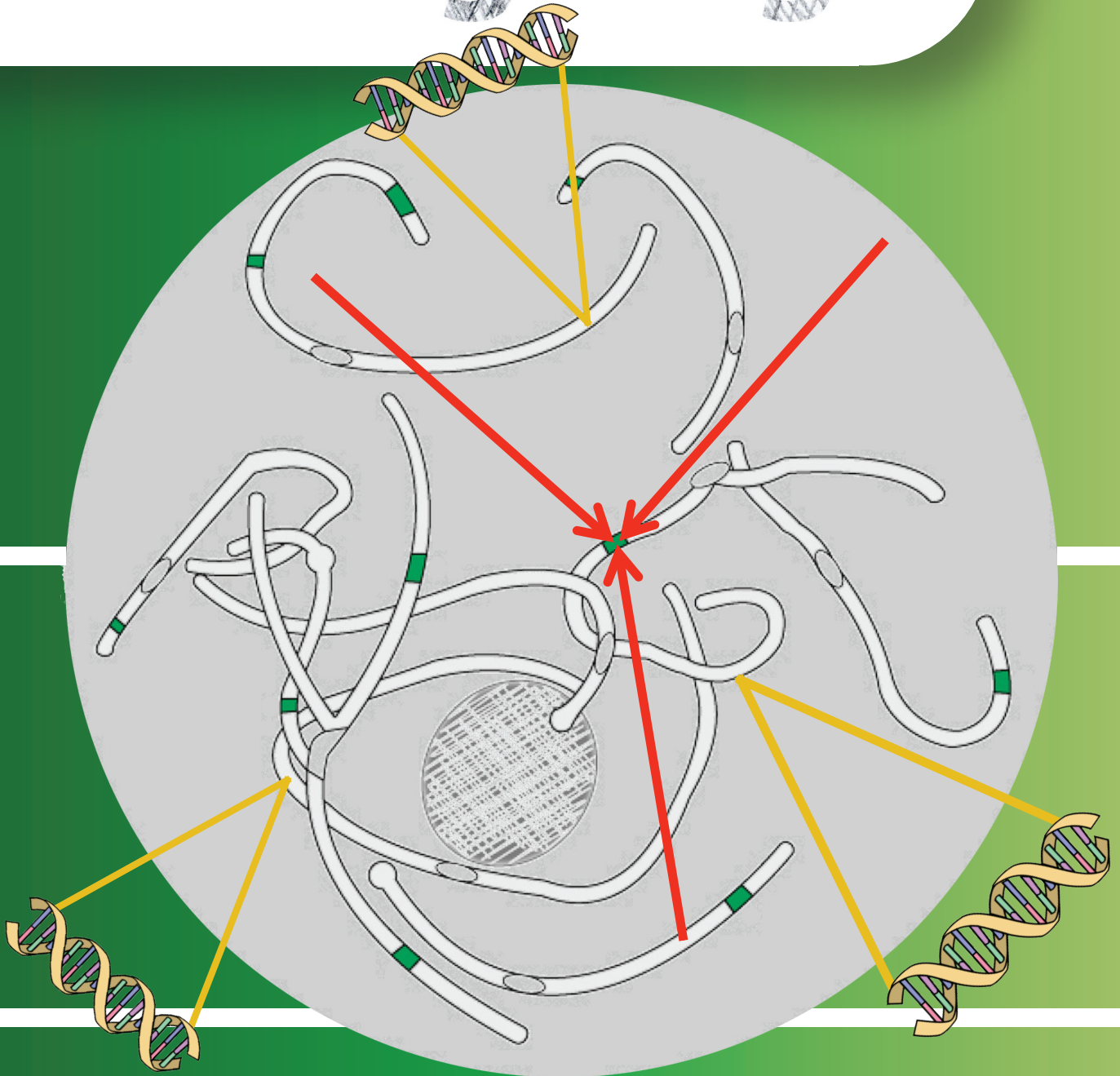


WiS Begierig



**Budo erklärt
die Gentechnik
... und mehr**

Inhalt

1

**Am Anfang stand
Zähmung und
Züchtung**

Seite 3

**Methoden der
Gentechnik**

Seite 4

2

3

**Die neue Revolution:
TALEN**

Seite 14

Am Anfang stand Zähmung und Züchtung

1

Hallo, Guten Tag !

Du erinnerst dich vielleicht an Heft 1 „Budo und die Revolutionen“, in dem wir über Domestikation geredet hatten. Seitdem sind zwei weitere Hefte zu diesem Thema erschienen: „Mais - Pflanze der Götter“ (Heft 2) und „Domestikation im Schnelldurchgang“ (Heft 6). In diesen Fällen wurde zunächst eine Wildpflanze gezähmt und sie somit weiterer Züchtung zugeführt (1,2). Nach der Neolithischen Revolution erfolgte dann mehr als 10 000 Jahre später die Grüne Revolution, die Norman Borlaug durch Züchtung von Kurzstrohsorten initiiert hatte (3). Ihr Erfolg hatte zu einer Verdopplung der Weltbevölkerung zwischen 1960 und 1999 von 3 auf 6 Milliarden Menschen geführt.

Nun war es wieder an der Zeit, eine neue Revolution einzuläuten:

Die gentechnische Revolution



(1) wildes Einkorn (links)
domestiziertes Einkorn (rechts)



(2) Wildgras Teosinte (oben)
domestizierte Mais (unten)



(3) Dr. Norman Borlaug mit seinem Kurzstrohweizen

2

Methoden der Gentechnik

In der klassischen Züchtung werden die ca. 25 000 Gene beider Eltern durch Kreuzung miteinander vermischt. Anschließend wird die gewünschte Merkmalskombination wieder ausgewählt (selektioniert). Dies ist ein aufwändiger, vor allem ein zeitaufwändiger Prozess. Mit molekularen Auswahlmethoden können die geeigneten Genkombinationen bereits in sehr frühen Wachstumsstadien der Nachfolgegeneration ausgewählt werden. Eine optische Beurteilung der Merkmale ist nicht mehr notwendig: daher die enorme Zeitersparnis.

Protoplasten (4) sind Pflanzenzellen, denen die harten, aus Pektinen, Hemizellulose, Protein und Lignin bestehenden Zellwände enzymatisch entfernt wurden und die nur noch von der Zellmembran umschlossen sind. Im Folgenden beschreibe ich den Versuch, der vor 25 Jahren am MPIPZ durchgeführt wurde. Protoplasten einer weiß-blühenden Petunie wurden mit einem DNA-

Was leistet dem gegenüber die Gentechnik?

