

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden vornehmlich an Protonemen des Laubmooses *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. durchgeführt. Die Wildtyp wt4-Kulturen (Hartmann *et al.*, 1983) entstammen aus vereinzelt Sporen, die 1979 im Wispental gesammelt und zur Keimung gebracht wurden. Seit 1979 werden diese Kulturen unter sterilen Kulturbedingungen gehalten und vegetativ vermehrt. Die verwendeten aphototropen *ptr*-Mutanten wurden über UV-Mutagenese aus wt4 isoliert (Lamparter *et al.*, 1996; Esch and Lamparter, 1998).

Der *Physcomitrella patens*-Wildtyp trägt die Bezeichnung wtDC (Ashton and Cove, 1977).

Die verwendeten Mutanten beider Moose werden bei den mit Ihnen durchgeführten Experimenten benannt.

2.1.1 Aufzucht

Ceratodon purpureus und *Physcomitrella patens* Wildtyp- und Mutantenkulturen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in einem Klimakonstantraum bei einer Temperatur von 20 °C und einem 16 h Licht- (Philips MCFE weiß, Photonen-Fluenzrate 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR) 8 h Dunkel-Rhythmus in Petrischalen von 90 mm Durchmesser auf Agar-Festmedium steril angezogen. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen.

2.1.2 Polarotropismus und positiver Phototropismus bei *Ceratodon*

Filamente von injizierten-, *knockout*- oder *gene replacement*-Kulturen wurden für Phototropismus-Untersuchungen als rund 1 mm breiter Streifen auf eine Petrischale mit 1b-Medium (s. 2.6.2.1) auf eine etwa 1 cm² große Cellophanfolie aufgetragen. Parallel wuchsen als Kontrolle auf den selben Schalen unter identischen Bedingungen Wildtyp-Protonemen bzw. Filamente aphototroper Mutanten (je nach Fragestellung). Diese Schalen wurden für fünf bis sieben Tage senkrecht in einen völlig abgedunkelten Kasten bei 20 °C gestellt. Die Filamente wuchsen in dieser Zeit parallel negativ gravitrop auf der Folie. Auf die Dunkeladaption folgte eine 24 h einseitige Bestrahlung der Filamente mit Rotlicht bei einer Photonen-Fluenzrate von 1,5 - 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ in einer Bestrahlungskammer. Unter diesen Bedingungen wachsen Wildtyp-Filamente von *Ceratodon* positiv phototrop (Hartmann *et al.*, 1983), nicht jedoch die verwendeten aphototropen Mutanten (Lamparter *et al.*, 1996; Lamparter *et al.*, 1997a). Als Bestrahlungsquelle dienten Projektoren der Firma Zeuschel (Systematic M 3, Tübingen, Deutschland) mit 150 W Projektorlampen (Osram, Berlin, Deutschland). Zur Erzeugung von monochromatischem rotem

Licht wurden Interferenz-Bandfilter mit einem Transmissionsmaximum bei 661 nm und einer Halbwertsbandbreite von 20 nm (Typ A1, Schott; Mainz, Deutschland) verwendet.

Für die Induktion von Polarotropismus wurden die dunkeladaptierten Filamente mit der Cellophanfolie auf kleine Glaspetrischalen mit 1b-Medium von 2 cm Durchmesser gebracht. Die Spitzen der Filamente wurden mit einem Deckglas von 1 cm Länge und 3 mm Breite abgedeckt. Die Glaspetrischalen wurden nach Verschluss mit einem Glasdeckel mit Parafilm umwickelt und horizontal in eine Bestrahlungskammer gebracht. In dieser Bestrahlungskammer wurde mit Rotlicht-Dioden (Wellenlänge 650 nm) eine Fluenzrate von $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ erzeugt. Das Licht fiel von oben durch einen Polarisationsfilter auf die liegenden Filamente. Der E-Vektor bezogen auf die Wachstumsrichtung der Filamente wurde auf 15° eingestellt.

Die resultierenden Krümmungswinkel wurden mit einer computergekoppelten Videokamera (Panasonic, WV-CD20, Japan), die auf einem Mikroskop (Nikon, SMZ-U, Japan) installiert war, abgespeichert und mit einer bildverarbeitenden Software (Image P2, H+H Meßsysteme, Berlin, Deutschland) ausgewertet.

2.1.3 Dunkeladaptation von *Physcomitrella patens*

Wachstumsbedingungen für *Physcomitrella* im Dunkeln mussten optimiert werden. Dazu wurden verschiedene Medien getestet. Als Basis-Medium kam immer BCE 2.0.5 (s. 2.6.2.3) zum Einsatz. Darin wurde Glucose, Fructose oder Saccharose in Konzentrationen von 0,2 - 0,5 % (w/v) gelöst. Des Weiteren wurde die Position der auf einer Cellophanfolie als feine horizontale Linie aufgetragenen Protonemen bezüglich des gravitropen Reizes getestet. Dazu wurden die Petrischalen mit den Mooszellen vor der Dunkeladaptation in verschiedenen Positionen für 0 h bis 3 d mit Licht induziert. Wachstum im Dunkeln wurde nach 10 d mikroskopisch (Nikon, SMZ-U, Japan) dokumentiert.

2.1.4 Untersuchung von Lichteffekten auf den Photo- und Polarotropismus caulonematischer Filamente von *Physcomitrella*

Für Phototropismus-Untersuchungen wurden *Physcomitrella*-Filamente als rund 1 mm breiter Streifen auf eine Petrischale mit Medium und Cellophanfolie aufgetragen. Auf eine 10 d Dunkeladaptation folgte eine 24 h bis 3 d einseitige Bestrahlung der Filamente mit Rotlicht ($661 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$). Für die *Physcomitrella*-Filamente wurden Fluenz-Effekt-Kurven aufgenommen.

Revertierbarkeit einer eventuell positiv phototropen Reaktion wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden die Filamente wie oben beschrieben für 5 min mit Rotlicht bestrahlt, dann für weitere 5 min mit Dunkelrotlicht einer Wellenlänge von 730 nm und daraufhin für 50 min ohne Licht stehen gelassen. Dieses Bestrahlungsprogramm wurde für 24 h wiederholt. Als Kontrolle wurden Filamente wie oben für 5 min mit Rotlicht bestrahlt und dann für 55 min dunkel gestellt.

Außerdem wurden Bestrahlungen dunkeladaptierter caulonematischer Filamente für 24 h bis 3 d mit Blaulicht einer Wellenlänge von $437 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ und einer Fluenzrate von $1 \mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-2}$ durchgeführt.

Für Polarotropismus-Untersuchungen wurden dunkeladaptierte *Physcomitrella*-Caulonemata wie unter 2.1.2 beschrieben, behandelt. Mittels des vor den Dioden angebrachten Polarisationsfilter wurden E-Vektoren von 0° , 45° und 90° bezüglich der Wachstumsrichtung der Filamente eingestellt.

Resultierende phototrope Reaktionen wurden wie unter 2.1.2 beschrieben ausgewertet.

2.2 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

Für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie zur Beobachtung von injizierten Moosfilamenten wurde ein Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Kamera (MC 100, Zeiss) verwendet. Folgende Objektive kamen zum Einsatz: Plan Neofluar 10x/0,30; Plan Neofluar 20x/0,50; Plan Neofluar 40x/0,75; Plan Neofluar 100x/1,30 Öl; LD Achroplan (Long distance) 32x/0,40. Filterkombinationen für Anregung und Emission: Detektion von Chlorophyll (BP 450-490; FT 510; LP 520); Detektion von GFP (BP 485; FT 510; LP 520); Detektion von DAPI (BP 365; FT 395; LP 397); als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 100 W, Osram, Berlin, Deutschland).

2.3 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Chlorophyll- und GFP-Fluoreszenz wurde auch mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (LSM) beobachtet, welches aus einem Inversmikroskop (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) besteht und mit dem MRC 1024 Laserscan-System (Biorad, Hemel Hempstead, London, UK) mit einer Krypton-/Argon-Gas Laserquelle (American Laser Corporation, Salt Lake City, Utah, USA) eine Einheit bildet. Die Bildaufnahme und -verarbeitung erfolgte über einen PC mit der unter dem Betriebssystem OS 2 (IBM) laufenden Software Lasersharp 1.2 (Biorad). Die aufgenommenen Bilder wurden auf der Festplatte des PC gespeichert und zum Teil auf einem Optical-Disc- oder ZIP-Laufwerk archiviert und über einen Videoprinter (Mavigraph, Sony, Japan) ausgedruckt.

Es wurden die Plan-Neofluar-Objektive 20x/0,50; 40x/0,75 und 63x/1,40 Öl verwendet. Die 488 nm Blaubande des Lasers wurde für die Anregung verwendet. Zwei Photomultiplier (PMT) detektierten zwei unterschiedliche Lichtqualitäten: GFP-Fluoreszenz wurde am PMT 2 im Wellenlängenbereich von 500-560 nm und Chlorophyll-Fluoreszenz am PMT 1 oberhalb 680 nm (680 DF 32 *Cutoff*-Filter) detektiert. Die Intensität des anregenden Lichts und die Spannung an den PMT wurde so eingestellt, dass maximaler Kontrast erzielt wurde. Abbildungen sind als Falschfarben dargestellt: Das Signal am PMT 2 wurde Gelbgrün und das am PMT 1 Rot wiedergegeben.

2.4 Bakterienstämme

Ligationen in TA-Vektoren bzw. den Moosexpressionsvektor pBAS (Zeidler, 1995) wurden in den Stamm *Escherichia coli* K12; DH5 α MCR (Stratagene, Heidelberg) transformiert. Dieser ist als Δ (lacZ)M15-Genotyp ausgewiesen. D.h. er exprimiert das λ -Fragment der β -Galactosidase und ist daher ein geeigneter Wirt für die Transformation von rekombinanten Plasmiden, bei denen erfolgreiche Ligationen in eine MCS über *blue/white screening* durch α -Komplementierung (Sambrook and Russell, 2001) möglich ist (s. 2.11.11: verwendete Plasmide). DH5 α MCR ist *mcrA*⁻ und *mcrBC*⁻, eignet sich also gut für das Klonieren methylierter DNA. Er ist jedoch nicht *dam*⁻, das heißt GATC-Motive werden weiterhin am Adenin methyliert. Der Stamm eignet sich daher für die Transformation von Plasmiden, die für die *Site Directed Mutagenesis* über PCR verwendet werden (s.2.11.9). Weiterhin ist DH5 α MCR ein *amber*-Suppressor und rekombinationsdefizient. Unerwünschte Rekombinationen zwischen und innerhalb von Plasmid-Sequenzen ereignen sich nicht.

2.5 Hefestämme

Die Expression von CerpuPhy2 aus *Ceratodon* wurde im doppelauxotrophen Stamm BJ2168 (*ura3*, *trp1*) (Sorger and Pelham, 1988) von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. In diesen Stamm wurden die Plasmide p2 μ GCP2His und pG-N795 (Skena and Yamamoto, 1988) transformiert (Zeidler *et al.*, 1998), so dass in den Hefezellen heterolog His-getagtes Phytochrom (CP2His) exprimiert wird.

2.6 Puffer und Lösungen

Für alle Lösungen und Puffer wurde Wasser aus dem "Ultra-Pure Water System" von Millipore verwendet. Wurde der pH-Werts mit einer Base oder Säure eingestellt, so ist diese nach dem Pufferreagenz angegeben.

2.6.1 Chemikalien

Feinchemikalien stammten, sofern nicht explizit anders ausgewiesen, von Sigma oder Roth.

2.6.2 Moosmedien

2.6.2.1 1b-Medium

Dieses Medium wurde als Standardmedium für die Aufzucht von *Ceratodon purpureus* verwendet.

	Molgewicht	Stammlösung	Endkonzentration
KNO ₃	101	100 g/l	1 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	147	14,7 g/l	0,1 mM
KH ₂ PO ₄	136	13,6 g/l	1 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	246	10 g/l	40 µM
C ₆ H ₅ FeO ₇ x 5H ₂ O	335	3,4 g/l	10 µM

Von den oben angegebenen Stammlösungen wurde 1 ml/l in Wasser pipettiert und 1 ml/l der aus den unten angegebenen Stammlösungen hergestellten Spurenelementlösung nach Hoagland (angegeben sind die Endkonzentrationen im Medium) und 2 g/l Glucose dazugegeben. Vor der Agarzugabe wurde die Lösung mit KOH auf pH 5,8 eingestellt. Allen Nährmedien wurden 1,1 % Agar zugegeben, bevor die Lösungen in 1 l Flaschen (DURAN, Schott) bei 121 °C für 20 min autoklaviert wurden. Die 1 l - Flaschen wurden nur mit 800 ml gefüllt, um ein Überkochen der Medien während des Erhitzens zu verhindern.

2.6.2.2 Spurenelementlösung nach Hoagland

	Molgewicht	Stammlösung	Endkonzentration
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	250	55 mg/l	0,22 µM
H ₃ BO ₄	62	614 mg/l	10 µM
CoCl ₂ x6H ₂ O	274	55 mg/l	0,2 µM
NaMO ₄ x 2H ₂ O	242	25 mg/l	0,1 µM
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	288	55 mg/l	0,2 µM
MnCl ₂ x 4H ₂ O	198	389 mg/l	2 µM
KJ	166	28 mg/l	0,17 µM

2.6.2.3 BCE 2.0.5-Medium

Das Standardmedium für die Anzucht von *Physcomitrella* im Licht ist BCE 2.0.5. Verglichen mit 1b-Medium bietet es eine höhere Konzentration an Stickstoff (Ammonium) und Calcium, so dass ein langes unlimitiertes Wachstum möglich ist. Es wurde weiterhin für die Anzucht von *Ceratodon* auf Petrischalen mit Cellophanfolie verwendet, aus denen Protoplasten isoliert wurden. BCE 2.0.5-Medium besteht aus den Lösungen B, C und E, enthält zusätzlich 2 mM CaCl₂ (2), keine Glucose (0) und 5 mM Ammoniumtetrat (5).

