# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Wiederherstellung aphototroper *Ceratodon*-Mutanten durch Mikroinjektion von Phycocyanobilin

Diese Arbeit wurde zum Teil bereits in Brücker *et al.* (2000) veröffentlicht.

Das aus *Spirulina*-Algen durch Ausschütteln aufgereinigte und in Hexan auskristallisierte PCB (s. 2.8) wurde in DMSO gelöst und für die Injektion in TE-Puffer in einer Konzentration von 100 µM verdünnt. Injiziert wurden Protonema-Spitzenzellen der aphototropen Mutanten *ptr114*, *ptr115* und *ptr116*. Diese Mutanten wurden als Linien mit einem Defekt in der Phytochrom-Chromophor-Biosynthese PÔB beschrieben (Lamparter *et al.*, 1996; Esch and Lamparter, 1998). Die Injektionen erfolgten jeweils im basalen Bereich der Spitzenzellen. Zur Kontrolle wurde PCB mit den gleichen Einstellungen für die Injektionsdauer und den Injektionsdruck mit der Injektionskapillare außerhalb direkt an die Zellwand der apikalen Filamentzelle appliziert. Als weitere Kontrolle wurde TE-Puffer ohne PCB injiziert.

Die Zellen wurden nach der Injektion seitlich mit Rotlicht bestrahlt und über eine Videokamera am Nikon Binokular nach 4 - 24 h fotografiert (s. 2.1.2). Exemplarisch sind Injektionen in Spitzenzellen von *ptr114*, *ptr115* und *ptr116* nach unterschiedlicher Bestrahlungszeit mit Rotlicht in Abbildung 12 dargestellt. Die Injektion von PCB führte bei 70 % der injizierten Filamente aphototroper Mutanten zu einer eindeutig positiv phototropen Antwort (s. Tabelle 1). Der Mittelwert der mit der Software ImageP analysierten Krümmungswinkel nach einer 24 h Bestrahlung mit Rotlicht betrug 54 ° (s. Tabelle 1).

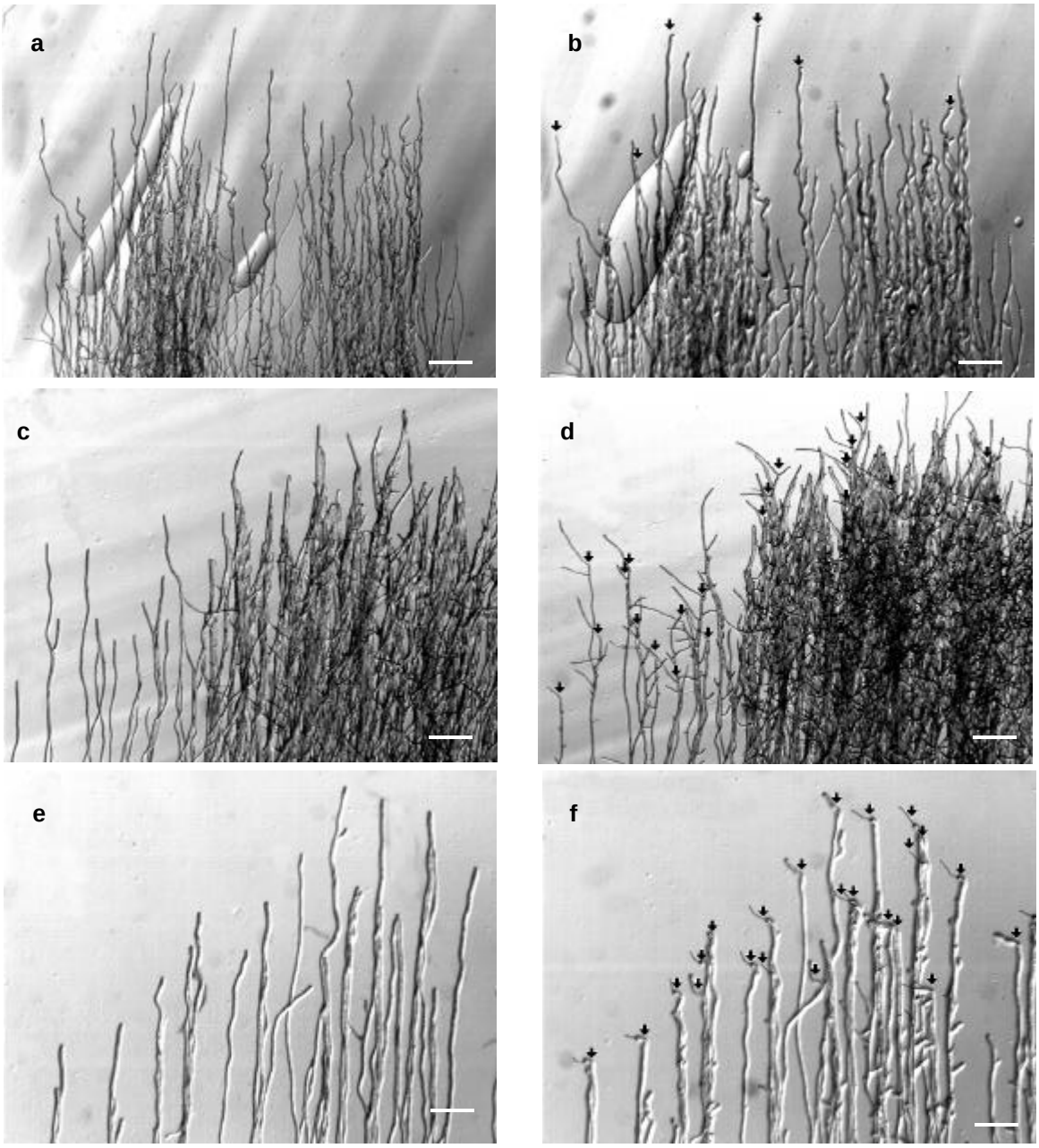



Abbildung 12: Negativ gravitrop gewachsene Filamente der Mutanten *ptr114* (a, b), *ptr115* (c, d) und *ptr116* (e, f) direkt nach der Injektion von PCB (a, c und e) und nach weiteren 4 h (b), 24 h (d) und 15 h (f) Bestrahlung mit Rotlicht (661 nm) von links. Beginnende (b) und deutlich sichtbare (d, f) positiv phototrope Reaktionen in injizierten Spitzenzellen sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. (e, f) Alle Spitzenzellen der längeren, gerade gewachsenen hier abgebildeten Filamente der Mutante *ptr116* wurden mit PCB injiziert. Annähernd alle injizierten Zellen krümmen sich zum Licht. Balken in (a, b) ~ 200 µM, in (c, d) ~ 300 µM und in (e, f) ~ 100 µM.

Kontroll-Injektionen mit TE-Puffer führten nicht zu einer Krümmungsreaktion (s. Abbildung 13 und Tabelle 1). Es bildeten sich Seitenverzweigungen, jedoch war keine Bevorzugung der Wachstumsrichtung zum Rotlicht zu erkennen.

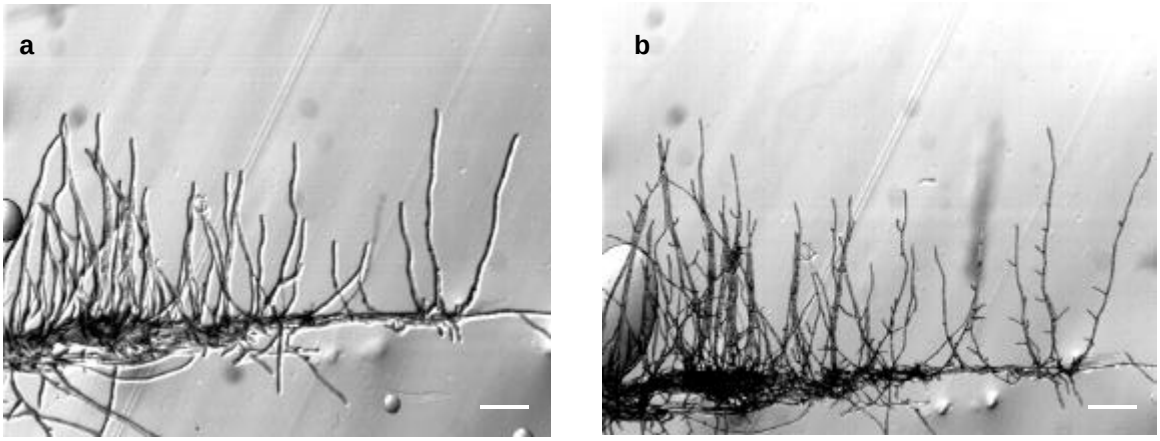



Abbildung 13: Kontroll-Injektionen mit TE-Puffer in Spitzenzellen der Mutante *ptr114*. (a) Unmittelbar nach der Injektion und (b) nach 24 h Bestrahlung mit Rotlicht von links. Die apikalen Protonemazellen zeigen keine phototrope Reaktion. Balken ~ 200 µM.

Ebenso wenig führten Kontroll-Injektionen, bei denen PCB mit dem Mikromanipulator äußerlich an die Zellwand einer Spitzenzelle appliziert wurde zu einer Krümmungsreaktion (s. Abbildung 14 und Tabelle 1).

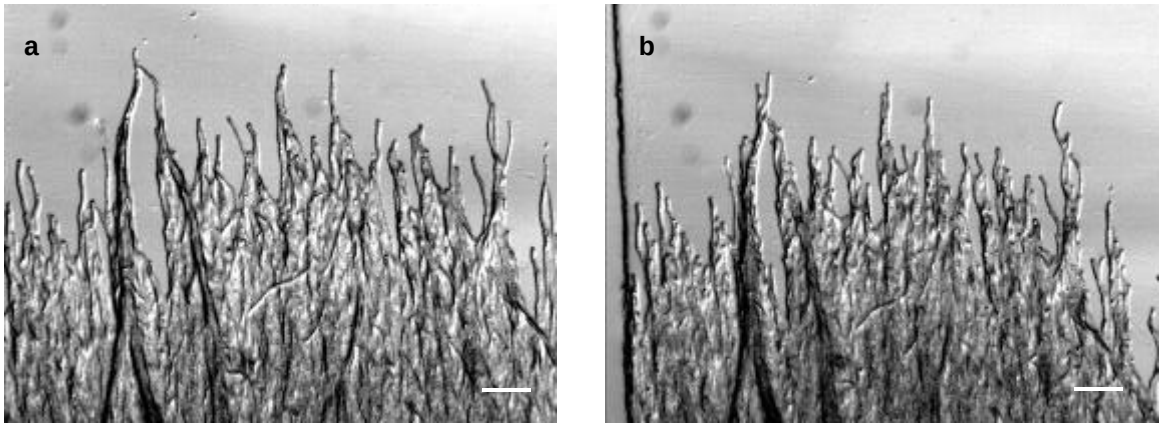
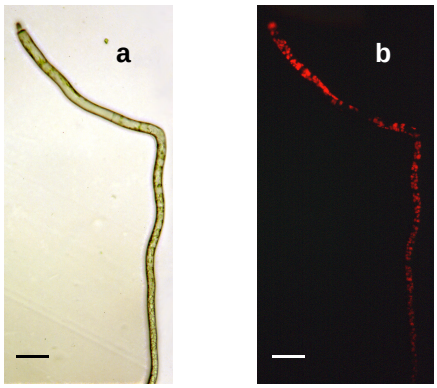



Abbildung 14: Injektionen von PCB außen an die Zellwand von Protonema-Spitzenzellen der Mutante *ptr116*. (a) Direkt nach der PCB-Applikation und (b) nach weiteren 24 h Rotlichtbestrahlung von links. Obwohl versucht wurde, alle vereinzelt stehenden längeren Filamente mit PCB zu behandeln, krümmte sich keine der Spitzenzellen zur Lichtquelle. Balken ~ 200 µM.

Tabelle 1: Phototrope Reaktion apikaler Zellen von *Ceratodon*-Filamenten der aphototropen Mutante *ptr116*. Phototropismus wurde nach 24 h Bestrahlung mit rotem Licht (661 nm) aufgezeichnet. ng = nicht gemessen.

| Kultur | Injizierte Lösungen | Konzentration | Anzahl der Injektionen | % injizierter Zellen mit positivem Phototropismus | Krümmungswinkel ±Standardfehler positiv reagierender Filamente |
|---|---|---|---|---|---|
| **wt4**[a] | - | | | | 82±1° |
| ***ptr116*** | PCB | 100 µM | 408 | 70 | 54±1° |
| ***ptr116*** | nur Puffer | - | 78 | 0 | ng |
| ***ptr116*** | PCB [b] | 100 µM | 50 [b] | 0 | ng |

[a] Messungen wurden an 163 Zellen vorgenommen. [b] Die Lösung wurde direkt an die Zellwand der Spitzenzellen appliziert.




In den mit PCB injizierten Zellen war der Chlorophyll-Gehalt, mikroskopisch über die Chlorophyll-Autofluoreszenz sichtbar gemacht, deutlich erhöht (s. Abbildung 15). Deutlich zu sehen ist ein Maximum der Fluoreszenz in der Spitzenzelle des Filamentes, welche in den basal anschließenden Zellen stetig abnimmt. In nichtinjizierten Zellen ist über konventionelle Fluoreszenzmikroskopie keine Chlorophyll-Fluoreszenz beobachtbar (s. Abbildung 16).

Abbildung 15: Hellfeldansicht (a) und Chlorophyll-Autofluoreszenz (b) eines *Ceratodon* Protonemas der Mutante *ptr116* nach Injektion von PCB. Die Filamente wurden für die Stimulation der Krümmung und der Chlorophyll-Biosynthese für 18 h mit Rotlicht bestrahlt . Die Lichtquelle stand links. Die Chlorophyll-Autofluoreszenz in den Chloroplasten erscheint rot. Balken ~ 25 µM. Veröffentlicht in Brücker *et al.* (2000).

Die phototrope Wachstumsrichtung der injizierten Filamente blieb über einen Zeitraum von drei Tagen erhalten. Anschließend wuchsen die Protonemen kontinuierlich mit schwächer werdendem Krümmungswinkel phototrop bis nur noch negativ gravitropes Wachstum, wie in nichtinjizierten Mutanten, beobachtet wurde. Die Chlorophyll-Fluoreszenz nahm ab, im Vergleich zur schwächer werdenden phototropen Reaktion jedoch weniger stark. Chlorophyll-Fluoreszenz konnte auch in den wieder negativ gravitrop wachsenden Spitzenzellen beobachtet werden. Die Injektion von PCB in die Spitzenzelle führte in vielen untersuchten Filamenten auch zur Induktion der Chlorophyll-Biosynthese in den nachfolgenden 1 - 2 Zellen.

## 3.2 Mikroinjektion von Hämoxygenase-Genen

Diese Arbeit wurde zum Teil bereits in Brücker *et al.* (2000) veröffentlicht.

Um zu testen, inwiefern Hämoxygenase den Phänotyp dieser Mutanten funktionell komplementieren kann, wurden das Hämoxygenase-Gen der Ratte *HO-1*, von *Arabidopsis thaliana HY1* und das erst kürzlich klonierte *CpHO1* von *Ceratodon purpureus* injiziert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pBAS (s. 2.11.6) injiziert.

### 3.2.1 Mikroinjektion von pBASHO

Das in den Vektor pBAS klonierte Ratten-Hämoxygenase-Gen *HO-1* kodiert für ein um 23 Aminosäuren verkürztes Protein. Das deletierte Peptid dient der Hämoxygenase als Membranverankerung (Wilks and Ortiz de Montellano, 1993). Ohne dieses Peptid ist das Protein löslich. Das in *Ceratodon* exprimierte Protein sollte daher löslich im Cytosol verbleiben. Mit Testverdaus konnte die Orientierung des Rattenleber-Hämoxygenase-Gens *in sense* im Expressionsplasmid pBASHO (s. Abbildung 6) gezeigt werden. Die Sequenzierung von pBASHO bestätigte die Vollständigkeit der kodierenden Sequenz. Injiziert wurde das Plasmid in einer Konzentration von 3 und 5 µg/µl in die Mutanten *ptr114* und *ptr116*. Insgesamt wurden 206 Spitzenzellen von *ptr116* und 83 Spitzenzellen von *ptr114* injiziert. Nach der Injektion wurden die Filamente mit der Cellophanfolie auf 1b-Medium ohne Osmotikum überführt und senkrecht stehend von der Seite mit Rotlicht bestrahlt. Eine deutliche Krümmung der injizierten Spitzenzellen zum Licht war nach 18 h Rotlichtinkubation zu beobachten (s. Abbildung 16a).

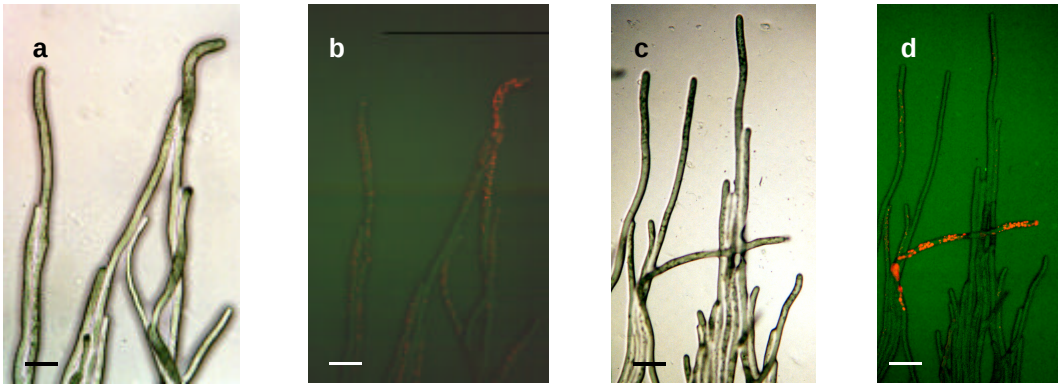



Abbildung 16: Hellfeldansicht (a, c) und Chlorophyll-Autofluoreszenz (b, d) von *Ceratodon* Protonemen der Mutante *ptr116* nach Injektion des Ratten-Hämoxygenase-Gens *HO1*. Die Aufnahmen entstanden nach 18 h (a, b) Induktion im Rotlicht bzw. 43 h (c, d) des gleichen Präparates. Das Licht strahlte seitlich von rechts auf die Filamente. Die Chlorophyll-Autofluoreszenz in den Chloroplasten erscheint rot. Balken ~ 25 µM. Veröffentlicht in Brücker *et al.* (2000).

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist die sukzessive Zunahme des Chlorophyll-Levels in den phototrop wachsenden Zellen mit zunehmender Zeit folgend auf die Injektion zu erkennen (s. Abbildung 16b und d). Nichtinjizierte Zellen bzw.

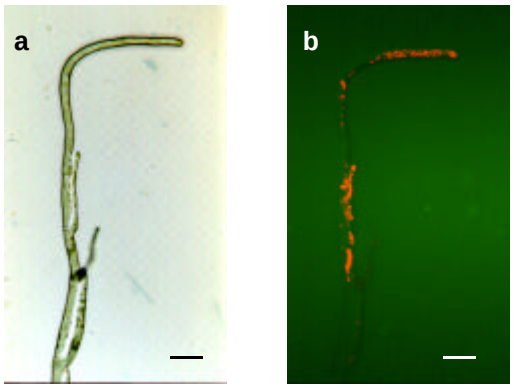
Kontrollzellen, die mit dem Vektor pBAS (s. 2.11.6) ohne Hämoxygenase-Insert injiziert wurden, zeigten weder eine phototrope Reaktion noch ein erhöhtes Chlorophyll-Level.

Insgesamt krümmten sich knapp 35 % der injizierten Zellen von *ptr114* und nahezu 40 % der injizierten Zellen der Mutante *ptr116* (s. Tabelle 2). Die injizierten Zellen konnten über einen längeren Zeitraum mikroskopisch beobachtet werden (s. Abbildung 16c). Sie wuchsen dabei kontinuierlich positiv phototrop zur Rotlichtquelle. Der Mittelwert der Krümmungswinkel wurde mit 54° bzw. 74°, je nach injizierter Mutante, berechnet (s. Tabelle 2). Eine Vielzahl der injizierten Filamente wuchs nach einem Zeitraum von 3 - 5 d wieder negativ gravitrop. Ein Hinweis darauf, dass die durch die Mikroinjektion hergestellten Transformanten die Hämoxygenase transient exprimieren und das Gen mehrheitlich nicht stabil in das Moosgenom integriert wurde. Der Übergang vom phototropen zum negativ gravitropen Wachstum erfolgte nicht wie nach der PCB-Injektion mit sukzessive geringer werdenden Krümmungswinkel, sondern abrupt.

Ein *screening* nach stabilen Transformanten wurde nicht durchgeführt. Da der Mikroinjektor samt Mikroskop nicht in einer Sterilbank aufgebaut war, verkeimten die injizierten Kulturen nach einigen Tagen. Die Beobachtung der injizierten Zellen am Binokular zur Aufnahme der Krümmungswinkel bzw. am Fluoreszenzmikroskop erfolgte ebenfalls unter nichtsterilen Bedingungen (s. 2.7.7). Eine Isolation stabiler Transformanten wäre daher nur unter großem Arbeitsaufwand möglich und nicht Ziel der Untersuchungen.

