

Abschlußbericht

Zum Verbundvorhaben:	Produktion von Polyhydroxyfettsäuren in Nutzpflanzen, Phase II
Teilvorhaben 4:	Optimierung der Produktion von PHB in transgenen Nutzpflanzen und Ansätze zur Erzeugung von PHF in Plastiden
Zeitraum:	1.1. 2000 – 31. 12. 2003
Ausführende Stelle	Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie Wissenschaftspark Golm Am Mühlenberg 1 14476 Potsdam
Projektleiter:	Prof. Dr. Lothar Willmitzer

1. Aufgabenstellung

Das Teilprojekt Golm hat die folgenden Ziele:

- a) Untersuchungen zum Verständnis der negativen Auswirkungen der Produktion großer Mengen PHB in transgenen Pflanzen
- b) Kurative Ansätze zur Vermeidung der negativen Effekte bei der Produktion großer Mengen an PHB
- c) Produktion von PHF in der Plastide durch Eingriff in die Fettsäurebiosynthese

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

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 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 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.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Aus den oben zusammengefassten Ergebnissen ergeben sich somit zwei wichtige Fragestellungen, die in der Berichtsperiode bearbeitet werden sollten:

3.1. Produktion von PHF in der Plastide durch Eingriff in die Fettsäurebiosynthese

In der Arbeitsgruppe Steinbüchel war eine neue 3-Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein-Coenzym A Transferase (phaG) aus *Pseudomonas putida* isoliert worden. Diese PHAG Acyltransferase sollte zusammen mit der PHAC1 Synthase aus *Pseudomonas aeruginosa* oder aus *Pseudomonas mendocina* in Plastiden exprimiert werden. Ziel war es, mittels dieses Ansatzes, PHF (medium-chain-length PHA, MCL-PHA) aus den 3-Hydroxyacyl-ACP Intermediaten der de novo Fettsäurebiosynthese herzustellen.

3.2. Eliminierung der negativen Effekte auf Pflanzenwachstum und – entwicklung gekoppelt mit der Produktion großer Mengen PHB in Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*)

Aus den oben aufgeführten Untersuchungsergebnissen ergibt sich, dass die Produktion großer Mengen PHB in *Arabidopsis thaliana* gelingt, aber mit massiven Beeinträchtigungen für Pflanzenentwicklung und –wachstum verbunden ist. Obwohl *Arabidopsis thaliana* keine Zielpflanze im Rahmen des Projektes darstellt, erscheint es angesichts der Schnelligkeit von in *Arabidopsis thaliana* durchzuführenden Experimenten sinnvoll, diesen Effekt in *A. thaliana* zu untersuchen, um so Strategien für die Lösung des Problems auch in Nutzpflanzen (hier: Kartoffel, Raps) zu entwickeln.

Im Einzelnen sind folgende Arbeiten vorgesehen:

- Untersuchungen zu metabolischen Veränderung in den große Mengen PHB bildenden transgenen Pflanzen mittels GC/MS
- Untersuchungen zur möglichen Adsorption von Proteinen an die PHB Granula und mögliche Überwindung des Problems durch Expression von Phasingenen in Pflanzen

3.3. Entwicklung von Strategien zur Erzeugung großer Mengen PHB in den Plastiden transgener Kartoffel- und Rapspflanzen

Wie oben geschildert führte die Verwendung des in *Arabidopsis thaliana* zu sehr großen PHB Mengen führenden Konstruktes in Kartoffel zu sehr wenigen Kalli, die zudem nur äußerst geringe Mengen PHB produzierten. Weitere Untersuchungen unter Verwendung der einzelnen Gene ergaben sehr starke Hinweise darauf, dass die Expression der 3-Ketothiolase in den Plastiden vermutlich das entscheidende Problem darstellt.

