

1. Theoretische Einleitung .....	2
1.1 Biotechnologie und Gentechnologie.....	2
1.2 Vor- und Nachteile der Pflanzenzellen und Tierzellen in der Gentechnik .....	3
1.3 Die Herstellung transgener Pflanzen.....	4
1.3.1 In vitro-Verfahren .....	4
1.3.2 Möglichkeiten des Gentransfers .....	5
1.3.3 Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen .....	6
1.3.4 Agrobacterium tumefaciens .....	9
1.3.5 Promotoren.....	13
1.4 Aufzucht einer transgenen Pflanze aus transformierten Zellen.....	13
1.5 Regulation der Genaktivität in Pflanzen .....	14
1.5.1 Antisense-Technik.....	14
1.5.2 Co-Suppression.....	14
1.6 Anwendungsmöglichkeiten transgener Pflanzen .....	14
1.6.1.Schutz vor Insektenfraß .....	15
1.6.2 Schutz vor Viren .....	15
1.6.3 Schutz vor Pilzbefall.....	15
1.6.4 Herbizidresistenz.....	15
1.6.5 Ertragsverbesserung .....	16
1.6.6 Schutz vor abiotischem Stress.....	16
2. Material und Methoden.....	16
3. Ergebnisse .....	17
3.1 Versuch 1: Messung der Promotoraktivität durch in situ-Färbung.....	17
3.2 Versuch 2: Fluorimetrische Messung der Promotoraktivitäten .....	18
4. Diskussion.....	20
4.1 Versuch 1:.....	20
4.2 Versuch 2: .....	20
5. Zusammenfassung .....	21
Literatur .....	21

# 1. Theoretische Einleitung

In den letzten Jahren hat die pflanzliche Gentechnik sehr schnell an Bedeutung gewonnen. Es werden immer neue Möglichkeiten entwickelt, pflanzliche Genome zu manipulieren, um den Nutzen der Pflanzen für die Menschen zu steigern: Pflanzen bekommen Resistenzgene gegen spezielle Herbizide, produzieren Medikamente, lassen sich länger lagern, etc.

In unserem Versuch haben wir mit *Arabidopsis*-Pflanzen gearbeitet, in die Fremd-Gene eingebracht worden waren und haben die Aktivität der Promotoren der transformierten Gene gemessen.

## 1.1 Biotechnologie und Gentechnologie

Um die Fähigkeiten und Eigenschaften der Pflanzen optimal nutzen zu können, versucht der Mensch seit jeher, die nützlichen Eigenschaften zu fördern und ungewollte zu unterdrücken. Beispielsweise werden in der **klassischen Pflanzenzucht** Wildformen durch Kreuzungszüchtungen oder Mutationszüchtungen in Kulturpflanzen mit den gewünschten verbesserten Eigenschaften verwandelt. Die **Kreuzungszüchtungen** (Kombinationszüchtungen) basieren auf den von Gregor Mendel aufgestellten Vererbungslehren, nach denen sexuelle Kreuzungen von Pflanzen zur Kombination gewünschter Eigenschaften durchgeführt werden können. Eine wichtige Methode hierbei ist die **Selbstung**, die künstliche Bestäubung der Blüten mit den eigenen Pollen. Die Durchführung der Kreuzungszüchtungen bleibt jedoch auf verwandte Arten beschränkt.

Die Mutationszüchtung basiert auf zufälligen Mutationen im Genom. Diese werden durch Mutagene, wie beispielsweise Chemikalien oder radioaktive Strahlung, hervorgerufen. Anschließend werden die Mutanten auf die gewünschten Eigenschaften hin geprüft und selektiert. Ein Beispiel für eine Mutation wäre die **Polyploidisierung** (Vervielfachung des Chromosomensatzes innerhalb von Zellen), diese findet jedoch auch ohne menschlichen Einfluss statt: bildet sich bei der Mitose der Spindelapparat nicht aus, findet keine Trennung der homologen Chromosomen statt. Dadurch werden die Pflanzen leistungs- und widerstandsfähiger, wie beispielsweise bei der Optimierung von Getreidesorten. Die Polyploidisierung wird künstlich durch Kältebehandlung, Röntgenstrahlen oder Chemikalien, zum Beispiel das Gift der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), das Colchizin, induziert.

Großer Nachteil der oben aufgeführten Methoden ist, dass die Anwendung auf verwandte Arten beschränkt bleibt und immer die gesamte Pflanze mit einbezogen werden muss.

Deshalb werden diese Methoden heute in der **modernen Pflanzenzüchtung** nur noch selten verwendet. Stattdessen werden verstärkt biotechnische und/oder genetische Methoden eingesetzt.

Die **Biotechnologie** umfasst Methoden, die spezielle Stoffwechselreaktionen der Organismen nutzen. So wird diese Technik seit Jahrtausenden zur Herstellung von Bier, Wein, Käse und auch Waschmittel

genutzt. Nützliche „Helfer“ hierbei sind Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen, aber auch Pilze. Im Gegensatz zur Gentechnologie wird hier der gesamte Organismus mit einbezogen.

**Gentechnologische Verfahren** werden *in vitro* durchgeführt und beschreiben das Arbeiten mit isoliertem genetischem Material. Der große Vorteil hierbei ist, dass nur einzelne Gene oder das Genom verwendet werden, nicht aber der ganze Organismus. Dabei wird das genetische Material unterschiedlicher Organismen *in vitro* rekombiniert und wieder in Zellen eingeschleust. Diese Art der Pflanzenzüchtung basiert auf der Totipotenz der verwendeten Zelle, und wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Des Weiteren liefert die Gentechnologie schneller ein Ergebnis, da die zeitaufwendigen langwierigen Rückkreuzungen entfallen, und die Artgrenze überschritten werden kann. So können beispielsweise Gene von Tieren auf pflanzliche Zellen übertragen werden, um den Pflanzen ein verbessertes Immunsystem zur besseren Abwehr von Krankheitserregern zu verschaffen, auf diesem Weg können z.B. monoklonale Antikörper und Antibiotika in Pflanzen hergestellt werden.

## 1.2 Vor- und Nachteile der Pflanzenzellen und Tierzellen in der Gentechnik

Die Vorteile der Pflanzen für die Gentechnik bestehen darin, dass Pflanzen meist in kurzer Zeit sehr viele Nachkommen erzeugen; des Weiteren entsteht nach erfolgreicher Befruchtung eine große Bandbreite an Mutationen und Variationen. Von Vorteil sind auch die hohe Regenerationsfähigkeit und die Totipotenz der Zellen, außerdem die geringen Haltungskosten und der pflegeleichte Charakter der meisten Pflanzen.

Ein Nachteil der Pflanzenzelle ist die stabile Zellwand, die enzymatisch entfernt werden muss, um die Zelle manipulieren zu können. Außerdem ist die Menge der von Pflanzen hergestellten Produkte relativ gering. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch die noch ungeklärte Tatsache, dass der Gentransfer bei den Monokotyledonen wie beispielsweise Getreide und Mais nur schlecht funktioniert, jedoch gerade diese Pflanzen für die Landwirtschaft von Bedeutung sind. Der zweite wichtige Nachteil ist die somaklonale Variation, die bei Pflanzen auftritt. Dies bedeutet, dass auch in einem Kallus, der aus einer einzelnen Zelle gewachsen ist, nicht alle Zellen die gleiche genetische Ausstattung haben. Auch die Polyploidie ist ein Problem, mit dem die Gentechniker zu kämpfen haben, da hier riesige Mengen genetischen Materials in einer Zelle vorliegen, und die Zellen die Gene in mehreren Kopien haben, die alle verändert werden müssten.

