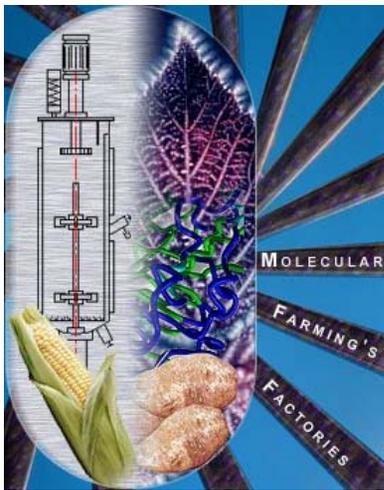


Perspektiven der Grünen Gentechnik durch Forschung und Entwicklung



Grüne
Gentechnik

Produktions-
verfahren

Produkte

Eigenschaften gentechnisch veränderter Pflanzen

- Ein oder wenige Zielgene übertragen
- Selektionsmarker an Zielgene gekoppelt
- Chromosomale Integration
- Unbekannte Integrationsstelle
- Pollenverbreitung des Fremdgens
- Vornehmlich konstitutive Expression

Selektionsmarker

Visuelle Markergene

GFP

Anthocyane

Carotinoide

Herbizidtoleranz

Imidazolinonresistenz

Glyphosatresistenz (EPSPS)

Phosphothricinresistenz (PAT)

Sulfonylharnstoffresistenz

Antibiotikatoleranz

Kanamycinresistenz (nptII)

Bleomycinresistenz

Hygromycinresistenz

Streptomycinresistenz

Gentamycinresistenz

Blasticidinresistenz

Nutritive Marker

Mannoseverwertung

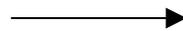
Xyloseverwertung

Anti-Nutritive Marker

2-Deoxyglukoseresistenz

Phytohormone

Cytokininaktivierung



• Vorteile:

Ubiquitäre Verbreitung

Hohe Substratspezifität

Gut charakterisiertes Protein

Kein bekanntes allergenes Potential

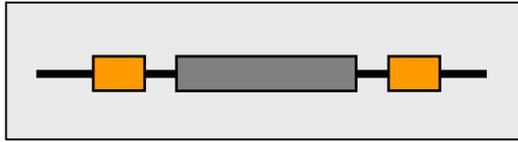
Gute Eignung zur Transformation

• Nachteil:

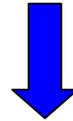
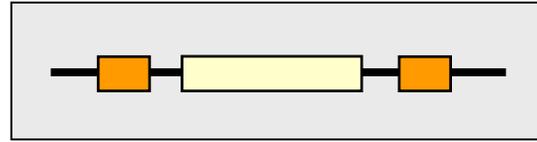
Geringe öffentliche Akzeptanz

