

5 DISKUSSION

5.1 DNA-Extraktion für *Southern blots*

Die Extraktion von Gesamt-DNA für *Southern blotting*-Experimente war für *Ceratodon* von Mittmann (1997) auf der Basis der CTAB-Methode von (Rogers & Bendich 1985) optimiert worden und hatte dort *ca.* 100 µg hochmolekulare und leicht-restringierbare DNA pro Gramm Frischgewicht ergeben. In *Physcomitrella* erwies sich eine einfache Adaption der Methode als nicht möglich: nicht nur lag die Ausbeute anfänglich um mehr als eine Größenordnung niedriger, vielmehr war die so extrahierte DNA häufig bräunlich verfärbt, schwer restringierbar und zudem bei etwa einem Viertel der Extraktionen teilweise oder gänzlich degradiert. Abhilfe ließ sich im Wesentlichen durch das Einfügen zweier Änderungen schaffen: die Präzipitation der DNA erfolgte angelehnt an Ausubel *et al.* (1988) bei 65 °C, wodurch sich die Ausbeute deutlich steigern ließ, und die β -Mercaptoethanolkonzentration wurde auf (je nach Zustand der Biomasse) bis zu 1,5 % erhöht, wodurch im Folgenden **reproduzierbar** nicht-degradierte, nicht verfärbte und restringierbare DNA extrahiert werden – wenn auch in (verglichen mit *Ceratodon*) nach wie vor geringerer Ausbeute (*ca.* 25 %) und noch immer nicht in derselben Qualität, wie anhand der *Southern blots* offensichtlich ist.

5.2 Phytochrome in *Ceratodon* und *Physcomitrella*

Die Sequenzanalyse der im Rahmen dieser Arbeit erstmals klonierten Moos-Phytochromgene und ihrer Genprodukte zeigte, dass CP3 und PP2-PP4 ausnahmslos auf ihrer ganzen Länge klassischen Phytochromen homolog sind. Es wurden keine untypischen Phytochrome gefunden, wie sie von (Thümmler *et al.* 1992) mit CP1 und von Nozue *et al.* (1998) mit dem *Adiantum*-Phytochrom 3 beschrieben wurden. Zudem konnte, basierend auf einer phylogenetischen Analyse, eine Einteilung der klassischen Moos-Phytochrome in die zwei Subgruppen, die von PP1, PP3 und CP2 auf der einen und PP2, PP4 und CP3 auf der anderen Seite repräsentiert werden, erfolgen. Dies dürfte eine auch von Markmann-Mulisch *et al.* (2002), Henschel *et al.* (2002) und Richter *et al.* (2002) unterstellte Genomduplikation in *Physcomitrella* widerspiegeln, die sich jedoch schon vor so langer Zeit ereignet hat, dass den jeweiligen Genprodukten individuelle

Funktionen zugefallen sind, da die physiologischen Daten (siehe 5.3) keine bloße Redundanz der Gene nahelegen.

Chloroplast-Target-Peptid (cTP)

Die Ergebnisse der *neural network-based* Software *ChloroP* ergaben wider Erwarten für einzelne der hier untersuchten, jedoch auch für einige der Datenbank entnommene Phytochromsequenzen die Vorhersage einer Lokalisation im Chloroplasten. Eine Chloroplastenlokalisierung wird unterstellt, sobald der *Score* der Tabelle 2 den Wert von 0,5 überschreitet; die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Vorhersage wird mit 88 % angegeben. Die Vorhersagen für die Phytochrome PP1 und PP3 werden mit größerer