Der Vorteil von nicht pflanzlichen Zellen in der Gentechnik ist, dass sie größere Mengen des gewünschten Produkts herstellen, wie beispielsweise das Insulin, das mittlerweile von *E.coli* produziert wird und nicht mehr aus Bauchspeicheldrüsen von Schweinen gewonnen werden muss..

Gegen die Verwendung von tierischen Zellen höherer Tiere sprechen ethische Bedenken, außerdem sind diese schwieriger zu züchten.

## 1.3 Die Herstellung transgener Pflanzen

### 1.3.1 In vitro-Verfahren

Die in vitro-Vermehrung basiert auf **totipotentem Pflanzenmaterial**, also Pflanzenzellen, die durch Teilung in der Lage sind, eine voll differenzierte Pflanze zu entwickeln. Die Zellkulturen werden dazu auf speziellen Nährböden gezüchtet, die neben den nötigen Nährstoffen auch Phytohormone zur gezielten Steuerung des Pflanzenwachstums enthalten. Häufig werden Auxine und Cytokinine verwendet. Die untere Abbildung zeigt, dass sie in unterschiedlichen Konzentrationen und Zusammensetzungen unterschiedliche Differenzierungsprozesse verursachen (Verhältnismäßig mehr IAA → Wurzelbildung, Verhältnismäßig mehr Kinetin → Sprossbildung)

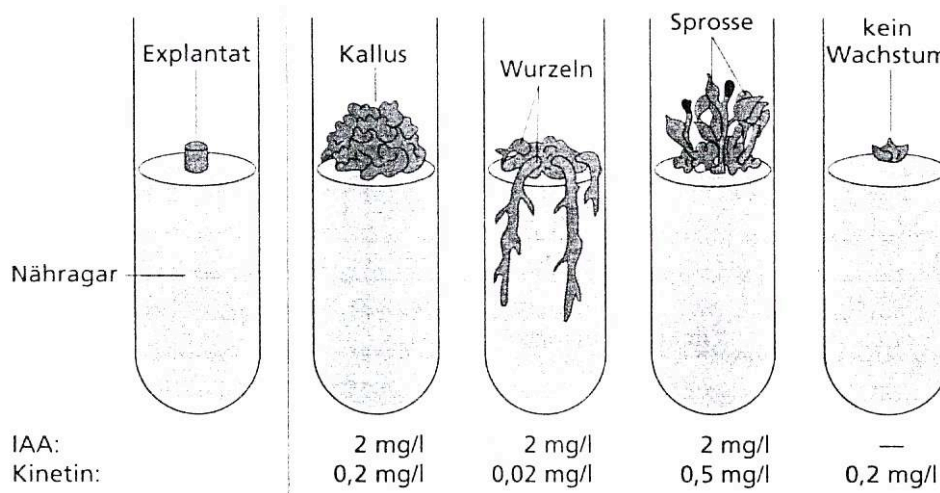


Abb. 1: Konzentrationsabhängiges Zusammenwirken von IAA (Auxine) und Kinetin (Cytokinine) bei der Regeneration von Pflanzen

Aus Munk „Grundstudium der Biologie –Botanik“, S.2-8, Spektrum Verlag 2001

Hierbei spielt die Sterilität eine große Rolle, da Pilze und Bakterien die Proben kontaminieren können. Kalli (sing. **Kallus**) sind Gewebe aus sekundär teilungsfähigen, undifferenzierten Zellen, die in vitro bei hohen Auxinkonzentrationen gezüchtet werden. Es handelt sich um große, stark vakuolisierte Zellen, die lose Zellhaufen bilden. Werden diese Kallikulturen in flüssigen Nährmedien, die ständig geschüttelt werden, herangezüchtet, so zerfallen die Zellhaufen in wenige oder einzelne Zellen, die sich weitervermehren. Die Kulturen werden dann als Zellsuspensionen oder **Suspensionskulturen** bezeichnet.

Wird von einer Pflanzenzelle mittels Enzymen die Zellwand entfernt, so spricht man von einem **Protoplasten**. Diese veränderten Zellen sind kugelförmig und haben den Nachteil, dass sie nur in isotonischen Medien überleben können. Ein großer Vorteil ist jedoch, dass sie auf Grund der fehlenden Zellwand leichter transformiert werden können. Auch kann unter diesen Voraussetzungen leichter eine in-vitro-Fusion von verschiedenen Pflanzen durchgeführt werden. Die entstandenen **Hybridzellen** werden anschließend zu ganzen Pflanzen regeneriert. Kommt es zu einer Verschmelzung der beiden Cytoplasmen, nicht aber zu einer Kernverschmelzung, so spricht man von **Cybriden**. Die Cybriden erfahren eine Ausprägung gemäß dem Karyotyp eines der Fusionspartner.

Die **somaklonale Variation** beschreibt den Zustand, wenn aus erbgleichen Protoplasten Nachkommen mit Unterschieden im Soma und in ihren Eigenschaften entstehen.

Entstehen aus einem Organismus erbgleiche Nachkommen, werden sie als Klone bezeichnet. Die **Klonierung** ist ein klassisches Verfahren zur Vermehrung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Bakterien. Dabei nimmt die Bakterienzelle Plasmide (kurze ringförmige DNA-Abschnitte) auf und vermehrt diese. Der Begriff der Klonierung beschreibt oft auch einfach die Vermehrung eines Organismus zu zahlreichen erbgleichen Nachkommen, beispielsweise durch Stecklinge.

### 1.3.2 Möglichkeiten des Gentransfers

Der eigentliche Vorgang des Gentransfers ist die Übertragung von DNA von einer Donorzelle auf eine Rezeptorzelle. Entwickelt sich die Rezeptorzelle zu einem Organismus, so wird er auf Grund seiner „Misch-DNA“ als **transgen** bezeichnet.

Der Gentransfer kann auf drei verschiedene Arten stattfinden:

- β **Konjugation**: Die Donor-Bakterienzelle bildet zur Empfängerzelle eine Cytoplasmabrücke aus. Über diese Brücke wird DNA bzw. RNA in Form eines Plasmids übertragen.
- β **Transformation**: Hierbei nimmt eine Zelle fremde nackte DNA aus ihrer Umgebung auf und integriert sie in ihr Genom. Voraussetzung ist, dass die Zelle kompetent ist, d.h. sie besitzt spezifische Rezeptorproteine, die die Fremd-DNA durch die Zellmembran schleusen und weitere Enzyme zum Einbau derselben ins Genom.
- β **Transduktion**: Bakteriophagen übertragen genetische Information von einer Bakterienzelle auf eine andere. Es gibt zwei Arten, die allgemeine und die spezifische Transduktion. Bei der allgemeinen Transduktion werden zufällig unbestimmte Gene übertragen, wohingegen sich bei der spezifischen der Prophage immer an der gleichen Stelle im Bakterien-Chromosom integriert und somit auch immer nur das gleiche Gen ausschneiden kann.

### 1.3.3 Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen

Es gibt verschiedene Methoden, transgene Pflanzen herzustellen, wobei nicht alle Pflanzen zum Transformieren geeignet sind. Bei den monokotyledonen Mais- und Reispflanzen, bei denen eine Transformation sehr interessant wäre, da sie wichtige Nahrungsmittel sind, ist die Transformation ziemlich kompliziert, wenn auch mittlerweile machbar.

