

4 DISKUSSION

4.1 Wiederherstellung aphototroper Mutanten über Mikroinjektion

Die hier durchgeführten Experimente sollten zeigen, inwiefern sich *Class 1*-Mutanten von *Ceratodon* (s. 1.4.2) über Mikroinjektion wiederherstellen lassen. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit konnte über die Injektion von fluoreszierenden Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts gezeigt werden, dass die Injektion einzelner apikaler Zellen von Moosprotonemen unter geeigneten Bedingungen möglich ist (Brücker, 1997). *Class I*-Mutanten sind als defizient im Phytochrom-Chromophor Phytochromobilin (P \hat{O} B) beschrieben (Lamparter *et al.*, 1996). Ihre Protonemen zeigen aphototropes Wachstum und einen stark reduzierten Chlorophyllgehalt. Sie sind somit deutlich vom Wildtyp-Phänotyp unterscheidbar. Injektionen in Protonema-Spitzenzellen, die den Mutanten-Phänotyp aufheben sind daher auf zellulärer Ebene leicht identifizierbar. Für Mikroinjektions-Experimente sind die *Class 1*-Mutanten daher hervorragend geeignet.

4.1.1 Mikroinjektion von PCB

Fütterungen mit Biliverdin, einer Vorstufe von P \hat{O} B, bzw. mit Phycocyanobilin (PCB) stellten die phototrope Reaktion bei der Mutante *ptr116* wieder her (Lamparter *et al.*, 1997a). Die Injektion von PCB sollte daher ebenso zu Wildtyp-Phänotypen führen. Bei den PCB-Injektionen handelte es sich um Vorversuche. Sollten sich diese als erfolgreich herausstellen, sollten die hier gewonnenen Erkenntnisse die Basis für weitere Injektionen in Spitzenzellen bilden. Bei diesen sollte dann sowohl DNA als auch aufgereinigte Proteine injiziert werden.

Die Aufreinigung von PCB ist im Gegensatz zur Aufreinigung von P \hat{O} B (Cornejo *et al.*, 1992), dem eigentlichen Chromophor der pflanzlichen Phytochrome, relativ einfach und kostenneutral. Sowohl über Ausschütteln und Kristallisieren in Hexan als auch über HPLC (s. 2.8) konnten problemlos ausreichende Mengen an durch Methanolyse aufgereinigtem PCB gewonnen werden. Dieses wurde in verschiedene dunkeladaptierte Protonema-Spitzenzellen von *Class 1*-Mutanten injiziert.

In der Tat führte die Injektion von PCB in Spitzenzellen von *Class 1*-Mutanten nach Rotlicht-Bestrahlung zu einer eindeutig positiv phototropen Reaktion dieser Zellen (s. Abbildung 12). Exemplarisch wurde die Krümmungsreaktion nach Injektionen in *ptr116* ausgewertet (s. Tabelle 1). In 70 % der injizierten Filamente konnte ein Winkel gemessen werden. Dieser Wert weist auf eine sehr hohe Überlebensrate der injizierten Zellen hin, da mindestens diese 70 % gekrümmter Zellen die Injektion überlebten. Der gemessene Mittelwert der Krümmungswinkel entspricht mit 54 ° dem aus Fütterungsexperimenten ermittelten Wert (Lamparter *et al.*, 1997a). Aus diesen Experimenten ist bekannt, dass

PCB aus dem Medium zumindest teilweise die Zellwand passiert und eine Krümmungsreaktion zum Licht induziert. Die Injektionen, bei denen das PCB in gleicher Konzentration und Menge außen an die Zellwand der Apex appliziert wurden, krümmten sich hingegen nicht (s. Abbildung 14). Das applizierte PCB war offensichtlich nicht ausreichend zur Assemblierung ausreichender Mengen an Holophytochrom, die für die phototrope Reaktion gereicht hätten. Durch Abtasten der Protonema-Spitzenzelle mit der Kapillare des Mikroinjektors wurde gezeigt, dass auf Cellophanfolie wachsende *Ceratodon*-Protonemen von einem Wasserfilm umgeben sind (Lamparter *et al.*, 2003). Wird PCB äußerlich appliziert, verteilt es sich wahrscheinlich entlang dieses Wasserfilms und wird zusätzlich durch Diffusion ins Medium verdünnt. Injektionen mit einem fluoreszierenden PEB-Cph1-Addukt außen an die Zellwand von *ptr115*-Spitzenzellen zeigen die Verteilung der applizierten Lösung entlang der apikalen Protonemazellen (s. Abbildung 50). Das beweist, dass in den Fällen, in denen der Phototropismus durch PCB wiederhergestellt wurde, das PCB tatsächlich in die Spitzenzelle injiziert wurde. Die Injektion von Bilinen in einzelne Zellen chromophordefizienter Mutanten stellt eine effektive Methode dar, um diese Moleküle in Bezug auf ihre Funktion als Chromophor in einem lebendem System zu untersuchen. Die benötigte Menge für jeden Versuchsansatz wird dabei, verglichen mit konventionellen Methoden (Parks and Quail, 1991), auf ein Minimum reduziert (Lamparter *et al.*, 1997a).

Interessant ist die Beobachtung, dass einmal injizierte Zellen bis zu drei Tagen positiv phototrop wuchsen. In diesem Zeitraum teilte sich die apikale Zelle etwa 9 Mal. Die anfängliche Konzentration von 100 μM wird dann in der Spitzenzelle rund 1000fach verdünnt, vorausgesetzt, dass injizierte PCB verteilt sich gleichmäßig zwischen beiden Zellen. Wird die ermittelte Menge von 500 fl injiziertem Volumen zugrunde gelegt (Brücker *et al.*, 2000), verdünnt sich das PCB bereits rund 25fach bei der Injektion (Zellvolumen \sim 12 pl bei Zelldurchmesser = 10 μM , Zelllänge = 150 μM). Außerdem degradiert PCB in wässrigem neutralen Milieu allmählich. Es hat sich gezeigt, dass 1 Tag altes PCB physiologisch nicht mehr wirksam ist (T. Lamparter, pers. Mitteilung). Aufgrund dieser Überlegungen ist es überraschend, dass das injizierte PCB noch so lange aktiv ist. Es scheint, dass sich an der Apex der Spitzenzelle nach Injektion von PCB ein Pool an aktivem Holophytochrom bildet, der bei jeder Zellteilung an die neu gebildete Spitzenzelle weitergegeben und dort gehalten wird. Dieses aktive Phytochrom scheint extrem stabil zu sein. Eine Fraktion an membranständigen phy-Molekülen konnte in *Ceratodon* gemessen werden (Böse *et al.*, 2003). Eine aktive Subfraktion dieser membranständigen Moleküle an der Apex könnte daher für eine phototrope Reaktion hinreichend sein. Diese wäre nach jeder Querteilung der Spitzenzelle in der neuen apikalen Zelle lokalisiert und würde nicht zur Hälfte in der alten Zelle zurückgehalten. Die abnehmende phototrope Reaktion ist wahrscheinlich auf proteolytischen Abbau dieses Phytochroms zurückzuführen.

