Schlussbericht:

Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen (Phase II)

im BML-Förderschwerpunkt 'Nachwachsende Rohstoffe'

Förderkennzeichen: 22009202

Laufzeit: 01.04.2005 - 30.11.2006

Koordinatorin:

Prof. Dr. Inge Broer

Verbundpartner:

Prof. Dr. Inge Broer Universität Rostock Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät Institut für Landnutzung / Agrobiotechnologie Justus-von-Liebig-Weg 8 18059 Rostock

Prof. Dr. Udo Kragl Universität Rostock Fachbereich Chemie Lehrstuhl für Techn. Chemie Albert Einstein Str. 3a 18059 Rostock

Prof. Dr. Wolfgang Lockau Institut für Biologie Biochemie der Pflanze Humboldt-Universität zu Berlin 10445 Berlin Prof. Dr. Elfriede Pistorius/ Prof. Dr. Dorothee Staiger Universität Bielefeld Fakultät für Biologie Zellphysiologie Postfach 100131 33501 Bielefeld

Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben Eberhard-Karls-Universität Tübingen Fakultät für Biologie Lehrstuhl für Mikrobiologie/Biotechnologie Auf der Morgenstelle 28 72076 Tübingen

Dr. Holger Junghans NORIKA-Kartoffelzucht-und Vermehrungs-GmbH Institutsplatz 1 18190 Groß-Lüsewitz

I. Kurzdarstellung

I.1 Aufgabenstellung

Eines der wesentlichen Ziele der Produktion nachwachsender Rohstoffe ist der Ersatz von Petrochemikalien. Ein möglicher Weg ist die Produktion von Biopolymeren in transgenen Pflanzen, die als biologisch abbaubare 'Kunststoffe' eingesetzt werden können. Polyaspartat stellt ein solches nicht toxisches Polymer dar, das bereits synthetisch hergestellt wird und breite Anwendung in industriellen, landwirtschaftlichen und medizinischen Bereichen findet. Die Produktion von Polyaspartat als Bestandteil des Speicherproteins Cyanophycin in transgenen Kartoffelknollen soll fossile Ressourcen schonen und eine kostengünstige und umweltfreundliche Alternative zu der chemischen Produktion darstellen.

Ziel des Projektes war es daher, Polyaspartat, als Bestandteil des Biopolymers Cyanophycin, in transgenen Kartoffelknollen in industriell verwertbaren Mengen herzustellen. Es sollte als Nebenprodukt bei der industriellen Verwertung von Stärkekartoffeln anfallen und daher äußerst kostengünstig sein. Im Vorlaufprojekt war es bereits gelungen, größere Mengen von löslichem Cyanophycin in transgenen Tabakpflanzen zu produzieren. Diese Synthese führte jedoch zu einer leichten Beeinträchtigung der Fitness der Pflanzen, der hier durch verschiedene Ansätze wie der Fokussierung auf bestimmte Speicherorgane und Optimierung der Stickstoffversorgung entgegengewirkt werden sollte.

I. 2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

I.2.1 Universität Rostock

AG Broer

Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Broer beschäftigt sich seit 1984 mit der Transformation von Tabak, Karotte, Raps, Kartoffel und verschiedenen Leguminosen sowie der genetischen und biochemischen Analyse der transgenen Pflanzen.

Eine der grundlegenden Arbeiten war die Konstruktion und Übertragung des Herbizidresistenz-Gens *pat* (Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase) aus *Streptomyces viridochromogenes* auf Tabak. Es schloss sich eine umfangreiche wissenschaftliche Begleitforschung mit folgenden Schwerpunkten an:

Analyse der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase und ihrer Wirkung auf den pflanzlichen Stoffwechsel

In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass das transgenkodierte Protein *in vitro* äußerst spezifisch reagiert. Der Metabolismus des Herbizids Phosphinothricin in transgenen und nicht transgenen Pflanzen konnte aufgeklärt werden (Dröge *et al.* 1992; Dröge-Laser *et al.* 1994; Vinnemeier *et al.* 1995).

<u>Einfluss von abiotischem Stress auf die Stabilität der Transgenexpression in Pflanzen</u> <u>mit verschiedenen Fremdgenen sowie phosphinothricinresistenten</u> <u>Suspensionskulturen</u>

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität verschiedener Transgene in Abhängigkeit von ihrer Sequenz (möglicherweise vom GC-Gehalt) oder auch ihrem Integrationsort im pflanzlichen Genom durch moderaten Stress reversibel, aber drastisch, reduziert wird. Es konnten DNA-Elemente isoliert werden, die die Aktivität positiv oder auch negativ regulieren (Walter *et al.* 1992; Broer *et al.* 1992; Broer 1996; Köhne *et al.* 1996; Neumann *et al.* 1996; Neumann *et al.* 1997; Köhne *et al.* 1998).

Etablierung eines sensitiven Systems zum Nachweis der Expression des *Photinus pyralis*-Luziferase-Gens in transgenen Bakterien und Pflanzen

Es wurde ein System entwickelt, um die Expression der Luziferase-Gens aus *Photinus pyralis* in Bakterien und Pflanzen genauer als bisher möglich zu quantifizieren (Quandt *et al.* 1992)

Entwicklung eines neuen Systems zum induzierten Zelltod in transgenen Pflanzen

Es wurde ein System zum gewebespezifisch induzierbaren Zelltod in transgenen Pflanzen entwickelt. Die Expression einer bakteriellen Deacetylase in Kombination mit der Applikation des nicht-phytotoxischen *N*-Acetyl-phosphinothricins führt in transgenen Pflanzen zum Absterben des Gewebes, in dem die Deacetylase aktiv ist. Pflanzen, die die Deacetylase konstitutiv exprimieren, sterben in Gegenwart des Induktors ab, während Pflanzen, die keine Deacetylase exprimieren, die Behandlung unbeeinträchtigt überstehen. Das System wurde sowohl zur Induktion der Pollensterilität bei der Produktion von Hybridsaatgut (Kriete *et al.* 1996) als auch zur wissenschaftlichen Analyse von Gewebefunktionen eingesetzt (Quandt *et al.* 1993).

Expression von VP60 in transgenen Tabak

Der Kodierbereich des VP60 Protein fusioniert mit dem konstitutiven CaMV35 S Promotor wurde bereits in Protoplasten und in ganzen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* exprimiert. Lyophylisate der transgenen Pflanzen, die eine starke Expression auf RNA Ebene zeigen, zeigten in Analysen durch die BFAV eine schwache VP60-Expression.

AG Kragl

Die Arbeitsgruppe von Prof. Kragl (FB Chemie / Technische Chemie) verfügt über langjährige Erfahrungen in der Aufreinigung von Proteinen und ihrem Einsatz als Biokatalysatoren für die Synthese von Feinchemikalien. Für die Isolierung werden vor allem Methoden verwendet, die auch im größeren Maßstab anwendbar sind, wie zum Beispiel Ultrafiltration oder Extraktion mit wässrigen Zwei-Phasen-Systemen. Die notwendige Ausstattung für Versuche bis in den Technikumsmaßstab (Mühlen, Zentrifugen, Filtrationsanlage, Extraktion und Rektifikation) stehen zur Verfügung. Im Anschluss an die Aufarbeitung besteht Dank einer modernen und leistungsfähigen Analytik (LC, GC, LC-MS, GC-MS, Ionenchromatographie) die Möglichkeit, die Reinheit der isolierten Produkte direkt zu untersuchen.

AG Lockau

Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit 1997 mit dem Metabolismus von Cyanophycin (Multi-L-arginyl-poly-L-aspartat), zuerst ausschließlich bei Cyanobakterien. Im Zuge der Untersuchungen konnten wir die Enzyme der Biosynthese (Cyanophycin-Synthetase) und des Abbaus (Cyanophycinase und Isoaspartyl-Dipeptidase) des Polymers reinigen, molekular klonieren und heterolog in *Eschericha coli* exprimieren (Ziegler *et al.* 1998; Richter *et al.* 1999; Hejazi *et al.* 2002). Die rekombinanten Synthetasen ermöglichten eine Analyse des Reaktionsmechanismus (Berg *et al.* 2000), die noch nicht völlig abgeschlossen ist. Es wurde gefunden, dass die Akkumulation von Cyanophycin in Cyanobakterien offenbar nicht über die Aktivität der Synthetase sondern über das Angebot an Arginin reguliert wird (Maheswaran *et al.* 2006).

Im Jahr 2002 wurden dann von der Arbeitsgruppe Steinbüchel (Krehenbrink *et al.* 2002) und uns (Ziegler *et al.* 2002) entsprechende Enzyme in Eubakterien beschrieben. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde entdeckt, dass Cyanophycin auch in einer wasserlöslichen Form vorkommt. Dieser Befund ist auch für die Analyse transgener Pflanzen relevant.

Mit den rekombinanten, abbauenden Enzymen Cyanophycinase und Isoaspartyl-Dipeptidase konnte ein optisch-enzymatisches Nachweisverfahren für Cyanophycin etabliert werden (Neumann *et al.* 2005). Das Verfahren ermöglicht eine spezifische und genaue Quantifizierung der wasserlöslichen und der wasserunlöslichen Form des Polymers.

I.2.2 Universität Bielefeld

AG Staiger/Pistorius

In dem Teilprojekt "Untersuchungen zum Nachweis und zur Optimierung der Cyanophycin-Produktion in transgenen Pflanzen" sollten die in der AG Broer konstruierten transgenen Pflanzen-Linien mit verschiedenen chimären Cyanophycin-Synthetase-Genen sowie Nachkommen aus Kreuzungen dieser Linien mit transgenen Pflanzen, die in verschiedenen Parametern optimiert sind, ultrastrukturell und immunocytochemisch untersucht werden. Diese Analysen tragen zur Identifizierung von transgenen Linien bei, die in der Lage sind, Cyanophycin zu synthetisieren. Ferner sollen damit Aussagen über die Menge, die Struktur und die Lokalisierung von Cyanophycin in den verschiedenen subzellulären Kompartimenten der Blätter bzw. der Speicherorgane der transgenen Pflanzen gemacht werden. In der Arbeitsgruppe liegen ausführliche Erfahrungen mit lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Techniken vor. Außerdem verfügen wir über Kenntnisse zum immunocytochemischen Nachweis von Protein in verschiedenen Geweben der Pflanze, und es liegt ein Antiserum gegen Cyanophycin, das aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 isoliert wurde, vor. Dieses Antiserum ist gut zur Detektion von Cyanophycin in transgenen Pflanzen geeignet.

I.2.3 Universität Tübingen

AG Wohlleben

Die Arbeiten des Antragstellers, auf dem Gebiet der Streptomyceten-Genetik und des Stoffwechsels, sind in über 100 Publikationen und mehr als 25 Patentanmeldungen dokumentiert. Die im direkten Zusammenhang zu dem vorliegenden Projektantrag stehenden Arbeiten sind im Folgenden, unter Angabe der entsprechenden Veröffentlichungen und Referenzen, kurz zusammengefasst.

Vektor-Entwicklung

Mit der Entwicklung von genetischen Werkzeugen in Streptomyceten, z. B. den vielfach eingesetzten Temperatur-sensitiven pGM-Vektoren (1) und der nichtreplikativen, einzelsträngigen *E. coli*-Vektoren (1), wurden wichtige Grundlagen zur genetischen Analyse der GS-Gene in Streptomyceten geschaffen.

Analyse der Antibiotikum-Biosynthese des GS-Inhibitors Phosphinothricin

Die Biosynthese des GS-Inhibitors und Herbizides Phosphinothricin-Tripeptid (PTT) in *S. viridochromogenes* wurde untersucht (2-11). Dabei wurde in Zusammenarbeit mit der AG Broer das PTT-Resistenzgen (*pat*) kloniert und in Pflanzen eingebracht, denen es eine Resistenz gegen das Herbizid verleiht.

Untersuchung des N-Metabolismus in Streptomyceten

Die Untersuchungen zum Stickstoffstoffwechsel in Streptomyceten in der Arbeitsgruppe des Antragstellers begannen mit dem Auffinden von zwei unterschiedlichen, getrennt regulierten Glutaminsynthetasen in *S. viridochromogenes* (12-14): GSI (kodiert von *glnA*) repräsentiert den universalen bakteriellen GS-Typ. Hingegen gehört die anders regulierte GSII (kodiert von *glnII*) zum eukaryotischen GS-Typ. Auf der Ebene der Primärstruktur zeigen beide GS-Typen eine Ähnlichkeit von lediglich 15%, die sich auf fünf hochkonservierte, alle im Bereich des aktiven Zentrums lokalisierten Domänen beschränkt. Entsprechend bestehen strukturelle, kinetische und regulatorische Unterschieden zwischen den beiden GS-Typen.

Um die Funktion der unterschiedlichen GS-Proteine in Streptomyceten unabhängig von der PTT-Biosynthese in *S. viridochromogenes* zu untersuchen, werden die Arbeiten zum N-Metabolismus in Streptomyceten seit 1996 in dem Modell-Streptomyceten *S. coelicolor* weitergeführt (15-19). Neben der Isolierung von *glnA* und *glnII* in *S. coelicolor* wurden drei weitere potentielle GS-Strukturgene (*glnA2*, *glnA3*, *glnA4*) kloniert und sechs Gene isoliert, die in die transkriptionelle und posttranslationale GS-Regulation involviert sind. Die bisher mit den verschiedenen *S. coelicolor*-Stickstoffgenen durchgeführten Mutagenesestudien und die biochemischen Charakterisierungen der entsprechenden Mutanten haben erstmals grundlegende Einblicke in die Funktion der unterschiedlichen GS-Proteine und die Regulation des primären Stickstoff-Metabolismus dieses Antibiotika-produzierenden Bakteriums geliefert.

I.2.4 NORIKA

Die NORIKA - Nordring Kartoffelzucht- und Vermehrungs-GmbH Groß Lüsewitz - wurde 1990 am traditionsreichen Standort für Kartoffelforschung – Groß Lüsewitz gegründet und repräsentiert durch seinen Ursprung – dem Kartoffelforschungsinstitut (gegr. 1949)- eine über 50 Jahre währende Kartoffelzuchttradition.

Die NORIKA ist ein modernes Kartoffelzuchtunternehmen, das sowohl konventionelle Verfahren als auch neueste Biotechnologien in der Neu- und Erhaltungszucht einsetzt.

Hauptaugenmerk der Züchtung liegt bei der Entwicklung von Sorten, die Verwendung in der Kartoffelveredlungsindustrie finden können. Das Sortiment der NORIKA umfasst gegenwärtig 37 Kartoffelsorten. Neben Speisekartoffelsorten enthält es Sorten, die Verwendung finden in der Chipindustrie, der Pommes frites Herstellung, der Produktion von Trockenkartoffelprodukten und der Stärkeindustrie.

Zur Sicherung der Pflanzgutqualität tragen unter anderem die firmeninterne *in-vitro*-Vermehrung von Kartoffelpflanzen und die Virusuntersuchung mittels ELISA bei. Die Mitarbeiter der NORIKA verfügen über langjährige Erfahrung im Bereich Zellkultur der Kartoffel sowie in der Anzucht und Vermehrung von Kartoffelpflanzen im Gewächshaus und im Freiland.

Die NORIKA betreibt Labore, Anzuchträume und Gewächshausfläche die dem Sicherheitsstandard S1 der Gentechniksicherheitsverordnung entsprechen und für die Arbeit mit transgenen Pflanzen zugelassen sind. Damit sind neben den personellen Voraussetzungen auch die technischen Bedingungen für eine erfolgreiche Umsetzung des Forschungsvorhabens gegeben.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Folgenden werden die Arbeiten dem Antrag entsprechend (Planung) in grauer Balkenform und die im Projekt durchgeführte Arbeiten im Bezug zum Zeitverlauf aufgelistet: (Begründungen für nicht planmäßige Durchführung von Arbeiten sind den jeweiligen Ergebnisteilen siehe II.1 zu entnehmen).

I.3.1 Universität Rostock



Aufgaben der Universität Rostock

Gemeinsame Aufgaben der Universität Rostock und der Fa. NORIKA

Zeitverlauf der Arbeiten

- A Analyse der knollenspezifischen Expression des Cyanophycin-Synthetasegens *cph*A_{Te} aus *T. elongatus*
- B1 Kreuzung von Cyanophycin-produzierenden Pflanzen mit Pflanzen, die Gene aus verschiedenen Aminosäurebiosynthesewegen exprimieren
- B2 Fusion des Cyanophycin-Synthetasegens mit verschiedenen Transitpeptiden für einen Transfer der Synthetase in den Chloroplasten
- B3 Optimierung des Cyanophycin-Synthetasegens durch ein synthetisches Gen
- B4 Analyse der Funktion von Genen in Pflanzen, die in Bakterien zur Produktion von löslichen Cyanophycin führen
- B5 Koordination der Kultivierung transgener Pflanzen im Gewächshaus und Freiland zur Analyse der Cyanophycin-Produktion
- B6 Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Pflanzen

I.3.2 Universität Bielefeld



Aufgaben der Universität Bielefeld Zeitverlauf der Arbeiten

- A.1 Untersuchungen aller in der AG Broer konstruierten Pflanzen auf das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von Cyanophycin.
- A.2 Elektronenmikroskopische Analysen, um Aussagen über die Struktur des synthetisierten Cyanophycin machen zu können und um zu untersuchen, in welchen Kompartimenten der Pflanzenzelle Cyanophycin vorliegt.
- A.3 Lichtmikroskopische Analysen, um Aussagen über die Lokalisation und die Menge des Cyanophycins in verschiedenen Organen und Geweben der Pflanze machen zu können.

|--|

Versuch	1.Jahr	2.Jahr	3.Jahr	
A.1				
A.2				
A.3		=		
В				
		•••••		
Aufgaben der Universität Tübingen				

- Zeitverlauf der Arbeiten
- A Analyse der transgenen Pflanzen
- A.1 HPLC-Untersuchungen zur Stoffwechselkontrolle in transgenen Pflanzen

- A.2 Ermittlung der GS-Aktivität in transgenen Pflanzen
- A.3 Immunologischer Nachweis
- B Konstruktion von AS-Biosynthese-Vektoren zur Transformation und Expression in Pflanzen

1.3.4 NORIKA

Die Umsetzung der Projektarbeiten erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Universität Rostock. Dabei waren im Wesentlichen zwei Arbeitsfelder zu unterscheiden. Einerseits die unter B1 bis B5 genannten molekularbiologischen und biochemischen Arbeiten (Siehe Abbildung Uni Rostock) sowie andererseits die Kultivierung des Versuchsmaterials unter verschiedenen Bedingungen. Die unter dem Schwerpunkt Kultivierung und Evaluierung des Pflanzenmaterials vorgesehenen Arbeitsscherpunkte sind in den Arbeitskapiteln D.1 bis D.3 zusammengefasst.

Versuch	1. Jahr	2. Jahr	3. Jahr	
D.1				
D.2				
D.3				

Aufgaben der Fa. NORIKA Zeitverlauf der Arbeiten

- D.1 In vitro Kultivierung und Regeneration
- D.2 Gewinnung von Blatt- und Knollenmaterial für molekularbiologische Analyse
- D.3 Evaluierung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Fitness der transgenen Pflanzen und die Produktion von Cyanophycin

Zu den geplanten Arbeiten zählte:

D.1 In vitro Kultivierung und Regeneration

Die Darstellung der Arbeiten zur Transformation und Regeneration erfolgt im Abschnitt II.1.1 erzielte Ergebnisse der Universität Rostock, A Analyse der knollenspezifischen Expression des Cyanophycin-Synthetasegens *cph*A_{Te} aus Thermos*ynechococcus elongatus.* Die in diesem Projektabschnitt erstellten transgenen Linien wurden für weitere Pflanzenerhaltung und Vermehrung in ein in vitro Depot überführt.

Etablierung eines in vitro Depots:

Sorte	Bezeichnung/Linie	Anzahl je Linie
Albatros	wt	5
Albatros	LH 9000/19	5
Albatros	B33t35S/2	5
Albatros	FNR- <i>cph</i> A _{Te} /9, 42	5
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te} /9, 10, 12, 23, 35	5
Albatros	B33- <i>cph</i> A _{Te} /4, 6, 12, 21, 27, 31, 60	5
Albatros	35S /205	5
Summe		90

Dieses *in vitro* Depot war für den gesamten Projektverlauf zu unterhalten und als Quelle für die Vermehrung von Pflanzen sowie die Knollenproduktion zu nutzen.

D.2 Gewinnung von Blatt- und Knollenmaterial für molekularbiologische Analyse

Die Kultivierung von Sorten/Linien im Gewächshaus erfolgte in unterschiedlichen Projektphasen mit unterschiedlicher Zielstellung. Sowohl Blatt als auch Knollenmaterial wurde für weiterführende Analysen produziert. Voraussetzung für die Gewächshausanzucht war jeweils die vorangehende in vitro Vermehrung des gewünschten Versuchsmaterials. Die Nutzung der unterschiedlichen Gewebe und Knollenproben ist unter den betreffenden Kapiteln des Berichtes der Projektteilnehmer dargestellt.

Gewächshausanzucht:

Die Anzucht von Pflanzenmaterial erfolgte im bisherigen Vorhabensverlauf in zwei Durchgängen. Beide Anzuchtzyklen dienten primär der Produktion von Untersuchungsmaterial und der Bewertung des Phänotyps von transgenen Linien.

Sorte	Bezeichnung/Linie	Anzahl Pflanzen
Albatros	wt	15
Albatros	LH 9000	15
Albatros	PsbY <i>cph</i> A _{Te} /10	15
Albatros	PsbY cphA _{Te} /12	15
Albatros	PsbY <i>cph</i> A _{Te} /23	15
Summe		75

1. Kultivierungszyklus-Produktion von Knollenmaterial für Analysezwecke

2. Kultivierungszyklus-Produktion von Knollenmaterial für Analysezwecke sowie die Evaluierung von Pflanzen und Knollenfitness

Sorte	Bezeichnung/Linie	Anzahl Pflanzen
Albatros	WT1	60
Albatros	Tubt 35S /3	60
Albatros	35S /205	60
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te} /10	40
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te} 12	40
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te} /23	40
Summe		300

Im Laufe des Projektes wurden zwischen den transgenen Linien Unterschiede bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber Pathogenen ermittelt, begleitet von nekrotischen Änderungen des Knollengewebes. Diese Beobachtung erforderte zusätzliche begleitende Experimente. Deshalb wurden, neben den Untersuchungen zum Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Fitness der Pflanzen, Versuche zur Bestimmung der Pathogenanfälligkeit der transgenen Pflanzen durchgeführt.

D.3 Evaluierung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Fitness der transgenen Pflanzen und die Produktion von Cyanophycin

Im Hinblick auf eine Pflanzguterzeugung ist es zwingend notwendig, das die transgenen Linien keine schlechteren Lagerungseigenschaften besitzen, bedingt durch den genetischen Eingriff, als der unveränderte Wildtyp der Sorte Albatros. Deshalb wurden folgende Tests durchgeführt:

D. 3.1.Test einiger transgener Linien auf erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen

Der Test beinhaltete eine Erd-Kultivierung von 5 transgenen Linien und dem Wildtyp (WT). Dabei wurden die Versuchsglieder einmal in steriler Erde und zum anderen in unsteriler, mikrobiell belasteter Erde im Gewächshaus der NORIKA angebaut.

Sorte	Bezeichnung	Linien	Anzahl Pfl. i	m GWH
			Sterile Erde	Unsterile Erde
Albatros	WT1	-	10	10
Albatros	B33t35S	3	10	10
Albatros	35S	205	10	10
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{⊺e}	10	10	10
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{⊺e}	12	10	10
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	23	10	10
Summe			60	60

Übersicht zu den getesteten Sorten und Linien:

D.3.2. Bewertung der Pathogenanfälligkeit der Knollen des 2. Kultivierungszykluses

Die während des 2. Kultivierungszykluses produzierten Knollen wurden einer intensiven Bonitur während der Ernte und Knollenlagerung unterzogen.

