

Pflanzenbiotechnologie

Hochdurchsatzanalysen im Laubmoos *Physcomitrella patens*

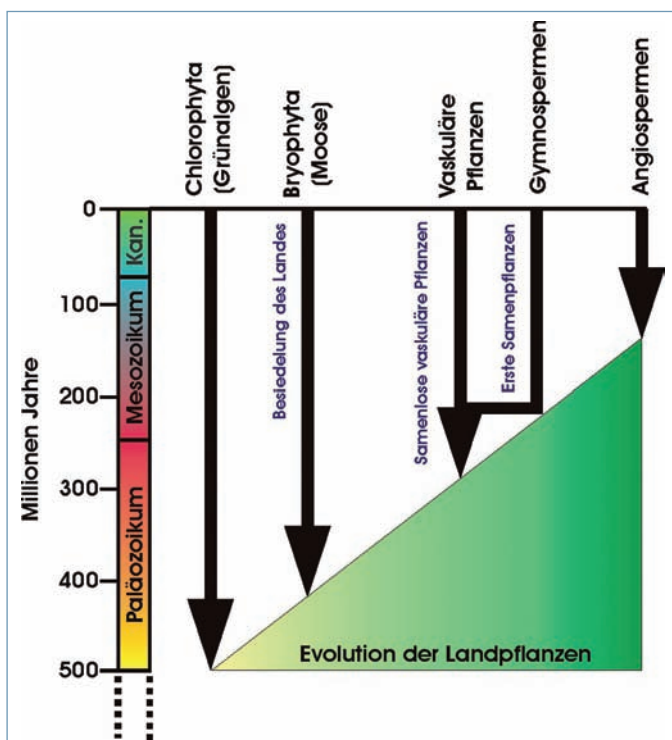
WOLFGANG FRANK UND RALF RESKI

LEHRSTUHL PFLANZENBIOTECHNOLOGIE, FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE,
ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG

Moose nehmen eine phylogenetische Schlüsselposition in der Entwicklung von Pflanzen ein. Die Entschlüsselung ihres Genoms und Proteoms kann für biotechnische Anwendungen genutzt werden.

■ Moose (Bryophyta) zählen zu den ersten Pflanzen, die den Übergang vom Leben im Wasser an ein Leben an Land vollzogen haben. Dieser drastische Schritt erforderte eine gezielte Anpassung an den neuen Lebensraum, verbunden mit der Entwicklung neuer molekularer Mechanismen und der Entstehung neuer Gene. Das Laubmoos *Physcomitrella* hat sich wegen spezifischer Merkmale als pflanzliches Modellsystem etabliert. Hierzu zählen der im Vergleich zu Samenpflanzen einfachere Bauplan aus nur wenigen verschiedenen Zelltypen^[1] und die Möglichkeit, Gene der genomischen DNA durch

homologe Rekombination gezielt zu deletieren^[2]. Viele Arbeitsgruppen nutzten die Methode – die bislang bei keiner anderen Pflanze einsetzbar ist –, um Knockout-Linien für die funktionelle Analyse ausgewählter Gene zu erhalten. Die funktionelle Analyse von Genen in *Physcomitrella* wird dadurch begünstigt, dass Moose einen heteromorphen, heterophasischen Generationswechsel durchlaufen, bei dem der haploide Gametophyt die vorherrschende Generation bildet. Die Funktion eines zerstörten Gens wird daher nicht durch die Wirkung des korrespondierenden Allels kompensiert.



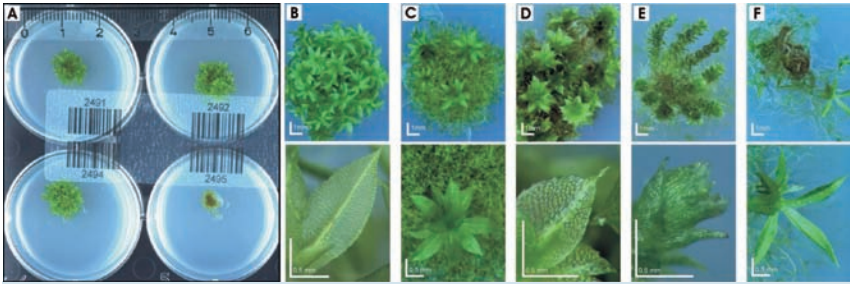
◀ Die Evolution der Landpflanzen: Vor etwa 450 Millionen Jahren (MJa) spalteten sich die Bryophyten von den Samenpflanzen ab. Paläozoikum: 542–251 MJa; Mesozoikum: 251–65,5 MJa; Känozoikum (Kan.): 65,5 MJa bis heute.

Genom- und Proteomanalyse von *Physcomitrella*

Für die molekulare Analyse von *Physcomitrella* stehen umfangreiche EST-Datenbanken zur Verfügung^[3]. Außerdem wurde die Sequenzierung des *Physcomitrella*-Genoms im Jahr 2006 abgeschlossen und eine erste Version des assemblierten Genoms veröffentlicht (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html). Anhand der EST-Daten wird auf eine Anzahl von annähernd 30.000 Genen geschlossen. Rund 6.000 Gene können bislang nicht annotiert werden. Die Verfügbarkeit des *Physcomitrella*-Genoms wird eine vergleichende Analyse mit den Genomen der Samenpflanzen *Arabidopsis thaliana*, Reis und Pappel ermöglichen und damit zum Verständnis der Diversität von Pflanzen beitragen.

Die Firma MoGene vertreibt einen Oligonukleotid-basierten Mikroarray mit 20.000 Proben, der auf öffentlich verfügbaren EST-Daten basiert (www.mogene.com). Wir haben zudem einen Mikroarray entwickelt, der sämtliche Gene für Transkriptionsfaktoren und Transkriptions-assoziierte Gene abdeckt. Die Partner des Konsortiums der Genomsequenzierung planen die Herstellung eines Gesamt-Genom-Arrays.