Es ist bekannt, dass Phytochrom in *Ceratodon* auch für die Induktion der Chlorophyll-Biosynthese verantwortlich ist. Fütterungen mit PCB führen zu einem erhöhten Chlorophyll-Level in mit Rotlicht bestrahlten Zellen von *ptr116* (Lamparter *et al.*, 1997a). Die-

ses Ergebnis konnte auch durch die Injektion von PCB in allen verwendeten Mutanten erzielt werden (s. Abbildung 15). Die Injektion von PCB in die Spitzenzelle führte häufig zur Induktion der Chlorophyll-Biosynthese in den nachfolgenden 1-2 Zellen. Ein Hinweis darauf, dass PCB innerhalb des Filaments von Zelle zu Zelle transportiert werden kann. Dies könnte zum Beispiel über Plasmodesmen oder über Diffusion durch die Zellmembran und -Wand erfolgen. Ist dieses der Fall, verdünnt sich die oben berechnete Endkonzentration entsprechend.

4.1.2 Mikroinjektion von Hämoxygenase-Genen

Aus früheren Fütterungsexperimente mit den aphototropen *Class 1*-Mutanten (s. 1.4.2) ist bekannt, dass die Zugabe von Biliverdin oder PCB im Medium, nicht aber Häm, den Wildtyp-Phänotyp wiederherstellen (Lamparter *et al.*, 1997a). Daher wurde vermutet, dass der Grund für die *Class 1*-Phänotypen ein Defekt in der Hämoxygenase (HO) ist. HO katalysiert die Konversion von Häm zu Biliverdin (s. Abbildung 1). Liegt der Defekt in diesem Enzym, sollte die Injektion von HO-Genen zu phototropen Reaktionen und einem erhöhten Chlorophyll-Gehalt in den Moosfilamenten führen.

Tatsächlich resultierten Injektionen mit Expressions-Plasmiden, die unter Verwendung verschiedener HO-Gene hergestellt wurden, in Spitzenzellen von *Class 1*-Mutanten zu positiv phototropen Reaktionen nach unilateraler Bestrahlung mit Rotlicht (s. Abbildung 16 - 18). Die Anzahl an injizierten Zellen mit phototroper Reaktion lag bei einigen Mutanten bei über 40 % (s. Tabelle 2 und 3). Auch die Chlorophyll-Biosynthese wurde durch die Injektion der Hämoxygenase-Gene induziert (s. Abbildung 16 - 18). Das beweist, dass die verwendeten Mutanten tatsächlich einen defekt in der Hämoxygenase aufweisen. Die beobachteten und ausgewerteten Phänomene unterschieden sich jedoch, je nach verwendetem Expressionskonstrukt, sowohl qualitativ als auch quantitativ.

Im Falle der cytoplasmatisch lokalisierten Ratten-HO (Wilks and Ortiz de Montellano, 1993) lag der resultierende Krümmungswinkel mit 54 ° bzw. 71 ° deutlich unter dem Wert, der mit den pflanzlichen HOs erzielt wurde (s. Tabelle 2 und 3). Bei diesen entsprach der gemessene Wert mit über 80 ° dem des Wildtyps. Eine eindeutig positiv phototrope Reaktion nach unilateraler Bestrahlung mit Rotlicht wurde in den Ratten-HO exprimierenden Zellen bereits nach 18 h beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde diese Reaktion in den HY1 exprimierenden Spitzenzellen erst nach über einem Tag gesehen. *HY1* aus *Arabidopsis* wurde als erstes pflanzliche Hämoxygenase-Gen identifiziert und mit *AtHO1* benannt (Muramoto *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 1999a). *AtHO1* ist in den Chloroplasten lokalisiert.

Mit Hilfe der *AtHO1*-Sequenz wurde von Franz Mittmann in EST-Datenbanken nach verwandten Sequenzen auch anderer Spezies gesucht. Ein *Alignment* ausschließlich pflanzlichen Sequenzen mit Ähnlichkeit zu HY1 verwendete er zur Klonierung des *Ceratodon* Hämoxygenase-Gens *CpHO1* (Mittmann, 2003). Die resultierenden Sequenzen für *CpHO1* umfassen 2625 bp für die genomische DNA und 1686 bp für die cDNA; (*Accession number*: AJ489940). Für *CpHO1* wurde eine Chloroplasten-Lokalisation von *chlo-*

rop v1.1 (Center for Biological Sequence Analysis, Denmark) mit einer Länge von 80 Aminosäuren für das Chloroplasten-Transit-Peptid (CTP) vorhergesagt. Die Chloroplastenlokalisierung wurde mit Hilfe chimärer GFP-CpHO1-Fusionsproteine bestätigt (s. Abbildung 19). Fusionsproteine, die um das vorhergesagte Transit-Peptid deletiert wurden, waren hingegen cytoplasmatisch lokalisiert, akkumulierten jedoch auch, wie Kontrollinjektionen mit GFP alleine, im Zellkern. Auch die beiden chimären Proteine waren in der Lage, den Wildtyp-Phänotyp sowohl bezüglich der phototropen Reaktion als auch der Plastiden-Entwicklung wiederherzustellen (s. Abbildung 20).

Obwohl sowohl AtHO1 als auch CpHO1 nach Translation in die Chloroplasten transportiert werden, zeigte sich die oben erwähnte Verzögerung der phototropen Reaktion bei den CpHO1 exprimierenden Zellen nicht. Dies könnte auf einen qualitativen Unterschied im Erkennen der CTPs und somit zu einem verzögerten Transport von AtHO1 in die Chloroplasten zurückzuführen sein. Über ein entsprechendes GFP-AtHO1-Fusionsprotein sollte ein verzögerter Transport, im Vergleich mit GFP-CpHO1, in weiteren Experimenten fluoreszenzmikroskopisch leicht verifizierbar sein. Auch ein qualitativer Unterschied in der enzymatischen Reaktion der pflanzlichen HOs in Bezug auf die Phytochrom-Synthese ist nicht auszuschließen. AtHO1 wurde zwar als die *Arabidopsis*-HO verantwortlich für die PÖB-Synthese identifiziert. Allerdings sind von *Arabidopsis* weitere HOs identifiziert (Davis *et al.*, 2001), die in die PÖB-Synthese involviert sind. Diese weisen jedoch unterschiedliche Aktivität zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien bzw. in verschiedenen Geweben auf (Terry *et al.*, 2002). Ein entsprechender Unterschied könnte auch für die hier verwendeten pflanzlichen HOs unterstellt werden. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die offensichtlich transient transformierten Zellen nach mehreren Zellteilungen ihr positiv phototropes Wachstum abrupt einstellten und negativ gravitrop weiterwuchsen. Chlorophyll-Fluoreszenz konnte in diesen aphototrop wachsenden Filamenten noch über mehrere Tage detektiert werden. Im Gegensatz dazu führten PCB-Injektionen mit zunehmender Zeit zu einer langsam schwächer werdenden phototropen Reaktion. Unterschiede wurden auch in der Induktion der Chlorophyll-Biosynthese beobachtet. Injektionen mit chloroplastenlokalisierten HO-Genen führten zu einer frühen Detektion der Chlorophyll-Fluoreszenz. Diese ging der phototropen Reaktion voraus. Nach Injektion der cytoplasmatisch lokalisierten Ratten-HO bzw. der um das CTP deletierten CpHO1 wurde zuerst eine Krümmung zum Licht nach Rotlicht-Bestrahlung beobachtet und erst später die Chlorophyll-Autofluoreszenz. Aufgrund dieser Ergebnisse kann postuliert werden, dass die Injektion pflanzlicher HOs nach Häm-Katalyse zur Assemblierung geringer Mengen an Holophytochrom führt. Gleichzeitig wird die Hemmung der Chlorophyll-Biosynthese aufgehoben. Beides zusammen resultiert in einem Anstieg von Chlorophyll. Erst später wird genug Chromophor produziert, der für eine phototrope Antwort ausreichend ist und die Filamente optimal zum Licht orientiert. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch eine Inhibition der Chlorophyll-Synthese und Chloroplasten-Entwicklung, hervorgerufen durch die Akkumulation von Häm in den Plastiden. So ist *hyl* blasser als quadruple phyA,B,D,E-Mutanten von *Arabidopsis* (Terry *et*

