

1 EINLEITUNG

1.1 Phytochrome

Pflanzen nutzen Licht nicht nur als Energiequelle für die Photosynthese; Lichtsignale liefern darüber hinaus existenzielle Informationen während der gesamten pflanzlichen Entwicklung und steuern beispielsweise Keimung, Blühzeitpunkt, die Reaktionen auf konkurrierende Nachbarpflanzen bis hin zur Seneszenz (Smith 2000), (Neff *et al.* 2000). Hierzu existieren in Pflanzen verschiedene Photorezeptoren: bekannt sind die Blaulichtrezeptoren NPH1/2 (Phototropin) (Briggs & Huala 1999) und die den Photolyasen verwandten Cryptochrome (Ahmad & Cashmore 1996) sowie die am besten untersuchten pflanzlichen Photorezeptoren, die Phytochrome.

Phytochrome sind signalvermittelnde Photorezeptoren, die zwischen zwei thermodynamisch stabilen Konformationen, einer Rotlicht- sowie einer Dunkelrotlicht absorbierenden Form durch Bestrahlung mit den jeweiligen Lichtqualitäten reversibel konvertiert werden können (Borthwick *et al.* 1952), (Kendrick & Kronenberg 1994).

Es wird gemeinhin unterstellt, dass Phytochrome vermittelt selektiver Regulation verschiedener Gene wirken. Tatsächlich ist die Expression vieler Gene bspw. des Photosyntheseapparates lichtreguliert (Bischoff *et al.* 1997). Jedoch existieren auch eine Reihe von Phytochromeffekten, die in so kurzer Zeit sichtbar werden, dass eine Regulation über modifizierte Genregulation unwahrscheinlich ist; bspw. ist die Phytochrom A-vermittelte Reduzierung der Hypocotyllängenzunahme nach Rotlichtbestrahlung von *Arabidopsis*-Keimlingen bereits nach wenigen Minuten detektierbar (Parks & Spalding 1999), und die erste Stufe der phototropen Reaktion dunkeladaptierter Protonemen von *Ceratodon* nach seitlicher Rotlichtbestrahlung ist nach 5 min. erkennbar (Anschwellen des Apex der Spitzenzelle) (Hartmann *et al.* 1983). Zudem existieren Effekte wie der (Phytochrom-abhängige) Polarotropismus von Farn- und Moosprotonemen, die eine dichroitische Anordnung der Photorezeptoren an der Plasmamembran nahe legen und daher nicht **unmittelbar** mit einer Steuerung über Genregulation in Einklang stehen dürften (Etzold 1965), (Kadota *et al.* 1982), (Hartmann *et al.* 1983), (Hughes & Hartmann 1998).

Der Einsatz chimerischer Fusionskonstrukte von Phytochromgenen mit den Reportergen GFP (Green Fluorescent Protein) oder GUS (Glucuronidase) deutete an, dass in höheren Pflanzen die P_r-Form der Phytochrome A und B tatsächlich – wie lange unterstellt - cytosolisch lokalisiert ist, die Photokonversion zu P_{fr} jedoch die Translokation in den Nucleus auslöst, so dass die Vermutung nahe liegt, dass Phytochrome im Kern direkt oder mittelbar als Transcriptionfaktoren wirken können (Sakamoto & Nagatani 1996), (Gil *et al.* 2000), (Kim *et al.* 2000), (Kircher *et al.* 1999). Die Phytochrome C bis E scheinen auch in ihrer Pr-Form im Kern detektierbar zu sein (Nagy *et al.* 2001), (Kircher *et al.* 2002).

Schneider-Poetsch und Mitarbeiter beschrieben schwache aber deutliche Homologien von Phytochrom-C-Termini mit Transmittermodulen sensorischer Histidin-Kinasen

bakterieller Zwei-Komponenten-Systeme (Schneider-Poetsch *et al.* 1991), (Schneider-Poetsch 1992), die meist der Perzeption von Umgebungssignalen dienen (Parkinson & Kofoid 1992), (Hoch & Silhavy 1995). Tatsächlich wurde mit *rcaE* im Cyanobakterium *Fremyella* eine Sensorische Histidinkinase, die in die Anpassung an die Lichtumgebung involviert ist (*Complementary chromatic adaptation*) (Kehoe & Grossman 1994), mit N- und C-terminalen Homologien zu Phytochromen identifiziert (Kehoe & Grossman 1996). Die vollständige Sequenzierung des Genoms des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.* 1996) lenkte die Aufmerksamkeit auf das Produkt des Gens *slr0473*, dessen C-Terminus Histidinkinase- und dessen N-Terminus Phytochrom-homolog ist. Lamparter *et al.* (1997b), Yeh *et al.* (1997) und Hughes *et al.* (1997) konnten für das Genprodukt zeigen, dass es ein *bona fide* Phytochrom ist und es molekular- sowie photobiologisch charakterisieren.

Aber auch für pflanzliche Phytochrome existieren Indizien für die Funktion als Proteinkinase: bspw. konnten Yeh & Lagarias (1998) für in Hefe exprimiertes rekombinantes Phytochrom aus *Mesotaenium caldariorum* und phyA aus *Avena sativa* zeigen, dass diese Phytochrome lichtabhängige Serin/Threonin-Kinase-Aktivität besitzen und den *cph1 response regulator* aus *Synechocystis* phosphorylieren.

Der in den vergangenen Jahren zunehmende und erfolgreiche Einsatz des *yeast two hybrid* Systems schließlich lieferte Hinweise auf eine Reihe verschiedener möglicher direkter Phytochrom-Interaktionspartner. Zunächst wurden Interaktionen der Blaulichtrezeptoren *Cryptochrome 1* und *-2* mit Phytochrom A in *Arabidopsis* (Ahmad *et al.* 1998) beschrieben. Später wurden der *phytochrome interacting factor 3* (PIF3; Ni *et al.* 1998), das *phytochrome kinase substrat 1* (PKS1; Fankhauser *et al.* 1999) und die *nucleoside diphosphate kinase 2* (NDPK2; Choi *et al.* 1999), die an ein oder mehrere Phytochrome bindet, als Interaktionspartner identifiziert.

Pflanzliche Phytochrome zeigen ein rel. Molekulargewicht von *ca.* 125 kDa und bestehen aus einem Polypeptid von *ca.* 1100 AS und einem linearen Tetrapyrrol-Chromophor, Phytochromobilin, der durch eine Thioetherbindung an ein konserviertes Cystein im ersten Protein-Drittel geknüpft ist. Phytochrome kommen *in vivo* und *in vitro* als Homodimere vor (Quail 1997).

Die Synthese des Phytochromchromophors Phytochromobilin startet mit Glutamat oder δ Aminolaevulinat. Es wird in einer mehrschrittigen Reaktion Protoporphyrin IX und daraus mittels Ferrochelatase Häm synthetisiert. Der spezifische Syntheseweg des Phytochromobilins führt nun vermittels Hämoxxygenase zu Biliverdin IXa und schließlich durch die Phytochromobilinsynthase zu Phytochromobilin, welches vom Syntheseort Chloroplast ins Cytosol gelangt und sich autokatalytisch mit Apophytochrom kovalent zum photoreversiblen Holophytochrom verknüpft. Chromophor-defiziente Mutanten sind aus vielen Spezies beschrieben und als Modelle für Phytochrom-defiziente Pflanzen in Hinblick auf verschiedene Aspekte pflanzlicher Entwicklung untersucht und zur eindeutigen Identifizierung von Phytochrom-Effekten genutzt worden. So sind von *Arabidopsis* u.a. die Mutanten *hy1* und *hy2* mit defekter Hämoxxygenase bzw. Phytochromobilinsynthase beschrieben (Parks & Quail 1991), (Kohchi *et al.* 2001), (Muramoto *et al.* 1999), und aus *Ceratodon* sind aphototrope (Klasse-1) Mutanten (*ptr*) untersucht, die, sobald sie auf Biliverdin-haltigem Medium kultiviert werden, wie der Wildtyp Phototropismus zeigen, (Lamparter *et al.* 1997a), (Lamparter *et al.* 1996).

