

Forschungsvorhaben: Trilaterales Projekt

Genosome -

Vergleichende genomische Analyse der Meristementwicklung in Solanaceae

Förderkennzeichen: 0313149A

Zuwendungsempfänger: Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
(IPK Gatersleben):

Ausführende Stelle: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Projektleiter: Dr. Uwe Scholz, Prof. Uwe Sonnewald, **Dr. Sophia Sonnewald (Koordinator)**

Laufzeit: 01.09.2004 bis 31.12.2007 (Beginn: 01.01.2005)

I. 1. Aufgabenstellung

Ziel des trilateralen Verbundprojektes war es am Beispiel von Tomaten- und Kartoffelpflanzen die molekularen Mechanismen der Meristemfunktion und -aktivität zu untersuchen. Dazu hatten sich fünf Arbeitsgruppen aus Spanien, Frankreich und Deutschland zusammengeschlossen, um verschiedene Meristem-assoziierte Entwicklungsprozesse zu untersuchen. So wurden neben Veränderungen in der Meristemaktivität, wie sie bei Bildung von Kartoffelknollen aus Stolonen stattfindet, die Regulation und Ausbildung von axillären Meristemen und die Re-aktivierung von dormanten in aktive Meristeme, wie sie bei der Keimung von Kartoffelknollen erfolgt, studiert. Die vergleichende bioinformatische Analyse von Transkriptprofilen sollte zur Identifizierung von für die entsprechenden Entwicklungsprozesse spezifischen und übergeordneten Regulatoren führen. Die funktionelle Überprüfung identifizierter Kandidatengene sollte durch Expression in transgenen Pflanzen unter Verwendung spezifischer Promotoren erfolgen. Dazu wurde geprüft, ob bereits bekannte Regulatoren und meristem-spezifische Promotoren aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* auch in Solanaceae Anwendung finden können.

Die Ergebnisse werden neue biotechnologische Ansätze liefern, um die Kohlenhydratverteilung, den Ertrag und die Lagerfähigkeit von Erntegut zu verbessern.

Die Identifizierung von Genen, die die Dormanz von Kartoffelknollen kontrollieren, die Bereitstellung von Datenbanken und bioinformatischen Analysetools sowie die vergleichende Datenanalyse waren Bestandteil dieses Arbeitspaketes.

Partner 1: Regulation der Dormanz bei Kartoffelknollen

Prof. Dr. Uwe Sonnewald, Dr. Sophia Sonnewald, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK): Abteilung Molekulare Zellbiologie, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben; ab 01.08.2005 Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biochemie, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen

Partner 2: Bereitstellung von Datenbanken; Analysetools und bioinformatische Datenanalyse

Dr. Uwe Scholz, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK): Abteilung Cytogenetik und Genomanalyse, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben

I. 2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Aufgrund der spezifischen Kompetenzen der einzelnen Projektpartner waren ideale Voraussetzungen für die Durchführung dieses Projektes gegeben. Die Gruppen von U. und S. Sonnewald sind an der Regulation metabolischer Prozesse durch endo- und exogene Faktoren und an der molekularen Analyse von Stoffwechselwegen interessiert. Die molekularen und biochemischen Veränderungen während der Knollenentwicklung und –

Keimung standen seit vielen Jahren im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten. So konnte u.a. gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von Saccharose wichtig für das Wachstum des Keims ist. Weiterhin wurden erste transgene Ansätze verfolgt, um die Rolle des Phytohormons Gibberellin bei der Keimung detaillierter zu untersuchen. Darüber hinaus bestand die Expertise zur Herstellung hoch-spezifischer cDNA-Banken sowie die Möglichkeit die technologischen Plattformen des IPKs, wie z.B. zur Sequenzierung und zur Erstellung von Makroarrays zu nutzen. So waren in Vorarbeiten bereits meristem-spezifische cDNA-Bibliotheken von Kartoffelknollen erzeugt, ein im Umfang begrenztes Sequenzierprogramm initiiert und Macroarray-Experimente durchgeführt worden.

