Abschlussbericht

Plant Made Pharmaceuticals - Expression rekombinanter Proteine in Tabak

Förderkennzeichen 22011206

Berichtszeitraum: gesamte Projektlaufzeit (01.01.2007 - 30.06.2009)

1. Kurze Darstellung zu:

1.1 Aufgabenstellung

Ziel des Projekts war die Entwicklung eines innovativen Ansatzes, der eine sehr hohe Produktion von wirtschaftlich interessanten, rekombinanten Proteinen in Tabak ("Bioreaktor") ermöglichen sollte. Hierzu sollte ein pflanzlicher Abwehrmechanismus, das „RNA-mediated gene silencing“ oder „RNA interference“ (RNAi), der gegen die Expression rekombinanter Proteine gerichtet ist, unterdrückt werden. Das RNAi hat bisher die Rentabilität pflanzlicher „Bioreaktoren“ erheblich beeinträchtigt. Darüber hinaus sollten die für das gewünschte Protein kodierenden Gene mit „matirx attachment regions“ (MARs) versehen werden, die eine Stabilisierung und eine weitere Erhöhung der Produktausbeute gewährleisten sollten. Um die direkte Nutzbarkeit des Systems zu demonstrieren, sollten therapeutische Antikörper (AK) in der Tabaksorte „Geudertheimer“ produziert werden.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In Rheinland-Pfalz wird der Tabakanbau von 275 landwirtschaftlich spezialisierten Betrieben auf 1272 Hektar durchgeführt. 90% der Betriebe werden im Haupterwerb bewirtschaftet und beschäftigen bis zu 3000 Arbeitskräfte. Mit einer jährlichen Ernte von 25.000-30.000 dt wird dabei Rohtabak im Wert von 10-12 Mill. € erzeugt. Noch fördert die EU den europäischen Tabakanbau, und eine zweistellige Millionensumme geht an deutsche Tabakproduzenten. Die Subventionierung soll schrittweise eingestellt werden. Es wurde nach Alternativen gesucht, um die Einkommen der Erzeuger für die Zukunft zu sichern. Im Rahmen des Projekts sollte die wirtschaftliche Nutzung des Tabaks als pflanzlicher „Bioreaktor“ eröffnet werden.

Zur Bearbeitung des Projektes stand eine technische Mitarbeiterin zur Verfügung, die für 30 Monate vom Projektträger finanziert wurde. Dazu wurden Eigenmittel der RLP AgroScience GmbH in Höhe von >100.000 € bereitgestellt. Laut Zuwendungsbescheide waren 56.205 € von der RLP AgroScience GmbH und 20.000 € von der Fa. Affimed Therapeutics AG,

Heidelberg, als zusätzliche Unterstützung vorgesehen. Da wir der Fa. Affimed während der Projektlaufzeit kein Produkt zur Testung liefern konnten, haben wir unsere Aktivitäten mit zusätzlichem Personal verstärkt (Wissenschaftler 12 statt 9 Mann-Monate (MM) und technische Mitarbeiter 6 MM), um das Vorhaben zu beschleunigen und damit Eigenleistungen in geplanter Höhe erbracht.

Vor Beginn des Projekts hatten wir bereits die cDNA der „RNA-directed RNA polymerase 6“ von *Nicotiana tabacum* kloniert (NtRDR6). Die NtRDR6 ist ein Schlüsselenzym bei der Aktivierung des pflanzlichen „RNA-mediated gene silencing“ Mechanismus. Weiterhin standen uns die Sequenz des „Chicken lysozym“ MAR und die Gene der Antikörper bzw. Antikörperfragmente zur Verfügung. Die Labor- und Laborgeräte-Ausstattung sowie die Infrastruktur unseres Institutes erlaubte die Durchführung aller Experimente.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die einzelnen Phasen und Aktivitäten des Projektes sind im Abschnitt „Ergebnisse“ detailliert beschrieben und entsprachen dem im Projektantrag vorgestellten bzw. den in den Zwischenberichten 2007 und 2008 genannten Ergänzungen und Änderungen. Aus Gründen eines besseren Projekterfolgs wurden einzelne Arbeiten vorzeitig beendet bzw. zusätzliche Experimente eingebunden. Alle Änderungen gegenüber den Angaben im Projektantrag bzw. den Zwischenberichten werden im Ergebnisteil ausführlich aufgeführt und begründet.

Finanzierungsplan

Die Mittelausgaben erfolgten im Rahmen des Zuwendungsbescheides von 119.860,00 € und wurden durch die Eigenmittel der RLP AgroScience GmbH in Höhe von mehr als 100.000,00 € ergänzt.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn

Für den weltweiten Biopharmakamarkt werden im Jahr 2010 Umsetzte von ca. 53 Mrd. US$ erwartet. Zu den Biopharmaka zählen u. a. monoklonale Antikörper, die überwiegend in Bakterien produziert werden. Die weltweite Produktionskapazität wird zukünftig nicht mehr ausreichen, um die Nachfrage des Marktes zu decken. Die Entwicklung von alternativen, z.B. pflanzlichen Produktionssystemen könnte dazu beitragen, diese Lücke zu schließen. Pflanzliche Produktionssysteme besitzen das Potential, große Proteinmengen zu relativ günstigen Kosten zu produzieren. Tabak wäre wegen seiner hohen Biomasse besonders als „Bioreaktor“ geeignet. Allerdings scheitern bisherige Bemühungen, das Potential der Pflanzen zu nutzen, an der Aktivierung des RNAi (Tomari and Zamore, 2005) (siehe auch

Nobelpreis für Medizin 2006), das durch hohe Expression von Fremdgenen (Transgenen) ausgelösten wird. Eliminiert man die Aktivität o. g. RDR6 wird der Abwehrmechanismus nicht aktiviert (Wassenegger and Krczal, 2006; Schiebel et al., 1998; Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000). Das RDR6 Gen selbst kann durch das RNAi inaktiviert werden (Schwach et al., 2005). Dies erreicht man durch die Expression sog. „hairpin" Konstrukte, bei denen DNA Sequenzen als (+)- und (-)-orientierte Fragmente miteinander verbunden werden. Wird ein solches „hairpin" Konstrukt in RNA umgeschrieben, entsteht ein RNAi-induzierender RNA-Doppelstrang (dsRNA). Eines der Ziele unserer Arbeiten war es daher die Produktion rekombinanter Proteine durch die Inaktivierung des RNAi mittels Inaktivierung der RDR6 zu bewirken.

Eine weitere Steigerung der Transgenexpression sollte durch die Verbindung der Transgene mit flankierenden MARs erhöht werden (Butaye et al., 2004). Transgene, die von MARs flankiert sind, können transkriptionell aktive Domänen ausbilden, selbst wenn die Integration des Transgens in eine inaktive Chromatinregion erfolgt ist (Holmes-Davis and Comai, 1998).

1.5 Zusammenarbeit mit andern Stellen

Direkte Zusammenarbeit erfolgte von Projektbeginn an mit der Fa. Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, und dem Bundesverband Deutscher Tabakpflanzer, von denen jeweils Vertreter bei mehreren Projektbesprechungen anwesend waren.

2. Eingehende Darstellung:

2.1a Verwendung der Zuwendung

Die Zuwendungen wurden entsprechend dem Zuwendungsbescheid für Personal (93.360,00 €) und sächliche Verwaltungsausgaben (26.500,00 €) verwendet. Die detaillierte Auflistung ist den Zahlungsanforderungen zu entnehmen. Die Personal- und Sachmittel wurden im vollen Umfang für die Durchführung der unter 2.1b aufgeführten Experimente benötigt.

2.1a Erzielte Ergebnisse

Arbeitspaket 1: Konstruktion der Pflanzenexpressionsvektoren

1. Vektorgeneration:

In einer ersten Versuchsreihe wurden drei von der Firma Affimed bereitgestellte Gensequenzen, die für die beiden Fragmente (LCH und VHCH1) des humanen AK AFM14 bzw. für die vollständige cDNA (EpCamxCD) des humanen AFM13 AK kodieren, dem

pflanzlichen „Codon-Usage“ durch Neusynthese (GENEART, Regensburg, Anlage 1) angepasst. Die drei cDNA-Sequenzen wurden dabei jeweils am 5’-Ende mit einer „Leader“-Sequenz für die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER-leader) und am 3’-Ende mit einer „Histin-Tag“- (His-Tag-) Sequenz versehen. Die synthetisierten Gene wurden bei AlPlanta in ein modifiziertes Vektorkonstrukt, den pRT104 pA Rbcs, kloniert (Anlage 2, Abb. 1). Die im ursprünglichen Antrag nicht vorgesehene Modifikation umfasste die Insertion einer zweiten 3’-Terminatorsequenz, die des Rubisco “small subunit“- (Rbcs-) Gens, welche die Transkription der Transgene zusätzlich stabilisieren sollte. Nachdem das AK-Gen bzw. die beiden AK-Fragmente erfolgreich in den pRT104 pA Rbcs eingesetzt wurden, konnten anschließend die jeweiligen Expressionskassetten in den binären Vektor pGREENII übertragen werden (Anlage 2, Abb. 2). Die Expression der cDNA-Sequenzen in der Pflanze wurde durch Verwendung des „*Cauliflower mosaic virus*“ (CaMV) 35S Promotors (P35S) und der CaMV 35S-Terminatorsequenz (pA-35S) gewährleistet.

Am Beispiel des AFM-LCH AK-Fragments sollte der Effekt einer möglichen Expressionssteigerung durch den Einsatz von MAR-Elementen gezeigt werden. Deshalb wurde das LCH-Genkonstrukt am 5’- und 3’-Ende mit diesen Elementen versehen (Anlage 2, Abb. 3).

Die Klonierung von MAR-Elementen an die 5’- bzw. 3’-Enden der beiden anderen Genkonstrukte wurde nicht durchgeführt. Aufgrund unvorgesehener Schwierigkeiten bei der Klonierung von 2 der 3 synthetisierten Antikörpergene ergaben sich Verzögerungen. Ohne den Verzicht auf das Einsetzen der MAR-Elemente hätte das Arbeitspaket nicht rechtzeitig fortgesetzt werden können. Darüber hinaus entspricht die Verwendung von MAR-Elementen nicht mehr dem „Stand der Technik“. Die hier vorgeschlagenen alternativen Strategien, w. z. B. die Stabilisierung der rekombinanten Proteine, sind geeigneter, da, im Gegensatz zu den MAR-Elementen, dafür nur sehr kurze Fremdsequenzen benötigt werden.

2. Vektorgeneration:

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass wir uns aufgrund einer Arbeit, die im Oktober 2008 online publiziert wurde (Sunilkumar et al., 2009), dazu entschlossen hatten, die AK-AFM14-Fragmente bzw. das AK-AFM13-Gen mit Sequenzen zu versehen, die für das KDEL- bzw. das HDEL-ER-Retentionssignal kodieren. In o. g. Publikation wurde eine deutliche Erhöhung der Expression eines AK-Fragments durch eine KDEL-vermittelte Stabilisierung des Proteins erzielt. Die AK-AFM14 Fragmente mit HDEL haben wir extern von der Firma GENEART synthetisieren lassen (Anlage 3). Das AK-AFM13-Gen wurde durch Insertion in ein von uns modifiziertes Derivat des binären Vektors pPZP (Hajdukiewicz, 1994) translational mit einer KDEL-Sequenz fusioniert. Auf weitere Details bezüglich der Generation dieser Genkonstrukte wird hier verzichtet, da erst nach Ablauf des Projekts die

stabile Transformation von Tabak mit den entsprechenden Konstrukten begonnen wird bzw. wurde.

