

Abschlussbericht

**Förderschwerpunkt Biotechnologie
Innovationszentrum Biokatalyse ICBio**

**Entwicklung pflanzlicher Bioreaktoren zur
nachhaltigen Produktion von
Biopharmazeutika**

(Projektlaufzeit 01.09.2002 – 31.08.2004)

Aktenzeichen
13077

Projektpartner I und Koordinator
PD Dr. Michael Kleine, PLANTON GmbH, Kiel

Projektpartner II
Prof. Dr. Jens-Michael Schröder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG	1
ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTS	2
METHODEN	5
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	9
WIRTSCHAFTLICHE UMSETZUNG UND UMWELTENTLASTUNG	32
AUSBLICK	34
SOLL/IST VERGLEICH IM MEILENSTEINPLAN	35
KOOPERATIONEN INNERHALB DES PROJEKTS	35
LITERATUR / PRÄSENTATIONEN / PATENTE	36

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des vorliegenden Projektes sollten zwei Ziele verfolgt werden.

- Erstens die Entwicklung und Optimierung eines ressourcenschonenden und nachhaltigen pflanzlichen Produktionsverfahrens für antimikrobielle Peptide humanen Ursprungs und
- zweitens die Verwendung erster Substanzmengen zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der neu produzierten rekombinanten Moleküle.

Um diese Ziele zu realisieren, wurden fünf Arbeitspakete (AP) geschnürt:

Arbeitspaket 1: Aufbau neuer Expressionskassetten

Es wurden 26 Expressionskassetten kloniert, in den binären Vektor inseriert und in die Kartoffel transformiert (Meilenstein 1 erreicht).

Arbeitspaket 2: Identifizierung neuer Promotoren

Es wurde eine Mutanten-Kollektion aus Kartoffelpflanzen, die mit einem promotorlosen GUS-Gen transformiert wurde, etabliert, um neue knollen- und artspezifische Promotoren zu selektieren. Hierzu wurden ca. 2000 transgene Linien erzeugt, die mittels GUS-Test und molekularer Methoden analysiert wurden. Es konnten Kandidatensequenzen isoliert werden, von denen zur Zeit genomische Klone $>1\text{kb}$ isoliert werden. Beim Aufbau der Expressionskassetten konnte ein artfremder Promotor selektiert werden (PlantonPro1), der eine 10-100fach höhere Expression als der 35S-Promotor aus dem CaMVirus und darüber hinaus eine knollenspezifische Aktivität aufweist. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Anzahl der erstellten Kartoffellinien nicht weiter erhöht (Meilenstein 2 weitgehend erreicht).

Arbeitspaket 3: Erstellung transgener Pflanzen

Je Konstrukt wurden mindestens 50 transgene Kartoffellinien erzeugt. Annähernd die gleiche Anzahl wurde im Gewächshaus angezogen und die Knollen geerntet. Die erstellten Pflanzen zur Produktion der rekombinanten Defensine wurden per Western- und ELISA-Analyse untersucht, um ihren Gehalt an rekombinantem Protein zu bestimmen. Dabei wurde ein Genotyp mit einer Expression von etwa 10-30 mg für das antimikrobielle Peptid HBD-2 je kg Kartoffelknolle selektiert (Meilenstein erreicht).

Arbeitspaket 4: Aufreinigung der rekombinanten Peptide aus den Pflanzen

Der in Arbeitspaket 3 selektierte Genotyp wird für die von der Firma PLANTON entwickelte großtechnische Aufreinigung von HBD-2 verwendet. Ein effizienter Aufreinigungsprozess wurde etabliert, in dem das HBD-2 mit einer hohen Reinheit ($> 97\%$) aus der Knolle extrahiert wird

(Meilenstein erreicht). Die Aufreinigung für das HBD-3 Peptid konnte nicht realisiert werden. Es wurden jedoch transgene, HBD-3 exprimierende Pflanzen erzeugt, deren Analyse noch nicht abgeschlossen ist.

Arbeitspaket 5: Antimikrobielle Tests mit den rekombinanten Peptiden

Die weitere Aufreinigung erfolgte beim Projektpartner II, der mit dem hochreinen HBD-2 Peptid die antimikrobiellen Tests etablierte und durchführte (Meilenstein erreicht). Die ersten Testergebnisse zeigten, dass rekombinantes HBD-2 vorwiegend gegen humanpathogene gramnegative Bakterien und gegen Pilze wirkt. Eine Wirkung bei grampositiven Keimen erfolgte offensichtlich nur bei einer sehr hohen Konzentration. Erstaunlicherweise zeigte sich eine sehr starke Wirkung gegen *Acinetobacter*, der ein Problemkeim insbesondere auf Intensivstationen und damit bei nosokomialen Infekten ist. Ein System für antimikrobielle Tests von β -Defensin-3 wurde ebenfalls durch Projektpartner II entwickelt (Meilenstein erreicht).

ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTS

Die Wirksamkeit antibiotisch aktiver Substanzen in der medizinischen Praxis wird zunehmend durch die Bildung resistenter Keime eingeschränkt. Verschiedene Studien (z.B. „Overcoming Antimicrobial Resistance“ der WHO; Alexander-Projekt) belegen, dass bereits heute mehr als 95% der *Staphylococcus aureus* Stämme gegen Penicillin und mehr als 60% der Stämme gegen das Penicillin-Derivat Methycillin resistent sind. Trotz der großen Anzahl verschiedener Antibiotika (150 FDA-genehmigte antibakterielle Medikamente in den USA) sind die meisten Präparate chemisch gesehen Abkömmlinge von Substanzen (z.B. Penicillin), die von Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen produziert werden. Darüber hinaus weisen Vertreter der FDA darauf hin, dass während der letzten 20 Jahre deutlich weniger antibiotische Wirkstoffe pro Jahr zugelassen wurden (Nature Biotechnology 2003, 21:1255-1256). Erst kürzlich konnte zum erstenmal seit Dekaden wieder eine Substanz, die eine neue antibiotisch wirksame Stoffklasse repräsentiert, von der FDA zugelassen werden (Daptomycin, Cubist Pharmaceuticals).

Eine neue antibiotisch aktive Molekülklasse, die erst kürzlich auch im Menschen entdeckt wurde (Harder *et al.* 1997) und ein vielversprechendes Anwendungspotenzial besitzt, stellen die antimikrobiellen Peptide dar. Diese Moleküle, die in mehrzelligen Organismen einen evolutionär gesehen alten, aber sehr effektvollen Wirkmechanismus der angeborenen Abwehr (*innate immunity*) gegen mikrobielle Erreger wie humanpathogene Bakterien, Pilze aber auch Viren (Qiunones-Mateu 2003) entfalten, können zu einer neuen innovativen Klasse von Therapeutika im Kampf gegen Infektionskrankheiten entwickelt werden (Zasloff 2002).

Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden die humanen antimikrobiellen Peptide β -Defensin 2 und 3 (Harder *et al.* 1997, 2001) bearbeitet. Die Planton GmbH besitzt die weltweiten Schutzrechte für die Vermarktung des Peptids HBD-2.

Diese humanen antimikrobiellen, die vorwiegend in Epithelien gebildet werden und deren Expression induzierbar ist, zeichnen sich durch eine besondere Aktivität aus, die das Risiko der Resistenzbildung bei Mikroben gering hält und darüber hinaus ein breites Wirkspektrum besitzt. Die antibiotisch wirksamen Substanzen sind optimal auf die physiologischen Bedürfnisse des Körpers eingestellt und repräsentieren somit eine neue Klasse von natürlichen, körperverschmelzlichen Mitteln zur Abwehr von Infektionen. Die besonderen Eigenschaften der Peptide, wie die starke antibiotische Wirkung und die komplexe Faltung, die für die Wirksamkeit essenziell ist, schließen eine effiziente, großtechnische Produktion in mikrobiellen Fermentationssystemen oder durch chemische Synthese aus.

Aus diesem Grunde war das erste Ziel des Projektes, ein umweltschonendes und nachhaltiges Verfahren zur Produktion von rekombinanten humanen β -Defensinen zu entwickeln, um damit mittelfristig aus diesen Molekülen Biopharmazeutika herzustellen und zu vermarkten.

Dazu besitzt die grüne Pflanze als photoautotropher Organismus, unter Ausnutzung des Sonnenlichts, des Treibhausgases Kohlendioxid und durch Aufnahme von mineralischen Nährstoffen die Fähigkeit, große Mengen an Biomasse, darunter auch Proteine zu produzieren. Sie bietet als Bioreaktor für rekombinante Proteine ein energetisch günstiges, ressourcenschonendes und im Sinne der Nachhaltigkeit umweltfreundliches Produktionssystem. Im Vergleich dazu erfordert die Kultivierung heterotropher Zellen in Fermentationsanlagen einen hohen Energieaufwand: zum einen in Form einer kostenintensiven „Fütterung“ mit einer Kohlenstoffquelle, zum anderen müssen die Kulturen permanent temperiert und belüftet werden.

Rohstoffe aus Pflanzen sind weitgehend CO₂-neutral. Bei ihrer Nutzung entsteht kein zusätzlicher Treibhauseffekt. Inaktiviertes Pflanzenmaterial, das nach der Aufreinigung von Biopharmazeutika der Kompostierung zugeführt wird, setzt immer nur die Menge an CO₂ frei, die es während des Wachstums der Atmosphäre entnommen hat. Ihre Verwendung kann somit helfen, den sich verstärkenden Treibhauseffekt abzumildern und globalen Klimaveränderungen entgegenzuwirken. Die Produktion von wirtschaftlich nutzbaren Proteinen in Pflanzen trägt damit zusätzlich zur Schonung endlicher fossiler Ressourcen, wie Erdöl, Erdgas und Kohle bei und eröffnet Möglichkeiten zur Verwirklichung einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft. Pflanzliche Produktionssysteme können daher mittel- bis langfristig zur Lösung von wirtschafts-, umwelt- und gesellschaftsrelevanten Problemen beitragen. Mit einer verstärkten industriellen Nutzung

pflanzlicher Systeme kann der Ressourcenverbrauch vermindert und damit die Entwicklung nachhaltiger Wirtschaftsformen im Sinne des „Sustainable Development“ und der Agenda 21 vorangetrieben werden.

Die Planton GmbH hat die Kartoffel als Produktionssystem ausgewählt, da bei der Kartoffel nicht nur Anbau-, Kultivierungs- und Erntebedingungen sowie die Prozessierungen (z.B. Stärkeindustrie) etabliert sind, sondern weil bereits sehr spezifische Bedingungen für die Arzneimittelproduktion, die von der FDA und der EMEA gefordert werden, erfüllt sind:

- Kartoffeln sind Nahrungsmittel: GRAS – „generally recognised as safe“,
- Kartoffelpflanzen werden klonal vermehrt,
- genetisch identische Populationen können somit aus einer Ausgangspflanze erzeugt werden,
- dadurch ist die Erstellung einer „transgene master bank“ möglich,
- keine Kreuzkontamination durch Fremdpolleneintrag, da vegetatives Organ (Knolle) geerntet wird,
- kein Pollen-Transfer, da männlich sterile Pflanzen verwendet werden können, bzw. die Blüte entfernt werden kann,
- Knollen sind lager- und transportfähig,
- Monitoring auf Pflanzenviren ist etabliert.

Ein weiterer großer Vorteil der Nutzung des pflanzlichen Produktionssystems ist die Vermeidung und Verminderung von Prozessabfällen im „down stream processing“ durch die weitere Aufarbeitung der Ertragsorgane. Die Kartoffelknolle als Produktionsort für rekombinante Proteine ermöglicht parallel die Extraktion der Stärke, die bis zu 20 % der Kartoffelknolle ausmacht. Die Stärke aus diesen Kartoffeln kann dann für Nichtnahrungszwecke eingesetzt werden. Die Planton GmbH führt hierzu Verhandlungen mit der Firma AVEBE, Veendam, NL (Dr. Bruinenberg), die eine Pilotanlage für die Aufarbeitung von transgenen Kartoffeln im 100 to Maßstab besitzt. Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit diese Anlage auch unter GMP-Bedingungen einzusetzen, so dass eine großtechnische Gewinnung von rekombinanten Biopharmazeutika aus der Kartoffel möglich ist. Zusammenfassend ergeben sich daraus folgende Ziele für das Projekt:

- 1) Entwicklung und Optimierung eines nachhaltigen pflanzlichen Produktionsverfahrens für Biopharmazeutika am Beispiel der humanen β -Defensine HBD-2 und HBD-3
- 2) Erzeugung erster Produktmengen im mg-Bereich, um Effektivität und Wirkspektrum der antimikrobiellen Peptide zu bestimmen.

METHODEN

Klonierungsverfahren zur Herstellung der Expressionskassetten

Die Fusionsmoleküle aus den codierenden Nukleinsäuremodulen für Transitpeptid, humanem antimikrobiellem Peptid und Promotor wurden mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung einer *proof reading*-Polymerase (*Pfu*, MBI Fermentas) hergestellt, bei dem in den beiden ersten Schritten zwei Fragmente erzeugt wurden, die durch die verwendeten Oligonukleotide zueinander komplementäre Enden besitzen. In einem zweiten Amplifikationsschritt wurden diese Fragmente aneinandergesetzt, in den pGEM T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert. Durch die PCR-Amplifikation war es möglich, die Fragmente mit den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease *XhoI* auszustatten, mit deren Hilfe die Sequenzen in die multiple Klonierungsstelle des binären Pflanzenvektors integriert wurden (siehe Abbildung 1).