Wahrscheinlichkeit getroffen (höherer Score) als für die **Hämoxygenasesequenzen** aus *Ceratodon* und *Physcomitrella*, bei denen eine Chloroplastenlokalisierung ähnlich dem *Arabidopsis* HY1 naheliegt (Muramoto *et al.* 1999) und für CpHO1 auch in Kooperation mit (und federführend von) Gerhard Brücker gezeigt werden konnte (Brücker 2003). Diese Vorhersage korreliert im Falle der Phytochrome PP1 und PP3 auch mit der phylogenetischen Einordnung in eine eigene Sub-Genfamilie, es wäre allerdings dann auch für CP2 eine entsprechende Vorhersage zu erwarten. Im Falle der Phytochrome aus *Arabidopsis* wird für PhyD, also eines der Phytochrome, die eine N-terminale Extension besitzen, eine Chloroplastenlokalisierung vorhergesagt.; nicht jedoch für das ähnlichste weitere Phytochrom aus *Arabidopsis*: PHYB. Dies spricht für eine zufällige Vorhersage. Andererseits sind Phytochromeeffekte wie die Chloroplastendrehung bei *Mougeotia* (Haupt 1960), (Haupt 1959) gut vorstellbar als vom Inneren des Chloroplasten gesteuerte Phänomene.

Inwieweit diese Vorhersage von Bedeutung ist, wird zur Zeit (in Kooperation mit/) von Alexander Repp untersucht mittels Transformation von *Physcomitrella*- und *Ceratodon*-Protonemen mit verschiedenen von A. Repp hergestellten chimerischen Phytochrom-GFP-Fusionskonstrukten.

Kernlokalisationssequenzen (NLS)

Von Kircher *et al.* (1999) und Kircher *et al.* (2002) wurde die Rotlichtabhängige Kernlokalisierung von PHYA und B aus *Nicotiana tabacum* und PHYA-E aus *Arabidopsis* mit Hilfe überexprimierter Phytochrom-GFP-Fusionskonstrukte gezeigt. Gleichwohl lässt sich in diesen Photorezeptoren keine klassische Kernlokalisationssequenz (Conti & Izaurralde 2001) detektieren. Entsprechend verwundert es nicht, dass auch in den hier erstmals beschriebenen Moos-Phytochromen keine NLSs zu finden sind. Die zuvor erwähnten Ansätze zur Transformation mit chimerischen Phytochrom-GFP-Fusionskonstrukten sollten aber auch hier in naher Zukunft Aussagen ermöglichen, inwieweit einzelne der hier beschriebenen Phytochrome eine rotlicht-abhängige Kernlokalisierung zeigen.

WD-40-Motive

Das in Proteindatenbanken sehr häufige, erstmals von Suhnel *et al.* (1997) in Phytochromen beschriebene WD-Motiv konnte in CP3, nicht jedoch in weiteren der hier erstmals beschriebenen Phytochrome gefunden werden. Die Identifikation dieses Motivs schien den Autoren bemerkenswert, da WD-repeats enthaltende Proteine häufig regulatorische Funktionen besitzen und eine Rolle in der Protein-Protein-Erkennung spielen (Neer *et al.* 2002). Da es sich bei den hier gefundenen wie auch den von Suhnel *et al.* beschriebenen Motiven nicht um WD-40-**repeats**, sondern jeweils nur um **eine** Kopie des Motivs handelt, ist ein zufälliges Auftreten angesichts der starken Degeneriertheit des Motivs (siehe 4.2) anzunehmen, zumal keine Korrelation zwischen Auftreten und Zuordnung zu einer Phytochromgen-Subfamilie festzustellen ist: in diesem Falle sollten neben CP3 auch PP4 und PP2 dieses Motiv zeigen.

Gegen Ende dieser Arbeit wurde eine Reihe von EST-Sequenzen aus *Physcomitrella* mit Phytochromhomologie in der *GenBank* Datenbank öffentlich zugänglich. Hier zeigte sich, dass mehrere der in dieser Arbeit beschriebenen Phytochrome durch diese ESTs repräsentiert sind (PP1: EST BI487297, PP2: BG409271, PP4: BI487757; CP3:

AW098271). Zudem sind drei weitere, untereinander sehr ähnliche Phytochromsequenzen zu finden, die wahrscheinlich zwei weitere Phytochromgene und mit diesen eine weitere Phytochromgen-Subfamilie widerspiegeln dürften (AW497360 & AW699500; BJ170012). Das bedeutet, dass die Phytochromgenfamilie in *Physcomitrella* noch größer als erwartet ist und möglicherweise ein entsprechendes Gen auch in *Ceratodon* zu erwarten ist.