Bei den direkten Methoden wird die DNA direkt in die Zelle eingebracht, ohne Verwendung von Vektoren.

#### 1.3.3.1 Direkte Methoden

##### Particle gun/ gene gun (Genkanone)

Bei dieser Technik werden Kügelchen aus Wolfram oder Gold (Durchmesser 1-4µm) mit einer dünnen Schicht der gewünschten DNA überzogen und mit hohen Geschwindigkeiten auf das Zellmaterial (Kalli, Blätter oder embryonales Gewebe) geschossen. Die Kügelchen müssen die Zellwände von Epidermis- und Mesophyllzellen durchdringen können, deswegen wird in einer Vakuumkammer geschossen. Die Genkanone erreicht hier Geschwindigkeiten von 1500 km/h. Bei dieser Methode werden zwar die Zellen, auf die die Geschosse direkt treffen, zerstört, die anderen Zellen aber bleiben intakt und können die DNA in ihr Genom integrieren. Es gelingt auf diesem Weg sogar, das Genom von Mitochondrien und Chloroplasten zu transformieren. Dies ist sehr schwierig, da diese Plastiden über kein eigenes DNA-Transportsystem verfügen und folglich auch fremde DNA nicht selbst aufnehmen können.

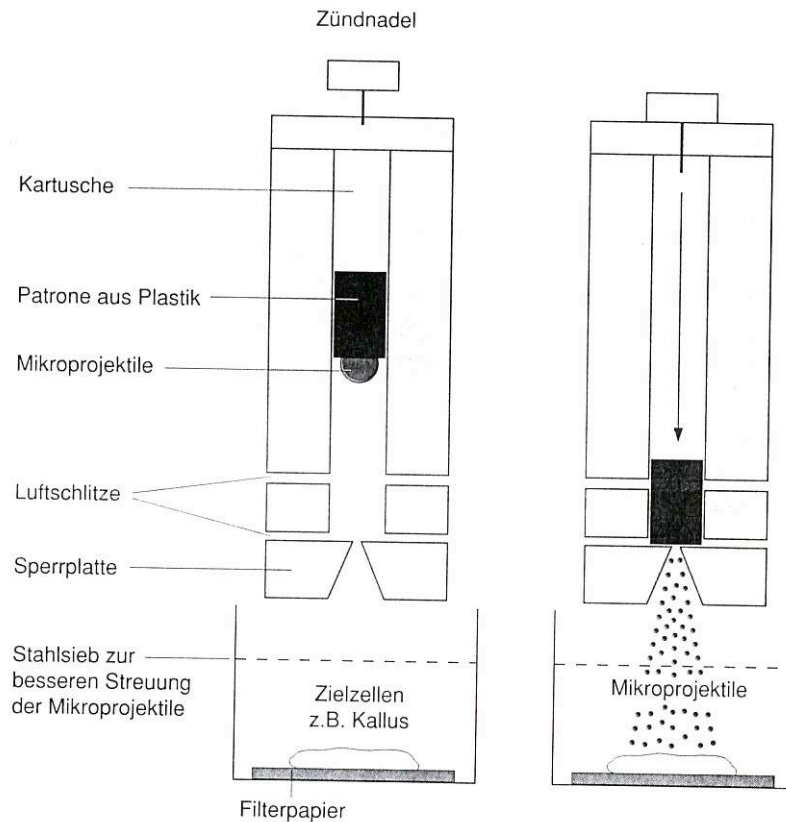


Abb.2: Gene gun (Heldt, Pflanzenbiochemie, Spektrum Verlag 1996, S.563)

### Mikroinjektion

Hier wird die DNA mit einer Mikro-Injektionsnadel direkt in den Kern der Zelle eingeführt, ein bekanntes Beispiel ist die in-vitro-Befruchtung von menschlichen Eizellen, dieser Vorgang wird oft im Fernsehen gezeigt.

### Protoplastentransformation mittels PEG oder $\text{CaCl}_2$

Unter Protoplast versteht man eine Pflanzenzelle, bei der enzymatisch die Zellwand entfernt wurde, sie ist nur noch in isotonischem Milieu stabil. Bei Anwesenheit von PEG (Polyethylenglykol) oder  $\text{CaCl}_2$  kann der Protoplast fremde DNA aufnehmen und in sein Genom integrieren.

### Protoplastenfusion

Hier verschmelzen zwei Protoplasten miteinander, wobei auch die Kerne miteinander fusionieren und komplett neu kombinierte Kerngenome entstehen.

### Elektroporation

Das Plasmid, das das zu übertragende Gen enthält wird zu einer Protoplastensuspension gegeben, dann wird ein Strom angelegt und ein elektrisches Feld entsteht. Dadurch nimmt die Permeabilität der Membranen zu (es entstehen kleine Risse in unterschiedlich geladenen Regionen der Membran) und die DNA kann in die Zellen aufgenommen werden.

### Calciumphosphat-Copräzipitation

Calcium- und Magnesium-Ionen können in einer Suspension die Aufnahme eines Präzipitats fördern, das aus mit Calciumphosphat versehener DNA besteht.

Bei den indirekten Methoden wird DNA mit Hilfe von Zwischenwirten oder Vektoren in die Zellen eingebracht, auch hier gibt es verschiedene Wege:

#### **1.3.3.2 Indirekte Methoden**

##### Phagen

Phagen sind bakterienspezifische Viren, die ihre DNA in ihre Wirte einschleusen und in deren Genom integrieren. Dort wird sie dann mit abgelesen und vermehrt. Da manche Phagen ihre DNA fehlerhaft aus der Bakterien-DNA ausschneiden und so aus Versehen Bakterien-Gene mit in die Phagen-Partikel verpacken, können sie zum Gentransfer benutzt werden.

##### Plasmide

Plasmide kommen in Bakterien vor, sie sind circulaire, doppelsträngige DNA, die sich im Cytoplasma des Bakteriums befindet. Auf einem Plasmid sind nur wenige Gene lokalisiert, zumeist nicht essentielle, sondern Resistenz- und ähnliche Gene. Die Plasmide können in großer Zahl in einem Organismus vorkommen, ihre Gene werden bei der Konjugation von einem Bakterium (Donor) auf ein anderes Bakterium (Rezipient) übertragen.

##### Cosmide

Hierbei handelt es sich um Phagen-DNA, in die fremde Gene eingebracht wurde und die dann in ein Bakterium übertragen wurde. Die Phagen-DNA (aus dem Phagen  $\lambda$ ) hat eine spezielle Sequenz, die cos-Sequenz. Wird an dieser Stelle das Chromosom durchgeschnitten, fügen sich die Reste ringförmig wieder zusammen, eine ringförmige DNA ist entstanden.

Cosmid = Mischung aus Cos-site und Plasmid, also aus Phagen- und Bakterien-DNA.

##### YACs (Yeast artificial chromosome) und BACs (Bacterial artificial chromosome)

Bei YACs handelt es sich um Chromosomen der Hefe, die als Vektor verwendet werden können. Ihr großer Vorteil liegt in ihrer Größe, sie haben bis zu 1 Gbp Insertkapazität, man kann mit ihnen also viel mehr Gene transportieren als mit Plasmiden. Durch ihre Größe besteht aber auch die Gefahr, dass sie brechen und es zum Crossing-over kommt. YACs sind spezifisch für Hefen, BACs spezifisch für Bakterien.