Prinzip der Co-Transformation

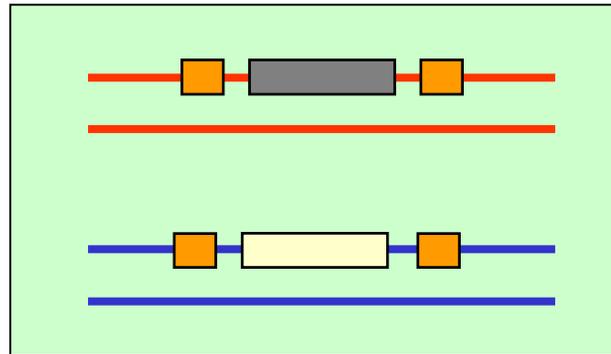
Trait-Gen



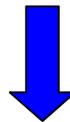
Marker-Gen



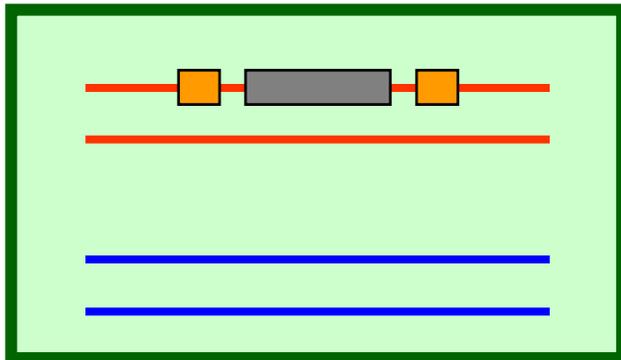
Transformation



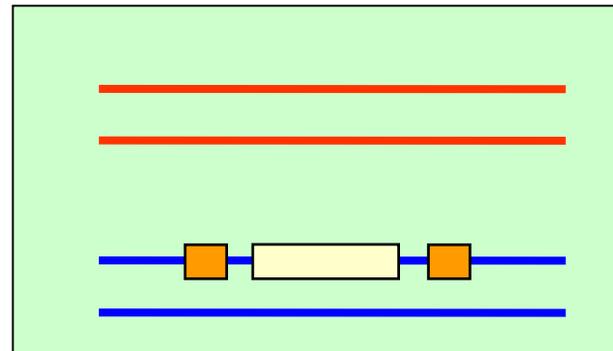
Integration der Gene an Nicht-gekoppelten Orten



Marker-frei



Segregation nach Selbstung

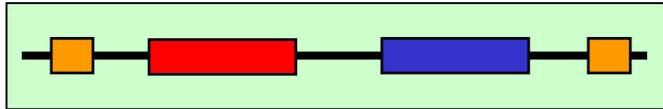


Technische Limitierungen der Co-Transformation / Forschungsbedarf

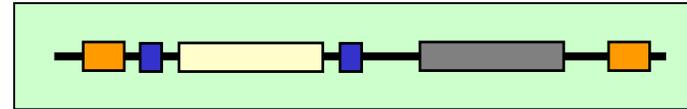
- Methode nicht universell einsetzbar; Integration an unabhängigen Loci stark variabel: 10-90%
- Keine etablierte Methode für Nutzpflanzen verfügbar
- Etablierung und Optimierung in Nutzpflanzen ist kostenintensiv und dauert einige Jahre
- Es müssten wesentlich mehr transgene Pflanzen hergestellt werden (4x mehr)

Entfernung des Markergens durch Excision

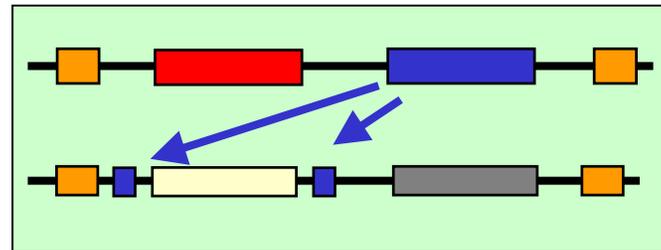
Selektionsmarker Rekombinase



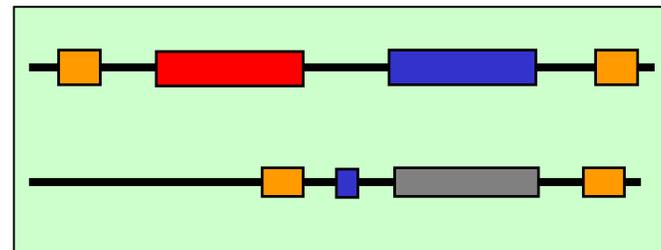
Selektionsmarker Trait Gen



X



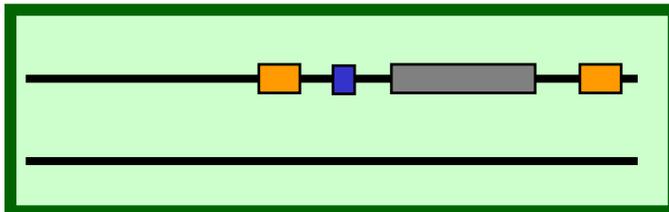
Excision



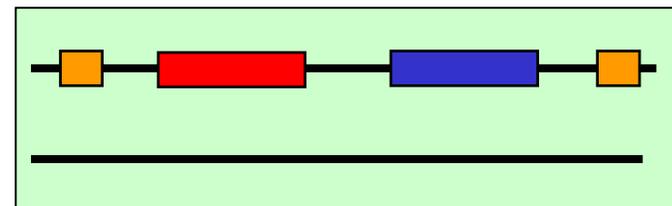
Nicht-gekoppelte Loci



Marker-frei



Segregation nach Selbstung



Technische Limitierungen der Markergeneeliminierung / Forschungsbedarf

- Prinzipiell in Modellpflanzen etabliert
- Etablierung und Optimierung in Nutzpflanzen ist kostenintensiv und dauert einige Jahre
- Längere Entwicklungszeiten zur Herstellung markergen-freier Pflanzen

