



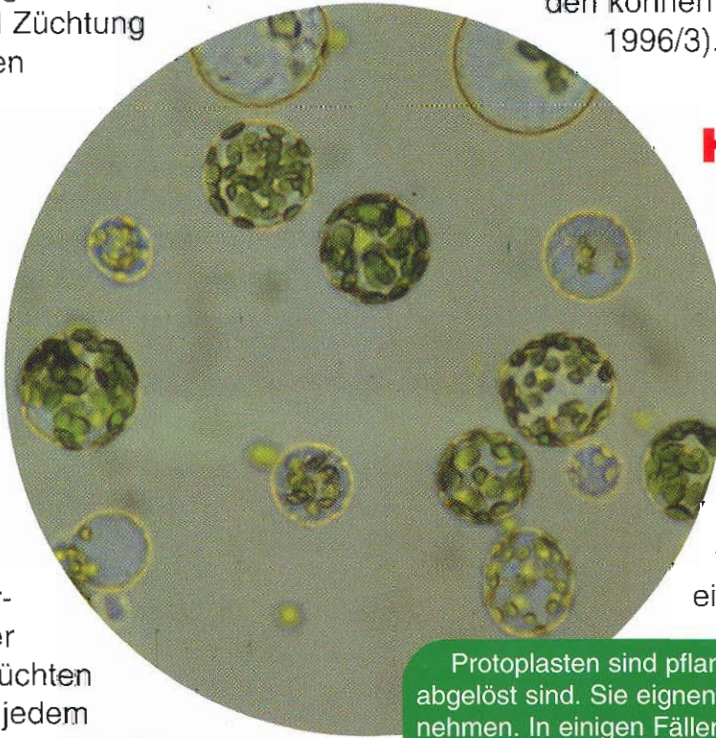
Wie gelangen fremde Gene in eine Zelle?

Auch in der Natur dringen fremde Gene in Pflanzenzellen ein

Die Züchtung schuf unsere heutigen Nutzpflanzen

Seit mehr als 10 000 Jahren verändert der Mensch Pflanzen so, daß sie seinen Bedürfnissen entgegenkommen. Durch Auswahl und Züchtung schuf er die heutigen Nutzpflanzen aus unscheinbaren Urformen. Dabei stellen Ertrag, Widerstandsfähigkeit gegen Krankheitserreger und Qualität wichtige Faktoren dar. Seit der Wiederentdeckung der Mendelschen Vererbungsregeln zu Beginn dieses Jahrhunderts konnte der Mensch gezielter züchten als zuvor. Aber bei jedem Kreuzungsvorgang werden die Erbanlagen der beiden Eltern - ob günstige oder weniger günstige - kräftig durcheinander gemischt. Gewünschte Kombinationen sortiert der Züchter dann aus, um sie weiter zu kreuzen oder zu vermehren. Ein solch "klassischer" Züchtungsvorgang dauert lange, bis zu 20 Jahre. Durch die Gentechnik läßt sich gezielt eine bestimmte Eigenschaft übertragen. Dabei

kennt man im Gegensatz zu der klassischen Züchtung genau die Anzahl und die Art der eingeschleusten Gene. Wichtiger ist es aber noch, daß über die Artgrenzen hinaus Gene, die zum Beispiel Widerstandskräfte gegen Schädlinge wie Pilze und Viren verleihen, übertragen werden können (siehe *MPIZ aktuell* 1996/2 und 1996/3).



Hürden behindern fremde Gene auf ihrem Weg in den Zellkern

Seit Beginn der achtziger Jahre ist es möglich fremde Gene in das Erbgut von Pflanzen einzuschleusen. Allerdings ist das nicht so einfach. Eine Pflanzenzelle besitzt eine Zellwand und die stellt die

Protoplasten sind pflanzliche Zellen, deren Zellwände abgelöst sind. Sie eignen sich besonders gut, um Gene aufzunehmen. In einigen Fällen kann man aus diesen Einzelzellen durch sogenannte Gewebekultur ganze Pflanzen ziehen.