Die wahrscheinlich am häufigsten angewandte Methode zu Transformation von Zellen ist die mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*:

### 1.3.4 *Agrobacterium tumefaciens*

Das überall im Boden vorkommende *Agrobacterium tumefaciens* befällt verletzte Pflanzen und löst bei ihnen das Wachstum von so genannten Wurzelhalsgallen aus. Pflanzenzellen können durch die Zugabe der Phytohormone Auxin und Cytokinin zu unregelmäßigem Wachstum angeregt werden, dies macht sich *Agrobacterium* zu Nutzen. Es schleußt seine Gene in die Pflanzenzelle, die die Information für Auxin- und Cytokinin-Bildung enthalten, die Zellen teilen sich daraufhin unentwegt und wachsen zu einer Galle aus. Außerdem haben die Tumorzellen der Wurzelhalsgalle die Fähigkeit erworben, Opine zu produzieren, die dem Bacterium als Nahrung dienen. Die Zellen bilden aus Aminosäuren und  $\alpha$ -Ketosäuren oder Aminosäuren und Zuckern Kondensationsprodukte, die Opine (Derivate der Aminosäure Arginin, z.B.: Octopin, Lysopin, Nopalin oder Agropin), die von der Pflanze selbst nicht abgebaut werden können.

*Agrobacterium tumefaciens* manipuliert die Pflanzen mittels eines speziellen Plasmids, das als **Tumor-induzierendes Plasmid (Ti-Plasmid)** (siehe Abb.1) bezeichnet wird, weil es Gene enthält, die Pflanzenzellen zu unkontrolliertem (Tumor-) Wachstum anregen. Angelockt wird *Agrobacterium* durch von einer verletzten Pflanze ausgeschüttete Phenole, die eigentlich Pathogene abwehren sollen.

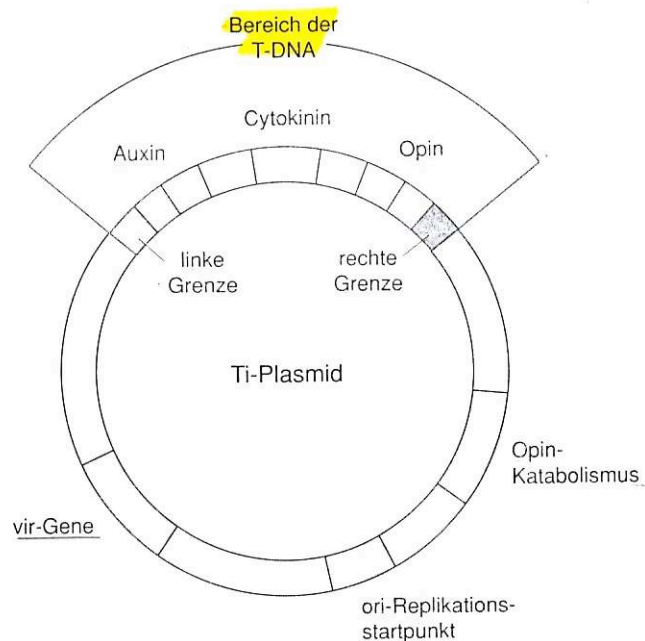


Abb.3: Schematische Darstellung eines Ti-Plasmids (Heldt, Pflanzenbiochemie, Spektrum Verlag 1996, S.554)

Das Ti-Plasmid enthält einen *Agrobacterium*-spezifischen ori (Replikationsstartpunkt), ca. 7-8 vir-Gene, die Virulenzproteine codieren, die Gene zur Bildung von Auxin, Cytokinin und Opinen und das Gen für den Opin-Katabolismus.

Genauer gesagt wird nur ein bestimmter DNA-Abschnitt des bis zu 200kbp großen Plasmids, die so genannte **T-DNA** (Transfer-DNA), vom Bacterium in die Pflanze übertragen (siehe Abb.2). Diese nimmt ca. 7-13% des Ti-Plasmids ein und trägt die Gene, die in der Pflanze zur Synthese der Opine und von Auxin und Cytokinin führen. Diese Gene sind durch eine linke und eine rechte Grenze (border sequences) von den übrigen Genen des Plasmids getrennt.

Durch künstliche Zugabe von Phenolen kann die Transformationswahrscheinlichkeit erhöht werden. Auch das Zuschneiden des Blattmaterials erhöht die Übertragungswahrscheinlichkeit des Ti-Plasmids, da dies zu einer Vergrößerung der Angriffsoberfläche führt.

Neben der T-DNA sind noch weitere unentbehrliche Komponenten an der Transformation beteiligt. Zum einen trägt das Plasmid die sogenannten **vir-Gene** (Virulenz-Gene). Diese werden durch Substanzen aktiviert, die von verletzten Pflanzen abgegeben werden, und führen zur Synthese wichtiger Virulenzproteine. Einige dieser Proteine wirken als Nukleasen und schneiden einen Strang der T-DNA aus dem Ti-Plasmid. Durch direkte Bindung anderer dieser Proteine an die T-DNA wird diese vermutlich durch die Zellwand transportiert. Außerdem dienen sie dem Schutz vor Abbau durch DNAsen der Pflanze und auch der Transport in den Nucleus wird vermutlich durch sie möglich gemacht. Allerdings sind diese Vorgänge noch nicht vollständig geklärt. Die Restaurierung der T-DNA bei der Replikation wird wahrscheinlich auch durch die vir-Proteine gesteuert. Eine weitere Komponente sind Gene, die für Stoffe kodieren, die für den direkten Kontakt zwischen Bakterium und Pflanze sorgen.