	Molgewicht	Stammlsg.	Endkonz.
Lsg. B : MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246	25 g/l	1 mM
Lsg. C : KH ₂ PO ₄ pH 6,5 m. KOH	136	25 g/l	2 mM
Lsg. E: KNO ₃ ⁺ +	101	101 g/l	10 mM
Fe(III)Citrat C ₆ H ₅ FeO ₇ x 5H ₂ O	335	3,4 g/l	0,05 mM

Von den oben angegebenen Stammlösungen wurden 10 ml/l in Wasser pipettiert und 1 ml/l Spurenelementlösung nach Hoagland (s. 2.6.2.2) zugegeben. Vor der Agarzugabe

wurde die Lösung mit KOH auf pH 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden dem handwarmen, noch flüssigen Medium 2 mM $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ aus einer 500 mM Stammlösung und 5 mM Ammoniumtetrat $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ aus einer 500 mM Stammlösung steril filtriert hinzugeben (Sterilfilter: 0,2 μm ; Schleicher & Schuell, Deutschland), da diese Salze, falls vor dem Autoklavieren bzw. bei großer Hitze zugegeben, ausfallen.

2.6.2.4 BCE 2.2.5

Für das Wachstum von *Physcomitrella* im Dunklen wurde das Medium BCE 2.0.5 modifiziert (s. 2.1.3). Es enthält zusätzlich 0,2 % (w/v) Glukose.

2.6.2.5 Medium 3

Medium 3 ist ein Vollmedium, welches zur Identifizierung kontaminierter Mooskulturen verwendet wurde. Es besteht aus 1b-Medium, dem 0,3 % Hefeextrakt zugesetzt wurde. Nach der Hefezugabe wurde ein pH 5,8 mit KOH eingestellt. Von allen verwendeten Linien wuchs ständig ein Teil als Stammkultur steril auf Medium 3 im Kulturraum.

2.6.2.6 Medium 1 zum Dekontaminieren

Medium 1 wurde wie Medium 1b, jedoch ohne Zucker, hergestellt und zur Dekontamination nicht keimfreier Mooskulturen verwendet. Im Licht wachsen auf Medium 1 zwar die verwendeten Moose noch, Bakterien und Pilze jedoch wesentlich langsamer oder aber überhaupt nicht. Um kontaminierte Mooskulturen wieder keimfrei zu bekommen, wurden geringe Mengen Gewebe von kontaminierten Platten mit einer spitzen Pinzette etwa 1cm tief in Medium 1 eingebracht und die Petrischalen Dauerrotlicht ausgesetzt oder in den Kulturraum unter Standardbedingungen gestellt. Die nach einigen Tagen durch das Medium gewachsenen Filamente konnten isoliert werden und wurden auf Medium 3 steril weiter gezogen. Medium 1 diente außerdem zum Dekontaminieren von *gene replacement*-Mutanten, da diese nach der Isolation häufig mit Protonemen der für die Transformation eingesetzten *ptr116*-Mutanten kontaminiert waren. In Dauerrotlicht gestellt wuchsen die *ptr116*-Mutanten weiterhin aphototrop und nur spärlich, da sie kaum Chlorophyll produzieren (Lamparter *et al.*, 1997a), während die SDM-Mutanten zur Lichtquelle wuchsen und dadurch leicht isoliert werden konnten.

2.6.3 Bakterienmedien

LB (Luria Bertani): 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl

RB (Rich Broth): 2 g/l Glucose; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

Mit NaOH wurde pH 7.6 eingestellt und die Medien autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedium für Petrischalen wurde Bacto-Agar (1,5 % (w/v) (Sigma A9799) zu-

gegeben. Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (1 mM) und X-Gal (1 mM) erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50 °C aus sterilen Stammlösungen.

SOC: 20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂*; 10 mM MgSO₄*; 0,4 % (w/v) Glukose.

* nach dem Autoklavieren durch Sterilfilter zugegeben.

2.6.4 Hefemedium

HMM Hefe Minimalmedium:

5 g/l (NH₄)SO₄; 1,7 g/l Yeast Nitrogen Base (Difco); 7 g/l Casein Hydrolysate (Difco); 2 g/l Glukose.

Es wurde eine 10x Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und zum Gebrauch mit autoklaviertem H₂O 1:10 verdünnt. Als Festmedium wurden 900 ml H₂O mit 20 g Bacto-Agar (Sigma A9799) autoklaviert und 100 ml 10x HMM nach Abkühlen zugefügt.

2.6.5 Lösungen für die Phytochromextraktion aus Hefe

Extraktionspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,9; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM DTT
Desoxycorticosteronlg.	10 mM in EtOH

2.6.6 Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie

STE 20 mM Tris/HCl, pH 7,9
 20 mM NaCl
 1 mM EDTA

Säulenpuffer: N = NaCl, T = Tris pH 7,9, E = EDTA, IMI = Imidazol (in mM)

Basis- und Laufpuffer:	50 T 150 N 10 IMI
Waschpuffer (Hochsalz):	50 T 2000 N 10 IMI
Elutionspuffer :	50 T 150 N 250 IMI
Ammoniumsulfatpuffer :	50 T 5 E 3300 Ammoniumsulfat

Der pH wurde nach EDTA-Zugabe eingestellt.

2.6.7 Bradfordlösung

50 mg Coomassie G250 wurden in 25 ml 95 % EtOH und 50 ml 85 % Phosphorsäure gelöst und mit H₂O auf 500 ml aufgefüllt.

2.6.8 Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Probenpuffer (3x):	30 % Glycerin, 6 % SDS, 300 mM DTT, 4,8 ml Sammelgelpuffer pro 10 ml, 0,01 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer (4x):	1,5M Tris, 0,6 % SDS, pH 8,8 mit HCl
Sammelgelpuffer (4x):	500 mM Tris, 0,6 % SDS, pH 6,8 mit HCl
Laufpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,15 % SDS

Acryl-/Bisacrylamid-Stammlösung: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
APS-Stammlösung: 10 % Ammoniumpersulfat in H₂O
TEMED Stammlösung: 40 % N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin in H₂O

Stammlösungen	Trenngel	Sammelgel
Acryl-/Bisacrylamid-Stammlösung	4 ml	1 ml
Trenngelpuffer	4 ml	
Sammelgelpuffer		1,8 ml
Wasser	8 ml	4,7 ml
TEMED	20 µl	9 µl
APS	80 µl	24 µl

2.6.9 Lösungen für die Transformation von Moosprotoplasten

8 % D-Mannitol-Lösung:
 D-Mannitol 80 g
 H₂O 1 l
 Sterilisieren durch Autoklavieren.

Driselase-Lösung:
 2 % Driselase in 8 % D-Mannitol-Lösung, mischen, 15 min RT, 2500 g für 5 min Sterilfiltrieren.

MMM-Lösung:
 D-Mannitol 910 mg
 H₂O 8,85 ml
 Sterilisieren durch Autoklavieren. Bei Raumtemperatur lagern. Am Tag der Transformation zugeben:
 1M MgCl₂-Lösung 150 µl
 1 % MES-Lösung, pH 5,6 1 ml
 Sterilfiltrieren

1M MgCl₂-Lösung:
 MgCl₂·6H₂O 203,3 g
 H₂O 1 l

1 % MES-Lösung:
 1 % (w/v) 2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure in H₂O. pH 5,6 mit 0,1 M KOH einstellen. Sterilisieren durch Autoklavieren. Bei 4 °C lagern.

PEG-Lösung:
 Frisch am Tag der Transformation zubereiten.
 PEG 6000 4 g
 8 % (w/v) D-Mannitol/Ca(NO₃)₂-Lösung 10 ml
 PEG in der D-Mannitol/Ca(NO₃)₂-Lösung in der Mikrowelle vorsichtig lösen, heiss sterilfiltrieren. Lösung für 3 h vor der Transformation stehen lassen.

D-Mannitol / Ca(NO₃)₂-Lösung:
 Frisch am Tag der Transformation zubereiten.
 8 % (w/v) D-Mannitol-Lösung 9 ml
 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung 1 ml
 1 M Trispuffer, pH 8,0 100 µl
 Sterilfiltrieren

1M Ca(NO₃)₂-Lösung:Ca(NO₃)₂·4 H₂O 236,1 gH₂O 1 l

Sterilisieren durch Autoklavieren. Bei 4 °C lagern.

Recovery-Agar:

Recovery-Agar wurde aus BCE 2.2.5-Medium mit 8 % Mannitol und 1,1 % Agar hergestellt. Sterilisieren durch Autoklavieren

Top-Agar:

Top-Agar wurde aus BCE 2.2.5-Medium mit 8 % Mannitol und 1 % Agar hergestellt. Er wurde nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 42 °C im Warmwasserbad flüssig gehalten.

Recovery-Lösung:

BCE 2.2.5 Flüssigmedium mit 8 % Mannitol

2.6.10 Lösungen für die Extraktion von DNA aus *Ceratodon***2x CTAB-Extraktionspuffer:**

CTAB 2 % (w/v)

Tris/Cl; pH: 8,0 100 mM

EDTA (pH 8,0) 20 mM

NaCl 1,4 M

PVP MW 40.000 1 % (w/v)

β-Mercaptoethanol 1 % wurde frisch vor Gebrauch zugegeben.

1x CTAB-Extraktionspuffer:

1:1 Mischung von 2x CTAB-Extraktionspuffer mit MilliQ Wasser

10x CTAB:

CTAB 10 % (w/v) (erwärmen auf etwa 65 °C, da schwer löslich)

NaCl 700 mM

CTAB-Präzipitationspuffer:

CTAB 1 % (w/v)

Tris/Cl, pH 8,0 50 mM

EDTA, pH 8,0 10 mM

HS-TE:

Tris/Cl, pH 8,0 10 mM

EDTA, pH 8,0 1 mM

NaCl 1 M

20 % PEG-Lösung:

PEG 8000 20 % (w/v)

NaCl 2 M

Chl./IAA:

24 Vol Chloroform

1 Vol Isoamylalkohol

2.6.11 Lösungen für Agarose-Gelelektrophoresen**10x TE:**

Tris/HCl, pH 8,0 100 mM

EDTA, pH 8,0 10 mM

10x SLB:

Glycerol 50 % (v/v)

Xylene cyanol 2.5 µg/ml

Bromophenol blue 2.5 µg/ml

5x TBE:		50x TAE:	
Tris-Base	54 g/l	Tris-Base	242 g/l
Borsäure	27,5 g/l	Essigsäure	57,1 ml/l
EDTA, 0,5 M, pH 8	20 ml/l	EDTA, 0,5 M, pH 8	100 ml/l
Natriumacetat:		Ammoniumacetat:	
NaC ₂ O ₂ H ₃ , pH 5,5	3 M	(NH ₄)C ₂ O ₂ H ₃	10 M

2.6.12 Lösungen für das *Southern Blotting*

20x SSC:		Stringenz-Waschlösung 1 (1st Wash):	
NaCl	3 M	2x SSC	
Natriumcitrat, pH 7,0	300 mM	SDS	0,1 % (w/v)
Stringenz-Waschlösung 2 (2nd Wash):		Denaturierungslösung:	
0,2x SSC		NaOH	0,4 M
SDS	0,1 % (w/v)	NaCl	1,0 M
10x DIG1:		50 % Formamid:	
Maleinsäure/NaOH pH 7,5	1 M	mit AG 501-X8 resin (Biorad) deionisiertes Formamid, 1:1 verdünnt mit TE	
NaCl	1,5 M		
DIG2 (Blockierungs-Puffer):		DIG-Waschpuffer:	
1x DIG1		1x DIG1	
2 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche)		Tween 20	0,3 % (w/v)
DIG3 (Detektionspuffer):		Detektions-Lösung:	
Tris/HCl, pH 9,5	100 mM	DIG3 mit CDP-Star (1:100)	
NaCl	100 mM		

2.7 Mikroinjektion

2.7.1 Pflanzenmaterial und Aufzucht

Für die Mikroinjektion wurden auf 1b-Medium aufgezogene *Ceratodon*-Filamente vom Wildtyp wt4 und aphototropen *ptr*-Mutanten verwendet. *Physcomitrella*-Filamente des Wildtyps wtDC wurden auf Medium BCE 2.2.5 (s. 3.5.1) angezogen. Moosgewebe wurde mit einem Ultraturrax (T 25, Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland) in Wasser zerkleinert, gleichmäßig dünn auf Petrischalen mit Medium und Cellophanfolie verteilt und 7 d im Klimakonstantraum angezogen, bis ein feines Protonemageflecht gewachsen war. Winzige Mengen des Protonemas wurden dann auf 1 cm x 1 cm große Cellophanblättchen, die in Petrischalen auf Medium auflagen, aufgebracht und wuchsen für 5 - 10 d senkrecht stehend im Dunklen.

2.7.2 Grenzplasmolyse

Vorbereitend für die Injektion wurde die Grenzplasmolyse der Protonemazellen ermittelt, um den Turgor so weit wie möglich herabzusenken, ohne dass die Zellen plasmolysieren. Dazu wurden Cellophanblättchen mit 0,5 - 1 cm langen negativ gravitrop gewachsenen Protonemazellen in Petrischalen übertragen, die 1b-Medium und Mannitol in Konzentrationen von 200 mM bis 500 mM enthielten. Das Erreichen der Grenzplasmolyse wurde an einem Mikroskop (Olympus CK2, Japan) mit Fotoeinrichtung (Olympus OM2, Japan) protokolliert und fotografisch ausgewertet. Die Osmolarität der eingesetzten Mannitol-Lösungen wurde mit einem Osmometers (Osmomat 030-DMA, Cryoscopic Osmometerprinters, Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland) ermittelt.

