311-339
Mesca PHY1	epylg1	263-268	islagstlrgvhgchaqymanmgsvaslv	311-339

CLUSTAL X Alignment:

1st PAS repeat

CP2	vrlietatapilavdstgmingwnakiahvtglpvs eamgr slvkd	613-658
CP3	vrlietatapilavdsngfingwnakvaeltglpvgdamgrslvqd	618-663
PP1	vrlietatapilavdsngmingwnakiaqvtglpvs eahgr slvkd	615-660
PP2	vrlietatapilavdsngfingwnakvaeltglpveeamgrslvkd	618-663
PP3	vrlietatapilavdsngmingwnakiaqetglpv eamgr slvkd	614-659
PP4	vrlietatapilavdsngfingwnakvaeltglpvgeeamgrslvkd	618-663
Arath PHYA	vrlietatvpilavdsdglvngwntkiaeltglsvdeaignkhlftl	623-668
Arath PHYB	vrlietatvpifavdaggcingwnakiaeltglsv eamgk slvkd	657-702
Selma PHY1	vrlietatapilavdsngfingwnakvadvtglpvt eamgr slake	621-666
Mesca PHY1	vrlietatapilavdsilgcvngwnakvsel tglpvs eamgkslvkd	634-679

2nd PAS repeat

CP2	vknpplippifggdeygyfcfewnpamealtgwkhdevvgkllvge	747-793
CP3	vqnpnplippifgsdelgcctewspmekltgwkrdevlgkmlvge	752-797
PP1	vqnpnplippifgdeygyfcfewnpamegl tgwk devvgkllvge	749-796
PP2	vqnpnplippifgtdeygyfcfewnpamegl tgwk reevlgkllvge	752-797
PP3	vqnpnplippifgdeygyfcfewnpamegl tgwk reevlgkllvge	748-793
PP4	vqnpnplippifgtdeygyfcfewnpamegl tgwk reevlgkllvge	752-797
Arath PHYA	iqnpnplippifgtdefgwctewnpamskltglkreevidkmlge	756-801
Arath PHYB	vhspnplippifaadentcclewnnamekl tgwsr reevlgkmlvge	791-836
Selma PHY1	vqnpnplippifgdeygyfcfewnpamekl sgwr reevlgkmlvge	755-800
Mesca PHY1	vrsrnslippifgsdeygyfcctewnpamekl tgvr reevlgkmlvge	770-815

	H-Box	(Pos.)	N-Box	(Pos.)
CP2	layirqeiknpl	891-902	lqqvlsdfllna	1003-1014
CP3	layirqeiknpl	896-907	lqhvladfllna	1008-1019
PP1	layivreiknpl	893-904	lqqvlsdfllna	1005-1016
PP2	layirqeiknpl	896-907	lqqvladfllna	1008-1019
PP3	layirqeiknpl	892-903	lqqvlsdfllna	1004-1015
PP4	layirqeiknpl	896-907	lqqvladfllna	1008-1019
Arath PHYA	layikrqirnpl	900-911	lqqvladflmla	1012-1023
Arath PHYB	layicqviknpl	932-942	iqqllaefllsi	1044-1055
Selma PHY1	layirqeiknpl	899-910	lqqvladfllna	1011-1022
Mesca PHY1	layirqeiqnpl	911-922	lqqvladflmna	1023-1034

	G1-Box	(Pos.)	F-Box	(Pos.)
CP2	vshpggglp	1049-1057	mydra	1064-1068
CP3	vahpgsglp	1054-1062	mfdrg	1069-1073
PP1	vshpgaglp	1051-1059	mydrgr	1066-1070
PP2	vthpglglp	1054-1062	mfgrgr	1069-1073
PP3	vshpgaglp	1050-1058	mfdkg	1065-1069
PP4	vthsgmglp	1054-1062	mfdrg	1069-1073
Arath PHYA	lthtgagip	1057-1065	mfgte	1072-1077
Arath PHYB	macpgeglp	1089-1097	mfhss	1104-1108
Selma PHY1	ithpgvglp	1057-1065	mfdrg	1072-1076
Mesca PHY1	vthsggeglp	1068-1076	mfdra	1083-1087

	G2-Box	(Pos.)	Sequenzlänge
			(AS) / MW (kDa)
CP2	gmtqeglgl	1070-1078	1122 / 124
CP3	gmtqeglgl	1075-1083	1126 / 125
PP1	gmtqeglgl	1072-1080	1123 / 124
PP2	gmtqeglgl	1075-1083	1131 / 125
PP3	gmtqeglgl	1071-1079	1122 / 125
PP4	gmtqeglgl	1075-1083	1126 / 125
Arath PHYA	dvseeegls1	1078-1086	1122 / 124
Arath PHYB	wtspeglgl	1110-1118	1172 / 129
Selma PHY1	gmtqeglgl	1078-1086	1134 / 125
Mesca PHY1	sksqeglgl	1091-1099	1142 / 125

```

Arath_PHYA -----MSGSRPTQSSSGS-RRSRH-----SARIIAQTVDAKLH
Arath_PHYC -----MSSN---TSRSCS-TRSRQ-----NSRVSSQVLVDKALH
Phypa_PHY2 -----MSTTKLAYSSGSS-VKSK-----HSVRVAQTADAKLQ
Phypa_PHY4 -----MSTTKLAYSSGSS-VKSK-----HSVRVAQTADAKLQ
Cerpu_PHY3 -----MASAKMAYSSSGS-IKSK-----HSVRVAQTSDAKLQ
Phypa_PHY3 -----MSAPKPTYSTSS-AKSK-----HSVRVAQTADAALH
Phypa_PHY1 -----MSTPKTYSTSS-AKSK-----HSVRVAQTADAALQ
Cerpu_PHY2 -----MSAPKPTYSTSS-AKSK-----HSVRVAQTADAALH
Selma_PHY1 -----MSTTKLYSSGSS-AKSK-----HSVRVAQTADAKLH
Marpa_PHY1 -----MSTTKVYSSGSS-AKSK-----HSVRVAQTADAKLQ
Adica_PHY1 -----MSSTRHSYSSGS-GKSK-----HGRRIAQTADAKLY
Mousc_PHY1 -----MSSSKRSQSSGRS--STQTR-----IQNRVTQASADAKLS
Mesca_PHY1 -----MSTSRMSQSSGES--TAKTK-----REVRVAQTADAKLN
Arath_PHYB MVSGVGGSGGGRRGGGEEEPSSHTPNRRRGGEQAQSSSGTKSLRPRSN-----TESMSKAIQQYTVDARLH
Arath_PHYD MVS-----GGGSKTSGGEAAASGHRRSRHTSAAEQAQSSANKALRSQNPQPNHGGGTSTNKAIQQYTVDARLH
Arath_PHYE -----MGFESSSSAASNMKPQPQ-----KSNTAQYSVDAALF

```

Abbildung 18. Beginn des *Alignments* ausgewählter Phytochrom-Aminosäuresequenzen. Die B-Typ-übliche Extension von ca. 30 AS findet sich in den Phytochromen niederer Pflanzen **nicht**.

Die Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstrukturen sowie die Suche nach möglichen konservierten Motiven mittels unterschiedlicher Internetangebote ([meta-] PredictProtein, Swissmodel u.a.) zeigte, dass die im Rahmen dieser Arbeit erstmals klonierten Phytochromgene PP2-4 und CP3 und die entsprechenden Genprodukte am ehesten den jeweiligen Vertretern aus niederen Pflanzen ähneln (siehe Tabelle 1). Es handelt sich ausnahmslos um *klassische* Phytochrome – also nicht um ungewöhnliche Phytochrome, wie sie in niederen Pflanzen von Nozue *et al.* (1998) für *Adiantum*

(*Adiantum_PHY3*) und speziell für *Ceratodon* von Thümmler *et al.* (1992) beschrieben wurden.

Tabelle 1. Swissprot WU-BLASTP (EMBL-EBI) Search mit Gesamt-AS-Sequenzen. Wiedergegeben sind jeweils die Homologien (identische und ähnliche Aminosäuren) zu den drei ähnlichsten Phytochromen der Swissprot-Datenbank. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Vergleichen CP2→PP1 zu PP1*→CP2 erklären sich dadurch, dass die zu EMBL-EBI gesandte PP1-Sequenz im Rahmen dieser Arbeit gegenüber der in der Datenbank gespeicherten modifiziert wurde

	ähnlichste Sequenz: identische / ähnliche AS	zweit-ähnlichste Sequenz: identische / ähnliche AS	dritt-ähnlichste Sequenz: identische / ähnliche AS
CP2	<i>Physcomitrella patens</i> PHY1 998/1122 (88%) 1054/1122 (93%)	<i>Selaginella martensii</i> PHY1 890/1129 (78%) 1006/1129 (89%)	<i>Pinus sylvestris</i> PHY1 780/1113 (70%) 936/1113 (84%)
CP3	<i>Selaginella martensii</i> PHY1 898/1133 (79%) 1014/1133 (89%)	<i>Ceratodon purpureus</i> PHY2 879/1122 (78%) 990/1122 (88%)	<i>Physcomitrella patens</i> PHY1 855/1123 (76%) 978/1123 (87%)
PP1*	<i>Ceratodon purpureus</i> PHY2 1004/1123 (89%) 1060/1123 (94%)	<i>Selaginella martensii</i> PHY1 879/1130 (77%) 998/1130 (88%)	<i>Pinus sylvestris</i> PHY1 774/1122 (68%) 937/1122 (83%)
PP2	<i>Selaginella martensii</i> PHY1 942/1131 (83%) 1039/1131 (91%)	<i>Ceratodon purpureus</i> PHY2 910/1124 (80%) 1010/1124 (89%)	<i>Physcomitrella patens</i> PHY1 891/1125 (79%) 997/1125 (88%)
PP3	<i>Physcomitrella patens</i> PHY1 1004/1122 (89%) 1058/1122 (94%)	<i>Ceratodon purpureus</i> PHY2 996/1123 (88%) 1061/1123 (94%)	<i>Marchantia paleacea</i> PHY1 894/1125 (79%) 1005/1125 (89%)
PP4	<i>Selaginella martensii</i> PHY1 951/1131 (84%) 1044/1131 (92%)	<i>Ceratodon purpureus</i> PHY2 919/1124 (81%) 1016/1124 (90%)	<i>Physcomitrella patens</i> PHY1 899/1125 (79%) 1002/1125 (89%)

Swissprot-Accession numbers: PHY2_ *Ceratodon purpureus* Q39557, PHY1_ *Selaginella martensii* Q01549, PHY1_ *Pinus sylvestris* Q41046, PHY1_ *Marchantia paleacea* Q9AVP3, PHY1_ *Physcomitrella patens* P36505

Chloroplast-Target-Peptid (cTP)

Die Ergebnisse des *Center for Biological Sequence Analysis, University of Denmark* mit Hilfe der *neural network-based* Software ChloroP (V. 1.1, Emanuelsson *et al.* 1999)) ergab für einzelne der hier untersuchten – jedoch auch für der Datenbank entnommene Phytochromsequenzen aus *Arabidopsis* die Vorhersage einer Lokalisation im Chloroplasten. Parallel sind die Vorhersagen für die Hämoxygenasesequenzen aus *Ceratodon* und *Physcomitrella* aufgeführt. Eine Chloroplastenlokalisierung wird von der Software vorhergesagt, sobald der *Score* 0,5 überschreitet. Für die meisten Phytochromsequenzen finden sich höhere Werte als für CpHO1.

Tabelle 2. Vorhersage von Chloroplasten-Target-Peptiden (cTP) für ausgewählte Phytochrome und die Hämoxygenasesequenzen aus *Ceratodon* und *Physcomitrella*.

Name	Länge	Score	cTP?	cTP-length
PP1	1123	0.536	ja	22
PP2	1130	0.480	-	86
PP3	1122	0.534	ja	85
PP4	1126	0.479	-	21
CP1	1307	0.494	-	59
CP2	1121	0.494	-	59
CP3	1126	0.482	-	64
MarpaPhy1	1126	0.488	-	83
SelmaPhy1	1134	0.473	-	21
MescaPhy1b	1142	0.486	-	22
MouscPhy1	1124	0.551	ja	25
AdicaPhy1	1118	0.469	-	32
AdicaPhy2	1140	0.538	ja	33
AdiPhy3	1465	0.483	-	91
PicabPhy1	1136	0.519	ja	12
PinsyPhy1	1131	0.553	ja	34
ArathPhyA	1122	0.464	-	7
ArathPhyB	1172	0.477	-	48
ArathPhyC	1111	0.489	-	20
ArathPhyD	1164	0.518	ja	26
ArathPhyE	1112	0.510	ja	28
CpHO1	305	0.511	ja	80
PpHO1	310	0.542	ja	83

Kernlokalisationssequenzen (NLS)

Für keine der Sequenzen wurde eine Kern-Lokalisation vorhergesagt (PredictNLS Columbia University Bioinformatics Center – CUBIC; (Cokol *et al.* 2000)). Die Suche hiernach ist gleichwohl von Interesse gewesen, da für PhytochromA und B aus *Arabidopsis* eine Kernlokalisierung (jedoch auch keine NLS) beschrieben ist (Kircher *et al.* 1999).

WD-40-Motive

Die Signatur von *WD-repeats* (Pattern-ID: WD_REPEATS PS00678 PDOC00574) ist ein häufiges Motiv in Proteindatenbanken. In Phytochromen wurden sie erstmals von (Suhnel *et al.* 1997) beschrieben, die sie in der "Gelenk-Region" in 11 von 23 der seinerzeit vorliegenden Phytochrom-Gesamtsequenzen gefunden haben. Es handelt sich bei dem hier gefundenen wie auch den von Suhnel *et al.* beschriebenen Motiven nicht um *repeats*, sondern jeweils nur um **eine** Kopie des Motivs:

Die Signatur eines *WD-repeats* wird repräsentiert von einer 15 Aminosäure-Sequenz:

[LIVMSTAC]-[LIVMFYWSTAGC]-[LIMSTAG]-[LIVMSTAGC]-x-x-

[DN]-x-x-[LIVMWSTC]-x-[LIVMFSTAG]-W-[DEN]-[LIVMFSTAGCN]

wobei x für eine beliebige Aminosäure steht. Ein WD-Motiv (Pattern-ID: WD_REPEATS PS00678 PDOC00574) konnte ausschließlich in CP3 gefunden werden.