5.2.1 Northern und Western blots

Die in (3.9) hergestellten Plasmide, die je 500 bp der 3'-UTR sowie des letzten Exons von PP1 bis PP4 enthalten, wurden von Mathias Zeidler für die Untersuchung der lichtabhängigen Expression der vier Phytochromgene im *Physcomitrella*-Wildtyp verwendet (siehe Abbildung 54).

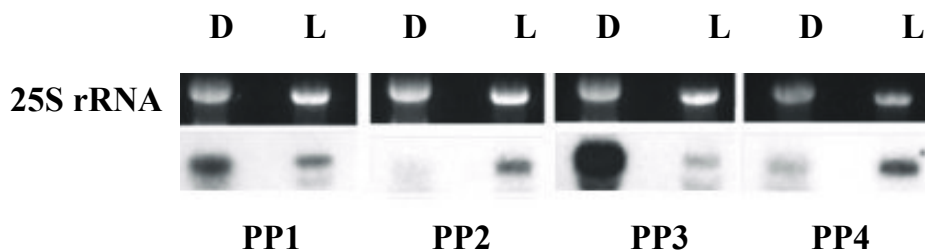


Abbildung 54. Northern blot mit poly(A)+-angereicherter RNA des *Physcomitrella*-Wildtyps (dunkeladaptiert) und genspezifischen 3'-UTR-Sonden (PP1-4) von Mathias Zeidler.

In höheren Pflanzen wird nur die Transcription der (Typ I) Phytochrom A-Vertreter in dunkeladaptierten Pflanzen durch Rotlichtbestrahlung (Phytochrom-gesteuert) heruntergeregelt, während die Transcription der Typ II Phytochrome weitgehend konstant, also unabhängig vom Licht-Regime ist (siehe bspw.: Quail 1994, Adam *et al.* 1995). Die Transcription der Phytochromgene in *Mesotaenium* und *Mougeotia* ist ebenfalls lichtreguliert. In *Mougeotia* nimmt bis zu 5 Tage lang bei Dunkeladaptation die PHY1-Transcriptmenge zu, um (dunkelrotrevertierbar) bereits nach 5 min Rotlichtbestrahlung auf 10 % abzunehmen. Da hier nur ein Phytochromgen zu existieren scheint, kann von Autoregulation der Expression ausgegangen werden (Winands & Wagner 1996). Auch in *Mesotaenium* ist die Phytochromgen-Transcription deutlich lichtreguliert, jedoch konnten wegen der starken Ähnlichkeit der Sequenzen nur gemittelte Ergebnisse für beide Gene erhalten werden (Lagarias *et al.* 1995). PP1 und PP3 verhalten sich wie die Phytochromgene aus den zwei genannten Algen, insofern auch sie im Dunkeln stärker als im Licht transkribiert werden. Demgegenüber zeigen die Gene PP2 und PP4 zwar ebenfalls eine lichtabhängige Expression, überraschenderweise werden sie jedoch im Dunkeln schwächer exprimiert als im Licht, also ähnlich den Typ I-Phytochromen höherer Pflanzen, jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen; gewissermaßen "Anti-Typ I-Phytochrome". Diese Expressionsmuster korrelieren mit den Homologien der Genprodukte: es zeigen genau diejenigen Phytochromgene eine jeweils ähnliche Expression, die auch derselben phylogenetischen Subgruppe angehören (PP1 und PP3 bzw. PP2 und PP4; siehe Abbildung 17 und Abbildung 19).

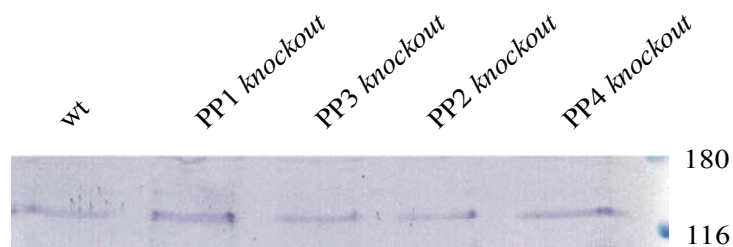


Abbildung 55. *Western blot* von Alexander Repp. Verwendet wurde der polyklonale Antikörper APC1 (Lamparter *et al.* 1995)