D.3.3. Beginn der Erzeugung von Mikroknollen bei folgenden Linien zur Erforschung der Ursache von nekrotischer Knollengewebeänderung

Für diese Untersuchungen wurden beispielhaft die Linien Albatros WT, Albatros PsbY-*cph*A_{Te} Linien 12 und 23, Albatros 35S Linie 205 herangezogen.

B.5. Koordination der Kultivierung transgener Pflanzen im Gewächshaus und Freiland zur Analyse der Cyanophycin-Produktion

Die Planung und Durchführung der Gewächshaus- und Freilandversuche wurde von NORIKA sachkundig begleitet und durch erforderliche Pflanz- und Erntetechnik abgesichert.

I. 4 wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die pflanzliche Biotechnologie kann nicht nur zur Ertragssteigerung und –stabilität in transgenen Kulturpflanzen beitragen, sondern auch industriell nutzbare Rohstoffe liefern. Im Gegensatz zu anderen Produktionsverfahren stellt die Produktion dieser Rohstoffe im Bioreaktor Pflanze eine umweltfreundliche, CO₂-neutrale und wirtschaftliche Alternative dar. Pflanzen bieten sich für derartige Versuche an, weil sie die natürlichen Ressourcen des Bodens und des Sonnenlichts nutzen, während beim Einsatz von Bakterien oder Zellkulturen kostenaufwendige Fermenter notwendig wären.

Die umweltfreundliche Produktion von Wertstoffen gewinnt besonders vor dem Hintergrund der verknappenden Ölreserven und der bedrohlichen CO₂-Belastung unsere Atmosphäre immer größere Bedeutung. Bisher ist die Produktion von Ölen, Stärke oder Nährstoffen durch die hohen Kosten der Aufreinigung und den geringen Anteil des Wertstoffs an der Biomasse begrenzt. Mit Hilfe der Biotechnologie, entweder durch moderne Züchtungsverfahren aber auch durch die Gentechnik, können die Anteile an spezifischen Wertstoffen in der Pflanze erhöht, aber auch die Produktion völlig neuer Stoffe induziert werden.

Bisher ist eine Reihe von erfolgreichen Produktionen von Wertstoffen in transgenen Pflanzen publiziert. So können z. B. Kartoffeln erzeugt werden, in denen der Gehalt an Amylose mittels Antisense-Strategie auf etwa ein Fünftel des ursprünglichen Gehalts gesenkt wurde (Kull B. et al. 1995). Aus diesen Kartoffeln kann das als Bindemittel und Kleister eingesetzte Amylopektin leichter aufgereinigt werden. Ein weiteres Beispiel ist die Erhöhung des Gehalts an Laurinsäure in Rapssamen von 0,1 % auf bis zu 40% durch das Einbringen eines zusätzlichen Enzyms aus der Fettsäurebiosynthese (Murphy 1996). Auch für eine Produktion pflanzenfremder Rohstoffe in transgenen Pflanzen gibt es erste Beispiele. So publizierten (Scheller et al. 2001) über die Produktion von Spinnenseide in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen. Ein bekanntes Beispiel ist auch die Produktion biologisch abbaubarer und daher umweltfreundlicher "Kunststoffe" ("Bioplastik") in transgenen Pflanzen: Das Bakterium Ralstonia *eutropha* produziert einen Polyester (Polyhydroxybuttersäure, PHB) als Kohlenstoffspeicher. PHB hat ähnliche Eigenschaften wie die Thermoplasten Polyethylen oder Polypropylen, ist im Gegensatz zu diesen aber vollständig biologisch abbaubar (Jendrossek et al. 1996). Aus Ralstonia eutropha wurden zwei Gene identifiziert, deren Expression abzweigend vom Primärstoffwechsel (über Acetyl-CoA) zur Synthese von PHB führt

(Steinbüchel et al. 1992). Damit war eine Expression des PHB-Biosynthesewegs in transgenen Organismen möglich. Der PHB-Biosyntheseweg wurde bereits in verschiedenen transgenen Pflanzen exprimiert. Eine Arbeitsgruppe aus Stanford, die drei Gene aus R. eutropha in Arabidopsis thaliana eingebracht hat, verglich die Effizienz der Synthese von PHB im Cytoplasma mit der Synthese-Effizienz im Chloroplasten (Nawrath et al. 1994). Die Synthese im Chloroplasten wurde durch eine Fusion der notwendigen transgenkodierten Enzyme mit einem Signalpeptid für den Chloroplastentransfer erreicht. Es wurde deutlich, dass sich die Synthese von PHB im Cytoplasma nachteilig auf das Wachstum und die Fertilität der transgenen Pflanzen auswirkte (Poirier et al. 1992; Steinbüchel & Fuchtenbusch 1998), während die Synthese in den Plastiden keinen offensichtlichen negativen Einfluss hatte. In den Plastiden wurden nach Nawrath et al. (1994) bis zu 14% des Trockengewichts an PHB akkumuliert (Nawrath et al. 1994), dessen die chemische Struktur mit dem in Bakterien produzierten PHB identisch ist (Poirier et al. 1995). Eine effiziente und umweltfreundliche Extraktionsmethode ist bislang noch nicht erarbeitet worden (Steinbüchel & Fuchtenbusch 1998).

Während PHB im wesentliche für feste Biokunststoffe Verwendung findet, wird das Polymer Polyaspartat als flüssige Substanz eingesetzt und ergänzt so den Anwendungsbereich von PHB. Polyaspartat lässt sich aus einem Speicherprotein der Cyanobakterien, dem Cyanophycin, gewinnen. Cyanobakterien, aus deren Gruppe die Vorläufer der pflanzlichen Chloroplasten stammen, bilden über nicht-ribosomale Proteinsynthese das einfach strukturierte Speicherpeptid Cyanophycin (Simon & Weathers 1976; Allen 1984; Simon 1987). Dazu wird im Gegensatz zum PHB, wo drei Gene notwendig sind, nur ein Gen, das für eine Cyanophycin-Synthetase kodiert, benötigt. Unterschiedliche Cyanophycin-Synthetase-Gene wurden bereits aus Cyanobakterien isoliert, das Enzym wurde charakterisiert (Ziegler *et al.* 1998; Berg *et al.* 2000). Das nicht-wasserlösliche Cyanophycin, das bis zu 16% der bakteriellen Trockenmasse ausmachen kann, wird von den Cyanobakterien in sogenannten Cyanophycin-Granula gespeichert. Es ist ein Polymer aus den beiden Aminosäuren (AS) L-Aspartat und L-Arginin (Multi-L-arginyl-poly-(L-aspartat)), dessen molare Masse zwischen 25 und 125 kDa liegt.

Abb.1 Schematische Struktur von Cyanophycin. Arg: Arginin, Asp: Aspartat

Durch Hydrolyse von Cyanophycin kann die Polyaspartatkette isoliert werden. Damit entsteht ein vollständig biologisch abbaubares Polymer. Polyaspartat ist ein nicht toxisches Polycarboxylat, das eine Vielzahl von industriellen und landwirtschaftlichen Anwendungen hat (Schwamborn 1996; Oppermann-Sanio *et al.* 1999). Unter anderem kann es als Ersatzstoff für nicht-biologisch abbaubare Polyacrylate in Detergentien oder in der Ölproduktion oder als Dispergiermittel in Wasch- und Reinigungsmitteln eingesetzt werden. Chemisch synthetisiertes und daher nicht vollständig biologisch abbaubares Polyaspartat wird von der Bayer AG in einem Maßstab von 3000 Tonnen pro Jahr (2003) produziert.

In der Landwirtschaft fördert die Applikation von Polyaspartat die Nährstoffaufnahme und damit den Ertrag und die Ausnutzung der Düngemittel. Die Donlar Corporation (USA) erhielt 1996 für dieses Produkt den von Präsident Clinton gestifteten 'Green Chemistry Challenge Award'.

Die Produktion von Wertstoffen im Bioreaktor Pflanze unterliegt aber noch immer einer Reihe von Problemen:

- 1. Ihr Anteil an der Trockenmasse muss durch eine Kompartimentierung beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum oder auch im Chloroplasten gesteigert werden.
- 2. Die Expression der Transgene unterliegt pflanzeneigenen Regulationsmechanismen und schwankt daher bedingt durch Änderungen in der Umwelt oder dem physiologischen Status der Pflanze sehr stark.
- 3. Verfahren zur Isolation der Wertstoffe sind häufig nicht vorhanden.
- 4. Es existieren häufig keine etablierten Produktionsketten zur Verwertung der Pflanzen.

Durch die gewebespezifische Expression der Cyanophycin-Synthetase in der Knolle von stärkeproduzierenden Industriekartoffeln und ihren Transfer in die Plastiden können die Probleme eins und vier gelöst werden. Die Schwankung der Genexpression ist häufig abhängig von zufällig in der bakteriellen Sequenz anwesenden DNA Elementen, die das pflanzliche Regulationssystem erkennt. Solche Sequenzen konnte bereits gefunden werden (Broer 1996; Neumann *et al.* 1997; Köhne *et al.* 1998) und sollen zur Stabilisierung der Genexpression im Freiland eingesetzt werden. Auch pflanzeneigene Sequenzen, die die Expression stabilisieren wurden bereits identifiziert (Schlogelhofer *et al.* 2002).

Die Isolation von Cyanophycin sollte sich als weniger problematisch erweisen. Durch entsprechende Filtrierungsschritte sollte sich Cyanophycin aus der Kartoffel während des industriellen Verarbeitungsprozesses bei der Stärkegewinnung als Abfallprodukt isolieren lassen. Es dient dann als billiger Rohstoff zur Produktion von Polyaspartat. Durch Hydrolyse können die Argininreste abgespalten werden. Resultat sind zwei kommerziell verwertbare Rohstoffe: Arginin und Polyaspartat. Damit sollten sich im Fall der biologischen Produktion von Polyaspartat alle genannten Probleme relativ unproblematisch und effektiv lösen lassen.

Der Entzug spezifischer AS aus dem Stoffwechsel der Pflanze sollte eine gesteigerte AS-Synthese bewirken. Glutamin ist eine zentrale Ausgangssubstanz für Aminosäure-Synthese, -Transport und -Speicherung. Besonders bei der Speicherung von AS wie Arginin und Aspartat in Cyanophycin könnte es also zu Stickstoff- bzw. Glutaminmangel kommen. Die gleichzeitige Expression eines bakteriellen, nicht pflanzenregulierten Aminosäure-Biosynthesegens soll deshalb diesen Mangel kompensieren und sowohl den Aminosäurefluss zur Cyanophycin-Synthese aufrechterhalten als auch ein optimales Wachstum der Pflanze ohne Stickstoff-Limitierung ermöglichen. Geeignete bakterielle Gene für solche Experimente stehen in Form von GS-Genen und *argJ* aus verschiedenen Organismen zur Verfügung. Hierbei ist von besonderem Vorteil, dass die bakteriellen Gene in ihren natürlichen Wirten anderer Regulation unterliegen (Fink *et al.* 1999; Weissschuh *et al.* 2000; Fink *et al.* 2002; Hesketh *et al.* 2002) als die entsprechenden Gene in Pflanzen, so dass die Konstruktion von Transgenen mit deregulierter GS-Aktivität erleichtert wird.

In dem vorangegangenen Projekt konnte gezeigt werden, dass die Expression einer Cyanobakterium Cyanophycin-Synthetase aus dem Thermosynechococcus elongatus BP-1 in transgenen Tabakpflanzen im Gegensatz zu der bakteriellen Produktion zur Bildung größerer Mengen von löslichem Cyanophycin führt. Das lösliche Cyanophycin unterscheidet sich von dem unlöslichen nur in diesem Punkt, es enthält ebenfalls eine Polyaspartatkette mit anhängenden Argininresten und wird ebenfalls durch die Cyanophycinase abgebaut. Eine vergleichbare Substanz wird auch von Bakterien hergestellt. Ein Gen aus Desulfobacterium hafniense, dessen Expression in den Bakterien zur Produktion von löslichem Cyanophycin führt, konnte in der AG Lockau bereits isoliert werden. Nach bisherigen Erkenntnissen sollte das lösliche Cyanophycin ebenso gut zur Produktion von Polyaspartat einsetzbar sein wie die in Cyanobakterien hergestellte unlösliche Substanz, ihre Isolation sollte sich aber wesentlich einfacher gestalten. Ziel des vorliegenden Projekts ist die Optimierung der Produktion des löslichen Cyanophycins in transgenen Kartoffelknollen. Das Projekt soll in einem Verbund mit den oben bezeichneten Gruppen durchgeführt werden.

Literatur

- Allen, M. M., 1984 Cyanobacterial Cell Inclusions. *Annual Review of Microbiology* **38**: 1-25.
- Berg, H., K. Ziegler, K. Piotukh, K. Baier, W. Lockau *et al.* 2000 Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin) - Mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers. *European Journal of Biochemistry* **267**: 5561-5570.
- Broer, I., 1996 Stress inactivation of foreign genes in transgenic plants. *Field Crops Research* **45**: 19-25.
- Broer, I., W. Dröge, D. Hillemann, K. Neumann, C. Walter et al. 1992 Instability of herbicide resistance in transgenic suspension cultures and plants. Proceedings of the 2nd International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms.(eds.Casper and Landsman) 230-239.

- Conrad, U., 2005 Polymers from plants to develop biodegradable plastics. *Trends in Plant Science* **10**: 511-512.
- Diehn, S. H., W. L. Chiu, E. J. De Rocher, and P. J. Green, 1998 Premature polyadenylation at multiple sites within a Bacillus thuringiensis toxin genecoding region. *Plant Physiology* **117**: 1433-1443.
- Dröge, W., I. Broer, and A. Puhler, 1992 Transgenic Plants Containing the Phosphinothricin-N-Acetyltransferase Gene Metabolize the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) Differently from Untransformed Plants. *Planta* **187**: 142-151.
- Dröge-Laser, W., U. Siemeling, A. Pühler, and I. Broer, 1994 The Metabolites of the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) - Identification, Stability, and Mobility in Transgenic, Herbicide-Resistant, and Untransformed Plants. *Plant Physiology* **105**: 159-166.
- Fink, D., D. Falke, W. Wohlleben, and A. Engels, 1999 Nitrogen metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2): modification of glutamine synthetase I by an adenylyltransferase. *Microbiology-Sgm* 145: 2313-2322.
- Fink, D., N. Weissschuh, J. Reuther, W. Wohlleben, and A. Engels, 2002 Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2). *Molecular Microbiology* 46: 331-347.
- Fox, J. L., 2006 Turning plants into protein factories. *Nature Biotechnology* **24**: 1191-1193.
- Haffani, Y. Z., S. Overney, S. Yelle, G. Bellemare, and F. J. Belzile, 2000 Premature polyadenylation contributes to the poor expression of the Bacillus thuringiensis cry3Ca1 gene in transgenic potato plants. *Molecular and General Genetics* 264: 82-88.
- Hejazi, M., K. Piotukh, J. Mattow, R. Deutzmann, R. Volkmer-Engert *et al.* 2002 Isoaspartyl dipeptidase activity of plant-type asparaginases. *Biochemical Journal* **364**: 129-136.
- Hesketh, A., D. Fink, B. Gust, H. U. Rexer, B. Scheel *et al.* 2002 The GlnD and GlnK homologues of Streptomyces coelicolor A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Molecular Microbiology* **46**: 319-330.
- Howard, J. A., 2005 Commercialization of biopharmaceutical and bioindustrial proteins from plants. *Crop Science* **45**: 468-472.
- Howard, J. A., and E. Hood, 2005 Bioindustrial and biopharmaceutical products produced in plants. *Advances in Agronomy, Vol 85* **85**: 91-124.
- Jendrossek, D., A. Schirmer, and H. G. Schlegel, 1996 Biodegradation polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**: 451-463.

- Köhne, S., K. Neumann, W. Dröge-Laser, and I. Broer, 1996 Quantification of a heat treatment-induced transgene silencing using single cells of *Nicotiana tabacum. Biosafty: Stability of DNA, Horizontal gene transfer and expression of transgenes* 239-248.
- Köhne, S., K. Neumann, A. Pühler, and I. Broer, 1998 The heat-treatment induced reduction of the pat gene encoded herbicide resistance in Nicotiana tabacum is influenced by the transgene sequence. *Journal of Plant Physiology* **153**: 631-642.
- Krehenbrink, M., F. B. Oppermann-Sanio, and A. Steinbuchel, 2002 Evaluation of non-cyanobacterial genome sequences for occurrence of genes encoding proteins homologous to cyanophycin synthetase and cloning of an active cyanophycin synthetase from Acinetobacter sp strain DSM 587. Archives of Microbiology 177: 371-380.
- Kriete, G., K. Niehaus, A. M. Perlick, A. Puhler, and I. Broer, 1996 Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. *Plant Journal* **9**: 809-818.
- Kull B., Salamini F., and Rohde W., 1995 Genetic engineering of potato starch composition: Inhibition of amylose biosynthesis in tubers from transgenic potato lines by expression of antisense sequences of the gene for granulebound starch synthase. *Journal of Genetics and Breeding* **49**: 69-76.
- Liu, Y. J., Y. Yuan, J. Zheng, Y. Z. Tao, Z. G. Dong *et al.* 2004 Signal peptide of potato PinII enhances the expression of Cry1Ac in transgenic tobacco. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **36**: 553-558.
- Menassa, R., Z. Hong, C. N. Karatzas, A. Lazaris, A. Richman *et al.* 2004 Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 431-438.
- Mullins, E., D. Milbourne, C. Petti, B. M. Doyle-Prestwich, and C. Meade, 2006 Potato in the age of biotechnology. *Trends in Plant Science* **11**: 254-260.
- Murphy, D. J., 1996 Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends in Biotechnology* **14**: 206-213.
- Nawrath, C., Y. Poirier, and C. Somerville, 1994 Targeting of the Polyhydroxybutyrate Biosynthetic-Pathway to the Plastids of Arabidopsis-Thaliana Results in High-Levels of Polymer Accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12760-12764.
- Neumann, K., W. Dröge-Laser, S. Köhne, A. Pühler, and I. Broer, 1996 A heat induced loss of transgene activity detected and analyzed in several differed transgenic *Nicotiana tabacum* lines. In: Biosafty: Stability of DNA, Horizontal gene transfer and expression of transgenes. *E.R.Schmidt (ed.) Springer Verlag* 231-238.

- Neumann, K., W. DrogeLaser, S. Kohne, and I. Broer, 1997 Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiology* **115**: 939-947.
- Neumann, K., D. P. Stephan, K. Ziegler, M. Huhns, I. Broer *et al.* 2005 Production of cyanophycin, a suitable source for the biodegradable polymer polyaspartate, in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 249-258.
- Oppermann-Sanio, F. B., T. Hai, E. Aboulmagd, F. F. Hezayen, S. Jossek *et al.* 1999 Biochemistry of polyamide metabolism. *Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers: Proceedings of the International Symposium (Steinbüchel, A.ed.)* 185-193.
- Poirier, Y., D. E. Dennis, K. Klomparens, and C. Somerville, 1992 Polyhydroxybutyrate, A Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants. *Science* **256**: 520-523.
- Poirier, Y., C. Somerville, L. A. Schechtman, M. M. Satkowski, and I. Noda, 1995 Synthesis of High-Molecular-Weight Poly([R]-(-)-3-Hydroxybutyrate) in Transgenic Arabidopsis-Thaliana Plant-Cells. *International Journal of Biological Macromolecules* **17**: 7-12.
- Quandt, H. J., I. Broer, and A. Pühler, 1992 Tissue-Specific Activity and Light-Dependent Regulation of A Soybean Rbcs Promoter in Transgenic Tobacco Plants Monitored with the Firefly Luciferase Gene. *Plant Science* **82**: 59-70.
- Quandt, H. J., A. Pühler, and I. Broer, 1993 Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta* A fast and reliable system for the comprehensive study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol.Plant Microbe Interaction* **6**: 699-706.
- Richter, R., M. Hejazi, R. Kraft, K. Ziegler, and W. Lockau, 1999 Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin) - Molecular cloning of the gene of Synechocystis sp PCC 6803, expression in Escherichia coli, and biochemical characterization of the purified enzyme. *European Journal of Biochemistry* **263**: 163-169.
- Scheller, J., and U. Conrad, 2005 Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 188-196.
- Scheller, J., K. H. Guhrs, F. Grosse, and U. Conrad, 2001 Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature Biotechnology* **19**: 573-577.
- Schlogelhofer, P., V. Nizhynska, N. Feik, C. Chambon, T. Potuschak *et al.* 2002 The upstream Sal repeat-containing segment of Arabidopsis thaliana ribosomal DNA intergenic region (IGR) enhances the activity of adjacent protein-coding genes. *Plant Molecular Biology* **49**: 655-667.
- Schwamborn, M., 1996 Polyasparaginsäuren. Nachr.Chem.Techn.Lab 44: 1167-1179.
- Simon, R. D., 1987 Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. *The cyanobacteria* 199-225.

- Simon, R. D., and P. Weathers, 1976 Determination of Structure of Novel Polypeptide Containing Aspartic-Acid and Arginine Which Is Found in Cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **420**: 165-176.
- Steinbüchel, A., and B. Fuchtenbusch, 1998 Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology* **16**: 419-427.
- Steinbüchel, A., E. Hustede, M. Liebergesell, U. Pieper, A. Timm *et al.* 1992 Molecular-Basis for Biosynthesis and Accumulation of Polyhydroxyalkanoic Acids in Bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **103**: 217-230.
- van Aarssen R., P. Soetaert, M. Stam, J. Dockx, V. Gossele *et al.* 1995 cry IA(b) transcript formation in tobacco is inefficient. *Plant Mol.Biol.* **28**: 513-524.
- van der Leij, F. R., R. G. Visser, A. S. Ponstein, E. Jacobsen, and W. J. Feenstra, 1991 Sequence of the structural gene for granule-bound starch synthase of potato (Solanum tuberosum L.) and evidence for a single point deletion in the amf allele. *Mol.Gen.Genet.* **228**: 240-248.
- Vinnemeier, J., W. Dröge-Laser, E. K. Pistorius, and I. Broer, 1995 Purification and partial characterization of the Streptomyces viridochromogenes Tu494 phosphinothricin-N-acetyltransferase mediating resistance to the herbicide phosphinothricin in transgenic plants. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **50**: 796-805.
- Walter, C., I. Broer, D. Hillemann, and A. Pühler, 1992 High-Frequency, Heat Treatment-Induced Inactivation of the Phosphinothricin Resistance Gene in Transgenic Single Cell-Suspension Cultures of Medicago-Sativa. *Molecular & General Genetics* 235: 189-196.
- Weissschuh, N., D. Fink, S. Vierling, M. J. Bibb, W. Wohlleben *et al.* 2000 Transcriptional analysis of the gene for glutamine synthetase II and two upstream genes in Streptomyces coelicolor A3(2). *Molecular and General Genetics* 264: 461-469.
- Wong, E. Y., C. M. Hironaka, and D. A. Fischhoff, 1992 Arabidopsis-Thaliana Small Subunit Leader and Transit Peptide Enhance the Expression of Bacillus-Thuringiensis Proteins in Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology* **20**: 81-93.
- Yang, J. J., L. A. Barr, S. R. Fahnestock, and Z. B. Liu, 2005 High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Research* 14: 313-324.
- Ziegler, K., R. Deutzmann, and W. Lockau, 2002 Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: Characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of Desulfitobacterium hafniense. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **57**: 522-529.
- Ziegler, K., A. Diener, C. Herpin, R. Richter, R. Deutzmann *et al.* 1998 Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *European Journal of Biochemistry* **254**: 154-159.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Maßgeblich für den wissenschaftlichen Erfolg ist eine enge Kooperation der beteiligten Forschungsgruppen. Während der Projektlaufzeit erfolgten vier Verbundbzw. Koordinierungstreffen der Projektleiter und ihrer Mitarbeiter im Zeitabstand von rund sechs Monaten, sowie ein Statusseminar im Juni 2006. Die Projekttreffen wurden für einen ausführlichen Wissenstransfer, Vorstellung der durchgeführten und geplanten Experimente, Materialaustausch sowie gemeinsamen Diskussion und Festlegung neuer Experimente genutzt.