4.3 Phylogenetische Analyse ausgewählter Phytochrome

Für die Produkte der hier erstmals klonierten Phytochromgene, weiterer Phytochrome niederer Pflanzen sowie der Phytochrome A-E aus *Arabidopsis thaliana* wurde mit Hilfe von VectorNTI eine phylogenetische Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 19).

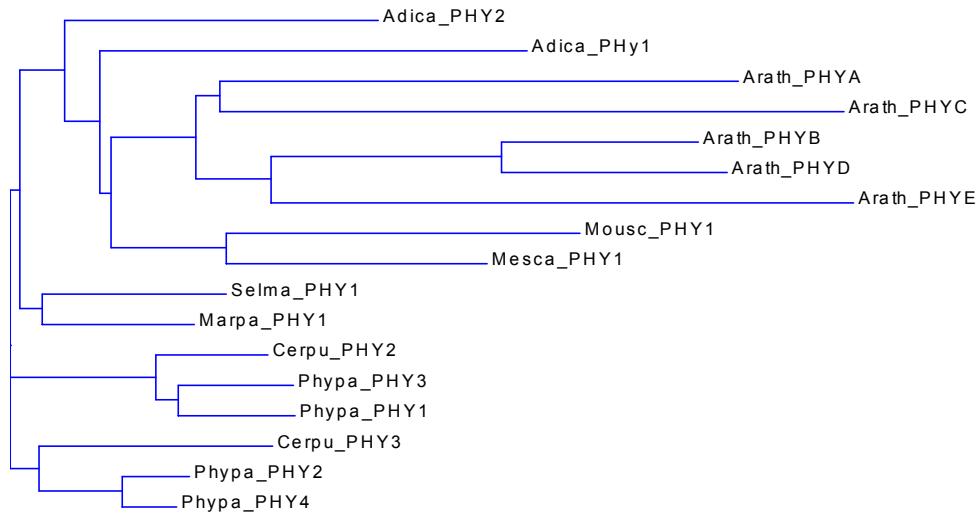


Abbildung 19. Phylogenetische Analyse mittels AlignX (VectorNTI, Matrix: blosum62mt2). Die Moossequenzen einschl. des Moosfarns *Selaginella* bilden eine eigene Subgruppe.

Hierbei zeigt sich deutlich, dass die Moos-Phytochrome von denen der höheren Pflanzen deutlich getrennt angeordnet werden und innerhalb der Phytochrome aus *Ceratodon* und *Physcomitrella* zwei Untergruppen unterscheidbar sind: PP2, PP4 und CP3 bilden die eine, CP2, PP3 und PP1 bilden die zweite Untergruppe.

4.4 Southern blotting Ergebnisse von CP1-3 und PP1-4

Zum Beleg, dass die vorhandenen *Physcomitrella*- bzw. *Ceratodon*- Phytochromgene tatsächlich den jeweiligen Organismen entstammen und dort jeweils unterschiedliche Vertreter der Genfamilie repräsentieren, wurde für jedes Gen ein *Southern blot* durchgeführt, bei dem eine Sonde verwendet wurde, die aus den am weitesten *downstream* liegenden, im Zuge der Sequenzierungen ermittelten 500 bp, also im Wesentlichen aus der 3'-UTR und Teilen des letzten Exons hergestellt wurde.

Für alle drei *Ceratodon* Phytochromgene wurde sowohl in der Spur der *Bam*HI- als auch der *Eco*RV-verdauten gDNA je ein einziges Signal gefunden (Abbildung 20).

Wie anhand der Qualität der *Physcomitrella* *Southern blots* ersichtlich ist, ist eine gDNA-Extraktion aus *Physcomitrella* verglichen mit *Ceratodon* nicht ansatzweise so einfach. Die DNA zeigt häufiger eine leichte Färbung, nach Präzipitation mit Natriumacetat und Ethanol (Sambrook & Russell 2001) ist das Pellet häufig leicht gelatinös, die DNA ist schwerer schneidbar mit Restriktionsendonukleasen und zeigt im Agarosegel ein ungleichmäßiges Wanderungsverhalten. Diese Probleme konnten durch Modifikation der Standard-Technik deutlich reduziert, aber offenbar nicht gänzlich beseitigt werden.

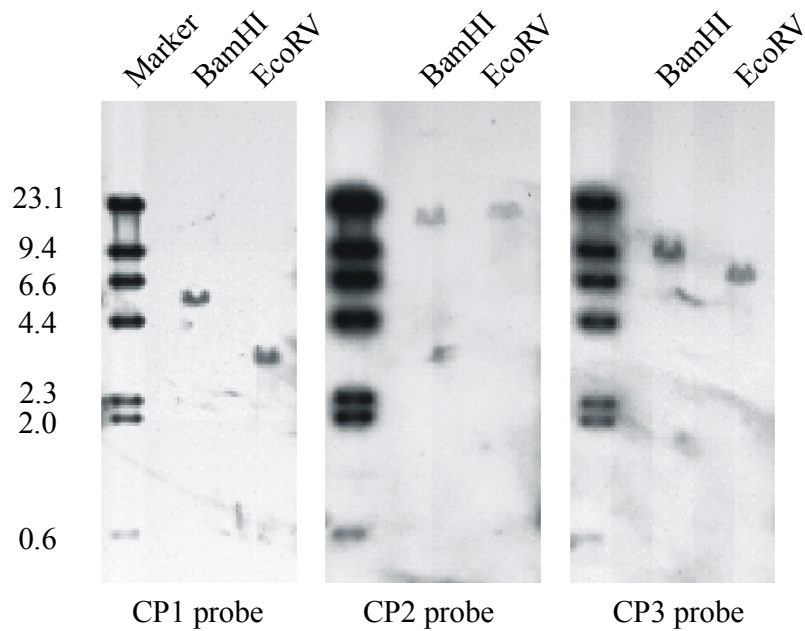


Abbildung 20. *Southern blotting* mit BamHI und EcoRV verdauter Wildtyp gDNA von *Ceratodon* und genspezifischen 3'-Sonden

Im Falle der *Physcomitrella* Phytochromgene wurde jeweils ein *EcoRI*-Verdau durchgeführt und die geblottete DNA ebenfalls mit entsprechenden 3'-UTR-Sonden hybridisiert.

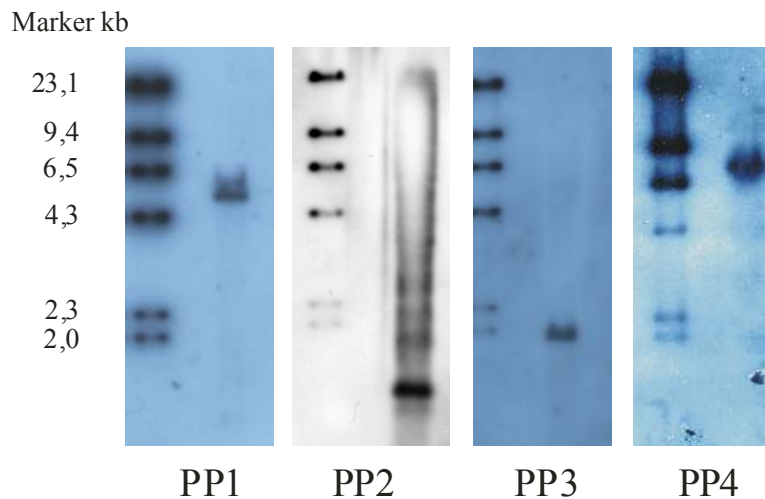


Abbildung 21. *Southern blotting* mit *EcoRI* verdauter Wildtyp gDNA von *Physcomitrella* und genspezifischen 3'-Sonden

Auch hier – siehe Abbildung 21 – wurde für jedes Gen ein eindeutiges und von den übrigen Genen unterscheidbares Signal erhalten.

4.5 gene targeting: *knockout* von PP1-4 aus *Physcomitrella*

Nach Transformation mit den jeweiligen *knockout*-Konstrukten wurden die *Physcomitrella*-Protoplasten nach 5-7 Tagen auf selektive Medien umgesetzt. Nach ca. 3 Wochen zeigten sich resistente Linien, die auf nummerierte Felder frischer Agarplatten mit und ohne Selektivmedium umgesetzt wurden. Teile dieser Biomasse wurden nach weiteren 2-3 Wochen für eine DNA-Mini-Präparation nach (3.4.2) eingesetzt. Mit der hier gewonnenen gDNA wurde ein erstes PCR-Screening durchgeführt. Potentiell positive Klone wurden erneut auf frische *plates* (mit und ohne Antibiotikum) umgesetzt und das PCR-Screening wiederholt. Von eindeutig positiven Linien der vier Phytochrom-*knockout*-Ansätze wurde jeweils **eine Linie** für weitere Untersuchungen ausgewählt (PP1: G2.7, nur dieser der vier hier ausgewählten *knockouts* wurde mit einem Insertions-*knockout*-Konstrukt erzeugt; PP2: F159.6; PP3: F151A.P3; PP4: F161.A.DC). Die Bestätigung, dass in diesen Linien tatsächlich das jeweilige Zielgen zerstört worden war, erfolgte durch PCR, RT-PCR und *Southern blotting*. Da keine gegen die vier Phytochrome gerichteten, spezifischen monoklonalen Antikörper vorlagen, konnte wegen der zu hohen Ähnlichkeit der Phytochrome ein Nachweis des *knockouts* in diesen Linien nicht auch über *Western blottings* erfolgen.

4.5.1 PCR-Analyse

Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen schematisch, wie das Screening nach Transformation mit **Insertions-** bzw. **replacement** *knockout*-Konstrukten erfolgt ist.

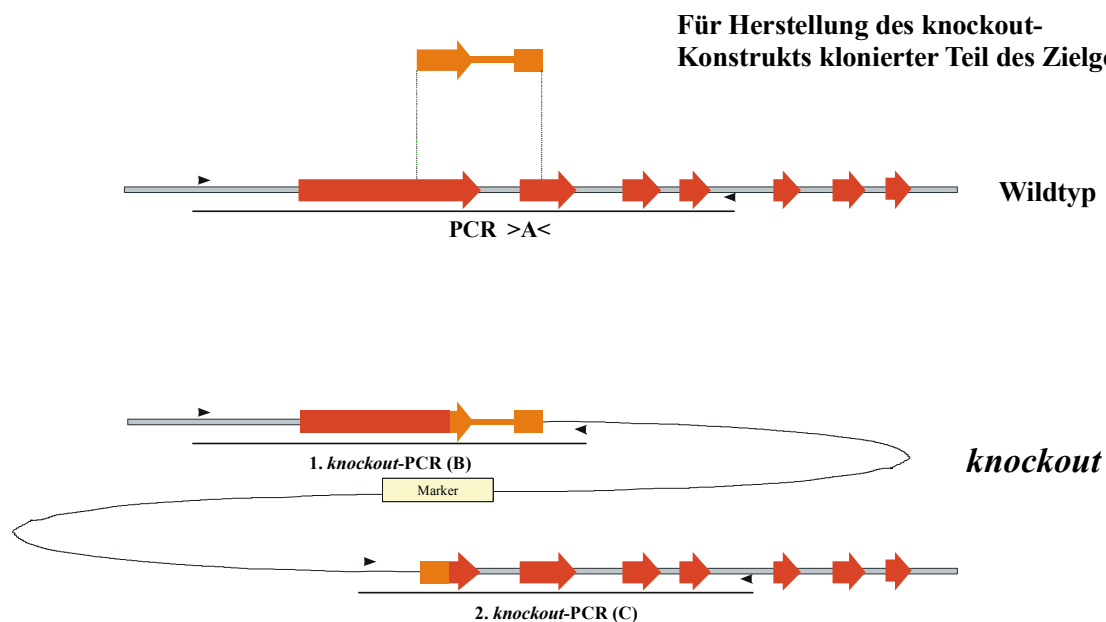


Abbildung 22. Schematische Darstellung des PCR-Screenings nach Transformation mit Insertions-*knockout*-Konstrukt. Oben: negative Kontrolle (PCR >A<); unten: zwei PCRs mit je einem innerhalb des Vektorrückgrats und einem zweiten im Gen (außerhalb der für die Konstruktherstellung verwendeten DNA) bindenden Primer (*knockout*-PCRs (B) und (C))

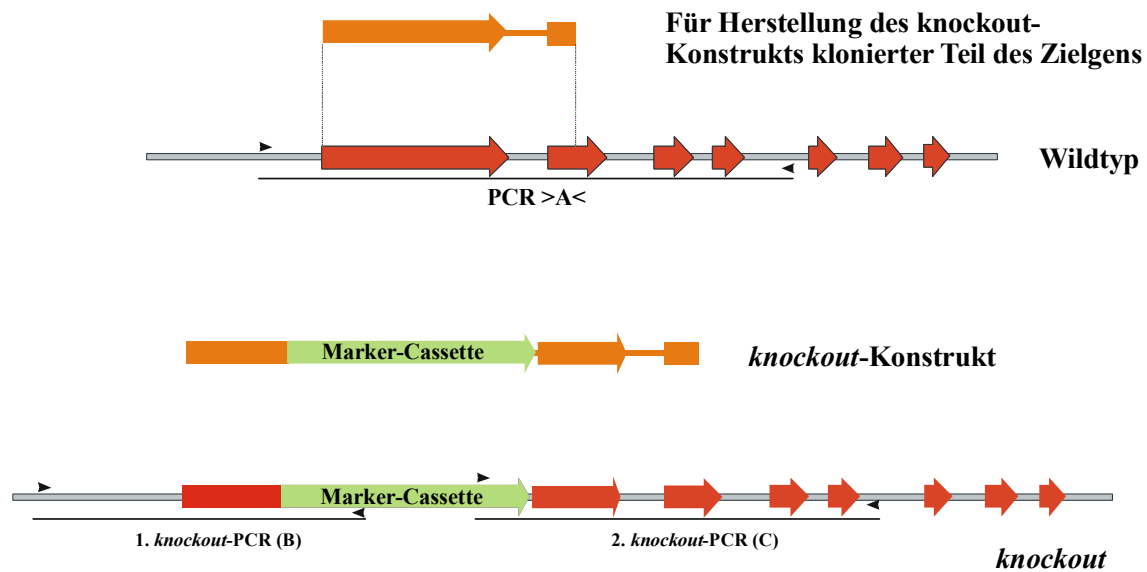


Abbildung 23. Schematische Darstellung des PCR-Screenings nach Transformation mit einem *replacement knockout*-Konstrukt. Oben: negative Kontrolle (PCR >A<); unten: zwei PCRs mit je einem innerhalb des Vektorrückgrats und einem zweiten im Gen (außerhalb der für die Konstruktherstellung verwendeten DNA) bindenden Primer (*knockout*-PCRs (B) und (C))

Im Falle des Insertions-*knockout*-Konstrukts ist das gesamte Konstrukt, also das Plasmid – in der Regel in concatemerisierter Form – in das Chromosom an homologer Position integriert (Schaefer & Zryd 1997). Die im oberen Teil der Abbildung 22 gezeigte negative Kontrolle (PCR >A<), die Wildtyp-PCR, sollte hier keinesfalls zu einer Bande im *knockout* führen, da die integrierte DNA zu einer Überschreitung der maximalen PCR-Produkt-Größe führt, während die im unteren Teil gezeigten zwei *knockout*-spezifischen PCR-Produkte mit im Plasmid-Rückgrat bzw. im Zielgen (außerhalb der zur *knockout*-Konstrukt-Herstellung verwendeten DNA) bindenden Primern naheliegenderweise nur in den *knockout*-Linien Banden der erwarteten Größe liefern sollten: PCRs (B) und (C).