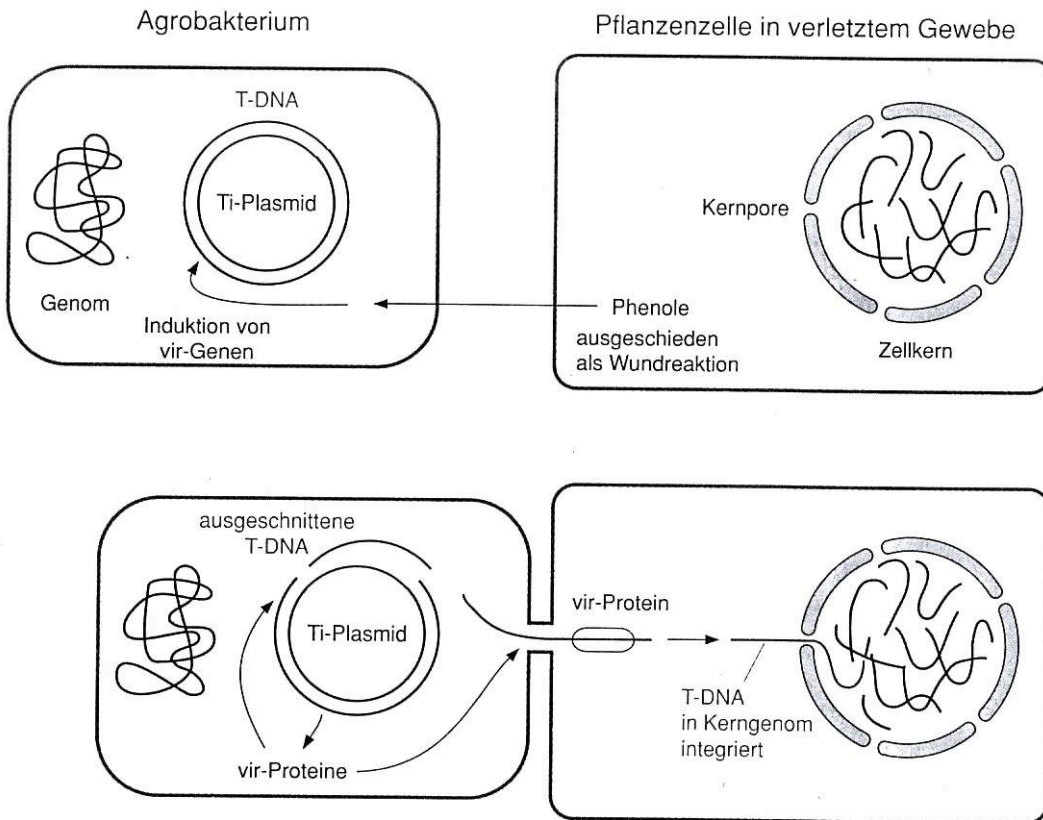


Abb.2: Transformation einer Pflanzenzelle durch *Agrobacterium* Heldt, Pflanzenbiochemie, Spektrum Verlag 1996, S.555)

Von großer Bedeutung für die Rekombination sind die an beiden Seiten der T-DNA liegenden ca. 25 bp langen unvollständigen Sequenzwiederholungen des Ti-Plasmids. Diese werden als **border sequences** (Grenzen) bezeichnet, wobei man eine linke Grenze (LB) und eine rechte Grenze (RB) unterscheidet. An der RB beginnt der Transfer durch den Bruch eines Einzelstrangs, durch einen weiteren Bruch an der LB entsteht die freie einzelsträngige T-DNA. Diese beiden Sequenzen machen die Nutzung des Ti-Plasmids als Vektor erst möglich, da sie auch für den Einbau des DNA-Stücks in das Pflanzen-Genom verantwortlich sind.

#### 1.3.4.1 Binäres Vektorsystem

Als Standardmethode zur Übertragung von Fremd-DNA wird heute das **binäre** oder auch **Zwei-Vektor-System** verwendet. Dieses beruht auf der Tatsache, dass die vir-Gene und die T-DNA sich auch auf verschiedenen Plasmiden befinden können, ohne dass dadurch die Transformation gestört wird.

Auf dem **binären Vektor** (siehe Abb.X) befinden sich die border sequences der T-DNA. Die zwischen den border sequences liegenden Phytohormongene können entfernt und später durch fremde DNA ersetzt werden. Das Entfernen dieser Gene hat außerdem den Vorteil, dass unerwünschte Nebenreaktionen wie unkontrolliertes Zellwachstum durch die Produktion von Auxin und Cytokinin ausbleiben. Der binäre Vektor besitzt zwei origins of replikation (ori), einen für *Agrobacterium* und einen

für *E.coli*. Der *E.coli*-ori wird eingeführt, damit der Vektor in *E.coli* vermehrt werden kann. Auch die Gene für den Opine-Katabolismus werden entfernt, so dass auf dem Vektor schließlich nur noch zwei *ori*s (*A.tumefaciens* und *E.coli*) und die beiden border sequences befinden, so hat man möglichst viel Platz, Fremd-Gene einzuschleusen.

Die *vir*-Gene befinden sich bei dieser Methode auf einem sogenannten **Helfer-Plasmid** und verbleiben im Bakterium, da sie in der Lage sind den Anlauf der Transformation in trans zu steuern.

Zwischen die beiden border sequences wird dann eine multicloning site (MCS) eingeführt, die Schnittstellen für mehrere Restriktions-Endonukleasen enthält. In die MCS kann dann mit Hilfe der Restriktions-Endonukleasen die fremde DNA eingebaut werden, wobei die MCS nur innerhalb der beiden Grenzen eingefügt sein darf, da nur diese Sequenz später auf die Pflanzenzelle übertragen wird. Außerdem muss innerhalb der beiden Grenzen ein **Promotor** (siehe Abschnitt 1.2.5) enthalten sein, damit die Gene überhaupt abgelesen werden können.

### 1.3.4.2 Reporter- oder Indikatorgene

Nach erfolgter Durchführung ist es wichtig herauszufinden, ob die Übertragung auch erfolgreich war und das gewünschte Gen in das Pflanzengenom aufgenommen wurde. Der direkte Nachweis über die Expression des Gens ist meist sehr schwierig oder unmöglich. Deshalb werden oft noch so genannte **Indikator- oder Reportergene** in die T-DNA mit eingeführt, welche durch ihr Expressionsprodukt leichter zu identifizieren sind.

Hierbei wird ein Reportergen innerhalb der border sequences und eines außerhalb benötigt, damit später die Zellen erkannt werden können, die das Plasmid aufgenommen haben, und die, die die auch Gene exprimieren, dabei kann es sich um verschiedene Reportergene handeln.

Ein Beispiel für ein Reporter-Gen wäre das *E.coli*-Gen für das Enzym  $\beta$ -**Glucuronidase** (GUS-Gen). Dieses ist in den Pflanzen selbst nur in sehr, sehr geringen Mengen vorhanden und kann durch Anfärbung mit X-Glucuronid leicht nachgewiesen werden. Allerdings kann dieser Nachweis nur an toten Zellen erfolgen. Zur Untersuchung in lebenden Zellen eignet sich das **Luciferase-Gen**. Das Enzym Luciferase oxidiert bei Zugabe von Luciferin und ATP das Luciferin was zu messbaren Lichtemissionen führt. Ebenfalls über die Messung von Lichtemissionen (Fluoreszenz) lässt sich das Reportergen für **GFP** (green fluorescent protein) nachweisen.

Sehr oft werden auch **Resistenzgene** zum Nachweis eingebauter Plasmide verwendet, deren Vorhandensein über das Wachstum auf Antibiotika enthaltenden Nährböden nachgewiesen werden kann.

Ein Beispiel hierfür wäre die **Chloramphenicolacetyltransferase** (CAT).

Neben der Detektion des eingeschleusten Gens erlauben diese Indikator-Gene auch Untersuchungen der Aktivität und Regulation des Promotors eines Gens.

### 1.3.5 Promotoren

Unter Promotoren versteht man Abschnitte der DNA, die als Erkennungsregion und Bindungsstelle für die DNA-abhängige RNA-Polymerase dient, hier beginnt die Transkription der DNA. Der Promotor liegt vor dem Operator des Gens und überlappt teilweise mit ihm.

Damit die RNA-Polymerase den Promotor erkennen kann, hat er bestimmte Sequenzen, die bekannteste Sequenz bei Eukaryoten ist die TATA-Box, die durch eine regelmäßige Abfolge der Basen Adenin und Thymin charakterisiert ist. Die TATA-Box liegt ca. 10 Basenpaare vor der Initiationsstelle der Transkription. Eine andere Erkennungssequenz ist die CAAT-Box, sie liegt weiter von der Initiationsstelle entfernt als die TATA-Box. Außerdem gibt es im Promotor noch weitere Sequenzen, zum Beispiel die Enhancer- oder Silencer-Sequenzen, die Einfluß auf die Aktivität des Promotors haben; sie liegen weit vor der TATA-Box.