Aufgabenverteilung auf die Verbundpartner:



II. Eingehende Darstellung

II. 1 erzielte Ergebnisse

II.1.1 erzielte Ergebnisse der Universität Rostock

Teilvorhaben: Expression der Cyanophycin-Synthetase in transgenen Kartoffelknollen

A Analyse der knollenspezifischen Expression des Cyanophycin-Synthetasegens *cph*A_{Te} aus Thermos*ynechococcus elongatus*

Die konstitutive Expression des *cph*A_{Te} Gens verursacht eine signifikante Reduktion der Transformationsrate und phänotypisch erkennbare Beeinträchtigungen des Wachstums bei der Speicherung von Cyanophycin. Eine Strategie zur Vermeidung solcher Schäden ist die spezifische Expression in Speicherorganen wie der Knolle, was ein unbeeinträchtigtes Wachstum der Pflanzen gewährleisten soll. Da bisher nur mit dem Cyanophycin-Synthetasegen aus Thermosynechococcus elongatus BP-1 eine messbare Produktion von Cyanophycin erreicht werden konnte, sollte der Kodierbereich dieses Gens mit zwei verschiedenen knollenspezifischen Promotoren fusioniert werden. Die Transformation des Gens in die stärkereiche Industriekartoffelsorte Albatros ist bereits ein erster Schritt in Richtung einer ökonomisch vertretbaren Produktion.

Transformation von Kartoffel mit dem cph A_{Te} Gen unter Kontrolle verschiedener knollenspezifischer Promotoren

Bei den knollenspezifischen Promotoren handelt sich zum einem um den Patatin B33-Promotor, welcher durch Aventis Crop Science geschützt ist und nur für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt werden kann und zum anderen um den GBSS-Promotor, welcher von Prof. Visser (Universität Wageningen) zur Verfügung gestellt wurde. Der GBSS-Promotor stammt von der Granula-gebundenen Stärke-Synthetase (GBSS) aus *Manihot esculenta* und zeigt 74% Homologie zu dem entsprechenden Kartoffel-Promotor. Seine Expression in der Knolle ist deutlich stärker als die des konstitutiven 35S-Promotors oder des üblicherweise zur knollenspezifischen Expression eingesetzten Patatin-Promotors, er zeigt jedoch im Gegensatz zum Patatin-Promotor auch Aktivität in anderen saccharosereichen Geweben (van der Leij *et al.* 1991).

Für die Fusion des GBSS Promotors mit dem Kodierbereich der Cyanophycin-Synthetase (*cph*A) wurden verschiedene Strategien angewendet, unter anderem die Nutzung eines PCR-Amplifikats oder der Einsatz der ursprünglichen Promotorsequenz, die aus einem Plasmid isoliert worden ist. Eine direkte Integration des Promotors in den vorhandenen Ausgangsvektor pp35S-*cph*A war, möglicherweise auf Grund von Sequenzinkompatibilitäten zwischen dem Promotor und den vorhandenen Sequenzen des Vektors, nicht erfolgreich. Die Fusion des GBSS-Promotors mit dem *cph*A_{Te} Kodierbereich kann durch Einfügen von nichtkodierenden Sequenzen zwischen dem t35S vom *npt*II und dem *cph*A-Kodierbereich erleichtert werden. Dazu wurden zwei verschieden lange Fragmente von 50 bp und 200 bp benutzt, die über PCR amplifiziert wurden. Im Gegensatz zum 50 bp Fragment, wurde das 200 bp Fragment erfolgreich in den Ausgangsvektor integriert. Die anschließende Integration des GBSS-Promotors in diesen modifizierten Vektor war ebenso erfolgreich. Um für die Transformation von Pflanzen genutzt werden zu können, muss der Vektor in den Agrobacterium tumefaciens Stamm LBA4404 überführt werden. Weder über den Gefrierschock noch über die Elektroporation konnte der Vektor stabil in Agrobakterien integriert werden, so dass dieses Konstrukt für die Transformation von Kartoffel nicht zur Verfügung stand.

In einem weiteren Ansatz wurde der GBSS-Promotor über PCR, mit Hilfe der Taq-Polymerase, amplifiziert und im Vektor pp35S-*cph*A gegen den CaMV35S Promotor ausgetauscht. Obwohl die Taq-Polymerase etwa alle 200 bp einen Fehler in das Amplifikat einbaut, konnte über Sequenzierung die richtige Sequenz des Promotors nachgewiesen werden. Die anschließende Überführung des GBSS-cphA (Abb.2A) Konstruktes in *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 konnte im Gegensatz zum oben genannten Konstrukt, bereits mit Hilfe der Gefrierschockmethode erzielt werden.

Die Fusion des zweiten knollenspezifischen Promotors B33 mit dem Kodierbereich des *cph*A Gens führte bereits beim ersten Versuch zum Erfolg (Abb. 2B), wobei auch die Überführung in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA 4404 ohne große Anstrengungen möglich war.



Abb.2: Plasmidkarten der Pflanzentransformationsvektoren pGBSS-cphA (A) und pB33-cphA (B) zur knollenspezifischen Expression des Cyanophycinsynthetasegens. cphA: Kodierbereich des Cyanophycin-Synthetasegens aus T. elongatus BP-1; pGBSS: knollenspezifisch exprimierter GBSS Promotor aus Manihot esculenta; pB33: knollenspezifisch exprimierter Patatin Promotor; p35S: konstitutiv cytoplasmatisch exprimierter 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikviruses; t35S: Blumenkohlmosaikvirus- 35S-RNA-Terminator; neo: Kodierbereich der Neomycinphosphotransferase, verleiht Kanamycinresistenz; BL, BR: Randsequenzen der T-DNA; pNos: Promotor des Nopalinsynthetasegens aus A. tumefaciens; thos: Terminator des Nopalinsynthetasegens aus A. Sm/Sp: tumefaciens; nptll: Kanamycinresistenzgen bakteriell exprimiertes Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen nptIII: bakteriell exprimiertes Kanamycinresistenzgen;

Beide Pflanzentransformationsvektoren wurden zur Erzeugung transgener Kartoffelpflanzen eingesetzt. Die dabei beobachteten Regenerationsraten und der Phänotyp der transgenen Pflanzen sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Konstrukt	Anzahl der Transformationen	Spross/Ex- plantat	Veränderte Blatt- morphologie	Veränderte Knollen- morphologie
GBSS-cphA	4	0,115	0/12	0/12
B33-cphA	3	0,7	0/35	22/35

 Tab. 1: Übersicht über die Regenerationsraten und den Phänotyp der transgenen knollenspezifisch exprimierten Cyanophycin-Synthetase Pflanzen.

Als transgene Kontrolle diente der Ausgangsvektor, der nur das Kanamycin-Resistenzgen beinhaltet. Dieser Vektor wurde in allen Transformationsansätzen zur Kontrolle der Regenerationsrate ohne Cyanophycinexpression eingesetzt. Die Transformation mit beiden knollenspezifischen Konstrukten zeigte deutliche Unterschiede in den Regenerationsraten: In vier unabhängigen Transformationen führte das GBSS-cphA Konstrukt zu stark reduzierten Raten. Eine mögliche Ursache kann die Expression des cphA_{Te} Gens bereits in den sich regenerierenden Sprossen sein, da der Promotor durch Saccharose, die sich im Regenerationsmedium befindet, induziert wird. Durch einen Austausch des Zuckers gegen Glucose im Infektionsmedium Transformation der Kartoffel bei der sollte über die Regenerationsfähigkeit der Regeneranten die Aktivität des Promotors beeinflusst werden (Tab. 2).

Zucker im Anzahl der Infektionsmedium Transformationen		Spross/Explantat
Saccharose	2	0,16
Glucose	2	0,26

Tab. 2: Übersicht über die Regenerationsraten transgener GBSS-cphA Kartoffelpflanzen unter Verwendung verschiedener Zucker im Regenerationsmedium.

Die Regenerationsraten konnten unter Verwendung von Glucose gegenüber Saccharose nur leicht gesteigert werden. Unklar ist, ob die Ursache in einer Reduktion der Promotoraktivität in den sich regenerierenden Sprossen liegt oder ob weitere Faktoren einen Einfluss haben.

Bei drei unabhängigen Transformationen mit dem B33-*cph*A Konstrukt konnten im Vergleich zur Kontrolle normale Regenerationsraten beobachtet werden (Tab. 1). Diese Raten weisen darauf hin, dass die knollenspezifische Expression des *cph*A_{Te} Gens keinen Einfluss auf die Regeneration transgener Sprosse hat.

Vergleich des Phänotyps von knollenspezifisch exprimierten cphA_{Te} Kartoffelpflanzen

Als Vergleich für alle weiteren Analysen der transgenen Pflanzen wurde die Wildtypsorte Albatros und der Ausgangsvektor, der nur das *npt*II Gen enthält, herangezogen. Der Phänotyp der GBSS-*cph*A Pflanzen war auf Blatt und Knollenebene nicht von dem der Kontrollpflanzen zu unterscheiden (Tab. 1, Abb. 3 A). Im Gegensatz dazu wiesen die Knollen der B33-*cph*A Transformanden eine veränderte Morphologie auf, die in deutlich kleineren und deformierten Knollen resultierte und zusätzlich eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen wie *Alternaria* zeigten (Tab. 1, Abb. 3 B und C).



Abb. 3: Phänotyp verschiedener Kartoffellinien mit knollenspezifisch cytoplasmatisch exprimierter Cyanophycin-Synthetase. A: Vergleich der Knollenausbeute und –morphologie von einer transgenen GBSS-*cph*A Linie, die sich nicht von den Kontrollen ohne Cyanophycin-Synthetase unterscheidet. B: Phänotyp einer B33-*cph*A Linie, die deutlich kleinere und reduzierte Knollen aufweist. C: Anfälligkeit

gegenüber Pathogenen wie *Alternaria* von B33-*cph*A Pflanzen, wobei die konzentrischen Ringe im Blatt und die Trockenfäule der Knolle deutlich erkennbar sind.

Der veränderte Phänotyp der B33-*cph*A Pflanzen könnte auf eine hohe Cyanophycinakkumulation im Cytoplasma der Knolle hindeuten, ähnlich wie im Blatt von konstitutiv cytoplasmatischen Tabak- und Kartoffelpflanzen (p35S-*cph*A). Hier führte die *cph*A_{Te} -Expression in den Linien mit der höchsten Polymerakkumulation zu starken Stresssymptomen wie panaschierten Blättern, einem reduzierten Wachstum und einer frühzeitigen Blühinduktion. Da die Cyanophycin-Synthetase in den B33-*cph*A Pflanzen nur in der Knolle exprimiert wird, beschränken sich auch die phänotypischen Veränderungen auf dieses Organ und beeinflussen nicht die grünen Teile der Pflanze. Insgesamt zeichnen sich die transgenen Linien durch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Alternaria* aus, die sich auf Grund der Krankheitssymptome auf die gesamte Pflanze erstrecken (Abb. 3C).

Molekulare Analyse der knollenspezifisch exprimierten cphATe Kartoffelpflanzen

Von beiden Konstrukten wurden von der AG Lockau (Humboldt Universität zu Berlin) und der AG Pistorius/Staiger Universität Bielefeld) transgene Kartoffellinien auf das Vorhandensein und die Lokalisation von Cyanophycin untersucht. Dabei konnte sowohl im Blatt als auch in der Knolle von verschiedenen transgenen GBSS-*cph*A Linien kein Cyanophycin nachgewiesen werden (Tab. 3). Es ist vorstellbar, dass die Produktion von Cyanophycin im Cytoplasma mit verschiedenen Stresssymptomen assoziiert ist. Da sich aber alle transgenen GBSS-*cph*A Pflanzen nicht von den Kontrollpflanzen unterscheiden und zusätzlich keine Polymerakkumulation detektiert werden konnte, ist es möglich, dass die Cyanophycin-Synthetase in der Knolle nicht exprimiert wird. Die Untersuchungen zum Nachweis der transgenspezifischen RNA in den Knollen müssen noch in weiteren Analysen erfolgen.

Bereits in den konstitutiv cytoplasmatisch exprimierten p35S-*cph*A Tabak- und Kartoffellinien konnten durch die AG Lockau zwei verschiedene Formen des Cyanophycins analysiert werden, die sich nur in der Eigenschaft der Löslichkeit voneinander unterscheiden. In den Cyanobakterien kommt nur die wasserunlösliche granuläre Form vor, wobei in Pflanzen zusätzlich von der wasserlöslichen Form bis zu 1% des Trockengewichts (TG) produziert werden kann. Alle im Projekt analysierten Pflanzen wurden auf beide Formen des Polymers untersucht. Dabei konnte in den Knollen aller untersuchten B33-*cph*A Linien größere Mengen granulären Cyanophycins gegenüber der wasserlöslichen Form nachgewiesen werden (Tab. 3).

Konstrukt	Gehalt des unlöslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht)	Gehalt des löslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht)
GBSS-cphA	0	0
B33-cphA Linie 33	18,24	3,16

Tab. 3: Cyanophycingehalt in der Knolle von knollenspezifisch cytoplasmatisch produzierenden Kartoffelpflanzen.

Es zeigte sich, dass in 22 von 23 untersuchten Pflanzen das Polymer mit bis zu 2,1% der Trockenmasse produziert wird. Das entspricht gegenüber der konstitutiv cytoplasmatischen Expression einer Steigerung um das 10-fache in der Kartoffelknolle. Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem veränderten Phänotyp der Kartoffelknollen und der Cyanophycin-Produktion. Es wäre möglich, dass entweder die Lokalisation des Polymers im Cytoplasma oder die lösliche Form die Ursache für die gesteigerte Anfälligkeit der transgenen Kartoffeln darstellt.

B Ansätze zur Optimierung der Cyanophycin-Produktion in transgenen Kartoffelknollen

<u>B1 Kreuzung von Cyanophycin-produzierenden Pflanzen mit Pflanzen die Gene aus verschiedenen Aminosäurebiosynthesewegen exprimieren</u>

Die Bildung von Cyanophycin kann zu einer wesentlichen Beeinträchtigung des Aminosäurepools (vor allem zu einem Mangel an Arginin und Aspartat oder ihren Vorläufern) führen. Diese Möglichkeit wurde bereits im Vorläuferprojekt in Betracht gezogen; Lösungsansatz war die gleichzeitige Expression bakterieller Gene aus der Aminosäurebiosynthese mit der Cyanophycin-Synthetase in den Pflanzen. Vor allem die Glutaminsynthetase gewährleistet als primäres Schlüsselenzym in allen zur N-Assimilation befähigten Organismen die Versorgung der Zelle mit dem zentralen Aminogruppen-Donor und Stickstoffspeichermolekül, der Aminosäure Glutamin. Der für die Synthese der Cyanophycinbausteine Arginin und Aspartat benötigte Stickstoff soll damit zusätzlich zu der pflanzeneigenen N-Versorgung bereitgestellt werden, ohne dass es zu Wachstumsbeeinträchtigungen und Defiziten im N-Stoffwechsel der Pflanze kommt.

Um den Stickstofffluss zum Cyanophycin optimieren und eventuelle zu vorzubeugen, wurden Verbundprojekt 1 Mangelversorgungen im sieben verschiedene bakterielle Aminosäure-Biosynthesegene (Glutamin-Synthetasegene und Arginin-Biosynthesegene) unter Kontrolle des CaMV35S Promotors in Tabak eingebracht und die Anwesenheit des Trangens in den resultierenden Pflanzen nachgewiesen. Nur für drei der sieben Gene (glnA aus Escherichia coli, glnII aus Streptomyces. coelicolor und argJ aus Streptomyces coelicolor) wurde die transgenspezifische RNA Banden auf der erwarteten Höhe nachgewiesen. Ein weiteres Konstrukt lieferte zusätzliche Banden zur korrekten (argC aus S. coelicolor.) Die nach Transformation mit dem *arg*J-Gen aus *Mycobacterium tuberculosis* beobachtete Bande war mehr als dopplelt so groß wie erwartet und Transkripte der beiden *gln*A-Gene aus *S. coelicolor* konnten in der Pflanze gar nicht nachgewiesen werden. Der Aminosäuregehalt von stark exprimierenden *gln*A, *gln*II und *arg*J Linien wurde in der AG Wohlleben untersucht. In der 2. Förderungsphase wurde, in Zusammenarbeit mit der Fa. NORIKA, jeweils eine Linie für die weiteren Kreuzungen mit drei konstitutiv cytoplasmatisch exprimierenden (p35S-*cph*A) Tabaklinien verwendet (Abb. 4).



Abb. 4: Auswahl der Cyanophycin-produzierenden Kreuzungspartner in Abhängigkeit vom Grad der Panaschierung der Blätter, die bei Verbesserung der N-Versorgung eine Reduktion dieser Stresssymptome zeigen sollten.

Es wurden drei p35S-*cph*A Linien für die Kreuzung ausgewählt, die einen unterschiedlichen Grad in der Panaschierung der Blätter aufweisen. Die p35S-*cph*A Linien 14 und 39 zeigten einen weniger gestressten Phänotyp, der in einem geringeren Grad der Panaschierung gegenüber der Linie 31 resultiert. Die Cyanophycinproduktion kann einen Einfluss auf die Samenbildung der Nachkommen der drei Pflanzen haben. So konnten keine transgenen Nachkommen der Linie 31 unter Selektion mit Kanamycin ermittelt werden. Möglicherweise kommt es zu einer gekoppelten Abschaltung vom *npt*II- und *cph*A_{Te} Gen. In den Linien 14 und 39 kam es zu normalen Auskreuzungsraten von 75% transgenen Nachkommen, die ebenfalls den gestressten Phänotyp der Primärtransformande aufwiesen. Es wurden jeweils die Cyanophycin-produzierenden Pflanzen als Mutterpflanze und als Pollenspender bei den Kreuzungen eingesetzt (Abb. 5).



Abb. 5: Schema von Kreuzungen von konstitutiv cytoplasmatischen Tabaklinien, in die zusätzlich Gene aus Aminosäurebiosynthesewegen eingekreuzt wurden. Dabei wurden alle Pflanzen sowohl als Mutterpflanze, als auch als Pollenspender verwendet.

Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden zunächst morphologisch und 20 Nachkommen molekularbiologisch auf die Anwesenheit der beiden Gene untersucht. In Abb. 6 sind diejenigen Nachkommen abgebildet, die sowohl die Cyanophycin-Synthetase als auch das Aminosäure-Biosynthesegen enthalten, dabei entspricht ein Kästchen einer Pflanze.



Abb. 6: Zusammenfassung der analysierten Kreuzungspflanzen auf DNA-Ebene unter Einbeziehung des Phänotyps.

Auffällig war, dass in den Kreuzungsnachkommen der Linie 31 sehr wenig Pflanzen ermittelt werden konnten, die beide Gene enthalten. Zusätzlich zeigten alle Nachkommen einen normalen, ungestressten Phänotyp. Es wurde von einigen Pflanzen stichprobenartig der Cyanophycingehalt in der AG Lockau untersucht, wobei kein Cyanophycin detektiert werden konnte. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass bereits in einem sehr frühen Stadium die Cyanophycin-Synthetase abgeschaltet wird.

In den Kreuzungsnachkommen der Linie 14 und 39, die ebenfalls beide Gene enthalten, konnte mit keinem der drei verwendeten AS-Biosynthesegene eine Verbesserung des gestressten Phänotyps ermittelt werden. Bei längerer Kultivierung der Pflanzen verstärkten sich die Panaschierungen und somit auch der Grad des Stresses.

Insgesamt konnte mit keinem der drei verwendeten Aminosäure-Biosynthesegene, im Vergleich zur Wildtypkreuzung, eine Verbesserung des Phänotyps der Pflanzen erreicht werden. In ersten stichprobenartigen Untersuchungen hinsichtlich des Cyanophycingehaltes konnte auch hier keine erhöhte Cyanophycinakkumulation festgestellt werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Expression der verwendeten Gene, die an der Glutamin- und Argininbiosynthese beteiligt sind, nicht zu einer Verbesserung des Phänotyps Cyanophycinproduzierender Pflanzen beitragen. Die Analyse der Wirkung dieser Gene auf den Gesamtaminosäurepool einer Pflanze wird durch die AG Wohlleben untersucht. Aus den bisher gewonnen Ergebnissen konnte keine Verbesserung der pflanzlichen Fitness abgeleitet werden, so dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht.

<u>B2 Fusion des Cyanophycin-Synthetasegens mit verschiedenen Transitpeptiden für einen Transfer der Synthetase in den Chloroplasten</u>

Da die Plastiden von einem Vorläufer der Cyanobakterien abstammen, sollte man erwarten, dass die Synthese des Speicherproteins hier zum einen leichter möglich und zum anderen weniger störend für die Pflanze ist. Vorteilhaft ist hier die nichtribosomale Synthese des Cyanophycins; um eine eventuell störende Cyanophycin-Ansammlung im Cytoplasma zu verhindern, ist es nicht notwendig, eine viel kompliziertere Chloroplastentransformation durchzuführen. Bei einem Transport der kernkodierten Synthetase in den Chlorplasten wird nur dort Cyanophycin produziert. Für das Cyanophycin-Synthetasegen aus Synechocystis spec. PCC6803 konnte im vorangegangenen Projekt bereits gezeigt werden, dass die Fusion mit dem Signalpeptid zu deutlich besseren Regenerationsraten führt (Schlussbericht FKZ: 98NR090). Da die Targetingeffizienz von Transitpeptiden von der kodierenden Sequenz des zu dirigierenden Proteins abhängig ist (Wong et al. 1992; Liu et al. 2004), wurden vier verschiedene Signalsequenzen mit dem Kodierbereich des cphA_{Te}-Gens unter Kontrolle des CaMV35S Promotors fusioniert. Es handelt sich dabei um die Signalseguenzen von kernkodierten Proteinen von CP24 (Lichtsammelkomplex Chlorophyllprotein CP24, in der Thylakoidmembran lokalisiert), FNR (Ferredoxin-NADP Oxodoreduktase, die locker an der Stromaseite der Thylakiodmembran angeheftet ist), Rieske (Rieske Eisen-Schwefel Protein, ist Komponente des Cytochrom b₆f Komplexes an der luminalen Seite der Thylakoidmembran), und PsbY (integrales Protein des Photosystem II). Alle Sequenzen enthalten die normalen Plastidimportsequenzen und zusätzliche Sequenzen für den Transport zur oder in die Thylakoidmembran der Chloroplasten.

Die konstruierten Transformationsvektoren CP24-*cph*A_{Te}, FNR-*cph*A_{Te}, Rieske*cph*A_{Te} und PsbY-*cph*A_{Te} (Abb. 7) wurden über den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in mehreren Transformationsexperimenten von Tabak und Kartoffel zur Erzeugung transgener Pflanzen eingesetzt.



Abb. 7: T-DNA der Pflanzentransformationsvektoren zur konstitutiven plastidären Expression der Cyanophycin-Synthetase. Der Kodierbereich der Cyanophycin-Synthetase wurde mit jeweils einem der vier Transitpeptide unter Kontrolle des konstitutiven p35S Promotors fusioniert. cphA: Kodierregion des Cyanophycin-Synthetasegens; TP: Transitpeptide von CP24, FNR, Rieske oder PsbY; p35S: Promotor der Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA; t35S: Terminator der Blumenkohlmosaikvirus-35S-RNA; *neo*: Kodierbereich des Neomycinphosphotransferasegens; LB, RB: linke bzw. rechte Randsequenzen der transferierten DNA

Molekulare Analyse der transgenen konstitutiv plastidär exprimierten cphA_{Te}Tabakpflanzen

Die Transformation von Tabak mit den vier verschiedenen Konstrukten zeigte deutliche Unterschiede in den Regenerationsraten, wobei CP24-*cph*A_{Te} reduzierte, PsbY-*cph*A_{Te} leicht reduzierte und FNR-*cph*A_{Te} und Rieske-*cph*A_{Te} im Vergleich zum Kontrollvektor LH9000 (exprimiert nur *npt*II) normale Raten aufwiesen (Tab. 4).