### 3.2.2 Mikroinjektion von pBASHY1

Der codierende Bereich des Hämoxygenase-Gens *HY1* aus *Arabidopsis* (Muramoto *et al.*, 1999) wurde in seiner gesamten Länge in den Vektor pBAS (s. 2.11.6) kloniert. Da für dieses Enzym ein Plastiden-Target-Peptid am N-Terminus vorhergesagt wird (Muramoto *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2001), sollte es nach Expression in den Chloroplasten lokalisiert sein. Die Identität und Orientierung des Inserts im resultierenden Expressionsvektor pBASHY1 (s. 2.11.6.2) wurde über Restriktionsverdaue analysiert. Der Klon pBASHY1#2 zeigte die erwarteten Banden des *in sense* ligierten Inserts und wurde für die Durchführung einer Plasmid-Midipräparation verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit einer Konzentration von 5 µg/µl in Spitzenzellen von *ptr116* injiziert und wie unter 3.2.1 beschrieben ausgewertet. Die zu beobachtende Krümmungsreaktion der injizierten Zellen zum Licht verlief im Gegensatz zu den pBASHO-Injektionen verzögert. Erst nach rund 24 h war der Beginn einer phototropen Reaktion auszumachen, die mehrere Stunden später in der beobachteten Spitzenzelle eindeutig zu erkennen war. In Abbildung 17 ist exemplarisch ein Protonemafilament 48 h nach der Injektion dargestellt. Die Krümmungswinkel wurden ebenfalls nach 48 h gemessen (s. Tabelle 2). Von den injizierten Spitzenzellen krümmten sich 37 % zum Licht. Der resultierende Krümmungswinkel lag mit berechneten 81° deutlich über dem Winkel der Ratten-Hämoxygenase exprimierenden Zellen. Im Gegensatz zur verzögerten Krümmung zum Licht war die Zunahme des Chlorophyllgehaltes zu einem früheren Zeitpunkt als nach pBASHO-




Injektion anhand der hohen Chlorophyll-Fluoreszenz zu detektieren (s. Abbildung 17b). Diese Chlorophyll-Fluoreszenz zeigte sich bereits 24 h nach der Injektion, zu dem eine phototrope Reaktion nicht wahrnehmbar war, die entsprechende Zelle also noch negativ gravitrop wuchs.

Abbildung 17: Hellfeldansicht (a) und Chlorophyll-Autofluoreszenz (b) einer *ptr116*-Mutante nach Injektion von pBASHY1. Das Chlorophyll in den Chloroplasten fluoresziert rot. Die Filamente wurden nach der Injektion für 48 h mit Rotlicht bestrahlt. Das Licht strahlte seitlich von rechts auf die Filamente. Balken ~ 25 µM. Veröffentlicht in Brücker *et al.* (2000).

Tabelle 2: Phototrope Reaktion apikaler Zellen von *Ceratodon*-Protonemen der aphototropen *Class* 1 Mutanten. Die phototrope Reaktion wurde nach 24 h (pBASHO u. pBAS) bzw. 48 h (pBASHY1) Bestrahlung mit rotem Licht (661 nm) aufgezeichnet. ng = nicht gemessen.

| Kultur | Injizierte Plasmide | Konzentration | Anzahl der Injektionen | % injizierter Zellen mit positivem Phototropismus | Krümmungswinkel ±Standardfehler positiv reagierender Filamente |
|---|---|---|---|---|---|
| ***ptr114*** | pBASHO | 3 µg/µl | 206 | 35 | 54±1° |
| ***ptr116*** | pBASHO | 5 µg/µl | 78 | 39 | 74±2° |
| ***ptr116*** | PBASHY1 | 5 µg/µl | 84 | 37 | 81±1° |
| ***ptr116*** | pBAS | 5 µg/µl | 50 | 0 | ng |

## 3.2.3 Mikroinjektion von *CpHO1*

Der codierende Bereich von *CpHO1* wurde mit und ohne CTP in den Vektor pBASterm ligiert (s. 2.11.6.3). Die Identität und Orientierung der cDNA im Vektor der erhaltenen Expressionsplasmide pBASCpHO1 und pBASÄCpHO1 wurde mittels PCR und Restriktionsverdau überprüft. Von Plasmiden mit *in sense* ligierten Inserts wurden Maxipräparationen durchgeführt und die DNA mit einer Konzentration von 1,5 - 3 µg/µl in Spitzenzellen von *Ceratodon Class* 1-Mutanten injiziert. Für die Komplementation wurden die aphototropen Mutanten *ptr114*, *ptr115*, *ptr116*, *ptr120* und *ptrP14* ausgewählt. In *ptr116* und *ptrP14*, über UV-Mutagenese bzw. Protoplastierung generiert (Lamparter *et al.*, 1997a; Esch, 1998), wurde von Franz Mittmann eine Veränderung der Gen-Sequenz von *CpHO1* nachgewiesen (Mittmann, 2003). Bei diesen beiden Mutanten und *ptr115* wurden beide Konstrukte injiziert. Alle injizierten Mutanten konnten in ihrer

phototropen Reaktion durch Injektion der Plasmide pBASCpHO1 und pBASÄCpHO1 wiederhergestellt werden (s. Tabelle 3). Exemplarisch sind mikroskopische Aufnahmen der Mutante *ptr115* dargestellt (s. Abbildung 18).

In allen 19 - 46 % injizierten Zellen, die eine positive phototrope Reaktion zeigten (s. Tabelle 3), wurde die Chlorophyll-Biosynthese induziert. Die Injektion des *full-length*-Gens führte wie im Fall der Injektion von *HY1* zu einer frühen Erhöhung des detektierbaren Chlorophyll-Levels. Wurde *CpHO1* ohne CTP injiziert, wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar (s. Abbildung 18b und c). Die Winkel wurden exemplarisch nur für die Mutanten *ptr115* und *ptr116* gemessen. Die berechneten Winkel der phototropen Reaktion lagen nach Injektion von pBASCpHO1 in beiden Fällen bei rund 80° und im Falle der Injektion von pBASÄCpHO1 bei rund 70° (s. Tabelle 3). Vier - sechs Tage nach der Injektion der Plasmide wuchsen die Spitzenzellen wieder negativ gravitrop. Diese Änderung der Wachstumsrichtung erfolgte ziemlich abrupt und nicht mit sukzessive abnehmenden Krümmungswinkel. Die Chlorophyll-Fluoreszenz in den Chloroplasten war noch einige Tage länger in den nicht mehr phototrop wachsenden Zellen zu beobachten.

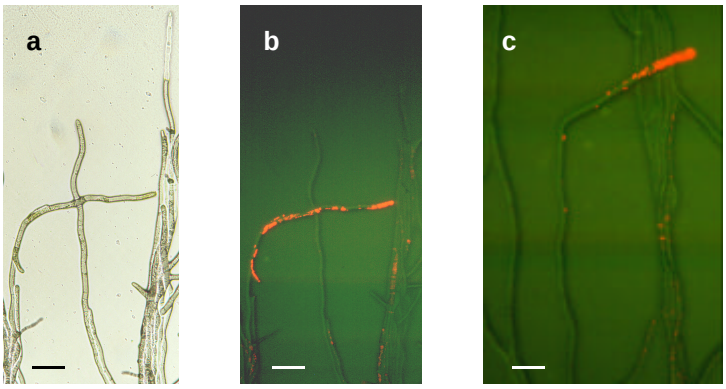



Abbildung 18: Hellfeld- (a) und Chlorophyll-Fluoreszenz-Aufnahme (b) von *Ceratodon*-Protonemen der Mutante *ptr115* nach Injektion von pBASCpHO1. Die Zellen wurden für 48 h nach der Injektion mit Rotlicht induziert. (c) Chlorophyll-Fluoreszenz-Aufnahme von *ptr115*-Spitzenzelle nach der Injektion von pBASÄCpHO1. Die Filamente wurden für 24 h mit Rotlicht bestrahlt. Das Licht (661 nm) kam von rechts. Die Spitzenzelle mit geringerer Lichtbrechung rechts oben in (a) ist nach der Injektion abgestorben. Die Chlorophyll-Autofluoreszenz ist rot. Balken in (a, b) ~ 50 µM, in (c) ~ 30 µM.

Tabelle 3: Untersuchung des Phototropismus nach Injektion von *Ceratodon* Hämoxygenase-Genen in Spitzenzellen aphototroper *Ceratodon* Mutanten. Die phototrope Reaktion wurde nach 24 stündiger Bestrahlung mit rotem Licht (661 nm) aufgezeichnet. n. g. = nicht gemessen.

| Kultur | Injizierte Plasmide | Konzentration | Anzahl der Injektionen | % injizierter Zellen mit positivem Phototropismus | Krümmungswinkel ±Standardfehler positiv reagierender Filamente |
|---|---|---|---|---|---|
| ***ptr114*** | pBASCpHO1 | 1,5 µg/µl | 37 | 24 | n. g. |
| ***ptr115*** | pBASCpHO1 | 3 µg/µl | 51 | 37 | 82±4° |
| ***ptr115*** | pBASÄCpHO1 | 3 µg/µl | 51 | 41 | 73±3° |
| ***ptr116*** | pBASCpHO1 | 3 µg/µl | 76 | 24 | 80±2° |
| ***ptr116*** | pBASÄCpHO1 | 3 µg/µl | 82 | 24 | 66±2° |
| ***ptr120*** | pBASCpHO1 | 1,5 µg/µl | 26 | 46 | n. g. |
| ***ptrP14*** | pBASCpHO1 | 3 µg/µl | 33 | 24 | n. g. |
| ***ptrP14*** | pBASÄCpHO1 | 3 µg/µl | 26 | 19 | n. g. |

## 3.3 Lokalisierung von CpHO1

Es sollte untersucht werden, inwiefern die Vorhersage für ein Chloroplasten-Transit-Peptid für die ersten 80 AS von CpHO1 zutrifft (Mittmann, 2003). Zu diesem Zweck wurden Reporter-Expressionskonstrukte von CpHO1 mit und ohne putative CTP hergestellt. Diese Konstrukte, pBASCpHO1GFP und pBASÄCpHO1GFP (s. 2.11.7), codieren für ein chimäres Protein, welchem C-terminal ein Green-Fluoreszent-Protein GFP angehängt wurde. Injiziert wurden die beiden Plasmide mit einer Konzentration von 1,5 µg/µl in dunkeladaptierte Spitzenzellen des *Ceratodon* Wildtyp wt4 und die aphototrope Mutante *ptr115*. Der injizierte Wildtyp wurde nach der Injektion für 24 h so gestellt, dass die injizierten Zellen auf eine Rotlichtquelle zuwuchsen. Dadurch wurde ein geradliniges Wachstum und somit eine Erleichterung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse ermöglicht. Zur Kontrolle wurde das GFP exprimierende Reporterkonstrukt pBASGFP (s. 2.11.7) mit einer Konzentration von 1,5 µg/µl injiziert. Das Fusionsprotein wurde im Falle des *full-length*-Konstruktes nur in den Chloroplasten lokalisiert (s. Abbildung 19a). Die um die putative CTP-Domäne deletierte Variante konnte, wie die Kontroll-Injektion, sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert werden (s. Abbildung 19b und c).

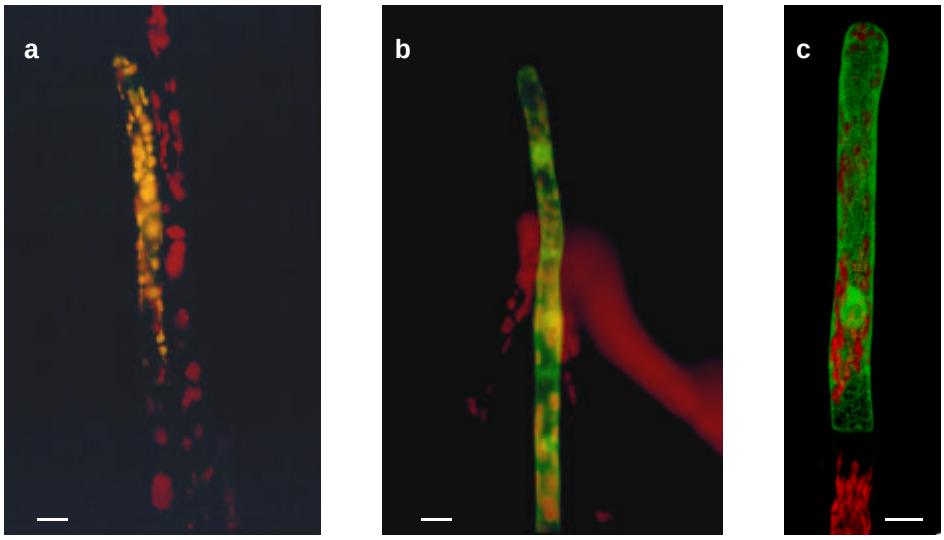



Abbildung 19: Lokalisierung der *Ceratodon* Hämoxygenase CpHO1 mittels Fluoreszenz-Aufnahmen. Alle Injektion in Wildtyp-Spitzenzellen (markiert mit Pfeil) von *Ceratodon* wt4. (a) und (b) konventionelles Fluoreszenz-Mikroskop; (c) konfokales LSM. (a) Injektion von pBASCpHO1GFP. Die Chlorophyll- und GFP-Fluoreszenzen in den Chloroplasten überlagern sich zu einem orangenen Farbton. (b) Injektion von pBASÄCpHO1GFP in die mittige Zelle. Gelbgrüne GFP-Fluoreszenz ist im Cytoplasma zu erkennen und akkumuliert in den Zellkernen. (c) Kontroll-Injektion mit pBASGFP (s. 2.11.7). GFP-Expression im Cytoplasma und Akkumulation im Zellkern. Falschfarbendarstellung: Chlorophyll-Fluoreszenz = rot; GFP-Fluoreszenz = grün. Balken ~ 10 µM.

Weiterhin wurde eine Komplementation der aphototropen Mutanten analysiert. Dazu wurden die injizierten Filamente von *ptr115*, *ptr116* und *ptr120* nach der Injektion und Umsetzen auf 1b-Medium ohne Osmotikum seitlich mit Rotlicht bestrahlt. Die HO1-GFP-Fusionsproteine waren ebenfalls in der Lage, einen *Rescue* in den injizierten Spitzenzellen hervorzurufen (s. Abbildung 20). Es wurde sowohl eine phototrope Antwort als auch die Chlorophyll-Biosynthese induziert. Der Krümmungswinkel ist nach Injektion des *full-length*-HO1-GFP-Fusionsproteins größer (s. Abbildung 20a) im Vergleich zur Injektion der deletierten Version des chimären Proteins (s. Abbildung 20b und c). Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Ergebnissen der Komplementierungs-Experimente aus 3.2.3. In den nicht injizierten Zellen ist weder eine Chlorophyllfluoreszenz noch eine positiv phototrope Reaktion zu erkennen. Die Lokalisierung der GFP-Fluoreszenz in den injizierten Mutanten entspricht den Resultaten, die beim Wildtyp erzielt wurden. In Abbildung 20a ist schön zu sehen, dass die Chlorophyllfluoreszenz nach Injektion des kompletten HO1::GFP-Fusiongens bereits vor der Krümmungsreaktion in den unteren zunimmt. Auch die GFP-Fluoreszenz ist deutlich erst im vorderen gekrümmten Drittel der Zelle zu sehen. Im Gegensatz dazu ist die GFP-Fluoreszenz nach Injektion des deletierten HO1-Reporterkonstruktes bereits ein bis zwei Zellen unterhalb der gekrümmten Spitzenzelle offensichtlich stark erhöht, jedoch eine Chlorophyll-Fluoreszenz kaum sichtbar.

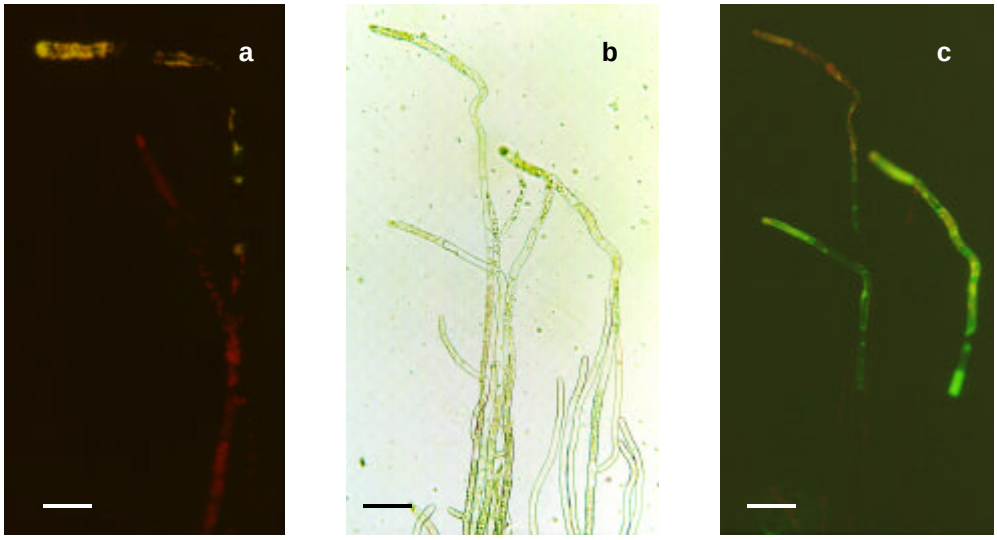



Abbildung 20: Komplementation aphototroper *Ceratodon*-Protonemen der Mutante *ptr120* durch Mikroinjektion von HO1::GFP-Fusionsproteinen und anschließender Bestrahlung mit Rotlicht von links. (a, c) Aufnahmen konventioneller Fluoreszenz-Mikroskopie (Chlorophyll-Fluoreszenz = rot; GFP-Fluoreszenz = gelbgrün) und (b) Hellfeld-Bild. (a) Spitzenzelle nach Injektion von pBASCpHO1GFP und 36 h Bestrahlung. Die zunehmende GFP-Fluoreszenz ist nur in den Chloroplasten detektierbar. (b, c) Filamente nach pBASÄCpHO1GFP-Injektion und 48 h Bestrahlung. (c) GFP-Fluoreszenz ist im Cytoplasma, und akkumuliert in den Zellkernen, zu erkennen. Balken in (a) ~ 25 µM und in (b, c) ~ 50 µM.

## 3.4 Injektion von CerpuPhy2

Ein Ziel war es, rekombinant exprimiertes Phytochrom-Protein in Mutanten zu injizieren, um die Wirkungsweise des Phytochroms zu testen. Die Injektion eines Phytochrom-Gens würde keinen Sinn machen, da der Phänotyp nicht komplementiert wird. Allerdings ergaben sich bei der Injektion des Proteins einige Komplikationen, so dass die Ergebnisse nicht eindeutig interpretiert werden können.

Unmittelbar nach Aufschluss der CerpuPhy2 exprimierenden Hefezellen (s. 2.5) mit einer *French Press* wurde der Extrakt mit PCB versetzt und mittels Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie das *His-getaggte* Phytochrom aufgereinigt (s. 2.9). Die Eluate mit den spektralphotometrisch bestimmten höchsten Phytochromgehalten wurden vereinigt und bis auf Konzentrationen von 2,5 - 7,5 µg/µl konzentriert. Die Injektionen erfolgten entweder direkt auf die Konzentration des Proteins oder aber am nächsten Tag. Die konzentrierten Eluate wurde ü. N. auf Eis gelagert und nicht eingefroren. Injektionen erfolgten nur mit frisch extrahiertem Phytochrom. Vor der Injektion wurde eventuell unlösliches Protein bei 28.000 g für 30 min gefällt. Eingefrorene Proben wurden lediglich für spektralphotometrische Quantifizierungen und SDS-PAGE-Gelelektrophoresen verwendet. Der Aufschluss über die *French Press* erwies sich als vorteilhaft. Die Hefezellen wurden

vollständig aufgeschlossen. Dadurch wurde ein erheblicher Zeitgewinn gegenüber einer Extraktion mit dem Ultraturrax erzielt. Dieses erschien als besonders wichtig, da die Aufreinigung, Konzentration und wenn möglich die Mikroinjektion innerhalb von 24 h erfolgen sollte. Vom Säulenauftrag, Durchlauf, Eluat und den konzentrierten Fraktionen, die für die Mikroinjektion weiterverwendet wurden, wurden Aliquots SDS-gelelektrophoretisch analysiert (s. Abbildung 21).

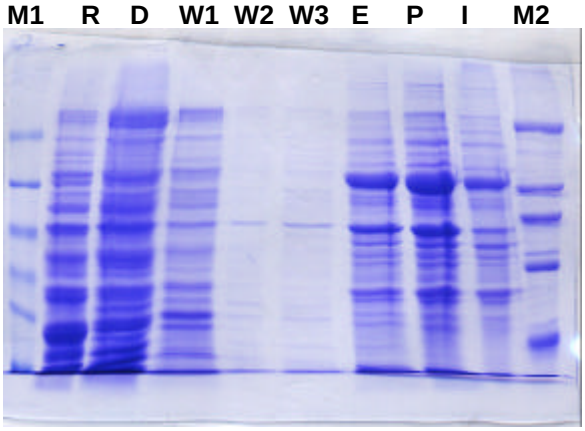



Abbildung 21: SDS-Gel der Phytochromaufreinigung und –Konzentration. M1 = PSM-Marker, R = Rohextrakt, D = Säulendurchlauf, W1 = 1. Waschdurchlauf (150 mM NaCl), W2 = 2. Waschdurchlauf (500 mM NaCl), W3 = 3. Waschdurchlauf (1200 mM NaCl), E = Eluat, P = Pellet der Ammoniumsulfatfällung des Eluats, I = Injektionslsg., M2 = HMW-Marker. Der Gesamtproteingehalt pro Spur beträgt 20 µg. Molekulargewichte der Marker in kDa.

| | Volumen [ml] | Gesamtprotein [mg] | Phytochrom [mg] | Reinigungs-faktor |
|---|---|---|---|---|
| **Rohextrakt** | 100 | 416 | 2 | |
| **Ü1 (AS)** | 90 | 373 | 0,15 | |
| **P1 (AS)** | 24 | 43 | 1,68 | 8 |
| **vereinigte Ni-NTA-Fraktionen** | 6,5 | 4,8 | 0,9 | 39 |
| **Injektionslösung** | 0,08 | 2 | 0,6 | 62 |

Tabelle 4: Beispiel für eine Aufreinigung von CerpuPhy2 für die Mikroinjektion. Insgesamt wurden hier 13,2 g Hefezellen extrahiert.

