

5 ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb dieser Doktorarbeit wurde auf zellulärer und molekularer Ebene die Photomorphogenese in den Moosen *Ceratodon purpureus* und *Physcomitrella patens* untersucht.

Protonemen von *Ceratodon* sind als Modellorganismus für diese Analysen auf zellulärer Ebene seit langem bekannt. Ihre Wachstumsregion beschränkt sich auf den Apex der Spitzenzelle. Seitliche Bestrahlung mit Rotlicht induziert in diesen Zellen positiven Phototropismus. Diese Antwort ist rot/dunkelrot reversibel und impliziert daher, dass sie von Phytochrom vermittelt wird. Des Weiteren ist Phytochrom in Moosen, wie auch in höheren Pflanzen, in die Chlorophyll-Biosynthese involviert. In früheren Arbeiten wurden verschiedene Klassen aphototroper Mutanten isoliert und charakterisiert. Die *Class 1*-Mutanten sind in den genannten Phytochrom-Effekten aufgrund eines Defektes in der Chromophor-Biosynthese gestört. Ein Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Mikroinjektion aphototrope Mutanten von *Ceratodon* wiederherzustellen und die Ursache des mutanten Phänotyps aufzuklären. Nachdem die Mikroinjektion für *Ceratodon* etabliert war, wurde diese ausgenutzt, um Mutanten auf zellulärer Ebene zu untersuchen. In der vorgelegten Arbeit wurde Phycocyanobilin, welches den Phytochrom-Chromophor Phytochromobilin (PÖB) substituiert, in einzelne Protonema-Spitzenzellen aphototroper Mutanten injiziert. Dieses führte in ~70 % der injizierten Zellen zu deutlichen phototropen Antworten und einer Erhöhung des Chlorophyll-Gehaltes nach seitlicher Bestrahlung mit Rotlicht. Die Untersuchungen geben Hinweise auf eine extrem stabile Subfraktion an Holophytochrom, die scheinbar an der Apex der Spitzenzelle lokalisiert ist. In einer Reihe von weiteren Experimenten wurden Expressionsplasmide mit Hämoxygenase (HO)-Genen aus Ratte, *Arabidopsis* (*AtHO1*) und *Ceratodon* injiziert. Das Wildtyp (wt)-Gen der *Ceratodon*-HO *CpHO1* wurde von Franz Mittmann in einer vorangegangenen Arbeit kloniert und sequenziert. HO katalysiert die Konversion von Häm zu Biliverdin, einer Vorstufe von PÖB. Die Injektionen führten in ~40 % der injizierten Filamente zu wt-Phänotypen. Die Ergebnisse zeigten, dass den *Class 1*-Mutanten eine Aktivität dieses Enzyms fehlt. Über ein GFP-CpHO1-Fusionsprotein wurde gezeigt, dass das Enzym in den Chloroplasten lokalisiert ist. Sowohl plastidär (*full-length* CpHO1 und AtHO1) als auch cytoplasmatisch (Ratten-HO und CpHO1 ohne Chloroplasten-Transit-Peptid) lokalisierte Enzyme unterdrückten den Phänotyp der Mutanten.

Ziel der Untersuchungen mit *Physcomitrella* war die Identifikation photorezeptorvermittelter Antworten. Dunkelgewachsene Pflanzen liefern genauere Ergebnisse bei der Erforschung der Photomorphogenese. Daher mussten zuerst Bedingungen etabliert werden, unter denen Protonema-Wachstum im Dunklen induziert wird. Dieses gelang und die Befunde deuteten an, dass die Adaptation an einen gravitropen Stimulus dafür eine Voraussetzung ist. Intensive physiologische Untersuchungen mit dunkeladaptierten Protonemen identifizierten phytochromvermittelten Phototropismus. Blaulicht-Rezeptoren scheinen nicht in diese Antwort involviert. Die Fluenz-Effekt-Kurven der phototropen