Konstrukt	Anzahl der Transformationen	Spross/Explantat (Mittelwert)	Phänotypische Veränderungen
Rieske- <i>cph</i> A _{Te}	2	1	1/8
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	4	0,91	ја
CP24- cphA _{Te}	3	0,4	ja
PsbY- cphA _{Te}	4	0,65	nein

Tabelle 4: Regenerationsraten und phänotypische Veränderungen transgener Tabakpflanzen bei konstitutiv plastidärer Expression der Cyanophycin-Synthetase.

Die transgenen Pflanzen von FNR-*cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} zeigten eine signifikant reduzierte Wachstumsrate, wobei viele Linien die gleichen phänotypischen Veränderungen wie die p35S-*cph*A Linien aufwiesen. Im Gegensatz dazu waren alle Rieske-*cph*A_{Te} und PsbY-*cph*A_{Te} Linien ohne solche Veränderungen oder Wachstumseinbußen (Abb. 8)



Abb. 8: Vergleich des Phänotyps von Cyanophycin-produzierenden Tabakpflanzen, die die Cyanophycin-Synthetase konstitutiv plastidär exprimieren. Die FNR-*cph*A_{Te} Linie weist eine starke Panaschierung der Blätter auf, sowie reduzierte Blattspreiten; wohingegen Nachkommen transgener PsbY-*cph*A_{Te} Pflanzen, mit einer hohen Cyanophycinakkumulation, einen verdickten Stamm und Blätter mit einer starken Äderung aufweisen und zusätzlich die Antheren der Blüten kleiner als die Narbe sind.

In Untersuchungen hinsichtlich der Transgenexpression der Cyanophycin-Synthetase mit Hilfe von Northern Analysen konnte in den p35S-*cph*A Linien die Bildung von verschiedenen kleinen mRNAs (Größe zwischen 1000 bp und 1900 bp), die homolog zum *cph*A Gen sind, detektiert werden (Schlussbericht FKZ 98NR090). Diese deuten auf eine nicht korrekte Prozessierung der mRNA hin, die bei der Expression bakterieller Gene in Pflanzen auftreten kann (van Aarssen R. *et al.* 1995; Diehn *et al.* 1998; Haffani *et al.* 2000). Die Fusion des Kodierbereichs der Cyanophycin-Synthetase mit den Transitpeptiden hingegen führte zu einer verstärkten mRNA Stabilität, so dass das gesamte Transkript nachgewiesen werden konnte (Abb. 9).



Abb. 9: Northern Analyse transgener PsbY-*cph*A_{Te} Tabakpflanzen, die die definierte Bande der Cyanophycin-Synthetase von 2.7 kb detektieren. Wt: nicht-transgene Tabakkontrollpflanze; *npt*II: Kontrollpflanze, die nur das *npt*II Gen exprimiert; Transgene Linien: Pflanzen von PsbY-*cph*A_{Te}.

Analyse des Cyanophycingehaltes in transgenen Tabakpflanzen mit unterschiedlichen Transitpeptiden

In den transgenen Tabakpflanzen, die PsbY-*cph*A_{Te} exprimieren, wurde in der AG Lockau primär die wasserunlösliche Form des Cyanophycins und höchstens in geringen Spuren die wasserlösliche Form gefunden. Die Linien von FNR-*cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} produzieren alle die wasserlösliche Form, die teilweise den Gehalt der unlöslichen Fraktion erreicht. In keiner der untersuchten Rieske-*cph*A_{Te} Linien wurde das Polymer nachgewiesen (Tab. 5).

Konstrukt	Trans- gene Linie	Gesamtgehalt von Cyanophycin (mg/g des Trockengewicht)	Gehalt des unlöslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht	Gehalt des löslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht	Phäno- typische Verän- derungen
Rieske-cphA _{Te}	2	n.n.	n.n.	n.n.	+++
	31	n.n.	n.n.	n.n.	-
	34	n.n.	n.n.	n.n.	-
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	13	2,15	1,4	0,75	++
	18	7,03	3,9	3,13	+++
	19	7,89	5,5	2,39	+++
CP24- cphA _{Te}	29	8,63	4,9	3,73	+++
	38	4,77	3,43	1,34	+++
	74	4,21	2,52	1,69	+++
PsbY- cphA _{Te}	51	14,45	14,45	n.n.	-
	67	14,45	14,45	n.n.	-
	104	7,37	7,37	n.n.	-
	158	14,65	14,44	0,21	-

Tabelle 5: Cyanophycingehalt von verschiedenen transgenen Tabaklinien (n.n. nicht nachgewiesen). Die Anzahl der + Zeichen zeigen den Grad der phänotypischen Veränderungen an.

In den FNR-*cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} Linien kam es im Vergleich zu den p35S-*cph*A Pflanzen zu keiner Steigerung des Polymergehaltes, aber Stresssymptome wie bei der cytoplasmatischen Expression. Dies legt die Vermutung nahe, das es nicht zu einem Plastidenimport der Cyanophycin-Synthetase kommt, was auch durch die Analysen der AG Staiger/Pistorius bestätigt wird. In allen untersuchten PsbY-cphA_{Te} Pflanzen konnte eine deutliche Steigerung der Cyanophycinproduktion bis auf 1,45% des TG nachgewiesen werden, wobei diese Linien nicht die vorher erwähnten Stresssymptome zeigten. In elektronmikroskopischen Aufnahmen der AG Pistorius/Staiger erfolgte ein Nachweis des Polymers in Form locker gepackter Aggregate sowohl in FNR-cphA_{Te} als auch in CP24-cphA_{Te} Pflanzen. Diese Aggregate wurden in den PsbY-*cph*A_{Te} Linien nur in Plastiden von Blatt und Wurzel gefunden (siehe erzielte Ergebnisse AG Pistorius/Staiger).

Alle untersuchten Tabaklinien waren fertil und produzierten Samen. Die T1 Generation von jeweils zwei FNR-*cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} sowie fünf PsbY-*cph*A_{Te} Linien wurden weiter untersucht. Die Nachkommen der FNR-*cph*A_{Te} und CP24*cph*A_{Te} Linien wiesen die gleichen panaschierten Blätter und leicht reduzierten Wachstumsraten wie die T0 Linien auf, im Gegensatz dazu waren die Nachkommen von PsbY-*cph*A nicht von den Kontrollkeimlingen zu unterscheiden. Es wurden jeweils 20 Nachkommen jeder Linie über sequenzspezifische *cph*A_{Te} PCR auf die Anwesenheit des Transgens überprüft und in mindestens fünf Nachkommen jeder Linie wurde der Polymergehalt von der AG Lockau quantifiziert (Tab. 6).

Konstrukt	T0 Generation der transgenen Linie	Gesamt- Cyanophycin- gehalt der T0 Generation (mg/g des TG)	Anzahl der untersuchten Nachkommen	durch- schnittlicher Cyanophycin- gehalt (mg/g des TG)	maximaler Cyanophycin- gehalt (mg/g des TG)
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	18	7,03	5	5,96	9,8
	19	7,89	9	2,28	4,5
CP24- <i>cph</i> A _{Te}	29	8,63	5	6,2	6,97
	38	4,77	5	2,22	2,37
PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	51	14,45	11	17,13	32,37
	58	8,83	10	4,04	9,57
	67	14,45	5	4,07	5,2
	104	6,3	10	6,39	13,85
	106	10,2	5	6,1	15,54

 Tabelle 6: Vergleich des Cyanophycingehaltes der T0 und T1 Generation verschiedener Tabaklinien.

Auffällig ist, dass in den Nachkommen der FNR-*cph*A_{Te} Linie 18 und 19 der durchschnittliche Polymergehalt im Vergleich zur Mutterpflanze reduziert ist. Das Gleiche konnte für die Nachkommen der CP24-*cph*A_{Te} Linie 29 und 38 beobachtet werden. Die Nachkommen der fünf PsbY-*cph*A_{Te} Linien unterscheiden sich in ihren

Cyanophycingehalten. So konnte in den Nachkommen der Linien 58, 106 und 126, die in der T0 nur die unlösliche Form des Cyanophycins produzieren, bis zu 0,5 mg/g des TG der löslichen Form quantifiziert werden. Außerdem stieg der Gehalt der unlöslichen Form in diesen Linien stark an. Interessanterweise unterscheiden sich zwei Linien (Linie 51 und 67) im Polymergehalt der Nachkommen, die in der T0 die höchste Cyanophycinakkumulation aufwiesen. Während der Polymergehalt in den Nachkommen der Linie 67 um das 3,5 fache reduziert ist, kommt es zu einer deutlichen Steigerung bis auf 32,37 mg/g des TG in der Linie 51. Von dieser Linie konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt die T2 Generation untersucht werden, in der wiederum eine Steigerung des Cyanophycingehaltes bis auf 4,2% des TG nachgewiesen werden konnte (Tab. 7).

Nachkommen	Gesamt- Cyanophycingehalt der T1 (mg/g des TG)	maximaler Cyanophycingehalt der T1 (mg/g des TG)	durchschnittlicher Cyanophycingehalt der T2 (mg/g des TG)
1	19,85	20,0	16,09
2	24,48	32,25	22,95
3	32,37	42,41	35,7
4	28,11	24,9	15,57
5	11,22	24,51	11,22

Tabelle 7: Vergleich der T1 und T2 Generation der PsbY-*cph*A_{Te} Linie 51, wobei mindestens drei Nachkommen untersucht worden sind.

In ausgewählten Nachkommen der hier untersuchten Linien erfolgte die Lokalisation des Cyanophycins in der Pflanze, dabei konnte wie schon in der T0 Generation von FNR-*cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} das Polymer ausschließlich im Cytoplasma und in allen PsbY-*cph*A Pflanzen in den Chloroplasten detektiert werden (siehe erzielte Ergebnisse AG Pistorius/Staiger).

Die Regeneranten, die mit FNR-*cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} erzeugt worden sind, wuchsen im Vergleich zum Tabak Wildtyp deutlich langsamer und zeigten einen veränderten Phänotyp, der sich in einer Panaschierung der Blätter, die dazu dicker als die der Kontrollpflanzen waren, und einer frühzeitigen Blühinduktion äußerte. Im Gegensatz dazu wiesen die PsbY-*cph*A_{Te} Linien einen normalen Phänotyp wie den der Kontrollpflanzen auf. Alle Cyanophycin-produzierenden Linien sind fertil, aber die PsbY-*cph*A_{Te} Linie 51 und ihre T1 und T2 Generation produziert nur sehr wenig Samen. Die Blüten dieser Pflanzen besitzen eine veränderte Blütenmorphologie, bei denen die Antheren kürzer als die Narbe sind. Zusätzlich haben die Nachkommen reduzierte Wachstumsraten, einen dickeren Stamm und Blätter mit einer deutlichen Äderung, die in der T0 Pflanze nicht beobachtet wurden (Abb. 8).

Insgesamt konnte nur mit einem der hier verwendeten vier Transitpeptide die Cyanophycin-Synthetase in die Chloroplasten der Zelle dirigiert werden. Aber in diesen PsbY-*cph*A_{Te} Linien kam es zu einer deutlichen Steigerung des Polymergehaltes bis auf 4,2% des TG ohne dass die Pflanzen starke Stresssymptome äußern.

Molekulare Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen mit unterschiedlichen Transitpeptiden

Da das Cyanophycin als Nebenprodukt bei der Stärkeisolierung anfallen soll, wurden parallel die Konstrukte FNR-*cph*A_{Te} und PsbY-*cph*A_{Te} in die *Solanum tuberosum* Sorte Albatros transformiert. Die Regenerationsraten sind, ähnlich wie in Tabak, im Vergleich zur Kontrolle und PsbY-*cph*A_{Te} bei den FNR-*cph*A_{Te} Regeneranten deutlich reduziert (Tab. 8).

Konstrukt	Anzahl der Transformationen	Spross/Explantat (Mittelwert)	Phänotypische Veränderungen
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	5	0,075	reduzierte Blattspreite, Aufhellungen der Blätter
PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	5	0,27	normaler Phänotyp

 Tabelle 8: Regenerationsraten und phänotypische Veränderungen transgener Kartoffelpflanzen bei konstitutiv plastidärer Expression der Cyanophycin-Synthetase.

Auffällig ist, dass die erzeugten FNR-*cph*A_{Te} Regeneranten ebenfalls eine Panaschierung der Blätter aufwiesen, dort ist sie allerdings in der Regel weniger stark ausgeprägt als bei den transgenen Tabakpflanzen. Die PsbY-*ph*A_{Te} Regeneranten waren phänotypisch nicht von den Kontrollpflanzen ohne Cyanophycin-Synthetase zu unterscheiden (Abb. 10).



Abb. 10: Phänotyp verschiedener Kartoffelllinien mit konstitutiv plastidär exprimierter Cyanophycin-Synthetase. A: Vergleich der Wuchshöhe und Morphologie von transgenen Pflanzen. B: Phänotyp von Blatt und Knolle der transgenen Pflanzen.

Deutliche Unterschiede im Phänotyp zwischen den beiden Konstrukten traten bereits bei der *in vitro* Kultivierung auf, wobei die Effekte bei der Anzucht in Erde stärker hervortraten (Abb. 10A). So konnte generell neben der Panaschierung der Blätter, ein deutlich reduziertes Wachstum der FNR-*cph*A_{Te} Pflanzen beobachtet werden. Dieser Effekt setzte sich bei den Knollen fort, die neben einer geringen
Knollenausbeute auch drastisch kleiner, als die PsbY-*cph*A_{Te} - und Kontrollpflanzen waren. Die transgenen PsbY-*cph*A_{Te} Linien waren weder *in vitro*, noch bei der Erdkultivierung von den Kontrollpflanzen im Blatt oder Knolle zu unterscheiden (Abb. 10B). Die Expression der Cyanophycin-Synthetase in den transgenen FNR-*cph*A_{Te} und PsbY-*cph*A_{Te} Pflanzen war mit Hilfe von Northern Blot Analysen im Blatt nachweisbar. Hier konnte ebenfalls das gesamte Transkript mit einer Größe von 2,9 kb ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Analyse des Cyanophycingehaltes in transgenen Kartoffelpflanzen mit unterschiedlichen Transitpeptiden

Sowohl im Blatt als auch in der Knolle konnten die lösliche und unlösliche Form des Cyanophycins von der AG Lockau detektiert werden. Hierbei wiesen die untersuchten FNR-*cph*A_{Te} Linien deutlich geringere Werte als die PsbY-*cph*A_{Te} Linien auf, wobei im Blatt in drei der vier Linien der Gehalt der löslichen Form geringer ist, als der der unlöslichen Form (Tab. 9A). Der höchste Cyanophycingehalt von 0,18% des TG wurde in Linie 13 gemessen, wobei hier der Anteil der löslichen Form überwiegt. Die FNR-*cph*A_{Te} Knollen produzieren ausschließlich die unlösliche Form des Cyanophycins, in denen aber nur sehr geringe Werte bis maximal 0,026% in Linie 6 quantifiziert werden konnten (Tab. 9B).

Konstrukt	Transgene Linie	Gesamtgehalt von Cyanophycin (mg/g des Trockengewicht)	Gehalt des unlöslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht)	Gehalt des löslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht)	Phäno- typische Verän- derungen
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	5	0,97	0,9	0,07	++
	6	0,71	0,6	0,11	++
	9	0,15	0,6	0,07	++
	13	1,85	0,35	1,5	++
PsbY-c <i>ph</i> A _{Te}	9	19,61	18,5	1,11	-
	10	24,7	23,9	0,8	-
	12	31,2	29,8	1,4	-
	23	8,7	8	0,7	-
	24	17,8	17,3	0.5	-

A Blatt

B Knolle

Konstrukt	Transgene Linie	Gesamtgehalt von Cyanophycin (mg/g des Trockengewicht)	Gehalt des unlöslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht)	Gehalt des löslichen Cyanophycins (mg/g des Trockengewicht)	Phäno- typische Verän- derungen
					kleine
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	5	0,11	0,11	n.n.	Knollen
	6	0,26	0,26	n.n.	kleine Knollen
	9	0,13	0,13	n.n.	kleine Knollen
	13	0,18	0,18	n.n.	kleine Knollen
PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	9	6,25	6,08	0,17	-
	10	8,54	8,22	0,32	-
	12	8,26	7,85	0,41	-
	23	7,83	7,53	0,3	-
	24	4,18	3,96	0,22	-

Tabelle 9: Vergleich des Cyanophycingehaltes im Blatt (A) und in der Knolle (B) von transgenen FNRcphA_{Te} und PsbY-cphA_{Te} Kartoffellinien (n.n. nicht nachgewiesen). Die Anzahl der + Zeichen zeigen den Grad der phänotypischen Veränderungen an.

Eine deutliche Steigerung des Polymergehaltes konnte im Blatt und der Knolle der untersuchten PsbY-*cph*A_{Te} Linie detektiert werden, in denen im Verhältnis lösliche zu unlöslicher Form, die unlösliche überwiegt. Im Blatt treten starke Schwankungen des Gesamtgehaltes von 0,8 bis 3,1% des TG auf (Abb. 9A), was auf den individuellen Level der Transgenexpression zurückzuführen ist. Ähnliche Schwankungen sind auch in der Knolle zu beobachten, bei denen die maximale Cyanophycinproduktion bei 0,85% des TG lag (Abb. 10B).

In den untersuchten FNR-*cph*A_{Te} Pflanzen wurde die Cyanophycingranula nur im Cytoplasma nachgewiesen, was die Vermutung zulässt, dass die Cyanophycin-Synthetase nicht in die Plastiden integrieren konnte. Die starken Stresssymptome am Blatt der Pflanzen und die geringe Knollenausbeute deuten darauf hin, dass die Cyanophycinakkumulation im Cytoplasma zu negativen Interaktionen mit dem Metabolismus dieses Kompartiments führen könnte. Diese Effekte konnten bei den PsbY-*cph*A_{Te} Linien nicht beobachtet werden, wobei hier das Polymer ausschließlich in den Plastiden von Blatt und Knolle vorliegt (siehe erzielte Ergebnisse AG Pistorius/Staiger).

Insgesamt führte die Verlagerung der Cyanophycin-Synthetase in die Plastiden der Zelle zum einen zu einer deutlichen Steigerung des Cyanophycingehaltes in den Knollen und zum anderen sind diese Hoch-Cyanophycin-produzierenden Linien in ihrem Phänotyp nicht durch Stresssymptome wie reduziertes Wachstum oder der Produktion von kleinen Knollen beeinträchtigt.

B3 Optimierung des Cyanophycin-Synthetasegens durch ein synthetisches Gen

Die Expression der Cyanophycin-Synthetase aus *T. elongatus* BP-1 führte in der ersten Förderperiode nur zu geringen Mengen der RNA in Pflanzen. Für eine Stabilisierung der RNA wurde ein synthetisches *cph*A Gen entworfen, das keine internen Spleißstellen aufweist und an den Codongebrauch von Kartoffelpflanzen angepasst ist. Nach bisherigen Erfahrungen führen solche synthetischen Gene zu einer deutlichen Steigerung der Expression. Das Gen wird zurzeit im Unterauftrag durch das Friedrich Löffler Institut auf der Insel Riems hergestellt und anschließend mit geeigneten Promotor- und Targetingsequenzen für den Import in Chloroplasten fusioniert und in die Kartoffelsorte Albatros eingebracht. Die Durchführung konnte, bedingt durch eine Erkrankung des Unterauftragnehmers, AG Keil Insel Riems, nicht planmäßig begonnen werden.

<u>B4 Analyse der Funktion von Genen in Pflanzen, die in Bakterien zur Produktion von löslichen Cyanophycin führen</u>

Von der AG Lockau wurde im Rahmen des Vorlaufprojekts ein nicht den Cyanobakterien zugeordnetes Bakterium (*Desulfitobacterium hafniense*) identifiziert, in dem eine lösliche Form des Cyanophycins produziert wird. Obwohl die transgenen konstitutiv cytoplasmatischen Cyanophycin-produzierenden Pflanzen eine Synthetase kodieren, die in Bakterien zur Bildung von granulärem Cyanophycin führt, bilden sie nur das lösliche Produkt oder kein Cyanophycin, sie scheinen die Produktion des löslichen Cyanophycins also besser zu verkraften. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Gen aus *Desulfitobacterium hafniense* besser zur Produktion einer Ausgangssubstanz für Polyaspartat geeignet sein könnte.

Der Kodierbereich (*cph*Al) des Gens wurde über PCR amplifiziert und mit dem konstitutiven CaMV35S Promotor fusioniert (Abb.11), um anschließend über die Gefrierschocktransformation in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 eingebracht zu werden.



Abb. 11: Plasmidkarte des Pflanzentransformationsvektors pLH*cph*Al zur konstitutiv cytoplasmatischen Expression eines Cyanophycin-Synthetasegens. *cph*Al: Kodierbereich des Cyanophycin-Synthetasegens aus *Desulfitobacterium hafniense*; p35S: konstitutiv cytoplasmatisch exprimierter 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikviruses; t35S: Blumenkohlmosaikvirus- 35S-RNA-Terminator; *neo*: Kodierbereich der Neomycinphosphotransferase, verleiht Kanamycinresistenz; Sm/Sp: bakteriell exprimiertes Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen; BL, BR: Randsequenzen der T-DNA

Molekulare Analyse der transgenen Tabakpflanzen zur Produktion von löslichen Cyanophycin

Der Pflanzentransformationsvektor wurde zur Erzeugung transgener Tabakpflanzen eingesetzt. Die dabei beobachteten Regenerationsraten und der Phänotyp der transgenen Pflanzen sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Konstrukt	Anzahl der	Spross/Explantat	Phänotypische
	Transformationen	(Mittelwert)	Veränderungen
p35S- <i>cph</i> Al	4	1,48	nein

Tab. 10: Übersicht über die Regenerationsraten und den Phänotyp des konstitutiv cytoplasmatischen Cyanophycin-Synthetasegens aus *D. hafniense* in Tabak.

Die Bestimmung der Regenerationsraten der transgenen Tabaksprosse kann einen ersten Aufschluss über die Verträglichkeit der Cyanophycin-Synthetase für die Pflanze liefern. Treten im Vergleich zum Kontrollvektor wiederholt erniedrigte Raten auf, weist dies darauf hin, dass die Expression des *cph*Al Gens oder die damit verbundene Produktion von löslichen Cyanophycin, schädlich für die Pflanzenzellen sein könnte. In vier unabhängigen Transformationen konnte im Vergleich zur transgenen Kontrolle, die nur das *npt*II Gen exprimiert, kein Unterschied in den Regenerationsraten bestimmt werden. Auch der Phänotyp der regenerierten transgenen Pflanzen unterschied sich nicht von dem der Wildtyppflanze.

Mit Hilfe der PCR wurde in den regenerierten transgenen Tabakpflanzen die Anwesenheit des *cph*Al Gens im pflanzlichen Genom überprüft. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der Transkription durch die Verwendung der RT-PCR. Mit Hilfe der RT-PCR-Technik können nur durch die Primer vorgegebene Abschnitte der Ziel-

40

mRNA dargestellt werden. Dabei wurde in 35 von 49 untersuchten transgenen Linien die Expression des *cph*Al Gens ermittelt (Abb. 12).