Weitere Ansätze zur Optimierung gentechnischer Verfahren

- Gezielte Integration des Fremdgens
- Bedarfsgerechte Ausprägung des Fremdgens
- Plastidentransformation

Ziele der Grünen Gentechnik

Ausgeglichene

- Vitamine
- Aminosäuren
- Proteine
- Mineralien (z.B. Fe)

Geschmack

- Aromastoffe
- reduzierte Bitterstoffe

Gesundheitsvorbeugend

- Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
- Antioxidantien
- verminderte Allergene
- Reduzierte Toxine

Resistenz gegenüber biotischem Stress

Insekten (Bt)

Viren

Bakterien

Pilze

Nematoden

Resistenz gegenüber abiotischen Stressfaktoren

Trockenheit

Temperatur

Salz

Schwermetalle

Herbizidresistenz

Ertragssteigerung

Photosyntheseleistung

Assimilatverteilung

Blühzeitpunkt

Fruchtreife

Nährstoffaufnahme

Hybridsorten

Produktqualität

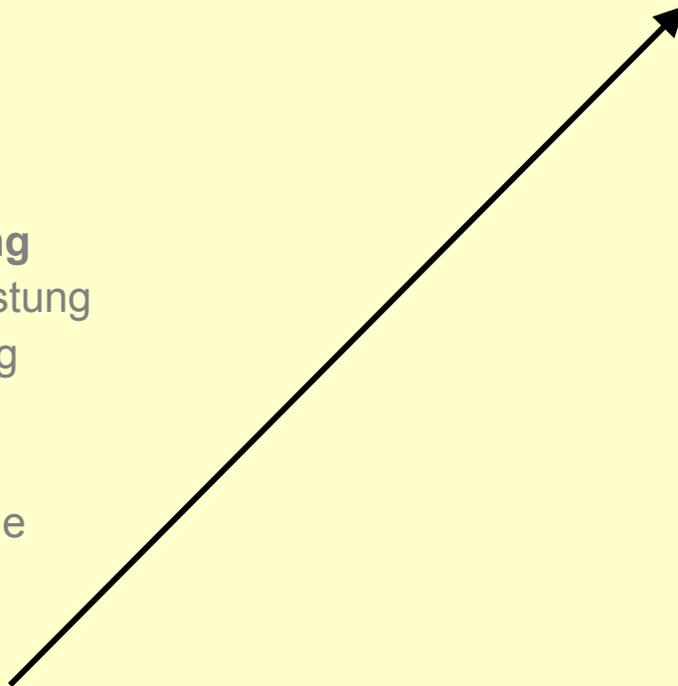
Nutraceuticals

Nachwachsende Rohstoffe

Feinchemikalien

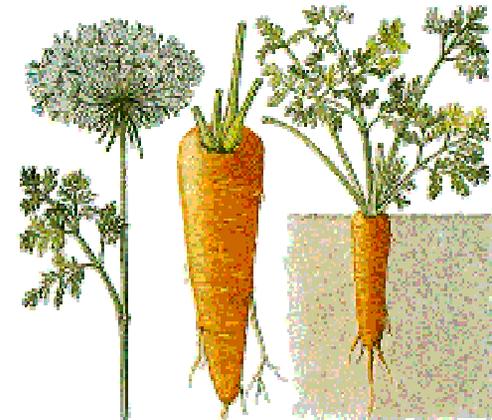
Enzyme

Therapeutische Eiweiße



Metabolic Engineering: Provitamin A

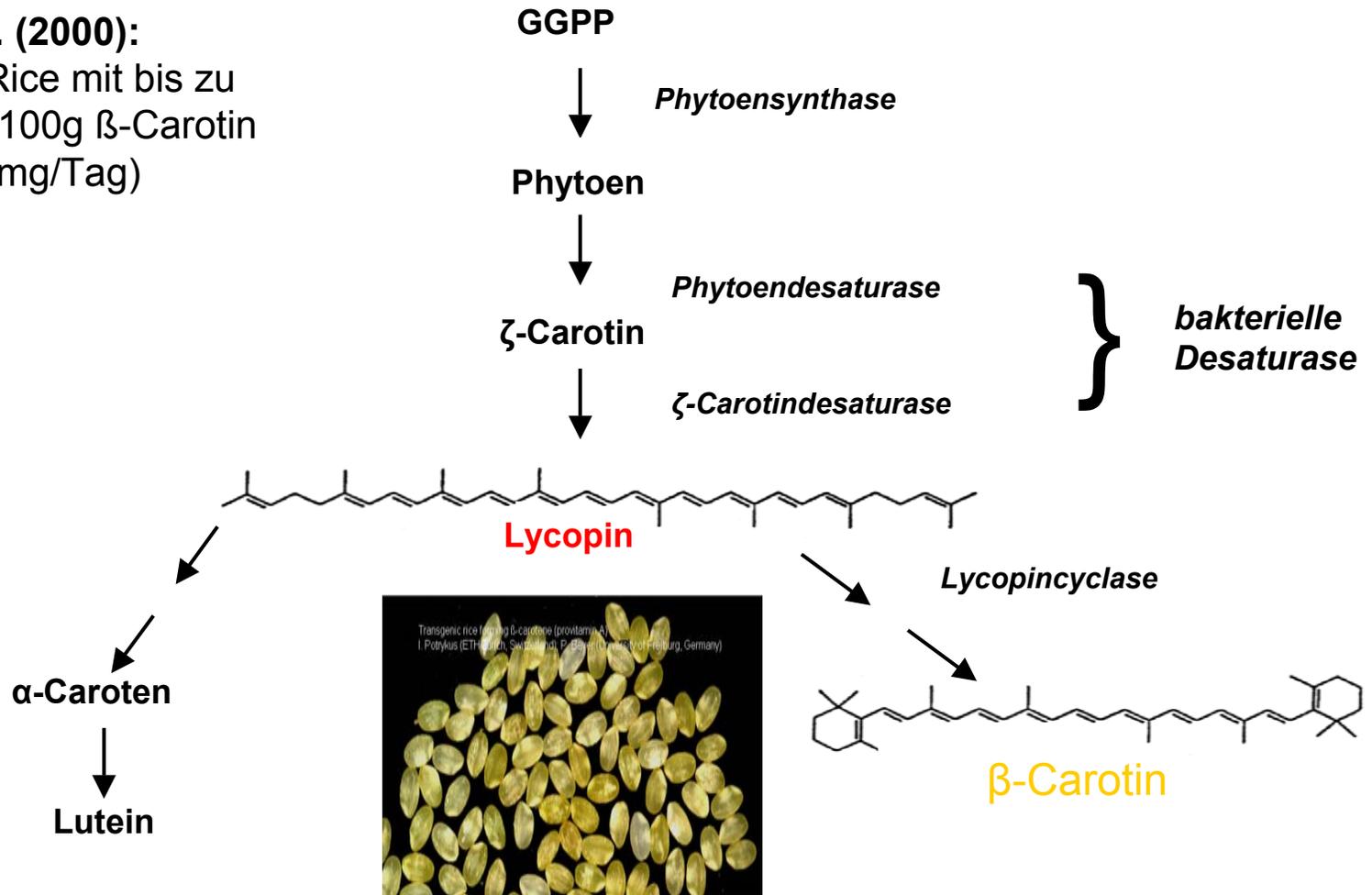
- Weltmarkt für Vitamine: > 2,5 Mrd \$
- β -Carotin (Vorstufe von Vitamin A) ist eines von 600 Carotinoiden
- natürliche Quellen: gelbes, rotes und dunkelgrünes Obst und Gemüse