Im Falle der *replacement knockout*-Konstrukte verhält es sich für diejenigen PCRs, die dem Nachweis der Insertion der Fremd-DNA dienen, analog, während im Falle einer *single insertion* die negative Kontrolle (PCR >A<) eine um ca. 2 kb größere PCR-Produkt ergeben sollte. Letzteres ist im Falle der PP3-*knockouts* zu sehen, während für PP2 und PP4 keine Bande für die negative Kontrolle mit den *knockout*-Linien erhalten wurde: auch hier dürfte es sich um den Einbau concatemerisierter Fremd-DNA handeln. Für alle vier Phytochromgen-*knockout*-Linien wurden die erwarteten Zielbanden erhalten, die entsprechend in der Wildtyp-Kontroll-Probe nicht sichtbar war (Primerkombinationen: PP1: A: f151-f69 (2,2 kb); B: mz32-f58 (1,8 kb); C: f60-f69 (1,4 kb). PP2: A: f169-f61b (2,6 kb); B: f169-f60 (1,3 kb); C: f55-f61b (3,35 kb). PP3: A: f132-f127 (5 (wt) bzw. 7 kb (*knockout*)); B: f132-f55 (2,7 kb); C: f60-f107 (2,5 kb). PP4: A: f77-f171 (2,4 kb); B: f77-f55 (2,6 kb); C: f60-f171 (1,5 kb)).

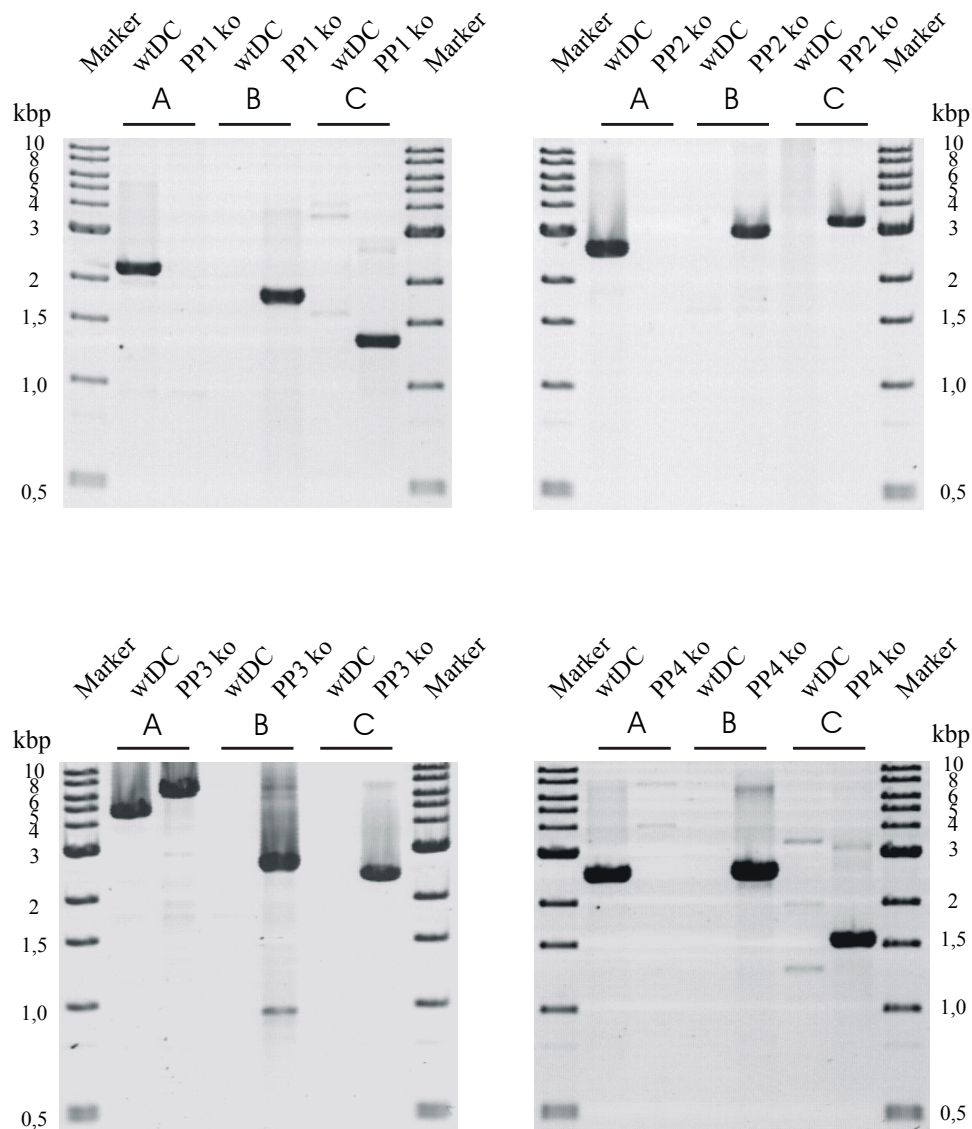


Abbildung 24. PCR-Analyse der ausgewählten *knockout* Linien. A: Wildtyp-Kontrolle, die nur im Falle einer *single insertion* ein um knapp 2 kb größeres PCR-Produkt ergeben sollte. B: PCR aus gDNA-Abschnitt, der vor (*upstream*) des *knockout*-Konstruktes liegt, bis in die Resistenz-Cassette. C: PCR von der Resistenz-Cassette bis in gDNA-Abschnitte jenseits (*downstream*) der für die *knockout*-Konstruktherstellung genutzten Bereiche.

4.5.2 RT-PCR als Beleg für erfolgten *knockout*

Durch die Insertion des *knockout*-Konstrukts mit dem in *Physcomitrella* sehr starken konstitutiven 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus' war nicht zweifelsfrei vorhersagbar, ob nicht Teile der jeweiligen genspezifischen RNA trotz *knockout* via RT-PCR amplifizierbar wäre. Aus diesem Grunde wurde eine RT-PCR durchgeführt, die den **gesamten kodierenden Abschnitt** der cDNA amplifizieren sollte. Ähnlich wie im Falle der PCR mit gDNA sollte hier keine oder allenfalls eine um die eingebrachte Fremd-DNA größere PCR-Bande sichtbar sein. Erwartungsgemäß ist in allen RT-PCR-Ansätzen – außer im Falle der Linien, in denen das jeweilige Gen ausgeschaltet worden war – eine deutliche Bande der erwarteten Größe sichtbar.

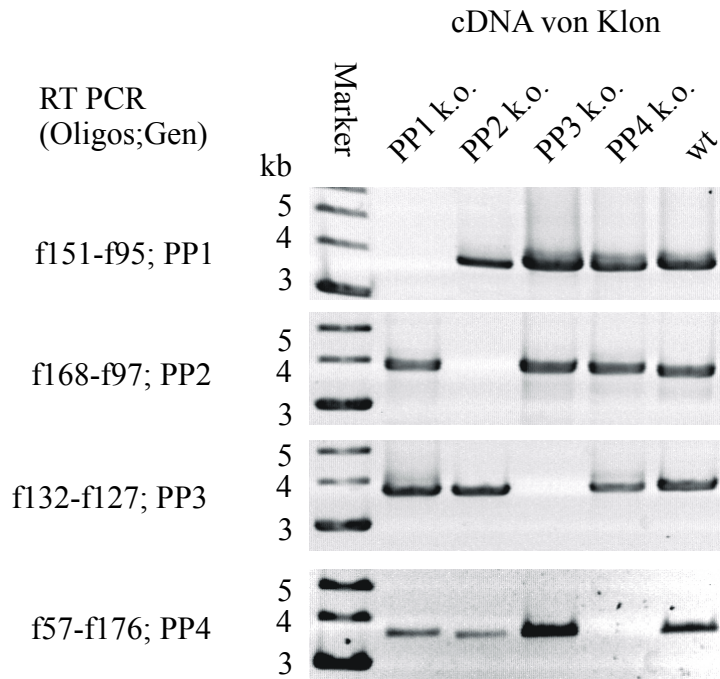


Abbildung 25. RT-PCRs mit cDNA aus wt und PP1-PP4 *knockout*-Linien zeigen, dass alle bis auf das jeweils ausgeschaltete Gen exprimiert werden.

4.5.3 Southern blotting Ergebnisse

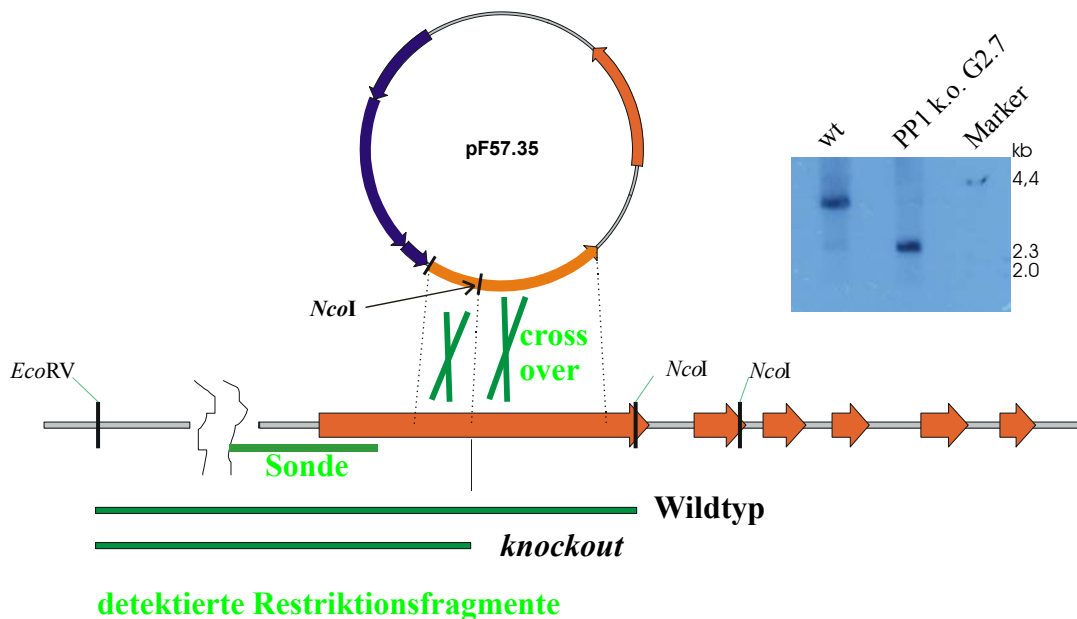


Abbildung 26. Schema von PP1 *knockout* und Nachweis über *Southern blotting* nach *EcoRV-NcoI*-Doppelverdau. Rechts: PP1-*Southern blot* mit *EcoRV*- und *NcoI*-doppelverdaute Wildtyp- sowie G2.7-*knockout*-gDNA.

Der Nachweis des *knockout* des Phytochromgens 1 mit dem Konstrukt pF57.35 (Abbildung 7) erfolgte nach Doppelverdau der genomischen DNA mit dem nicht innerhalb der bekannten PP1-Genabschnitte schneidenden Enzym *EcoRV* sowie dem im

Wildtyp gegen Ende von Exon I und im *knockout* durch Einfügen der zusätzlichen Schnittstelle in der Mitte des Exons I schneidenden Enzyms *NcoI*. Als Sonde wurden *ca.* 1000 bp der cDNA, genutzt, die *upstream* des zur Herstellung des *knockout*-Konstrukts verwendeten Gen-Abschnitts liegen (labeling via PCR mit Primern f78→f150←). Da die Entfernung der *EcoRV*-Schnittstelle vom Translationsstart nicht (genau) bekannt war, konnte nur vorhergesagt werden, dass im Falle des *knockouts* ein *ca.* 1 kb kleineres Restriktionsfragment im *Southern blot* detektiert werden würde. Genau das ist in Abbildung 26 (rechts) für den Vergleich Wildtyp-G2.7 deutlich zu sehen.

Im Falle des PP2-*knockouts* war bei der Enzymauswahl, die in Abbildung 27 gezeigt ist, im Falle des *knockouts* verglichen mit dem Wildtyp bei Verwendung einer 5'-UTR-Sonde mit einem um 1,5 kb kleineren Fragment zu rechnen.

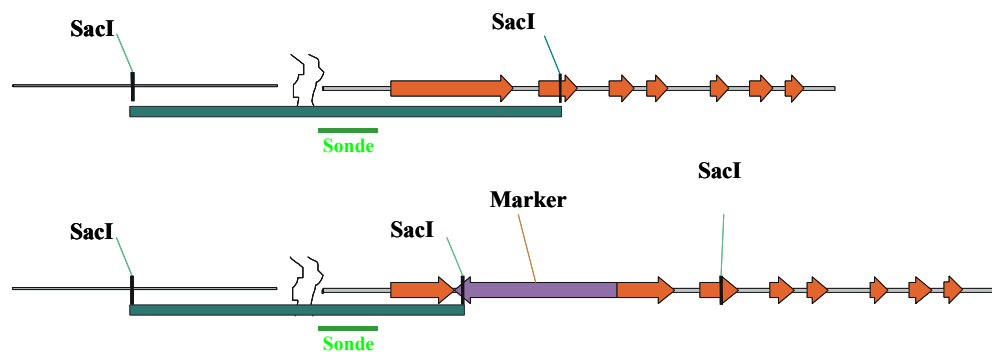


Abbildung 27. Schema des PP2 *knockout* und Nachweis über *Southern blotting* nach *SacI*-Verdau

Genau dieses Ergebnis ist in Abbildung 28 deutlich zu erkennen.

