

# 1 EINLEITUNG

Pflanzen werden von vielen biotischen und abiotischen Signalen aus ihrer physischen Umgebung erreicht. Als Konsequenz bildete sich im Lauf der Evolution ein hoch entwickeltes System aus Rezeptoren und Signal-Transduktionswegen, die entsprechende Antworten erzeugen (Briggs and Olney, 2001). Die Reaktion auf Lichtsignale spielt dabei in der pflanzlichen Entwicklung eine herausragende Rolle. Für die sessilen Organismen ist die Perzeption von Licht aus ihrer Umgebung so wichtig wie das Sehen für Tiere (Smith, 2000). Schwankungen in der Quantität und Qualität dieses essentiellen Umweltfaktors können entscheidend sein für die Konkurrenz und das Überleben der Pflanze. Als photosynthetisch aktive Organismen benötigen sie Licht, welches ihnen die Energie für die Umwandlung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O in Zucker ermöglicht. Entsprechend ist die pflanzliche Entwicklung von der Sporen- (Wada and Sugai, 1994; Scheuerlein and Haas, 1995) und Samenkeimung (Albrecht and Deng, 1996) über die Blühinduktion (Vince-Prue, 1983) bis zur Seneszenz (Thomas and Stoddart, 1980) lichtkontrolliert. Die Entwicklungs-Homöostasis findet ihren Niederschlag auf allen Ebenen der Zellphysiologie: In Änderungen im Metabolismus (Mancinelli, 1982; Kasemir, 1983), von Membran assoziierten Ionenströmen (Kendrick and Bossen, 1987; Neuhaus *et al.*, 1993) und in der Regulation der Genexpression (Batschauer *et al.*, 1994). Diese lichtregulierten Prozesse ermöglichen den Pflanzen eine optimale Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen. Um sich kontinuierlich auf die Fluktuationen des Lichts einzustellen, entwickelten diese sessilen Organismen ein hochsensibles Wahrnehmungssystem über sensorische Photorezeptoren.

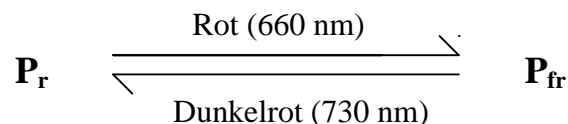
## 1.1 Lichtwahrnehmung bei Pflanzen

Aktionsspektroskopie lieferte Hinweise auf drei Photorezeptoren, die im ultravioletten, blauen und rot/dunkelroten Spektralbereich arbeiten (Kendrick and Kronenberg, 1994). Diese überwachen die An- oder Abwesenheit von Licht, dessen spektrale Qualität, die Richtung und tägliche Dauer des vorherrschenden Lichts sowie dessen Fluenzrate, also die Lichtquantität. Angemessenes Wachstum und Entwicklung der Pflanze kann daher so moduliert werden, dass diese eine optimale Energieausbeute erzielt, um Überleben und Reproduktion zu gewährleisten (Kendrick and Kronenberg, 1994). Dieser Photomorphogenese genannte Prozess wird mit Hilfe der oben erwähnten Photorezeptoren gesteuert. Mittlerweile sind zwei Gruppen von Blaulichtrezeptoren bekannt, aber noch kein UV-Lichtrezeptor. Diese sind die kleine Familie der Cryptochrome (Cashmore *et al.*, 1999) und Phototropine (Briggs *et al.*, 2001). Den rot/dunkelroten Spektralbereich des Lichts kontrollieren die Phytochrome (Neff *et al.*, 2000; Smith, 2000; Quail, 2002). In den letzten Jahren wurden beträchtliche Fortschritte sowohl in der Aufklärung der Rolle der individuellen Photorezeptoren in der Pflanze als auch in der molekularen und zellulären Grundlage der Lichtsignal-Perzeption und -Transduktion gemacht (Deng and Quail, 1999; Fankhauser, 2001; Chory and Wu, 2001). Die bisher am besten charakterisierte

Gruppe von Photorezeptoren sind die rot/dunkelrot absorbierenden Phytochrome (Neff *et al.*, 2000).

## 1.2 Phytochrome

Phytochrom wurde von Butler (Butler *et al.*, 1959) als der Photorezeptor identifiziert, der die von Borthwick und auch anderen beschriebenen rot-/ dunkelrot-reversiblen Reaktionen der Samenkeimung (Borthwick *et al.*, 1952b) und Blütenbildung (Borthwick *et al.*, 1952a) steuert. Ein mit spannenden Anekdoten gewürzter Abriss der Geschichte der Phytochrom-Forschung findet sich bei Sage (1992). Biologisch aktives Phytochrom existiert in zwei thermodynamisch stabilen Konformationen: Es wird in der biologisch inaktiven Rotlicht absorbierenden Form ( $P_r$ ) synthetisiert, die ein Absorptionsmaximum um 660 nm aufweist. Diese wird durch Absorption von Rotlicht in die biologisch aktive, Dunkelrotlicht absorbierende Form ( $P_{fr}$ ), mit einem Absorptionsmaximum von 730 nm konvertiert.



Wenn genügend lang bestrahlt wird, stellt sich ein photostationäres Gleichgewicht zwischen der  $P_r$ - und der  $P_{fr}$ -Form ein, welches abhängig von der spektralen Zusammensetzung des eingestrahlten Lichtes ist. Bei einer Wellenlänge des Lichtes von 660 nm liegen beim Hafer etwa 80 % des Gesamtphytochroms in der  $P_{fr}$ -Form vor, bei einer Wellenlänge von 730 nm weniger als 1 %. In der  $P_{fr}$ -Form wird Phytochrom A (phyA), das bisher nur in Angiospermen gefunden wurde und die Hauptmasse des Phytochrompools in dunkeladaptierten Zellen ausmacht, über den Ubiquitin-Weg proteolytisch schnell abgebaut (Shanklin J. *et al.*, 1987). Eine Regulation von phyA findet auch auf transkriptioneller Ebene statt. Für die übrigen Phytochrome wird eine lichtunabhängige Regulation postuliert (Quail, 1994). Das variable  $P_r/P_{fr}$ -Verhältnis ermöglicht es der Pflanze in jeder lichtzugänglichen Zelle auf die Menge an Photonen der korrespondierenden Wellenlänge zu reagieren und adäquat über entsprechendes Verschieben des  $P_r/P_{fr}$ -Gleichgewichts auf Veränderungen in der Zusammensetzung des Lichts zu reagieren.

Phytochromabhängige Reaktionen werden in die *very low fluence*-Reaktion (VLFR), die bei einer Rotlicht-Fluenz zwischen 0,1 und 100 nmol m<sup>-2</sup> stattfindet, in die *low fluence*-rot-/ dunkelrot-reversible Reaktion (LFR) (Mandoli and Briggs, 1981), die bei einer Rotlicht-Fluenz im Bereich von 1 bis 1000 μmol m<sup>-2</sup> gesättigt ist und die *high irradiance*-Reaktion (HIR) unterteilt (Smith, 1995). In Untersuchungen mit *phyA*- und *phyB*-Minus-Mutanten wurde ermittelt, dass die VLFR und die HIR phyA vermittelt sind (Shinomura *et al.*, 1996) s.u.). Bei der HIR-Reaktion wird phyA auch über kontinuierliches dunkelrotes Licht aktiviert. Dieses widersprüchliche Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass dieses Licht in der Lage ist, eine kleine Fraktion an  $P_{fr}$  zu bilden und über einen längeren Zeitraum in der Pflanze zu stabilisieren (Mancinelli, 1994).

Die Möglichkeit, eine Induktion durch Dunkelrot zu revertieren, geht in den meisten etiolierten Geweben schnell verloren, bleibt in grünen Geweben jedoch für längere Zeit erhalten. Dieser Befund war ein erster Hinweis darauf, dass Pflanzen zwei physiologisch unterscheidbare Pools an  $P_{fr}$  enthalten (Furuya, 1993): einen relativ großen, labilen Pool, der sehr schnell nach seiner Lichtkonversion zu  $P_{fr}$  verschwindet und einen quantitativ wesentlich kleineren stabilen Pool, der sich nicht weiter verringern lässt (Brockmann and Schäfer, 1982). Spektralphotometrische Ergebnisse zeigten zum einen, dass etiolierte Gewebe  $P_{fr}$  in labiler Form enthielten und grüne Gewebe in stabiler Form (Jabben and Holmes, 1983) und weiterhin, dass sowohl etiolierte als auch deetiolierte Gewebe unterschiedliche Phytochrom-Apoproteine enthalten (Abe *et al.*, 1989).

Der Beweis für die Anwesenheit verschiedener Phytochrome innerhalb einer Pflanzenspezies wurde mit der Klonierung und vollständigen Sequenzierung von inzwischen fünf verschiedenen Phytochrom-Genen von *Arabidopsis thaliana* geliefert: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC* (Sharrock and Quail, 1989) und *PHYD* und *PHYE* (Clack *et al.*, 1994). Bisher wurden sowohl cDNA als auch genomische DNA von Phytochrom-Genen aus verschiedenen Samenpflanzen (Pratt, 1995), Algen (Lagarias *et al.*, 1995), Moosen (Thümmler *et al.*, 1992; Kolukisaoglu *et al.*, 1993), (Hughes *et al.*, 1996) dem Moosfarn *Selaginella* (Hanelt *et al.*, 1992) und Farnen (Okamoto *et al.*, 1993; Nozue *et al.*, 1998) kloniert und sequenziert. Die bereits über Immunoblots ermittelte Evidenz, dass Phytochrome in niederen Pflanzen vorkommen (Rüdiger *et al.*, 1991), wurde somit durch die Sequenzierung der Gene bestätigt. Interessanterweise wurde eine phytochromhomologe Sequenz in der Proteindatenbank bei dem Cyanobakterium *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1995) identifiziert und als erstes prokaryontisches Phytochrom Cph1 charakterisiert (Hughes *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 1997b). Mittlerweile werden auch in nicht-photosynthetisch aktiven Prokaryonten, bspw. in *Deinococcus radiodurans* DrBphP (Davis *et al.*, 1999b) oder *Agrobacterium tumefaciens* Agp1 und Agp2 (Lamparter *et al.*, 2002), Phytochrome gefunden.

### 1.2.1 Molekulare Eigenschaften und Funktionen der Phytochromtypen

Pflanzliche Phytochrom-Gene codieren für Polypeptide von etwa 1100 AS. Sie besitzen ein relatives Molekulargewicht  $M_r$  von 123-129 kDa. Das Protein baut einen Bilin-Chromophor autokatalytisch ein, so dass Phytochrome in der Pflanze immer als Chromoproteine vorkommen. Diese bilden lösliche Dimere. Zwei Hauptdomänen lassen sich in den Monomeren unterscheiden: N-terminal die photosensorische Domäne, an die kovalent das Tetrapyrrol Phytochromobilin (PÖB) als Chromophor gebunden ist und C-terminal die für die Dimerisation zuständige Domäne.

Untersuchungen an Phytochrom-Mutanten, vor allem des pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis*, der Gene *PHYA*, *B*, *D* und *E*, und auch einigen durch Kreuzung generierten Mehrfachmutanten sowie transgenen Pflanzen, die individuelle Phytochrom-Gene überexprimieren zeigten, dass die jeweiligen Proteine sowohl unterschiedliche, als auch überlappende photosensorische und/oder physiologische und ökologische Funktio-

nen in der Kontrolle der pflanzlichen Antwort ausüben (Whitelam and Devlin, 1997; Quail, 1998; Smith, 2000). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass phyB in allen Stadien des Lebenszyklus eine Rolle spielt, während phyA, phyD und phyE wichtige Funktionen in ausgewählten Phasen beeinflussen. Eine *phyC*-Mutante, herrührend von einer 14 kb großen *PHYC* einschließenden Deletion, wurde durch Überexpression von phyC nicht verändert (Halliday *et al.*, 1997). Eine spezifische Funktion kann phyC daher noch nicht zugeschrieben werden.

