

## **ABSCHLUSSBERICHT**

### **Industrieraps - Biotechnologie II**

#### **Teilvorhaben: Gentechnische Steigerung des Ölsäure- gehaltes in Raps**

**Berichtszeitraum: 01.01.1993 bis 30.06.1995**

**Projektleiter:** Prof. Dr. Ernst Heinz

**Mitarbeiter:** Dr. Hermann Schmidt

Dr. Petra Sperling

#### **Einleitung**

Raps ist die produktivste Ölseed, die in den gemäßigten Klimazonen angebaut wird. Die Triacylglycerine herkömmlichen Rapsöls bestehen zu 60-70% aus einfach ungesättigter Ölsäure und zu 30-40% aus Linol-, Linolen- und Palmitinsäure. Ein Samenöl in Form reiner Trioleate sowie ein Speiseöl ohne Reste von Linolensäure sind Produkte, deren Verarbeitung von Chemie und Nahrungsmittelindustrie seit langem gewünscht wird. Wenn es gelänge, die Fettsäurezusammensetzung im Samenöl entsprechend zu modifizieren, würden Anbau und Absatz dieses Hoch-Ölsäure Rapses erheblich ausgeweitet werden können.

Ziel des High-Oleic Projektes ist ein gentechnologischer Eingriff in die Fettsäuredesaturierung bei der Akkumulation von Triacylglycerinen in Rapssamen. Unsere primären Ziele sind daher die Isolierung von cDNAs für plastidäre und mikrosomale Oleatdesaturasen. Aufgrund der subzellulären Komplementation bei Desaturatedefekten ist damit zu rechnen, daß nur durch Ausschaltung aller Isoenzyme in Plastiden und ER der maximale Ölsäuregehalt erreicht werden kann. Die rapseigenen Gene sollen

als antisense-Konstrukte in geeigneten Vektoren zur Rapstransformation eingesetzt werden. Durch die Expression der spezifischen antisense-mRNAs wird die Desaturierung von Ölsäure blockiert, wodurch ein Rapsprototyp erhalten wird, der sich durch einen hohen Ölsäure- und niedrigen Linolensäuregehalt auszeichnet.

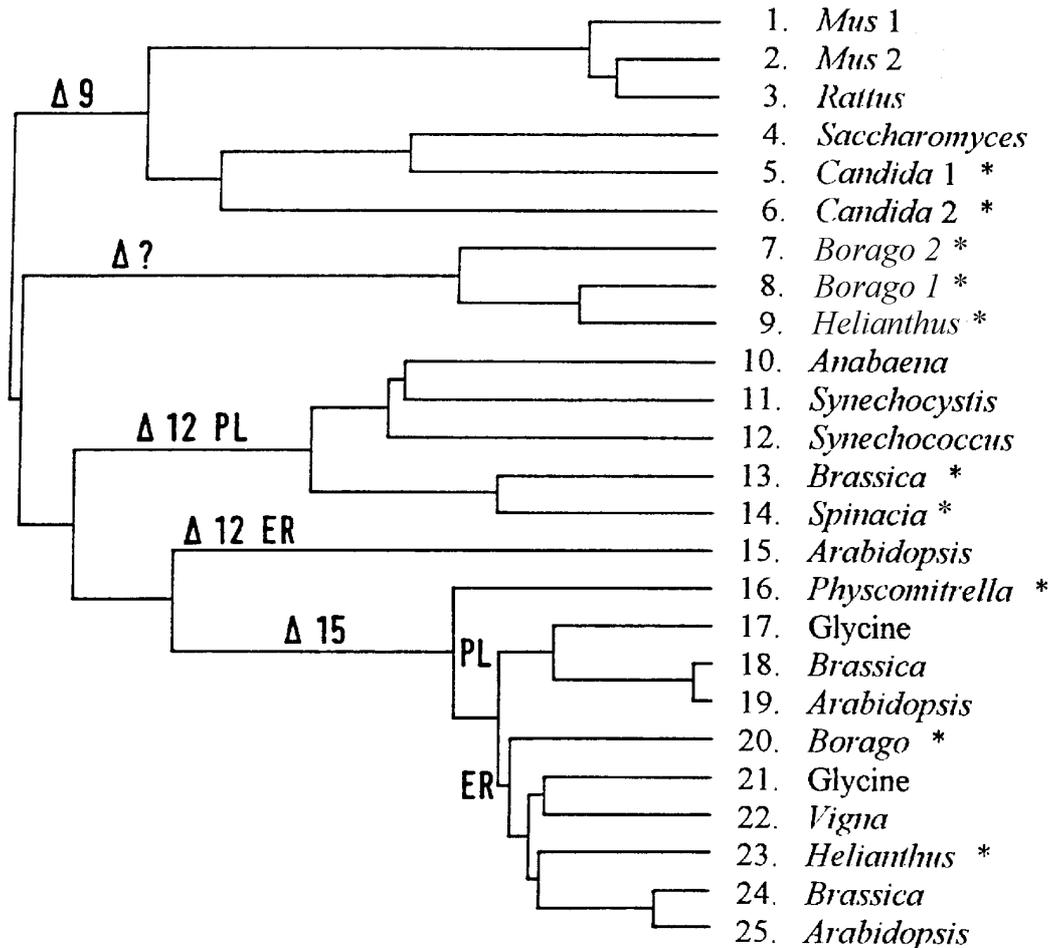
Wie unsere biochemischen und enzymatischen Studien zeigten, stellen die Fettsäuregruppen intakter Lipide ohne transienten Austausch die eigentlichen Substrate plastidärer (Schmidt & Heinz 1992, 1993) und mikrosomaler Oleatdesaturasen (Sperling et al. 1992, Sperling & Heinz 1993, Sperling et al. 1993) dar. Die plastidäre Oleatdesaturase aus Spinat wurde gereinigt und N-terminal sequenziert (Schmidt & Heinz 1992). Korrespondierende Oligonukleotide sollen über die PCR-Technik zur Isolierung einer cDNA aus mRNA führen. Die homologen Isoenzyme der Linoleatdesaturase aus Plastiden und Mikrosomen, die als erste pflanzliche Desaturasen sequenziert wurden (Arondel et al. 1992), zeigen eine unerwartet große Sequenzübereinstimmung. Aufgrund zu erwartender Homologien zwischen plastidärer und mikrosomaler Oleatdesaturase soll ein PCR-Screening zur Isolierung der homologen Rapssequenzen führen.