Arabidopsis (Terry *et al.*, 2002). Die Chloroplasten-Entwicklung scheint somit auch unabhängig von der Abwesenheit von Phytochrom durch HO-Mangel beeinflusst zu werden. Vorgeschlagen wird ein *feedback*-Effekt auf die Produktion der Aminolävulinatsäure, wodurch die Tetrapyrrol-Synthese limitiert würde (Terry and Kendrick, 1999). Dieses führt zu einem negativen Effekt auf die Plastiden-Entwicklung. Die injizierten HOs hätten somit einen doppelten Effekt auf die Chloroplasten-Entwicklung: Zum Einen führt die Degradation akkumulierten Häms zur Produktion von Aminolävulinatsäure und somit zu Vorstufen der Chlorophyll-Biosynthese und zum Zweiten beeinflusst das neu assemblierte Holophytochrom die Entwicklung der Chloroplasten positiv. Über weitere Experimente an den *Class 1*-Mutanten kann die Beziehung zwischen PÖB-Synthese und Chlorophyll-Biosynthese und wie sich deren Synthesewege gegenseitig beeinflussen mit den hier beschriebenen Untersuchungen weiter aufgeklärt werden. Das Gen für den auf die HO folgenden Schritt in der PÖB-Synthese wurde in *Arabidopsis* über die *hy2*-Mutante ebenfalls identifiziert (Kohchi *et al.*, 2001). Die PÖB-Synthase HY2 ist wie AtHO1 eine ferredoxinabhängige Bilinreduktase. Über die hier vorgestellte Methode der Mikroinjektion dieser Gene bzw. ihrer *Ceratodon*-Pendanten in aphototrope Mutanten bzw. den Wildtyp, besteht die Möglichkeit, die Regulation der Bilin-Biosynthese in einzelnen Spitzenzellen zu untersuchen. Dieser Prozess ist für Pflanzen im Hinblick auf Ihre Möglichkeiten auf Lichtreize zu reagieren, kritisch und daher von besonderer Bedeutung für die Entwicklung.

4.1.3 Mikroinjektion von CerpuPhy2His

Die Injektion von PCB-assemblierten Holophytochrom CerpuPhy2 führte nach unilateraler Bestrahlung mit Rotlicht bei vier Spitzenzellen zu einer deutlichen positiv phototropen Reaktion (s. Abbildung 22). Dies entspricht rund ~ 2,5 % der überlebenden injizierten Zellen. Dieser Wert liegt im Bereich der Effizienz früherer Experimente, bei denen durch die Injektionen von Haferphytochrom A und B in einzelne Hypokotylzellen von Keimlingen der Tomaten-Mutante *aurea* Phytochrom-Antworten induziert wurden (Neuhaus *et al.*, 1993; Bowler *et al.*, 1994; Kunkel *et al.*, 1996; Neuhaus *et al.*, 1997). Hier lag die Effizienz der Injektionen zwischen 2,4 – 7,6 %. *Aurea* ist wie die *Ceratodon Class 1*-Mutanten eine Phytochrom-Chromophor-Mutante (Terry and Kendrick, 1996). Das phototrope Wachstum stoppte ähnlich wie bei den Injektionen mit den HO-Genen abrupt ab (s. Abbildung 22g und h). Allerdings nach Protein-Injektion zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt. Die Filamente wuchsen negativ gravitrop weiter.

Die CerpuPhy2-Injektionen führten bei ~ 90 % der injizierten Spitzenzellen zum Absterben (s. Abbildung 23). Diese hohe Letalitätsrate wurde bei den PCB- bzw. DNA-Injektionen nie beobachtet. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine toxische Substanz mitgereinigt wurde. Der SAR der injizierten Proben war 0,3. Das bedeutet, dass nach der Reinigung immer noch 70 % kontaminierende Proteine enthalten waren. Diese werden teilweise als diskrete Bande im SDS-Gel aufgetrennt sichtbar (s. Abbildung 21). Es kann

auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Konzentration von CerpuPhy2 in der Injektionslösung zu hoch war und dadurch toxisch wirkte.

Die Anzahl an proteininjizierten Spitzenzellen mit phototroper Antwort war im Vergleich zu den PCB- bzw. DNA-Injektionen gering. Die *Class 1*-Mutanten enthalten Apophytochrom in gleichen Levels wie der Wildtyp (Lamparter *et al.*, 1996). Hieraus ergibt sich eine mögliche Erklärung für die wenigen phototropen Reaktionen, wenn angenommen wird, dass dieses vorhandene Apoprotein, eventuell aufgrund einer Assoziation mit einer unbekanntem Zellkomponente, nicht ausreichend von dem injizierten Holoprotein verdrängt werden kann. Das in den Mutanten vorhandene Apophytochrom hätte somit einen negativen Effekt auf eine phototrope Antwort. In *aurea* hingegen wird das *in situ* exprimierte Apoprotein schnell degradiert (Terry, 1997).

Eine weitere Erklärung könnte das Fehlen einer assoziierten Komponente sein, die CerpuPhy2 zur Funktionalität benötigt. Diese könnte wegen der heterologen Expression in der Hefe fehlen. Falls diese Komponente phytochromabhängig in Moosen exprimiert würde, fehlte sie ebenfalls in den PÖB-defizienten Mutanten. Dass die Injektion der relativ viskosen Proteinlösung nicht gleichmäßig im Cytoplasma der Zellen verteilt wurde, kann ausgeschlossen werden. Injektionen mit ähnlich hohen Konzentrationen eines fluoreszierenden PEB-Cph1-Adduktes verteilten sich gleichmäßig im Cytoplasma der injizierten Spitzenzellen (s. Abbildung 50).