Eines der besten Beispiele, in der verschiedene Mitglieder der Phytochrom-Familie abweichende Parameter des umgebenden Lichts überwachen aber die gleiche essentielle physiologische Antwort kontrollieren, stellt die bereits oben erwähnte lichtinduzierte Samenkeimung dar (Shinomura *et al.*, 1996). Unmittelbar nach der Quellung ruhender *Arabidopsis*-Samen wird die lichtreversible Samenkeimung von phyB allein induziert. Weder phyA, phyC, phyD oder phyE sind in der P<sub>r</sub>-Form in der Lage, die Keimung auszulösen. Werden die Samen jedoch für 48 h im Dunkeln gewässert, keimen Wildtyp Pflanzen unter signifikant niedrigerer Photonenfluenz, während Samen von *phyA*-Mutanten bei gleicher Fluenz nicht keimen. Daraus kann geschlossen werden, dass phyA für die VLFR verantwortlich ist. PhyB ist in diesem System nicht in die phyA-Aktion involviert und umgekehrt. Die phyA induzierte Keimung mit Licht sehr niedriger Fluenz war in diesen Analysen nicht photoreversibel. In diesem Versuch wurden zum ersten Mal die Aktionspektren für die phyA- und phyB-spezifische Induktion der Samenkeimung separat dadurch bestimmt, dass sowohl der Wildtyp als auch *phyA*- und *phyB*-Minus-Mutanten von *Arabidopsis* untersucht wurden. Das aus diesen Analysen erhaltene phyA-Aktionsspektrum stimmt ziemlich gut mit dem Absorptionsspektrum von gereinigtem phyA in der P<sub>r</sub>-Form überein. Diese Beobachtung zeigt, dass die Lichtabsorption von phyA in der P<sub>r</sub>-Form die ursprünglichste Antwort des phyA ist. Im Gegensatz dazu war die phyB induzierte Keimung photoreversibel. Das Aktionsspektrum der phyB-Antwort ist ähnlich dem rot/dunkelrot reversiblen Effekt der Salatsamen-Keimung, den Borthwick 1952 beschrieben hat (Borthwick *et al.*, 1952b).

Auch andere Untersuchungen mit *Arabidopsis*-Mutanten zeigten, dass phyB für die LFR vermittelte Photomorphogenese verantwortlich ist (Botto *et al.*, 1995). Es wurde aber gezeigt, dass verschiedene Mitglieder der Phytochrom-Familie auf gleiche Lichtsignale reagieren, aber verschiedene physiologischen Antworten regulieren. Zum Beispiel übt phyB eine überwiegende Kontrolle auf die Entwicklung des Keimlings aus, während die Funktion von phyE die Regulation der Länge der Internodien und der Blühdauer in *Arabidopsis* zu sein scheint (Devlin *et al.*, 1998). Aus diesen und weiteren Beispielen kann geschlossen werden, dass differentielle Regulation der verschiedenen Phytochrome ein generelles Merkmal von Pflanzen ist.

*Microarray*-Experimente mit *Arabidopsis*-Keimlingen von Wildtyp und *phyA*-Mutanten zeigten, dass die Expression zahlreiche Gene durch kontinuierlicher Dunkelrot-Bestrahlung induziert wird (Tepperman *et al.*, 2001). Vor allem Transkriptionsfaktoren werden nach Lichtperzeption differentiell exprimiert, und das mit einer Verzögerung von

1 h nach Lichtreizung. Diese Untersuchungen lieferten einen experimentellen Hinweis darauf, dass phyA-Lichtsignale die Aktivierung von *Master-Switches* bewirken, die wiederum für die Aktivierung weiterer Gene verantwortlich sind. Aktiviert können Transkripte einer Vielzahl von Zielgenen, involviert in diverse Zweige phyA-vermittelter Signaltransduktion, differentiell gebildet werden.

In den letzten Jahren wurden einige Proteine, die direkt mit Phytochromen interagieren, als primäre Signalpartner über *Yeast-Two-Hybrid-Screens* isoliert (Quail, 2002). Eines der identifizierten Proteine ist der *Phytochrome-Interacting-Factor 3* PIF3; (Ni *et al.*, 1998), zugehörig zur Familie der *basic Helix-Loop-Helix* Transkriptions-Regulatoren. Sowohl phyA als auch phyB binden PIF3 in der biologisch aktiven P<sub>fr</sub>-Form (Zhu *et al.*, 2000). PIF3 ist ausschließlich im Nukleus lokalisiert und bindet sequenzspezifisch über ein G-Box-Motiv an DNA. G-Box-Motive wurden in vielen lichtregulierten Promotoren gefunden. Darüber hinaus kann phyB spezifisch und photoreversibel an bereits DNA-assoziiertes PIF3 binden. Es wurden bereits einige wichtige phyB induzierte lichtregulierte Gene isoliert, für deren Expression PIF3 zuständig ist. Z.B. die Gene für das *Circadian Clock-Associated-Protein 1* CCA1 und *Late Elongated Hypocotyl LHY* (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). Die Promotoren beider Gene enthalten das G-Box-Motiv. CCA1 und LHY wiederum codieren für die der MYB-Klasse zugehörigen Transkriptionsfaktoren, deren Eigenschaft bezüglich der Regulation des Chlorophyll A/B bindenden Proteins CAB bzw. Komponenten der circadianen Uhr gut dokumentiert ist (Wang *et al.*, 1997; Wang and Tobin, 1998). Aus diesen und weiteren Ergebnissen wurde geschlossen, dass PIF3 den zentralen Kontrollpunkt repräsentiert, über den das Phytochromsystem sowohl den wichtigsten Bereich der Photomorphogenese als auch des circadianen Oszillators reguliert (Quail, 2002).

Vorraussetzung für die beschriebene direkte Interaktion von Phytochromen mit PIF3 ist die Translokalisierung von Phytochromen in den Nukleus. Forschungsergebnisse der letzten Jahre ergaben eine zwingende Evidenz für den lichtinduzierten Kerntransport von Phytochrom-Molekülen in der P<sub>fr</sub>-Form. Mit Hilfe von  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)- bzw. *Green Fluorescent Protein* (GFP)-Phytochrom-Fusionsproteinen sowie immunocytologischer Lokalisation wurde gezeigt, dass Phytochrome in der inaktiven P<sub>r</sub>-Form cytoplasmatisch lokalisiert sind, aber durch Photokonversion in die aktive P<sub>fr</sub>-Form zur Translokalisierung in den Kern induziert werden (Sakamoto and Nagatani, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1999; Kircher *et al.*, 1999; Hisada *et al.*, 2000). Da alle Phytochrome höherer Pflanzen lichtinduziert in den Kern importiert werden (Nagy and Schäfer, 2000) und phyA-GFP- und phyB-GFP-Fusionsproteine in der Lage sind *phyA*- bzw. *phyB*-Mutanten von *Arabidopsis* zu komplementieren, wird bereits diskutiert, dass es sich bei den hier beobachteten zellulären Aktivitäten um einen allgemeinen Mechanismus dieser Photorezeptoren handelt (Quail, 2002). Über die immer wieder beobachteten *speckles* (Flecken) (Kircher *et al.*, 1999), die die phy-GFP-Fusionsproteine im Nukleus bilden, wird spekuliert, dass diese multimolekulare 'Transkriptosom'-Komplexe repräsentieren, die in die

phy-regulierte Genexpression an spezifische Orten im Genom, die mehrere lichtregulierte Gene enthalten, involviert sind (Tepperman *et al.*, 2001).

Phytochrome sind aber auch lösliche, cytoplasmatisch lokalisierte Proteine, und es wurde aufgrund vielversprechender Ergebnisse (Neuhaus *et al.*, 1993) vorgeschlagen, dass sie über die Aktivierung von *second messengern* durch G-Proteine Signale zu nukleären Genen übertragen (Millar *et al.*, 1994) können. (Bowler *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1997) Die ersten Hinweise auf die Verwicklung von G-Proteinen in die Rotlichtreaktion ergaben Untersuchungen an Protoplasten von Weizenblättern (Bossen *et al.*, 1990). Besonders Mikroinjektions-Experimente bestätigten die Theorie, dass G-Proteine in den Signaltransduktionsweg von Phytochromen involviert sind. Der *aurea*-Mutante der Tomate fehlt intaktes phyA (Sharma *et al.*, 1993). In einzelne Hypokotylzellen von Keimlingen der *aurea*-Mutante wurde gereinigtes Haferphytochrom injiziert und diese dann mit Rotlicht bestrahlt (Neuhaus *et al.*, 1993). In den injizierten Zellen wurden drei lichtregulierte Antworten induziert: Chloroplastenentwicklung, Anthocyaninproduktion und ein GUS-Reportergen ligiert mit einem Weizen-CAB-Promotor wurde aktiviert. Da diese Phänomene lediglich in den injizierten Zellen beobachtet wurden, weisen diese Experimente darauf hin, dass die phytochromvermittelte Antwort ein zellautonomes Ereignis darstellt. Zellen, denen GTP- $\gamma$ -S (ein nichtlösliches GTP-Analog und außerdem ein Aktivator von G-Proteinen) oder Cholera toxin (eine Verbindung, die ADP ribosyliert und heterotrimere G-Proteine aktiviert) injiziert wurde, zeigten die gleichen Antworten. Im Gegensatz dazu waren Zellen, denen gereinigtes phyA und GDP- $\beta$ -S (ein GDP-Analog, welches G-Proteine inhibiert) injiziert wurde und die darauf folgend mit Rotlicht bestrahlt wurden, nicht in der Lage, adäquat auf den Lichtreiz zu antworten. Mikroinjektionen von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin, einem calciumbindenden Protein, welches die Aktivität zahlreicher Proteine einschließlich der von Kinasen (Roberts *et al.*, 1986) reguliert, veranlasste die Expression rotlichtinduzierbarer Gene. Neuere Forschungsergebnisse lieferten ebenfalls Hinweise auf die Beteiligung von G-Proteinen an lichtinduzierten Reaktionen. So zeigten transgene *Arabidopsis*-Keimlinge, die die  $\alpha$ -Untereinheit heterotrimärer G-Proteine überexprimieren, hypersensitive Antworten auf Lichtstimuli (Okamoto *et al.*, 2001). Weiterhin wurde in *Arabidopsis* das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein SUB1 identifiziert (Guo *et al.*, 2001). Genetische Analyse mit *sub1*-Mutanten deuten an, dass dieses Protein eine Komponente im Cryptochrom-Signaltransduktionsweg darstellt und die Rolle eines Modulators im Phytochrom-Signalweg spielt. Die lichtabhängige Akkumulation des Transkriptionsfaktors HY5 wird von SUB1 unterdrückt.

Einen weiteren wesentlichen Einfluss auf das heute vorherrschende Konzept der molekularen, zellulären und biochemischen Mechanismen, über die die phy-Familie informative Lichtsignale induziert, übte die Entdeckung phy-assoziiierter Proteinkinase-Aktivität aus. Die zentrale Frage der biochemischen Transaktion eines Signaltransfers von lichtaktivierten phy-Molekülen auf seine primären Signalakzeptoren beschäftigt Forscher in diesem Arbeitsgebiet seit vielen Jahren (Quail, 2000). Mehrere Studien untersuchten die Möglichkeit, ob Phytochrome als lichtregulierte Proteinkinasen über

Transphosphorylierung eines oder mehrere interagierende Partner den Mechanismus des Signaltransfers bewerkstelligen (Fankhauser, 2000). Mit der Entdeckung des bakteriellen Phytochroms Cph1 (Hughes *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 1997b) konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Phytochrom um eine lichtregulierte Histidinkinase handelt, die sowohl zur Autophosphorylierung an einem Histidin als auch zur Transphosphorylierung eines Aspartatrestes seines Response-Regulators Rcp1 (Yeh *et al.*, 1997) in der Lage ist. In einer darauf folgenden Arbeit wurde auch gezeigt, dass rekombinantes Phytochrom der Grünalge *Mesotaenium caldariorum* bzw. phyA von Hafer autophosphoryliert werden (Yeh and Lagarias, 1998). Damit wurden erstmals Hinweise, die eine Sequenzähnlichkeit zwischen Phytochromen und Sensor-Histidinkinasen bakterieller Zweikomponenten-Systeme ergaben (Schneider-Poetsch, 1992), bekräftigt.

In den letzten Jahren wurde, basierend auf *Yeast-Two-Hybrid-Screens*, das Protein Phytochromkinase-Substrat 1 PKS1 gefunden, das *in vitro* von phyA phosphoryliert wird (Fankhauser *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten von PKS1 wird um das über zweifache nach Photokonversion von phyA in die aktive Form verstärkt. PKS1 ist ein konstitutiv cytoplasmatisch lokalisiertes Protein. Interessanterweise wurden auch Transphosphorylierungen zwischen verschiedenen Photorezeptoren gefunden. Die Blaulichtrezeptoren Cryptochrom 1 und 2 (cry1 und cry2) interagieren *in vitro* mit phyA und stellen dessen Substrat dar (Ahmad *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von cry2 ist darüber hinaus *in vivo* rotlichtstimuliert.

Eine weitere Komponente im phy-Signalpfad ist die Nukleosid-Diphosphat-Kinase 2 NDPK2 (Choi *et al.*, 1999) aus *Arabidopsis*. NDPK2 interagiert bevorzugt mit der C-terminalen Domäne von Hafer phyA in der P<sub>fr</sub>-Form. Die P<sub>fr</sub>-Form erhöhte die enzymatische Aktivität von NDPK2 um etwa 70 % während die P<sub>r</sub>-Form keinen Einfluss auf die NDPK2-Aktivität ausübte. Für NDPK2 wurde eine Lokalisation sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus gefunden.