2.7.3 Injektor

Die hier eingesetzte Mikroinjektionsanlage besteht aus dem Mikroinjektor (Transjector 5246 basic, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) gekoppelt mit einem Mikromanipulator (Micromanipulator 5171, Eppendorf), der sich aus drei Komponenten zusammensetzt: Einer Moduleinheit aus drei Schrittmotoren, die in Richtung der X-, Y- oder Z-Achse bewegt werden können, einem Steuerpult zur Programmierung der Arbeitsparameter mit Tastatur und *Joystick* und der Leistungseinheit, die die Elektronik des Mikromanipulators enthält. Die Funktionen des Mikroinjektors wurden ebenfalls über ein programmierbares Bedienpult eingestellt. Ein Piezo-Stepper (Modell 5172, Eppendorf), in den der Kapillarenhalter samt Kapillare eingespannt wird, wurde für den schnellen Vortrieb der Injektionskapillare verwendet. Die Moduleinheit des Mikromanipulators wurde auf einem inversen Olympus-Mikroskop (s. 2.7.2) mit Fotoeinrichtung montiert.

2.7.4 Injektionskapillaren

Es kamen nur selbstgezogene Glaskapillaren zum Einsatz. Diese wurden mittels eines Pullers (Getra, München, Deutschland), bestückt mit einer 90 % Platin-/10 % Iridium-Heizspirale, gezogen. Zum Ziehen der Spitzen wurden Borosilicatglas-Kapillaren mit Filament (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) mit einer Länge von 100 mm, einem Außendurchmesser von 1,5 mm, einem Innendurchmesser von 0,87 mm und einem inneren Filament von 0,2 mm Stärke verwendet. Beladen wurden die Kapillaren vor dem Einspannen in den Kapillarenhalter von hinten mit *Microloaders* (Eppendorf).

2.7.5 Durchmesser der Injektionskapillaren

Der innere Durchmesser der selbstgezogenen Injektionskapillaren wurde mittels der *bubble pressure*-Methode (Schnorf *et al.*, 1994) ermittelt. Dazu wurde die Spitze der Injektionskapillare mittels des Mikromanipulators in 100 % EtOH gebracht und kontinuierlich ansteigend ein Injektionsdruck auf die mit Luft gefüllte Kapillare gegeben, bis Blasen im EtOH sichtbar wurden. Anhand eines Diagramms konnte der Innendurchmesser

der Kapillarenspitze, der mit dem ermittelten Druck, der die Luft in das EtOH presste, korreliert, direkt abgelesen werden.

2.7.6 Injektions-Lösungen

Das in DMSO gelöste PCB wurde für die Injektionen in einer Konzentration von 100 μM in TE-Puffer gelöst.

Injektionspuffer für die Injektion von CerpuPhy2: 10 mM Phosphatpuffer, 0,1 mM EDTA, pH 7,8.

Nukleinsäuren wurden in autoklaviertem mQ-H₂O gelöst. Die Konzentration der injizierten DNAs lag bei 1 – 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.7.7 Injektion

Die Injektionen wurden nur mit Mooszellen, die auf osmotisches Medium überführt wurden, durchgeführt. Folgende Objektive kamen dabei am Olympus-Mikroskop zum Einsatz: A4 4x/0,10; A10 PL 10x/0,25; CA20 PL 20x/0,40 und CD Plan 40x/0,55. Injiziert wurden nur Spitzenzellen von völlig gerade gewachsenen Filamenten. Häufig wurden diese nach der Injektion dadurch markiert, dass mit der Injektionskapillare eine feine Linie neben dem Zellapex der injizierten Zelle gezogen wurde. Die Spitze der Injektionskapillare wurde nach 10 - 20 Injektionen, bzw. wenn die Kapillare verstopft war, neben eine Protonemaspitze in den Agar versenkt und abgebrochen. Da die Zellen nach der Injektion sofort am Nikon Binokular (s. 2.1.2) fotografiert wurden, ermöglichte diese Vorgehensweise ein exaktes Auffinden injizierter Zellen nach Inkubation mit Rotlicht und erneuter fotografischer Aufnahme. Beobachtete Ergebnisse (s. 2.1.2), die zum Teil auch auf Grund von Fluoreszenzeigenschaften, z.B. Autofluoreszenz von Chlorophyll oder GFP-Fluoreszenz, auswertbar waren, wurden entweder konventionell am Zeiss-Mikroskop fotografisch festgehalten (s. 2.2) oder die Injektionsergebnisse mittels konfokaler Laser *Scanning* Mikroskopie wie unter 2.3 geschildert verarbeitet und archiviert.

2.7.8 Optimale Methode für die Injektion von Moosprotonema-Spitzenzellen

Selbstgezogene Kapillaren mit einem extrem kleinen Innendurchmesser von 0,25 - 0,3 μm an der Spitze führten zu erfolgreich durchgeführten Mikroinjektionen (Brücker, 1997). Injektionen erfolgen am Besten im basalen Teil der Spitzenzelle. Die Zellen mussten dunkeladaptiert und während der Injektion so wenig wie möglich dem Licht ausgesetzt sein. Dieses erleichterte der Kapillarenspitze das Durchstoßen der Zellwand. Möglicherweise baut diese im Licht vermehrt Verstärkungselemente ein. Injiziert wurden die auf Cellophanfolie aufliegenden Filamente auf 1b Nährmedium, welchem 250 mM Mannitol als Osmotikum zugegeben wurde. Die Injektionen wurden bei einem Kompressionsdruck von 100 hPa und einem Injektionsdruck von 7000 hPa (entspricht 100 PSI und ist der maximal am Kompressor des Transjektors erzeugbare Druck) durchgeführt. Die Injektionszeit betrug 3 - 5 Sekunden. Der Piezo-Stepper, der für die Durchführung erfolg-

reicher Injektionen unabdingbar ist, und in den die Injektionskapillare eingespannt wird, wurde auf einen axialen Vortrieb von 3 - 5 μm eingestellt. Unter diesen Bedingungen überlebten über 50 % der injizierten *Ceratodon*- und *Physcomitrella*-Zellen (Brücker, 1997).

Die Quantifizierung der injizierten Volumina wurde mit Hilfe der von Minaschek etablierten Methode (Minaschek *et al.*, 1989) durchgeführt. Dabei wurde Fluorescein in ein niederviskoses Öl injiziert und das Volumen des fluoreszenten Tropfens mit 500 fl berechnet. Hierbei handelt es sich um einen Höchstwert, der sich bei der Injektion von lebenden Zellen durch den Turgor der Zellen verringern kann.

2.8 Reinigung von Phycocyanobilin aus *Spirulina geitleri* durch Methanolyse

Die Aufreinigung von Phycocyanobilin PCB erfolgte unter leichten Abänderungen nach (Kufer and Scheer, 1979; Kunkel *et al.*, 1993). Alle Arbeiten erfolgten unter dem Abzug.

2.8.1 Extraktion von Chlorophyll

Zuerst wurde störendes Chlorophyll mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Das an Phycocyanin gebundene PCB wurde bei dieser Prozedur nicht ausgewaschen. Es wurden 50 g trockene *Spirulina*-Zellen eingewogen, dazu 300 ml Methanol (MeOH) gegeben und gut geschüttelt. Nach 5 min bis 15 h wurde das MeOH durch einen Filter (oder eine Fritte) abgeleert und die Cyanobakterien gesammelt. Dieser Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis kein Chlorophyll mehr sichtbar war und die Zellen blau aussahen. Das Methanol wurde im Rotationserdampfer bei $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ rückdestilliert.

2.8.2 Methanolyse

Die *Spirulina*-Zellen wurden in einer Extraktionshülse in eine Soxhlett-Apparatur überführt und mit 200 bis 250 ml MeOH extrahiert. Im Abstand von 4 bis 24 h wurde das MeOH dreimal durch frisches MeOH ersetzt. Die letzte Extraktion erfolgte über Nacht. Dieses resultierte in Methanolyse 1 - 4. Die Fraktion 3 und 4 wurden in einem Rundkolben vereinigt, Siedesteine zugegeben und im Rotationsverdampfer (Druck $< 200\text{ mbar}$, Wasserbadtemp. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) auf 30 ml eingeeengt.

2.8.3 Ausschütteln

Zu dem eingeeengten Extrakt wurden 70 ml Diethylether gegeben und das Ganze in einen Scheidetrichter gefüllt. Die organische Phase wurde mit 100 ml 1% Zitronensäure extrahiert. Im Scheidetrichter wurde durch vorsichtiges Schwenken und mehrmaliges Entlüften ausgeschüttelt bis der Dampfdruck auf Null war und die beiden Phasen sich trennten. Das blaugrüne PCB befand sich in der oberen Etherphase, die sofort mit dem gleichen Volumens NaHCO_3 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,5 % w/v) ausgeschüttelt wurde. Das PCB befand

sich nun in der unteren wässrigen Phase. Da es ist im alkalischen instabil ist, wurde ab hier zügig auf Eis weitergearbeitet. Es wurde solange feste Zitronensäure zugegeben (rund 1 % w/v des Extraktes), bis es zu einem Farbumschlag kam. Das PCB war jetzt wieder sauer (pH 3,6). Der NaHCO_3 -Extrakt wurde 2 x in 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Das PCB ging dabei in die untere Chloroform-Phase. Da angesäuert wurde, wurde die CHCl_3 / PCB - Phase noch einmal mit milli-Pore H_2O ausgeschüttelt. Mit Natriumsulfat wurde dem CHCl_3 /PCB-Extrakt das restliche Wasser entzogen. Es wurde etwa eine Spatelspitze Natriumsulfat zugegeben, geschüttelt und sofort in einen Rundkolben filtriert (Filter IG 3 von Schott), in dem das Extrakt dann im Rotationsverdampfer auf 5 bis 10 ml eingengt wurde (< 200 mbar, Wasserbadtemp. 30°C).

2.8.4 Kristallisieren in Hexan.

Der CHCl_3 /PCB-Extrakt wurde in eiskaltes Hexan gegeben und ü. N. kalt gestellt. Das PCB kristallisierte dabei aus. Das Hexan wurde vorsichtig abgesaugt und restliches Hexan durch Zentrifugieren des PCB bei 2000 g (4°C) entfernt. Die feuchten PCB-Kristalle wurden auf zwei $1,6\text{ ml}$ Kunststoff-Reaktionsgefäße verteilt in einer *Speed-Vac* eingetrocknet und in $10 - 100\ \mu\text{l}$ DMSO gelöst. Es wurden möglichst hohe PCB Konzentration angestrebt, da die DMSO-Konzentration sonst für die Mikroinjektion bzw. Assemblierung mit Phytochrom zu hoch geworden wären. Für die nachfolgende HPLC-Reinigung wurde MeOH zum Lösen verwendet. Die PCB-Lösung wurde bei -70°C gelagert.

2.8.5 HPLC-Aufreinigung

Alternativ wurde auch HPLC aufgereinigtes PCB verwendet. Diese Aufreinigung wurde von der technischen Assistentin Connie Görick durchgeführt. Verwendet wurde eine C18 Säule von SepServ (Separation Service Berlin, Vertriebsgesellschaft Dr. Eppert & Co, Tel. 3930991, Säule PHA18E7258/1 $8 \times 250\text{ mm}$, UltraSep ES PHARM RP $18\ 7\ \mu\text{m}$ *Endcapped*) mit einer Flussrate von 3 ml/min . Der Druck durfte nicht über 210 bar steigen. Getrennt wurde isokratisch mit Essigsäure/Methanol/Wasser $1/50/50$ (v/v/v). Auftrag: max. 1 ml PCB im Laufmittel gelöst mit einer OD von etwa 40 . Die Fraktionen wurden im 1 min Takt gesammelt. Unter optimalen Bedingungen erfolgte die Elution nach etwa 40 min . Kontrolliert wurde dieses über das Absorptionsspektrum des Eluats, dessen Maximum bei 687 nm liegen sollte. Anschließend wurde das Lösungsmittel über eine C18 Kartusche ausgetauscht. Dazu wurde das PCB durch die Kartusche gespritzt, diese kurz mit Wasser gespült und mit Methanol eluiert. Das HPLC aufgereinigte PCB wurde bei -70°C gelagert.

2.8.6 Bestimmung der PCB-Konzentration

1. Absorptionsspektrum in Saurem pH: Von der PCB-Lösung wurde, gelöst in 1 M HCl/MeOH (10% HCl), ein Absorptionsspektrum erstellt (*Fastscan* bei $250 - 800\text{ nm}$, Nullwert mit DMSO in HCl/MeOH). Der Extinktionskoeffizient ϵ im Absorptionsmaxi-

mum (690 nm) liegt bei $37900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Cole *et al.*, 1967). Für diese Messung musste entweder 1/100 oder 1/1000 verdünnt werden.

2. Spektrum in wässrigem Puffer bei pH 7,8: Das Absorptionsmaximum ist jetzt bei 610 nm, der Extinktionskoeffizient ϵ liegt bei rund $16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Verdünnung war wie unter 1.

Die Konzentration c wurde nach dem Lambert Beer'schen Gesetz berechnet (E: Extinktion, d: Schichtdicke): $c=E/(\epsilon \times d)$.

2.9 Expression und Affinitäts-Chromatographie von *Cerato-* *don-Phytochrom CerpuPhy2His* in *Saccharomyces*

Die Methode für die Expression, Extraktion und Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie ist im Detail in (Zeidler, 1998) beschrieben. Abweichend von diesem Protokoll wurde die Hefe mittels einer *French Press* bei 20.000 PSI aufgeschlossen. Sofort nach der Extraktion wurde reines PCB in DMSO zugegeben. Sättigend waren 15 – 20 μl 20 mM PCB/DMSO für die Extraktion von Hefe aus vier Schikanekolben á 1,5 l. Die gesamte Aufreinigung erfolgte in einer auf 4 °C gekühlten Klimakammer.

