

Entsprechend erhalten wir für jede der drei anderen 2',3'-Dideoxynucleotid-Reaktionen eine Leiter von Fragmenten. Aus allen zusammen, in vier Spuren auf einem **Elektropherogramm** getrennt (Abb. 13.29c), können wir leicht die komplementäre DNA-Sequenz des Templates ablesen. Der Nachweis der synthetisierten DNA-Fragmente erfolgt mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, die man entweder an die Primer anhängt oder aber an die vier ddNTPs.

Moderne **Sequenzierungsautomaten**, die geeignet sind, die riesigen Genome eukaryotischer Organismen in einer vertretbaren Zeit komplett zu sequenzieren, arbeiten mit zwei Verbesserungen dieser Grundtechnik:

- Wenn die vier ddNTP mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können alle vier Reaktionen in einem Elektrophoreseschritt gemeinsam getrennt und mit entsprechenden Laserlicht-Detektoren simultan und vollautomatisch registriert werden.
- Die Cycle-Sequencing-Methode nutzt Primer mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen und thermostabile DNA-Polymerasen. Dadurch können selbst sehr kleine Mengen von DNA noch sequenziert werden, weil die Reaktion wie bei der PCR (Kap. 13.11.2) noch mit einer starken Amplifikation verbunden ist.

13.12 **Pflanzentransformation und transgene Pflanzen**

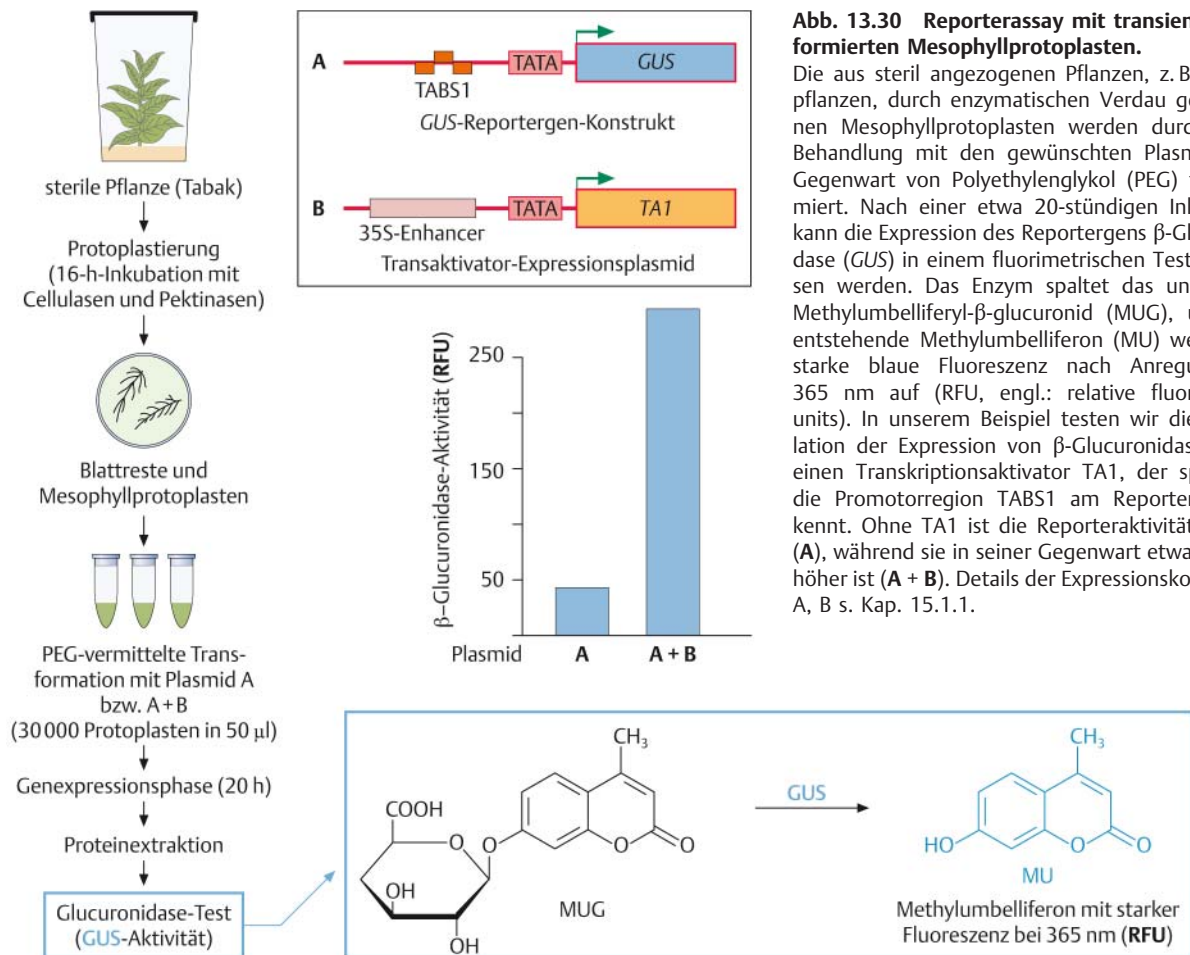
Eine Reihe gentechnischer Methoden haben die Grundlage für die Transformation von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen im breiten Umfang geschaffen. Neben der Möglichkeit zur transienten Transformation als einfache Methode zur Genfunktionsanalyse können auch transgene Pflanzen erzeugt werden. Dadurch entstehen ggf. ganz neue Merkmalskombinationen, die eine grundlegende Verbesserung von Qualität und Quantität der Erträge oder von Resistenz gegen Frost, Herbizide oder pathogene Organismen bewirken können. Trotz einiger Bedenken gegen den massenhaften Anbau scheint die Nutzung transgener Pflanzen angesichts der Welternährungssituation und der Folgeerscheinungen der industriellen Landwirtschaft unausweichlich und unaufhaltsam.