Sie vermeidet die Durchmischung ganzer Genome und überträgt ein einzelnes Gen in eine Elitesorte, um dieser ein neues Merkmal, z.B. die Resistenz gegenüber einem Krankheitserreger zu vermitteln.

Die hierfür entwickelten recht unterschiedlichen Methoden wollen wir uns nun ansehen.

Plasmid versetzt und auf eine Agar-Platte gegeben, auf der die Protoplasten wieder zu einer ganzen Pflanze regenerieren konnten.

Welche Gene waren auf dem Plasmid lokalisiert?

Ein Gen aus Mais, das eine lachsrot blühende Petunie bewirkt. Das Pigment kommt normalerweise in Petunien nicht vor. Ein Antibiotika-Resistenzgen (Kanamycin) zur Selektion der transformierten Protoplasten (5). Jahre später (1990)

wurde dann mit diesen transgenen, lachsrot blühenden Petunien ein Feldversuch durchgeführt, um sogenannte Transposons einzufangen. Wenn du die Bedeutung von Transposons für die Evolution kennen lernen willst, dann lies WiS Begierig Heft 5 „Werkzeuge der Evolution“. Falls Transposons in ein Gen hineinspringen, dann verursachen sie eine Mutation. Bei ihrem Ausschnitt aus dem Gen hinterlassen sie eine „Fußspur“ (Mutation). Transposons sind sehr „wanderlustig“. Sie ziehen während der Entwicklung des Organismus im Genom umher. Integriert ein Transposon z.B. in ein Gen für Blütenfarbe, dann wird das Gen zerstört, die Blüten wären weiß,



(4) Pflanzenzellen: Protoplasten

da mutiert. Aber auf Grund der Wanderlust des Transposons kann die Funktion des Gens auch wiederhergestellt werden (Reversion). Man erwartet daher eine rot-weiß gesprenkelte Blüte (6). Die Integration eines Transposons in ein vorgegebenes Gen ist selten, sehr selten ($10^{-5} - 10^{-7}$). Unter einer Million Blüten sollten daher nur wenige gesprenkelt blühende Petunien sein. Aber, und das war die große Überraschung des Freiland-Versuches 1990: bis zu 60% aller Blüten waren rot-weiß gesprenkelt (7).

Was war hier passiert? Ungewöhnlich war 1990 die langanhaltende Schönwetterperiode mit intensiver UV-Einstrahlung. Die rotblühenden Petunien bleichten aus und erschienen weiß. Die nach dieser Periode neugebildeten Blüten waren gesprenkelt oder sektoriert (6). Die molekulare Analyse des übertragenen Maisgens deckte etwas Neues auf: Methylgruppen hatten die DNA des Promoters (Schaltstelle) des übertragenen Gens verändert und es in seiner Funktion abgestellt (8).

Da dieser Prozess offensichtlich in jeder Zelle unabhängig passieren konnte, gab es frühe Ereignisse (fast ganz weiße Blüten) spätere Ereignisse (halb weiß/ halb rot) und sehr späte Ereignisse (sehr viele weiße Sprenkel). Das war neu: Durch Umweltfaktoren ausgelöste DNA-Methylierung verändert die Genausprägung.



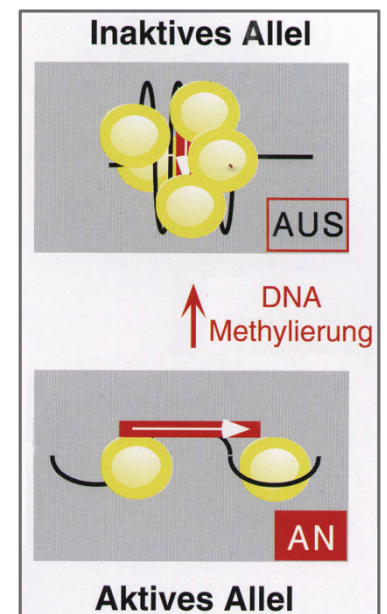
(5) transgene lachsrot-blühende Petunie



(7) Petunien-Feld nach der Hitzeperiode



(6) sektorierte, gesprenkelte Blüte



(8) Schalter der Genaktivität

So geht Forschung.

Hypothese:

Ein gesprenkelter Phänotyp (Erscheinungsbild) wird durch die Integration eines Transposons verursacht.

Befund des Feldversuches:
Das beobachtete Farbmuster der Blüten beruht auf einer DNA-Methylierung des Promoters.

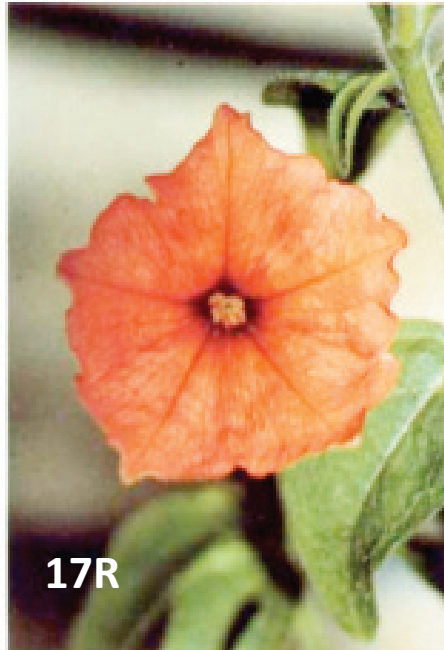
Hieraus ergeben sich neue Fragen:

Wovon hängt die Methylierung ab, Umweltfaktoren, G-C Gehalt des Promoters?

Wie werden diese Veränderungen vererbt?

Du erinnerst dich: wenn eine rot-blühende mit einer weiß-blühenden Pflanze gekreuzt wird, dann sind laut Mendelscher Erbgang die Nachkommen rot-blühend. Rot ist demnach dominant.

Kreuzungen von roten und weißen Linien aus dem Feldversuch ergaben überraschende Ergebnisse.



(9) Kreuzung der isogenen transgenen Linien

Beide Linien sind isogen, d.h. jede Linie hat das transgene Maisgen an der gleichen Stelle (9). Sie unterscheiden sich nur durch Methylierung ihres Promoters. In der rotblühenden Linie ist der Promoter nicht methyliert, wohl aber in der weißblühenden Linie. Wie sehen nun die Nachkommen der Kreuzung aus: rot, weiß, rosa oder gar gesprenkelt?

