

Abschlussbericht

Produktion von Polyhydroxyfettsäuren in Nutzpflanzen

Phase I

Antragszeitraum 1.1.1997 – 31.12.1999

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Prof. Dr. Christian Jung

Institut für Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

Prof. Dr. Alexander Steinbüchel

Botanisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop

MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm/Potsdam

Prof. Dr. Lothar Willmitzer

PLANTA Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH, Einbeck gemeinsam mit der Südzucker AG

Dr. Hinrich Harling

1. Gesamtziel des Vorhabens

Polyhydroxyfettsäureester werden in einer Vielzahl von Bakterien als Speicherstoff gebildet und inzwischen neben Polynukleotiden, Polysacchariden, Polypeptiden, Polyphosphaten, Lignin und Polyisoprenoiden als eine neue Gruppe von Biopolymeren angesehen (Müller and Seebach, 1993). Chemisch gesehen sind sie Polyhydroxyalkanoate und gehören zu den Polyhydroxysäuren (3-Hydroxypropionsäure, 3-Hydroxybuttersäure, 4-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxyvaleriansäure, 5-Hydroxyvaleriansäure, 3-Hydroxyoctansäure). Sie werden im Weiteren der Einfachheit halber als Polyhydroxyfettsäuren (PHFs) bezeichnet.

Sie lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Kurzkettige PHFs (SCL=short chain length) bestehen aus C3- bis C5-Monomeren und werden z.B. von *R. eutropha* (ehemals *A. eutrophus*) gebildet, mittelkettige (MCL) haben 6 bis 14 (*P. oleovorans*) und langkettige (LCL) mehr als 14 C-Atome. Das am weitesten verbreitete Polymer ist die Poly-3-Hydroxybuttersäure (Trivialname PHB), die allgemein in der Kurzform P(3HB) geschrieben wird. Sie wird als unverzweigtes Homopolymer bestehend aus 1000-30000 Monomeren gespeichert. PHFs zeichnen sich durch große Vielfalt aus. Neben Homopolyestern gibt es Copolyester, die aus unterschiedlichen Hydroxyfettsäuren wie z.B. 3-Hydroxybuttersäure und 3-Hydroxyvaleriansäure [P(3HB-co-3HV)] zusammengesetzt sind.

Neben der Tatsache, daß es sich bei den PHFs um biologisch abbaubare Polymere handelt, sind besonders ihre guten chemischen und physikalischen Eigenschaften wie UV- und Hydrolysebeständigkeit hervorzuheben, die denen von Polypropylen sehr ähnlich sind. Sie sind wasserunlöslich und haben geringe Resistenz gegen Säuren und Basen. PHFs sind auch ein interessanter Grundstoff für die chemische Industrie. Je nach Zusammensetzung reichen ihre Eigenschaften von elastisch-gummiartig bis steif und brüchig (De Koning, 1995).

Die Eigenschaften von PHFs können durch chemische Modifikationen weiter optimiert werden. So sind Umesterungen in der Schmelze zwischen Poly(3HB) oder Poly(3HB-co-3HV) mit Polycaprolacton beschrieben worden. Weitere Modifikationen resultieren aus der Quervernetzung von PHF-Molekülen. Derartige Polymere sind ebenfalls durch PHF-Depolymerasen natürlich vorkommender Mikroorganismen abbaubar. Weiterhin wurden Copolymere aus 3HB und 3HV beschrieben, die sich durch bessere Festigkeit und Verarbeitungsqualität auszeichnen. Seit einigen Jahren wird ein derartiges Copolymer aus *R. eutropha* gewonnen und unter dem Namen BIOPOL vermarktet. Jedoch ist dieses Produkt aufgrund der hohen Produktionskosten bedingt durch den Einsatz externer C-Quellen wie Glucose und Propionsäure und die hohen Energiekosten zur Zeit gegenüber Rohölprodukten nicht konkurrenzfähig. Die Produktion von PHB durch Pflanzen, die in unseren Breiten landwirtschaftlich genutzt werden, erscheint aus folgenden Gründen sehr interessant (Poirier et al., 1992, Steinbüchel and Fuchtenbusch, 1998).