Für die Pflanzenzüchtung stehen heute neben den klassischen Verfahren der Kreuzung und Selektion auf der Basis eines vorgegebenen genetischen Pools einer Sorte oder Art auch neue Methoden der Gentechnologie zur Verfügung, die es ermöglichen, das Erbgut von Pflanzen direkt und gezielt zu verändern. Hierbei können Gene aus Tieren, Mikroorganismen oder anderen Pflanzen auf die gewünschte Zielpflanze übertragen werden. In solchen **transgenen Pflanzen** erhält man Merkmalskombinationen, die die Qualität und Quantität der Erträge verbessern oder Resistenz gegen Frost, Herbizide oder pathogene Organismen bewirken und durch klassische Züchtungsverfahren nicht erreicht werden können. Die neuen Methoden machen die Arbeit der Züchter aber keinesfalls überflüssig. Sie bereichern das Methodenspektrum und beschleunigen Selektionsprozesse. Abhängig von der Zielstellung werden Methoden zur vorübergehenden (transienten) oder aber zur stabilen Transformation genutzt. Bei letzterer entstehen transgene Pflanzen, deren neue Eigenschaften an die Nachkommenschaft weitergegeben werden.

13.12.1 Transiente Transformation und Reporterassays

Die einfachste Methode für eine transiente Transformation ist in der Abb. 13.30 am Beispiel eines Reporterassays in Tabak-**Mesophyllprotoplasten** beschrieben. Sie ist sehr gut geeignet, um wichtige Grundeigenschaften der Wirkung von Genen bzw. Genprodukten zu testen.

