

## 4 Diskussion

Körnerleguminosen sind eine wichtige Proteinquelle für die menschliche Ernährung. Ein wesentliches Ziel in der Züchtung von Leguminosen ist die Behebung des Mangels an schwefelhaltigen Aminosäuren. Mit den klassischen Züchtungsstrategien wie Kreuzung, Auslese von natürlichen oder induzierten Mutationen etc. konnte dieses Ziel bislang noch nicht verwirklicht werden (Bliss 1990, Müntz *et al.* 1997).

Bei der Suche nach Formen, die eine Verminderung der weniger hochwertigen Proteine zugunsten der limitierenden Proteinfraction aufwiesen, selektierten Shewry *et al.* (1980) eine lysinanreichernde Gerste mit reduzierten Prolaminwerten. Auch bei Mais und Hirse wurden entsprechende Mutanten mit veränderter Proteinzusammensetzung gefunden. Bei Leguminosen dagegen fand Schroeder (1982) bei einem *Screening* von 45 natürlichen Erbsensorten aus unterschiedlichen Ursprungsgebieten, dass der Anstieg schwefelhaltiger Speicherproteine stets von einem Rückgang anderer schwefelhaltiger Proteinfractionen begleitet wurde. Das Resultat dieser negativen Korrelation bedeutete, dass der Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren im Endeffekt konstant blieb.

Durch die pflanzliche Zell- und Gewebekultur und die Entwicklung der Gentechnik eröffneten sich neue Perspektiven in der Pflanzenzüchtung. Das Repertoire an Züchtungstechniken wurde hierdurch erweitert und die Bearbeitung bislang schwer zu erreichender Zuchtziele möglich. Seit der Veröffentlichung der ersten stabil transformierten Tabakpflanzen und der entsprechend den Mendel'schen Regeln erfolgten Vererbung des Transgens (Otten *et al.* 1981) wurden für viele weitere Pflanzenarten Transformations- und Regenerationsprotokolle erarbeitet.

Der Erfolg jeder Transformationsmethode beruht a) auf einer wirksamen Möglichkeit zur Genübertragung in die Zellen des Zielgewebes und b) auf der Verfügbarkeit eines Regenerationssystems für die transformierten Zellen. Schließlich müssen c) die neueingefügten Gene in der Wirtspflanze korrekt und stabil exprimiert werden und ihre Vererbung, und damit Verbreitung, sichergestellt sein.

Die Regenerierbarkeit transformierter Zellen stellt bei Körnerleguminosen das Nadelöhr des Prozesses dar. Oft genug sind die für eine Gentransfermethode suszeptiblen Zellen nicht identisch mit denen, die die Fähigkeit zur Regeneration besitzen (Parrott *et al.* 1989). Aus diesem Grund müssen in der Regel bei schwierigen Arten die möglichen Gentransfermethoden und Regenerationssysteme getestet und auf ihre Vereinbarkeit geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Transformationssystem für die wirtschaftlich und agronomisch bedeutsame Ackerbohne (*Vicia faba*) etabliert, welches den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer mit einem 3-stufigen Regenerationssystem verbindet, welches die Erzeugung transgener Pflanzen aus Epicotylexplantaten mittels Organogenese über eine selektive Kallusphase unter Verwendung des Wachstumsregulators TDZ erlaubt.

## 4.1 Entwicklung des Transformationssystems

### 4.1.1 Gentransfer mit *Agrobacterium tumefaciens*

In mehreren unabhängigen Transformationsexperimenten wurden stabil transformierte Linien von *Vicia faba* cv. Mythos mit Hilfe von zwei verschiedenen *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen in Kombination mit sieben verschiedenen Binärvektoren erzeugt.

Die beiden verwendeten, nicht-onkogenen L,L-Succinamopin/Agropin-Stämme EHA101 und EHA105, wie auch ihr onkogener Vorläufer A281 (Hood *et al.* 1986), werden als hochvirulent für Pflanzenzellen, insbesondere für Leguminosenarten beschrieben (Meurer *et al.* 1998, Egnin *et al.* 1998, Donaldson & Simmonds 2000, Nadolska-Orczyk & Orczyk 2000), aber auch für Tomate (van Roekel *et al.* 1993), Apfel (de Bondt *et al.* 1994), *Vaccinium ssp.* (Cao *et al.* 1998), Weizen und Gerste (Guo *et al.* 1998). Vergleiche der Effizienz von entwaffneten Ti-Plasmiden vom Nopalalin-, Octopin- und Succinamopin- Typ für die Transformation von Lavendel ergaben eine Überlegenheit der Succinamopin-Stämme AGL1 und EHA105, welche an über 50% der kokultivierten Explantate Kalluswachstum bewirkten (Dronne *et al.* 1999). Die Inokulation von *Vicia faba* Explantaten mit EHA101 und EHA105 führte zu Transformationsraten von bis zu 30%, bezogen auf das Wachstum von transgenem Kallus auf selektiven Medien, womit die Virulenz von EHA101 bzw. EHA105 für *Vicia faba* in einem günstigen Bereich lag. Deutliche Unterschiede in den Transformationsraten der durchgeführten Versuche (zwischen 3% und 30%) könnten ihre Ursache in der unterschiedlichen Effektivität der verwendeten Transformationsvektoren haben, eine Beobachtung, die auch für *Vicia faba* von Kramer (2002) beschrieben wurde.

Die Zugabe von Acetosyringon zum Versuchsansatz wurde von Stachel *et al.* (1985) als Mittel zur Aktivierung des T-DNA Transfers beschrieben. Dass die Zugabe von Acetosyringon zum Medium der Kokultur transformationsfördernd wirken kann, ist vor allem für weniger virulente Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* (z.B. C58C1) publiziert worden. Untersuchungen zur genetischen Transformation von Gerste mit supervirulenten Agrobakterienstämmen (AGL1, AGL0) zeigten, dass die Verwendung von Acetosyringon zur Induzierung der *vir*-Gene nicht notwendig war (Tingay *et al.* 1997, Fang *et al.* 2002, Popelka & Altpeter 2003). Für die hypervirulenten Stämme EHA101 und EHA105 ist eine fördernde Wirkung durch Acetosyringon ebenfalls nicht bekannt (Nadolska-Orczyk & Orczyk 2000), es wurde deshalb für die Transformation von *Vicia faba* nicht verwendet.

Versuche mit unterschiedlicher Dauer der Kokultur wurden in einem Bereich von 2 bis 12 Tagen durchgeführt. Der optimale Zeitraum zur Inkubation mit *Agrobacterium* wurde mit 3-4 Tagen bestimmt. Längere Inkubationszeiten führten zu einem unkontrollierbaren Bakterienüberwuchs, der sich letztendlich als schädlich für das pflanzliche Gewebe erwies. Die Bakterienkulturen konnten nicht mehr aus den Kallussen entfernt werden und führten zum Absterben des Pflanzengewebes. Die Beobachtung, dass das Überschreiten

einer viertägigen Dauer der Kokultur nachteilige Auswirkungen hat, wurde auch von de Clercq (2002) bei der Transformation von *Phaseolus* beschrieben; ebenso von Yan *et al.* (2000) bei *Glycine max* und Dronne *et al.* (1999) bei *Lavandula*.

Bei der Transformation von *Vicia faba* mit *Agrobacterium tumefaciens* konnten im Durchschnitt 10-20% resistenter Kallus selektiert werden. Die Expression der übertragenen Genkonstrukte in den selektierten Kallussen konnte im Fall des *uidA*-Gens mit dem enzymatischen GUS-Assay sichtbar gemacht werden, die Aktivität der Phosphinotricinacetyltransferase konnte im PAT-Assay gezeigt werden. Der erfolgte Gentransfer und die Integration des Transgens in das Genom der Pflanze konnte somit nachgewiesen werden.

Da der so gewonnene transgene Kallus noch durch das Nadelöhr der Regeneration geschleust werden musste, lag die Transformationsfrequenz, d.h. die Anzahl regenerierter Pflanzen im Verhältnis zu der Menge an inokulierten Explantaten, deutlich niedriger. Sie betrug für die jeweiligen Versuchsanordnungen zwischen 0,08 und 1,2 % für *Vicia faba* cv Mythos. Die relativ geringe Transformationsfrequenz steht in Übereinstimmung mit einer Reihe von Ergebnissen der Transformationsprotokollen anderer, schwierig zu handhabender Leguminosen z.B. mit Erdnuß 0,2-0,3 % (Cheng *et al.* 1996), Lupine 0,01 % (Molvig *et al.* 1997), Guar 0,3-0,8 % (Joersbo *et al.* 1999), Sojabohne 0,03 % (Yan *et al.* 2000), Kichererbse 0,5-1,3 % (Tewari-Singh *et al.* 2004).