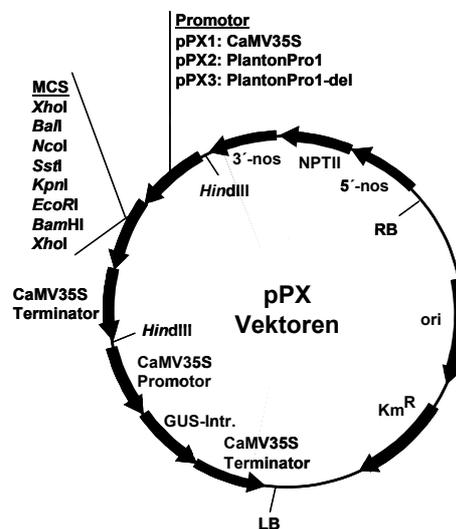


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pflanzen-Transformationsvektoren pPX mit den 3 verwendeten Promotoren CaMV35S, PlantonPro1, PlantonPro1-del. Km^R: Kanamycin-Resistenz, ori: Replikationsursprung, LB: left border, RB: right border, MCS: multiple Klonierungsstelle.

Zu Beginn der Klonierungsarbeiten stellte sich heraus, dass die umfangreichen Modifikationen am Pflanzen-Transformationsvektor (pPZP-Vektor, siehe Antrag) dazu führten, dass die Klonierung nur mit unzureichender Sicherheit und Geschwindigkeit durchgeführt werden konnte. Daraufhin wurde ein alternatives Vektorsystem etabliert, das auf der Basis der binären Vektoren der pBIN-Familie konstruiert wurde (Bevan, 1984).

Erstellung von *hairy roots* als Testsystem für die Expression von HBD-2 und HBD-3

Als Alternative zur Erzeugung der gesamten Kartoffelpflanze wurde das *hairy root* System etabliert, das dazu dienen soll, die Kombination aus Transitpeptid und Gen in einer Expressionskassette durch ein schnelles Testsystem zu untersuchen. Dabei wurde der konstitutive Promotor CaMV35S eingesetzt. Die Erstellung von *hairy roots* erfolgte durch die Behandlung von

Kartoffel-Explantaten, die aus internodalen Sprossabschnitten steril angezogener Pflanzen der Sorte Desiree bestanden, mit rekombinantem *Agrobacterium rhizogenes*. Diese enthielten die unterschiedlichen Expressionskassetten in Form eines binären Vektors. Nach einer 10-minütigen Inokulation mit Bakteriensuspension wurden die behandelten Explantate kurz auf Whatman-Papier getrocknet und auf MS-Medium ausgelegt. Bereits nach 8-10 Tagen kam es zu einer Bildung von Wurzeln an den Schnittstellen der Explantate. Die Wurzelspitzen wurden in Form von etwa 2-4 cm langen Abschnitten auf Cefotaxim-haltiges MS-Agarmedium (400 µg/µl) überführt und im Dunkeln gehalten. Nachdem die Agrobakterien durch das Antibiotikum abgetötet worden waren, wurde ein Teil der Wurzelkultur in Flüssigmedium angezogen. Mittels dieses Testsystems ist es möglich, etwa 60 Tage nach der Agrobakterium-Transformation das Protein aus dem Wurzelgewebe zu isolieren und die Menge des rekombinanten Peptids mit Hilfe der Western-Immunoreaktion zu quantifizieren.

Inverse PCR zur Identifizierung neuer knollenspezifischer Promotoren

Zur Identifizierung neuer regulatorischer Kartoffelsequenzen wurde das GUS-Reportergen aus dem binären Vektor pPROMTAG1 mittels Agrobakterium in das Kartoffelgenom integriert. Aus den erzeugten transgenen Kartoffellinien, die ein Knollen-spezifisches GUS-Signal aufwiesen, wurde zur Isolation des regulatorischen DNA-Bereichs zunächst genomische DNA isoliert. Dabei kam das Verfahren der inversen PCR (iPCR) zum Einsatz, das darauf beruht, den Bereich stromaufwärts der T-DNA Integration mittels PCR zu amplifizieren (vergleiche Antrag, Abbildung 5). Dazu wurde die genomische Kartoffel-DNA zunächst mit einem Restriktionsenzym behandelt, das an einer definierten Stelle innerhalb des GUS Gens schneidet. In einem Ligationsschritt wurde die DNA zirkularisiert. Mit Hilfe von GUS-spezifischen *primern* wurde in einem Amplifikationsschritt der gesuchte Bereich vervielfältigt und sequenziert. Durch eine sogenannte *nested* PCR, bei der der ersten PCR ein weiterer Amplifikationsschritt mit einem zweiten *primer*-Paar folgt, wurde die Spezifität der Amplifizierung erhöht. Für die iPCR wurden die Restriktionsendonukleasen *Bst*BI, *Hae*II und *Pst*I eingesetzt. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die Position der Restriktionsstellen und die relative Lage der verwendeten *primer*.

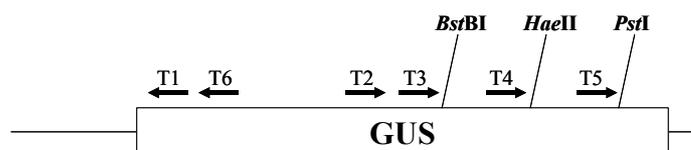


Abbildung 2: Übersicht der relativen Position der Restriktionsstellen und *primer*-Bindungsstellen innerhalb der Sequenz des Reportergens (GUS)

Proteinisolation aus Kartoffelpflanzen / -knollen und Westernanalyse mit polyklonalen Antikörpern

Das pflanzliche Protein wurde, nach dem Zellaufschluss durch Mörsern in flüssigem Stickstoff, mittels eines Isolationspuffers aus der Pflanze isoliert, nach einer Zentrifugation in einem erneuten Zentrifugationschritt gefällt und in einem Puffer gelöst. Eine entsprechende Proteinmenge wird auf ein PAA-Gel geladen, für 100 Minuten bei 80 V aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia) im *semi dry* Verfahren transferiert. Die Detektion des HBD-2 erfolgt mittels eines affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpers (Peprotec).

Sandwich-ELISA mit polyklonalen Antikörpern

Für eine genauere Quantifizierung mit höherem Durchsatz wurde ein Sandwich-ELISA etabliert. Dazu wurden Maxisorb-Platten der Firma NUNC verwendet. Die Beschichtung mit polyklonalem anti-HBD2-Antikörper erfolgte in Carbonatpuffer 50mM (1:1500) über Nacht bei RT. Nach einem Waschschrift mit 1x PBS (+ 0,1 % Tween 20) wurden die HBD2-Standard- und Pflanzenprotein-Proben in 1x PBS (+ 1 % BSA) verdünnen. Nach einer Inkubation von 3 Stunden wurde ein polyklonaler BIOTIN-anti-HBD2-Antikörper in 1x PBS (+ 0,1 % Tween 20) in einer Verdünnung von 1:300 für 2 Stunden inkubiert. Nach einem Waschschrift mittels 1x PBS (+ 0,1 % Tween 20) erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:1000 für 1 Stunde. Einem Waschschrift mittels 1 x PBS (+ 0,1 % Tween 20) folgte die Hinzugabe des TMB-Substrats (SIGMA). Die Reaktion wurde nach 1 Stunde unter Verwendung von 0,1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mit Hilfe eines Photometers bei 450nm/630nm gemessen.

Perfusionschromatographie zur Aufreinigung rekombinanter Peptide aus der Kartoffelknolle

Für die chromatographische Auftrennung der Kartoffelproteine kommt eine Variante der HPLC, die Perfusionschromatographie (Fa. Applied Biosystems (AB)) zum Einsatz. Das hierbei verwendete Säulenmaterial besteht aus porösen Kunststoffkugeln auf quervernetzter Poly-(Styren-Divinylbenzen)-basis von 20 bzw. 50 µm Durchmesser. Die Druckbeständigkeit des Säulenmaterials erlaubt im Gegensatz zur herkömmlichen Chromatographie das Ausführen hoher Flussraten, ohne dass die Qualität der Trennung leidet. Bedingt durch den hohen Fluss der mobilen Phase können Trennungen von Proteinen oder Peptiden 10 bis 100mal schneller als gewöhnlich ausgeführt werden. Für die Aufreinigung von HBD-2 kommen verschiedene Säulensysteme als Anreicherungsschritt und eine Reversed-Phase-(RP)-Säule als Reinigungsschritt zum Einsatz. Die Funktionalitäten des Perfusionschromatographie-Materials entsprechen mit einer Sulfopropyl-

Gruppe für den Kationentauscher sowie mit Alkyl-Gruppen variabler Länge für die RP-Säule der „normalen“ HPLC. Durch sorgfältige Auswahl der Lade- und Elutionsbedingungen lassen sich mit der Perfusionschromatographie erstaunlich gute Trennleistungen in denkbar kurzen Analysezeiten erzielen. Die Analyse der jeweiligen Peakzusammensetzungen der chromatographischen Fraktionen erfolgt mittels MALDI-MS. HBD-2 zeigt im MALDI-MS-Spektrum ein durchschnittliches Molekulargewicht (MW) von 4329 Da.

MALDI-TOF-MS

Die durch die Chromatographie erhaltenen Fraktionen müssen hinsichtlich ihrer Protein-zusammensetzung analysiert werden, da ein einzelner Peak aus vielen Einzelkomponenten zusammengesetzt sein kann. Neben dem HBD-2 können bei ungenügenden Trennleistungen des HPLC-Laufs noch Verunreinigungen auftreten. Die Qualitätskontrolle der HPLC-Aufreinigung wird mittels MALDI-MS durchgeführt. Wenige Mikroliter der zu untersuchenden Fraktion werden hierfür mit Matrix vermischt auf eine Stahlplatte getropft und getrocknet. Beim Trocknen kristallisiert diese Matrix in sehr feinen Nadeln aus. Im Massenspektrometer wird die in der Matrix eingebettete Probe im Vakuum durch Anregung mittels eines UV-Lasers freigesetzt und ionisiert. Die durch Protonierung positiv geladenen Proteine bzw. Peptide werden im elektrischen Feld beschleunigt und treffen entsprechend ihrer Massen nach einer definierten Flugzeit auf den Detektor. Rechnergesteuert werden Massenspektren generiert, die die jeweiligen Ionenmassen (Da) und die zugehörige Häufigkeit (Intensität) aufzeigen. Im Idealfall einer hochreinen chromatographischen Fraktion wäre nur die Masse des zu reinigenden HBD-2s ($MW_{\text{HBD-2}} = 4329$ Da) sichtbar. Zusätzliche Signale im Massenspektrum hingegen zeigen Verunreinigungen bzw. Koeluate an. Die Entwicklung der chromatographischen Aufreinigung des HBD-2 lässt sich unter Einsatz der leistungsfähigen MALDI-MS sehr gut überwachen und steuern.

Endaufreinigung HBD-2 (Projektpartner II)

Die aus Kartoffeln gewonnenen rohen HBD-2-Präparationen wurden in wässriger Trifluoressigsäure gelöst und an einer präparativen Umkehrphasen (RP)-HPLC-Säule (Macherey & Nagel) getrennt. Dazu wurden die Proben auf die Säule appliziert und mithilfe eines ansteigenden Gradienten in TFA-haltigem Wasser HBD-2 aufgetrennt und fraktioniert. Die Fraktionen wurden sowohl biologisch (mit Hilfe des Agarose-Overlay-Verfahrens (Methods in Molecular Biology Vol. 78, ANTIBACTERIAL PEPTIDE PROTOCOL, ed. William M. Shafer, Humana Press, Totowa/New Jersey, 1997) hinsichtlich antimikrobieller Aktivität gegen *E. coli*) als auch massenspektrometrisch (MALDI) hinsichtlich der Anwesenheit von HBD-2 (die 41 Aminosäuren enthaltende Form) analysiert. Die antimikrobiell aktiven, HBD-2 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und bei -78°C gelagert.

Antimikrobielle Tests (Projektpartner II)

Für Untersuchungen der antibiotischen Eigenschaften der rekombinanten HBD-2 Präparationen wurden hochkonzentrierte Stammlösungen hergestellt und anschließend die antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl verschiedener Erreger mit Hilfe des Mikroverdünnungs-Testsystems durch seriell Ausplattieren (Methods in Molecular Biology Vol. 78, ANTIBACTERIAL PEPTIDE PROTOCOL, ed. William M. Shafer, Humana Press, Totowa/New Jersey, 1997) bestimmt. Dazu wurden die Mikroorganismen in einem salz- und nährstoffarmen Puffer (10 mM Phosphatpuffer, 0.1 % TSB) suspendiert und 3 Stunden mit einer frisch bereiteten Lösung des HBD-2 in 10 mM Phosphatpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Mikroorganismen seriell ausplattiert und die Anzahl der Kolonien bestimmt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Paket 1: Konstruktion eines Kassettensystems zur Optimierung der Expression von HBD-2 und HBD-3 mit Hilfe neuer und bereits vorhandener Promotoren, Signal- und Transitpeptide

Als wichtige Voraussetzung für die Erstellung effektiver Expressionskassetten wurden zunächst die beiden bereits vorhandenen Promotoren, der *sink*-spezifische *PlantonPro1* aus der Süßkartoffel und der Salicylsäure-induzierbare *PlantonPro2*, hinsichtlich ihrer Aktivität und Spezifität untersucht. Dazu wurden Konstrukte erstellt, die das GUS-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des jeweiligen Promotors aufwiesen. Darüber hinaus wurde ein Deletionsfragment des Promotors *PlantonPro1* untersucht.

Als Referenz für die Beurteilung der GUS-Expressionsstärke wurde der CaMV35S-Promotor eingesetzt. Die Ergebnisse der Promotor-Analysen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht über die bisher erstellten transgenen Linien. Der GUS-Assay wurde im Spross und in der Knolle (Mikroknolle) durchgeführt

Konstrukt	Anzahl Linien gesamt	Anzahl Linien im Sprossstest	GUS-Intensität Spross	Anzahl Linien	Anzahl Linien im Mikroknollentest	GUS-Intensität Knolle	Anzahl Linien
PlantonPro1/ GUS	100	49	IV	0	33	IV	6
			III	0		III	8
			II	5		II	9
			I	25		I	4
			0	19		0	6
PlantonPro1-del/ GUS	67	37	IV	0	19	IV	0
			III	3		III	6
			II	10		II	10
			I	18		I	3
			0	6		0	0
PlantonPro2/ GUS	50	10*	IV	0	4*	IV	0
			III	0		III	0
			II	0		II	0
			I	7		I	3
			0	3		0	1
CaMV35S/ GUS	100	68	IV	0	65	IV	0
			III	4		III	7
			II	7		II	8
			I	51		I	12
			0	6		0	38

Zeichenerklärung: 0 = keine GUS-Expression, I = sehr schwache GUS-Expression, II = schwache GUS-Expression, III = starke GUS-Expression, IV = sehr starke GUS-Expression, *GUS-Test nach Induktion mit 5 mM Salicylsäure.