Die folgenden Messungen wurden von jedem Schritt der Chromatographie bzw. anschließenden Konzentration protokolliert:

- a) Absorptionsspektrum nach Hellrot-Bestrahlung;
- b) Absorptionsspektrum nach Dunkelrot-Bestrahlung;
- c) Differenzspektrum;
- d) Proteinmenge gesamt nach Bradford (Bradford, 1976; Spector, 1978).
- e) Ausserdem wurden Aliquots für SDS-PAGE abgenommen (100 μl der Proteinlösung auf 50 μl 3x Probenpuffer).

Für die Mikroinjektion von *CerpuPhy2His* wurden die eluierten Phytochrom-Fractionen, deren Phytochromgehalt über ein Differenzspektrum bestimmt wurde, sofort nach der Elution konzentriert und umgepuffert. Dazu wurden die Fractionen in mittleren (Centrex UF 2, 30 - 100 kDa, Schleicher & Schuell) oder großen (Macrosep, 100 – 300 kDa, Filtron) Zentrifugen-*Concentrators* auf 0,5 - 1 ml konzentriert (4000 g, 4 °C). In 90 min wurden so 4 ml Eluat auf 0.5 ml konzentriert. Über eine NAP-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB) wurde das Konzentrat nach Anweisung des Herstellers entsalzt (Imidazol wegwaschen) und gleichzeitig in Injektionspuffer aufgenommen. Die entsalzte Phytochromlösung wurde mit kleinen Zentrifugen-*Concentrators* (Centrex UF 0,5, 100 kDa) bei 1000 g, 4 °C auf 1,0 - 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Phytochrom erneut konzentriert. Vor der Injektion wurde unlösliches Phytochrom bei 28.000 g für 15 min pelletiert und der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben wurden bis zur Injektion ständig auf Eis gelagert.

2.10 DNA-Isolierung aus *Ceratodon*

Die hier beschriebenen Methoden verwenden das kationische chaotrope Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid CTAB. Es bildet mit DNA einen unlöslichen Komplex, wenn die anfängliche Natrium-Konzentration auf rund 0,5 M abgesenkt wird (Rogers and Bendich, 1985). Polysaccharide, phenolische Komponenten und andere enzyminhibierende Kontaminationen werden mit dem Überstand effektiv entfernt, da sie unter den beschriebenen Bedingungen nicht präzipitierten. Der Nukleinsäure-CTAB-Komplex ist in Hoch-Salz-Puffer (HS-TE) löslich. Das Detergenz wurde nach dem Lösen entfernt, indem die DNA als Natrium-Salz gefällt und mit 70 - 80 % EtOH gewaschen wurde. CTAB ist in EtOH weit besser löslich und wurde mit der Waschlösung verworfen.

2.10.1 *Ceratodon*-DNA-Miniprep für PCR-Analysen von Transformanten

Diese Methode diente der Extraktion kleiner Mengen DNA für PCR-Analysen von Transformanten. Für PCRs sollte DNA ein Mindestmaß an Sauberkeit mitbringen, sie muss aber nicht besonders hochmolekular sein. Gleichzeitig sollte die Methode möglichst schnell sein, damit gegebenenfalls ein *Screening* einer größeren Zahl von Proben möglich war. Ein solches Screenen sollte Kontaminationen der DNAs, wie es z.B. bei Verwendung von einem Mörser für mehrere Proben zu erwarten ist, ausschließen.

In ein 1,6 ml Reaktionsgefäß wurden 10 bis 100 mg Frischgewicht Mooskultur überführt und 50 - 125 µl Extraktionspuffer, abhängig von der Menge an Frischgewicht, zugeben. Das Moos wurde für etwa 30 s mittels eines Kunststoff-Pistills, eingespannt in eine Bohrmaschine, bei rund 500 rpm unter gleichmäßiger Bewegung des Reaktionsgefäßes homogenisiert. Dann wurde eine kleine Spatelspitze Sand zugegeben, gegebenenfalls mit Extraktionspuffer auf 125 µl aufgefüllt und die Probe für eine weitere Minute unter gleichmäßiger Bewegung des Reaktionsgefäßes aufgeschlossen. Der Pistill wurde mit weiteren 125 µl Extraktions-Puffer gespült, die Probe kurz gevortext und das Reaktionsgefäß in ein 65 - 68 °C Wasserbad überführt, in dem es für 2 - 60 min verblieb. Für jede Probe wurde ein frischer Kunststoff-Pistill verwendet. Gebrauchte Pistills wurden zum depurinieren in 2 M HCl gesammelt. Bis zu 20 Proben wurden im Wasserbad gesammelt.

Nach Entnahme der Proben aus dem Wasserbad und Zugabe von 200 µl ChI/IAA, wurden die Proben kräftig gevortext und für 3 - 5 min bei RT (13.000 rpm) zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200 µl ohne Interphasepartikel zu pipettieren abgenommen, 0,7 - 0,8 Vol. Isopropanol zugegeben, gründlich gevortext und wiederum bei RT wie oben zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 200 µl 70 % EtOH (-20 °C) eine Minute bis ü. N. gewaschen und erneut für etwa 1 min wie oben zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Pellets angetrocknet. Die DNA wurde in 40 µl TE für 10 min im 68 °C Wasserbad gelöst, hart gevortext, für weitere 5 min bei 68 °C gelöst

und wieder gevortext und kurz anzentrifugiert. Die Proben wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgehoben. Für eine $20\text{ }\mu\text{l}$ -PCR wurden $1 - 2\text{ }\mu\text{l}$ der DNA-Lösung eingesetzt.

Alternativ kam zur Isolation von Gesamt-DNA aus den SDM-Mutanten auch das DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen) zum Einsatz. Abweichend von den Herstellerangaben wurden die Mooszellen mechanisch wie oben beschrieben im mitgelieferten Extraktionspuffer aufgeschlossen. Eluiert wurde mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Elutionspuffer. Drei μl des Eluats wurden für eine $20\text{ }\mu\text{l}$ PCR eingesetzt.

2.10.2 Extraktion von Gesamt-DNA aus *Ceratodon* für Southern-Analysen

Die Extraktion größerer Mengen hochmolekularer DNA, die sich mit den üblichen DNA-modifizierenden Enzymen bearbeiten lässt, beispielsweise für *Southern Blots*, erfordert weitaus größere Sorgfalt als Miniprep-Techniken, deren Produkte lediglich in PCRs einfließen sollen. Das durchschnittliche Molekulargewicht der DNA-Moleküle hängt vom Ausmaß der Scherkräfte während der Extraktion und von der Wirkung von DNasen ab. Die hier beschriebene Methode wurde von F. Mittmann nach (Rogers and Bendich, 1985) in seiner Diplomarbeit optimiert (Mittmann, 1997). DNA-Lösungen wurden langsam und nur mit Pipettenspitzen pipettiert, deren Spitze abgeschnitten wurde. Pflanzen sind reich an Nukleasen. Probenmaterial wurde daher schnellstmöglichst mit flüssigem N_2 gefroren, in diesem Zustand mechanisch aufgeschlossen und dann in einem Extraktionspuffer aufgetaut, der EDTA und Detergenzien enthielt. Das EDTA chelatisiert divalente Kationen, welche von den meisten Nukleasen als Cofaktoren benötigt werden.

Die NaCl-Konzentration lag vor der Präzipitation bei $0,7\text{ M}$ und nach Zugabe von Präzipitationspuffer bei $0,35\text{ M}$. Bei der Extraktion wurde unterstellt, dass 1 g Pflanze in erster Näherung 1 ml Wasser entsprach. Die pflanzliche NaCl-Konzentration wurde vernachlässigt. Pro g Pflanzenmaterial wurde 1 ml $2\times$ CTAB-Extraktionspuffer eingesetzt. Durch diese Mischung wurden die Konzentrationen von NaCl und CTAB aus dem $2\times$ CTAB-Extraktionspuffer halbiert und waren daher wie im $1\times$ CTAB-Extraktionspuffer bei $0,7\text{ M}$ NaCl und 1% CTAB. Durch Zugabe von 1 Vol. Präzipitationspuffer wurde die NaCl-Konzentration auf rund $0,35\text{ M}$ halbiert, während die CTAB-Konzentration unverändert blieb. Die DNA sollte ungefähr 50 kb Durchschnitts-Fragmentgröße aufweisen.

Ein großer Mörser von 20 cm \varnothing wurde in einem Styroporgefäß mit flüssigem N_2 temperiert und darin $5 - 20\text{ g}$ Moosprotonemen zusammen mit 1 Vol. $2\times$ CTAB Extraktionspuffer zu einem feinen Puder gemörsert. Der Mörser war dabei ständig mit flüssigem N_2 gefüllt. Der vollständige Aufschluss wurde mikroskopisch bestätigt. Das Pulver wurde zu 2 Vol. auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmten $1\times$ CTAB (+ 2ME) in 50 ml Sarstedttubes gegeben und für $5 - 7\text{ min}$ im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol. Chl./IAA wurde gut aber vorsichtig unter mehrmaligem Entlüften des Deckel geschüttelt und 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Spuren der Interphase in ein neues 50 ml Tube überführt, das Volumen bestimmt, $1/10\text{ Vol.}$ $10\times$ CTAB-Puffer bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugegeben und gemischt bis sichtbare Schlieren verschwanden. Es wurde eine weitere Chloroformextrakti-

on durchgeführt und 1,1 Vol. CTAB-Präzipitationspuffer zugeben. Die Nukleinsäuren wurden für 15 min bis 1 h bei 65 °C gefällt (Ausubel *et al.*, 1988) und 5 min bei 2000 x g pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in HS-TE gelöst. Die gelösten Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 2 Vol EtOH gefällt, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und in TE gelöst. Die Lösung wurde 10 min bei RT mit RNaseA, Endkonzentration 1 µg/ml, inkubiert und die DNA ü. N. nach Zugabe von 1 Vol. 20 % PEG/2M NaCl-Lösung (Sambrook and Russell, 2001) präzipitiert und bei 10.000 x g, 4 °C, für 15 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in TE gelöst, Chloroform extrahiert und mit 1/4 Vol. 10 M NH₄Ac plus 2,5 Vol. 100 % EtOH gefällt (Sambrook and Russell, 2001), mit 70 % EtOH gewaschen, leicht angetrocknet und wieder in TE gelöst. Mittels Absorptionsspektrum von 200 - 300 nm wurde die Reinheit der DNA-Lösung ermittelt (A_{260}/A_{280} sollte > 1.8 sein; von allen Werten wurde A_{300} abgezogen) und deren Konzentration c (Sambrook and Russell, 2001) bestimmt (c (µg/ml) = $A_{260} \times 50$ µg/ml x [Verdünnungs-Faktor]). Ein Aliquot der DNA-Lösung wurde auf ein 0,7 % TBE-Gel mit Marker und Lambda-DNA (48,5 kb) aufgetragen und so die durchschnittliche Molekülgröße geschätzt.

2.11 Klonierung von DNA-Fragmenten

Klonierungen wurden hauptsächlich wie in den Protokollen bei (Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook and Russell, 2001) beschrieben durchgeführt.

2.11.1 Agarosegel-Elektrophorese

Je nach Größe der elektrophoretisch aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,7 - 2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Je kleiner die zu erwarteten Fragmente, desto höherprozentig waren die eingesetzten Gele. Produkte von PCR-Reaktionen, Restriktionsanalysen und von DNA-Extraktionen wurden durch Auftrennung in Agarosegelen mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) untersucht. Die Färbung der DNA erfolgte nach Abschluss der Elektrophorese in TBE-Puffer versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Präparative Gele wurden mit einer bei niedrigen Temperaturen schmelzenden Agarose (LMP-Agarose), gelöst in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), durchgeführt. Ethidiumbromid in der oben genannten Konzentration war diesem Puffer bereits zugegeben. Die Konzentration der LMP-Gele lag ebenfalls zwischen 0,7 - 2 % (w/v). Agarosegele wurden durch Einwiegen von Agarose in TBE- bzw. TAE-Puffer und Auflösen in einem Mikrowellengerät hergestellt. Der Auftrag der zu untersuchenden Proben auf das Gel erfolgte nach Zugabe von SLB. Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde durch UV-B-Illumination sichtbar gemacht. Das eingesetzte UV-Licht des Transilluminators (UV-Products Inc., San Gabriel, USA) regt das Ethidiumbromid zu einem orangenen Leuchten an (~590 nm) und macht somit die DNA-Banden sichtbar, mit der es interkaliert. Die Nachweisgrenze einer scharfen Bande liegt mit dieser Methode bei etwa 5 - 10 ng DNA. Die Gele wurden mit einer Videokamera aufgenommen und zur Dokumentation fotografiert (Herolab).

2.11.2 Präparation von Plasmid-DNA

DNA-Plasmid-Präparationen erfolgten mittels alkalischer Lysis als Mini-, Midi- oder Maxi-Präparation aus 2 - 3 ml, 100 ml bzw. 500 ml über Nacht gewachsener Bakterienkulturen. Es wurden die entsprechenden DNA-Plasmid Mini-, Midi- oder Maxi-Isolierungskits (Qiagen GmbH) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.11.3 PCR

Für die Durchführung von PCR-Reaktionen wurden ein Biometra Trio Thermoblock, der dreimal 20 Reaktionsgefäße je 0,5 ml aufnehmen konnte oder ein Biometra TGradient Thermocycler für 96 Reaktionsgefäße je 0,2 ml, verwendet. Die PCRs wurden nach (Gassen and Schrimpf, 1999) und (Sambrook and Russell, 2001) durchgeführt. Taq-DNA-Polymerase, der mitgelieferte Puffer und $MgCl_2$ (Invitrogen) wurden für Standard-PCRs eingesetzt. Für die Herstellung größerer PCR-Produkte wurde TaKaRaEx Taq-DNA-Polymerase (TaKaRa) verwendet. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide (s. 2.11.12) wurden als Lyophilisat von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen und in einer Konzentration von 100 μM in TE-Puffer gelöst.