Die Antwort findest du im benachbarten Schaukasten. Und was du auch noch siehst, es gibt einen reziproken Unterschied (rot x weiß ist anders als weiß x rot). Das ist charakteristisch für cytoplasmatische Vererbung aber auch für einen epigenetischen Erbgang.

Ergebnisse

Kreuzung der roten 17-R Linie mit der isogenen weißen 17-W Linie liefert überraschenderweise keine roten, aber viele weiße (40%) und 60% unterschiedlich rot/weiß gemusterter Blüten.

Die reziproke Kreuzung 17-W mal 17-R zeigt 11% rote, 5% weiße und noch mehr (84%) unterschiedlich gemusterte Blüten.

Beginn der molekularen Epigenetik.

Die Genkanone

Diese Methode wurde insbesondere für die Genübertragung bei Getreiden genutzt.

Das zu übertragende Gen wird auf Gold- oder Wolfram-Kügelchen aufgebracht und dann mit hohem Druck in das Gewebe der Pflanze geschossen.

Abbildung 10 zeigt eine der ersten Genkanonen aus den 1980-er Jahren, wie du sie in der WiS noch bestaunen kannst. In diesem Modell wurde die Druckwelle noch von einem Geschoss (Patrone) generiert. Neuere Modelle nutzen Gasdruck, um die DNA-beschichteten Kügelchen zu beschleunigen.

Die Maiskörner in (11) vor und nach dem „Beschuss“ mit dem C1 Gen verdeutlichen die Effektivität der Prozedur. C1 ist ein Kontrollgen für die Anthozyan-Biosynthese in Mais. Gelbe Maiskörner tragen ein defektes C1-Gen. Zellen, in die ein intaktes C1-Gen geschossen wird, färben sich nach einigen Tagen rot, daher die roten Flecken.

Wollte man aus diesen Zellen ganze transgene Pflanzen regenerieren, dann sollte natürlich auch ein Selektionsmarker mit übertragen werden.



(10) Historische Genkanone

Modernere Varianten von Genkanonen sind in den Abbildungen 12 und 13 wiedergegeben. Sie werden nicht mehr mit Pulver, sondern mit Gasdruck betrieben.



(12) Stationäre Genkanone



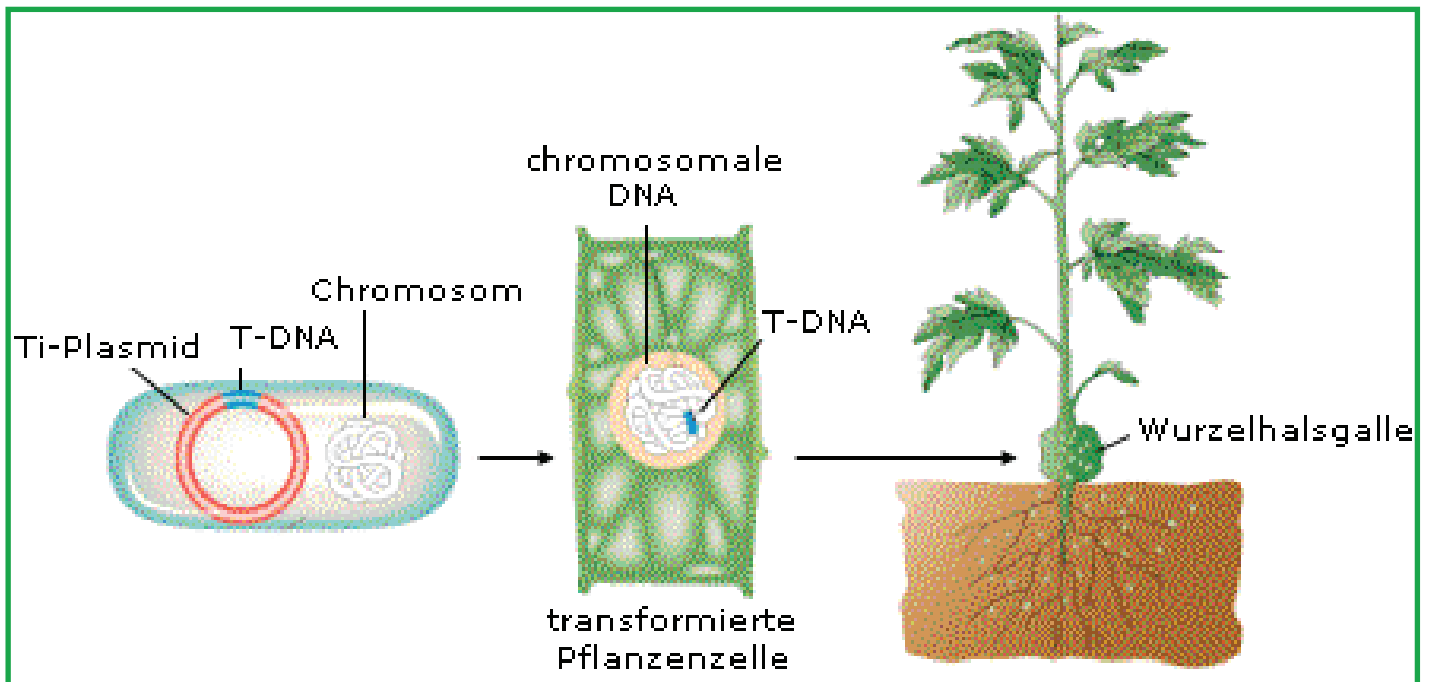
(11) „Beschuss“ mit dem C1- Gen



(13) Mobile Genkanone

In der WiS kannst du auch eine moderne Genkanone in die Hand nehmen.