- Pflanzen fixieren CO₂ und gewinnen die dafür benötigte Energie mittels Photosynthese direkt aus dem Sonnenlicht. Damit entfällt die Notwendigkeit, externe Kohlenstoffquellen für die PHF-Produktion einsetzen zu müssen.
- Die derzeitige Situation in der Pflanzenproduktion hierzulande ist gekennzeichnet durch Überschüsse. Anbaualternativen im Bereich nachwachsende Rohstoffe sind daher gefragt. PHF-liefernde Nutzpflanzen könnten dabei das Spektrum der nachwachsenden Rohstoffe in eine völlig andere Richtung erweitern und neue Marktchancen eröffnen.
- Diejenigen Gene, welche für die an der PHF-Synthese beteiligten Enzyme codieren, sind inzwischen kloniert und stehen für Transformationsexperimente zur Verfügung.

- Die prinzipielle Machbarkeit konnte inzwischen in mehreren Fällen bewiesen werden. PHF-Gene wurden in verschiedenen Pflanzen zur Expression gebracht, und die Akkumulation von PHFs wurde nachgewiesen.

Aus diesen Gründen haben sich fünf kompetente Partner aus Industrie, dem universitären Forschungsbereich sowie ein Max-Planck-Institut zusammengetan, um ein Forschungs- und Entwicklungsprojekt zur PHF-Produktion in Nutzpflanzen durchzuführen. Alle Partner verfügen über einschlägige Erfahrungen auf den Gebieten der PHF-Forschung und der Pflanzentransformation

Die Partner haben die folgenden Kurzbezeichnungen:

Institut f. Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Kiel	KIEL
Institut f. Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster	MÜNSTER
Botanisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München	MÜNCHEN
MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm/Potsdam	GOLM
PLANTA Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH, Einbeck-/ (Unterauftragnehmer Südzucker AG, Offstein)	EINBECK

Das Verbundprojekt ist an der Nahtstelle Pflanzenzüchtung-Gentechnik angesiedelt. Das Projekt hat eine Laufzeit von sechs Jahren und ist in zwei Förderphasen unterteilt. Das Ziel besteht darin, pflanzliche Prototypen herzustellen, die später in der Züchtung Verwendung finden können. Diese Typen sollen signifikante Mengen an PHB akkumulieren und diese Eigenschaft stabil weitervererben. Drei landwirtschaftlich wichtige Nutzpflanzen werden bearbeitet, nämlich die Zuckerrübe und die Kartoffel als typische Kohlenhydrat-speichernde Pflanzen und der Raps als die klassische Öl-speichernde Nutzpflanze unserer Breiten. In der ersten Förderphase (1996-1999) wurden Forschungsarbeiten durchgeführt, die zur pflanzenzüchterischen Grundlagenforschung gehören. Das Ziel bestand darin, Wege für die Produktion von PHB in den genannten Nutzpflanzen aufzuzeigen und Protokolle zur Erstellung derartiger Pflanzen auszuarbeiten.

Da es sich bei den PHB-Genen um bakterielle Gene handelt, die in Pflanzen nicht vorkommen und dementsprechend PHB in keiner Pflanzenart als Speicherstoff gebildet wird, mußte in der ersten Phase nach Ansätzen gesucht werden, diese Gene stabil zur Expression zu bringen und den PHB-Stoffwechsel in den der Wirtspflanze einzubinden. Dazu werden unterschiedliche Wege beschritten, von denen sich zwei als erfolgversprechend erwiesen:

- PHF-Gene wurden im Kerngenom integriert und exprimiert. Sie wurden mit Transitsequenzen versehen, die die Polypeptide posttranslationell in die Chloroplasten dirigieren, damit die entsprechenden Enzyme dort die PHB-Synthese katalysieren können.
- PHF-Gene wurden direkt in das Chloroplasten-Genom integriert. Es wird zur Zeit geprüft, ob sie dort in funktionelle Polypeptide umgesetzt werden, was zur PHB-Akkumulation in diesen Organellen führen sollte.

2. Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms „Nachwachsende Rohstoffe“

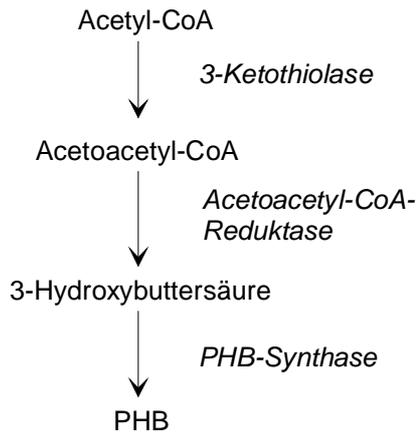
Das Projekt steht in engem Bezug zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms „Nachwachsende Rohstoffe“ der Bundesregierung. Es erfüllt in mehrerlei Hinsicht die derzeitigen politischen Vorgaben.