#### **4.1.2 Einsatz von Antibiotika zur Selektion und zur Eliminierung der Agrobakterien**

Die Selektion für das *nptII*-Gen wurde mit den Aminoglycosiden Kanamycin (in Phase I) bzw. G418 (in Phase III) durchgeführt. G418 (3',4'-dihydroxy-6'-hydroxy-6'-deamino-Gentamicin) ist strukturell mit Gentamicin verwandt, mit einer OH-Substitution der C6'Aminogruppe. Es verhindert nicht nur die prokaryontische Biosynthese, sondern interagiert darüber hinaus mit den 80S-Ribosomen der eukaryontischen Zellen und ist deshalb für die Humantherapie ungeeignet, wird jedoch gewöhnlich, ebenso wie Hygromycin, als dominanter Selektionsmarker bei eukaryontischen Klonierungsvektoren verwendet (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999).

Aus der Humantherapie ist bekannt, dass geringe Mengen von Gentamicin die Wirkung von Penicillinen und Cephalosporinen verstärken (Simon & Stille 2002), umgekehrt jedoch eine hohe Konzentration von Penicillinen und/oder Cephalosporinen Gentamicin größtenteils inaktiviert (Chambers & Sande 1998). Dieser Effekt scheint auch bei der Verwendung von G418 zur Selektion transformierter Pflanzenzellen (in Phase I) aufzutreten, wenn gleichzeitig ein Cephalosporin (Claforan) oder Carboxypenicillin (Betabactyl, Carbenicillin) in Konzentrationen von bis zu 500 mg/l zur Eliminierung der Agrobakterienpopulation nach der Kokultur ins Kulturmedium gegeben wurde. Die mangelnde Selektionswirkung von G418 in der ersten Phase nach der Kokultur konnte mit der Verwendung von Kanamycin umgangen werden, da eine Inaktivierung bei

Kanamycin nicht auftritt und auch nicht beschrieben wurde. Die Verwendung von G418 war während der Kallusselektion nicht möglich, es wurde aber aufgrund seiner guten Verträglichkeit und Selektionswirkung bei Pflanzen in Phase III zur Selektion von Sprossen eingesetzt.

In Phase II (Sproßinduktion) wurde mit der Selektion ausgesetzt, weil das Vorhandensein von Kanamycin im Kulturmedium die Regeneration verlangsamt bzw. hemmt (Müller *et al.* 2001, Horlemann *et al.* 2003). Eine Vorgehensweise, die dieses Problem berücksichtigt, wurde von Popelka & Altpeter (2003) bei der Transformation von Roggen verfolgt: die transformierten Kallusse wurden erst ab der Regenerationsphase einer Selektion unterzogen, um Störungen der Induktion somatischer Embryonen durch Antibiotika im Kulturmedium zu vermeiden.

Es ist wiederholt beschrieben worden, dass die zur Selektion oder Bakterieneliminierung eingesetzten Antibiotika auch eine hormonähnliche Wirkung entfalten können und damit in das hormonelle Zusammenspiel der Regeneration eingreifen können. Lin *et al.* (1995) beschreiben die auxinartige Wirkung von Carbenicillin bei der Regeneration von Tabak und dessen positiven Einfluß auf die Transformationsrate bei *A. thaliana* cv. Columbia. Bei *Vicia faba* wurde die Wurzelbildung an Sprossen durch Carbenicillin im Medium erhöht bzw. durch Claforan verringert gegenüber einem Kulturmedium ohne Zusatz eines Antibiotikums (Böttinger 1993). Demgegenüber beschrieben Joersbo *et al.* (1999) eine Reduktion der Transformationsfrequenz durch Verwendung von Carbenicillin bei *Cyamopsis tetragonoloba*. Bei *Malus x domestica* beobachteten de Bondt *et al.* (1996) einen stimulierenden Effekt auf die Regeneration bei Verwendung von Cefotaxim (200 mg/l) und eine Steigerung der Transformationseffizienz durch Verwendung einer Kombination von Cefotaxim/Ticarcillin.

Die Verwendung von Carbenicillin allein war nicht ausreichend zur Kontrolle des Bakterienwachstums nach der Kokultur von *Vicia faba* mit EHA101 bzw. EHA105. Auch die Ergebnisse von Lin *et al.* (1995) zeigten damit übereinstimmend die Überlegenheit des bakteriziden Effekts von Cefotaxim gegenüber Carbenicillin. Eine effektive Eliminierung der Agrobakterien aus den Explantaten konnte mit einer Mischung aus Claforan/Carbenicillin oder mit Betabactyl erreicht werden. Auswirkungen auf die Transformationseffizienz durch den Einsatz unterschiedlicher Antibiotika konnten hierbei nicht festgestellt werden.

#### **4.1.3 Nutzung des *bar*-Gens als Selektionsmarker**

Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (White *et al.* 1990) zur Selektion mit Phosphinotricin (PPT) wurde bereits vielfach zur Erzeugung von transgenen Leguminosen verwendet, z.B. *Pisum sativum* (Schroeder *et al.* 1993, Bean *et al.* 1997), *Lupinus angustifolius* (Molvig *et al.* 1997), *Lupinus luteus* (Li *et al.* 2000), *Glycine max* (Clemente *et al.* 2000), *Vicia narbonensis* (Mahmoodzadeh 2001, Demidov *et al.* 2003), mit unterschiedlichen, der jeweiligen Art entsprechenden Konzentrationen.

Die Selektion mit PPT in einer Konzentration von 2 mg/l führte bei *Vicia faba* zu Transformationsraten (bezogen auf die Menge an resistentem Kallus), die auf vergleichbarem Niveau der Selektion mit Kanamycin lagen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl an Kallussen, die die Fähigkeit zur Regeneration von Sprossen zeigten, deutlich herabgesetzt. Für den Einsatz von PPT als Selektionsmarker bei *Vicia faba* müsste das Regenerationsprotokoll noch entsprechend optimiert werden. Dieses kann oft schon durch geringe Veränderungen erreicht werden, so musste für die Verwendung des *bar*-Gens bei *Vicia narbonensis* die Selektionsdauer gegenüber früheren Protokollen verkürzt werden, weil die Anwesenheit von PPT im Kulturmedium das Absterben der induzierten somatischen Embryonen verursachte (Mahmoodzadeh 2001, Demidov *et al.* 2003).

#### 4.1.4 *Agrobacterium vs. particle gun*

Vielfach wird in der Transformation von Pflanzen die Genübertragung mit Hilfe des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers favorisiert, da er viele Vorteile aufweist (siehe Chilton 1993, De Block 1993, Smith & Hood 1995, Somers *et al.* 2003):

- einfaches, billiges, technisch wenig aufwendiges Verfahren („*poor man´s vector system*“)
- ein -in gewisser Hinsicht- „natürlicher“ Vektor mit einem universellen, großen Wirtsbereich
- die Integration der übertragenen T-DNA in aktive Genorte mit wenigen intakten Kopien oder als *single copy*.

Seit der Entwicklung von hypervirulenten *Agrobacterien*stämmen und von Binärvektoren konnten zahlreiche Protokolle zur Transformation vormals als widerspenstig geltender Spezies beschrieben werden, z.B. Reis (Hiei *et al.* 1994), Erdnuß (Cheng *et al.* 1996), Lupine (Molvig *et al.* 1997), Gerste (Tingay *et al.* 1997) und Roggen (Popelka & Altpeter 2003).

Für manche Leguminosen wie z.B. Erbse (*Pisum sativum*) wurden mehrere Protokolle zum *Agrobacterien*-vermittelten Gentransfer in Verbindung mit unterschiedlichen Ausgangsexplantaten und Regenerationsmethoden publiziert (Puonti-Kaerlas *et al.* 1990, Schroeder *et al.* 1993, Davies *et al.* 1993, Bean *et al.* 1997, Grant *et al.* 1998).