In *Arabidopsis* umfasst die Phytochromgenfamilie fünf Mitglieder: PHYA bis PHYE (Sharrock & Quail 1989). Diese Phytochrome detektieren dieselben Umgebungssignale, nutzen sie aber für unterschiedliche Funktionen (Smith 2000). In Angiospermen haben die Phytochrome im Zuge der Evolution **unterschiedliche** wie auch **überlappende** (Whitelam & Devlin 1997) und auch antagonistische (Smith *et al.* 1997) Funktionen erworben. Die Menge des Phytochrom A, oder Typ 1-Phytochrom, das nur in Angiospermen vorzukommen scheint, wird im Licht sehr ausgeprägt herunterreguliert, sowohl auf transkriptioneller als auch post-translationaler Ebene. Es wird nach Photokonversion von der physiologisch inaktiven, rot-absorbierenden (P_r) zur aktiven, dunkelrot-absorbierenden (P_{fr}) Form proteolytisch degradiert (Vierstra 1994). Der Abbau erfolgt sehr schnell, mit Halbwertszeiten von 30-120 min. (Quail 1994). Die übrigen Typ 2-Phytochrome sind weitgehend unabhängig vom Licht reguliert (Quail 1994). Für *Arabidopsis* als **Modellsystem für höhere Pflanzen** sind Phytochrommutanten der Gene phyA, B, D, E und teilweise Mehrfachmutanten isoliert bzw. durch Kreuzung hergestellt worden. Von phyC ist bislang nur eine Mutante mit einer mindestens 14 kb großen, das phyC einschließenden Deletion beschrieben; eine Überexpression von phyC in dieser Mutante führt hier nicht zu einem *rescue*, so dass Aussagen zur Funktion des phyC durch diese Mutante nur bedingt möglich sind (Whitelam *et al.* 1998).

Phytochrome finden sich vermutlich in allen grünen Pflanzen, einschließlich Gymnospermen, Moosen, Algen und Farnen, daneben in photosynthetisch aktiven Prokaryonten wie *Synechocystis* (Kaneko *et al.* 1996), (Hughes *et al.* 1997) aber auch nicht-photosynthetisch aktiven Prokaryonten, bspw. in *Deinococcus radiodurans* (Davis *et al.* 1999b) oder *Agrobacterium tumefaciens* (Lamparter *et al.* 2002). Ungewöhnliche pflanzliche Phytochrome wurden aus *Ceratodon* (siehe nächsten Abschnitt) sowie aus *Adiantum* beschrieben: das Phytochrom 3 dieses Farns ist für den Phototropismus der Farnprotonemen verantwortlich und besitzt neben seinem Phytochromähnlichen N-Terminus einen C-Terminus, der dem Blaulichtrezeptor NPH1 homolog ist (Nozue *et al.* 1998).

1.1.1 Phytochrome in *Physcomitrella* und *Ceratodon*

In *Ceratodon* wurde ein Gen für ein ungewöhnliches putatives Phytochrom, CP1, identifiziert, das vom N-Terminus bis zum Beginn des zweiten PAS-Moduls homolog zu *normalen* pflanzlichen Phytochromen ist, dessen C-Terminus jedoch starke Homologien zu katalytischen Domänen von Proteinkinasen aufweist. Am ausgeprägtesten sind diese Homologien zu Protein-Tyrosin-Kinasen von *Dictyostelium discoideum* sowie zu den Produkten retroviraler Onkogene, die zur Raf/Mos Serin/Threonin-Kinase-Familie gehören (Thümmler *et al.* 1992). Diese Entdeckung unterstützte die bereits erwähnte These, dass Phytochrome als Proteinkinasen wirksam sein könnten (Schneider-Poetsch 1992). Jedoch wurde kurze Zeit später aus *Physcomitrella* eine klassische Phytochrom-cDNA-Sequenz publiziert (Kolukisaoglu *et al.* 1993) mit sehr großer Homologie zum Phytochromgen aus *Selaginella* (Hanelt *et al.* 1992). Hughes *et al.* (1996) konnten auch aus *Ceratodon* ein normales Phytochromgen isolieren. Auch die Untersuchungen von Lamparter *et al.* (1995) zeigen, dass das dominierende Phytochrom in *Ceratodon* nicht CP1, sondern ein klassisches ist. Die Bedeutung von CP1 ist noch immer ungeklärt; Mittmann (1997) konnte zeigen, dass in *Ceratodon*-Proben aus Nordost- und Südwest-Amerika, Südafrika, der Antarktis, Australien, Japan, von La Palma sowie aus Deutschland die von ihm sequenzierten Abschnitte von CP1 und CP2 in gleich starkem

Maße konserviert waren. Ein zu CP1 homologes Genprodukt wurde in keiner anderen Spezies beschrieben. In *Physcomitrella* wurde bereits die Möglichkeit der Existenz eines weiteren Phytochromgens auf der Basis heterologen *Southern blottings* beschrieben (Pasentsis *et al.* 1998). Aus *Ceratodon* wurde im Laufe dieser Arbeit eine EST-Sequenz veröffentlicht, die hier (4.1.5) zur Klonierung von CP3 genutzt wurde. Gegen Ende dieser Arbeit wurden darüber hinaus EST-Sequenzen bekannt, die den im Rahmen dieser Arbeit vollständig klonierten neuen Phytochromgenen PP2-4 zuzuordnen sind. Darüber hinaus wurden EST-Sequenzen von zwei weiteren, bislang unbekanntem *Physcomitrella*-Phytochromgenen in *GenBank* veröffentlicht.

Phytochromeffekte in *Ceratodon* und *Physcomitrella* umfassen u.a. die Sporenkeimung (Cove 1992), die Regeneration von Protoplasten (Jenkins & Cove 1983a), die Chloroplastenbewegung (Kadota *et al.* 2000), die Ausbildung von Seitenverzweigungen in Protonemen (Kagawa *et al.* 1997), (Ermolayeva *et al.* 1996), Chlorophyll-Akkumulation (Lamparter *et al.* 1997a) sowie Polaro- und Phototropismus (Esch *et al.* 1999), (Hartmann & Pfaffmann 1990), (Hartmann & Weber 1988), (Jenkins & Cove 1983b), (Jenkins & Cove 1983c). Weitere Effekte in niederen Pflanzen sind in (Wada & Kadota 1989) und (Schneider-Poetsch *et al.* 1998) beschrieben.

Phototropismus in *Ceratodon* und *Physcomitrella*

Im Gegensatz zu höheren Pflanzen zeigen die meisten Farn-, Algen- und alle Moos-Protonemen keinen Blaulicht-, sondern einen **Phytochrom**-gesteuerten Phototropismus (Kadota *et al.* 2000). Im Dunkeln wachsen caulonematische Spitzenzellen der Protonemen von *Ceratodon* negativ gravitrop und zeigen nach seitlicher Rotlichtbestrahlung eine positive phototrope Reaktion, die durch dunkelrotes Licht aufgehoben werden kann. UV- und Blau-Licht sind bei dieser Auslösung von Phototropismus nicht wirksam. Es handelt sich also um einen eindeutigen Phytochromeffekt (Hartmann & Weber 1988), (Hartmann *et al.* 1983). Der Phototropismus von *Physcomitrella* wurde von Jenkins & Cove (1983c, 1983b) und Cove *et al.* (1978) untersucht. Hierbei wurden zellspezifisch unterschiedliche Reaktionen bei primären oder sekundären Chloronemata, bei Caulonemata oder Gametophoren festgestellt. Am besten untersucht ist die phototrope Reaktion primärer, unmittelbar zuvor aus keimenden Sporen entwickelter Chloronemata (Jenkins & Cove 1983c), (Jenkins & Cove 1983b). Hier zeigen sich Fluenzraten-abhängige Unterschiede: bei niedrigen Rotlicht-Bestrahlungsstärken zeigen die Spitzenzellen einen positiven Phototropismus, bei höheren Lichtintensitäten wachsen die Zellen quer zur Richtung des einfallenden Lichts. Der Phototropismus von Gametophoren ist unabhängig von der Fluenzrate stets positiv (Cove *et al.* 1978), während Caulonemata (s. Abbildung 12) sich wie primäre Chloronemata verhalten. (Cove *et al.* 1978) fanden bei ihrer Untersuchung des Phototropismus', dass das Verhalten unmittelbar zuvor aus Sporenkeimung hervorgegangener Protonemata unterschiedlich ist zu dem älteren Materials.