- Mit der Produktion von PHB durch Nutzpflanzen würden innovative technische Anwendungsfelder erschlossen werden. Diese Produkte haben ein potentiell bedeutsames industrielles Verwendungspotential (Poirier et al., 1995; Nawrath et al., 1995). Bei den Pflanzen handelt es sich um klassische Kulturarten der gemäßigten Breiten, die in Mitteleuropa angebaut werden können. Das Produkt PHB führt nicht zur Substitution eines bestehenden agrarischen Rohstoffes.
- PHBs haben ein günstiges Marktpotential und tragen zur Diversifizierung der Rohstoffpalette bei. Der durch die Überschußproduktion bedrängten Landwirtschaft soll eine interessante Produktionsalternative zur Verfügung gestellt werden. Bei den PHFs handelt es sich um ein völlig neues Ernteprodukt, welches mit keinem der derzeitigen Produktionsziele konkurrieren würde.
- Produktion und industrielle Nutzung von PHFs z. B. als Verpackungstoff würden dem wichtigen umweltpolitischen Ziel der Abfallvermeidung entgegenkommen. Sie bereiten keine ökologischen Probleme durch toxische Abbauprodukte. Viele freilebende Mikroorganismen sind in der Lage, mit Hilfe ihrer PHF-Depolymerasen PHFs abzubauen. Damit könnten entsprechende aus PHFs bestehende Verpackungsprodukte dem normalen Kompostierungsprozeß zugeführt und dabei vollständig zu CO₂ und Wasser abgebaut werden.

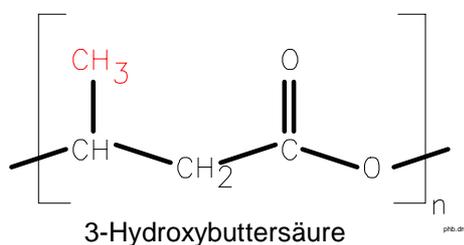
3. Stand der Wissenschaft und Technik

Die PHF-Produktion in Bakterien ist intensiv untersucht worden. Sie wurden 1926 erstmals in *B. megaterium* entdeckt und sind heute weit mehr als 100 Bakterienarten nachgewiesen worden. Bakterien sind in der Lage, bei ausreichender Zufuhr einer C-Quelle PHFs bis zu 90 % des Zellrockengewichtes anzureichern (Yamane et al., 1996). PHFs in Form von Einschlüssen (Grana) sind schwer löslich, haben ein hohes Molekulargewicht und üben keinen osmotischen Druck aus. Dadurch sind sie ein idealer Speicherstoff.

Die Oberfläche der PHF-Grana ist mit Proteinen besetzt. Neben der PHF-Synthase befindet sich dort in hoher Konzentration ein 24kDa großes Protein, welches als „Phasin“ bezeichnet wird und durch das Gen *phaP* kodiert wird (Steinbüchel et al., 1995; Pieper-Fürst et al., 1994). Bakterien verfügen auch über entsprechende Enzymsysteme, um PHFs wieder abzubauen und sie damit als C-Quelle zu nutzen (Jendrossek et al., 1995).



Der Synthese-Reaktionsweg ist in *R. eutropha* (Kidwell et al., 1995) und anderen Bakterien eingehend studiert worden (Tombolini et al., 1995; Takeda et al., 1995). Die wesentlichen Schritte sind in der Grafik beschrieben.



Das Enzym 3-Ketothiolase überführt Acetyl-CoA in Acetoacetyl-CoA. Drei *phaA*-Gene sind in *R. eutropha* bekannt. Dieses Enzym ist auch in Pflanzen vorhanden, wo es am Isoprenoidstoffwechsel beteiligt ist. Die Acetyl-CoA-Acetylreduktase (*phaB* Genprodukt) katalysiert die NADPH-abhängige Überführung von Acetoacetyl-CoA in 3-Hydroxybuttersäure. Dieses