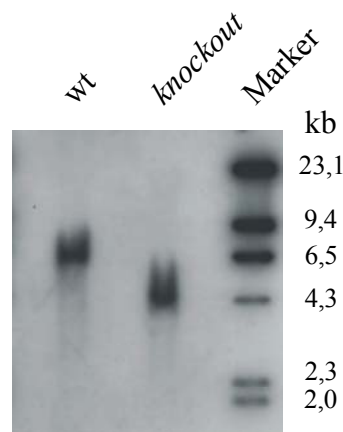


Abbildung 28. *Southern blot* mit PP2-*knockout*- und wt-DNA nach *SacI*-Verdau. Die Hybridisierung erfolgte mit einer PP2-Sonde – siehe Abbildung 27.

Auch im Falle des PP3-*knockouts* war die Position der einen Schnittstelle (*XbaI*) und damit die absolute Größe des im Wildtyp zu detektierenden Restriktionsfragments nicht bekannt, während für den *knockout* eine Größe von 3,5 kb vorhersagbar war. Abbildung 29 zeigt nun, dass im *knockout* erwartungsgemäß ein entsprechend großes und verglichen

mit dem Wildtyp deutlich kleineres Restriktionsfragment detektiert wird, sofern eine Sonde verwendet wird, die aus Genabschnitten *downstream* des *knockout*-Konstrukts hergestellt wurde.

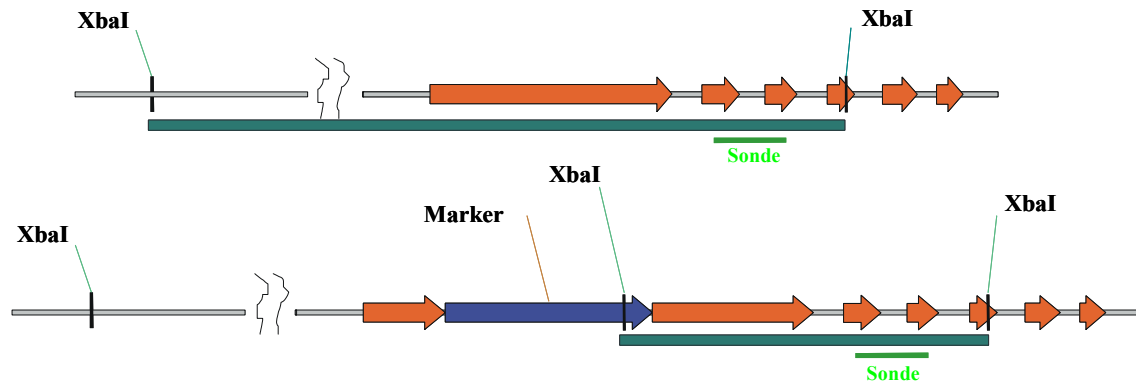


Abbildung 29. Schema des PP3 *knockout* und Nachweis über *Southern blotting* nach *XbaI*-Verdau

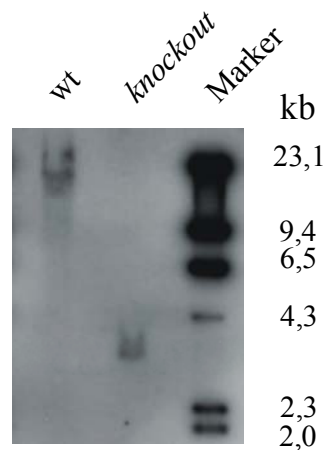


Abbildung 30. *Southern blot* mit PP3-*knockout*- und wt-DNA nach *XbaI*-Verdau. Die Hybridisierung erfolgte mit einer PP3-Sonde – siehe Abbildung 29

Im Falle des PP4 *knockouts* wurde ein Enzym eingesetzt, das nicht im *knockout*-Konstrukt schneidet, mithin zur Detektion eines **größeren** Restriktionsfragments führt bei Verwendung einer in Abbildung 31 gezeigten (*downstream* des Konstrukts bindenden) Sonde.

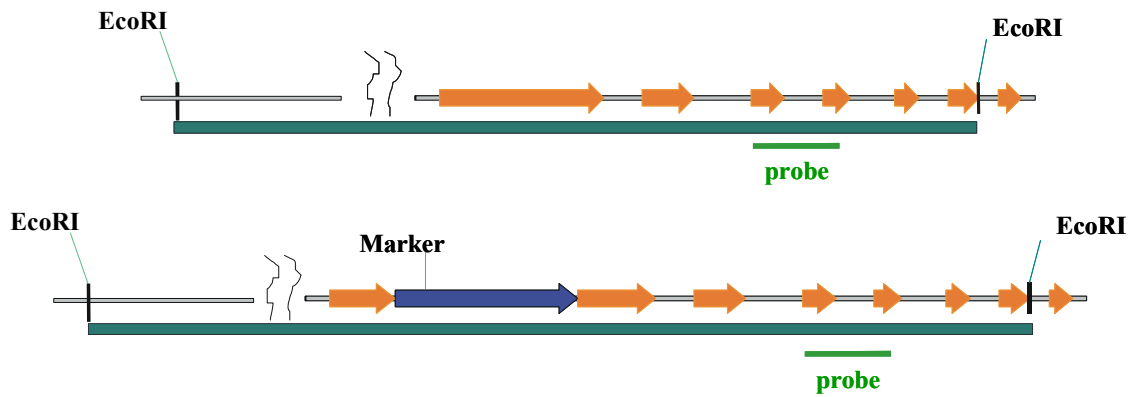


Abbildung 31. Schema des PP4 *knockout* und Nachweis über *Southern blotting* nach *EcoRI*-Verdau

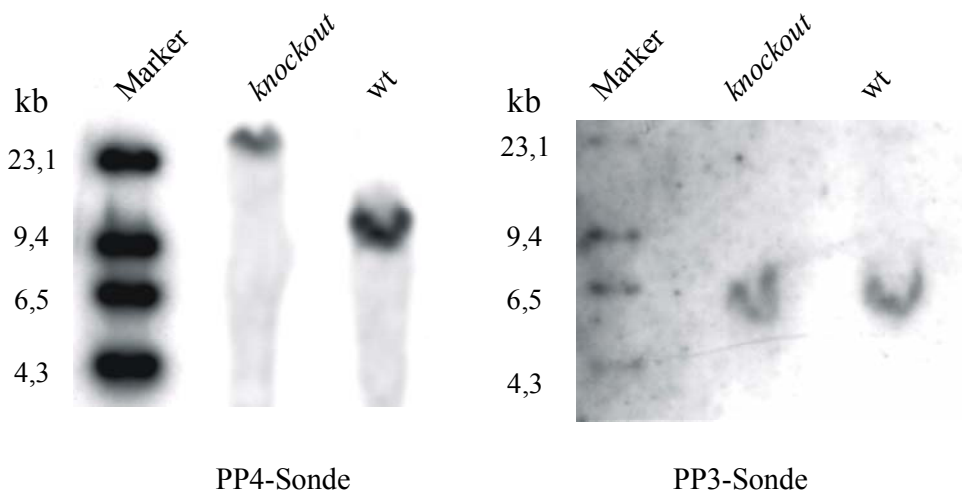


Abbildung 32 *Southern blot* mit PP4-*knockout*- und wt-DNA nach *EcoRI*-Verdau. Links nach Hybridisierung mit PP4-Sonde (Position siehe Abbildung 31); rechts PP3-Sonde aus Abbildung 29.

Abbildung 32 zeigt, dass im Wildtyp eine Bande von *ca.* 10 kb, im *knockout* jedoch eine Bande von mehr als 23 kb sichtbar sind. Offensichtlich ist hier die *knockout*-DNA in concatemerisierter Form ins Genom integriert worden, so dass zum Beleg, dass hier keine unverdaute DNA eingesetzt worden war, die zu einem ähnlichen Signal geführt hätte, der *blot* von der PP4-Sonde befreit und mit der PP3-Sonde (s.o.) erneut hybridisiert wurde. Erwartungsgemäß zeigen sich nun im Wildtyp und in der Spur des PP3-*knockouts* dieselben Signale.

4.5.4 Physiologische Untersuchung der PP1-*knockout*-Linie 2.17

Die Transformation mit *HindIII*-verdautem p57.35 (siehe 4.7) sollte eigentlich im Zuge der *gene substitution* Klone ergeben, die lediglich punktuell in ihrem PP1-Gen modifiziert sind. Es wurden jedoch diverse Linien gefunden, in denen das modifizierte 1.2 kb Stück

des PP1-Gens in concatemerisierter Form in das Gen eingebaut wurde. Die Bestätigung, dass es sich um PP1-*knockouts* handelt, wurde via PCR und *Southern blot* erreicht. Ein Vertreter dieser Linien, Klon 2.17, wurde für die hier wiedergegebene Untersuchung zum Phototropismus sowie den in 4.5.5 beschriebenen *Western blot* verwendet, weswegen hier kurz der Nachweis der PP1-Genzerstörung des Klons 2.17 skizziert ist (zur Herstellung dieser *knockout*-Linie: siehe 4.7). Da es sich hier nicht um eine zielgerichtete Genzerstörung (*targeted gene disruption*) im engeren Sinne handelt, wurden weitere, **planmäßige PP1-*knockouts*** (siehe 3.6.2.1 und 4.5) hergestellt, von denen Klon G2.7 im Folgenden für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt wurde.

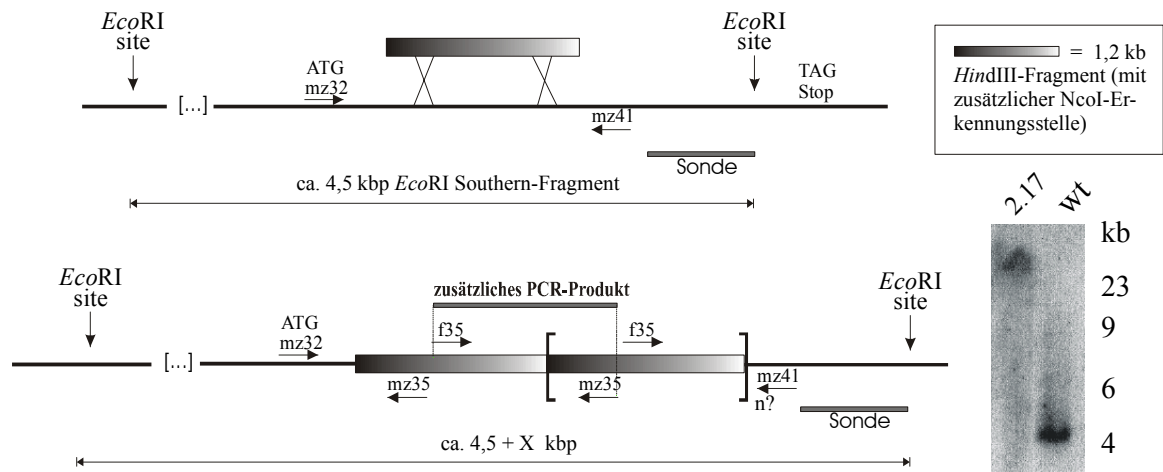


Abbildung 33. Schema des Nachweises des PP1-*knockouts* 2.17 über PCR (links) und via *Southern blot* mit jew. *EcoRI*-verdauter DNA (rechts). Links oben: Wildtyp-; unten *knockout*-Genlocus.

Nachweis des *knockouts*:

Mit gDNA aus 2.17 als template war es wider Erwarten nicht möglich, PCR-Banden mit den Primern mz32 und mz41 zu erzeugen, von denen einer **vor** (*upstream*) und der zweite **hinter** dem (*downstream*) 1.2 kb *HindIII*-Fragment im PP1-Gen bindet. Es ließen sich jedoch **beliebige** andere Teile des Gens amplifizieren. Weiterhin war es möglich, mit zwei Primern (mz35, f35) Produkte zu erhalten, die nur im Falle concatemerisierter 1.2 kb *HindIII*-Fragmente entstehen dürfen: mz35 und f35 binden zwar beide innerhalb des 1.2 kb *HindIII*-Fragment, jedoch weisen ihre **5'- statt der 3'**-Enden aufeinander zu (siehe Schema in Abbildung 33; PCR-Ergebnisse nicht gezeigt). Zudem ließ sich mit einer aus dem 3'-Bereich des PP1-Gens gewonnenen Sonde (Primer J76-f73) zeigen, dass *EcoRI*-verdaute DNA des Wildtyps zwar erwartungsgemäß eine 4,5 kb-Bande ergibt, die *knockout*-DNA jedoch zu einem hochmolekularen Signal, deutlich oberhalb von 23 kb führt (siehe Abbildung 33, rechts).

Exemplarische Ergebnisse zur Untersuchung des Phototropismus:

Die seitliche Rotlichtbestrahlung zuvor dunkeladaptierter, caulonematischer Protonemata ergab bei einer Fluenzrate von $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sek}^{-2}$ für den Wildtyp wie den PP1-*knockout* 2.17 ein identisches Ergebnis: die Protonemen zeigten eine sehr deutliche phototrope Reaktion, jeweils etwa zur Hälfte eine positive bzw. negative.