1.2 Moose als genetische Modellsysteme

Moose spielen als Modellsysteme für die Pflanzen-Genetik seit Beginn des vorigen Jahrhunderts eine wichtige Rolle. Ein vorzüglicher Abriss der Geschichte der Moos-Genetik findet sich bei Reski (1998). Moose lassen sich einfach unter sterilen Laborbedingungen kultivieren; ein Generationszyklus ist in *ca.* 10-12 Wochen

(*Physcomitrella*) vollendet (Cove 1992). Der morphologische Aufbau ist vergleichsweise einfach; die Entwicklung des Gametophyten kann unterteilt werden in die protonematische Phase, die gekennzeichnet ist von einem verzweigten Netz filamentöser Zellen, die ein eindimensionales Spitzenwachstum zeigen und der Phase des Gametophoren, der ein dreidimensionales Wachstum aufweist. Wenn auch im Rahmen dieser Arbeit die genetischen Werkzeuge im Vordergrund stehen, kann hier dennoch betont werden, dass angesichts der Vielfalt möglicher molekularer Wirkungswege und unmittelbarer Interaktionspartner der verschiedenen Phytochrome (siehe oben) Moos-Systeme einen besonderen Vorteil bieten: die Protonemen stellen mit ihrer phototropen und auch polarotropen Reaktionen ein fast ideales Untersuchungsobjekte gerade in der Lichtphysiologie dar, da sie ermöglichen, innerhalb einer einzelnen Zelle die Erkennung von Richtung und Schwingungsebene des Lichts durch Phytochrom und die Umsetzung dieser Information in differentielles Wachstum zu untersuchen. Zudem handelt es sich hierbei ganz offensichtlich um Reaktionen, die nicht alleine mit der selektiven (In-) Aktivierung von Genen erschöpfend zu erklären ist (Hughes & Hartmann 1998). Demgegenüber erlaubt der Gametophor primär die Untersuchung pflanzlicher Entwicklungsvorgänge, die denen höher Pflanzen analog sind. So wird auch in Moosen die Entwicklung von ähnlichen Stoffen (z.B: Auxin, Abscisinsäure, Giberellin, Cytokinine) und Umwelteinflüssen (wie bspw. Licht unterschiedlicher Qualitäten) gesteuert. Im Lebenszyklus der Moose dominiert der haploide Gametophyt, wodurch Mutagenese und genetische Analysen erleichtert und auch rezessive Mutationen sogleich sichtbar werden (Schaefer 2002).

Physcomitrella patens wurde bereits 1968 zur Mutagenese eingesetzt (Engel 1968) und zur Untersuchung der Entwicklungsvorgänge und ihrer Steuerung; siehe z.B. Cove (1992), Cove *et al.* (1978), Ashton *et al.* (1979). Mit der Genomgröße, die zwischen $3,1 \times 10^8$ bp (Gerhard Brücker, unveröffentlicht) und $4,6 \times 10^8$ bp (Reski 1998) liegt, besitzt *Physcomitrella* ein etwa 2,5-3mal größeres Genom als *Arabidopsis* ($1,25 \times 10^8$ bp; The Arabidopsis Initiative 2000).

Ceratodon purpureus wurde bereits seit einigen Jahrzehnten für die Untersuchung lichtabhängiger Prozesse verwendet (Hartmann & Jenkins 1984), (Hartmann *et al.* 1983); für einen Review-Artikel siehe: (Hughes & Hartmann 1998). *Ceratodon* besitzt 150-170 Mbp im haploiden Genom (Gerhard Brücker, unveröffentlicht), das somit nur etwa halb so groß ist wie das von *Physcomitrella*.

Protonemen von *Physcomitrella* und *Ceratodon* können darüber hinaus leicht protoplastiert und die Protoplasten lichtabhängig wieder zu fertilen Pflanzen regeneriert werden (Grimsley *et al.* 1977), (Cove *et al.* 1996). Für Moose sind verschiedene Transformationssysteme etabliert: Mikroinjektion (Brücker *et al.* 2000), *particle gun* (Sawahel *et al.* 1992) und vor allem die PEG-vermittelte direkte DNA-Aufnahme nach Hitzeschock (Schaefer *et al.* 1991), (Zeidler *et al.* 1999), (Zeidler *et al.* 1996). In *Physcomitrella* sind die in (Croy 1993) beschriebenen Promotor- und Terminator-Sequenzen des 35S-RNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower mosaic virus, CaMV) sowie des Nopalinsynthasegens aus der *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA aktiv (Cove *et al.* 1997). Der (auch in *Ceratodon* aktive) Reis Actin1-Gen-Promotor (McElroy *et al.* 1991) führt ebenfalls zu einer starken, konstitutiven Expression; zudem ist ein Tetracyclin-schaltbares Promotorsystem für *Physcomitrella* beschrieben (Zeidler *et al.* 1996). (Knight *et al.* 1995) haben den Weizen-*Em*-Promotor in *Physcomitrella* untersucht und fanden bereits ohne Induktion und deutlich verstärkt nach einer Induktion mit ABA

oder Mannitol starke Expression eines entsprechenden GUS-Konstrukts. Wenngleich *Arabidopsis* den Vorteil bietet, dass das gesamte Genom sequenziert wurde, existieren für *Physcomitrella* (und *Ceratodon*) zumindest mehrere EST-Datenbanken (University of Leeds (UK) & Washington University, St. Louis, MO sowie BASF (letztere ohne öffentlichen Zugang).

1.3 homologe Rekombination / *gene targeting*

Der klassische Ansatz der *vorwärts gerichteten* Genetik versucht, nach der unspezifischen Erzeugung einer hinreichenden Zahl unterschiedlicher Mutanten und dem Screenen nach interessierenden Phänotypen das betroffene Gen, dessen Zerstörung für den geänderten Phänotyp verantwortlich ist, zu identifizieren. *Reverse* Genetik demgegenüber geht vom interessierenden Gen aus und hat zum Ziel, dessen Funktion durch zielgerichtete Mutagenese zu untersuchen. Der Terminus *gene targeting* bezieht sich auf die zielgerichtete Veränderung einer spezifischen DNA-Sequenz in ihrem genomischen *locus*, die als ein Ergebnis **homologer Rekombination** chromosomaler DNA mit nicht-chromosomalen DNA-Molekülen erfolgt. Rekombination als Austausch genetischer Information ist der Grundmechanismus des *gene targeting*. Im Gegensatz zur illegitimen oder nicht-homologen Rekombination, bei der eine Rekombination von DNA-Molekülen ohne signifikante Sequenz-Homologie stattfindet, interagieren bei der homologen Rekombination DNA-Abschnitte mit großer Sequenz-Übereinstimmung (Bertling 1995). In einer größeren Zahl von Organismen wurde mit unterschiedlichem Erfolg versucht, Gene über homologe Rekombination zu verändern oder auszuschalten. Im Folgenden wird die Situation für *E. coli*, Hefe und Maus sowie pflanzliche Systeme kurz skizziert. Im Rahmen dieser Arbeit meint der Begriff "**knockout**" stets "**targeted gene knockout** **vermittels homologer Rekombination**" und nicht das bloße Identifizieren gewünschter Klone aus einem Pool von Zufalls-Mutanten.