Mit den hier vorgestellten neuen Konstrukten konnten die gesteckten Ziele der meisten Arbeitspakete nicht mehr im Rahmen der Projektlaufzeit erreicht werden. Wir haben uns dennoch zu diesem Schritt entschieden, um später eine optimierte Expressionsplattform bereitstellen zu können. Wir werden versuchen, dieses System mit eigenen Mitteln weiterzuentwickeln und zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Arbeitspaket 2: Konstruktion des NtRDR6-hairpin

Um den o. g. Abwehrmechanismus der höheren Pflanzen gegen die Expression fremder Gene stillzulegen, wurde die RNA-vermittelte Inaktivierung der RDR6 als Strategie gewählt. Aus der cDNA Sequenz der RDR6 des Tabaks *N. tabacum*, Cultivar „SR1 Petit Havanna“, (NtRDR6) wurde ein 260 bp langes Fragment für die Konstruktion des NtRDR6-hairpin ausgewählt. Die Sequenz dieses Fragments wurde so ausgesucht, dass die resultierende NtRDR6-hairpin RNA ($hpRNA_{RDR6}$) spezifisch die Expression der endogenen NtRDR6 herunterreguliert, ohne dabei die anderen Gene der NtRDR-Genfamilie zu beeinflussen. Die (+)- und (-)-orientierten NtRDR6-Fragmente wurden durch das Intron 3 des Tomaten RDR2- (SeRDR2-) Gens von einander getrennt. Das NtRDR6-hairpin-Konstrukt wurde in das von uns modifizierte pGREENII Vektor-Derivat, pG104 pARbcs, zwischen den P35S und pA-35S eingesetzt (Anhang 2, Abb. 4A). Das resultierende Plasmid wurde pG104 IR R6 genannt (Anhang 2, Abb. 4B).

Arbeitspaket 3 und 4: Transformation von Tabak und molekulare Analyse transgener Tabaklinien

In diesem Projektvorhaben wurde die Herstellung von selektionsmarkerfreien, transgenen Pflanzen verfolgt. Mit Hilfe der Co-Transformationsstrategie sollte das für die Durchführung der Transformation notwendige Selektionsmarkergen durch Auskreuzung nachträglich aus dem Genom der transgenen Pflanze eliminiert werden. Die Co-Transformation wurde mittels der „Blattstückchen-Transformation“ von zwei verschiedenen Arbeitgruppen von der RLP AgroScience GmbH unter Anwendung von zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt.

1. Transformationsansatz:

Die in den Arbeitspaketen 1 und 2 generierten AK-Genkonstrukte sowie entsprechende Konstrukte, die das Kanamycin-Resistenzgen (NPTII) als Selektionsmarkergen enthalten (Anhang 2, Abb. 5), wurden jeweils in den Agrobakterienstamm ATHV überführt. Die binären Vektoren, die das Selektionsmarkergen enthalten, wurden zusätzlich mit einem Reportergen versehen, welches einerseits die schnelle Identifizierung von transformierten Regeneraten in

der Gewebekultur und andererseits ein einfaches „screening“ des auszukreuzenden Selektionsmarkergens im Gewächshaus ermöglichen soll. Hier wurde neben dem etablierten β-Glucuronidase- (GUS-) Reportergen, dessen Genprodukt in einem histochemischen Test leicht nachweisbar ist, das MybA-Gen aus *Vitis labruscana* als visuelles Reportergen verwendet (VLmybA1-2_pBI121). Das MybA-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der ein Gen aktiviert, dessen Genprodukt bei der pflanzlichen Anthocyansynthese beteiligt ist. Arbeiten bei AlPlanta haben gezeigt, dass eine konstitutive Expression dieses Gens in *N. tabacum* zu einer Akkumulierung von Anthocyanen und damit zu einer Dunkelrotfärbung des Pflanzengewebes führt (Abb. 1). Dieser Ansatz war neu in das Projektvorhaben aufgenommen worden, da mit dem MybA-Reporter ein effizienteres „screening“ von Regeneraten und aufspaltenden Populationen zu erwarten war.

Beide LCH-Genkonstrukte (mit und ohne flankierenden MAR-Elementen) wurden in die Tabaksorte, Geudertheimer’ transformiert. Das Genkonstrukt ohne MAR-Sequenzen wurde

Abbildung 1: Aufspaltende Nachkommenschaft einer MybA-überexprimierenden Tabakpflanze. MybA-überexprimierende Keimlinge haben durch Akkumulationen von Anthocyanen eine dunkelrote Farbe. Diejenigen Keimlinge, bei denen das MybA-Gen ausgekreuzt wurde, sind grün.

als Kontrolle für die Funktionalität der MAR-Elemente in die Transformation aufgenommen. Aus den Co-Transformationsexperimenten mit dem GUS-Gen als Reportergen konnten 76, aus Experimenten mit dem MybA-Gen 106 unabhängige Transformanten isoliert werden. Mit Hilfe der PCR-Technologie wurde geprüft, ob in den „Co-Transformanten“ neben dem Selektions- und dem Reportergenkonstrukt auch das LCH-AK-Fragment enthalten ist. Nach Auswertung der PCR-Daten konnten 23 bzw. 12 unabhängige Linien identifiziert werden, die das GUS bzw. das MybA-Gen zusammen mit dem mit MAR-Elementen versehene LCH-Genkonstrukt trugen. Im Gegensatz dazu konnten keinen Linien isoliert werden, bei denen

neben dem GUS bzw. dem MybA-Gen das MAR-Elemente-freie LCH-Genkonstrukt integriert vorlag.

2. Transformationsansatz:

Für den zweiten Transformationsansatz wurden in erster Line die Derivate des pPCV702SM (Wassenegger, et al., 1994) verwendet. In die P35S/pA-nos (pA-nos, 3'-Terminatorsequenz des Nopalin-Synthase-Gens) Expressionskassette dieses Vektors wurde das MybA-Gen (pPCV702SM-Myb) bzw. das „green fluorescent protein-" (GFP-) Gen (pPCV702SM-GFP5) als Reportergen eingesetzt (Anhang 2, Abb. 6). An dieser Stelle sei erwähnt, dass wir feststellen mussten, dass die konstitutive Expression des MybA-Gens zu einer starken Verlangsamung des Tabakwachstums führte (Abb. 2). Der Umstand, dass die transgenen Pflanzen später für genetische Kreuzungen verwendet werden sollten, hatte uns dazu bewogen, auf die weitere Charakterisierung der MybA-exprimierenden Pflanzen zu verzichten. Die Blüten- und Samenbildung war derart verlangsamt, dass genetische Kreuzungen während der Laufzeit des Projekts nicht hätten durchgeführt werden können. Zudem hatte die Tabaksorte Geudertheimer im Gewächshaus

Abbildung 2: Vergleich der Wuchshöhe zwischen einer MybA-überexprimierenden und einer nicht-MybA-exprimierenden, aber transgenen Tabakpflanze.

Beide Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Aufnahme gleich alt. Die Wuchsgeschwindigkeit einer MybA-überexprimierenden ‚Geudertheimer' Takakpflanze (linke Pflanze) war aber gegenüber der einer Wildtyppflanze (rechte Pflanze) um etwa 1/3 verlangsamt.

eine ausgesprochen hohe Wuchsform und eine deutlich längere Generationszeit als die von uns üblicherweise verwendeten *Nicotiana*-Sorten (Abb. 3). Diese Faktoren hatten die Einhaltung der zeitlichen Projektvorgaben bereits zusätzlich erschwert.

Der pPCV702SM Vektor trägt neben der Expressionskassette, in welche die Reportergene eingesetzt wurden, eine zweite Kassette, die das NPTII-Gen exprimiert. Die Kanamycin-Reistenz wurde auch hier, wie im ersten Transformationsansatz genutzt, um transformierte Zellen zu selektionieren.

Die Co-Transformation von Tabak mit dem pPCV702SM-GFP5 und dem MAR-Elemente-freien LCH-Genkonstrukt ergab bisher acht unabhängige Linien, die durch PCR-Analyse identifiziert wurden. Die Co-Transformation mit pPCV702SM-GFP5 und pG104 IR R6 brachte vier Linien hervor, die bereits einer „Southern blot" Analyse unterzogen wurden, um die Transgen-Kopienzahl bestimmen zu können. Dabei stellte sich heraus, dass drei der vier Linien das NtRDR6-hairpin-Konstrukt als Einzelkopie enthielten. Die vierte Linie wies hingegen zwei Integrationsorte auf. Es sei erwähnt, dass eine der Linien zwar noch das NPTII- aber nicht mehr dass GFP-Gen enthielt. Offensichtlich hatten sich hier Umlagerungen vor oder während der T-DNA-Integration ereignet. Co-Transformationsexperimente mit den anderen AK-Konstrukten wurden zwar durchgeführt, aber nicht weiter verfolgt, als sich herausstellte, dass bereits transient

Abbildung 3: Vergleich der Wuchshöhe zwischen den Tabaksorten Geudertheimer (linke Pflanze, als Jungpflanze am 05. 03. 2009 getopft) und SR1 Petit Havana (rechte Pflanze, als Jungpflanze am 29. 06. 2009 getopft) nach Beginn der Blüte.

exprimierte AK bzw. AK-Fragmente instabil waren (siehe unten). Durch die Fusion der Proteine an das KDEL bzw. das HDEL Peptid konnte dieses Problem gelöst werden (siehe

unten). Eine erneute Co-Transformation mit diesen modifizierten Konstrukten konnte allerdings im zeitlichen Rahmen dieses Projekts nicht mehr ausgeführt werden.

Analyse der Funktionalität des RDR6-hairpin:

Der Nachweis für den Einfluss der RDR6-hairpin-Expression auf das „gene silencing“ wurde mit Hilfe von zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte bei einer reduzierten RDR6-Aktivität die Produktion von endogenen „short interfering“ RNAs (siRNAs), den s. g. „trans-acting“ siRNAs (tasiRNAs), verringert sein. Wir hatten deshalb versucht, ein auf Tabak abgestimmtes Protokoll für den Nachweis von tasiRNAs zu etablieren. Diese Arbeiten umfassten beispielsweise die Klonierung der *N. tabacum* TAS3 cDNA. Die TAS3 RNA ist eine der drei RNA-Sequenzen, die durch die Aktivität der RDR6 in einen RNA-Doppelstrang überführt wird, der dann wiederum zu tasiRNAs prozessiert werden kann. Von den TAS RNAs ist leider nur die auch in der Modelpflanze *Arabidopsis thaliana* sehr schwach exprimierte TAS3 RNA konserviert. Da wir mit Hilfe des Northern blot Verfahrens bereits in Tabak Wildtyp-Pflanzen weder die TAS3 RNA noch die von der TAS3 RNA prozessierten tasiRNAs detektieren konnten, haben wir diesen direkten Weg für den Nachweis der RDR6-hairpin-Funtionalität nicht weiter verfolgt.

Als zweites Analyseverfahren wollten wir die Inaktivierung eines GFP-Reportergenkonstrukts in hpRNA$_{RDR6}$-exprimierenden Pflanzen untersuchen. Zu diesem Zweck wurden bereits GFP-exprimierende *N. tabacum* cv. Geudertheimer Linien hergestellt. Nach erfolgreicher genetischer Kreuzung von NtRDR6-hairpin und GFP Linien, sollten GFP-exprimierende Nachkommen mit einem „sense post-transcriptional gene silencing“ (S-PTGS) Genkonstrukt (pPCV702SM 5end GFP, wurde bereits hergestellt) infiltriert werden, welches gegen die mRNA des GFP gerichtet war. In Pflanzen, in denen die RDR6-Aktivität reduziert vorliegt, sollte kein S-PTGS erfolgen. Diese Experimente wurden neu in das Projektvorhaben aufgenommen, um transgene Tabakpflanzen für Kreuzungsexperimente selektieren zu können, die eine effizient funktionierende hpRNA$_{RDR6}$ produzieren. Drei der bereits oben beschriebenen Linien, die aus der Co-Transformation mit pPCV702SM-GFP5 und pG104 IR R6 hervorgingen, werden derzeit direkt für Infiltrationsexperimente mit dem pPCV702SM 5end GFP Konstrukt verwendet.

Parallel zu den Funktionsanalysen wurden von Stecklingen der o. g. vier Linien nach Selbstbefruchtung Samen geerntet. Derzeit erfolgt die Aufzucht der Nachkommen, um die T1-Generation dieser Linien molekularbiologisch untersuchen, den Selektionsmarker auszukreuzen und homozygote Linen identifizieren zu können, die Einzelkopien des NtRDR6-hairpin-Konstrukts enthalten.