Abb. 12: Nachweis der *cph*Al m-RNA über die RT-PCR von 6 transgenen Tabakpflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Von der RNA wird hierbei für die nachfolgende PCR die entsprechende cDNA mit Hilfe der reversen Transkriptase erstellt (RT-PCR). Um DNA-Kontaminationen und DNA-PCR-Produkte ausschließen zu können, wurde die RNA mit einer DNase behandelt. Die entsprechend gekennzeichneten Kontrollen (-) wurden ohne den Zusatz des Enzyms der reversen Transkriptase durchgeführt. Die Größe der m-RNA beträgt durch sequenzspezifische Primer 800 bp. wt: Tabak SRI Wildtyp; +: Nachweis der cDNA über *cph*Al Primer; -: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase.

Analyse des Cyanophycingehaltes in transgenen Tabakpflanzen zur Produktion von löslichen Cyanophycin

Erste transgene Linien in denen die Expression der Cyanophycin-Synthetase nachgewiesen werden konnte, wurden zur Analyse des Cyanophycingehaltes in die AG Lockau versand. In diesen Pflanzen wurde weder die erwartete wasserlösliche Form, noch das unlösliche Cyanophycin nachgewiesen werden. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt nur drei Pflanzen analysiert werden konnten, ist es durchaus möglich, dass in weiteren Linien die lösliche Form des Polymers im Cytoplasma nachzuweisen ist.

Optimierung des Nachweisverfahrens zur Bestimmung des Cyanophycingehaltes

In den vorangegangenen Analysen wurden in der AG Lockau die beiden Formen des Cyanophycins (lösliche und unlösliche) getrennt bestimmt (Abschlußbericht FKZ: 98NR090). Dieses Verfahren konnte durch bestimmte Modifikationen deutlich vereinfacht werden, so dass der Gehalt beider Formen des Cyanophycins zusammen schneller bestimmt werden kann. Im Anschluss erfolgt das enzymatisch-optische Verfahren zur Quantifizierung von Cyanophycin (Abb. 13).



Summe: Cyanophycin + H₂O + α -Ketoglutarat + NADH + H⁺ \rightarrow Glutamat + Arginin + Lysin + Malat + NAD⁺

Abb13: Die Reaktionen der enzymatisch-optischen Quantifizierung von Cyanophycin. Cyanophycin wird durch Cyanophycinase und Isoaspartyldipeptidase vollständig zu Aspartat, Arginine und Lysin hydrolysiert. Die beiden anschließenden Reaktionen sind die Teilreaktionen eines etablierten Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Aspartat (Möllering 1985).

<u>B5 Koordination der Kultivierung transgener Pflanzen im Gewächshaus und Freiland</u> zur Analyse der Cyanophycin-Produktion

Da die artifiziellen Kultivierungsbedingungen in vitro durchaus die "Fitness" und die Stärke der Transgenexpression in Pflanzen beeinflussen könnten, müssen die vorher durchgeführten Untersuchungen zunächst im Gewächshaus und anschließend im wiederholt werden. Bereits 2006 wurden zwei transgenen PsbY-cphA Freiland Kartoffellinien von der Universität Rostock und der NORIKA freigesetzt. Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit erteilte die Erlaubnis zur Freisetzung auch für die Jahre 2007 und 2008. Die Cyanophycin-produzierenden Pflanzen speichern das Polymer aus Aspartat und der Stickstoff-reichen Aminosäure Arginin. Im Freiland soll ermittelt werden, ob dieser erhöhte Stickstoff-Bedarf von zwei transgenen Kartoffellinien durch veränderte Stickstoffgaben ausgeglichen werden muss. Dazu werden in den drei Versuchsjahren vergleichende Versuche mit in-vitro Pflanzen sowie mit knollen-bürtigen Pflanzen durchgeführt. Dabei soll das Stickstoff-Angebot auf ein Minimum für ausreichendes Wachstum der verwendeten Wildtypsorte reduziert werden. Haben Cyanophycin-produzierende Kartoffeln einen höheren Bedarf, so wird dies im Feld bei Versorgung im untersten Niveau deutlich.

Im Rahmen der ersten Förderperiode konnte der Freisetzungsversuch für 2006 durchgeführt werden. Die Analysen zur Bestimmung des Cyanophycingehaltes, Identifikation und Lokalisation des Cyanophycins, sowie der Bestimmung des Stickstoff- und Stärkegehaltes sind erst im Rahmen der zweiten Projektphase möglich.

B6 Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Pflanzen

Ein entscheidender Aspekt bei der Produktion von Biopolymeren in transgenen Pflanzen ist deren Isolierung aus der pflanzlichen Matrix. Dabei sollte möglichst auf bestehende Prozesse eingegangen werden, um die Aufarbeitungskosten so gering wie möglich zu halten und eine Wirtschaftlichkeit der Polymere gegenüber ihren chemisch synthetisierten Analoga zu gewährleisten (Daten zur Gewinnberechnung siehe Tab. 13). Für die Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen ist eine Angliederung an den großtechnischen Stärkeaufarbeitungsprozess geplant. Ein Besuch bei der Firma Emsland Stärke brachte dafür die nötigen Anregungen. Mit dem gewonnenen Einblick in den Verarbeitungsprozess der Kartoffelknollen wurde folgendes Schema (Abb. 14) entwickelt, nachdem die Aufarbeitung der transgenen Pflanzen im Labor erfolgen sollte.



Abb. 14: Schematische Darstellung der großtechnischen Kartoffelaufarbeitung. Rot gekennzeichnet: Theoretische Isolierungsstellen für Cyanophycin im Prozess.

Eine besondere Schwierigkeit bei der Aufarbeitung von Kartoffeln liegt in der enzymatischen Bräunung. Diese wird durch Polyphenoloxidasen hervorgerufen (Weaver 1974). Polyphenoloxidasen sind in vielen Pflanzen vorhanden. Sie katalysieren eine Reaktion von phenolischen Substraten mit Luftsauerstoff zu quinoiden Substanzen, die der Polymerisation unterliegen können (Abb. 15).



Abb. 15: Reaktionsschema der Polyphenoloxidasen.

Diese polymeren Strukturen sind zu meist stark gefärbt und besitzen anti-fungale Wirkungen. Sie sind somit für den Schutz der Pflanzen von großer Bedeutung und werden bei jeder Beschädigung der Pflanzenhülle gebildet und freigesetzt (2).

Bei der Verarbeitung von Kartoffelprodukten sind sie unerwünscht. Die Färbung beeinträchtigt die Qualität der gewonnenen Produkte, daher ist es unerlässlich, die für die Bräunung verantwortlichen Enzyme während der Verarbeitung der Kartoffel zu inhibieren bzw. ganz zu zerstören.

Dafür aibt es verschiedene Lösungen, eine ist die Arbeit in einer Schutzgasatmosphäre aus SO₂, dadurch wird die Oxidation der phenolischen Substrate, an den Schnittflächen, mit Luftsauerstoff unterbunden (2). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, verschiedene Inhibitoren in den Aufarbeitungsprozess einzubringen. Bei der Stärkeproduktion wird dem Waschwasser Natriumhydrogensulfit zugesetzt und somit die Reaktion der Polyphenoloxidasen unterdrückt.

Auch in dem im Labormaßstab entwickelten Aufarbeitungsprozess der transgenen Kartoffeln ist der Zusatz von Inhibitoren wichtig. Hierbei geht es weniger um die Qualitätssicherung, sondern eher darum, eine Oxidation des Cyanophycins mit den quinoiden Substanzen zu vermeiden. Es ist bekannt, dass diese Verbindungen nicht nur zur Reaktion untereinander neigen, sondern auch Reaktionen mit Aminosäuren und reduzierenden Zuckern sind denkbar (Robertson et al. 1996). Das würde zu einem Abbau des Biopolymers führen, das bekanntermaßen nur aus Arginin- und Aspartateinheiten besteht.

Die exakt benötigte Menge an Natriumhydrogensulfit muss noch experimentell bestimmt werden, eine 2% ige Lösung unterdrückt die Reaktionsfähigkeit der Enzyme für mehrere Tage, wahrscheinlich wäre aber auch weniger ausreichend.

Aus den Eigenschaften des Biopolymers Cyanophycin ergeben sich zwei Stellen im Prozess, an denen eine Abtrennung sinnvoll erscheint (Abb. 14).

Die wasserlösliche Form des Polymers wird sich mit den restlichen Kartoffelproteinen in der Waschlösung befinden, mit deren Hilfe die Stärke aus den aufgebrochenen Zellen gewaschen wird.

Die zweite Form des Cyanophycins, die nur bei pH-Werten kleiner 2 oder größer 9 löslich ist (Frey *et al.* 2002), wird zusammen mit der Stärke aus den Zellen ausgespült. Für eine weitere Aufreinigung der wasserunlöslichen Form muss in einem zweiten Schritt die abzentrifugierte und getrocknete Stärke mehrfach mit 0,1M Salzsäurelösung gewaschen werden. Dadurch erfolgt die Abtrennung des Cyanophycins von der Stärke. Anschließend muss die saure Lösung mit 1M Natronlauge neutralisiert werden, um das Polymer auszufällen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mit Hilfe einer Speedvakuum Anlage getrocknet (Abb. 16).



Abb. 16: Schematische Darstellung des Aufarbeitungsprozesses im Labormaßstab für die wasserunlösliche Form des Cyanophycins.

Diese Methode wurde in Anlehnung an die Isolierung von Cyanophycin aus Cyanobakterien entwickelt. Es konnte bei den Bakterien gezeigt werden, dass durch die saure Aufarbeitung bis zu 69% des Cyanophycins im ersten Extraktionsschritt isoliert werden können (Frey *et al.* 2002). In wie weit dieses Ergebnis auf die Extraktion aus Kartoffeln übertragbar ist, wurde noch nicht untersucht.

Die bisher für die Isolierungsversuche verwendete transgene Kartoffellinie PsbY $cphA_{Te}$ Linie 12 enthält 0,83% Cyanophycin (Gesamtgehalt bestimmt durch die AG Lockau (Ziegler *et al.* 2002); unlösliche Form 0,79% und lösliche Form 0,04%). Da Kartoffeln zu etwa 75% aus Wasser bestehen (25% Feststoffanteil), müsste es also möglich sein, bei eingesetzten 100g pro Isolierungsversuch, rund 200mg Cyanophycin (unlösliche Form) aus den Knollen zu extrahieren.

Bei den Isolierungsversuchen können mit den zwei Fällungsschritten mit 1M Natronlauge etwa 342 mg Feststoff isoliert werden (Abb. 17). Diese Masse überschreitet die berechnete Menge an zu isolierendem Cyanophycin deutlich. Dass deutet darauf hin, das trotz der sauren Aufarbeitung kein reines Cyanophycin (unlösliche Form) gewonnen werden konnte.



Abb. 17: Beispiel für die beiden isolierbaren Cyanophycin-Fraktionen aus der transgenen Kartoffellinie PsbY-*cph*A_{Te} Linie 12.

Die AG Lockau wird von dem isolierten Material eine Gelelektrophorese-Analyse durchführen und die Reinheit bestimmen.

Im bisherigen Verlauf des Projektes ist es also gelungen ein Konzept für die Isolierung des Cyanophycins zu entwickeln und in ersten Versuchen konnte eine wasserunlösliche Fraktion gewonnen werden, die im weiteren Verlauf auf ihre Reinheit untersucht werden muss. Im Anschluss daran ist ein nun wichtig den Prozess im Labormaßstab weiter zu optimieren, vor allem in Hinblick auf den Zusatz des Polyphenoloxidaseinhibitors und der benötigten Waschgänge, um am Ende der Aufarbeitung ein möglichst reines Cyanophycin (wasserunlösliche Form) zu erhalten.

Die Aufreinigung der wasserlöslichen Polymerform steht noch aus. Bisher war hier eine Trennung von den übrigen Kartoffelproteinen nicht erfolgreich. Im Hinblick auf Punkt B4 des Abschlussberichtes scheint es aber gerade an dieser Stelle des Isolierungsprozesses dringenden Forschungsbedarf zu gegeben. Wenn die Produktion des Cyanophycins in den Kartoffelknollen auf die Seite der wasserlöslichen Form hin verschoben wird, ist umso wichtiger eine Aufarbeitung und Aufreinigung dieser Fraktion zu gewährleisten. Erste Vorüberlegungen zeigen, dass der Einsatz von chromatographischen Adsorbenzien bei der Abtrennung denkbar ist, um diese Fragstellung zu bearbeiten.

Weitere Untersuchungen der AG Kragl hinsichtlich des Gesamtproteingehaltes der transgenen Pflanzen

Neben der Isolierung des Cyanophycins aus den transgenen Pflanzen ist im Laufe des Projektes die Frage nach dem Gesamtproteingehalt immer interessanter geworden. Wird das Cyanophycin zusätzlich zu den normalen Proteinen in den transgenen Pflanzen gebildet oder geschieht dies auf Kosten der anderen Proteine.

Für die Messung des Gesamtproteingehaltes gibt es verschiedene Möglichkeiten. Hier wurde eine Bestimmung mittels Elementarzusammensetzung gewählt. Dabei werden die zu untersuchenden Proben mit Hilfe eines Verbrennungsanalysators untersucht. Die Probe wird oxidiert und die einzelnen Elemente können quantitativ ermittelt werden. Stickstoff wird zu Stickoxiden (NO_x), Kohlenstoff zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasserstoff zu Wasser (H₂O). Anschließend werden diese Gase über eine Reduktionssäule geleitet und wieder in ihre reduzierte elementare Form überführt und chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgt Wärmeleitfähigkeitsdetektor (Gebhardt 2005). Durch den mittels Vergleich verschiedener Pflanzenproben kann dann eine Aussage über den Einfluss des Cyanophycins auf den Proteingehalt getroffen werden.

Für diese Messungen konnten nur Blattproben von transgenen Tabakpflanzen verwendet werden, da nicht genügend Proben von Kartoffelknollen vorlagen.

Von der AG Broer herangezogene Tabakpflanzen wurden also nach dem oben beschriebenen Schema analysiert. Dabei wurden folgende Aspekte betrachtet:

- 1) Vergleich des Blattstickstoffgehaltes innerhalb einer Pflanze und
- 2) Vergleich von transgenen Pflanzen (PsbY- *cph*A_{Te}) mit Wildtyppflanzen.

Stickstoffverteilung in den Blättern einer Pflanze



Abb. 18: Nummerierung der Tabakblätter von unten beginnend nach oben bis zum letzten jüngsten Blatt.

Aus Abbildung 19 wird deutlich, dass einerseits innerhalb der Pflanze eine scheinbare Stickstoffanreicherung in den jüngeren Blättern (Blattnummerierung siehe Abbildung 18) stattfindet und andererseits der Stickstoffgehalt in den transgenen Tabakblättern fast immer deutlich höher ist, als in den Blättern der isogenen Vergleichspflanze.



Abb. 19: Diagramm zur Verteilung des Stickstoffs in den Blättern einer Tabakpflanze (Blattnummer 2 entspricht einem alten Blatt und Blattnummer 14 einem jüngeren Blatt siehe Abb. 17)

Diese Messungen konnten bisher allerdings nur anhand einer Pflanze vorgenommen werden. Um die Ergebnisse zu verifizieren, müssen diese Messungen wiederholt werden.

Stickstoffgehalt in isogenen und transgenen Tabakblättern im Vergleich

Bei der Untersuchung von verschiedenen transgenen PsbY-*cph*A_{Te} Tabaklinien und deren Stickstoffgehalt in ausgewählten unteren und oberen Blättern zeigt sich dasselbe Bild (Abbildung 20). Der Stickstoffgehalt ist in den unteren Blättern wieder kleiner als in den jüngeren oberen Blättern. Im Vergleich zu den Kontrollen LH9000 und Wildtyp Tabak zeigt sich in den unteren Blättern keine deutliche Anhebung des Gesamtstickstoffgehaltes. Bei den oberen Blättern könnte man von einer leichten Erhöhung sprechen.



Abb. 20: Vergleich des Gesamtstickstoffgehaltes in verschiedenen PsbY-*cph*A_{Te} Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und Wildtyp).

Die Frage nach einer Beeinträchtigung des Gesamtproteingehaltes durch die Synthese von Cyanophycin in den transgenen Pflanzen kann an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden. Es müssen dazu noch weitere Messungen erfolgen, die die bereits ermittelten Daten untermauern. Bisher lässt sich nur feststellen, dass in den jüngeren Blättern aufgrund einer erhöhten Stoffwechselaktivität mehr Stickstoff zu messen war, als in den älteren Blättern.

Es wird auch in Erwägung gezogen, weitere Methoden zur Messung des Gesamtstickstoffgehaltes anzuwenden. Zum Beispiel die Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Test. Dieser hat im Vergleich zur Elementaranalyse den Vorteil, das nur Proteine nachweisbar sind und nicht alle stickstoffhaltigen Substanzen aus der Blattprobe mit in die Messergebnisse einfließen (*BCA-Test*.

Reaktion von Proteinen mit Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen in alkalischem Milieu, und anschließende Chelatisierung der Kupfer(I)-Ionen durch zwei Bicinchoninsäuremoleküle, der Komplex kann dann bei 562nm photometrisch quantifiziert werden können).

Literatur

Frey, K. M., F. B. Oppermann-Sanio, H. Schmidt, and A. Steinbuchel, 2002 Technical-scale production of cyanophycin with recombinant strains of Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3377-3384.

Gebhardt, S. (2005) Organisch-geochemische Untersuchungen der Oberflächengewässer aus dem Einzugsgebiet der Sielacht Esens (Ostfriesland). Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Dissertation."

Möllering, H. (1985) L-aspartate and L-asparagine. *In* Methods of Enzymatic Analysis 3rd edn. Vol. VIII (Bergmeyer, H.U. Bergmeyer, J. & Grassl, M., eds.) pp. 350-357. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Robertson, C. und Christensen G. (1996). Enzymatic browning inhibitors: Factors which interfere or prevent polyphenoloxidase from oxidizing phenolic compounds in tissues and creating brownish polymers. (NFM 425)

Weaver, C.M. (1974). Factors Influencing Enzymatic Browning of Ripening Bananas. Department of Foods and Nutrition, Oregon State University Master of Science Thesis.

[2] www.towson.edu/csme/mctp/Journeys/DENNIST.DOC

Ziegler, K., R. Deutzmann, and W. Lockau, 2002 Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: Characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of Desulfitobacterium hafniense. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **57**: 522-529.

II.1.2 erzielte Ergebnisse der Universität Bielefeld

Teilvorhaben: Untersuchungen zum Nachweis und zur Optimierung der Cyanophycin-Produktion in transgenen Pflanzen

Die Arbeiten in der vorangegangenen Phase I hatten gute Voraussetzungen für die Untersuchung der transgenen Pflanzen geschaffen, die es ermöglichen, umfassende Aussagen über Vorhandensein sowie Lokalisation und Menge von Cyanophycin in transgenen Pflanzen zu machen. Die Arbeiten in der gegenwärtigen Antragsperiode hatten ihren Schwerpunkt in der Charakterisierung der großen Anzahl der in der AG Broer konstruierten Pflanzen, und zwar unter Einsatz von lichtmikroskopischen, elektronenmikroskopischen und immunocytochemischen sowie physiologischen Methoden. Es sollte vor allem geklärt werden, in welchen Mengen, in welcher Form (fest oder lose gepackt) und in welchem subzellulären Kompartiment Cyanophycin in den Blättern bzw. Speicherorganen der transgenen Pflanzen vorhanden ist. Ferner sollte untersucht werden, ob eine gesteigerte Cyanophycin-Produktion die Photosyntheseleistung der Pflanzen beeinträchtigt. Diese Analysen waren Basis für die Konzipierung weiterer Expressionskonstrukte zur Optimierung der Cyanophycin-Produktion und zur Erhaltung einer guten Fitness der transgenen Pflanzen.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Charakterisierung der aus der AG Broer angelieferten Pflanzen bzw. der zum Teil in Bielefeld angezogenen Pflanzen sind ausführlich in den Abbildungen 1 bis 22 im Anhang dokumentiert und werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

Analyse von Tabakpflanzen, die die Cyanophycin-Synthetase in den Chloroplasten exprimieren

Die während der Phase I erzeugten transgenen Tabakpflanzen, die die Cyanophycin-Synthetase (CphA) im Cytoplasma enthalten und für die wir eine Lokalisierung des Cyanophycins im Cytosol und gelegentlich im Zellkern nachgewiesen haben, wiesen sehr starke phänotypische Veränderungen auf. Deshalb wurde eine zweite Serie transgener Pflanzen erzeugt, die die Cyanophycin-Synthetase (CphA aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 – nachfolgend CphA_{Te} genannt) mit einem pflanzlichen Transitpeptid zum Transport in die Chloroplasten exprimieren.

Verwendet wurden das Transitpeptid der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase FNR (Lokalisierung an der Thylakoidmembran), des Chlorophyll-bindenden Lichtsammel-Chlorophyll-Proteins CP24 (Lokalisierung in der Thylakoidmembran), und des Photosystem II-Proteins PsbY (Lokalisierung in der Thylakoidmembran).

Die elektronenmikroskopischen Analyen (EM-Analysen) von Ultradünnschnitten nach Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid-Fixierung dieser drei transgenen Tabak-Pflanzen haben ergeben, dass Cyanophycin in den Blättern aller drei Pflanzen vorhanden ist. Bei den Pflanzen FNR-*cph*A_{Te} ist das Cyanophycin ausschließlich im Cytosol nachweisbar. In den Pflanzen CP24-*cph*A_{Te} ist das Cyanophycin ebenfalls überwiegend im Cytosol vorhanden, wird aber gelegentlich auch im Kern vorgefunden. Lediglich in den Tabak-Pflanzen PsbY- *cph*A_{Te} ist das Cyanophycin ausschließlich in den Chloroplasten vorhanden (Anhang Abb. 1 und 2). Somit ist lediglich das Transitpeptid des PsbY in der Lage, den Import der Cyanophycin-Synthetase in den Chloroplasten zu vermitteln (zumindest bei den Konstrukten, die in der AG Broer zum Einsatz kamen – siehe AG Broer). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Semidünnschnitten nach Naphtholblau-Färbung von Blättern der Tabak-Pflanzen PsbY-*cph*A_{Te} zeigen, dass die Mehrzahl der Chloroplasten erhebliche Mengen von Cyanophycin enthält (Anhang Abb. 3).

Es konnte weiter gezeigt werden, dass Cyanophycin in den Wurzeln aller drei Tabak-Pflanzen vorhanden ist. In den Pflanzen FNR-*cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} ist das Cyanophycin im Cytosol und in der Pflanze PsbY-*cph*A_{Te} in den Proplastiden nachweisbar (Anhang Abb. 4).

Analyse der Struktur des Cyanophycins in der Tabak-Pflanze PsbY-cphATe

Ein Vergleich von jüngeren und älteren Blättern der Tabak-Pflanze PsbY-*cph*A_{Te} hat ergeben, dass in den älteren Blättern mehr Cyanophycin als in den jüngeren Blättern vorhanden ist. Es wurden 8, 12 und 20 cm lange Blätter verglichen (Anhang Abb. 5). Mit zunehmender Gelbfärbung der Blätter entwickeln sich aus den Chloroplasten Gerontoplasten, allerdings nur in den transgenen Pflanzen und nicht im Wildtyp (WT). In den Gerontoplasten ist noch Cyanophycin nachweisbar. Allerdings liegt das Cyanophycin nicht mehr als ein kompaktes Granulum sondern in Form von locker gepackten Aggregaten vor (Anhang Abb. 6). Diese Aggregate werden von dem Anti-Cyanophycin-Antiserum erkannt, was beweist, dass es sich bei diesen lose gepackten Aggregaten auch tatsächlich um Cyanophycin handelt (Anhang Abb. 7).