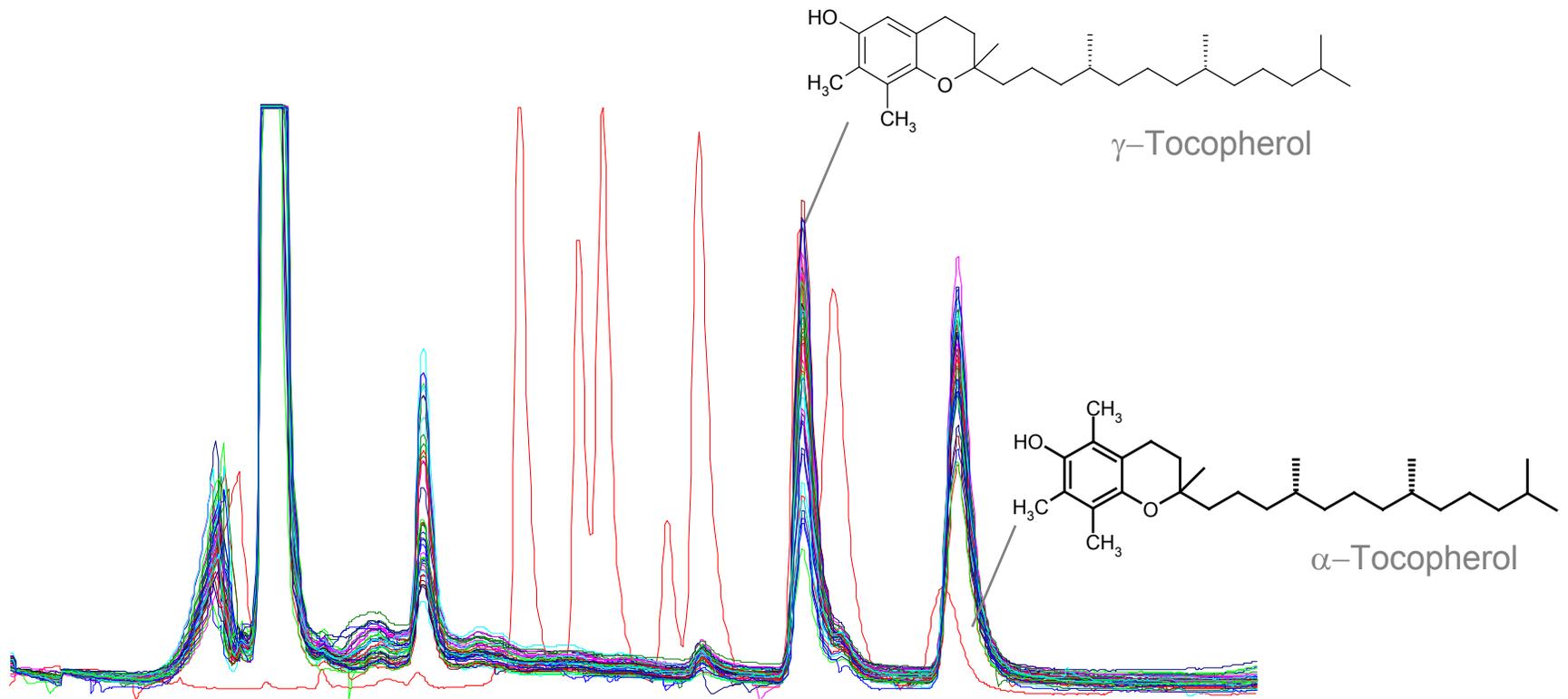
- mehr als 130 Millionen Kinder und Jugendliche in „Reisländern“ leiden unter Vitamin A-Mangel
- ca. 1 Millionen Erblindungen jährlich
- Ziel: Reis mit β -Carotin

Metabolic Engineering: Provitamin A in Reis

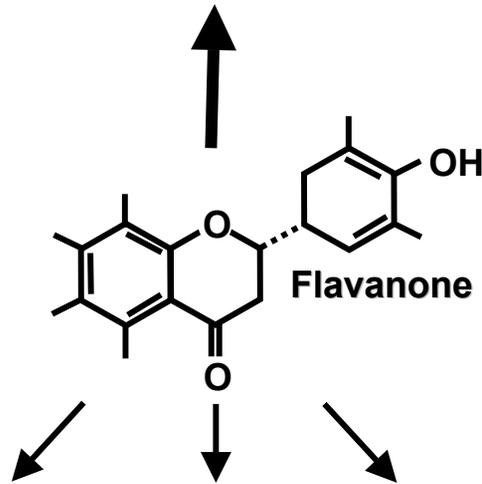
Ye, et al. (2000):
Golden Rice mit bis zu
0,16 mg/100g β -Carotin
(RDA= 6mg/Tag)