Der SAR der injizierten Proben lag bei ~0,3. Dieser Wert errechnet sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 280 nm und der Absorption bei 644 nm nach Dunkelrot-Bestrahlung. Das Phytochrom-PCB-Addukt besitzt hier sein Absorptionsmaximum bei 644 nm (Zeidler *et al.*, 1998).

Injiziert wurden rund 900 Spitzenzellen der *Class* 1-Mutanten *ptr116*, rund 500 Spitzenzellen von *ptr115* und 100 von *ptr120*. Die Phytochromkonzentration der Injektionslösung lag bei 2,5 - 7,5 µg/µl.

Die Auswertung der injizierten *ptr116*-Zellen gestaltete sich als schwierig, da die dunkeladaptierten Filamente im Zeitraum der durchgeführten Experimente nicht parallel aus-

gerichtet sondern leicht wellenförmig (s. Abbildung 22) negativ gravitrop wuchsen. Die dadurch entstehende Krümmung war jedoch nicht so hoch wie bei der positiv phototropen Reaktionen des Wildtyps. Daher sollten Protein-Injektionen, die zu phototropen Reaktionen ähnlich denen des Wildtyps führten, von diesen Tropismen unterscheidbar sein. Filamente von *ptr115* und *ptr120* wuchsen im Dunklen parallel ausgerichtet negativ gravitrop. Es wurden nur die längsten Zellen der dunkeladaptierten Kulturen injiziert. Als zusätzliches Kriterium mussten diese frei stehen, um nicht durch eng benachbarte Filamente an einer phototropen Reaktion behindert zu werden. Viele injizierte Zellen wurden außerdem nach der Injektion über eine Markierung im Medium mit der Kapillarenspitze gekennzeichnet. Über diese Merkmale konnten die injizierten Filamente relativ gut auch 24 h nach der Injektion erkannt werden.

Von den injizierten *ptr116*-Filamenten zeigten drei Spitzenzellen nach unilateraler Bestrahlung mit Rotlicht eine eindeutig positiv phototrope Reaktion, eine der injizierten *ptr115*-Zellen und keine von *ptr120* (s. Abbildung 22). Positiv phototropes Wachstum konnte über einen Zeitraum von 20 – 30 h beobachtet werden. Nach dieser Zeit wuchsen die Filamente abrupt negativ gravitrop (s. Abbildung 22g und h), vergleichbar den Beobachtungen nach Injektionen der Hämoxygenase-Gene. Bemerkenswert scheint eine weitere Beobachtung, die nur nach der Injektion des Holo-Phytochroms beobachtet wurde: An der Injektionsstelle zeigte sich häufig, und das auch bei überlebenden Zellen, die nicht phototrop wuchsen, eine Verdickung.

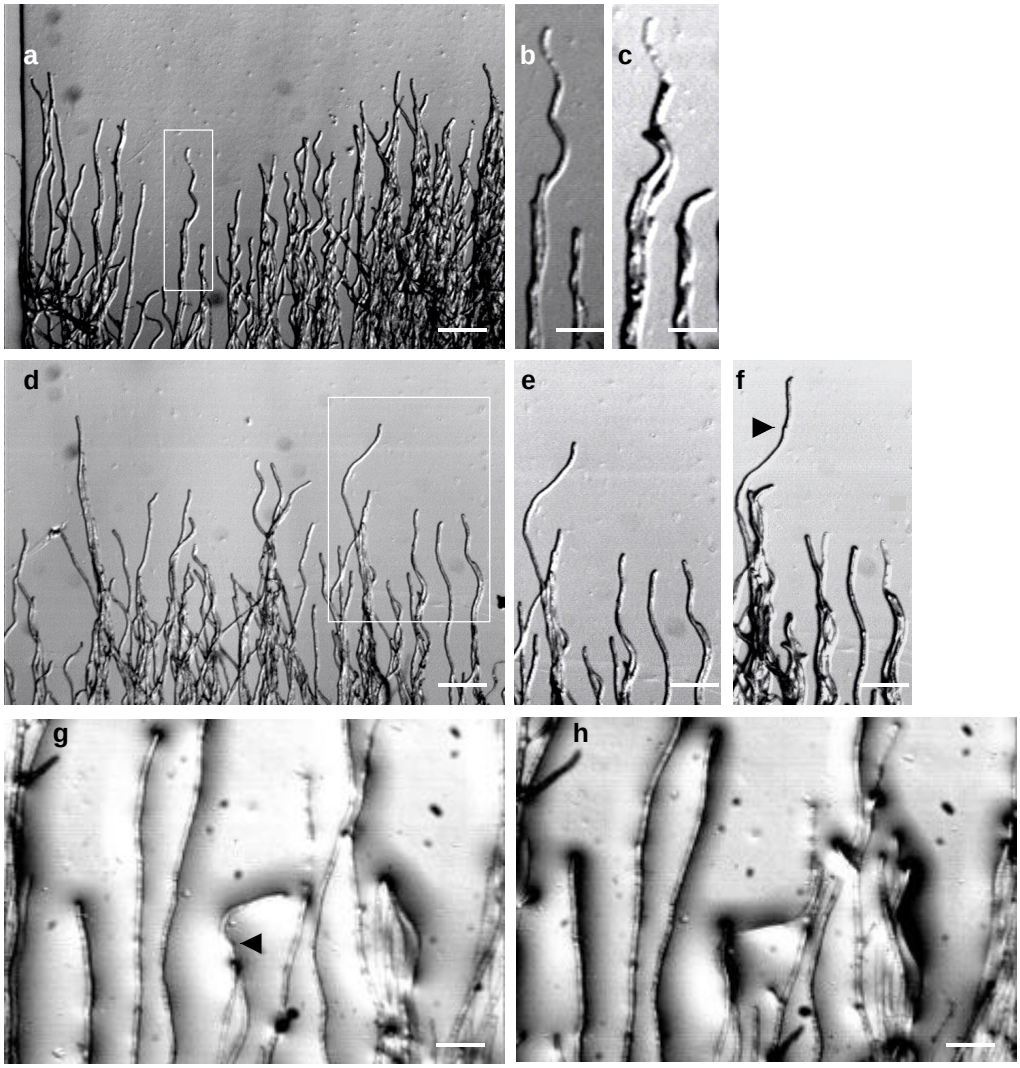



Abbildung 22: Dokumentation der Mikroinjektion von CerpuPhy2His in Protonema-Spitzenzellen dunkeladaptierter Filamente der aphototropen Mutante *ptr116* (a – f) und *ptr115* (g und h). (a, d) direkt nach der Injektion, (b, e) Ausschnitt aus (a bzw. d) und (c bzw. f) der gleiche Ausschnitt 24 h nach der Injektion, (g) 24 h nach der Injektion und (h) die gleichen Zellen 35 h nach der Injektion. Die Zellen wurden seitlich mit Rotlicht (661 nm) von rechts bestrahlt. Beide freistehenden Spitzenzellen in (b) wurden injiziert. Die Spitzenzelle links des längeren Filamentes starb unmittelbar auf die Injektion ab. (c) Die injizierte Zelle rechts krümmt sich zum Licht. (e) Alle Spitzenzellen der fünf freistehenden längeren Filamente wurden injiziert. (f) Von den drei rechten Zellen sind die beiden äußeren abgestorben. Die mittlere Zelle lebt, ist nach der Injektion aber nicht weiter gewachsen. Die benachbarte linke Zelle zeigt eine positiv phototrope Reaktion. Das Filament links überlebte die Injektion und wächst zunächst negativ gravitrop weiter. Die Apex ihrer Spitzenzelle zeigt zum Zeitpunkt der Aufnahme eine Verlagerung der Wachstumszone in Lichtrichtung. (g) Die injizierte Zelle krümmt sich zum Licht und (h) wächst 11 h später abrupt negativ gravitrop. Die schwarzen Pfeilspitzen in f und g zeigen auf die verdickten Injektionsstellen. Balken in a, d ~ 300 µM; in b, c ~ 80 µM, in e, f ~ 150 µM und in g, h ~ 50 µM.

Die Mehrzahl der Injektionen führte bei allen Mutanten zur Letalität der Spitzenzellen. Dieses wurde bereits kurz nach der Injektion beobachtet und ist auf der Kontrollaufnahme in Abbildung 23a am schwächeren Kontrast der abgestorbenen Zellen zu erkennen. Einen Tag folgend auf die Injektion sind die letalen Zellen deutlich zu sehen (s. Abbildung 23b). Die Auswertung von 7 Injektions-Experimenten mit insgesamt 212 injizierten Spitzenzellen ergab, dass 187 Zellen nach 1 d abgestorben waren. Dies entspricht ~88 %. Einige der injizierten Zellen stellten ihr Wachstum nach der Injektion ein, zeigten 24 h folgend auf die Injektion aber keine Anzeichen von Letalität (s. Abbildung 22f, die mittlere der 3 Zellen am rechten Rand). Einige Zellen wuchsen nach der Injektion weiter, bevor sie nach 24 h als abgestorbene Zellen erkannt wurden.

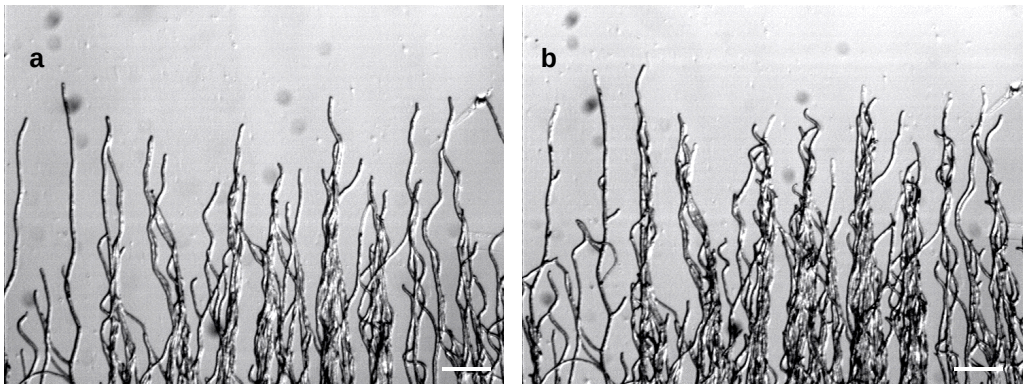



Abbildung 23: Mikroinjektion von CerpuPhy2His in *ptr116*-Protonemaspitzenzellen. (a) Bereits auf der Aufnahme direkt nach der Injektion des Proteins sind einige abgestorbene Zellen am schwächeren Kontrast zu erkennen. (b) Die meisten injizierten Zellen sind 24 h folgend auf die Injektion abgestorben. Balken ~ 300 µM.

Eine Auswertung der Krümmungswinkel wurde aufgrund der geringen Anzahl an positiv phototrop wachsenden Zellen nicht vorgenommen. Eine Induktion der Chlorophyll-Biosynthese infolge der Protein-Injektion konnte nicht detektiert werden. Kontrollexperimente mit wt4 führten nach Mikroinjektion des Phytochrom-Proteins ebenfalls bei ~90 % der Zellen zum Absterben. Überlebende wt4-Zellen zeigten eine sehr viel schwächere Chlorophyll-Autofluoreszenz gegenüber nichtinjizierten Zellen. Kontrollinjektionen mit dem 10 mM Phosphatpuffer in wt4- und *ptr115*-Zellen führten weder zum Absterben, noch wurde eine phototrope Reaktion oder die Chlorophyll-Biosynthese in den injizierten apikalen Zellen induziert. Ein weiteres Kontroll-Experiment wurde mit der Injektion von aufgereinigten Hafer-phyA durchgeführt. Dieses wurde mir von Dr. W. Gärtner (MPI für Strahlenchemie, Mühlheim a.d. Ruhr, Germany) zur Verfügung gestellt. Es wurde wie CerpuPhy2 konzentriert und mit einer Konzentration von 2,2 µg/µl in 10 mM Phosphatpuffer in 97 Spitzenzellen von *ptr116* injiziert. Keine der injizierten Zellen krümmte sich nach einer 24 h unilateralen Bestrahlung mit Rotlicht oder zeigte Chlorophyll-Fluoreszenz. Mit 91 abgestorbenen Zellen, die 24 h folgend auf die Injektion gezählt wurden, war die Letalität mit 94 % gegenüber den CerpuPhy2-Injektion erhöht.

# *3.5* Phototropismus von *Physcomitrella patens*

## 3.5.1 Dunkeladaptation von *Physcomitrella*-Caulonemata

Das Wachstum chloronematischer apikaler und subapikaler Zellen von *Physcomitrella* wird im Dunkeln vollständig eingestellt (Jenkins and Cove, 1983a; Jenkins and Cove, 1983b). Caulonematische apikale Zellen können sich hingegen im Dunklen teilen, so dass dunkel gewachsene, subapikale caulonematische Zellen entstehen (Cove, 1992). Die caulonematischen Filamente wachsen im Dunklen negativ gravitrop. Es hat sich jedoch gezeigt, dass dieses Dunkelwachstum nach 1 - 2 d und nur wenigen Zellteilungen aufhört. Es sollten daher Bedingungen für eine Dunkeladaptation der Filamente etabliert werden. Zuerst wurde der Einfluss verschiedener Zucker auf das Wachstum im Dunklen getestet. Es wurde entweder Glucose, Fructose oder Saccharose in Konzentrationen von 0,2 - 0,5 % (w/v) als Kohlenstoffquelle verwendet. Keiner der eingesetzten Zucker konnte das Dunkelwachstum stimulieren. Nach 10 d ohne Licht waren kaum negativ gravitrop gewachsene Zellen sichtbar. Abbildung 24a zeigt ein Beispiel für Protonema-Wachstum auf BCE2.0.5 plus 0,2 % Glucose.

Es zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen, dass eine Vorinkubation in weißem Licht das Wachstum der Protonemen in der nachfolgenden Dunkelperiode stimulieren kann. Die Bedingungen für die Vorbestrahlung wurden systematisch untersucht . Dazu wurden die auf einer Cellophanfolie als feine Linie aufgebrachten Protonemen vor der Dunkelinkubation bis zu drei Tage entweder vertikal oder horizontal in einen mit weißem Licht ausgeleuchteten Klimakonstantraum gestellt (Details siehe unter 2.1.2). In allen Fällen erfolgte die Aufzucht mit Glucose-haltigem Medium (BCE 2.2.5, das ist BCE2.0.5 mit 0,2 % Glucose). Es zeigte sich, das 1 d Inkubation im Klimakonstantraum und somit 16 h Bestrahlung mit weißem Licht das Wachstum caulonematischer Zellen induzierte (s. Abbildung 24b). Das Ergebnis war vergleichbar, wenn die Vorinkubation 2 - 3 d lang war, zusätzlich bildeten sich dann zahlreiche Gametophyten aus (s. Abbildung 24c).

Entscheidend war, dass die Petrischalen während der Vorinkubation ebenfalls senkrecht orientiert waren. Wenn während der Vorinkubation die Petrischalen horizontal positioniert waren, konnte kein Wachstum caulonematischer Filamente beobachtet werden (s. Abbildung 24d und e). ). Während der 3 d Inkubation im Weißlicht wurde zwar das Wachstum chloronematischer Zellen induziert, es bildeten sich jedoch keine Caulonemata in der nachfolgenden Dunkelperiode (s. Abbildung 24d). Die bereits gebildeten Chloronemata wuchsen im Dunklen geringfügig positiv gravitrop. Ausgestrichene Kulturen, die nach 3 d horizontal im Klimakonstantraum stehend für 10 d horizontal ins Dunkle überführt wurden, wuchsen mit identischer Wachstumsrate flächig auf dem Medium (s. Abbildung 24e).

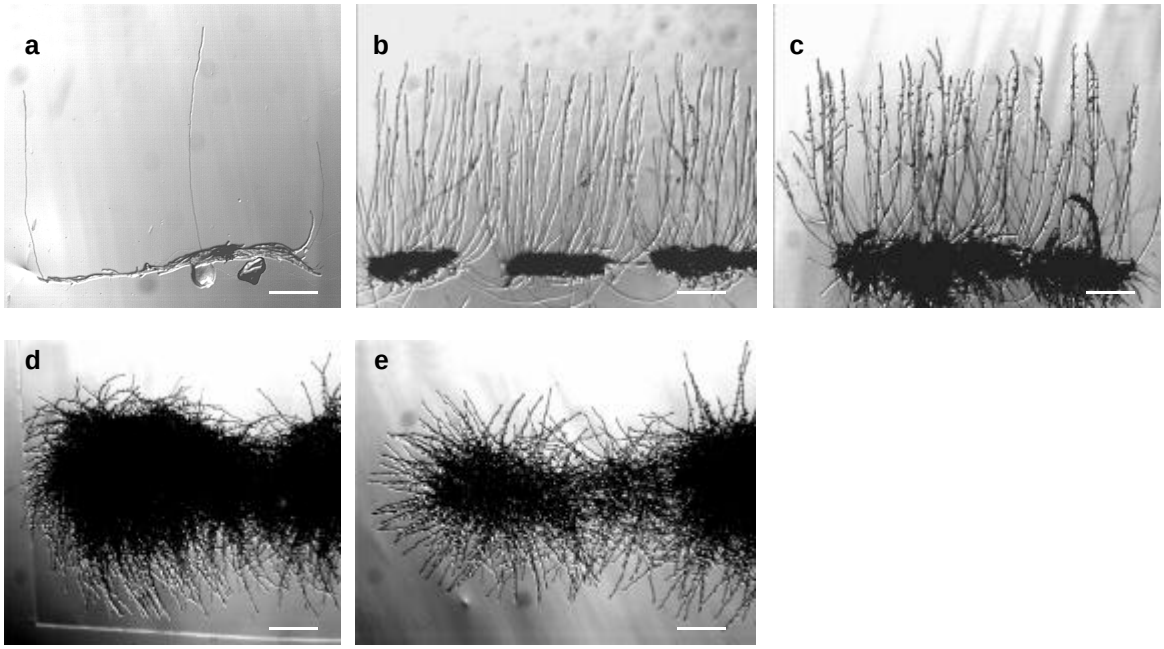



Abbildung 24: Einfluss von Weißlicht und Schwerkraft auf das Dunkelwachstum von *Physcomitrella*-Wildtyp-Protonemen. Die Aufzucht erfolgte auf BCE2.2.5-Medium. Die Filamente wurden für zehn Tage senkrecht (a, b, c, und d) oder horizontal (e) stehend dunkeladaptiert. (a) Nach dem Ausstreichen auf Cellophanblättchen wurden die Kulturen sofort ins Dunkle gestellt. Nur wenige Filamente bildeten sich im Dunklen. (b) Nach Inokulation wurden die Kulturen für 24 h auf senkrecht stehenden Platten mit Weißlicht induziert. Eine Vielzahl negativ gravitrop wachsender Filamente ohne Seitenverzweigungen hat sich im Dunklen ausgebildet. (c) wie (b), aber die Platten standen 3 d im Weißlicht. Es bildeten sich Gametophyten. (d) wie (b), aber während der Vorinkubation waren die Petrischalen horizontal orientiert. Negativ gravitrop wachsende Filamente wurden im Dunklen nicht ausgebildet. Chloronemen mit vielen beginnenden Seitenverzweigungen wachsen positiv gravitrop. (e) wie (d), Protonemen wurden jedoch horizontal stehend dunkeladaptiert. Balken in a, b, und c ~ 5 mm; in d und e ~ 2 mm.

Werden die nach 10 d Dunkelwachstum gebildeten Filamente mit höherer Vergrößerung mikroskopisch betrachtet, sind schräggestellte Querwände zwischen den Zellen deutlich zu erkennen (s. Abbildung 25a, b). Dieses ist ein sicheres Erkennungsmerkmal für caulonematische Protonemen. In Filamenten, die im Weißlicht wachsen, bilden sich Chloronema-Zellen mit senkrecht zur Längsachse stehenden Querwänden (s. Abbildung 25c). Dunkel gewachsene Spitzenzellen sind mit einer durchschnittlichen Länge von 150 - 250 µM wesentlich länger als die Spitzenzellen lichtgewachsener Protonemen, die eine Länge von etwa 120 µM aufweisen. Die Chloroplasten der caulonematischen Zellen sind nur rudimentär entwickelt. Ihr Chlorophyllgehalt ist stark reduziert. Die Fluoreszenz war durch das Okular mit dem bloßen Auge kaum zu erkennen. In den dunkeladaptierten Spitzenzellen sind die vorderen 20 - 30 µM immer frei von Chloroplasten. Diese befinden sich fast ausschließlich im vorderen Drittel der Zelle mittig im Cytoplasma. Die restlichen der Zelle werden von einer langgestreckten Vakuole ausgefüllt (s. Abbildung 25a

und b). Nur wenige Chloroplasten sind zellwandständig lokalisiert. Lichtgewachsene Spitzenzellen hingegen sind mit Chloroplasten, die einen leicht ovalen Körper bilden, dicht gefüllt (s. Abbildung 25c). Ihre Chlorophyll-Fluoreszenz war mikroskopisch deutlich zu sehen.