GUS-Analyse der Aktivität des induzierbaren Promotors PlantonPro2 in Mikroknollen

Zur Überprüfung des Promotors PlantonPro2 im System Kartoffel wurde dieser mit dem GUS-Gen fusioniert und in die Kartoffelsorte Desiree transformiert. Es wurden 50 transgene Linien erzeugt und getestet. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die GUS-Expressionsmuster in den Mikroknollen zweier Linien (5 und 6) nach erfolgter Behandlung mit 5 mM Salicylsäure. Die Kontrolle wurde mit Reinst-H₂O behandelt.

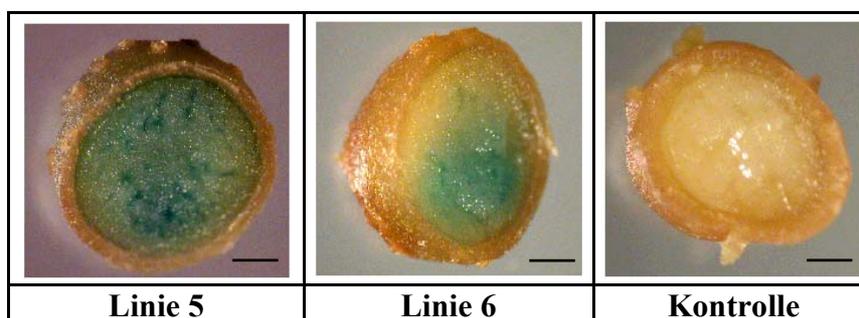


Abbildung 3: GUS-Expressionsmuster in Mikroknollen der transgenen Kartoffellinien 5 und 6. Standard: 1000 µm.

Abbildung 3 zeigt, dass die Induktion des Promotors PlantonPro2 mit Salicylsäure im System Kartoffel grundsätzlich funktioniert. Die Stärke der induzierten GUS-Expression ist im Vergleich zu den Promotoren PlantonPro1 und 35S jedoch deutlich geringer. Ein Einsatz dieses Promotors für ein effizientes Nach – Ernte - Verfahren zur Erzeugung rekombinanter Peptide in der

Kartoffelknolle ist somit denkbar. Für die Experimente zur Optimierung der Expressionskassetten wurde dieser Promotor aufgrund der Ergebnisse, die eine zu schwache Expressionsleistung zeigten, nicht eingesetzt.

GUS-Analyse der Aktivität des *sink*-spezifischen Promotors *PlantonPro1* in Blatt- und Knollengewebe transgener Kartoffellinien

Nachfolgend wird für 3 Linien die GUS-Expression im Blatt und in der Knolle unter der Kontrolle des *PlantonPro1*-Promotors exemplarisch dokumentiert (siehe Abbildung 4). Hierbei handelt es sich um Pflanzenmaterial, dass zuvor im Gewächshaus in einem Einheitserde-Sand-Gemisch kultiviert wurde.

Die GUS-Expression war bei den untersuchten Pflanzenlinien in den Blättern relativ schwach. Im Blattstiel, der Blattspreite sowie am Blattrand und dort besonders an der Blattspitze war in einigen Fällen eine höhere Expression festzustellen. Dagegen zeigten die untersuchten Knollen eine starke (Note III) bis sehr starke (Note IV) GUS-Expression (siehe Linie Nr. 4).

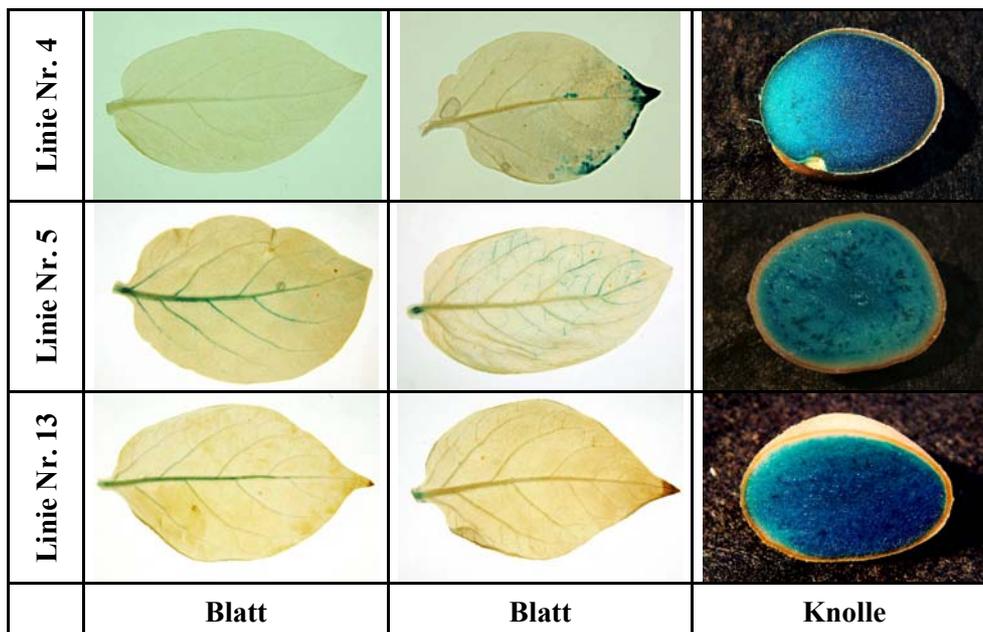


Abbildung 4: GUS-Expressionsmuster in Blatt- und Knollengewebe von *PlantonPro1*-Pflanzenlinien

Der Promotor zeigt also die Eigenschaften, die für eine Überexpression eines Peptids in der Kartoffelknolle notwendig sind. Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde der Promotor *PlantonPro1* in einer Reihe von Konstrukten eingesetzt, um mit optimierten Expressionskassetten eine weitere Steigerung der Expression von Zielproteinen in der Knolle zu erreichen.

Untersuchungen mit dem Deletionsfragment *PlantonPro1-del* zeigten, dass dieser Teil des Promotors in der Lage ist, ebenfalls eine starke Genexpression hervorzurufen. Daraufhin wurde

dieser verkürzte Promotor auch bei der Konstruktion der Expressionskassetten eingesetzt (vergleiche Tabelle 2). Eine Übersicht über die Leistungsfähigkeit der untersuchten Promotoren ist in Abbildung 5 dargestellt.

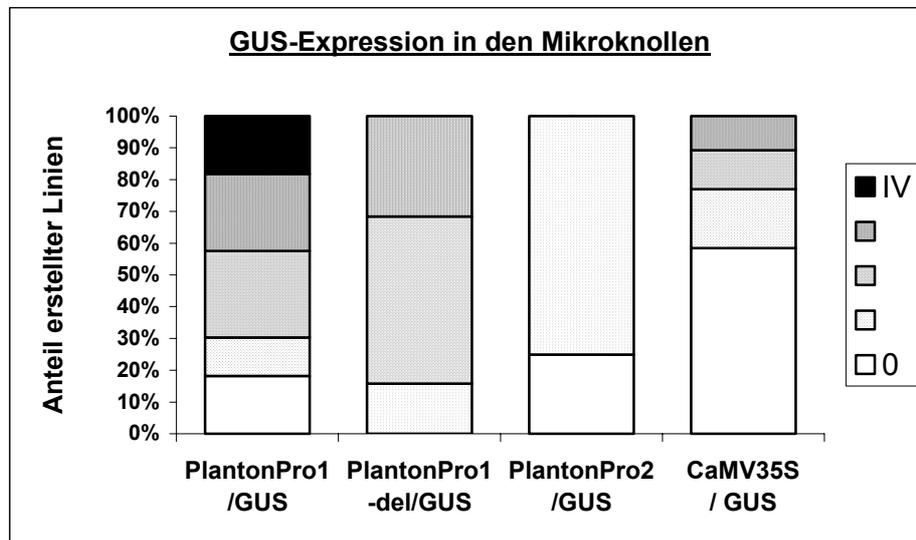


Abbildung 5: GUS-Expressionsintensität in den Mikroknollen des untersuchten Linienmaterials. 0 = keine GUS-Expression, I = sehr schwache GUS-Expression, II = schwache GUS-Expression, III = starke GUS-Expression, IV = sehr starke GUS-Expression.

Des Weiteren werden zur Zeit die putativ-regulatorischen Elemente des PlantonPro1 Promotors neu kombiniert, beziehungsweise partiell dupliziert, um somit eine mögliche Steigerung der regulatorischen Aktivität ohne einen Verlust der Spezifität zu erzielen.

Die Spezifität des PlantonPro1 Promotors wurde zusätzlich in einer Western-Analyse bestätigt. Auf diese Weise wurde eine Linie selektiert, die der bisher zur Produktion verwendeten Linie in ihrem HBD-2 Gehalt gleichkommt (siehe Abbildung 6).

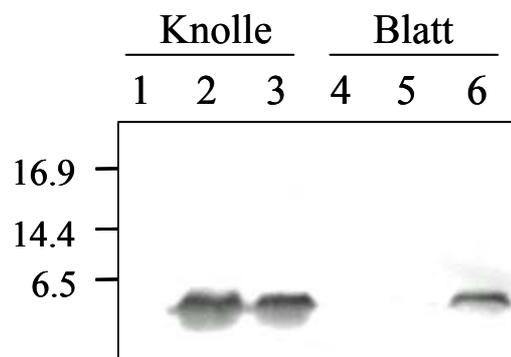


Abbildung 6: Western-Analyse mit dem HBD-2 Antikörper zur Bestätigung der Knollen-Spezifität des Promotors PlantonPro1. Zum Vergleich wurden identische Mengen Protein aus Knollen (Spuren 1-3) und aus Blattmaterial (Spuren 4-6) aufgetragen. Spuren 1 + 4: Desiree Wildtyp, Spuren 2 + 5: CaMV35S/HBD-2 Linie 17, Spuren 3 + 6: PlantonPro1/HBD-2 Linie 1.

Die Hybridisierung mit dem HBD-2 Antikörper zeigt, dass sich die Expressionsstärke zwischen CaMV35S und PlantonPro1 in der Knolle auf einem vergleichbaren Niveau liegt. Im Blattmaterial

lässt sich in der CaMV35S/ HBD-2 Linie eine deutliche HBD-2 Expression nachweisen, die in der PlantonPro1/ HBD-2 Linie nicht nachweisbar ist. Dieses Ergebnis zeigt die Richtigkeit der Strategie, den PlantonPro1-Promotor für einen Großteil der Expressionskassetten einzusetzen.

Sequenzmodifikationen des Promotors PlantonPro1

Um die regulatorische Aktivität des PlantonPro1-Promotors zu erhöhen, wurden verschiedene Bereiche des Promotors dupliziert. Das Ziel ist es, die Genexpression mit Hilfe des veränderten Promotors weiter zu steigern, ohne seine Spezifität zu zerstören. Hierfür wurden 7 Konstrukte entwickelt (Übersicht siehe Abbildung 7, A-G), die unterschiedliche Kombinationen der putativ regulatorischen Elemente des PlantonPro1-Promotors enthalten. Dazu wurden PCR-Amplifikationen der zu kombinierenden Promotorregionen durchgeführt, deren Fragmente mittels eingefügter *XhoI/XbaI* bzw. *XhoI/XhoI*-Schnittstellen miteinander verbunden wurden.

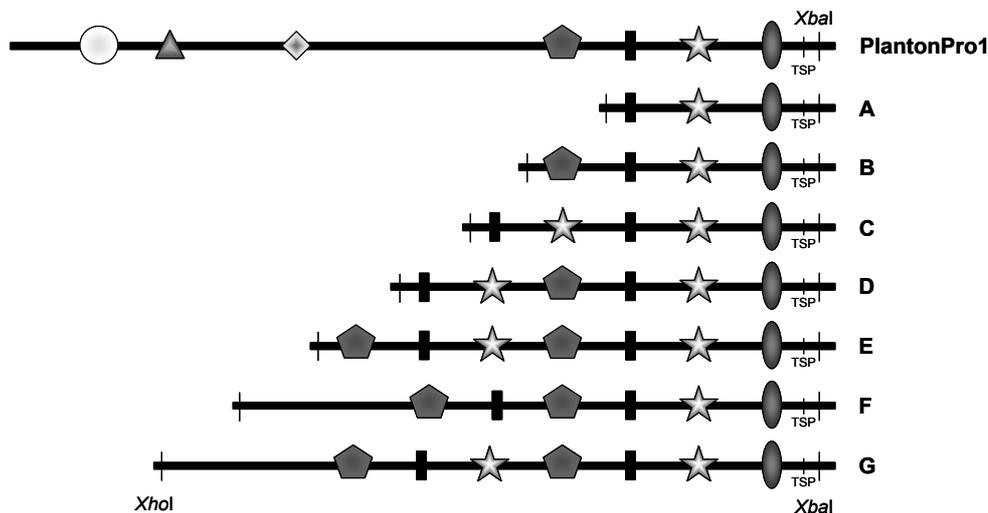


Abbildung 7: Schematische Darstellung der 7 PlantonPro1-Promotorfragmente zur Steigerung der transkriptionellen Aktivität. Die *cis*-Elemente sind mit Symbolen dargestellt.