U. Scholz war als Bioinformatiker wesentlich an der Erstellung der CR-EST Datenbank am IPK beteiligt und besaß bereits Erfahrungen in der Entwicklung von Datenbanken und der Datenintegration. So gab es enge Kooperationen im Rahmen des BMBF-Projektes „Bioinformatik Centrum Gatersleben-Halle: BIG-GH“. Hier wurde insbesondere an dem Teilprojekt „Aufbau eines Plant Data Warehouses“ gearbeitet. Darüber hinaus war er in das begonnene Sequenzierungsprojekt involviert und wo er maßgeblich an der Analyse der Sequenzen und der entsprechenden Auswertung beteiligt war. Weiterhin waren Erfahrung in der Verwaltung von Expressionsdaten im Besonderen von Daten basierend auf Macroarray-Experimenten vorhanden.

I. 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Start des Projektes war der 01. September 2004. Allerdings konnte in der AG von von S. Sonnewald, erst zum 01.01.2005 eine geeignete Mitarbeiterin gefunden und eingestellt werden (Frau Melanie Senning). In der AG von U. Scholz wurde der Mitarbeiter (Herr Burkhard Steuernagel) zum 15.09.2005 eingestellt. Nach Absprache mit PTJ wurde die Laufzeit bis zum 31.12.2007 kostenneutral verlängert.

Die Aufgaben waren zwischen den beiden Partnern klar verteilt. Partner 1 (U. und S. Sonnewald) waren für die molekularen Arbeiten (z.B. Herstellung der cDNA-Banken, Genexpressions-experimente, Herstellung und Analyse von transgenen Pflanzen) verantwortlich, die in WP 1.1, 2.3 und WP 3 beschrieben waren. U. Scholz war für die Erstellung der Datenbanken und die vergleichende Datenanalyse zuständig (WP4).

Im Folgenden ist der Ablauf gemäß der im Antrag aufgeführten Planung genauer beschrieben.

- Herstellung normalisierter cDNA-Banken aus ruhenden und aktiven Kartoffelaugen, Generierung eines Meristem-spezifischen c-DNA Arrays

Die normalisierten cDNA-Banken wurden aus Material vom einen Feldversuch hergestellt und als SDBN (Solanum tuberosum dormant buds normalized) und SSBN (Solanum tuberosum sprouting buds normalized) bezeichnet. 2304 ESTs der SDBN und 1152 Klone der SSBN-Bibliothek wurden sequenziert und zusammen mit den in Vorarbeiten gewonnen Sequenzen aus nicht-normalisierten cDNA-Banken analysiert und die entsprechenden

Informationen in der CR-EST Datenbank abgelegt und an die GABI-Primärdatenbank weitergeleitet.

Von der Herstellung eines eigenen auf dem ESTs der cDNA-Banken beruhenden c-DNA Arrays wurde abgesehen, da sich parallel ein Konsortium zusammengefunden hatte, mit dem Ziel einen 44K Kartoffel Oligo Chip (POCI- potato oligo chip initiative) herzustellen und gemeinsam zu nutzen. Dieser Chip umfasst(e) alle 2004 öffentlich verfügbaren Kartoffel-spezifischen EST und cDNA Sequenzen und zusätzlich bis dahin nicht publizierte Information, wie z.B. die der normalisierten Banken aus diesem Projekt. Mit Zustimmung der PTJ haben wir für unsere späteren Experimente diesen 44K Microarray verwendet, während für die initialen Analysen der kommerziell erwerbliche 10K Microarray von TIGR benutzt wurde (siehe unten)

- Erfassung der transkriptionellen Veränderungen in ruhenden und aktiven Kartoffelaugen mittels Microarrays

Zwei verschiedene Arten von Experimenten wurden durchgeführt, um die transkriptionellen Veränderungen während der Brechung der Keimruhe und dem nachfolgenden Austreiben des Keims zu erfassen. In ersten Experimenten wurde der 10K TIGR Array benutzt und mit cDNA Sonden hybridisiert, die aus ruhenden Augen bzw. aus gerade zu keimen beginnenden Kartoffelaugen präpariert wurden. Nachdem der POCI-Array Ende 2006 für uns verfügbar war, wurde damit ein vergleichbares Experiment durchgeführt und die Daten ausgewertet.

Parallel wurde ein experimentelles System etabliert, das es uns erlaubt, die Keimung ruhender Kartoffelaugen kontrolliert innerhalb von 3-5 Tagen zu induzieren. Dabei wurde die Beobachtung ausgenutzt, dass die Applikation von Gibberellinsäure (GA₃) die Keimruhe brechen und das Austreiben induzieren kann. Dieses System sollte es uns ermöglichen Gene zu identifizieren, die vor dem bzw. zum Zeitpunkt der Brechung der Keimruhe aktiv sind und daher vermutlich Schlüsselregulatoren darstellen. Daher wurde der POCI-Array zusätzlich mit Probenmaterial aus diesem experimentellen System hybridisiert.