Ein solcher Test kann in dieser oder ähnlicher Form mit vielen Pflanzenzellen durchgeführt werden, deren Zellwände in einem hyperosmotischen Medium (Pufferlösung, osmotisch stabilisiert durch Zusatz von 0,5 M Mannit) mit Cellulasen und Pektinasen verdaut werden können, ohne daß der Protoplast zerstört wird. Voraussetzung für ein gutes Ergebnis sind die Gewinnung einer ausreichenden Zahl von Protoplasten und deren Qualität, d. h. ihre Stabilität, Transformierbarkeit und schließlich Kapazität zur Genexpression. Zur Transformation verwendet man **Expressionsplasmide** mit den gewünschten cDNA-Kassetten (Abb. 13.31). Durch kurzzeitige Behandlung der Mischung aus Protoplasten und Plasmiden mit **Polyethylenglykol** (PEG) werden Plasmide in großer Zahl in die Zellen aufgenommen. In guten Experimenten können bis zu 80% der Protoplasten transformiert sein. Nach einer Genexpressionsphase von etwa 20 h



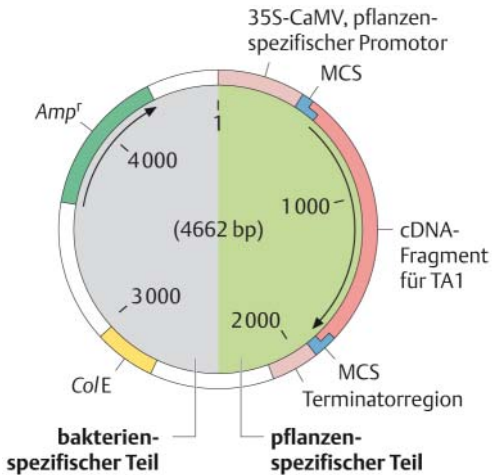


Abb. 13.31 Pflanzlicher Expressionsvektor.

Erläuterungen s. Text. 35S-CaMV, Promotor-/Enhancer-Region des Blumenkohlmosaik-Virus (Box 20.9 S. 839).

sind die Plasmide aus den Zellen weitgehend verschwunden. Daher spricht man von einer **transienten Transformation**.

Ein geeignetes **Expressionsplasmid** für die Transformation pflanzlicher Zellen hat folgende Grundeigenschaften (Abb. 13.31):

- Wegen der massenhaften Vermehrung in *E. coli* und der leichten Handhabung liegt seine Größe am besten im Bereich von 3–5 kb.
- Es enthält einen bakterienspezifischen Teil für die Klonierungsarbeiten und Vermehrung in *E. coli* (graues Segment mit dem Replikationsursprung *ColE* und dem Resistenzgen *Amp^r*; s. a. Kap. 13.11.1).
- Das Plasmid enthält einen pflanzenspezifischen Teil (grünes Segment) mit einer starken Promotor- und Terminatorregion für die Bildung der gewünschten mRNA in Pflanzenzellen (Kap. 15.1.1). In den beiden Klonierungsstellen (MCS) sind Erkennungsmotive für verschiedene Restriktionsendonucleasen, die man für das Einfügen der gewünschten Information als cDNA-Kassette nutzen kann (Abb. 13.26 S. 426). In unserem Fall wäre das eine cDNA für den Transkriptionsaktivator TA1. Das Reporterkonstrukt in Abb. 13.30 ist prinzipiell ähnlich aufgebaut.

Für einen **Reporterassay** im Allgemeinen benutzt man ein **Reportergenkonstrukt**, dessen Proteinprodukt leicht nachweisbar ist, etwa weil ein gutes Antiserum zur Verfügung steht oder weil das Reporterenzym mit hoher Empfindlichkeit durch den Umsatz eines **chromogenen Substrats** nachzuweisen ist. Ein häufig verwendetes Reporterenzym ist die bakterielle **β -Glucuronidase** (Abb. 13.30). Ein anderes, bei Tieren und Pflanzen gleichermaßen verwendbares Reportergen codiert für **Luciferase**, deren Gen aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) kloniert wurde. In diesem Fall erfolgt der Nachweis durch Oxidation von Luciferin in Gegenwart von ATP (Plus 17.4 S. 690). Der geschilderte Typ von Reporterassay ist außerordentlich wirkungsvoll und erlaubt einen Durchsatz von zahlreichen Proben. Er hat allerdings klare Grenzen, wenn es um Untersuchungen in spezifischen Geweben geht, aus denen man nicht so einfach Protoplasten herstellen kann. Solche Pflanzenzellen können aber ggf. direkt mit Plasmiden beschossen werden (**biolistische Methode**). Dazu werden kleine Gold- oder Wolframpartikel von 0,5–2 μm in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen und Spermidin mit der zu transformierenden DNA beschichtet und anschließend mithilfe einer **Partikelkanone** mit hoher Geschwindigkeit auf das Pflanzenmaterial geschossen. Einzelne Metallpartikel mit der DNA durchschlagen dabei die Zellwände und dringen so in das Cytoplasma oder den Zellkern ein. Dies kann zu einer transienten aber auch stabilen Transformation führen. Der Nachweis der Genexpression erfolgt in den meisten Fällen in situ, d. h. durch Anfärbung der transformierten Zellen selbst. Für die β -Glucuronidase gibt es ein sehr wirkungsvolles chromogenes Substrat für In-situ-Färbungen (**X-Gluc**). Das ist ein Indolyl- β -glucuronid, dessen Spaltung Indol freisetzt, das in Gegenwart von Luftsauerstoff ein tiefblau gefärbtes Indigoderivat liefert (Plus 12.5 S. 368, Plus 16.10 S. 645).