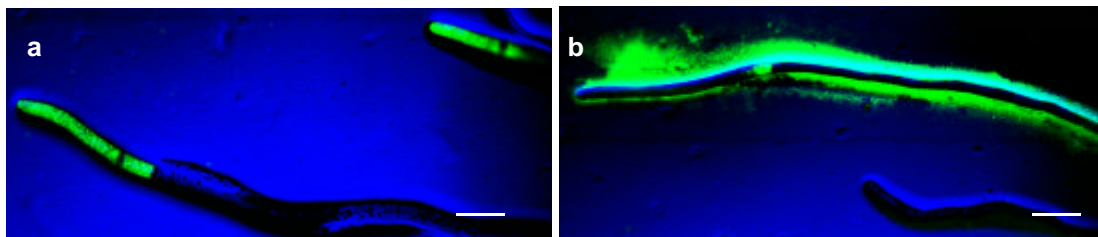


Abbildung 50: CLSM-Transmissions-Aufnahmen von PEB-Cph1-Addukt Injektionen. Dargestellt sind *ptr115*-Spitzenzellen von *Ceratodon*. (a) Injektionen in zwei –Zellen führt zu gleichmäßiger Verteilung des fluoreszierenden Adduktes im Cytoplasma. (b) PEB-Cph1 wurde außen auf die Zellwand appliziert. Die Fluoreszenz von PEB-Cph1 ist gelb dargestellt. Balken ~ 30 μ M.

In von T. Kunkel durchgeführten Experimenten mit heterolog in Hefe exprimiertem Hafer-Phytochrom führte bereits die Injektion des Rohextraktes zu Phytochrom-Antworten (Kunkel *et al.*, 1996). Die Versuche sollten daher mit dem Rohextrakt wiederholt werden. Von Vorteil wäre, dass dadurch die zeit- und arbeitsaufwendige Aufreinigung und Konzentration des Proteins entfallen würde.

4.2 Phototropismus und Polarotropismus von *Physcomitrella patens*: Antworten des Wildtyps

Es konnten zum ersten Mal Bedingungen etabliert werden, unter denen *Physcomitrella*-Protonemen über einen längeren Zeitraum im Dunklen wachsen. Dazu wurden syste-

matisch Parameter getestet, die einen Einfluss auf das Wachstum von Pflanzen ausüben (s. 3.5.1). Die im Dunklen auf Cellophan wachsenden Filamente waren parallel ausgerichtet und wuchsen negativ gravitrop (s. Abbildung 24b). Unter den durchgeführten Bedingungen wurde das Wachstum caulonematischer Zellen induziert (s. Abbildung 25a und b). Deren Wachstum konnte über einen Zeitraum von mehr als 14 d im Dunklen beobachtet werden. Ausschlaggebender Faktor für das Wachstum im Dunklen war die Orientierung der Zellen während einer 24 h Vorinkubation mit Licht. Nur wenn diese gegenüber der Dunkelinkubation nicht verändert wurde, wuchsen Caulonemata.

Mit der Etablierung des Dunkelwachstums waren die Voraussetzungen für photobiologische Untersuchungen wesentlich vereinfacht. Es konnte gezeigt werden, dass unilaterale Bestrahlung mit Rotlicht eine phototrope Reaktion in *Physcomitrella*-Caulonemen induziert (s. Abbildung 26). Der Rotlicht-Effekt wurde durch Dunkelrot revertiert (s. Abbildung 30). Dadurch wurde der Beweis erbracht, dass der hier beobachtete Phototropismus phytochromvermittelt ist. Des Weiteren wurde rotlichtinduzierter Polarotropismus, sowie die Bildung von Seitenverzweigungen und eine Beeinflussung der Chloroplasten-Morphogenese und Chlorophyll-Biosynthese beobachtet. Quantitativ ausgewertet wurde der Phototropismus und der Polarotropismus des *Physcomitrella*-Wildtyps wtDC.

Die für den Phototropismus erstellte Fluenz-Effekt-Kurve der Krümmungswinkel von Protonema-Spitzenzellen ist zweigipfelig und wird dadurch ziemlich komplex (s. Abbildung 27). Bei niedrigen Fluenzraten liegen ihre Werte im negativen und bei Fluenzraten ab etwa $0,3 \mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-2}$ im positiven Bereich der Y-Achse. Höhere Bestrahlungsstärken ab etwa $10 \mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-2}$ führten wieder zu negativen Krümmungswinkeln. Hier könnte es sich um eine Meide-Reaktion handeln. Es bleibt zu untersuchen, inwiefern höhere Photonen-Fluenzraten eine negative Auswirkung auf die Entwicklung von *Physcomitrella* hervorrufen.

Die Kreisdiagramme vermitteln ein differenzierteres Bild der phototropen Reaktionen (s. Abbildung 28). Es zeigte sich, dass die Spitzenzellen insgesamt sehr heterogen wachsen. Bei $0,5 \mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-2}$ krümmen sich im selben Ansatz Filamente zu etwa gleichen Anteilen sowohl negativ als auch positiv phototrop. *Ceratodon*-Filamente wachsen unabhängig von der Lichtintensität auf Cellophan positiv phototrop (Hartmann *et al.*, 1983; Esch *et al.*, 1999). Positiv und negativ krümmen sich nur Filamente, nach Rotlicht-Bestrahlung mit sehr niedrigen Fluenzraten (Esch *et al.*, 1999) bzw. wenn diese entweder von Wasser umgeben sind oder im Agar wachsen (Kern and Sack, 1999).

Die Bedeutung der zweigipfeligen Fluenz-Effekt-Kurve ist unklar. Die phototrope Reaktion von Hafer- oder Mais-Koleoptilen und *Arabidopsis*-Hypokotylen weist ebenfalls eine zweigipfelige Kurve auf (Firn, 1994). Beide Gipfel liegen hier jedoch im positiven Bereich und werden mit erster und zweiter positiver Kurve bezeichnet. Die erste positive Kurve und die zwischen den beiden Gipfeln liegende neutrale Zone folgen dem Bunsen-Roscoe Reziprozitäts-Gesetz. Als Antwort auf kurze Lichtpulse wird die erste positive Kurve daher nur unter Laborbedingungen gemessen. Die Fluenz-Effekt-Kurve von *Phys-*

comitrella wurde jedoch nach Bestrahlungen längerer Dauer ermittelt und die phototropen Antworten sind daher proportional zur Dauer und zur Photonen-Fluenzrate.