Folgende Mengen bzw. Konzentrationen wurden für Standard-PCRs verwendet: 0,2 Unit DNA-Polymerase in einem 20 μl Reaktionsansatz; 200 μM je dNTP Desoxynukleotide (Perkin Elmer Cetus; GeneAmp dNTPs); die Magnesiumkonzentration betrug 1,5 - 3,0 mM; die Primerkonzentration betrug je 0,5 μM . Von der *template*-DNA wurden bei Verwendung von Plasmiden 1 - 10 pg DNA eingesetzt oder von pflanzlicher Gesamt-DNA 10-100 ng.

Soweit als möglich wurden Reaktions-Mastermixe aus gemeinsamen Komponenten für die verschiedenen Ansätze hergestellt, um das Pipettieren kleiner Volumina zu vermeiden und möglichst vergleichbare Reaktionsbedingungen zu garantieren. Auf eine anfängliche Denaturierung für 1 min bei 96 °C folgten 25 - 30 Zyklen nach folgendem Temperaturprogramm: 30 s Denaturierung bei 96 °C; 30 s *Annealing*; 2 min Elongation bei 68 °C. Abschließend wurde für weitere 5 min bei 68 °C inkubiert, bevor die Ansätze auf 4 °C heruntergekühlt wurden.

Die *Annealing*-Temperaturen T_{an} wurde nach (Baldino *et al.*, 1989) berechnet: für jeden Cytosin- und Guaninrest wurden 4 °C, für jeden Adenin- und Thyminrest 2 °C berechnet und die Summe aus allen Resten des Oligonukleotids gebildet. Bei den verwendeten Primern wurden in der Regel *Annealing*-Temperaturen zwischen 58 °C und 72 °C gewählt. Kamen Primerpaare mit unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen zum Einsatz, wurde der niedrigere Wert berücksichtigt. Für die Extensionszeit wurden pro 1000 bp des erwarteten PCR-Produkts 60 s gewählt. Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 5 μl Aliquots der Ansätze auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Falls erforderlich, wurden PCR-Amplifikate mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH) gereinigt.

2.11.4 Klonierungen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen GmbH) entsprechend den Instruktionen des Herstellers. Restriktionsenzyme, Ligasen, Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP), RNase, Polynukleotidkinase wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB), Promega oder Boehringer bezogen. PCR-DNA-Polymerasen (Taq-Polymerasen) stammten von den Firmen Gibco, Amersham oder Roche, TaKaRaEx-DNA-Polymerase (rekombinant) wurde von Stratagene, dNTPs von Pharmacia bezogen. DNA-Sequenzierungen erfolgten mit Hilfe des ABI Prism-Dye-Terminator-System (Big Dye / FS-Kit, Perkin Elmer) und einem Trio Thermoblock (Biometra). Die Sequenzierungsreaktionen wurden von Martin Meixner (DLMBC, Berlin) kommerziell durchgeführt. Das Prism Dye Terminator-System basiert auf der Dideoxy-Terminations-Sequenzierungs-Reaktion nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die vier Didesoxynukleotide und damit die Terminationsprodukte sind hier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Es wurden entweder gereinigte PCR-Produkte (s. 2.11.3) oder linearisierte Plasmide als Matritze für die Sequenzierungen eingesetzt. DNA-Mengen und das Temperatur-Programm orientierten sich an den Herstellerangaben. Es wurden jeweils beide Stränge sequenziert und die Sequenzierdaten mit Hilfe der Programme Chromas und VectorNTI analysiert.

2.11.5 Enzymatische Behandlung von DNA

Klonierungen wurden nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Die Verwendung spezifischer Restriktionsenzyme zum Schneiden der DNA-Moleküle erfolgte nach den Herstellerangaben. DNA-Fragmente wurden in LMP-Agarose (s. 2.11.1) aufgetrennt und mit Hilfe des DNA Purification Kit (Biozym Diagnostik GmbH) mittels *glassmilk* bzw. mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) gereinigt. Für Ligationen von DNA-Molekülen wurde T4 DNA-Ligase bzw. das Quick Ligation Kit (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. CIAP für Dephosphorylierungen von Vektor-DNA und T4-Polynukleotidkinase für die Phosphorylierung der 5'-Enden von PCR-Produkten (NEB) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für Ligationen mit glatten Enden wurde die DNA-Fragmente vor der Gelreinigung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, der Vent-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase (NEB) nach Herstellerangaben *geblunted*.

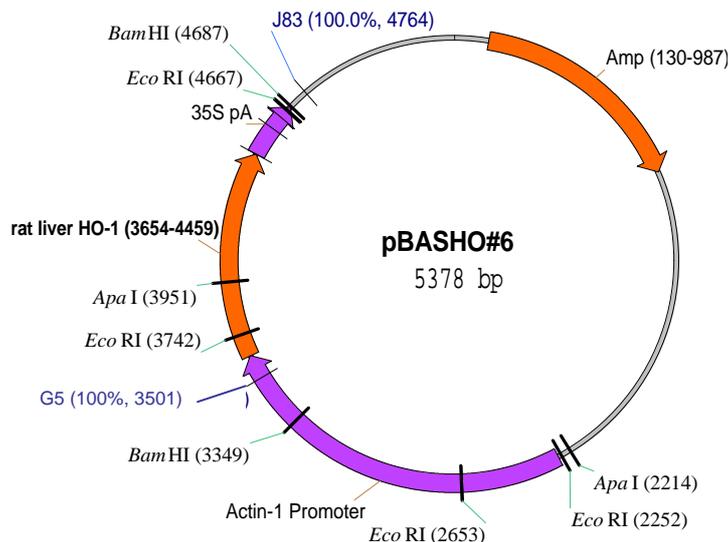
2.11.6 Klonierungen für Expressionskonstrukte in *Ceratodon*

Für die konstitutive Expression von Genen in *Ceratodon* (s. 2.11.6.1 - 2.11.7) wurde das Plasmid pBASterm (Zeidler, 1998) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein auf pBluescript II SK⁺ basierendes Plasmid, welches eine einzige *Sma* I-Restriktionsstelle zwischen dem Promoter des *Actin-1* Gens P-Act aus Reis und dem 35S Poly-Adenylierungssignal (35S pA) aus pGL2 besitzt (Zhang *et al.*, 1991). Die *Sma* I-Restriktionsstelle erlaubt die *blunt*-Klonierung des interessierenden Gens zwischen Pro-

moter und 35S pA. Um Vektoren mit Insert gegenüber Wildtyp-Vektoren anzureichern, wurde den Ligationsansätzen während oder nach einer Ligationsreaktion das Restriktionsenzym *Sma* I zugegeben. Nach Ligation eines Inserts verschwindet die *Sma* I-site. Zirkularisierte Expressionsvektoren ohne die interessierende cDNA wurden durch diese Vorgehensweise geschnitten, so dass der Anteil an positiv klonierten Plasmiden stieg. Das Screening der *Ceratodon*-Expressionsplasmide bezüglich der Orientierung in *sense* des insertierten Gens erfolgte mit dem Primer G5 und einem entsprechenden genspezifischem komplementären Primer oder über Verdau mit Restriktionsendonukleasen.

2.11.6.1 Konstruktion eines *Ceratodon*-Expressionsplasmids für Ratten-Hämoxigenase

Das Gen für die in Rattenleber exprimierte Hämoxigenase *HO-1* wurde von Professor A. Wilks (Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Maryland, Baltimore, USA) und Professor P. R. Ortiz de Montellano (Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of California, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei der hier verwendeten HO-1 um ein Enzym, welches C-terminal um die letzten 23 Aminosäuren deletiert ist. Diese kodieren für eine Membranbindestelle. Der zur Verfügung gestellte bakterielle Expressionsvektor pBAHO30 (Wilks and Ortiz de Montellano, 1993) wurde mit den Restriktionsenzymen *Nde* I und *Sal* I verdaut, die 5'-Überhänge des 806 bp HO-1-DNA-Fragments mit Deep Vent DNA-Polymerase geglättet und wie unter 2.11.6 beschrieben in die *Sma* I-site des linearisierten Vektors pBASterm ligiert. Einzel- und Doppel-Testverdaue mit den Restriktionsendonukleasen *Apa* I, *Bam*H 1 und *Eco*R I wurden zum Screenen der Ori-



entierung der HO-1-DNA-Fragmente in *sense* durchgeführt. Die Identität und Orientierung des Inserts des Plasmids pBASHO#6 (s. Abbildung 6) wurde zusätzlich durch Sequenzierung mit den Primern J83 und G5 bestätigt. Von diesem Plasmid wurde eine Maxipräparation für die Mikroinjektion durchgeführt.

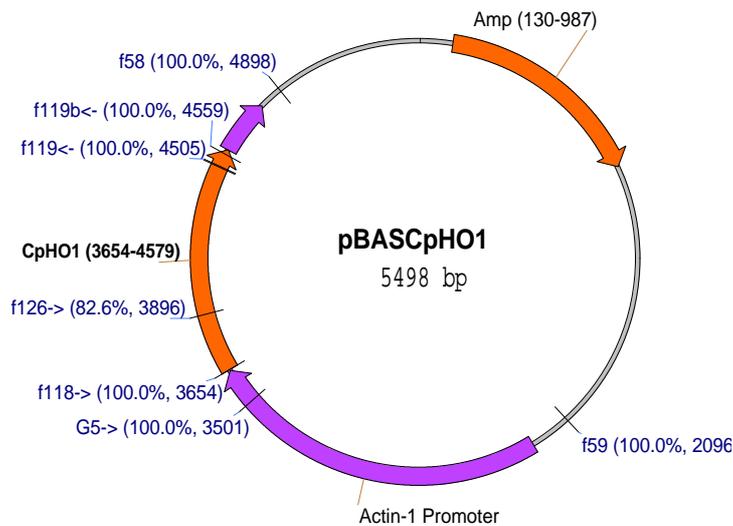
Abbildung 6: *Ceratodon*-Expressionsvektor pBASHO#6 zur konstitutiven Expression der Rattenleber Hämoxigenase. Die um 23 Aminosäuren verkürzte cDNA des Gens wurde in die *Sma* I-site stromabwärts des Actin-Promoters von pBASterm ligiert.

2.11.6.2 Konstruktion des *Ceratodon*-Expressionsplasmids pBASHY1

Das Plasmid pZLHY1, welches die *Arabidopsis thaliana* cDNA für den Locus *HY1* (Koorneef *et al.*, 1980) enthält, wurde von Takayuki Kohchi (Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan) zur Verfügung gestellt. Die *HY1*-Sequenz kodiert für die *Arabidopsis* Hämoxygenase HO-1 (Muramoto *et al.*, 1999). Das Plasmid wurde mit *EcoR* V und *Sal* I verdaut, der *Sal* I 5'-Überhang des *HY1*-Fragments mit Vent-Polymerase aufgefüllt und in die *Sma* I-site des Vektors pBASterm ligiert. Erfolgreiche Ligation und die Orientierung des Inserts wurde durch eine PCR mit den Primern J83 und f36 bestätigt. Von dem Plasmid pBASHY1#2 wurde für die Mikroinjektion eine Midipräparation durchgeführt.

2.11.6.3 Klonierung von *Ceratodon*-Hämoxygenase-Expressionsvektoren

Im Rahmen seiner Doktorarbeit wurde von Franz Mittmann das Gen für die *Ceratodon*-Hämoxygenase *CpHO1* kloniert und sequenziert (Mittmann, 2003). Mit den phosphorylierten Primern f118 und f119b wurde mit einer 1st strand cDNA von *Ceratodon* wt4 (von F. Mittmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt) als Matritze eine PCR mit TaKaRaEx-Polymerase durchgeführt. Parallel wurde mit unbehandelten Primern die gleiche PCR durchgeführt und das Produkt in den Klonierungsvektor pT-Adv (s. 2.11.11) ligiert. Mit dieser Ligation lag die *CpHO1* cDNA jederzeit für weitere Klonierungen vor. Das Screening nach positiven Ligationen in den TA-Vektor erfolgte nach blue/white-screening transformierter Bakterienkolonien durch eine PCR-Reaktion mit den Primern f58 und f59. Das PCR-Produkt der phosphorylierten Primer wurde mit Klenow geglättet, gereinigt (s. 2.11.3) und in den Vektor pBASterm (s. 2.11.6) ligiert. Die Orientierung der *CpHO1* cDNA in pBASterm wurde durch eine PCR mit den Primern G5 und f119 analysiert. Von dem Plasmid pBASCpHO1 (s. Abbildung 7) wurde für die Mikroinjektion eine Maxipräparation durchgeführt. Parallel zu der obigen Klonierung wurde ein Expressionskonstrukt aus dem PCR-Produkt der Primer f126 und f119b hergestellt. Für die *Ceratodon*-Hämoxygenase wurde eine Chloroplastenlokalisierung von der neural network-based Software Chlorop v1.1 (Emanuelsson *et al.*, 1999) des Center for Biological Sequence Analysis (University of Denmark) mit einem Score von 0,511 vorhergesagt. Die 80 N-terminalen Aminosäuren sollen für ein putatives Chloroplasten-Transit-Peptid CTP kodieren (Mittmann, 2003). Die Primer f126 und f119b amplifizieren von der wt4 1st strand cDNA eine um 240 bp verkürzte Sequenz, die nicht für diese Transitsequenz kodiert.