Arbeitspaket 5: Bestimmung der Stabilität rekombinanter Antikörper

Diese Studien wurden u. a. im Rahmen einer Bachelor-Arbeit von Frau Ngar Shien Leong vom 01. Oktober 2008 bis zum 28. Februar 2009 durchgeführt, wobei in erster Linie die AK-Genkonstrukte, die mit dem GFP fusioniert wurden, in *N. benthamiana* Blätter infiltriert wurden. Parallel dazu wurden allerdings auch stabil transformierte Tabakpflanzen verwendet (Arbeitspaket 2), die das LCH-Gen enthielten. Das wichtigste Ergebnis dieser Studien war die Erkenntnis, dass AK-Fragment ohne KDEL bzw. HDEL Peptide-Fusionierung, instabil waren. Dies zeigte sich in einem direkten Vergleich zwischen den Fusionsproteinen mit KDEL bzw. HDEL und denen ohne „Leader“ (Abb. 4). In Western blot Analysen wurden die transient exprimierten Fusionsproteine mit GFP-spezifischen Antikörpern detektiert. Dabei zeigte sich, wie am Beispiel der LCH-Genkonstrukte in Abbildung 5 dargestellt, dass offensichtlich das LCH-Protein proteolytisch gespalten wurde. Das GFP alleine hat eine Größe von etwa 28 kDa (Abb. 5C). Das Hauptprodukt, dass bei der Western blot Analyse der ER-LCH-GFP-Probe nachgewiesen werden konnte, lag bei 36 kDa, was darauf hinweist, dass eine Spaltung innerhalb des LCH-Proteins erfolgt war (Abb. 5A). Im Gegensatz dazu wurde bei der Analyse der ER-LCH-HDEL-GFP-Probe ein Hauptprodukt detektiert, das mit einer Größe von 52 kDa dem zu erwartenden Protein entspricht (Abb. 5B). Obwohl bei allen Proben, die aus infiltrierten Blättern gewonnen wurden, Degradationsprodukte zu finden waren, konnten nur bei Verwendung der HDEL-fusionierten Konstrukte, größere Mengen an AK-Proteinen voller Länge nachgewiesen werden.

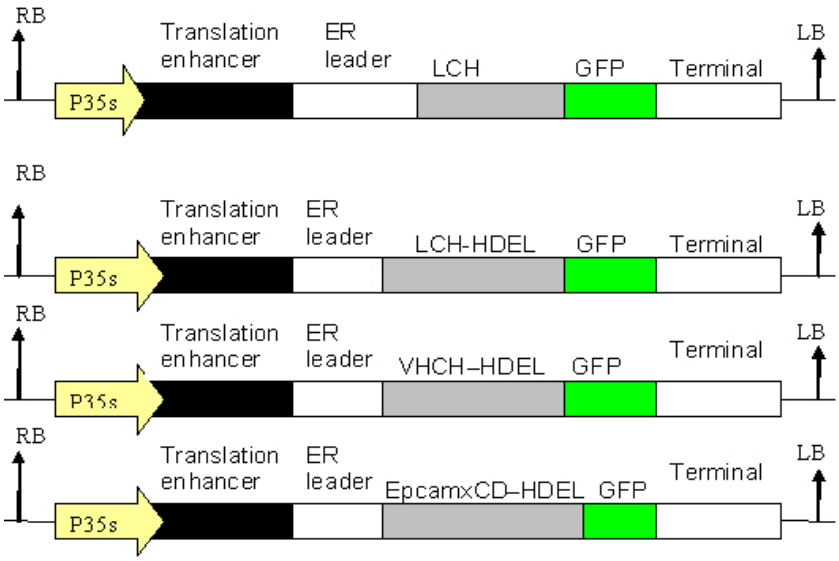


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Genkonstrukte, die für Expressionsstudien der AK-Proteine in Blätter von *Nicotiana benthamiana* infiltriert wurden. Von oben nach unten pKB ER-LCH-GFP, pKB ER-LCH-HDEL-GFP, pKB ER-VHCH-HDEL-GFP, pKB ER-EpCAMxCD-HDEL-GFP.

LB = „left border“ Sequenz; P35S = “Cauliflower mosaic virus” 35S Promotor; ER leader = ‚Leaderpeptid’ für die Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum; Terminal = 3’-Terminatorsequenz des “Cauliflower mosaic virus” 35S Gens; RB = „right border“ Sequenz.

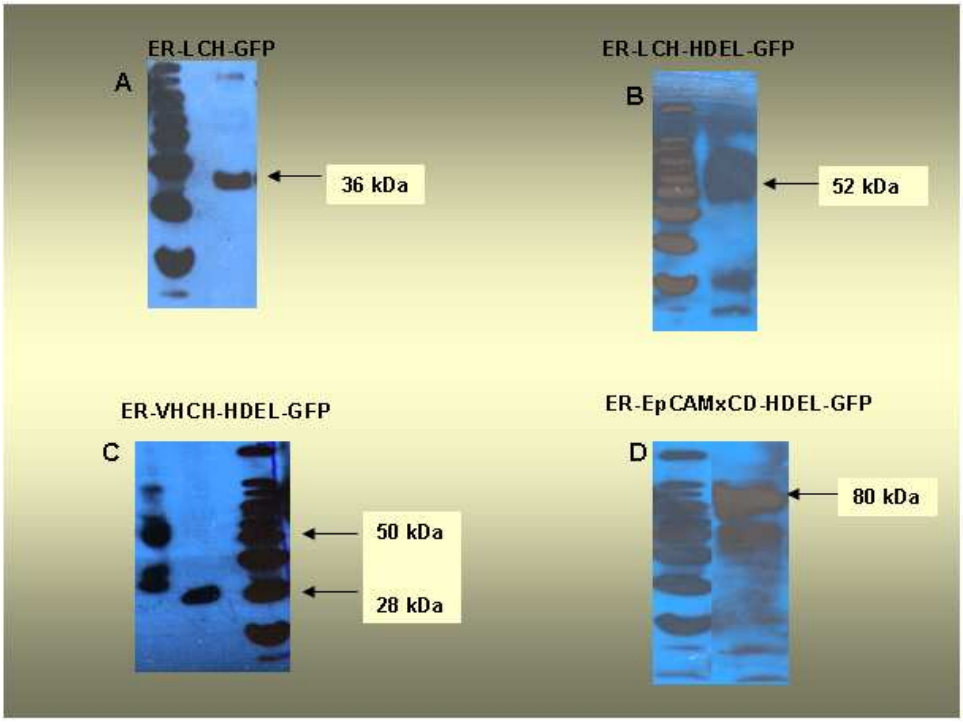


Abbildung 5: Western blot Analyse von Gesamtproteinproben aus Blättern agroinfiltrierter *Nicotiana benthamiana* Pflanzen.
Für die Infiltration wurden die in Abbildung 4 dargestellten Genkonstrukte verwendet.

2.2 Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Siehe Anlage 4: Verwendungsnachweisbericht (der Bericht wird nach Absprache der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. und der Verwaltung der RLP AgroScience GmbH zum Jahresende nachgereicht)

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Abschnitt 2.1a -Erzielte Ergebnisse- und den Anlagen 1 bis 3 ist hinreichend dargestellt, dass die geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen waren, um das Vorhaben zum Erfolg zu bringen. Die unerwarteten und unvorhersehbaren Komplikationen, die während der Ausführung der Arbeiten erkannt wurden, haben alle zusätzlichen Experimente und Strategieänderungen erforderlich gemacht.

2.4 Voraussichtliche Nutzen/Verwendbarkeit des Ergebnisses

Die bisher erzielten Erfolge reichen derzeit für eine direkte Anwendung nicht aus. Eine Nutzung der hergestellten transgenen Pflanzen kann aber nach Abschluss der von uns noch über die Laufzeit des Projekts hinweg weitergeführten Arbeiten in Aussicht gestellt werden. Die RLP AgroScience GmbH steht diesbezüglich auch nach Beendigung des Projekts im engen Kontakt mit dem Bundesverband Deutscher Tabakpflanzer.

2.5 Dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens

In erster Linie sei hier eine Studie genannt, die die Bedeutung von ER-Retentionssignal für die Stabilität von rekombinanten, in Pflanzern produzierten Antikörpern beschreibt (Sunilkumar et al., 2009). Auf Grund dieser Publikation haben wir gravierende Änderungen unserer ursprünglichen Plattform-Strategie vorgenommen (siehe oben).

2.6 Geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Zum jetzigen Zeitpunkt reichen die Ergebnisse nicht aus, unsere Arbeiten in einem international anerkannten Journal zu publizieren. Nach erfolgreichem Abschluss aller Arbeiten planen wir, ein Manuskript bei der Zeitschrift „Transgenic Research“ einzureichen.

Förderung des Projektes durch Eigenmittel der RLP AgroScience GmbH:

Konzeptionelle Mitarbeit und Betreuung der Arbeiten durch Dr. Michael Wassenegger, Leiter Forschungsschwerpunkt Epigenetik, und Dr. Michael Wallbraun, Arbeitsgruppenleiter Molekulare Pflanzenzüchtung sowie Durchführung von Experimenten durch technisches Planstellenpersonal.

Sachmittel aus dem AlPlanta Haushaltsetat.

Literaturnachweise:

Butaye, K.M.J. et al. (2004). Stable high-level transgene expression in Arabidopsis thaliana using gene silencing mutants and matrix attachment regions. Plant J. 39: 440-449.
Dalmay, T. et al. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell 101: 543-553.
Holmes-Davis, R. and Comai, L. (1998). Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression. Trends in Plant Science: 3: 91-97.
Hajdukiewicz, P. et al. (1994). The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation Plant Mol. Biol. 25: 989-994.
Mourrain, P. et al. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. Cell 101: 533-542.
Schiebel, W. et al. (1998). Isolation of a RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato leaf-tissue mRNA. Plant Cell 10: 2087-2101.
Schwach, F. et al. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. Plant Physiol. 138: 1842-1852.
Sunilkumar, G. et al. (2009). Expression of anti-K99 scFv in transgenic rice tissues and its functional characterization. Transgenic Res. 18: 347-360.
Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2005). Perspective: Machines for RNAi. Genes & Dev. 19: 517-529.
Wassenegger, M. and Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. Trends Plant Sci. 11: 142-151.
Wassenegger, M. et al. (1994). An infectious viroid RNA replicon evolved from an in vitro-generated noninfectious viroid deletion mutant via a complementary deletion in vivo. EMBO J. 13: 6172-6177.