13.12.2 Herstellung transgener Pflanzen

Prinzipiell können durch die Kultur transformierter Protoplasten transgene Pflanzen regeneriert werden (Abb. 16.54 S. 666). Das ist allerdings eine sehr aufwendige und heute kaum noch in diesem Zusammenhang angewandte Prozedur. Viel effizienter ist die natürliche Transformation, die durch das **Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*** vermittelt wird. Wie in Kap. 20.6.2 beschrieben, kann dieses Bakterium ein kleines

Stück einer Plasmid-DNA, die sog. Tumor-DNA (T-DNA) als Minichromosom in Pflanzenzellen einschleusen, und dieses wird irgendwo im Genom integriert (Plus 13.11 S. 418).

Die für die Transformation eingesetzten Plasmide sind sog. **binäre Vektoren**, weil sie sowohl in *E. coli* als Wirt für die aufwendigen Klonierungsarbeiten als auch in *A. tumefaciens* als Wirt für die Pflanzentransformation vermehrt werden können. Binäre Vektoren müssen also Replikationsregionen für beide Bakterien haben. Außerdem enthalten sie eine modifizierte Form der T-DNA mit den eingebauten Zielgenen, die in die Pflanze übertragen werden sollen (Box 20.7 S. 833). Darunter befindet sich im allgemeinen auch ein Selektionsmarker, z. B. das **PAT-Gen**, damit man transgene Pflanzen von Wildtyppflanzen unterscheiden kann. Für die **Transformation** selbst werden häufig **Blattscheiben** der zu behandelnden Pflanze mit den Agrobakterien kokultiviert, sodaß der DNA-Transfer in die Zellen an den Blatträndern erfolgen kann. Nach Abwaschen der meisten Bakterien und Zusatz von großen Mengen von Antibiotika, um das weitere Wachstum der noch anheftenden Bakterien zu stoppen, werden die Blattscheiben in Gegenwart von geeigneten Hormonkombinationen (**Cytokinin** und **Auxin**) zur **Regeneration von Sprossen** und schließlich von ganzen Pflänzchen angeregt (vgl. Kap. 16.11.3).

Bei einigen Pflanzen mit der Kapazität zur Bildung zahlreicher, meist sehr kleiner Samen, wie z. B. *Arabidopsis*, Kartoffel u. a. m., hat sich in den letzten Jahren eine viel bessere Methode durchgesetzt. Man taucht den ganzen jungen Blütenstand mit noch geschlossenen Knospen kurzzeitig in eine Suspension der Agrobakterien (**Floral-dip-Methode**, Abb. 13.32). Der Transfer der T-DNA kann in diesem Fall direkt in den Eiapparat erfolgen (Abb. 14.17 S. 480), und damit erhalten wir im positiven Fall bereits den transgenen Embryo im reifen Samen. Von der Gesamtheit der geernteten Samen einer so behandelten *Arabidopsis*-Pflanze können bis zu 1% transgen sein. Zur Selektion werden die Keimlinge angezogen und dann mit dem Selektionsagens, in unserem Fall mit dem **Herbizid Phosphinotricin** (BASTA) besprüht. Die wenigen transgenen Keimlinge