Dieses Konstrukt wurde im Rahmen eines von Franz Mittmann und mir als Lehrveranstalter durchgeführten Fortgeschrittenen-Praktikums von den Studentinnen Mareike Becker und Ireen Köllmer hergestellt und mit pBASÄCpHO1 gekennzeichnet. Auch von diesem Plasmid wurde eine Maxipräparation für Mikroinjektionen durchgeführt.

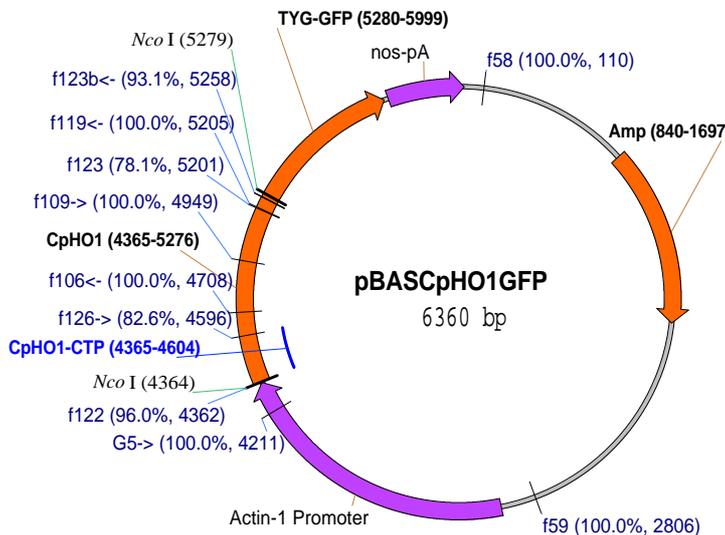
Abbildung 7: Expressionsvektor pBASCPHO1 zur konstitutiven Expression des Hämoxygenase-Gens *CpHO1* in *Ceratodon*. Primer f126 amplifiziert mit f119b ein um das Chloroplasten-Transit-Peptid verkürztes PCR-Produkt, welches zur Klonierung des Expressionsplasmids pBASÄCpHO1 führte.

2.11.7 Klonierungen für die intrazelluläre Lokalisation der *Ceratodon*-Hämoxygenase

Für die Intrazelluläre Lokalisation der *Ceratodon* Hämoxygenase CpHO1 (Mittmann, 2003) wurde das Plasmid pBASGFP (Zeidler, 1998) verwendet. In diesem ist das modifizierte TYG-GFP (Sheen *et al.*, 1995) in pBASterm (s. 2.11.6) kloniert. Außerdem besitzt dieser Vektor das Poly-Adenylierungssignal des Nopalinsynthase-Gens (Sheen *et al.*, 1995) nos-pA. Das interessierende Gen wird in eine *Nco* I-Schnittstelle zwischen Promoter und GFP kloniert. Das *Screening* der Fusionskonstrukte bezüglich der Orientierung *in sense* des insertierten Gens erfolgte mit dem Primer G5 und einem entsprechenden genspezifischem komplementären Primer.

Es wurden zwei unterschiedliche Fusionskonstrukte für die Expression chimärer Proteine aus dem *Ceratodon*-Hämoxygenasegen und dem *Green Fluorescent Protein*-Gen (GFP) hergestellt. Für das erste Konstrukt wurde ein PCR-Amplifikat mit den Primern f122 und f123b mit *Ceratodon* wt4 cDNA als Matritze hergestellt. Die beiden Primer binden an den 3'- und 5'-Enden von CpHO1 und besitzen zusätzlich als *header*-Sequenz je eine *Nco* I-Restriktionsstelle. Der Primer f123b wurde so konstruiert, dass die Hämoxygenase ihr Stopcodon TAA verliert, ein Alanin mittels der Sequenz GCC zwischen Hämoxygenase und GFP eingebaut wird und das GFP stromabwärts dieses Alanins ohne Leserasterverschiebung codiert ist. Nach Verdau des PCR-Produktes sowie des Plasmides pBASGFP mit *Nco* I, einer CIAP-Behandlung des Plasmides und Reinigung

der DNAs wurden diese ligiert und in *E. coli* transformiert. Das fertige Plasmid pBASCpHO1GFP ist in Abbildung 8 dargestellt. Das zweite Fusionskonstrukt wurde wie oben hergestellt, es wurde jedoch das *Nco* I verdaute PCR-Produkt aus den Primern f126 und f123b in pBASGFP ligiert. Der Primer f126



amplifiziert CpHO1 ohne die ersten N-terminalen 80 Aminosäuren, die für die Chloroplasten-Lokalisation (s. 2.11.6.3) verantwortlich sein sollen (Mittmann, 2003). Das resultierende Plasmid wurde mit pBASÄCpHO1GFP bezeichnet. Die Orientierung der ligierten DNA-Fragmente wurde über PCR mit den in Abbildung 8 dargestellten Primern untersucht.

Abbildung 8: Expressionsvektor pBASCpHO1GFP zur Analyse der subzellulären Lokalisation von CpHO1. Die Sequenz für ein putatives CTP ist blau gekennzeichnet und beschriftet. Sie fehlt im Plasmid pBASÄCpHO1GFP.

2.11.8 Klonierung der *Knockout*-Konstrukte

Die *Knockout*-Konstrukte für das Hämoxygenase-Gen *CpHO1* aus *Ceratodon purpureus* wurden als *replacement*-Konstrukt nach Girke (Girke *et al.*, 1998) hergestellt. Dazu wurde das ~2,5 kb PCR-Amplifikat der Primer f117 und f116, mit genomischer DNA aus *Ceratodon wt4* als *template*-DNA, in den TA-Vektor pTAdvantage (Clontech) kloniert. Dieses PCR-Produkt beinhaltet die komplette gDNA von *CpHO1* zuzüglich ~500 bp im 5'UTR und ~50 bp im 3'UTR. Das so entstandene Plasmid pG17.2#42 (s. Abbildung 9) wurde mit *Mfe* I verdaut, die Enden mit Klenow geglättet und der Plasmidrest dephosphoryliert.

In die *Mfe* I-Restriktionsstelle wurde eine eukaryontische Hygromycin-Kassette (bestehend aus P-Act, hpt-Gen, 35SpA), die aus dem Plasmid pBAShygV3 (Zeidler, 1995) mit *EcoR* V und *Not* I geschnitten und mit glatten Enden versehen wurde, kloniert. Die Resistenzkassette wurde sowohl *in sense* als auch *in antisense* Richtung bezüglich der *CpHO1*-Leserichtung in die *Mfe* I-site ligiert. Die so entstandenen Plasmide wurden mit pG18s (Hygromycin-*Sense*-Konstrukt, s. Abbildung 10) und pG18as (Hygromycin-*Antisense*-Konstrukt) bezeichnet. Die Orientierung der ligierten DNA-Fragmente wurde über PCR mit den in Abbildung 10 dargestellten Primern untersucht. Das eigentliche *knockout*-Konstrukt enthielt keine Anteile des Plasmid-Rückgrats, da es für die Transformation mit einem *Nhe* I/*Hpa* I-Doppelverdau aus dem Plasmid freigesetzt wurde.

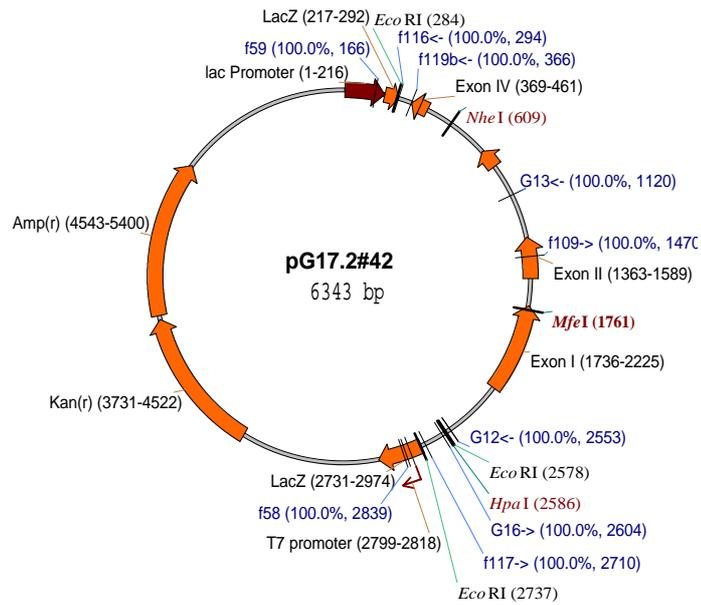


Abbildung 9: TA-Klonierung der genomischen DNA von *CpHO1* in pT-Adv. In die *Mfe* I-Site des resultierenden Plasmids pG17.2#42 soll zur Herstellung des *knockout*-Konstruktes ein eukaryontischer Resistenzmarker ligiert werden.

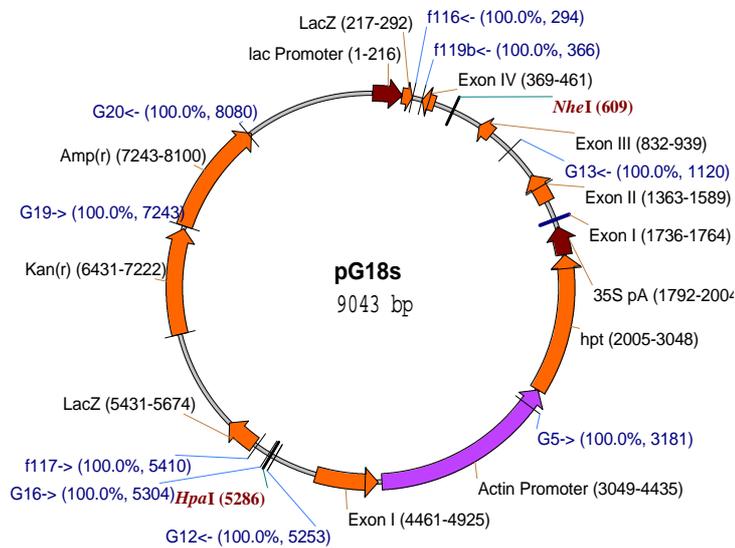


Abbildung 10: *Knockout*-Konstrukt pG18s. In die *Mfe* I-Site des Plasmids pG17.2#42 (s. Abbildung 9) wurde der eukaryontische Resistenzmarker Hygromycinphosphotransferase *hpt in sense* bezüglich der *CpHO1*-Leserichtung ligiert.

2.11.9 Site Directed Mutagenesis über PCR

Die hier beschriebene Methode zur *Site Directed Mutagenesis* (SDM) diente der Veränderung ausgewählter Nukleotide eines Plasmids, welches für die SDM in *Ceratodon* konstruiert werden sollte. Sie beruht auf einer inversen PCR mit zwei Primern, deren 3'-Enden in entgegengesetzte Richtungen weisen und deren 5'-Enden auf benachbarten Nukleotidpositionen sind. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass mit ihnen Restriktionsstellen entfernt oder hinzugefügt wurden. Es wurden nur Sequenzveränderungen vorgenommen, die zu *silent mutations* führten. D. h. die Aminosäuresequenz eines exprimierten Proteins würde nach Transformation der veränderten Nukleotidsequenz in Moosprotoplasten und eines homologen Rekombinations-Ereignisses beibehalten. Das Amplifikat der inversen PCR wurde mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I geschnitten. Dieses Enzym verdaut nur von *Dam* methyliertes Substrat (s. 2.11.11), d.h. das für die PCR verwendete Plasmid wurde verdaut, nicht jedoch das PCR-Produkt. Nach Reinigung des PCR-Amplifikats wurde dieses geglättet, 5'-phosphoryliert, erneut gereinigt, ligiert und in *E. coli* transformiert. Erfolgreiche SDM wurde über Restriktionsverdau und Sequenzierung der aufgereinigten SDM-Plasmide bestätigt.

2.11.9.1 Klonierung eines *gene replacement*-Konstruktes zur Transformation der aphototropen *Ceratodon*-Mutante *ptr116*

In der UV-Mutante *ptr116* (Lamparter *et al.*, 1996; Lamparter *et al.*, 1997a) wurde eine einzelne Punktmutation in Codon 31 identifiziert (Mittmann, 2003), die ein Codon für Glutamin in ein Stopcodon verwandelt hat (CAG → TAG; Q31 → Stop). Mit der oben beschriebenen Methode der SDM einer Sequenz in einem Plasmid soll die Mutante *ptr116* durch *gene replacement*, bei der das Stop-Codon wieder gegen eines für Glutamat getauscht wird, den Wildtyp-Phänotyp zurückerhalten. Als zusätzliche *silent*-Mutationen wurden eine neue Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym eingefügt und eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym entfernt. Als Matrize für die SDM wurde das Plasmid pG20 verwendet. Hierbei handelt es sich um pBluescript II SK⁻, in das über TA-Klonierung das PCR-Amplifikat der Primer f117 und f116 der genomischen Sequenz der *Ceratodon*-Wildtyp Hämoxygenase ligiert wurde. Die oben beschriebene SDM über PCR wurde mit den Primern f156 und f155 durchgeführt. Dadurch wurde in Exon I von *CpHO1* das Stop-Codon in ein für Glutamin codierendes Codon geändert, eine *Apa* I-Site neu generiert und eine *Nar* I-Site entfernt. Dieses Konstrukt wurde im Rahmen eines von Franz Mittmann und mir als Lehrveranstalter durchgeführten Fortgeschrittenen-Praktikums von den Studentinnen Annika Hinze und Kristin Kellner hergestellt. Die Orientierung und Identität der ligierten DNA-Fragmente, resultierend im Plasmid pG23#4 (s. Abbildung 11) wurde über PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert. Das *gene replacement*-Konstrukt wurde für die Transformation in *Ceratodon*-Protoplasten mit *Nhe* I und *Hpa* I verdaut, so dass es keine Anteile des Plasmid-Rückgrats enthielt.