Antwort vermittelten ein komplexes Bild. Abhängig von der Bestrahlungsstärke reagierten Protonemen positiv und/oder negativ phototrop. Bei niedrigen Lichtintensitäten wuchs die Mehrzahl weg vom Licht. Mittlere Lichtintensitäten induzierten eine positive Antwort in den meisten Filamenten und im starken Licht dominierte wieder negativer Phototropismus (Meidereaktion). Darüber hinaus deuteten Experimente mit polarisiertem Licht an, dass aktive Phytochrom-Moleküle in *Physcomitrella* dichroitisch orientiert in enger Nachbarschaft zur Plasmamembran lokalisiert sind.

In *Physcomitrella* ist *gene targeting* über homologe Rekombination mit hoher Effizienz möglich. Von Franz Mittmann wurden die vier Phytochromgene *PhypaPhy1 - 4* identifiziert und durch homologe Rekombination ausgeschaltet. Der quantitativen Vergleich des phototropen Verhaltens der *knockouts* mit dem des Wildtyps lieferte ein detailliertes Bild der Funktion von jedem der vier Phytochrom-Gene. Jedes Phytochrome scheint eine spezifische Rolle der phototropen Antwort zu übernehmen. In *PhypaPhy4-knockouts* ist der positive Phototropismus vollständig unterdrückt. Damit wurde der erste Photorezeptor in Moosen identifiziert, der diese Antwort kontrolliert. *PhypaPhy3* scheint für die Meidereaktion, die sich in Krümmungen weg vom Licht unter hohen Fluenzraten zeigte, verantwortlich zu sein. Einen schwächeren Phänotyp zeigten die *knockouts* von *PhypaPhy1* und 2. Ihre Aufgabe liegt eventuell in einer Modulation der durch *PhypaPhy3* und 4 induzierten Effekte.

Die oben beschriebenen *Class 1*-Phototropismus-Mutationen wurde zur Untersuchung von *gene targeting*-Experimenten in *Ceratodon* genutzt. *HO-knockouts* sollten aufgrund des aphototropen Phänotyps leicht zu identifizieren sein. Transformationen mit einem *knockout*-Konstrukt, welches das *CpHO1*-Gen im wt zum Ziel hatte, resultierten in ~40% der regenerierten Protoplasten im aphototropen Phänotyp. Überraschenderweise wurde dieser Phänotyp nicht durch Integration des *knockout*-Konstruktes am homologen genomischen *Locus* erzielt, beruht aber allem Anschein nach auf der homologen DNA, die möglicherweise über RNAi oder DNA-Methylierung wirkt. Von Franz Mittmann wurde auch der *CpHO1-Locus* mehrerer *Class 1*-Mutanten sequenziert. Bei einer Mutante lag die Ursache in einem Stopcodon wenig stromabwärts hinter dem Startcodon. Mit der Transformation aphototrope Protoplasten mit einem modifizierten *CpHO1*-Genfragment sollte versucht werden, das defekte Gen über homologer Rekombination zu reparieren (*gene replacement*). PCR- und *Southern*-Analysen belegten die Integration eines einzelnen Fragments im homologen Bereich des *Ceratodon*-Genoms und belegten somit eindeutig erfolgreiches *gene replacement*. Erstmals wurde somit ein *replacement* eines pflanzlichen Kern-Gens durchgeführt. Die hohe Rate von 0,9 % regenerierender Protoplasten mit wt-Phänotyp zeigen das Potential dieser Methode. Über *site directed mutagenesis* chromosomaler Gene *in vivo* besteht die Möglichkeit, die Methode zur Funktionsanalyse pflanzlicher Genprodukte durch Nutzung des Moos-Systems einzusetzen. Darüber hinaus wurde mit diesem Experiment auf elegante Weise gezeigt, dass in *Ceratodon purpureus* effizientes *gene targeting* durch homologe Rekombination möglich ist.