Unabhängig von den gemessenen Ergebnissen kann ein Einfluss der Schwerkraft auf die Etablierung des Dunkelphänotyps impliziert werden. Es scheint, dass während der Lichtinkubation die Etablierung eines gravitropen Reizes Voraussetzung für das Wachstum im Dunklen ist. In *Ceratodon* sind Lichteffekte auf den Gravitropismus bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass blaues und grünes Licht die gravitrope Antwort von Protonemen inhibieren (Young and Sack, 1992). Untersuchungen mit *Class 2*-Mutanten von *Ceratodon* (s. 1.4.2) deuteten an, dass auch Phytochrom in der Pfr-Form ähnlich wirkt (Lamparter *et al.*, 1996). Amyloplasten (stärkehaltige Plastiden) wurden in *Ceratodon* als einzige Partikel gefunden, die nach gravitroper Stimulation sedimentierten (Walker and Sack, 1990). Daher wird vermutet, dass diese Organellen als Statoliten fungieren. Dass ein gravitroper Reiz auf lichtinkubierte Statoliten das Wachstum von *Physcomitrella*-Caulonemata im Dunklen stimuliert, wird aufgrund der erzielten Ergebnisse hier postuliert. Von *Ceratodon*-Protonemen ist bekannt, dass die Fluenzrate des Rotlichts eine Kontrollfunktion auf den Gravitropismus ausübt (Kern and Sack, 1999). Weitere Bestrahlungs-Experimente sollten zeigen, ob für *Physcomitrella* das Wachstum im Dunklen von einer wellenlängen- und fluenzratenspezifischen Vorinkubation mit Licht abhängig ist.

Die Untersuchungen zum Polarotropismus von *Physcomitrella* zeigten im Ergebnis keinen Unterschiede im Vergleich zu Experimenten mit *Ceratodon*- (Esch *et al.*, 1999) oder Farnprotonemen (Wada and Sugai, 1994). Die Protonemen wuchsen bis auf wenige Filamente (E-Vektor = 45 °, s. Abbildung 31) senkrecht zum E-Vektor des polarisierten Lichtes. Das Phänomen des Polarotropismus ist seit langem bekannt (Bünning and Etzold, 1958). Dass Phytochrom in die polarotrope Antwort involviert ist, wurde auch in anderen Moosarten wie *Physcomitrium turbinatum* (Nebel, 1969) und *Ceratodon* (Esch *et al.*, 1999) gefunden. Mit *Physcomitrella* wurden hierzu bereits Untersuchungen an primären Chloronemata durchgeführt (Jenkins and Cove, 1983b). Es handelt sich beim Polarotropismus um einen vektoriellen Effekt, der unter Bestrahlung mit polarisiertem Licht auftritt. Die Antwort ist mit der phototropen vergleichbar, da in beiden Fällen die Wachstumsrichtung der Spitzenzelle von Licht determiniert wird. Im Falle des Polarotropismus steht die Wachstumsrichtung jedoch im Bezug zum elektrischen Vektor des polarisierten Lichtes und nicht zum Richtungsvektor des Lichtstrahls. In der natürlichen Umgebung von Moosen spielt polarisiertes Licht sicherlich keine wichtige Rolle. Unter Laborbedingungen kann über die auftretende Antwort jedoch auf eine dichroitische Orientierung der Phytochrom-Moleküle geschlossen werden (im Detail beschrieben in 1.3). Die Ergebnisse deuten an, dass die für die polarotrope Antwort verantwortlichen Phytochrom-Moleküle in *Physcomitrella* in enger Nachbarschaft zur Plasmamembran lokalisiert sind. In *Ceratodon*-Spitzenzellen konnte membranassoziertes Phytochrom gemessen werden. Dieses neue Ergebnis wurde mittels einer *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS) genannten Technik erzielt (Böse *et al.*, 2003).

Ein membranbindendes Motiv wurde weder für die *Physcomitrella*-Phytochrome PhypaPhy1 - 4 gefunden (Mittmann, 2003), noch ist ein solches von anderen Phytochromen bekannt. Andererseits besitzt der für den Phototropismus in höheren Pflanzen verantwortliche Photorezeptor Phototropin auch keine Membrandomäne und ist gleichwohl membranlokalisiert (Sakamoto and Briggs, 2002).

4.3 Phototropismus von *Physcomitrella*-Phytochrom *knockout*-Linien

Für den *Physcomitrella*-Wildtyp wurde gezeigt, dass dunkeladaptierte Moosfilamente phytochromvermittelt phototrop reagieren. Damit entstand die Möglichkeit, *knockout*-Linien der Phytochrom-Gene *PhypaPhy1* - *PhypaPhy4* (Mittmann, 2003) bezüglich ihrer phototropen Wirkung physiologisch zu charakterisieren (s. 3.5.5). Wie bereits beim Wildtyp beobachtet, reagierten auch die Spitzenzellen der *knockouts* nicht mit einer homogenen Antwort.

Die Messungen der phototropen Antwort ergaben, dass besonders die Phytochrome PhypaPhy3 und 4 eine spezifische Rolle im Phototropismus caulonematischer Spitzenzellen von *Physcomitrella* übernehmen (s. Abbildung 34-36 und Tabelle 8-10). Den deutlichsten Phänotyp ohne erkennbaren positiven Phototropismus zeigen die *knockouts* des *PhypaPhy4*-Gens. Mit PhypaPhy4 wurde offensichtlich der erste Photorezeptor, der den positiven Phototropismus von Moosfilamenten kontrolliert, identifiziert. Die Fluenz-Effekt-Kurve erreicht bei keiner Fluenzrate den positiven Bereich der Y-Achse (s. Abbildung 35). Allerdings zeigen die Kreisdiagramme (s. Abbildung 35), dass bei den relevanten Fluenzraten, die in wtDC positiv phototrope Antworten hervorrufen, die gemessenen Krümmungswinkel um den Nullwert verteilt sowohl im Positiven als auch im Negativen liegen. PhypaPhy3 scheint für den negativen Phototropismus bei hohen Fluenzraten verantwortlich zu sein. Hier ist der Mittelwert der Krümmungswinkel bei $5 \mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-2}$ deutlich über dem von wtDC und bleibt bei $15 \mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-2}$ sogar im Positiven. Eine geringe Anzahl an Spitzenzellen wächst jedoch, wie die Kreisdiagramme zeigen, auch hier negativ phototrop (s. Abbildung 34).

Die *PhypaPhy1*- und *PhypaPhy2*-*knockouts* besitzen einen schwächeren Phänotyp. Sie zeigten eine gegenüber wtDC geringere phototrope Reaktion (s. Abbildung 32 u. 33). Diese zeigt sich signifikant in den Maxima der negativen und positiven Gipfel ihrer Fluenz-Effekt-Kurven. Auffällig ist auch der mit -44° mehr als doppelt so hohe Krümmungswinkel des *PhypaPhy1*-*knockouts* bei $15 \mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-2}$ gegenüber der Wildtyp-Antwort mit -19° . Die Funktion von PhypaPhy1 und 2 scheint daher vor allem, und dieses partiell spezifisch, in der Modulation der phototropen Antwort zu liegen.

Der Polarotropismus wurde bisher für die *PhypaPhy1* - 4-*knockouts* nicht quantitativ untersucht. Erste Experimente zeigen jedoch, dass PhypaPhy4 auch in die polarotrope Antwort involviert ist (s. Abbildung 51). Die Spitzenzellen der *knockouts* reagieren entweder abgeschwächt (s. Abbildung 51e) oder sehr heterolog auf den E-Vektor des polarisierten Lichtes (s. Abbildung 51d und f). Für die *PhypaPhy1*-3-*knockouts* wurden bei

diesen rein qualitativen Untersuchungen keine Veränderung im Polarotropismus beobachtet.