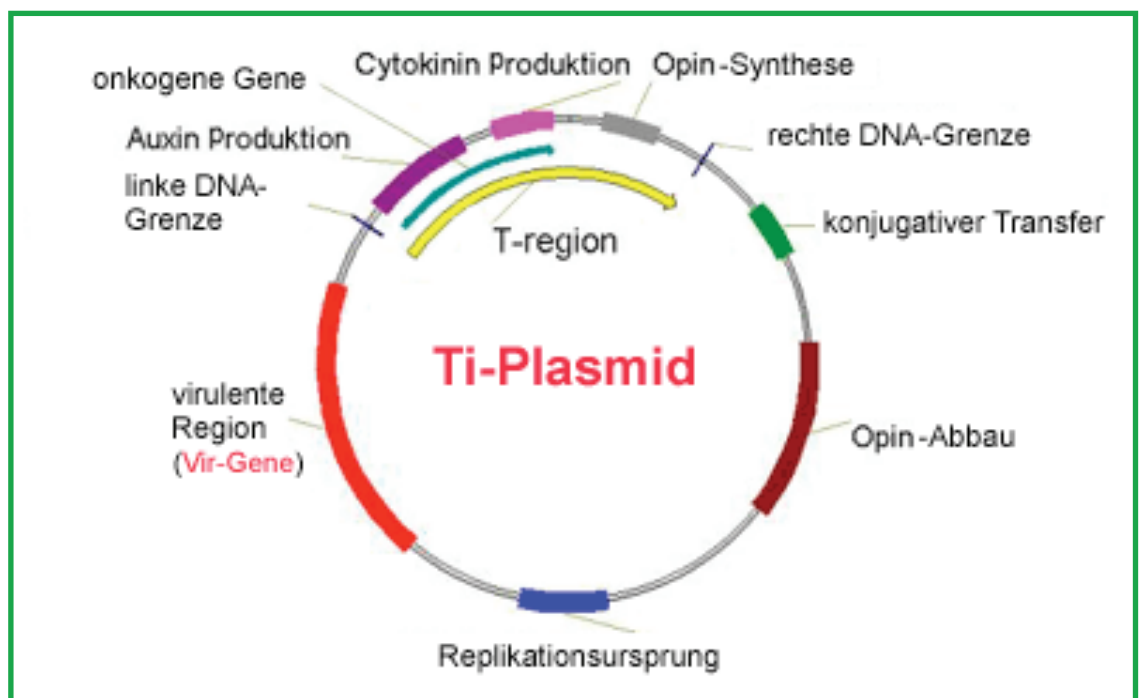
Gentransfer durch *Agrobacterium tumefaciens*: ein natürlicher Prozess



(14) Bildung von Wurzelhalsgallen

Wenn du WiS Begierig Heft 7 „Vom Schutz und Trutz in der Pflanzenwelt“ gelesen hast, dann sind dir die folgenden Zeilen vertraut: *Agrobacterium tumefaciens*, ein im Boden lebendes Bakterium kann Pflanzen im Wurzelhalsbereich infizieren (14).

Dabei wird ein kleiner Teil der bakteriellen genetischen Information des Ti-Plasmids (15) in das Genom der Pflanze übertragen. Die betroffenen Pflanzenzellen werden umprogrammiert und wachsen unkontrolliert weiter, so dass ein Tumor gebildet wird. Der kann sehr, sehr groß werden (16)



(15) Funktionen des Ti-Plasmids

Die Aufklärung und die Nutzung dieses natürlichen Vorgangs einer bakteriellen Infektion führten Schell und Mitarbeiter zu einer Revolution in der Pflanzenzüchtung:

der **Grünen Gentechnik**.



(16) Riesentumor

Köln heute

Donnerstag, 20.7.1995

Wurzelhalsgallen verändern die Welt

Interview mit
Jozef S. Schell
(1935 – 2003)



Direktor
am MPI für
Züchtungsfor-
schung
in Köln (1978-2000)

Budo:

Herr Prof. Schell, gestatten Sie, mein Name ist Budo von „Köln heute“. Ich möchte gerne anlässlich Ihres 60. Geburtstages ein Interview mit Ihnen machen, um unseren Lesern Ihre epochalen Entdeckungen etwas näher zu bringen. Können wir anfangen?

Prof. Schell, wie sind Sie, ein Pionier der modernen Gentechnik, auf die Idee der Einzelgenübertragung bei Pflanzen gekommen?

J.S.S.:

Alles fing an mit unseren Studien an einem Bakterium, *Agrobacterium tumefaciens*. Dieses Bakterium kann bei Pflanzen Tumore auslösen. Allerdings sind hierfür zwei Voraussetzungen erforderlich: 1. Das Bakterium enthält neben seinem „Chromosom“ noch ein zusätzliches Extra-Chromosom, ein Plasmid, das ist eine ringförmige DNA, auf

der die krankmachenden Gene und andere lokalisiert sind, und

2. dieses Bodenbakterium infiziert die Wirtspflanze im Wurzelhalsbereich.

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, dann kann sich ein Tumor entwickeln, daher auch der Name für das Plasmid, Tumor-induzierendes-Plasmid, Ti-Plasmid.

Budo:

Was passiert denn bei dieser Transformation im Einzelnen?

J.S.S.:

Wie Sie hier auf dem Bild 14 erkennen können, wird nur ein Teil des Ti-Plasmids übertragen, die sogenannte T-Region. Sie ist begrenzt von der rechten und linken DNA-Grenze. Diese Begrenzungen sind für den Übertragungsmechanismus sehr wichtig. Zwischen den „Grenzen oder Borders“ befinden sich die übertragenen Gene für die Auxin- und Cytokinin- Biosynthese. Diese beiden Gene kodieren Funktionen für die Biosynthese der entsprechenden Wachstums-hormone. Diese sorgen dafür, dass die infizierte Pflanzenzelle sich weiter ungebremsst teilen kann, also einen Tumor bilden.

Budo:

Was hat denn das Bakterium davon?

J.S.S.:

Das Opine-Gen veranlasst die Pflanzenzelle eine energiereiche Verbindung, das Opine, zu bilden, sozusagen als Futter für Agrobacterium, denn nur dieses Bakterium kann das Opine als Energiequelle nutzen, da der Opine-Abbau auch auf dem Plasmid kodiert ist.

Budo:

Prof. Schell, habe ich das jetzt richtig verstanden:

Das Bakterium infiziert die Pflanzenzelle, überträgt einen Teil seiner genetischen Information, die dann die Pflanzenzelle so umprogrammiert, dass sie ungehemmt weiterwächst und somit einen Tumor bildet. Gleichzeitig produzieren die Tumorzellen einen Stoff, der dem Bakterium Energie für sein Wachstum liefert.

J.S.S.:

Ja, das ist korrekt. Diesen Prozess haben meine Mitarbeiter in einem Übersichtsbild (14) dargestellt.