Order No. **0705153** **Map**

Customer **AgroScience: Michael Wallbraun**

Name of the gene **LCH** 12.04.2007 16:18:17

optimized for Nicotiana tabacum

```
            KpnI  BspHI
      GGGCGAATTGGGTACCTCATGAAAACTAACCTTTTCCTTTTCCTTATTTTCTCTCTCCTT
1     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      CCCGCTTAACCCATGGAGTACTTTTGATTGGAAAAGGAAAAGGAATAAAAGAGAGAGGAA
                        M__K__T__N__L__F__L__F__L__I__F__S__L__L__

                                                          PvuII
      TTGTCTCTTTCATCTGCTGAGTCATCTGAGCTTACTCAGGACCCAGCTGTTTCTGTGGCT
61    ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AACAGAGAAAGTAGACGACTCAGTAGACTCGAATGAGTCCTGGGTCGACAAAGACACCGA
      L__S__L__S__S__A__E__S__S__E__L__T__Q__D__P__A__V__S__V__A__

      CTTGGACAGACTGTGAGGATTACTTGCCAGGGTGATAGTCTTAGGAACTTCTACGCTTCT
121   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GAACCTGTCTGACACTCCTAATGAACGGTCCCACTATCAGAATCCTTGAAGATGCGAAGA
      L__G__Q__T__V__R__I__T__C__Q__G__D__S__L__R__N__F__Y__A__S__

      TGGTATCAACAAAAGCCAGGACAGGCTCCAACTCTTGTGATTTACGGACTTTCTAAGAGG
181   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      ACCATAGTTGTTTTCGGTCCTGTCCGAGGTTGAGAACACTAAATGCCTGAAAGATTCTCC
      W__Y__Q__Q__K__P__G__Q__A__P__T__L__V__I__Y__G__L__S__K__R__

      CCATCAGGTATTCCTGATAGGTTCTCTGCTTCTTCATCTGGAAACACTGCTTCTCTTACT
241   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GGTAGTCCATAAGGACTATCCAAGAGACGAAGAAGTAGACCTTTGTGACGAAGAGAATGA
      P__S__G__I__P__D__R__F__S__A__S__S__S__G__N__T__A__S__L__T__

      ATTACTGGTGCTCAGGCTGAAGATGAGGCTGATTACTACTGCCTTCTTTACTACGGTGGA
301   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      TAATGACCACGAGTCCGACTTCTACTCCGACTAATGATGACGGAAGAAATGATGCCACCT
      I__T__G__A__Q__A__E__D__E__A__D__Y__Y__C__L__L__Y__Y__G__G__

                                          HincII
      GGACAACAGGGAGTTTTTGGTGGAGGAACTAAGTTGACTGTGCTTGGACAACCTAAGGCT
361   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      CCTGTTGTCCCTCAAAAACCACCTCCTTGATTCAACTGACACGAACCTGTTGGATTCCGA
      G__Q__Q__G__V__F__G__G__G__T__K__L__T__V__L__G__Q__P__K__A__

      GCTCCATCTGTGACTTTGTTCCCTCCATCTTCTGAAGAGCTTCAGGCTAACAAGGCTACT
421   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      CGAGGTAGACACTGAAACAAGGGAGGTAGAAGACTTCTCGAAGTCCGATTGTTCCGATGA
      A__P__S__V__T__L__F__P__P__S__S__E__E__L__Q__A__N__K__A__T__

      CTTGTGTGCCTTATTTCTGATTTCTACCCAGGTGCTGTTACTGTTGCTTGGAAGGCTGAT
481   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GAACACACGGAATAAAGACTAAAGATGGGTCCACGACAATGACAACGAACCTTCCGACTA
      L__V__C__L__I__S__D__F__Y__P__G__A__V__T__V__A__W__K__A__D__

      TCTTCTCCAGTTAAGGCTGGTGTTGAGACTACTACTCCATCTAAGCAGTCTAACAACAAG
541   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AGAAGAGGTCAATTCCGACCACAACTCTGATGATGAGGTAGATTCGTCAGATTGTTGTTC
      S__S__P__V__K__A__G__V__E__T__T__T__P__S__K__Q__S__N__N__K__
```

```
    TACGCTGCTTCTTCTTACCTTTCTCTTACTCCAGAGCAGTGGAAGTCTCACAGGTCTTAC
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    ATGCGACGAAGAAGAATGGAAAGAGAATGAGGTCTCGTCACCTTCAGAGTGTCCAGAATG
    Y__A__A__S__S__Y__L__S__L__T__P__E__Q__W__K__S__H__R__S__Y__

    TCTTGCCAAGTTACTCACGAGGGATCTACTGTGGAAAAGACTGTGGCTCCAACTGAGTGC
661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    AGAACGGTTCAATGAGTGCTCCCTAGATGACACCTTTTCTGACACCGAGGTTGACTCACG
    S__C__Q__V__T__H__E__G__S__T__V__E__K__T__V__A__P__T__E__C__

                                  BglII SacI
    TCTCATCATCACCATCACCACTGATAAAGATCTGAGCTCCAGCTTTTGTTCCC
721 ---------+---------+---------+---------+---------+---
    AGAGTAGTAGTGGTAGTGGTGACTATTTCTAGACTCGAGGTCGAAAACAAGGG
    S__H__H__H__H__H__H__*__*__
```

Order No.	**0705154 Map**
Customer	**AgroScience: Michael Wallbraun**
Name of the gene	**VHCH1**
optimized for	Nicotiana tabacum

12.04.2007 16:21:52

```
            KpnI  BspHI
      GGGCGAATTGGGTACCTCATGAAAACTAACCTTTTCCTTTTCCTTATTTTCTCTCTTCTT
1     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      CCCGCTTAACCCATGGAGTACTTTTGATTGGAAAAGGAAAAGGAATAAAAGAGAGAAGAA
                        M__K__T__N__L__F__L__F__L__I__F__S__L__L__

      CTTTCACTTTCTTCAGCAGAGGAGGTTCAGCTTGTTGAATCTGGTGGAGGACTTGTTCAA
61    ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GAAAGTGAAAGAAGTCGTCTCCTCCAAGTCGAACAACTTAGACCACCTCCTGAACAAGTT
      L__S__L__S__S__A__E__E__V__Q__L__V__E__S__G__G__G__L__V__Q__

      CCTGGTGGATCTCTTAGGCTTTCTTGCGCTGCTTCTGGATTCATGTTCTCTACTTACGAT
121   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GGACCACCTAGAGAATCCGAAAGAACGCGACGAAGACCTAAGTACAAGAGATGAATGCTA
      P__G__G__S__L__R__L__S__C__A__A__S__G__F__M__F__S__T__Y__D__

      ATGTCTTGGGTTAGGCAAGCTCCTGGAAAAGGACCAGAATGGGTGTCAGGAATTGGATCT
181   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      TACAGAACCCAATCCGTTCGAGGACCTTTTCCTGGTCTTACCCACAGTCCTTAACCTAGA
      M__S__W__V__R__Q__A__P__G__K__G__P__E__W__V__S__G__I__G__S__

      TCTTCTGGAAACACTTACTACGCTGATTCTGTGAAGGGAAGGTTCACTGTGTCTAGGGAT
241   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AGAAGACCTTTGTGAATGATGCGACTAAGACACTTCCCTTCCAAGTGACACAGATCCCTA
      S__S__G__N__T__Y__Y__A__D__S__V__K__G__R__F__T__V__S__R__D__

      AACTCTAAGAACACTCTTTACCTTCAGATGAACTCTCTTAGGGCTGAGGATACTGCTGTT
301   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      TTGAGATTCTTGTGAGAAATGGAAGTCTACTTGAGAGAATCCCGACTCCTATGACGACAA
      N__S__K__N__T__L__Y__L__Q__M__N__S__L__R__A__E__D__T__A__V__

      TACTATTGCGCTAGGGCTTTCATTAGACAGTCTAGGGGTGATGTTCCAGATCAGACTTCT
361   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      ATGATAACGCGATCCCGAAAGTAATCTGTCAGATCCCCACTACAAGGTCTAGTCTGAAGA
      Y__Y__C__A__R__A__F__I__R__Q__S__R__G__D__V__P__D__Q__T__S__

      TTCGATTACTGGGGACAGGGAACTCTTGTGACTGTGTCATCTGCTTCTACTAAGGGACCA
421   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AAGCTAATGACCCCTGTCCCTTGAGAACACTGACACAGTAGACGAAGATGATTCCCTGGT
      F__D__Y__W__G__Q__G__T__L__V__T__V__S__S__A__S__T__K__G__P__

                                  AccI
      TCTGTGTTTCCACTTGCTCCATCTTCTAAGTCTACTTCAGGTGGAACTGCTGCTCTTGGA
481   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AGACACAAAGGTGAACGAGGTAGAAGATTCAGATGAAGTCCACCTTGACGACGAGAACCT
      S__V__F__P__L__A__P__S__S__K__S__T__S__G__G__T__A__A__L__G__

      TGCCTTGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCAGTTACTGTTTCTTGGAACTCTGGTGCTCTT
541   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      ACGGAACACTTCCTAATGAAGGGTCTCGGTCAATGACAAAGAACCTTGAGACCACGAGAA
      C__L__V__K__D__Y__F__P__E__P__V__T__V__S__W__N__S__G__A__L__
```

PvuII

```
    ACTTCTGGTGTTCACACTTTCCCAGCTGTGCTTCAGTCATCTGGACTTTACTCTTTGTCA
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TGAAGACCACAAGTGTGAAAGGGTCGACACGAAGTCAGTAGACCTGAAATGAGAAACAGT
```

T__S__G__V__H__T__F__P__A__V__L__Q__S__S__G__L__Y__S__L__S__

```
    TCAGTGGTGACTGTGCCTTCTTCATCTCTTGGTACTCAGACTTACATCTGCAACGTGAAC
661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    AGTCACCACTGACACGGAAGAAGTAGAGAACCATGAGTCTGAATGTAGACGTTGCACTTG
```

S__V__V__T__V__P__S__S__S__L__G__T__Q__T__Y__I__C__N__V__N__

```
    CACAAGCCATCTAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTGGAGCCAAAGTCTTGTGCTGCTGCT
721 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    GTGTTCGGTAGATTGTGTTTTCACCTATTCTTCCACCTCGGTTTCAGAACACGACGACGA
```

H__K__P__S__N__T__K__V__D__K__K__V__E__P__K__S__C__A__A__A__

BglII SacI

```
    GGTTCTCATCATCACCATCATCACTGATAAAGATCTGAGCTCCAGCTTTTGTTCCC
781 ---------+---------+---------+---------+---------+------
    CCAAGAGTAGTAGTGGTAGTAGTGACTATTTCTAGACTCGAGGTCGAAAACAAGGG
```