Diese Fragmente wurden in einem Pflanzen-Transformationsvektor mit dem GUS-Reportergen kombiniert und in die Kartoffel transformiert. Von den Konstrukten C, D und F (Abbildung 7) sind bereits mehr als 40 transgene Linien erstellt. Diese werden zur Zeit im Gewächshaus angezogen und später einem GUS-Test unterzogen. Als Kontrolle dient dabei die Expressionsintensität des Ausgangspromotors PlantonPro1 (vergleiche Abbildung 4).

Erzeugung der HBD-2 und HBD-3 Expressionskassetten

Der im Antrag aufgeführte induzierbare Promotor PlantonPro2 wurde ausschliesslich in Kombination mit dem GUS-Reportergen untersucht und steht somit als Werkzeug zur zeitlich begrenzten Synthese der rekombinanten Peptide zur Verfügung. Für die Untersuchung einer größeren Anzahl von Transitpeptid/ Gen-Kombinationen erschien nach Auswertung der vielen Promotor-Reportergen Experimente der *sink*-spezifische Promotor PlantonPro1 wesentlich besser

geeignet, der sowohl in der Stärke der Aktivität als auch der Spezifität der Gen-Regulation eine auf die Kartoffelknolle beschränkte, hohe Peptid-Synthese verspricht. Die Reporter-Gen-Experimente zeigten überdies, dass ein Deletionsfragment des Promotors PlantonPro1, das Fragment PlantPro1-del in der Lage war, eine starke GUS-Färbung innerhalb der Knolle hervorzurufen, so dass diese beiden Promotoren in der Konstrukterstellung berücksichtigt wurden. Eine Aufstellung der erzeugten Konstrukte zeigt Tabelle 2. Zur Expression von HBD-2 und HBD-3 in der Kartoffel wurden 20 Expressionskassetten erstellt und in den binären Vektor pPX kloniert, womit ein Projekt-Meilenstein erreicht wurde.

Tabelle 2: Aufstellung der erstellten binären Vektoren für die Pflanzentransformation unter Angabe der verwendeten Elemente für die Expressionskassetten. (TP) Transitpeptid, (SP) Signalpeptid, (HBD-2) humanes beta-Defensin 2, (HBD-3) humanes beta-Defensin 3, (synHBD2 / synHBD3) DNA-Sequenzen mit angepasster codon-Struktur.

TP/SP \ Promotoren	TPA	TPB	SPX	SPY	ohne TP/SP
PlantonPro1	HBD-2	HBD-2	HBD-2	-	HBD-2
	-	-	synHBD-2	-	-
	HBD-3	HBD-3	-	HBD3	-
	-	-	-	synHBD3	-
PlantonPro1-del	HBD-2	HBD-2	HBD-2	-	HBD-2
	-	-	synHBD-2	-	-
	HBD-3	HBD-3	-	HBD3	-
	-	-	-	synHBD3	-
CaMV35S	HBD-2	HBD-2	HBD-2	-	-
	-	-	synHBD-2	-	-
	HBD-3	HBD-3	HBD-3	-	-
	-	-	-	synHBD3	-

Darüber hinaus wurde in diesem Stadium der Experimente ein konstitutiver Promotor (CaMV35S) verwendet, um mit einer größeren Sicherheit die optimale Kombination aus *targeting*-Sequenz und Gen zu finden, ohne die zusätzliche Variation eines Gewebe-spezifischen Promotors berücksichtigen zu müssen. Bei den bisher erstellten Konstrukten für die Pflanzentransformation wurde der Schwerpunkt auf pflanzliche Transit- und Signalsequenzen gelegt. Zusätzliche Expressionskassetten werden zur Zeit bearbeitet, die weitere Ansätze verfolgen, wie beispielsweise das Vakuolen-*targeting* oder die Veränderung der codon-Struktur des aus dem Menschen stammenden Gens HBD-2 für eine Expression in der Kartoffel. Letzteres beinhaltet eine Veränderung der transformierten DNA-Sequenz, die auf den t-RNA-Pool der Kartoffel abgestimmt ist, ohne die Aminosäureabfolge der beta-Defensin-Peptide zu verändern.

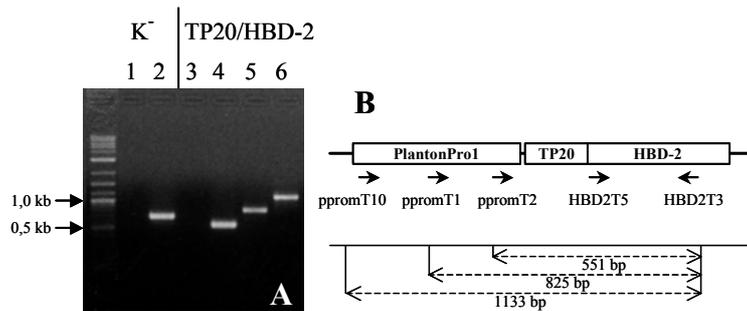


Abbildung 8: PCR-Analyse zur Identifizierung von Expressionskassetten mit erwünschter Orientierung der einzelnen Elemente. (A) EtBr-gefärbtes Agarosegel zur Auftrennung der PCR-Fragmente einer Kassette mit unerwünschter Orientierung K⁻: *primer*-Kombinationen (1) ppromT1/ HBD2T3, (2) ppromT1 / HBD2T5. Daneben die PCR-Fragmente des Klons TP20HBD-2 mit korrekter Orientierung: *primer*-Kombinationen (3) ppromT1 / HBD2T5, (4) ppromT2 / HBD2T3, (5) ppromT1 / HBD2T3, (6) ppromT10 / HBD2T3. (B) Schematische Darstellung der *primer*-Positionen.

Durch PCR- und Restriktionsanalysen konnte die korrekte Integration der Elemente nachgewiesen werden (Abbildung 8). Die korrekte Orientierung der Fragmente innerhalb der Konstrukte wurde nach der PCR-Analyse noch einmal durch eine Sequenzierung der Konstrukte bestätigt.

Der Meilenstein zur Erstellung von Konstrukten für die Pflanzentransformation ist somit erreicht. Es wird stetig an der Erstellung neuer Konstrukte gearbeitet, die eine weitere Steigerung der Peptid-Synthese bewirken sollen.

Veränderung der Codon-Struktur mittels punktmutierter Gensequenzen

Ein limitierender Faktor bei der Expression eines Art-fremden Gens in einem Organismus kann eine für den Empfängerorganismus ungünstige Codon-Zusammensetzung sein. Um festzustellen, ob eine angegliche Codon-Struktur zu einer Steigerung der Genexpression führt, wurden HBD-2 und HBD-3 Sequenzen erstellt, die gezielte stille Mutationen enthalten (Tabelle 3). Dabei wurden in die HBD-2 Sequenz 8 Veränderungen, in die HBD-3 Sequenz 11 Veränderungen eingefügt.

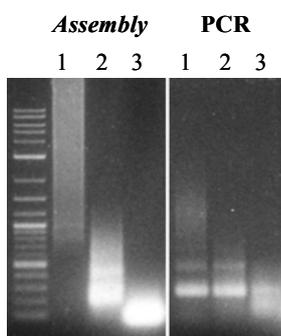


Abbildung 9: Erstellung der veränderten HBD-2 Sequenz mit Hilfe des *Single Step Assembly*. Im *Assembly*-Schritt kommt es zur Aneinanderlagerung der Oligonukleotide (Ausgangskonzentration 100 mM): Die nachfolgende PCR-Amplifikation führt zum gewünschten Fragment, das in der Gelelektrophorese zu erkennen ist. Spur 1: Verdünnung 1:1000, Spur 2: Verdünnung 1:40, Spur 3: unverdünnt.

Tabelle 3: Veränderung der Codon-Struktur der Gene HBD-2 und HBD-3. Aufgeführt sind diejenigen Aminosäuren, deren Codon verändert wurde und dessen relative Häufigkeit.

	Aminosäure	relativer Anteil
HBD-2	Serin	0,06
	Leucin	0,13
	Glycin	0,15
	Valin	0,16
	Alanin	0,16
	Threonin	0,17
HBD-3	Arginin	0,06
	Serin	0,06
	Threonin	0,07
	Leucin	0,10
	Arginin	0,12
	Leucin	0,13
	Prolin	0,13
	Leucin	0,14
	Glycin	0,15
	Valin	0,16
	Asparagin	0,37

Die beiden veränderten Sequenzen wurden erstellt (Abbildung 9), sequenziert und unter der transkriptionellen Kontrolle des CaMV35S, sowie den Promotoren PlantonPro1 und PlantonPro1-del3 in den binären Pflanzenvektor inseriert.

Paket 3: HBD-2 / Transformation, Regeneration und Selektion transgener Kartoffelpflanzen

Die bisher erstellten Expressionskassetten wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens* in die Kartoffelsorte Desiree transformiert. Nach der Regeneration und Selektion sind die entstandenen neuen transgenen Sprosse zu Linien entwickelt und als solche verschiedenen histochemischen (GUS-Test) und molekularbiologischen Tests (PCR) unterzogen worden. In der nachfolgenden Tabelle 4 sind alle bisher auf diesem Wege erstellten Linien mit den entsprechenden Ergebnissen dargestellt. Mittels Western- und ELISA-Analyse wurden die als transgen identifizierten Kartoffellinien hinsichtlich ihres relativen Gehalts an rekombinantem Protein untersucht. Da es für die Selektion der leistungsfähigsten Linie entscheidend war, die Defensin-Gehalte der Kartoffelknolle zu vergleichen, beschränkten sich die Untersuchungen seit dem letzten Bericht auf die Analyse der Knolle.

Tabelle 4: Umfang der Transformationsarbeiten zur Erstellung transgener **HBD2-Linien** und der Analysen zur Bestimmung des relativen Gehalts an HBD-2 (Western und ELISA), synHBD-2: codon-angepasste HBD-2 Sequenz; ID: interne Identifikationsnummer

Promotor	Signal-sequenz	Protein	transgene Kartoffellinien			ID
			gesamt	Western getestet	ELISA getestet	
CaMV35S		HBD-2	101	44	0	110
CaMV35S	SPX	HBD-2	100	27	0	120
PlantonPro1	SPX	HBD-2	48	42	0	157
PlantonPro1-del	SPX	HBD-2	50	16	0	158
PlantonPro1-del		HBD-2	54	34	0	159
PlantonPro1		HBD-2	45	29	0	160
CaMV35S	TPB	HBD-2	51	12	14	209
CaMV35S	TPA	HBD-2	45	16	34	210
PlantonPro1	TPB	HBD-2	46	8	27	211
PlantonPro1-del	TPB	HBD-2	36	2	25	212
PlantonPro1	TPA	HBD-2	44	4	25	213
PlantonPro1-del	TPA	HBD-2	45	0	13	214
CaMV35S	SPX	synHBD-2	44	0	41	236
PlantonPro1	SPX	synHBD-2	32	0	27	237
PlantonPro1-del	SPX	synHBD-2	34	0	29	238

Bei der Auswertung der Western zeigte sich, dass das Konstrukt SPX/HBD-2 korrekt prozessiert wird. Darüber hinaus scheint das pflanzliche Signalpeptid wichtig für die Stabilität des Moleküls in der Pflanzenzelle zu sein, da es sich bei diesen Kartoffellinien um solche mit den höchsten HBD-2 Erträgen handelt.

Um den Zeitraum zwischen einer Transformation und der Aussage über die Funktionsfähigkeit einer Expressionskassette zu verringern, wurde innerhalb der PLANTON GmbH ein Testsystem entwickelt. Hierzu wurde das *hairy root*-System etabliert, das, ebenso wie die *A. tumefaciens*-Transformation, von Sprossplantaten ausgeht und in die Generierung von transgenen Wurzeln mündet. Die in einer *in vitro*-Kultur gehalten Linien können aufgrund eines veränderten Phytohormonhaushaltes ohne Spross überleben (vergleiche Methodenteil). Hierzu wird das *Agrobacterium rhizogenes* verwendet. Die *hairy roots* werden in Flüssigkultur angezogen und benötigen bis zur Bildung von 3 g Frischgewicht einen Zeitraum von 2 Monaten. Auf diese Weise soll es ermöglicht werden, kurze Zeit nach der Fertigstellung eines Konstrukts erste Ergebnisse über dessen Funktion zu erhalten, um somit Expressionskassetten, die nicht zu einem korrekt prozessierten Peptid führen, frühzeitig aus dem Versuchsablauf zu entfernen. Bisher wurden 2 Konstrukte für die *hairy roots* Transformation eingesetzt: Konstrukt CaMV35S/TPA/HBD-2 und Konstrukt CaMV35S/SPX/HBD-3. Es liegen 50 transgene Wurzeln je Konstrukt vor. Zudem wurden entsprechende Kontrollen hergestellt. In keiner der erzeugten transgenen *hairy root*-Linien

konnte rekombinantes Peptid nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge des aus den Wurzeln zu isolierenden Proteins war scheinbar nicht ausreichend für einen sicheren Nachweis des Proteins. Die erzeugten Linien sind deshalb in Tabelle 3 nicht mehr berücksichtigt. Die Arbeiten an diesem Testsystem wurden deshalb eingestellt.

Mit Hilfe der Western-Analysen war es möglich, eine transgene Kartoffellinie zu identifizieren, die einen HBD-2 Gehalt von mehr als 5 mg pro kg Knollenfrischgewicht aufweist (siehe Abbildung 10, Spur 8). Diese Linie wird zur Zeit für die Produktion von HBD-2 eingesetzt. Parallel dazu werden neu erstellte Linien getestet, um Pflanzen mit weiter gesteigertem Defensingehalt zu selektieren, die eine effizientere Aufreinigung des Peptids ermöglichen.