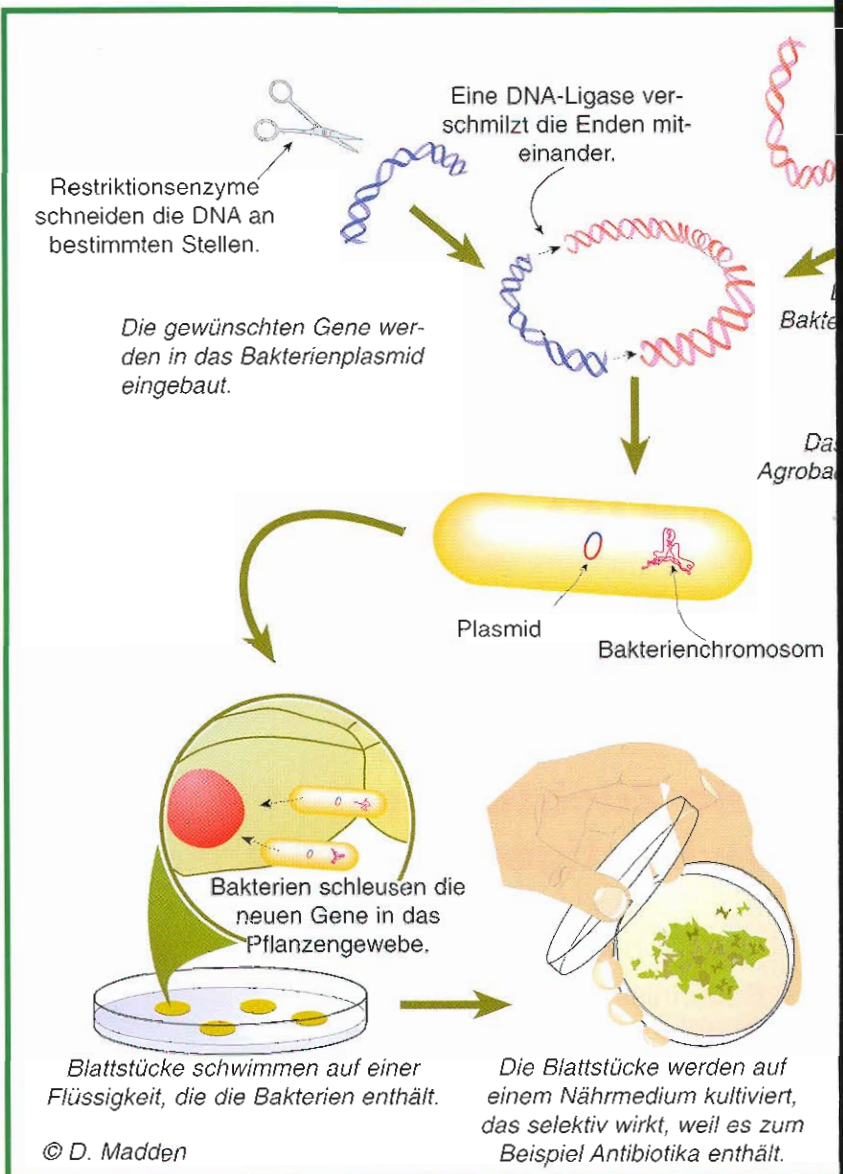
erste Barriere dar. Als nächstes folgt die Zellmembran. Ist diese überwunden, dann muß die neu eingeschleuste DNA noch in den Zellkern gelangen und dort stabil - also auch für die folgenden Generationen verfügbar - in das Erbgut eingebaut werden und zwar so, daß die neuen Gene angeschaltet sind.

Natürliche Gefahren helfen, fremde Gene in Pflanzen zu schleusen

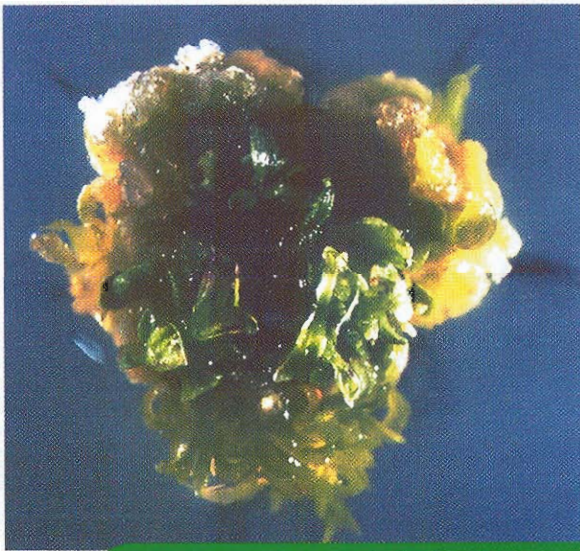
Das Hineinschmuggeln von fremden Genen in eine Pflanze ist ein Vorgang, der durchaus auch in der Natur vorkommt. Ein kleines Bakterium, das im Boden lebt, tut sich als wahrer Meister auf diesem Gebiet hervor: **Agrobacterium tumefaciens**.