- Identifizierung von Kandidatengenen und deren funktionale Analyse

Die Analyse der verschiedenen Expressionsprofile offenbarte eine Vielzahl von Genen, deren Expression sich während der Induktion der Keimung verändert. Für die detaillierte funktionale Untersuchung wurden zwei Gene ausgewählt; ein GA-reguliertes Gen, das als GARP (GA reguliertes Protein) bezeichnet wurde und das Kartoffel-homologe Gen zu Let6 (StLet6). Let6 ist ein Transkriptionsfaktor aus Tomate, der zur Gruppe der *Knotted-like* Homeobox Gene gehört. Die Expression von GARP wurde in transgenen Kartoffelpflanzen zunächst durch Überexpression bzw. RNAi-vermitteltes *silencing* unter Kontrolle des CaMV-35S Promoters verändert, während StLet6 durch die Expression eines RNAi-Konstruktes ausgeschaltet werden sollte.

- GA- und KNOX-abhängige Regulationsmechanismen.

Da es in der Literatur verschiedene Hinweise darauf gibt, dass KNOX-Proteine die Expression von GA-Biosynthesegenen im Meristem unterdrücken, war ein weiteres Ziel diese Beziehung näher zu charakterisieren.

In Vorarbeiten sind dazu transgene Kartoffelpflanzen erzeugt worden, die hervorgerufen durch die Expression einer GA20-oxidase bzw. einer GA2-oxidase aus *A. thaliana*, erhöhte bzw. verringerte Gehalte an biologisch-aktiven GAs aufweisen. Allerdings zeigten unsere Untersuchungen, dass die Modifikation der GA-Biosynthese ohne Einfluss auf das Keimungsverhalten der Kartoffelknollen blieb. Als Ursache dafür wird die zu geringe Aktivität des verwendeten CaMV 35S Promoters während des untersuchten Entwicklungsabschnittes angenommen. Daher wurden beide Gene auch unter Kontrolle des chimären STLS1/CaMV 35S- Promoters (L700-GA20ox; L700-GA2ox) kloniert, von dem in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass dieser in Kartoffelknollen sehr aktiv ist (Hajirezaei und Sonnewald, 1999). Zudem wurden transgene Pflanzen erzeugt, die beide Gene unter Kontrolle des UFO-Promoters (aus *Arabidopsis*) exprimieren. Der UFO-Promoter wurde im Rahmen dieses Projektes in transgenen Kartoffeln getestet und die Aktivität in austreibenden Kartoffelknollen nachgewiesen (siehe unten).

Darüber hinaus wurde die Sequenz des *Knotted-like* Gens aus Tabak (NTH15) benutzt, um in der TIGR-Datenbank nach homologen Kartoffel-EST's zu suchen. Dabei konnten drei nahe verwandte EST-Klone gefunden werden. Weitere Analysen ergaben, dass die ESTs dem in Microarray identifizierten StLet6 Klon repräsentieren. Transgene Pflanzen, die ein RNAi-Konstrukt tragen wurden erzeugt und molekular und im Hinblick auf verändertes Keimverhalten analysiert.

- Analyse Meristem-spezifischer Promotoren aus *Arabidopsis thaliana* in Kartoffelpflanzen.

Um zu prüfen inwieweit Meristem-spezifische Promotoren aus *A. thaliana* in *Solanaceae* Anwendung finden können, wurden verschiedene Promotoren ausgewählt, mit GFP oder GUS als Reportergene fusioniert und in Kartoffelpflanzen transformiert und analysiert. Die Konstrukte wurden vom französischen Partner (P. Laufs, INRA de Versailles) hergestellt und uns zur Verfügung gestellt.

- Entwicklung projektrelevanter Datenbanken

Zur Entwicklung projektrelevanter Datenbanken wurden existierende Systeme analysiert und auf ihre Adaptierbarkeit hin überprüft. Ziel war es hier bestehende Systeme zu erweitern, um so den Pflege- bzw. Administrationsaufwand nach Förderungsende des GENOSOME-Vorhabens möglichst zu minimieren. Die konkrete Umsetzung wird detailliert im Abschnitt II beschrieben.

- Vergleichende Datenanalyse