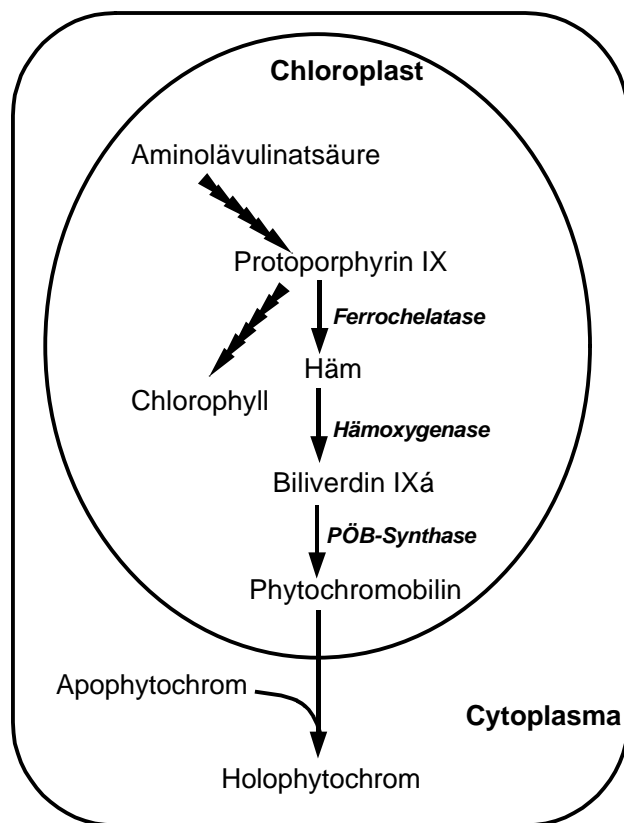
Wie die mit phy-Molekülen assoziierte Serin-Threonin-Kinase-Aktivität in die Signaltransduktion involviert ist, konnte noch nicht geklärt werden. Auch existiert keine Untersuchung zur Kinase-Aktivität von phyB. Diskutiert wird ein bisher unbekannter cytoplasmatischer Signalweg, bei dem die phy-Substrate eine Art cytoplasmatische Rückhaltefunktion für Phytochrome ausüben (Fankhauser, 2000). Eine Beobachtung, die in diese Richtung zielt, ist die Kern-Translokation von P<sub>fr</sub>B. Die lichtinduzierte Konversion von P<sub>r</sub> zu P<sub>fr</sub> ist sehr schnell, aktiviertes phyB akkumuliert jedoch erst nach einigen Stunden im Kern und ist somit als P<sub>fr</sub>B zuerst präsent im Cytoplasma und eventuell dort in Aktion (Fankhauser, 2000).

In der Tat sind einige Phytochrom-Antworten bekannt, die nicht über veränderte Genexpression erklärt werden können. Dazu gehört die Depolarisation der Membran (Cosgrove, 1994) oder Veränderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit des Hypokotyls (Parks and Spalding, 1999). Weiter unten wird im Detail der beeindruckende Phototropismus von *Ceratodon*-Protonemen beschrieben, der nicht wie der Phototropismus höherer Pflanzen durch einen Blaulichtrezeptor vermittelt ist, sondern durch Phytochrom. Ers-

te Reaktionen sind in diesem Modellorganismus für phototrope Studien bereits nach 5 min seitlicher Bestrahlung mit Rotlicht, im Anschwellen der Apex von Protonema-Spitzenzellen, zu erkennen (Hartmann *et al.*, 1983). Eine ausschließliche Aktion der Phytochrome im Kern ist aufgrund der oben genannten Ergebnisse unwahrscheinlich. Denkbar ist eine phytochromvermittelte Phosphorylierung, die sehr schnell induzierte Phytochrom-Antworten vermittelt und eine über Genregulation induzierte Antwort, die auf langfristige Veränderungen hinzielt.

## 1.2.2 Chromophor-Biosynthese

Zwei Synthesewege sind in die Bildung von Holophytochrom involviert: Einer für das Apoprotein und ein Zweiter für den Phytochrom-Chromophor Phytochromobilin (PÖB) (Terry *et al.*, 1993). Apophytochrom wird im Cytosol synthetisiert während die komplette PÖB-Synthese in den Chloroplasten stattfindet. Von dort diffundiert das PÖB ins Cytosol, wo die Assemblierung zum Holophytochrom erfolgt (s. Abbildung 1). Basierend auf spektroskopischen Untersuchungen mit gereinigten Phytochromen und *in vitro* Assemblierungs-Studien mit Bilinen und rekombinantem Apophytochrom, scheint PÖB der



einzigste Phytochrom-Chromophor aller höheren Pflanzen (Terry, 1997) und Moose (Zeidler *et al.*, 1998) zu sein. PÖB wird ausgehend von Aminolävulinat synthetisiert und hat bis zum Protoporphyrin einen gemeinsamen Stoffwechselweg mit Chlorophyll (s. Abbildung 1). Untersuchungen mit Haferkeimlingen wiesen daraufhin, dass Biliverdin IXá (BV) eine Vorstufe zu PÖB ist (Elich *et al.*, 1989), woraus gefolgert wurde, dass Häm ein Intermediat im Phytochrom-Chromophor-Biosynthesepfad darstellt. Die Katalyse von Häm zu BV wird durch eine ferredoxinabhängige Hämoxygenase (HO), die 1999 als erste pflanzliche HO in *Arabidopsis* identifiziert wurde, bewerkstelligt (Muramoto *et al.*, 1999).

Abbildung 1: Phytochrom-Biosynthese in *Arabidopsis* (nach: Kohchi *et al.*, 2001).

In Pflanzen wird das BV von der PÖB-Synthase zu 3Z-PÖB reduziert. Dieses ebenfalls ferredoxinabhängige Enzym wurde kürzlich über kartenbasierte Klonierung als *HY2*-



*Locus* in *Arabidopsis* identifiziert (Kohchi *et al.*, 2001). *HY2* kodiert für ein lösliches Protein mit einer  $M_r$  von 38 kDa und ist in den Chloroplasten lokalisiert. Ferredoxinabhängige Bilinreduktasen sind auch in Cyanobakterien und Rotalgen präsent, in denen sie die Konversion von BV zu Phycobilinen katalysieren (Beale, 1993) und können in 5 Klassen unterteilt werden (Frankenberg *et al.*, 2001). Obwohl 3Z-PÖB als funktionaler Phytochrom-Chromophor dienen kann, ist in Pflanzen eine Isomerisierung zu 3E-PÖB vor der Assemblierung wahrscheinlich (Terry *et al.*, 1995).

### 1.2.3 Hämoxigenase (HO)

Ursprünglich wurde HO als das Schlüsselenzym der Hämdegradation wegen seiner Rolle bei der Bilirubin-Produktion in der Rattenleber identifiziert (Tenhunen *et al.*, 1968). Es ist bis heute als einziges Enzym bekannt, welches die Hämdegradation katalysieren kann. Wie in Abbildung 2 gezeigt, oxidiert HO Häm an der  $\alpha$ -meso-Position, um letztendlich BV IX $\alpha$ ,  $Fe^{2+}$  und CO zu bilden. Für diese Reaktion wird molekularer Sauerstoff und Elektronen von NADPH benötigt. Der Mechanismus dieser Reaktion führt über die relativ stabilen Intermediate  $\alpha$ -meso-Hydroxyhäm und Verdohäm und wird detailliert in (Ortiz de Montellano, 2000) beschrieben.

Obwohl das gemeinsame Merkmal aller HOs die Degradation von Häm ist, spielt dieses Enzym in der Natur eine Vielzahl von Rollen. In Säugern wird BV IX $\alpha$  über die BV-Reduktase zu Bilirubin reduziert, welches vor dem Ausscheiden zu Glucuronsäure konjugiert wird (Ortiz de Montellano and Wilks, 2000). Die Ausscheidung muss jedoch nicht die einzige Möglichkeit sein. Sowohl für BV IX $\alpha$  als auch für Bilirubin wurde eine stark antioxidative Wirkung *in vitro* gezeigt (Stocker *et al.*, 1987), so dass über eine Schutzfunktion von HO bei Gewebeerletzungen spekuliert wird (Platt and Nath, 1998). Die Freisetzung von Eisen und die folgende Induktion eisenchelatierender Proteine wie Ferritin wurde ebenfalls als Funktion von HO, oxidativem Stress in Säugerzellen entgegenzuwirken, vorgeschlagen (Vile *et al.*, 1994). Starke Expression von HO im Nervensystem von Säugern und die Entdeckung physiologischer Antworten auf CO führten zu der Überlegung, dass HO spezifisch die Freisetzung von CO in neuronalen Zellen vermittelt, um dort Signale auszulösen (Maines, 1997). In Reptilien, Fischen, Insekten und der Schale von Vogeleiern dient BV IX $\alpha$  direkt der Pigmentation und fungiert dort sogar als Signalmolekül bei der dorsalen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* (Falchuk *et al.*, 2002). In Cyanobakterien und Rotalgen ist BV IX $\alpha$  eine Vorstufe der Chromophore Phycocyanobilin (PCB) und Phycoerythrobilin (PEB) für die Phycobiliproteine Phycocyanin und Phycoerythrin, die als akzessorische Antennenpigmente des Photosystem II dienen. Ein weiteres Beispiel für die Rolle von HO im Eisenmetabolismus ist von der Rotalge *Rhodella violacea* bekannt, in der Eisenmangel die Transkription des HO-Gens aktiviert (Richaud and Zabulon, 1997). In Pflanzen wird BV IX $\alpha$  zum Phytochrom-Chromophor PÖB reduziert.

Die erste direkte Evidenz für HO in photosynthetisch aktiven Organismen kam von Fütterungsexperimenten mit der Rotalge *Cyanidium caldarium* (Troxler *et al.*, 1979). In

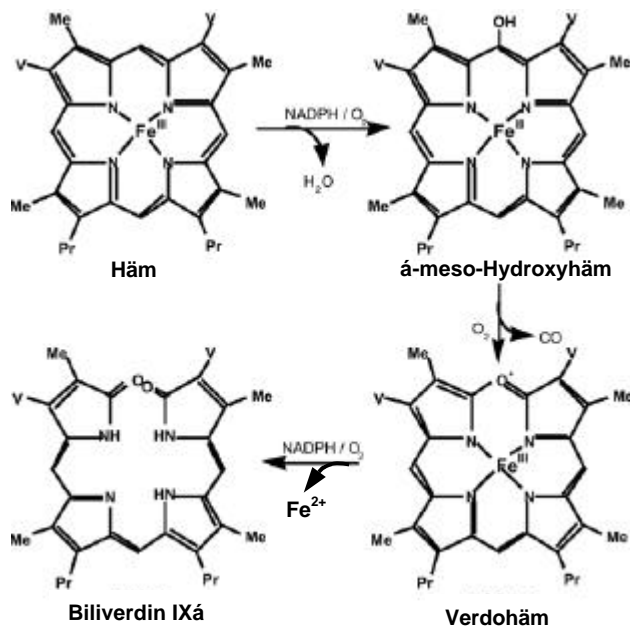


Abbildung 2: Reaktionsintermediate der Hämoxygenase katalysierten Konversion von Häm zu Biliverdin und CO nach (Ortiz de Montellano, 2000).

diesen Experimenten wurde gezeigt, dass der Phycobiliprotein-Chromophor PCB in einer Weise aus Häm synthetisiert wurde, die identisch zu der in Säugern ist. Das System wurde daraufhin für die erste partielle Aufreinigung einer HO aus Algen genutzt (Cornejo and Beale, 1988).