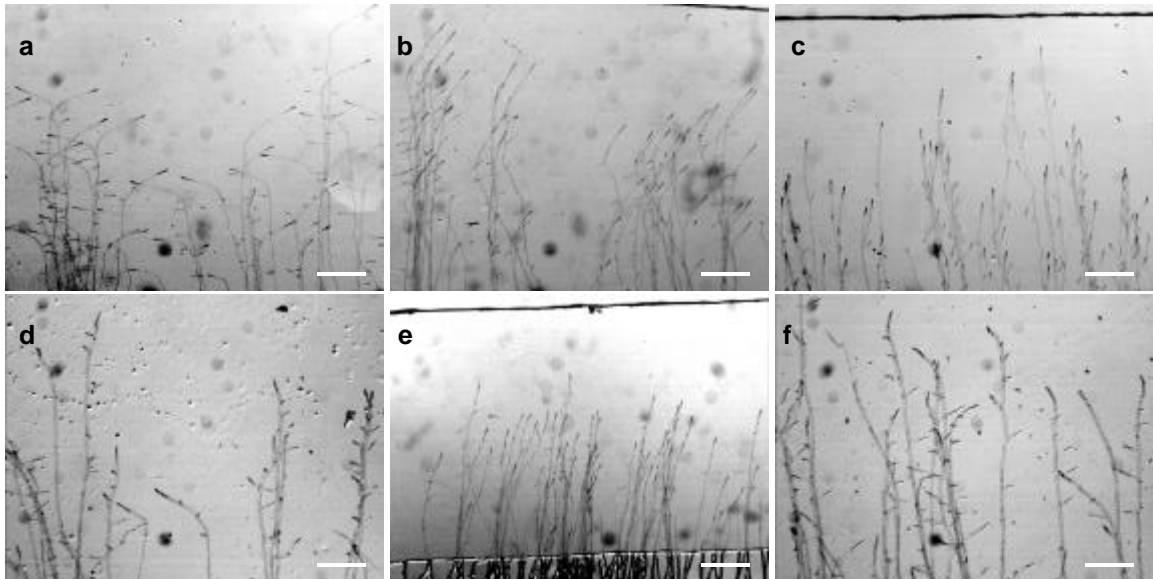


Abbildung 51: Antwort auf polarisiertes Licht bei Protonema-Filamenten von *Physcomitrella*-wtDC- (a-c) und *PhypaPhy4*-knockouts (d-f). E-Vektor bezüglich der Wachstumsrichtung in (a, d) = 0°, (b, e) = -45° und (c, f) = 90°. Balken in a, b, c und e ~ 200 µm und in d und f ~ 50 µm.

Es ist grundsätzlich möglich, multiple *knockout*-Mutanten in *Physcomitrella* herzustellen (Schipper *et al.*, 2002; Imaizumi *et al.*, 2002). Von Tom Abts wurde in Kooperation mit Franz Mittmann versucht, Doppel-*knockout*-Linien für die Phytochrom-Gene *PhypaPhy3/4* und *PhypaPhy1/3* herzustellen (Mittmann, 2003). Aus den bereits erzielten Ergebnisse für die *PhypaPhy3* und *4*-Einzel-*knockouts* kann bei diesen Doppel-*knockouts* ein deutlicher Phänotyp erwartet werden. Detaillierte Analysen zu Transformanten, die doppelselektiv auf G418/hygromycinhaltigem Medium regenerierten und isoliert werden konnten, stehen noch aus. Stellen sich diese dabei als positiv heraus, sollten weitere Untersuchungen zum Photo- und Polarotropismus folgen, um die komplexen phytochromvermittelten Antworten in diesem Organismus genauer aufzuklären.

In *Physcomitrella* und anderen Moosen ist eine Vielzahl weiterer physiologischer Antworten als lichtabhängig reguliert bekannt. Für die Sporenkeimung (Schild, 1981) und die Orientierung der Chloroplasten innerhalb der Zelle (Kadota *et al.*, 2000) wurde in *Physcomitrella* eine Phytochrom-Abhängigkeit gezeigt. In *Ceratodon* ist die Chlorophyll-Biosynthese (Lamparter *et al.*, 1997a), die Bildung von Seitenverzweigungen (Kagawa *et al.*, 1997) und die Regeneration von Chloroplasten (Cove *et al.*, 1996) phytochromkontrolliert. Einige dieser Effekte sind sowohl rot- als auch blaulichtabhängig (Lamparter and Brücker, 2003). Ziel weiterer Untersuchungen sollten Aufschluss über die hier genannten physiologischen Antworten liefern. Mit der Etablierung dunkeladaptierbarer Protonemen und weiteren Experimenten mit den *PhypaPhy*-*knockouts* sind die Voraussetzungen für vielversprechende Ergebnisse gegeben. Inwiefern Phytochrome spezifisch

bzw. im Zusammenspiel mit anderen, eventuell auch mit den beiden bisher nicht klonierten Phytochromen oder weiteren Photorezeptoren die genannten physiologische Antworten regulieren, kann nun auch in *Physcomitrella* auf zellulärer Ebene untersucht werden.

Die *PhyphaPhyl* - 4 -*knockouts* sollen des weiteren auf transkriptioneller Ebene mittels auf cDNA basierenden *Microarrays* analysiert werden (Grant: *European Science Foundation*, Strasbourg, Frankreich, Programm: “*Integrated Approaches for Functional Genomics*” wurde bewilligt). Die Untersuchungen werden in Kollaboration mit Dr. A. Cuming (Leeds University, UK) durchgeführt. Für diese Analysen wurden *Microarrays* hergestellt, auf die *Physcomitrella*-cDNAs von rund 2000 Genen fixiert wurden. Eine Vielzahl dieser Gene ist in *Arabidopsis* als lichtabhängig reguliert bekannt. Gene die als differentiell exprimiert identifiziert werden, sollen anschließend über quantitative *real-time* RT-PCR im Detail auf ihr Expressionsmuster untersucht werden.

4.4 Gene targeting in *Ceratodon purpureus*

Ziel dieser Experimente war die Möglichkeit des *gene targetings* über homologe Rekombination in *Ceratodon* zu untersuchen. Für die Experimente wurde der Phänotyp der *Ceratodon* Class 1-Mutanten genutzt (s. 1.4.2). Dieser zeichnet sich durch aphototropes Wachstum und ein deutlich reduziertes Chlorophyll-Level aus (Lamparter *et al.*, 1996), wodurch er leicht von Wildtyp-Kulturen unterscheidbar wird. Es wurden zwei unterschiedliche Strategien, die den Einbau von Oligonukleotiden aufgrund homologer Rekombination voraussetzten, gewählt. Zum einen sollte die Transformation des Wildtyps mit klassischen *knockout*-Konstrukten zu Transformanten mit Class 1-Phänotyp führen. Mit der Zweiten Strategie sollte durch die Transformation aphototroper Mutanten der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden. In beiden Fällen wurde die Selektion homologer Rekombinanten ohne Nutzung eines Resistenzmarkers untersucht.