1.3.1 *gene targeting* in Prokaryonten, Hefe und Maus

Mit der zunehmenden Zahl vollständig sequenzierter Genome wächst das Interesse an effektiven *gene knockout* Techniken, mit denen die Untersuchung der Funktion einzelner Gene spezifisch möglich ist: beispielsweise waren 1997, nach der Komplettssequenzierung des *E. coli* Genoms (Blattner *et al.* 1997) noch 58 % der *E. coli* ORFs keiner bekannten Funktion zugeordnet (Link *et al.* 1997). Seit der 1996 vollendeten Sequenzierung des Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* gibt es aber bspw. von 96 % der vorhergesagten Gene *knockout*-Linien, die eine Genanalyse erlauben (Giaever *et al.* 2002). Auch das Genom von *Saccharomyces pombe* ist seit kurzem vollständig sequenziert (Wood *et al.* 2002), so dass sich auch über den Vergleich dieser Genome weitere Untersuchungsmöglichkeiten ergeben.

In den meisten Modell-Systemen, die homologe Rekombination als molekularbiologisches Werkzeug zulassen, finden sich zwei Grundtypen von *gene targeting*-Konstrukten: **Insertions-** und **Replacement-Konstrukte**. Der einfachere Fall ist das **Insertions-Konstrukt**; hier genügt u.U. ein Plasmid, das einen Selektionsmarker trägt, in das zusätzlich ein Teil des Zielgens hineinkloniert wird. Das resultierende Plasmid wird in zirkulärer Form oder im Bereich der Homologie linearisiert zur Transformation eingesetzt. Ein Ereignis homologer Rekombination führt über ein Einzel-*cross over* zu

einer **Integration** des Plasmids, wobei die ursprünglich klonierten Zielgenabschnitte im Genom nun dupliziert vorliegen und damit die Basis für eine erneute **intrachromosomale Rekombination** bieten. Das würde bedeuten, dass die eingebauten Sequenzen wieder verloren gingen. Im Falle der Hefe wird deswegen durch permanenten Selektionsdruck in den identifizierten positiven Linien sichergestellt, dass der Selektionsmarker nicht aus dem Zielgen wieder herausgeschnitten wird.

Der zweite Grundtyp ist der der **Replacement-Konstrukte** und besteht im einfachsten Fall aus einer Marker-Cassette, die von Abschnitten des Zielgens flankiert wird. Ein Doppel-*cross over* zwischen den entsprechenden Genabschnitten und den homologen Bereichen auf dem *knockout*-Konstrukt führt zu einem **Austausch** der im Wildtyp-Chromosom zwischen diesen zwei Abschnitten liegenden DNA mit der Marker-Cassette. Für Hefe wurde ein frühes System von Rothstein (1983) entwickelt. Sehr einfach wird dieser Ansatz, wenn das Anfügen der zum Zielgen homologen Abschnitte an die Marker-Cassette nicht durch eine Klonierung, sondern direkt via PCR erfolgen kann, wenn also die zur Transformation verwendete DNA mittels PCR hergestellt wird, indem eine Resistenz-Cassette mit Hilfe von Primern, die Zielgen-homologe *header* besitzen, amplifiziert wird. So reichen in *E. coli* bei der Einschnitt-Methode von Datsenko & Wanner (2000), die auf dem λ *Red*-Rekombinase-System (Murphy 1998) basiert, 36 nt Homologie zu Randbereichen des auszuschaltenden Gens und auch bei dem ähnlichen System von Baudin *et al.* (1993), mit dem sehr effizient spezifische DNA-Abschnitte vom Hefegenom deletiert werden können, homologe Bereiche von je 30-40 nt. Vorteile dieses Ansatzes liegen in der Tatsache, dass (1) mangels Duplikation von Gensequenzen keine Rückreaktion, also kein Herausschneiden des Konstrukts und Wieder-Herstellen des Wildtyp-*locus* möglich ist. (2) Auf diesem Wege lassen sich größere Chromosomenabschnitte – bei der Maus bis zu cM – deletieren, also eine größere Zahl von Genen gleichzeitig ausschalten (Ramirez-Solis *et al.* 1995), (Hasty *et al.* 1991), (Mombaerts *et al.* 1991). (3) Verschiedene Systeme erlauben zudem anschließend die Entfernung der Marker-Cassette. Dies verhindert wirkungsvoll ungewünschte Effekte durch einen eingefügten Resistenz-Cassetten-Promotor und erlaubt damit auch, innerhalb eines Operons gelegene Gene auszuschalten, ohne die Expression der downstream gelegenen Gene zu beeinflussen.

1.3.2 homologe Rekombination / *gene targeting* in Pflanzen

Im Bereich der Pflanzen sind bereits das vollständige Genom von *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Initiative 2000) und das von *Oryza sativa* (ssp. *japonica* sowie *indica*) (Goff *et al.* 2002), (Yu *et al.* 2002) sequenziert, so dass auch hier großes Interesse an effizientem *gene targeting* existiert. Im extremen Gegensatz zu den vorgenannten Modellen hat es in den vergangenen Jahrzehnten jedoch keinen vergleichbaren Erfolg bei den Versuchen gegeben, die homologe Rekombination als molekularbiologisches Werkzeug für eine reverse Genetik in pflanzlichen Systemen zu etablieren - mit der unter 1.4 beschriebenen Ausnahme. Während bei Hefe eine Transformation mit DNA, die keine Sequenzhomologie zeigt, sehr schwierig ist, dafür aber DNA *mit* Sequenzhomologie fast ausschließlich mit den homologen Abschnitten auf dem Chromosom rekombiniert, beeinflusst in Pflanzen i. A. eine Sequenzhomologie nicht die Transformationseffizienz. Das heisst, auch wenn homologe Abschnitte existieren, erfolgt in den weitaus seltensten Fällen ein Einbau der Fremd-DNA ins Genom am Ort dieser Homologie, sondern ungerichtet und zufällig durch illegitime Rekombination (Puchta 2002). Aus diesem

Gründe sind Versuche zur Gen-Funktionsanalyse auf die vergleichsweise äußerst ineffizienten Methoden der *random mutagenesis*, der zufälligen Mutagenese bspw. mittels T-DNA-Insertion oder Transposon-Aktivierung und anschließender Suche nach den gewünschten Linien angewiesen. Verschiedene Wege wurden daher beschrrieben, um die molekularen Voraussetzungen des *gene targeting* in Pflanzen besser zu verstehen und die möglichen Techniken zu optimieren.

1.3.2.1 extra- und intrachromosomale HR in Pflanzen

Der experimentell einfachste Weg, homologe Rekombination zu untersuchen, besteht darin, Pflanzenzellen mit zwei getrennten Plasmiden mit überlappenden, jeweils für sich nicht funktionalen Teilen **eines** Markergens zu transformieren. Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass diese zwei extrachromosomalen Moleküle mit hoher Effizienz rekombinieren und dabei ein funktionales Markergen bilden können (Puchta & Hohn 1996) und Literaturquellen in dieser Veröffentlichung). Die **extrachromosomale homologe Rekombination** erfolgt dabei in einer kurzen Zeitspanne nach der Transformation (Puchta *et al.* 1992).

Werden für die Untersuchung der homologen Rekombination Pflanzen eingesetzt, die an zwei benachbarten aber getrennten Orten ihres Genoms unterschiedliche nicht-funktionale Markergene enthalten, die durch HR eine funktionale Variante bilden können, ergeben sich um einige Größenordnungen niedrigere Raten von HR (Peterhans *et al.* 1990). Angesichts der Genomstabilität in Pflanzen mit vielfach großen Anteilen von repetitiver DNA ist diese Feststellung nicht verwunderlich (Puchta & Hohn 1996). Die Häufigkeit der **intrachromosomalen Rekombination** ist gering, jedoch kann dieses System dazu dienen, den Einfluss von chemischen oder physikalischen Faktoren auf die Frequenz der HR zu untersuchen. So konnten bspw. für ionisierende Strahlung (de Groot *et al.* 1992), UV-Strahlung (Puchta *et al.* 1995) oder das Mutagen Mitomycin C (Shulman *et al.* 1995) stimulierende Effekte nachgewiesen werden – die HR scheint also mit den Enzymen der DNA-Reparatur eng verknüpft. Puchta (1999) konnte zeigen, dass auch ein zielgerichtetes Linearisieren im Bereich der Homologie, also das Einfügen eines Doppelstrangbruchs in eine von zwei defekten Kopien eines Markergens durch transiente Expression des Gens für das I-SceI-Restriktionsenzym, homologe Rekombination zwischen diesen zwei *loci* und damit die Herstellung eines funktionalen Markers provoziert.