Die Ähnlichkeit von PÖB zum PCB und der Nachweis, dass BV IXá die Vorstufe von PÖB ist, führten zu dem Vorschlag, dass die PÖB-Synthese in höheren Pflanzen ähnlich der PCB-Synthese in *Cyanidium* ist (Elich *et al.*, 1989). Die Analyse von Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren PÖB zu synthetisieren, löste die Frage der Rolle von HO in der Phytochrom-Synthese (Terry, 1997). Biochemische Analysen der PÖB-defizienten Mutanten *hyl* von *Arabidopsis* (Parks and Quail, 1991), *pcd1* von Erbse (Weller *et al.*, 1996) sowie *yg-2* von Tomate (Terry and Kendrick, 1996) zeigten, dass diese keine HO-Aktivität aufwiesen. Der über positionelle Klonierung gefundene *hyl-Locus* einer äquivalenten *Arabidopsis*-Mutante, die Homologie der *hyl*-Sequenz zu HOs von Säugern und Cyanobakterien und der Nachweis, dass das Wildtyp-Genprodukt HO-Aktivität *in vitro* aufwies, führte zur Identifikation des ersten pflanzlichen HO-Gens, welches *AtHO1* benannt wurde (Muramoto *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 1999a). *AtHO1* kodiert für ein chloroplastenlokalisiertes Protein mit 282 AS und einer M<sub>r</sub> von 32,6 kDa. Die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms offenbarte für die HOs eine kleine Genfamilie mit vier Mitgliedern (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). *AtHO3* und *AtHO4* fallen in eine Klasse mit dem *AtHO1*-Gen, während in *AtHO2* ein konserviertes Histidin, welches als Häm-Ligand funktioniert, durch ein Arginin ersetzt ist. Die funktionelle Folge einer solchen Substitution ist noch nicht geklärt. Mittlerweile wurden HO-Gene in mehreren Pflanzen identifiziert bzw. wurden deren Sequenzen in EST-Datenbanken gefunden {Mittmann 2002 9208 /id} (Terry *et al.*, 2002). Eine phylogenetische Analyse dieser Sequenzen zeigt, dass die Hämoxygenasen höherer Pflanzen den gleichen Abstand von den HOs der Cyanobakterien und Algen, die eine Gruppe bilden, sowie den Säugern sind. Es

gibt jedoch biochemische Evidenz dafür, dass die pflanzlichen HOs ähnlicher sind mit denen von Cyanobakterien und Algen (Muramoto *et al.*, 2002). Die Klonierung des Hämoxygenase-Gens *CpHO1* aus *Ceratodon* gelang über ein *Alignment* mit ausschließlich pflanzlichen Sequenzen (Mittmann, 2003). Mehrere Versuche, eine HO-Sequenz mittels *Alignments* aus tierischen und bakteriellen Sequenzen zu detektieren, brachten kein Ergebnis. Für die resultierende Sequenz von *CpHO1* wurde eine Chloroplastenlokalisierung vorhergesagt (Mittmann, 2003).

### 1.3 Phytochrom-gesteuerter Phototropismus in Cryptogamae

Phytochrom kontrolliert in Spitzenzellen von Moos- und Farnprotonemen den Phototropismus (Etzold, 1965; Hartmann *et al.*, 1983; Cove, 1992). Vor allem bei Farnen, aber auch einigen Moosen, ist Blaulicht ebenfalls in die Kontrolle phototroper Antworten involviert (Kadota *et al.*, 1982). In *Arabidopsis* kontrolliert Phototropin neben anderen Effekten den Phototropismus. Ein ungewöhnliches Phytochrom (AdicaPhy3) wurde im Farn *Adiantum capillus veneris* (Nozue *et al.*, 1998) identifiziert. Die C-terminale Region von AdicaPhy3 ist homolog zum Phototropin. Neben einer Kinase-Domäne enthält diese Region auch zwei LOV-Domänen, welche Flavin-Chromophore binden können. Der N-terminale Bereich ist homolog zu den Phytochromen. Somit bindet AdicaPhy3 drei Chromophore: Ein Bilin im N-Terminus und zwei Flavine im C-Terminus (Nozue *et al.*, 1998; Christie *et al.*, 1999). Charakterisierungen von Mutanten und deren Komplementation sowie *silencing*-Experimente deuten an, dass AdicaPhy3 die durch Rotlicht vermittelte phototrope Antwort in *Adiantum*-Protonema kontrolliert (Kadota and Wada, 1999; Kawai *et al.*, 2003). Das Chloroplasten-Bewegungen in *Adiantum* AdicaPhy3-vermittelt sind, konnte in diesen neuen Untersuchungen gezeigt werden. Es scheint, als ob dieser chimäre Photorezeptor mit Eigenschaften für Rot-/Dunkelrot- als auch Blaulicht-Absorption zwischen Jura (vor 205 – 138 Mill. J.) und Kreide (vor 138 – 65 Mill. J.) als Spezialist für schattige Lichtverhältnisse während der Bildung dichter Wälder evolvierte. AdicaPhy3 homologe Sequenzen wurden in weiteren *Polypodiaceae*, die ebenfalls in diesen Zeiträumen erstmals auftraten gefunden, jedoch nicht in früher evolvierten Farnarten (Kawai *et al.*, 2003).

Phytochromaktionen können in Protonemen auf zellulärer Ebene untersucht werden, da einzelne Zellen die Richtung des Lichtes erkennen können. Dieses Erkennen der Lichtrichtung erfordert, dass sich ein intrazellulärer Gradient an aktiviertem Phytochrom aufbaut. Man nimmt an, dass die einzelnen Photorezeptor-Moleküle in einer geordneten Orientierung innerhalb der Zelle, die als dichroitische Anordnung bezeichnet wird, vorliegen (Kraml, 1994). Bei Farn- und Moosspitzenzellen ruft eine Bestrahlung mit polarisiertem Rotlicht meist eine Krümmungsreaktion hervor, die verschieden von der phototropen Reaktion ist (Hartmann *et al.*, 1983). Eine solche Reaktion wird als Polarotropismus bezeichnet.

Ist der E-Vektor des anregenden Lichtes parallel zum Übergangsdipolmoment des Photorezeptors orientiert, ist die Wahrscheinlichkeit für die Absorption eines einfallenden

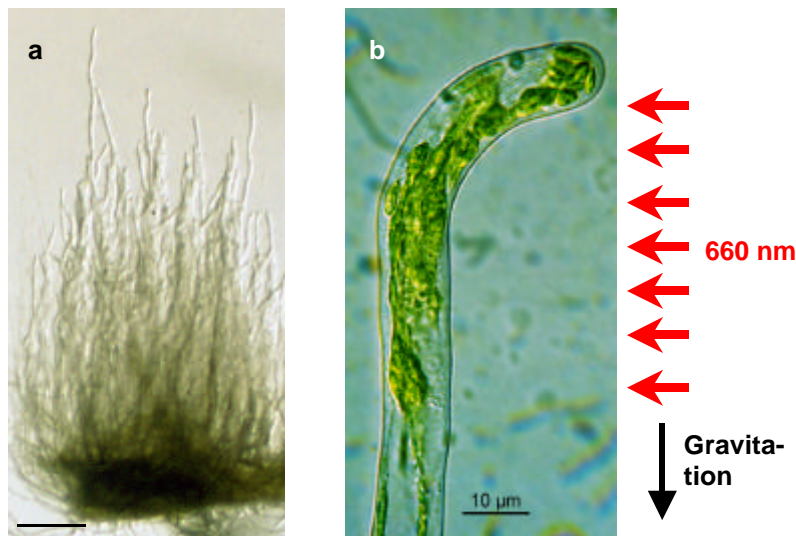
Photons sehr hoch. Diese reduziert sich auf ein Minimum, wenn der E-Vektor senkrecht zum Dipolmoment des Photorezeptors steht. Für die Phytochrom-Moleküle zylindrischer Zellen wie bei Protonemafilamenten wird angenommen, dass die  $P_r$ -Form mit ihren Dipolachsen parallel zur Zelloberfläche orientiert ist, und dass die Dipolachsen der  $P_{fr}$ -Form senkrecht dazu stehen. Photokonversion resultiert daher beim Phytochrom nicht nur in einer spektralen Absorptionsänderung, sondern vermutlich auch in einer Änderung der dichroitischen Orientierung des Chromophors. Bei einseitiger Bestrahlung baut sich innerhalb der Zelle somit ein tetrapolarer  $P_{fr}$ -Gradient aufgrund der unterschiedlichen Absorptionswahrscheinlichkeiten auf (Kraml, 1994). Außer der physiologischen Evidenz gibt es keinen Beweis für diese Hypothese, da es bislang nicht gelang, die dichroitische Orientierung von Phytochrom in der Zelle nachzuweisen

Die meisten Phytochrom vermittelten Lichtreaktionen lassen sich bei den niederen Pflanzen in zwei Kategorien einteilen. Zum einen die schnellen Antworten, wozu der Ionenflux in der Armleuchteralge *Nitella* (Weisenseel and Ruppert, 1977) gehört, aber auch die Chloroplastendrehung in der Grünalge *Mougeotia* (Haupt and Wagner, 1982) sowie der Phototropismus des Farnes *Adiantum* (Kadota *et al.*, 1982), die gerichtete lichtabhängige Effekte sind und der oben beschriebenen Hypothese des Wirkungsdichroismus zugeschrieben werden. Zum anderen langfristige Reaktionen, die möglicherweise durch Genexpression vermittelt sind.

## 1.4 *Ceratodon purpureus* als Modellorganismus für den Phototropismus

Auch wenn die Photomorphogenese von Pflanzen in den letzten Jahren sehr intensiv vor allem in *Arabidopsis* untersucht wurde und dort zu detaillierten Ergebnissen führte, waren diese Studien nie auf die Samenpflanzen beschränkt. In den wenig differenzierten Protonemen und Gametophyten von Moosen sind Photomorphosen oft bereits auf zellulärer Ebene zu erkennen, so dass diese meist mikroskopisch untersucht werden. Erste Untersuchungen zum positiven Phototropismus von Moosprotonemen wurden bereits 1935 von (Pringsheim and Pringsheim, 1935) durchgeführt.

Die Sporen von *Ceratodon purpureus* keimen zu einem sich verzweigenden, positiv phototrop reagierenden grünen Protonema aus. Die sich zunächst entwickelnden chloroplastenreichen Filamente mit senkrecht zur Filamentachse stehenden Querwände werden als Chloronema bezeichnet und die daraus hervorgehenden chloroplastenärmeren Filamente mit schräggestellten Querwänden als Caulonema. Diese Bezeichnungen gelten allgemein für Moose. Bei *Ceratodon* ist der Unterschied zwischen den beiden Zelltypen nicht sehr deutlich. Filamente von Moosprotonema des Laubmooses *Ceratodon* wachsen, wie bei allen Moosen, ausschließlich an ihren Spitzenzellen, ausgelöst durch eine lokale Exocytose von Golgivesikeln an der Apex der Spitzenzelle. *Ceratodon*-Protonema zeigt ein sehr gutes, negativ gravitropes Wachstum im Dunklen (s. Abbildung 3a) und die Antwort der Spitzenzelle auf Lichtreize ist relativ schnell. Die apikalen Zellen sind nega-



tiv gravitrop und positiv phototrop (s. Abbildung 3b), wobei der Phototropismus phytochromreguliert ist (Hartmann *et al.*, 1983).

Abbildung 3: Protonema von *Ceratodon purpureus*. (a) Filamente wurden als feine Linie auf Cellophanfolie ausgestrichen und wuchsen für 7 d auf 1b-Medium im Dunklen. (b) Spitzenzelle eines dunkeladaptierten Protonemafilamentes nach 1 h Bestrahlung mit Rotlicht. Balken in (a) = ~500 µM. Abbildung von T. Lamparter.

Dunkeladaptierte Moose schwellen rund 5 min nach kontinuierlicher Rotlicht-Bestrahlung an der apikalen Region der Spitzenzellen an. Nach etwa 20 min ist eine Polarisierung des Wachstums in Richtung des einstrahlenden Lichtes deutlich sichtbar (*bulging*), die aus einer Verlagerung des Wachstumszentrums von der Spitze an die Flanke der apikalen Region herrührt. Dieser Effekt ist durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht revertierbar. Untersuchungen mit polarisiertem Licht zeigten, dass der rotlichtinduzierte Phototropismus abhängig ist von der Schwingungsebene des E-Vektors, wobei die größte phototrope Reaktion bei einer Schwingungsebene des polarisierten Lichtes parallel zur Wachstumsrichtung der Filamente ermittelt wurde (Esch *et al.*, 1999).

#### 1.4.1 Phytochrome von *Ceratodon purpureus* und *Physcomitrella patens*

Von *Ceratodon* sind drei Phytochrom-Gene sequenziert worden. Das von Thümmeler identifizierte *CerpuPhy1* (Thümmeler *et al.*, 1992) codiert möglicherweise für eine licht-regulierte Proteinkinase, die 20-25 kDa größer ist als andere Phytochrome. Die C-terminale Region dieses Phytochroms weist eine Homologie zu der katalytischen Region von Proteinkinasen auf, jedoch keine Homologie zu anderen Phytochromen höherer und niederer Pflanzen. Transkripte von *CerpuPhy1* konnten nur in sehr niedrigen Mengen detektiert werden (Pasentsis *et al.*, 1998). In Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen den N-Terminus des Phytochroms konnte das Protein nicht detektiert werden (Lamparter *et al.*, 1995). Die Bedeutung dieses Gens ist bisher nicht bekannt, unterstützte aber die bereits erwähnte These, dass Phytochrome als Proteinkinasen wirksam sein könnten (Schneider-Poetsch, 1992).