G__S__H__H__H__H__H__H__*__*__

Order No. **0705152** **Map**

Customer **AgroScience: Michael Wallbraun**

Name of the gene **EpCAMxCD** 20.04.2007 15:13:48

optimized for Nicotiana tabacum

```
      PacI                KpnI  BspHI
      TTAATTAACGCGATGTAAGGTACCTCATGAAAACTAACCTTTTCCTTTTCCTTATTTTCT
1     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AATTAATTGCGCTACATTCCATGGAGTACTTTTGATTGGAAAAGGAAAAGGAATAAAAGA
                                M__K__T__N__L__F__L__F__L__I__F__S

                                      BspMI
      CTCTTCTTCTTTCTCTTTCTTCAGCAGAGCAGGTTCAGCTTGTTCAATCTGGTGCTGAGG
61    ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GAGAAGAAGAAAGAGAAAGAAGTCGTCTCGTCCAAGTCGAACAAGTTAGACCACGACTCC
      __L__L__L__S__L__S__S__A__E__Q__V__Q__L__V__Q__S__G__A__E__V

                           AflII
      TTAAGAAACCTGGTGAGTCTCTTAAGGTGTCATGCAAGGCTTCAGGATACACTTTCACAT
121   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AATTCTTTGGACCACTCAGAGAATTCCACAGTACGTTCCGAAGTCCTATGTGAAAGTGTA
      __K__K__P__G__E__S__L__K__V__S__C__K__A__S__G__Y__T__F__T__S

      CTTACTACATGCACTGGGTGAGGCAAGCTCCAGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGAATCA
181   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GAATGATGTACGTGACCCACTCCGTTCGAGGTCCTGTTCCTGAACTCACCTACCCTTAGT
      __Y__Y__M__H__W__V__R__Q__A__P__G__Q__G__L__E__W__M__G__I__I

           PflMI
      TTAACCCATCTGGTGGATCTACTTCATACGCTCAGAAGTTCCAGGGAAGGGTTACAATGA
241   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      AATTGGGTAGACCACCTAGATGAAGTATGCGAGTCTTCAAGGTCCCTTCCCAATGTTACT
      __N__P__S__G__G__S__T__S__Y__A__Q__K__F__Q__G__R__V__T__M__T

      CTAGGGATACTTCTACTTCTACTGTGTACATGGAACTTTCTTCTCTTAGATCAGAGGATA
301   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GATCCCTATGAAGATGAAGATGACACATGTACCTTGAAAGAAGAGAATCTAGTCTCCTAT
      __R__D__T__S__T__S__T__V__Y__M__E__L__S__S__L__R__S__E__D__T

      CTGCTGTGTATTATTGCGCTAGGGGATCTGCTTACTACTACGATTTCGCTGATTACTGGG
361   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GACGACACATAATAACGCGATCCCCTAGACGAATGATGATGCTAAAGCGACTAATGACCC
      __A__V__Y__Y__C__A__R__G__S__A__Y__Y__Y__D__F__A__D__Y__W__G

      GACAAGGTACTCTTGTGACTGTGTCATCTGGTGGTTCTGGTGGAAGTGGAGGATCTCAGT
421   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      CTGTTCCATGAGAACACTGACACAGTAGACCACCAAGACCACCTTCACCTCCTAGAGTCA
      __Q__G__T__L__V__T__V__S__S__G__G__S__G__G__S__G__G__S__Q__S

      CTGTTCTTACTCAGCCACCATCTGCTTCAGGAACTCCAGGACAGAGAGTGATTATTTCTT
481   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      GACAAGAATGAGTCGGTGGTAGACGAAGTCCTTGAGGTCCTGTCTCTCACTAATAAAGAA
      __V__L__T__Q__P__P__S__A__S__G__T__P__G__Q__R__V__I__I__S__C

      GCTCTGGATCTCACTCTAACATTGGATCTAACAACGTGAACTGGTATCAACAGCTTCCAG
541   ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
      CGAGACCTAGAGTGAGATTGTAACCTAGATTGTTGCACTTGACCATAGTTGTCGAAGGTC
      __S__G__S__H__S__N__I__G__S__N__N__V__N__W__Y__Q__Q__L__P__G
```

```
     GAACTGCTCCAAAGTTGCTTATTTACAACAACAACCAGAGGCCATCTGGTGTTCCAGATA
601  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     CTTGACGAGGTTTCAACGAATAAATGTTGTTGTTGGTCTCCGGTAGACCACAAGGTCTAT
     __T__A__P__K__L__L__I__Y__N__N__N__Q__R__P__S__G__V__P__D__R

     GGTTCTCTGGATCTAAGTCTGGAACATCAGCTTCTCTTGCTATTTCTGGACTTCAGTCTG
661  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     CCAAGAGACCTAGATTCAGACCTTGTAGTCGAAGAGAACGATAAAGACCTGAAGTCAGAC
     __F__S__G__S__K__S__G__T__S__A__S__L__A__I__S__G__L__Q__S__E

     AGGATGAGTCTGATTACTTCTGCGGAACTTGGGATGATTCTCTTAACGGACCAGTTTTCG
721  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     TCCTACTCAGACTAATGAAGACGCCTTGAACCCTACTAAGAGAATTGCCTGGTCAAAAGC
     __D__E__S__D__Y__F__C__G__T__W__D__D__S__L__N__G__P__V__F__G

                HincII
     GAGGTGGAACTAAGTTGACTGTGCTTGGAGGATCTGGTGGTAGTGGTGGTTCTCAAGTTC
781  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     CTCCACCTTGATTCAACTGACACGAACCTCCTAGACCACCATCACCACCAAGAGTTCAAG
     __G__G__T__K__L__T__V__L__G__G__S__G__G__S__G__G__S__Q__V__Q

     AGTTGGTTCAGAGTGGTGCTGAAGTGAAGAAGCCAGGATCTTCTGTTAAGGTTTCATGTA
841  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     TCAACCAAGTCTCACCACGACTTCACTTCTTCGGTCCTAGAAGACAATTCCAAAGTACAT
     __L__V__Q__S__G__A__E__V__K__K__P__G__S__S__V__K__V__S__C__K

     AGGCATCTGGTGGAACTTTCTCTTCTTACACTATTTCTTGGGTTAGGCAGGCACCTGGTC
901  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     TCCGTAGACCACCTTGAAAGAGAAGAATGTGATAAAGAACCCAATCCGTCCGTGGACCAG
     __A__S__G__G__T__F__S__S__Y__T__I__S__W__V__R__Q__A__P__G__Q

          XhoI
     AAGGACTCGAGTGGATGGGTGGAATTATTCCAATTTTCGGAACTGCTAACTACGCACAAA
961  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     TTCCTGAGCTCACCTACCCACCTTAATAAGGTTAAAAGCCTTGACGATTGATGCGTGTTT
     __G__L__E__W__M__G__G__I__I__P__I__F__G__T__A__N__Y__A__Q__K

                                          AccI
     AGTTCCAAGGTAGAGTGACTATTACTGCTGATGAGTCTACTTCAACAGCTTACATGGAAT
1021 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     TCAAGGTTCCATCTCACTGATAATGACGACTACTCAGATGAAGTTGTCGAATGTACCTTA
     __F__Q__G__R__V__T__I__T__A__D__E__S__T__S__T__A__Y__M__E__L

     TGTCATCACTTAGAAGTGAAGATACTGCTGTTTACTACTGTGCACGTGGTGGATCTTCTG
1081 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     ACAGTAGTGAATCTTCACTTCTATGACGACAAATGATGACACGTGCACCACCTAGAAGAC
     __S__S__L__R__S__E__D__T__A__V__Y__Y__C__A__R__G__G__S__S__G

     GATGGTGGTGGGGTCAGGGAACTCTTGTGACAGTTTCTAGTGGAGGAAGTGGAGGTTCAG
1141 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     CTACCACCACCCCAGTCCCTTGAGAACACTGTCAAAGATCACCTCCTTCACCTCCAAGTC
     __W__W__W__G__Q__G__T__L__V__T__V__S__S__G__G__S__G__G__S__G

     GTGGAAGTTCTTACGTGCTTACTCAGCCTTCTTCTGTTTCTGTTGCTCCTGGACAGACTG
1201 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     CACCTTCAAGAATGCACGAATGAGTCGGAAGAAGACAAAGACAACGAGGACCTGTCTGAC
     __G__S__S__Y__V__L__T__Q__P__S__S__V__S__V__A__P__G__Q__T__A
```

```
     CTACTATTTCATGCGGAGGACACAACATTGGTTCAAAGAACGTTCATTGGTATCAGCAAA
1261 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     GATGATAAAGTACGCCTCCTGTGTTGTAACCAAGTTTCTTGCAAGTAACCATAGTCGTTT
     __T__I__S__C__G__G__H__N__I__G__S__K__N__V__H__W__Y__Q__Q__R

                                                      StuI
     GGCCAGGACAATCTCCAGTGCTTGTGATTTACCAGGATAACAAGAGGCCTTCTGGTATTC
1321 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     CCGGTCCTGTTAGAGGTCACGAACACTAAATGGTCCTATTGTTCTCCGGAAGACCATAAG
     __P__G__Q__S__P__V__L__V__I__Y__Q__D__N__K__R__P__S__G__I__P

     CTGAGAGGTTCTCCGGTTCTAACTCCGGAAACACTGCTACTCTTACTATCTCCGGAACTC
1381 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     GACTCTCCAAGAGGCCAAGATTGAGGCCTTTGTGACGATGAGAATGATAGAGGCCTTGAG
     __E__R__F__S__G__S__N__S__G__N__T__A__T__L__T__I__S__G__T__Q

     AGGCTATGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAAGTGTGGGATAACTACTCTGTGCTTTTCG
1441 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     TCCGATACCTACTCCGACTAATAATGACGGTTCACACCCTATTGATGAGACACGAAAAGC
     __A__M__D__E__A__D__Y__Y__C__Q__V__W__D__N__Y__S__V__L__F__G

                HincII                                        BglII
     GTGGAGGTACAAAGTTGACAGTGTTGGGATCTCATCATCACCATCACCATTGATAAAGAT
1501 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     CACCTCCATGTTTCAACTGTCACAACCCTAGAGTAGTAGTGGTAGTGGTAACTATTTCTA
     __G__G__T__K__L__T__V__L__G__S__H__H__H__H__H__H__*__*__

                     BssHII
       SacI           AscI
     CTGAGCTCTTACATCGCTGGCGCGCCC
1561 ---------+---------+-------
     GACTCGAGAATGTAGCGACCGCGCGGG
```

Anlage 2

Plant Made Pharmaceuticals - Expression rekombinanter Proteine in Tabak

Förderkennzeichen 22011206

Berichtszeitraum: gesamte Projektlaufzeit (01.01.2007 - 30.06.2009)

Schematische Darstellung der im Rahmen des Projekts generierten Plasmide:

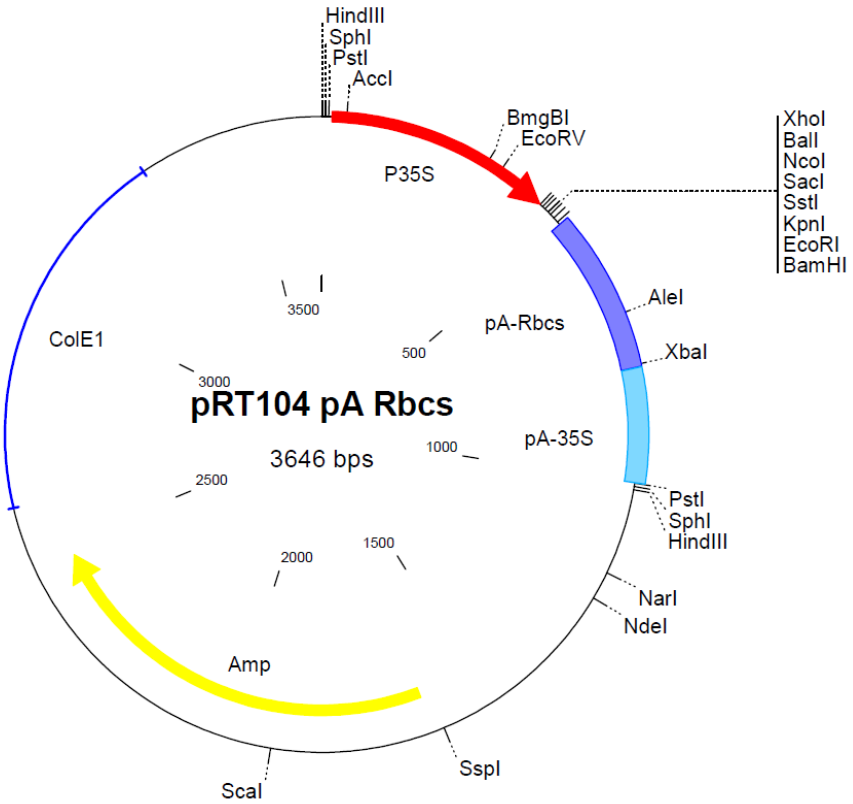
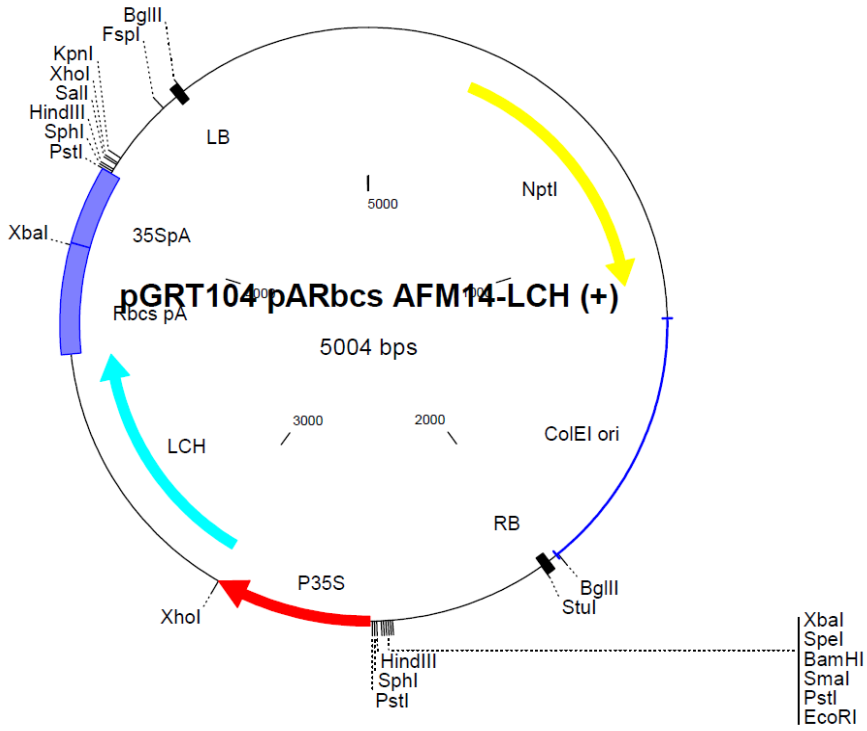
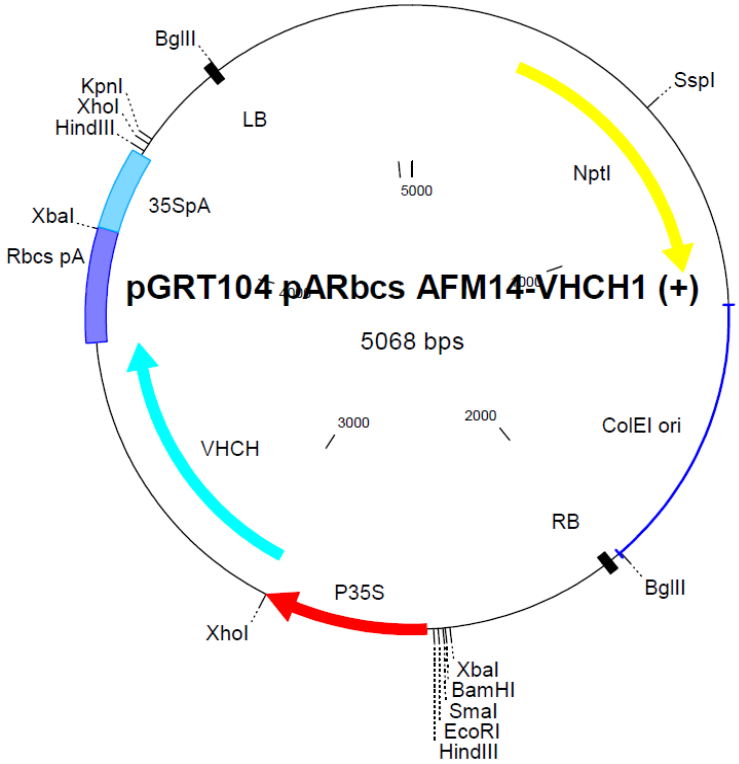


