

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	5
Abkürzungen	6
Inhaltsverzeichnis	8
1 Einleitung	14
1.1 Lichtwahrnehmung bei Pflanzen	14
1.2 Phytochrome	15
1.2.1 Molekulare Eigenschaften und Funktionen der Phytochromtypen	16
1.2.2 Chromophor-Biosynthese	21
1.2.3 Hämoxygenase (HO)	22
1.3 Phytochrom-gesteuerter Phototropismus in Cryptogamae	24
1.4 <i>Ceratodon purpureus</i> als Modellorganismus für den Phototropismus	25
1.4.1 Phytochrome von <i>Ceratodon purpureus</i> und <i>Physcomitrella patens</i>	26
1.4.2 Aphototrope Mutanten von <i>Ceratodon purpureus</i>	28
1.4.3 Mikroinjektion in Protonema-Spitzenzellen von <i>Ceratodon</i>	30
1.5 Reverse Genetik in Pflanzen	31
1.5.1 <i>Gene targeting</i>	33
1.5.2 Untersuchungen zur homologen Rekombination in Pflanzen	35
1.5.3 Steigerung der <i>gene targeting</i> -Effizienz in Pflanzen	35
1.5.4 <i>Gene targeting</i> in <i>Physcomitrella patens</i>	37
1.6 Ziele der Arbeit	39
1.6.1 Mikroinjektion in Protonema-Spitzenzellen von <i>Ceratodon</i>	39
1.6.2 Phototropismus in <i>Physcomitrella patens</i>	39
1.6.3 <i>Gene targeting</i> in <i>Ceratodon purpureus</i>	39
2 Material und Methoden	41

2.1	Pflanzenmaterial.....	41
2.1.1	Aufzucht.....	41
2.1.2	Polarotropismus und positiver Phototropismus bei <i>Ceratodon</i>	41
2.1.3	Dunkeladaptation von <i>Physcomitrella patens</i>	42
2.1.4	Untersuchung von Lichteffekten auf den Photo- und Polarotropismus caulonematischer Filamente von <i>Physcomitrella</i>	42
2.2	Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie.....	43
2.3	Konfokale Laser- <i>Scanning</i> Mikroskopie	43
2.4	Bakterienstämme.....	44
2.5	Hefestämme.....	44
2.6	Puffer und Lösungen	44
2.6.1	Chemikalien	44
2.6.2	Moosmedien.....	44
2.6.2.1	1b-Medium.....	44
2.6.2.2	Spurenelementlösung nach Hoagland.....	45
2.6.2.3	BCE 2.0.5-Medium	45
2.6.2.4	BCE 2.2.5	46
2.6.2.5	Medium 3	46
2.6.2.6	Medium 1 zum Dekontaminieren.....	46
2.6.3	Bakterienmedien	46
2.6.4	Hefemedium.....	47
2.6.5	Lösungen für die Phytochromextraktion aus Hefe.....	47
2.6.6	Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie.....	47
2.6.7	Bradfordlösung.....	47
2.6.8	Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese	47
2.6.9	Lösungen für die Transformation von Moosprotoplasten.....	48

2.6.10	Lösungen für die Extraktion von DNA aus <i>Ceratodon</i>	49
2.6.11	Lösungen für Agarose-Gelelektrophoresen	49
2.6.12	Lösungen für das <i>Southern Blotting</i>	50
2.7	Mikroinjektion.....	50
2.7.1	Pflanzenmaterial und Aufzucht.....	50
2.7.2	Grenzplasmolyse	51
2.7.3	Injektor	51
2.7.4	Injektionskapillaren.....	51
2.7.5	Durchmesser der Injektionskapillaren.....	51
2.7.6	Injektions-Lösungen.....	52
2.7.7	Injektion	52
2.7.8	Optimale Methode für die Injektion von Moosprotonema-Spitzenzellen.	52
2.8	Reinigung von Phycocyanobilin aus <i>Spirulina geitleri</i> durch Methanolyse.....	53
2.8.1	Extraktion von Chlorophyll.....	53
2.8.2	Methanolyse	53
2.8.3	Ausschütteln	53
2.8.4	Kristallisieren in Hexan.....	54
2.8.5	HPLC-Aufreinigung.....	54
2.8.6	Bestimmung der PCB-Konzentration	54
2.9	Expression und Affinitäts-Chromatographie von <i>Ceratodon</i> -Phytochrom CerpPhy2His in <i>Saccharomyces</i>	55
2.10	DNA-Isolierung aus <i>Ceratodon</i>	56
2.10.1	<i>Ceratodon</i> -DNA-Miniprep für PCR-Analysen von Transformanten	56
2.10.2	Extraktion von Gesamt-DNA aus <i>Ceratodon</i> für <i>Southern</i> -Analysen.....	57
2.11	Klonierung von DNA-Fragmenten	58
2.11.1	Agarosegel-Elektrophorese	58