Dies brachte uns zur Einsicht, dass der Austausch des genetischen Materials zwischen RB und LB durch ein „Wunsch“-Gen eine Pflanze mit neuen Eigenschaften möglich machen könnte. Denn für die Übertragung sind die „Border“-Sequenzen sehr wichtig, um die dazwischen liegende genetische Information in das Genom der Pflanzenzelle zu integrieren.

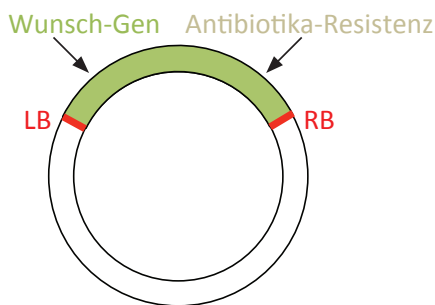
Ein anderes Problem, das gelöst werden musste, war die transformierte Zelle auch wieder zu finden, um sie zu einer ganzen Pflanze regenerieren zu können.

Budo:

Wie haben Sie das erreicht?

J.S.S.:

Die transformierten Zellen konnten relativ leicht selektiert werden, falls ein Antibiotika-Resistenz-Gen neben dem „Wunsch“-Gen auf dem Konstrukt innerhalb der „Borders“ vorhanden war, so wie in der Abbildung dargestellt (17).



(17) Künstliches Ti-Plasmid

In Gegenwart des Antibiotikums wuchsen dann nur die transformierten Zellen zu einem Zellhaufen heran, dessen weitere Differenzierung zur ganzen Pflanze durch Hormongaben und Wechsel der Medien ermöglicht wurde. Das Ergebnis war eine gentechnisch veränderte Pflanze.

Budo:

Ich kann mir gut vorstellen, dass diese ganze Arbeit nicht im stillen Kämmerlein erfolgte und dass es viel Konkurrenz gab.

J.S.S.:

Ja, das ist richtig. Wie man aus der unteren Liste entnehmen kann, stritten sich weltweit vier Gruppen darum, wer als erste ihre Ergebnisse veröffentlichen würde. Die Publikationen erschienen 1983 kurz nacheinander und wir waren die glücklichen Sieger. Natürlich mussten die Ergebnisse und ihre möglichen Anwendungen zuvor auch zum Patent angemeldet sein. Auch hier lagen wir ganz gut. Da das US-Patentrecht etwas anders als das europäische ist, dauerte die Zeit der Einigung doch recht lange, mehr als 10 Jahre.

Die Arbeit der **Schell Gruppe**

erschien im Mai in *Nature* (Herrera-Estrella, L., A. Depicker, M. van Montagu, and J. Schell. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303:209-213)

der **Chilton Gruppe** im Juli in *Nature*

(Bevan, M.W., R.B. Flavell, and M.D. Chilton. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304:184-187)

der **Monsanto Gruppe** im August in *PNAS*

(Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann, and S.C. Woo. 1983b. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80:4803-4807)

der **Hall Gruppe** im November in *Science*

(Murai, N., D.W. Sutton, M.G. Murray, J.L. Slightom, D.J. Merlo, N.A. Reichert, C. Sengupta-Gopalan, C.A. Stock, R.F. Barker, J.D. Kemp, and T.C. Hall. 1983. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222:476-482).

Budo:

Es versteht sich von selbst, dass eine derart epochale Leistung auch viele Ehrungen nach sich zog. Wir wollen sie hier nicht alle aufzählen und stellvertretend nur den Wolf-Preis 1990 und den Japan-Preis 1998 erwähnen. Ein besonderes Ereignis muss für Sie der Besuch des belgischen Königspaares und des Bundespräsidenten Ende der 80-er Jahre an ihrem Institut gewesen sein (18). Welche Erinnerungen haben Sie daran?

J.S.S.:

Ja, das war ein Großereignis für das gesamte Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, ein Staatsbesuch in einem wissenschaftlichen Institut. Obwohl sehr formell, doch erhebend. Jahre später besuchte uns auch König Albert zu einem privaten Besuch. Dieser Besuch war legerer und wissenschaftliche Fragen standen im Vordergrund, was uns Forschern sehr entgegenkommt.

Budo:

Prof. Schell, welche Bedeutung hat denn diese Technik für die moderne Pflanzenforschung?

J.S.S.:

Ich denke, dass kann ich einfach beantworten: die Erforschung molekularer genetischer Netzwerke ohne Gentechnik ist nicht möglich.

Budo:

Prof. Schell, wir bedanken uns für das Gespräch.



(18) Bundespräsident von Weizsäcker, Prof. Schell, König Baudouin und Königin Fabiola von Belgien

Die Grüne Gentechnik war geboren.

Sie veränderte die Züchtung von Kulturpflanzen sehr rasch und ist heute aus dem Portfolio der international operierenden Firmen nicht wegzudenken.

Ich frage mich, welche Pflanzen hauptsächlich gentechnisch verändert werden und wozu?

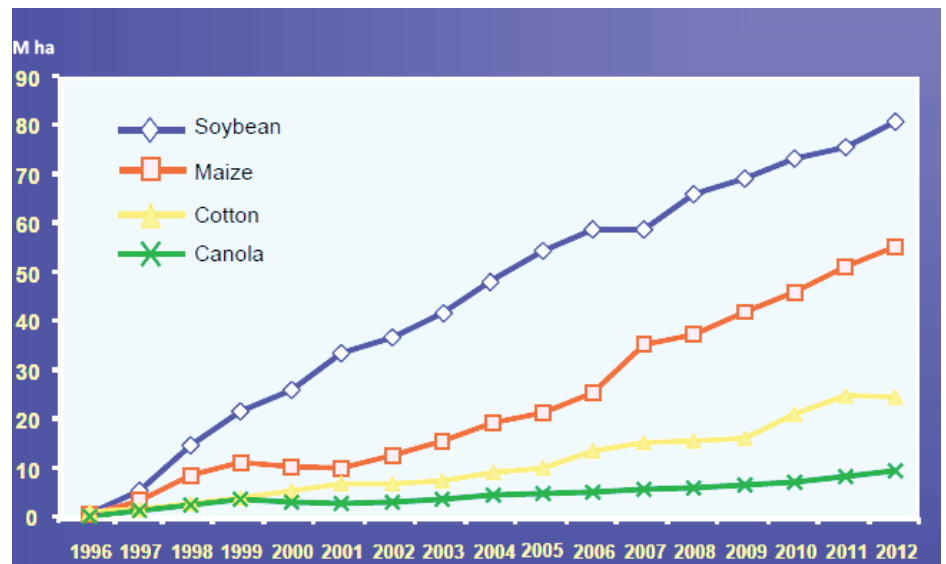
Detaillierte Antworten findest du auf der Homepage von TransGen:
www.transgen.de/home/