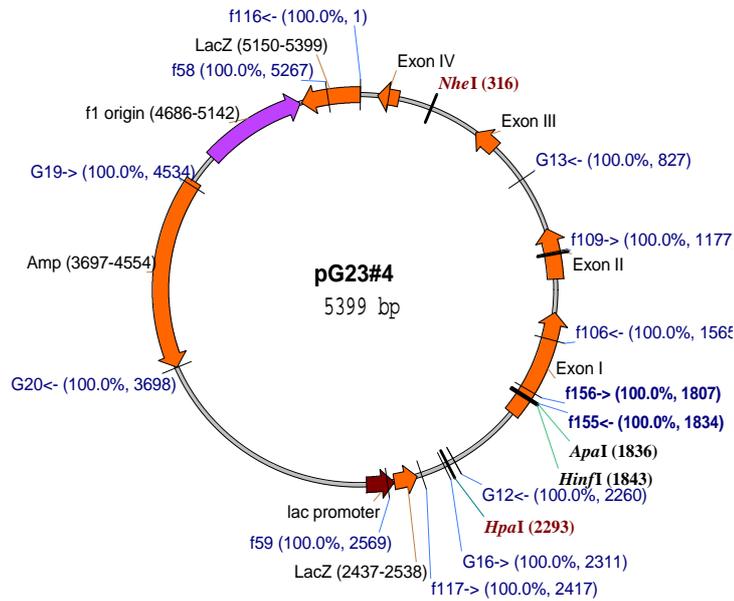


Abbildung 11: *Gene replacement*-Konstrukt pG23#4. Die für die SDM des Plasmides eingesetzten Primer f156 und f155 fügten eine *Apa* I-Site ein und gleichzeitig wurde eine *Nar* I-Site an Position 1812 entfernt.

2.11.10 Transformation von Bakterien

Transformation von DNA in Bakterien erfolgte durch Elektroporation (Easyject PLUS Elektroporator, Peqlab; Elektroporationsküvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand, Biorad) nach Dower (Dower *et al.*, 1988) mit folgenden Parametern: $U = 2000$ V; Pulsdauer = 5 ms; $R = 200$ Ω ; Kapazität = 25 μ F. Die Herstellung elektrokompeter Zellen erfolgte nach Sambrook und Russell (2001). Mit Zellen, die nach dieser Methode hergestellt werden, lassen sich Transformationseffizienzen von etwa 10^{8-9} cfu/ μ g Plasmid bei 10 pg eingesetztem pBluescript erzielen. Über Nacht bei 18 °C in 500 ml LB Medium gewachsene Zellkulturen, die eine OD_{595} von 0,4 - 0,7 aufwiesen wurden pelletiert, dreimal in eiskaltem MilliQ-H₂O gewaschen und in 4 ml eiskaltem 7 % DMSO in MilliQ-H₂O resuspendiert. Aliquots von je 105 μ l wurden in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C gelagert. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Transformationen aufgetaut. Eine Übersicht über weitere in dieser Arbeit verwendeten Plasmide findet sich unter 2.11.11. Verwendete Bakterienzell-Linien sind im Abschnitt 2.4 aufgeführt.

2.11.10.1 Screening von *E. coli*-Kolonien

Das Screenen von Bakterien-Kolonien erfolgte mit Hilfe einer PCR-Reaktion (s. 2.11.3). Als *template*-DNA wurden 1 - 3 *E. coli*-Kolonien in je 10 oder 20 μ l eines PCR-Master-Mix mit zwei geeigneten Primern verwendet.

2.11.11 Kommerzielle Klonierungsvektoren

Als Klonierungsvektoren kamen die *high-copy* Plasmide pBluescript II SK^{-/+} (Stratagene), pGEM-T easy (Promega) und pTAdvantage pT-Adv (Clontech) zum Einsatz. Sie haben eine geringe Größe, enthalten das Ampicillin-Resistenz-Gen Amp^r sowie das vom lac-Promotor getriebene lacZ α Fragment, das ein *blue/white*-Screening erlaubt. Wurden Klonierungen von PCR-Produkten mit A-Überhängen in pBluescript durchgeführt, geschah dieses in ein nach Marchuk (Marchuk *et al.*, 1991) modifiziertes Plasmid: Dazu wurde pBluescript in der MCS mit dem Restriktionsenzym *EcoRV blunt* geschnitten und das so linearisierte Plasmid mit Taq-Polymerase bei 72 °C in Anwesenheit von dTTP matrizen-unabhängig mit 3'-T-Überhängen versehen. Das Alternativ für die Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhängen verwendete Plasmid pT-Adv besitzt zusätzlich das Kanamycin-Resistenzgen Kan^r.

2.11.12 Verwendete Primer

f58: TCCCAGTCACGACGTTGTA
 f59: GTATGTTGTGTGGAATTGTGA
 f106 : GCCTCCTTCTCCCCCTCCTTCG
 f108 : CACATCGTCACCATCAATCG
 f116 : TTGGACTGCACACCCCATACC
 f117 : CGAGTAGGCTTCACGTGAAC
 f118 : GGTTCTGGATGATGGCTATGG
 f119b : TTATGCTGAGACAATCAGGCG
 f122 : GCCATGGCTATGGCGGTAGGGGAGC
 f123b : CCCCCATGGCTGCTGAGACAATCAGGCGC
 f126 : GCCATGGCCAGCTCGGTTGCCCC
 f155 : CCCATTCTGAATCACACTTTTC
 f156 : CCCAGTAGAGCGCCGACGTCGGCCCAT
 G5 : CTCGTCAGGCTTAGATGTGC
 G7 : TTGGTTTCCCTACTAACGCC
 G12 : CGATTGATGGTGACGATGTG
 G13 : GTAATAATAACAGAGTTTGAATCATC
 G14 : CCCAACCCACTGCCACTG
 G16 : GCTGAATGCCGCTGCTGC
 G17 : CCTCCCTCCCAACCCACT
 G18 : AAGATGCGTTGTAGTTTACCTC
 G19 : ATGAGTATTCAACATTTCCGTG
 G20 : CCAATGCTTAATCAGTGAGGC
 J62: GGGCTCGGCCTGACCGGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 J63: GGGCTCGGCCTGACCGGC
 J83: TTGTAAAACGACGGCCAGT
 J84: GAAACAGCTATGACCATGAT
 MZ28 : TATCCCGACTCTCTTCTCAA

Die f-Primer wurden von Dr. F. Mittmann, G-Primer von mir, J-Primer von Prof. Dr. J. Hughes und MZ-Primer von Dr. M. Zeidler konstruiert.

2.12 Transformation von *Ceratodon purpureus*

Für die Transformation von *Ceratodon* wurden die Parameter Temperatur und Dauer des Hitzeschocks gegenüber der Standarddurchführung (Schaefer and Zryd, 1997) bei *Physcomitrella* variiert. Es wurde zur Transformation nur Plasmid-DNA verwendet, die mit dem *Endofree* Plasmid Maxi-Kit (Qiagen GmbH) aus *E. coli* isoliert wurde. Da diese Methode lipopolysaccharid-, und daher endotoxin-freie Plasmid-DNA liefert, sollte dieses zu einer Steigerung der Transformationseffizienz, wie bei tierischen Zellen gezeigt wurde (Weber *et al.*, 1995), führen.

2.12.1 Protoplastenisolation

Alle Arbeiten wurden unter der *Cleanbench* mit sterilen Geräten und in autoklavierten Gefäßen durchgeführt.

Moosgewebe von *Ceratodon purpureus* wt4- und aphototropen Mutantenkulturen wurde zur Protoplastenpräparation mit einem Ultraturrax (T 25, Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland) in Wasser zerkleinert, gleichmäßig dünn auf Petrischalen mit BCE 2.0.5-Medium und Cellophanfolie verteilt und für sieben bis 14 Tage im Klimakonstantraum angezogen, bis ein feiner Moosrasen gewachsen war. BCE 2.0.5-Medium führt zu stärker verzweigtem Wachstum der Moosfilamente und Protoplasten werden vornehmlich aus den Verzweigungen isoliert.

Mit Hilfe zellwandabbauender Enzyme wie Driselase lassen sich aus Pflanzengewebe Protoplasten isolieren. Driselase besteht aus Laminarinase, Xylarase und Cellulase. Der Moosrasen wurde mit einem Spatel von der Cellophanfolie genommen, in eine Petrischale überführt und Driselaselösung hinzugegeben. Die Driselase wurde 2 % in einer 8 % Mannitol-Lösung angesetzt und für 30 min auf einem Schüttler gelöst. Mit KOH wurde pH 5,6 eingestellt und die Lösung für 5 min bei 2500 g im *Swing-Out*-Rotor zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech, Berlin, Deutschland). Das Pellet aus nicht gelösten Bestandteilen wurde verworfen und der Überstand steril (0,2 µm Sterilfilter, Schleicher & Schuell) zu den Moosfilamenten filtriert. Für die Isolierung von Protoplasten aus Moosrasen einer Petrischale wurden 5 ml dieser Driselaselösung verwendet. Die Zellwände wurden für 30 min bei Raumtemperatur auf einem langsam eingestellten Schüttler verdaut und die Protoplasten durch ein 50 µm x 50 µm Metallnetz, welches in einen Trichter eingeschraubt war, in ein "Sarstedt-Tube" gesiebt. Bei 100 - 200 x g wurden die Protoplasten für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und dreimal in einer 8 % Mannitol-Lösung gewaschen. Pro Waschvorgang wurden 5 ml 8 % Mannitol-Lösung verwendet, 5 min bei 100 bis 200 x g pelletiert (Zentrifuge: Sigma 4K10, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland) und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Die Protoplasten wurden in 10 ml 8 % Mannitol-Lösung aufgenommen und ihre Anzahl mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Protoplasten erneut bei 200 g zentrifugiert und in der MMM-Lösung verdünnt, so dass die Anzahl der Protoplasten $0,34 \times 10^6$ /ml betrug.

2.12.2 Transformation mittels PEG

Nach Aufnahme der Protoplasten in der MMM-Lösung wurde zügig mit der Transformation begonnen, da die Protoplasten nicht länger als 30 min in dieser Lösung stehen sollten. Für jeden Transformationsansatz wurden 30 µg verdauter Plasmid-DNA in einer Konzentration von 30 µg/µl eingesetzt. Die DNA wurde in 15 ml Reaktionsgefäße pipettiert, zentrifugiert, und 300 µl der Protoplastensuspension (~100.000 Protoplasten) zugegeben. Dazu wurden 300 µl der PEG-Lösung pipettiert und die Lösungen durch vorsichtiges Schütteln gemischt. In einem auf 42 °C bis 47 °C vorgeheizten Wasserbad wurden die Protoplasten für 3 - 7 min inkubiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. In Abständen von 3 min wurden nun 5 x 300 µl und anschließend 5 x 1 ml 8 % Mannitol-Lösung zu den Protoplasten pipettiert. Die Protoplasten wurden nach jedem Pipettierschritt durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Nach Zentrifugation der Protoplasten bei 200 g und Abgießen des Überstandes wurden die Protoplasten in 5 ml *Recovery*-Lösung aufgenommen, zügig mit 5 ml auf 42 °C erhitztem Top-Agar durchmischt und auf jeweils 2 Petrischalen mit *Recovery*-Agar gleichmäßig verteilt (~ 50.000 Protoplasten/Petrischale). Durch das Verdünnen der Protoplasten in der *Recovery*-Lösung mit dem Top-Agar ergab sich ein 0,5 % Agar. Die Protoplasten wurden nur mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert, um Scherkräfte zu reduzieren. Zur Kontrolle für eine erfolgreiche Transformation wurde außer den *knockout*- bzw. *gene replacement*-Konstrukten das Plasmid pBASGFP (s. 2.11.7) in gleicher Konzentration eingesetzt.

2.12.3 Regeneration der Protoplasten

Zur Regeneration wurden die Protoplastensuspensionen auf *Recovery*-Agar waagegerecht für 24 h im Dunklen in den Klimakonstantraum gestellt. Nach weiteren zwei Tagen im Klimakonstantraum im 16 h Licht- / 8 h-Dunkelrhythmus wurden die Cellophanfolien mit den aufliegenden eingebetteten Protoplasten von dem osmotischem Medium auf Petrischalen mit 1b-Medium umgesetzt. Dazu wurden die in Agar eingebetteten Protoplasten mit der Folie abgenommen und kopfüber auf das 1b-Medium gebracht. Die Folie wurde entfernt.

2.12.4 Selektion homolog rekombinierter Mutanten

Die weitere Regeneration der Protoplasten erfolgte unter konstantem Rotlicht. Dazu wurden die Petrischalen mit den auf 1b Medium umgesetzten Protoplasten mit einer Wellenlänge von (660 ± 20) nm und einer Photonen-Fluenzrate von $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ einseitig bestrahlt. Sie wuchsen bei einer Temperatur von 20 °C. Die Petrischalen standen entweder seitlich oder mit der Rückseite der Petrischalen zur Lichtquelle. In beiden Fällen wuchsen Protonemen mit wt-Phänotyp zur Lichtquelle während Protonemen aphototroper Mutanten nach oben wuchsen. Letztere *Screening*-Methode hatte den Vorteil, dass die positiv phototropen Wildtypen in den Agar wuchsen, dadurch weniger mit den aphototropen Filamenten durchmischt wurden und somit die gewünschten Phänotypen einfacher zu isolieren waren. Hämoxygenase-defiziente Mutanten sind

cher zu isolieren waren. Hämoxygenase-defiziente Mutanten sind darüber hinaus stark reduziert in ihrem Chlorophyllgehalt und bilden nur rudimentäre Chloroplasten aus. Sie waren daher unter einem binokularen Mikroskop (Nikon, SMZ-U, Japan) von Wildtyp-Kulturen leicht zu unterscheiden. Die gewünschten Moosphenotypen wurden nach drei bis zehn Tagen Wachstum im Rotlicht mit einer sehr spitzen Pinzette (Dumont Nr. 5, Fine Science Tools) unter einem binokularen Mikroskop isoliert und vereinzelt auf kleine Petrischale mit 1b-Medium umgesetzt. Die Zahl der regenerierten Protoplasten, eine erste Auszählung putativer Transformationsereignisse und deren fotografische Dokumentation erfolgte ebenfalls am Mikroskop.