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pRT104 pA Rbcs.
P35S = “Cauliflower mosaic virus” 35S Promotor; pA-Rbcs = 3’-Terminatorsequenz des “small subunit“ Rubisco Gens; pA-35S = 3’-Terminatorsequenz des “Cauliflower mosaic virus” 35S Gens; Amp = Ampizilin-Resistenzgen; ColE1 = Replikon des pBR322 Plasmids.
Alle andern Kürzel bezeichnen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

A


BglII
FspI
KpnI
XhoI
SalI
HindIII
SphI
PstI
LB
NptI
5000
XbaI
35SpA
Rbcs pA
pGRT104 pARbcs AFM14-LCH (+)
5004 bps
3000
2000
ColEI ori
LCH
RB
P35S
BglII
StuI
XhoI
HindIII
SphI
PstI
XbaI
SpeI
BamHI
SmaI
PstI
EcoRI

B


BglII
KpnI
XhoI
HindIII
LB
SspI
NptI
5000
XbaI
35SpA
Rbcs pA
pGRT104 pARbcs AFM14-VHCH1 (+)
5068 bps
3000
2000
ColEI ori
VHCH
RB
P35S
BglII
XhoI
XbaI
BamHI
SmaI
EcoRI
HindIII

C

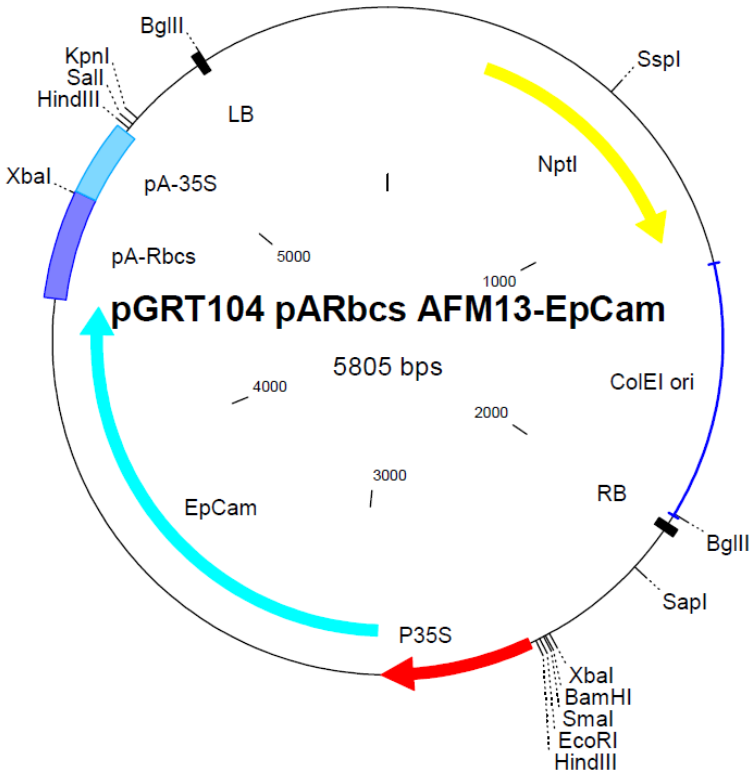


Abbildung 2: Schematische Darstellung der fertig gestellten binären Pflanzentransformationsvektoren, in denen die AK-Fragmente AFM14-LCH (A) und AFM14-VHCH1 (B) bzw. das AK-Gen AFM13-EpCamxCD (C) kloniert wurden.
P35S = “Cauliflower mosaic virus” 35S Promotor; LCH = AFM14 LCH AK-Fragment mit ER-leader; VHCH1 = AFM14 VHCH1 AK-Fragment mit ER-leader; EpCam = AFM13 EpCamxCD AK-Gen mit ER-leader; pA-Rbcs = 3’-Terminatorsequenz des “small subunit“ Rubisco Gens; pA-35S = 3’-Terminatorsequenz des “Cauliflower mosaic virus” 35S Gens; LB = „left border“ Sequenz; RB = „right border“ Sequenz, NPTI = Kanamycin-Resistenzgen; ColE1 ori = Replikon des pBR322 Plasmids.
Alle andern Kürzel bezeichnen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

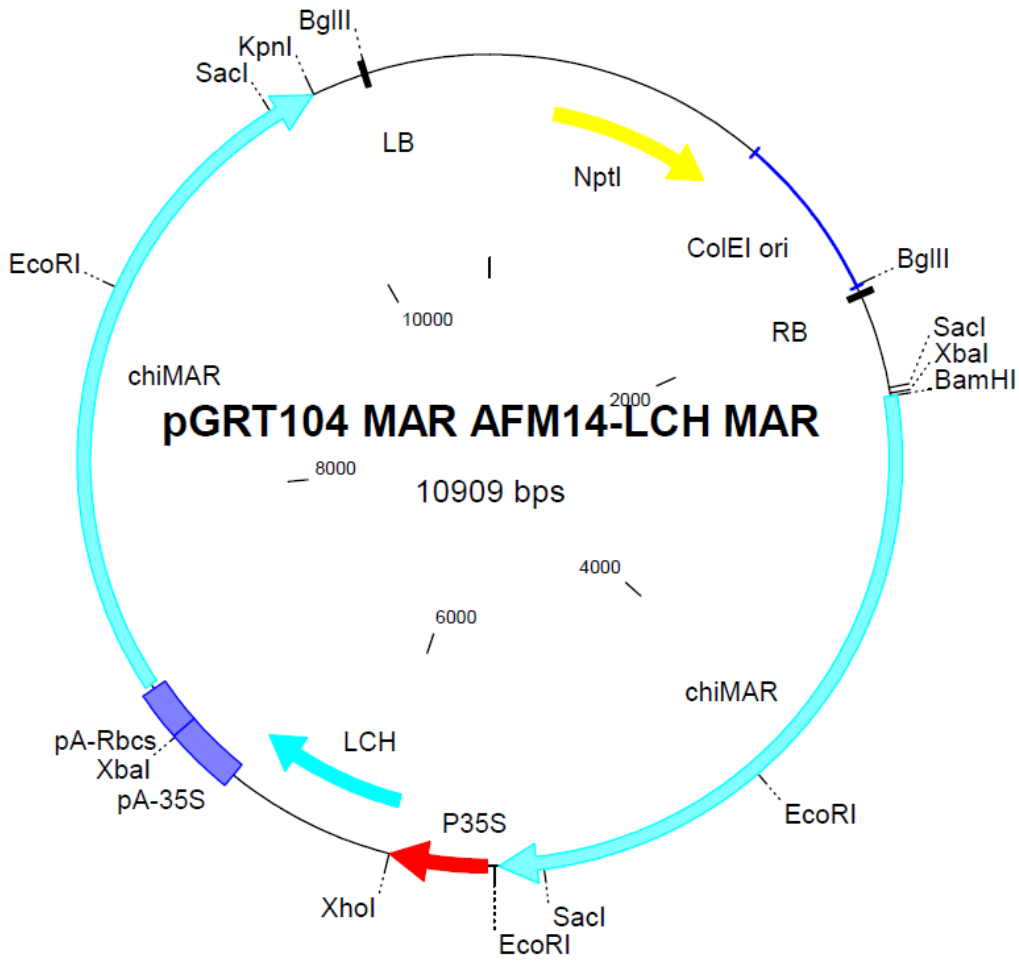
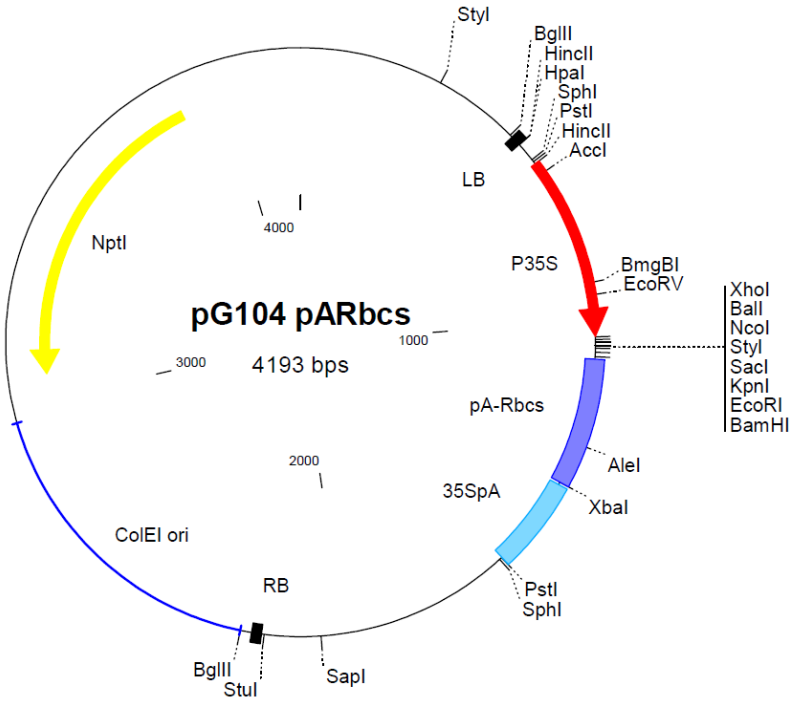


Abbildung 3: Schematische Darstellung des LCH-Genkonstrukts, das mit MAR-Elementen versehen wurde.
P35S = “Cauliflower mosaic virus” 35S Promotor; LCH = AFM14 LCH AK-Fragment mit ER-leader; MAR = „Chicken lysozym matirx attachment region“; pA-Rbcs = 3’-Terminatorsequenz des “small subunit“ Rubisco Gens; pA-35S = 3’-Terminatorsequenz des “Cauliflower mosaic virus” 35S Gens; LB = „left border“ Sequenz; RB = „right border“ Sequenz, NPTI = Kanamycin-Resistenzgen; ColE1 ori = Replikon des pBR322 Plasmids.
Alle andern Kürzel bezeichnen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

