

Abschlußbericht

**im Rahmen
des Forschungsverbunds Wissenschaft - Wirtschaft
im BML-Förderschwerpunkt 'Nachwachsende Rohstoffe'
zum Thema**

Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen

Prof. Dr. Norbert Erdmann/ PD Dr. Inge Broer (Universität Rostock)

Verbundpartner

Prof. Dr. Wolfgang Lockau (Humboldt-Universität zu Berlin)
Prof. Dr. Elfriede Pistorius (Universität Bielefeld)
Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben (Universität Tübingen)
Dr. Holger Junghans (Norika-Kartoffelzucht und -Vermehrungs-GmbH)
Dr. Hans-Joachim Traenkner (Bayer AG)

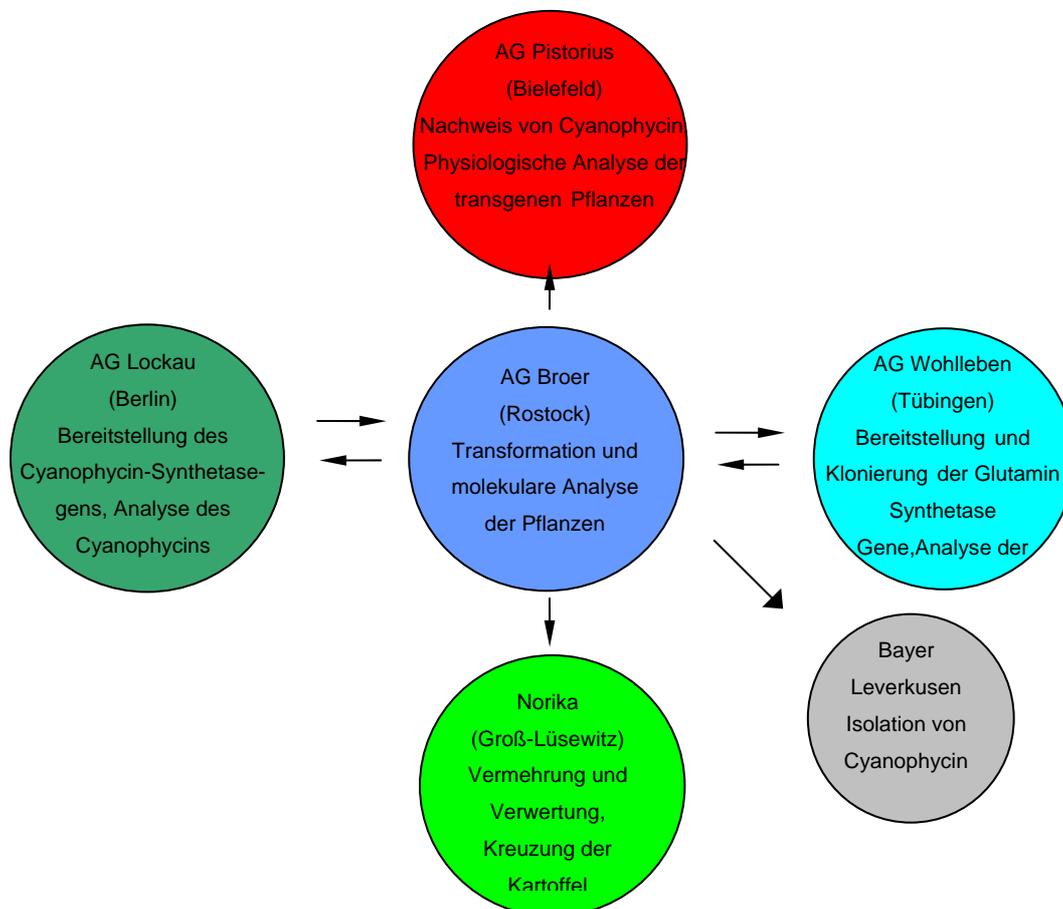
FKZ: 98NR090

1.11.99-31.10.02

Zusammenfassung

Ziel des Projektes war es, in transgenen Kartoffelknollen das cyanobakterielle Protein Cyanophycin herzustellen, das als Ausgangsstoff für das Biopolymer Polyaspartat genutzt werden kann. Polyaspartat ist biologisch abbaubar, nicht toxisch und hat vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise als Ersatzstoff für nicht biologisch abbaubare Polyacrylate in Detergentien, Lösungsmitteln und in der Ölproduktion. Cyanophycin soll als Nebenprodukt bei der industriellen Verwertung von Kartoffeln anfallen und daher äußerst kostengünstig sein. Im Rahmen des Projektes ist es uns gelungen, durch die Analyse der konstitutiven Expression verschiedenen Synthetase Gene in Tabak und Kartoffel ein Gen zu identifizieren, das ohne besondere Modifikationen zu einem Anteil von 1% der Trockenmasse an Cyanophycin in Tabakblättern führt. Die während der Pflanzenentwicklung deutlich werdenden Beeinträchtigungen der Pflanze durch die Transgenexpression sollen durch gewebespezifische Expression und die unterstützende Modifikation der Aminosäuresynthese ausgeglichen werden.