Pflanzen, die verwundet werden, scheiden Stoffe aus, die diese Mikroorganismen anlocken. Überfallartig besiedeln die Bakterien das Pflanzengewebe. Dabei schleusen sie einen Teil ihrer Erbinformation in die Zellen ein. Dieser Teil des Bakteriengenoms liegt auf einem DNA-Ring, einem sogenannten Plasmid. Dringt diese Information in die Zelle der Pflanze ein, dann beginnt diese, Nährstoffe für die Bakterien zu produzieren. Darüber hinaus beginnt das Pflanzengewebe unkontrolliert zu wuchern, denn neben der Information für die Herstellung der Nährstoffe schmuggeln die Mikroorganismen ebenfalls zusätzliche Baupläne für Pflanzenwachstumshormone in die Zellen. Dadurch gerät das Wachstum der Zellen außer Kontrolle. Die Pflanze wird Zeit ihres Lebens zur nichtversiegenden Stickstoffquelle für die Bakterien. Sichtbar werden die Veränderungen als sogenannte Tumore an den befallenen Pflanzenstengeln. Daher der Name des Plasmids: **Tumor induzierend**. Ein Teil der DNA des Plasmids, die sogenannte **Transfer-DNA**, dringt in das Erbgut der Pflanze ein und verbleibt dort. Sie enthält die Information für die Pflanzenhormone und die Herstellung der Nährstoffe.

Wissenschaftler nutzen diesen natürlichen Vorgang, denn sie erkannten schnell, daß die Gene, die auf der T-DNA liegen, wie blinde Passagiere – also sozusagen Huckepack – vom Bakterium übertragen werden. Lediglich die DNA-Stücke, die diese Gene begrenzen (border oder Randsequenzen) und



einige Erbanlagen, die außerhalb der T-DNA in der sogenannten **Vir-Region** (Virulenz) liegen, sind für den Vorgang wichtig. Entfernt man die ursprünglichen T-DNA Gene, dann erhält man eine "entschärfte" T-DNA, die nicht zur Bildung von Tumoren führt. Nun kann man die ursprünglichen Gene durch beliebige Gene ersetzen. Da aber nicht alle Zellen der Pflanzen die neue Eigenschaft enthalten, ist es für die Wissenschaftler wichtig, ein sogenanntes **Marker-gen** mit in die Zelle zu schleusen.



Agrobacterium ist ein im Boden lebendes Bakterium, das ein wahrer Meister auf dem Gebiet der Übertragung von Erbgut ist. Mit diesem Trick sorgt es dafür, daß die Pflanze Nährstoffe produziert, die dem Mikroorganismus selber nutzen.

Dieses Gen kann zum Beispiel eine Resistenz gegen ein bekanntes Antibiotika sein.



Restriktionsenzym

Die nicht erwünschten
Gene werden aus dem
Plasmid entfernt.

Das neue Plasmid wird in
Agrobacterium tumefaciens einge-
schleust.

Ganze Pflanzen, die das
neue Gen enthalten, wer-
den so aus einzelnen
Zellen herangezogen.

Wenn sie die behandelten Zellen oder Gewebestücke dann auf ein Nährmedium legen, das dieses Antibiotikum enthält, dann überleben genau die Zellen, die die gewünschten neuen Gene zusammen mit den Markergenen besitzen - also sozusagen markiert sind. In der Folge ist es dann möglich, aus diesen einzelnen Zellen ganze Pflanzen heranzuziehen. Denn bestimmte Pflanzenzellen besitzen im Gegensatz zu tierischen Zellen die Möglichkeit, unter geeigneten Bedingungen ihre Teilungsfähigkeit wiederzuerlangen und sich zu einer ganzen Pflanze zu entwickeln (Regeneration).