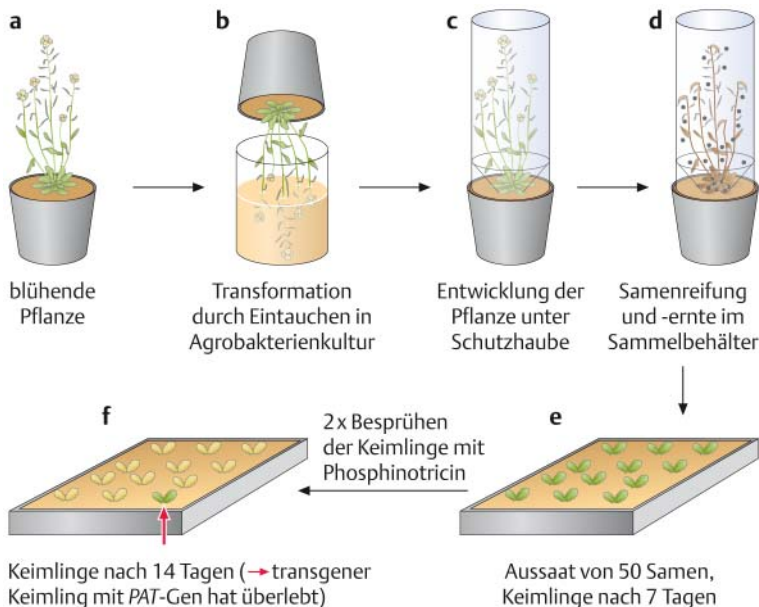


Abb. 13.32 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* nach der Floral-dip-Methode und Selektion transgener Keimlinge. Details siehe Text.

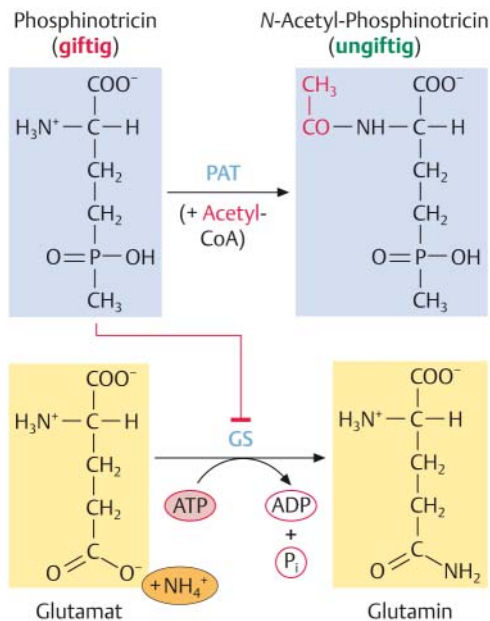


Abb. 13.33 Biochemische Wirkung und Entgiftung von Phosphinotricin.

Hemmung der Glutaminsynthese in Gegenwart von Phosphinotricin führt zur Vergiftung der Pflanzen durch Ammoniak. Weitere Details siehe Text.

überleben, während die Wildtypkeimlinge sich nicht weiterentwickeln können. Die Resistenz beruht auf der Entgiftung des Phosphinotricins durch Acetylierung (Abb. 13.33). Das als Resistenzmarker benutzte **PAT-Gen** codiert für die Expression von **Phosphinotricin-Acetyltransferase**.