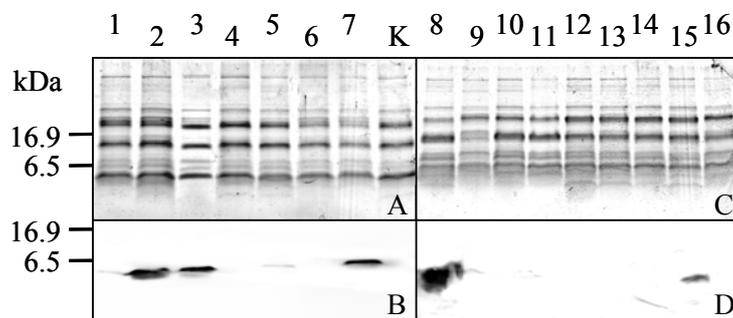


Abbildung 10: (A+C) Gelelektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von Kartoffelknollen im Polyacrylamidgel. (B+D) Westernblot-Signale der Kartoffellinien entsprechend der Reihenfolge aus dem PAA-Gel. Spuren 1-16 Proteinproben von Kartoffellinien transformiert mit Konstrukt PlantonPro1/SPX/HBD-2 (Spur 1-7) und Konstrukt CaMV35S/SPX/HBD-2 (Spuren 8-16). Als Kontrolle wurde Protein des untransformierten Wildtyps Desiree aufgetragen (K).

Bei der Beurteilung der unterschiedlichen Expressionskassetten ist der HBD-2 Gehalt der Knolle der entscheidende Parameter. Zwischen dem Generieren einer Linie nach erfolgter Transformation und der Ernte von Knollen in ausreichender Menge für eine Proteinbestimmung liegt ein Zeitraum von etwa 6 Monaten. Um die Anzahl der analysierten Linien zu steigern, wurden die Linien im Gewächshaus in 6 x 4 Topfpaletten kultiviert. Mittels dieses Verfahrens wurde eine effiziente Anzucht einer großen Anzahl von Linien gewährleistet. Sowohl hinsichtlich der Genauigkeit der Quantifizierung als auch hinsichtlich des Durchsatzes erbrachte die Entwicklung des Sandwich-ELISA eine wesentliche Verbesserung bei der Abschätzung des HBD-2 Gehalts. Es konnten 12 Linien je ELISA-Platte untersucht werden (in den Verdünnungsstufen 1:500, 1:5000 und 1:50000). Die Bearbeitung war innerhalb eines Tages abgeschlossen und die Messergebnisse erleichterten die Auswertung, da keine Abschätzungen von Signalflächen und -intensitäten notwendig war. Nach der Umstellung auf die ELISA-Untersuchung wurden alle Linien, die im Western eine der bisherigen Masterlinie annähernden HBD-2 Expression zeigten, im ELISA nachuntersucht. Zudem wurden

exemplarisch Linien derjenigen Konstrukte im ELISA untersucht, die im Western keinerlei Expression aufwiesen.

Durch die Western-Analyse war es möglich, nicht nur einen Vergleich der Kartoffellinien untereinander vorzunehmen, sondern darüber hinaus zu lokalisieren, in welchem Organ das Peptid gebildet beziehungsweise wohin es nach der Synthese in der Pflanzenzelle transloziert wird.

Abbildung 11 zeigt am Beispiel einer Linie (transformiert mit dem Konstrukt CaMV35S/SPX/HBD-2), dass das rekombinante Peptid zusammen mit der löslichen Proteinfraction aus der Zelle zu extrahieren ist. Diese Tatsache stellt eine wichtige Voraussetzung für die Pflanzenanalyse und darüber hinaus für die technische Ausrichtung des Aufreinigungsverfahrens dar.

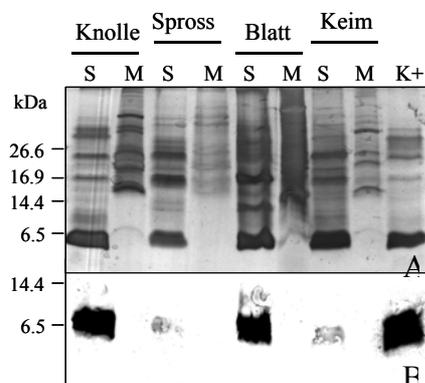


Abbildung 11: Westernanalyse der löslichen Fraktion (S) und Membran-Fraktion (M) unterschiedlicher Gewebe der Kartoffelpflanze. Abgebildet ist die Auftrennung im PAA-Gel (A) und darunter die entsprechenden Signale der western-Hybridisierung.

Die ELISA- und Western-Ergebnisse zeigen, dass die Transitpeptide nicht so gut geeignet sind, eine stabile Expression und Anreicherung in den Amyloplasten der Kartoffelknolle zu gewährleisten. Keines der Konstrukte mit den Kombinationen TPA/HBD-2 und TPB/HBD-2 rief eine ausreichende Expression des rekombinanten Peptids hervor. Diese, vor allem mittels Western erzielten Ergebnisse, wurden durch den ELISA bestätigt. Zur Zeit wird überprüft, ob die Transkription der inserierten Gene stattfindet, um zu klären, auf welcher Ebene die Biosynthese ihren Abbruch erfährt.

Der Einsatz codon-optimierter DNA-Sequenzen erwies sich als erfolgreich. Mittels ELISA wurde gezeigt, dass eine Steigerung des HBD-2 Gehalts gegenüber der bisher verwendeten Masterlinie (Abbildung 12, Spur M und Spur Linie 237-30) erzielt wird.

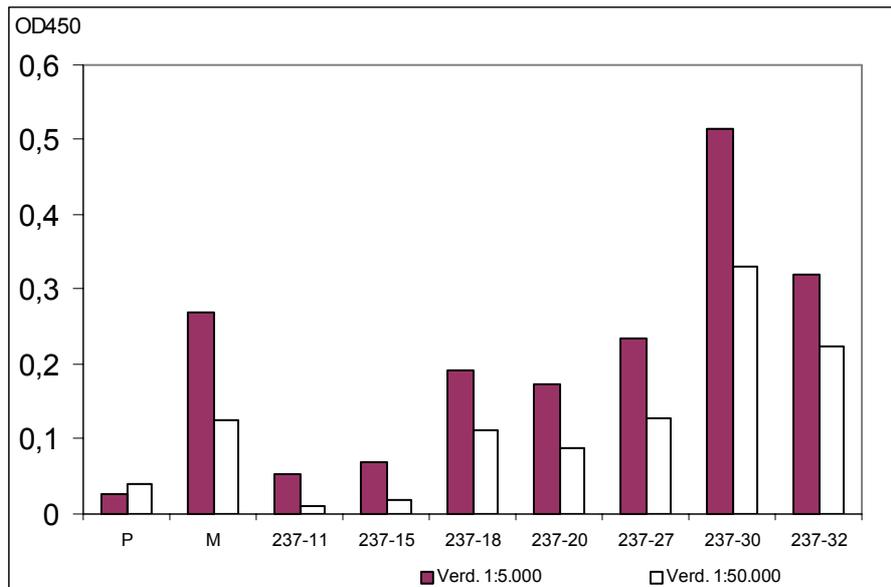


Abbildung 12: ELISA-Diagramm einer Auswahl getesteter transgener Kartoffellinien. Eingesetzt wurde Knollenextrakt, dessen Gesamtproteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt wurde. Die gemessenen OD450-Werte wurden über diesen Wert korrigiert. P: Pufferkontrolle; M: bisherige Masterlinie; 237-11 bis 237-32: getestete transgene Linien mit codon-angepasster HBD-2 Sequenz (synHBD-2).

Diese Ergebnisse sind über die eingesetzte Gesamtproteinmenge, bestimmt mittels Bradford-Assay, korrigiert. Selektiert wurden insgesamt 7 Kartoffellinien, die einen gegenüber dem letzten Bericht gesteigerten HBD-2 Gehalt aufweisen. Alle selektierten Linien tragen den PlantonPro1-Promotor. Drei dieser Linien gehen auf die Transformation mit der optimierten HBD-2 Sequenz zurück. Die sich aus den ELISA-Ergebnissen ableitenden HBD-2 Gehalte liegen bei diesen Linien zwischen 10 und 30 mg HBD-2 je Kilogramm Kartoffelknolle.

Das Proteinextrakt für die in diesem Bericht dargestellten Analysen entsammt den Knollen von jeweils 2 Pflanzen je getesteter Linie. Um eine höhere Sicherheit bei der Aussage über den HBD-2 Gehalt der selektierten Linien zu erreichen, werden die ausgesuchten Linein zur Zeit *in vitro* vermehrt. Nach diesem Vermehrungsschritt kann eine größere Anzahl Pflanzen gegeneinander getestet werden.

Paket 3: HBD-3 / Transformation, Regeneration und Selektion transgener Kartoffelpflanzen

Analog zu den Konstrukten mit dem HBD-2 Gen wurden auch solche mit dem humanen Beta-Defensin-3 Gen (HBD-3) erstellt und in die Kartoffel transformiert. Die erstellten Linien wurden angezogen und die Knollen auf HBD-3 Expression untersucht (siehe Tabelle 4).

Ein Problem bei der Detektion von HBD-3 war ein starkes Hintergrundsignal in den Westernanalysen, die eine Auswertung sehr erschwerten. Nachdem eine Reihe von polyklonalen Antikörper systematisch getestet wurde, konnte dieses Problem beseitigt werden. In den Western-Hybridisierungen, durchgeführt mit dem Antikörper der Firma Orbigen, zeigte sich ein spezifisches

HBD-3 Signal mit einer geschätzten Größe von 16 kDa (Abbildung 13). Dieses Signal zeigte sich in einer großen Anzahl von Linien. Dabei scheint die Fusion mit den pflanzlichen Transitpeptiden in Verbindung mit der maturen HBD-3 Sequenz zu stabil-exprimierten Peptiden zu führen. Aufgrund der Western-Ergebnisse wurden 8 transgene Kartoffellinien ausgesucht, die zur Zeit *in vitro* für weiterführende Untersuchungen vermehrt werden.

Das HBD-3 Molekül besitzt eine Molekülmasse von 4,9 kDa. Das Signal der Positivkontrolle, rekombinantes HBD-3 der Firma Peptotech, entspricht dieser Größe. Die Signale der getesteten Kartoffellinien lassen jedoch auf ein deutlich größeres Molekül schließen. Trotz der identischen Bedingung der Denaturierung und Beladen des SDS-Gels scheint das HBD-3 an der Bildung von Proteinkomplexen beteiligt zu sein, die zu diesem unerwarteten Signal führen. Ob es sich dabei um polymere Strukturen handelt, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt lediglich mutmaßen.

Unabhängig vom verwendeten Transitpeptid erschien dieses Signal auf einer Höhe von etwa 16 kDa. Dies gilt auch für das Fusionsprodukt kombiniert mit der maturen Sequenz von HBD-3. Dieses Peptid weist mit 7,85 kDa ein zu den beiden Fusionsproteinen mit den pflanzlichen Transitpeptiden deutlich unterschiedliches Molekulargewicht auf. Es kann sich demnach nicht um die Folge einer unvollständigen Prozessierung handeln. Die aus der DNA-Sequenz abgeleiteten molekularen Massen der HBD-3 Fusionspeptide mit TPA und TPB besitzen ein Molekulargewicht von 11,7 kDa beziehungsweise 10,6 kDa. Die Extrakte der identifizierten Linien werden zur Zeit fraktioniert und als Pool in der MS-Analytik untersucht. Dieser Schritt dient neben der Verifizierung der Ergebnisse der Westernanalyse auch der Beantwortung der Frage nach dem Prozessierungsgrad und etwaiger Unterschiede der Peptide in Abhängigkeit der eingesetzten Transit- beziehungsweise Signalpeptide.

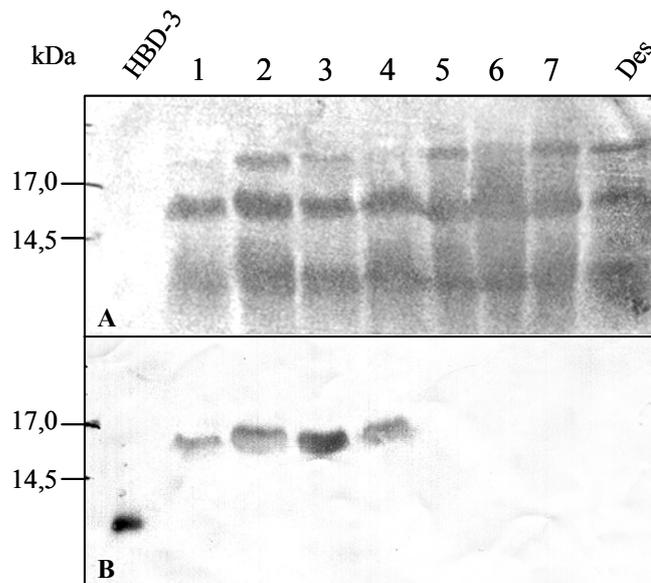


Abbildung 13: Westernanalyse einer Auswahl getesteter transgener Kartoffellinien. **A:** Ponceaurot-gefärbte Membran zur Kontrolle des Proteintransfers während des *blottings*. **B:** Westernanalyse mittels polyklonalem HBD-3 Antikörper (Orbigen). Eingesetzt wurde Proteinextrakt aus den Knollen transgener Kartoffellinien. HBD-3: rekombinantes HBD-3 (Peprotech); 1-7: getestete transgene Linien mit HBD-3 Sequenz ; Des: Wildtypkartoffel Desiree als Kontrolle.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Linien-screenings ist in Tabelle 5 dargestellt. Aus der Tabelle ist zu erkennen, dass alle Konstrukte Linien hervorgebracht haben, die HBD-3 exprimieren. Lediglich der relative Anteil an den untersuchten Linien je Konstrukt schwankt stark zwischen Werten von 2 (von 49 Linien gesamt) bis 24 (von 49 Linien gesamt). Solche Schwankungen sind bei der Untersuchung einer Gruppe transgener Linien, die aus unterschiedlichen Konstrukten hervorgehen, zu erwarten.