2.12.5 RNA-Extraktion aus *Ceratodon*

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mit dem TriStar-Reagenz (Trizol) nach Herstellerangaben (Angewandte Gentechnologische Systeme GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Trizol ist ein Reagenz, welches aus einer Mischung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat (GITC) besteht. Bei der Phenol-Extraktion (Chirgwin *et al.*, 1979) werden Proteine denaturiert und mit ihrem hydrophoben Anteil in die organische Phase übernommen, der geladene Anteil bleibt weiterhin wasserlöslich. Dadurch reichern sich die Proteine im Phasengrenzbereich an, aggregieren und werden unlöslich. Zusätzlich können RNase-Inhibitoren zugeben werden, die die aktiven Zentren blockieren. Mit dem chaotropen Salz GITC wird dessen denaturierende Wirkung genutzt. Proteine werden entfaltet und inaktiviert, bleiben aber gelöst. RNA dagegen wird aufgrund des Wasserentzuges gefällt (Puissant and Houdebine, 1990). Die Trizol-Extraktion (Simms *et al.*, 1993) verbindet die Vorteile der beiden Methoden. Es wurde nur mit sauberem Plastik-Einwegmaterial und RNase freien Substanzen gearbeitet bzw. Lösungen mit DEPC-Behandlung von RNase befreit. Der Aufschluss des Moooses erfolgte vor der Reagenzzugabe durch Mörsern in flüssigem Stickstoff. Eine Quantifizierung der erhaltenen RNA wurde spektralphotometrisch nach

$$c (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times [\text{Verdünnungs-Faktor}] \text{ (Sambrook and Russell, 2001)}$$

durchgeführt. Gelelektrophoretisch wurde bestätigt, dass die isolierte RNA nicht degradiert war (s. 2.11.1).

2.12.6 cDNA-Synthese und RT-PCR

Nach Lessard (Lessard *et al.*, 1997) wurde 1st strand cDNA hergestellt. Auf Eis wurde 1 µg Gesamt-RNA aus *Ceratodon* mit 500 ng Oligonukleotid J62 (*lock-docking* oligo-dT-Primer mit 5'-*header*; s. 2.11.12) gemischt, mit Wasser auf 11,5 µl aufgefüllt und 2 Tropfen Mineralöl darauf pipettiert. Zum Aufschmelzen der Sekundärstrukturen wurde für 1 min bei 70 °C und dann 30 s bei 80 °C erwärmt. Die Lösung wurde danach für 30 s auf 4 °C abgekühlt und wieder für 3 min auf 70 °C erwärmt und sofort auf Eis gestellt. Es wurden 4 µl 5 x 1st strand Buffer (BRL), 2 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl RNase-Inhibitor (USB/Amersham) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) zugegeben und vorsichtig gemischt. Bei 42 °C wurde für 2 min inkubiert, sodann 200 U RT (Moloney Murine Leukemia Vi-

rus RNase H⁻ Reverse Transcriptase *Superscript II*; BRL) zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 42 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit TE 1:2 verdünnt und davon je 1 µl für einen RT-PCR-Ansatz eingesetzt. Es wurde ein genspezifischer sense-Primer und der anti-sense-Primer J63 (Primer mit der *header*-Sequenz von J62) für die RT-PCR (s. 2.11.12) eingesetzt.

2.13 Southern Blot-Analyse

Die hier durchgeführten *Southern Blots* (Southern, 1975) dienten der Analyse von Transformanten, bei denen erfolgreicher *Site Directed Mutagenesis* über homologe Rekombination in *Ceratodon purpureus* durchgeführt wurde. Für den Nachweis der Hybridisierung wurde das Roche Digoxigenin (DIG)-System verwendet (Boehringer Mannheim, 1995). Die DIG-Markierungsmethode basiert auf dem aus *Digitalis*-Pflanzen (*Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*) isolierten Steroid Digoxigenin. Die Blüten und die Blätter von *Digitalis* sind die einzige natürliche Quelle für das Digoxigenin, so dass der spezifische DIG-Antikörper (Anti-DIG) kein anderes biologisches Material detektiert. Das Digoxigenin ist über einen 11 C-Atome langen *Spacer*-Arm mit der C-5 Position eines Uridin-Nukleotids verknüpft (DIG-11-dUTP). Bei der Sondenherstellung werden diese anstatt dTTP eingebaut. Der Einbau von DIG-11-dUTP erfolgt enzymatisch mit DNA-Polymerasen oder chemisch. Der polyklonale Anti-DIG ist mit Alkalischer Phosphatase konjugiert (Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat). Er detektiert mit hoher Affinität DIG-markierte hybridisierte Sonden über eine Chemilumineszenz-Reaktion. Verwendet wurde hier zur Visualisierung des Anti-DIG-Konjugates das Chemolumineszenz-Substrat CDP-Star (Tropix Inc. USA). Dieses wird von der Alkalinen Phosphatase dephosphoryliert und das entstehende metastabile Intermediat emittiert bei seinem Zerfall Licht ($\lambda_{\max} = 466 \text{ nm}$), welches auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Die Sensitivität dieser Detektionsreaktion liegt im Bereich $< 0,1 \text{ pg}$ auf einem *Southern Blot*.

2.13.1 Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Markierung der Sonde erfolgte über eine normale PCR-Amplifikation, in die zum einen der DIG-labeling-Mix (eine Mischung von jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1.3 mM dTTP, 0.7 mM DIG-11-dUTP; Roche) gegeben wurde. Parallel wurde eine PCR mit gleichen Primern und *template* mit dNTPs durchgeführt. Die Bedingungen für eine optimale Amplifikation der entsprechenden Sequenz wurde vorab mittels plasmidärer DNA als Matritze getestet. Verändert wurden hierbei die *template*-Mengen, die T_{an} und die MgCl_2 -Konzentration im PCR-Reaktionsansatz. Bei dem zur Sondenherstellung verwendeten Plasmid handelte es sich um pBlu2KS⁺, in dessen MCS der komplette ORF der *Ceratodon* Hämoxygenase (von Primern F117-F116) kloniert wurde. Als *template* für die Sonden diente sowohl die Plasmid-DNA mit den sequenzierten Inserts als auch PCR-Produkte dieser Plasmide. Letzterer Ansatz verhindert effektiv die Amplifikation und somit die Markierung unspezifischer Sequenzen. Mit Ersterem kann dafür auch der Einbau von nicht homologen Plasmid-Sequenzen nach der Transformation der Moose durch

illegitime Rekombination detektiert werden, da der Vektor für die Herstellung des SDM-Konstruktes ebenfalls pBlu2KS⁻ war. Auf einem Agarose-Gel wurde die Effizienz der DIG-Markierung sichtbar gemacht. Die Bande der markierten DNA sollte dabei höher liegen als die Bande des unmarkierten PCR-Amplifikats. Zur Ermittlung der optimalen Sondenkonzentration für den *Southern Blot* wurden pro Sonde drei Testnylonmembranen mit verschiedenen DNAs hergestellt. Als Positivkontrolle wurde das nichtmarkierte PCR-Produkt, welches bei der Sondenherstellung parallel mit der markierten Sonde entstand, verwendet. Als Negativkontrolle diente zum einen das Plasmid pBlu2KS⁻, welches zur Herstellung des *Site Directed Mutagenesis* Konstruktes verwendet wurde und eine heterologe Vergleichs-DNA aus genomischer DNA von *Synechocystis coccus* PCC6803 (von F. Mittmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Diese DNAs wurden in Verdünnungsreihen mit einer weißen Pipettenspitze als feine Punkte auf mit Bleistift gezeichneten Feldern einer positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer Mannheim) pipettiert. Die DNA wurde mit einer UV-C-Handlampe (4 W, $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$) für 3 min bestrahlt und dadurch auf der Membran quervernetzt und mit drei verschiedenen Sondenkonzentrationen hybridisiert. Es wurde die Sondenkonzentration für die eigentlichen *Southern Blots* verwendet, die nach der Detektionsreaktion die beste Nachweisgrenze bei günstigstem Signal-Rausch-Verhältnis zeigte. Vor der Hybridisierung wurden die Sonden durch Kochen für 5 min in 50 μl 50 % Formamid denaturiert und sofort in die Hybridisierungs-Lösung überführt.

2.13.2 DIG-Southern Blotting

Über Nacht wurden 3 - 5 μg genomische *Ceratodon*-DNA je aufzutragender Spur mit 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym pro μg DNA in einem Volumen von 100 μl verdaut. Die verdaute DNA wurde Phenol/Chloroform extrahiert, mit NaAc/EtOH gefällt, mit 70 % EtOH gewaschen und in 1 x SLB (bzw. TE + 10 x SLB) bei 65 °C gelöst, so dass eine Konzentration von 300 - 500 ng/ μl erzielt wurde. Ein Agarose-Gel wurde mit 200 - 400 ng DNA beladen, damit nach Sichtung des Testgels entsprechend gleiche Mengen für das Blotting aufgetragen wurden. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag für 5 min bei 68 °C gelöst und dann sofort auf Eis abgekühlt. In einem frisch zubereiteten 0,6 % Agarosegel mit TBE-Puffer wurde die DNA bei niedrig angelegter Spannung elektrophoretisch aufgetrennt. Mittig wurde auf das Gel 10 μl unverdünnter 10 x SLB zur Verfolgung des Gel-Laufs pipettiert, da die Farbmarker der DNA-Proben nach einer vierstündigen Elektrophorese kaum sichtbar sind. Erfolgreiche Auftrennung der DNA wurde durch Ethidiumbromid-Färbung des Gels bestätigt. Hochmolekulare DNA wurde durch Abschneiden von etwa 1 cm im oberen Gel-Bereich entfernt. Das Gel wurde durch Abschneiden einer der Gel-Ecken zur Orientierung markiert. Die DNA wurde im Gel für 3 x 20 min mit der Denaturierungs-Lösung denaturiert und das Gel auf eine positiv geladene äquilibrierte Nylonmembran (Roche) gelegt. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht in einem Kapillarttransfer-Apparat nach (Southern, 1975) mit neutraler Hochsalz-Transferlösung (20 x-SSC; pH 7, da der DIG-Marker alkalilabil ist). Der Transfer der DNA wurde nach dem Blotting durch nochmaliges Färben des Gels in

DNA wurde nach dem Blotten durch nochmaliges Färben des Gels in Ethidiumbromid am UV-Transilluminator kontrolliert. Die Membran wurde durch waschen in 2 x SSC-Puffer neutralisiert, auf 3MM-Papier leicht angetrocknet und über UV-*crosslinking* fixiert.

2.13.3 Hybridisierung

Die Membran wurde in eine hitzebeständige Folie geschweißt und unspezifische Bindungsstellen mit 5 - 15 ml Prähybridisierungs-Lösung DIG Easy Hyb für mindestens 2 h bei 42 °C abgeblockt. Die über Dot-Blot geschätzte optimale Sondenmenge wurde denaturiert, in 5 - 10 ml DIG-Easy Hyb (42 °C) pipettiert und gegen die Prähybridisierungs-Lösung ausgetauscht. Die optimale Hybridisierungs-Temperatur T_{hyb} wurde nach Herstellerangaben (Roche) mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$T_{\text{an}} = 49.82 + 0.41 (\% \text{ G} + \text{C}) - (600/l) \quad l = \text{Länge des Hybrids in bp}$$

$$T_{\text{hyb}} = T_{\text{an}} - (20 \text{ bis } 25 \text{ °C})$$

Die optimale Hybridisierungs-Temperatur liegt mit DIG Easy Hyb zwischen 37 - 42 °C. Die Hybridisierung erfolgte ü. N. bei 42 °C auf einem Schüttler. Die Membranen wurden nach der Hybridisierung für 2 x 5 min in *1st wash* bei RT sowie für 2 x 15 min bei 68 °C stringent in *2nd wash* in großen Petrischalen gewaschen.

2.13.4 Detektion Digoxigenin markierter Sonden

Die Detektionsreaktionen erfolgten nach Herstellerangaben (Roche 2000). Die Membranen wurde kurz in DIG 1 äquilibriert, die Nylonmembranen in Folie geschweißt und unspezifische Bindungsstellen für mindestens 1 h bei RT in DIG 2 abgeblockt. Die Inkubation des Blots mit 20.000fach in DIG 2 verdünntem Antikörper erfolgte für 30 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen für 15 min mit Waschpuffer wurde der Blot mit alkalischem Detektionspuffer DIG 3 für 5 min in einer Petrischale äquilibriert und sodann mit etwa 500 µl CDP-Star Detektions-Lösung (5 µl CDP-Star in 500 µl DIG3) für 5 min inkubiert. Die Membran wurde ohne überschüssige Detektions-Lösung, jedoch weiterhin feucht, in Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Chemilumineszenz wurde mit Kodak X-OMAT UV-Film bei Expositionszeiten von 5 min bis 16 h aufgenommen. Die Entwicklung des Films erfolgte in Kodak-Entwickler RP X-Omat EX und fixiert wurde mit Kodak RP X-Omat LO.