Enzym kann Moleküle mit einer Kettenlänge von 4 bis 6 C-Atomen verarbeiten. Die PHF-Synthase (*phaC* Genprodukt) katalysiert schließlich die Polymerisation von 3-Hydroxybuttersäure-CoA zu PHB. ca. 30 *phaC*-Gene sind inzwischen sequenziert worden, die meisten davon beim Partner MÜNSTER. Sie lassen sich nach Aminosäuresequenz und Substratspezifität in drei Klassen einordnen. Die PHB-Synthase aus *R. eutropha* kann auch 4-Hydroxy- und 5-Hydroxyalkanoate und zahlreiche andere 3-Hydroxyacyl-CoAs polymerisieren, nicht jedoch C6- oder längerkettige Hydroxyalkanoate. Hinweise, daß das PHF-Synthase-Polypeptid in Bakterien posttranslational durch Bindung an 4'-Phosphopantetein modifiziert wird, konnten nicht bestätigt werden.

Die Produktion des PHAs ist direkt abhängig von Einsatz der C-Quelle. Der Zusatz von Propionsäure und Valeriansäure zum Glucose-haltigen Kulturmedium führt zur Bildung von Copolymeren aus 3-HB und 3-HV. Eine Ausnahme stellt die PHF-Synthese-Maschinerie von *Rhodococcus ruber* dar. Auch Copolymere aus 3-HB und 3-Hydroxycaprinsäure wurden inzwischen beschrieben (Caballero et al., 1995).

Es gibt mehrere Arbeiten, die über die Produktion von PHFs in Pflanzen berichten (Poirier et al., 1995). Eine Acetoacetyl-CoA-Reduktase und eine PHF-Synthase wurde in *A. thaliana* unter der transkriptionellen Kontrolle des 35S-Promotors kloniert (Poirier et al., 1992). Es wurden geringe Mengen an PHFs gebildet (ca. 100µg pro g Frischgewicht), und die Pflanzen waren im Wuchs stark gehemmt. Einen wesentlichen Fortschritt stellte das Plastiden-targeting mit Hilfe plastidärer Transitpeptide dar. Dazu wurde das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (SSU) mit dem N-terminalen Ende der Enzymgene verbunden und unter die transkriptionelle Kontrolle des 35S-Promotors gestellt. Damit wurden in *A. thaliana* bis zu 14 % PHFs in der Trockenmasse (entsprechend 10 mg/g Frischgewicht) älterer Blätter angereichert (Poirier et al., 1995). Die transgenen Pflanzen zeigten dabei normales Wuchsverhalten. Nur bei hoher PHF-Akkumulation wurden Chlorosen beobachtet. Neben *A. thaliana* wurden PHF-Gene inzwischen auch in landwirtschaftlich genutzte Arten eingeschleust und zur Expression gebracht.

Die cytosolische Lokalisation von Acetoacetyl-CoA-Reduktase und PHF-Synthase in Raps brachte Ergebnisse, die mit denen von *A. thaliana* vergleichbar waren (Smith et al., 1994).

Bei der Firma Monsanto wurden *Arabidopsis* und Raps-Pflanzen mit *phbB* und *phbC* transformiert. Um die spätere züchterische Bearbeitung zu erleichtern, wurden nur Transformanten mit singulären Insertionsereignissen weiter verwendet. In allen Fällen wurde eine stabile Vererbung der eingeführten Gene beobachtet. Waren die anfänglich akkumulierten PHB-Mengen relativ gering (<0,1%), konnten diese durch relativ wenige Selektionszyklen stark erhöht werden. So wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit bis zu 12,1% PHB und Rapspflanzen mit bis zu 7,7% PHB beschrieben (Gruys et al. 1998). Die höchsten PHB-Werte wurden erreicht, wenn die Transgene im homozygoten Zustand vorlagen. Das durchschnittl. Molekulargewicht lag im Falle des Raps bei ~1.000.000. Durch den Einsatz des BktB-Kethothiolases aus *Ralstonia eutropha* konnte der Anteil der Copolymere auf bis zu 6,4% erhöht werden.

Ein zusätzlicher Weg zur Erzeugung von PHFs in Pflanzen ist das *targeting* bakterieller PHF Synthasen in Peroxysomen, wo mit Hilfe der in der β -Oxydation auftretenden R-3-Hydroxyacyl-CoAs die Bildung mittelkettiger PHAs möglich ist. Nach Transformation von *Arabidopsis* mit der *P. aeruginosa* PHA Synthase, welche Hydroxyfettsäuren mit einer Kettenlänge zwischen 6 und 14 als Substrat verwendet, gekoppelt mit einer Peroxysomen targeting-Sequenz (Isocitratlyase) aus *B. napus* wurden in 7 Tage alten Pflanzen bis zu 4mg/g TM gemessen (Mittendorf et al. 1998). Diese Ergebnisse zeigen, daß PHFs in Pflanzen in nennenswerten Mengen produziert werden können.