Grüne Gentechnik im Alltag

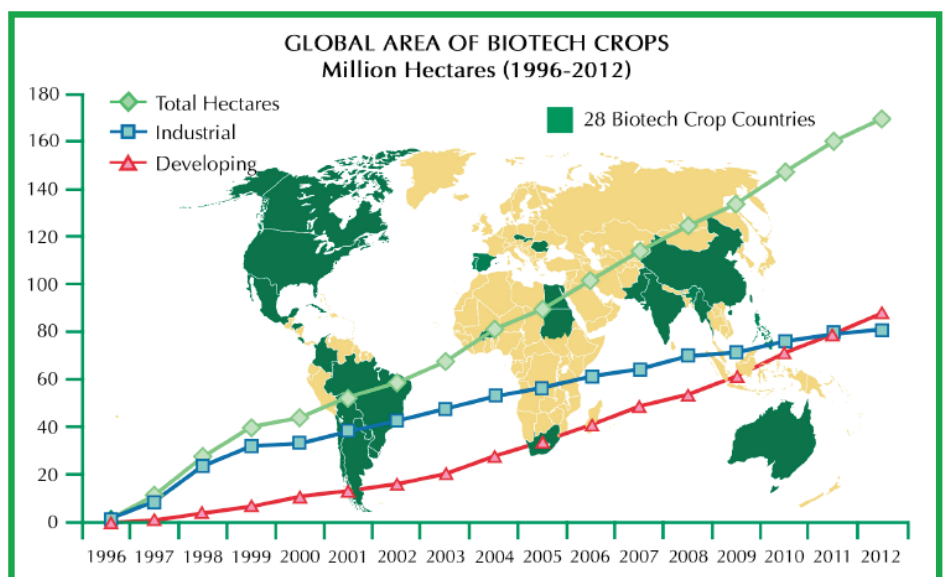
Hier in Kürze: Baumwolle, Soja, Mais, Raps und Zuckerrüben, also domestizierte Nutzpflanzen wurden vorwiegend mit Genen aus Bakterien ausgestattet, die vor Schädlingen und Herbiziden schützen (19). Neuerdings kommen bakterielle Gene hinzu, die Dürresistenz verleihen.

Bereits heute spielen gentechnisch veränderte Pflanzen (GVP) eine große Rolle selbst in Entwicklungsländern. In einzelnen Ländern macht der Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen bereits mehr als 90% der ausgesäten Art aus.

Von den ca. 320 Millionen ha Anbaufläche von Soja, Mais, Baumwolle und Raps sind mehr als die Hälfte (ca. 53%) mit transgenen Pflanzen bestellt. Erstmals bauen die Entwicklungsländer mehr GVPs an als die Industrieländer (20).



(19) Anbauflächen von transgener Soja, Mais, Baumwolle und Raps, weltweit in Millionen Hektar



(20) Entwicklung des Anbaus transgener Pflanzen weltweit

Dies hat Konsequenzen, insbesondere bei den Kleinbauern in der Region. In Indien z.B. können durch den Zusatzgewinn (21) die Kinder der Kleinbauern erstmalig eine Schule besuchen.

Gentechnik ist ein sehr zielorientiertes Verfahren mit enormem Zeitgewinn.

Warum hat diese äußerst erfolgreiche Technologie in Zentraleuropa so viele Gegner?

Es gab im Wesentlichen 2 sachliche Gründe:

- 1) Um das übertragene Gen unter den vielen Zellen wieder zu finden, bedarf es einer Selektion. Ein Antibiotika-Resistenz-Gen wird hierzu oft verwendet.
- 2) Ein weiterer Schwachpunkt des Verfahrens beruht auf der zufälligen Anzahl der übertragenen Gene und der Orte ihrer Integration in das pflanzliche Genom (22).

Land	Reduktion der Insektizidmenge (%)	Anstieg im effektiven Ertrag (%)	Zusatzgewinn (US % /ha)
BT-Baumwolle			
Argentinien	47	33	23
Australien	48	0	66
China	65	24	470
Indien	41	37	136
Mexiko	77	9	295
Südafrika	33	22	91
USA	36	10	58

(21) Betriebliche Ergebnisse

DNA-Sequenzierung des Genoms stellt sicher, dass kein pflanzeigenes Gen durch den Einbau des Transgens verändert ist.

Neben dieser molekularen Charakterisierung sind natürlich auch Feldtests vorgeschrieben, die sicherstellen, dass auch das avisierte Ziel z.B. einer Pilz-Resistenz erreicht wurde.

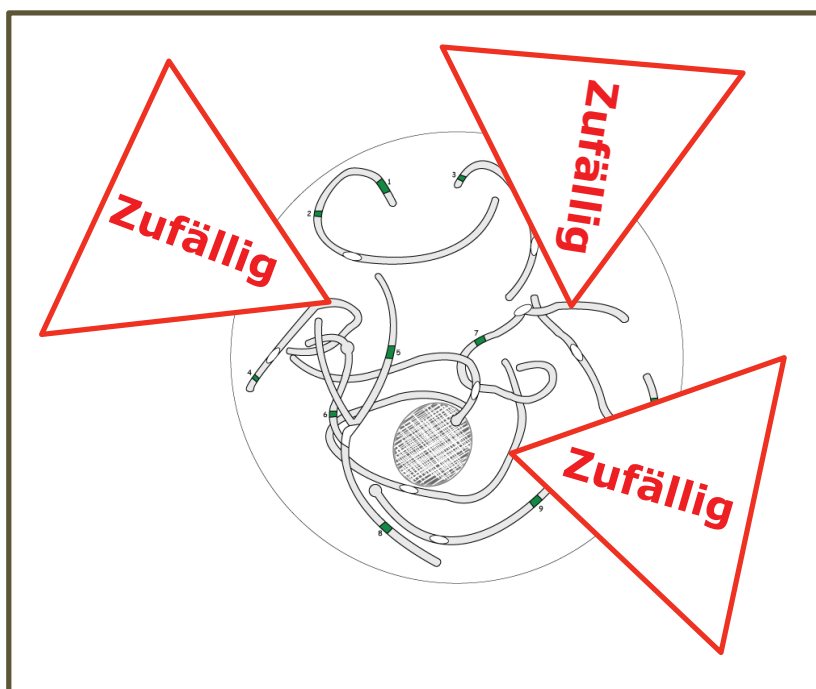
Neben diesen sachlichen Gründen, die eine Akzeptanz gentechnisch veränderter Pflanzen bei uns entgegenstanden und immer noch stehen, gibt es eine Vielzahl ideologischer Vorbehalte, die speziell in Zentraleuropa vorhanden sind.