Im Rahmen des Berichtszeitraums war daher vorgesehen, dieses Gen und falls notwendig auch die Acetoacetyl-CoA-Reduktase sowie die PHB-Synthase unter die

Kontrolle von induzierbaren Promotoren zu stellen. Dieses Vorgehen könnte u. U. auch ein grundsätzlicher Ansatz für die Vermeidung der mit der PHB-Synthese einhergehenden negativen Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze sein (vgl. oben). Als Promotoren waren der Salicylsäure-induzierbare Promotor prp 1-1 sowie der (knollenspezifische und im Blatt induzierbare) Klasse I Patatin Promoter B33 vorgesehen.

4. Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse

4.1. Produktion von PHF in der Plastide durch Eingriff in die Fettsäurebiosynthese

Doppelkonstrukte mit der plastidären PHAG-Acyltransferase und der plastidären PHAC1 Synthase sollten in *Arabidopsis* und Kartoffel auf Funktion (d.h. PHF-Produktion) untersucht werden. Da die zur Verfügung stehenden Mengen der Intermediate und auch die gesamte Kapazität der Fettsäurebiosynthese in diesen Pflanzen unterschiedlich sein könnten, sollte ein paralleler Ansatz in beiden Spezies durchgeführt werden.

Dazu wurde ein Doppelkonstrukt bestehend aus der PHAC1 Synthase und der PHAG Acyltransferase beide mit einem N-terminalen Transitpeptid für die Aufnahme in Chloroplasten versehen und unter der Kontrolle des konstitutiven 35 s CaMV Promotors stehend in *Arabidopsis thaliana*, Tabak und Kartoffel transformiert. In allen Fällen wurden transgene Pflanzen erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass im Falle von *Arabidopsis thaliana* die transgenen Pflanzen eine starke Wachstumsbeeinträchtigung aufwiesen. Durch Kontrolltransformation mit den beiden Einzelkonstrukten getrennt konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsbeeinträchtigung auf das PHAG-Gen zurückzuführen ist.

Untersuchungen der transgenen Pflanzen mittels GC-MS (ca. jeweils 50 transgene Pflanzen wurden untersucht, es wurde ausschließlich Blattmaterial verwendet) ergaben keine signifikanten Mengen an PHF. Eine sinnvoll erscheinende Erklärung für die Abwesenheit von PHF in den transgenen Pflanzen ist die Annahme, dass die Expression der PHAG Acyltransferase negativ für Pflanzenentwicklung – und Wachstum ist und daher gegen eine Expression selektiert wird. Falls diese Annahme richtig ist, bietet sich der Einsatz von induzierbaren Promotoren an.

Es wurden daher in weiteren Versuchen transgene Arabidopsispflanzen erstellt, die die PHAC1 Synthase unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors enthielten, die PHAG Acyltransferase jedoch unter der Kontrolle eines induzierbaren

Promotors. Auf Grund von in der Arbeitsgruppe vorhandenen Erfahrungen wurde ein Äthanol induzierbarer Promotor (das alc-System) eingesetzt. Dieser Ansatz erwies sich zunächst als erfolgreich, i.e. transgene Pflanzen, die beide Gene enthielten, wuchsen ohne sichtbaren Phänotyp und erst nach Induktion des PHAG-Gens konnte wiederum eine starke Wachstumsretardierung beobachtet werden.

Es wurden auch hier von ca. 50 transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen Blattproben entnommen und mittels GC-MS auf das Vorhandensein von PHF untersucht. Auch diese Untersuchungen verliefen leider negativ, i.e. es waren keinerlei Spuren von PHF's nachweisbar.

Die Versuche zur Erzeugung von PHF in Plastiden mittels Eingriffe in die Fettsäurebiosynthese wurden auf Grund dieser eindeutig negativen Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt eingestellt. Anzumerken bleibt noch, dass ähnliche Ergebnisse (i.e. Wachstumsretardierung als Ergebnis der Expression der PHAG Acyltransferase, aber keine Produktion von PHF) zu einem späteren Zeitpunkt auch von den Wissenschaftlern der Firma Monsanto berichtet worden sind (persönliche Mitteilung).