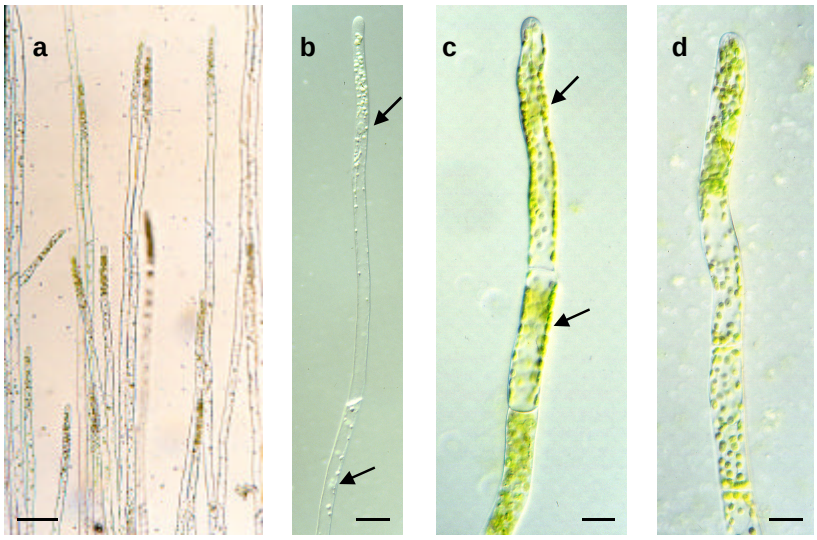



Abbildung 25: *Physcomitrella*-Protonemen. (a) Hellfeld- und (b) DIC-Aufnahme 10 d dunkelgewachsener Filamente. Deutlich sind die schräggestellten Zellwände zwischen den Zellen und die nur rudimentär entwickelten Chloroplasten zu erkennen. (c) Typische, viel kürzer gewachsene Spitzenzellen eines für 13 d weisslichtadaptierten Moosfilaments und (d) eines Filaments, welches für 13 d mit Rotlicht (661 nm; 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$) bestrahlt wurde. Die Pfeile markieren die Position der Zellkerne. Balken in: (a) ~ 50 µM; (b) ~ 30 µM; (c und d) ~ 20 µM.

Es ist eine Zonierung der Spitzenzelle bezüglich der Chloroplasten-Verteilung zu erkennen. Die Apex ist oft, jedoch nicht immer, chloroplastenfrei. Die Mehrzahl der Chloroplasten befindet sich dichtgedrängt in der apikalen Hälfte der Zelle, während die basale Hälfte von einer oder mehreren Vakuolen ausgefüllt wird. Chloroplasten befinden sich jedoch auch hier, und zwar vornehmlich randständig entlang der Zellwand. Der Zellkern ist sowohl in Caulonemen als auch in Chloronemen zwischen den aufgrund der Chloroplastenanzahl deutlich voneinander abgegrenzten Zonen mittig im Cytoplasma zu finden (s. Abbildung 25b und c). In den subapikalen Zellen sitzt der Zellkern an der Plasmamembran im vorderen Zelldrittel. In den dunkeladaptierten Filamenten sind in diesen Zellen nur noch sehr wenige Chloroplasten zu sehen während die lichtgewachsenen viele große Chloroplasten enthalten. Diese sind in beiden Fällen zellwandständig gleichmäßig im Cytoplasma verteilt (s. Abbildung 25b und c). Wachstum im Dauerrotlicht hebt die deutliche Zonierung der Spitzenzelle teilweise auf. Die Chloroplasten sind wie in den subapikalen Zellen gleichmäßiger über die Zelle verteilt. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich in der Position der Chloroplasten. Diese sind nicht wie in dunkel- oder weißlichadaptierten Zellen an die Zellwand gedrängt (s. Abbildung 25d).

### 3.5.2 Phototrope Reaktionen des *Physcomitrella*-Wildtyps

Phototropismus-Experimente lassen sich wesentlich einfacher mit dunkelgewachsenen, parallel ausgerichteten Filamenten durchführen. Entsprechend den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Vorversuchen wurden *Physcomitrella*-Filamente als 1 mm breiter Streifen auf eine Petrischale mit BCE2.2.5-Medium und Cellophanfolie aufgetragen. Diese Schalen wurden senkrecht stehend im Klimakonstantraum für 24 h mit Weißlicht inkubiert und daraufhin für zehn Tage senkrecht in einen völlig abgedunkelten Kasten bei 20 °C gestellt (s. Ergebnisse 3.5.1). Zunächst sollte untersucht werden, ob die Spitzenzellen auf Rotlicht-Induktion phototrop reagieren. Auf die Dunkeladaptation folgte eine 24 h unilaterale Bestrahlung mit Rotlicht (661 nm ± 20 nm). Die Spitzenzellen reagierten bei einer Fluenzrate von 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ positiv phototrop (s. Abbildung 26a). Daraufhin wurde eine Fluenz-Effekt-Kurve für die phototrope Antwort bei Photonen-Fluenzraten zwischen 0,005 - 15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ aufgenommen (s. Abbildung 27). Zusätzlich wurde die dunkeladaptierten Spitzenzellen gemessen und in die Kurve aufgenommen. Für jede Fluenzrate wurden mindestens fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Von jeder bestrahlten Kultur wurden von 30 oder mehr Filamenten die Krümmungswinkel der Spitzenzellen ermittelt, so dass jeder Punkt der resultierenden Fluenz-Effekt-Kurven aus mindestens 150 Messungen besteht.

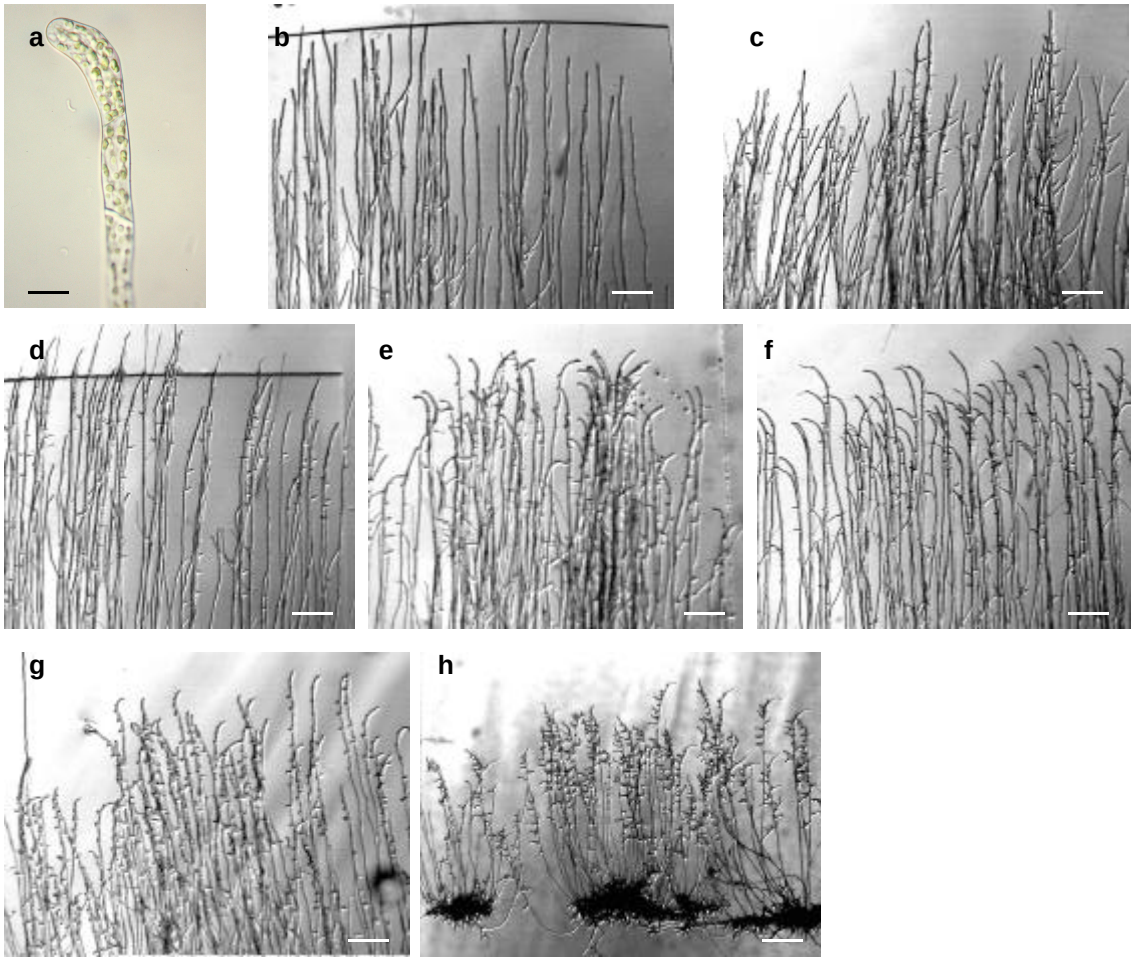



Abbildung 26: Phototrope Reaktion 10 d dunkeladaptierter *Physcomitrella*-Filamente, die für (a) 3 h; (d, e, f, g) 24 h und (c, h) 48 h mit Rotlicht (661 nm) von links bestrahlt wurden. (a) Apikale u. subapikale Zelle nach 3 h 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$: deutlich positiver Phototropismus der Spitzenzelle; die schrägen Querwände der caulonematischen Zellen sind gut zu erkennen; (b) Unbestrahlte Filamente; (c) eine Fluenzrate von 0,015 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ induziert Seitenverzweigungen, jedoch keine phototrope Antwort; (d) bei Fluenzrate von 0,05 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ ist eine leichte Krümmung weg von der Lichtquelle ist zu erkennen; (e) bei einer Fluenzrate von 0,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ reagieren die Spitzenzellen positiv und negativ phototrop; (f) positiver Phototropismus der Protonema-Spitzenzellen bei einer Bestrahlungsstärke von 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$; (g) Spitzenzellen von Protonemen wachsen mit negativ-, Seitenverzweigungen mit positiv phototroper Antwort bei einer Fluenzrate von 15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$; (h) diese Reaktion zeigt sich verstärkt nach 48 h Bestrahlung mit 15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$. Balken in (a) ~ 25 µM; in (b - g) ~ 300 µM; in (h) ~ 500 µM.

Interessanterweise hat die Fluenz-Effekt-Kurve sowohl ein Maximum als auch ein Minimum (s. Abbildung 27). Bei einer Fluenzrate von 0,005 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ wurde keine signifikante phototrope Reaktion induziert. Allerdings bildeten sich bereits Seitenverzweigungen. Dieses war im Dunklen nur sehr selten zu beobachten (s. Abbildung 26b). Auch nach 2 d seitlicher Bestrahlung mit 0,005 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ reagierten die Zellen

nicht phototrop (s. Abbildung 26c). In den Fluenz-Effekt-Kurven wurden diese Messungen daher nicht berücksichtigt. Veränderungen in der phototropen Reaktion erfolgte erst bei der nächsthöheren Fluenzrate. Zwischen 0,015 bis 0,15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ reagierten die Protonema-Spitzenzellen negativ phototrop (s. Abbildung 26d und Abbildung 27).

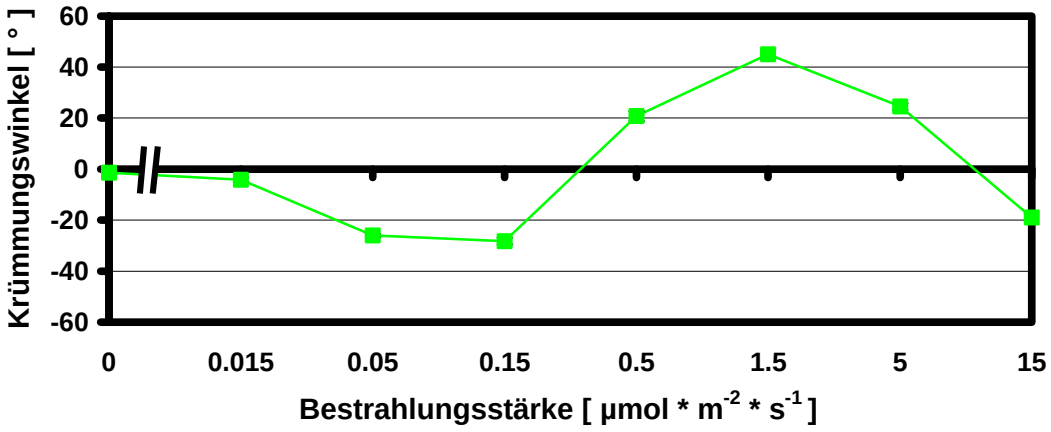



Abbildung 27: Fluenz-Effekt-Kurve des für 10 d dunkeladaptierten *Physcomitrella*-Wildtyps wtDC nach Bestrahlung mit Rotlicht (Wellenlänge: 661 nm; Bestrahlungsdauer: 24 h; Mittelwerte ± Standardfehler).

Erste positiv phototrope Reaktionen ergaben sich bei einer Fluenzrate von 0,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ (s. Abbildung 26e). Allerdings wuchsen auch bei dieser Bestrahlungsstärke noch ein großer Anteil der Filamente negativ phototrop. Im Mittel lag der Krümmungswinkel hier bei knapp über 20° (s. Abbildung 27). Deutlich positiven Phototropismus zeigten die Spitzenzellen der *Physcomitrella*-Filamente bei einer Fluenzrate von 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ (s. Abbildung 27). Es wuchsen kaum Zellen negativ phototrop bzw. völlig ohne Krümmung (s. Abbildung 26f). Der Mittelwert der Krümmungswinkel wurde mit rund 45° berechnet (s. Tabelle 5). Die nächsthöhere getestete Fluenzrate von 5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ führte zwar noch zu einem positiven Krümmungswinkel, jedoch bereits abgeschwächt gegenüber dem bei 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ gemessenen Wert (s. Abbildung 27). Bei 15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ ergab sich eine negativ phototrope Reaktion mit einem Mittelwert von rund –20° (s. Abbildung 27). Interessanterweise wuchsen die Verzweigungen bei dieser Fluenzrate fast ausnahmslos positiv phototrop (s. Abbildung 26g). Diese Beobachtungen manifestierten sich mit längerer Bestrahlungszeit (s. Abbildung 26h). Das phototrope Verhalten der *Physcomitrella*-Spitzenzellen kann, vor allem im Vergleich zum Phototropismus caulonematischer *Ceratodon*-Zellen, als stark heterogen bezeichnet werden. Die berechneten Standardabweichungen sind relativ groß (s. Tabelle 5). Dieses liegt zum Teil daran, dass innerhalb eines Versuchs sowohl positiv als auch negativ phototrope Reaktionen beobachtet wurden. Um das tatsächliche phototrope Verhalten der

apikalen Protonemazellen zu verdeutlichen, wurden daher zusätzlich zu den Fluenz-Effekt-Kurven Kreisdiagramme für jede gemessene Fluenzrate erstellt, die die Anzahl der Filamente, die mit einem bestimmten Krümmungswinkel zum Licht wachsen, prozentual darstellen (s. Abbildung 28).

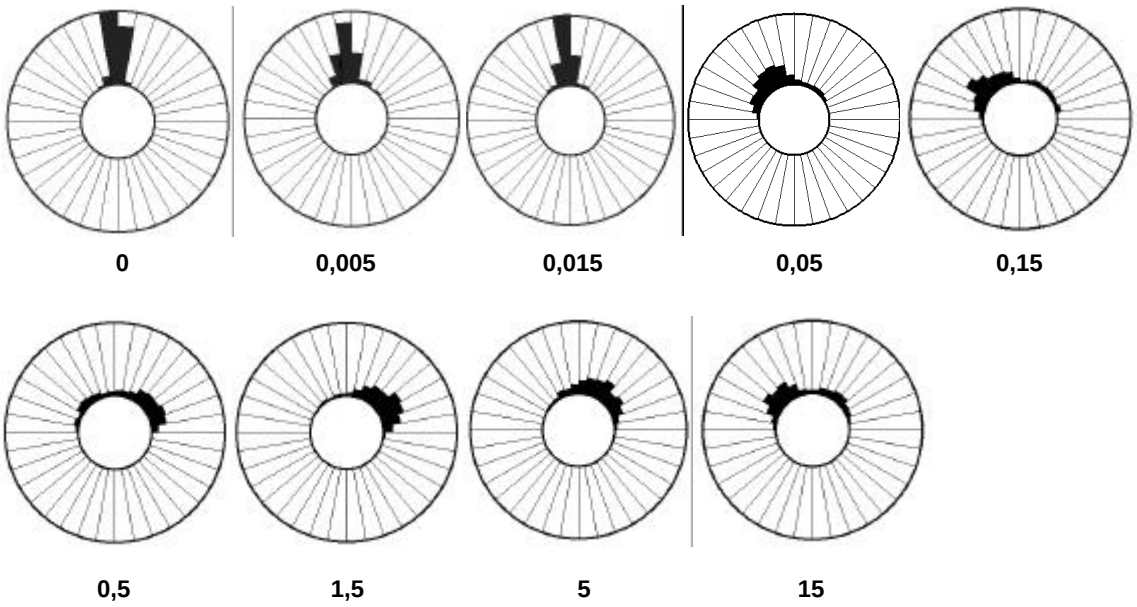



Abbildung 28: Prozentuale Verteilung der Krümmungswinkel 10 d dunkeladaptierter *Physcomitrella*-Wildtyp-Spitzenzellen nach 24 h Bestrahlung mit Rotlicht (661 nm) von rechts. Unterhalb der Kreisdiagramme ist die jeweilige Fluenzrate in µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ angegeben. In die Berechnung jedes Kreisdiagramms flossen die Einzelwerte von mindestens 150 gemessenen Krümmungswinkeln, die in fünf unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Die Balken repräsentieren die Häufigkeit der Krümmungswinkel gruppiert in 10° Intervallen. Die Distanz zwischen dem Inneren und äußeren Kreis entspricht einer Häufigkeit von 50 %. Das obere Ende der Diagramme stellt 0° Krümmung dar; nach rechts werden positive und nach links negative Krümmungswinkel dargestellt.

Chloroplasten entwickeln sich im Rotlicht recht schnell, jedoch noch nicht so weit, dass sie nach 24 h Bestrahlung ausdifferenziert wären (s. Abbildung 26a). Im Dauerrotlicht gewachsene Spitzenzellen (s. Abbildung 25d) zeigen nicht mehr die deutliche Zonierung des licht- bzw. dunkelgewachsenen Phänotyps: Vakuolen sind kaum zu erkennen und wenn dann wesentlich kleiner als bei den Vorhergenannten. Die Chloroplasten sind gleichmäßiger über die gesamte Zelle, mit einer leichten Bevorzugung der basalen Zellhälfte, verteilt.

Tabelle 5: Krümmungswinkel in Grad der mit Rotlicht bestrahlten Spitzenzellen von für 10 d dunkeladaptierten Wildtyp-Protonemen.

| **Fluenzrate in µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$** | **0** | **0,005** | **0,015** | **0,05** | **0,15** | **0,5** | **1,5** | **5** | **15** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mittelwerte** | -1,49 | -4,04 | -4,17 | -26,03 | -28,25 | 20,69 | 44,96 | 24,51 | -18,95 |
| **Standardabweichung** | 6,19 | 13,09 | 11,17 | 29,04 | 41,97 | 49,24 | 29,86 | 31,29 | 43,50 |
| **Standardfehler** | 0,69 | 0,94 | 0,61 | 1,31 | 1,88 | 1,98 | 1,31 | 1,43 | 1,66 |

Außerdem wurden Bestrahlungen dunkeladaptierter caulonematischer Filamente für 24 h bis 10 d mit Blaulicht einer Wellenlänge von 438 nm ± 20 nm und einer Fluenzrate von 1 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ durchgeführt. Es zeigte sich weder nach 2 d (s. Abbildung 29a) noch nach 4 d (s. Abbildung 29b) eine phototrope Reaktion. Seitenverzweigungen waren bereits nach 2 d gut ausgeprägt. Jedoch zeigten auch diese, im Gegensatz zu den Rotlichtbestrahlungen, keine phototrope Antworten, sondern wuchsen in gleicher Anzahl zur Lichtquelle hin als auch von ihr weg. Nach weiterer Bestrahlung mit Blaulicht bis zu 10 d bildeten sich Gametophyten in erheblicher Anzahl, die sich vornehmlich aus der Mitte der Filamente entwickelten (s. Abbildung 29c). Die Gametophyten zeigten keinerlei Anzeichen einer phototropen Reaktion.

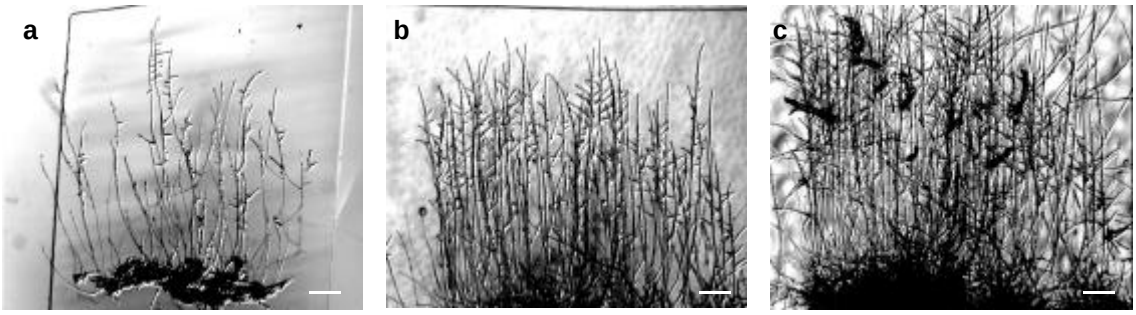



Abbildung 29: Für 10 d im Dunklen negativ gravitrop gewachsene *Physcomitrella*-Filamente nach seitlicher Bestrahlung mit Blaulicht (438 nm; 1 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$) von links. (a) Zwei- und (b) viertägige Bestrahlung mit blauem Licht führen nicht zu einer phototropen Antwort, jedoch werden Seitenverzweigungen induziert. (c) Weder Gametophyten noch Protonema-Spitzenzellen reagieren phototrop auf eine 10 d Bestrahlung. Balken ~ 500 µM.

### 3.5.3 Revertierbarkeit des Phototropismus

Wenn das Phytochromsystem für den Phototropismus verantwortlich ist, sollte die Rotlicht-Induktion durch dunkelrotes Licht revertierbar sein. Revertierungs-Experimente können nicht unter Dauerbestrahlung durchgeführt werden. Daher wurden die Filamente jede Stunde mit 5 min Rotlicht-Pulsen einer Fluenzrate von 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ bestrahlt, dann für weitere 5 min mit Dunkelrotlicht-Pulsen einer Wellenlänge von 730 nm

(4 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$) 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. Das Bestrahlungsprogramm wurde insgesamt fünfmal in unabhängigen Experimenten wiederholt. Von jeder bestrahlten Kultur wurde wiederum von mindestens 30 Filamenten die Krümmungswinkel der Spitzenzellen ermittelt, so dass insgesamt mindestens 150 Messwerte sowohl in das Rot-/Dunkelrot-Bestrahlungsprogramm als auch in die Kontrolle einflossen.

