

**Abschlußbericht**

**im Rahmen  
des Forschungsverbunds Wissenschaft - Wirtschaft  
im BML-Förderschwerpunkt 'Nachwachsende Rohstoffe'**

**zum Thema**

**Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen**

**Prof. Dr. Norbert Erdmann/ PD Dr. Inge Broer (Universität Rostock)**

**Verbundpartner**

Prof. Dr. Wolfgang Lockau (Humboldt-Universität zu Berlin)

Prof. Dr. Elfriede Pistorius (Universität Bielefeld)

Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben (Universität Tübingen)

Dr. Holger Junghans (Norika-Kartoffelzucht und -Vermehrungs-GmbH)

Dr. Hans-Joachim Traenkner (Bayer AG)

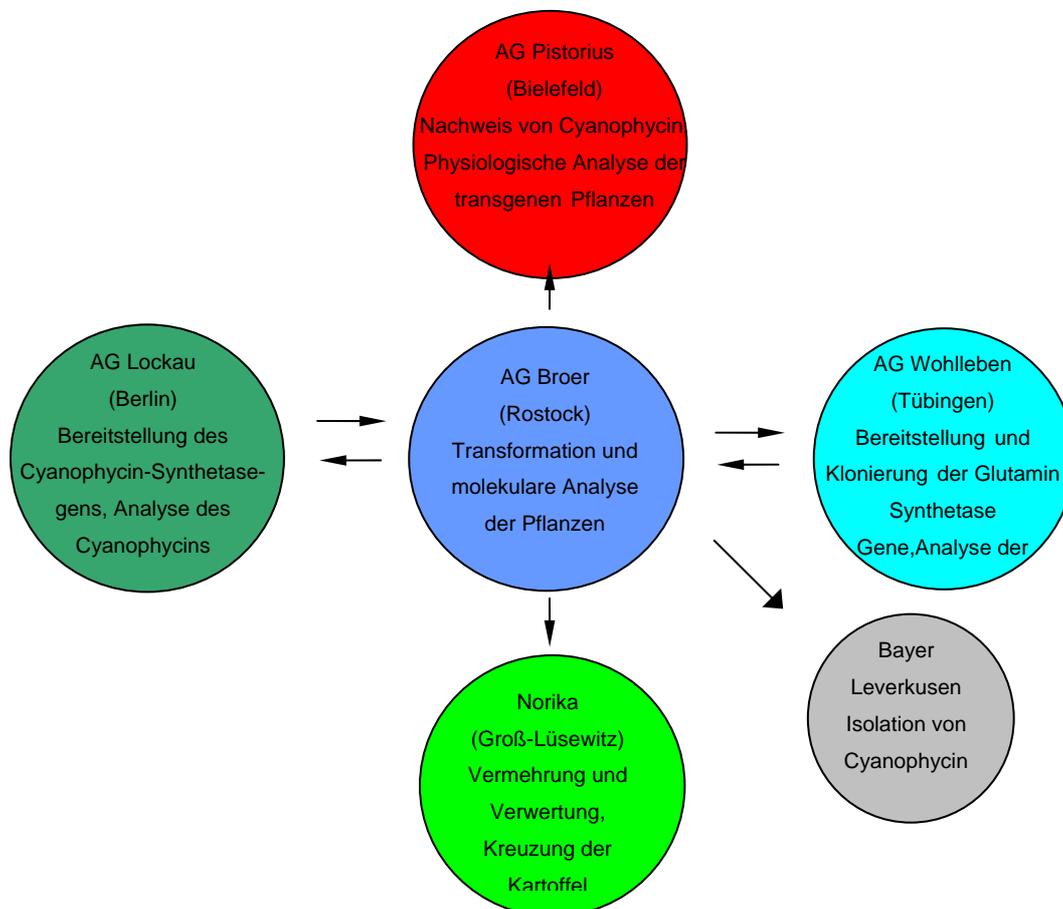
**FKZ: 98NR090**

**1.11.99-31.10.02**

## Zusammenfassung

Ziel des Projektes war es, in transgenen Kartoffelknollen das cyanobakterielle Protein Cyanophycin herzustellen, das als Ausgangsstoff für das Biopolymer Polyaspartat genutzt werden kann. Polyaspartat ist biologisch abbaubar, nicht toxisch und hat vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise als Ersatzstoff für nicht biologisch abbaubare Polyacrylate in Detergentien, Lösungsmitteln und in der Ölproduktion. Cyanophycin soll als Nebenprodukt bei der industriellen Verwertung von Kartoffeln anfallen und daher äußerst kostengünstig sein. Im Rahmen des Projektes ist es uns gelungen, durch die Analyse der konstitutiven Expression verschiedenen Synthetase Gene in Tabak und Kartoffel ein Gen zu identifizieren, das ohne besondere Modifikationen zu einem Anteil von 1% der Trockenmasse an Cyanophycin in Tabakblättern führt. Die während der Pflanzenentwicklung deutlich werdenden Beeinträchtigungen der Pflanze durch die Transgenexpression sollen durch gewebespezifische Expression und die unterstützende Modifikation der Aminosäuresynthese ausgeglichen werden.

## Aufgabenverteilung auf die Verbundpartner



# **Ausführliche Beschreibung des Arbeitsplanes und der gewonnenen Ergebnisse**

Universität Rostock

## **Expression verschiedener Cyanophycin-Synthetasegene in transgenen *Nicotiana tabacum* - und *Solanum tuberosum* Pflanzen**

Die AG Lockau stellte drei verschiedene Cyanophycin-Synthetasegene aus *Anabaena variabilis*, *Synechocystis* spec PCC 6803 sowie aus *Synechococcus elongatus* zur Verfügung. Die Analyse von Cyanophycin-Synthetasegenen aus verschiedenen Organismen in transgenen Pflanzen war notwendig, da aus der Expression bakterieller Gene in Mikroorganismen nicht auf ihre Funktionalität in Pflanzen rückgeschlossen werden kann. Bakterielle Gene können z.B. durch kryptische pflanzliche Regulationssignale oder auf Grund ihrer Basenzusammensetzung in der Pflanzenzelle unerwartete Expressionsmuster zeigen. Die im folgenden zusammengefassten Ergebnisse zeigen auch deutliche Unterschiede in der Expression und Funktionalität verschiedener Cyanophycin-Synthetasegene in transgenen Pflanzen.

### **1. Vergleich der Regenerationsraten nach Transformation von Pflanzen mit verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegenen**

Drei Cyanophycin-Synthetasegene unterschiedlicher Herkunft (siehe Tabelle 1) wurden unter Kontrolle des konstitutiven, cytoplasmatisch exprimierten 35S-RNA-Promotors in Tabak und Kartoffel exprimiert, um Aussagen über einen möglichen Einfluss der Cyanophycin-Synthese auf Regeneration und Wachstum transgener Pflanzen erkennen zu können. Die Konstruktion der Pflanzentransformationsvektoren, die die drei verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegen tragen, erwies sich teilweise aufgrund der Größe der Gene und der dadurch geringen Anzahl an verwendbaren Restriktionsschnittstellen als vergleichsweise zeitaufwendig. Die Pflanzentransformationsvektoren zur cytoplasmatisch konstitutiven Expression der drei Cyanophycin-Synthetasegene sind in Abb. 1 gezeigt.