4.4.1 Knockout von *CpHO1*

Phototropismus und Chlorophyll-Biosynthese unterliegen in *Ceratodon* der Kontrolle von Phytochrom (Hartmann *et al.*, 1983; Lamparter *et al.*, 1997a). In *Ceratodon* wurden bisher drei Phytochrom-Gene identifiziert (Thümmler *et al.*, 1992; Hughes *et al.*, 1996; Mittmann, 2003). Das für die beiden genannten Phänomene verantwortliche Phytochrom ist nicht bekannt. Es ist daher unter Umständen nötig, alle drei Phytochrom-Gene auszuschalten, um die Möglichkeit des *gene targetings* über homologe Rekombination in *Ceratodon* aufgrund dieser leicht identifizierbaren Phänomene zu untersuchen. Allerdings lassen sich durch *knockout* von Genen im Chromophor-Stoffwechselweg alle Phytochrome gleichzeitig inaktivieren. Diese Vorgehensweise wurde hier mit *knockout*-Konstrukten, die als *target* das Hämoxygenase-Gen *CpHO1* (Mittmann, 2003) haben, durchgeführt. Hämoxygenasen katalysieren die Konversion von Häm zu Biliverdin (s. Abbildung 2), einen Syntheseschritt der Chromophor-Biosynthese (s. Abbildung 1). Phytochromobilin PÖB, der Chromophor pflanzlicher Phytochrome, würde in *CpHO1*-*knockouts* nicht mehr gebildet.

Nach Transformation von Wildtyp-Protoplasten mit klassischen *replacement-knockout*-Konstrukten regenerierten 37 % der Protoplasten mit einem *Class 1*-Phänotyp (s. Abbildung 38 – 40 und Tabelle 11). Eine Vielzahl aphototroper Linien wurde isoliert und genomischer DNA extrahiert. In keiner Linie konnte über PCRs homologe Rekombination nachgewiesen werden (s. 3.6.1.3). Es stellt sich natürlich die Frage, auf welchem Phänomen die hohe Anzahl an aphototropen Mutanten beruht. Protoplastierung des Wildtyps führt nur bei sehr wenigen regenerierenden Protoplasten zu aphototropen Mutanten (Esch, 1998). In Kontroll-Transformationen unter gleichen Bedingungen mit einem GFP-Reporterkonstrukt wurden keine *Class 1*-Phänotypen beobachtet. Damit scheidet der Hitzeschock als Ursache ebenfalls aus. *Gene silencing* über RNA-Interferenz (RNAi) kann nicht ausgeschlossen werden. RT-PCRs zeigten, dass die Hygromycin-Resistenz in den Mutanten transkribiert wird (s. 3.6.1.3). Primäre Transkripte des *knockout*-Konstruktes könnten somit *CpHO1-antisense*-RNA darstellen und die Transkription des genomischen *Locus* resultierte in doppelsträngigen RNA-Hybriden, die eventuell abgebaut werden. Veröffentlichungen über RNAi in Moosen gibt es nicht. Aus weiteren Transformationen mit den beiden *knockout*-Konstrukten pG18s (Marker *in sense*) und pG19 (Verschiebung im Leseraster) wurden ähnlich hohe Anzahlen an aphototropen Mutanten gefunden. RNAi kann nach diesen Experimenten zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, wird jedoch besonders aufgrund der vielen Aphototropen aus dem pG19-Experiment sehr unwahrscheinlich. Aufgrund aller durchgeführten Transformationen, einschließlich der GFP-Kontrollen, ist der Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit auf die transformierte homologe DNA zurückzuführen. Es sollte daher möglich sein, auch andere Gene in *Ceratodon* mit ähnlich hoher Frequenz mittels dieser Methode auszuschalten. *Silencing* über Methylierung des *target-Locus* kann ebenfalls zu dem aphototropen Phänotyp führen. Da Untersuchungen zu den genannten Phänomenen nicht durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle nicht weiter spekuliert werden. Neuere *Reviews* zum Thema *RNA-Silencing* finden sich in (Ahlquist, 2002) und zum Thema *Gene-Silencing* über DNA-Methylierung in Pflanzen in (Wassenegger, 2000; Martienssen and Colot, 2001).

Die mit 2,3 % relativ niedrige Rate an regenerierenden Protoplasten ist wahrscheinlich auf den hohen Stress (Hitzeschock und MMM-Lösung) während der Transformation zurückzuführen. In früheren Protoplastierungs-Experimenten mit *Ceratodon*, die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden, regenerierten 20 – 30 % der Protoplasten (Lamparter *et al.*, 1998).

Wie die *gene replacement*-Experimente zeigten (s.u.), ist *gene targeting* in *Ceratodon* möglich. In weiteren Transformationen mit den gleichen Konstrukten sollten daher die transformierten Protoplasten auf Selektivmedium regenerieren. Dieses ermöglicht ein Abschätzen der Frequenz, mit der *targeted knockouts* über homologe Rekombination in *Ceratodon* generiert werden können.

4.4.2 *Gene replacement in Ceratodon*

Für die *gene replacement*-Experimente wurde die *Ceratodon*-Mutante *ptr116* gewählt. Der Phänotyp dieser Mutante ist auf eine Punktmutation, die in einem Stopcodon in der kodierenden Region des Hämoxygenase-Gens *CpHO1* resultiert, zurückzuführen (Mittmann, 2003). Als Ergebnis ist die Biosynthese von PÖB in dieser Mutante blockiert. Dadurch ist in *ptr116* die phytochromkontrollierte phototrope Antwort inhibiert und der Chlorophyll-Gehalt stark reduziert (Lamparter *et al.*, 1997a).

Die Mutante wurde mit dem modifizierten Hämoxygenase-Gen *CpHO1* (Mittmann, 2003) transformiert. In dieses Gen wurden zwei *silent mutations* eingeführt, die neue Restriktionsstellen generierten. Über eine weitere *silent mutation* im *gene replacement*-Konstrukt wurde eine im Wildtyp-Gen vorhandene Restriktionsstelle entfernt (s. 2.11.9). Nach der Transformation konnten mit hoher Frequenz Linien mit wiederhergestelltem Phänotyp isoliert werden (s. Abbildung 43). Homologe Rekombination des Konstruktes ins Genom könnte zu diesem Wildtyp-Phänotyp führen. Die dadurch resultierenden veränderten Restriktionsstellen im *CpHO1-Locus* ermöglichen ein exaktes *screenen* putativer *gene replacement*-Mutanten auf molekularer Ebene.

Die Ergebnisse zum *gene replacement* in *Ceratodon* sind eindeutig: Über PCR-, Sequenz- und genomische *Southern Blot*-Analysen (s. 3.6.2.2 - 3.6.2.4) konnte das erste erfolgreiche *replacement* eines pflanzlichen Kern-Gens bewiesen werden! Damit wurde gezeigt, dass *site directed mutagenesis* (SDM) *in vivo* in *Ceratodon* funktioniert. Es sollte daher grundsätzlich möglich sein, Genfunktionen über die Manipulation von Promoterelementen bzw. kodierenden Motiven in *Ceratodon* zu modifizieren. Über zufällige Insertionsmutagenese sind solche Modifikationen nicht zu erzielen. Entsprechend dieses Resultates konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass *gene targeting* über homologe Rekombination in *Ceratodon purpureus* möglich ist.