1.3.2.2 *gene targeting* in Pflanzen

Bereits 1988 wurde ein erster erfolgreicher Versuch von *gene targeting* in *Nicotiana tabacum* beschrieben, bei dem Protoplasten, die eine stabil integrierte Kopie eines nicht-funktionalen Antibiotika-Resistenzgens besaßen, transformiert wurden mit einem alleine ebenfalls nicht funktionalen Reparaturkonstrukt für dieses Resistenzgen. Tatsächlich wurden in drei Experimenten acht unabhängige Klone isoliert, deren Kanamycinresistenz als Ergebnis von homologer Rekombination belegt werden konnte (Paszkowski *et al.* 1988). Weitere *gene targeting* Ereignisse in anderen Spezies und auf andere Gene zielend wurden kurz danach beschrieben, z. B. von Lee *et al.* (1990), Offringa *et al.* (1990), Halfter *et al.* (1992); Hallmann *et al.* (1997). Hanin *et al.* (2001) haben zwecks Optimierung des *gene targeting* in *Arabidopsis* das Gen für die Protoporphyrinogenoxidase (PPO) ausgewählt, da hier nur mehrere Punktmutationen **zusammen** (spontane Einzel-Mutationen sind wirkungslos) zu einer Resistenz gegen verschiedene Herbizide –

wie Butafenacil – führen (Duke *et al.* 1991), die normalerweise das Enzym vollständig blockieren. Die Rate der Linien, die *gene targeting* repräsentieren, lag hier bei *ca.* 1 pro 1500 transgener Linien.

Bei den genannten Ansätzen war die erfolgte homologe Rekombination stets **unmittelbar screenbar**, während das eigentliche Ziel des *gene targeting* die Inaktivierung oder Modifikation von Wildtyp-Genen zwecks Untersuchung ihrer Funktion und Bedeutung ist. Ist jedoch der zu erwartende Phänotyp nach einem *knockout* nicht bekannt oder nur sehr aufwändig screenbar, stellt sich das Problem, dass die Herbizid- oder Antibiotikaresistenz eines von einem Resistenzmarker unterbrochenen Gens nicht von einem illegitim rekombinierten *knockout*-Konstrukt unterscheidbar ist. Einen großen Fortschritt bedeuteten daher die Arbeiten von Kempin *et al.* (1997) und Miao & Lam (1995), die zeigten, dass grundsätzlich auch ein nicht unmittelbarer screenbarer *knockout* eines endogenen Gens in *Arabidopsis* mit hinreichend hoher Effizienz durchführbar und vor dem Hintergrund der illegitimen Rekombinationsereignisse auffindbar ist.

1.3.2.3 Versuche zur Steigerung der Frequenz von HR und speziell des *gene targeting* in Pflanzen

Versuche zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus zeigten eine exponentielle Korrelation zwischen der *gene targeting*-Frequenz und der Länge der Homologie zwischen genomischer DNA und dem *knockout*-Konstrukt (Fujitani *et al.* 1995), (Deng & Capecchi 1992), (Fujitani *et al.* 1995). Bei Untersuchungen mit Pflanzen ergab sich dasselbe Bild (Ohl *et al.* 1994), jedoch betrug die Homologie meist nur zwischen 0,3 und 3,5 kb. Ein naheliegender Ansatz war daher, die Länge der Homologie drastisch zu steigern. Ein zweiter von Thykjaer *et al.* (1997) in Kombination damit verfolgter Ansatz war, durch kombinierte positive/negative Selektion diejenigen stabilen Transformanten, die durch illegitime Rekombination entstanden sind, zu eliminieren.

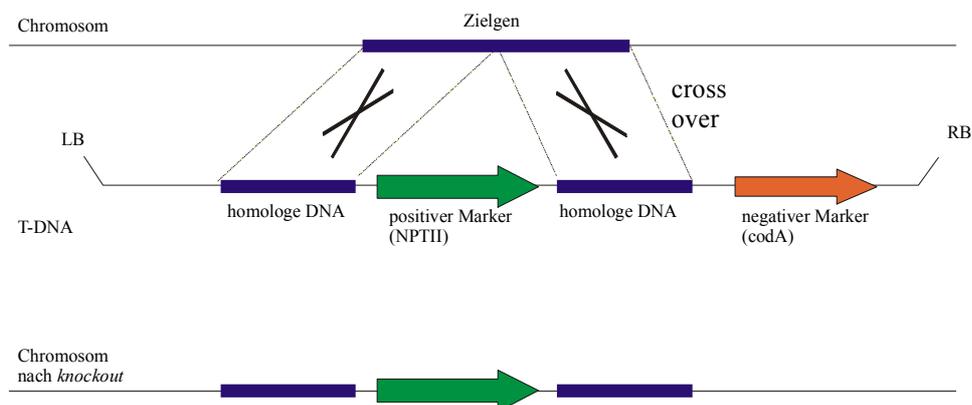


Abbildung 1. Schema der positiven/negativen Selektion

Hierzu wurde in einen binären Vektor zwischen die linke und rechte Border-Sequenzen ein von einem positiven Marker unterbrochenes genomisches DNA-Stück und seitlich davon ein negativer Marker kloniert. Im Falle eines erwarteten *gene targeting* sollte ein Doppel-*cross over* das Zielgen durch Einfügen des positiven Markers zerstören und den negativen Marker freisetzen, der – zumindest in einem Teil der Fälle – nicht illegitim rekombinieren, sondern verloren gehen sollte (siehe Abbildung 1). Stougaard und Mitarbeiter haben in *Lotus japonicus* beim Versuch, zwei nicht-selektierbare *single copy*

Gene zu zerstören, bis zu knapp 23 kb große flankierende gDNA-Sequenzen und eine NPTII-Cassette als positiven Marker verwendet. Als negativer Marker wurde das *codA*-Gen aus *E. coli*, das die Cytosin Deaminase codiert, eingesetzt (Kobayashi *et al.* 1995), (Stougaard 1993). Die Ergebnisse dieses ebenso eleganten wie aufwändigen Ansatzes waren jedoch ernüchternd: es wurden zwar 158 von *ca.* 20.000 Kalli nach negativer **und** positiver Selektion isoliert, jedoch ließ sich **kein einziges gene targeting** Ereignis nachweisen. Zudem war die DNA des negativen Selektionsmarkers in den genauer untersuchten Fällen keineswegs - wie erwartet - verloren worden, sondern *gene silencing* des *codA*-Gens der vermutliche Grund für das Überleben der Kalli bei der negativen Selektion.

1.3.2.4 *gene targeting* mittels chimerischer Oligonukleotide

Eine alternative Strategie für reverse Genetik stellt die *chimeric oligonucleotide dependent mismatch repair, cdMMR* dar. Mit ihrer Hilfe konnten in verschiedenen Säugetiergenen zielgerichtet Punktmutationen eingeführt werden; siehe z.B.: (Cole-Strauss *et al.* 1996), (Yoon *et al.* 1996). Chimerische Oligonukleotide bestehen aus DNA- und RNA-Abschnitten mit komplementärer Konfiguration (Hohn & Puchta 1999). Beetham *et al.* (1999) und Zhu *et al.* (1999) konnten parallel demonstrieren, dass der Einsatz von chimerischen Oligonukleotiden auch in Mais bzw. Tabak zur Einführung von Punktmutationen erfolversprechend ist. Jedoch zeigte sich, dass in **keiner** der so transformierten und genauer untersuchten Tabak-Linien tatsächlich die **gewünschte** Mutation eingeführt wurde. Im Falle der mutierten Mais-Linien entsprach nur ein kleiner Teil der untersuchten Sequenzen den Zielvorgaben, während wie beim Tabak die meisten Linien in benachbarten Nukleotidpositionen oder zwar an der richtigen Position aber in falscher Weise mutiert waren. Die gewünschte "Gene Therapy in Plants" (Hohn & Puchta 1999) ist offenbar auf diesem Wege noch lange keine Realität.