A



B

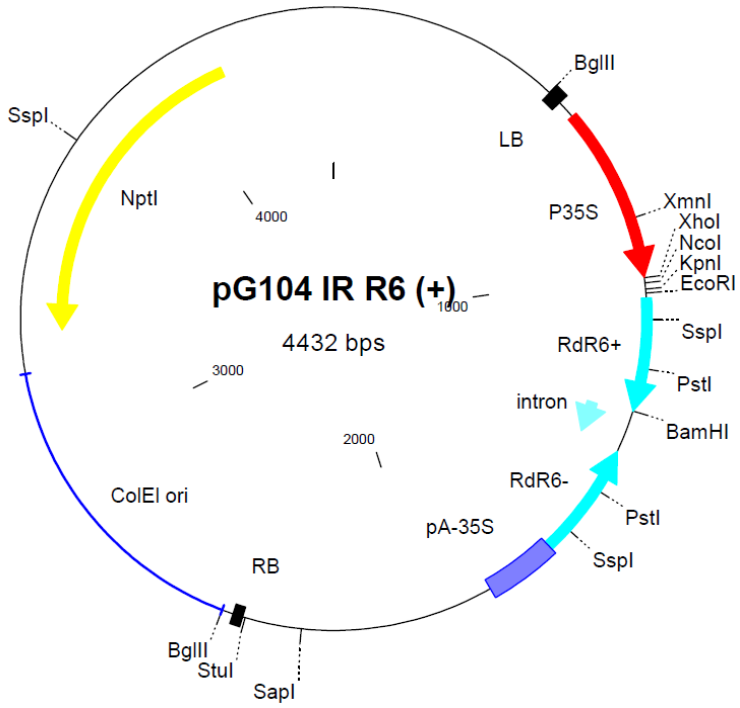
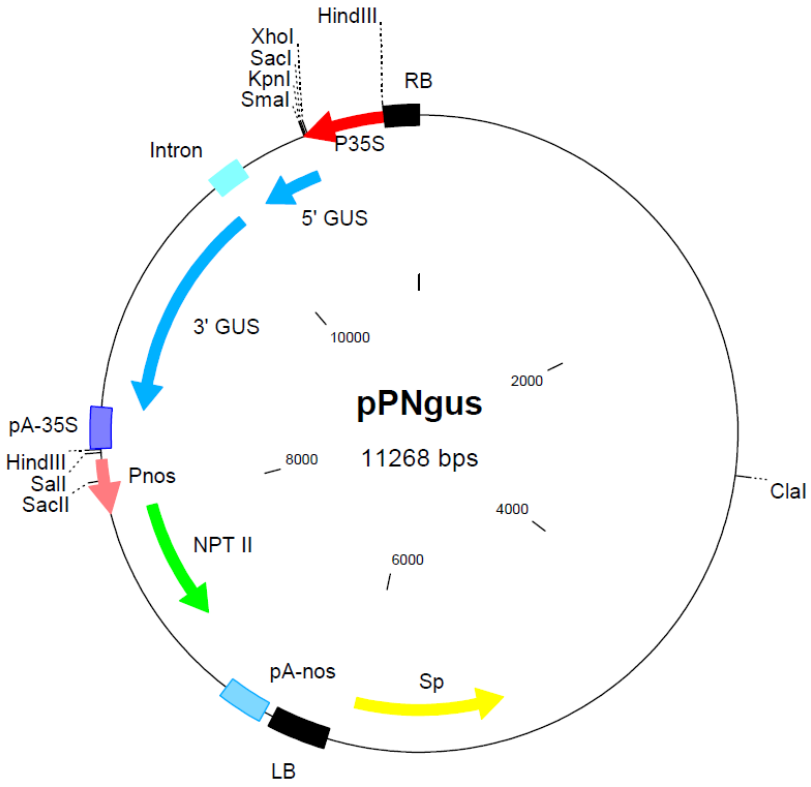


Abbildung 4: Schematische Darstellung der binären Vektoren pG104 pARbvs und pG104 IR R6 (+). A) Modifizierter Ausgangsvektor pG104, der mit einer zweiten 3'-Terminatorsequenz, dem pA-Rbcs versehen wurde.

B) pG104 pARbvs in den das NtRDR6 „inverted repeat“ (IR) Konstrukt unter Kontrolle des 35S Promotors eingeführt wurde.
P35S = “Cauliflower mosaic virus” 35S Promotor; RdR6+ = cDNA Fragment der *N. tabacum* „RNA-directed RNA ploymerase“ 6 in (+)-Orientierung; intron = Sequenz des Intron 3 der *Solanum lycopersicum* „RNA-directed RNA ploymerase“ 2; RdR6- = cDNA Fragment der *N. tabacum* „RNA-directed RNA ploymerase“ 6 in (-)-Orientierung; pA-Rbcs = 3’-Terminatorsequenz des “small subunit“ Rubisco Gens; pA-35S = 3’-Terminatorsequenz des “Cauliflower mosaic virus” 35S Gens; LB = „left border“ Sequenz; RB = „right border“ Sequenz, NPTI = Kanamycin-Resistenzgen; ColE1 ori = Replikon des pBR322 Plasmids.
Alle andern Kürzel bezeichnen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

A



B)

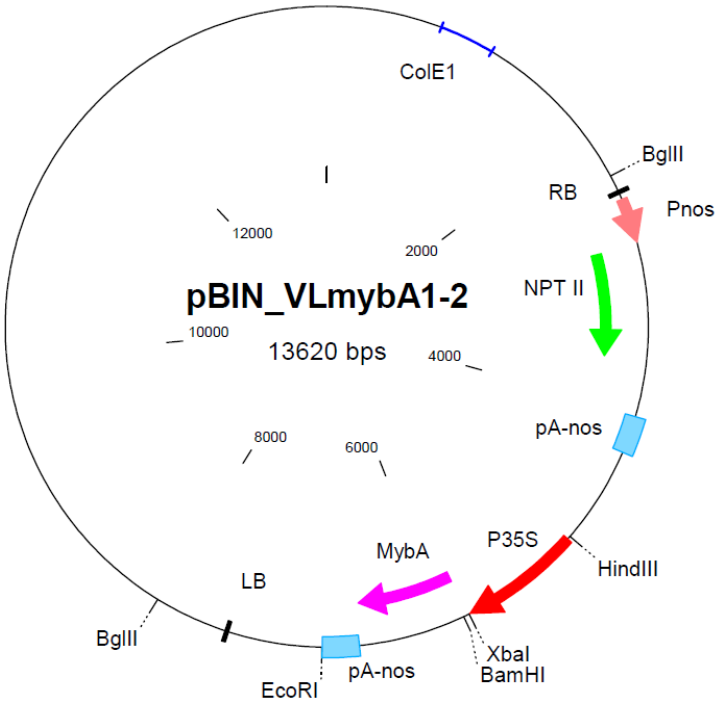


Abbildung 5: Schematische Darstellung der binären Vektoren pPNgus (a) und pBIN-VLmybA1-2 (B), die für den 1. Co-Transformationansatz verwendet wurden.
P35S = "Cauliflower mosaic virus" 35S Promotor; 5' GUS = 5' cDNA Fragment des β-Glucuronidase-Gens; Intron = Sequenz des Intron 2 des *Solanum tuberosum* „Potato light-inducible tissue-specific ST-LS1-" Gens; 3' GUS = 3' cDNA Fragment des β-Glucuronidase-Gens; pA-35S = 3'-

Terminatorsequenz des “Cauliflower mosaic virus” 35S Gens; Pnos = Nopalin-Synthase-Gen-Promotor; NPT II = Kanamycin-Resistenzgen; pA-nos = 3’-Terminatorsequenz des Nopalin-Synthase-Gens; LB = „left border“ Sequenz; Sp = Spectinomycin-Resistenzgene; RB = „right border“ Sequenz.
ColE1 = Replikon des pBR322 Plasmids; MybA = cDNA des MybA-Transcriptionsfaktors aus *Vitis labruscana*.
Alle andern Kürzel bezeichnen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

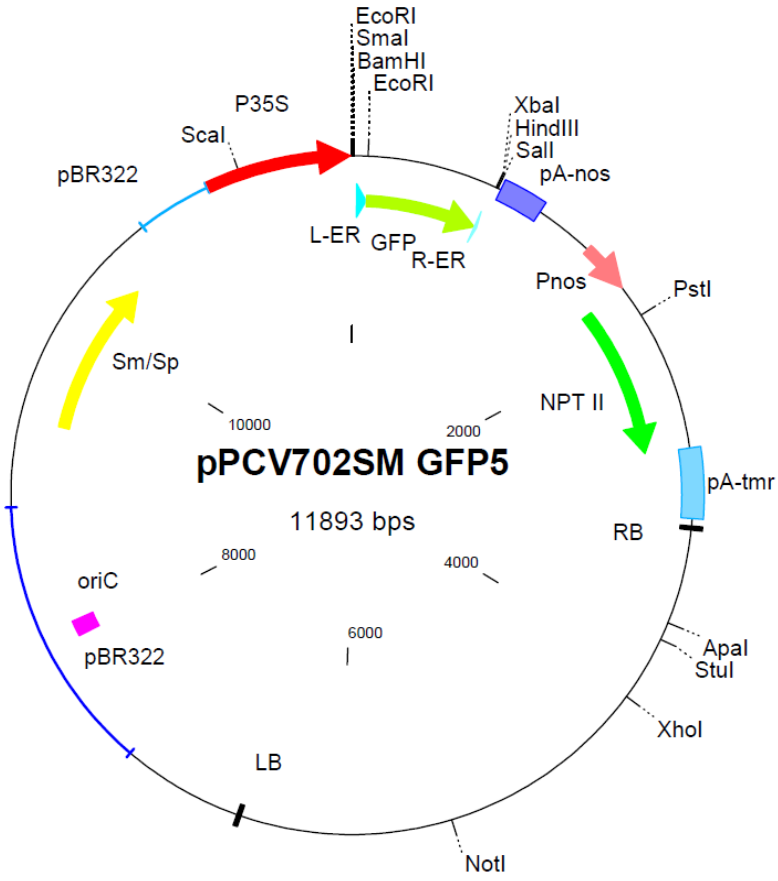


Abbildung 6: Schematische Darstellung des binären Vektors pPCV702SM-GFP5.
P35S = “Cauliflower mosaic virus” 35S Promotor; L-ER = „leader“ des Endoplasmatischen Retikulums; GFP bzw. GFP5 = „green fluorescent protein-“ Gen; R-ER = Retentionssignalsequenz des Endoplasmatischen Retikulums; pA-nos = 3'-Terminatorsequenz des Nopalin-Synthase-Gens; Pnos = Nopalin-Synthase-Gen-Promotor; NPT II = Kanamycin-Resistenzgen; pA-tmr = 3’-Terminatorsequenz des tmr-Gens; RB = „right border“ Sequenz; LB = „left border“ Sequenz; oriC = Replikon des pBR322 Plasmids; pBR322 = Sequenzregionen des pBR322 Plasmids; Sm/Sp = Streptinomycin- und Spectinomycin-Resistenzgene.
Alle andern Kürzel bezeichnen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

Order No. **0835709** **Map**

Customer **RLP Agroscience GmbH, Dr. Michael Wallbraun**

Name of the gene **5153_LCH**

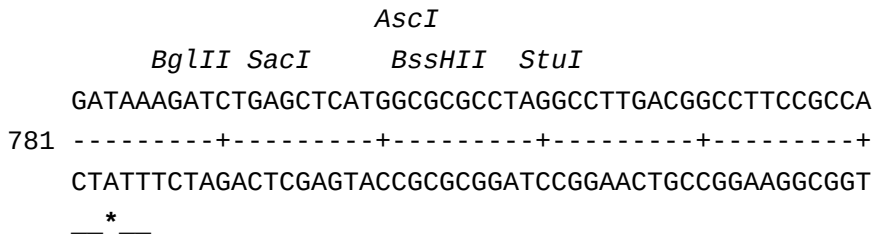
optimized for Nicotiana tabacum

20.11.2008 12:37:45

```
                                PacI       KpnI  BspHI
    GAGCGGAAGGCCCATGAGGCCAGTTAATTAAGAGGTACCTCATGAAAACTAACCTTTTCC
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    CTCGCCTTCCGGGTACTCCGGTCAATTAATTCTCCATGGAGTACTTTTGATTGGAAAAGG
                                                  M__K__T__N__L__F__L

    TTTTCCTTATTTTCTCTCTCCTTTTGTCTCTTTCATCTGCTGAGTCATCTGAGCTTACTC
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    AAAAGGAATAAAAGAGAGAGGAAAACAGAGAAAGTAGACGACTCAGTAGACTCGAATGAG
    __F__L__I__F__S__L__L__L__S__L__S__S__A__E__S__S__E__L__T__Q

          PvuII
    AGGACCCAGCTGTTTCTGTGGCTCTTGGACAGACTGTGAGGATTACTTGCCAGGGTGATA
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TCCTGGGTCGACAAAGACACCGAGAACCTGTCTGACACTCCTAATGAACGGTCCCACTAT
    __D__P__A__V__S__V__A__L__G__Q__T__V__R__I__T__C__Q__G__D__S

    GTCTTAGGAACTTCTACGCTTCTTGGTATCAACAAAAGCCAGGACAGGCTCCAACTCTTG
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    CAGAATCCTTGAAGATGCGAAGAACCATAGTTGTTTTCGGTCCTGTCCGAGGTTGAGAAC
    __L__R__N__F__Y__A__S__W__Y__Q__Q__K__P__G__Q__A__P__T__L__V

    TGATTTACGGACTTTCTAAGAGGCCATCAGGTATTCCTGATAGGTTCTCTGCTTCTTCAT
241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    ACTAAATGCCTGAAAGATTCTCCGGTAGTCCATAAGGACTATCCAAGAGACGAAGAAGTA
    __I__Y__G__L__S__K__R__P__S__G__I__P__D__R__F__S__A__S__S__S

    CTGGAAACACTGCTTCTCTTACTATTACTGGTGCTCAGGCTGAAGATGAGGCTGATTACT
301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    GACCTTTGTGACGAAGAGAATGATAATGACCACGAGTCCGACTTCTACTCCGACTAATGA
    __G__N__T__A__S__L__T__I__T__G__A__Q__A__E__D__E__A__D__Y__Y
```