Die Analyse der Phytochrommenge des Wildtyp und der verschiedenen *knockout*-Linien mittels *Western blotting* mit Hilfe des polyklonalen Anti-Phytochrom-Antikörpers, der gegen den konservierten N-Terminus von *Ceratodon* CP1 gerichtet ist, zeigt deutlich, dass keines der Phytochromgene das **quantitativ** dominierende ist. Das heißt auch, dass die sehr große Signalintensität beim PP3-*Northern* nicht mit einem geringeren Signalstärke im *Western blot* beim PP3-*knockout* korreliert. Nicht nur ist ein direkter Zusammenhang von mRNA- und Protein-Menge nicht zwingend gegeben; außerdem sind Signalintensitäten von vier verschiedenen *Northern blots*, die zudem mit vier verschiedenen Sonden hergestellt wurden, naheliegenderweise nicht quantitativ vergleichbar (Ausubel *et al.* 1988).

5.3 Physiologische Analyse von WT und Phytochrom-*knockout*-Linien aus *Physcomitrella*

Von Gerhard Brücker wurden mit dunkeladaptierten Caulonemata des *Physcomitrella*-Wildtyps und ausgewählten Linien der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *knockouts* der Phytochromgene 1 bis 4 Untersuchungen zum Rotlicht-abhängigen Phototropismus durchgeführt und dabei **Fluenz-Effektcurven** zwischen 0 und 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sek}^{-1}$ erstellt. Diese Untersuchungen von Gerhard Brücker stellen eine konsekutive und konsequente Ergänzung der vorgestellten Ergebnisse zum *knockout* der Phytochromgene 1-4 dar und werden daher in der Diskussion abgehandelt. Eine ausführliche Erörterung der Daten erfolgt in der Dissertation von Herrn Brücker 2003. Zunächst fällt beim Wildtyp die verglichen mit *Ceratodon* deutlich kompliziertere Fluenz-Effektcurve auf (Abbildung 56): bei geringen Fluenzraten zeigen die mit seitlichem Rotlicht (660 nm +/- 20 nm) bestrahlten caulonematischen Protonemen einen negativen Phototropismus; am ausgeprägtesten bei *ca.* 0,15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sek}^{-1}$. Mit steigenden Fluenzraten ergibt sich eine Situation, in der die Hälfte der Protonemen positiven, die andere Hälfte negativen Phototropismus zeigt, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abbildung 34). Eine maximale Krümmung beim positiven Phototropismus zeigen die Protonemen bei *ca.* 1,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sek}^{-1}$, woraufhin eine weitere Zunahme der Bestrahlungsintensität abnehmende positive Krümmung und schließlich eine erneute negative phototrope Reaktion – eine Vermeidungsreaktion – bewirkt.

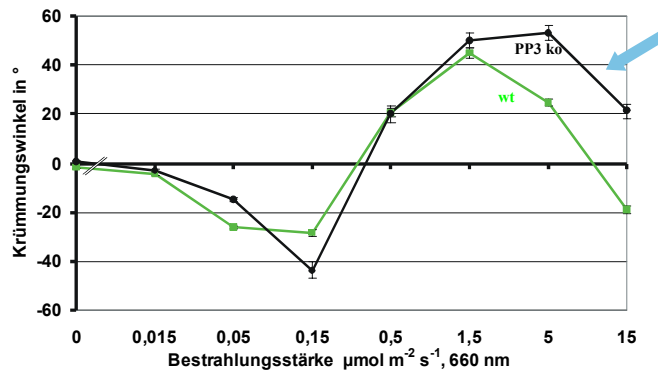


Abbildung 59. Fluenz-Effekt-Kurve des PP3-*knockouts* im Vergleich zum *Physcomitrella*-Wildtyp. Abbildung von Gerhard Brücker.

Am auffälligsten ist der Phänotyp des PP4-*knockouts*, der schon in Abbildung 57 gezeigt wurde: hier fehlt die positive phototrope Reaktion vollständig, während der Fluenz-Effekt-Kurvenverlauf ansonsten bis 0,15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sek}^{-1}$ bei PP4-*knockout* und Wildtyp identisch ist.