1.4 *gene targeting* in *Physcomitrella*

Die erste Beschreibung einer stabilen Transformation von *Physcomitrella* wurde von (Schaefer *et al.* 1991) veröffentlicht. Angelehnt an die Methode zum direkten DNA-Transfer von (Saul *et al.* 1988) wurden Protoplasten transformiert. In Schaefer *et al.* (1994), Schaefer (1994) und Zeidler *et al.* (1996) wurden die Transformation weiter verbessert und Optima für die Hitzeschockdauer und -Temperatur, für den Zeitraum, den die Protoplasten in PEG verbringen sollten, die Mannitolkonzentration sowie die Konzentration der Transformations-DNA bestimmt.

homologe Rekombination

Von Schaefer (1994), Schaefer *et al.* (1994) und - später - von Kammerer & Cove (1996) wurden Ergebnisse von Transformationen beschrieben, bei denen stabil transformierte *Physcomitrella*-Linien mit anderen Plasmiden re-transformiert wurden. Hierbei zeigte sich eine deutliche Steigerung der Transformationseffizienz und eine Lokalisation der neu eingebrachten DNA an genau den Genomabschnitten, die bereits die erste Fremd-DNA aufgenommen hatte. Da die Transformations-DNAs über ihr jeweiliges Vektor-Rückgrat untereinander größere Abschnitte von Sequenzidentität aufwiesen, wurde hier erstmals die Möglichkeit diskutiert, dass die Steigerung der Effizienz bei den Re-Transformationen das Resultat homologer Rekombination und damit *Physcomitrella* ein geeignetes System

für die Etablierung von *gene targeting* sein könnte. Schaefer & Zryd (1997) demonstrierten dann tatsächlich sehr effizientes *gene targeting* in *Physcomitrella*, indem sie drei genomische *single-copy* Sequenzen von 2,3 bis 3,6 kb jeweils in ein Plasmid mit eukaryotischer Hygromycin- oder G418-Resistenz-Cassette (Abbildung 5) klonierten und mit diesen drei Konstrukten Protoplasten transformierten. Tatsächlich ließ sich in den meisten Hygromycin- oder G418-resistenten stabilen Transformanten die erwartete Insertionsmutagenese über *Southern blotting* nachweisen.

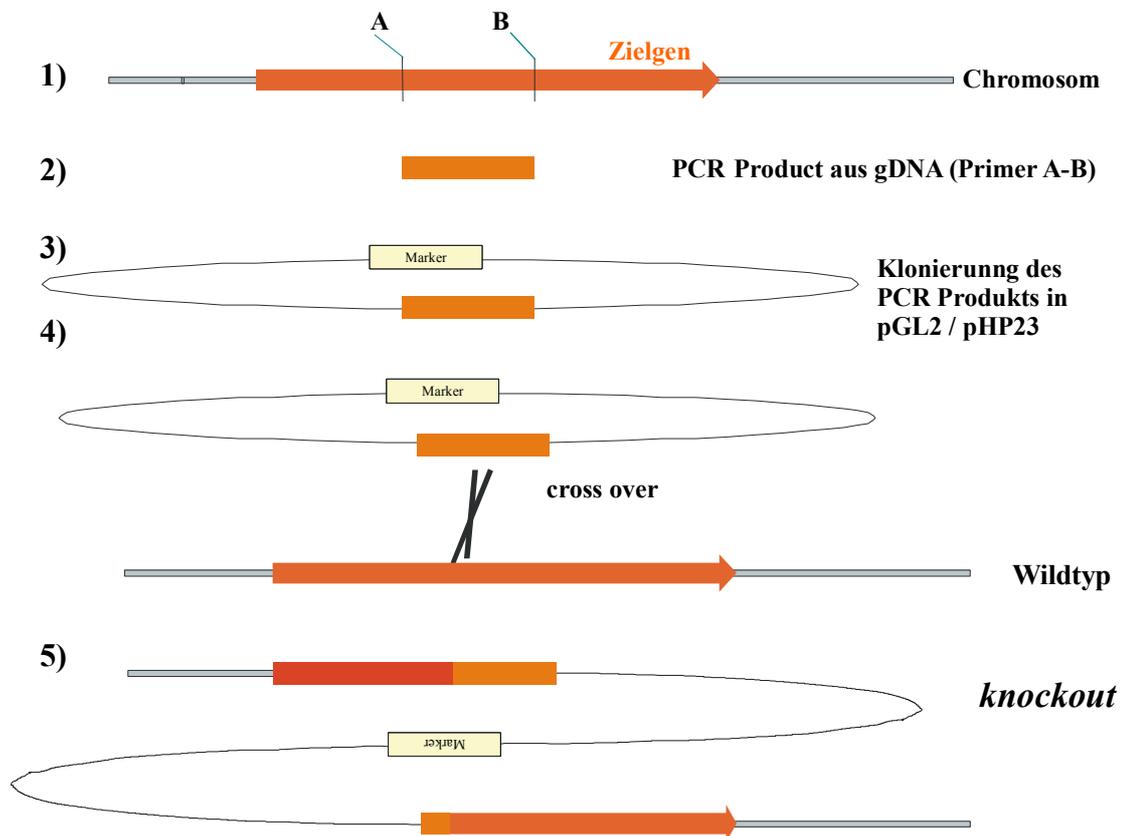


Abbildung 2. Herstellung eines Insertions-*knockout*-Konstrukts nach Schaefer & Zryd (1997) und vereinfachte Darstellung des homologem Rekombinationsereignisses

Mit den Plasmiden mit homologen Abschnitten wurden Transformationseffizienzen erhalten, die um eine Größenordnung über der mit dem Kontroll-Plasmid ohne Homologie lag. Das legte eine Rate von homologer Rekombination von 90 % nahe – und in der Tat wurde dieser Wert auch bei der Analyse der Transformanten mittels *Southern blotting* bestätigt. Es ergibt sich also ein Bild, das dem in Hefe ähnlich ist – mit dem Unterschied, dass die stabile Transformation sehr viel besser funktioniert als in Hefe, sofern **keine homologen** DNA-Abschnitte in das Konstrukt integriert sind (Ausubel *et al.* 1988). In der Folgezeit wurden diverse Genfunktionen in *Physcomitrella* mittels Insertionsmutagenese über homologe Rekombination untersucht. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Typen von *knockout*-Konstrukten verwendet – ähnlich den Konstrukten, die auch in *E. coli*, Hefe und Maus verwendet werden (1.3.1). Zum einen **Insertions-Konstrukte**, Plasmide, in die neben eine eukaryontische Antibiotika- oder Herbizid-Resistenz-Cassette ein cDNA- oder gDNA-Abschnitt aus *Physcomitrella* kloniert wurde. Abbildung 2 zeigt schematisch die Herstellung eines solchen Konstrukts und den hypothetischen Ablauf der homologen Rekombination durch ein *cross-over*-Ereignis (die

Möglichkeiten des Screenings über PCR sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 gezeigt). Schaefer & Zryd (1997) betonten jedoch bereits, dass in aller Regel nicht nur eine einzige Kopie des Konstrukts am Ziel-locus zu finden ist, sondern Concatemere der *knockout*-Konstrukte gebildet und diese durch homologe Rekombination eingebaut werden. Die Abbildungen in dieser Arbeit geben die Situation insofern vereinfacht wieder, als der Übersichtlichkeit wegen nur eine *single copy* Insertion gezeigt ist.