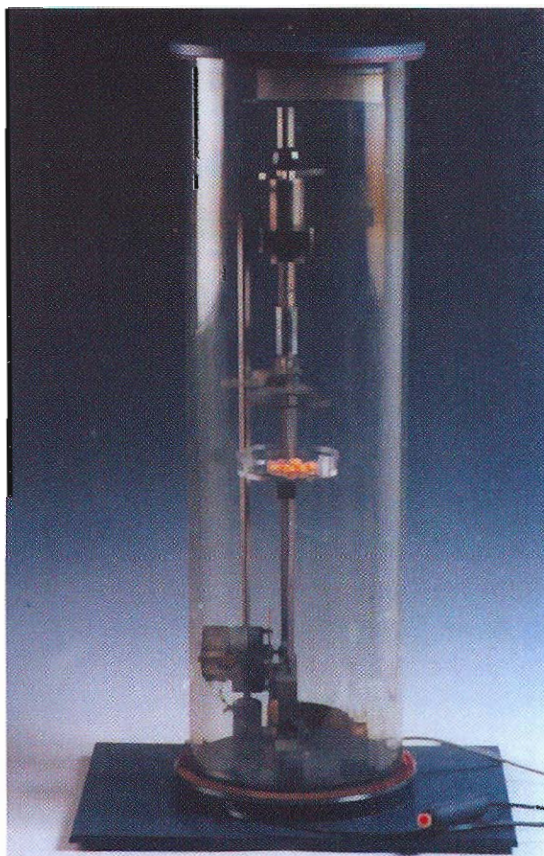
Das Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung hat

für dieses Verfahren der Übertragung von Genen in eine Pflanzenzelle ein Patent angemeldet.

Agrobacterium ist wohl das wichtigste Werkzeug bei der Übertragung von fremden Genen in eine Pflanzenzelle (**Transformation**), denn es hat ein erstaunlich breites Wirtsspektrum. Das heißt mehr als sechzig Prozent aller zweikeimblättrigen Pflanzen und auch einige einkeimblättrige Pflanzen werden durch diesen Mikroorganismus befallen. Allerdings ist es nach wie vor schwierig Gräser (dazu gehören alle wichtigen Getreidearten wie Reis, Weizen, Roggen und Gerste) mit diesem kleinen Helfer zu verändern. Erste Erfolge gibt es beim Reis und Mais zu melden. Allerdings hat man hier das Ti-Plasmid zuvor grundlegend verändert.

Die Genkanone

Auf der Suche nach neuen Methoden mit denen man auch andere Pflanzen wie zum Beispiel die für die Ernährung so wichtigen Getreidesorten verändern kann, sind die Wissenschaftler sehr erfinderisch. Zahlreiche Methoden entwickelten sie im Laufe der Jahre. Der Beschuss von pflanzlichem Gewebe mit winzigen Partikeln aus Gold oder Wolfram ist eine davon. Diese Partikel sind nur etwa zwei μm groß, also ein Fünfhundertstel eines Millimeters. An solche „Kugeln“ bindet man zunächst DNA. Mit hoher Geschwindigkeit feuert eine Genkanone diese Partikel auf das pflanzliche Gewebe oder einzelne Zellen. Der Druck dazu entsteht je nach Anlage durch Preßluft, Strom, Helium oder Kohlendioxid. Die so beschleunigten Partikel durchbohren die Zellwände und die Zellmembranen. Das Zellinnere bremst sie ab. Die DNA löst sich ab und kann eventuell in das Erbgut des Zellkerns eingebaut werden. Natürlich wird das Gewebe dabei verletzt. Wählt man aber die Versuchsbedingungen günstig, dann können sich die einzelnen Zellen weiterentwickeln.



Die Genkanone (particle gun) ist eine Anlage, mit der man DNA in Zellen feuern kann. Die DNA wird dazu zunächst an Goldpartikel gebunden und dann auf das Gewebe geschossen (hier Maiskörner).

Fast alle wichtigen Kultursorten transformierten Wissenschaftler mit dieser Methode schon. Transformieren das heißt gentechnisch verändern. Neben der Transformation durch Agrobacterium kann der Gebrauch der Genkanone als eine der erfolgversprechendsten Methoden gesehen werden. Allerdings ist nicht nur die gentechnische Veränderung einer Pflanzenzelle eine Hürde auf dem Weg zu Pflanzen mit neuen Eigenschaften: Auch die Regeneration ganzer

Pflanzen aus einzelnen Zellen stellt ein Hindernis dar. Für jede Pflanzenart, mehr noch für jede Sorte, müssen geeignete Bedingungen gefunden und ausgetestet werden.