Die *Southern*-Analysen (s. Abbildung 49) der Linie G23#G4 belegen eine einzelne Insertion des Konstruktes am *target-Locus*. Die Wildtyp-Bande bzw. Signale illegitim rekombinierter Konstrukte wurden nicht detektiert. Nebeneffekte, die durch multiple Insertionen am *target-Locus* bzw. durch nicht homolog rekombinierte DNA ins pflanzliche Genom hervorgerufen werden können, treten daher in dieser Linie nicht auf. Dieses ist für alle Experimenten, bei denen Gene gezielt ausgeschaltet werden sollen bzw. SDM *in vivo* durchgeführt wird, von großem Vorteil, da der resultierende Phänotyp auf ein eindeutiges Ereignis zurückzuführen ist.

Die *Southern Blots* der Linie G23#A2 (s. Abbildung 49) zeigen, dass das *gene replacement*-Konstrukt wahrscheinlich illegitim in das Genom dieser Linie rekombinierte. Dass die weiteren detektierten Signale von ectoper Rekombination (s. u.) herrühren, kann nicht ausgeschlossen werden. Intensive *Southern-Blot*- und Sequenzanalysen mit den 93 isolierten Linien sollten zeigen, mit welcher Frequenz einzelne oder multiple Insertionen am *target-Locus* bzw. nichthomologe oder ectope Rekombination in *Ceratodon* auftreten. Ectope Rekombination wurde häufig nach *gene targeting* Experimenten in höheren Pflanzen beobachtet (Puchta, 2002). Hierbei wird die Sequenzhomologie des *target-*

Locus auf die extrachromosomale DNA des *gene targeting*-Konstruktes kopiert. Dieses kann dabei um zusätzliche Nukleotide der 5'- oder 3'-Region des *target-Locus* verlängert werden. Die modifizierte Sequenz kann dann irgendwo im Genom integrieren (*ectopic targeting*). Sorgfältig durchgeführte *Southern*-Analysen wie hier durchgeführt sind daher unabdingbar, um dieses Phänomen in Rekombinanten auszuschließen. In zwei Linien wurde zwar homologe Rekombination über PCR und Restriktion der Amplifikate nachgewiesen, es zeigte sich jedoch, dass nur zwei der drei eingeführten Modifikationen in den Rekombinanten vorlagen. Die Sequenzierung der Linie G23#C1 bestätigte das Ergebnis der Restriktions-Analysen (s. Abbildung 47). Auch hier sollten weitere Untersuchungen der selektierten Linien Aufschluss über die Häufigkeit dieser ungewollten Mutation ergeben.

Mit dem neben *Physcomitrella* nun zweiten Moos, in dem *gene targeting* effizient möglich ist, wird es wahrscheinlich, dass auch in anderen Moosarten diese Technik einsetzbar ist. Hier gelang die Selektion homologer Rekombinanten ohne Einsatz eines Selektionsgens aufgrund des eindrucksvollen Phänotyps. Inwiefern sich dieses Ergebnis auf andere Gene in *Ceratodon* übertragen lässt, wird vor allem von den gewählten Konditionen abhängen. Integriert die transformierte DNA vornehmlich durch homologe Rekombination, könnte auch eine Cotransformation mit einem Reportergen in Betracht gezogen werden. Die Möglichkeit, über SDM *in vivo* einzelne Aminosäuren eines Genproduktes zu verändern, ist so attraktiv, dass die Methode eine große Chance besitzt, in der Funktionsanalyse pflanzlicher Genprodukte breiter eingesetzt zu werden.

Warum *gene targeting* in Moosen effizient ist, konnte noch nicht geklärt werden, ist jedoch von besonderem Interesse. Die Aufklärung dieser Frage könnte bei der Etablierung von *gene targeting* in höheren Pflanzen, die wirtschaftlich eine weit größere Bedeutung besitzen wie Moose, helfen. PEG-vermittelte Transformation, wie auch in den hier durchgeführten Experimenten angewandt (s. 2.12.2), scheint besonders effizient um *gene targeting* zu erzielen (Schaefer, 2002). Für höhere Pflanzen konnte dieses jedoch nicht beobachtet werden (Mengiste and Paszkowski, 1999). Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung berichtet von 1 % selektierter Reis-Kallus-Linien, die sich als echte Rekombinanten herausstellten (Terada *et al.*, 2002). Dieses Ergebnis mit der bisher höchsten erzielten Frequenz an *gene targeting* in höheren Pflanzen wurde nicht über PEG-vermittelte Transformation erzielt. Der Einfluss der Protoplastierung und des Hitzeschocks und eine infolge des induzierten Stresses erhöhte Expression der für die homologe Rekombination verantwortlichen Enzym-Maschinerie ist ebenso möglich. Über ein relativ simples Experiment, deren Grundlage mit den in dieser Arbeit etablierten Techniken gegeben ist, könnte dieses untersucht werden: Dazu müssten die verwendeten *gene-replacement*-Konstrukte (s. 2.11.9.1) bzw. kürzere einzel- oder doppelsträngige Oligonukleotide in einzelne Zellen aphotroper Mutanten injiziert werden. Werden aus diesen Experimenten aphotrope Linien isoliert, deren Phänotyp auf homologer Rekombination beruht, kann ein Einfluss der Protoplastierung bzw. des Hitzeschocks ausgeschlossen werden. Werden die Zellen nach der Mikroinjektion einem Hitzeschock ausgesetzt, las-

sen sich die verantwortlichen Parameter weiter eingrenzen. In zwei *Reviews* jüngerer Datums finden sich weitere Spekulationen zu diesem Thema (Schaefer, 2002; Puchta, 2002).

Die erzielten Resultate zeigen, dass der Phäno- und Genotyp der aphototropen Mutante *ptr116* zur Untersuchung der homologen Rekombination in *Ceratodon* besonders gut geeignet ist. Für die weiteren Aufklärung des Rekombinations-Mechanismus in Moosen könnte er wertvolle Einsichten liefern. So können über *gene targeting*-Experimente mit dieser Mutante Erkenntnisse über die mindestens notwendige Anzahl an Homologie der Fremd-DNA zum genomischen *Locus*, die für deren erfolgreiche homologe Integration Voraussetzung ist, gewonnen werden. Nach ersten von mir durchgeführten Transformationen in *ptr116* mit Einzel- und Doppelsträngigen Oligonukleotiden einer Länge von 65 bp konnten drei Linien mit wt-Phänotyp isoliert werden. Alle drei Linien entstammten der Transformation mit doppelsträngiger DNA. Eine Analyse der Sequenzierung des entsprechenden genomischen *Locus* steht noch aus. Stellen sich diese als echte homologe Rekombinanten heraus, erübrigt sich für weitere *gene targetings* die zeit- und kostenintensivere Klonierung von *knockout*-Konstrukten.