Aufgabenverteilung auf die Verbundpartner



Ausführliche Beschreibung des Arbeitsplanes und der gewonnenen Ergebnisse

Universität Rostock

Expression verschiedener Cyanophycin-Synthetasegene in transgenen *Nicotiana tabacum* - und *Solanum tuberosum* Pflanzen

Die AG Lockau stellte drei verschiedene Cyanophycin-Synthetasegene aus *Anabaena variabilis*, *Synechocystis* spec PCC 6803 sowie aus *Synechococcus elongatus* zur Verfügung. Die Analyse von Cyanophycin-Synthetasegenen aus verschiedenen Organismen in transgenen Pflanzen war notwendig, da aus der Expression bakterieller Gene in Mikroorganismen nicht auf ihre Funktionalität in Pflanzen rückgeschlossen werden kann. Bakterielle Gene können z.B. durch kryptische pflanzliche Regulationssignale oder auf Grund ihrer Basenzusammensetzung in der Pflanzenzelle unerwartete Expressionsmuster zeigen. Die im folgenden zusammengefassten Ergebnisse zeigen auch deutliche Unterschiede in der Expression und Funktionalität verschiedener Cyanophycin-Synthetasegene in transgenen Pflanzen.

1. Vergleich der Regenerationsraten nach Transformation von Pflanzen mit verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegenen

Drei Cyanophycin-Synthetasegene unterschiedlicher Herkunft (siehe Tabelle 1) wurden unter Kontrolle des konstitutiven, cytoplasmatisch exprimierten 35S-RNA-Promotors in Tabak und Kartoffel exprimiert, um Aussagen über einen möglichen Einfluss der Cyanophycin-Synthese auf Regeneration und Wachstum transgener Pflanzen erkennen zu können. Die Konstruktion der Pflanzentransformationsvektoren, die die drei verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegen tragen, erwies sich teilweise aufgrund der Größe der Gene und der dadurch geringen Anzahl an verwendbaren Restriktionsschnittstellen als vergleichsweise zeitaufwendig. Die Pflanzentransformationsvektoren zur cytoplasmatisch konstitutiven Expression der drei Cyanophycin-Synthetasegene sind in Abb. 1 gezeigt.

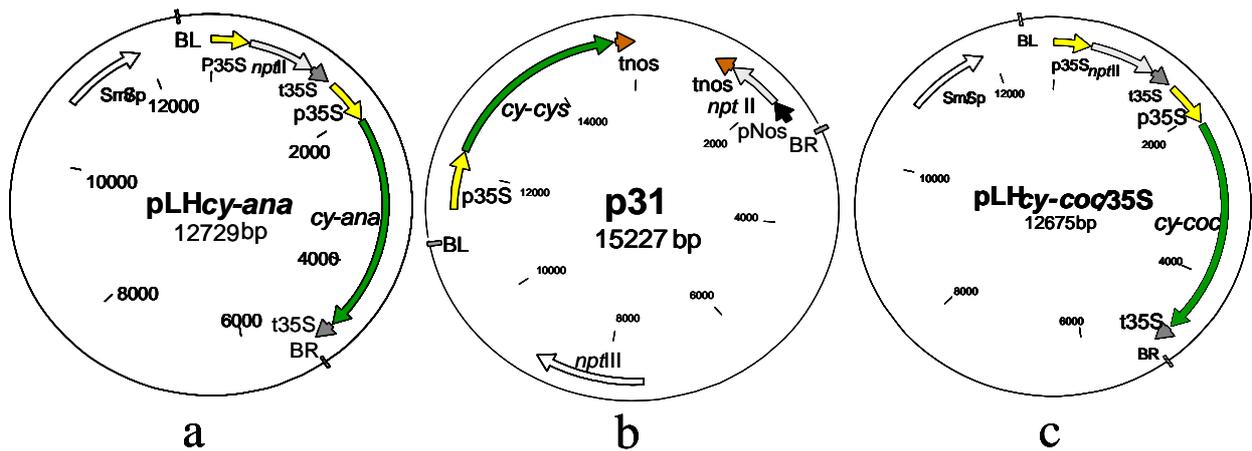


Abb.1: Pflanzentransformationsvektoren zur cytoplasmatisch konstitutiven Expression der drei verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene. a: Kodierbereich der Cyanophycin-Synthetase aus *Anabaena variabilis* (*cy-ana*); b: Kodierbereich aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 (*cy-cys*); c: Kodierbereich aus *Synechococcus elongatus* (*cy-coc*). p35S: konstitutiv cytoplasmatisch exprimierter 35S-RNA-Promotor der Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA; t35S: Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA-Terminator; *nptII*: Kanamycinresistenzgen; pNos/tnos: Nopalinsynthetase-Promotor (pNos) und -Terminator (tnos) aus *A. tumefaciens* BL, BR: Randsequenzen der T-DNA; Sm/Sp: bakteriell exprimiertes Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen; *nptIII*: bakteriell exprimiertes Kanamycinresistenzgen.