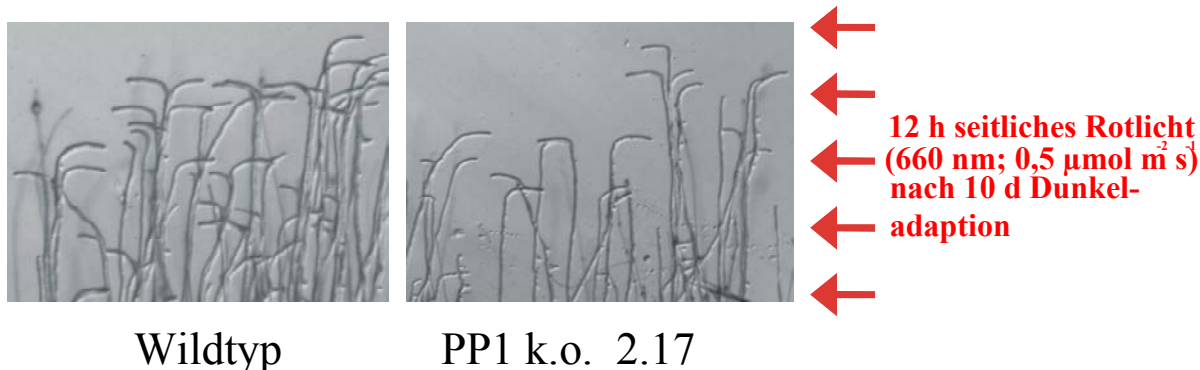


Abbildung 34 phototrope Reaktion der Wildtyp- und 2.17-Protonemen

Dieses Ergebnis ist hier exemplarisch dargestellt. Ausführliche Fluenz-Effekt-Kurven für den Wildtyp und einen (anderen) PP1- sowie je einen PP2- bis PP4-*knockout* wurden im Folgenden nicht von mir, sondern von Gerhard Brücker hergestellt, und *seine* Ergebnisse werden aus diesem Grunde in 5.3 vorgestellt und kurz diskutiert.

4.5.5 Western blot mit PP1-*knockout* 2.17

Nach *knockout* des ersten Phytochromgens wurde unter Verwendung des polyklonalen Anti-Phytochrom-Antikörpers APC1 (Lamparter *et al.* 1995) ein *Western blot* mit *Ceratodon*- und *Physcomitrella*-Wildtyp- sowie PP1-*knockout*-Proteinextrakten (*knockout* 2.17) durchgeführt und in allen genannten Proben ein qualitativ identisches Ergebnis erhalten (Abbildung 35).

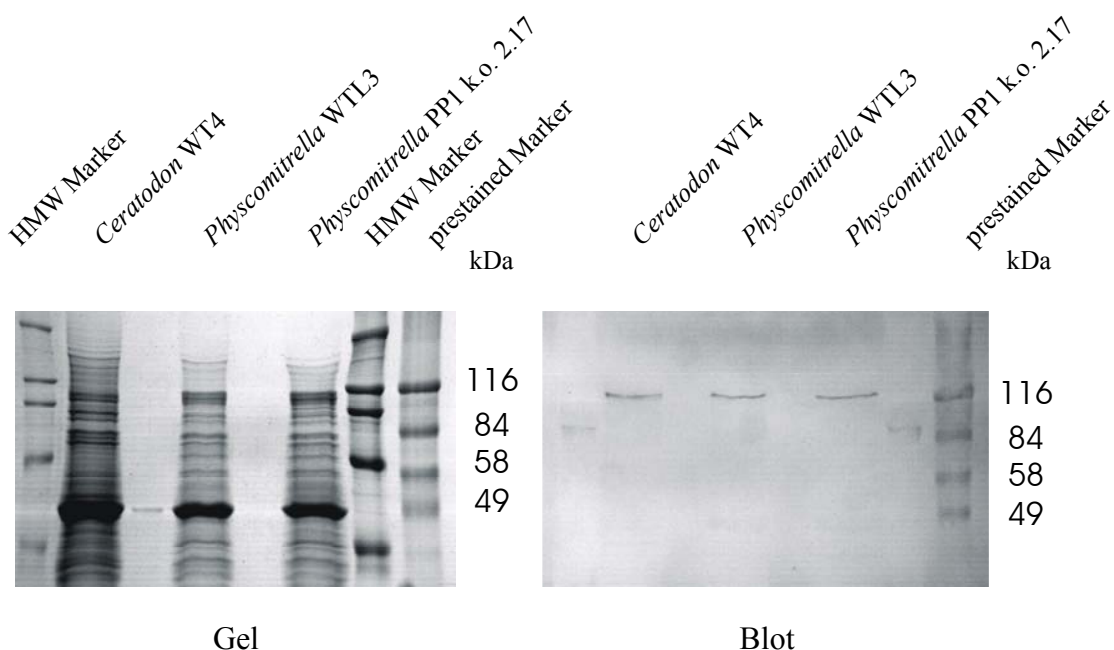


Abbildung 35. *Western blot* mit *Physcomitrella*-, *Ceratodon*- und PP1-*knockout*-Proteinextrakten sowie dem Antikörper APC1

Schon hier zeigte sich, dass neben PP1 offensichtlich weitere Phytochromgene existieren mussten. Ein weiterer *Western blot* mit dem *Physcomitrella*-Wildtyp und ausgewählten

knockouts der Phytochromgene 1-4 wurde von Alexander Repp durchgeführt und wird daher in 5.3 vorgestellt und diskutiert.

4.5.6 Erste Ergebnisse zum Versuch, Mehrfach-*knockout*-Linien herzustellen

Hierzu wurden (freundlicherweise von Tom Abts) zwei *knockout*-Linien mit *knockout*-Konstrukten zur Zerstörung eines jeweils anderen Phytochromgens und einer anderen Resistenz-Cassette transformiert. Zum einen wurden G418-resistente Phytochrom 3 *knockouts* (Klon F151AP3) mit dem Hygromycin-Resistenzvermittelnden PP4-*knockout*-Konstrukt pF87P2.6.Hyg und zum anderen wurde der Hygromycin-resistente Phytochrom 1 *knockout* G2.7 mit einem G418-Resistenz-vermittelnden PP3-*knockout*-Konstrukt (pF136.76.G418) transformiert.

PCR-Ergebnisse der ersten 2 x 20 Linien, die lediglich auf Selektivmedium regeneriert sind – also nicht zwischenzeitlich auf nicht-selektiv-Medium wachsen konnten, zeigten, dass in beiden Ansätzen jeweils 2 von 20 Linien möglicherweise Doppel-*knockouts* repräsentieren, da zumindest eine einzelne *knockout*-spezifische PCR positiv (Abbildung 36 und Abbildung 37) und die korrespondierende Wildtyp-PCR negativ (In Abbildung 37 rechts exemplarisch für den versuchten PP1/PP3-Doppel-*knockout* gezeigt) verlaufen war.

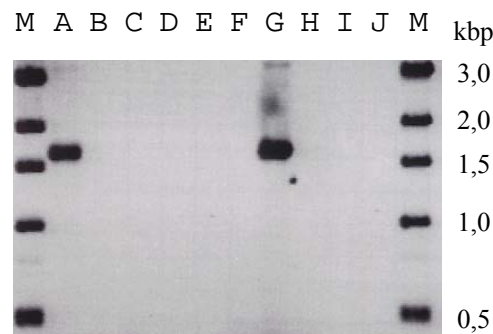


Abbildung 36. Transformation von PP3-*knockouts* mit PP4 *knockout*-Konstrukten (Primer F60 – f171; Zielgröße: 1,55 kb). M = Marker; A-J: analysierte Transformanten

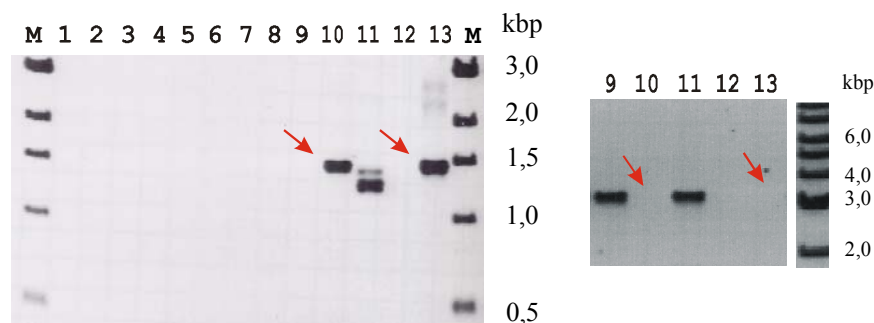


Abbildung 37. Transformation von PP1-*knockouts* mit PP3 *knockout*-Konstrukten (Primer F60 – f136; Zielgröße: 1,75 kb). M = Marker; 1-13: analysierte Transformanten. Rechts: Wildtyp-Negativkontrolle. Hier zeigte sich, dass tatsächlich keine Bande mit den Proben 10 und 13 (potentielle PP1-PP3-Doppel-*knockouts*) erhalten wird.

Im Falle der PP1-PP3-Doppel-*knockouts* ergaben die zwei möglicherweise positiven Klone zwar erwartungsgemäß kein Signal in der negativen Kontrolle, jedoch ist das PCR-

Produkt des *gene targeting* Screenings (Abbildung 37) statt 1,75 kb nur rund 1,45 kb groß, also fast 20 % kleiner als erwartet. Demgegenüber stimmen die Produktgrößen beim PP3-PP4-Screen mit den Erwartungen gut überein: Zielgröße 1,55 kb.

4.6 *knockout* von PpPLC1 aus *Physcomitrella*

Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipasen C (PI-PLC) spalten die polare Kopfgruppe von Phosphatidylinositol und phosphorylierten Phosphatidylinositol-Derivaten wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat unter Bildung von Diacylglycerin und dem entsprechenden Inositolphosphat – hier Inositol-1,4,5-trisphosphat, die als *second messenger* wirken. Inositol-1,4,5-trisphosphat induziert die Ca^{2+} -Ausschüttung aus der Vakuole (Sanders *et al.* 1999) und dem endoplasmatischen Retikulum über IP_3 -kontrollierte Ca^{2+} -Kanäle (Allen *et al.* 1995). Anders als in tierischen Systemen konnte in pflanzlichen PLCs nicht gezeigt werden, dass Diacylglycerin die Proteinkinase C aktivierte; gleichwohl gibt es Indizien für eine Proteinkinase C-ähnliche Aktivität in Pflanzen (Sopory & Munshi 1998). Von Hartmann & Pfaffmann (1990) konnte eine Verknüpfung der Phytochrom- sowie Phosphatidyl-Signaltransduktionswege nachgewiesen werden, insofern Rotlicht-abhängig die PI-PLC-Aktivität erhöht und die Phosphatidylinositol-Hydrolyse Raten gesteigert werden.

Ziel des Versuchs, PpPLC1 durch *gene targeting* zu zerstören, war es primär, nach dem sehr schnellen Ergebnis bei PP3 (hier wurden nur 3 Monate von der erstmaligen Klonierung und Ansequenzierung eines PP3-Genabschnitts bis zur Identifizierung des ersten *knockout*-Klons via PCR benötigt), zu versuchen, ein weiteres Gen in vergleichbarer Zeit auszuschalten, um die Reproduzierbarkeit der Technik abzuschätzen und um zwei *knockout*-Konstrukt-Varianten, nämlich *replacement*-Konstrukte mit und ohne terminale Vektor-Rückgrat-Anteile, hinsichtlich ihrer Effizienz zu vergleichen. Der **eh**er naheliegende Ansatz, nämlich den Einfluss der hier produzierten *gene disruption* auf den Phototropismus und andere Phytochromeffekte zu untersuchen, sollte von oder in Kooperation mit Alexander Repp verfolgt werden. Ausgehend von der Sequenzinformation der PpPLC1 cDNA (Koji Mikami, unveröffentlicht) wurde die genomische DNA vom Start- bis zum Stop-Codon des PpPLC1-Gens amplifiziert (Primer a05 \rightarrow , a06 \leftarrow) und sequenziert.

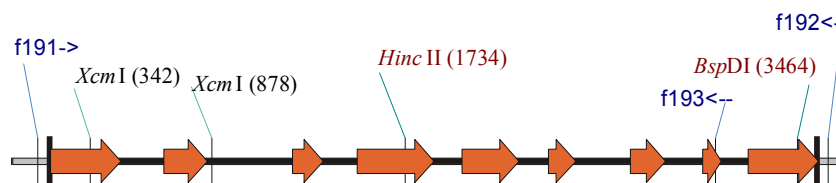


Abbildung 38. Schematische Darstellung der Exon/Intron-Struktur von PpPLC1.

Aus dem Plasmid pF156.6 G418 (3.6.2.5 und Abbildung 39), das diese 3.4 kb PpPLC1-gDNA, unterbrochen von einer *ca.* 1,7 kb großen eukaryontischen G418-Resistenz-Cassette aus pHP23 enthält, wurde das eigentliche *knockout*-Konstrukt mittels Verdau mit *XcmI* alleine oder *XcmI* und *BspDI* freigesetzt. Der Verdau mit *XcmI* und *BspDI* resultiert in einem *knockout*-Konstrukt, das an seinen beiden Termini PpPLC1-homologe DNA besitzt, während ein Verdau ausschließlich mit *XcmI* ein Konstrukt ergibt, in dem downstream von Exon 9 noch *ca.* 950 bp aus pT-Advantage enthalten sind.

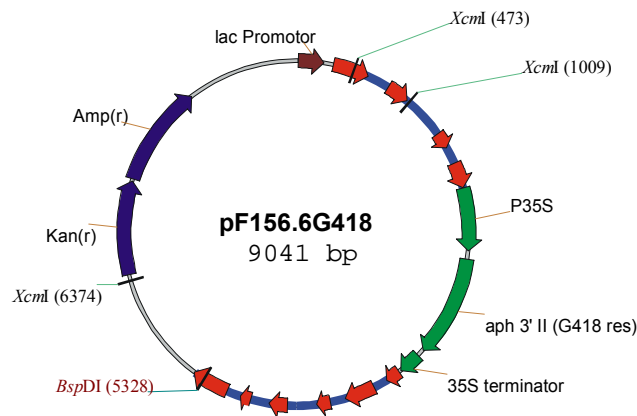


Abbildung 39. PpPLC1 *knockout*-Plasmid pF156.6G418. Die Abschnitte der PpPLC1 gDNA sind in rot (Exons) und blau (Introns) wiedergegeben

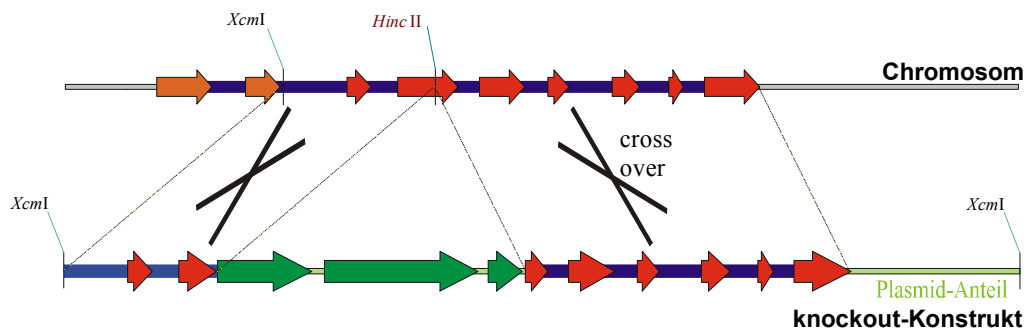


Abbildung 40. Schematische Darstellung des PpPLC1-*knockout* durch *double cross over*

Abbildung 40 zeigt den hypothetischen Verlauf des *knockout*-Ereignisses, Abbildung 41 den Zustand nach der Insertionsmutagenese in vereinfachter Darstellung, insofern als im Allgemeinen die *knockout*-Konstrukte vor oder während des Insertionsmutagenese-Ereignisses Concatemere bilden (Schaefer & Zrýd 1997), während hier eine *single insertion* gezeigt ist.