Der Vorteil dieser Konstrukte liegt darin, dass keinerlei Sequenzinformation über den auszuschaltenden *locus* erforderlich ist. Es genügt, ein PCR-Produkt oder ein auf anderem Wege erhaltenes lineares DNA-Stück in einen geeigneten Vektor zu klonieren und mit dem resultierenden Plasmid *Physcomitrella* Protoplasten zu transformieren. Nachteilig könnte die Möglichkeit einer erneuten, intrachromosomalen Rekombination sein, bei der, wie bei der Hefe in 1.3.1 als üblicher Fall beschrieben, wegen der Sequenzdupplung das Konstrukt wieder verloren gehen könnte. Jedoch sind in *Physcomitrella* derartige Fälle nicht berichtet worden.

Den zweiten grundsätzlichen Typ stellt das **Replacement-Konstrukt** dar. Das Schema dieses Typs und der Nachweis des *knockouts* vermittels PCR und *Southern blotting* ist in Abbildung 3 beschrieben.

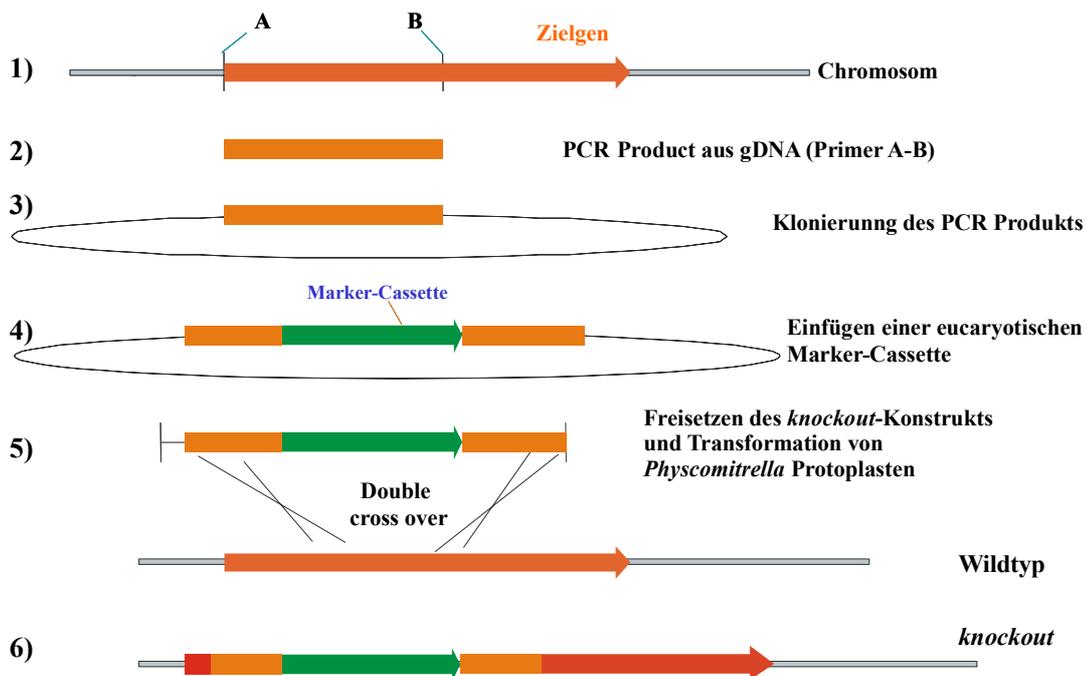


Abbildung 3. Schema der Herstellung von und Transformation mit *replacement knockout*-Konstrukten

Hierbei ist ein gewisses Maß an Sequenzinformation, mindestens die Kenntnis einiger geeigneter Restriktionsschnittstellen notwendig. Der Klonierungsaufwand ist größer, da zunächst der Zielgen-Abschnitt und dann in seine Mitte die Resistenz-Cassette (oder vor bzw. hinter eine Resistenz-Cassette jeweils unterschiedliche Gen-Abschnitte) kloniert und die fertigen *knockout*-Konstrukte durch Verdauung mit 1-2 Restriktionsenzymen vor der Transformation der *Physcomitrella*-Protoplasten verdaut und anschließend gereinigt werden müssen.

Girke *et al.* (1998) veröffentlichten das erste Beispiel für tatsächliches *gene targeting*, insofern hier ein reales Gen zerstört und ein Phänotyp nachgewiesen wurde. $\Delta 6$ -Desaturasen werden bei der Synthese längerkettiger, ungesättigter Fettsäuren benötigt; *Physcomitrella* enthält bis zu 30 % Arachidonsäure (Grimsley *et al.* 1981). Girke *et al.* haben als erste ein *replacement*-Konstrukt für den *knockout* eingesetzt mit einer NPTII-Resistenz-Cassette, die flankiert war von je etwa 1 kb des Zielgens. Von 5 stabil transformierten, G418-resistenten Linien erwiesen sich vier als korrekte Produkte eines *gene targeting*. Die geänderte Fettsäurezusammensetzung ließ sich eindrucksvoll belegen.

Strepp *et al.* (1998) haben ein kernkodiertes Gen, das für die Chloroplastenteilung essentiell ist (*ftsZ1*-Gen) durch Insertionsmutagenese zerstört und als deutlichen Phänotyp Zellen mit nur einem einzigen, fast die gesamte Zelle ausfüllenden Makro-Chloroplasten erhalten. Der *knockout* wurde mit einem *replacement* Konstrukt durchgeführt, das eine NPTII-Cassette, flankiert von *ca.* 250 bzw. 650 bp der entsprechenden cDNA enthielt. 7 von 15 stabilen Transformanten erwiesen sich als Produkt von planmäßigem *gene targeting*.

Hofmann *et al.* (1999) konnten gezielt den *knockout* eines von 14 CAB-Genen, die weniger als 10 % Sequenzabweichungen zeigen, unter Verwendung eines Insertions-*knockout*-Konstruktes durchführen. Das Verhältnis homologer zu illegitimer Rekombination betrug 3 : 6 (jeweils stabil-Hygromycin-resistente Klone).

Fu *et al.* (1999), und Girod *et al.* (1999) haben die MCB1 (PRN10) Untereinheit des 26S Proteasoms, der wichtigsten Protease im Ubiquitin-vermittelten proteolytischen System in Eukaryonten, durch *knockout* des entsprechenden *single copy* Gens mit *replacement* Konstrukten, die durch PCR hergestellt wurden, untersucht. Von 55 Hygromycin-resistenten Klonen zeigten zwei eine Zerstörung des Gens durch *gene targeting* via homologer Rekombination. Die resultierenden Linien bilden ungewöhnliche Caulonemata und sind unfähig, Knospen und Gametophoren zu bilden.

Imaizumi *et al.* (2002) haben zwei Cryptochrom-Gene untersucht und Einzel- und Doppel-*knockout*-Linien hergestellt. Die Autoren haben *ca.* 4 kb jeder gDNA in einen TA-Vektor kloniert und in eine etwa mittig gelegene Schnittstelle die Resistenz-Cassetten kloniert. Vor der Transformation wurden die Inserts und Vektorreste durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen getrennt. Die Autoren treffen keine Aussagen zur Effizienz des *gene targeting*.

Meiri *et al.* (2002) haben drei Protein-Disulfid-Isomerase-Gene aus *Physcomitrella* isoliert, die sich durch schwache, mittlere und starke Expression auszeichnen. Ein *knockout* ist in keinem der drei Fälle mit einem deutlichen Phänotyp verknüpft. Die Vervielfältigung der *knockout*-DNA erfolgte über PCR. Die Konstrukte enthielten jeweils links und rechts einer G418-Resistenz-Cassette etwa 400-500 bp der kodierenden Sequenz. Die Autoren treffen keine Aussage zur Zahl der potentiellen *knockout*-Linien pro Ansatz. Zwei der drei näher untersuchten Linien enthielten das NPTII-Transgen als *single copy* Gen.