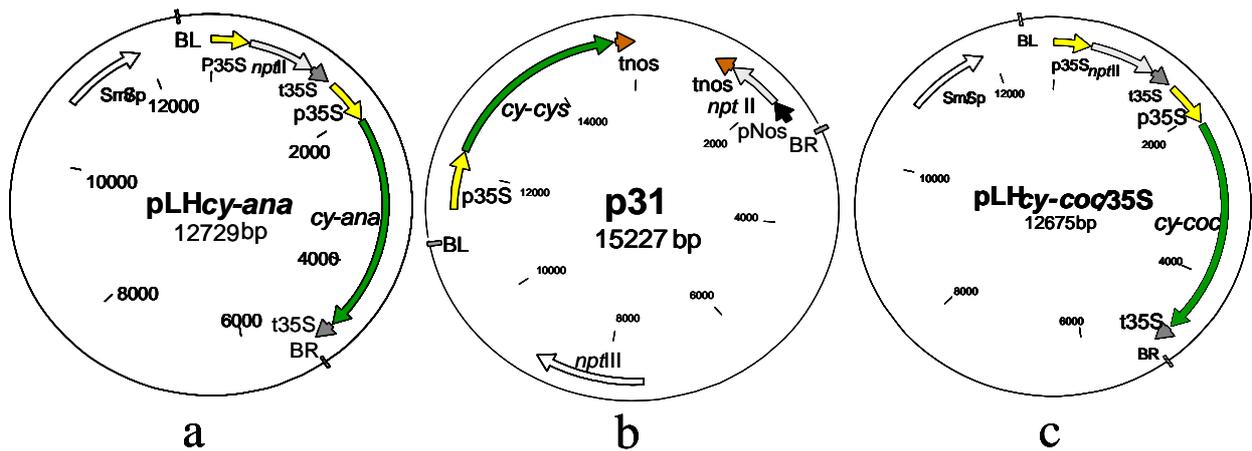


Abb.1: Pflanzentransformationsvektoren zur cytoplasmatisch konstitutiven Expression der drei verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene. a: Kodierbereich der Cyanophycin-Synthetase aus *Anabaena variabilis* (*cy-ana*); b: Kodierbereich aus *Synechocystis spec. PCC 6803* (*cy-cys*); c: Kodierbereich aus *Synechococcus elongatus* (*cy-coc*).  
 p35S: konstitutiv cytoplasmatisch exprimierter 35S-RNA-Promotor der Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA; t35S: Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Terminator; *nptII*: Kanamycinresistenzgen; pNos/tnos: Nopalinsynthetase-Promotor (pNos) und -Terminator (tnos) aus *A. tumefaciens* BL, BR: Randsequenzen der T-DNA; Sm/Sp: bakteriell exprimiertes Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen; *nptIII*: bakteriell exprimiertes Kanamycinresistenzgen.

Die in Abbildung 1 dargestellten Pflanzentransformationsvektoren wurden mehrfach (s. Tabelle 1) zur Transformation von Tabak und Kartoffel eingesetzt. Als transgene Kontrolle diente der Ausgangsvektor, der nur das Kanamycinresistenzgen beinhaltet. Dieser Vektor wurde in allen Transformationsansätzen zur Kontrolle der Regenerationsrate ohne Cyanophycinexpression eingesetzt. Die im Vergleich zu der Kontrolltransformation erniedrigte Regenerationsraten bei dem Einsatz der Cyanophycinvektoren weisen darauf hin, dass die Expression eines Cyanophycin-Synthetasegens schädlich für die Pflanze sein könnte. Die Analyse des Phänotyps (Wachstumsrate, Morphologie) der adulten Pflanzen kann ebenfalls auf Störungen durch die Expression der Cyanophycin-Synthetasegene hinweisen. In Tabelle 1 und 2 sind die Daten aus den bisher so ermittelten Ergebnissen für Tabak- und Kartoffel zusammengefasst.

Tab. 1: Regenerationsraten und Phänotyp transgener Tabakpflanzen bei konstitutiver Expression der verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene im Cytoplasma.

Herkunft des Cyanophycin-Synthetasegens	Abkürzung	Regenerationsrate	Anzahl Transformationen	Phänotyp der Regeneranten
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	<i>cy-ana</i>	109%	3	normal
<i>Synechocystis spec</i> PCC6803	<i>cy-cys</i>	37%	3	normal
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>cy-coc</i>	86%	3	normal

Tab. 2: Regenerationsraten und Phänotyp transgener Kartoffelpflanzen bei konstitutiver Expression der verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene im Cytoplasma.

Herkunft des Cyanophycin-Synthetasegens	Abkürzung	Regenerationsrate	Anzahl Transformationen	Phänotyp der Regeneranten
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	<i>cy-ana</i>	200%	1	normal
<i>Synechocystis</i> spec PCC6803	<i>cy-cys</i>	0	3	normal
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>cy-coc</i>	70%	3	normal

Die Transformation von Tabak und Kartoffel mit verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegenen zeigte deutliche Unterschiede in den Regenerationsraten: Das aus *Anabaena variabilis* stammende Cyanophycin-Synthetasegen (*cy-ana*) führte nie zu reduzierten Regenerationsraten. Die bei Kartoffel beobachtete verdoppelte Rate im Vergleich zur Kontrolltransformation ist sehr wahrscheinlich eine zufällige Abweichung; in Kartoffel wurde dieser Versuch nur einmal durchgeführt. Bei der Transformation von Tabak oder Kartoffel mit diesem Transgen kann also kein Einfluss einer möglichen Transgenexpression auf Regenerationsraten sowie den Phänotyp der resultierenden Pflanzen beobachtet werden.

Zu den schlechtesten Regenerationsraten führte das aus *Synechocystis* stammende Cyanophycin-Synthetasegen (*cy-cys*): In drei unabhängigen Transformationsexperimenten wurde bei Tabak nur eine durchschnittliche Rate von 37% einer Kontrolltransformation erreicht, während sich Kartoffelpflanzen mit diesem Gen nicht transformieren ließen. Der Phänotyp der regenerierenden oder auch älterer Pflanzen war nicht von dem der Kontrollpflanzen zu unterscheiden. Ursache der stark verringerten Regenerationsraten könnte eine Schädigung der transformierten pflanzlichen Zellen über die Expression der Synthetase oder die Synthese von Cyanophycin und der daraus resultierende Mangel an Arginin und Aspartat sein. Aufschluss über mögliche Ursachen könnte die Transformation mit einem von der AG Lockau konstruierten funktionslosen *cy-cys*-Gen liefern. Dieses Gen führt bei fast identischer DNA-Sequenz zur Bildung einer funktionslosen Cyanophycin-Synthetase. In den Pflanzen kann es damit nicht zu einer Schädigung durch die Synthese von Cyanophycin kommen; damit sollte auch keine Reduktion der Regenerationsrate mehr auftreten. Ein solcher Kodierbereich wurde zwar von der AG Lockau konstruiert, ließ sich aber bislang nicht in einen Pflanzentransformationsvektor klonieren.

Bei der Transformation von Tabak oder Kartoffel mit dem aus *Synechococcus elongatus* stammenden Cyanophycin-Synthetasegen (*cy-coc*) konnten in beiden Fällen im Vergleich zur Kontrolle leicht reduzierte Regenerationsraten beobachtet werden. Auch hier reagieren

Kartoffelpflanzen etwas empfindlicher auf die Expression der Cyanophycin-Synthetase als Tabakpflanzen, der Effekt ist hier jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei der Expression des *cy-cys*-Gens in transgenen Pflanzen. Die beobachteten Regenerationsraten weisen darauf hin, dass die Expression des *cy-coc*-Gens für die Pflanzen besser verträglich ist als die des *cy-cys*-Gens; die auch hier leicht reduzierten Regenerationsraten deuten wie bei dem *cy-cys*-Gen auf eine tatsächliche Expression des Transgens in transgenen Pflanzen hin.

Der Phänotyp der regenerierenden *cy-coc*-Pflanzen war zunächst nicht von dem der Kontrollpflanzen zu unterscheiden. Nach etwa sechs Monaten fielen jedoch bei 14 von 18 der transgenen Linien im Vergleich zu gleich alten Kontrollpflanzen verlangsamte Wachstumsraten, eine verstärkte Blühinduktion und vor allem zum Auftreten von mehr oder weniger auffällig panaschierten Blättern auf; gleichzeitig waren die Blätter oft leicht verdickt.