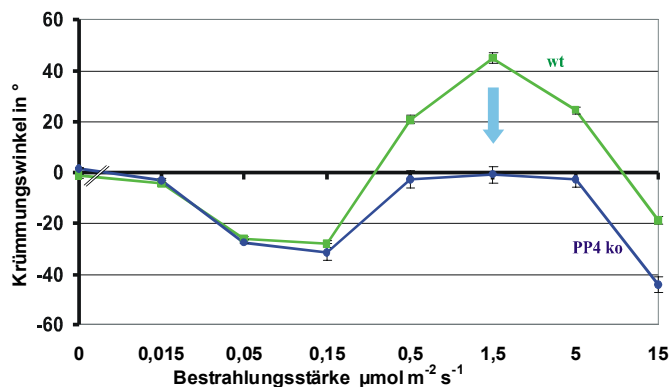


Abbildung 60. Fluenz-Effekt-Kurve des PP4-*knockouts* im Vergleich zum *Physcomitrella*-Wildtyp. Abbildung von Gerhard Brücker.

Die *knockouts* der Phytochrome PP1 und PP2 verhalten sich untereinander ähnlich und unterscheiden sich am stärksten vom Wildtyp genau in jenem Fluenz-Bereich, in dem der Wildtyp den stärksten positiven Phototropismus zeigt: hier ist die phototrope Reaktion der *knockouts* signifikant abgeschwächt. Und bei einer Bestrahlungsstärke von 0,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sek}^{-1}$ unterscheiden sich Wildtyp und PP2-*knockout* durch positiven bzw. negativen Phototropismus.

Der PP3 *knockout* unterscheidet sich hauptsächlich durch eine größere Sensibilität gegenüber höheren Bestrahlungsstärken; er zeigt also eine frühere Vermeidungsreaktion, so dass bei 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sek}^{-1}$ der Wildtyp positiv, der *knockout* jedoch negativ phototrop reagiert.

Die phototrope Reaktion der Caulonemata des *Physcomitrella*-Wildtyps ist deutlich komplizierter als die des *Ceratodon*-Wildtyps, so dass nicht verwundert, dass nicht einfach "ein Phytochrom" identifiziert werden konnte, dass für "den" Phototropismus verantwortlich wäre. Gleichwohl konnte die positive phototrope Reaktion im Wesentlichen PP4 zugeordnet werden. Auch lässt sich die Vermeidungsreaktion bei höheren Fluenzraten zu grossen Teilen PP3 zuordnen.

Auf der Basis der vier *knockouts* und – zukünftiger Mehrfach-*knockouts* – lassen sich Phytochromeffekte vermutlich in naher Zukunft differenzierter betrachten und weitere Anteile der phototropen Reaktion der Caulonemata einzelnen Gen-Subfamilien zuordnen. Von besonderem Interesse wird die Untersuchung weiterer Phytochromeffekte sein, hierbei nicht zuletzt die phototrope Reaktion der Chloronemata. Die Bedeutung des Unterschieds vollkommen dunkeladaptierter Caulonemata zu dem lichtgewachsener Chloronemata zeigt sich anschaulich in Abbildung 57, wo sichtbar ist, dass die Mehrheit der während der kurzen Phase der Untersuchung gebildeten **Verzweigungen** im Gegensatz zur caulonematischen Spitzenzelle, die keinen positiven Phototropismus zeigt, wie im Wildtyp unverändert weiter zur Lichtquelle weisen. Hier sind offenbar unterschiedliche Phytochrome involviert.

Sind weitere Photorezeptoren involviert?