Im Gegensatz dazu weist die ballistische Methode (*particle gun*) vor allem den Vorzug eines unbegrenzten, genotypenunabhängigen Wirtsspektrums auf und die Möglichkeit des Einschleusens fremder DNA in Zellen und Gewebe, die für *Agrobacterium* schlecht oder nicht zugänglich sind. Als nachteilig bei dieser kosten- und technik-intensiven Art des Gentransfers erwies sich die ungezielte Genübertragung, die häufig fragmentierte Integrationsmuster oder „*multicopy cluster*“ hervorbrachte (Finnegan & McElroy 1994, Pawlowski & Somers 1998, Kohli *et al.* 1998). Die Integration von vielen Kopien des Transgens kann in positiver oder negativer Weise mit der Genexpression verbunden sein;

in vielen Fällen wurde eine Kosuppression der Multigenkopien und *gene-silencing* beobachtet (Vaucheret *et al.* 1998, Vaucheret & Fagard 2001).

Trotz dieser Nachteile war bei vielen „widerspenstigen“ Leguminosen und den nicht zum natürlichen Wirtsbereich von *Agrobacterium* zählenden *Graminaea* (Monocotyledonae) die Genübertragung mit der *particle gun* die Methode der Wahl, die sich für wirtschaftlich interessante Pflanzen etablierte. Beispiele hierzu findet man bei Sojabohne (McCabe *et al.* 1988, Christou *et al.* 1990, Aragão *et al.* 2000); Mais (Gordon-Kamm *et al.* 1990, Zhang *et al.* 1996, Brettschneider *et al.* 1997); Weizen (Becker *et al.* 1994, Uzé *et al.* 1999); *Triticale* (Zimny *et al.* 1995); Gerste (Wan & Lemaux 1994, Cho *et al.* 1998). Bis heute ist zur stabilen Transformation der Körnerleguminosen *Lens culinaris* und *Phaseolus vulgaris* nur die *particle gun*-Methode beschrieben worden (Gulati *et al.* 2002, Aragão *et al.* 1996, 2002).

Die Anwendung der *particle gun*-Methode zur Transformation von *Vicia faba* führte bislang zu keinen stabilen Transformanden (Hanafy 2002, eig. Ergeb., unver.), was auch ein Problem der starken Reaktion auf Verletzungen sein mag, die bei *Vicia faba* immer mit der Bildung von den der Gewebekultur abträglichen Polyphenolen einhergeht und besonders in jungen Geweben ausgeprägt ist.

Die von Dai *et al.* (2001) bei Reis durchgeführten Studien zum Vergleich der beiden Transformationssysteme ergaben Resultate, welche die genannten Vor- und Nachteile der beiden Transfersysteme unterstrichen. Als Vorteile des *particle gun*-Systems wurden Genotypenunabhängigkeit und die dreifach höhere Transformationseffizienz aufgeführt, als Nachteil die weit geringere Expression des Reportergens, möglicherweise aufgrund von Kosuppression, und eine reduzierte Fertilität gegenüber den aus dem Agrobakteriensystem hervorgegangenen Pflanzen. Aus züchterischer Sicht scheint es dem zufolge sinnvoll, der *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfermethode den Vorzug zu geben, wenn ein geeignetes Arbeitsprotokoll zu dieser Vorgehensweise verfügbar ist.

## 4.2 Eigenschaften des Regenerationssystems

### 4.2.1 Regenerationssysteme mit „einfachen“ oder „komplexen“ Geweben

Das Hauptproblem bei der Etablierung eines Transformationsprotokolls für Körnerleguminosen liegt in ihrer Widerspenstigkeit gegenüber einer *in vitro*-Regeneration. Viele Protokolle, die für Leguminosenarten entwickelt wurden, benutzen zur Umgehung der schwierigen *de novo* Regeneration meristemhaltige Explantate wie Sproßspitzen, Cotyledonarnodien, Embryoachsen etc. als Ausgangsmaterial. Die Sproßproliferation erfolgt hier innerhalb weniger Wochen aus bereits vorhandenen Meristemen ohne eine Phase unorganisierten Kalluswachstums. Protokolle, die auf der Verwendung „komplexer“, meristemhaltiger Explantate basieren, sind in der Regel schneller und weniger der unerwünschten somaklonalen Variabilität unterworfen,

verglichen mit Protokollen, die durch eine eingeschobene Phase „unorganisierten“ Kalluswachstums charakterisiert sind.

Die Nutzung solcher Protokolle unter Verwendung „komplexer“ Gewebe für die Transformation führt jedoch zu einem anderen Problem. Da die Regeneration der Sprosse aus einem multizellulären Hintergrund geschieht, kann es verstärkt zu Bildung von Chimären kommen, was ein *Screening* der Folgegenerationen erforderlich macht (Christou *et al.* 1989, 1991; Barwale & Widholm 1990, Hanafy 2002). Joersbo *et al.* (1999) berichteten in diesem Zusammenhang von 5-10% Chimärenbildung unter den Primärtransformanden; von den Nachkommen der verbleibenden T<sub>0</sub> waren noch 47% negativ für das Transgen. Das *Screening* auf Transformanden kann unter Umständen aufwendiger und weniger effizient ausfallen als eine konsequente Selektion transgener Zellen und Kallusse in der Vor-Regenerationsphase der *in vitro*-Kultur (Dillen 1997).

Die für das vorgestellte Arbeitsprotokoll verwendeten Explantate (Internodien des Epicotyls, Petiolen, etiolierte Blättchen) sind junge, ausdifferenzierte Gewebe, die keine Sproßmeristeme z. B. in Form von Achselknospen enthielten. Bisher existieren nur wenige weitere Protokolle für Leguminosen, die Pflanzengewebe ohne vorhandene Meristeme erfolgreich für die Transformation nutzten (Pickardt *et al.* 1995/*Vicia narbonensis*, Cheng *et al.* 1996/*Arachis hypogaea*, Dillen *et al.* 1997/*Phaseolus acutifolius*).

#### 4.2.2 Verwendung und Wirkung von TDZ

Thidiazuron (Handelsname DROPP®) wurde von der Schering AG zur Entlaubung von Baumwollpflanzen (*defoliant*) zur Erleichterung der maschinellen Ernte der Samenkapseln entwickelt (Arndt *et al.* 1976, Grossmann 1991). Als Herbizid des Phenylharnstofftyps setzt die Wirkung bei der Photosynthese an, durch Hemmung der Hill-Reaktion in den Zellen (Overbeek 1964). Darüberhinaus gilt TDZ als ein synthetischer Wuchsstoff mit starker cytokininähnlicher Wirkung (Mok *et al.* 1982, Capelle 1983, Malik & Saxena 1992, Murthy *et al.* 1995). Diese Tatsache führte zu einer starken Ausbreitung der Verwendung von TDZ in der pflanzlichen *in vitro*-Kultur. TDZ kann sowohl zur Sproßproliferation als auch zur Induktion der Embryoidbildung eingesetzt werden (Visser 1992).

Die von Huetteman & Preece (1993) beschriebene Wirkung von TDZ bei der Regeneration von Gehölzarten zeigte Erfolge in der Regeneration dieser bislang als schwierig bezeichneten Spezies. Seither ist ein sprunghafter Anstieg an Veröffentlichungen zu verzeichnen, die mit Hilfe von Thidiazuron Erfolge in der Regeneration vormals widerspenstiger Arten erzielen konnten (siehe Murthy *et al.* 1998).

De Bondt *et al.* (1996) konnten in Verbindung mit TDZ-induzierter Regeneration ein Transformationssystem für Apfel etablieren. Tegeder (1995) verglich die Wirkung verschiedener Medien und Phytohormone für die Regeneration aus Protoplasten bei *Vicia faba*. Erst durch die Einführung von TDZ konnten erstmalig komplette Pflanzen aus Protokallussen von *Vicia faba* und *Vicia narbonensis* regeneriert werden. Es zeigte sich

mit dieser Arbeit, dass die Verwendung von TDZ auch bei Gewebeexplantaten essentiell für den Regenerationserfolg von *Vicia faba* ist.