Es gibt Promotoren, die erst durch den Einfluß eines anderen Moleküls aktiv werden, die so genannten **induzierbaren Promotoren**. So gibt es Promotoren, die sich zum Beispiel unter Lichteinfluß so verändern, dass die RNA-Polymerase binden kann. Ebenso gibt es **reprimierbare Promotoren**, an die ein Molekül bindet und den Promotor damit für die RNA-Polymerase unerreichbar macht. Viele Promotoren sind auch gewebespezifisch, sind also nur in bestimmten Geweben der Pflanze aktiv. Promotoren, die in der ganzen Pflanze aktiv sind, nennt man **konstitutiv**.

Beispiele für Promotoren sind der **CaMV-35S-Promotor**, der aus dem Cauliflower-Mosaic-Virus stammt oder der **nos-Promotor** aus dem Ti-Plasmid von *A.tumefaciens*.

### 1.4 Aufzucht einer transgenen Pflanze aus transformierten Zellen

Um aus eine transgene Pflanze erzeugen zu können, werden Blattstückchen in eine Suspension gegeben, die *A.tumefaciens* mit dem transformierten Vektor enthält. Die verletzten Zellen an den Schnittstellen schütten Phenole aus und werden daraufhin von den Bakterien befallen. Dann werden die infizierten Blattstücke in ein agarosehaltiges Kulturmedium überführt, das Auxine und Cytocinine enthält, die die Pflanzenzellen zum Tumorwachstum anregt. Nun werden die Zellen, die nicht transformiert wurden, mittels des Antibiotikums, dessen Resistenzgen die transformierten Zellen enthalten, abgetötet. Auch die Bakterien werden durch ein weiteres Antibiotikum abgetötet.

Die übrig gebliebenen Zellen werden dann in ein Nährmedium überführt, das die Wurzel- und Sprossbildung stimuliert. So können Pflänzchen herangezogen werden, in denen alle Zellen die neuen Gene enthalten.

## 1.5 Regulation der Genaktivität in Pflanzen

Durch den Einbau geeigneter Promotoren (z.B. gewebespezifisch oder konstitutiv) kann die Expression eingeschleuster Gene in den Pflanzen gesteuert werden. Eine andere Verwendung der Gentechnologie ermöglicht es, die unerwünschte Expression bestimmter Pflanzengene zu unterdrücken. Hierzu bedient man sich verschiedener Methoden:

### 1.5.1 Antisense-Technik

Bei dieser Methode bestimmt man die Nukleotid-Sequenz des Genes, das ausgeschaltet werden soll. Daraufhin wird dieses Gen spiegelbildlich hinter den gleichen Promotor ins Genom der Pflanze eingebaut. Wird diese neukombinierte Gensequenz transkribiert, entstehen zwei komplementäre mRNA-Stränge, die sich zusammenlagern und von der Pflanzenzelle sofort abgebaut werden. Dies liegt daran, dass die Pflanze doppelsträngige RNA als Virus-RNA erkennt und bekämpft.

### 1.5.2 Co-Suppression

Die effektivere Methode zur Ausschaltung von Genen ist die Co-Suppression. Hierbei wird das auszuschaltende Gen noch mehrmals in das Genom integriert, so dass es zu einer Überexprimierung des Genprodukts kommt. Der genaue Vorgang ist noch nicht verstanden, aber die Überexprimierung führt in manchen Fällen dazu, dass weder das eigentliche noch das eingeführte Gen mehr abgelesen werden.

Beide Methoden der Gen-Ausschaltung funktionieren nicht hundertprozentig. Dies hat den Vorteil, dass Stoffwechselprodukte, die für die Pflanze eventuell essentiell sind, nicht komplett wegfallen.

## 1.6 Anwendungsmöglichkeiten transgener Pflanzen

In den letzten Jahren hat die Gentechnologie viele Ergebnisse geliefert, die die praktische Anwendung revolutionieren. Mittlerweile ist es üblich, in einer Pflanze durch gentechnische Transformationen eine erhöhte oder erniedrigte Expression eines zu untersuchenden Proteins hervorzurufen, um aus den Ergebnissen des Versuchs Rückschlüsse auf die Aufgabe des Proteins in der Pflanze zu ziehen.

Außerdem hat die Industrie ein großes Interesse an gentechnisch veränderten Pflanzen, da man zum Beispiel mit einem Schutz vor Schädlingen den quantitativen und qualitativen Ertrag der Pflanze erhöhen kann. Im Folgenden möchten wir einige Beispiele für die Anwendung von transformierten Pflanzen geben:

### 1.6.1. Schutz vor Insektenfraß

Durch den Kartoffelkäfer, den Maiszünsler oder den Baumwollkapselwurm entstehen Schäden, die die Ernte teilweise sogar um 1/6 reduzieren. Dies macht es nötig, die Schädlinge auf chemischem Weg zu bekämpfen. Die früher verwendeten Mittel hatten den Nachteil, dass sie sehr langsam abgebaut wurden und sich in der Nahrungskette angereichert haben, im Gegensatz dazu werden die heute verwendeten Mittel sehr schnell abgebaut. Leider treffen diese Schädlingsbekämpfungsmittel aber auch nützliche Insekten wie Bienen und sind auch für Menschen giftig.

Ersatzweise werden schon länger biologische Insektizide mit einem Wirkstoff aus dem *Bacillus thuringensis* (BT) angewendet. Diese Bakterien bilden die so genannten **BT-Proteine**, die durch Bindung an Rezeptoren im Darm der Insekten die Nahrungsresorption behindern. Dies führt zu einem Verhungern der Insekten, obwohl sie Nahrung zu sich nehmen.

Nach demselben Prinzip funktionieren **Proteinase-Hemmer** und **Amylase-Hemmer**, die die Insekten am Verdauen der aufgenommenen Nahrung hindern.

Die Gene für die BT-Proteine oder die Proteinase-Hemmer wurden gentechnisch in die Pflanzen eingeführt und schützen diese so vor Insektenfraß.

### 1.6.2 Schutz vor Viren

Durch den Einbau eines Gens, das die Bildung von **viralen Hüllproteinen** codiert, können Pflanzen vor dem Befall dieses Virus' geschützt werden. Hierbei werden die Pflanzen durch das Hüllprotein zur Bildung von Antikörpern angeregt und sind gegen folgende Angriffe dieser Viren immun.

### 1.6.3 Schutz vor Pilzbefall

Manche Pflanzen schützen sich gegen den Angriff von Pilzen dadurch, dass sie die Zellwand der Pilze mit **Chitinasen** angreifen. Das Gen für die Produktion von Chitinase kann auf andere Pflanzen übertragen werden und macht diese ebenfalls resistent gegen Pilzbefall.

### 1.6.4 Herbizidresistenz

Schon lange werden Herbizide eingesetzt, um Ackerunkräuter zu vernichten. Die Firma Monsanto hat das Total-Herbizid Glyphosphat (Round up®) entwickelt. Dieses Mittel hemmt spezifisch die Synthese von aromatischen Aminosäuren durch den Shikimatweg auf der Stufe der EPSP-Synthase. Der Shikimat-Weg existiert bei den Tieren nicht, außerdem ist Glyphosphat schnell abbaubar und tötet auch die hartnäckigsten Unkräuter ab. Um die Nutzpflanzen vor dem Herbizid zu schützen, wurden den

Pflanzen Gene aus Bakterien eingebaut, die diese gegenüber dem Glyphosphat weniger empfindlich machen.