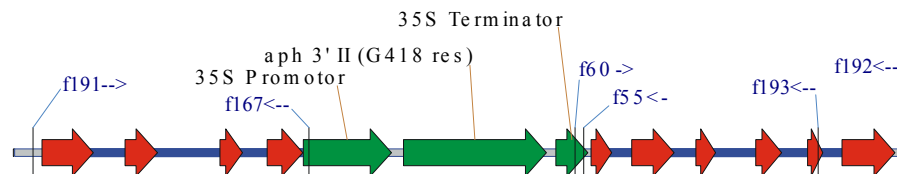


Abbildung 41. genomischer locus des PpPLC1-Gens nach *knockout* (vereinfachte Sicht – siehe Text). An den Rändern in grau wiedergegeben sind die flankierenden Genabschnitte, die nicht im Konstrukt (rote und blaue Abschnitte) enthalten waren und für die Synthese der Primer, die zum Screenen der Transformanten dienten, genutzt wurden

Ein Screenen der Transformanten hinsichtlich erfolgreichen *knockouts* erfolgte mit den Primerpaaren f191→ f167← (ca. 1,7 kb), f60→ f192← (ca. 2 kb), also mit je einem in der 5'- bzw. 3'-UTR (d.h. außerhalb der zur Herstellung des *knockout*-Konstrukts klonierten DNA) bindenden Primer und jeweils einem weiteren innerhalb der Resistenz-

Cassette bindenden Primer. Ein PCR-Produkt sollte also nur nach erfolgter homologer Rekombination gebildet werden. Für die negative Kontrolle, die nur im Wildtyp, nicht aber in den *knockouts* ein PCR-Produkt von ca. 3,5 kb ergeben sollte, wurden die Primer f191→ und f192← eingesetzt. Von einem ausgewählten *knockout* (F175.21), der isoliert wurde nach Transformation mit einem Konstrukt, das lediglich mit *XcmI* verdaut worden war sowie dem Wildtyp sind diese drei exemplarischen PCR-Ansätze in Abbildung 42 vergleichend wiedergegeben:

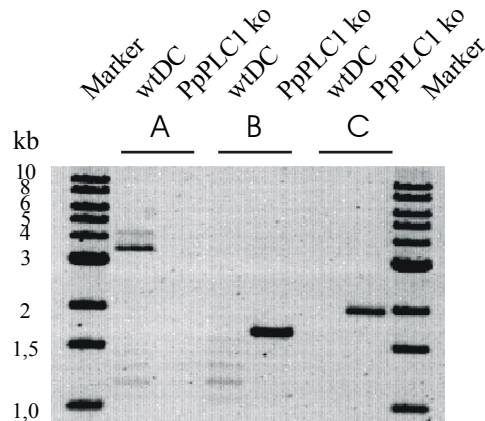


Abbildung 42. PCR-Analyse der ausgewählten *knockout* Linie F175.21. **A:** 3,5 kb-Wildtyp-Kontrolle, die nur im Falle einer *single insertion* ein um knapp 1,7 kb größeres PCR-Produkt ergeben sollte. **B:** PCR aus gDNA-Abschnitt, der vor (*upstream*) des *knockout*-Konstruktes liegt, bis in die Resistenz-Cassette. **C:** PCR von der Resistenz-Cassette bis in gDNA-Abschnitte jenseits (*downstream*) der für die *knockout*-Konstruktherstellung genutzten Bereiche.

Deutlich sichtbar ist, dass nur in den Spuren des *knockouts* die Banden, die zum Nachweis der Insertionsmutagenese dienen, gebildet wurden und dass im Wildtyp – und nur hier – die erwartete 3,5 kb Bande der negativen Kontrolle zu sehen ist. Die Tatsache, dass keine Bande bei 5,2 kb in der Wildtyp-Negativkontrolle beim *knockout* zu finden ist, bedeutet gleichzeitig, dass keine Einzel-Insertion des *knockout*-Konstruktes erfolgt ist, sondern ein Einbau eines Concatemers.

Ein Vergleich der Effizienzen der ausschließlich *XcmI*- sowie der *XcmI*-*BspDI*-verdauten Konstrukte ist in (4.8) aufgeführt.

4.7 *gene substitution*

Für diesen Versuchsansatz wurden *Physcomitrella*-Protonemen mit *HindIII*-verdautem Plasmid pF57.35a oder pF57.36 transformiert, das heißt in beiden Fällen mit 1,2 kb **modifizierter** PP1-gDNA sowie einer linearisiert vorliegenden Hygromycin-Resistenz-Cassette. In 5 unabhängigen Transformationen wurden ca. 250 unabhängige Hygromycin-resistente Linien isoliert und nach (3.4.2) DNA-Minipräparationen durchgeführt. Mit diesen DNA-Proben wurden PCRs mit den Primern mz32→ und mz41← (die in PP1 vor bzw. hinter dem vom *gene substitution*-Konstrukt abgedeckten Bereich binden) durchgeführt und PCR-Produkte, die hier erhalten wurden, mit *NcoI* verdaut und gelelektrophoretisch (3.5.1) untersucht. Tatsächlich konnten in verschiedenen Klonen nach *NcoI*-Verdau die erwarteten zwei kleineren Restriktionsfragmente detektiert werden, wie es Abbildung 43 für den Klon 101.8 zeigt. Obschon hier die Restriktion über Nacht durchgeführt wurde, war das PCR-Produkt – reproduzierbar – nur zu größeren Teilen,

nicht aber vollständig verdaubar. Die übrigen Klone verhielten sich umgekehrt: hier war das PCR-Produkt nur zu geschätzten 10-30 % verdaubar.

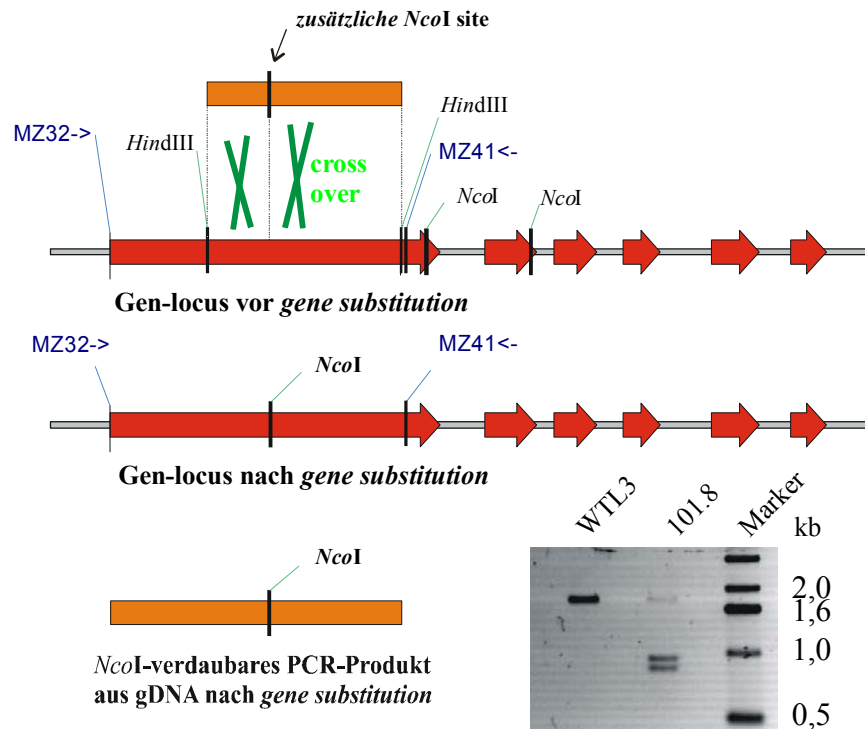


Abbildung 43. Schema des *gene substitution* Ansatzes und ü. N.-Verdau der mz32-mz41-PCR mit *NcoI* bei Enzymüberschuss (unten rechts)

Um Kontaminationen des jeweiligen Klons mit Wildtyp-Protonemen auszuschließen, wurden die Linien sub-kultiviert und die DNA-Extraktion wiederholt – zunächst ohne geänderte Ergebnisse. Nach einer längeren Kultivierung der Linie 101.8 (mehrere Monate) war nach erneuter DNA-Extraktion und PCR jedoch keinerlei Verdaubarkeit des PCR-Produktes mehr feststellbar.

Etwa 10 % der untersuchten Hygromycin-resistenten Linien ergaben mit dem genannten Primerpaar wider Erwarten **keine** PCR-Bande; hier war offenbar das *gene substitution* Konstrukt in concatemerisierter Form in das Zielgen eingebaut und hatte einen *gene knockout* anstelle der *gene substitution* ergeben. Der Nachweis des *gene knockout* der Linie 2.17 ist in 4.5.4 skizziert.

4.8 Effizienzen der verschiedenen *knockout*-Konstrukte

Vergleich von *replacement*-Konstrukten mit bzw. ohne terminale Plasmidanteile:

Der *knockout* des PpPLC1-Gens wurde (auch) geplant, um einen Vergleich von *replacement*-Konstrukten mit bzw. ohne terminale Plasmidanteile durchzuführen. Da der Klonierungsaufwand dieser Konstrukttypen deutlich höher ist als bei Insertions-*knockout*-Konstrukten und es häufig Schwierigkeiten bereitet, geeignete Schnittstellen zu finden, um die von der Resistenz-Cassette unterbrochene gDNA vom Vektor-Rückgrat zu

trennen, sollte getestet werden, ob die Nutzung von Schnittstellen der MCS des Vektors Einfluss auf die *gene targeting*-Effizienz hat. Daher wurden in Parallel-Ansätzen Protoplasten aus dem selben Protoplastierungsversuch mit *XcmI* bzw. *XcmI* und *BspDI*-verdautem pF156.6G418 transformiert. Im Falle von pF156.6G418/*XcmI*, also unter Verwendung eines Konstruktes, das Vektoranteile enthielt, wurden **8 von 16 Linien**, im Falle von pF156.6G418/*XcmI*-*BspDI* (Konstrukt ohne Vektoranteile) wurden lediglich **2 von 9 Linien** identifiziert, die kein Wildtyp- jedoch mindestens eines der zwei PCR-Produkte ergaben, die im Falle des *gene targeting* zu erwarten waren.

Vergleich von Integrations- und *replacement*-Konstrukten:

Im Falle des PP2-*knockouts* wurde ein Insertions-*knockout*-Konstrukt mit einem *replacement*-Konstrukt verglichen. Nur **zwei von 25** stabil transformierten Klonen erwiesen sich etwa 2 Jahre nach der Transformation mit einem Insertions-*knockout*-Konstrukt als positiv, während **vier von sieben** Klone, die mit einem *replacement*-Konstrukt transformiert waren, positiv waren.

Im Falle des PP3-*knockouts* zeigte sich, dass der einzige stabil-transformierte G418-resistente Klon der ersten Transformation und **18 von 20** stabil transformierte Hygromycin-resistente Klone der zweiten Transformation positiv hinsichtlich des gesuchten *gene targeting* waren. Demgegenüber wurden bei Verwendung des Insertions-*knockout*-Konstrukts pF99gP3.G418 ca. 40 G418-resistente Klone vergeblich auf ein *gene targeting*-Ereignis untersucht.

4.9 Klonierung von NPH1- / Superchrome-Sequenzen

Auf der Basis eines *Alignments* verschiedener NPH1-homologer Sequenzen und des Adiantum-Phytochroms 3 (siehe 1.1) waren die PCR-Primer f64→, f65→, die beide in der Phytochromdomäne von Adiantum-Phy3 binden, f66→, der in der LOV2-Domäne sowie f68→ und f87←, die in der Kinase-Domäne binden (siehe Abbildung 44), für RT-PCRs jeweils mit *Physcomitrella*- und *Ceratodon*-cDNA eingesetzt worden. Keinerlei PCR-Produkte wurden mit den *sense*-Primern f64→ und f65→ in Kombination mit dem *anti-sense*-Primer f67← hergestellt. Diese Kombinationen hätte Teile von *Adiantum*-Phy3-homologen Genen amplifizieren sollen. Demgegenüber wurden diverse Amplifikationsprodukte mit den Primerpaaren f66→ f67← und f68→ f67← gefunden (siehe bspw. Abbildung 45), kloniert und ansequenziert, die Abschnitte von NPH1-homologen Genen repräsentieren sollten (*Ceratodon*: pF77.7-8, ~14, ~27, ~28, ~41, ~46 und ~50; *Physcomitrella*: pF77.8-5, ~7 und ~12). Soweit diese Amplifikate erfolgreich ansequenziert werden konnten, zeigte sich im Zuge von BLASTX-Analysen, dass sie höchste Homologie zu bekannten NPH1-Sequenzen besitzen. Da jedoch bereits die Zahl der hier ansequenzierten, potentiellen NPH1-Homologen aus *Ceratodon* und *Physcomitrella* die der jeweiligen Phytochromgene noch zu übersteigen schien, wurde zunächst darauf verzichtet, einzelne Gene vollständig zu klonieren und zu versuchen, diese über homologe Rekombination auszuschalten. Die hier erhaltenen Sequenzen werden in Kürze an *GenBank* übermittelt.