Die Wirkungsweise von TDZ ist noch nicht hinreichend geklärt, einerseits könnte TDZ durch eigene biologische Aktivität das Wachstum fördern, andererseits könnte es die Bildung endogener Cytokinine unterstützen. Visser *et al.* (1992) und Gill & Saxena (1993) vermuteten eine Beeinflussung des Zusammenspiels von endogenen Auxinen und Cytokinin, da TDZ ebenfalls Auslöser für somatische Embryogenese in der Gewebekultur sein kann. Darauf weisen auch die Ergebnisse von Mithila *et al.* (2003) hin, die mit niedrigen TDZ-Konzentrationen Sprosse, mit hohen Konzentrationen dagegen Embryonen an denselben Gewebeexplantaten von *Saintpaulia ionatha* erhielten. Es wurde vorgeschlagen, dass die TDZ-induzierte Wirkungsweise auf die Morphogenese von dem endogenen Level an Phytohormonen abhängig ist und diesen modifizieren kann (Murthy *et al.* 1995, Hutchinson *et al.* 1996). Murch *et al.* (1999) zeigten, dass die TDZ-induzierte Regeneration mit einer Akkumulation von ABA und Prolin begleitet wird. Bei Kichererbse konnte durch Zugabe von Prolin zum Kulturmedium somatische Embryogenese statt Organogenese ausgelöst werden (Murthy *et al.* 1996).

In einigen Untersuchungen zeigte sich, dass die Präsenz von TDZ einen gestauchten Wuchs bei Leguminosen hervorruft und die normale Sproßelongation und Blattentwicklung unterdrückt wird; dieser Effekt wurde auch in dieser Arbeit beobachtet. Erst nach Transfer auf TDZ-freies Medium konnte eine normale Weiterentwicklung stattfinden (Tegeder *et al.* 1995, Murthy *et al.* 1995, 1998, diese Arbeit).

Die Suche nach der „optimalen Konzentration“ und den begleitenden Faktoren, sowie verschiedene Versuche zur Umgehung der Nebenwirkungen von TDZ wie

- kurzzeitige Applikation von TDZ, dann Ablösung durch schwächere Cytokinine
- gleichzeitige Verwendung von „echten“ Cytokinin, um synergistische Effekte zu erzielen
- Verwendung von Zusätzen, um die Nebenwirkungen abzuf puffern
- *pulsed feeding*, d.h. diskontinuierliche TDZ-Zugabe ins Medium
- generelles Absenken des Hormonlevels auf die niedrigstmögliche Konzentration
- schrittweise Anhebung des TDZ-Levels zur Adaption an den Wirkmechanismus,

wurden getestet, führten jedoch zu keinen Verbesserungen des Regenerationsverhaltens von *Vicia faba*.

#### **4.2.3 Wirkung von Caseinhydrolysat und Kokoswasser**

Die Stickstoffversorgung der Explantate wird in der Regel durch Nitrat und Ammonium gewährleistet, meist in Form ihrer Salze; schon White (1934) setzte seinen Nährmedien Nitrat als anorganische Stickstoffquelle zu. Heute wird stattdessen oft Caseinhydrolysat,

ein komplexes Gemisch aus verschiedenen Aminosäuren, als Quelle für reduzierten Stickstoff eingesetzt. Durch Zugabe von Caseinhydrolysat zu Kalluskulturen von *Daucus carota* konnte die Wachstumsleistung fast verdoppelt werden (Neumann 1995). Bei der somatischen Embryogenese von *Hordeum vulgare* wurden die besten Ergebnisse mit 1 g/l Caseinhydrolysat im Kulturmedium erreicht (Lührs & Lörz 1986).

Generell nimmt der Aminosäuregehalt der Lösung schnell ab, da diese von den Explantaten aufgenommen werden, wobei verschiedene Pflanzengewebe unterschiedliche Präferenzen aufweisen und einzelne Aminosäuren schneller verbraucht werden als andere. Sind diese bekannt, könnte auch die Zugabe einzelner Aminosäuren dieselben Resultate erzielen, z. B. durch Glutaminsäure, die den größten Anteil bei Caseinhydrolysat stellt (Neumann 1995). Darüber hinaus scheint die Zugabe von Proteinhydrolysaten die Vitrifizierung von Pflanzen bei *in vitro*-Kultur zu verringern, die mit Casein supplementierten Medien brachten vitalere Sprosse als Medien ohne solchen Zusatz hervor.

Die positive Wirkung von Kokoswasser auf die Entwicklung isolierter Embryonen von *Datura innoxia* wurde bereits Anfang der vierziger Jahre von Overbeek, Conklin & Blakeslee (1942) beschrieben. Caplin & Steward (1948) konnten durch Zugabe von Kokoswasser zu dem von White (1934) erstellten Kulturmedium erhebliche Wachstumssteigerungen erzielen. Shantz *et al.* (1955) führten die Wirkung von Kokoswasser auf drei verschieden wirkende Fraktionen zurück: zum einen ein Aminosäurengemisch, ähnlich wie bei Caseinhydrolysat, zum zweiten eine neutrale Kohlenhydratfraktion (myo-Inosit, Sorbit u.a.), die dritte Fraktion zeigte eine fördernde Wirkung auf die Zellteilungsaktivität, hier wurden die beiden Cytokinine Zeatin und 2-Isopentenyladenin nachgewiesen, außerdem 1,3-Diphenylharnstoff (Steward & Shantz 1956). Die heutige Bedeutung von Kokoswasser für die Gewebekultur liegt größtenteils in seiner Verwendung bei Versuchssystemen, deren Kultur sich schwierig gestaltet, solange die Ansprüche der kultivierten Art (noch) nicht bekannt sind und die verwendeten komplexen Zusätze noch nicht durch besser definierte Substanzen ersetzt werden konnten. Niu *et al.* (2000) schilderten die Verwendung von 25 % (v/v) Kokoswasser, zusammen mit TDZ, als Schlüsselkomponente für die Sproßinduktion und Regeneration von *Mentha x piperita*. Zambre *et al.* (1998) nutzten Kokoswasser (10 % v/v) zur Induktion von Sprossen bei *Phaseolus vulgaris* und *Phaseolus acutifolius*. Dass die Verwendung von Kokoswasser im vorliegenden Regenerationssystem von *Vicia faba* keine positiven Resultate erzielte, mag darin begründet liegen, dass die Ansprüche an Stickstoffverbindungen bereits durch Caseinhydrolysat besser abgedeckt wurden, und die cytokininartige Wirkung bei gleichzeitigem Einsatz des potenten Wuchsstoffes TDZ keine weitere Wirkung entfalten konnten.

#### 4.2.4 Effekte des Basismediums und der Kohlenstoffquelle auf die Sproßbildung

Verschiedene Untersuchungen hatten gezeigt, dass neben der Steuerung durch Phytohormone auch die Art des Basismediums (z.B. *high/low salt*) eine Rolle spielt, ebenso wie die Art und Konzentration des verwendeten Zuckers. Shetty *et al.* (1992) verglich die Effekte verschiedener modifizierter MS-Medien auf die Sproßorganogenese bei *Glycine max* und berichteten über Sproßbildung bei der Zugabe von ausgewählten Aminosäuren und der Verwendung von BAP. Kaneda *et al.* (1997) beschrieben MS-Medium als wenig geeignet für die Sproßinduktion bei Sojabohne, sie erzielten eine vierfache Sproßausbeute an Hypocotylexplantaten mit halbkonzentriertem B5-Medium unter Zusatz von 2 mg/l TDZ. In der vorliegenden Arbeit mit *Vicia faba* wurde im Vergleich der Kulturmedien KM und MS keine unterschiedlichen Effekte gefunden. Die Verwendung von MS, supplementiert mit B5-Vitaminen, die bei Kichererbse erfolgreich angewendet wurde (Tewari-Singh *et al.* 2004), führte ebenfalls zu keiner Steigerung der Regenerationsrate bei *Vicia faba*.

Lazzeri *et al.* (1988) beschrieben die Korrelation von Saccharosegehalt und eingesetzter Auxinkonzentration im Kulturmedium bei der Bildung somatischer Embryonen bei Sojabohne. Die ermittelten optimalen Werte unterschieden sich jedoch von den bei Barwale & Widholm (1987) gefundenen Daten, was auf einen Einfluß weiterer Faktoren hinweist.

Die von Yu & Reed (1993) durchgeführten Versuche zu Kombinationen verschiedener Basalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen und ihrer Effekte auf die Mikropropagation von *Coryllus avellana* zeigten die Überlegenheit von Glucose gegenüber Saccharose in Form von vermehrter Sproßbildung. Auch weitere Autoren beschrieben die erfolgreiche Verwendung anderer Kohlenstoffquellen, z.B. Glucose bei *Alnus* und Fructose für *Malus* (Welander *et al.* 1989). De Bondt *et al.* (1994) fanden Saccharose oder Glucose am geeignetsten, Fructose und Galactose dagegen zeigten inhibitorische Wirkung auf den Regenerationsprozess von Apfel.