Die phototrope Reaktion, die sich, wenn auch abgeschwächt gegenüber einer 24 h Dauerbestrahlung, bei den Kontrollexperimenten einstellte, wurde durch den dunkelroten Lichtpuls völlig revertiert. Wie die Kreisdiagramme zeigen (s. Abbildung 30), ist der Krümmungswinkel der Spitzenzellen, die das Rot-/Dunkelrot-Lichtprogramm erfahren haben, gegen Null. Die Revertierbarkeit der negativen phototropen Reaktion wurde nicht untersucht.

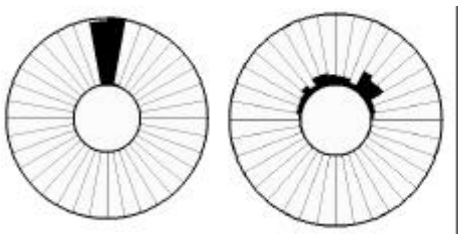


Abbildung 30: Auswertung der Revertierbarkeit der positiv phototropen Reaktion der Spitzenzellen von *Physcomitrella*-Wildtyp-Filamenten. Links: Kreisdiagramm rot (1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$)/dunkelrot (4 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$) bestrahlter Filamente (Licht von rechts); rechts: Kontrolle. Für Details zu den Kreisdiagrammen s. Abbildung 28.

## 3.5.4 Polarotrope Reaktionen des *Physcomitrella*-Wildtyps

Für Polarotropismus-Untersuchungen wurden dunkeladaptierte *Physcomitrella*-Caulonemata wie unter 2.1.2 beschrieben behandelt. Der elektrische Vektor des polarisierten Lichts wurde im Winkel von 0°, 45° (in Uhrzeigerrichtung) und 90° zur Längsachse der Filamente eingestellt. Für jeden Winkel wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Von jeder bestrahlten Kultur wurde wiederum von mindestens 30 Filamenten die Krümmungswinkel der Spitzenzellen ermittelt, so dass die Messwerte von mindestens 90 Protonemen in das Ergebnis für jeden E-Vektor einflossen. Resultierende polarotrope Reaktionen wurden wie in 2.1.2 beschrieben ausgewertet und als Kreisdiagramme (s. 3.5.2) dargestellt (s. Abbildung 31).

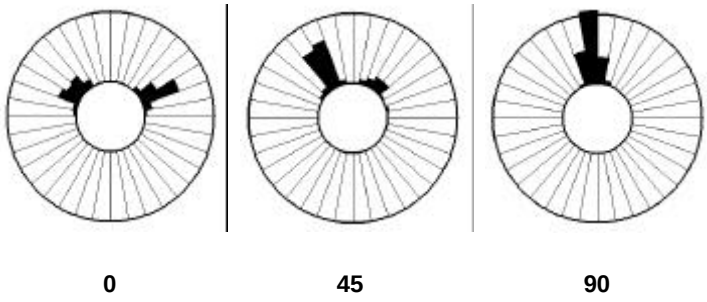



Abbildung 31: Untersuchung der polarotropen Reaktion dunkeladaptierter *Physcomitrella*-Filamente von wtDC. Die Kreisdiagramme stellen die prozentuale Verteilung der Krümmungswinkel von für 24 h mit polarisiertem Licht bestrahlten Protonema-Filamenten dar. Für Details zu den Kreisdiagrammen s. Abbildung 28.

Caulonematische *Physcomitrella*-Filamente reagierten vergleichbar polarotrop wie die von *Ceratodon* (Esch *et al.*, 1999) bzw. chloronematische Filamente von *Physcomitrella* (Jenkins and Cove, 1983b). Es machte keinen Unterschied, ob der E-Vektor des Polarisationsfilters im Winkel von 0°, 45° oder 90° zur Wachstumsrichtung der Protonemen eingestellt wurde - die Zellen wuchsen ab dem Zeitpunkt, zudem sie mit polarisiertem Licht bestrahlt wurden, im rechten Winkel zum E-Vektor des einstrahlenden Lichts. Bei dem 45 ° Versuch wuchsen einige Zellen auch parallel zum E-Vektor.

### 3.5.5 Phototrope Reaktionen der Phytochrom-*knockout*-Linien aus *Physcomitrella*

Nach der Charakterisierung des Phototropismus vom *Physcomitrella*-Wildtyp entstand die Möglichkeit, die von Franz Mittmann generierten *knockout*-Linien der Phytochrom-Gene *PhypaPhy1-PhypaPhy4* (Mittmann, 2003) bezüglich ihrer Wirkung auf den Phototropismus dunkeladaptierter Moosfilamente zu analysieren. Diese von Franz Mittmann isolierten vier Phytochrom-Gene sind die bisher einzig bekannten in *Physcomitrella*. Die hier durchgeführten Untersuchungen wurden mit Einzel-*knockouts* vorgenommen.

Die Phototropismus-Untersuchungen wurden wie unter 3.5.2 geschildert vorgenommen. Es wurden ebenfalls Fluenz-Effekt-Kurven wie für den Wildtyp unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Da sich bei Photonen-Fluenzraten zwischen 0,005 bis 0,015 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ beim Wildtyp keine phototrope Reaktion zeigte (s. Abbildung 27), wurde bei den *knockout*-Mutanten auf eine Messung bei einer Photonen-Fluenzrate von 0,005 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ verzichtet. Die Verteilung der Krümmungswinkel wurde wieder in Kreisdiagrammen dargestellt. Im Dunklen und bei der geringsten Fluenzrate von 0,015 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ wurden bei keiner Mutante Veränderungen gegenüber dem Wildtyp gemessen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden daher die Messungen dieser beiden Fluenzraten nicht als Kreisdiagramm dargestellt. Wildtyp-Kulturen wuchsen zur Kontrolle auf jeder Petrischale der jeweiligen *knockout*-Linie mit und wurden dadurch mit den gleichen Fluenzraten bestrahlt. Die Anzahl der durchgeführten Experimente und die in

die Ergebnisse eingeflossenen Messwerte wurden wie für den Wildtyp gewählt. Lediglich von den zur Kontrolle mitbestrahlten Wildtypen wurden nur drei Bestrahlungsexperimente ausgewertet. Von diesen Kontrollen wurden die Fluenz-Effekt-Kurven gemeinsam in einem Diagramm aufgetragen (s. Abbildung 37). Folgende *knockout*-Mutanten wurden für die Bestrahlungsexperimente ausgewählt: *PhypaPhy-knockout*: G2.7; *PhypaPhy2-knockout*: F159.6; *PhypaPhy3-knockout*: F151A.P3 G418; *PhypaPhy4-knockout*: F161.A.DC (Mittmann, 2003). Die Mutante G2.7 (*PhypaPhy1-knockout*) wurde mit einem Insertions-*knockout*-Konstrukt, alle anderen mit *replacement-knockout*-Konstrukten erzeugt. In allen Linien wurde über PCR, RT-PCR und *Southern blotting* bestätigt, dass das jeweilige Zielgen zerstört wurde (Mittmann, 2003).

Die Fluenz-Effekt-Kurven des *PhypaPhy1-* (s. Abbildung 32) und *PhypaPhy2- knockouts* (s. Abbildung 33) waren relativ ähnlich mit der des Wildtyps. Die Zweigipfeligkeit der Kurve ist bei beiden Mutanten weiterhin deutlich zu erkennen. Bei beiden Linien war der Phototropismus, vor allem in den Spitzenwerten, gegenüber dem Wildtyp abgeschwächt . Der negative Phototropismus bei einer Fluenzrate von 0,05 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ wurde bei beiden Mutanten mit rund -15° ermittelt (s. Tabelle 6 und Tabelle 7). Bei dieser Fluenzrate erreicht der Wildtyp seinen ersten negativen Gipfel mit rund –26° (s. Tabelle 5 und auch Vergleich der Mittelwerte Tabelle 10). Ähnlich verhält es sich mit dem positiven Winkel bei 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$, bei dem der Wildtyp einen Wert von knapp 45° erreicht, während die Krümmungswinkel des *PhypaPhy1-knockouts* hier einen Wert von rund 25° und die des *PhypaPhy2-knockouts* einen Wert von 15° erreichen. Zu erwähnen ist auch, dass der zweite negative Gipfel, der beim Wildtyp bei –19° liegt, von den Mutanten noch unterschritten wird. Für den *PhypaPhy1-knockout* wurde bei 15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ ein Wert von –44° und für den *PhypaPhy2-knockout* ein Wert von –32° ermittelt. Allerdings variiert die phototrope Reaktion der Wildtyp-Kontrollen (s. Abbildung 37) hier stark, auch wenn die gemessenen Krümmungswinkel immer im negativen Bereich lag.

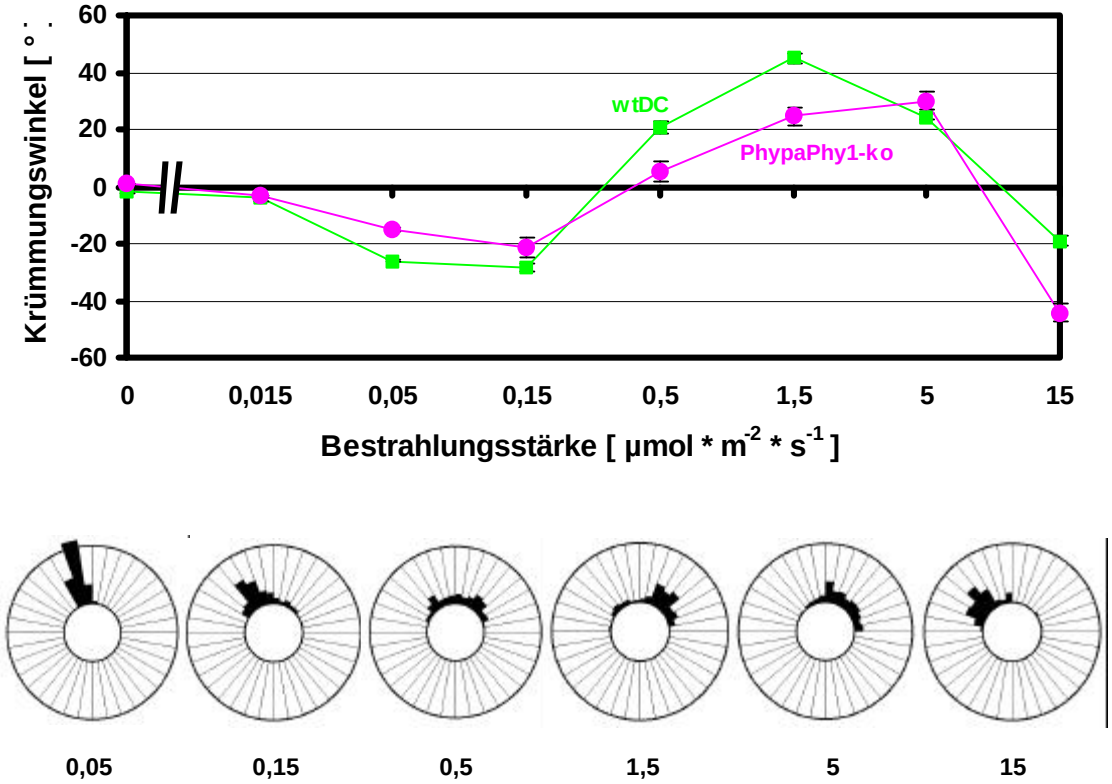



Abbildung 32: Fluenz-Effekt-Kurven (oben) des *PhypaPhy1-knockouts* im Vergleich zum *Physcomitrella*-Wildtyp wtDC (Mittelwerte ± Standardfehler) und Kreisdiagramme (unten), die die prozentuale Verteilung der Krümmungswinkel dunkeladaptierter *PhypaPhy1-knockout*-Spitzenzellen darstellen. Die Filamente wurden 24 h mit Rotlicht (661 nm) von rechts bestrahlt. Für Details zu den Kreisdiagrammen s. Abbildung 28.

Tabelle 6: Krümmungswinkel in Grad rotlichtbestrahlter Spitzenzellen nach 10 d Dunkeladaptation der *PhypaPhy1-knockout*-Linie G2.7.

| **Fluenzrate in µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$** | **0** | **0,015** | **0,05** | **0,15** | **0,5** | **1,5** | **5** | **15** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mittelwerte** | 0,92 | -3,47 | -15,02 | -21,64 | 5,57 | 24,73 | 30,16 | -44,23 |
| **Standardabweichung** | 5,73 | 6,58 | 6,61 | 23,20 | 36,85 | 36,25 | 32,20 | 23,15 |
| **Standardfehler** | 0,32 | 0,64 | 0,95 | 3,46 | 3,47 | 3,34 | 3,11 | 2,87 |

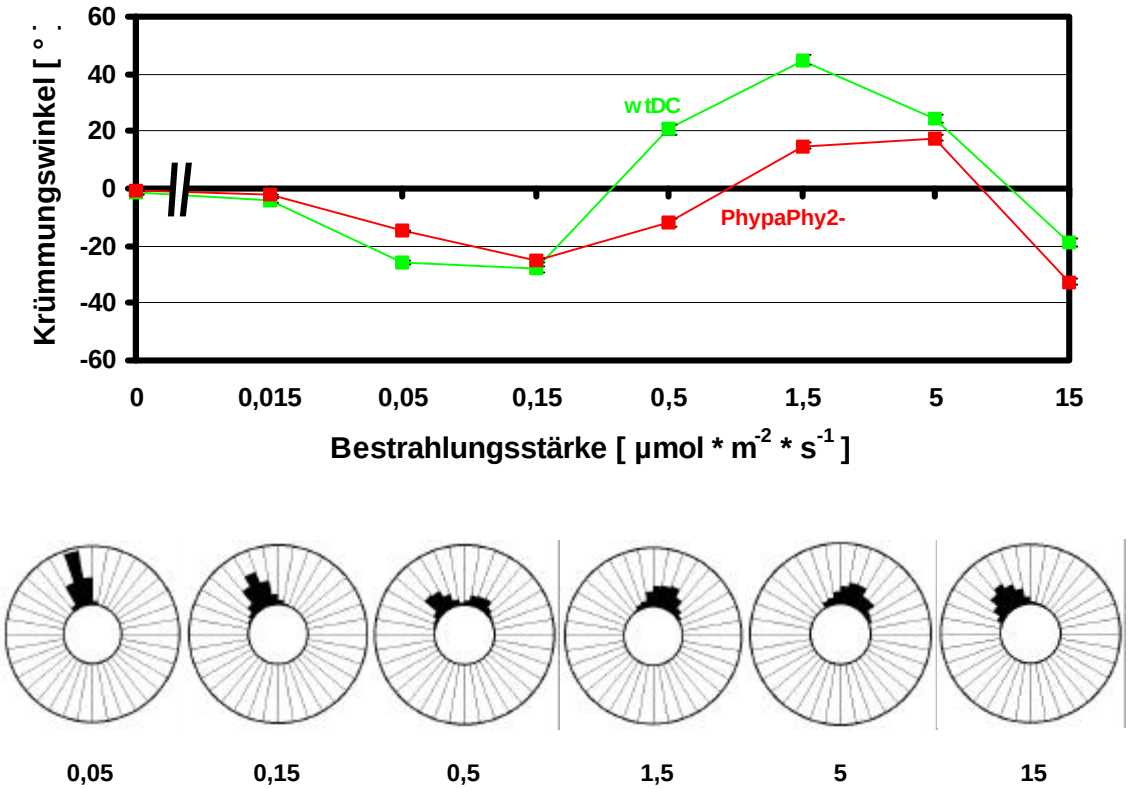



Abbildung 33: Fluenz-Effekt-Kurven (oben) des *PhypaPhy2-knockouts* im Vergleich zum *Physcomitrella*-Wildtyp wtDC (Mittelwerte ± Standardfehler) und Kreisdiagramme (unten), die die prozentuale Verteilung der Krümmungswinkel dunkeladaptierter *PhypaPhy2-knockout*-Spitzenzellen darstellen. Die Filamente wurden 24 h mit Rotlicht (661 nm) von rechts bestrahlt. Für Details zu den Kreisdiagrammen s. Abbildung 28.

Tabelle 7: Krümmungswinkel in Grad rotlichtbestrahlter Spitzenzellen von dunkeladaptierten Protonemen der *PhypaPhy2-knockout*-Linie F159.6.

| **Fluenzrate in µmol * m$^{-2}$ * s$^{-2}$** | **0** | **0,015** | **0,05** | **0,15** | **0,5** | **1,5** | **5** | **15** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mittelwerte** | -0,59 | -2,37 | -14,96 | -24,96 | -11,81 | 14,97 | 17,67 | -32,60 |
| **Standardabweichung** | 4,12 | 6,02 | 8,94 | 14,80 | 35,54 | 19,18 | 21,96 | 17,84 |
| **Standardfehler** | 0,20 | 0,44 | 0,52 | 0,69 | 1,57 | 0,86 | 0,99 | 0,92 |

Einen deutlicheren Phänotyp in der phototropen Reaktion zeigen die *knockouts* der Phytochrom-Gene *PhypaPhy3* und *PhypaPhy4*. Der negative Phototropismus des Wildtyps bei 0,15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ wird bei dem *PhypaPhy3-knockout* mit einem Krümmungswinkel von -43° gegenüber -28° beim Wildtyp noch verstärkt (s. Tabelle 8) und auch Vergleich der Mittelwerte (s. Tabelle 10). Die Fluenz-Effekt-Kurve (s. Abbildung 34) ist weiterhin zweigipfelig, die Krümmungswinkel im Mittelwert jedoch ohne negativen Phototropismus bei der höchsten Fluenzrate. Der Wildtyp krümmt sich bei 15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ mit einem Winkel von -19°, während der *PhypaPhy3-knockout* hier einen Krümmungswinkel von über 21° besitzt. Bei einer Fluenzrate von 5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ ist die positiv phototrope Reaktion des *knockouts* mit 53° mehr als doppelt so hoch wie die des Wildtyps mit 24°. Die Tendenz für dieses Ergebnis zeigen bereits die Kreisdiagramme der Krümmungswinkel für die Bestrahlung mit 0,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ und 1,5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$.Die *PhypaPhy3-knockouts* weisen hier einen leicht erhöhten positiven Phototropismus gegenüber dem Wildtyp auf.

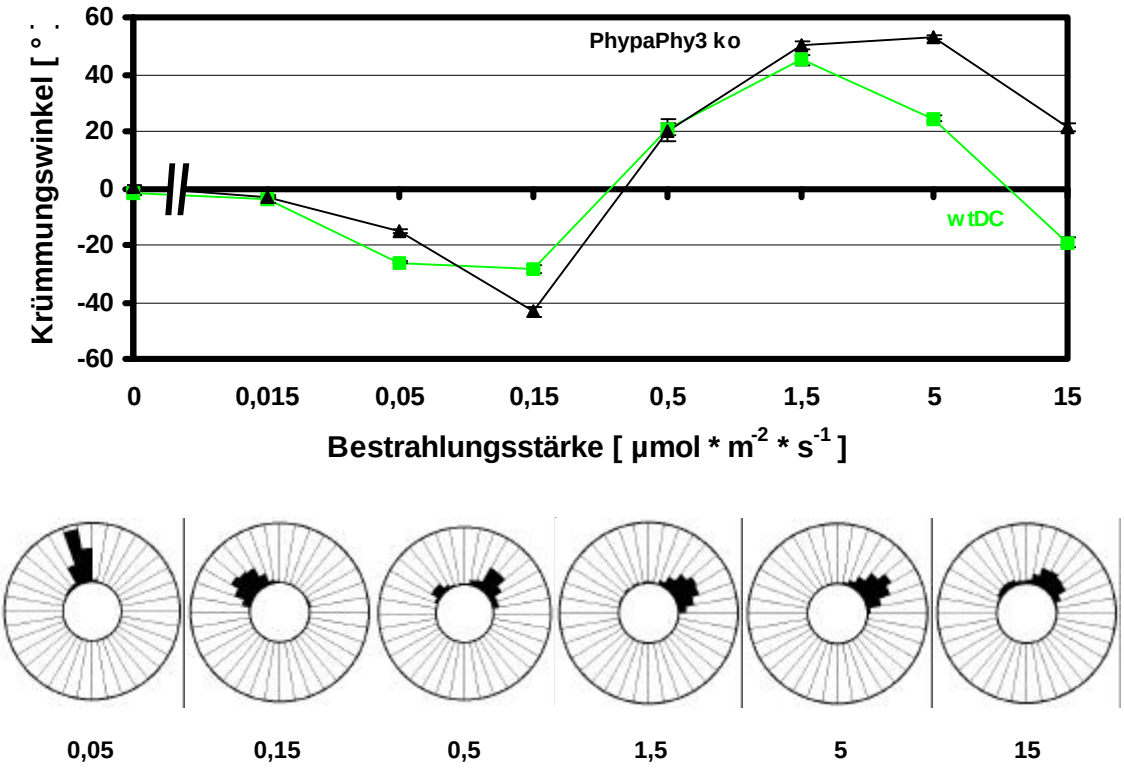



Abbildung 34: Fluenz-Effekt-Kurven (oben) des *PhypaPhy3-knockouts* im Vergleich zum *Physcomitrella*-Wildtyp wtDC (Mittelwerte ± Standardfehler) und Kreisdiagramme (unten), die die prozentuale Verteilung der Krümmungswinkel dunkeladaptierter *PhypaPhy3-knockout*-Spitzenzellen darstellen. Die Filamente wurden 24 h mit Rotlicht (661 nm) von rechts bestrahlt. Für Details zu den Kreisdiagrammen s. Abbildung 28.