Vergleich von Tabakblättern in verschiedenen Entwicklungsstadien bezüglich der Cyanophycin-Struktur

Es wurden die oberen, jüngeren und unteren, älteren Blätter der Tabakpflanzen PsbY-*cph*A_{Te}, der S₂-Generation, die im Gewächshaus in Bielefeld angezogen worden waren, auf Lokalisation und Struktur des Cyanophycins untersucht. Das Cyanophycin ist in allen Pflanzen im Chloroplasten lokalisiert. In den jüngeren Blättern liegt das Cyanophycin in einer kompakten Struktur in relativ fest gepackten Granula vor, während in den älteren Blättern das Cyanophycin in einer mehr oder weniger lockeren Struktur vorliegt (Anhang Abb. 8-10).

Messung der photosynthetischen Aktivität an intakten Blättern

Um festzustellen, ob die erhöhte energieaufwendige Produktion von Cyanophycin in den Chloroplasten Auswirkungen auf die photosynthetische Aktivität der transgenen Pflanzen hat, wurden Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen mit dem Chlorophyll-Fluorometer Photosynthesis Yield Analyzer - Mini-PAM durchgeführt. In der Tabelle 11 sind exemplarisch die Ergebnisse dargestellt, die mit der Tabak-Pflanze PsbY*cph*A_{Te} 51/3 (hohe Cyanophycin-Produktion) im Vergleich zum Wildtyp und zu der Pflanze mit leerem Vektor (LH9000) erhalten wurden (zwei Versuchsserien).

	Licht-adaptierte Pfl	anze	Dunkel-adaptierte Pflanze		
	Photosynthetischer	Photosynthetischer	Fluoreszenz:	Fluoreszenz:	
Pflanza	Yield	Yield	Fv / Fm	Fv / Fm	
1 Hall20	Junges Blatt	Älteres Blatt	Junges Blatt	Älteres Blatt	
SRI-WT:					
Pflanze A	0,589	0,596	0,819	0,800	
Pflanze B	0,689	0,577	0,809	0,813	
LH9000: Pflanze A Pflanze B	0,611 0,637	0,549 0,610	0,819 0,828	0,831 0,799	
PsbY- <i>cphA</i> _{Te} 51/3: Pflanze A Pflanze B	0,461 0,666	0,488 0,507	0,819 0,824	0,823 0,796	

Versuch A

Versuch B (7 Tage später)

	Licht-adapt	ierte Pflanze	Dunkel-adaptierte Pflanze	
Dflanza	Photosynthetischer Vield	Photosynthetischer Viold	Fluoreszenz:	Fluoreszenz:
r Hallze	Junges Blatt	Älteres Blatt	Junges Blatt	Älteres Blatt
SRI-WT:				
Pflanze A	0,462	0,546	0,819	0,822
Pflanze B	0,533	0,312	0,836	0,826
LH9000:				
Pflanze A	0,727	0,414	0,830	0,824
Pflanze B	0,647	0,534	0,827	0,828
PsbY-cphA _{Te}				
51/3:	0,669	0,424	0,822	0,800
Pflanze A Pflanze B	0,690	0,386	0,779	0,810

Tab. 11: Vergleichende Untersuchungen des photosynthetischen Yields der Tabakpflanzen SRI Wt, LH9000 (leerer Vektor) und PsbY-cphA_{Te}. Der photosynthetische Yield wurde mit der Mini-PAM an Pflanzenblättern gemessen, die entweder Licht-oder Dunkel- adaptiert waren. Es wurde jeweils ein junges und ein älteres Blatt ausgewählt, und die Ergebnisse von zwei vergleichbaren Pflanzen sind dargestellt.

Die Messungen zeigten erhebliche Schwankungen, wenn vergleichbare Pflanzen oder junge mit alten Blättern verglichen wurden. Es kann jedoch aus diesen Messungen geschlossen werden, dass bei der Cyanophycin synthetisierenden Pflanze PsbY-*cph*A_{Te} keine signifikante Beeinträchtigung der photosynthetischen Aktivität besteht und die Pflanze deshalb eine vergleichbare Fitness wie die beiden Kontroll-Pflanzen (Wildtyp und Pflanze mit leerem Vektor) hat. Dies besagt, dass es durchaus möglich sein sollte, die transgene Cyanophycin produzierende Pflanze weiter zu modifizieren, um eine noch höhere Ausbeute an Cyanophycin zu erhalten.

Analyse der Blätter der Kartoffel-Pflanzen PsbY-cphATe und FNR-cphATe

Die mit den Blättern der transgenen Kartoffel-Pflanzen erhaltenen Ergebnisse entsprechen denen mit Tabak: Cyanophycin ist in den Blättern aller drei Pflanzen vorhanden. In FNR- *cph*A_{Te} und CP24-*cph*A_{Te} ist das Cyanophycin im Cytosol und in PsbY-*cph*A_{Te} im Chloroplasten nachweisbar (Anhang Abb. 11).

Allerdings scheint in älteren Blättern der Kartoffel-Pflanze PsbY-*cph*A_{Te} nicht wesentlich mehr Cyanophycin als in jüngeren Blättern vorhanden zu sein (Anhang Abb. 12), wie das in Tabak der Fall ist (Anhang Abb. 5). Ein weiterer Unterschied zu Tabak ist, dass in den leicht gelb-grünen Blättern noch reguläre Chloroplasten vorliegen, in denen das Cyanophycin in kompakt gepackten Granula wie in grünen Blättern vorliegt (Anhang Abb. 12).

Charakterisierung der Knollen der Kartoffel-Pflanzen FNR-cphATe und PsbY-cphATe

In der Knolle der Pflanze FNR-*cph*A_{Te} ist das Cyanophycin im Cytosol lokalisiert, während in der Knolle der Pflanze PsbY-*cph*A_{Te} das Cyanophycin in den Amyloplasten vorhanden ist (Anhang Abb. 13 und 14). Das Vorliegen von Cyanophycin in den Amyloplasten ist besonders gut in den sehr kleinen Knollen von ca. 1mm Länge zu sehen, in denen die Strukturen noch klar erkennbar sind (Anhang Abb. 13).

<u>Charakterisierung der Kartoffel-Pflanzen B33-*cph*A_{Te}, die die Cyanophycin-Synthetase unter Kontrolle des knollenspezifischen Patatin-Promotors exprimieren</u>

Die Analyse von vier Linien ergab, dass in den Blättern der Kartoffel-Pflanzen B33*cph*A_{Te} kein Cyanophycin nachweisbar ist (Anhang Abb. 15).

Wie erwartet, war in den Knollen der Kartoffel-Pflanzen B33-*cph*A_{Te} Cyanophycin im Cytosol nachweisbar (untersucht wurden die Knollen von insgesamt zwölf B33*cph*A_{Te}-Linien). Mit Ausnahme der Linie 56 war in allen Linien in den Knollen Cyanophycin nachweisbar (Anhang Abb. 16-19).

Einige der Kartoffel-Pflanzen der Linien B33-*cph*A_{Te} bilden Luftsprosse mit kleinen Knollen aus (gezeigt für die Linien 7, 17 und 33), während die Linie 44 Sprossähnliche Stränge ausbildet (Anhang Abb. 20). Für die Linie 7 wurde gezeigt, dass der Spross, die Knollen und die kleinen Blättchen auf den Knollen Cyanophycin enthalten (Anhang Abb. 21).

Im Anhang Abb. 22 ist die Ausbeute an Kartoffelknollen von B33-*cph*A_{Te}-Linien im Vergleich zum Wildtyp und der Pflanze mit dem leeren Vektor gezeigt. In den Cyanophycin synthetisierenden Pflanzen sind die Kartoffelknollen wesentlich kleiner als im Wildtyp. Allerdings ist die Anzahl an Knollen in den transgenen Pflanzen erheblich größer als im Wildtyp, so dass in den meisten Linien das Gesamtgewicht der produzierten Knollen nur unwesentlich kleiner ist als im Wildtyp (z. B. Linie 33: Gewicht der Knollen 662 g, Wildtyp: Gewicht der Knollen 768 g). Das Gesamtgewicht

der Knollen der transgenen Pflanze kann aber auch um mehr als 50 % geringer als im Wildtyp sein (z. B. Linie 7: Gewicht der Knollen 302 g im Vergleich zu 768 g beim Wildtyp).

II.1.3 erzielte Ergebnisse der Universität Tübingen

Teilvorhaben: Optimierung der Fitness von Cyanophycinproduzierenden Pflanzen durch die Bereitstellung von transgenen Enzymen der Aminosäurebiosynthese

A Analyse der transgenen Pflanzen

A.1 Immunologischer Nachweis

Die Gene glnA und gInII aus Streptomyces coelicolor codieren für Glutaminsynthetasen (GSI bzw. GSII), welche Schlüsselenzyme des Stickstoff-Metabolismus sind. Beiden Gene wurden zur Stoffwechsel-Optimierung in Cyanophycin-produzierende Pflanzen eingebracht. Um GSI und GSII in Pflanzen immunologisch nachweisen zu können, sollten spezifische polyklonale Antikörper hergestellt werden. Hierfür wurden beide Gene in Escherichia coli heterolog exprimiert und die Enzyme über His-tag mittels Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die gereinigten Proteine wurden zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern an die Firma Seglab (Göttingen) übermittelt. Verschiedene Bleedings (first, second und final) wurden auf Spezifität und Sensitivität überprüft und die optimale Antikörper-Konzentration ermittelt. Mit den polyklonalen Antiseren gegen GSI und GSII ist es möglich, die Enzyme hochspezifisch qualitativ und quantitativ in unterschiedlichen biologischen Proben nachzuweisen (z.B. Kartoffelknolle, Tabak). Außerdem kann in zukünftigen Experimenten die subzelluläre Lokalisation über bildgebende mikroskopische Verfahren (Immunfluoreszenz, Immunogold) untersucht werden. So kann z.B. bestimmt werden, ob sich das Enzym im selben Zellkompartiment wie die Cyanophycin-Synthetase befindet.

A.2 Ermittlung der GS-Aktivität in transgenen Pflanzen

Zur Bestimmung der GS-Aktivität wurde der GS-Transferase-Assay etabliert und optimiert. Dabei wird durch Zugabe von Arsenat und ADP eine nicht-physiologische Reaktion der Gutaminsynthetasen erzwungen. Das Produkt dieser Reaktion kann über eine Farbreaktion photometrisch nachgewiesen werden. Der große Vorteil dieses Systems ist der Nachweis von GS-Aktivität direkt im Zellextrakt.

Ziel war es, die Sensitivität des Assays zu optimieren und gleichzeitig ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Deshalb wurde ein Protokoll zur Assay-Durchführung im Mikrotiter-Maßstab entwickelt. Mit diesem optimierten Protokoll können mit hohem Probendurchsatz Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden. Außerdem wurden die optimalen Assay-Parameter zum Nachweis von GSI und GSII aus *S. coelicolor* bestimmt. Somit kann die GS-Aktivität in verschiedenen transgenen Pflanzenlinien schnell und reproduzierbar detektiert werden.

A.3 HPLC-Untersuchungen zur Stoffwechselkontrolle in transgenen Pflanzen

Diese Arbeiten waren ursprünglich für den zweiten Teil der Förderphase vorgesehen (Monate 19-36, siehe Balkenplan 1.3.3). Sie wurden in diesen Teil der Förderphase vorgezogen, um mögliche Mangelzustände bezüglich der Aminosäure-Zusammensetzung in den bereits vorhandenen transgenen Pflanzenlinien zu identifizieren. Anhand dieser Erkenntnisse können dann für den zweiten Teil der Förderphase gezielte Optimierungsstrategien entwickelt werden (siehe B).

Das in der Arbeitsgruppe Wohlleben eingesetzte Protokoll zur HPLC-basierten Aminosäure-Analytik wurde weiter optimiert. Ein Verfahren zum automatisierten Zellaufschluss wurde etabliert. Mit dem Precellys-Gerät können parallel bis zu 24 Proben aufgeschlossen werden. Der große Vorteil gegenüber dem bisherigen Zellaufschluss über Mörsern ist die hohe Reproduzierbarkeit und der Zeitgewinn. Mit diesem System ist es möglich, auch die Analyse umfangreicher Probenmengen durchzuführen.

Mit dem optimierten Protokoll wurden von der Arbeitsgruppe Broer und NORIKA bereitgestellte Pflanzen analysiert. Untersucht wurden Kreuzungen zwischen Tabakpflanzen, die konstitutiv cytoplasmatisch die Cyanophycin-Synthetase exprimieren, mit Pflanzen. welche verschiedene Gene aus Aminosäurebiosynthesewegen enthalten. Kreuzungspflanzen mit dem glnA-Gen aus Escherichia coli wiesen starke Veränderungen in der Zusammensetzung der Fraktion der freien Aminosäuren auf, während die Zusammensetzung der Gesamt-Aminosäuren weniger stark variierte (Abb.21). Der Arginingehalt im Pool der freien Aminosäuren war deutlich reduziert, während sich der Gehalt an Aspartat und Glutamat verdoppelte (Abb.22). Dadurch konnte gezeigt werden, dass mit bakteriellen Stoffwechsel-Genen der Aminosäurepool beeinflusst werden kann.



Abb. 21: Zusammensetzung des Gesamt-Aminosäure-Pools verschiedener Kreuzungslinien von Tabak. SRI wt: Tabak Wildtyp; L29: 35S-*cph*A Linie 29, cytoplasmatische Expression; glnA: 35S*gln*A, *gln*A aus *E. coli*, cytoplasmatische Expression; Val = Valin; Tyr = Tyrosin; Ser = Serin, Phe = Phenylalanin; Met = Methionin; Lys = Lysin; Leu = Leucin; Ile = Isoleucin; His = Histidin; Gly = Glycin; Glu/Gln = Glutamat/Glutamin; Cys = Cystein; Asp/Asn = Aspartat/Asparagin; Ala = Alanin.



Abb. 22: Zusammensetzung des Pools freier Aminosäuren verschiedener Kreuzungslinien.

SRI wt: Tabak Wildtyp; **L29**: 35S-*cph*A Linie 29, cytoplasmatische Expression; **glnA**: 35S-*gln*A, *gln*A aus *E. coli*, cytoplasmatische Expression; Val = Valin; Tyr = Tyrosin; Ser = Serin, Phe = Phenylalanin; Met = Methionin; Lys = Lysin; Leu = Leucin; IIe = Isoleucin; His = Histidin; Gly = Glycin; Glu/Gln = Glutamat/Glutamin; Cys = Cystein; Asp/Asn = Aspartat/Asparagin; Ala = Alanin.

Außerdem wurden Tabakpflanzen analysiert, in welchen die Cyanophycin-Synthetase im Chloroplasten lokalisiert ist. Diese subzelluläre Enzym-Lokalisation hat sich als vorteilhaft für die Fitness der Pflanzen und die Cyanophycin-Ausbeute erwiesen. Der Gesamt-Aminosäuregehalt sowie der Pool der freien Aminosäuren wurden analysiert. Der Gehalt an Gesamt-Aminosäuren war in den transgenen Pflanzen im Vergleich zu den Wt-Kontrollen leicht erhöht. Im Pool der freien Aminosäuren konnten starke Schwankungen zwischen den einzelnen Pflanzenlinien festgestellt werden. Auffällig war eine Reduktion des Glutamatgehaltes in den Cyanophycin-produzierenden transgenen Pflanzenlinien. Offensichtlich wird dieser Mangel durch die Produktion von Cyanophycin ausgelöst. Dies könnte einen limitierenden Faktor bei der Optimierung der Cyanophycin-Produktion in Tabakpflanzen darstellen.

Wie gezeigt kann durch das Einbringen bakterieller Stoffwechsel-Gene der Aminosäure-Zusammensetzung von transgenen Pflanzen modifiziert werden. Dieser Ansatz kann als vielversprechende Strategie betrachtet werden, die Mangelzustände in Cyanophycin-produzierenden Pflanzen auszugleichen und damit die Ausbeute zu optimieren. Gerade das Einbringen von GS-Genen hat eine deutliche Erhöhung des Aspartatgehaltes in transgenen Pflanzen bewirkt (Abb.22). Gleichzeitig kam es zur Verringerung des Gehalts an Arginin. In zukünftigen Experimenten muss deshalb versucht werden, auch die Versorgung der Pflanze mit Arginin zu optimieren. Ein vielversprechender Ansatz ist hierbei das Einbringen bakterieller NAG-Kinase-Gene. Die NAG-Kinase bewirkt in Cyanobakterien eine Stimulierung der Arginin-Biosynthese. In der nächsten Förderphase soll versucht werden, diesen Effekt auf Cyanophycin-produzierende Pflanzen zu übertragen.

B. Konstruktion von AS-Biosynthese-Vektoren zur Transformation und Expression in Pflanzen

Zur Optimierung der Cyanophycin-Produktion sollte der Aminosäure-Stoffwechsel optimiert werden. Hierfür wurden in Phase I bakterielle Stoffwechsel-Gene in Cyanophycin-produzierende Pflanzen eingebracht. Die Synthese der Enzyme erfolgte im Cytoplasma. Die Verlagerung der Cyanophycin-Produktion vom Cytoplasma in Chloroplasten brachte deutliche Fortschritte in Bezug auf die Fitness der Pflanzen und Cyanophycin-Ausbeute. Deshalb sollten auch die bakteriellen Enzyme im Chloroplasten lokalisiert sein. Diese Experimente werden im zweiten Teil der Förderphase durchgeführt (Monate 19-36, siehe Balkenplan 1.3.3). Stattdessen wurden die Experimente unter Abschnitt A.3 in diesen Teil der Förderphase vorgezogen. Diese waren ursprünglich erst im zweiten Teil der Förderphase vorgesehen. Durch diese Änderung können die Ressourcen effizienter genutzt werden. Über die HPLC-Analyse sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die genetischen Manipulationen aus Phase I auf die Aminosäure-Zusammensetzung der transgenen Pflanzen haben. Mit diesen Erkenntnissen können dann in der nächsten Phase gezielt Strategien umgesetzt werden, um etwaige Mangelzustände auszugleichen (siehe B.3).

Die über die HPLC-Analyse erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass Arginin ein entscheidender limitierender Faktor bei der Optimierung der Ausbeute sein kann. Deshalb soll das Hauptaugenmerk auf die Optimierung des Aminosäure-Stoffwechsels, besonders auf den Arginingehalt gerichtet werden. Entsprechende bakterielle Gene, wie zum Beispiel das NAG-Kinase-Gen, liegen in der Arbeitsgruppe vor und werden im nächsten Teil der Förderphase (Monate 19-36) in Pflanzen-Transformationsvektoren kloniert.

II.1.4 erzielte Ergebnisse der NORIKA

Teilvorhaben: Evaluierung von transgenen Cyanophycin produzierenden Kartoffelpflanzen und agrotechnische Optimierung der Kultivierung

D.1 In vitro Kultivierung und Regeneration

Die Darstellung der Arbeiten zur Transformation und Regeneration erfolgt im Abschnitt II.1.1 erzielte Ergebnisse der Universität Rostock, A Analyse der knollenspezifischen Expression des Cyanophycin-Synthetasegens *cph*A_{Te} aus Thermosynechococcus elongatus. Die in diesem Projektabschnitt erstellten transgenen Linien wurden für weitere Pflanzenerhaltung und Vermehrung in ein *in vitro* Depot überführt.

Im Laufe des Projektes wurde zwischen den transgenen Linien Unterschiede bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber Pathogenen ermitteltet. Diese Beobachtung erforderte zusätzliche begleitende Experimente. Deshalb wurden, neben den Untersuchungen zum Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Fitness der Pflanzen, Versuche zur Bestimmung der Pathogenanfälligkeit der transgenen Pflanzen durchgeführt.

Alle im Laufe der Forschungsarbeiten regenerierten und anhand der Cyanophycin-Genexpression ausgewählten transgenen Pflanzen wurden erfolgreich in die *in vitro* Kultivierung und Depothaltung aufgenommen. Jederzeit bestand Zugriff auf die entsprechenden Genotypen. Für die unterschiedlichen Kultivierungsversuche konnte auf die vorhandenen *in vitro* Pflanzen zurückgegriffen werden (Tab. 12).

Bezeichnung/Linie	Anzahl je Linie
wt	5
LH 9000/19	5
B33t35S/2	5
FNR- <i>cph</i> A _{Te} /9, 42	5
PsbY- <i>cph</i> A _{Te} /9, 10, 12, 23, 35	5
B33- <i>cph</i> A _{Te} /4, 6, 12, 21, 27, 31, 60	5
35S/205	5
	90
	Bezeichnung/Linie wt LH 9000/19 B33t35S/2 FNR-cphA _{Te} /9, 42 PsbY-cphA _{Te} /9, 10, 12, 23, 35 B33-cphA _{Te} /4, 6, 12, 21, 27, 31, 60 35S/205

Tab. 12: in vitro Depot zur Erhaltung der transgenen Pflanzen.

Donote

Dieses *in vitro* Depot war für den gesamten Projektverlauf zu unterhalten und als Quelle für die Vermehrung von Pflanzen sowie die Knollenproduktion zu nutzen.

D. 2 Kultivierung von Sorten/Linien im Gewächshaus

Die Kultivierung der Versuchspflanzen diente grundsätzlich zur Verfolgung von drei Zielen:

- Die Bewertung des Phänotyps der transgenen Pflanzen im Vergleich zur Ausgangspflanze
- 2. Die Gewinnung von Probenmaterial in Form von Blatt oder Knollenmaterial
- 3. Die Beurteilung des Ertragsvermögens der transgenen Linien

Bei der Bewertung der bislang erfolgten Pflanzenanzucht bei NORIKA ist zu berücksichtigen, dass die Gewächshausverhältnisse ein Leistungspotential der Kartoffel nur bedingt widerspiegelt. Der einjährige Freilandversuch ist gerade im Jahr 2006, mit der sehr späten Auspflanzung und den untypischen Wetterbedingungen, nur begrenzt aussagekräftig. Vor diesen Hintergrund stellen sich die Ergebnisse der Gewächshausanzucht wie folgt dar:

Bewertung des Phänotyps:

Die kultivierten transgenen Kartoffellinien zeigten im Laufe der Gewächshausanzucht keine nennenswerten phänotypischen Unterschiede im Vergleich zur Ausgangsform Albatros.

Gewinnung von Probenmaterial:

In den nachfolgenden Tabellen sind die für die Materialgewinnung angebauten Genotypen mit den erzielten Erträgen zusammenfassend dargestellt.

Sorte	Bezeichnung/Linie	Anzahl Knollen	Masse in g	Knollen/Pflanze
Albatros	WT1	102	1505,6	6,8
Albatros	LH9000	91	1623,1	6,1
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te} /10	119	944,6	7,9
Albatros	PsbY-cphA _{Te} / 12	154	1145,3	10,3
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te} /23	147	1355,2	9,8

1. Kultivierungszyklus:

2. Kultivierungszyklus:

Sorte	Bezeichnung/Linie	Anzahl Knollen	Masse in g	Knollen/Pflanze	Stärke in %
Albatros	WT1	107	2025	1,88	17,2
Albatros	B33t35S /3	107	1604	1,88	16,5
Albatros	35S /205	99	1699	1,74	18,5
Albatros	PsbY- <i>cph</i> A _{Te} /10	107	1605	1,88	15,6
Albatros	PsbY-cphA _{Te} /12	123	2093	2,16	16,8
Albatros	PsbY-cphA _{Te} /23	102	1645	2,68	16,2

Tab. 13: Kultivierungszyklen verschiedener transgener Kartoffelpflanzen für die Materialgewinnung.

Die in den Tabellen dargestellten Erträge der transgenen Linien erlauben keine abschließende Beurteilung des Ertragsvermögens. Einjährige Versuche sind dafür nicht heranzuziehen. In weiterführenden Experimenten muss wiederholt die Ertragsfähigkeit der transgenen Linien geprüft werden. Die transgenen Linien unterscheiden sich schon im Ertragsniveau im Vergleich zum Wildtyp zwischen erstem und zweitem Kultivierungszyklus.