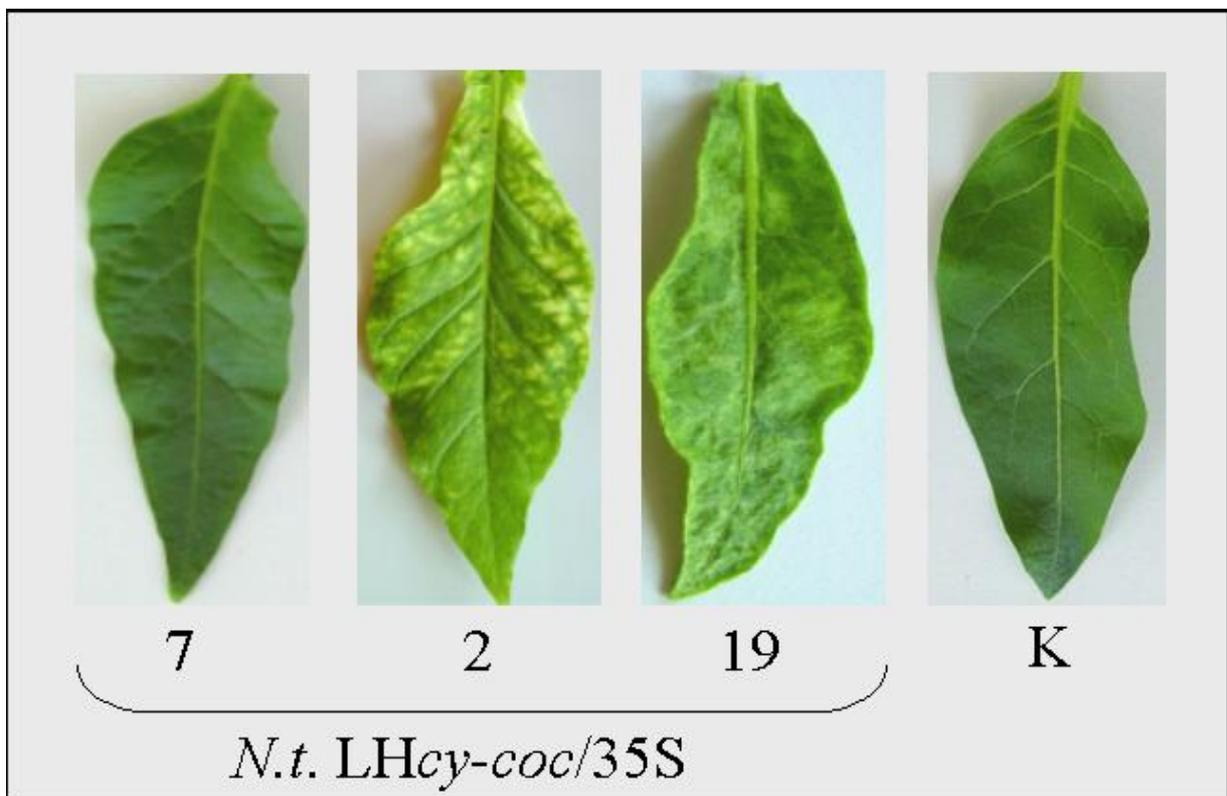


Abb.2: Vergleich von Tabakblättern einer Kontrollpflanze (K; nur *npfl*-Gen, rechts) bzw. von drei etwa 10 Monate alten Tabaklinien, die mit dem Pflanzentransformationsvektor pLHcy-coc/35S erzeugt wurde (von links Linien LHcy-coc/35S **7**, **2** und **19**). Linie 7 hat normale Blätter, die von Linie 2 und 19 zeigen verschiedene Formen der Panaschierung.

Abbildung 2 zeigt deutlich die bei einem großen Teil der mit Hilfe von pLHcyell/35S erzeugten transgenen Tabaklinien nach einiger Zeit auftretenden panaschierten Blätter. Tabaklinie 2 wies immer sehr auffällige Verfärbungen auf, Linie 7 dagegen nie. Solche Blätter wurden in

unserer Arbeitsgruppe an anderen transgenen Tabakpflanzen nie beobachtet. Eine potentielle Ursache könnte der Befall mit einem Pathogen, z.B. einem Virus sein. Viren lassen sich über Extrakte auf andere Pflanzen übertragen und sollten hier ähnliche Symptome auslösen. Um einen eventuellen Virusbefall als Ursache für den veränderten Phänotyp zu verifizieren, wurde von panaschierten Blättern steril kultivierten Tabaklinien ein Blattextrakt hergestellt und auf ebenfalls steril kultivierte nicht transgene Tabakpflanzen appliziert (mit und ohne Verwundung der „infizierten“ Blätter). In keinem der Fälle kam es zum Auftreten sichtbarer Blattveränderungen, auch nicht nach vier Wochen. Damit scheint ein Pathogenbefall als Ursache der beobachteten Blattveränderungen sehr unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass in diesen Pflanzen Cyanophycin produziert wird. Wenn Cyanophycin wie erwartet in Pflanzen nicht abbaubar sein sollte, könnte es durch die Akkumulation im Laufe der Zeit zu Blattveränderungen kommen. Mit pLHcy-coc/35S erzeugte transgene Kartoffelpflanzen wiesen ebenfalls zum Teil eine solche Panaschierung der Blätter auf, dort ist sie allerdings in der Regel weniger stark ausgeprägt als bei den transgenen Tabakpflanzen. Eine Untersuchung der Norika GmbH auf einen möglichen Virusbefall dieser Pflanzen verlief negativ.

## **2. Vergleich der molekularen Analysen nach Transformation von Pflanzen mit verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegenen**

Die molekulare Analyse der mit den verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegenen transformierten Pflanzen zeigte ebenfalls auffällige Unterschiede. Bei der Untersuchung der Expression der drei Gene in den transgenen Pflanzen mittels RT-PCR- sowie Northern-Blot-Analysen konnte die transgenspezifischen RNA zwar in der deutlich sensitiveren RT-PCR für alle drei Cyanophycin-Synthetasegene zumindest in einem Teil der Pflanzen nachgewiesen werden, nicht jedoch in Northern-Blot-Analysen: Keine der mit dem aus *Anabaena variabilis* stammenden Gen transformierten Tabak- oder Kartoffelpflanzen wies ein Signal auf. RNA aus *E. coli*-Bakterien, die den Pflanzentransformationsvektor pLHcy-ana beinhalten, zeigte dagegen in denselben Northern-Blot-Analysen ein deutliches Signal der transgenspezifischen RNA.

Die Expression der anderen beiden Cyanophycin-Synthetasegene war in transgenen Pflanzen auch mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen nachweisbar. Auffällig war dabei in beiden Fällen das Vorhandensein transgenspezifischer RNA in verschiedenen Größen. Die erwartete Größe der Cyanophycin-Synthetase-RNA konnte zwar in einem Teil der Pflanzenlinien gezeigt werden, zusätzlich traten jedoch sehr häufig auch kleinere Banden in typischen Mustern auf (Abb. 3).