Besondere Probleme bei der **Transformation** bereiteten lange Zeit alle wichtigen **Kulturgräser** (Reis, Mais, Gerste, Weizen, Hirse etc.), die natürlich für die Welternährung eine herausragende Rolle spielen. Bei diesen Pflanzenarten werden im allgemeinen isolierte unreife Embryonen oder Mikrosporen mit der Partikelkanone transformiert und anschließend Pflanzen durch nachfolgende In-vitro-Kultivierung regeneriert. Bei der Kultivierung wird durch Gabe von Phytohormonen (Kap. 16.11.3) zunächst Kalluswachstum und danach durch Änderung der Hormonkonzentration somatische Embryogenese induziert. Die Embryonen wachsen später zu Pflänzchen heran. Inzwischen sind allerdings auch die meisten Kulturgräser für die experimentell einfachere und effizientere Transformation mit speziellen Stämmen von Agrobakterien empfänglich. Auch dafür dienen unreife Embryonen als Ausgangsmaterial.

13.12.3 Anbau transgener Pflanzen

Der Anbau transgener Kulturpflanzen ist weltweit in den letzten 5 Jahren jährlich um 15–20% gestiegen. Insgesamt haben wir es Ende 2006 mit etwa 100 Millionen Hektar Nutzfläche und im wesentlichen mit vier Großkulturen zu tun: **Soja, Mais, Baumwolle** und **Raps** (Abb. 13.34). Nach Angaben internationaler Organisationen bauen etwa 8–9 Millionen Landwirte in 20 Ländern transgene Kulturpflanzen an, und der Trend geht ungebremst weiter. Der Zuwachs wird insbesondere in den Ländern Südamerikas und Asiens erwartet. Schon jetzt liegen die Anteile von transgenen Sorten am Gesamtanbau bei den genannten vier Kulturpflanzen in einigen Fällen bei 60–90%. Die zunehmende Nutzung transgener Pflanzen scheint angesichts der Welternährungssituation und der Folgeerscheinungen der industriellen Landwirtschaft unausweichlich.

Allerdings ist die Nutzung dieser neuen Technologie bei allen Vorteilen auch mit einer Reihe von Problemen verbunden, die eine breite Diskussion hervorgerufen haben und auch weiterhin umfangreiche Begleituntersuchungen erfordern. Es muß verhindert werden, daß für viele Gebiete der Erde die dringend erforderlichen Verbesserungen in der Nahrungsmittelproduktion nicht mit unvermeidbaren negativen Folgen für die Umwelt einhergehen. Dabei spielt die Möglichkeit der Weitergabe der **Transgene** an Wildpflanzen in der Umgebung, die mit den Kulturpflanzen kreuzbar sind, eine zentrale Rolle (**Transgen-Introgression**). Im Einzelfall und für jedes Land muß über den Nutzen und die Risiken des Anbaus transgener Kulturpflanzen vorurteilsfrei und unabhängig entschieden werden. Eine hervorragende Möglichkeit, sich über praktische und gesellschaftspolitische Aspekte des Umgangs mit transgenen Kulturpflanzen zu informieren, bietet die Homepage der Verbraucherinitiative e. V. (www.transgen.de).

Abschließend wollen wir vier Beispiele für die Nutzung transgener Pflanzen erläutern; die ersten beiden sind die Grundlage für den verbreiteten Anbau in den letzten Jahren (Abb. 13.34), die letzten beiden beziehen sich auf Entwicklungen in der nahen bzw. fernerer Zukunft.

Herbizidresistenz: Die Rolle von Herbizid-Resistenzgenen soll am Beispiel des **Phosphinotricins** beschrieben werden. Dieses Antibiotikum, das ursprünglich aus Bodenbakterien isoliert wurde, hemmt als Analogon der Glutaminsäure die Glutaminsynthese, d.h. die Fixierung von NH_3 . Die Pflanzen sterben an einer Ammoniakvergiftung. Durch Acetylierung wer-