### **Isolierung von cDNA-Klonen für plastidäre und mikrosomale Oleatdesaturasen**

Zur Isolierung der für unser Vorhaben erforderlichen cDNA der plastidären Oleatdesaturase aus Spinat wurde das gereinigte Protein geblottet und N-terminal sequenziert. Von der resultierenden Aminosäuresequenz wurden degenerierte Oligonucleotidprimer für PCR-Experimente abgeleitet. Mit verschiedenen Primern wurde mittels 3'- und 5'-RACE ein vollständiger cDNA-Klon aus Spinatblatt-mRNA isoliert und sequenziert. Dieser cDNA-Klon besitzt eine Länge von 1717 bp sowie eine polyA-Sequenz und ein offenes Leseraster von 448 Aminosäuren. Diese

Sequenz kodiert für ein plastidäres Leaderpeptid von 65 Aminosäuren und die eigentliche Desaturase von 382 Aminosäuren und einer Masse von 43 kDa (Schmidt et al. 1994). Das abgeleitete Protein zeigte deutliche Sequenzidentitäten von 52% zu der Oleatdesaturase (desA) aus *Synechocystis* (Wada et al. 1990) und von 25% zu Linoleatdesaturasen (fad3, fad7) aus *Arabidopsis* (Arondel et al. 1992, Iba et al. 1993, Yadav et al. 1993).

Ein Vergleich mit den seinerzeit bekannten Desaturasen (Ntambi et al. 1988, Stukey et al. 1990, Wada et al. 1990, Arondel et al. 1992) führte zur Identifizierung von drei hoch konservierten Regionen mit der generellen Aminosäuresequenz HXXXH. Diese Histidin-Boxen und auch ihr gegenseitiger Abstand sind in allen membrangebundenen Desaturasen hoch konserviert (Schmidt, Sperling & Heinz 1993, Schmidt et al. 1994). Die konservierten Aminosäuresequenzen der ersten und dritten Histidin-Box wurden benutzt, um diverse Oligonucleotidprimer verschiedener Degeneration und Länge zu konstruieren. Diese Primer wurden in PCR-Experimenten mit cDNAs eingesetzt, die von polyA-mRNA verschiedener Organismen transkribiert wurde. Die resultierenden DNA-Fragmente von 550-700 bp wurden kloniert und sequenziert. Mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser partiellen Klone und bekannter Desaturasesequenzen wurde ein Dendrogramm erstellt (Abb.1), wodurch sich die neuen Sequenzen aufgrund ihrer Homologie einer entsprechenden Regioselektivitätsgruppe zuordnen lassen. Auf diese Weise konnte u.a. ein cDNA-Klon aus Raps isoliert und eindeutig als plastidäre Oleatdesaturase identifiziert werden (Schmidt, Sperling & Heinz 1995).