Nachdem in *Adiantum* mit dem **Phytochrom 3** ein ungewöhnlicher Photorezeptor identifiziert wurde, der in diesem Farn für den Phototropismus zuständig ist (Nozue *et al.* 1998), stellte sich die Frage, ob auch in Moosen ein entsprechender Photorezeptor existieren und für Phytochrom-gesteuerte Phänomene verantwortlich sein könnte. Die Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit via PCR keine Amplifikation von Abschnitten entsprechender, homologer Gene aus *Ceratodon* und *Physcomitrella* möglich war, besitzt wie alle negativen Ergebnisse lediglich den Wert eines schwachen Indiz', auch wenn die Amplifikation von NPH1-homologen Genabschnitten, die hier als positive Kontrolle aufgefasst werden kann, problemlos möglich gewesen ist. Eine Klarheit, ob weitere Photorezeptoren in den Rotlicht-abhängigen Phototropismus in *Physcomitrella* und *Ceratodon* involviert sein können, wird es erst geben, wenn die Genome durchsequenziert und/oder die EST-Projekte – soweit möglich – vollendet sind. EST-Sequenzen, die mit vermutlich zwei weiteren Phytochromgenen korrespondieren, wurden unlängst in der *GenBank*-Datenbank hinterlegt. Die Bedeutung dieser Gene und Genprodukte konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr via *targeted gene knockout* untersucht werden.

5.4 Gene Targeting in *Physcomitrella*

Gene targeting ist in *Physcomitrella* eine sehr effizient einsetzbare Technik – jedoch (in meiner Hand und bei der Arbeit mit **Phytochromgenen**) nur mit den *replacement* Konstrukten. Die für eine gesamte Versuchsdurchführung von der erstmaligen Klonierung der genspezifischen DNA bis zu erfolgreichen Isolierung eines *knockout*-Klons in einem PCR-Screening der stabil Antibiotika-resistenten Transformanten dauerte bei den zwei zuletzt ausgeschalteten Genen lediglich drei Monate. Die Arbeitsschritte sind sehr gut kompatibel mit dem gleichzeitigen Ausschalten mehrerer Gene, so dass in recht kurzer Zeit alle bekannten Mitglieder einer kleinen Genfamilie untersucht werden können; hier liegt allerdings das Problem, dass das Genom von *Physcomitrella* im Gegensatz zu dem von *Arabidopsis* (noch) nicht sequenziert wurde. Jedoch stellt die stark wachsende Zahl der (öffentlich zugänglichen) EST-Klone eine gewisse Kompensation dar. Das von Schaefer & Zryd (1997), Schaefer *et al.* (1994) und Schaefer (1994) beschriebene Phänomen, dass die Transformationseffizienzen erhöht werden, wenn in das Plasmid mit Resistenz-Cassette ein Abschnitt genomischer *Physcomitrella*-DNA eingefügt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Phytochromgenen **nicht** bestätigt werden, vielmehr zeigte sich durchweg die deutlich größere Zahl von stabilen Transformanten bei den Kontroll-Transformationen mit entsprechenden Plasmiden ohne

homologe DNA (pHP23, pGL2; 3.3.6.1 und 3.3.6.1); dieser Effekt mag der Tatsache geschuldet sein, dass in oben genannten Untersuchungen genomische *loci* verwendet wurden, die - anders als die hier untersuchten Phytochromgene - keine Proteinkodierenden Abschnitte des Genoms repräsentieren. Möglicherweise beeinflussen beim *gene targeting* die Bedeutung der Zielgene für den Organismus und/oder die Position des Gens auf dem Chromosom und die Zustandsform der DNA (Eu-/Heterochromatin; Methylierungsgrad etc.) die Leichtigkeit, mit der sie zerstört werden können.

Die Variation der Hitzeschock-Dauer zwischen 3 und 7 min. sowie die Verwendung von Protonemen aus Flüssigkulturen haben keinen messbaren Einfluss auf die Effizienzen des *gene targeting*, jedoch eine teilweise negative Auswirkung auf die Transformations-effizienz gezeigt. Die Verwendung von endotoxinfreier DNA hingegen schien die Transformationseffizienz zu erhöhen, allerdings wurden **keine direkt vergleichbaren Parallelversuche** durchgeführt, so dass über das Gesagte hinaus keine quantitativen Aussagen getroffen werden können.