Eine Verbesserung der Regenerationsrate durch die Verwendung von Glucose bzw. die Reduzierung des Zuckergehalts konnte bei der Kultur von *Vicia faba* nicht festgestellt werden.

#### 4.3 Genetische und phänotypische Veränderungen in den transgenen Linien

Pflanzen entwickelten aufgrund ihrer sessilen Lebensweise und ihrer zum Teil langen Lebensspanne eine ausgeprägte Fähigkeit, sich veränderlichen Lebensbedingungen anzupassen. Ihre genetische und phänotypische Plastizität erlaubt ihnen, ihren Metabolismus, ihr Wachstum und ihre Entwicklung entsprechend den Erfordernissen der Umwelt zu verändern (Walbot 1996).

Die bei *in vitro*-Kulturen auftretenden Veränderungen von Eigenschaften sind als somaklonale Variabilität bekannt (Larkin & Scowcroft 1981). Ihre Ursache sind mutagene Hintergrundprozesse wie Punktmutationen, Verluste von Genen, Umstrukturierung von Chromosomen, sowie polygene Veränderungen von Merkmalen (Lee & Phillips 1988). Somaklonale Variabilität kann genetisch oder epigenetisch (z.B. Methylierung) begründet sein. Die auftretenden Veränderungen können z. T. züchterisch genutzt werden, so sind bei Kartoffel, Tomate und Zuckerrohr neue Sorten aus somaklonalen Varianten hervorgegangen (Karp 1991).

Ausgelöst durch den bei Gewebekultur oder Gentransferprozessen auftretenden „Stress“ tritt somaklonale Variabilität zu einem gewissen Grad bei allen Transformationsprotokollen auf. Der Stress beeinflusst die Chromosomenstabilität, aktiviert andere Gene, verändert die metabolischen Prozesse und bewirkt die Produktion und Akkumulation verschiedenster Metabolite (Steward *et al.* 1964, Constantin 1981, Karp 1991, Bregitzer *et al.* 2002). Das Auftreten von Regenerationserscheinungen in der Gewebekultur könnte einen adaptiven Reproduktionsmechanismus zur Bewältigung von physiologischem Stress darstellen (Murch *et al.* 1997, 1999).

Die Mutationsrate bei Transformationsexperimenten liegt ziemlich hoch; bei der Transformation von *A. thaliana* wiesen 5% der erzeugten Transformanten eine „sichtbare“ Mutation auf, die nicht in einem direkten Zusammenhang mit der T-DNA-Insertion stand (Van Lijsebettens *et al.* 1991). Transgene Pflanzen können multiple Mutationen enthalten, die den Phänotyp der Primärtransformanten beeinflussen und verändern, oder aber erst in den Folgegenerationen in Erscheinung treten. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten transgenen Linien wiesen in der T<sub>0</sub> über 30% morphologisch aberrante Phänotypen wie Zwergwuchs, abnormale Blütenformen oder Hülsen auf, was eine bekannte Begleiterscheinung langer *in vitro*-Kulturdauer ist.

Von den 12 etablierten Linien von *Vicia faba* erwiesen sich vier als tetraploid, zwei davon mit von 4n abweichendem DNA-Index, was eine Addition bzw. Deletion chromosomalen Materials anzeigte. Zwei der tetraploiden Linien stellten sich als nicht transgen heraus, möglicherweise hatte der tetraploide Status eine erhöhte Toleranz gegenüber dem selektiven Agens (Kanamycin) bewirkt. Die stabil transformierte tetraploide Linie 8-66 zeigte in den Folgegenerationen eine den diploiden Linien entsprechende Aufspaltung von 3:1 für *nptII* und *sfa8*, die Samenmenge war jedoch deutlich gegenüber den diploiden Linien reduziert. Linie 26-2 war eine unbalancierte Mutation (4n+Addition), die keine Nachkommenschaft aufwies. Eine starke Korrelation zwischen zunehmender chromosomaler Variation und abnehmender Fertilität wurde auch von Gordon-Kamm *et al.* (1990), Cho *et al.* (1998) und Choi *et al.* (2000) beschrieben.

Das verstärkte Auftreten von tetraploiden Formen bzw. anderen Aneuploidien infolge einer *in vitro*-Phase wurde bei vielen Spezies festgestellt. 8% Tetraploidie als Folge somaklonaler Variation bei der somatischen Embryogenese von *Quercus robur* beschrieb Endemann (2001). Cho *et al.* (1999) fanden 50 % tetraploide Linien vor, die nach

*particle gun* Transformation aus Gerste-Kallus regeneriert worden waren. Choi *et al.* (2000) führten den hohen Anteil an aneuploiden Transformanten von 57 % auf die Kombination verschiedener Stressfaktoren (Gentransfer, Selektionsdruck, Kultur unter suboptimalen Bedingungen) zurück.

#### 4.4 Untersuchungen zur Integration und Expression der Fremdgene

Die Stabilität der Expression des Transgens ist eine weitere wesentliche Voraussetzung für die Anwendung gentechnischer Methoden in der Züchtungsforschung. Es sind Faktoren bekannt, die mit der Inhibierung der Genexpression in Verbindung gebracht werden und zur Stilllegung des Transgens, dem *gene silencing* führen können. So können die Kopienanzahl, die Position des Transgens und dessen Methylierungsstatus Einfluß auf die Expression nehmen (Hobbs *et al.* 1990, Finnegan & McElroy 1994, Stam *et al.* 1997, Meng *et al.* 2003).

Die Southern Blot Analysen der transgenen Linien zeigten, dass diese überwiegend *single copy*-Insertionen oder nur wenige Kopien (2-4) des Transgens enthielten, was ein Charakteristikum der *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfermethode ist (Cheng *et al.* 1997, Fang *et al.* 2002). Sämtliche transgene Linien, die über mindestens drei, z.T. sogar bis sieben Generationen (Linie A13) mittels genomischer PCR getestet wurden, bestätigten die stabile Weitergabe des Transgens.

Von drei etablierten Linien mit *lysC*-Insertion zeigten nur zwei (12-2 und 12-40) die spezifische Aktivität der bakteriellen Aspartatkinase, die im AK-Assay oder mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte. Linie 12-1 dagegen wies durchgängig keine messbare Expression des Transgens auf. Die Southern Blot Analyse hatte für 12-2 und 12-40 je eine Kopie *versus* drei vollständigen und einer fragmentierten Kopie des übertragenen Genkonstrukts bei Linie 12-1 ergeben. Die fehlende Expression des *lysC*-Gens bei 12-1 könnte mit der höheren Anzahl an integrierten Kopien oder dem Insertionslocus zusammenhängen.

Die Inaktivierung von einzelnen Genloci als Positionseffekt kann dem genomischen und chromosomalen Kontext zugeschrieben werden (Peach & Velten 1991). Die Integration des Transgens in stark methylierte oder hochrepetitive Bereiche führt zu dessen Stilllegung, da der Charakter der flankierenden DNA auf das Insert übertragen wird (Koncz *et al.* 1989, Pröls & Meyer 1992, Van Blokland *et al.* 1994). Der als *position effect variegation* (PEV) bezeichnete Vorgang bestimmt die Expression bzw. Reprimierung des Gens in Abhängigkeit von seiner Lokalisierung in Nachbarschaft zu Euchromatin oder Heterochromatin, wobei letzteres vor allem in centromerischen und telomerischen Bereichen konzentriert vorliegt. PEV ist vor allem bei *Drosophila melanogaster* gut untersucht und dokumentiert (Henikoff 1990, Karpen 1994, Wu & Morris 1999), aber auch bei Pflanzen wurden vergleichbare Effekte nachgewiesen (Springer *et al.* 2003).

Untersuchungen bei Mäusen zeigten Mosaikexpression von Genen, die centromernah lokalisiert waren (Dobie *et al.* 1997).