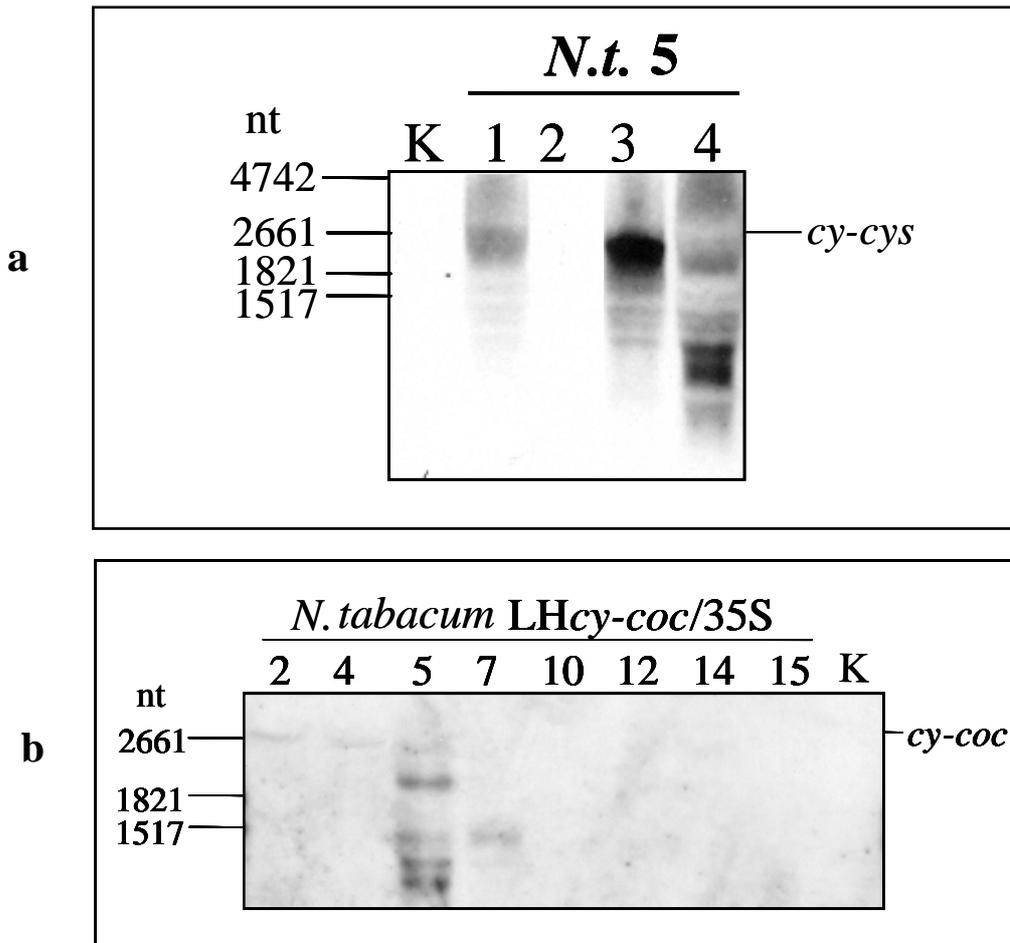


Abb.3: Beispiele von Northern-Blot Analysen der transgenspezifischen RNA. **a**: RNA aus transgenen Pflanzen, die das Cyanophycin-Synthetasegen aus *Synechocystis* tragen (*cy-cys*, hier mit plastidär konstitutiver Expression); **b**: RNA aus transgenen Pflanzen, die das Cyanophycin-Synthetasegen aus *Synechococcus elongatus* tragen (*cy-coc*). Gut erkennbar ist das Auftreten definierter Banden von z.T. deutlich geringerer Bandengröße als der erwarteten (Größe des Kodierbereichs ca 2700bp). wt, K: nicht transgene Kontrollpflanzen; 1-15: verschiedene unabhängige transgene Tabaklinien.

Sowohl für das *cy-cys*-Gen als auch für das *cy-coc*-Gen kann in einem großen Teil der Linien in Northern-Blot-Analysen keine oder nur wenig der transgenspezifischen RNA nachgewiesen werden, in den sensitiveren RT-PCR-Analysen dagegen in einem großen Teil der Pflanzen. Das deutet darauf hin, dass Expressionsstärke und/oder Stabilität der transgenspezifischen RNA relativ gering sind und im Folgeprojekt optimiert werden sollten. Ein großer Teil der transgenspezifischen RNA scheint in Form von definierten kürzeren RNA-Fragmenten vorzuliegen. Insgesamt ist bei dem *cy-coc*-Gen der Anteil an transgenspezifischer RNA der korrekten Länge größer und es treten weniger verkürzte RNAs auf (maximal vier kleinere Fragmente; bei *cy-cys* bis zu sieben).

Das Auftreten solcher verkürzten transgenspezifischen RNAs könnte darauf beruhen, dass alle drei Cyanophycin-Synthetase-Gene im Kodierbereich Sequenzen enthalten, die mehr oder weniger den pflanzlichen Konsensus-Sequenzen für ein Spleißen oder eine

Polyadenylierung der RNA entsprechen. Die meisten dieser potentiellen Erkennungsstellen finden sich im *cy-ana*-Gen (dort konnte dementsprechend auch nie RNA in Northern-Blot-Analysen nachgewiesen werden), die wenigsten im *cy-coc*-Gen. Die Northern Blot Analysen entsprechen diesen Daten.

### **3. Vergleich der Cyanophycin-Produktion nach Transformation von Pflanzen mit verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegenen**

Für alle drei cytoplasmatisch exprimierten Cyanophycin-Synthetase-Gene wurden von den AG Lockau (Humboldt Universität zu Berlin) und Pistorius (Universität Bielefeld) transgene Tabak- und Kartoffelpflanzen auf das Vorhandensein der Cyanophycin-Synthetase bzw. von Cyanophycin-Granula hin untersucht. Zunächst konnten in keinem Fall Cyanophycin-Granula in der Form nachgewiesen werden, wie sie in Cyanobakterien vorliegen (granuläre Form). Die in zwei Fällen (*cy-cys* und *cy-coc*) wiederholt deutlich reduzierten Regenerationsraten nach der Transformation wiesen jedoch darauf hin, dass in den Pflanzenzellen zumindest direkt nach der Transformation eine schwer verträgliche Substanz, möglicherweise Cyanophycin, produziert wurde. Es wäre vorstellbar, dass dann nur solche Pflanzen regenerieren können, die vergleichsweise wenig oder keine transgenspezifische RNA synthetisieren und daher auch nur wenig funktionelle Cyanophycin-Synthetase bilden können. Es bestand aber auch die Möglichkeit, dass eine andere Form des Cyanophycins gebildet werden könnte, die mit den vorher eingesetzten Messmethoden nicht erfasst wird. Aus diesem Grund wurde in der AG Lockau das Auftreten von löslichem statt granulären Cyanophycin in den Überständen analysiert. Es zeigte sich, dass **mit dem *cy-coc*-Gen transformierte Tabak- und Kartoffelpflanzen tatsächlich relativ große Mengen an löslichem Cyanophycin produzieren (bis zu 1% der Trockenmasse)**. Daraufhin wurden auch die mit dem *cy-ana*- bzw. dem *cy-cys*-Gen transformierte Pflanzen noch einmal auf das Vorhandensein von löslichem Cyanophycin analysiert. In Pflanzen mit cytoplasmatisch konstitutiver Expression des *cy-ana*- sowie des *cy-cys*-Gens wurde bis jetzt noch keine Form des Cyanophycins nachgewiesen. Um diese Ergebnisse zu verifizieren müssen allerdings noch umfangreichere Analysen durchgeführt werden.

Auffällig war, dass nur die mit dem *cy-coc*-Gen transformierten Tabaklinien, in denen lösliches Cyanophycin produziert wurde auch die auffälligen Blattveränderungen aufwiesen. Es besteht eine deutliche Korrelation vom Vorhandensein dieser Blattveränderungen, der transgenspezifischen RNA und von Cyanophycin. Dabei ist die transgenspezifische RNA in einigen Linien auch dann nachweisbar, wenn keine Cyanophycin-Produktion nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise wird hier nur sehr wenig oder nur verkürzte RNA gebildet. Nur zwei Linien zeigen Auffälligkeiten (32 und 37). Es wäre möglich, dass dort falsch

negative Resultate erzielt wurden; die Untersuchungen müssen noch einmal wiederholt werden. Tabelle 3 und 4 zeigen eine Zusammenfassung dieser Beobachtungen.

Tab. 3: Korrelation der beobachteten Blattveränderung mit dem Vorhandensein der transgen-spezifischen RNA sowie der Produktion von löslichem Cyanophycin in verschiedenen unabhängigen *N.t.* LHcy-coc/35S-Linien

<b><i>N.t.</i> LHcy-coc/35S</b>	<b>RNA-Nachweis (RT-PCR)</b>	<b>Produktion von lösl. Cyanophycin</b>	<b>veränderte Blattmorphologie</b>
2	ja	ja	ja
4	ja	ja	ja
5	ja	nein	nein
7	ja	nein	nein
10	nein	nein	nein
12	ja	ja	ja
14	ja	ja	ja
19	ja	ja	ja
21	nein	nein	nein
22	ja	ja	ja
23	ja	ja	ja
24	ja	ja	ja
29	ja	ja	ja
31	ja	ja	ja
32	nein	ja	ja
37	ja	nein	ja
38	ja	ja	ja
39	ja	ja	ja

Tab. 4: Zusammenfassung der für die Expression konstitutiv cytoplasmatisch exprimierter Cyanophycin-Synthetasegene bisher ermittelten Daten

<b>Cyanophycin-Synthetasegen</b>	<b>Regenerationsrate (% einer Kontrolle)</b>	<b>RNA-Nachweis (Northern-Blot)</b>	<b>Produktion von lösl. Cyanophycin</b>	<b>Veränderte Blattmorphologie</b>
<i>cy-ana</i>	normal	nicht möglich	nicht messbar	nein
<i>cy-cys</i>	stark reduziert	einige Linien	fast nie messbar	nein
<i>cy-coc</i>	leicht reduziert	einige Linien	ja	ja