Beispiel: Bt-Mais

Dieser transgene Mais, der ein bakterielles Gen enthält, das ihn resistent gegen den Mais-Zünsler macht (23), gilt in der Öffentlichkeit als der Inbegriff des Bösen.

Für sie symbolisiert er: die Abhängigkeit der Kleinbauern von den global operierenden Multis, die ökologische Gefahr der unkontrollierten Ausbreitung der transgenen Pflanze und als Verursacher des Bientods, um nur 3 Befürchtungen zu erwähnen.

Keine dieser Behauptungen konnten verifiziert werden.



(22) Gentechnische Übertragung



(23) Die Raupen von *Ostrinia nubilalis* infizieren einen Maiskolben

Demgegenüber stehen zweifellos Vorteile für die Kleinbauern in Entwicklungsländern, die ihr Leben durch den Anbau von Bt-Mais sehr verbessern können:

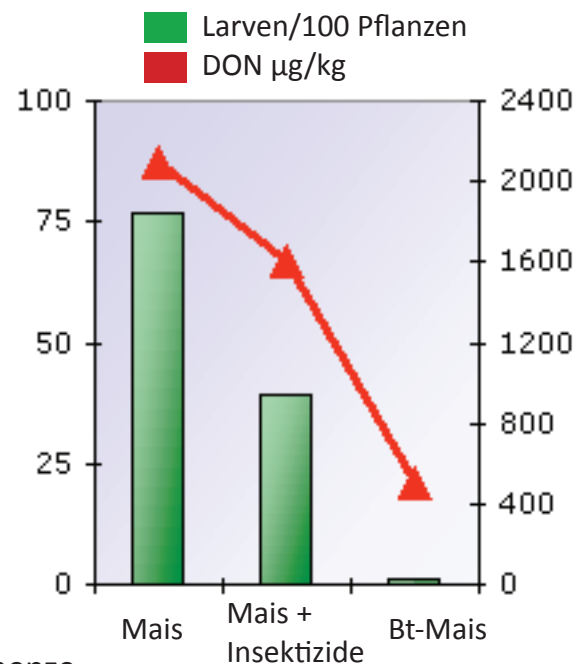
Durch den Anbau können sie ein höheres Einkommen erzielen und durch den Konsum reduzieren sie die Abortions- und Mißbildungsrate ihrer Babys.

Wieso das?

Der Maiszünsler legt seine Eier auf einer Maispflanze ab. Die sich entwickelnden Raupen fressen sich in die Pflanze hinein (23). Mit Insektiziden wird versucht, den Schaden niedrig zu halten. Durch die Fraßspuren dringen jedoch Schimmelpilze oder Fusarien in die Pflanzenzellen ein und produzieren dort Toxine (Aflatoxin bzw. Fumonisin). Selbst nach Insektizidbehandlung werden noch Mycotoxine, wie DON oder Fumonisine gebildet (24).

Der Anbau von Bt-Mais scheint dieses Problem zu lösen. Warum sind Pilz-Toxine wie Fumonisin so gefährlich? Fumonisin B1 greift in die Bioverfügbarkeit von Folsäure (Vitamin B9) ein. In der Embryonalentwicklung begünstigt ein Folsäuremangel die Entstehung von Neuralrohrdefekten, wie Spina bifida oder Anenzephalie. Er soll außerdem Einfluss auf eine Frühgeburtlichkeit haben und scheint an der Entwicklung von angeborenen Herzfehlern beteiligt zu sein.

In vielen Entwicklungsländern liegt die Geburtensterblichkeit bis 20 mal höher als in Europa. Besonders in Ländern, in denen Mais auch direkt in die Nahrungskette einfließt, wie etwa in Guatemala, ist der Anbau und Verzehr von Bt-Mais daher ein Gewinn.



(24) Mycotoxine in Mais

Neues aus der Wissenschaft:

Eine molekulare Manipulation der Eigenschaften von Organismen ist auch ohne Übertragung von genetischem Material möglich.

TALEN macht's möglich !

Du kennst meine Strategie: ab in die Bibliothek oder ins www und recherchieren: im nächsten Kapitel findest du die Ergebnisse.

Die neue Revolution: TALEN

3

TALEN was heißt das?
**Transcription-Activator-Like-
Effector-Nuclease.**

Was ist das?

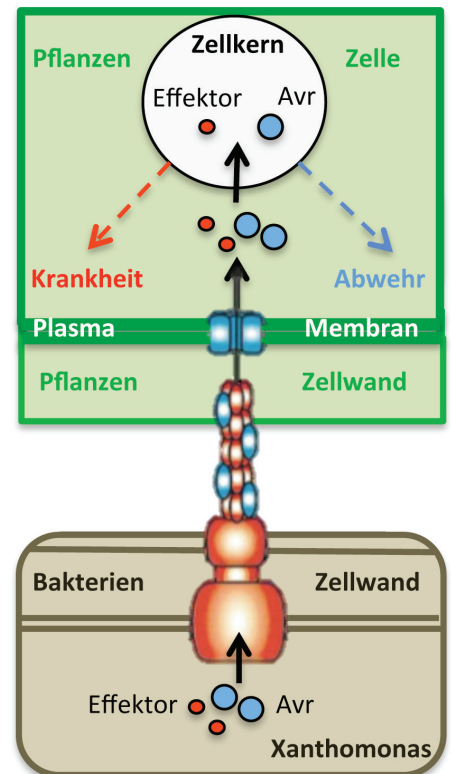
Zunächst einmal ein künstliches Protein, bestehend aus einem Transkriptionsaktivator-ähnlichem Protein, an das eine Endonuklease gekoppelt wurde.

Was ist so Besonderes an dem TAL-Effektor Protein?