D.3 Evaluierung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Fitness der transgenen Pflanzen und die Produktion von Cyanophycin

D.3.1. Test einiger transgener Linien auf erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen

Es wurden 5 transgene Linien der Sorte Albatros und deren Wildtyp getestet. Die Versuchsglieder wurden in unsteriler sowie steriler Erde im GWH angebaut. Der

unsterilen Erde wurde zusätzlich mit Pilzen (unter anderem Alternaria) belastetes Kartoffelkraut beigemengt.

Die Kultivierung in der sterilen Erde erfolgte auf Basis gedämpfter Topferde.

	Linien	Code	Anzahl Knollen/Pfl. im GWH	
			Sterile Erde	Unsteri. Erde
Albatros WT1	-	1T	2,9	2
B33t35S	3	2T	2,7	1,5
35S	205	7T	1,9	1,5
PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	10	8T	2,8	1,4
PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	12	9T	2,2	1,0
PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	23	10T	2,3	1,9
Bintje	-	-	2	2
Golden		-	9	9
wonder	-			

Übersicht zu den getesteten Sorten und Linien und deren Erträge pro Pflanze:

Tab. 14: Knollenerträge bei Kultivierung in steriler und unsteriler Erde.

Als Kontrolle dienten, neben dem Wildtyp Albatros, die weiteren Sorten Golden Wonder und Bintje. Die Beimengung von befallenem Kartoffelkraut zum Kultursubstrat hatte einen deutlichen Einfluss auf die Vegetationslänge und den Ertrag. Die Vegetationslänge bei den Pflanzen in steriler Erde, war ca.3-4 Wochen länger als bei jenen Pflanzen in unsteriler Erde. Der Ertrag der Pflanzen in unsteriler Erde war geringer als der Ertrag der Pflanzen in unbelasteter Erde.

Das Kraut der Pflanzen in unsteriler Erde war deutlich mit Pathogenen (Pilzen) befallen, während jenes bei den Pflanzen auf steriler Erde solche Symptome kaum zeigte. Beim Krautbefall schnitten die transgenen Linien nicht schlechter ab als der Wildtyp Albatros oder die Sorten Golden Wonder und Bintje. Die Linien PsbY-*cph*A_{Te} 10 und 23 waren deutlich geringer befallen als der Wildtyp. Aus einem akuten Krautbefall könnte aber nicht automatisch ein Pathogenbefall der Knollen während der Lagerung abgeleitet werden. Zwischen Krautbefall und Knollenfäule gab keine Korrelation. Die Linie PsbY-*cph*A_{Te} 10 zeigte in diesem als einzige Knollenverluste durch nekrotisches Gewebe nach Lagerung.

D.3.2. Bewertung der Pathogenanfälligkeit der Knollen des 2. Kultivierungszykluses

Während es beim obigen Test auch um Unterschiede in der Krautanfälligkeit der transgenen Linien zum Wildtyp ging, wurden im folgenden Unterschiede zwischen den Linien an Hand von Knollenmaterial bezüglich der Fäuleanfälligkeit und Ausprägung von nekrotischem Gewebe untersucht.

.Während der 12-wöchigen Lagerung bei NORIKA bei 4°C kam es bei einigen Linien zu Verlusten durch nekrotische Veränderung des Knollengewebes in Begleitung von Mischfäulen. Festgestellte Erreger waren *Erwinia carotovora* spp. und *Colletitrichum*.

In der tabellarischen Übersicht werden die Verhältnisse dargestellt:

Sorte	Bez./Linie	Code	Anzahl Knollen	Knollen / Pflanze	Masse gesamt in g	Verlust in Folge akuter Fäule in Gewichts- prozent	Restmasse in g
Albatros	WT1	1 T	107	1,88	2025	1	2009
	B33t35S /3	2 T	107	1,88	1604	4	1545
	35S /205	7 T	99	1,74	1699	1	1687
	PsbY-				1605	0	1605
	<i>срһ</i> А _{те} /10	8 T	107	1,88			
	PsbY-				2093	0	2093
	cphA _{Te} /12	9 T	123	2,16			
	PsbY-				1645	9	1500
	<i>срһ</i> А _{те} /23	10 T	102	2,68			

Tab. 15: Einfluss nekrotischer Veränderung und Fäulen auf das Gesamtgewicht der Knollen bei 12wöchiger Lagerung.

Von nekrotischer Veränderung und Fäulen waren demnach auch der Wildtyp betroffen. Die Verluste in Folge Fäule sind deshalb bei den Linien B33t35S /3 und 35S /205 im normalen Rahmen anzusiedeln. Die Linie PsbY-*cph*A_{Te} /23 neigt eindeutig zu mehr Fäulebefall und nekrotischer Gewebeänderung als die übrigen Linien. Dies zeigte sich auch deutlich im äußeren Erscheinungsbild des Knollenmaterials. Es zeigten ¼ der Knollen pathogene Abweichungen. Bei allen übrigen Linien, einschließlich des Wildtypen, wiesen die Knollen ein vitales Aussehen auf. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse unter D.3.1. trat bisher nur die Linie PsbY-*cph*A_{Te} 12 nicht auffällig in Erscheinung.

D.3.3. Beginn der Erzeugung von Mikroknollen bei ausgewählten folgenden Linien zur Erforschung der Ursache der Nekrosen in Knollengewebe.

Eine beabsichtigte sterile Kultivierung von Kartoffellinien in Topferde mit den Ziel, Pathogene als Ursache von Nekrosen an Knollen der transgenen Linien auszuschließen, war aus technischen Gründen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Versuch zur Produktion von Kartoffelknollen in künstlichem sterilem Substrat vor Ende der Projektförderphase in Angriff genommen.

Für die Produktion der *in vitro* Knollen unter sterilen Bedingungen wurden folgenden Kartoffellinien ausgewählt, vermehrt und zur Knollenproduktion inkubiert:

Albatros WT, Albatros PsbY- *cph*A_{Te} Linien 12 und 23, Albatros 35S Linie 205.

Der Versuch dauerte bei Projektende noch an.

II. 2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse und Erfahrungen

Das Projekt liefert Erkenntnisse, die Strategien auch für die Produktion anderer Stoffe in transgenen Pflanzen ermöglichen. Die erzielten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass eine erhöhte Polymerproduktion in Pflanzen möglich ist, ohne den Habitus der Pflanzen negativ zu beeinflussen. Damit bieten diese Pflanzen ein hohes Potential, zum einen für den Ersatz von Petrochemikalien, zum anderen einer besseren Ausnutzung Nachwachsender Rohstoffe.

Die gewonnenen Erkenntnisse zum knollenspezifischen GBSS Promotor schließen diesen für weitere Anwendungen in der Kartoffelknolle aus; hierbei sollte der Patatin B33 Promotor aufgrund seiner Gewebespezifität und hohen Expression bevorzugt werden. Für zukünftige Analysen zur Produktion von neuen Inhaltsstoffen in Plastiden spielen die Untersuchungsergebnisse zum Einfluss der Targetingeffizienz von Transitpeptiden auf die kodierende Sequenz des zu dirigierenden Proteins eine wichtige Rolle. Die Nutzung von vier verschiedenen Transitpeptiden machte deutlich, dass die Targetingeffizienz stark abhängig ist, von den verwendeten Sequenzen und dabei nicht alle gleich geeignet sind. Die Verlagerung der Cyanophycinproduktion in die Plastiden der Zelle führte zu einer deutlichen Steigerung um das 4-fache ohne den Habitus der Pflanzen negativ zu beeinflussen. Dies eröffnet Spielraum für eine weitere Steigerung der Cyanophycinproduktion durch zusätzliche Modifikationen wie der Integration von Expressions-steigernden oder -stabilisierenden Elementen.

Die Erhöhung des Aminosäurepools in Cyanophycin-produzierenden Linien ließ sich nicht realisieren, da sich im Projektverlauf zeigte, dass nicht wie bisher angenommen Aspartat die limitierende Aminosäure bei der Polymerproduktion darstellt, sondern Arginin. In einem geplanten Ansatz in der zweiten Förderperiode soll der leichten Reduktion der Regenerationsraten und den leichten Wachstumseinbußen in Hoch-Cyanophycin-produzierenden Pflanzen, durch Aufrechterhaltung des Stickstoffflusses in Richtung der Cyanophycin Synthese entgegengewirkt werden. Dazu werden Gene des Argininbiosyntheseweges zusätzlich in der Pflanze exprimiert. Hierbei ist von besonderem Vorteil, dass die bakteriellen Gene in ihren natürlichen Wirten anderen Regulationen unterliegen (Burillo, et al., 2004; Maheswaran, et al., 2004; Smith et al., 2004; Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995, Fink et al. 1999) als die entsprechenden Gene in Pflanzen.

Die ersten Ergebnisse zur Isolierung von Cyanophycin aus konventionellen Kartoffelsorten machen deutlich, dass sich Cyanophycin aus der Knolle, während der Simulation des industriellen Verarbeitungsprozesses, bei der Stärkegewinnung als Nebenprodukt isolieren lässt.

Die erzielten Erkenntnisse zur Polymerproduktion zeigen, dass durch verschiedene Strategien die Erhöhung der Produktmenge des Polymers, sowie die Entwicklung kostengünstiger Isolierungsmethoden im Rahmen des Projektes verwirklicht werden konnten.

II.3 Während der Bearbeitung bekannt gewordene Fortschritte auf dem untersuchten Gebiet

In der Projektlaufzeit konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen wichtige Erkenntnisse über die Regulation der essentiellen Aminosäure Arginin in Pflanzen und Cyanobakterien gewonnen werden. In Analysen der AG Wohlleben zum Aminosäuregehalt der Cyanophycinpflanzen konnte freies Aspartat, nicht aber freies Arginin gemessen werden. Arginin scheint also die limitierende Aminosäure für die Cyanophycinproduktion zu sein. Das Schlüsselenzym der Argininbiosynthese stellt die NAG (N-Acetylglutamat)-Kinase dar, deren Aktivität vom PII Protein reguliert ist, dass als Signalprotein zwischen Bakterien, Archaeen und Pflanzen weit verbreitet (Ninfa et al.2000; Arcondeguy et al. 2001; Forchhammer et al. 2004), und hoch konserviert ist. Es dient als Sensor in der Regulation der Stickstoffassimilation. Sowohl in Pflanzen, als auch in Cyanobakterien sind diese Schlüsselenzyme der Arginin-Biosynthese in den Plastiden lokalisiert (Sugiyama et al., 2004; Chen et al., unveröffentlicht; Forchhammer et al., 1994). Durch die Aktivität des PII Proteins ist in Thermosynechococcus elongatus bei hoher Stickstoffverfügbarkeit eine Steigerung der NAGK-Aktivität, um das 40-fache möglich (Heinrich et al., 2004; Maheswaran, et al., 2004). Bei Expression der NAGK in Cyanophycin-produzierenden Pflanzen sollte so der erhöhte Argininbedarf gedeckt werden können. Die Regulation der bakteriellen NAGK sollte vom pflanzlichen hochkonservierten PII Protein übernommen werden.

Weiterhin erfolgten zahlreiche Veröffentlichungen, hauptsächlich Reviews, zur Gesamtthematik der Produktion nachwachsender Rohstoffe und insbesondere von Biopolymeren (Menassa *et al.* 2004; Yang *et al.* 2005; Howard 2005; Howard & Hood 2005; Scheller & Conrad 2005; Conrad 2005; Fox 2006; Mullins *et al.* 2006).

II. 4 Veröffentlichungen/ geplante Veröffentlichungen

Poster:

- 1. "Produktion eines biologisch abbaubaren Kunststoffes in transgenen Pflanzen", Biotechnica 2005 in Hannover
- 2. "Bioplastic in transgenic plants: cyanophycin as a suitable resource for polyaspartate" ABIC 2004

Tagungen:

- Regionale wissenschaftliche Konferenz "Pflanzenbiotechnologie" IAPTC&B, Wien 22.03.-24.03.06 " Bioplastik in transgenen Pflanzen: Cyanophycin als geeignete Quelle für Polyaspartat"
- 2. BBA Braunschweig 04.04.06 "Bioplastic in transgenic plants: cyanophycin as a suitable resource for polyaspartate"

3. GVC/ DECHEMA-Jahrestagungen 2006 mit 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden 26.09-28.09.06 "Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Pflanzen"

Veröffentlichungen:

Neumann, K., Stephan, D.P., Ziegler, K., Hühns, M., Broer, I., Lockau, W., and Pistorius, E.K. (2005) "Production of cyanophycin, a suitable source for the biodegradable polymer polyaspartate, in transgenic plants." Plant Biotechnology Journal **3**: 249-258.

Geplante Veröffentlichungen:

1. Hühns, M. Neumann, K.; Ziegler,K.; Kahmann, U.; Staiger, D.; Lockau, W.; Pistorius, E.K.; Broer, I. "Targeting of the cyanophycin synthetase into plastids of *Nicotiana tabacum* leads to high levels of polymer accumulation without adverse effects on the phenotype." (bei Plant Biotechnology Journal eingereicht)

2. "Production of the biodegradable polymer cyanophycin in amyloplasts of transgenic potato plants" (in Vorbereitung)

III. Erfolgskontrollbericht

III.1 Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Das Projekt ist im Förderprogramm "Nachwachsende Rohstoffe" eingeordnet. Die förderpolitischen Ziele, einen Beitrag für eine nachhaltige Rohstoff- und Energiebereitstellung zu leisten, sowie besonders CO₂-Emissions-vermindernde und umweltverträgliche Produkte zu produzieren, konnte durch unser Verbundprojekt bewerkstelligt werden. Eines der wesentlichen Ziele der Produktion nachwachsender Rohstoffe ist der Ersatz von Petrochemikalien. Ein möglicher Weg ist die Produktion von Biopolymeren in transgenen Pflanzen, die als biologisch abbaubare Kunststoffe eingesetzt werden können. Polyaspartat ist ein solches Polymer, das bisher nur synthetisch hergestellt werden kann und breite Anwendung findet. Die Produktion von Polyaspartat als Bestandteil des Speicherproteins Cyanophycin in transgenen Kartoffelknollen schont die fossilen Ressourcen und bietet eine kostengünstige und umweltfreundliche Alternative zu der chemischen Produktion.

III.2 Wissenschaftlich- technisches Ergebnis des Vorhabens

Die verwendeten Ansätze zur Steigerung der Cyanophycinproduktion, sowie einer verbesserten Versorgung Cyanophycinproduzierender Pflanzen mit stickstoffhaltigen Aminosäuren und der Isolierung des Polymers aus den Pflanzen führte zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Die Expression des cphA Gens aus dem thermophilen Cyanobakterium Thermosynechochoccus elongatus BP-1 führte in Tabak bereits ohne Optimierung zur Produktion von bis zu 0,1% der Trockenmasse einer löslichen Form des Cyanophycins (Neumann et al., 2005). Das Produkt unterscheidet sich nur in der Frage der Löslichkeit von dem granulären Cyanophycin, das in den Bakterien hergestellt wird, es enthält ebenfalls ein Polyaspartatrückrat mit anhängenden Argininresten und ist durch die Cyanophycinase abbaubar. Es ist als Ausgangssubstanz für Polyaspartat also ebenso wie das granuläre Cyanophycin geeignet. Die Expression des Gens führte gelegentlich zu Beeinträchtigungen des Habitus der transgenen Tabakpflanzen und zu einer Reduktion der Regenerationsraten. In einer Reihe von Linien konnte transgenspezifische RNA nachgewiesen werden, dabei wurden teilweise spezifische Spaltprodukte der transgenspezifischen RNA gefunden. Diese könnten durch das zufällige Vorliegen pflanzlicher Konsensus-Sequenzen für ein Spleißen oder eine Polyadenylierung der RNA erklärt werden, die in Kodierbereichen bakterieller Herkunft auftreten können.

In den Kartoffelsorten Desiree und Albatros wurde nach Transfers des Cyanophycin-Synthetase Gens cphA_{Te} aus Thermosynechoccocus elongatus BP-1 ebenfalls lösliches Cyanophycin konstitutiv im Cytoplasma produziert. Wie bei den Tabakpflanzen kommt es hier zu Beeinträchtigungen des Habitus und zu reduzierten Regenerationsraten. Damit wurde gezeigt, dass die Produktion von Cyanophycin in Kartoffeln prinzipiell möglich ist. An diesem Gen wurde in der ersten Phase des Folgeprojektes weitergearbeitet, da mit den Synthetasegenen aus Anabaena variabilis und Synechocystis spec. PCC 6803 keine signifikante Cyanophycinproduktion möglich war.

Von der AG Lockau wurde im Rahmen des Vorlaufprojekts ein nicht den Cyanobakterien zugeordnetes Bakterium (*Desulfitobacterium hafniense*) identifiziert, in dem eine lösliche Form des Cyanophycins produziert wird. In den konstitutiv produzierenden Cyanophycinpflanzen konnte nur eine lösliche Form des Cyanophycins nachgewiesen werden, so dass angenommen worden ist, dass sie die Produktion des löslichen Polymers besser verkraften. Daher lag die Vermutung nahe, dass das Gen aus *Desulfitobacterium hafniense* besser zur Produktion einer Ausgangssubstanz für Polyaspartat geeignet sein könnte. Der Kodierbereich des Gens wurde über PCR amplifiziert und mit dem konstitutiven CaMV Promotor fusioniert und in Tabakzellen eingebracht. Bei den ersten Analysen transgener Pflanzen konnte bisher kein Cyanophycin nachgewiesen werden.

In der ersten Phase der Weiterförderung konnte der Kodierbereich der Cyanophycin-Synthetase mit zwei verschiedenen **knollenspezifischen Promotoren**, dem Patatin B33-Promotor und dem GBSS-Promotor, fusioniert werden. Eine Cyanophycinakkumulation konnte aber nur mit dem B33-Promotor ermittelt werden, wobei der Phänotyp der regenerierten Pflanzen nicht von den Kontrollpflanzen zu unterscheiden war. Im Gegensatz dazu wiesen die Kartoffelknollen einen veränderten Phänotyp auf, der in deutlich kleineren und deformierten Knollen resultierte. Ohne eine weitere Optimierung führte es bereits zu einer Produktion bis zu 2,1% der Trockenmasse in den Knollen, welche die lösliche und wasserunlöslichen Form des Cyanophycins beinhaltet. Die Schädigung der Knollen, in stark exprimierenden Pflanzen, könnte auf die Lokalisation im Cytoplasma zurückzuführen sein, die durch weitere Optimierungen wieder aufgehoben werden könnten.

Durch die Fusion mit vier verschiedenen Targetingsequenzen (den Targetingsequenzen des Rieske-Fe-S-Proteins. der Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase FNR, des Light-Harvesting-Chorophyll-Proteins CP24, alle aus Spinacia oleraceae und des Photosystem II-Proteins PsbY - aus Arabidopsis thaliana) für den Chloroplasten, die in verschiedene Kompartimente dirigieren, sollte der Polymergehalt drastisch gesteigert werden. Aber nur mit Hilfe des PsbY Transitpeptids konnte der Cyanophycingehalt in den Tabak- Primärtransformanden auf bis zu 1,45% und in den Folgegenerationen bis auf 4,2% der Trockenmasse erhöht werden. Die drei anderen Transitpeptide (Rieske, CP24, FNR) zeigten den gleichen Phänotyp wie die konstitutiv cytoplasmatische Expression, es kam auch zu keiner Steigerung der Produktion im Vergleich zur konstitutiven Produktion. Die Ergebnisse zur Expression der Cyanophycin-Synthetase mit den verschiedenen Transitpeptiden in Tabak sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Konstrukt	Anzahl der Transfor- mationen	Spross/ Ex- plantat	veränderte Blattmorphologie	maximaler Cyanophycingeha It in % des Trockengewichts	Lokalisation des Cyanophycin in der Zelle
Rieske- <i>cph</i> A _{Te}	2	1	reduzierte Blattspreite, Aufhellungen der Blätter, reduziertes Wachstum	kein Cyanophycin nachgewiesen	-
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	4	0,91	reduzierte Blattspreite, Aufhellungen der Blätter, reduziertes Wachstum	To: 0,7 T1: 0,9	im Cytoplasma
CP24- <i>cph</i> A _{Te}	3	0,4	reduzierte Blattspreite, Aufhellungen der Blätter, reduziertes Wachstum	To: 0,8 T1: 0,7	im Cytoplasma
PsbY- <i>cph</i> A _{Te}	4	0,65	verdickte Blätter, ansonsten normaler Phänotyp, in der T2 Generation reduziertes Wachstum	To: 1,45 T1: 3,2 T2: 4,2	in den Plastiden

Tab. 16: Zusammenfassung der bisher ermittelten Daten für die Expression der konstitutiv plastidär exprimierten Cyanophycin-Synthetase (*cph*A_{Te}) in Tabak.

Eine Steigerung des Polymergehaltes gegenüber der konstitutiven cytoplasmatischen Expression konnte auch in transgenen Kartoffelpflanzen mit dem PsbY Transitpeptid (bis zu 2,9% im Blatt und 0,8% in der Knolle) detektiert werden. Sowohl in den Blättern als auch in den Knollen wurde das Polymer, in unlöslicher Form, ausschließlich in den Plastiden der Zellen nachgewiesen. Die Ergebnisse zur Expression der Cyanophycin-Synthetase mit zwei verschiedenen Transitpeptiden in Kartoffel sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

In der Regenerationsphase wurde allerdings eine Reduktion der Anzahl regenerierender Pflanzen beobachtet. Dies ist möglicherweise auf den Mangel an Aminosäuren zurückzuführen, der bei einer starken Genexpression zu erwarten ist.

Für zwei stark exprimierende Albatros-Linien mit dem Konstrukt PsbY-*cph*A_{Te} wurde ein Freisetzungsantrag für die Jahre 2006-2008 gestellt und genehmigt.

Konstrukt	Anzahl der Transfor- mationen	Spross/ Ex- plantat	veränderte Blattmorphologie	maximaler Cyanophycingehalt in % des Trockengewicht	Lokalisation des Cyanophycin in der Zelle
FNR- <i>cph</i> A _{Te}	5	0,075	reduzierte Blattspreite, Aufhellungen der Blätter	Blatt: 0,18 Knolle: 0,018	im Cytoplasma
PsbY-c <i>ph</i> A _{Te}	5	0,27	normaler Phänotyp	Blatt: 2,9 Knolle: 0,8	in den Plastiden von Blatt und Knolle

Tab.17: Zusammenfassung der bisher ermittelten Daten für die Expression der konstitutiv plastidär exprimierten Cyanophycin-Synthetase ($cphA_{Te}$) in Kartoffel.

Um den Stickstofffluss zum Cyanophycin optimieren und zu eventuelle Mangelversorgungen wurden im Verbundprojekt 1 vorzubeugen, sieben verschiedene bakterielle Aminosäure-Biosynthesegene (Glutamin-Synthetasegene und Arginin-Biosynthesegene) unter Kontrolle des CaMV35S Promotors in Tabak eingebracht und die Anwesenheit des Trangens in den resultierenden Pflanzen nachgewiesen. Nur für drei der sieben Gene (glnA aus Escherichia coli, glnII aus Streptomyces. coelicolor und argJ aus Streptomyces coelicolor) wurde die transgenspezifische RNA Banden auf der erwarteten Höhe nachgewiesen. Ein weiteres Konstrukt lieferte zusätzliche Banden zur korrekten (argC aus S. coelicolor.) Die nach Transformation mit dem argJ-Gen aus Mycobacterium tuberculosis beobachtete Bande war mehr als doppelt so groß wie erwartet und Transkripte der beiden glnA-Gene aus S. coelicolor konnten in der Pflanze gar nicht nachgewiesen werden. Der Aminosäuregehalt von stark exprimierenden glnA, glnII und argJ Linien wurde in der AG Wohlleben untersucht. Mit den glnII- und argJ-Konstrukten konnte kein gesteigerter Glutamin- bzw. Arginingehalt in den Pflanzen erreicht werden. In einer Linie des glnA-Konstruktes wurde ein 10-fach erhöhter Glutamingehalt

gegenüber den Kontrollpflanzen nachgewiesen, der nicht zu einer Erhöhung des Gesamt-AS-Gehaltes führte, möglicherweise aber zu einem reduzierten Glutaminsäuregehalt. In den untersuchten Linien besteht ein Ungleichgewicht zwischen freiem Aspartat und Arginin (durchschnittlich: Asp:Arg= 20:1) (siehe Abschlußbericht FKZ: 98NR090).