Die in Abbildung 1 dargestellten Pflanzentransformationsvektoren wurden mehrfach (s. Tabelle 1) zur Transformation von Tabak und Kartoffel eingesetzt. Als transgene Kontrolle diente der Ausgangsvektor, der nur das Kanamycinresistenzgen beinhaltet. Dieser Vektor wurde in allen Transformationsansätzen zur Kontrolle der Regenerationsrate ohne Cyanophycinexpression eingesetzt. Die im Vergleich zu der Kontrolltransformation erniedrigte Regenerationsraten bei dem Einsatz der Cyanophycinvektoren weisen darauf hin, dass die Expression eines Cyanophycin-Synthetasegens schädlich für die Pflanze sein könnte. Die Analyse des Phänotyps (Wachstumsrate, Morphologie) der adulten Pflanzen kann ebenfalls auf Störungen durch die Expression der Cyanophycin-Synthetasegene hinweisen. In Tabelle 1 und 2 sind die Daten aus den bisher so ermittelten Ergebnissen für Tabak- und Kartoffel zusammengefasst.

Tab. 1: Regenerationsraten und Phänotyp transgener Tabakpflanzen bei konstitutiver Expression der verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene im Cytoplasma.

Herkunft des Cyanophycin-Synthetasegens	Abkürzung	Regenerationsrate	Anzahl Transformationen	Phänotyp der Regeneranten
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	<i>cy-ana</i>	109%	3	normal
<i>Synechocystis spec</i> PCC6803	<i>cy-cys</i>	37%	3	normal
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>cy-coc</i>	86%	3	normal

Tab. 2: Regenerationsraten und Phänotyp transgener Kartoffelpflanzen bei konstitutiver Expression der verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegene im Cytoplasma.

Herkunft des Cyanophycin-Synthetasegens	Abkürzung	Regenerationsrate	Anzahl Transformationen	Phänotyp der Regeneranten
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	<i>cy-ana</i>	200%	1	normal
<i>Synechocystis</i> spec PCC6803	<i>cy-cys</i>	0	3	normal
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>cy-coc</i>	70%	3	normal

Die Transformation von Tabak und Kartoffel mit verschiedenen Cyanophycin-Synthetasegenen zeigte deutliche Unterschiede in den Regenerationsraten: Das aus *Anabaena variabilis* stammende Cyanophycin-Synthetasegen (*cy-ana*) führte nie zu reduzierten Regenerationsraten. Die bei Kartoffel beobachtete verdoppelte Rate im Vergleich zur Kontrolltransformation ist sehr wahrscheinlich eine zufällige Abweichung; in Kartoffel wurde dieser Versuch nur einmal durchgeführt. Bei der Transformation von Tabak oder Kartoffel mit diesem Transgen kann also kein Einfluss einer möglichen Transgenexpression auf Regenerationsraten sowie den Phänotyp der resultierenden Pflanzen beobachtet werden.

Zu den schlechtesten Regenerationsraten führte das aus *Synechocystis* stammende Cyanophycin-Synthetasegen (*cy-cys*): In drei unabhängigen Transformationsexperimenten wurde bei Tabak nur eine durchschnittliche Rate von 37% einer Kontrolltransformation erreicht, während sich Kartoffelpflanzen mit diesem Gen nicht transformieren ließen. Der Phänotyp der regenerierenden oder auch älterer Pflanzen war nicht von dem der Kontrollpflanzen zu unterscheiden. Ursache der stark verringerten Regenerationsraten könnte eine Schädigung der transformierten pflanzlichen Zellen über die Expression der Synthetase oder die Synthese von Cyanophycin und der daraus resultierende Mangel an Arginin und Aspartat sein. Aufschluss über mögliche Ursachen könnte die Transformation mit einem von der AG Lockau konstruierten funktionslosen *cy-cys*-Gen liefern. Dieses Gen führt bei fast identischer DNA-Sequenz zur Bildung einer funktionslosen Cyanophycin-Synthetase. In den Pflanzen kann es damit nicht zu einer Schädigung durch die Synthese von Cyanophycin kommen; damit sollte auch keine Reduktion der Regenerationsrate mehr auftreten. Ein solcher Kodierbereich wurde zwar von der AG Lockau konstruiert, ließ sich aber bislang nicht in einen Pflanzentransformationsvektor klonieren.

Bei der Transformation von Tabak oder Kartoffel mit dem aus *Synechococcus elongatus* stammenden Cyanophycin-Synthetasegen (*cy-coc*) konnten in beiden Fällen im Vergleich zur Kontrolle leicht reduzierte Regenerationsraten beobachtet werden. Auch hier reagieren