**Abb.1. Ähnlichkeiten von membrangebundenen Desaturasen hinsichtlich der Aminosäuresequenzen zwischen erster und dritter Histidin-Box.** Das Dendrogramm wurde mit dem Programm CLUSTAL mit einer 'gap weight' von drei erstellt. Vertreter, die in unserem Labor sequenziert wurden, sind mit einem Stern bezeichnet. Nummer 1,2 (Ntambi et al. 1988); 3 (Thiede et al. 1986); 4 (Stukey et al. 1990); 9 (Sperling et al. 1995); 10,12 (Sakamoto et al. 1994); 11 (Wada et al. 1990); 14 (Schmidt et al. 1994); 15 (Okuley et al. 1994); 17,18,19,21,25 (Yadav et al. 1993); 22 (Yamamoto et al. 1992); 24 (Arondel et al. 1992).

Mit der o.g. PCR-Technik konnte auch ein völlig neuer Desaturasetyp noch unbekannter Funktion aus cDNA von Sonnenblumen und Borretsch isoliert und sequenziert werden. Der vollständige Klon aus reifenden Sonnenblumenembryonen mit einer Länge von 1377 bp zeigte ein offenes Leseraster von 458 Aminosäuren, korrespondierend zu einer Proteinmasse von 52 kDa. Auch diese Sequenz weist die für membrangebundene Desaturasen

charakteristischen drei konservierten Histidin-Boxen auf, obwohl die höchste Aminosäureidentität zur delta-6-Desaturase aus *Synechocystis* (Reddy et al. 1993) nur 18% beträgt und der N-Terminus um 100 Aminosäuren länger ist. Die N-terminale Sequenz zeigte hohe Ähnlichkeit mit Cytochrome b<sub>5</sub>, so daß die komplette Sequenz für ein Fusionsprotein aus Cytochrom b<sub>5</sub> und einem desaturaseähnlichen Enzym zu kodieren scheint. Die N-terminale DNA-Region, die für die hydrophile Cytochrom b<sub>5</sub>-Domäne kodiert, konnte in *E.coli* funktional exprimiert werden. Das rekombinante Protein zeigte ein Redoxabsorptionsspektrum, das charakteristisch für mikrosomales Cytochrom b<sub>5</sub> aus Pflanzen ist. Expressionsstudien werden zeigen, ob dieses Fusionsprotein in die Desaturierung von Phospholipiden, Sphingolipiden oder deren Hydroxylierung involviert ist (Sperling et al. 1995).

Zwischenzeitlich wurde die erste Sequenz für eine mikrosomale Oleatdesaturase aus *Arabidopsis* veröffentlicht (Okuley et al. 1994). Unter Berücksichtigung dieser Sequenz wurden neue degenierte PCR-Primer abgeleitet und erfolgreich zur Isolierung der mikrosomalen Oleatdesaturase aus Raps eingesetzt. Damit standen die rapseigenen Gene der plastidären und mikrosomalen Oleatdesaturase für die gezielte Veränderung des Fettsäuremusters bei der Akkumulation von Triacylglycerinen im Rapssamen zur Verfügung.

### **Rapstransformation**

Für eine erste gentechnologische Blockade der Ölsäure-desaturierung im Raps wurden Antisensekonstrukte von den isolierten cDNAs der plastidären (P1) und mikrosomalen Oleatdesaturase (E1) erstellt. Um die Wirksamkeit der verschiedenen Konstrukte möglichst schnell überprüfen zu können, wurden diese Konstrukte in den Pflanzenexpressionsvektor pBI121 (Fa. CLONTECH, Heidelberg) hinter den konstitutiven 35S-Promotor aus Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) anstelle des  $\beta$ -Glucuronidase

(GUS)-Gens und vor den Nopalinsynthase(nos)-Terminator kloniert. Der binäre Vektor pBI121 enthält das Neomycinphosphotransferase-Gen (NPT II) unter der Kontrolle des Nopalinsynthase(nos)-Promotors, nos-Terminators und ermöglicht eine Selektion auf Kanamycinresistenz (Abb.2a).