Ein zweites, klassisches Phytochrom-Gen *CerpuPhy2* wurde in unserer Arbeitsgruppe sequenziert (Hughes *et al.*, 1996). Es codiert für ein 124,1 kDa großes Apoprotein mit 1121 Aminosäuren und ist über seine gesamte Länge homolog zu den Orthologen in Samenpflanzen.

Immunologische Untersuchungen haben gezeigt, dass *CerpuPhy2* in der Größe und in den spektralen Eigenschaften vergleichbar ist, mit dem anderer Phytochrome (Lamparter *et al.*, 1995). Bei *Ceratodon* ist der Phytochromgehalt *in vivo* von den Lichtbedingungen während des Wachstums abhängig. Dunkeladaptierte Protonemen akkumulieren bis zu 7 Tagen Phytochrom, anschließender Transfer in weißes Licht lässt den Phytochromgehalt relativ langsam nach 6 Stunden auf 50 % des anfänglichen Gehaltes absinken. Ein weiterer Abfall konnte auch nach 40 Stunden im weißen Licht nicht gemessen werden. Die Dunkelreversion von  $P_{fr}$  zu  $P_r$  vollzieht sich schnell: innerhalb von 10 min ist die Hälfte des  $P_{fr}$  zu  $P_r$  revertiert. Die Photokonversionsrate von  $P_r \rightarrow P_{fr}$  und  $P_{fr} \rightarrow P_r$  gleicht der von Haferphytochrom. Das Differenzspektrum von *Ceratodon* Phytochrom weist ein Maximum bei 660 nm und ein Minimum bei 722 nm auf (Lamparter *et al.*, 1995). Die photochemischen Eigenschaften heterolog exprimierten *CerpuPhy2s* wurden ebenfalls extensiv untersucht (Zeidler *et al.*, 1998). Ein weiteres *Ceratodon*-Phytochrom-Gen *CerpuPhy3* wurde kürzlich von (Mittmann, 2003) vollständig kloniert und sequenziert. Untersuchungen über dessen Funktion stehen noch aus.

Folgende bisher untersuchte Antworten in *Ceratodon* sind Phytochrom vermittelt bzw. beeinflusst: Sporenkeimung (Valanne, 1966), positiver Phototropismus (Hartmann *et al.*, 1983), Polarotropismus (Esch *et al.*, 1999), Chlorophyll-Biosynthese und Chloroplasten-Morphogenese (Lamparter *et al.*, 1997a), die Initiierung von Seitenverzweigungen in Protonemen (Kagawa *et al.*, 1997) sowie die Regulation des Gravitropismus (Lamparter *et al.*, 1996).

In *Physcomitrella* wurden bisher vier Phytochrom-Gene, *PhypaPhy1* – *PhypaPhy4*, gefunden (Kolukisaoglu *et al.*, 1993){Mittmann 2002 9208 /id}. Weiterhin wurden kürzlich EST-Sequenzen von zwei bisher unbekanntem *Physcomitrella*-Phytochrom-Genen in *GenBank* veröffentlicht (Mittmann, 2003). Auch in diesem Moos sind phytochromvermittelte Effekte beschrieben (Cove, 1992; Kadota *et al.*, 2000).

In phylogenetischen Analysen (s. Abbildung 4), basierend auf der Aminosäure-Sequenz des N-terminalen Chromophormoduls, lassen sich zwei Gruppen in Moosen unterscheiden. Die eine besteht aus den Phytochromen *CerpuPhy1*, *CerpuPhy2*, *PhypaPhy1* und *PhypaPhy3*, und die andere aus *CerpuPhy3*, *PhypaPhy2* und *PhypaPhy4*. Es scheint als ob *CerpuPhy1* und *CerpuPhy2* aus einer späten Genduplikation hervorgingen, gefolgt von einer Umordnung der Domänen, wobei *CerpuPhy1* entstand.

Daher ist es nicht überraschend, dass keine Phytochrom-Gene ähnlich *CerpuPhy1* in anderen Arten gefunden wurden. Die *Physcomitrella*-Paare *PhypaPhy1/3* und *PhypaPhy2/4* gingen offensichtlich ebenfalls aus einem Duplikationsereignis hervor, nachdem bereits zwei Moosphytochrom-Gruppen evolutiv divergiert waren (Lamparter and Brücker, 2003). Am Einfachsten ist dieses über eine Duplikation des kompletten

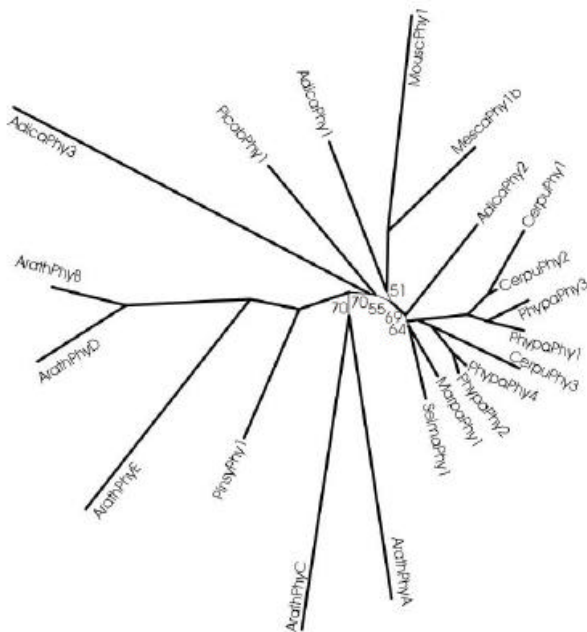
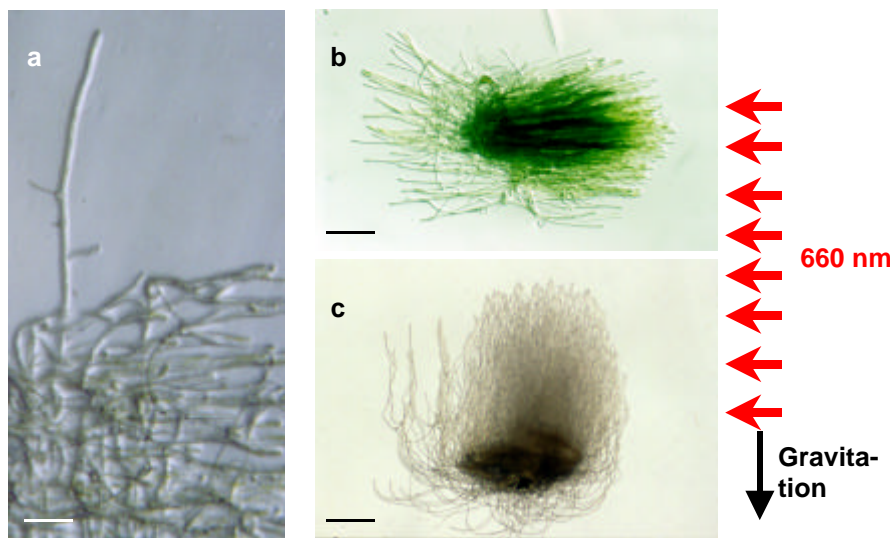


Abbildung 4: Stammbaum mit Phytochromen aus Moosen und anderen Pflanzen (Lamparter and Brücker, 2003). Adica: *Adiantum capillus veneris*, Arath: *Arabidopsis thaliana*, Cerpu: *Ceratodon purpureus*, Mesca: *Mesotaenium caldariorum*, Marpo: *Marchantia polymorpha*, Mousc: *Mougeotia scalaris*, Phypa: *Physcomitrella patens*, Picab: *Picea abies*, Piny: *Pinus sylvestris*, Selma: *Selaginella martensii*.

### 1.4.2 Aphototrope Mutanten von *Ceratodon purpureus*

Die Isolierung und Charakterisierung von Mutanten liefern den Schlüssel zur genetischen Analyse von Entwicklungsvorgängen (Cove, 1993). Aus Untersuchungen an Mutanten können zum einen Hypothesen über die Rolle des mutierten Gens im pflanzlichen Metabolismus aufgestellt werden und weiterhin ermöglichen sie die Isolierung des identifizierten Gens, welches anschließend molekular charakterisiert werden kann. Die Modellpflanze für die genetische Analyse ist *Arabidopsis thaliana*, die zugleich die erste Pflanze war, deren Genom komplett sequenziert und veröffentlicht wurde (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Weitere Modellorganismen bei Pflanzen sind die Monokotylen Mais und Reis. Obwohl auch bei den niederen Pflanzen zahlreiche Mutantennalysen durchgeführt wurden, hat sich bis heute kein Modell etablieren können. Von *Ceratodon* sind mehrere aphototrope Mutantenlinien des Wildtyps wt4, bei denen die Mutationen durch UV-Mutagenese ausgelöst wurden, isoliert worden (Lamparter *et al.*, 1996). Sie wurden nach einseitiger Rotlicht-Bestrahlung vereinzelt (s. Abbildung 5a) und können in zwei phänotypisch unterscheidbare Klassen eingeteilt werden. Linien der *Class 1* (s. Abbildung 5c) zeigen auch nach längerer Bestrahlung mit Rotlicht keine phototrope Reaktion, wachsen also negativ gravitrop wie dunkeladaptierte wt4, und besitzen einen



etwa 20fach geringeren Gehalt an spektral aktivem Phytochrom wie der Wildtyp (s. Abbildung 5b und c).

Abbildung 5: (a) Isolation aphotroper *Ceratodon*-Mutanten. Wildtyp-Filamente wachsen zum Licht, Mutanten wachsen entweder negativ gravitrop oder in alle Richtungen. Hier wurden die Filamente nach 7 d Dunkelwachstum für 24 h mit Rotlicht bestrahlt. (b) Wildtyp und (c) *Class 1*-Mutante nach 7 d Bestrahlung mit Rotlicht. Balken in (a) = 50  $\mu\text{M}$ ; in (b, c)  $\sim 0,3$  cm. Abbildung von T. Lamparter.

Immunologische Untersuchungen weisen einen gegenüber dem Wildtyp unveränderten Gehalt an Apoprotein auf. Da sich bei den Mutanten die phototrope Reaktion durch Fütterung mit Biliverdin oder mit Phycocyanobilin (Lamparter *et al.*, 1997a) wieder herstellen lässt, zeigen diese Linien die typische Charakteristik chromophordefizienter Mutanten. *Class 2*-Linien reagieren schwach phototrop nach 24 stündiger Rotlicht-Bestrahlung und wachsen nach längerer Bestrahlung mit Rotlicht gleichmäßig in alle Richtungen. Der Gravitropismus ist bei diesen Mutanten weiterhin wie auch beim Wildtyp von  $P_{fr}$  unterdrückt, ebenso entspricht der Phytochrom- und Chlorophyllgehalt dem des Wildtyps (Lamparter *et al.*, 1996). Die Ursache für den Phänotyp ist bei dieser Mutantenlinie noch unklar. *Class 1*-Mutanten besitzen außerdem einen geringeren Chlorophyllgehalt als der Wildtyp. Weitere Untersuchungen an einzelnen Spitzenzellen zeigten, dass sich der Chlorophyllgehalt nach Dunkeladaption sowohl beim Wildtyp, der dunkelgewachsen einen etwa 100fach niedrigeren Chlorophyllgehalt aufweist als unter Standardweißlichtbedingungen, als auch bei den aphotrophen Mutanten, durch Bestrahlung mit blauem Licht erhöhen lässt. Bestrahlung mit rotem Licht erhöhte den Chlorophyllgehalt zwar beim Wildtyp, bei den Mutanten jedoch erst nach PCB-Fütterung. Die Erhöhung des Chlorophyllgehaltes beim Wildtyp durch Bestrahlung mit rotem Licht konnte durch anschließende Bestrahlung mit dunkelrotem Licht teilweise aufgehoben werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Phytochrom als auch ein Blaulichtrezeptor die Chlorophyllakkumulation bei Protonemen von *Ceratodon* regulieren.

Bei höheren Pflanzen wird angenommen, dass der Phytochrom-Chromophor aus Protoporphyrin IX synthetisiert wird (s. 1.2.2). Dieses ist auch das Ausgangsprodukt für die Chlorophyll-Biosynthese.



Da sich bei den *Class 1*-Mutanten der Chlorophyllgehalt durch Bestrahlung mit blauem bzw. rotem Licht bei gleichzeitiger PCB-Fütterung erhöhen lässt, ist Protoporphyrin nicht der limitierende Faktor. Wahrscheinlich ist bei diesen Mutanten der Syntheseweg des Phytochrom-Chromophors PÖB zwischen dem Schritt vom Protoporphyrin zum Biliverdin blockiert.

