

Forschungsverbund:

Gezielte Übertragung minimierter Transgensequenzen mit optimierter Funktion

Entwicklung eines neuen Sicherheitssystems zur Produktion von Proteinen in Pflanzen mit veränderten Viren

Dr. Ulrike Harr, Dr. Joachim Schiemann

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Braunschweig

Förderkennzeichen O312627E

Einleitung:

Mit Hilfe von modifizierten Pflanzenviren können Pflanzen dazu gebracht werden, bestimmte Proteine zu produzieren. Mit solchen Verfahren kann eine hohe Protein-Ausbeute bis in den Prozentbereich erreicht werden - wirtschaftlich interessant vor allem, wenn künftig in Pflanzen hochwertige Proteine wie etwa Pharmawirkstoffe synthetisiert werden sollen.

Der Einsatz modifizierter Viren wirft jedoch neue Sicherheitsfragen auf. Es gibt Bedenken, dass sich die veränderten Viren ausbreiten und weitere Pflanzen infizieren könnten.

Aufgabe dieses Forschungsvorhabens ist es, Kombinationen von modifizierten Viren und darauf zugeschnittenen transgenen Pflanzen zu entwickeln und zu erproben. Damit soll die unerwünschte Ausbreitung der Viren verhindert werden. Das Verfahren soll eine Synthese von Proteinen in Pflanzen ohne Sicherheitsbedenken ermöglichen.

Virale Volllängeklone

Zur Produktion von wirtschaftlich interessanten Proteinen werden virale Volllängeklone verwendet. Virale Volllängeklone sind mit Hilfe molekularbiologischer Methoden hergestellte Varianten eines natürlich vorkommenden Pflanzenvirus. Sie umfassen das gesamte Genom des Virus und enthalten alle Informationen, die für die Entstehung, die Vermehrung und die Ausbreitung des Virus in einer Pflanze notwendig sind. Im Gegensatz zu dem natürlich vorkommenden Pflanzenvirus können in virale Volllängeklone zusätzliche Gene eingebaut werden, die z.B. für ein wirtschaftlich interessantes Protein kodieren. Schleust man den modifizierten Volllängeklon in Pflanzen ein, wird in den Pflanzenzellen nicht nur Virusprotein, sondern auch das gewünschte neue Protein gebildet (Abb. 1).

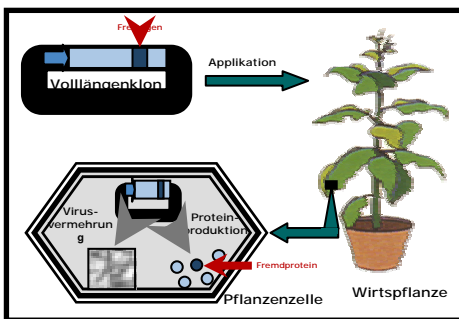


Abb. 1: Nutzung eines viralen Volllängeklons zur Expression von Fremdprotein in Pflanzen - Eine schematische Darstellung

Der **Vorteil** dieses Verfahrens ist vor allem die hohe Ausbeute an Fremdprotein. Schon zwei bis drei Wochen nach der Infektion mit dem Volllängeklon können die Pflanzen mit dem gewünschten Protein geerntet und das Protein aus der Pflanze isoliert werden.

Ein **Nachteil** ist jedoch, dass in den infizierten Pflanzen vermehrungsfähige neue (chimäre) Viren entstehen. Eine praktische Anwendung von Volllängeklonen wäre nur dann vertretbar, wenn es geeignete Sicherheitssysteme gibt, die ein Freisetzen chimärer Viren zuverlässig verhindern können.

Entwicklung eines Sicherheitssystems:

Kombination transportdefizientes Virus/Transportprotein-transgene Pflanze

Für die Entwicklung eines Sicherheitssystems wurde der Volllängeklon PVX GUS verwendet. PVX GUS basiert auf dem Genom des Kartoffel-Virus X (PVX) und trägt als zusätzliche Information das β -Glucuronidase (*gus*)-Gen. Wird dieser Volllängeklon in eine Pflanze eingebracht, so wird in jeder virusinfizierten Zelle neben dem Virusprotein auch das GUS-Protein gebildet. GUS ist ein Enzym, das einen farblosen Farbstoff in einen blauen Farbstoff umsetzen kann. So läßt sich die Produktion des GUS-Proteins über den Volllängeklon in der infizierten Pflanze durch einen einfachen Färbetest nachweisen (Abb. 2 I.).

Aus dem PVX GUS-Volllängeklon wurde nun das virale Transportprotein entfernt (\rightarrow PVX GUS Δ 25k). Dadurch ist das veränderte Virus nicht mehr in der Lage, sich in normalen (Wildtyp-) Pflanzen auszubreiten (Abb. 2 II.). Wird das transportdefiziente Virus dagegen auf eine transgene Pflanze gebracht, welche das virale Transportprotein produziert (\rightarrow 25k-transgene Pflanze), wird dieser Defekt behoben und das Virus kann sich in der Pflanze verbreiten (Abb. 2 III.).

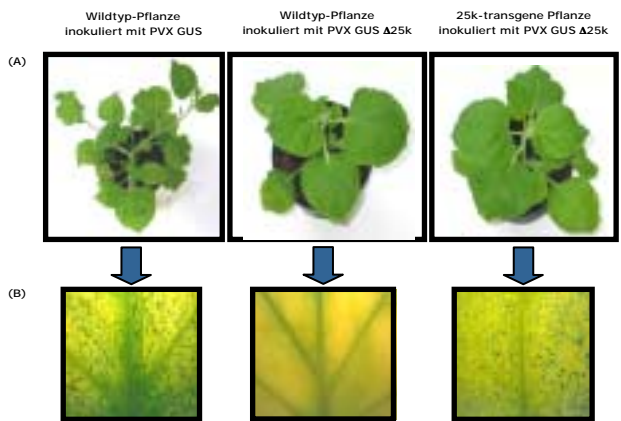


Abb. 2: Inokulationsversuche von *N. benthamiana*-Pflanzen (Wildtyp und transgen) mit nicht modifiziertem PVX GUS- und transportdefizientem PVX GUS Δ 25k-Volllängeklon

(A) Symptome nach Inokulation: (A I.) PVX-typische Symptome; (A II.) keine Symptome; (A III.) keine Symptome. (B) Blatt aus dem oberen Bereich der Pflanze nach GUS-Test: (B I.) GUS-Expression = systemische Infektion durch PVX GUS in Wildtyp-Pflanze; (B II.) keine GUS-Expression = keine systemische Infektion durch PVX GUS Δ 25k in Wildtyp-Pflanze; (B III.) GUS-Expression = systemische Infektion durch PVX GUS Δ 25k nach Komplementation des Transportdefekts in Transportprotein-transgener Pflanze.

In weiterführenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch die Nachkommen des transportdefizienten Virus diese Eigenschaft über einen der maximalen Nutzungsdauer der Pflanzen entsprechenden Probenzeitraum von 12 Wochen beibehalten und normale Pflanzen nicht systemisch infizieren konnten.

Schlußfolgerung:

Da das transportdefiziente Virus ausschließlich Transportprotein-transgene Pflanzen systemisch infizieren kann, wird eine unerwünschte Verbreitung des Virus zuverlässig verhindert und eine sichere Synthese von Fremdproteinen mittels viraler Volllängeklone ermöglicht.