4.2. Eliminierung der negativen Effekte auf Pflanzenwachstum und –entwicklung gekoppelt mit der Produktion großer Mengen PHB in Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*)

4.2.1. Analyse der metabolischen Veränderungen

In der ersten Projektphase konnten transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erzeugt werden, die bis zu 40% des Trockengewichtes als PHB enthalten, jedoch eine sehr starke Zwergwüchsigkeit aufwiesen. Um zu untersuchen, ob diese Zwergwüchsigkeit auf eindeutige und monokausale metabolische Veränderungen zurückzuführen ist, wurden diese Pflanzen mittels GC-MS im Rahmen von Metabolic Profiling Ansätzen untersucht. Diese Untersuchungen ergaben gewisse Hinweise auf einen verringerten Pool an TCA Cyclus Intermediaten, der sich jedoch quantitativ nicht von im Rahmen anderer Forschungsprojekte beobachteten Veränderungen unterschied, obwohl in diesen transgenen Pflanzen keine so starke Wachstumsretardierung beobachtet

worden war. Er schied daher als einzige Ursache aus. Der Ansatz wurde deshalb an dieser Stelle nicht weiterverfolgt.

4.2.2. Untersuchungen zur möglichen Adsorption von Proteinen an die PHB Granula und mögliche Überwindung des Problems durch Expression von Phasingenen in Pflanzen

In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Akkumulation von PHB in *Arabidopsis* bis zu 4% des Frischgewichts (ca. 40% dw) möglich ist, aber zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums und zu chlorotischen Effekten führt. Als möglicher Ansatz zur Wiederherstellung des Wildtypphänotyps sollte zusätzlich zu den drei *phb* Genen das Phasingen *phaP* aus *Ralstonia eutropha* in *Arabidopsis* exprimiert werden. Phasine sind Proteine, die in PHB produzierenden Bakterien mit den PHB Granula assoziiert vorkommen. Transposon-getaggte Mutanten von *R. eutropha*, die Phasine nur noch in geringer Menge produzieren, bilden statt mehrerer kleiner nur ein großes PHB Granulum. In diesen Mutanten ist außerdem die spezifische Aktivität der Synthase und die PHB Synthese reduziert.

Weiterhin konnte bei *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass in Anwesenheit der Phasine der Turnover der Synthase sowie ihre spezifische Enzymaktivität steigt. Durch die zusätzliche Expression des Phasingens in Pflanzen soll getestet werden, ob Phasine auch im heterologen System positive Effekte auf die PHB Synthese und auf die Verträglichkeit des PHBs für die Pflanze haben. Dazu wurde ein Konstrukt hergestellt, das die konstitutive Expression des *pha P* Gens in *Arabidopsis* ermöglicht (pBI P), sowie ein Fünffachkonstrukt, das neben der Expression von *phaP* zur konstitutiven Expression der drei *phb* Gene führt (pBinARHyg ABC P).

Über die Herstellung der transgenen pBI P Kontrollpflanzen in *Arabidopsis* und deren Untersuchung durch Northern-Analyse wurde gezeigt, dass die konstitutive Expression von *pha P* alleine nicht zu phänotypischen Veränderungen führt.

Beim Screenen der 166 transgenen *Arabidopsis* T₁-Pflanzen aus der Transformation mit dem Konstrukt pBinARHyg ABC P wurde ein maximaler Gehalt an 3-