Tabelle 5: Umfang der Transformationsarbeiten zur Erstellung transgener **HBD3-Linien** und der Analysen zur Bestimmung des relativen Gehalts an HBD-2 (Western); ID: interne Identifikationsnummer

Promotor	Signal-sequenz	Protein	transgene Kartoffellinien im		ID
			gesamt	Western getestet	
PlantonPro1	SPY	HBD-3	46	34	228
PlantonPro1-del	SPY	HBD-3	46	30	229
CaMV35S	SPX	HBD-3	49	40	202
CaMV35S	TPB	HBD-3	46	38	203
CaMV35S	TPA	HBD-3	46	37	204
PlantonPro1	TPB	HBD-3	49	42	205
PlantonPro1-del	TPB	HBD-3	36	33	206
PlantonPro1	TPA	HBD-3	35	30	207
PlantonPro1-del	TPA	HBD-3	44	26	208

Paket 4: Entwicklung ökonomischer und umweltverträglicher Prozesse zur Aufreinigung der rekombinanten antimikrobiellen Peptide aus der Kartoffel

Die Aufreinigung des rekombinanten HBD-2s erfolgt zum Teil abweichend von dem in Antrag skizzierten Weg. Die grundlegende Reinigungsstrategie mit einer Säule als Anreicherungsschritt und mit einer nachfolgenden hydrophoben Säulenchromatographie zur Aufreinigung ist jedoch beibehalten worden. Vor der chromatographischen Auftrennung der löslichen HBD-2-haltigen Kartoffelproteine erfolgt der mechanische Zellaufschluss. Durch Zusatz von Substanzen im Extraktionspuffer werden spezifisch Alkaloide und phenolische Verbindungen gebunden und abgetrennt. Als weitere Komponenten enthält der Extraktionspuffer Tris (pH 8) und EDTA. Aus diesem Pufferauszug werden Proteine gefällt. Das HBD-2 verbleibt bei diesen Proteinfällungen immer in der löslichen Phase (MALDI-MS-Kontrolle) und wird durch Zentrifugation und Filtration von den festen Bestandteilen abgetrennt. HBD-2 zeigt im MALDI-MS-Spektrum ein durchschnittliches Molekulargewicht (MW) von 4329 Da. Vor dem ersten Chromatographieschritt werden zusätzlich Partikel durch Filtration entfernt. Nach der Extraktion der Kartoffelproteine kann der lösliche partikelfreie Anteil direkt auf eine Chromatographiesäule geladen werden. Aufgrund der geringen Molekülgröße und muss für die Elution des HBD-2s Acetonitril (ACN) als organischer Modifizier zugesetzt werden. Die anschließende notwendige Entsalzung des Eluats wird im gleichen Chromatographieschritt mit einer Reversed-Phase-(RP)-Säule erreicht.

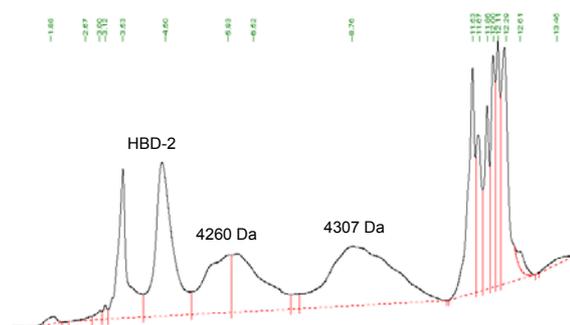


Abbildung 10: RP-Chromatogramm mit Peaks von HBD-2 und Kartoffelproteinen mit 4260 Da und 4307 Da Molekulargewicht (MALDI-Analyse)

Die chromatographisch mit einem ansteigenden Isopropanol-Gehalts eluierten Fraktionen werden mit MALDI-MS analysiert und nach dem jeweiligen HBD-2-Gehalt für die weitere Aufreinigung

selektiert. Sämtliche Fraktionen werden vom organischen Lösungsmittelanteil befreit und für die nachfolgenden chromatographischen Schritte eingeeignet.

Die chromatographische Reinigung erfolgt mittels Chromatographie in Trifluoressigsäure gegen einen ansteigenden ACN-Gradienten. Die den Elutionspuffern zugesetzte Trifluoressigsäure (TFA)

verbessert als Ionenpaarreagenz die Trennleistung des Systems und somit auch die Abtrennung des HBD-2s. Das Chromatogramm eines

Aufreinigungsschritts von HBD-2 ist in Abbildung 10 dargestellt. Die chromatographische Endreinigung erfolgt bislang im Labor von Prof.

Schröder. Die HBD-2-Fraktionen mit hoher Reinheit (>97 %, MALDI-MS-Kontrolle) werden lyophilisiert und gewogen (Abbildung 11). Da bislang nicht sämtliche Verluste des Aufreinigungswegs bekannt sind, lässt sich die Ausbeute an HBD-2 im Verhältnis zur Kartoffeleinwaage nur abschätzen.

Für die bisher verwendete Linie ergibt sich ein HBD-2-Gehalt von etwa 5 bis 10 mg pro kg Kartoffelknollen. Die neu selektierten Linien lassen einen HBD-2-Gehalt von 10 bis 30 mg pro kg Kartoffelknolle erwarten.



Abbildung 11: ca. 220 µg hochreines HBD-2 nach der Endreinigung

Ergebnisse und Erfahrungen, die im Rahmen des hier beschriebenen

Projekts erarbeitet wurden, haben bereits zu entscheidenden Verbesserungen des

Aufreinigungsprozess geführt. Als ein wichtiger Schritt für die nachhaltige Produktion von HBD-2 in Pflanzen konnte das Acetonitril als Lösungsmittel der Chromatographie aus dem Prozess

eliminiert werden. Dies bedeutet, dass ein hinsichtlich seiner Umweltverträglichkeit kritischer Stoff nicht mehr in den Prozess eingeht. Somit hat sich die ökologische Bilanz des Prozesses stark verbessert.

HBD-2 / Antimikrobielle Tests (Projektpartner II)

Angereicherte HBD-2-Proben wurden an einer präparativen Reversed-Phase-HPLC-Säule gereinigt.

Dabei galt es, zwei kationische, offensichtlich von der Kartoffel konstitutiv produzierte Peptide

abzutrennen. Dies gelang durch einen ansteigenden Acetonitril-Gradienten in Anwesenheit von

Trifluoressigsäure (TFA) an einer präparativen Säule. Trifluoressigsäure wurde als Ionenpaar-

Reagenz gewählt, da bei Lyophilisation der HBD-2-haltigen HPLC-Fraktionen überschüssiges TFA

nicht mehr in der Probe verblieb, sondern durch seine hohe Flüchtigkeit ebenfalls entfernt werden

konnte. Das verbleibende HBD-2 lag als TFA-Salz vor.

Für eine systematische Analyse des Erregerspektrums des HBD-2 wurden zunächst optimale, standardisierte Lagerbedingungen ermittelt:

Es stellte sich heraus, dass eine Lagerung als Lösung in hoher Konzentration und kleinen Volumina bei $< -78^{\circ}\text{C}$ für die Untersuchungen optimal erschien.

Für die Untersuchungen der antimikrobiellen Wirksamkeit unterschiedlicher HBD-2-Chargen wurde der sogenannte Agarose-Diffusions-Test eingesetzt, bei dem der Durchmesser des Hemmhofes (mit *E. coli* als Testkeim) ein Maß für die in der jeweiligen HPLC-Fraktion vorhandene antimikrobiell wirksame HBD-2-Menge darstellte.

Es war auffällig, dass manche Präparationen des rekombinanten HBD-2 mehrere Peaks bei der HPLC-Trennung aufwiesen, die nach der MALDI-MS-Analyse allerdings gleichartige Massen des 41 Aminosäuren enthaltenden Peptids zeigten. Wir interpretieren die Ergebnisse in der Weise, dass HBD-2 offensichtlich in unterschiedlichen aggregierten Formen vorzuliegen scheint, die in der HPLC-Zeitskala so langlebig zu sein scheinen, dass ihre Separation möglich ist. Unterschiede in der spezifischen antimikrobiellen Aktivität im Agarose-Diffusions-Assay-System haben wir bislang noch nicht feststellen können.

Für die systematische Analyse der antimikrobiellen Aktivität gegen eine Vielzahl unterschiedlichster Erreger wurden HPLC-Fractionen, die identisch hinsichtlich physikochemischer Parameter wie Retentionszeit in der HPLC, MALDI-MS-Daten, SDS-PAGE-Analysen-Daten sowie der spezifischen antimikrobiellen Aktivität (mit *E. coli* als Referenz-Stamm) waren, gepoolt und aliquotiert, um eine möglichst große Zahl unterschiedlicher Erreger mit einer identischen Charge HBD-2 testen zu können.

Ziel der Untersuchungen war es, das Erregerspektrum des rekombinanten HBD-2 möglichst weitgehend zu charakterisieren.

Da viele Erreger in dem einfacheren Agarose-Diffusions-Assay-System nicht wachsen und demnach auch eine Wachstumsinhibition nicht nachgewiesen werden kann, wurden die Untersuchungen ausschließlich im sog. Mikroverdünnungs-Assay-System durchgeführt. Bei diesem Assay werden die Mikroorganismen in einem salzarmen Puffer bei nahezu neutralem pH und bei Abwesenheit oder bei sehr geringen Mengen Nährlösung (TSB) eine definierte Zeit vorinkubiert und anschließend ausplattiert. Mit diesem Verfahren lassen sich ohne Matrixeffekte (die z. B. in Agarose zu einer eingeschränkten Diffusion führen) Ergebnisse erzielen. Die für eine Antibiotika-Testung üblichen Medien sind für die Untersuchung von Defensinen nicht geeignet, da Bestandteile der eingesetzten Medien antimikrobielle Eigenschaften der Defensine inhibieren.

Bei einzelnen Erregern, die in den für die Kultur optimalen Medien kultiviert worden waren, wurden die minimalen bakteriziden Konzentrationen bzw. auch die LD90 bestimmt. Dabei sind bislang folgende Erreger untersucht worden, die zu den nachfolgend aufgeführten noch unvollständigen Ergebnissen führten:

Tabelle 6: MBK (minimale bakterizide Konzentration) des rekombinanten HBD-2 aus der Kartoffel für verschiedene humanpathogene Erreger

Erreger	MBK (Mittelwerte) [µg/ml]	Erreger	MBK (Mittelwerte) [µg/ml]
Staphylococcus aureus	> 100	Pseudomonas aeruginosa	12,5
S. aureus MRSA	> 100	P. aeruginosa (CF)	12,5
S. epidermidis	> 100	P. fluorescens	25
Streptococcus pyogenes	> 100	P. putida	12,5
Str. pneumoniae	50 – 100	Stenotrophomonas maltophilia	25
Enterococcus faecalis	> 100	Burkholderia. cepacia	> 100
E. faecium	> 100	Brevundimonas diminuta	12,5
Coryneb. amycolatum	25	Acinetobacter baumannii	25
Coryneb. pseudodiph	12,5	Ac. Genosp. 3	0,78
E. coli	6,25	Ac. Iwoffii	0,78
Klebsiella pneumonite	30	Ac. junii	12,5
Enterobacter. cloacae	50	Ac. johnsonii	1,56
Eb. aerogenes	25	Ac. haemolyticus	1,5
Serratia marcescens	> 100	Ac. calceoaceticus	0,78
Citrobacter freundii	12,5	Ac. Genosp. 10	1,56
Proteus mirabilis	> 100	Ac. Genosp. 11	3,1
Prot. mirabilis U 1792/03	12,5		
Prot. vulgaris	12,5	Candida albicans	25
Prot. vulgaris	> 100	C. tropicalis	25
Providencia rettgeri	> 100	C. glabra	> 100
Prov. stuartii	> 100	C. parapsilos	25
Morganella morganii	> 100	Issat. orientalis	50
Aeromonas hydrophilia	> 100	Crypt. neoformans	12,5
Salmonella typhimurium	6,25	Sacch. cerevisiae	25
Yersinia enterococc.	> 100	Helicobacter pylori	50
Propionibacter acnes	100	Campylobacter jejuni	6,25
Odontogen Keime			
Prev. intermedia	12,5		
Fusob. nucleatum	100		
Actinobac. actinom.	> 100		
Strept. mutans	> 100		
Eikenella corr. Wildstamm	> 100		

Mit den bislang vorhandenen Daten wird der Eindruck verstärkt, dass HBD-2 primär gegen gramnegative Erreger gerichtet ist. Bei gramnegativen Erregern existieren deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Spezies. Interessant erscheint, dass es bei Proteus offensichtlich neben völlig

unempfindlichen Stämmen auch sehr empfindliche gibt. Auch Sprosspilze scheinen gegenüber HBD-2 empfindlich zu sein, wenngleich die Sensitivität niedriger ist als die der gramnegativen Erreger. Überraschend erscheint die ungewöhnlich hohe Empfindlichkeit verschiedener *Acinetobacter ssp.* gegenüber HBD-2, die bislang nicht erklärt werden kann.

Untersuchungen zur induzierten Resistenz gegenüber HBD-2

Am Institut für medizinische Mikrobiologie am Universitätsklinikum SH/ Campus Kiel (Frau Dr. Schubert) wurden 30 Passagen der Anzucht einer Reihe von Mikroorganismen dahingehend untersucht, ob sie in der Lage sind, eine Resistenz gegenüber HBD-2 aufzubauen.

Tabelle 7: Untersuchungen zur Resistenz von *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (MHK= 6,25 µg/ml).
w: Bakterienwachstum.

Passage	µg/ml HBD-2					
	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56
1					w	w
2					w	w
3					w	w
4					w	w
5				w	w	w
6				w	w	w
7					w	w
8					w	w
9						w
10					w	w
11						w
12				w	w	w
13					w	w
14						w
15				w	w	w
16						w
17				w	w	w
18					w	w
19					w	w
20						w
21					w	w
22				w	w	w
23					w	w
24						w
25					w	w
26					w	w
27					w	w
28						w
29					w	w
30				w	w	w

Die Ergebnisse aus Tabelle 7 zeigen, dass der getestete Stamm *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 nicht in der Lage ist, eine Unempfindlichkeit gegenüber HBD-2 aufzubauen.