### 1.6.5 Ertragsverbesserung

Der Ertrag einiger Pflanzen kann durch die Bildung von **Hybriden** gesteigert werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist Triticale, eine Mischung aus Weizen und Roggen. Die transformierten Pflanzen codieren Enzyme und Proteine beider Arten und können so ein breiteres Spektrum an Temperaturoptima und mehr Ressourcen nützen.

Außerdem kann die Verteilung der Biomasse gentechnisch verändert werden, so dass die verwertbaren Teile der Pflanze größer sind. Auch die Inhaltsstoffkonzentration der Pflanzen kann durch gentechnologische Manipulationen gesteigert werden.

Ein bekanntes Beispiel ist die Flavr-Savr-Tomate® (Anti-Matsch-Tomate), bei der durch die Antisense-Technik das Gen für den Reifungsprozess ausgeschaltet wurde. Bei diesen Tomaten wird das Pektin in der Zellwand nicht, wie bei normalen Tomaten, zersetzt, die Zellstruktur bleibt sehr lange erhalten und die Tomate „matscht“ nicht mehr.

### 1.6.6 Schutz vor abiotischem Stress

Mittlerweile besteht auch die Möglichkeit, in Pflanzen Gene zu übertragen, die sie widerstandsfähiger gegen Klimaeinflüsse, Schwermetalle, Sauerstoffradikale oder Salze im Boden machen. Diese Pflanzen können dann an Orten angebaut werden, an denen ihre „normalen“ Verwandten nicht mehr wachsen können, so kann ein höherer Ertrag erzielt werden. Dies wird dadurch erreicht, dass man in den Pflanzen die Überexpression der an der Stressantwort beteiligten Enzyme veranlasst.

## 2. Material und Methoden

Die bei unseren Versuchen verwendeten transgenen Pflanzen der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) besaßen verschiedene Promotoren. Zum einen den CaMV35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaic Virus), zum anderen den X-Prom, über den wir relativ wenig wissen. Der CaMV35S-Promotor wird bei der Arbeit mit transgenen Pflanzen sehr gerne verwendet, da er als konstitutiv exprimierter Promotor in allen Gewebetypen ständig aktiv ist.

Als Indikator-Gen haben wir das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen (GUS-Gen) verwendet. Die  $\beta$ -Glucuronidase ist ein Enzym, das in den meisten Pflanzengeweben nicht exprimiert wird und sich daher besonders gut als Indikator eignet. Es stammt aus *E.coli* und hat sein Temperaturoptimum bei 37°C, also bei Körpertemperatur.



Um nachzuweisen, dass  $\beta$ -Glucuronidase in der Pflanze gebildet wurde verwendeten wir 2 verschiedene Substrate. Zum einen das sogenannte X-Glc, zum anderen MUG (4-Methyl- $\beta$ -D-umbelliferylglucuronid). Das X-Glc besteht aus einem organischen Gruppe und einem Zuckerrest, die über eine glycosidische Bindung verknüpft sind. Die  $\beta$ -Glucuronidase spaltet diese Bindung, worauf der die bisher farblose organische Gruppe sich blau färbt.

Beim MUG entsteht durch die Spaltung der glycosidischen Bindung Methylumbelliferon, welches durch Anregung mit UV-Licht von 365nm Länge blaues Licht mit einer Wellenlänge von 455nm aussendet. Diese Extinktion kann mit dem Fluorimeter gemessen werden.

Es wurde mit zwei Proben aus Pflanzen mit dem CaMV35S-Promotor, einer mit X-Prom und einem Wildtyp gearbeitet.

Im ersten Versuchsteil wurde der  $\beta$ -Glucuronidase-Gehalt in verschiedenen Pflanzenteilen (Blüte, Blatt, Stengel, Wurzel) mittels des X-Glc's bestimmt. Im zweiten Versuchsteil wurde ein aus den Pflanzen gewonnenes Extrakt mit dem fluorigenem MUG versetzt und die Promotoraktivität über die Fluoreszenz bestimmt.

Die nähere Durchführung kann dem Anhang 1 entnommen werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Versuch 1: Messung der Promotoraktivität durch in situ-Färbung

Tab.1: In situ-Färbung mit X-Glc

	Blüte	Blatt	Stengel	Wurzel
<b>Wildtyp</b>				
nach ca.20min	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
nach ca. 60min	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
nach ca. 3 h	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
<b>CaMV35S/GUS</b>				
nach ca.20min	Stamina blau	keine Färbung	keine Färbung	Blaufärbung
nach ca. 60min	Stamina blau	leichte Blaufärbung	blau-grün	Blaufärbung
nach ca. 3 h	komplett blau	Blattadern blau	leicht blau	komplette Färbung
<b>X-Prom/GUS</b>				
nach ca.20min	Stamina blau	blauer Fleck in der Mitte	keine Färbung	Blaufärbung
nach ca. 60min	Stamina blau	Adern blau gefärbt	Nodien stark gefärbt	tiefblaue Färbung
nach ca. 3 h	komplett blau	Adern blau gefärbt	Nodien stark gefärbt	tiefblaue Färbung

Der *Arabidopsis*-Wildtyp zeigte auch nach 3 Stunden noch keinerlei Färbung. Bei CaMV35S und X-Prom als verwendetem Promotor zeigte sich bei den Wurzeln und den Stamina schon nach den ersten 20 Minuten eine deutliche Blaufärbung. Nach 60 Minuten zeigten sämtliche Blattteile bei beiden Promotortypen zumindest eine leichte Färbung, die sich nach weiteren 2 Stunden noch verstärkte.

### 3.2 Versuch 2: Fluorimetrische Messung der Promotoraktivitäten

In der folgenden Tabelle ist die Konzentration an  $\beta$ -Glucosidase in mM in den verschiedenen Pflanzenextrakten angegeben. Diese wurde bestimmt durch fluorimetrische Messungen nach Zusetzen von GUS. Das Extrakt/GUS-Gemisch wurde nach 2; 6; 15; 40 und 75 Minuten Inkubationszeit auf eine Stopplösung gegeben.

Mit einer 10mM Eichlösung (4-Methylbelliferon) wurde das Fluorimeter auf 100% geeicht. Das heißt, dass 100% auf der Anzeige des Fluorimeters einer Konzentration von 100% entsprechen.

Auch die vorgenommenen Verdünnungen wurden in der Tabelle schon mit eingerechnet. Diese wären:

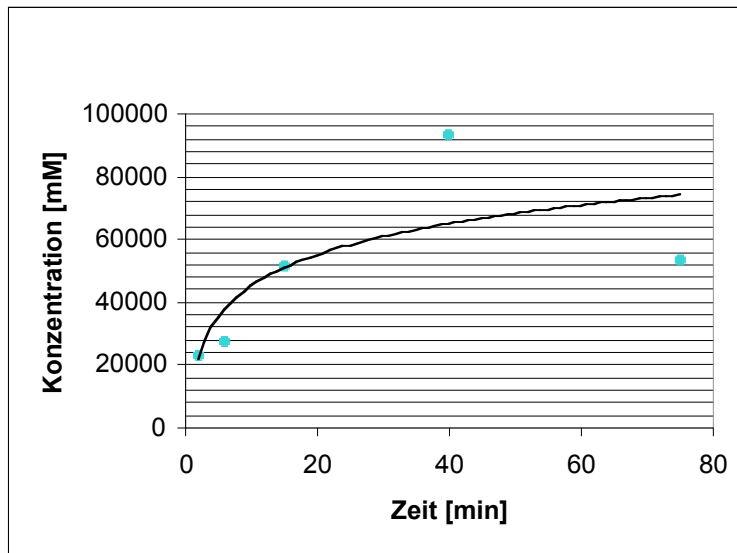
- 100  $\mu$ l Blattmaterial (in Extraktionspuffer) zu 500  $\mu$ l Reaktionslösung  $\ddot{E}$  VF = 6
- 100  $\mu$ l der Lösung in 1900  $\mu$ l Stopplösung  $\ddot{E}$  VF = 20
- verschiedene Verdünnungen der Proben um „overflow“ zu verhindern  $\ddot{E}$  VF zwischen 50 und 200

Die gemessenen relativen Prozente und die unterschiedlichen Verdünnungen können dem Anhang 2 entnommen werden.