Hydroxybutyrat (3-HB) von 5.8 % des Trockengewichts bestimmt. Die hoch-PHB-akkumulierenden Pflanzen zeigten eine Wachstumsreduktion und chlorotische Effekte. Über Northern- und Western-Analyse wurde die Expression aller vier Gene (*phbA*, -B, -C; *phaP*) und das Vorhandensein des Phasinproteins in den transgenen ABC P Linien nachgewiesen. Durch elektronenmikroskopische Untersuchung der ABC P Linien konnten plastidäre PHB Granula sichtbar gemacht werden. In einer hoch-PHB akkumulierenden und hoch-Phasin-exprimierenden Linie kommen vermehrt kleinere PHB Granula vor. Um statistisch abgesicherte Aussagen zu einer möglichen Größenänderung der PHB Granula bei der Anwesenheit von Phasinen zu machen, müssten EM Untersuchungen in größerem Umfang vorgenommen werden. Um die Lokalisation des Phasinproteins in den Zellen der ABC P-Linien zu überprüfen, wurden Antikörper gegen das Phasinprotein von *R. eutropha* für Immunogoldlabelling-Experimente verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten eindeutig, dass sich das Phasinprotein wie gewünscht ausschließlich in den Plastiden befindet und dort bevorzugt in Assoziation mit der Oberfläche der PHB Granula vorkommt.

Dieser Ansatz zur Überkommung der negativen Effekte der Produktion großer PHB Mengen auf Wachstum und Entwicklung war zwar erfolgreich im Sinne der Expression des Phasinproteins aus *Ralstonia Eutropha* in *Arabidopsis thaliana* sowie des korrekten Targetting des Proteins an die Oberfläche der PHB Granula. Er war jedoch nicht erfolgreich im Hinblick auf das eigentlich angestrebte Ziel, i.e. die Produktion großer Mengen PHB bei gleichzeitig normalem Wachstum und normaler Entwicklung.

Dieses Teilprojekt wurde daher an dieser Stelle nicht weitergeführt.

4.3. Entwicklung von Strategien zur Erzeugung großer Mengen PHB in den Plastiden transgener Kartoffel- und Rapspflanzen

4.3.1. Einsatz induzierbarer Promotorsysteme

Über Kontrolltransformationen von Tabak und Kartoffel mit den Einzelkonstrukten, die jeweils nur eines der drei *phb*-Gene mit 35S-Promotor und der plastidären Targettingsequenz trugen, konnte gezeigt werden, dass das Thiolase-Konstrukt in beiden Species zu einer im Vergleich zu dem Reduktase- und Synthase-Einzelkonstrukt deutlich verringerten Transformationseffizienz führte und dass bei Veränderung der Expression des offenbar kritischen Thiolase(*phb A*)-Gens transgene, PHB produzierende Kartoffel- und Tabaklinien erzeugt werden können.

Ausgehend von diesen Überlegungen und der daraus sich ableitenden Idee, die Wachstumsphase der Pflanzen von der Produktionsphase abzukoppeln, wurden folgende drei neue chimäre Konstrukte erstellt:

pSRN *phbABC*: enthält die codierende Sequenz von *phb A* unter der Kontrolle des *alcA* Promotors aus *Aspergillus nidulans*; den *alcR* Transkriptionsfaktor aus *A. nidulans* unter Kontrolle des 35S Promotors; sowie *phb B* und *phb C* jeweils unter Kontrolle des 35S Promotors (bis auf *alcR* sind alle kodierenden Sequenzen mit einer plastidären Targettingsequenz versehen)

- pSRN *phbA*: enthält die codierende Sequenz von *phb A* unter der Kontrolle des *alcA* Promotors aus *Aspergillus nidulans*
- pSRN *phbBC*: enthält *phb B* und *phb C* jeweils unter Kontrolle des 35S Promotors

Alle drei Konstrukte wurden zur Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabaccum* und *Solanum tuberosum* Pflanzen eingesetzt. Die