Tabelle 8: Krümmungswinkel in Grad rotlichtbestrahlter Spitzenzellen von dunkeladaptierten Protonemen der *PhypaPhy3-knockout*-Linie F151A.P3 G418.

| Fluenzrate in µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ | 0 | 0,015 | 0,05 | 0,15 | 0,5 | 1,5 | 5 | 15 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mittelwerte | 0,66 | -3,06 | -14,87 | -43,48 | 20,04 | 49,98 | 53,18 | 21,34 |
| Standardabweichung | 5,39 | 6,30 | 10,29 | 26,43 | 41,63 | 29,04 | 17,66 | 34,86 |
| Standardfehler | 0,38 | 0,44 | 0,83 | 1,93 | 3,85 | 1,36 | 0,82 | 1,56 |

Den stärksten Phänotyp zeigt der *knockout* von *PhypaPhy4* (s. Abbildung 35). Auf der Fluenz-Effekt-Kurve fehlt dieser Mutante eine positive phototrope Reaktion!

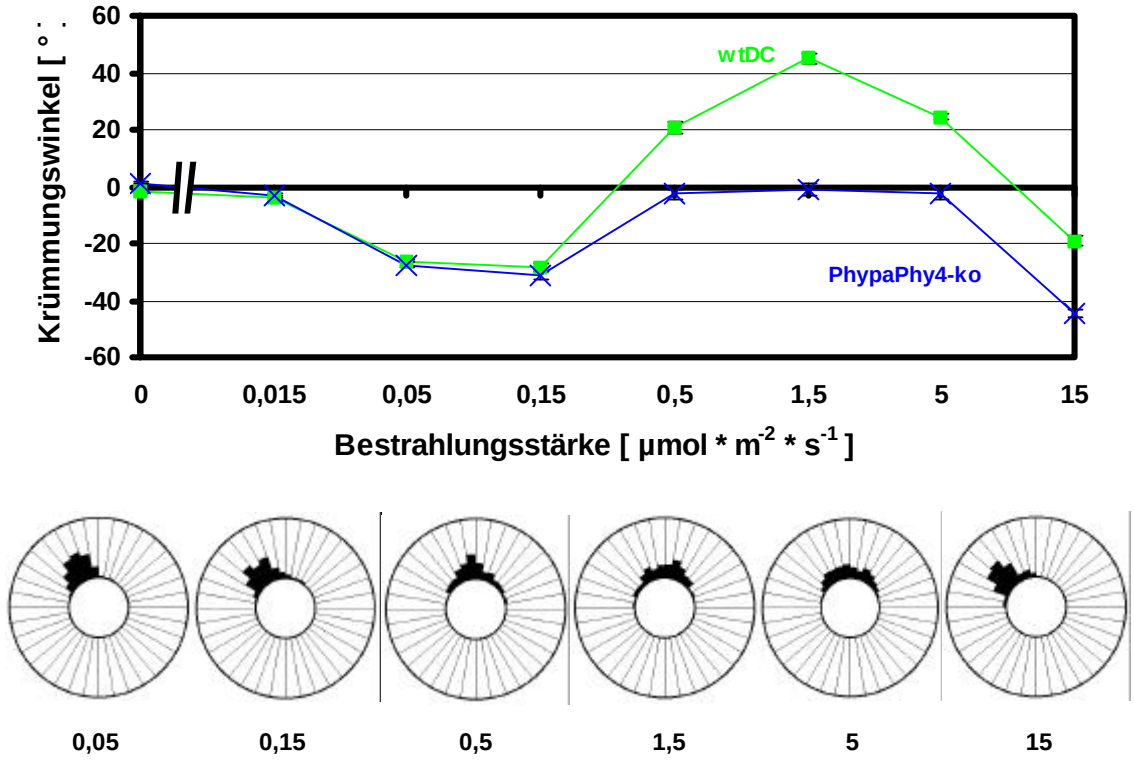



Abbildung 35: Fluenz-Effekt-Kurven (oben) des *PhypaPhy4-knockouts* im Vergleich zum *Physcomitrella*-Wildtyp wtDC (Mittelwerte ± Standardfehler) und Kreisdiagramme (unten), die die prozentuale Verteilung der Krümmungswinkel dunkeladaptierter *PhypaPhy4-knockout*-Spitzenzellen darstellen. Die Filamente wurden 24 h mit Rotlicht (661 nm) von rechts bestrahlt. Für Details zu den Kreisdiagrammen s. Abbildung 28.

Die Messungen bei 0,5, 1,5 und 5 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$ ergeben ausnahmslos Mittelwerte der Krümmungswinkel mit negativem Vorzeichen (s. Tabelle 9); die Krümmungswinkel des Wildtyps sind bei diesen Fluenzraten positiv (s. Tabelle 5 und auch Vergleich der Mittelwerte in Tabelle 10). Die nächsthöhere Bestrahlungsstärke von 15 µmol * $m^{-2}$ * $s^{-2}$

führt bei der Mutante mit einem Krümmungswinkel von -44° zu einer deutlich verstärkten Reaktion gegenüber dem Wildtyp mit hier knapp -19°.

Tabelle 9: Krümmungswinkel in Grad rotlichtbestrahlter Spitzenzellen von dunkeladaptierten Protonemen der *PhypaPhy4-knockout*-Linie F161.A.DC.

| **Fluenzrate in µmol * m$^{-2}$ * s$^{-2}$** | **0** | **0,015** | **0,05** | **0,15** | **0,5** | **1,5** | **5** | **15** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mittelwerte** | 1,36 | -3,11 | -27,39 | -31,42 | -2,77 | -0,86 | -2,75 | -44,28 |
| **Standardabweichung** | 6,25 | 5,91 | 16,80 | 23,01 | 29,41 | 31,73 | 32,03 | 18,18 |
| **Standardfehler** | 0,57 | 0,62 | 1,09 | 1,36 | 1,75 | 2,16 | 1,83 | 1,42 |

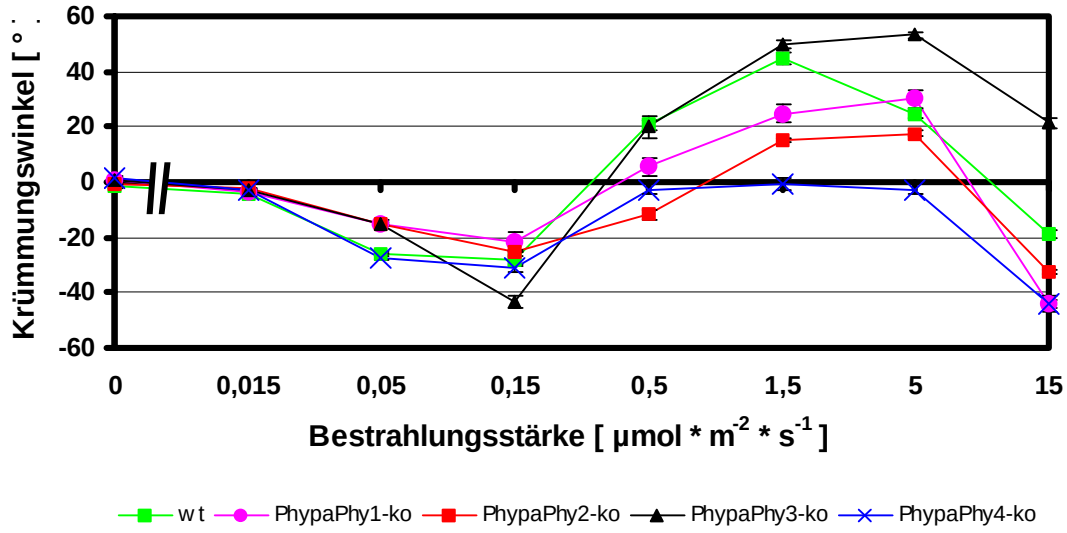



Abbildung 36: Fluenz-Effekt-Kurven der *PhypaPhy1 - 4 -knockouts* im Vergleich zum *Physcomitrella*-Wildtyp bei einer Wellenlänge von 661 nm und einer Bestrahlungsdauer von 24 h (Mittelwerte ± Standardfehler).

Tabelle 10: Mittelwerte der Krümmungswinkel in Grad des *Physcomitrella*-Wildtyps wtDC und der *knockout*-Linien der vier Phytochrom-Gene *PhypaPhy1 - 4* .

| | **0** | **0,015** | **0,05** | **0,15** | **0,5** | **1,5** | **5** | **15** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **wt** | -1,49 | -4,17 | -26,03 | -28,25 | 20,69 | 44,96 | 24,51 | -18,95 |
| **PhypaPhy1-ko** | 0,92 | -3,47 | -15,02 | -21,64 | 5,57 | 24,73 | 30,16 | -44,23 |
| **PhypaPhy2-ko** | -0,59 | -2,37 | -14,96 | -24,96 | -11,81 | 14,97 | 17,67 | -32,60 |
| **PhypaPhy3-ko** | 0,66 | -3,06 | -14,87 | -43,48 | 20,04 | 49,98 | 53,18 | 21,34 |
| **PhypaPhy4-ko** | 1,36 | -3,11 | -27,39 | -31,42 | -2,77 | -0,86 | -2,75 | -44,28 |

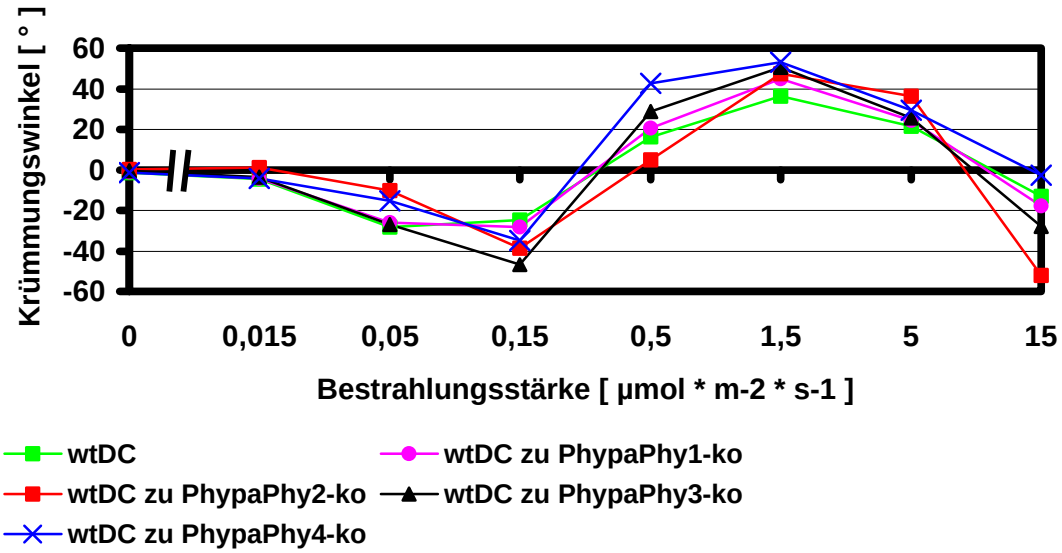



Abbildung 37: Vergleich der Fluenz-Effekt-Kurven der *Physcomitrella*-Wildtyp Kontrollen zu den *knockouts* der Phytochrom-Gene *PhypaPhy1 - 4* bei einer Wellenlänge von 661 nm und einer Bestrahlungsdauer von 24 h (Mittelwerte ± Standardfehler).

## *3.6 Gene targeting* in *Ceratodon purpureus*

Die Experimente zum *gene targeting* in *Ceratodon* basieren auf den Phänotypen des Wildtyps wt4 und der *Class* 1-Mutanten (Hartmann *et al.*, 1983; Lamparter *et al.*, 1996). Filamente des Ersteren reagieren positiv phototrop auf Rotlicht-Bestrahlung und zeigen eine deutlich grüne Farbe. Die Mutanten sind blassgrün und wachsen aphototrop (s. Abbildung 5b und c). Da es sich bei den *Ceratodon*-Kulturen, die transformiert wurden, sowohl um aphototrope Mutanten als auch um Wildtyp-Kulturen handelte, musste zuerst eine geeignete Methode gefunden werden, um homolog rekombinierte Transformanten zu selektieren und sofort zu isolieren. Es sollte gezeigt werden, inwiefern eine Selektion homologer Rekombinanten ohne Einsatz von Resistenzmarkern möglich ist. Daher erfolgte die Selektion der Transformanten nur aufgrund der oben erwähnten phänotypischer Merkmale. Die DNA-Konstrukte zum *gene replacement* enthielten kein Resistenzgen als Marker. Eine Selektion auf antibiotikahaltigem Medium wurde nur mit wenigen, bereits phänotypisch selektionierten Linien putativer *knockout*-Linien durchgeführt.

### *3.6.1* Versuche, das Gen *CpHO1* in *Ceratodon* wt4 durch homologe Rekombination auszuschalten

#### 3.6.1.1 Protoplastenregeneration und Selektion putativer *knockouts*

Die Optimierung der Protoplastenregeneration für *Ceratodon* wurde in einer früheren Diplomarbeit vorgenommen (Brücker, 1997). Die dort ermittelten Bedingungen wurden für die vorliegende Arbeit übernommen. Unter den dort beschriebenen Konditionen wurde, ohne dass eine Transformation der Protoplasten erfolgte, Regenerationsraten von 20 bis 30 % ermittelt.

Nach der Transformation mit einem *knockout*-Konstrukt wurden die wt4-Protoplasten auf mehrere Petrischalen mit jeweils 50.000 Protoplasten verteilt. Von 16 Petrischalen wurde die Anzahl regenerierender Protoplasten 6 d folgend auf die Transformation ausgezählt. Im Mittel regenerierten ~1150 Protoplasten pro Petrischale. Dieses entspricht einer, gegenüber der oben erwähnten, deutlich geringeren Regenerationsrate von 2,3 % (s. Tabelle 11). Unterschiede in der Regenerationsrate bezüglich der gewählten Transformationsbedingungen (Dauer und Temperatur des Hitzeschocks, s. 2.12) wurden nicht festgestellt. Kontroll-Transformationen mit pBASGFP (s. 2.11.7) wurden 1 - 2 d nach dem Umsetzen auf 1b-Medium qualitativ am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet, jedoch nicht ausgezählt. Es zeigte sich, dass Transformations-Bedingungen, bei denen ein Hitzeschock von 42 °C für 3 min gegeben wurde, zu 2 - 3 Mal mehr fluoreszierenden Zellen führte, als unter Konditionen von 45 °C für 70 s.

### 3.6.1.2 Phänotypische Analyse

Die Transformation mit dem *knockout*-Konstrukt pG18as (s. 2.11.8) sollte nach erfolgtem homologen Rekombinations-Ereignis zu aphototropen *knockout*-Mutanten mit blassgrüner Farbe führen. Es wurde daher mikroskopisch nach regenerierenden Protoplasten mit diesem Phänotyp gesucht. Direkt nach der Transformation wurden die *Ceratodon*-Protoplasten für 24 h dunkelinkubiert und anschließend für 2 d im Klimakonstantraum auf *Recovery*-Agar regeneriert. Zur weiteren Regeneration auf 1b-Medium, und vor allem für die Selektion putativer *knockouts*, wurden sie anschließend in konstantes Rotlicht gestellt (s. 2.12.4). Nach 3 d Wachstum im Rotlicht zeigten sich im Binokular gut sichtbar eine Vielzahl aphototrop regenerierender Protoplasten. Deren Protonemen wuchsen negativ gravitrop und annähernd weiß (s. Abbildung 38) im Gegensatz zu den grünen zum Rotlicht wachsenden Protonemen des Wildtyp-Phänotyps.

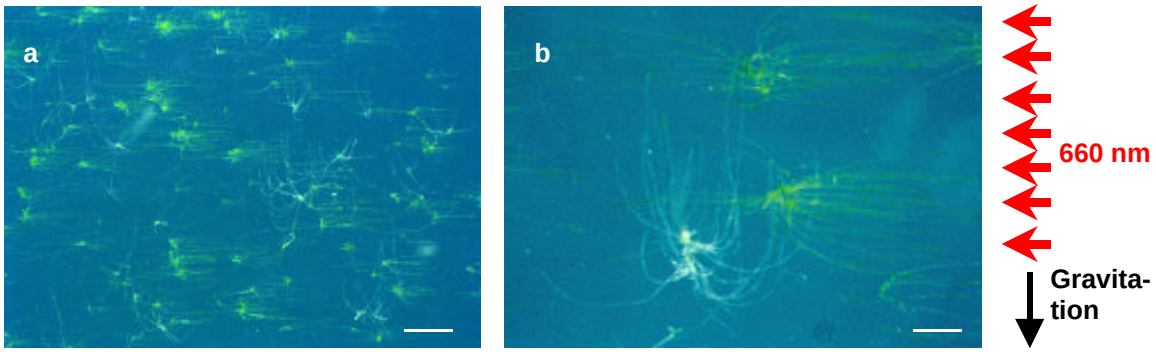



Abbildung 38: Phänotypisches *Screening* nach putativen *CpHO1-knockouts*. Die transformierten Protoplasten wurden für 3 d mit Rotlicht bestrahlt. Regenerierende Wildtyp-Kulturen wachsen zur Lichtquelle und deutlich grüner als die negativ gravitrop wachsenden Filamente typischer *Class* 1-Kulturen. In (b) wird sichtbar, dass die Filamente der beiden Phänotypen mit diesem *Screening* leicht miteinander kontaminieren. Balken in (a) ~ 1500 µM; in (b) ~ 200 µM.

Mit einer sehr spitzen Pinzette wurden 107 aphototrope Kulturen auf nummerierte Felder frischer Agarplatten umgesetzt und mit G18A1 bis G18T7 benannt. Zuvor wurde die Anzahl der Wildtyp-Linien und der aphototropen Mutanten von 16 Petrischalen mit regenerierenden wt4-Protoplasten bestimmt. Die Zahl regenerierender Protoplasten, die einen Phänotyp wie die aphototropen *Class* 1-Mutanten aufwiesen, lag bei 37 %. (s. Tabelle 11). Die oben genannte Beobachtung der Kontrolltransformationen mit dem Plasmid pBASGFP steht im Gegensatz zur Transformation mit den *knockout*-Konstrukten. Bei letzteren gab es keinen Unterschied in der Anzahl der aphototropen Mutanten bezüglich Dauer und Temperatur des Hitzeschocks, dem die Protoplasten ausgesetzt wurden.

Es zeigte sich beim Umsetzen, dass eine saubere Selektion der Mutanten schwierig war, da die Petrischalen seitlich zur Lichtquelle standen und Filamente aphototroper Pro-

tonemen leicht von phototrop wachsenden Kulturen kontaminiert wurden (s. Abbildung 38). Für weitere Transformationen wurden die Petrischalen daher mit der Rückseite zur Lichtquelle gestellt. Die Filamente der beiden anzutreffenden Phänotypen wuchsen daraufhin aneinander vorbei. Die Isolation einzelner Linien ohne Kontaminationen gelang nach den weiteren Transformationen durch dieses Umpositionierung der regenerierenden Protoplasten zum Rotlicht sehr gut (s. Abbildung 39).

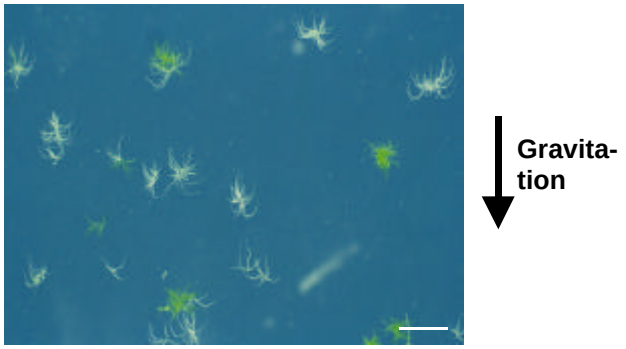



Abbildung 39: *Screening* putativer *CpHO1-knockouts* nach 3 d Bestrahlung mit Rotlicht (660 nm). Die Lichtquelle stand hinter der senkrecht stehenden Petrischale. Wildtyp-Protonemen wachsen auf die Lichtquelle zu, so dass eine Kontamination bei der Isolation aphototroper Filamente erfolgreich vermieden wurde. Balken ~ 1500 µM.

| ***knockout*-Konstrukt** | **regenerierte Protoplasten** | **regenerierte Protoplasten mit wt-Phäntyp** | **regenerierte Protoplasten mit *Class* 1-Mutante-Phäntyp** |
|---|---|---|---|
| pG18as | 2,3 % | 63 % | 37 % |

Tabelle 11: Phänotypische Auswertung der Transformation von wt4-Protoplasten mit dem *knockout*-Konstrukt pG18as.

Für gründlichere Phototropismus-Untersuchungen wurden von der 1. Transformation mit pG18as 205 aphototrope Mutanten für 7 d dunkeladaptiert. Von diesen zeigten 107 Linien nach unilateraler Bestrahlung mit Rotlicht keine phototrope Reaktion (s. Abbildung 40a). Die restlichen 98 Linien waren aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten bei der Isolation (s. Abbildung 38) mit wt4-Filamenten kontaminiert (s. Abbildung 40b). In der folgenden Transformation wurden aphototrope Linien nach Rotlicht-Bestrahlung von hinten selektioniert (s. Abbildung 39). Dadurch waren lediglich drei von 67 isolierten Linien kontaminiert. Mit den kontaminierten Linien wurden nicht weiter gearbeitet bzw. versucht, diese ohne Kontaminationen zu isolieren.