### 1.4.3 Mikroinjektion in Protonema-Spitzenzellen von *Ceratodon*

Kapillare Mikroinjektion von Lösungen in lebende Zellen hat sich als außergewöhnlich wirksames Werkzeug in der Zellforschung bewährt. In tierischen Zellen ist sie eine der effektivsten Methoden, um Makromoleküle in das Cytoplasma oder direkt in den Nukleus einzubringen. Zu den in Säugetierzellen injizierten Substanzen gehören Spurenelemente (Kreis and Birchmeier, 1982; Gorbsky *et al.*, 1988), um deren Verteilung durch zytoplasmatische Prozesse und interzelluläre Kopplungen zu beobachten, Ionen z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  (Hamaguchi and Kuriyama, 1982); (Stolz and Bereiter-Hahn, 1987), spezifische Inhibitoren z.B. synthetische Peptide, mRNA (*sense* und *antisense*) oder Antikörper gegen Zytoskelettelemente (Sanger *et al.*, 1987) und Aktivatoren wie Proteine und Peptide oder cDNAs (Pepperkok *et al.*, 1988) unter der Kontrolle konstitutiver Promotoren. Heute wird im Prinzip mit der von Grässmann (1970) entwickelten Technik gearbeitet: Die Kapillarenspitze wird mit der zu injizierenden Flüssigkeit gefüllt und auf das Kapillarenende Druckluft gegeben. Kritische Aspekte dieser Technik wurden in den letzten Jahren deutlich verbessert. Das Ziehen der Glasmikropipetten wird heute zumeist mittels computerkontrollierter Mikropipetten-Puller durchgeführt, die einen höchsten Grad an Reproduzierbarkeit der Form und des Durchmessers der Kapillarenspitze erlauben. Die Computer Automation der Injektionstechnik (Ansorge and Pepperkok, 1988) ermöglicht bei tierischen Zellen heute bis zu 1500 Injektionen in der Stunde. Die Aufrüstung der Mikroinjektion mit der Technik der Fluoreszenzmikroskopie oder der konfokalen Laser-*Scanning* Mikroskopie, gekoppelt mit Software gestützter Bildverarbeitung, ermöglicht eine automatische Berechnung und Auswertung von Mikroinjektions-Experimenten an integrierten Systemen.

In den letzten Jahren wurde die Mikroinjektionstechnik auch erfolgreich bei höheren Pflanzen eingesetzt. Schwierigkeiten bereitet dabei vor allem die Existenz einer Zellwand und die großen Vakuolen. Stamina-Haarzellen von *Tradescantia* bieten den Vorteil, dass sie verhältnismäßig groß sind und ihr Zytoplasmaanteil sehr hoch ist. Die Mikroinjektionstechnik kam bis heute vor allem an diesen Pflanzenzellen zur Beobachtung der Dynamik von Mikrotubuli und Mikrofilamenten bei sich teilenden Zellen zum Einsatz (Zhang *et al.*, 1990; Cleary *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; Cleary, 1995). Pollenschläuche von Lilien haben sich ebenfalls als geeignetes Pflanzenmaterial für die Mikroinjektion etabliert. Sie weisen ein ausgesprochen polarisiertes Wachstum bei extrem hohen Wachstumsraten auf. Die Rolle des Calciums als Signaltransmitter sowie die Aktivität von Calciumkanälen und cytoplasmatische Strömungsverhältnisse während ihres Wachstums wurden in neueren Experimenten durch die Injektion von Kalziumindikatoren und

Wachstumsinhibitoren untersucht (Miller *et al.*, 1992);(Pierson *et al.*, 1994); (Malho *et al.*, 1995). Membranspannungen wurden hierbei mittels einer Mikroelektrode, die in einer zweiten Mikrokapillare geführt wurde, gemessen. Neuere Mikroinjektoren verfügen meist über mehrere Ausgänge, an die auch Kapillaren zum Halten und Transferieren von sich frei im flüssigen Medium bewegenden Zellen z.B. Protoplasten, angeschlossen werden können.

Unter 1.2.1 wurde bereits über Untersuchungen phyA kontrollierter Reaktionen mittels der Mikroinjektionstechnik berichtet. Resultate phyB vermittelter Antworten durch die Injektion aus in Hefe exprimierten phyB-PCB-Addukten in Keimlingen der *aurea*-Mutante (Kunkel *et al.*, 1996), bezeugen die Effektivität dieser Methode. Bei diesen Experimenten wurde gezeigt, dass phyB, im Gegensatz zu phyA, nicht die Akkumulation von Anthocyaninen induzieren kann. Weiterhin deuten die erzielten Ergebnisse an, dass phyB zur Vermittlung einer schnellen und effizienten Deetiolierung mit anderen Photorezeptoren in Interaktion tritt.

Von mir wurde eine Methode für die Injektion einzelner Protonemazellen von *Ceratodon purpureus* und *Physcomitrella patens* etabliert (Brücker, 1997). Die filamentös auswachsenden Protonemazellen von Moosen bieten mit ihrem Spitzenzellenwachstum für physiologische Untersuchungen auf zellulärer Ebene die besten Voraussetzungen. Im Gegensatz zu Farnprotonemazellen haben die Moosprotonemazellen für die Mikroinjektion den Vorteil, sich nicht mit einem Wachselag gegen Austrocknung zu schützen. In 1.1 werden die von mir ermittelten Bedingungen, die zu erfolgreichen Injektionen in Moosprotonema-Spitzenzellen führen, ausgeführt.

Die Etablierung der Mikroinjektionstechnik bei *Ceratodon purpureus* kann, vor allem in Verbindung mit den bereits oben erwähnten isolierten Mutanten, interessante Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge der Lichtregulation und zur Physiologie der Moose liefern.

## 1.5 Reverse Genetik in Pflanzen

Die Beziehung zwischen Gen und Phänotyp zu ermitteln ist ein Hauptziel in der modernen Biologie. Die Sequenz eines Gens alleine liefert zunächst wenig biologisch relevante Informationen für die große Mehrzahl der in Hochdurchsatz-Sequenzierungsprogrammen identifizierten Gene. Die Genetik liefert diese über die Analyse von funktionsgestörten Genen. Im Gegensatz zum klassischen Ansatz der vorwärts gerichteten Genetik, bei der über Mutagenese des interessierenden Organismus willkürliche Mutationen erzeugt werden und anschließend nach geeigneten Phänotypen gesucht wird, hat die reverse Genetik das kontrollierte Ausschalten bzw. Verändern von Genen im Kerngenom zum Ziel, um anschließend deren Funktion im Organismus zu definieren. Dieses geschieht über Transformation des Organismus mit Fremd-DNA. Diese wird über illegitime oder homologe Rekombination in die chromosomale DNA eingebaut, wodurch Mutationen entstehen können. Im folgenden Abschnitt wird zunächst auf die Erzeugung von

Mutanten über illegitime Rekombination eingegangen und in den anschließenden Kapiteln detailliert Experimente zur homologen Rekombination bei Pflanzen beschrieben.

Transformationsstrategien zur Identifikation von Proteinfunktionen bzw. neuen Genen in Pflanzen nutzen die einfache Handhabung somatischer Zellen in etablierten Modellorganismen. Veränderungen in der Basenabfolge können nach der Transformation meristematischen Gewebes bzw. der Regeneration von transformierten Protoplasten auch in der Keimbahn etabliert und an die Folgegeneration weitergegeben werden. Die am weitest verbreitete Methode in der funktionellen Genomik von Pflanzen ist die Insertionsmutagenese, bei der durch illegitime Rekombination nach einer Transformation wiederidentifizierbare DNA-Sequenzen zufällig in das Genom integrieren und dadurch Gene zerstören können (Walbot, 1992). Bei diesen Ansätzen wird T-DNA von *Agrobacterium* bzw. heterologe Transposons für die Transformation pflanzlicher Zellen verwendet, um große Kollektionen markierter Mutanten zu erzeugen. Ziel solcher Sammlungen *getaggtter* Mutanten, die unter anderem von *Arabidopsis* (Parinov and Sundaresan, 2000) und Reis (Jeon *et al.*, 2000) zur Verfügung stehen, ist eine Saturierung in der Anzahl der zerstörten Gene. Nach phänotypischer Analyse und Isolierung der gewünschten Mutante kann über die bekannte Basenabfolge des insertierten Elements die flankierende DNA, und somit das mutierte, *getaggte* Gen, sequenziert werden. Mehrere PCR-Techniken wurden zu diesem Zweck entwickelt (Rios *et al.*, 2002). Statistisch existieren in diesen Kollektionen Insertionsmutationen, in denen jedes Gen des transformierten Organismus mindestens einmal betroffen und somit funktional zerstört ist. Auch wenn diese Herangehensweise zur Identifikation und Charakterisierung einer Vielzahl von Genen durch die Generierung von *loss-of-function*-Mutationen führte, birgt die Methode der Insertions-Mutagenese konzeptionelle Nachteile (Schaefer, 2002). Trotz intensiver Studien ist bis heute nicht geklärt, inwiefern die *tag*-induzierten Mutationen tatsächlich gleichmäßig auf das Genom verteilt sind. T-DNA-*tags* in *Arabidopsis* scheinen nicht in alle Bereiche des Genoms zufällig zu insertieren und viele Allele sind somit uneinheitlich betroffen (Szabados *et al.*, 2002). Nach neueren Schätzungen sind mindestens 150.000-200.000 Insertionen notwendig, um das *Arabidopsis* Genom annähernd saturiert mit *Gen-knockouts* abzudecken (Bouché and Bouchez, 2001). Die Identifizierung betroffener Gene wird durch das *Screenen* solch großer Transformanten-Kollektionen kostspielig und zeitaufwendig. Multiple Insertionen und sogar chromosomale Rearrangements in Folge der Insertion erschweren die Analyse einer Mutante zusätzlich. Außerdem sind letale Phänotypen und konditionelle Mutationen nicht identifizierbar und neue Gene ohne bekannte Homologien somit nur schwer zu finden. Auch wenn die zufällige Insertion von Verstärkerelementen (*enhancers*) die Identifizierung von *gain-of-function* Mutationen erlaubt (Weigel *et al.*, 2000) und durch *gene trap screens* die Aktivität von Genen *in situ* mittels Fusion eines Reportergens mit einem endogenen Element darstellbar wird (Springer, 2000), existiert keine Methode, um spezifische Punktmutationen in einem Gen zu erzeugen.

### 1.5.1 *Gene targeting*

Die zielgerichtete Mutagenese, mit *gene targeting* bezeichnet, macht sich den Vorgang der homologen DNA-Rekombination zu nutze, bei der annähernd identische genomische Sequenzen rekombinieren. In meiotischen Zellen wird die homologe Rekombination durch DNA Doppelstrangbrüche ausgelöst und kombiniert die genetische Information der beiden Eltern neu, die dann an die nächste Generation weitergegeben wird. In somatischen Zellen wird durch homologe Rekombinationsvorgänge vor allem die Reparatur von Mutationen bzw. DNA-Brüchen gewährleistet. Durch homologe Rekombination werden diese Schäden vor der Replikation konservativ, d. h. ohne Veränderungen der Nukleotidsequenz, wieder miteinander verknüpft und dadurch repariert. In somatischen Zellen von Säugern und Pflanzen überwiegt jedoch die illegitime Rekombination, bei der Sequenzhomologien kaum eine Rolle zu spielen scheinen und die Nukleotidsequenz nach der Verknüpfung zweier DNA-Abschnitte verändert ist. Sowohl die homologe als auch die illegitime DNA-Rekombination wurden, mit sehr unterschiedlicher Frequenz, bei allen Organismen beobachtet (Puchta, 2002).

*Gene targeting* durch homologe rekombinationsvermittelte Integration von Fremd-DNA umgeht die oben beschriebenen Beschränkungen, die eine stochastische Mutantenerzeugung mit sich bringt. Für die kontrollierte Manipulation eines Genoms ist die homologe Rekombination, da das Produkt des Ereignisses vorhersagbar ist, daher von besonderem Interesse. Voraussetzung ist die Verfügbarkeit der Sequenzinformation, die verändert werden soll. Dieses stellt jedoch kaum mehr eine Limitation dar. Nukleotidsequenzen kompletter Genome sowohl von prokaryontischen (Blattner *et al.*, 1997; Kunst *et al.*, 1997) als auch von eukaryontischen Modellorganismen (Clayton *et al.*, 1997; *Caenorhabditis elegans* sequencing consortium, 1998; Adams *et al.*, 2000), sowie die der bereits oben genannten Pflanzen *Arabidopsis* und Reis {*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* (Goff *et al.*, 2002) und *indica* (Yu *et al.*, 2002)}, stehen in Datenbanken gespeichert zur Verfügung. Darüber hinaus existieren Datenbanken mit ESTs (*expressed sequence tags*) einer Vielzahl von Organismen. Über Sequenzvergleiche von Genen oder Proteinen der bestehenden Datenbanken können so auch noch nicht bekannte Sequenzen in anderen Organismen identifiziert werden.