umfangreichsten Analysen wurden mit dem Arabidopsis System durchgeführt, welche daher hier auch ausführlicher dargestellt werden sollen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Chimäre Gene, welche das Thiolasegen konstitutiv exprimieren, führen zu einer deutlich verringerten (ca. Faktor 1000) Transformationsrate im Vergleich zu chimären Genen, die das Thiolasegen unter der Kontrolle des äthanolinduzierbaren Promotors enthalten.
- Die Verwendung des äthanolinduzierbaren Promotors führt zum Erhalt von phänotypisch normal erscheinenden Pflanzen
- Die Produktion von PHB kann durch Äthanolapplikation sehr gut kontrolliert werden (Induktion ca. um einen Faktor 10 – 100)
- Die maximale Menge an PHB, die nach 3wöchiger wiederholter Äthanolapplikation in Arabidopsisblättern produziert wurde, beträgt lediglich 2,7 mg/g Frischgewicht und liegt damit weit unterhalb der vorher beobachteten Werte.
- Wesentlicher dafür verantwortlicher Faktor könnte ein rasches Abschalten des Äthanolinduzierbaren Promotors sein (RNA-Blot Analysen legen diesen Befund nahe).

Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Pflanzenphänotyp und Transformierbarkeit wurden im Fall von Kartoffel und Tabak beobachtet, die Menge an maximal produzierten PHB war hier jedoch eher noch geringer (ca. 0,1 mg/g Frischgewicht).

Die Verwendung induzierbarer Promotoren zur Entkopplung von Pflanzenwachstum und PHB Produktion war damit zwar erfolgreich im Hinblick auf den Erhalt phänotypisch normaler Pflanzen, jedoch nicht ausreichend erfolgreich im Hinblick auf die Menge an produziertem PHB. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz im Rahmen des Projektes nicht mehr weiterverfolgt.

4.3.2. Untersuchungen zur knollenspezifischen Expression der drei *phb* Gene in *Solanum tuberosum*

Eine weitere Möglichkeit, die negativen Effekte der Produktion von PHB auf Pflanzenentwicklung und Pflanzenwuchs zu überkommen, ist die Produktion in Speicherorganen wie der Kartoffelknolle. Dazu wurden folgende Konstrukte hergestellt und in *Solanum tuberosum* transformiert:

- pBinB33 ABC: enthält alle drei *phb* Gene mit plastidärem Targetting, jeweils unter Kontrolle des Patatin B33 Promotors.
- pBinB33A: trägt die β -Ketothiolase (*phbA*) mit plastidärem Targetting und unter Kontrolle des Patatin B33 Promotors.

Es wurden in jedem Fall ca. 100 unabhängige transgene Kartoffelpflanzen erhalten und mittels GC-MS auf PHB Gehalt in den Knollen analysiert.

Diese Analysen ergaben einen für Nicht-Arabidopsis Spezies sehr hohen PHB Gehalt von bis zu 1 mg/g Frischgewicht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten das Vorliegen von PHB-Granula in den Amyloplasten. Als weitere Folge der Bildung des PHB zeigten die Knollen allerdings einen drastischen Phänotyp, charakterisiert durch eine erhöhte Lenticelldichte, spindelförmige Form sowie Sekundärauswüchse.

Da jedoch die Mengen an PHB die höchste in einer Nutzpflanze im Rahmen des Verbundprojektes erzielte Konzentration darstellte, wurden weitere Untersuchungen an diesen Pflanzen vorgenommen.

Dazu wurde zum einen die Stabilität des Phänotyps überprüft. Die drei besten Linien (alle mit ca. 0,8 – 1 mg PHB/g Frischgewicht Knolle) wurden amplifiziert und in einer großen Stückzahl (jeweils 20 Replikate) im Gewächshaus angebaut. Die Bestimmung des PHB Gehaltes ergab, dass dieser weitestgehend stabil blieb

(zwischen 0,5 mg and 1 mg/g Frischgewicht), dass jedoch die Knollenausbeute pro Pflanze um ca. 50% reduziert war.