Die vorläufigen Ergebnisse der ersten Versuche, Doppel-*knockout*-Linien durch Transformation von *single knockout*-Linien mit weiteren *knockout*-Konstrukten herzustellen, deuten an, dass auch die Produktion von Mehrfachmutanten möglich ist. Hier wurden potentiell positive Linien identifiziert, obschon die Transformanten nicht zur Abtrennung transient transformierter Linien wechsender Kultivierung auf selektivem und nicht-selektivem Medium unterworfen und nur wenige Transformanten via PCR untersucht wurden. Erfolgreiche Tests mit weiteren Resistenzgenen (und vorzugsweise Promotoren, und Terminationssequenzen) vorausgesetzt, sollte auf der Basis der beschriebenen Kreuzbarkeit von *Physcomitrella* (Ashton & Cove 1977) auch die Herstellung von Linien möglich sein, in denen alle Phytochromgene, die einander in *knockout*-Linien funktional ersetzen können, ausgeschaltet sind, so dass auch in Hinblick auf weitere Phytochromeffekte weitere Zuordnungen von spezifischen Genen und entsprechenden Funktionen möglich werden.

Für die in 1.4 aufgelisteten erfolgreichen Versuche anderer Arbeitsgruppen, spezifische Gene in *Physcomitrella* durch *gene targeting* auszuschalten, wurden entweder Insertions-*knockout*-Konstrukte (erstmalig von Schaefer & Zryd (1997) erfolgreich eingesetzt) oder *replacement*-Konstrukte (erstmalig von Girke *et al.* (1998) eingesetzt) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls beide Konstrukttypen getestet. Zudem wurde ein Vergleich angestellt, inwieweit im Falle der *replacement* Konstrukte das Vorhandensein von Abschnitten des Vektorrückgrats an einer Seite des *knockout*-Konstrukts Einfluss auf die *gene targeting* Effizienz hat. Gleichwohl, da hier im Vordergrund stand, spezifische *knockout*-Linien herzustellen und zu isolieren und weniger, rein methodische Untersuchungen anzustellen, sind die Zahlen der untersuchten Transformanten und damit der positiven Linien meist gering und für statistische Aussagen nur bedingt brauchbar. Trotz alledem lässt sich eindeutig festhalten: bei Verwendung von *replacement* Konstrukten scheint das Vorhandensein terminaler Plasmid-Rückgrat-Abschnitte (zumindest auf einer Seite des Konstrukts) keinen negativen Einfluss auf die Effizienz des *gene targeting* zu haben. Dies stellt einen großen Vorteil dar, da somit nach Abschluss der Klonierungsschritte zum Freisetzen des eigentlichen *knockout*-Konstrukts auf eine Restriktionsenzym-Erkennungsstelle der *multiple cloning site* des Vektor-Rückgrats zurückgegriffen werden kann.

Ein gravierender Unterschied zeigte sich demgegenüber in den Effizienzen der zwei grundsätzlichen Konstrukttypen: während mit *replacement*-Konstrukten stets mit hoher Effizienz *knockout*-Linien gefunden werden konnten, war dies mit Insertions-*knockout*-Konstrukt nur im Falle von PP1 möglich (hier fehlt der Vergleich zu *replacement* Konstrukten). Es ist im Rahmen dieser Arbeit gegen Ende nur mit den *replacement* Konstrukten ein reproduzierbarer *knockout* innerhalb weniger Monaten nach erstmaliger Klonierung der Zielgen-DNA möglich gewesen. Dies gelang im Falle von PP3 mit hoher Ausbeute, während mit einem Insertions-*knockout*-Konstrukt trotz der um eine Größenordnung höheren Zahl getesteter Transformanten kein einziger positiver (*knockout*) Klon unter den stabil transformierten (also nach mehrfachem Wechsel zwischen Antibiotika-haltigem und Antibiotika-freiem Medium uneingeschränkt resistenten) Linien gefunden werden konnte. Auch im Falle von PP2 ließen sich (relativ und absolut) nur wenige *knockouts* mit dem Insertions-*knockout*-Konstrukt und eine deutlich höhere Zahl mit *replacement* Konstrukten identifizieren. Für PP4 und PpPLC1 wurde daher ausschließlich auf *replacement* Konstrukte zurückgegriffen. Diese Konstrukte erfordern zu ihrer Herstellung ein höheres Maß an Zeit, Aufwand und Sequenzinformation, jedoch sind die Durchführung der Transformationen und die folgende Kulturpflege so arbeitsintensiv und langwierig, dass sich die anfängliche umständlichere Klonierung empfiehlt.