In Bakterien, Hefen und mehreren filamentösen Pilzen ist *Gene targeting* seit langem die Methode der Wahl, um effizient gezielt Gene auszuschalten oder zu verändern (Schaefer, 2002). In Hefen integriert ein von extern zugeführtes Stück DNA, welches homologe Sequenzen zum Genom trägt, beinahe ausschließlich an seiner korrespondierenden genomischen Position. Seit frühen Pionierarbeiten mit Mäusen aus den 90 Jahren, in denen embryonaler Stammzellen (ES) transformiert wurden (Doetschmann *et al.*, 1987; Thomas and Capecchi, 2003), führte diese Technik auch in diesem Organismus zur funktionalen Identifizierung hunderter Gene. Ein Fakt der unter anderem dazu beitrug die Maus zum Modellorganismus für Säuger zu etablieren. *Gene targeting* steht in embryonalen Stammzellen mit einer Frequenz von einer homologen Integration auf maximal 100 illegitime Integrationen zur Verfügung. Eine umfassende Übersicht zum Thema bietet der

Artikel von Jasin (Jasin *et al.*, 1996). Vor wenigen Tagen wurde auch der erste Bericht über erfolgreiche homologe Rekombination mit humanen ES-Zellen veröffentlicht (Zwaka and Thomson, 2003). Die Transformation der Stammzellen erfolgte dabei über Elektroporation und die erzielte Frequenz an homologen Rekombinanten war ähnlich der für ES-Zellen von Mäusen.

Leider konnten ähnliche Frequenzen wie bei Hefen und Mäusen in *Gene targeting*-Experimenten mit Pflanzen bisher nicht erzielt werden. Anfängliche Studien zur Abschätzung der Frequenz von *gene targeting*-Ereignissen in Pflanzen nutzten als Versuchsansatz die Komplementierung unvollständiger, selektierbarer Markergene, die bereits stabil in das pflanzliche Genom transformiert waren. Der direkte Gentransfer (Halfter *et al.*, 1992) in Protoplasten erfolgte dabei mittels PEG-Transformation oder Elektroporation (Paszkowski *et al.*, 1988). Des Weiteren wurden verschiedene pflanzliche Gewebe über Bombardierung mit DNA mit Hilfe der *particle gun* als auch über die T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* (Offringa *et al.*, 1990) transformiert (Lee *et al.*, 1990). Unabhängig von der verwendeten Art (Tabak oder *Arabidopsis*) und Transformationsmethode lag die beobachtete *gene targeting*-Frequenz bei  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$ , also einem *target*-Ereignis auf 10.000 - 100.000 illegitimen Integrationen. In *Escherichia coli* (Datsenko and Wanner, 2000) und *Saccharomyces* (Baudin *et al.*, 1993) sind 30 - 40 Nukleotide Homologie zum genomischen Zielbereich hinreichend, um effizient gezielt Gene auszuschalten. In höheren Pflanzen sieht die Situation jedoch völlig anders aus. Selbst Ansätze, bei denen der homologe Bereich der zu transferierenden DNA auf bis zu 22 kb Länge ausgedehnt wurde (Thykjaer *et al.*, 1997), führten nicht zu einer signifikanten Steigerung des *gene targetings* in Pflanzen. Eine Möglichkeit, die Frequenz der homologen Rekombination zu steigern, besteht in der Induktion von Doppelstrangbrüchen an der genomischen Zielposition. Alle gegenwärtigen Rekombinationsmodelle basieren auf der Reparatur solcher Brüche (Paques and Haber, 1999). Untersucht wurde diese Herangehensweise bei Pflanzen zuerst in Tabak. Dazu wurde das selten schneidende Restriktionsenzym I-SceI in Transgenen, die eine artifizielle I-SceI Erkennungssequenz enthalten, kurzzeitig exprimiert (Puchta *et al.*, 1993). Die homologe Integration *in vivo* konnte mittels dieser Strategie auf eine Frequenz von  $10^{-2}$  gesteigert werden (Puchta *et al.*, 1996). Leider ist diese Methode der Doppelstrangbruch-Induktion für das *gene targeting* kaum nutzbar, da statistisch eine I-SceI-Erkennungsschnittstelle auf 4 Tabak- und 70 *Arabidopsis*-Genomen vorkommt.

In den letzten Jahren erschienen zwei Arbeiten zum gezielten *Knockout* in *Arabidopsis* (Miao and Lam, 1995; Kempin *et al.*, 1997). In beiden Fällen wurden Gene zerstört, die nicht als *loss-of-function*-Mutationen identifizierbar sind. In letzterer Arbeit konnte immerhin ein *target*-Ereignis in 750 Transformanten erzielt werden. Es wurde vermutet, dass diese relativ hohe Frequenz auf der Vakuum-Infiltration beruhte, über die der Gentransfer durchgeführt wurde. Leider konnte die Effizienz dieser Methode noch nicht verbessert werden, und die bereits erzielten Ergebnisse wurden auch kontrovers diskutiert (Puchta, 1998; Liljegren and Yanofski, 1998).

### 1.5.2 Untersuchungen zur homologen Rekombination in Pflanzen

Da das Interesse an *gene targeting* in Pflanzen sehr groß ist, wurden neue Ansätze getestet, die sich in prokaryontischen oder tierischen Systemen als effizient erwiesen. Dabei ging es zum Einen um das molekulare Verständnis der homologen Rekombination in Pflanzen und zum Anderen darum, die erzielten Erkenntnisse zur Steigerung der *gene targeting*-Frequenz zu nutzen. Experimenteller Ausgangspunkt dieser Arbeiten war die Verwendung von Reportergenen. Nichtfunktionelle Fragmente wurden mit überlappenden Sequenzen unterschiedlicher Länge auf mehrer Konstrukte verteilt und in pflanzliche Zellen transformiert. Eine Reparatur des Reportergens infolge homologer Rekombinationsvorgänge ist leicht identifizierbar und die Effizienz der gewählten Versuchsbedingungen statistisch auswertbar. Extrachromosomale Rekombination führte mit hoher Effizienz zu funktionellen Reportergenen und konnte daher bereits sehr detailliert untersucht werden (Puchta and Hohn, 1991; Tinland *et al.*, 1994). Die DNA-Moleküle rekombinieren innerhalb einer halben Stunde nach der Transformation. Der Methylierungszustand der Moleküle spielte dabei keine Rolle.

Untersuchungen zur intrachromosomalen Rekombination sind für die Entwicklung einer effizienten *gene targeting* Methode jedoch wesentlich interessanter, da hier auch der Einfluss der Chromatinstruktur und der Genomstabilität des mit hochrepetitiven Basenabfolgen angereicherten Pflanzengenoms ausschlaggebend zu sein scheint. Methodisch konzentrieren sich diese Experimente um ähnliche Reporter-Konstrukte wie die oben erwähnten (s. auch die in 1.5.1 zitierten Experimente), außer dass hier die nichtfunktionellen DNA-Moleküle stabil, aber voneinander getrennt, im Genom integriert sind. Die ermittelten Rekombinationsfrequenzen waren mit  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  sehr viel niedriger als bei den transienten Untersuchungsansätzen zur extrachromosomalen Rekombination (Swoboda *et al.*, 1994). Allerdings konnten mit diesen Methoden Parameter gefunden werden, die die Rekombinationshäufigkeit erhöhten. Zum Einen geben diese Hinweise auf die biologische Funktion der homologen Funktion in somatischen Zellen, da diese nach DNA-schädigender Behandlung mit höherer Rekombinationsfrequenz reagierten, d. h. Doppelstrangbrüche repariert werden konnten (Tovar and Lichtenstein, 1992; Puchta *et al.*, 1995). Zum Anderen wurden aber auch stressinduzierende Faktoren wie Hitzeschock oder eine Erhöhung der Kochsalzkonzentration gefunden, die nicht zu Doppelstrangbrüchen der DNA führen, und dennoch die Häufigkeit homologer Rekombinationsereignisse erhöhten (Lebel *et al.*, 1993). In die homologe Rekombination involvierte Enzyme werden demzufolge durch negative Umweltbedingungen, die die DNA in unmittelbarer Folge schädigen oder auf längere Sicht zu Mutationen führen, induziert. Eine Hypothese, die bereits früh von prominenter Seite formuliert wurde (McClintock, 1984).

### 1.5.3 Steigerung der *gene targeting*-Effizienz in Pflanzen

Trotz ausgefeilter Strategien (s. z. B. Thykjaer *et al.*, 1997) führten die oben beschriebenen Ansätze nicht zu einem effizienten, gezielten Verändern von Genen höherer Pflanzen. Ein Ansatz, welcher kurz beschrieben werden soll, hat sich zum Ziel gesetzt, die Ma-

schinerie aus anderen Organismen in Pflanzen zu übertragen. Dazu wurde RecA aus *E. coli* in Tabak exprimiert. Dieses führte tatsächlich zu einer Erhöhung der intrachromosomalen Rekombination um eine Zehnerpotenz (Reiss *et al.*, 1996). Die im Folgenden durchgeführten Experimente für zwei transgene Loci zeigten jedoch keine signifikante Erhöhung der *gene targeting*-Frequenz (Reiss *et al.*, 2000). Die Überexpression der bakteriellen Resolvase RuvC in Tabak führte sowohl zu einer Erhöhung der extra- und intra- als auch interchromosomalen Rekombination (Shalev *et al.*, 1999). Ergebnisse für *gene targeting*-Experimente mit diesem System sowie mit pflanzlichen Enzymen, die in Rekombinationsprozesse involviert sind, stehen noch aus (Puchta, 2002).

Eine weiterer Technik, die auf der Transformation selbstkomplementärer, chimärer RNA/DNA-Oligonukleotide beruht, wurde in den letzten Jahren in prokaryontischen und eukaryontischen Organismen erforscht. In Säuger-Zellen wurden mittels diesen Ansatzes endogene Gene erfolgreich modifiziert (Cole-Strauss *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 1996). Die Methode ging von der Beobachtung aus, dass die Transkription RecA-vermitteltes homologes Paaren von DNA *in vitro* verstärkte. Vermutet wurde, dass die DNA-Paarung in Gegenwart komplementärer RNA verstärkt wird. Daher wurden chimäre Oligonukleotide aus DNA und komplementärer RNA, welche durch Methylierung stabilisiert wurde, hergestellt. In Pflanzen wurden solche Oligonukleotide zuerst in Tabak- (Beetham *et al.*, 1999) und Maiszellen (Zhu *et al.*, 1999) transformiert, um dort jeweils ein endogenes und ein transgenes Gen zu mutieren. Bei den endogenen Loci handelte es sich um Gene, die nach Mutation bestimmter Aminosäuren resistent gegen die Herbizide Imidazolinon und Chlorsulfuron sind und somit als Marker für ein erfolgreiches *targeted gene replacement* dienen. Die Effizienz, mit der herbizidresistente Kalli regenerierten, erschien hinreichend gut, um die Methode für die Selektion gezielter Mutationen in Pflanzen zu verwenden. Die Sequenzierung des modifizierten Bereichs zeigte jedoch im Falle des mit zwei unterschiedlichen RNA/DNA-Oligonukleotiden transformierten Tabaks in keiner der analysierten regenerierenden Kalli die erwarteten Mutationen. Im Maisexperiment zeigten Restriktionsanalysen der herbizidresistenten Kalli, dass nicht alle endogenen *target-sites* verändert wurden. Außer erwarteten ungeschnittenen Fragmenten erschien auch die Wildtyp-Bande. Die Sequenzierung des erwarteten Fragmentes wies in 34 von 40 Klonen die vorhergesagte Nukleotidsubstitution auf, die restlichen 6 Klone enthielten alternative Mutationen im Zielbereich. Die Sequenz für das transgene, nichtfunktionelle GFP-Gen, welches im Rahmen dieser Experimente repariert werden konnte, wurde in einem Fall in transformierten Maispflanzen analysiert. Die resultierende Aminosäuresequenz entsprach wiederum nicht der Erwartung. Die Frequenz, mit der *site*-spezifische Veränderungen erzielt wurden, lag bei  $10^{-4}$ . Diese liegt damit im Bereich oben zitierter *gene targeting*-Experimente (s. 1.5.1) in höheren Pflanzen, jedoch um 2 - 3 Größenordnungen niedriger als in ähnlichen Experimenten mit Säugerzellen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist daher keine effiziente Methode für *gene targeting* in höheren Pflanzen bekannt. Um die Funktion tausender unbekannter Gene in der Modellpflanze *Arabidopsis* zu definieren, scheint der Ansatz, systematisch die mit T-DNAs und

Transposons markierten Insertionsstellen zu sequenzieren um anschließend in intensiven Untersuchungen Phänotypen der Pflanzen mit zerstörten Genen zu charakterisieren (Bouché and Bouchez, 2001), am erfolgsversprechendsten.