Tabellen 3 und 4 zeigen deutlich, dass die nach Transformation mit dem *cy-coc*-Gen beobachteten Blattveränderungen auf der Produktion von Cyanophycin beruhen könnten. Das späte Auftreten dieser Veränderungen könnte auf eine Akkumulation von Cyanophycin zurückzuführen sein.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die drei verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene in der Pflanze zu sehr unterschiedlichen Reaktionen führen. Da das *cy-ana*-Gen in der Pflanze nicht funktionell zu sein scheint (vermutlich durch einen Abbau seiner RNA), kann die Regenerationsrate auch nicht durch die Produktion von Cyanophycin reduziert werden. Die Expression des *cy-cys*-Gens dagegen scheint für die Pflanze so schwer verträglich zu sein; dass nur die wenigen Pflanzen, die wegen eines ungünstigen Integrationsortes nur nicht detektierbare Mengen an Cyanophycin produzieren, in der Lage sind zu regenerieren. Die Expression des *cy-coc*-Gens scheint besser verträglich zu sein, sie führt nur zu einer leichten Beeinträchtigung der transgenen Pflanzen bei gleichzeitiger Produktion von löslichem Cyanophycin. Der Unterschied der Reaktion der Pflanze auf zwei funktionell identische Gene könnte in leichten Unterschieden in dem jeweils gebildeten Cyanophycin begründet sein, wie sie in *E.coli* beobachtet wurden. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurde die Linie *N.t. LHcy-coc/35S 2* zusammen mit einer Kontrolllinie ohne Cyanophycin-Synthetasegen an die Norika zur Anzucht großer Mengen Blattmaterials übergeben. Von der der AG Lockau soll dann die genaue Struktur des in Pflanzen gebildeten Cyanophycins bestimmt werden.

#### **4 Versuche zur Optimierung der Cyanophycin-Expression in transgenen Pflanzen**

Die Synthese von Cyanophycin scheint für die Pflanzen problematisch zu sein. Mit mehreren Ansätzen wurde versucht, diese Probleme zu lösen.

##### **4.1 Stabilisierung der transgenspezifischen RNA**

Bisher konnte nicht gezeigt werden, ob die von dem *cy-ana* Gen kodierte Syntetase zu einer Produktion von Cyanophycin in der Pflanze führen kann, weil bereits die RNA degradiert wird und so kein Produkt gebildet werden kann. Ziel war daher eine Stabilisierung der RNA. Es ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass die Translationsfusion eines instabilen Gens mit einem sehr stabil exprimierten Gen im 5´ Bereich zu einer Stabilisierung der RNA führen kann.

Wir konnten in einem anderen Projekt nachweisen, dass die von dem syntetischen *patS* Gen kodierte RNA, die zur Bildung einer Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase führt, in Pflanzen außerordentlich stabil ist. Daher wurde der *patS*-Kodierbereich von der AG Lockau mit dem

5' Bereich des *cy-ana*-Gens fusioniert. Das entstehende Fusionsprotein könnte den Pflanzen sogar die leicht nachweisbare Resistenz gegen das Totalherbizid Phosphinothricin vermitteln. Das chimäre Gen wurde in unserer Arbeitsgruppe in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert (Abbildung 4).

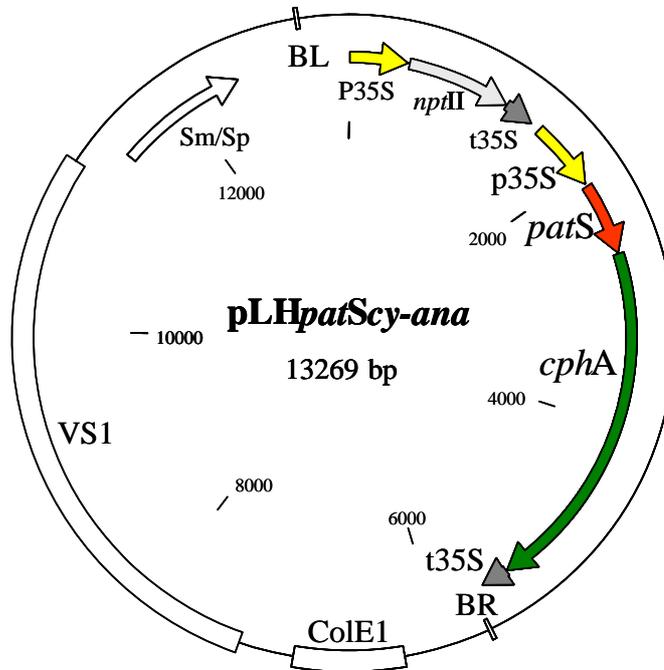


Abb. 4: Pflanzentransformationsvektor pLHpatScy-ana/35S. *cy-ana*: Kodierbereich des Cyano-phycin-Synthetasegens aus *Anabaena variabilis*; *patS*, synthetisch hergestelltes Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferasegen; p35S: konstitutiv cytoplasmatisch exprimierter 35S-RNA-Promotor der Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA; t35S: Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Terminator; *nptII*: Kanamycinresistenzgen; BL, BR: Randsequenzen der T-DNA; Sm/Sp: bakteriell exprimiertes Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen; oriColE1, oriVS1: Replikationsstartpunkte für die Erhaltung des Plasmids in *E.coli* bzw. Agrobakterien.

Der Pflanzentransformationsvektor pLHpatScy-ana wurde zur Tabaktransformation eingesetzt. Trotz zweifacher Wiederholung des Transformationsexperiments konnten unter Phosphinothricinselektion keine resistenten Pflanzen regeneriert werden. Auf Kanamycin erfolgte eine Regeneration mit normalen Raten. Die durch das Fusionsprotein vermittelte Phosphinothricinresistenz ist also entweder nicht funktionell, oder die erhoffte Transkriptstabilisierung tritt nicht ein und die transgenspezifische RNA wird -wie für das *cy-ana*-Gen alleine beobachtet- abgebaut. Da in den auf Kanamycin regenerierten Pflanzen keine *patS* oder *cy-ana*-spezifische RNA gefunden werden konnte, gehen wir davon aus, das auch die Fusions-RNA instabil ist. Möglicherweise könnten aber mit andern Gensequenzen bessere Resultate erzielt werden.

Sowohl die *cy-cys* als auch die *cy-coc*-Pflanzen produzieren RNAs, deren Länge nicht ausreicht um einen Cyanophycin-Synthetase zu kodieren. Die Effizienz der Produktion könnte also über eine Vermeidung der kurzen RNAs erhöht werden. In der Sequenz des Gens finden sich potentielle Spleiß- sowie Polyadenylierungssequenzen, die für das Entstehen der kurzen RNAs verantwortlich sein könnten. Das *cy-cys*-Gen wurde bereits von der AG Lockau so modifiziert, dass ein Herausspleißen von Introns nicht mehr möglich sein sollte. Es war allerdings weder in unserer noch in den AGs Lockau und Wohlleben möglich, dieses Gen in einen Pflanzentransformationsvektor zu klonieren. In einem Folgeprojekt sollten in der AG Lockau einzelne Basen der *cy-coc*-Sequenz ausgetauscht werden, um eine Erkennung der RNA durch das Spleißosom zu vermeiden. Da das *cy-coc*-Gen bisher mit Abstand die besten Ergebnisse in Bezug auf Cyanophycin-Produktion lieferte, scheint es sinnvoll, weitere Genoptimierungen vorzugsweise mit diesem Gen durchzuführen.

Die Reduktion der Transformationsrate durch das *cy-cys*-Gen und die Veränderung der Morphologie der *cy-coc* Linien, die Cyanophycin produzieren zeigen deutlich, dass eine Erhöhung der Syntheserate von Maßnahmen begleitet werden muss, die es der Pflanze erlauben Cyanophycin ohne eine Reduktion der Wachstumsrate zu akkumulieren. Möglichkeiten dazu werden im folgenden dargestellt.

#### **4.2 Gewebespezifische Expression des Cyanophycin-Synthetasegens und Produktion von Cyanophycin in den Chloroplasten**

Bereits bei der Expression des *cy-cys*-Gens in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen zeigte sich, dass die Fusion des *cy-cys*-Gens mit dem aus Erbse stammenden *rbcS*-Signalpeptid für den Transfer der Cyanophycin-Synthetase in Chloroplasten zu einer Erhöhung der Regenerationsraten, also möglicherweise zu einer besseren Verträglichkeit der Cyanophycin-Synthese, führt (Tabelle 5). Der dazu konstruierte Pflanzentransformationsvektor p5 (Abbildung 5) wurde in mehreren Transformationsexperimenten von Tabak und Kartoffel zur Erzeugung transgener Pflanzen eingesetzt.