Die stabile antimikrobielle Wirkung von HBD-2 ist ebenfalls an den Ergebnissen der Tests mit *Pseudomonas aeruginosa* CF 55 zu beobachten (Tabelle 8). Hier zeigt sich das identische Bild einer stabilen Wirksamkeit von HBD-2. Der Wert der 15. Passage ist dabei auf Besonderheiten der Versuchsdurchführung zurückzuführen (persönliche Mitteilung, Frau Dr. S. Schubert). Die Werte ab der 16. Passage, in denen kein Wachstum der Bakterien zu beobachten ist, zeigen, dass es nicht zum Aufbau einer Resistenz kommt.

Tabelle 8: Untersuchungen zur Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa* CF 55 MBK= 12,5 µg/ml.
w: Bakterienwachstum.

Passage	µg/ml HBD-2					
	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56
1				w	w	w
2					w	w
3					w	w
4						w
5					w	w
6					w	w
7					w	w
8					w	w
9					w	w
10					w	w
11					w	w
12					w	w
13				w	w	w
14					w	w
15	w	w	w	w	w	w
16				w	w	w
17					w	w
18					w	w
19						w
20					w	w
21						w
22					w	w
23	-	-	-	-	-	-
24						w
25					w	w
26					w	w
27					w	w
28					w	w
29					w	w
30					w	w

Die in Tabelle 6 und 7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Resistenzbildung nicht zu beobachten war. Die Untersuchungen werden zur Zeit mit weiteren Isolaten durchgeführt.

HBD-3 / Antimikrobielle Tests (Projektpartner II)

Um die antimikrobielle Aktivität von HBD-3 zu bestätigen, wurde am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Testsysteme etabliert. Ähnlich der Aktivitätsuntersuchung für HBD-3 wurde ein Erregerspektrum ausgewählt, dessen Anfälligkeit gegenüber dem Defensin untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Studien sind in einer Publikation zusammengefasst (Sahly *et al.* 2003).

Paket 2: Identifizierung neuer Promotoren aus der Kartoffel durch Promotor *tagging*

Um eine maximale Effizienz der Produktion von antimikrobiellen Peptiden in der Kartoffel zu erreichen, ist der Einsatz von Promotoren mit hoher Spezifität und hoher Expressionsleistung notwendig. In diesem Ansatz wird versucht, einen Knollen-spezifischen Promotor aus der Kartoffel zu isolieren, der dem sink-spezifischen Promotor PlantonPro1 bei gleicher Spezifität in der regulatorischen Aktivität überlegen ist. Mit Hilfe des Promotor-*tagging* wurde versucht, neuartige regulatorische Kartoffelsequenzen zu isolieren, die ausschließlich in der Knolle aktiv sind. Hierzu wurde das GUS-Reportergen mittels *A. tumefaciens* in das Kartoffelgenom integriert. Zeigte eine so erstellte Kartoffellinie eine GUS-Färbung, die auf das Knollengewebe beschränkt war, wurde der genomische Sequenzbereich stromaufwärts des GUS-Gens näher untersucht. Durch das Verfahren der inversen PCR (iPCR) wurden GUS-interne *primer*-Bindungsstellen genutzt, um den gesuchten Bereich zu isolieren (vergleiche Abbildung 7 des Antrags). Für die Herstellung der transgenen Linien wurde der binäre Vektor pPROMTAG1 verwendet, der im Bereich der T-DNA ein promotorloses GUS-Gen besitzt.

Bisher wurden im Rahmen des Promotor-*tagging* über 2000 Linien erzeugt, in denen sich das Promotor-lose GUS-Intron-Gen des Vektors pPROMTAG1 befindet. Diese Linienanzahl wurde bei einem Umfang von 20 unabhängigen Transformationen erreicht. Die Leistungsfähigkeit des bereits beschriebenen Promotors PlantonPro1 und die Tatsache, dass bereits 18 Linien mit einer starken knollenspezifischen Aktivität identifiziert wurden, ließ es als sinnvoll erscheinen, von dem ursprünglich angestrebten Ziel von 10.000 Linien abzurücken. Von den bisher mit Hilfe der Sprosstransformation erzeugten 2035 Linien liegen die GUS-Test Ergebnisse von 1209 getesteten Sprossen und von 1563 getesteten Mikroknollen vor. Die Sprosse können nach der Erstellung und vegetativen Vermehrung der Linien bereits nach 4-wöchiger Wachstumszeit einem GUS-Test unterzogen werden. Dagegen kann die Testung der Mikroknollen erst zu einem späteren Zeitpunkt (ca. 12 Wochen) nach einer entsprechenden Vorbehandlung und Kultivierung (Wachstum auf einem MS-Medium mit 6 %-iger Saccharose und Kultivierung bei 8 °C unter Kurztagsbedingungen) erfolgen. Von den 1209 getesteten Sprossen wiesen 208 Linien eine GUS-Expression auf. Die Expressionsstärke variierte dabei von sehr schwach bis stark. Die Mikroknollenergebnisse sind in der folgenden Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Zusammenfassung der GUS-Test-Ergebnisse im Rahmen des Promotor-tagging

Summe getesteter Mikroknollen	davon waren GUS-positiv	ausschließlich in der Knolle positiv	Expressionsstärke				
			0	I	II	III	IV
1563	164	77	1399	67	79	18	0

Zeichenerklärung: 0 = keine GUS-Expression, I = sehr schwache GUS-Expression, II = schwache GUS-Expression, III = starke GUS-Expression, IV = sehr starke GUS-Expression.

Von 1563 getesteten Linien war bei 164 eine GUS-Expression in der Mikroknolle nachweisbar. Hiervon wiesen 67 Linien eine sehr schwache, 79 Linien eine schwache und 18 Linien eine starke GUS-Expression auf. Potentiell interessant für die weitere Analyse dieses Pflanzenmaterials sind diejenigen Genotypen, die

1. eine starke GUS-Expression in der Knolle zeigen und die
2. keine oder nur eine relativ schwache Expression in den übrigen Pflanzenteilen aufweisen.

77 Linien, bei denen ausschließlich eine Expression in der Mikroknolle nachweisbar war, konnten bisher selektiert werden. Zunächst wurden die 15 Linien, die die stärkste Knollen-spezifische GUS-Färbung aufwiesen, untersucht. Bisher wurden 18 PCR-Fragmente ausgewählt und sequenziert mit einer durchschnittlichen Länge von 542 Basenpaaren (zwischen 92-1973 bp ohne die Bereiche mit Homologie zum GUS-Gen). Dabei stammten 11 Fragmente aus der Restriktion mit *HaeII*, 5 Fragmente aus einem Ansatz mit *BstBI* und jeweils 1 Fragment aus den Ansätzen *AlwNI* und *PstI*. Als Kontrolle diente die Restriktionsreaktion (siehe Abb. 14, K^{Ris}) der Linie 18, um sicherzustellen, dass die auftretenden PCR-Fragmente ligierte Sequenzen repräsentieren.

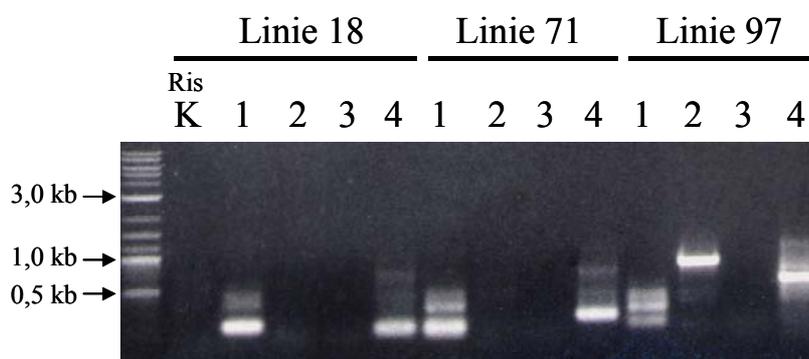


Abbildung 14: Beispiel der PCR-Amplifikation zur Isolation neuer regulatorischer Sequenzen nach einer Restriktion mit *HaeII* und anschließender PCR (Annealing: 62° C). Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Fragmenten, die aus genomischer DNA von 3 transgenen Kartoffellinien (Linie 18, 71, 97) amplifiziert wurden. K^{Ris}: PCR mit Restriktionsansatz ohne Ligation als Template; 1: DNA vor der Ligation mit Phenol/Chloroform (1:1) behandelt; 2: Einsatz von 1 µl Ligationsansatz als PCR-Template; 3: Verdünnung des Ligationsansatzes 1:10 vor der PCR; 4: Verdünnung des Ligationsansatzes 1:100 vor der PCR.

Die PCR-Fragmente wurden zum Teil in den pGEM-T Vektor kloniert oder direkt sequenziert. Eine Sequenzanalyse der Fragmente wurde durchgeführt. Zwei Fragmente, isoliert aus Kartoffellinien mit einer sehr starken Knollen-spezifischen GUS-Expression, wiesen dabei den vollständigen 5'- und 3'-Bereich des GUS-Gens auf, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um spezifische Fragmente handelt. Eine schematische Darstellung dieser PCR-Fragment (395/9 und 274/10) ist in Abbildung 15 und 16 gegeben. Die übrigen 16 Fragmente wurden als unspezifisch klassifiziert (7 Fragmente mit vollständiger Homologie zu Vektorsequenzen, 4 Fragmente lediglich mit dem 3'-Bereich des GUS-Gens und 5 ohne homologe Region zum GUS-Gen).

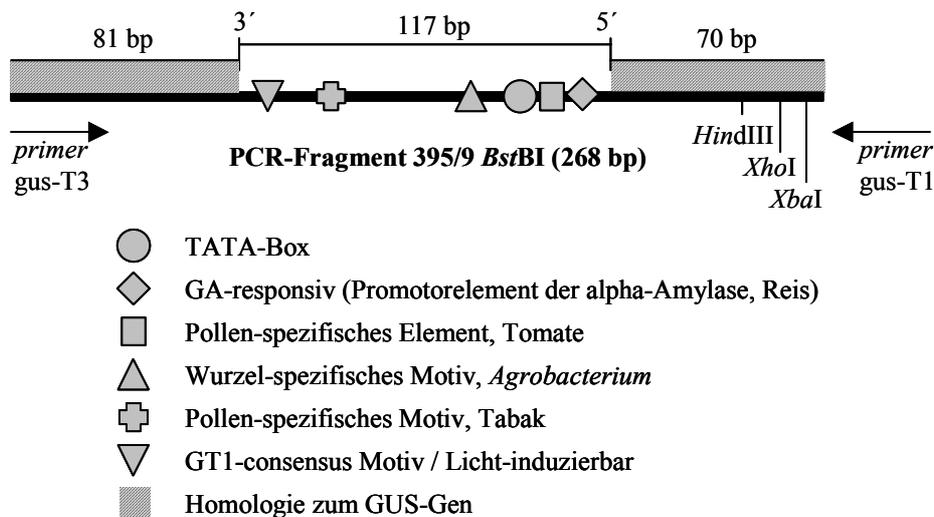


Abbildung 15: Schematische Darstellung des PCR-Fragments 395/9 *BstBI*, sequenziert mit Hilfe des primers gus-T1. Die Sequenz wies an den Enden die erwartete Homologie zum GUS-Gen auf. Innerhalb der 117 bp genomischer Kartoffelsequenz wurden putative *cis*-Elemente identifiziert, die grafisch dargestellt sind und unterhalb des Schemas erläutert werden (PLACE Datenbank, Japan: Higo *et al.* 1999).

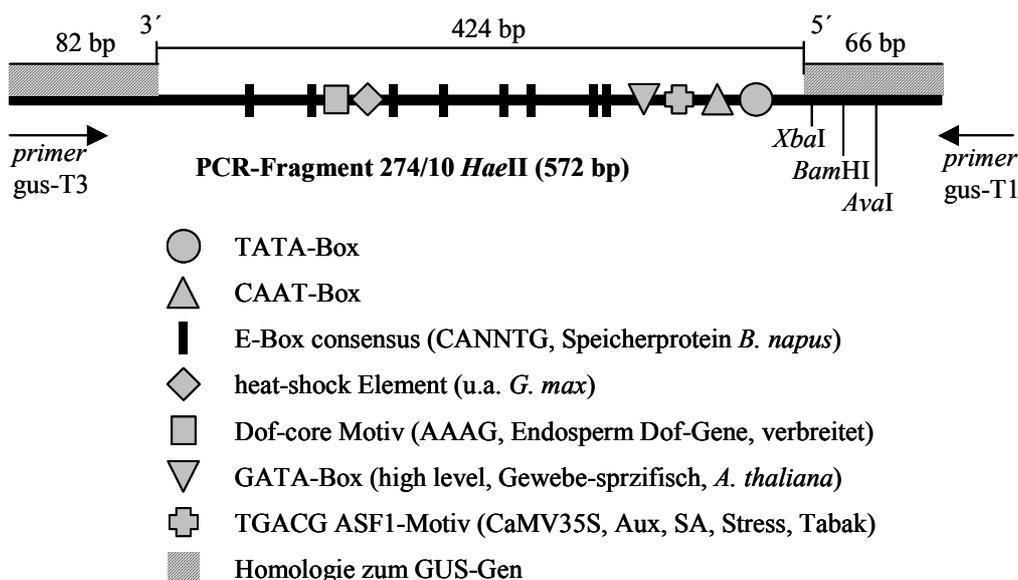


Abbildung 16: Schematische Darstellung des PCR-Fragments 274/10 *HaeII*, sequenziert mit Hilfe des primers gus-T1. Die Sequenz wies an den Enden die erwartete Homologie zum GUS-Gen auf. Innerhalb der 424 bp genomischer Kartoffelsequenz wurden putative *cis*-Elemente identifiziert, die grafisch dargestellt sind und unterhalb des Schemas erläutert werden (PLACE Datenbank, Japan: Higo *et al.* 1999).