Die Antisense-tragenden und in ihrer Sequenz überprüften Konstrukte pBI-P1-Bn und pBI-E1-Bn wurden dem Verbundpartner in Einbeck (PLANTA) für die Rapsstransformation zur Verfügung gestellt. Die Transformation von Kotyledonen aus Sommerraps der Sorte *Drakkar* erfolgte mittels *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) und Ti-Plasmid(pMP90)-vermitteltem DNA-Transfer. Nach Kanamycinselektion, Regeneration und *in vitro*-Aufzucht wurden die Pflanzen schließlich auf Erde überführt und mit Hilfe des NPTII-ELISA-Tests auf ihre Neomycinphosphotransferase(NPT)-Aktivität überprüft. In Blattextrakten von 18 der regenerierten Pflanzen waren signifikante NPT-Gehalte nachweisbar.

Die extrem niedrigen Raten der Kotyledonen-Transformation von 0-1% zeigten, daß sich der Vektor pBI121 für die Transformation von Raps nicht besonders eignet. Daher wurde das chimäre Genkonstrukt aus 35S-Promotor, antisense-DNA der plastidären (P1) bzw. mikrosomalen (E1) Oleatdesaturase und nos-Terminator in den binären Vektor pRE1 umkloniert (Abb.2b). Bei dem Vektor pRE1 handelt es sich um ein von Filsak und Töpfer entwickeltes Derivat des Vektors pGSC1706a (de Block, unveröffentlicht), der das Neomycinphosphotransferase-Gen (NPT II) unter der Kontrolle des 35S-Promotors als Selektionsmarker enthält. Die resultierenden Konstrukte pRE1-P1 und pRE1-E1 wurden erneut zur Rapsstransformation an PLANTA übergeben. Durch die *Agrobacterium*-vermittelte Kotyledonen-Transformation mit den pRE1-Konstrukten wurden wesentlich höhere Raten von 2-6% erreicht. Aus diesen Transformationen sind 48 (pRE1-E1) und 41 (pRE1-P1) unabhängige NPT-positive Pflanzen hervorgegangen.

a.



b.



**Abb.2. Vektorkonstruktionen** zur Antisense-Expression der Oleatdesaturasen in Raps in pBI121 (a) und pRE1 (b). Erläuterungen siehe Text.

Die in Einbeck entwickelten, transgenen Pflanzen wurden von uns übernommen und bis zur Fruchtreife weiterkultiviert. Die Analyse genomischer DNA (Southern Blots) zeigte, daß 11 von 18 NPT-positiven Pflanzen (pBI-Konstrukte) das 'gene of interest' enthielten. Die HPLC-Analysen dieser 11 transgenen Pflanzen zeigten keine signifikanten Veränderungen im Fettsäuremuster vegetativer Gewebe. Die Blätter der 89 NPT-positiven Pflanzen mit pRE1-Konstrukten wurden von uns bei dem Verbundprojektspartner Norddeutsche Pflanzenzucht (NPZ), Hohenlieth gaschromatographisch (GC) analysiert. Aufgrund der starken Expression der Oleatdesaturasen in Blättern ergaben auch die GC-Analysen der pRE1-Pflanzen keine signifikante Erhöhung des Ölsäuregehaltes in vegetativen Geweben. Ob die Antisense-Expression der Oleatdesaturasen unter Kontrolle des verwendeten, konstitutiven Promotors im Samen wirksam ist, werden zukünftige Halbkorn-Analysen in Hohenlieth zeigen.

Somit ist es im vorliegenden Forschungsvorhaben gelungen, die für einen transgenen Hochölsäureraps erforderlichen Gene zu klonieren und auf Raps zu übertragen. Durch die enge Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern in Einbeck und Hohenlieth ist es gelungen, die Gene für die plastidäre und mikrosomale Oleat-

desaturase auf die Sommerrapssorte *Drakkar* zu übertragen und 100 unabhängige transgene Pflanzen zu entwickeln. Eine Wirksamkeit der Antisense-Konstrukte unter konstitutivem Promotor konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Antisense-Expression unter der Kontrolle samenspezifischer Promotoren optimiert werden muß, um den Züchtern die für weitere Züchtung erforderlichen Prototypen zur Verfügung stellen zu können.

### Literatur

(Projektbezogene Publikationen sind durch Fettdruck hervorgehoben)

V. Arondel, B. Lemieux, I. Hwang, S. Gibson, H.M. Goodman, C.R. Somerville

Science 258, 1353-1355, 1992.

Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*.

K. Iba, S. Gibson, T. Nishiuchi, T. Fuse, M. Nishimura, V. Arondel, S. Hugly, and C. Somerville

J. Biol. Chem. 268, 24099-24105, 1993

A gene encoding a chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*.

J.M. Ntambi, S.A. Buhrow, K.H. Kaestner, R.J. Christy, E. Sibley, T.J. Kelly Jr., M.D. Lane

J. Biol. Chem. 263, 17291-17300, 1988

Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase.