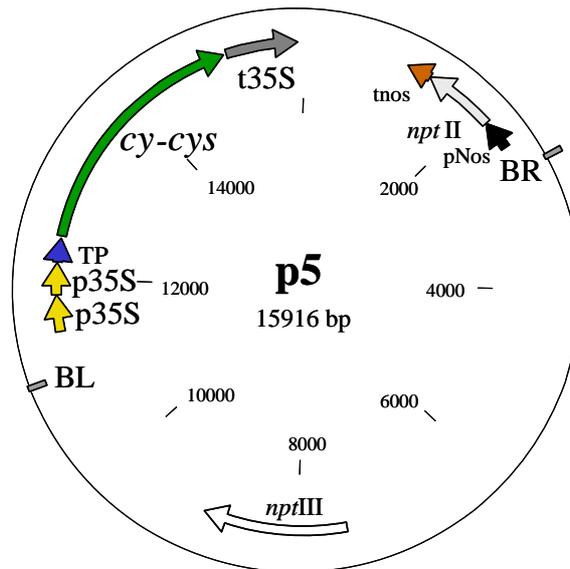


Abb. 5: Pflanzentransformationsvektor p5 zur plastidär-cytoplasmatischen Expression des Cyanophycin-Synthetasegens *cy-cys* aus *Synechocystis spec.* PCC 6803. *cy-cys*: Kodierbereich des Cyanophycin-Synthetasegens aus *Synechocystis spec.* PCC 6803; p35S: doppelter Promotor der Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA; t35S Terminator der Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA; TP: plastidäres Signalpeptid aus Erbse; *nptII*: Neomycinresistenzgen unter Kontrolle des Nopalinsynthetase-Promotors (pNos) und -Terminators (tnos) aus *A. tumefaciens*; BL, BR: linke bzw. rechte Randsequenzen der transferrierten DNA; *nptIII* bakteriell exprimierbares Neomycinresistenzgen

Tab. 5: Vergleich der Regenerationsraten (im Vergleich zu einer Kontrolltransformation nur mit dem *nptII*-gen) bei cytoplasmatisch konstitutiver (p31) und plastidär konstitutiver (p5) Expression des Cyanophycin-Synthetasegens aus *Synechocystis spec.* PCC 6803

	p31 (cytoplasmat. konstitutiv)		p5 (plastidär konstitutiv)	
	Regenerationsrate	Anzahl Transf.	Regenerationsrate	Anzahl Transf.
<b>Tabak</b>	<b>37%</b>	<b>3</b>	<b>54%</b>	<b>4</b>
<b>Kartoffel</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>21%</b>	<b>4</b>

In Kartoffel war es nur bei Fusion mit diesem Signalpeptid möglich, transgene Pflanzen zu regenerieren. Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, dass Chloroplasten den Cyanobakterien ähnlicher sind als das Cytoplasma der Pflanzenzelle und damit eine Cyanophycin-Synthese besser toleriert wird. Obwohl in diesen Pflanzen wie in den mit p31 transformierten Pflanzen bei vorhandener transgenspezifischer RNA kein Cyanophycin

nachgewiesen werden konnte, zeigen die verbesserten Regenerationsraten, dass hier eine höhere Expression des Gens weniger schädlich ist. Dieser positive Effekt könnte auch zur Vermeidung der Schäden an transgenen *cy-coc*-Pflanzen genutzt werden. Daher soll in einem Folgeprojekt eine Fusion des *cy-coc*-Kodierbereichs mit dem *rbcS*-Signalpeptid für einen Transport der Cyanophycin-Synthetase in den Chloroplasten hergestellt werden. Gleichzeitig sollen auch weitere ähnliche Transitpeptide mit *cy-coc* fusioniert werden, um eine Kombination zu finden, die einen möglichst vollständigen Transfer der Cyanophycin-Synthetase ins Stroma der Chloroplasten gewährleistet.

Ein weiterer Ansatz ist die knollenspezifische Expression von Cyanophycin-Synthetasegenen. In dem Speicherorgan Knolle könnte es für die Pflanze leichter sein, Cyanophycin zu produzieren; außerdem fällt die Synthese in der übrigen Pflanze weg, so dass die Regeneration transgener Pflanzen nicht beeinträchtigt sein sollte. Besonders notwendig und erfolgversprechend war diese Strategie im Fall des *cy-cys*-Gens, dessen konstitutive Expression in Kartoffel nicht toleriert wurde. Zur Erhöhung der Transformationsrate wurde daher das *cy-cys*-Gen mit knollenspezifisch exprimierten Promotoren fusioniert. Zur Verfügung stehen zwei verschiedene knollenspezifische Promotoren: der häufig für eine knollenspezifische Transgenexpression eingesetzte Patatin B33-Promotor, welcher durch Aventis Crop Science geschützt ist und nur für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt werden kann und der GBSS-Promotor, welcher von Prof. Visser (Universität Wageningen) zur Verfügung gestellt wurde. Der GBSS-Promotor stammt von der Granula-gebundenen Stärke-Synthetase (GBSS) aus *Manihot esculenta* und zeigt 74% Homologie zu dem entsprechenden Kartoffel-Promotor. Seine Expression in der Knolle ist deutlich stärker als die des konstitutiven 35S-Promotors oder des üblicherweise zur knollenspezifischen Expression eingesetzten Patatin-Promotors, er zeigt jedoch im Gegensatz zum Patatin-Promotor auch Aktivität in anderen saccharosereichen Geweben. Das *cy-cys*-Gen wurde stromab der beiden Promotoren kloniert (Abbildung 5).

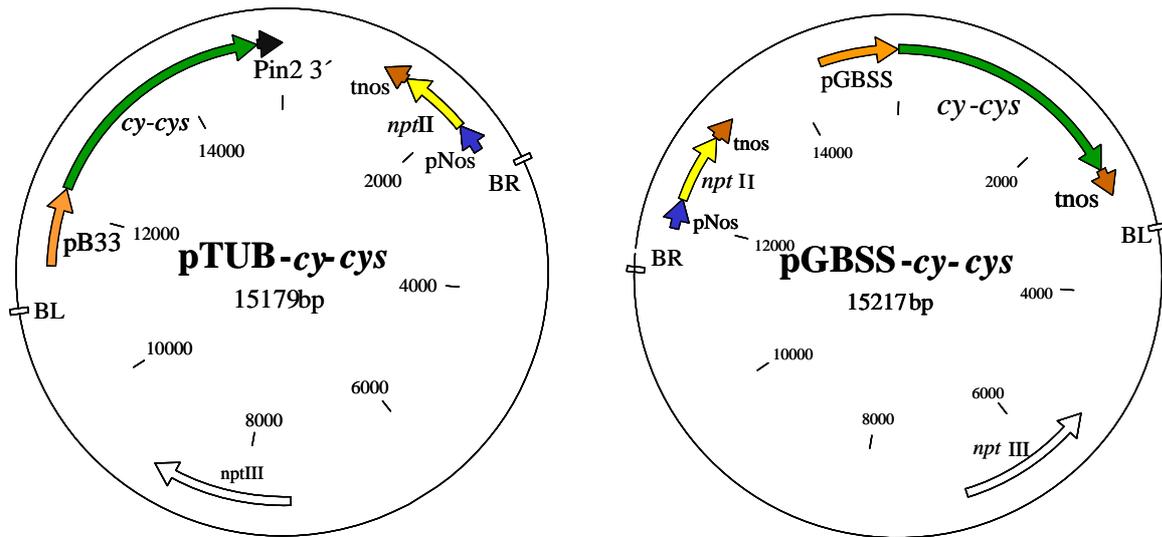


Abb.6: Pflanzentransformationsvektoren pTUB-cy-cys (links) und pGBSS-cy-cys (rechts) zur knollenspezifischen Expression des Cyanophycin-Synthetasegens. cy-cys: Kodierbereich des Cyanophycin-Synthetasegens aus *Synechocystis* PCC 6803; pB33: knollenspezifisch exprimierter Patatin B33-Promotor; pGBSS: knollenspezifisch exprimierter GBSS-Promotor aus *Manihot esculenta*; Pin2 3': Terminator des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus *S. tuberosum*; tnos: Terminator des Nopalinsynthetasegens aus *A. tumefaciens*; nptII: Kanamycinresistenzgen; pNos: pflanzenexprimierter Nopalinsynthetase-Promotor aus *A. tumefaciens*; nptIII bakteriell exprimierbares Neomycin-resistenzgen; BL, BR: Randsequenzen der T-DNA

Beide Pflanzentransformationsvektoren wurden zur Erzeugung transgener Kartoffelpflanzen eingesetzt. Die dabei beobachteten Regenerationsraten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 5: Regenerationsraten und Phänotyp transgener Kartoffelpflanzen bei knollenspezifischer Expression des cy-cys-Gens.