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen der Linien 12-1 und 12-2 zur Lokalisierung des Transgens ergaben für beide Linien die Insertion im distalen Bereich des längeren Arms von Chromosom 5 bzw. 3 (Snowdon *et al.* 2001). Die distalen Bereiche der Chromosomenarme enthalten eine Vielzahl an Genen z.B. bei Weizen (Gill *et al.* 1993), Mais (Bernardi 1995) und Menschen (Saccone *et al.* 1992). Diese Bereiche scheinen ein bevorzugtes Ziel für die Integration der T-DNA des Gentransfers von *Agrobacterium tumefaciens* zu sein, wie die Resultate von Studien mittels FISH an transgenen Petunien und bei Gerste, Weizen, *Triticale* schließen lassen (Wang *et al.* 1995, ten Hoopen *et al.* 1996, Pedersen *et al.* 1997). Ein weiterer möglicher Grund für die Tendenz zur gehäuft auftretenden T-DNA-Insertion im distalen Bereich könnte sein, dass die Insertion in einem z.B. centromernahen heterochromatischen Bereich zu nur schwach ausgeprägter Expression des Gens führt und diese Linie infolge dessen während der Selektion verloren geht. Übrig blieben demzufolge nur Linien mit Insertionen in transkriptionsaktiven Euchromatinbereichen. Zumindest in der T<sub>0</sub> muß das Transgen aktiv sein, da die Selektion nur aktive Gene „berücksichtigt“, ein *silencing* in den folgenden Generationen ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Weitere Gründe für eine Nichtexpression des Transgens können Homologien mit endogenen Gensequenzen oder das Vorhandensein von *multi copy clustern* sein, die Ko-suppression bzw. Epistasie bewirken (Matzke *et al.* 1989, 1994). Das Phänomen des *gene silencing* ist für transgene Pflanzen schon früh beschrieben worden (Napoli *et al.* 1990, van der Krol *et al.* 1990, Yang *et al.* 1998, Bellucci *et al.* 1999, Reddy *et al.* 2003; Zusammenfassungen bei Finnegan & McElroy 1994 und Stam *et al.* 1997).

Geninaktivierung, welche auf Sequenz-Homologie-Wechselwirkungen beruht, wird als homologieabhängiges *gene silencing* bezeichnet (Matzke & Matzke 1993, Jorgensen *et al.* 1996, Meyer & Saedler 1996, Vaucheret *et al.* 1998). In Pflanzen kann sich das Transgen-induzierte *gene silencing* auf transkriptionaler Ebene (TGS) oder post-transkriptionaler Ebene (PTGS) ereignen (Matzke & Matzke 1998, Fagard & Vaucheret 2000):

**TGS** wird mit einer stark methylierten und inaktivierten Promotorregion in Verbindung gebracht und/oder veränderter Chromatinstruktur (Meyer *et al.* 1993, Meyer & Saedler 1996, Park *et al.* 1996). Bei transkriptionaler Inaktivierung der Genaktivität wird die Synthese der RNA stark reduziert bzw. eingestellt (Bruening 1998).

**PTGS** wird auch als RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet und wirkt über die sequenzspezifische RNA-Degradierung (Chandler & Vaucheret 2001), die mit der Akkumulation von 25 Nucleotide großen RNA-Molekülen in Zusammenhang steht (Hamilton & Baulcombe 1999). Bei PTGS bleibt, im Gegensatz zum TGS, der Promotor aktiv, die Transkription des Gens ist nicht betroffen. Es findet jedoch keine Akkumulation der mRNA statt. Die Wirkung ist systemischer Natur und reversibel (Palauqui *et al.*

1997). Zur Erklärung der zugrunde liegenden Mechanismen wurden verschiedene Modelle wie (i) das „*ectopic pairing*“ Modell als DNA/DNA bzw. DNA/RNA-Interaktion zwischen homologen Genen (Jorgensen 1992, Baulcombe & English 1996, Wassenegger & Pélissier 1998, Waterhouse *et al.* 1999) und (ii) das „*threshold*“ Modell (Dehio & Schell 1994, Elmayan & Vaucheret 1996, Stam *et al.* 1997, Matzke *et al.* 2001, Voinnet 2002) vorgeschlagen.

Während *gene silencing* zunächst als eher unerwünschter Nebeneffekt bei der Transformation von Pflanzen erschien, besteht mittlerweile die Auffassung, dass man auf einen universellen Mechanismus, einer Art „Immunabwehr“ bei Pflanzen gestoßen ist, geeignet zur Eindämmung von Virusinfektionen und Inaktivierung von transposablen Elementen, vergleichbar dem „Quelling“ bei Pilzen (Bsp. *Neurospora crassa*), der unbeabsichtigt beim Gentransfer ausgelöst werden kann (Cogoni & Macino 1997, Waterhouse *et al.* 1998, 2001, Chandler & Vaucheret 2001, Voinnet 2001, Yu & Kumar 2003, Jorgensen *et al.* 2004).

PTGS oder RNAi wird auch zur Unterdrückung unerwünschter Eigenschaften genutzt z. B. zur Erzeugung *Crown gall*-resistenter Pflanzen über das *silencing* von *A. tumefaciens* Onkogenen in transgenen Apfelpflanzen (Viss *et al.* 2003).

Die ermittelten Daten für Linie 12-1 (Integration im aktiven Chromosomenbereich, 3 (+1 fragmentarische) Kopien, Phaseolinpromotor aus *Phaseolus vulgaris*) legen die Vermutung nahe, dass die Nichtexpression des Transgens auf homologieabhängige Ko-suppression zurückzuführen sein könnte. Da der Phaseolinpromotor keine endogene Entsprechung in *Vicia faba* aufweist, ist TGS infolge von Promotorsequenzhomologien weniger wahrscheinlich. Zur sicheren Unterscheidung, ob ein TGS oder PTGS-Mechanismus vorliegt, wäre die Durchführung einer *run off* Transkriptionsanalyse erforderlich gewesen (Dehio & Schell 1994).

Die Expression des *sfa8*-Gens in den Linie 8-5 und 8-66 konnte durch Western Blot Analyse bestätigt werden. Da die Signale des Antikörpers schwach bis nicht detektierbar waren, wurde die Transkription des Gens auch über RT-PCR überprüft. Weil das übertragene Konstrukt den *Vicia faba*-eigenen USP-Promotor zur samenspezifischen Expression enthielt, konnte die Amplifikation des endogenen *usp*-Gens als interne Kontrolle zum Vergleich der Stärke der Expression herangezogen werden.

Der USP-Promotor ist die 600 bp große 5' *upstream* Region des für das sogenannte *unknown seed protein* codierenden Gens in *Vicia faba* (Bäumlein *et al.* 1991). Das zugehörige Protein scheint nicht zu akkumulieren, während das *usp*-Transkript in großen Mengen während der Samenentwicklung von *Vicia faba* nachgewiesen werden kann, was für eine starke Promotoraktivität spricht. Die Verwendung des *usp*-Promotors zur samenspezifischen Expression fremder Gene in *Arabidopsis thaliana* (Bäumlein *et al.* 1991) und Tabak (Fiedler *et al.* 1993) bestätigte diese Vermutung.

Die Verwendung möglichst starker Promotoren, z. T. mit zusätzlichen *enhancer*-Elementen, zur Überexpression der eingefügten Merkmale war häufig ein erklärtes Ziel in der Pflanzenzüchtung. Es zeigte sich jedoch, dass ein sehr hoher Expressionslevel oftmals gegenteilige Resultate durch Stilllegung des Inserts bewirken kann (Finnegan & McElroy 1994, Elmayan & Vaucheret 1996). Möglicherweise ist auch die Verwendung des starken endogenen USP-Promotors ein potentielles Problem, da aufgrund der Sequenzhomologie der Transkripte eine *trans*-Inaktivierung auftreten könnte. Auch eine Abregulierung der Transkriptakkumulation durch Überschreiten eines Schwellenwertes an mRNA wäre denkbar. Dieses könnte bei folgenden Transformationen durch den Austausch des USP-Promotors auf dem Vektor durch einen artfremden samenspezifischen Promotor z.B. den Phaseolinpromotor aus *Phaseolus vulgaris* berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass der Level an Transkripten für *sfa8* ca 3-4 mal geringer war als die des endogenen USP-Transkripts. Über den Grund für die schwache Expression des *sfa8*-Gens kann aufgrund der geringen Anzahl an produzierten transgenen Linien nur spekuliert werden. Da das *usp*-Gen zu einer 15-20 Mitglieder umfassenden Genfamilie gehört (Bäumlein *et al.* 1991), könnte die Beobachtung einer unterschiedlich starken Transkriptakkumulation einem Gen-Dosis-Effekt zugeschrieben werden.