Die isolierten Fragmente weisen eine Reihe putativer regulatorischer Elemente auf. In den folgenden Arbeitsschritten werden die oben gezeigten Sequenzen verlängert, um zwei vollständige Promotoren zu isolieren und diese auf ihre regulatorische Aktivität und auf ihre Gewebespezifität zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden die Promotoren mit dem GUS-Gen fusioniert und zur Erzeugung neuer transgener Linien verwendet, deren GUS-Muster dann zur einer etwaigen Verifizierung einer Knollen-spezifischen Promotoraktivität dient.

WIRTSCHAFTLICHE UMSETZUNG UND UMWELTENTLASTUNG

Aufgrund der Ergebnisse dieses Projekts konnte die Herstellung von rekombinantem HBD-2 etabliert werden. Sowohl bei der Erstellung leistungsfähiger transgener Kartoffellinien als auch bei der weiteren Aufarbeitung konnten entscheidende Schritte zur Entwicklung eines vermarktungsfähigen Wirkstoffs gemacht werden. In diesem Zusammenhang wurden Kontakte zu Vertretern der Pharmaindustrie aufgenommen, die die Entwicklung möglicher pharmazeutischer und kosmetischer Produkte zum Thema hatten. In diesem Zusammenhang ist die Etablierung einer großtechnischen Aufarbeitung ein entscheidendes Kriterium, konkrete Entwicklungskooperationen für die klinischen Phasen abschließen zu können. Durch die innovativen Modifikationen des Herstellungsprozesses können zum jetzigen Zeitpunkt ausreichende Mengen an rekombinantem HBD-2 auf umweltschonende Weise hergestellt werden, um damit erste präklinische toxikologische Studien als Voraussetzung für die Einleitung der klinischen Phase durchzuführen.

Die Gespräche mit der pharmazeutischen Industrie haben deutlich gemacht, dass es notwendig ist, einen günstigen Preis für HBD-2 zu erreichen. Die in diesem Projekt erreichten Ziele der effizienten Produktion des rekombinanten Peptids und der Entwicklung eines Aufreinigungsprozesses, der auch im großtechnischen Maßstab etablierbar ist, tragen dazu bei, die notwendigen niedrigen Herstellungskosten zu realisieren. Dies ist ausschließlich in großtechnischen Produktionseinheiten durchführbar. Eine erste Kosten-/ Ertragskalkulation ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Kosten- /Ertragskalkulation zur Herstellung von HBD-2 in Kartoffeln bei einem nutzbaren Gehalt von 30 mg HBD-2 /kg Kartoffelknollen..

Ertragsparameter	relativer Ertrag	absoluter Ertrag	Produktionsfaktoren	Kosten (EURO)
Agronomischer Kartoffelertrag /ha		30 t	Anbau, Ernte, Lagerung	50.000
Gesamtprotein	2 %	600,0 kg		
Lösliches Protein	10 % des Gesamtproteins	60,0 kg		
Rekombinantes Protein /ha	1,5 % des löslichen Proteins	0,9 kg	Aufarbeitung, Aufreinigung (GMP-konform)	600.000
				= 0,75 € /mg

Tabelle 10 macht deutlich, dass die entscheidenden Parameter der nutzbare Gehalt an HBD-2 je kg Kartoffelknollen und die Effizienz der Aufreinigung (GMP-konform) sind. Aus diesen Faktoren ergibt sich die Summe von 600.000 €, die für die Kartoffelmenge eines Hektars aufzuwenden ist.

Im Rahmen der Arbeiten auf dem Gebiet der Prozessoptimierung wurde die HBD-2 Aufreinigung noch einmal gänzlich überarbeitet. Dabei wurden Aufarbeitungsschritte und eingesetzte Komponenten auf ihre Notwendigkeit und eine etwaige Kollision mit den Anforderungen eines GMP-konformen Prozesses überprüft. Dies führt zu einer deutlichen Verbesserung der Umweltbilanz des Verfahrens. Aus beiden Veränderungen im Prozessablauf ergibt sich eine Entlastung der Umwelt bei gleichzeitiger Reduktion der Produktionskosten. Dies stellt einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung eines nachhaltigen Aufreinigungsprozesses dar.

Die ersten antimikrobiellen Tests, die im Rahmen dieses Vorhabens vollzogen wurden, sollen auf weitere Problemkeime, insbesondere solche, die bereits gegen herkömmliche Antibiotika resistente Stämme hervorgebracht haben, ausgedehnt werden. Somit ist mit Hilfe des vorliegenden Projektes die Entwicklung eines neuen innovativen und effektiven antimikrobiellen Wirkstoffs ein deutliches Stück vorangekommen.

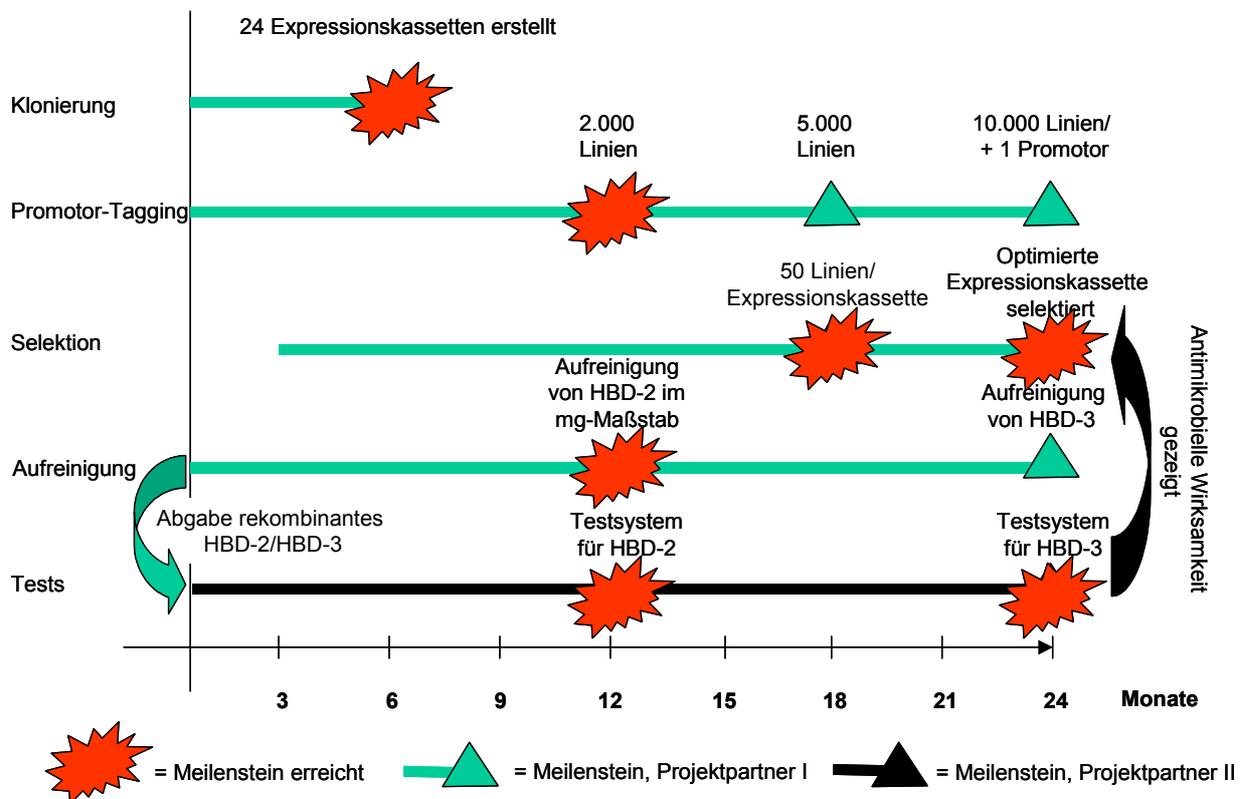
Eine ökologisch positive Eigenschaft des pflanzlichen Produktionssystems ist die ausgeglichene CO₂-Bilanz. Die PLANTON GmbH arbeitet darüber hinaus an Konzepten, die anfallende Biomasse, die als Abfallprodukt der Proteinextraktion entsteht, einer energetischen Verwertung zuzuführen. Da es sich um Reststoffe transgener Organismen handelt, liegt die Verwertung dieser Stoffe mit hoher Wahrscheinlichkeit in der industriellen Verwertung des *non food* Bereichs.

Angedacht ist die Verwertung der Stärke für technische Produkte oder die Verwertung der Biomasse in Biogasanlagen, die die gespeicherte Energie der Kartoffelknolle nutzbar macht. Dies würde einen zusätzlichen ressourcenschonenden Effekt haben, der über den einer einfachen Kompostierung der Reststoffe hinausginge.

AUSBLICK

Die Optimierung der HBD-2 Produktion wird auf dem eingeschlagenen Weg fortgesetzt. Darüber hinaus war die Expression von HBD-3 in Pflanzen ein wichtiger Schwerpunkt für die Endphase des Projekts. Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnte eine HBD-3 Expression in den erstellten Kartoffellinien nachgewiesen werden. Erste Ergebnisse mit diesem Molekül, das aus menschlichem Gewebe aufgereinigt wurde, zeigten, dass das Molekül eine starke Aktivität gegen grampositive Keime ausübt und damit HBD-2 hervorragend ergänzt (Schibli *et al.* 2002, Joly *et al.* 2004, Maisetta *et al.* 2003, Sahly *et al.* 2003). Gleichzeitig ist dieses Molekül allerdings wesentlich kationischer (pI 11) als HBD-2, worauf sich sicherlich ein Großteil der Schwierigkeiten bei der heterologen Expression und der Identifikation zurückführen lassen. Aussagen von Vertretern der Pharmaindustrie zur Folge handelt es sich bei HBD-3 um einen potenziellen Wirkstoff, der vor allem im topischen Anwendungsbereich gegen grampositive Keime ein großes Marktpotenzial besitzt. Daher werden die Arbeiten an diesem Molekül mit hoher Intensität weitergeführt. In diesem Zusammenhang strebt die PLANTON GmbH ein neues Projekt an, in dem HBD-3 eine zentrale Bedeutung zukommt.

Soll/Ist Vergleich im Meilensteinplan



KOOPERATION INNERHALB DES PROJEKTS

Zwischen dem Projektpartner I und II haben regelmäßig Projekttreffen stattgefunden. Diese fanden sowohl zwischen den Projektleitern als auch den Mitarbeitern statt. Begünstigt wurde dieser sehr direkte Kontakt durch die räumliche Nähe zwischen dem Klinikum SH und der Planton GmbH in Kiel. Dazu wurden insbesondere Aufreinigungsprotokolle für das rekombinante HBD-2 gemeinsam diskutiert, entwickelt und im jeweiligen Labor etabliert. Darüber hinaus wird bei der Planton GmbH am 8.12.03 ein 1. Symposium über HBD-2 mit den Wissenschaftlern, die mit dem rekombinanten Molekül gearbeitet und erste Ergebnisse erzielt haben, statt.

Innerhalb des ICBio Verbundes hat Projektpartner I (Dr. Michael Kleine) die Koordination der Taskforcegruppe „Projektmanagement“ übernommen. Im Rahmen dieses Engagements wurden zwei aufeinander aufbauende Seminare zum Projektmanagement als Weiterbildungsangebot für Mitglieder des ICBio-Verbundes organisiert und durchgeführt (s. hierzu Bericht des Koordinators „Projektmanagement“).

LITERATUR/PRÄSENTATIONEN/PATENTE

Veröffentlichungen

- Publikation zur Erzeugung von HBD-2 in Kartoffelknollen (in Vorbereitung)
- FAZ, Sonderbeilage Biotechnologie, 7.10.2003
- Transkript, Sonderband „Nachhaltige Biokatalyse“ 2003
- Ernst & Young, Biotechnologie Report „Zeit der Bewährung“ 2003

Fachvorträge

- | | |
|-----------------|--|
| 19.9.02 | Biotech Corporation, Schwedisches Generalkonsulat, Hamburg |
| 23.9. – 25.9.02 | Botanikertagung Freiburg |
| 29.10.02 | Dechema Regional-Kolloquium, Luckenwalde, „Neue Protein-Expressionssysteme für die Biotechnologie und Medizin“ |
| 28.11.02 | HiTechTage, Hamburg |
| 21.5. – 23.5.03 | Achema, Frankfurt |

Messen, Konferenzen

- | | |
|-------------------|---|
| 30.9. – 1.10.02 | European Biotechnology Symposium, München |
| 16.3. – 19.3.03 | Conference on Plant Made Pharmaceuticals, Québec, Kanada |
| 27.4. – 2.5.03 | 4th International Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides, Il Ciocco, Barga, Italien |
| 22.6. – 25.6.03 | Bio2003, Washington, USA |
| 7.10. – 9.10.03 | Biotechnica, Hannover |
| 20.10. – 21.10.03 | BMBF-Biotechnologietage, Leipzig |
| 06.06. – 09.06.04 | Bio2004, San Francisco, USA |

Literatur

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M and Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA-elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*, **27**: 297-300

Stemmer, W. P. C., Cramer, A., Ha, K.D., Brennan, T.M. and Heyneker, H.L. (1995) Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, **164**: 49-53.

Saly, H., Schubert, S., Harder, J., Rautenberg, P., Ullmann, U., Schröder, J., and Podschun, R. (2003) *Burkholderia* Is Highly Resistant to Human Beta-Defensin 3. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, May 2003: 1739-1741.

Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Luperini, F., Pardini, M., Bottai, D., Florio, W., Giuca, M.R., Gabriele, M., and Campa, M. (2003) Activity of β -Defensin 3 Alone or Combined with Other Antimicrobial Agents against Oral Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct. 2003: 3349-3351.

Joly, S., Maze, C., McCarty Jr., P.B., and Guthmiller, J.M. (2004) Human β -Defensins 2 and 3 Demonstrate Strain-Selective Activity against Oral Microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2004:1024-1029.

Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Twyman, R.M. (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opinion in Plant Biol.*, 7: 152-158.

Ma, J.K.C., Drake, P.M.W., and Christou, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews/Genetics*, 4: 794-805.

Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Fischer, R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnol.*, 21: 570-578.