Vektor zur Pflanzentransformation	Regenerationsrate	Anzahl Transformationen	Phänotyp der Regeneranten
pTUB-cy-cys	18%	1	Normal
pGBSS-cy-cys	52%	3	Normal

Auffällig ist, dass trotz der knollenspezifischen Expression des cy-cys-Gens deutlich erniedrigte Regenerationsraten zu beobachten sind. Da die Transformation mit pTUB-cy-cys bisher nur einmal durchgeführt wurde muss die extreme Reduktion der Regenerationsrate erst in Wiederholungsexperimenten verifiziert werden. Die beim Einsatz von pGBSS-cy-cys signifikant reduzierte Transformationsrate könnte durch eine Aktivierung des Sacchrose-

induzierten Promotors auf dem zuckerhaltigen Regenerationsmedium verursacht sein. Um das zu überprüfen, wurde die Expression eines  $\beta$ -Glucuronidase-Kodierbereichs (*gus*) in Fusion mit dem GBSS-Promotor in Kartoffel analysiert. Der das pGBSS-*gus*-Gen tragende Vektor (pBGP121-GUS) wurde von Prof. Visser (Universität Wageningen) zur Verfügung gestellt. Als Vergleich dazu wurde das *gus*-Gen unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Promotors in die Kartoffelpflanzen eingebracht. Der Vergleich der GUS-Aktivität in Blättern ca. drei Wochen nach der Kartoffel-Transformation ist in Abbildung 7 gezeigt.



Abb. 7: Test der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität in Kartoffelblättern ca. drei Wochen nach der Transformation. pBGP121-GUS: Pflanzentransformationsvektor zur Expression des *gus*-Gens unter Kontrolle des GBSS-Promotors; p35S-GUS: Pflanzentransformationsvektor zur Expression des *gus*-Gens unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Promotors; K: Inkubation der Blätter mit einem nicht transgenen Agrobakterium.

Die Versuche weisen darauf hin, dass der GBSS-Promotor im Vergleich zum Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Promotor bereits in frühen Stadien der Regeneration auf den zuckerhaltigen Regenerationsmedien deutlich stärker aktiviert zu sein scheint. Unklar ist bislang noch, warum eine Regeneration transgener Sprosse trotz dieser starken Aktivität möglich war, während bei cytoplasmatisch konstitutiver Expression unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Promotors keine transgenen Pflanzen geerntet wurden.

Insgesamt scheint eine knollenspezifische Expression (pGBSS oder pB33) im Gegensatz zur konstitutiven cytoplasmatischen Expression über den 35S Promotor ohne Signalpeptid das Heranziehen transgener Pflanzen zu ermöglichen. Zur Zeit wird der Cyanophycingehalt transgener Kartoffelknollen (B33- und GBSS-Promotor) analysiert. In den Blättern transgener Pflanzen war bei beiden Promotoren keine transgenspezifische RNA nachweisbar. Hier scheint der Promotor also nicht erkennbar induziert zu sein. **In einer der Linien (*cy-cys*-Gen unter Kontrolle des B33-Promotors wurde bereits in der Knolle Cyanophycin nachgewiesen**, der erste Nachweis von Cyanophycin in Pflanzen mit diesem Gen. Die These, dass die Synthese von Cyanophycin spezifisch im Speicherorgan Knolle für die Pflanze besser verträglich sein sollte, scheint sich also zu bestätigen.

Da in den bisherigen Versuchen bei Einsatz des *cy-coc*-Gens bereits unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Promotors Cyanophycin in den Pflanzen gefunden wurde, steht zu erwarten, dass bei einer knollenspezifischen Expression noch höhere Produktionsraten erreicht werden. Daher werden zur Zeit Fusionen dieses Cyanophycinsynthetasegens mit dem Patatin- und dem GBSS-Promotor hergestellt. Eine Fusion des *cy-coc*-Gens mit dem knollenspezifischen B33-Promotor wurde bereits fertiggestellt (Abbildung 8); diese Fusion soll in einem Folgeprojekt in transgene Kartoffelpflanzen eingebracht werden.

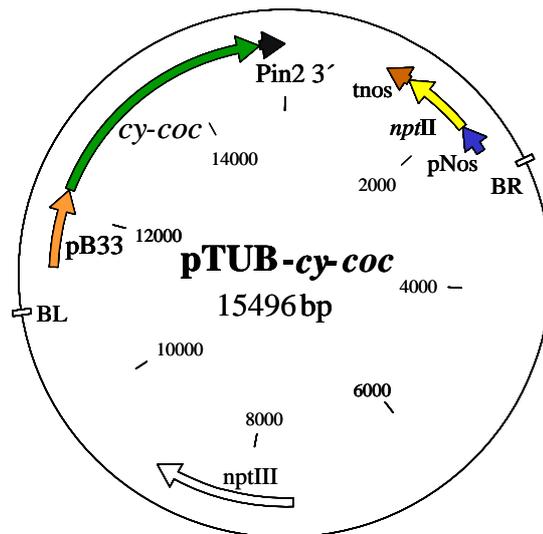


Abb. 8: Pflanzentransformationsvektor pTUB-*cy-coc* zur knollenspezifischen Expression des Cyanophycin-Synthetasegens aus *Synechococcus elongatus*. *cy-coc*: Kodierbereich des Cyanophycin-Synthetasegens aus *Synechococcus elongatus*; pB33: knollenspezifisch exprimierter Patatin B33-Promotor; Pin2 3': Terminator des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus *S. tuberosum*; tnos: Terminator des Nopalinsynthetasegens aus *A. tumefaciens*; *nptII*: Kanamycinresistenzgen; pNos: pflanzenexprimierter Nopalinsynthetase-Promotor aus *A. tumefaciens*; *nptIII* bakteriell exprimierbares Neomycinresistenzgen; BL, BR: Randsequenzen der T-DNA

#### 4.3 Expression zusätzlicher Aminosäure-Biosynthesegene in transgenen Pflanzen

Die bisher beschriebenen Versuche deuten darauf hin, dass eine Bildung von Cyanophycin in den Pflanzen zu einer wesentlichen Beeinträchtigung des Aminosäure-Pools (vor allem zu einem Mangel an Arginin und Aspartat oder ihren Vorläufern) führen könnte. Diese Möglichkeit war bereits im Projektantrag in Betracht gezogen worden; Lösungsansatz war die gleichzeitige Expression bakterieller Gene aus den Aminosäure-Biosynthesewegen mit der Cyanophycin-Synthetase in den Pflanzen. Vor allem die Glutaminsynthetase gewährleistet als primäres Schlüsselenzym in allen zur N-Assimilation befähigten Organismen die Versorgung der Zelle mit dem zentralen Aminogruppen-Donor und Stickstoffspeichermolekül, der Aminosäure Glutamin. Der für die Synthese der Cyanophycinbausteine Arginin und Aspartat benötigte Stickstoff soll damit zusätzlich zu der

wirtseigenen N-Versorgung bereitgestellt werden, ohne dass es zu wachstumsbeeinträchtigenden Ungleichgewichten und Defiziten im pflanzlichen N-Stoffwechsel kommt. In den bisher durchgeführten Ansätzen wurde immer nur ein Gen aus dem Biosyntheseweg in die Pflanzen transferiert.