Andererseits treten in jeder Population transgener Pflanzen in der Regel unterschiedlich stark exprimierende Exemplare auf, was auf diversen Faktoren beruhen kann. Bei einer genügenden Anzahl Transformanden können die besten Linien ausgewählt und weitervermehrt werden, die anderen werden verworfen. Bei den vorliegenden drei SFA8-Linien, davon eine tetraploid, könnte der Fall eingetreten sein, dass durch Zufall nur schwach exprimierende Pflanzen selektiert wurden bzw. regenerierten.

#### **4.5 Erhöhung des Methioningehalts in Samen von *Vicia faba***

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten transgenen Linien stehen größtenteils in Zusammenhang mit einem Projekt zur Veränderung der Aminosäurezusammensetzung in Körnerleguminosensamen. Die hierbei verfolgten Strategien waren (a) die Übertragung der codierenden Sequenz für das methioninreiche 2S-Albumin aus *Helianthus annuus* (Kortt *et al.* 1991) als zusätzliches „*sink*“ für schwefelhaltige Aminosäuren, und (b) die Insertion eines mutierten *lysC*-Gens aus *E. coli*, codierend für eine bakterielle Aspartatkinase, die insensitiv gegenüber der *feedback* Kontrolle durch Lysin und Threonin ist (Shaul & Galili 1992).

##### **4.5.1 Methioninreiche Speicherproteine**

Die Übertragung von *sfa8* in *Vicia faba* zeigte in der Western Blot Analyse der Linien 8-5 und 8-66 nur schwache bis keine detektierbaren Signale, obwohl die Expression von *sfa8* auf RNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Die Messung der

proteingebundenen Aminosäuren in den SFA8-Linien ergaben einen deutlichen Anstieg im Gesamtproteingehalt gegenüber dem Wildtyp und den AK-Linien. Dieser Anstieg beruhte jedoch größtenteils auf einem erhöhten Arginingehalt; die Akkumulation des Sonnenblumen-Albumins war nicht ausreichend, um nennenswerte Änderungen des Aminosäureprofils im Bereich der schwefelhaltigen Aminosäuren zu bewirken. Eine Erhöhung des Gehalts an Methionin und Cystein wurde nicht festgestellt.

Molvig *et al.* (1997) erreichten durch die Übertragung des Sonnenblumen-Albumin 8-Gens in Lupine einen Anteil von 5% des Fremdproteins am Gesamtproteingehalt in den Samen. Eine Erhöhung des Schwefelgehalts im Samen wurde dennoch nicht erzielt, da der Gehalt an Cystein und an anorganischem Schwefel gleichzeitig reduziert war.

Versuche zur Erhöhung des Methioningehalts in Pflanzen durch die Transformation mit heterologen Genen für methioninreiche Speicherproteine wurden in diversen Arbeitsgruppen durchgeführt (siehe Müntz *et al.* 1998, Tabe & Higgins 1998). Das am häufigsten übertragene Gen ist das 2S-Albumin aus der Paranuß (BNG) (Altenbach *et al.* 1989, 1992, Townsend & Thomas 1994, Pickardt *et al.* 1995, Saalbach *et al.* 1995, Jung *et al.* 1997). Die Arbeiten mit dieser Sequenz wurden jedoch nach dem Bekanntwerden seiner allergenen Eigenschaften (Nordlee *et al.* 1996) weitgehend eingestellt. Die Verwendung anderer Gene für methioninreiche Proteine wurde in weiteren Publikationen beschrieben, aber auch hier wurde z.T. bereits allergenes Potential entdeckt (Kelly & Hefle 2000, SFA8). Chakraborty *et al.* (2000) zeigten die Expression eines 2S-Albumins aus *Amaranthus hypochondriacus* (AmA1, Raina & Datta 1992), das bis jetzt als nicht allergieauslösend angesehen wird, in Kartoffel. Ein weiteres Beispiel zur Veränderung der Samenproteine ist die Expression eines tierischen Proteins, des Rinder- $\beta$ -Caseins unter Kontrolle des samenspezifischen Lectinpromotors in Sojabohne (Philip *et al.* 2001).

Transgene Sojabohnenlinien, die 10% des 2S Albumins (BNG) enthielten, zeigten keine dieser Akkumulation entsprechende Erhöhung an proteingebundenem Methionin. Diese auch für Reis (Tabe *et al.* 2002) publizierte Beobachtung eines nicht-proportionalen Anstiegs von Methionin läßt die Unterdrückung endogener methioninreicher Proteine vermuten (Galili & Höfgen 2002). Ob diese Limitierung durch einen Mangel an verfügbarem Schwefel begründet ist, wurde noch nicht geklärt. Bei *Vicia narbonensis* war ein erhöhter Level an Methionin direkt mit der Expression des heterologen BNG korreliert. Hier zeigte sich, dass die Akkumulation des 2S Albumins mit einer Verringerung des endogenen schwefelhaltigen Proteins  $\gamma$ -Glutamyl-Ethenyl-Cystein (GEC) einherging (Saalbach *et al.* 1995, Enneking *et al.* 1998).

Die Beobachtung, dass ein hoher *steady state*-Level an mRNA des Transgens nicht unbedingt mit einer ebensolchen Akkumulation des Proteins korreliert ist, beschrieben Bellucci *et al.* (2000, 2002) für die Expression des schwefelreichen 10kD Zeins aus Mais in *Medicago sativa* und *Lotus corniculatus*. Andere Faktoren wie die mRNA Translationseffizienz oder die inkorrekte Faltung des Polypeptids könnten eine Rolle spielen, auch posttranskriptionale Effekte, z. B. Instabilität der mRNA aufgrund der

5´ untranslatierten Region des Transgens (Bellucci *et al.* 1997). Die Erhöhung der mRNA Stabilität für ein methioninreiches Speicherprotein (Dzs10) in Mais durch Integration eines chimären Gens mit modifizierten 5´UTR publizierten Lai & Messing (2002) und konnten damit einen konstant höheren Methioninlevel über mehrere Generationen erzielen.

Weitere Strategien zur gleichen Zielstellung sind z. B. die Veränderung endogener schwefelarmer Proteine durch *in vitro*-Mutagenese oder die Einfügung methioninreicher Sequenzen (Hoffman *et al.* 1988, de Clercq *et al.* 1990, de Clercq 2002). Saalbach *et al.* (1995) modifizierten das 12S Legumin aus *Vicia faba* durch Einführung einer *frame shift* Mutation in Legumin B4 (LeB4), dies führte zu einer Verlängerung des Leserasters um 16 zusätzliche Nucleotid-Triplets, einschließlich zweier Methionincodons. Die Expression des Genkonstrukts in Tabak wurde nachgewiesen, die Akkumulation des Proteins dagegen fand nicht statt. Weitere Versuche ergaben die unkorrekte Faltung und vorzeitige Degradation des Proteins (Müntz *et al.* 1997). De Clercq (2002) übertrug ein modifiziertes Arcelin-Gen (mit 7 statt 0 Methioninen von 240 Aminosäuren) in *Arabidopsis thaliana*, die Expression von Arc5a zeigte eine Akkumulation des modifizierten Proteins unter 0,5%, die nicht ausreichend für eine Anhebung des Methioningehalts in den Samen war. In keinem dieser Versuche konnte der Methioningehalt wesentlich gesteigert werden.

#### 4.5.2 Deregulierung des Aspartatstoffwechsels

Karchi *et al.* (1993) hatten gezeigt, dass die durch Expression des mutierten *lysC*-Gens aus *E. coli* erfolgte Deregulierung des Aspartatstoffwechsels den Gehalt an freiem Methionin in Tabaksamen erhöhen konnte. Der Anstieg auf den dreifachen Wert des Wildtyps an freiem Methionin wurde begleitet von einem 17fach erhöhtem Level an Threonin, der Gehalt an proteingebundenem Methionin war dagegen nur leicht erhöht.

Die Übertragung des *feedback*-insensitiven AK-Gens in *Vicia narbonensis* (Demidov *et al.* 2003) bewirkte eine Verdreifachung an freiem Methionin in homozygoten Linien im Vergleich zu Wildtypsamen; der Gehalt an Threonin, Glycin und in geringerem Umfang Leucin und Illeucin, waren ebenfalls erhöht. In Luzerne (*Medicago sativa*) führte die Expression der bakteriellen Aspartatkinase zu erhöhten Threoninwerten bei unverändertem Methionin- und Lysin-Level, Aspartat und Glutamat waren hier reduziert (Galili *et al.* 2000).