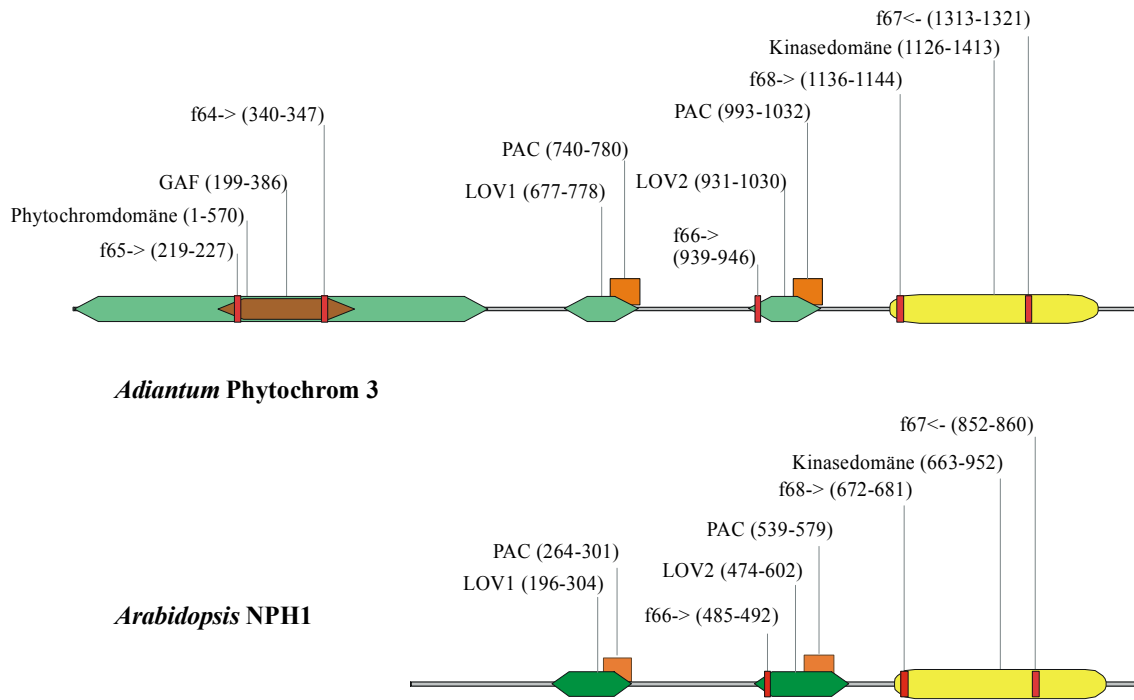
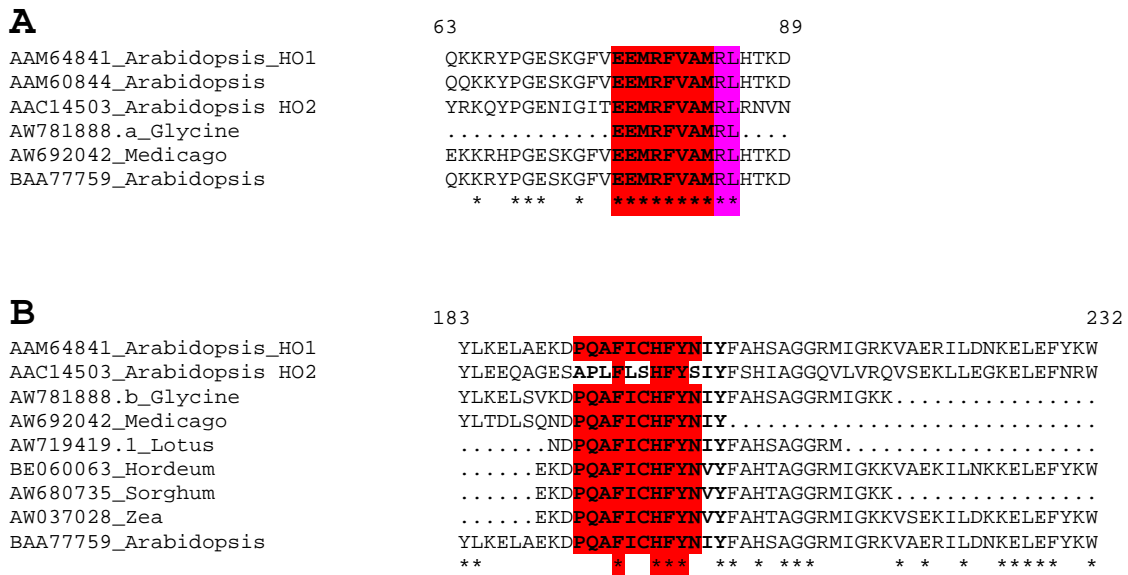


Abbildung 44. Schematische Darstellung von *Adiantum* Phytochrom 3 und *Arabidopsis* NPH1 mit Primer-Positionen

4.10 Klonierung der *Ceratodon*- und *Physcomitrella* Häm-Oxygenase-Sequenzen

Für die Klonierung der Hämoxigenasegene aus *Ceratodon* und *Physcomitrella* wurde ein *Alignment* sämtlicher bei *GenBank* hinterlegter Hämoxigenase-Sequenzen hergestellt. Aus dem konservierten Motiv der Aminosäure-Sequenz GDLSGGQV wurde der degenerierte Primer f38→D (256fach degeneriert; siehe 8) abgeleitet und für 3'-RACE mit cDNAs beider Moose verwendet. Hierbei wurde jedoch keine Hämoxigenase-Sequenz amplifiziert. Zu diesem Zeitpunkt wurde von Muramoto *et al.* (1999) und Davis *et al.* (1999a) gezeigt, dass es sich in *Arabidopsis* bei *hyl* um eine Mutation in einem Hämoxigenase-Gen handelt. Damit war die erste pflanzliche HO-Sequenz bekannt, während für das zuvor beschriebene *Alignment* tierische und bakterielle Sequenzen genutzt worden waren. Die HY1-Sequenz lässt sich jedoch nicht mit dem *Alignment* in Deckung bringen, vielmehr scheinen die tierischen und bakteriellen HO-Sequenzen zu einer getrennten Genfamilie zu gehören. Aus diesem Grunde wurde mit der HY1-Sequenz in EST-Datenbanken nach verwandten Sequenzen auch anderer Spezies gesucht (BLASTN). Entsprechende Abschnitte wurden translatiert und für ein *Alignment* mit ausschließlich pflanzlichen Sequenzen mit Ähnlichkeit zu HY1 verwendet. Hierbei wurden nun die zwei folgenden konservierten Bereiche **A** und **B** identifiziert. In Abschnitt **A** ergibt sich ein Block von zehn Aminosäuren mit vollständiger Homologie bei allen vorhandenen Sequenzen, allerdings sind nur zwei der Sequenzen *nicht* aus *Arabidopsis*. Ein weiterer weitgehend konservierter Block - **B** - von ebenfalls zehn Aminosäuren findet sich weiter im C-terminalen Teil des *Alignments*; dieser Block repräsentiert eine deutlich größere Zahl von Spezies; jedoch gibt es *eine* gegenüber allen anderen an 6 Positionen abweichende *Arabidopsis*-Sequenz (HO2). Daher wurde

zunächst für den ersten konservierten Abschnitt der abgeleitete degenerierte Primer f98→D (AS-Sequenz: EEMRFVAM) hergestellt.



In 3'-RAcE-Versuchen (3.5.4) mit diesem Primer und 1st strand cDNA aus *Ceratodon* und *Physcomitrella* wurden Banden mit der erwarteten Größe von knapp 1 kb erhalten (Abbildung 45). Die RT-PCR-Kontrollen, die gewählt wurden, weil die erwarteten Produkte ähnlicher Größe sind, sollten Abschnitte von NPH1-ähnlichen Sequenzen amplifizieren (siehe 4.8).

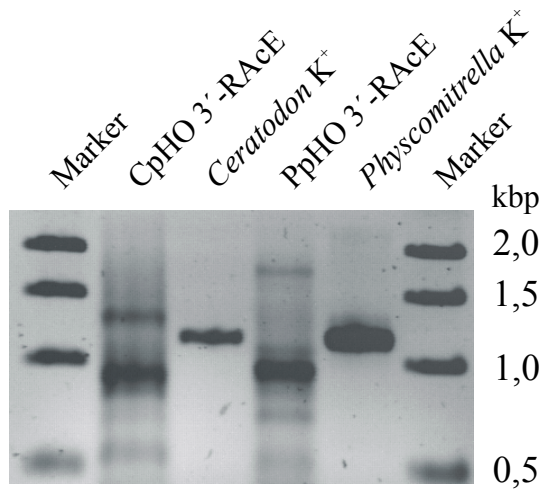


Abbildung 45. 3'-RAcE mit 1st strand cDNA von *Ceratodon* und *Physcomitrella*. Die Kontrollen sind RT-PCRs, die mit den gleichen cDNAs und den Primern f66-f67 durchgeführt wurden und NPH1-ähnliche Sequenzen amplifizieren sollten (siehe 4.9).

Auch die 5'-RAcE-Durchführungen (3.5.5) mit sequenzspezifischen Oligos, die abgeleitet waren von den Sequenzierungsergebnissen der 3'-RAcE-Produkte (f106← für CpHO1 bzw. f134← für PpHO1), waren unmittelbar erfolgreich und resultierten in Produkten von knapp 1 kb bzw. 0,7 kb (Abbildung 46).

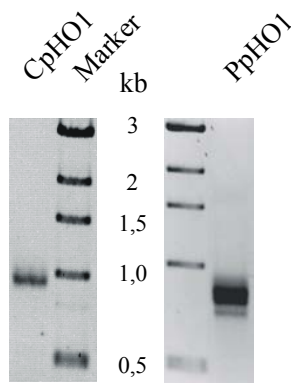


Abbildung 46. 5'-RACE mit cDNA aus *Physcomitrella*- und *Ceratodon* zur Klonierung von Hämoxigenase cDNA-Sequenzen

Die 3'- und 5'-RACE-Produkte wurden in pTAdvantage kloniert (*Ceratodon*: pF91.C4; pF92.8.2 und ~5; *Physcomitrella*: pF91.P16; pF132.5R) und sequenziert. CpHO1 wurde zudem mit den Oligos (f116→ f117←) auch aus gDNA amplifiziert und die Introns sequenziert.

Die resultierenden Sequenzen umfassen für PpHO1 1448 bp (cDNA mit 288 und 230 bp 5'- bzw. 3'-UTR; *Accession number* AJ489941) sowie für CpHO1 2625 bp für die genomische DNA und 1686 bp für die cDNA; *Accession number*: AJ489940). Die Sequenzierung zeigte, dass die Wahl des ersten konservierten Blocks zur Herstellung des degenerierten Primers günstig war, da in beiden Moos-HO-Sequenzen zwei Abweichungen von der Consensussequenz des zweiten Blocks (*VPAFICHFYN* statt *PQAFICHFYN*) identifiziert wurden; die Amplifikation spezifischer RACE-Produkte wäre mithin unwahrscheinlich gewesen, sofern die Abweichungen in den Primersequenzen repräsentiert gewesen wären.

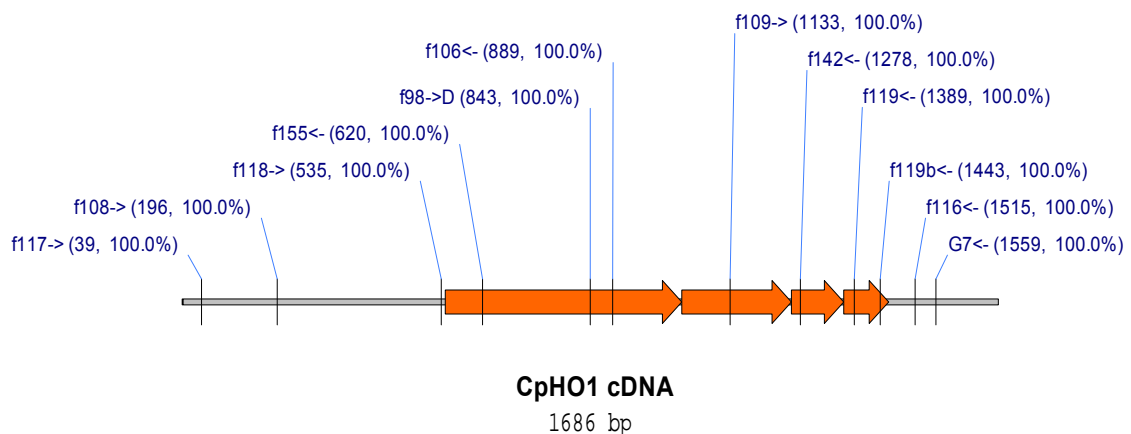
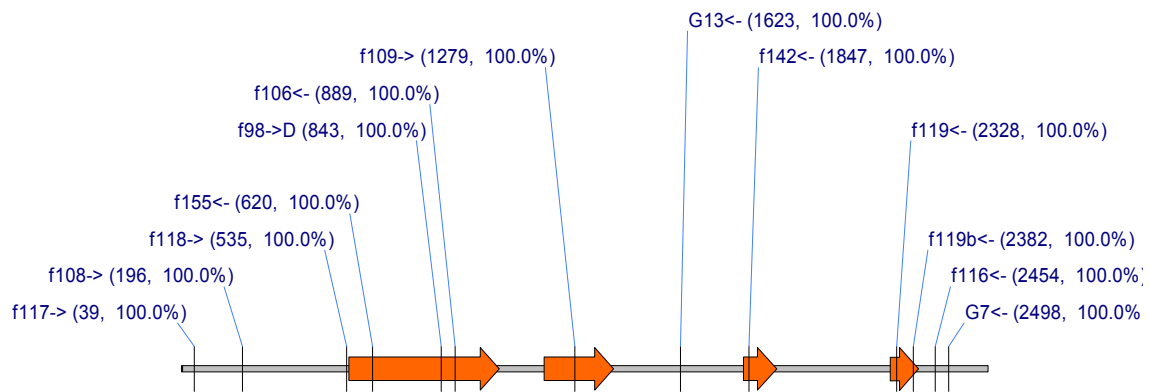


Abbildung 47. Schematische Darstellung der cDNA von CpHO1 mit den für die Klonierung & Sequenzierung verwendeten Primern.



CpHO1gDNA

2625 bp

Abbildung 48. Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur der CpHO1-gDNA mit Angabe der für die Klonierung & Sequenzierung verwendeten Primer.