2.11.2	Präparation von Plasmid-DNA	59
2.11.3	PCR	59
2.11.4	Klonierungen.....	60
2.11.5	Enzymatische Behandlung von DNA	60
2.11.6	Klonierungen für Expressionskonstrukte in <i>Ceratodon</i>	60
2.11.6.1	Konstruktion eines <i>Ceratodon</i> -Expressionsplasmids für Ratten-Hämoxigenase	61
2.11.6.2	Konstruktion des <i>Ceratodon</i> -Expressionsplasmids pBASHY1	62
2.11.6.3	Klonierung von <i>Ceratodon</i> -Hämoxigenase-Expressions-vektoren .	62
2.11.7	Klonierungen für die intrazelluläre Lokalisation der <i>Ceratodon</i> -Hämoxigenase	63
2.11.8	Klonierung der <i>Knockout</i> -Konstrukte	64
2.11.9	<i>Site Directed Mutagenesis</i> über PCR.....	66
2.11.9.1	Klonierung eines <i>gene replacement</i> -Konstruktes zur Transformation der aphototropen <i>Ceratodon</i> -Mutante <i>ptr116</i>	66
2.11.10	Transformation von Bakterien	67
2.11.10.1	<i>Screening</i> von <i>E. coli</i> -Kolonien	67
2.11.11	Kommerzielle Klonierungsvektoren	68
2.11.12	Verwendete Primer.....	68
2.12	Transformation von <i>Ceratodon purpureus</i>	69
2.12.1	Protoplastenisolation	69
2.12.2	Transformation mittels PEG	70
2.12.3	Regeneration der Protoplasten	70
2.12.4	Selektion homolog rekombinierter Mutanten	70
2.12.5	RNA-Extraktion aus <i>Ceratodon</i>	71
2.12.6	cDNA-Synthese und RT-PCR.....	71
2.13	<i>Southern Blot</i> -Analyse	72

2.13.1	Herstellung DIG-markierter Sonden	72
2.13.2	DIG- <i>Southern Blotting</i>	73
2.13.3	Hybridisierung.....	74
2.13.4	Detektion Digoxigenin markierter Sonden	74
3	Ergebnisse	75
3.1	Wiederherstellung aphototroper <i>Ceratodon</i> -Mutanten durch Mikroinjektion von Phycocyanobilin	75
3.2	Mikroinjektion von Hämoxygenase-Genen	79
3.2.1	Mikroinjektion von pBASHO	79
3.2.2	Mikroinjektion von pBASHY1	80
3.2.3	Mikroinjektion von <i>CpHO1</i>	81
3.3	Lokalisierung von <i>CpHO1</i>	83
3.4	Injektion von CerpuPhy2	85
3.5	Phototropismus von <i>Physcomitrella patens</i>	90
3.5.1	Dunkeladaptation von <i>Physcomitrella</i> -Caulonemata.....	90
3.5.2	Phototrope Reaktionen des <i>Physcomitrella</i> -Wildtyps	93
3.5.3	Revertierbarkeit des Phototropismus	97
3.5.4	Polarotrope Reaktionen des <i>Physcomitrella</i> -Wildtyps	98
3.5.5	Phototrope Reaktionen der Phytochrom- <i>knockout</i> -Linien aus <i>Physcomitrella</i>	99
3.6	<i>Gene targeting</i> in <i>Ceratodon purpureus</i>	107
3.6.1	Versuche, das Gen <i>CpHO1</i> in <i>Ceratodon wt4</i> durch homologe Rekombination auszuschalten	107
3.6.1.1	Protoplastenregeneration und Selektion putativer <i>knockouts</i>	107
3.6.1.2	Phänotypische Analyse	108
3.6.1.3	PCR-Analyse.....	110
3.6.2	<i>Gene replacement</i> in <i>Ceratodon ptr116</i>	112

3.6.2.1	Phänotypische Analyse	113
3.6.2.2	PCR-Analyse.....	115
3.6.2.3	Sequenzanalyse	117
3.6.2.4	<i>Southern Blot</i> -Analyse	118
4	Diskussion	121
4.1	Wiederherstellung aphototroper Mutanten über Mikroinjektion	121
4.1.1	Mikroinjektion von PCB	121
4.1.2	Mikroinjektion von Hämoxygenase-Genen	123
4.1.3	Mikroinjektion von CerpuPhy2His	125
4.2	Phototropismus und Polarotropismus von <i>Physcomitrella patens</i> : Antworten des Wildtyps.....	126
4.3	Phototropismus von <i>Physcomitrella</i> -Phytochrom <i>knockout</i> -Linien	129
4.4	<i>Gene targeting</i> in <i>Ceratodon purpureus</i>	131
4.4.1	<i>Knockout</i> von <i>CpHO1</i>	131
4.4.2	<i>Gene replacement</i> in <i>Ceratodon</i>	133
5	Zusammenfassung	136
	Summary	138
6	Literaturverzeichnis.....	140
7	Anhang: Sequenzierung der <i>gene replacement</i> -Mutanten	155
7.1	<i>CpHO1</i> von G23#G4.....	155
7.2	<i>CpHO1</i> von G23#C1	156
8	Publikationen.....	157
8.1	Konferenzbeiträge während der Promotion:	158
9	Curriculum vitae.....	159