Die transgenen Pflanzen sollen durch Cyanophycin-Synthese entzogene Aminosäuren schneller ersetzen und trotz Bildung von Cyanophycin unbeeinträchtigt wachsen. Gene für solche Schlüsselenzyme wurden von der AG Wohlleben in Pflanzentransformationsvektoren kloniert. Da bisher nicht bekannt ist, welches der Enzyme eine verbesserte Cyanophycinproduktion gewährleisten könnte, wurden parallel verschiedene Gene zur Tabak-Transformation eingesetzt. Alle Gene wurden unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert. Die Ergebnisse für die verschiedenen Gene sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Expression verschiedener Gene aus dem Glutamin- (*gln*) und Arginin- (*arg*)-Biosyntheseweg in *N. tabacum*.

Gen	Herkunft	RNA in Pflanzen (Northern-Blot)
<i>glnA</i>	<i>E. coli</i>	korrekte Länge
<i>glnA1</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	nicht nachweisbar
<i>glnA2</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	nicht nachweisbar
<i>glnI1</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	korrekte Länge
<i>argJM</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	zu groß
<i>argC</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	korrekte Länge
<i>argJ</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	zusätzliche Banden

Auch bei der Transformation von Tabak mit verschiedenen Genen aus Aminosäure-Biosynthesewegen zeigte sich die Notwendigkeit der Analyse der Expression verschiedener Gene in den Pflanzen. Nur für drei der sieben Gene (*glnA* aus *E.coli*, *glnI1* aus *S. coelicolor* und *argC* aus *S. coelicolor*) konnte Banden nur auf der erwarteten Höhe nachgewiesen werden. Ein weiteres Konstrukt lieferte zusätzliche Banden zur Korrekten (*argJ* aus *S. coelicolor*.) Die nach Transformation mit dem *argJ*-Gen aus *M. tuberculosis* beobachtete Bande war über doppelt so groß wie erwartet und Transkripte der beiden *glnA*-Gene aus *S. coelicolor* konnten in der Pflanze gar nicht nachgewiesen werden. Pflanzen mit starker Expression der Gene mit korrekten Transkripten wurden an die AG Lockau und die AG Wohlleben zur Bestimmung des AS-Gehalts weitergegeben.

Gene aus Aminosäure-Biosynthesewegen wurden durch das Einkreuzen hochexprimierender Linien in Tabaklinien mit Cyanophycin-Synthetasegenen transferiert. Zwei Linien mit dem cytoplasmatisch bzw. dem plastidär exprimierten *cy-cys*-Gen wurden mit einer hochexprimierenden Tabaklinie mit dem *glnA*-Gen aus *E.coli* gekreuzt. Außerdem wurde eine Tabaklinie mit dem *cy-coc*-Gen, die bereits Cyanophycin produziert, mit der Tabaklinie mit *glnA* aus *E.coli* sowie einer Tabaklinie mit *glnII* gekreuzt. Ein Schema dieser Kreuzungen ist in Abbildung 9 gezeigt.

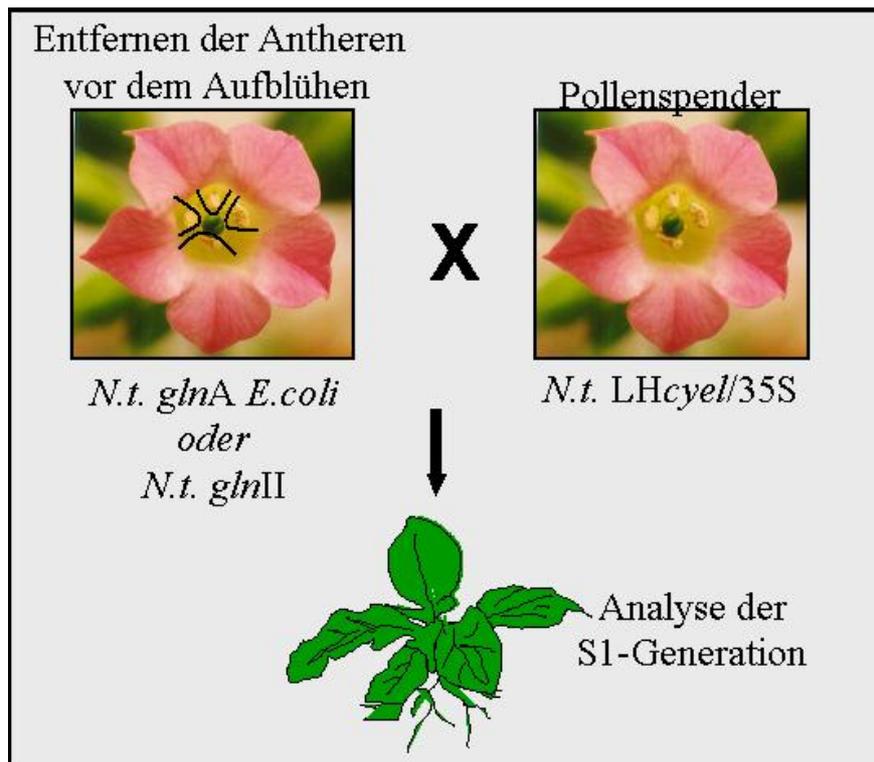


Abb. 9: Schema von Kreuzungen von hochexprimierenden Tabaklinien, in die zusätzliche Gene aus Aminosäure-Biosynthesewegen eingekreuzt wurden (*glnA* bzw. *glnII*, als Mutterpflanze) mit einer Tabaklinie, die das Cyanophycin-Synthetasegen aus *Synechococcus elongatus* cytoplasmatisch konstitutiv exprimiert (Pollenspender).

Die Nachkommen dieser Pflanze werden in einem Folgeprojekt auf Cyanophycin-Produktion und Aminosäuregehalt hin analysiert.

Da bereits die Expression des unmodifizierten *cy-coc*-Gens ohne zusätzliche Aminosäure-Supplementation in Tabakpflanzen zur Bildung größerer Mengen an löslichem Cyanophycin ermöglichte, erwarten wir nach dem bisherigen Stand der Arbeiten, dass die beschriebenen Maßnahmen zur Optimierung der Expression mit diesem Cyanophycin-Synthetasegen zur Bildung kommerziell verwertbarer Mengen an Cyanophycin führen.

## **Perspektiven für einen Nachfolgeantrag**

- Transformation von Kartoffel mit den knollenspezifisch exprimierten *cy-coc*-Genen und molekulare Analyse der transgenen Pflanzen
- Fusion des *cy-coc*-Gens mit dem Signalpeptid aus Erbse für einen Transfer der Cyanophycin-Synthetase in den Chloroplasten, Transformation von Tabak und Kartoffel und molekulare Analyse der transgenen Pflanzen
- Analyse von *cy-coc*-Pflanzen, in die Genen aus Aminosäuresynthesewegen eingekreuzt wurden
- Gleichzeitige Transformation von Pflanzen mit Genen aus Aminosäuresynthesewegen sowie dem knollenspezifisch exprimierten *cy-coc*-Gen (auf einer T-DNA)
- Erhöhung der Transkriptionsrate des *cy-coc* Gens durch spezifische DNA Elemente
- Analyse der Stabilisierung der *cy-coc* RNA durch die Eliminierung von Spleißsites in transgenen Kartoffeln
- Analyse von bakteriellen Genen, die bereits in Bakterien für eine lösliche Cyanophycin-ähnliche Substanz kodieren in transgenen Pflanzen.

## **Zusammenfassung:**

Der Ablauf der Arbeiten und die daraus gewonnenen Ergebnisse entsprechen den in der Vorhabensbeschreibung aufgeführten Arbeitszielen, Arbeitsplänen und erwarteten Erfolgsaussichten. Eine Änderung der Vorhabensziele war deshalb nicht notwendig. Der Mittelverbrauch lag ebenfalls im Rahmen der beantragten Mittel. Wissenschaftliche Erkenntnisse, die den Verlauf des Projektes beeinflussen liegen nicht vor. Bisher wurden vom Zuwendungsempfänger im Rahmen des Projektes Schutzrechte für eine Erfindungen angemeldet.

## **Veröffentlichungen:**

Eine Veröffentlichung über die Expression des *cy-coc*-Gens in transgenen Pflanzen für *Nature Biotechnology* wird zur Zeit geschrieben, eine weitere zum Vergleich der verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene ist geplant. Die Ergebnisse wurden bereits auf verschiedenen auch internationalen Tagungen vorgestellt.