Gene substitution

Bei Transformationen werden bekanntlich sehr selten einzelne Kopien, sondern eher Concatemere der Fremd-DNA eingebaut. Dies trifft nicht nur auf *Physcomitrella* zu (Schaefer & Zryd 1997), sondern auch auf die Transformation höherer Pflanzen (siehe hierzu bspw.: Fu *et al.* (2000)). Dies legt nahe, dass, sofern überhaupt DNA aufgenommen wird, es sich um eine große Anzahl von Molekülen handelt. Es sollte daher auch im Fall einer Transformation mit einer Mischung verschiedener DNA-Moleküle, etwa den zwei Verdauprodukten eines Plasmids, unterstellt werden können, dass die Aufnahme der Moleküle des einen Typs einhergeht mit der Aufnahme von DNA des zweiten Typs. Wenn nach einer Transformation mit *HindIII*-verdaulichem pF57.35 (Abbildung 7) Hygromycin-resistente Klone isoliert werden könnten, sollten diese also auch die veränderte PP1-DNA, also das *gene substitution* Konstrukt, aufgenommen haben und mit gewisser Wahrscheinlichkeit eine *gene substitution* des PP1-Gens zeigen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass *gene substitution* grundsätzlich funktioniert – siehe Abbildung 43. Es war jedoch nicht möglich, das entsprechende Ergebnis via *Southern blotting* zu belegen, da nach einigen Monaten Kultur der Klon 101.8 Wildtypgleich nicht mehr verdaubare PCR-Produkte ergeben hat. Die in diesem Versuchsansatz sehr variablen Raten der Verdaubarkeit der PCR-Produkte deutet an, dass es sich um *ectopic gene targeting* (Hanin *et al.* 2001) handeln dürfte, dass also (ggf. concatemerisierte) Fremd-DNA mit Hilfe der chromosomalen DNA als Matrize partiell "vervollständigt" und via illegitimer Rekombination in das Genom integriert wird. Die Tatsache, dass *knockout*-Konstrukte dazu neigen, Concatemere zu bilden, bevor oder während sie mit der chromosomalen DNA rekombinieren, dürfte auch für die für *gene substitution* verwendete DNA gelten: tatsächlich wurde hier eine größere Zahl von *knockouts* detektiert, bspw. ist der anfänglich für physiologische Untersuchungen eingesetzte PP1-*knockout*-Klon 2.17 auf diesem Wege isoliert worden: siehe 4.5.4. Zusammenfassend lässt sich also unterstellen, dass die Concatemerisierung eine Tendenz zeigt, eine effiziente *gene substitution* zu verhindern.

5.5 Gene Targeting in *Ceratodon*

Die erstmalige Klonierung des für die Phytochrom-Chromophor Phytochromobilin notwendigen Hämoxygenasegens und der Nachweis, dass genau dieses Gen in den aphototropen Mutanten ptr116 und ptrP14 geschädigt ist (4.10.1), bedeuteten, dass für *Ceratodon* nun die Erkenntnis vorlag, wie sich ein definierter, deutlicher und leicht screenbarer Phänotyp (fast weiße, aphototrope bzw. grüne, positiv-phototrope Filamente bei Mutante bzw. Wildtyp) durch Austausch eines einzigen Nukleotids (oder Zerstörung eines einzigen Gens) des Wildtyps erreichen ließ. Und umgekehrt war offensichtlich geworden, dass die Mutante ptr116 durch Veränderung eines einzelnen Nukleotids wieder in ihrem Phänotyp dem Wildtyp angeglichen werden konnte.

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. In einem zweiten Ansatz wurde das Hämoxygenasegen CpHO1 in der Mutante ptr116 durch *gene substitution* wiederhergestellt, indem 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. Dieser Ansatz wurde mit großem Erfolg durchgeführt und belegt eindrucksvoll, dass *gene targeting* auch in *Ceratodon* ein taugliches molekularbiologisches Werkzeug ist.

Mit der Sequenzierung des Häm-Oxygenase Gens von *Ceratodon* war die Möglichkeit gegeben, *gene replacement*-Experimente durchzuführen. Das ist in der Dissertation von Gerhard Brücker (2003) erfolgreich gelungen.