Hoch Vitamin E-haltige Pflanzen



Metabolic Engineering: Polyphenole



Flavone Isoflavonoids Anthocyanidin

- ca. 5000 Flavonoide u. Anthocyane
- Flavonoide: gelb bis orangefarben
- Schutzwirkung vor freien Radikalen und Zellschäden jedlicher Art

Herausforderung:
Identifizierung einzelner Wirkstoffe
und der entsprechenden Gene



Forschungsbedarf im Bereich „Metabolic Engineering“ Nutraceuticals

- Aufklärung von Biosynthesewegen (functional Genomics)
- Verbessertes Verständnis metabolischer Netzwerke (Metabolom)
- Analyse regulatorischer Netzwerke (Transkriptom, Proteom)
- Erarbeitung von Bewertungskriterien für substantiell nicht äquivalenter Produkte
- Analyseverfahren zur Erstellung von Metabolitprofilen
- Erarbeitung von Bewertungskriterien für komplexe Metabolitgemische
- Ernährungsphysiologische Studien zur Wirksamkeit pflanzlicher Inhaltsstoffe
- Festlegung politischer Rahmenbedingungen

Nachwachsende Rohstoffe

• Endogene Polymere

- Stärke

Kossmann, Lloyd (2000) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 35, 141ff

- Cellulose

Delmer, Haigler (2002) Metab. Eng. 4, 22 ff

- Lignin

Pena, Seguin (2001) Trends Biotech. 19, 500 ff

- Fruktane (Oligofruktose)