Die transgenen Fabalinien 12-2 und 12-40, die mit demselben Konstrukt transformiert worden waren, zeigten ebenfalls die spezifische Aktivität der insensitiven Aspartatkinase auf einem Level, der vergleichbar mit den in Tabaksamen bzw. *Narbonensis*-Samen gefundenen Werten ist. Das HPLC-Profil der freien Aminosäuren zeigte bis zu zehnfach erhöhte Werte für Threonin gegenüber dem Wildtyp, der Gehalt an Methionin war um 2-3fach erhöht. Dagegen sanken die Werte für Isoleucin, dem Folgeprodukt von Threonin zum Teil deutlich ab, Aspartat war größtenteils ebenfalls reduziert, was eine Limitierung

durch die Menge an zur Verfügung stehendem Aspartat bei *Vicia faba* bedeuten könnte. Dem gegenüber fanden Demidov *et al.* (2003) bei *Vicia narbonensis* keine Absenkung des Aspartatlevels, jedoch eine starke Reduzierung von Lysin entsprechend der Menge der erhöhten Threonin- und Methionin-Werte. In Tabak AK-Linien wurde keine entsprechende Absenkung von Lysin beschrieben (Karchi *et al.* 1993).

Weitere Enzyme des Aspartatstoffwechsels waren Ziel von Versuchen zur Produktion von Pflanzen mit einem verbesserten Gehalt an schwefelhaltigen freien Aminosäuren. Eine Schlüsselstellung bei der Methioninproduktion nimmt *O*-Phosphohomoserin ein. Es ist das gemeinsame Substrat für Threoninsynthase (TS) und Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (CGS) zur kompetitiven Produktion von Threonin bzw. Methionin (Ravanel *et al.* 1998). Durch Reduktion der TS Aktivität in einer Mutante von *Arabidopsis* (Bartlem *et al.* 2000) oder durch *antisense*-Abregulierung in Kartoffel (Zeh *et al.* 2001) konnte der Gehalt an Methionin, auf Kosten des Threoningehaltes stark gesteigert werden. Eine *antisense*-Inhibierung der Cystathionin- $\beta$ -Lyase (CBL) in Kartoffel erbrachte einen Anstieg der Metabolite Cystein, Cystathionin und Homoserin bei nahezu konstanten Threonin und Methioninwerten (Maimann *et al.* 2000).

Eine Deregulierung des Biosynthesewegs der Aspartat-Aminosäuren läßt sich nach den bisherigen Ergebnissen auch in *Vicia faba* erreichen. Ursprünglich war geplant, die Deregulierung mit einem Methionin-*sink* in Form eines zusätzlich eingeführten Speicherproteins (z. B. das in der vorliegenden Arbeit benutzte SFA8) durch Kreuzung entsprechender Linien oder durch Retransformation zu kombinieren. Dass hierdurch jedoch keine synergistischen Effekte zu erzielen sind, zeigten Demidov *et al.* (2003) inzwischen in *Vicia narbonensis*. In Doppeltransformanden, die durch Kreuzung oder Retransformation von AK- und BNG-Linien erzeugt worden waren, wurde lediglich ein additiver Effekt nachgewiesen.

Die bereits seit über 10 Jahren währenden Forschungsarbeiten zur Erhöhung des Methioningehaltes in Samen von Leguminosen (vor allem Soja) lieferten bislang keine in der Praxis anwendbaren Ansätze. Welche Bedeutung neueren Strategien zukommt, etwa der Erhöhung der mRNA-Stabilität (Lai & Messing 2002), bleibt abzuwarten.

Im Gegensatz hierzu waren die Ansätze zur Erhöhung des Lysins, einer anderen essentiellen, für die Tierproduktion wichtigen Aminosäure aus der Aspartatfamilie, erfolgreicher. Auch in diesem Fall besteht ein wesentlicher Schritt darin, den Biosyntheseweg der Aspartat-Aminosäuren zu deregulieren (Falco *et al.* 1995). Derzeit belegen gentechnisch veränderte *high lysine*-Maislinien den größten Teil der US-Freisetzungsflächen für transgene Pflanzen mit verbesserten Qualitätseigenschaften. Mit einer Kommerzialisierung entsprechender Sorten ist in den nächsten Jahren zu rechnen.

## 4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Transformationssystem für die Körnerleguminose *Vicia faba* etabliert, für die bisher keine Methode zur Genübertragung publiziert worden war. Obwohl die hier entwickelte Methode von einer Routineanwendung noch weit entfernt ist, wird es mit ihrer Hilfe erstmals möglich, auch bei *Vicia faba* gentechnische Methoden zur Einbringung heterologer Gene anzuwenden und in einem Zeitrahmen von 1-2 Jahren transgene Linien mit den erwünschten Eigenschaften zu erzeugen. Die Erprobung verschiedener Parameter zur Verbesserung der Regenerationsproblematik sollte weiter verfolgt werden, z. B. wären weitere Varianten der Verwendung von unterschiedlichen Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquellen im Kulturmedium denkbar. Eine Verkürzung der langen *in vitro*-Phase ist mit fortschreitender Laborroutine zu erwarten.

Die drei wesentlichsten Ziele der Züchtung bei *Vicia faba* stellen (i) die Verbesserung der Widerstandsfähigkeit der Sorten, z. B. gegen Pilz- und Virenbefall, (ii) die Herstellung männlich steriler Pflanzen für die Hybridzüchtung und (iii) die Verbesserung der Samenqualität und ihrer Inhaltsstoffe dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Linien hergestellt, die dem dritten Themenbereich, der Veränderung der Aminosäurezusammensetzung der Samen, zugehörig sind. Die Ergebnisse zeigten, dass Modifikationen im Aminosäureprofil möglich sind. Die weitere Forschung auf diesem Gebiet in den letzten Jahren hat jedoch ergeben, dass die bisher verfolgten Ansätze zur Erhöhung des Methioningehalts in den Samen hinter den Erwartungen zurückgeblieben sind. Zudem wurden Studien veröffentlicht, die die Vorteile eines erhöhten Methioninlevels in Kultursorten in Frage stellen, da dieser naturgemäß Schwankungen unterworfen ist und auch ein Zuviel an Methionin in der Tierfütterung problematisch sein kann. So fällt die Ökobilanz der Verfütterung von heimischem Weizen mit synthetisch hergestelltem Methionin als Additiv in der Geflügelmast besser aus als die Zufütterung von entsprechendem Sojaschrot (Degussa Newsletter 04/2003).

Ein Wechsel der Ziele, von *Output traits* (Qualitätsmerkmale und Nutzungseigenschaften wie z. B. Aminosäureveränderungen) hin zu *Input traits* (agronomische Eigenschaften, z.B. Resistenzen) zeigt weitere Perspektiven für die Anwendung der hier entwickelten Transformationsmethode auf. Die Übertragung von Resistenzgenen in ertragreiche Kultursorten, die bis jetzt an der Inkompatibilität der Genome bei konventioneller Kreuzung scheiterten, könnte durch Einsatz der Gentransfermethode zu der Entwicklung neuer Sorten mit verbesserter Widerstandsfähigkeit führen. Entsprechende Resistenzen sind aus verwandten *Vicia*-Arten oder aus Wildformen bekannt, z. B. gegen *Ascochyta fabae* und den Bohnenrost (*Uromyces fabae*) aus *Vicia narbonensis* oder gegen *Orobanche crenata* aus *Vicia sativa*.

Auch die Hybridzüchtung könnte ein Gebiet für die Anwendung des Gentransfer-Verfahrens sein. Der bis zu 25% höhere Ertrag von  $F_1$ -Hybridpflanzen bei *Vicia faba* macht die Bestäubungskontrolle über männliche Sterilität (MS), der Unfähigkeit einer Pflanze zur Bildung fertilen Pollens, zu einem wirtschaftlich interessanten Faktor. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist es noch nicht gelungen, ein gut funktionierendes System, basierend auf cytoplasmatischer männlicher Sterilität (CMS) für *Vicia faba* zu etablieren. Die Entwicklung transgener Linien für kerncodiert männlich sterile Pflanzen (NMS) anstelle des CMS-Systems der Bestäubungskontrolle, welches bei der Fababohne bis jetzt nur begrenzt verfügbar ist, könnte einen interessanten alternativen Ansatz für die Züchtungsforschung darstellen.