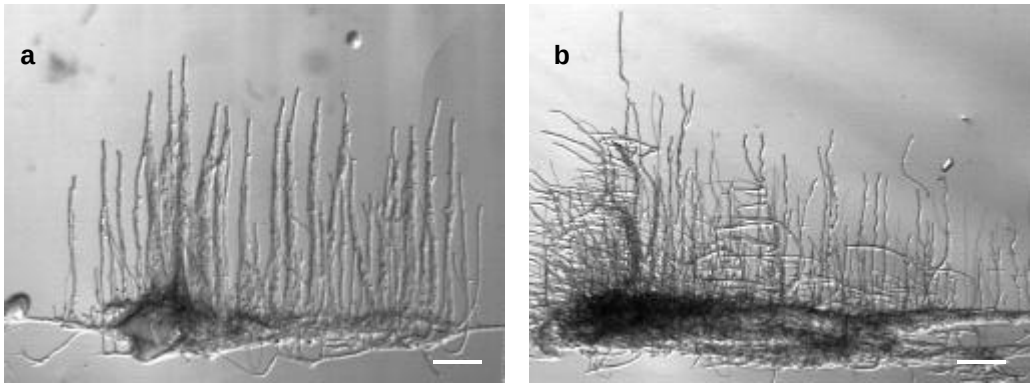



Abbildung 40: Isolierung putative *knockout*-Mutanten nach 24 h seitlicher Bestrahlung mit Rotlicht (661 nm) von links. (a) pG18A7 zeigt den Phänotyp der *ClassI*-Mutanten. (b) pG18S66 ist mit Filamenten, die den Wildtyp-Phänotyp zeigen, kontaminiert. Balken ~ 300 µM.

### 3.6.1.3 PCR-Analyse

Im Falle eines *knockouts* nach Transformation mit einem *replacement knockout*-Konstrukt, sollte das gesamte Konstrukt in das Wildtyp-Gen an homologer Position integrieren. Im hier durchgeführten Experiment wäre dies der mit *Nhe* I und *Hpa* I aus dem Vektor pG18as geschnittene Bereich. In *Physcomitrella* integriert die extrachromosomale DNA häufig als multiple Insertion in concatemererForm (Schaefer, 2002). Allerdings kann auch die Möglichkeit, dass wenige Moleküle des Plasmids pG18as nicht vollständig geschnitten wurden und in linearisierter Form homolog rekombinierten bzw. illegitim integriert wurden, nicht ausgeschlossen werden. Die hier verwendeten Primerkombinationen (s. Abbildung 41) würden diese Fälle nachweisen.

Die Klonierung der *knockout*-Konstrukte pG18as und pG18s hatte das Plasmid pG17.2#42 zum Ursprung (s. Abbildung 9). In dieses wurde die zum damaligen Zeitpunkt gesamte bekannte Nukleotidsequenz von *CpHO1* mit Hilfe der Primern f117 – f116 kloniert. Es wurde daher, aus dem oben genannten Grund eines eventuell unvollständigen Verdaus des *knockout*-Konstrukts, zusätzliche Sequenzinformation für die PCR-Analysen benötigt. Die *CpHO1*-Sequenz 5'-stromaufwärts und 3'-stromabwärts des in pG18as klonierten Bereichs, der für die in der PCR-Analyse eingesetzten Primer G14 und G18 benötigt wurde, konnte über 3'- und 5'-RAcE einer mit dem SMART-Kit (Clontech) hergestellten cDNA erhalten werden. Diese wurde mir von F. Mittmann zur Verfügung gestellt. Von 57 isolierten aphototropen Linien wurde nach weiteren drei Wochen Wachstum auf 1b-Medium DNA-Präparation durchgeführt (s. 2.10.1). Mit der extrahierten, genomischen DNA wurden PCR-Analysen nach dem unten dargestellten Schema durchgeführt (s. Abbildung 41).

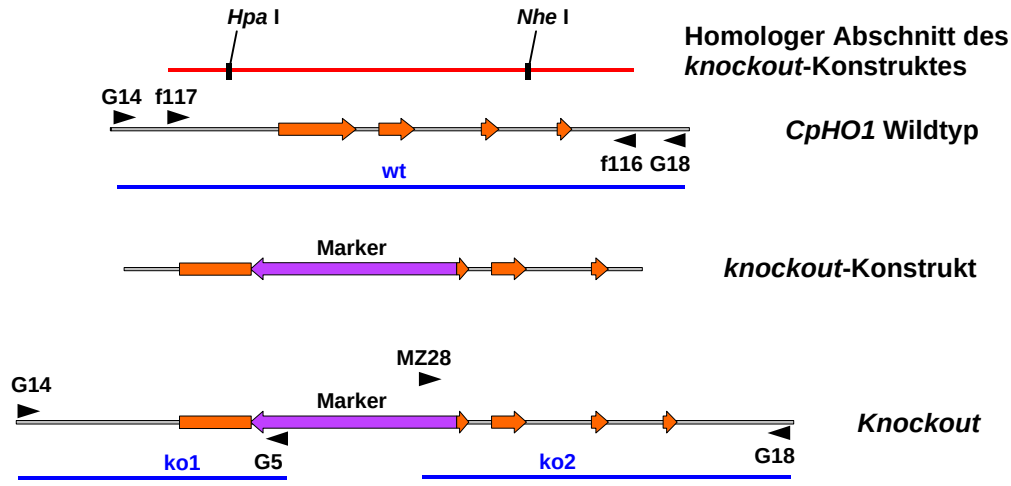



Abbildung 41: Schema des PCR-*Screenings* nach Transformation mit dem *replacement knockout*-Konstrukt pG18as. Blau sind die jeweiligen PCRs dargestellt. wt = Wildtyp-Kontrolle, ko1 u. ko2 = Detektion von *knockout*-Ereignis nach homologer Rekombination. Die Primer G14 u. G18 liegen außerhalb des homologen Bereichs von f117 bis f116, der zur Herstellung des *knockout*-Konstruktes verwendet wurde (dargestellt in rot). Dieses wurde vor der Transformation *Hpa* I/*Nhe* I doppelverdaut.

Überraschenderweise zeigte keine der PCRs, durchgeführt mit mehreren Primerkombinationen, das gewünschte Bandenmuster eines *knockouts*. In allen analysierten gDNAs wurde die Wildtyp-Bande (Primer G14/G18), wie in Abbildung 41 dargestellt, mit einer Größe von ~2,5 kb gefunden. Dieses PCR-Produkt sollte jedoch in *CpHO1-knockouts* nicht gebildet werden. Erwartet wurde in den *knockout*-Linien ein um ~2,6 kb verlängertes Produkt bei entsprechend Elongationszeit. Es wurden auch PCRs zum *knockout*-Nachweis mit einem HO-genspezifischen Primer und einem innerhalb des Vektors im Resistenzgen *hpt* durchgeführt (s. Abbildung 41). Im Falle eines *knockouts* durch homologe Rekombination wurden, unabhängig ob Einzel- oder Multiple-Insertion vorlag, Produkte einer Größe von ~2,4 kb (Primer G14/G5) bzw. ~1,4 kb (Primer G18/MZ28) erwartet. Diese PCR-Amplifikate konnten in den durchgeführten PCRs nicht nachgewiesen werden.

Es sollte untersucht werden, ob Transkripte der in *antisense* ligierten Hygromycin-Resistenz in den Mutanten detektiert werden können. Ist dies der Fall, kann vermutet werden, dass die aphototropen Mutanten Ergebnis von RNA-Interferenz (RNAi) sind. Primäre Hygromycin-Resistenz-Transkripte werden mit großer Wahrscheinlichkeit über ihr 3'-Ende hinaus verlängert und bilden somit *CpHO1-antisense*-RNA, die mit *sense*-Transkripten des Gens hybridisieren kann. In Folge könnten diese abgebaut werden. Von vier aphototropen Mutanten wurde in einem gemeinsamen Pool RNA isoliert, eine 1$^{st}$ *strand* cDNA hergestellt (s. 2.12.6) und mit den Primern J63 und MZ12 eine RT-PCR durchgeführt. Damit sollte das Hyromycin-Transkript amplifiziert werden. Dieses diente

auch dem Nachweis einer erfolgreichen DNA-Aufnahme der Protoplasten durch die PEG-Transformation. Die Bande der RT-PCR zeigte die erwartete Größe von ~1300 bp des Hygromycin-Transkripts. Damit wurde gezeigt, dass die Transformation erfolgreich verlief und RNAi nicht ausgeschlossen werden kann.

Es sollte untersucht werden, inwiefern die Orientierung der Marker-Kassette einen Einfluss auf die Anzahl regenerierender Protoplasten mit *Class* 1-Mutanten-Phänotyp hat. In pG18s (s. Abbildung 10) ist die Marker-Kassette *in sense* bezüglich der Leserichtung des *CpHO1*-Gens kloniert. Eine Transformation mit dem *Hpa* I / *Nhe* I doppeltverdauten *knockout*-Konstrukt führte zu einer ähnlichen Zahl aphototroper Mutanten mit reduziertem Chlorophyllgehalt. Wie im Fall der Transformation mit pG18as konnten mit extrahierten gDNAs von 10 aphototropen Linien kein *knockout* über PCR-Analyse nachgewiesen werden.. Mit der Transformation eines weiteren Konstruktes sollte geklärt werden, ob die Marker-Kassette überhaupt die Anzahl der resultierenden Phänotypen beeinflusst. Hierzu wurden das Plasmid pG19 hergestellt. Dieses Plasmid entstand durch Verdau von pG17.2#42 (s. Abbildung 9) mit *Mfe* I und anschließender Re-Ligation. Dieses resultierte in einer Verschiebung des Leseraster von *CpHO1*. Homologe Rekombination des Konstruktes in das wt4-*CpHO1*-Gen sollte daher zu einem *knockout* des Gens führen. Die Transformation von wt4-Protoplasten mit dem *Hpa* I / *Nhe* I doppeltverdauten Plasmid pG19 führte wiederum zu der extrem hohen Rate an *Class* 1-Phänotypen. Von diesen wurden 103 Linien ohne Kontamination isoliert. Weitere Untersuchungen wurden mit diesen Linien nicht durchgeführt.

Eine Subkultur von rund 700 isolierten G18-Mutanten wurde auf hygromycinhaltigem 1b-Medium kultiviert. Eine dieser Mutanten erwies sich als stabil antibiotikaresistent. Offensichtlich rekombinierte das *knockout*-Konstrukt illegitim in das *Ceratodon*-Genom. Weitere Untersuchungen auf molekulare Ebene wurden mit diesen Mutanten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### *3.6.2 Gene replacement* in *Ceratodon ptr116*

Protoplasten der *Class* 1-Mutante *ptr116* sollten mit dem *gene replacement*-Konstrukt pG23#4 transformiert werden (s. Abbildung 11). Infolge homologer Rekombination des Konstruktes in das *ptr116-CpHO1*-Gen sollte der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden. Die Protoplastierung von *ptr116* unter Standard-Bedingungen ergab lediglich ~600.000 Protoplasten pro Ansatz. Die geringe Anzahl an *ptr116*-Protoplasten wurde bereits von Heike Esch bei Transformations-Versuchen mit diesen Mutanten beobachtet (Esch, 1998). Protoplastierungen von ähnlichen Mengen Ausgangsmaterial des *Ceratodon*-Wildtyps wt4 ergaben im Falle der Transformationen mit den *knockout*-Konstrukten 3 - 5 x $10^6$ Protoplasten, also die 5 - 8fache Ausbeute. Die Transformation des *Hpa* I- / *Nhe* I-geschnittenen Plasmides pG23#4 erfolgte unter folgenden Bedingungen: 3 min bei 45 °C, 5 min bei 45 °C und 7 min bei 45 °C. Die Protoplasten wurden nach der Transformation wie oben ausgeführt (s. 3.6.1) weiterbehandelt.

### 3.6.2.1 Phänotypische Analyse

Nach 7 d in konstantem Rotlicht waren einige phototrop wachsende Filamente erkennbar. Unter dem Binokular zeigte sich, dass diese erheblich Mengen an Chlorophyll produzierten und wie der Wildtyp wuchsen (s. Abbildung 42a und b). Weitere 3 Wochen nach der Transformation waren die Wildtyp-Phänotypen auch makroskopisch gut sichtbar (s. Abbildung 42c und d).

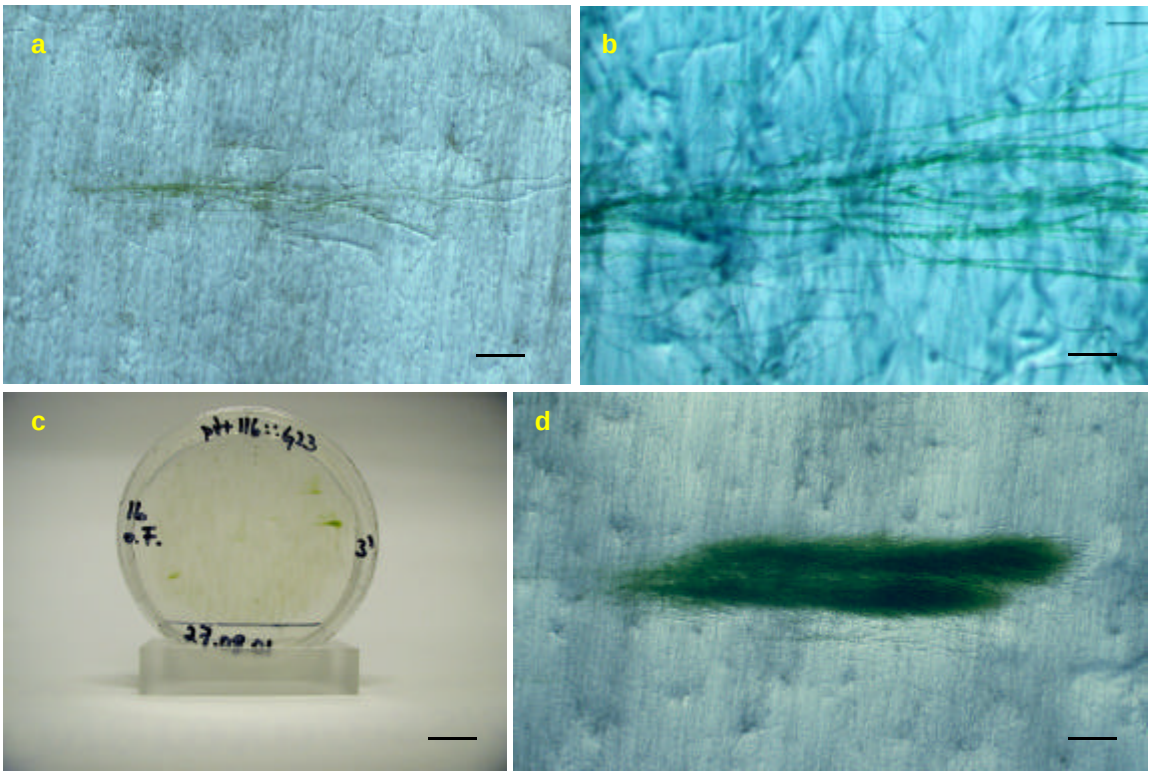



Abbildung 42: Dokumentation der Transformation von *ptr116*-Protoplasten mit dem *gene replacement*-Konstrukt pG23#4. Die Petrischalen wurden seitlich mit Rotlicht (661 nm) bestrahlt. (a, b) Phototrop wachsende Protonemen nach 7 d Bestrahlung. (b) In diesem Ausschnitt aus (a) sind die Chloroplastenreichen, grünen Filamente, die von chloroplastenarmen, weißlichen aphototropen Filamenten überwuchert werden, gut zu erkennen. (c, d) Phototrope Phänotypen nach 4 Wochen Bestrahlung. Balken in (a) ~ 200 µm, (b) ~ 50 µm, (c) ~ 20 mm, (d) ~ 1 mm.

Die Anzahl regenerierender Protoplasten wurde von 3 Petrischalen 6 d folgend auf die Transformation ausgezählt (s. Tabelle 12). Von ~ 47.000 ausplattierten Protoplasten je Petrischale regenerierten ~900. Dies entspricht 1,9 %. Insgesamt konnten 93 Linien mit einem Wildtyp-Phänotyp isoliert werden. Das sind 0,9 % der insgesamt regenerierten ~ 12.000Protoplasten auf 12 Petrischalen. Diese Rate an möglichen *gene replacement*-Mutanten ist sehr hoch. Positiv phototrop wachsende Filamente wurden mit einer spitzen Pinzette auf frische Agarplatten mit Medium 1 (s. 2.6.2.6) umgesetzt und mit G23#A1 bis G23#M1 bezeichnet. Medium 1 enthält keine Glucose. Da *ptr116*-Mutanten kaum Chlorophyll produzieren (Lamparter *et al.*, 1997a) wachsen sie auf diesem Medium, im Ge-

gensatz zu Wildtyp-Filamenten, nur spärlich. Über weiteres Wachstum mit seitlicher Dauerrotlicht-Bestrahlung konnten die selektionierten Linien so nach und nach von überwuchernden Kontaminationen der aphototropen Ausgangskultur befreit werden.

Die meisten wt-Phänotypen wurden von Protoplasten, die einen Hitzeschock für 3 min erfuhren, isoliert. Hier wurden 58 Linien auf 6 Petrischalen gezählt. Aus jeweils 3 Petrischalen nach 5 bzw. 7 min Hitzeschock konnten 23 bzw. 12 Linien isoliert werden. Exemplarisch wurden 14 Mutanten einer phänotypischen Analyse bezüglich der phototropen Reaktion wie unter 2.1.2 unterzogen (s. Abbildung 43).

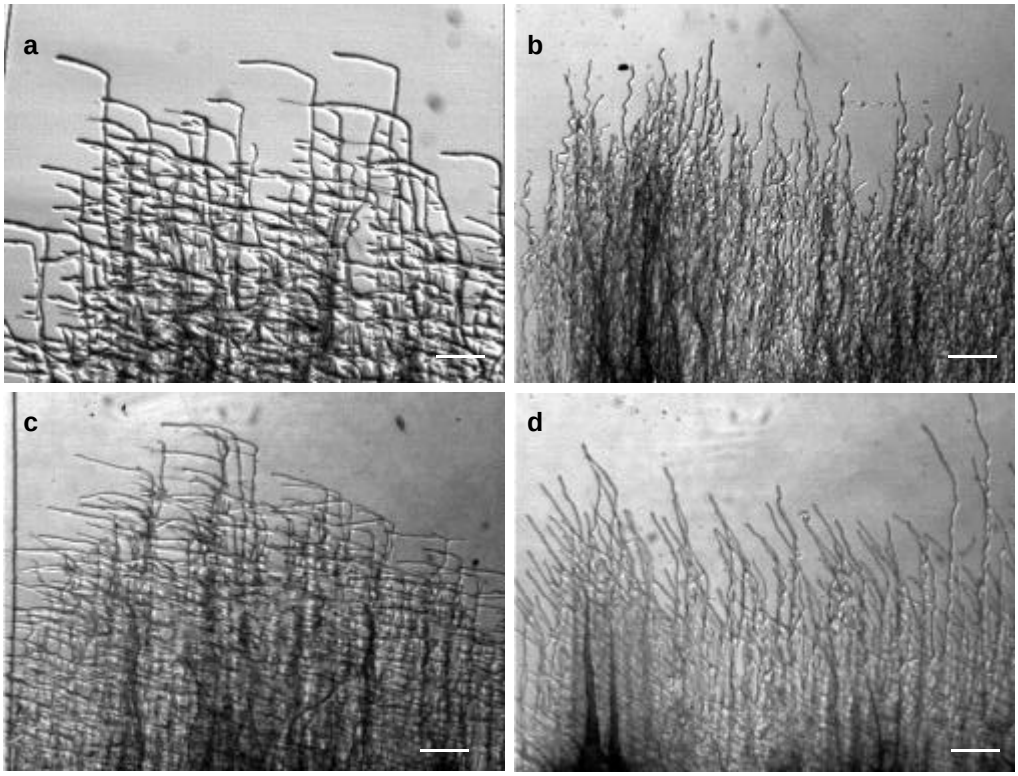



Abbildung 43: Phototrope Analyse der *gene replacement*-Mutanten im Vergleich zu wt4 und *ptr116*. Die dunkeladaptierten Kulturen wurden für 48 h seitlich mit Rotlicht (661 nm) von links bestrahlt. (a) wt4, (b) *ptr116*, (c) G23#G4, (d) G23#L1. Balken ~ 300 µM

Die Mooskulturen wurde nach der 7 d Dunkeladaptation für 48 h mit Rotlicht bestrahlt. Alle isolierten Linien zeigten einen positiven Phototropismus, die meisten so stark wie wt4. Interessanterweise waren zwei Mutanten, pG23#E1 und pG23#L1 (s. Abbildung 43), schwächer in der Krümmungsreaktion.

| ***gene replacement*-Konstrukt** | **regenerierte Protoplasten** | **regenerierte Protoplasten mit wt-Phänotyp** |
|---|---|---|
| PG23#4 | 1,9 % | 0,9 % |

Tabelle 12: Auswertung der Transformation von *ptr116*-Protoplasten mit dem *gene replacement*-Konstrukt pG23#4.

### 3.6.2.2 PCR-Analyse

In Abbildung 44 ist die genomische Situation des für das *gene replacement* interessierenden *target*-Bereichs von *CpHO1* dargestellt. Die korrespondierende Sequenz des Plasmids pG23#4 (s. Abbildung 11) wurde über Restriktionsverdaue und Sequenzierung wie dargestellt bestätigt.

**wt4**

```
 G   R   E   K   S   V   I   Q   N   G   P   S   R   A   P   T   S   A   H   F
GGG CGA GAG AAA AGT GTG ATT CAG AAT GGG CCG AGT AGG GCG CCG ACG TCG GCC CAT TTT
                    Hinf I                      Nar I
```

***ptr116***

```
 G   R   E   K   S   V   I   *   N   G   P   S   R   A   P   T   S   A   H   F
GGG CGA GAG AAA AGT GTG ATT TAG AAT GGG CCG AGT AGG GCG CCG ACG TCG GCC CAT TTT
                                                    Nar I
```

**pG23#4**

```
 G   R   E   K   S   V   I   Q   N   G   P   S   R   A   P   T   S   A   H   F
GGG CGA GAG AAA AGT GTG ATT CAG AAT GGG CCC AGT AGA GCG CCG ACG TCG GCC CAT TTT
                    Hinf I              Apa I
```

Abbildung 44: Ausschnitt der *target*-Sequenz des Hämoxygenase-Gens. Oben: Situation im Wildtyp; Mitte: gleicher Bereich in der aphototropen Mutante *ptr116*. Die Mutation **C T** führt zu einem Stopcodon (Mittmann, 2003). Die *Hinf* I-Restriktions-*site* existiert nicht mehr. Unten: gleicher Bereich im Plasmid pG23#4. Durch die im *replacement*-Konstrukt substituierten Nukleotide (dargestellt in **rot**) wird die Aminosäure-Sequenz gegenüber dem wt nicht verändert. Neben der *Hinf* I-*site* entsteht eine *Apa* I-*site* und die *Nar* I-*site* verschwindet.