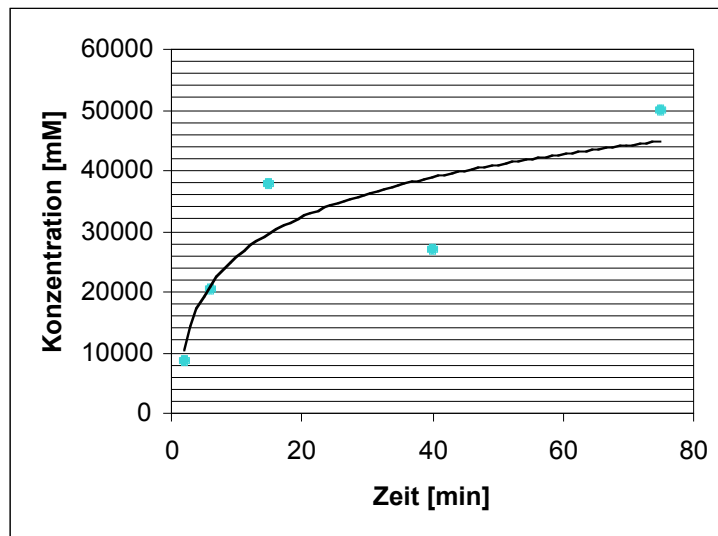
Tab.2: Konzentration an  $\beta$ -Glucosidase in mM

	Einwaage [mg]	nach 2min	nach 6min	nach 15min	nach 40min	nach 75min
<b>Wildtyp</b>	103,4	-	-	-	-	288
<b>X-Prom/GUS [mM]</b>	102,7	33000	29940	55320	122280	71280
<b>X-Prom/GUS [mM]</b>	110,4	12840	24780	47640	63360	34668
<b><math>\phi</math>X-Prom/GUS [mM]</b>	106,55	22920	27360	51480	92820	52974
<b>CaMV35S/GUD [mM]</b>	107,5	8640	20400	37800	26880	49680

Die errechneten Konzentrationen lassen sich in einem Diagramm gegen die Zeit auftragen.



Dia. 1: Enzymaktivität X-Prom/GUS



Dia. 2: : Enzymaktivität CaMV35S/GUS

Aus den Diagrammen lässt sich anhand der Kalibriergerade die Konzentration nach 60 Minuten ablesen. Daraus lässt sich die Aktivität des GUS-Gens, bzw. der Promotoren bestimmen. Bei dem X-Prom liegt die Konzentration nach 60 min bei 68000mM, bei dem CaMV35S-Promotor bei 42000mM.

Die Aktivität pro Stunde ergibt sich durch  $A = c \cdot V_{\text{Küvette}} \cdot M_{\text{MUG}}$ .

- $A_{\text{X-Prom}} = 68 \text{ mol/l} \cdot 0,002 \text{ l} \cdot 198,2 \text{ g/mol} = \mathbf{26,9552 \cdot 10^6 \text{ Unit}} \text{ (}\mu\text{g/h)}$
- $A_{\text{CaMV35S}} = 42 \text{ mol/l} \cdot 0,002 \text{ l} \cdot 198,2 \text{ g/mol} = \mathbf{16,6488 \cdot 10^6 \text{ Unit}} \text{ (}\mu\text{g/h)}$

Bezogen auf die Menge eingesetzten Pflanzenmaterials ergibt sich:

- $A_{\text{X-Prom}} = \mathbf{252,98 \cdot 10^3 \text{ Unit/mg}}$

- $A_{\text{CaMV35S}} = 154,87 \cdot 10^3 \text{ Unit/mg}$

Der Wildtyp diente als Negativkontrolle, von ihm wird also auch keine Aktivität berechnet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Versuch 1:

Die Ergebnisse haben die Erwartungen für den Wildtyp und die Mutante mit CaMV25S-Promotor voll bestätigt.

So ist beim Wildtyp aufgrund der fehlenden  $\beta$ -Glucuronidase keine Reaktion mit dem zugegebenen Substrat erfolgt und folglich auch keine Blaufärbung festzustellen gewesen.

Bei der Mutante mit dem CaMV25S-Promotor ist eine starke Blaufärbung in sämtlichen Pflanzenteilen zu sehen. Dies liegt daran, dass es sich hier um einen konstitutiven Promotor handelt, durch den das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen ständig abgelesen wird. Wird hier X-Glc als Substrat zugegeben kommt es zu einer Reaktion und damit zu einer Blaufärbung der Pflanzenteile.

Bei dem unbekanntem Promotor X-Prom scheint es sich ebenfalls um einen konstitutiven Promotor zu handeln, da hier gleichermaßen wie beim CaMV25S-Promotor zu einer starken Färbung in sämtlichen Pflanzenteilen kommt. Die Färbung ist hier sogar noch etwas intensiver, was darauf schließen lässt, dass der X-Prom ein noch stärkerer Promotor ist.

### 4.2 Versuch 2:

Die Aktivitätsbestimmung der Promotoren brachte ein ähnliches Ergebnis wie bei Versuch 1. So ist die von uns bestimmte Aktivität des X-Promotors um ca. 60% größer als die des CaMV35S-Promotors.

Der Wildtyp hätte eigentlich überhaupt keine Fluoreszenz zeigen sollen. Die 288mM sind allerdings, verglichen mit den Konzentrationen der transgenen Pflanzen, vernachlässigbar gering. Ursache der Fluoreszenz könnten Verunreinigungen der Küvette gewesen sein, da diese in den vorherigen Versuchen mit dem  $\beta$ -Glucuronidase haltigen Material in Kontakt kam.

Einzelne von der Kalibriergeraden stark abweichende Werte lassen sich durch Messfehler erklären, da es sich bei dem Fluorimeter um ein hochempfindliches Gerät handelt. Eventuell sind auch hier wieder Verunreinigungen oder Fehler in der vorherigen Versuchsdurchführung die Ursache.

## 5. Zusammenfassung

Der Versuch zur pflanzlichen Gentechnologie sollte uns mit Verfahren zum Nachweis von Veränderungen im pflanzlichen Genom und deren Ausprägung bekannt machen. Hierzu untersuchten wir mittels eines Enzym codierenden Indikatorgens und verschiedenen Substraten (X-Glc, MUG) die Aktivität zweier Promotoren (X-Prom, CaMV35S-Prom).

## Literatur

- Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1996
- Watson, James D.: Rekombinierte DNA, 2.Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1993
- Munk, K.: Grundstudium der Biologie–Botanik, Spektrum Verlag 2001
- Campbell, Biologie; 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum Akademischer Verlag