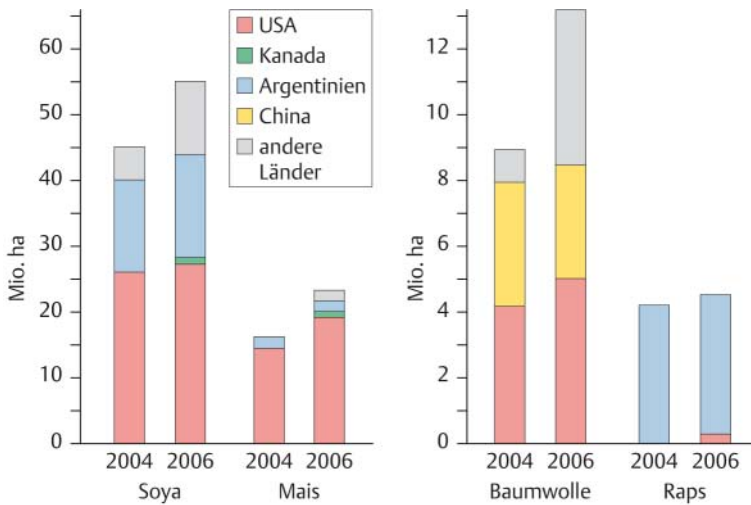


Abb. 13.34 Übersicht über den Anbau transgener Kulturpflanzen.

Die quantitativen Angaben (Millionen Hektar) beziehen sich auf die angegebenen 4 Kulturpflanzen und die Jahre 2004 bzw. 2006 (Details s. <http://www.transgen.de> und <http://www.isaaa.org>). Zum Vergleich: Die Fläche der Bundesrepublik Deutschland beträgt 35,7 Mio ha.

den die Phosphinotricin-Moleküle inaktiviert (Abb. 13.33). Erzeugt man also transgene Kulturpflanzen mit dem Gen für **Phosphinotricin-Acetyltransferase (PAT)** aus *Streptomyces viridochromogenes*, so können die Anbauflächen leicht durch Anwendung des umweltverträglichen Phosphinotricins frei von anderen Pflanzen gehalten werden. Die Anwendung anderer, häufig für Mensch und Umwelt bedenklicher Herbizide entfällt.

Resistenz gegen Insekten: Der großflächige Anbau von wenigen Hochleistungssorten bestimmter Kulturpflanzen in weiten Teilen der Welt schafft ideale Voraussetzungen für die massenhafte Verbreitung von entsprechend angepassten Schädlingen. Ein eindrucksvolles Beispiel ist der **Maizünsler**, eine Schmetterlingsart, deren Raupen weltweit enorme Schäden im Maisanbau anrichten. In dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* gibt es allerdings ein Toxin (**Bt-Toxin**), das sehr toxisch gegenüber den Raupen von Lepidopteren ist. Transgene Maissorten, die dieses *Bacillus*-Toxin exprimieren, sind gegenüber dem Fraß der Zünslerraupen und den Folgeschäden durch Pilzbefall der Maiskolben wirksam geschützt, ohne daß wiederholt mit Insektiziden besprüht werden muß. Die Befürchtungen, daß andere Schmetterlingsarten von dem für sie toxischen Mais geschädigt werden könnten, haben sich bisher nicht eindeutig belegen lassen. Das Bt-Toxin-Gen wird ebenso erfolgreich gegen Fraßschädlinge bei **Baumwolle** und **Raps** eingesetzt.

Goldener Reis: Weltweit und mit besonderer Häufigkeit in Asien sind 800 Millionen Menschen von gravierendem **Vitamin-A-Mangel** bedroht. Man schätzt, daß dies bei etwa 500 000 Kindern zum Erblinden führt und daß bei ausreichender Versorgung mit Vitamin A jährlich 1–2 Millionen Kinder vor dem Tod durch Folgeerkrankungen gerettet werden könnten. Das Phänomen beruht auf der einseitigen Ernährung mit Reis. Durch den Einbau von drei Genen für die Umsetzung des Geranylgeranylpyrophosphats im Reis-Endosperm in β -Carotin (Kap. 12.3 S. 362) ist es gelungen, eine transgene Reissorte zu erhalten, die erhebliche Mengen β -Carotin (Provitamin A) produziert. Die Reiskörner haben eine goldgelbe Farbe. Man schätzt, daß der Verzehr von etwa 300 g des goldenen Reises pro Tag ausreichen würde, Vitamin-A-Mangel und die dramatischen Folgeschäden zu vermeiden.