HincII

```
    ACTGCCTTCTTTACTACGGTGGAGGACAACAGGGAGTTTTTGGTGGAGGAACTAAGTTGA
361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TGACGGAAGAAATGATGCCACCTCCTGTTGTCCCTCAAAAACCACCTCCTTGATTCAACT
    __C__L__L__Y__Y__G__G__G__Q__Q__G__V__F__G__G__G__T__K__L__T


    CTGTGCTTGGACAACCTAAGGCTGCTCCATCTGTGACTTTGTTCCCTCCATCTTCTGAAG
421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    GACACGAACCTGTTGGATTCCGACGAGGTAGACACTGAAACAAGGGAGGTAGAAGACTTC
    __V__L__G__Q__P__K__A__A__P__S__V__T__L__F__P__P__S__S__E__E


    AGCTTCAGGCTAACAAGGCTACTCTTGTGTGCCTTATTTCTGATTTCTACCCAGGTGCTG
481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TCGAAGTCCGATTGTTCCGATGAGAACACACGGAATAAAGACTAAAGATGGGTCCACGAC
    __L__Q__A__N__K__A__T__L__V__C__L__I__S__D__F__Y__P__G__A__V


    TTACTGTTGCTTGGAAGGCTGATTCTTCTCCAGTTAAGGCTGGTGTTGAGACTACTACTC
541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    AATGACAACGAACCTTCCGACTAAGAAGAGGTCAATTCCGACCACAACTCTGATGATGAG
    __T__V__A__W__K__A__D__S__S__P__V__K__A__G__V__E__T__T__T__P


    CATCTAAGCAGTCTAACAACAAGTACGCTGCTTCTTCTTACCTTTCTCTTACTCCAGAGC
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    GTAGATTCGTCAGATTGTTGTTCATGCGACGAAGAAGAATGGAAAGAGAATGAGGTCTCG
    __S__K__Q__S__N__N__K__Y__A__A__S__S__Y__L__S__L__T__P__E__Q


    AGTGGAAGTCTCACAGGTCTTACTCTTGCCAAGTTACTCACGAGGGATCTACTGTGGAAA
661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TCACCTTCAGAGTGTCCAGAATGAGAACGGTTCAATGAGTGCTCCCTAGATGACACCTTT
    __W__K__S__H__R__S__Y__S__C__Q__V__T__H__E__G__S__T__V__E__K


    AGACTGTGGCTCCAACTGAGTGCTCTCATCATCACCATCACCACAAACATGATGAGCTTT
721 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TCTGACACCGAGGTTGACTCACGAGAGTAGTAGTGGTAGTGGTGTTTGTACTACTCGAAA
    __T__V__A__P__T__E__C__S__H__H__H__H__H__H__K__H__D__E__L__*
```


AscI
BglII SacI BssHII StuI
GATAAAGATCTGAGCTCATGGCGCGCCTAGGCCTTGACGGCCTTCCGCCA
781
CTATTTCTAGACTCGAGTACCGCGCGGATCCGGAACTGCCGGAAGGCGGT

Order No. **0835710** **Map**

Customer **RLP Agroscience GmbH, Dr. Michael Wallbraun**

Name of the gene **5154_VHCH**

optimized for Nicotiana tabacum

20.11.2008 12:37:50

```
                          PacI       KpnI  BspHI
    GAGCGGAAGGCCCATGAGGCCAGTTAATTAAGAGGTACCTCATGAAAACTAACCTTTTCC
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    CTCGCCTTCCGGGTACTCCGGTCAATTAATTCTCCATGGAGTACTTTTGATTGGAAAAGG
                                                M__K__T__N__L__F__L

    TTTTCCTTATTTTCTCTCTTCTTCTTTCACTTTCTTCAGCAGAGGAGGTTCAGCTTGTTG
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    AAAAGGAATAAAAGAGAGAAGAAGAAAGTGAAAGAAGTCGTCTCCTCCAAGTCGAACAAC
    __F__L__I__F__S__L__L__L__S__L__S__S__A__E__E__V__Q__L__V__E

    AATCTGGTGGAGGACTTGTTCAACCTGGTGGATCTCTTAGGCTTTCTTGCGCTGCTTCTG
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TTAGACCACCTCCTGAACAAGTTGGACCACCTAGAGAATCCGAAAGAACGCGACGAAGAC
    __S__G__G__G__L__V__Q__P__G__G__S__L__R__L__S__C__A__A__S__G

    GATTCATGTTCTCTACTTACGATATGTCTTGGGTTAGGCAAGCTCCTGGAAAAGGACCAG
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    CTAAGTACAAGAGATGAATGCTATACAGAACCCAATCCGTTCGAGGACCTTTTCCTGGTC
    __F__M__F__S__T__Y__D__M__S__W__V__R__Q__A__P__G__K__G__P__E

    AATGGGTGTCAGGAATTGGATCTTCTTCTGGAAACACTTACTACGCTGATTCTGTGAAGG
241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TTACCCACAGTCCTTAACCTAGAAGAAGACCTTTGTGAATGATGCGACTAAGACACTTCC
    __W__V__S__G__I__G__S__S__S__G__N__T__Y__Y__A__D__S__V__K__G

    GAAGGTTCACTGTGTCTAGGGATAACTCTAAGAACACTCTTTACCTTCAGATGAACTCTC
301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    CTTCCAAGTGACACAGATCCCTATTGAGATTCTTGTGAGAAATGGAAGTCTACTTGAGAG
    __R__F__T__V__S__R__D__N__S__K__N__T__L__Y__L__Q__M__N__S__L
```

```
    TTAGGGCTGAGGATACTGCTGTTTACTATTGCGCTAGGGCTTTCATTAGACAGTCTAGGG
361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    AATCCCGACTCCTATGACGACAAATGATAACGCGATCCCGAAAGTAATCTGTCAGATCCC
    __R__A__E__D__T__A__V__Y__Y__C__A__R__A__F__I__R__Q__S__R__G


    GTGATGTTCCAGATCAGACTTCTTTCGATTACTGGGGACAGGGAACTCTTGTGACTGTGT
421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    CACTACAAGGTCTAGTCTGAAGAAAGCTAATGACCCCTGTCCCTTGAGAACACTGACACA
    __D__V__P__D__Q__T__S__F__D__Y__W__G__Q__G__T__L__V__T__V__S


                                                          AccI
    CATCTGCTTCTACTAAGGGACCATCTGTGTTTCCACTTGCTCCATCTTCTAAGTCTACTT
481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    GTAGACGAAGATGATTCCCTGGTAGACACAAAGGTGAACGAGGTAGAAGATTCAGATGAA
    __S__A__S__T__K__G__P__S__V__F__P__L__A__P__S__S__K__S__T__S


    CAGGTGGAACTGCTGCTCTTGGATGCCTTGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCAGTTACTG
541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    GTCCACCTTGACGACGAGAACCTACGGAACACTTCCTAATGAAGGGTCTCGGTCAATGAC
    __G__G__T__A__A__L__G__C__L__V__K__D__Y__F__P__E__P__V__T__V


                                                      PvuII
    TTTCTTGGAACTCTGGTGCTCTTACTTCTGGTGTTCACACTTTCCCAGCTGTGCTTCAGT
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    AAAGAACCTTGAGACCACGAGAATGAAGACCACAAGTGTGAAAGGGTCGACACGAAGTCA
    __S__W__N__S__G__A__L__T__S__G__V__H__T__F__P__A__V__L__Q__S


    CATCTGGACTTTACTCTTTGTCATCAGTGGTGACTGTGCCTTCTTCATCTCTTGGTACTC
661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    GTAGACCTGAAATGAGAAACAGTAGTCACCACTGACACGGAAGAAGTAGAGAACCATGAG
    __S__G__L__Y__S__L__S__S__V__V__T__V__P__S__S__S__L__G__T__Q


    AGACTTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCATCTAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTGG
721 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TCTGAATGTAGACGTTGCACTTGGTGTTCGGTAGATTGTGTTTTCACCTATTCTTCCACC
    __T__Y__I__C__N__V__N__H__K__P__S__N__T__K__V__D__K__K__V__E
```

```
    AGCCAAAGTCTTGTGCTGCTGCTGGTTCTCATCATCACCATCATCACAAACATGATGAGC
781 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
    TCGGTTTCAGAACACGACGACGACCAAGAGTAGTAGTGGTAGTAGTGTTTGTACTACTCG
    __P__K__S__C__A__A__A__G__S__H__H__H__H__H__H__K__H__D__E__L


                         AscI
           BglII SacI     BssHII  StuI
    TTTGATAAAGATCTGAGCTCATGGCGCGCCTAGGCCTTGACGGCCTTCCGCCA
841 ---------+---------+---------+---------+---------+---
    AAACTATTTCTAGACTCGAGTACCGCGCGGATCCGGAACTGCCGGAAGGCGGT
    __*__*__
```

Anlage 5, Erfolgskontrollbericht:

Die meisten Projektarbeiten, w. .z. B. die Herstellung aller Genkonstrukte, Transformation derselben und Genotypisierung der transgenen Linien wurden umgesetzt, dennoch wurden die gesetzten Ziele bisher nicht im vollen Umfang erreicht. Anfängliche Probleme bei der Klonierung der Antikörpergene in die binären Vektoren waren dabei eher unbedeutend. Deutlich ungünstiger hatte sich ausgewirkt, dass die Proteine, die von der ersten Generation der AK-Genkonstrukte kodiert wurden, also nicht die mit dem KDEL- oder HDEL-Peptid fusionierten, instabil waren. Die lange Generationszeit der im Gewächshaus kultivierten Tabaksorte Geudertheimer war unerwartet und führte dazu, dass die gewünschten genetischen Kreuzungen nicht im zeitlichen Rahmen dieses Projekts ausgeführte werden konnten.

Positiv kann bewertet werden, dass die gemachten Erfahrungen die Herstellung einer optimierten Expressionsplattform erleichtert haben. Wir werden deshalb die begonnenen Arbeiten im Rahmen der verfügbaren Hausmittel fortsetzen, und zumindest für die Expression des LCH-AK AFM14 als „Show Case“ unser System fertigstellen. Dazu werden die bereits neu generierten LCH-KDEL-Genkonstukte in die Tabaksorte Geudertheimer eingeführt. Die schon vorhandenen NtRDR6-hairpin Linien sollen dann anschließend mit LCH-KDEL-exprimierenden Linen genetisch gekreuzt werden. Die Durchführung dieser Experimente wird sicherlich noch ein bis zwei Jahre in Anspruch nehmen. Die Erfolgsausichten scheinen aber genügend groß, eine hohe Menge an funktionellem LCH-AK AFM14 zu produzieren.