Direkter Gentransfer in Protoplasten

Im Gegensatz zu tierischen Zellen besitzen pflanzliche Zellen eine Zellwand, die der Pflanze ihre Festigkeit verleiht. Diese Zellwand umgibt den sogenannten Protoplasten, den eigentlichen lebenden Teil der Zelle.

Bestimmte Proteine (Enzyme) können die Zellwände abbauen. Dadurch erhält man die Protoplasten, die unter dem Mikroskop wie kleine, grüne Tennisbälle aussehen (siehe Titelblatt). Schafft man geeignete Bedingungen, kann in diese Bälle DNA von außen eindringen (MPIZ *aktuell* 1996/1). Die erfolgreiche Aufnahme von DNA in den Protoplasten setzt einen engen Kontakt der beiden Komponenten voraus. Aber sowohl die Nukleinsäure (DNA) als auch der Protoplast besitzen beide negative Ladungen und stoßen sich daher ab. Positiv geladene Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} erleichtern den Vorgang. Ist der Kontakt erst einmal hergestellt, dann müssen die Protoplasten noch dazu gebracht werden, die DNA aufzunehmen. Substanzen wie Polyethylenglykol zeigten sich hierzu als besonders geeignet.



Aus einer einzelnen Zelle kann eine ganze Pflanze durch Gewebekultur herangezogen werden. Ist diese Zelle gentechnisch verändert, dann enthalten alle Zellen dieser neuen Pflanze das neue Gen.

Mit solchen Transfermethoden versuchen Wissenschaftler zum Beispiel die Qualität von Nutzpflanzen zu verbessern. Ein Beispiel ist die in Amerika auf dem Markt schon erhältliche Antimatsch -Tomate. Ebenso schaffen sie im Bereich nachwachsende Rohstoffe Alternativen für Landwirte (MPIZ *aktuell* 1996/5, 1996/6) oder sie verbessern die Widerstandskraft von Pflanzen gegen Schädlinge. Aber auch für die Erforschung von Grundlagen sind diese Methoden wichtig. Viele Wege führen nach Rom beziehungsweise in den Zellkern. Der optimale Weg, den man für jede Pflanzensorte benutzen kann, ist noch nicht gefunden worden. Vielmehr muß für jede Pflanze ein eigener, für sie richtiger Weg ausgetestet werden. Dieser führt

nur über die geeignete Gentransfermethode und eine spezielle Gewebekultur zum Ziel.

Literatur

→ Hans-Henning Steinbiß
Transgene Pflanzen, Spektrum Verlag

→ Biotechnologie in der Pflanzenzüchtung Programm Biotechnologie 2000. Herausgeber BEO, BMBF & KFA Jülich (1994) 105-110.

→ MPI Broschüre 1994-1995, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln

Vorschau

Unsere nächste Ausgabe von MPIZ *aktuell* befaßt sich mit Nachwachsenden Rohstoffen:

Die amylosefreie Kartoffel. Durch Gentechnik zu umweltfreundlichen, nachwachsenden Rohstoffen für die Industrie

Gelbes Gold, maßgeschneidertes Rapsöl durch Gentechnik

Text, Satz & Layout: Ellen Peerenboom

Bildnachweis: M. Kalda, E. Peerenboom, D. Madden

Druck: Druckerei Reintjes, Kleve

Herausgeber:

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung

Carl-von-Linné-Weg 10

D-50829 Köln

Nachbestellung von MPIZ *aktuell* gegen eine Schutzgebühr von 0,50 DM pro Exemplar zuzüglich Porto ab 10 Exemplare schriftlich an oben genannte Adresse oder telefonisch unter Tel.: 0221 5062 501, Fax: 0221 5062 513

MPIZ *aktuell* ist ebenfalls über Internet abrufbar unter

<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~rsaedler/>

MPIZ*aktuell*/MPIZ*aktuell*.html

© 1996 Ellen Peerenboom und MPI für Züchtungsforschung