Vijn, Smeekens (1999) Plant Physiol. 120, 351 ff

- Fette

Thelen, Ohlrogge (2002) Metab. Eng. 4, 12 ff

• Neuartige Polymere

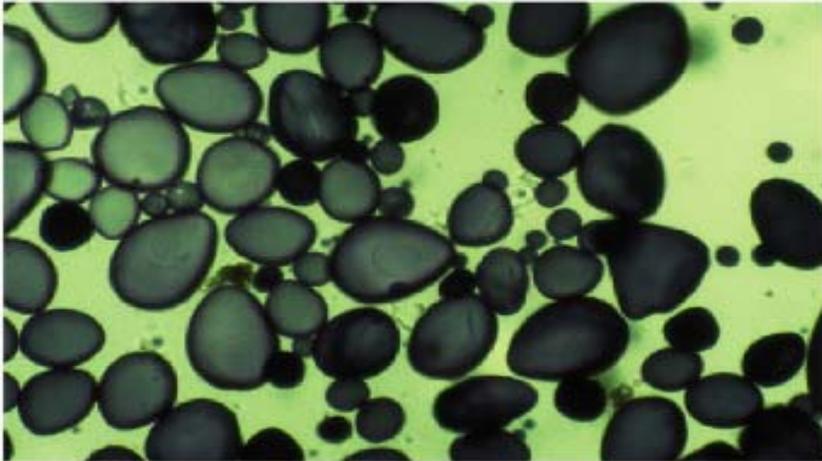
- Polyhydroxybutyrat

Hanley et al. (2000) Trends Plant Sci. 5, 45 ff

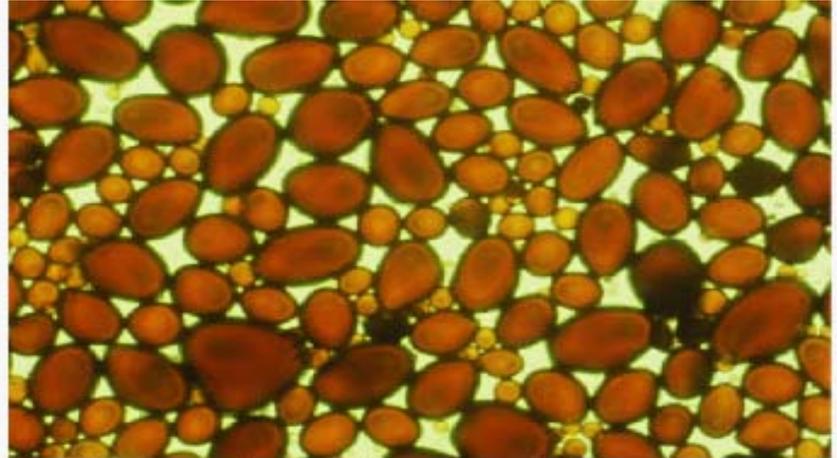
- Spinnenseidenproteine

Scheller et al. (2001) Nat. Biotech. 19, 573 ff

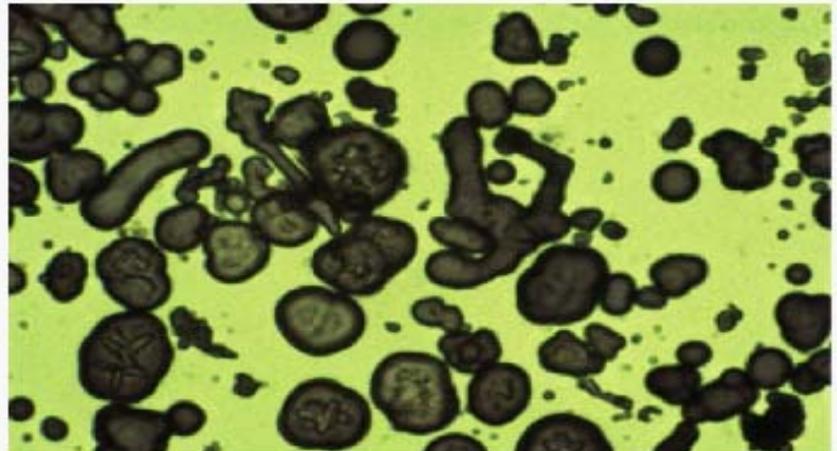
Herstellung von Amylopektin- oder Amylosestärke