3.1. Literatur

- Caballero, K.P., Karel, S.F., and Register, R.A. (1995). Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 86-92.
- Dekoning, G. (1995). Physical properties of bacterial poly((R)-3- hydroxyalkanoates). *Can. J. Microbiol.* 41, 303-309.
- Gruys, K., Taylor, N.B., Colburn, S., Daae, E., Dunnill, P., Houmiel, K., Mahadeo, D., Mitsky, T., Padgett, S., Reiser, S., Rodriguez, D., Slater, S., Stock, R., Tran, T., Thorne, G., and Valentin, H. (1998). PHA production: from bacteria to plants. Intern. symposium on biological polyhydroxyalkanoates. Tokio, 9.-11.9.1998
- Jendrossek, D., Backhaus, M., and Andermann, M. (1995). Characterization of the extracellular poly(3- hydroxybutyrate) depolymerase of *Comamonas* sp and of its structural gene. *Can. J. Microbiol.* 41, 160-169.
- John, M.E., and Keller, G. (1996). Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12768-12773.
- Kidwell, J., Valentin, H.E., and Dennis, D. (1995). Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* PHA biosynthesis genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1391-1398.
- Mittendorf, V., Robertson, E.J., Leech, R.M., Krüger, N., Steinbüchel, A., and Poirier, Y. (1998). Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95, 13397-13402.

- Müller, H.-M. and Seebach, D. (1993). Poly(hydroxyfettsäureester), eine fünfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen Biopolymeren? *Angew. Chem.* *105*, 483-509.(Abstract)
- Nawrath, C., Poirier, Y., and Somerville, C. (1995). Plant polymers for biodegradable plastics: Cellulose, starch and polyhydroxyalkanoates. *Mol. Breeding.* *1*, 105-122.
- Pieper-Fürst, U., Madkour, M.H., Mayer, F., and Steinbüchel, A. (1994). Purification and Characterization of a 14-Kilodalton Protein That Is Bound to the Surface of Polyhydroxyalkanoic Acid Granules in *Rhodococcus ruber*. *J. Bacteriol.* *176*, 4328-4337.(Abstract)
- Poirier, Y., Dennis, D., Klomparens, K., Nawrath, C., and Somerville, C. (1992). Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants. *FEMS Microbiology Reviews* *103*, 237-246.
- Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K., and Somerville, C. (1992). Polyhydroxybutyrate, a Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants. *Science* *256*, 520-523.
- Poirier, Y., Nawrath, C., and Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology* *13*, 142-150.
- Poirier, Y., Somerville, C., Schechtman, L.A., Satkowski, M.M., and Noda, I. (1995). Synthesis of high-molecular-weight poly([R]-(-)-3-hydroxybutyrate) in transgenic *Arabidopsis thaliana* plant cells. *Int. J. Biol. Macromol.* *17*, 7-12.
- Smith, E., White, K.A., Holt, D.C., Fentem, P.A., and Bright, S.W.J. (1994). The production of poly- β -hydroxybutyrate in transgenic oilseed rape plants. 1955 (Abstract)
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Föllner, C., Liebergesell, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Pieper-Fürst, U., Pries, A., Valentin, H.E., and Wieczorek, R. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid granules and introducing the terms GAP and Phasin. article 1-21.
- Steinbüchel, A. and Fuchtebusch, B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology* *16*, 419-427.
- Takeda, M., Matsuoka, H., Hamana, H., and Hikuma, M. (1995). Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by *Sphaerotilus natans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *43*, 31-34.
- Tombolini, R., Povolo, S., Buson, A., Squartini, A., and Nuti, M.P. (1995). Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. *Microbiology-Uk.* *141*, 2553-2559.
- Yamane, T., Fukunaga, M., and Lee, Y.W. (1996). Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Biotechnol. Bioeng.* *50*, 197-202.