In weiteren Untersuchungen wurde sodann versucht, den PHB Gehalt in der Knolle weiter zu steigern. Grundlage des experimentellen Ansatzes war dabei die Überlegung, dass durch Erhöhung des Substratflusses in Richtung PHB Vorläufer (i.e. AcetylCoA) bzw. Reduktion des Stärkegehaltes die Menge an PHB erhöht werden könnte. Es wurden daher die beiden folgenden chimären Gene in die besten PHB produzierenden Pflanzen eingeführt:

1. Einführung eines RNAi-Konstruktes zur Inhibierung der Stärkebiosynthese über die Blockierung der ADP-Glucosepyrophosphorylase
2. Expression einer cytosolischen Invertase zur Erhöhung des Flusses in Richtung Glycolyse, TCA Zyklus und oxidativer Pentosephosphateweg

In beiden Fällen wurden ca. 20 transgene Pflanzen erhalten und der PHB Gehalt in den Knollen untersucht. Dabei ergab sich jedoch keinerlei Steigerung des PHB Gehaltes über die in den Ausgangspflanzen vorhandenen Mengen hinaus.

Das Projekt musste an dieser Stelle auf Grund des Auslaufens der Projektmittel abgeschlossen werden.

5. Voraussichtlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse

Wie aus dem Bericht klar wird, war die Produktion von PHB/PHF in den verwendeten Pflanzensystemen entweder nur zu einer minimalen Menge möglich und damit ökonomisch nicht haltbar oder bei Erreichung größerer Konzentrationen mit einem negativen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung und damit letztlich Ertrag

gekoppelt. Somit ergibt sich kein direkter ökonomisch verwertbarer Nutzen aus diesen Untersuchungen.

6. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf diesem Gebiet an anderen Stellen

Im Berichtszeitraum ist dem Zuwendungsempfänger kein über die hier erhaltenen Ergebnisse verbessertes Ergebnis anderer Stellen bekannt geworden. Im Gegenteil, die Mengen an PHB in Kartoffelknollen sind nach wie vor von keiner anderen Stelle erreicht.

7. Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

Teile der hier beschriebenen Ergebnisse sind in zwei Publikationen zusammengefasst:

1. Bohmert K, Balbo I, Steinbuchel A, Tischendorf G, Willmitzer L
Constitutive expression of the beta-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants
PLANT PHYSIOLOGY 128 (4): 1282-1290 APR 2002
2. Bohmert K, Balbo I, Kopka J, Mittendorf V, Nawrath C, Poirier Y, Tischendorf G, Trethewey RN, Willmitzer L
Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight
PLANTA 211 (6): 841-845 NOV 2000

Kurzfassung des Schlussberichtes

Ziel des Projektes war die Erzeugung von transgenen Pflanzen zur Produktion von Polyhydroxybutyrat bzw. Polyhydroxyalkanoaten.

Zur Erreichung des Zieles wurden Gene der PHB Synthese, Gene zur PHF Synthese sowie PHB-bindende Proteine kodierende Gene unter Verwendung konstitutiver, organspezifischer als auch mittels Chemikalien induzierbarer Promotoren in *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana* sowie *Nicotiana tabacum* eingeführt. Als Zielort in der Zelle wurden die Amyloplasten/Chloroplasten durchgängig gewählt.

Es wurden im Rahmen des Projektes weit über tausend unabhängige transgene Pflanzen erzeugt und mittels eines schnellen GC-MS Verfahrens auf das Vorliegen von PHB bzw. PHF untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Produktion großer Mengen an PHB prinzipiell zumindest in *Arabidopsis thaliana* erreicht werden konnte (bis zu 40% vom Trockengewicht waren in Form von PHB enthalten). Dieses ging jedoch einher mit einer massiven Störung des Wachstums und der Entwicklung. Verschiedenste Versuche, die Produktion großer PHB Mengen von diesen unerwünschten Nebenwirkungen zu entkoppeln, scheiterten.

Geringere Mengen an PHB (ca. 1% vom Trockengewicht) konnten in der Knolle von transgenen Kartoffelpflanzen erzeugt werden mit geringeren Störungen der Entwicklung. Vor einer kommerziellen Nutzung ist jedoch eine Steigerung um mindestens einen Faktor 10 in der Konzentration noch notwendig.

Die Versuche zur Erzeugung von PHF verliefen erfolglos.