

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In *Physcomitrella* konnten erfolgreich vier Phytochromgene kloniert, sequenziert und diese, sowie ein Phospholipase C Gen durch *gene targeting* zerstört werden. Hierbei konnte die Effizienz des *gene targeting* mit replacement *knockout*-Konstrukten sowie Insertions-*knockout*-Konstrukten anschaulich verglichen und die Überlegenheit der *replacement knockout*-Konstrukte belegt werden. Bei diesen zeigte sich, dass einseitige terminale Reste des Vektorrückgrats keinen störenden Einflüsse auf die Effizienz des *gene targeting* haben, so dass sich die Herstellung der Transformations-DNA erleichtern lässt. Ausgiebige Untersuchungen der phototropen Reaktion dunkeladaptierter caulonematischer Protonemata zeigten eindeutige Ergebnisse – besonders im Falle des PP4-*knockouts*, der keinen positiven Phototropismus mehr zeigt.

Ein homologes Gen für PP4 konnte auch aus *Ceratodon* erstmals kloniert werden und bietet hervorragende Möglichkeiten zur Untersuchung der Phytochromwirkung in diesem zweiten Moos-Modellsystem. Hier konnte von Gerhard Brücker (2003) gezeigt werden, dass ebenfalls mit hoher Effizienz *gene targeting* möglich ist. Hierzu wurde aus *Ceratodon* ein Gen für die Hämoxygenase kloniert und sequenziert. In zwei aphototropen *class I* Mutanten aus *Ceratodon* konnte belegt werden, dass genau dieses Gen durch eine Deletion bzw. durch eine Punktmutation geschädigt ist. Die Punktmutation ließ sich effizient durch *gene targeting* reparieren.

Bislang wurde nur ein einziger der bekannten Phytochromeffekte und ausschließlich in Einzel-*knockout*-Linien untersucht. Diese Arbeit hat gezeigt, dass Mehrfach-*knockouts* durch Re-Transformation von *knockout*-Linien mit *knockout*-Konstrukten für unterschiedliche Gene erzeugt werden können. Zukünftig sollte die Herstellung von Mehrfach-Phytochrom-*knockout*-Linien von *Physcomitrella* und *Ceratodon* den Weg zur Zuordnung individueller Phytochrome zu spezifischen Phytochromeffekten ebnen.

SUMMARY

Four phytochrome genes from *Physcomitrella* had been cloned and sequenced. These phytochrome genes and an additional phospholipase C gene were disrupted via targeted gene knockout. Insertional and replacement constructs were compared and the superiority of the latter could be shown. In case of replacement constructs it was found that remaining terminal parts of the vector at one side of the construct do *not* reduce the gene targeting efficiency. This allows more simple production of transformation DNA. In extensive phototropism studies of dark adapted caulonematic protonemata clear phenotypes were found. The most distinct phenotype could be seen in the PP4 knockout missing any positive phototropic response.

In *Ceratodon* a homolog of PP4 could be cloned. This will allow the study of phytochrome action in this different model system. In cooperation with Gerhard Brücker efficient gene targeting was demonstrated in *Ceratodon*. For this approach a heme oxygenase gene from *Ceratodon* was cloned and sequenced. In two aphototropic class I lines of *Ceratodon* a mutation of this gene was found – a deletion in ptrP14 and a point mutation in ptrI16. This point mutation could be efficiently repaired by gene targeting.

Up to now only one single phytochrome effect has been analysed and this was done only in single knockout lines. However, it could be demonstrated that double knockouts can be produced. This was done by re-transformation of knockout lines with knockout constructs for different genes. In future, the production of multiple phytochrome knockout lines by re-transformation and crossing in *Physcomitrella* and *Ceratodon* may allow to identify the phytochromes responsible for specific phytochrome effects.