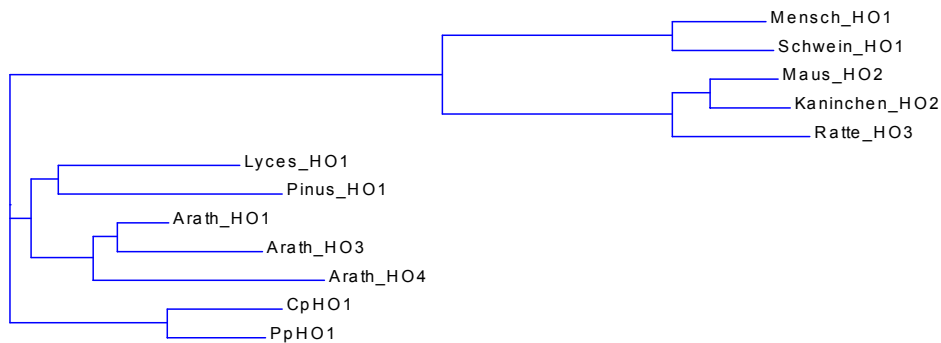


Abbildung 49. Phylogenetische Analyse der Moos-Hämoxygenasen. *Lyces*: *Lycopersicum esculentum*; *Pinus*: *Pinus taeda*; *Arath*: *Arabidopsis thaliana*; PpHO1, CpHO1: *Physcomitrella* und *Ceratodon* Hämoxygenase 1

Die phylogenetische Analyse zeigt anschaulich, dass die tierischen bzw. pflanzlichen Sequenzen jeweils getrennte Hämoxygenase-Sub-Familien repräsentieren. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse eines Sequenzvergleichs von CpHO1 und PpHO1 mit den drei jeweils ähnlichsten Hämoxygenasesequenzen der *GenBank*-Datenbank (BLASTP), den Hämoxygenasen *Lycopersicon esculentum* HO1, *Pinus taeda* HO1 und *Arabidopsis* HO1.

Tabelle 3. Sequenzvergleich von CpHO1 und PpHO1 mit den drei jeweils ähnlichsten Hämoxygenasesequenzen der *GenBank*-Datenbank (Stand: 07 2002)

		<i>Lycopersicon esculentum</i> HO1	<i>Pinus taeda</i> HO1	<i>Arabidopsis</i> HO1
CpHO1	identische AS	160/236 (67%)	150/233 (64%)	150/234 (64%)
	ähnliche AS	185/236 (78%)	189/233 (81%)	189/234 (80%)
PpHO1	identische AS	161/231 (69%)	157/224 (70%)	185/233 (79%)
	ähnliche AS	186/231 (80%)	186/224 (83%)	190/233 (81%)

Für beide Moos-Hämoxygenasen wird eine Chloroplastenlokalisation von *chlorop v1.1* (Center for Biological Sequence Analysis, Denmark) vorhergesagt; siehe Tabelle 4.

Tabelle 4. Vorhersage von Chloroplasten-Target-Peptiden in beiden Moos-HO-Sequenzen (Center for Biological Sequence Analysis, Denmark, *chlorop v1.1*)

Sequenz	Länge	cTP vorhergesagt:	Länge der vorhergesagten cTP
CpHO1	306	ja	80 AS
PpHO1	310	ja	83 AS

4.10.1 Analyse der CpHO1-Sequenzen der class I Mutanten ptr116 und ptrP14

Nachdem die genomische Sequenz eines Hämoxygenasegens aus dem *Ceratodon*-Wildtyp bestimmt war, sollte in einigen ausgewählten aphototropen Mutanten, für die ein Schaden in der Hämoxygenase vorhergesagt (Lamparter *et al.* 1997a), und teilweise bereits belegt war (ptr116; Brücker *et al.* 2000), untersucht werden, ob die Gen-Sequenz von CpHO1 verändert ist.

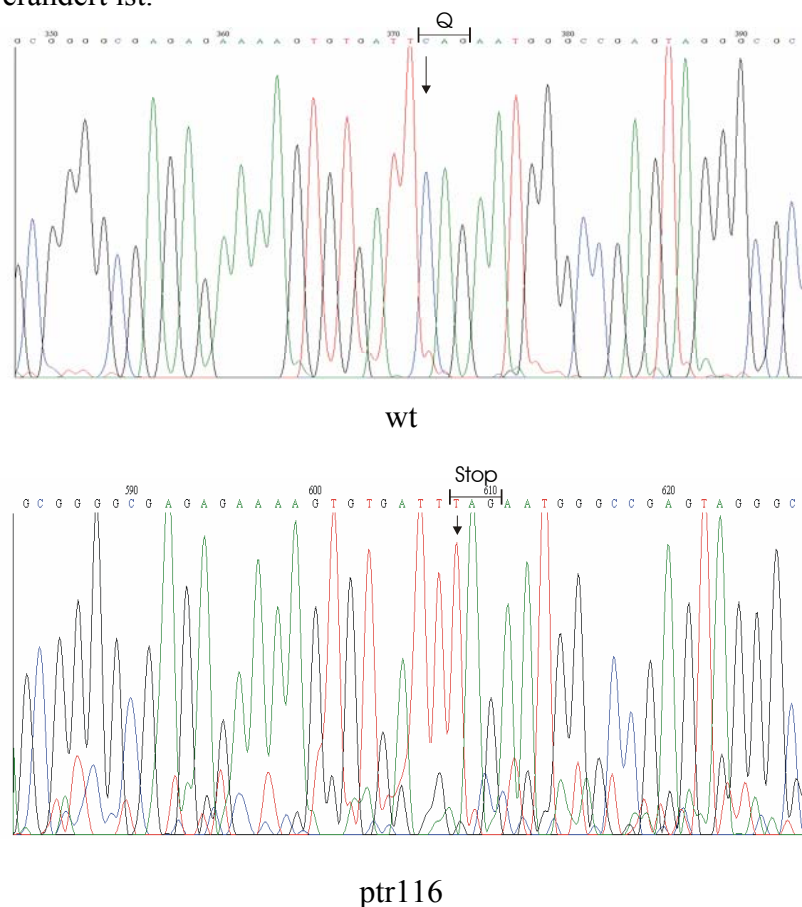


Abbildung 50. Teilsequenz des CpHO1 von wt und ptr116. Der Austausch C→T verändert das Codon für Glutamin in ein Stopcodon.

Hierzu wurden gDNA und RNA der Mutanten isoliert, cDNA hergestellt und die CpHO1-cDNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Tatsächlich ließ sich in der Mutante ptr116 eine einzelne Punktmutation in Codon 31 identifizieren, die ein Codon für Glutamin zu einem Stopcodon verwandelt hat (CAG → TAG; Q31 → Stop):

```

          M M A M A V G E L G L G L K G S A A
wt 5' ...TCTGGATGATGGCTATGGCGTAGGGGAGCTTGGGTTGGGGTTGAAGGGGTCGGCCGCGC
          P V V G A G R E K S V I Q N G P S R A P
wt      CTGTTGTGGGAGCGGGCGAGAGAAAAGTGTGATTCAGAATGGGCCGAGTAGGGCGCCGA... 3'
ptr116:                               TAG

```

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde der interessierende Abschnitt auch aus gDNA amplifiziert und sequenziert und dieselbe Sequenzabweichung gefunden.

Im Falle der Mutante ptrP14 gelang es wider Erwarten nicht, die cDNA oder gDNA des Gens zu amplifizieren. Daher sollte der Gen-*locus* durch *Southern blotting* untersucht werden.

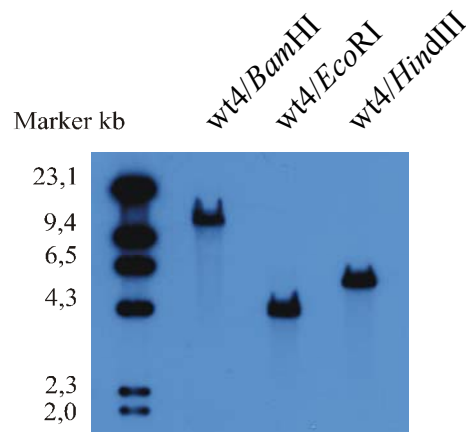


Abbildung 51. *Southern blot*, der der Bestimmung geeigneter Restriktionsenzyme für die Analyse der Mutante ptrP14 diente.

Zunächst wurde mit Wildtyp-DNA versucht, geeignete Restriktionsenzyme zu ermitteln, die keine allzu großen Banden ergeben sollten, damit die Insertion von zusätzlicher DNA leichter sichtbar wäre. Mit Hilfe einer aus der gesamten kodierenden Sequenz der cDNA abgeleiteten Sonde und gDNA, die mit den Enzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III verdaut worden war, wurden Signale bei *ca.* 15, 4,5 bzw. 5,5 kb erhalten (Abbildung 51), von denen vor allem die zwei letztgenannten geeignet schienen. Überraschenderweise konnte mit derselben Sonde in der Mutante ptrP14 – im Gegensatz zum Wildtyp - **keinerlei** Signal erhalten werden (Abbildung 52). Bei dieser durch Protoplastierung erzeugten Mutante war also zumindest der gesamte kodierende Bereich des Gens aus dem Genom eliminiert. Demgegenüber konnte das Phytochromgen CP2 mit einer 3'-Sonde im Wildtyp wie in der Mutante in gleicher Weise nachgewiesen werden. Bei den zwei Teilbildern der Abbildung 52 handelt es sich um **denselben** *blot*, von dem nach der ersten Hybridisierung und Detektionsreaktion (3.5.10) die HO-Sonde entfernt wurde, um eine zweite Hybridisierung mit der Phytochromsonde zu ermöglichen. Der DIG-markierte Marker ist alkali-labil, weswegen die im linken Teilbild noch sehr starken Markerbanden rechts fehlen. Zur weiteren Absicherung der These, dass die gesamte kodierende Sequenz von CpHO1 in der Mutante ptrP14 verloren wurde, wurde ein weiterer *Southern blot* mit einer Mischung zweier Sonden, die gegen CpHO1 bzw. den konservierten 5'-Abschnitt des Phytochromgens CP1 gerichtet sind, durchgeführt.

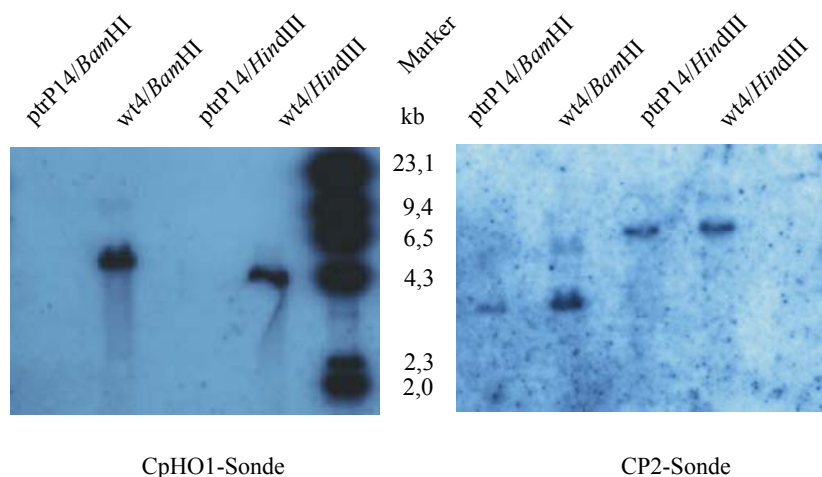


Abbildung 52. *Southern blot* von ptrP14 und wt4 DNA. Derselbe *blot* wurde zunächst mit CpHO1-Sonde hybridisiert (links), gestriipt und anschließend mit CP2-3'-Sonde hybridisiert (rechts)

Abbildung 53 zeigt, dass es hier gelungen war, die Hybridisierung mit einem solchen Sonden-Gemisch durchzuführen, dass die Signale beider Gene ähnlich intensiv geworden sind. Hier sind deutlich die unveränderten Phytochromsignale in der Mutante und die zusätzliche CpHO1-Bande im Wildtyp zu erkennen.

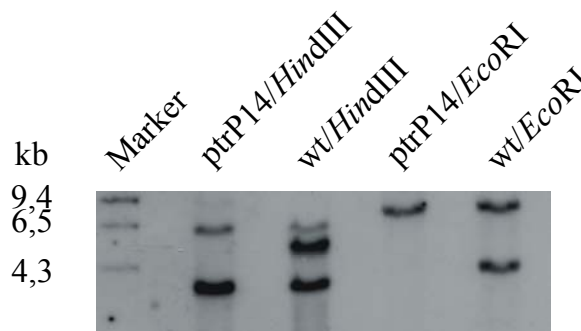


Abbildung 53. *Southern blot* mit wt4- und ptrP14 DNA nach Verdau mit *HindIII* bzw. *EcoRI*. Eingesetzt wurde eine Mischung einer Sonde, die gegen den konservierten Teil des Phytochromgens CP1 gerichtet ist und einer CpHO1 cDNA *full length* Sonde.

4.11 Gene Targeting in *Ceratodon*

Die Sequenzierung des Hämoxygenasogens der Mutante ptr116 (4.10.1), legte nahe, dass sich Wildtyp und Mutante mit ihrem definierten, deutlichen und leicht screenbaren Phänotyp (fast weiße, aphototrope bzw. grüne, positiv-phototrope Filamente bei Mutante bzw. Wildtyp) jeweils durch Austausch eines **einzigen** Nukleotids ineinander umwandeln lassen sollten.

Da bislang *Physcomitrella* das einzige pflanzliche System war, in dem homologe Rekombination als molekularbiologisches Werkzeug effektiv einsetzbar war, jedoch lichtphysiologische Untersuchungen mit *Ceratodon* deutlich einfacher realisierbar, vor allem aber in schon viel größerem Maße bereits durchgeführt worden sind (Hughes & Hartmann 1998), lag es nahe, auch in *Ceratodon* zu untersuchen, wie effizient *gene targeting* als Mittel zur Untersuchung der Genfunktionen nutzbar ist. Hierzu sollte

zunächst das CpHO1-Gen in ähnlicher Weise wie im Falle der vier Phytochrom-Gene sowie des PhospholipaseC-Gens aus *Physcomitrella* durch Insertionsmutagenese mit Hilfe eines *replacement knockout*-Konstrukts zerstört werden und später die Mutante ptr116 durch *gene substitution*, bei der das stop-Codon wieder gegen eines für Glutamat getauscht wird und (als zusätzliche *silent* Mutationen) eine neue Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym eingefügt wird, den Wildtyp-Phänotyp zurückerhalten.

Die Untersuchungen zum *gene targeting* in *Ceratodon* wurden von Gerhard Brücker durchgeführt und werden von ihm in seiner Dissertation (Brücker 2003) abgehandelt.