Koprivova *et al.* (2002) haben ein Adenosin 5'-Phosphosulphatreduktase-Gen, ein Schlüsselenzym der Sulphat-Assimilation durch *gene targeting* zerstört. Hierzu wurde ein *ca.* 2 kb großes Stück des Gens kloniert, ein 361 bp großer zentraler Teil gegen eine G418-Resistenz-Cassette getauscht und mit dem resultierenden Plasmid transformiert.

Rund 40 % der G418-resistenten Linien zeigten die für *gene knockout* erwarteten PCR-Banden. Für *Southern blotting* Analysen wurden jene 361 bp als Sonde eingesetzt, die bei der Konstruktherstellung herausgeschnitten wurden. Das Fehlen eines entsprechenden Signals dient als Beleg für *gene targeting* via homologer Rekombination, jedoch wurde keine Hybridisierung mit einer neutralen Sonde als positiv-Kontrolle gezeigt.

Zank *et al.* (2002) haben ein Gen für eine Komponente der $\Delta 6$ -Elongase durch *gene targeting* ausgeschaltet, nennen jedoch hierzu keinerlei molekularbiologische Details.

Schaefer (2001) führt in seinem Review-Artikel den *knockout* eines *Ppapt*-Gens an (Schaefer, Laloue *et al.*, nicht veröffentlicht); Die Inaktivierung des *P. patens* Adenin-Phosphoribosyl-Transferasegens ist durch die damit verbundene Resistenz gegenüber dem Adenin-Analogen 2,6-diaminopurin direkt screenbar. Das erlaubte mit Hilfe eines cDNA-basierten Replacement-Vektors die untere Grenze der notwendigen Homologie zu ermitteln: wengleich mit geringer Effizienz waren noch bei 51 bp Sequenzidentität *knockouts* herstellbar.

1.5 *gene substitution*

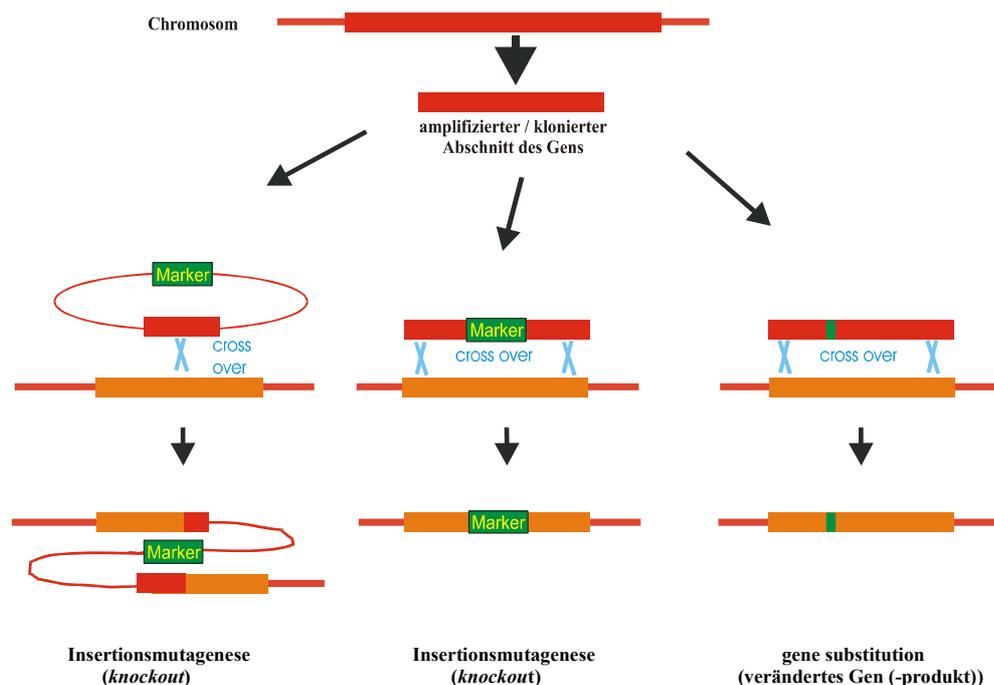


Abbildung 4. Schematischer Vergleich von *targeted gene disruption* und *gene substitution* (Original-Abb. von Jon Hughes, verändert)

Die bis zu 90 % reichende Effizienz des *gene targeting* sollte es prinzipiell ermöglichen, nicht nur *gene knockout*-Linien herzustellen, sondern auch subtile Modifikationen in die Zielgene einzubringen. Abbildung 4 zeigt neben den zwei Möglichkeiten, durch Insertions- bzw. *replacement knockout*-Konstrukte Gene zu zerstören, einen Ansatz, ein Zielgen punktuell zu modifizieren. Sinnvoll wäre eine Co-Transformation eines Resistenzmarkers mit dem getrennten Molekül des *gene substitution* Konstrukts. Werden stabil transformierte, Antibiotika-resistente Linien weiter untersucht, kann man davon ausgehen, dass sie auch die *gene substitution*-DNA aufgenommen haben. Auch wenn nur

einzelne Codons modifiziert werden, kann sehr leicht (als *silent mutation*) eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingefügt werden. Positive Linien lassen sich nach einer überlappenden PCR und einem Verdau der PCR-Produkte einfach identifizieren.

Entsprechende Ansätze sind bspw. in Hefe Standard (*Transplacement*-Vektoren; siehe 1.3.1), jedoch in *Physcomitrella patens* noch nicht verwirklicht worden.

1.6 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten in *Physcomitrella patens* die Phytochromgenfamilie vervollständigt und für jedes Mitglied *knockout*-Linien hergestellt werden, um eine Untersuchung zu ermöglichen, welche Bedeutung die jeweiligen Gene für den Phototropismus der caulonematischen Spitzenzelle im Rotlicht haben. Für das erste Phytochromgen aus *Physcomitrella*, PpPhy1 sollte untersucht werden, ob die Effizienz der homologen Rekombination auch eine hinreichende Voraussetzung für die *in vivo* Modifikation ausgewählter Codons via *gene substitution* ist. Dies wäre eine vorzügliche Basis, um die Bedeutung individueller Aminosäuren der Phytochrome zu klären.

Da für Untersuchungen zur molekularen Basis des Phototropismus das Moos *Ceratodon purpureus* deutlich geeigneter ist, da zum einen die Physiologie der Phytochromeffekte sehr gut untersucht ist (Hughes & Hartmann 1998) und zum anderen die Handhabung der entsprechenden Protonemen sehr viel einfacher ist, da sie im Dunkeln problemloser ein negativ-gravitropes Wachstum und einen leichter messbaren Phototropismus zeigen, sollte parallel in Kooperation mit Gerhard Brücker in *Ceratodon* erprobt werden, ob auch in diesem Moos *gene targeting* als molekularbiologisches Werkzeug einsetzbar ist.

Die Synthese des Phytochrom-Chromophors Phytochromobilin erfordert die enzymatische Umsetzung von Häm zu Billiverdin durch die Hämoxygenase. Neben einer größeren Zahl weiterer *Ceratodon*-Klasse-1-Phototropismus-Mutanten konnte für die Mutanten ptr116 (Lamparter *et al.* 1997a) und ptrP14 (Esch 1998) durch Fütterungsversuche gezeigt werden, dass in ihnen genau dieser enzymatische Schritt gestört ist. In den Moosen *Ceratodon* und *Physcomitrella* sollte daher nach entsprechenden Genen gesucht werden, da ihre Zerstörung einen leicht-screenbaren Phänotyp erzeugt (Lamparter *et al.* 1996), der eine gute Basis darstellen würde, in *Ceratodon* ein *gene targeting* System zu etablieren. In den genannten Mutanten sollte die molekulare Basis der Mutation geklärt werden, um sicherzugehen, das richtige Gen für *gene targeting* Versuche in *Ceratodon* zu nutzen.