Die entschlüsselte *Physcomitrella*-Genomsequenz erlaubt die schnelle Identifizierung von Proteinen durch einen Datenbankabgleich ermittelter Peptidsequenzen. Da sich *Physcomitrella* unter standardisierten und skalierbaren Kulturbedingungen, zum Beispiel in Bioreaktoren, kultivieren lässt, ist die Anzucht von Pflanzenmaterial für proteomische Untersuchungen kein Problem. Protokolle für die Auftrennung von Proteinen, zum Beispiel aus verschiedenen Zellorganellen, gibt es ebenso wie etablierte Methoden für die Untersuchung von Signaltransduktionswegen, um Phosphorylierungskaskaden infolge spezifischer Stimuli aufzuklären. Die Anreicherung und Identifizierung phosphorylierter Proteine beruht hierbei auf der Kombination von Revers-Phasen-Chromatographie, Fe³⁺-Metall-Affinitätschromatographie,



▲ *Physcomitrella*-Mutanten. **A:** Auxotrophe Mutanten; vier transgene *Physcomitrella*-Linien wurden auf Minimalmedium angezogen. Eine Mutante (unten rechts) zeigt deutlich retardiertes Wachstum. Diese Mutante wächst normal auf Vollmedium (nicht gezeigt). Größenskala in cm. **B-F:** Mutanten mit Entwicklungsdefekten; obere Reihe: Übersichtsaufnahmen; untere Reihe: Detailaufnahmen.

Kapillarzonenelektrophorese, LC-MS/MS und MALDI-TOF-MS. Auf diese Weise wurden rund 250 Phosphopeptide aus *Physcomitrella* identifiziert^[4].

160 transgene Linien pro Tag

Neben der Untersuchung einzelner Gene mit Knockout-Mutanten ist die Analyse einer Vielzahl von Genen durch einen Forward-Genetics-Ansatz unerlässlich. Hierfür erstellt man eine Mutanten-Kollektion, charakterisiert aberrante Phänotypen und identifiziert dann den mutierten genomischen Locus. Idealerweise sollte die Mutagenese ungerichtet sein und alle Gene des Organismus mit gleicher Wahrscheinlichkeit treffen, um eine gesättigte Mutanten-Kollektion zu generieren. Die Isolierung der betroffenen Gene vereinfacht sich, wenn die Mutagenese durch das Einbringen bekannter DNA-Sequenzen erfolgt. Ein solcher Ansatz wurde für *Physcomitrella* etabliert, indem klonierte cDNA-Regionen durch eine Transposon-Mutagenese mutiert und dann in einem Hochdurchsatz-Verfahren eingesetzt wurden, das 160 transgene Linien pro Tag erzeugt^[5]. Auf diese Weise wurde eine *Physcomitrella*-Mutantenkollektion mit 75.000 transgenen Linien erstellt, die in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf regeneriert werden.

Von 16.000 *Physcomitrella*-Mutanten wiesen etwa 16% einen abweichenden Phänotyp auf^[5]. Diese Rate liegt deutlich über der Rate von vergleichbaren Mutanten-Kollektionen der diploiden Pflanze *A. thaliana*. Die große Anzahl an *Physcomitrella*-Mutanten mit aberrantem Phänotyp beruht höchst wahrscheinlich auf der haploiden Lebensform des Gametophyten. Neben Mutanten mit einer gestörten Entwicklung wurden viele auxotrophe Mutanten isoliert, die Defekte im Metabolismus

aufwiesen. Mit Hilfe dieser Mutanten können Gene gefunden werden, die essenzielle Funktionen in pflanzenspezifischen Biosynthesewegen, beispielsweise in der Synthese von Vitaminen oder ungesättigten Fettsäuren, erfüllen. Diese Gene können für biotechnische Anwendungen genutzt werden. ■

Literatur

- [1] Reski, R. (1998): Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot Acta* 111: 1–15.
- [2] Strepp, R., Scholz, S., Kruse, S., Speth, V., Reski, R. (1998): Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4368–73.
- [3] Lang, D., Eisinger, J., Reski, R., Rensing, S. A. (2005): Representation and high-quality annotation of the *Physcomitrella patens* transcriptome demonstrates a high proportion of proteins involved in metabolism in mosses. *Plant Biol* 7: 238–50.
- [4] Heintz, D., Wurtz, V., High, A. A., Van Dorsseleer, A., Reski, R., Sarnighausen, E. (2004): An efficient protocol for the identification of protein phosphorylation in a seedless plant, sensitive enough to detect members of signaling cascades. *Electrophoresis* 25: 1149–1159.
- [5] Egener, T., Granado, J., Guitton, M. C., Hohe, A., Holtorf, H., Lucht, J. M., Rensing, S. A., Schlink, K., Schulte, J., Schween, G., Zimmermann, S., Duwenig, E., Rak, B., Reski, R. (2002): High frequency of phenotypic deviations in *Physcomitrella patens* plants transformed with a gene-disruption library. *BMC Plant Biol* 2: 6.

Korrespondenzadresse:



PD Dr. Wolfgang Frank¹
 Prof. Dr. Ralf Reski²
 Pflanzenbiotechnologie, Fakultät für Biologie
 Albert-Ludwigs-Universität
 Schänzlestraße 1
 D-79104 Freiburg
 Tel.: 0761-203-2820 (Dr. Wolfgang Frank) oder
 -6969 (Prof. Dr. Reski),
 Fax: 0761-203-6945 oder -6967
 wolfgang.frank@biologie.uni-freiburg.de
 ralf.reski@biologie.uni-freiburg.de
 www.plant-biotech.net