4. Ergebnisse der ersten Projektphase

4.1. Kiel: Optimierung des Plastiden-targetings bakterieller PHF-Gene

Prof. Dr. Christian Jung, Dr. Daguang Cai, Dr. Hans Harloff, Dr. Gerhard Menzel, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Kiel

Förderkennzeichen 95 NR 048-F

4.1.1. Plastiden-targeting und Transformation

Das Ziel der 1. Projektphase war die Optimierung des Plastiden-targetings bakterieller PHF-Gene und die Erstellung von „single-gene“-Konstrukten sowie von „triple“-Konstrukten, die alle drei PHB-Gene (*phbA*, *phbB* und *phbC*) auf einem binären Vektor aufwiesen und somit die Transformation von Pflanzen in einem Schritt erlauben. Diese Konstrukte wurden für die Kerntransformation von „hairy roots“ der Zuckerrübe und *Arabidopsis* eingesetzt. Zudem wurden die Transformationskonstrukte aus Kiel dem Projektpartner PLANTA für die Transformation von Raps und Zuckerrübe zu Verfügung gestellt. Die PHB-Analyse transgener Pflanzenmaterials konnte bis zum Ende des Berichtszeitraumes noch nicht abgeschlossen werden.

4.1.2. PHB-Analytik

In der ersten Phase des Verbundes wurden Molekulargewichtsbestimmung von µg-Mengen sowie PHB-Bestimmung im ng-Bereich durchgeführt. Die PHB-Bestimmung mit GC und HPLC wurde etabliert und die Empfindlichkeit erheblich verbessert (in der GC von 200 µg auf 5 ng PHB). Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte über GPC nach Umbau der vorhandenen HPLC-Anlage. Auch hier wurde die Bestimmungsgrenze durch die Verwendung von Microbore-Säulen von 60 µg auf 10 µg PHB gesenkt. Der Einsatz der computergesteuerten flexIKA-Apparatur ermöglichte die Entwicklung eines reproduzierbaren Extraktionsverfahrens für eine größere Probenzahl mit geringerem Zeitaufwand und Lösungsmittelverbrauch als das herkömmliche Soxhletverfahren (max. 50 Extraktionen/Woche), sowie einen Ersatz des PHB-Aufschlusses im Ölbad durch einen programmierbaren Trockenaufschluß im Heizblock.

5. Münster: Klonierung und Charakterisierung neuer PHF-Gene aus Bakterien

Prof. Dr. Alexander Steinbüchel, Dr. Silke Hein, Institut für Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms- Universität, Münster

Förderkennzeichen 95 NR 039

Im Rahmen der 1. Förderphase des Verbundprojektes wurden die Strukturgene für zwei neue PHF Synthasen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Pseudomonas mendocina* kloniert und molekulargenetisch charakterisiert sowie die Enzyme biochemisch charakterisiert. Die Klonierung weiterer PHF Synthasen aus schwer oder nicht zu kultivierbaren Bakterien sowie aus Bakterien, die ausgehend von Lactonen Hydroxyfettsäuren mittlerer Kettenlänge mit einer Hydroxylgruppe am 4'-, 5'- oder 6'-Kohlenstoffatom in PHF einbauen, wurde begonnen. Die Reinigung der neuen, oben erwähnten PHF Synthase-Proteine und die Gewinnung von

Antikörpern gegen diese Proteine läuft. Die Gene wurden den Partnern zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurden für den Projektpartner in Kiel verschiedene PHF fermentativ mit Bakterien hergestellt, in reiner Form isoliert und zur Standardisierung der gaschromatographischen Analyse zur Verfügung gestellt.

6. München: PHF-haltige, transplastomische Pflanzen von Raps und Zuckerrübe

Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop, Dr. Christian Eibl, Alexander Dovzhenko, Botanisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Als Auftragnehmer von Prof. Dr. Christian Jung, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Kiel

Förderkennzeichen 95 NR 048-F

6.1.1. Regeneration und Transformation von Raps und Zuckerrübe

In der ersten Förderphase wurden Protokolle zur *in vitro* Regeneration von Raps und Zuckerrübe entwickelt. Die Regenerationseffizienz konnte gegenüber bekannten Verfahren deutlich verbessert werden.

6.1.2. Plastomtransformation von Raps und Zuckerrübe

In der ersten Förderperiode gelang die Integration des gesamten PHB-Operons aus *R. eutropha* in das Plastom der Modellpflanze Tabak. Diese Pflanzen zeigten eine signifikante, aber doch geringe Akkumulation von PHB in Blättern. Entsprechende Plastidentransformationen von Raps und Zuckerrübe konnten in der letzten Phase dieser Förderperiode begonnen werden.

