

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.