Jeweils eine Linie der Aminosäure-Biosynthesegene wurde in der ersten Phase von Verbundprojekt 2 mit vier Tabaklinien mit einer konstitutiv cytoplasmatischen Expression der Cyanophycin-Synthetase gekreuzt und die Nachkommen auf die Anwesenheit der Transgene untersucht. In den untersuchten Kreuzungspflanzen, die die Cyanophycin-Synthetase und das *gln*A Gen konstitutiv cytoplasmatisch exprimieren, konnte bei einigen Nachkommen bei der Analyse der freien Aminosäuren eine Reduktion von Arginin, aber eine Verdopplung von Aspartat und Glutamat gezeigt werden. Das bedeutet, dass durch die Expression des *gln*A Gens aus *E. coli* ein erhöhter Aspartatgehalt nachgewiesen werden konnte, der aber wiederum keinen Einfluss auf die Cyanophycinproduktion hat, da Arginin die limitierende Aminosäure darstellt.

Aus den bisher gewonnen Ergebnissen konnte keine Verbesserung der pflanzlichen Fitness abgeleitet werden, so dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht (siehe Projektantrag Phase IIb, FKZ: 22012606).

III.3 Fortschreibung des Verwertungsplans

Schutzrechte

Zur Absicherung der Verwertbarkeit wurde die vorhandene Patentrecherche aktualisiert und der aktuelle Status der bekannten Patente geprüft. Die Patente der Grundidee des Projekts (198 13 692.7), sowie des "Wasserlöslichen Polymers mit Polyaspartatrückrat" (DE-A 10201758) und zur Isolierung der Polyaspartatkette aus Cyanophycin (DE000019709024A1) wurden inzwischen aufgegeben. Damit steht einer Verwertung des entwickelten Verfahrens nichts entgegen. Ergebnisse, die über den Stand der Technik hinausgehen und damit patentierbar sind, können daher zur Absicherung des Verfahrens genutzt werden, um die Möglichkeiten der wirtschaftlichen Verwertung zu verbessern.

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Durch Hydrolyse von Cyanophycin kann die industriell interessante Polyaspartatkette isoliert werden. Damit entsteht ein vollständig biologisch abbaubares Polymer. Polyaspartat ist ein nicht toxisches Polycarboxylat, das eine Vielzahl von industriellen und landwirtschaftlichen Anwendungen wie z.B. als Zementverflüssiger in der Bauindustrie oder als Zusatz in Windeln hat. Es kann auch als Ersatzstoff für nicht biologisch abbaubare Polyacrylate in Detergentien, in der Ölproduktion und als Dispergiermittel in Wasch- und Reinigungsmitteln, eingesetzt werden (Schwamborn, 1996; Oppermann-Sanio et al., 1999). Chemisch synthetisiertes und daher nicht

vollständig biologisch abbaubares Natrium-Polyaspartat wird von der Bayer AG in einem Maßstab von 3000 Tonnen (2003) jährlich produziert (Preis etwa 6150 €/Tonne). Die wirtschaftlichen Aussichten werden als sehr gut eingeschätzt, da Polyaspartat in transgenen Pflanzen kostengünstiger und umweltschonender produziert werden soll. Auch ist das aus Cyanophycin isolierte Polyaspartat durch seine weiße Farbe deutlich besser als Waschpulverzusatz geeignet als das bräunliche chemisch hergestellte Produkt. Zusätzlich fällt bei der Aufreinigung von Polyaspartat aus Cyanophycin noch das ebenfalls kommerziell verwertbare Arginin an, das deutlich höhere Preise erzielt (siehe Tabelle 18).

Unter der Annahme, dass 10% der Trockenmasse nach Isolierung Cyanophycin darstellen, kommt man zu folgender Kalkulation:

	Anteil/Tonne in	Preis/kg in €	Preis/Tonne Restprotein in €
Trockenmasse	250		
Cyanophycin	25		
Polyaspartat	12,5	5,00 €	62,50 €
Arginin	12,5	55,00 €	687,50 €
Isolierungskosten			100,00 €
des Polymers			
Aufarbeitung			200,00 €
Gewinn			450,00 €
Gewinn/ha (bei			
50t Ertrag)			22.500,00 €
Derzeitiger			
Gewinn/ha aus			
der			
Stärkeproduktion			5.000.00€

Tab. 18: Berechnung des möglichen Gewinns von Polyaspartat und Arginin aus Cyanophycinproduzierenden Kartoffelknollen.

Obwohl ein Anteil von 10% am Gesamtprotein bei der jetzigen Ergebnislage zu erwarten ist, kann er in der Knolle derzeit nicht garantiert werden. Die angegebenen Isolierungskosten sind hoch gegriffene Schätzwerte, die überschritten werden können, ohne die Rentabilität der Produktion in Frage zu stellen. Von der Firma Lanxess wird Na-Polyaspartat zu einem Kilogrammpreis von 6,15 € angeboten. Da der Reinheitsgrad des in Pflanzen produzierten Cyanophycins noch nicht bekannt ist, wurden zur Gewinnkalkulation des Polyaspartats geringere Preise angenommen. Aber auch unter diesen Bedingungen übersteigt der mögliche Gewinn durch die Cyanophycinproduktion den heutigen Gewinn aus der alleinigen Stärkeproduktion.

Für die Entwicklung der kommerziellen Sorte fallen einmalige Kosten wie Sortenprüfung und Zulassung eines gentechnisch veränderten Organismuses an. Diese Kosten sind zurzeit nicht abschätzbar, sie sollten aber in Anbetracht des möglichen Gewinns nicht ausschlaggebend sein. Das nach der Isolierung von Cyanophycin verbleibende Restprotein sollte weiterhin als Futtermittelzusatz vermarktbar sein, allerdings wären diese Futtermittel dann kennzeichnungspflichtig. Dies gilt nicht für die tierischen Produkte nach der Fütterung, daher scheint der Markt für gentechnisch veränderte Futtermittel hier eher geeignet als für Lebensmittel.

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Nach dem bisherigen Stand der Arbeiten war zu erwarten, dass eine Optimierung der Expression eines Cyanophycin-Synthetasegens in Kartoffel zur Bildung kommerziell verwertbarer Mengen an Cyanophycin führt.

Der Eingriff in den pflanzlichen Stoffwechsel ist jedoch wesentlich gravierender als beispielsweise bei der Integration eines Herbizidresistenzgens. Es waren daher umfangreiche physiologische Untersuchungen an einer großen Zahl von Transformanden notwendig, um eine Linie mit hoher Produktion und geringer Beeinträchtigung zu finden. Damit lieferte das Projekt aber auch Erkenntnisse, die Strategien auch für die Produktion anderer Stoffe in transgenen Pflanzen ermöglichen. Die Produktion von Cyanophycin kann auch als Modelprotein in anderen Projekten eingesetzt werden. So wurde von den Projektbeteiligten beim BMBF ein Antrag zur Erhöhung der Biomasse durch Steigerung der Kohlenhydratanteile am Beispiel der Cyanophycinkartoffel gestellt.

Die wirtschaftlichen Aussichten werden als sehr gut eingeschätzt, da Polyaspartat bereits heute einen Markt hat (s.o.) und in den transgenen Pflanzen kostengünstiger produziert werden kann. Da bereits mit den vorhandenen Pflanzen größere Mengen von Cyanophycin hergestellt werden, rechnen wir damit, im Rahmen eines Freisetzungsexperiments valide Daten zu Isolationsverfahren und -kosten zu erhalten.

III.4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

1. Universität Rostock:

Die knollenspezifisch cytoplasmatische GBSS-*cph*A Expression führte in Kartoffel nicht zu einer Cyanophycinproduktion.

Die Cyanophycin-Synthetase aus *D. hafniense* führte in den ersten untersuchten Pflanzen nicht zu einer Produktion von löslichem Cyanophycin.

Mit Hilfe der verwendeten Aminosäure-Biosynthesegene konnte keine Steigerung des Aminosäurepools in transgenen Cyanophycin-produzierenden Pflanzen bewirkt werden.

2. Universität Bielefeld:

Es konnten alle in der AG Broer erzeugten transgenen Pflanzen elektronenmikroskopisch und teilweise immunocytochemisch untersucht werden.

3. Universität Tübingen:

Die Klonierung der bakteriellen Stoffwechsel-Gene wurde auf den zweiten Teil der Förderphase verschoben. Stattdessen wurde die HPLC-basierte Aminosäure-Analytik in den ersten Teil vorgezogen.

4. NORIKA:

Die von der NORIKA durchgeführten Arbeiten erzielten in allen Fällen einen Erkenntnisgewinn bezüglich der Eigenschaften der neu entwickelten Kartoffellinien. Experimente die nicht zum gewünschten Erfolg zeigten, wie die Produktion von Kartoffelknollen unter sterilen Bedingungen in Topferde, führten zu neuen Projektideen. So wurde kurz vor Beendigung der ersten Förderphase des Vorhabens die Anzucht von Kartoffelknollen unter sterilen Bedingungen, bei unterschiedlichem Nährstoff Versorgungsgrad *in vitro* in Angriff genommen.

III.5 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Keine

III.6 Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Ausgabenplanung:

Der Kostenplan wurde eingehalten

Zeitplanung:

Zur Einhaltung der Zeitplanung siehe Schlussbericht Punkt I.3

IV. Kurzfassung (Berichtsblatt)

Siehe Berichtsblatt der einzelnen Verbundpartner

Anhang

Abbildungen der Universität Bielefeld

Anlagen zum Schlussbericht des Teilprojektes "Untersuchungen zum Nachweis und zur Optimierung der Cyanophycin-Produktion in transgenen Pflanzen"

im Verbundprojekt

"Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffeln" im BMVEL-Förderschwerpunkt "Nachwachsende Rohstoffe" (Förderperiode: 1.7.2005 bis 31.12.2006)

Projektleiterin: Prof. Dr. Dorothee Staiger Universität Bielefeld Biologie VIII: Molekulare Zellphysiologie Postfach 10 01 31 33501 Bielefeld

(Abbildungen 1 bis 22 und Tabelle 1)
Kontrolle LH9000



Vergrößerung: 9500 x

CP24-cphA_{Te} Linie 31



Vergrößerung: 22000 x

FNR-*cphA*_{Te} Linie 1





Vergrößerung: 43000 x





Vergrößerung: 50000 x



Vergrößerung: 15000 x





Vergrößerung: 36000 x

Abb. 1: EM-Bilder von Blättern der Tabak-Pflanzen CP24-*cphA*_{Te} und FNR-*cphA*_{Te} sowie der Kontrolle LH9000

In CP24-*cphA*_{Te} und FNR-*cphA*_{Te} war Cyanophycin im Cytosol nachweisbar. In CP24-*cphA*_{Te} Linie 31 konnte gelegentlich auch Cyanophycin im Kern detektiert werden.

A: PsbY-*cphA*_{TE} Linie 51/7



Vergrößerung: 23500 x

C: PsbY-cphA_{Te} Linie 51/3



Vergrößerung: 15500 x

B: PsbY-cphATe Linie 67



Vergrößerung: 20000 x

D: PsbY-cphA_{Te} Linie 51/3



Vergrößerung: 28500 x

Abb. 2: EM-Bilder von Blättern der Tabak-Pflanze PsbY-cphA_{Te}

- In PsbY-*cphA*_{Te} ist das Cyanophycin ausschließlich in den Chloroplasten lokalisiert. A, B und C: EM-Bilder von Ultradünnschnitten nach Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid-Fixierung.
- D: Immunocytochemischer Nachweis von Cyanopyhcin mit dem Antiserum gegen
- Cyanophycin und Gold-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG.

PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51/3



PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51/3



Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Blättern der Tabak-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Lichtmikroskopische Aufnahmen von Semi-Dünnschnitten nach Anfärbung mit Naphtholblau. CP24-*cphA*_{Te} Linie 38





Vergrößerung 28500 x





Vergrößerung 23000 x





PsbY-Cyel Linie 51/3

Vergrößerung 30000 x

Abb. 4: EM-Bilder von Wurzeln der Tabak-Pflanzen CP24-cphA_{Te}, FNR-cphA_{Te} und PsbY-cphA_{Te}

In den Wurzeln der Pflanzen CP24-*cphA*_{Te} und FNR-*cphA*_{Te} ist das Cyanophycin im Cytosol und in der Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} in den Proplastiden lokalisiert.

EM-Bilder



Blatt: 8 cm lang



Vergrößerung: 18000 x



Blatt: 12 cm lang



Vergrößerung: 11000 x



Blatt: 20 cm lang



Vergrößerung: 5000 x

Lichtmikroskop. Aufnahmen







Abb. 5: EM-Bilder und lichtmikrospische Aufnahmen von unterschiedlich großen Blättern der Tabak-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51/3

EM-Bilder von Ultradünnschichten nach Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid-Fixierung und lichtmikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten nach Naphtholblau-Färbung.

Die älteren Blätter enthalten häufig mehr Cyanophycin als die jüngeren Blätter.

Kontrolle: LH9000



Vergrößerung: 23000 x



Vergrößerung: 20000 x



Vergrößerung: 12500 x



Vergrößerung: 13000 x

Vergrößerung: 53000 x

Abb. 6 : EM-Aufnahmen von gelb-grünen Blättern der Tabak-Pflanzen LH9000 und PsbY-cphA_{Te}

Im Gegensatz zu LH9000 (leerer Vektor) bildet PsbY-*cphA*_{Te} Gerontoplasten aus, in denen das Cyanophycin in Form von lose gepackten Aggregaten vorliegt.

PsbY-cphATe Linie 51/3

PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51/3



Vergrößerung: 56000 x

Abb. 7: Immunocytochemischer Nachweis von Cyanophycin in Gerontoplasten

In den gelb-grünen Blättern der Tabak-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51/3 entwickeln sich aus Chloroplasten Gerontoplasten, in denen das Cyanophycin in Form von lose gepackten Aggregaten vorliegt. Diese Aggregate werden von dem Anti-Cyanophycin-Antiserum erkannt.

Tabak-Pflanz	ze PsbY- <i>cphA</i> _{Te}
Konstrukt	S2-Generation
PsbY- <i>cphA</i> _T	e
Linie 51	3 - 1
Linie 51	3 - 2
Linie 51	3 - 4
Linie 51	2 - 5
Linie 51	4 - 1
Linie 51	4 - 6
(Übergabe-P Pflanzen wu in Bielefeld I	Protokoll vom 19.6.2006 rden im Gewächshaus kultiviert)



3 - 1 3 - 2 3 - 4



2 - 5 4 - 1 4 - 6

Abb. 8: Tabak-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51 - S2-Generation

Analysen eines jüngeren und älteren Blattes sind in Abb. 21 und 22 dargestellt.

S2-Generation 3-1: Oberes Blatt



Vergrößerung: 15000 x

S2-Generation 3-1: Unteres Blatt

Tabak-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51

S2-Generation 3-2: Oberes Blatt



Vergrößerung: 11000 x

S2-Generation 3-2: Unteres Blatt

Vergrößerung: 17000 x

S2-Generation 3-4: Oberes Blatt



Vergrößerung: 10500 x

S2-Generation 3-4: Unteres Blatt





Abb. 9: EM-Aufnahmen von Blättern der Tabak-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51 - S2-Generation der Pflanzen 3-1, 3-2 und 3-4: Vergleich oberes mit unterem Blatt

Vergrößerung: 13500 x

Nicotiana tabacum PsbY-*cphA*_{Te} Linie 51

S2-Generation 4-1: Oberes Blatt



S2-Generation 2-5: Oberes Blatt





S2-Generation: 4-6: Oberes Blatt



Vergrößerung: 16500 x

Vergrößerung: 7500 x

S2-Generation 2-5: Unteres Blatt



Vergrößerung: 20000 x

S2-Generation 4-1: Unteres Blatt



Vergrößerung: 21000 x

S2-Generation 4-6: Unteres Blatt

Vergrößerung: 19000 x



Vergrößerung:	12000 x
---------------	---------

Abb. 10: EM-Aufnahmen von Blättern der Tabak-Pflanze PsbY-*cph*A_{Te} Linie 51 – S2-Generation der Pflanzen 2-5, 4-1 und 4-6: Vergleich oberes mit unterem Blatt

Tabak-Blätter



Vergrößerung: 23500 x

Vergrößerung: 14000 x

Vergrößerung 15000 x

Abb. 11: Nachweis von Cyanophycin in Blättern von Tabak- und Kartoffel-Pflanzen

EM-Bilder von Blättern der Pflanzen LH9000, PsbY-*cphA*_{Te} und FNR-*cphA*_{Te}: Vergleichende Darstellung von Tabak und Kartoffeln In PsbY-*cphA*_{Te} ist das Cyanophycin im Chloroplasten und in FNR-*cphA*_{Te} im Cytosol lokalisiert. LH9000 ist die Pflanze mit dem leeren Vektor. Junge Blätter



Vergrößerung: 18000 x



Vergrößerung: 10000 x



Vergrößerung: 21000 x



Vergrößerung: 20000 x



Vergrößerung: 18000 x



Vergrößerung: 14000 x

Gelbe-grüne Blätter



Vergrößerung: 22000 x



Vergrößerung: 19000 x

Abb. 12: Gegenüberstellung von jüngeren und älteren sowie gelb-grünen Blättern der Kartoffel-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 23

In gelb-grünen Kartoffel-Blättern werden keine Gerontoplasten ausgebildet (im Gegensatz zu gelb-grünen Tabak-Blättern), und das Cyanophycin liegt noch in relativ kompakten Granula vor.





5 mm Knolle



Vergrößerung: 11000 x

1 mm Knolle



Vergrößerung: 21000 x



Vergrößerung: 11000 x

Vergrößerung: 23500 x



Vergrößerung: 19000 x



Vergrößerung: 33000 x

Abb. 13: EM-Bilder von 10 mm, 5 mm und 1mm großen Knollen der Kartoffel-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 23

In den 1 mm großen Knollen ist deutlich erkennbar, dass das Cyanophycin in den Amyloplasten lokalisiert ist.

EM-Bilder nach Glutaraldehyd/Osmium-

Tetroxid-Fixierung



Vergrößerung: 33000 x

EM-Bilder nach immunocytochemischem

Nachweis von Cyanophycin



Vergrößerung: 30500 x



Vergrößerung: 19000 x



Vergrößerung: 31500 x

Abb. 14: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Cyanophycin nach Glutaraldehyd/Osmium-Tetroxid-Fixierung und immunocytochemischer Nachweis von Cyanophycin mit dem Anti-Cyanophycin-Antiserum in 5 mm Knollen der Kartoffel-Pflanze PsbY-*cphA*_{Te} Linie 23

B33-*cphA*_{Te} Linie 7



Vergrößerung: 6500 x

B33-*cphA*_{Te} Linie 33



Vergrößerung: 9500 x

B33-cphA_{Te} Linie 17



Vergrößerung: 6500 x

B33-*cphA*_{Te} Linie 44



Vergrößerung: 5000 x

Abb. 15: EM-Bilder von Blättern der Kartoffel-Pflanzen B33-*cphA*_{Te} Linie 7, 17, 33 und 44

In den Blättern dieser Pflanzen war kein Cyanophycin detektierbar.

3 mm Knolle der Kartoffel-Pflanze B33-*cphA*_{Te} Linie 17



Vergrößerung: 24000 x

Vergrößerung: 25000 x

Vergrößerung: 8000 x



Vergrößerung: 7500 x





Vergrößerung: 9000 x

Vergrößerung: 21000 x

Abb. 16: EM-Bilder von 3 oder 9 mm großen Knollen der Kartoffel-Pflanze B33-*cphA*_{Te} Linie 17

Cyanophycin ist in den meisten Knollen nachweisbar. Es ist im Cytosol lokalisert. Vor allem in den größeren Knollen liegt das Cyanophycin in relativ lose gepakckten Aggregaten vor.

9 mm Knolle der Kartoffel-Pflanze B33-*cphA*_{Te} Linie 17

Linie 5



Vergrößerung: 5000 x



Linie 6

Vergrößerung: 9000 x

Linie 16



Vergrößerung: 12000 x



Vergrößerung: 13000 x



Vergrößerung: 13000 x



Vergrößerung: 13000 x

Abb. 17: EM-Bilder von Knollen der Kartoffel-Pfanzen B33-*cphA*_{TE} der Linien 5, 6 und 16

Cyanophycin ist in den Knollen nachweisbar und ist im Cytosol lokalisiert.

Linie 21



Linie 51



Vergrößerung: 10500 x



Vergrößerung: 21000 x



Vergrößerung: 13500 x



Vergrößerung: 6000 x



Vergrößerung: 10500 x



Vergrößerung: 23000 x

Abb. 18: EM-Bilder von Knollen der Kartoffel-Pflanzen B33-cphA_{Te} der Linien 21, 50 und 51

Cyanophycin ist in den Knollen nachweisbar und im Cytosol lokalisiert.

Linie 56



Vergrößerung: 5500 x

Linie 58



Vergrößerung: 16000 x



Vergrößerung: 6500 x



Vergrößerung: 23500 x

Abb. 19: EM-Bilder von Knollen der Kartoffel-Pflanzen B33- $cphA_{Te}$ der Linien 56 und 58

In der Linie 56 war kein Cyanophycin detektierbar. In der Linie 58 ist Cyanophycin im Cytosol nachweisbar.

Kartoffel-Pflanzen B33-cphA_{Te}







Luftknollen





Luftknolle





Abb. 20: Photos der Kartoffel-Pflanzen B33-*cphA*_{Te} der Linien 7, 17, 33 und 44 B33-*cphA*_{TE} der Linie 7, 17 und 33 bilden Luftsprosse mit kleinen Knollen, und Linie 44 bildet Sprossähnliche Stränge ohne Knollen aus.

Luftknollen



Vergrößerung: 14000 x

Luftknollen-Sproß



Vergrößerung: 22000 x

Luftknollen-Blättchen



Vergrößerung: 9500 x



Vergrößerung: 6000 x



Vergrößerung: 23000 x



Vergrößerung: 25000 x

Abb. 21: Nachweis von Cyanophycin in der Luftknolle, im Luftknollen-Sproß und im auf der Knolle befindlichem Blättchen (EM-Bilder) der Kartoffel-Pflanze B33-*cphA*_{Te} Linie 7

Ausbeute an Knollen der Kartoffel-Pflanze B33-*cphA*_{Te} Linie 7, 17, 33 und 44 sowie des Wildtyps und der Pflanze mit dem leeren Vektor

Pflanze	Anzahl der Knollen	Gesamtgewicht der Knollen
Wildtyp	12	768 g
Leerer Vektor	10	720 g
B33- <i>cphA</i> _{Te} : Linie 7	27	302 g
Linie 17	60	581 g
Linie 33	125	662 g
Linie 44	60	601 g
Ausbeute von 2 Pflanzen (Pflanzen sind im Topf von 20 cm Durchmesser gewachsen)		

Aussehen der Knollen der Kartoffel-Pflanze B33- $cphA_{Te}$ Linie 7, 17, 33 und 44 sowie des Wildtyps und der Pflanze mit dem leeren Vektor



Abb. 22: Ausbeute und Aussehen der Knollen der Kartoffel-Pflanze B33-*cpA*_{Te}-Linie 7, 17, 33 und 44 sowie des Wildtyps und der Pflanze mit dem leeren Vektor (B33 t 35S)