7. Golm: Optimierung der Produktion von PHB in transgenen Nutzpflanzen und Ansätze zur Erzeugung von PHF in Plastiden

Prof. Dr. Lothar Willmitzer, Dr. Karen Bohmert, Dr. Volker Mittendorf, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm

Förderkennzeichen 96 NR 040

Im Rahmen der ersten Projektphase wurden zahlreiche chimäre Gene, die zur Erzeugung von PHB geeignet sind, in Kartoffelpflanzen eingeführt. Als Expressionsort wurden dabei primär das Mitochondrium sowie in geringerem Umfang das Cytosol gewählt. Die Untersuchungen großer Zahlen (mehrere hundert) transgener Linien ergaben durchweg sehr geringe Mengen an PHB (< 50 µg/g Frischgewicht). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß für diese geringe Menge an gebildetem PHB Spezifika der Konstrukte verantwortlich sind, wurden in Abweichung vom ursprünglichen Arbeitsplan Versuche zur Expression der Gene für die 3-Ketothiolase, die Acetoacetyl-CoA-Reduktase sowie die PHB-Synthase aus *R. eutropha* in Chloroplasten unternommen. Diese Versuche wurden mit „triple“-Konstrukten parallel in *Arabidopsis thaliana* und Kartoffel durchgeführt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In *Arabidopsis thaliana* wurden transgene Pflanzen mit einem PHB-Gehalt von bis zu 40 mg/g Frischgewicht erzeugt (diese Menge liegt weit (Faktor 3) über allen bisher erzielten Mengen). Dies ist eine entscheidende Kenngröße für eine mögliche kommerzielle Nutzung.
 - Die Pflanzen mit einem PHB-Gehalt von > 5 mg/ g Frischgewicht weisen stark verzögerte Wachstumsraten bis hin zu früher Seneszenz auf, dabei korreliert die Stärke der Ausprägung des Phänotyps mit der Menge an PHB.
 - Bei der Verwendung des identischen Konstruktes zur Transformation von Kartoffel wurden nur äußerst wenige Kalli gebildet, die nicht regenerierten.
 - Der PHB-Gehalt dieser Kalli schwankte zwischen 10 und 150 µg/g Frischgewicht
- Untersuchungen zur Identifizierung des Parameters, der die effiziente Transformation von Kartoffel behindert, weisen auf eine negative Rolle der plastidär lokalisierten 3-Keto-Thiolase hin.

8. Einbeck: Kerngenomtransformation von Raps und Zuckerrüben

Dr. Hinrich Harling, Josef Dettendorfer, PLANTA Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH, Einbeck

Förderkennzeichen 96 NR 041-F

Zur Transformation von Raps und Zuckerrübe wurden zunächst Einzelgenkonstrukte mit unterschiedlichen plastidären Targeting-Sequenzen und Promotoren eingesetzt. Einige Konstrukte wurden cotransformiert. Um aufwendige Kreuzungsarbeiten zu umgehen wurden, sobald triple-Konstrukte der Projektpartner verfügbar waren, die Arbeiten auf die Transformation von triple-Konstrukten fokussiert. Die Transformation von Tabak wurde zusätzlich in den Arbeitsplan aufgenommen. Insgesamt konnten in der 1. Phase über 200 transgene Linien erstellt und molekular charakterisiert werden. Ausgewählte Linien wurden im Gewächshaus angezogen und Pflanzenmaterial wurde zur Analyse an die Projektpartner abgegeben. Die Analytik wird in der 2. Projektphase abgeschlossen.

9. Zusammenfassung

Die wesentlichen Ergebnisse der ersten Projektphase lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es wurden Konstrukte mit Transitsequenzen erzeugt, die *in vivo* optimale Importeigenschaften zeigten, und für die Pflanzentransformation eingesetzt.
- Die Analytik zum Nachweis auch sehr geringer PHB Mengen aus pflanzlichem Gewebe wurde optimiert.
- Eine neue PHB-Synthase mit alternativer Substratspezifität wurde isoliert.
- Transplastome Pflanzen wurden erzeugt, die das PHB Operon aus *R. eutropha* enthalten, und ein Protokoll zur Regeneration ganzer Pflanzen aus Raps- und Zuckerrübenprotoplasten wurde erstellt.
- In *Arabidopsis* konnten bis zu 40% PHB nach Plastiden-*targeting* angereichert werden.