J. Okuley, J. Lightner, K. Feldman, N. Yadav, E. Lak, J. Browse  
 J. Plant Cell 6, 147-158, 1994

Arabidopsis fad2 gene encodes the enzyme that is essential for  
 polyunsaturated lipid synthesis.

A.S. Reddy, M.L. Nuccio, L.M. Gross and T. Thomas  
 Plant Mol. Biol. 27, 293-300, 1993

Isolation of a  $\Delta 6$ -desaturase gene from the cyanobacterium  
*Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 by gain-of-function  
 expression in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120.

T. Sakamoto, H. Wada, I. Nishida, M. Ohmori and N. Murata  
 Plant Mol. Biol. 24, 643-650, 1994

Identification of conserved domains in the  $\Delta 12$  desaturases of  
 cyanobacteria.

**H. Schmidt and E. Heinz**

n-6-Desaturase from chloroplast envelopes: purification and  
 enzymatic characteristics, in Metabolism, Structure and  
 Utilization of Plant Lipids, Cherif, A., et al., eds., Cent.  
 Natl. Péd., Tunis, pp 140-144, 1992.

**H. Schmidt and E. Heinz**

Biochem. J. 289, 777-782, 1993  
 Direct desaturation of intact galactolipids by a desaturase  
 solubilized from spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast  
 envelopes.

**H. Schmidt, P. Sperling and E. Heinz**

New *in vivo* and *in vitro* evidence for lipid-linked desaturation  
 in plants, in Biochemistry and Molecular Biology of Membrane  
 and Storage Lipids of Plants, N. Murata and C.R. Somerville,  
 eds., ASPP, Rockville, pp. 40-49, 1993.

**H. Schmidt, T. Dresselhaus, F. Buck and E. Heinz**

Plant Mol. Biol. 26, 631-642, 1994  
 Purification and PCR-based cDNA cloning of a plastidial n-6  
 desaturase.

**H. Schmidt, P. Sperling and E. Heinz**

PCR-based cloning of membrane-bound desaturases, in *Plant Lipid Metabolism*, J.C. Kader and P. Mazliak, eds., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp 21-23, 1995.

**P. Sperling, S. Stöcker, H.-P. Mühlbach and E. Heinz**

Alkenyl ether analogues as substrates for microsomal acylation and desaturation systems, in *Metabolism, Structure and Utilization of Plant Lipids*, Cherif, A., et al., eds., Cent. Natl. Péd., Tunis, pp 122-136, 1992.

**P. Sperling and E. Heinz**

Eur. J. Biochem. 213, 965-971, 1993

Isomeric *sn*-1-octadecenyl and *sn*-2-octadecenyl analogues of lysophosphatidylcholine as substrates for acylation and desaturation by plant microsomal membranes.

**P. Sperling, M. Linscheid, S. Stöcker, H.P. Mühlbach and E. Heinz**

J. Biol. Chem. 268, 26935-26940, 1993

*In vivo* desaturation of *cis*-delta 9-monounsaturated to *cis*-delta 9,12-diunsaturated alkenylether glycerolipids.

**P. Sperling, H. Schmidt and E. Heinz**

Eur. J. Biochem. 232, 798-805, 1995

A cytochrome-b<sub>5</sub>-containing fusion protein similar to plant acyllipid desaturases.

J.E. Stukey, V.M. McDonough, C.E. Martin

J. Biol. Chem. 265, 20144-20149, 1990

The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the  $\Delta 9$  fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase.

M.A. Thiede, J. Ozols, P. Strittmatter

J. Biol. Chem. 261, 13230-13235, 1986

Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase.

H. Wada, Z. Gombos, N. Murata

Nature 347, 200-203, 1990

Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation.

N.S. Yadav, A. Wierzbicki, M. Aegerter, C.S. Caster, L. Pérez-

Grau, A.J. Kinney, W.D. Hitz, J.R. Booth Jr., B. Schweiger,

K.L. Stecca, S.M. Allen, M. Blackwell, R.S. Reiter, T.J.

Carlson, S.H. Russell, K.A. Feldmann, J.Pierce, and J. Browse

Plant Physiol. 103, 467-476, 1993

Cloning of higher plant  $\omega$ -3 fatty acid desaturases.

K.T. Yamamoto, H. Mori and H. Imaseki

Plant Cell Physiol. 33, 13-20, 1992

Novel mRNA sequences induced by indole-3-acetic acid in sections of elongating hypocotyls of mung bean (*Vigna radiata*).