konventionelle Kartoffelstärke



Amylopektinstärke



Amylosestärke

Herstellung von Polyhydroxybuttersäure

Acetyl-CoA

3-Ketothiolase

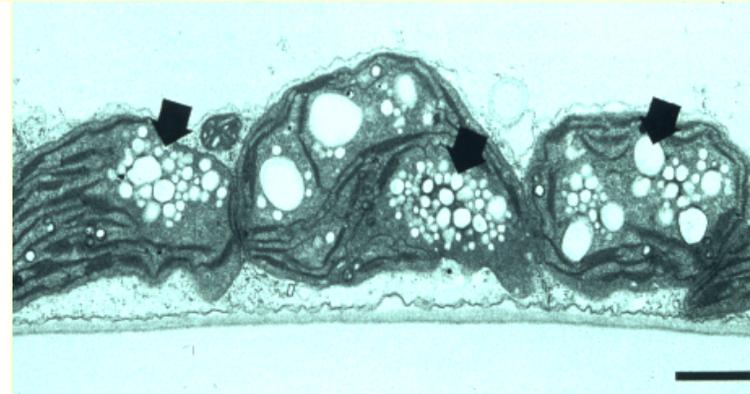
Acetoacetyl-CoA

*Acetoacetyl-CoA
Reduktase*

(R)-3-Hydroxybutyryl-CoA

PHB Synthase

PHB



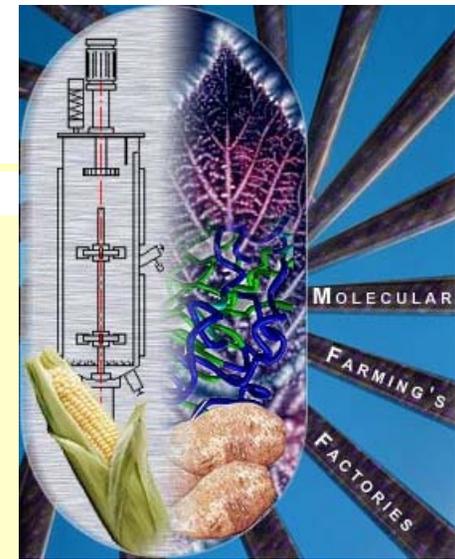
„Molecular Farming“

- **Therapeutische Proteine**

- Impfstoffe
- Antikörper
- Biologisch aktive Peptide
- Pharmaceutische Proteine

- **Industrielle Enzyme**

- Nahrungsmittelindustrie
- Tierernährung
- Waschmittelindustrie



Pflanze als Bioreaktor zur Produktion pharmaceutischer Proteine

Markt für pharmaceutische Proteine

1998: 17 Mrd. \$

2008: 90 Mrd. \$

Vorteile der Pflanze als Produktionssystem

- Geringe Produktionskosten
- Hohe Produktsicherheit
- Flexible Massenproduktion

Geringe Energiekosten

Massenproduktion

Flexible Produktion

Keine Toxine

Keine Humanpathogene

Keine Inclusion Bodies

Posttranslationale Modifikationen

Keine Aufreinigung bei Futtermittelzusatz

Hohe Produktstabilität

Kühlung nicht erforderlich

Einfacher Transport

Nahezu unbegrenzte Lagerfähigkeit

Begrenzungen

- Proteinglykosylierung
- Produktionsniveau
- Aufarbeitungskosten

„Plant-made“ pharmaceutische Proteine

Rekombinantes Protein	Quelle	Wirt	Productionniveau (%tIP)	Referenz
Enkephalin	Mensch	Arabidopsis	0.1 (Samen)	Vandekerckhove et al 1989
Erythropoietin	Mensch	Tabak	0.0026	Matsumoto et al 1995
HL enterotoxin B	<i>E. coli</i>	Tab/Kar	0.001 / 0.01 (Knolle)	Haq et al 1995
Hepatitis B Antigen	Hepatitis B Virus	Tab	0.0066	Mason et al 1992
Hepatitis B Antigen	Hepatitis B Virus	Kartoffel	up to 0.05	Richter et al 2000
Hirudin	<i>Hirudo medicinalis</i>	Raps	1 (Samengewicht)	Parmenter et al 1995
β-Interferon	Mensch	Tab	0.000017	Edelbaum et al 1992
Malarial Epitope	Plasmodium	Tab	0.4 - 0.8	Turpen et al 1995
γ / κ chains hybridoma	Maus	Tab	1.3	Hiatt et al 1989

Weitere Beispiele in:

Giddings et al. (2000) Nature Biotech 18:1151-1155

Daniell et al. (2001) Trends Plant Sci. 6, 219-226

Status quo des „Molecular Farmings“

• International führende Firmen

- Applied Phytologics
- Boyce Thompson Institut
- CropTech
- Epicyte
- Large Scale Biology
- Meristem Therapeutics
- Prodigene
- SemBioSys

• Deutsche Firmen

- MPB Cologne
- Novoplant
- Greenovation

• Klinische Prüfungen

- Anti-Tumor Antikörperfragment (Phase II, Large Scale Biology)
- Gastritische Lipase (Phase II, Meristem Therapeutics / Solvay)
- Anti-Tumor Antikörper (Phase I, Monsanto / NeoRx)
- Anti-Karies Antikörper (Phase III, Guy's Hospital)

Gentechnische Herstellung von Enzymen

Enzym	Quelle	Pflanze	Referenz
α -Amylase	B. licheniformis	Tabak	Pen et al (1992)
		Vicia narbonensis	Czihal et al. (1999)
		Erbse	(unpublished data)
Phytase	A. niger	Tabak	Verwoerd et al. (1995)
		Sojabohne	Denbow et al. (1998)
β (1,3-1,4) Glucanase	R. flavefaciens	Tabak	Herbers et al. (1996)
β (1,3-1,4) Glucanase	B. amyloliquefaciens	Gerste	Jensen et al. (1996)
β (1,4) Xylanase	C. thermocellum	Tabak	Herbers et al. (1995)
β (1,4) Xylanase	R. flavefaciens	Tabak	Herbers et al. (1996)

Aus: Herbers and Sonnewald (1999) Current Opinion in Biotechnology 10, 163-168

Aussichten

- Ertragssteigerung durch verbesserte Resistenzen und Stoffwechseleoptimierungen
- Reduzierter Ressourcenverbrauch (z.B. Wassernutzungseffizienz)
- Verbesserte Lebensmittelqualität durch Optimierung der Inhaltsstoffe
- Verbesserte Rohstofflieferanten durch Veränderung pflanzlicher oder neuartiger Polymere
- Produktion von Feinchemikalien
- Produktion hochwertiger Biomoleküle für pharmaceutische Anwendungen
- Produktion industrieller Enzyme