#### 1.5.4 *Gene targeting in Physcomitrella patens*

Eine Alternative zu den Blütenpflanzen bezüglich *gene targeting*-Experimenten ist das Moos *Physcomitrella patens*. Dieses integriert fremde DNA mit hoher Effizienz über homologe Rekombination (Schaefer and Zryd, 1997). Zum Einsatz kommen dabei zwei Arten von Konstrukten, mit denen in *Physcomitrella* experimentiert wurde: Insertions- und *replacement*-Vektoren (Schaefer, 2002). Erstere sind Plasmide, die einen genomischen Abschnitt oder eine cDNA des zu transformierenden Organismus enthalten und einen Marker. Dieser exprimiert konstitutiv eine Herbizid- oder eukaryontische Antibiotika-Resistenz im Zielorganismus. Zur Konstruktion von *replacement*-Vektoren muss die Sequenzinformation des *target*-Bereichs zumindest ausreichend für die Herstellung eines hinreichend großen PCR-Amplifikates bekannt sein. Dieses gDNA- oder cDNA-Fragment des Zielgens wird in einen Klonierungsvektor ligiert. Möglichst mittig wird in das Fragment ein Marker kloniert. Das eigentliche *replacement*-Konstrukt wird über Verdau im 5'- und 3'-Bereich des gDNA- oder cDNA-Fragments erzielt. Sollte dieses aufgrund ungünstiger Schnittstellen nicht möglich sein, kann das Konstrukt auch Abschnitte des Vektors enthalten. Dieses hat keinen Einfluss auf die Effizienz seiner homologer Integration (Mittmann, 2003). Die Transformation von *gene targeting*-Konstrukten erfolgte in den bisher durchgeführten *Physcomitrella*-Experimenten PEG-vermittelt mit Protoplasten. *Physcomitrella* lässt sich aber auch biolistisch (Sawahel *et al.*, 1992) über eine *particle gun* als auch über Mikroinjektion (Brücker *et al.*, 2000) transformieren. Transformierte Linien werden über Selektionsmedium isoliert und anschließend auf erfolgreiche homologe Rekombination des Konstruktes analysiert. Dabei wurde entdeckt, dass die Konstrukte häufig als multiple Insertionen, ebenfalls infolge homologer Rekombination, am *target-Locus* eingebaut werden (Schaefer and Zryd, 1997). In der oben zitierten Arbeit von Didier Schaefer wurde zum ersten Mal über erfolgreiches *gene targeting* in *Physcomitrella* berichtet. Für diesen Untersuchungen wurden stabil transformierte Linien von *Physcomitrella* verwendet. Erneute Transformation dieser Linien mit DNA, die über das Plasmid-Rückgrat homolog zur bereits zuvor im Genom integrierten war zeigte, dass diese mit hoher Effizienz in den homologen Abschnitt des Genoms rekombinierte. Die Effizienz des *gene targetings* wurde über *Southern-blotting* bestätigt und lag mit über 90 % im Bereich dessen, was in Hefe erzielt wurde. Dass diese Technik in der Tat für das Ausschalten von Genfunktionen verwendet werden kann, wurde bereits im folgenden Jahr eindrucksvoll von zwei unabhängigen Gruppen bestätigt. In der Arbeitsgruppe von Ralf Reski wurde mit *ftsZ1* das Gen, welches für die Chloroplasten-Teilung in *Physcomitrella* verantwortlich ist, ausgeschaltet (Strepp *et al.*, 1998). Verwendet wurde hier ein auf cDNA basierendes *replacement*-Konstrukt mit einer diskontinuierlichen homologen Sequenz von ~ 1 kb. In der Gruppe von E. Heinz, die am Lipidstoffwechsel in Pflanzen



arbeitet, wurde das  $\Delta 6$ -Acylgruppen-Desaturase-Gen *PPDES6* erfolgreich ausgeschaltet (Girke *et al.*, 1998). Diese Gruppe verwendete ein *replacement*-Konstrukt, welches eine gDNA mit 2 kb Sequenzhomologie enthielt, in dessen Mitte eine Neomycin-Resistenz-Kassette kloniert wurde. In den letzten Jahren akkumulierten die Berichte über erfolgreiche *knockouts* in *Physcomitrella*. Einen Überblick bietet das Review von (Schaefer, 2002) sowie die *Abstracts* des *moss 2002 meetings*.

Es zeigt sich, dass *Physcomitrella* ein wertvolles System für die Untersuchung grundlegender biologischer Prozesse in Pflanzen darstellt. Moose teilen mit anderen Pflanzen die gleiche Ausstattung an Hormonen und ihre biochemischen Wege sind überaus konserviert. Entsprechend ist die Ähnlichkeit in ihren Signalübertragungs-Mechanismen hoch. Analogie besteht auch in weiten Bereichen der Zelldifferenzierung sowie den Interaktionen zwischen Nukleus und den Organellen. Die meisten der bisher rund 60.000 sequenzierten frei zugänglichen *Physcomitrella* ESTs (The *Physcomitrella* EST programme (PEP): <http://www.moss.leeds.ac.uk>) zeigen eine starke Homologie zu Genen anderer Pflanzen (Knight *et al.*, 2002). So besitzen 66 % der ESTs von *Physcomitrella* ein Homolog in *Arabidopsis* und 44 % in Reis. Viele Arbeitsgruppen, die die biologische Funktion eines bestimmten Gens in höheren Pflanze untersuchen, nutzten daher in den letzten Jahren *Physcomitrella* als analogen Organismus für *gene targeting*-Experimente. Ein großer Vorteil dieser Experimente in *Physcomitrella* ist der Zeitfaktor: Von der Klonierung genomischer DNA bis zur Isolierung von *knockout*-Linien vergehen nur rund drei Monate (Mittmann, 2003). Der Generationszyklus von *Physcomitrella* dauert rund zwei bis drei Monate und wird vom haploiden Gametophyten-Stadium dominiert. Rezessive Phänotypen können daher ohne weitere Kreuzungsexperimente isoliert werden (Cove *et al.*, 1997; Reski, 1998a).

Bisher ist unklar, warum homologe Integration in *Physcomitrella* mit extrem hoher Effizienz erfolgt. Spekuliert wurde über Unterschiede in der Enzym-Maschinerie als auch über die Phase des Zell-Zyklus, zu der die Aufnahme der Fremd-DNA stattfindet (Reski, 1998b). Ferner wurde die Hypothese aufgestellt, dass die haploide Phase von eukaryontischen Organismen an sich Voraussetzung für effizientes *gene targeting* ist (Schaefer and Zryd, 1997). Dieses konnte mit haploiden Tabak-Kulturen nicht bestätigt werden (Mengiste and Paszkowski, 1999). Extrachromosomale DNA kann in *Physcomitrella* über einen langen Zeitraum unverändert fortbestehen (Ashton *et al.*, 2000). Es ist daher vorstellbar, dass diese DNA mit der Zeit für homologe Interaktionen stärker ‚aktiviert‘ wird. Zukünftige Untersuchungen über den Rekombinations-Mechanismus in *Physcomitrella* und die darin involvierten Faktoren sollten zur Aufklärung dieser wichtigen Frage beitragen.

## 1.6 Ziele der Arbeit

### 1.6.1 Mikroinjektion in Protonema-Spitzenzellen von *Ceratodon*

Mit dieser Technik sollten die methodischen Möglichkeiten zur Untersuchung der Phytochromwirkungen bei Moosen weiter ausgebaut werden. In tierischen Systemen wird die Transformation mittels Mikroinjektion seit längerem eingesetzt (s. 1.4.3). Bei höheren Pflanzen wurde durch die Injektion von DNA in Protoplasten die Technik bereits für Transformationen eingesetzt (Schnorf *et al.*, 1991). Die Mikroinjektion von *Ceratodon purpureus* wurde von mir erfolgreich etabliert (Brücker, 1997). Im Anschluss an diese Arbeit wurde die Methode mittels Injektion eines GFP-Gens in Protonema-Spitzenzellen optimiert (Brücker *et al.*, 2000). In transformierten Spitzenzellen konnte GFP-Expression bis zu zwei Wochen beobachtet werden. Die Mikroinjektions-Experimente sollten vor allem mit dem Ziel, Phytochromeffekte auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, in dieser Arbeit fortgeführt werden. Zum Einen sollte die Ursache der aphototropen *Class 1*-Mutanten (Lamparter *et al.*, 1996) identifiziert werden, indem über die Injektion von Hämoxygenase-Genen der Phototropismus wiederhergestellt wird. Zum Anderen sollte die Injektion von Phytochrom-Holoprotein Aufschluss über den Photorezeptor geben, der für den in Protonema-Spitzenzellen von *Ceratodon* gut untersuchten Photo- und Polarotropismus verantwortlich ist. Dazu sollte das von M. Zeidler in Hefe klonierte *CerpuPhy2* (Zeidler *et al.*, 1998) nach Expression hochaufgereinigt injiziert werden.

### 1.6.2 Phototropismus in *Physcomitrella patens*

Für das Moos *Physcomitrella patens* sollten Bedingungen etabliert werden, unter denen Protonemen des *Physcomitrella*-Wildtyps einer Dunkeladaptation zugänglich werden. Die Etablierung eines Dunkelphänotyps von *Physcomitrella* erleichtert durch die Bestrahlung der dunkelgewachsenen Filamente mit Licht verschiedener Wellenlänge die Identifikation photorezeptorvermittelter Antworten von spezifischer Qualität. Dadurch sollte unter anderem untersucht werden, ob die Spitzenzellen von *Physcomitrella*-Protonemen wie bei *Ceratodon* phytochromvermittelt phototrop reagieren. Im Anschluss an diese Untersuchungen sollten die von F. Mittmann in unserer Arbeitsgruppe identifizierten und über *gene targeting* hergestellten *Physcomitrella patens knockout*-Linien (Mittmann, 2003) für die Phytochrom-Gene *PhypaPhy1-PhypaPhy4* funktionell analysiert werden. Im Vordergrund stand hier spezifische, rotlichtinduzierte Antworten der Phytochrom-Gene für den Phototropismus und Polarotropismus von Protonema-Spitzenzellen zu charakterisieren.

### 1.6.3 *Gene targeting* in *Ceratodon purpureus*

Über den gut untersuchten und leicht identifizierbaren Phänotyp der *Class 1*-Mutanten in *Ceratodon* (Lamparter *et al.*, 1996) sollte die Möglichkeit des *gene targeting* über ho-

mologe Rekombination in diesem Moos untersucht werden. Ein experimenteller Ansatz ist dabei der *Knockout* des Hämoxygenase-Gens im Wildtyp. Dieses katalysiert einen Syntheseschritt der Chromophor-Biosynthese. Die zweite Möglichkeit besteht in der gezielten Reparatur defekter Hämoxygenase-Gene in aphototropen *Class 1*-Mutanten. Dazu sollte ein *in vitro* modifiziertes Hämoxygenase-Gen von *Ceratodon* in aphototrope Mutanten transformiert werden. Infolge eines homologen Rekombinations-Ereignisses soll dieses zum Wildtyp-Phänotyp führen. Auf molekularer Ebene wäre dieser ebenso als Folge der Modifikationen identifizierbar. Ein erfolgreiches *gene replacement* sollte die Möglichkeit, feine Veränderungen wie den Austausch einzelner Nukleotide und somit der Aminosäuresequenz eines Proteins, dokumentieren. Diese Art der Modifikation kann über zufällige Insertions-Mutagenese nicht erzielt werden. Die Identifikation homologer Rekombinanten sollte dabei in einem ersten Schritt visuell auf Basis der bekannten chromophordefizienten- bzw. Wildtyp-Phänotypen erfolgen. Die Möglichkeit der Selektion ohne Resistenzmarker sollte hier ebenfalls untersucht werden. Mit dem in unserer Arbeitsgruppe von F. Mittmann sequenzierten Hämoxygenase-Gen *CpHO1* aus dem *Ceratodon*-Wildtyp wt4 und einigen *Class 1*-Mutanten (Mittmann, 2003) wurde die Voraussetzung für diese Experimente geschaffen.