Von den für die phänotypische Analyse ausgewählten 14 isolierten Linien wurde genomische DNA extrahiert (s. 2.10.1). Mit diesen wurden PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt, die anschließend mit den in Abbildung 44 dargestellten Enzymen verdaut wurden. Die durch das Stopcodon deletierte *Hinf* I-*site* ergibt in *ptr116* ein PCR-Fragment von 1052 bp. Dieses resultiert in wt4 sowie erfolgreichen *gene repla-*

*cement*-Mutanten in zwei PCR-Fragmenten von 394 bp und 658 bp Größe. Exemplarisch ist in Abbildung 45 ein mit *Hinf* I verdautes PCR-Amplifikat (Primerkombination f108/G7) dargestellt. Die PCR-Amplifikate wurde geschnitten und bis auf die Linie G23#K1 zeigen alle Spuren das erwartete Bandenmuster, welches sich infolge eines *gene replacements* ergeben sollte. Ein *Apa* I-Verdau des PCR-Amplifikats ergab ein ähnliches Resultat. Jedoch zeigten hier die geschnittenen PCR-Fragmente aller G23-Mutanten bis auf G23#C1 (s. Abbildung 46) die erwarteten Verdauprodukte von 448 bp und 1874 bp Größe. Das 2322 bp PCR-Amplifikat aus G23#C1 wurde wie bei wt4 und *ptr116* nicht von *Apa* I geschnitten.

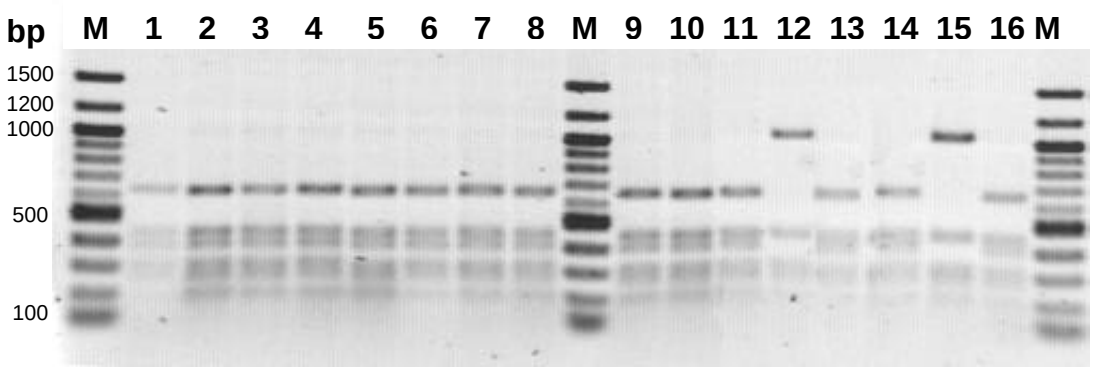



Abbildung 45: PCR-Analyse von *gene replacement*-Mutanten und Kontrollen. Das PCR-Amplifikat f108-G7 (2322 bp) wurde *Hinf* I verdaut. M = Marker, 1-14 = G23-Mutanten (1 = #A1, 2 = #A2, 3 = #A3, 4 = #B1, 5 = #C1, 6 = #D1, 7 = #E1, 8 = #G3, 9 = #G4, 10 = #H1, 11 = #I1, 12 = #K1, 13 = #L1, 14 = #L2), 15 = *ptr116*, 16=wt4.

Das in Abbildung 45 verwendete Primerpaar f108/G7 umschließt nicht den gesamten Bereich der für das *gene replacement*-Konstrukt verwendeten Nukleotidsequenz. Für die Analyse eines eventuell multiplen Einbaus des *gene replacement*-Konstruktes wurde die Primerkombination G14/G18 verwendet (s. Abbildung 46). Die Primer G14 u. G18 liegen außerhalb des homologen Bereichs, der zur Herstellung des *gene replacement*-Konstruktes verwendet wurde. Von allen Linien bis auf G23#A1 konnte die erwartete Bande von rund 2,5 kb amplifiziert werden. Eine PCR mit G23#A1 führte auch nach verlängerter Elongationszeit zu keinem Amplifikat. Eine weitere Analyse dieser Mutante steht noch aus.

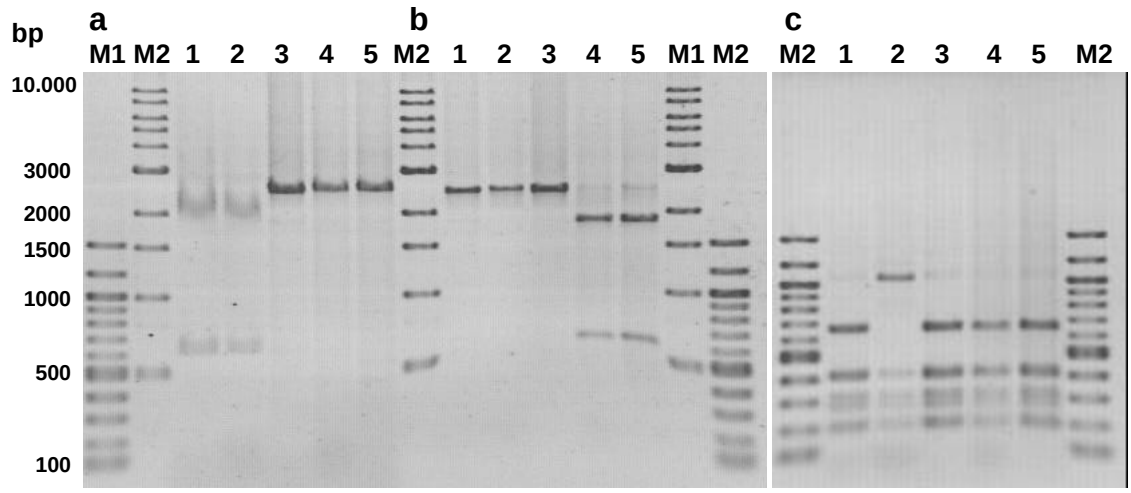



Abbildung 46: PCR-Analyse von *gene replacement*-Mutanten und Kontrollen. Das PCR-Amplifikat G14/G18 wurde in (a) Turbo-*Nar* I, (b) *Apa* I und (c) *Hinf* I verdaut. M1 u. M2 = Marker, 1 = wt4, 2 = *ptr116*, 3 = G23#C1, 4 = G23#A2, 5 = G23#G4.

Das Restriktionsenzym *Nar* I verdaute die extrahierte Miniprep-gDNA nur schlecht. Daher wurden nicht alle Mutanten bezüglich dieser Schnittstelle analysiert. Von den Linien G23#A2, G23#C1 und G23#G4 wurde Gesamt-DNA, die für *Southern Blot*-Analysen verwendet werden sollte (s. 2.10.2), extrahiert. Restriktionen von PCR-Amplifikaten mit der Primerkombination G14/G18 zeigten, dass in allen drei *gene replacement*-Mutanten die *Hinf* I-*site* vorhanden sowie die *Nar* I-*site* nicht mehr vorhanden war. Verwendet wurde Turbo-Nar I (NEB), da dieses die korrespondierende Schnittstelle effektiver verdaute. Die *Apa* I-*site* zeigte sich wie oben geschildert nur in den Transformanten G23#A2 und G23#G4, nicht jedoch in G23#C1.

### 3.6.2.3 Sequenzanalyse

Von den Linien G23#C1 und G23#G4 wurde die gDNA von *CpHO1* zur genaueren Analyse sequenziert (s. Anhang: 7). Erstere sollte bezüglich der nicht vorhandenen *Apa* I-*site* verifiziert werden. G23#G4 wurde exemplarisch als Linie, die in allen verdauten PCR-Fragmenten die drei erwarteten Schnittstellen im Falle homologer Rekombination enthielt, gewählt. Für die Sequenz-Analyse wurde das 2522 bp große PCR-Amplifikat der Primerkombination G14/G18 in pGEM-T Easy (Promega) ligiert und sequenziert. Im Bereich der Restriktionsschnittstellen *Hpa* I und *Nhe* I, die den homologen Bereich des *gene replacement*-Konstruktes umschließen, zeigten sich bei beiden Linien keine Veränderungen der Nukleotidsequenz im Vergleich zu wt4-gDNA.

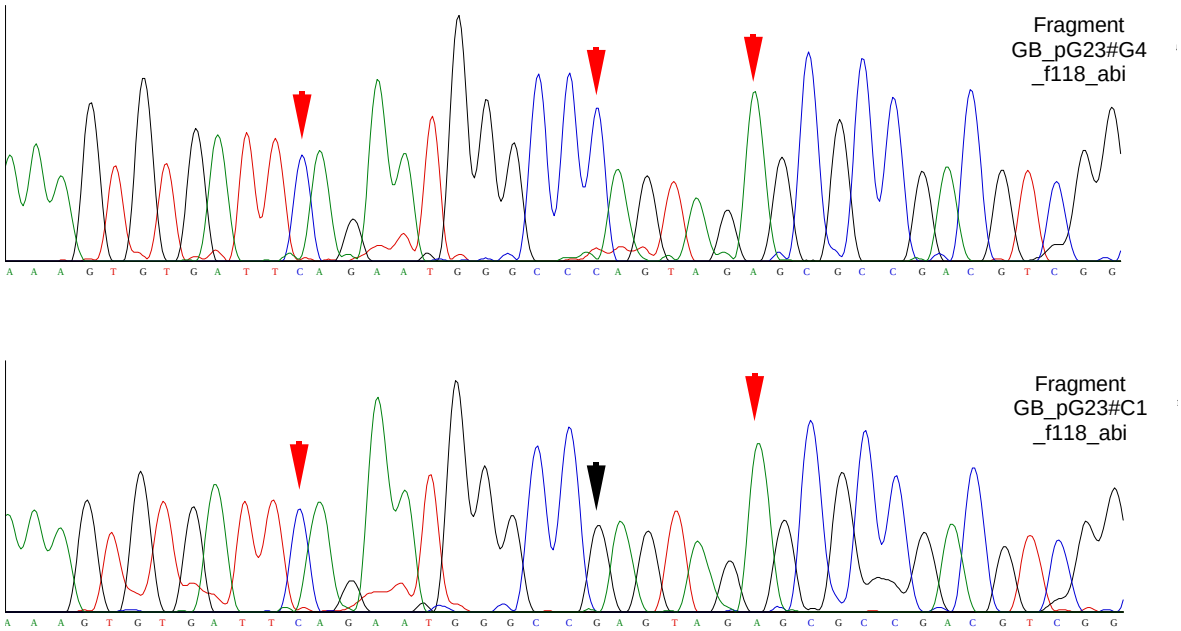



Abbildung 47: Sequenzanalyse der *gene replacement*-Mutanten G23#G4 (oben) und G23#C1 (unten) mit Primer f118. Der hier dargestellte Ausschnitt umschließt die in Abbildung 44 gezeigten Veränderungen. Die roten Pfeile markieren die veränderten Nukleotide des *gene replacement*-Konstruktes. Der schwarze Pfeil markiert das Nukleotid, welches *ptr116* entspricht.

Der in Abbildung 47 dargestellte Ausschnitt zeigt den Bereich, der zu veränderten Restriktionsschnittstellen infolge eines homologen Rekombinations-Ereignisses führen soll. Die Nukleotidsequenz der Mutante G23#G4 entspricht der Basenabfolge, die aufgrund eines homolog rekombinierten *gene replacement*-Konstruktes erwartet wird. Die Linie G23#C1 entspricht an der Position, die nach homologer Rekombination zu einer neu generierten *Apa* I-site führen soll, der Mutante *ptr116*. Die restliche Nukleotidsequenz entspricht der des gene replacement-Konstruktes. Sequenzierung mit dem *antisense*-Primer f106 führte zu dem gleichen Ergebnis.

### 3.6.2.4 *Southern Blot*-Analyse

Für die *Southern Blot*-Analyse wurde gDNA der Linien G23#A2 u. G23#G4 extrahiert. Diese beiden Linien wurden exemplarisch gewählt, da sie in allen verdauten PCR-Fragmenten die drei erwarteten Schnittstellen im Falle homologer Rekombination enthielten. Für G23#G4 wurden diese bereits über die Sequenzanalyse bestätigt (s. Abbildung 47). Die gDNAs wurden mit den Enzymen *Apa* I und *Eco*R V bzw. *Apa* I und *Hind* III doppelverdaut. *Hind* III-verdaute genomische DNA des Wildtyps ergab mit einer Sonde, die aus der gesamten kodierenden Sequenz der cDNA abgeleitet war, ein rund 5,5 kb großes Fragment (Mittmann, 2003). Ein von Janina Hahn im Rahmen einer freien

Mitarbeit (unter Anleitung von F. Mittmann) durchgeführter *Southern Blot* mit der gleichen Sonde und *Eco*R V verdauter gDNA führte zu einem Signal ähnlicher Größe. Die beiden Enzyme schienen daher geeignet, da sie beide keine großen Banden ergaben und *Single*-Insertionen somit leicht von multiplen Insertionen unterscheidbar wären. Innerhalb des sequenzierten Bereichs des *CpHO1*-Gens wurden keine *Apa* I-, *Eco*R V- bzw. *Hind* III-*sites* gefunden. Der genaue Abstand der *Eco*R V- bzw. *Hind* III-*site* von der eingefügten *Apa* I-*site* war daher bekannt. Die erwarteten Signale sollten jedoch infolge homologer Rekombination des *gene replacement*-Konstruktes wegen der neuen *Apa* I-*site* kleiner als in wt4 bzw. *ptr116* sein (s. Abbildung 48). Als Sonde wurden 446 bp der gDNA-Sequenz genutzt, die innerhalb des zur Herstellung des *gene replacement*-Konstruktes verwendeten Gen-Abschnitts lagen. Die Sonde wurde über PCR mit den Primern f108→ und f155← DIG-markiert (s. 2.13.1). Illegitime Rekombinationen bzw. multipler Einbau des Konstruktes am *target*-Bereich sind mit dieser Sonde nachweisbar. Abbildung 48 zeigt schematisch den *Southern Blot*-Nachweis nach homologer Rekombination des *gene replacement*-Konstruktes.

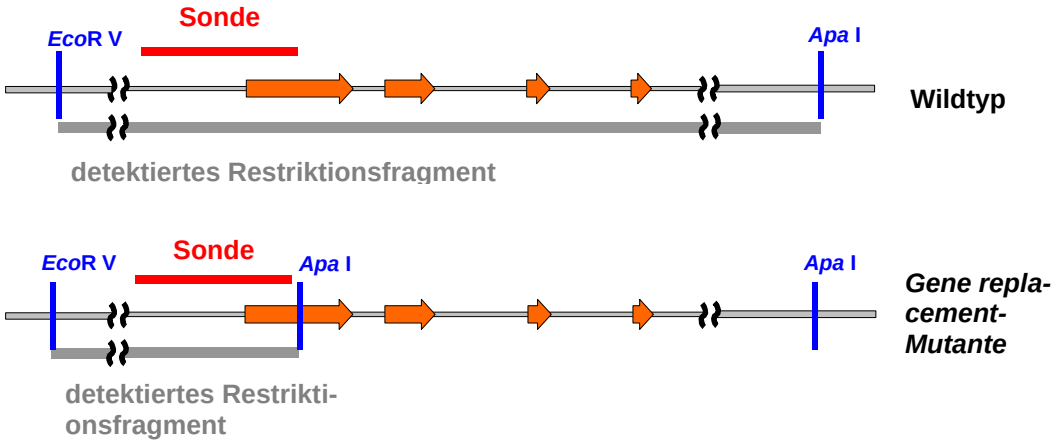



Abbildung 48: Schema für den Nachweis des *gene replacement* nach *Eco*R V- und *Apa* I-Verdau über *Southern blotting*.

Die in Abbildung 49 gezeigten *Southern Blots* belegen erfolgreich durchgeführtes *gene replacement* in der Linie G23#G4. Die *Southern Blots* zeigen sowohl das Ergebnis einer *Single*-Insertion für diese Linie als auch zusätzliche illegitime Rekombinationen für die Linie G23#C1. Das Signal der *Apa* I-*Hind* III doppelverdauten gDNA von wt4 bzw. *ptr116* (s. Abbildung 49a) entspricht mit einer Größe von rund 5,5 kb dem Signal der *Hind* III verdauten wt4-gDNA (Mittmann, 2003). Daraus kann geschlossen werden, dass die unbekannten *Apa* I-*sites* außerhalb der *Hind* III Restriktionsstellen liegen. In gDNA von G23#G4 wird ein einziges Signal bei rund 2,1 kb nach *Eco*R V-*Apa* I-Doppelverdau und von knapp über 500 bp (Markerbande bei 500 bp wurde auf dem Blot abgeschnitten) nach *Hind* III-*Apa* I-Doppelverdau detektiert. Zusätzliche Banden, die auf illegitime Rekombination des Konstruktes hingewiesen hätten, konnten nicht detektiert werden. Ebenso wenig wurde das Wildtyp-Signal detektiert. Auch die *Southern Blots* der Linie

G23#A2 enthalten am *target-Locus* eine *Single*-Insertion. Im *Eco*R V-*Apa* I-Doppelverdau ist das Signal nur schwach sichtbar. Umso deutlicher ist es in *Hind* III-*Apa* I doppelverdauter gDNA auf gleicher Höhe wie das Signal in G23#G4 zu sehen (s. Abbildung 49), auch wenn der niedermolekulare Bereich im Gel vor dem Blotten zu stark entfernt wurde. Zusätzliche Banden in dieser Spur deuten auf zahlreiche illegitim rekombinierte *gene replacement*-Konstrukte hin. Der Einbau multipler Insertionen am *target-Locus* kann aufgrund der intensiv durchgeführten PCRs, die keinerlei Beleg in dieser Richtung ergaben, ausgeschlossen werden. Auch die Größe des Signals im *Southern-Blot* mit *Hind* III-*Apa* I doppelverdauter gDNA von G23#G4 belegt die Insertion nur eines Konstruktes. Die Größe der detektierten Bande liegt nur wenig über der Sondengröße, die 446 bp aufwies, ist jedoch aufgrund einer fehlenden Markerbande in diesem Bereich nicht genauer abzuschätzen. Homologe Rekombinationsereignisse an Loci, an denen Konstrukte bereits illegitim rekombinierten, können für die Linie G23#A2 nicht ausgeschlossen werden. Da die unbekannten *Apa* I-*sites* außerhalb der *Hind* III-Restriktionsstellen liegen und somit die Wahrscheinlichkeit eines Signal im hochmolekularen Bereich gegeben war, wurde auf weitere *Southern Blots* mit gDNA die lediglich *Apa* I verdaut wurden verzichtet.

Mit den vorliegenden Analysen wurde erstmals für das Moos *Ceratodon gene targeting* über homologen Rekombination gezeigt.

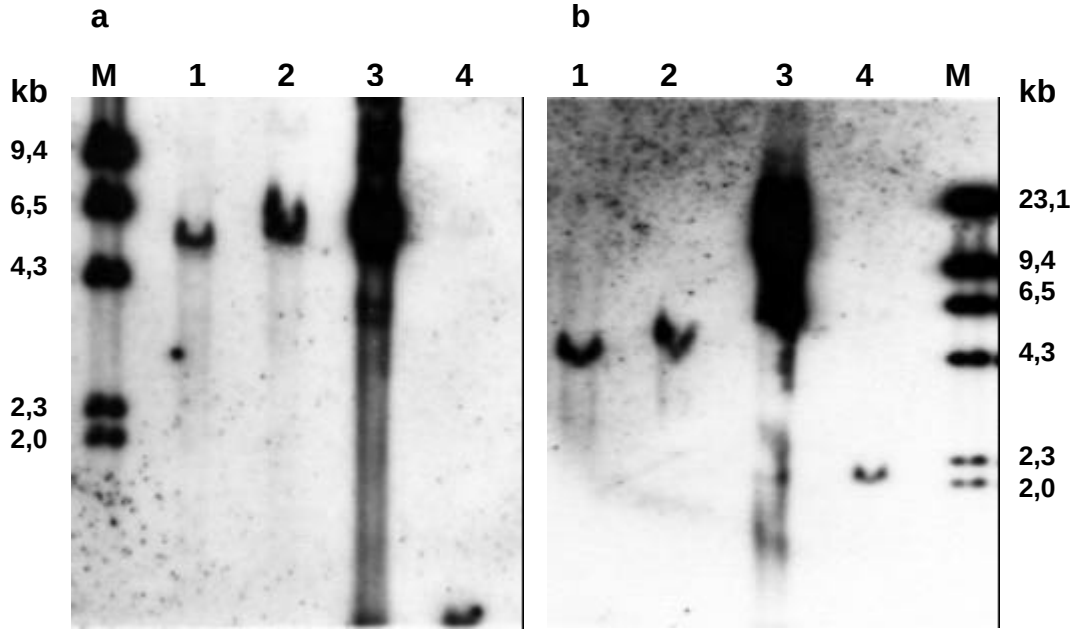



Abbildung 49: Nachweis des *gene replacement* über *Southern blotting* nach (a) *Apa* I und *Hind* III und (b) *Apa* I und *Eco*RV verdauter gDNA. 1 = wt4, 2 = *ptr116*, 3 = G23#A2, 4 = G23#G4, M = Marker.