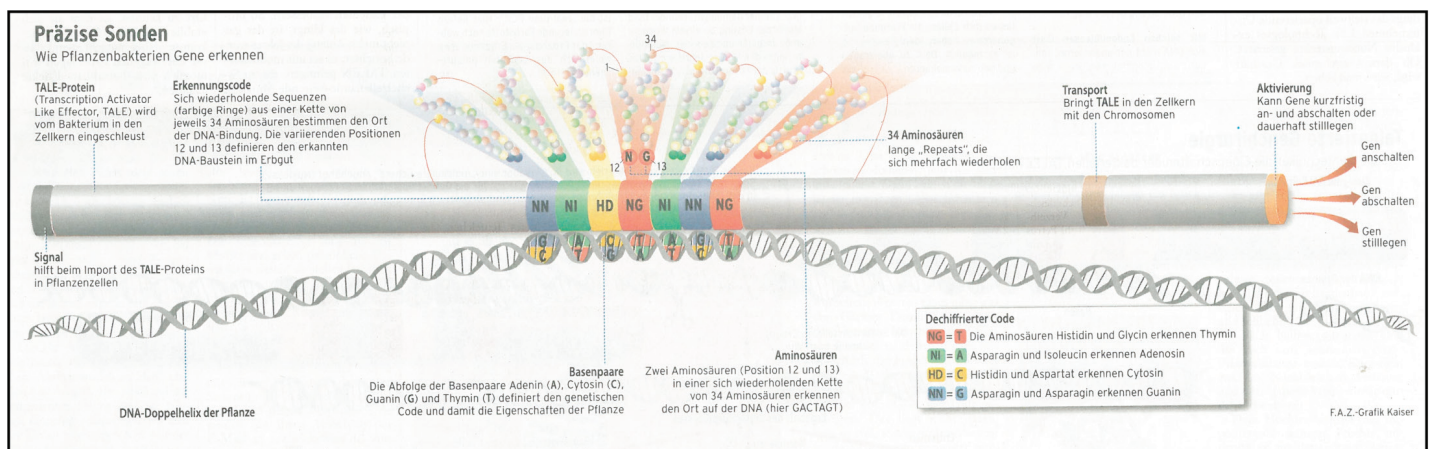
Volker Stollorz hat in der Frankfurter Allgemeinen Sonntagszeitung am 26. August 2012 im Artikel „Das Leben, einmal neu redigiert“ darüber berichtet (25).

Doch zunächst zurück zum Anfang. *Xanthomonas campestris*, ein Bakterium, infiziert z.B. die Blattzelle einer Paprika. Durch ein Typ III-Sekretions-system werden die bakteriellen Effektoren in die Pflanzenzelle injiziert (26). Die übertragenen Proteine erkennen eine ganz spezifische DNA-Sequenz in einem Pflanzengen, dessen Ausprägung sie anschalten, ausschalten oder umsteuern können.

Wie wirken TAL-Effektoren?
Die Entschlüsselung dieses Codes gelang Ulla Bonas und ihren Mitarbeitern an der Universität Halle (27).



(26) *Xanthomonas campestris* infiziert eine Pflanzenzelle

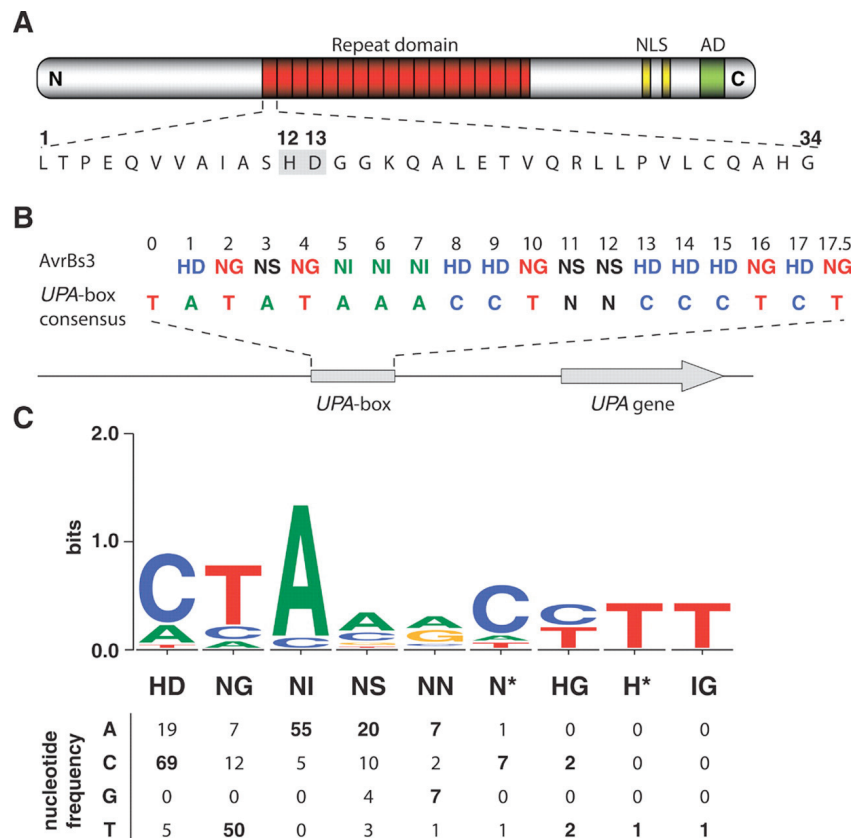


(25) Zusammenfassung der Wirkungsweise eines TAL-Effektors

Ein Effektor-Protein enthält ca. 17 „Repeats“, die jeweils 34 Aminosäuren lang sind. Jeder „Repeat“ kann eine Polypeptidschleife bilden. Die Aminosäuren 12 und 13 haben eine besondere Aufgabe, zusammen erkennen sie ganz spezifisch eine Base in der DNA- Sequenz. Demnach erkennt ein Effektor-Protein insgesamt ca. 17 benachbarte Basen. Eine solche Sequenz kommt nur einmal in einem Genom vor, es sei denn die Sequenz ist dupliziert. Mit einer derart spezifischen „Waffe“ kann das Bakterium ganz gezielt den Stoffwechsel einer Pflanze steuern und sich somit einen Vorteil verschaffen, ohne dass genetisches Material übertragen werden müsste; ein natürlicher Vorgang.

„Engineering“ von TALEN

Heute können Proteine mit vorgegebener Aminosäuresequenz hergestellt werden, kein Problem mit den „Repeats“, die ja nur 34 Aminosäuren lang sind. Inzwischen kann für eine vorgegebene DNA-Zielsequenz ein



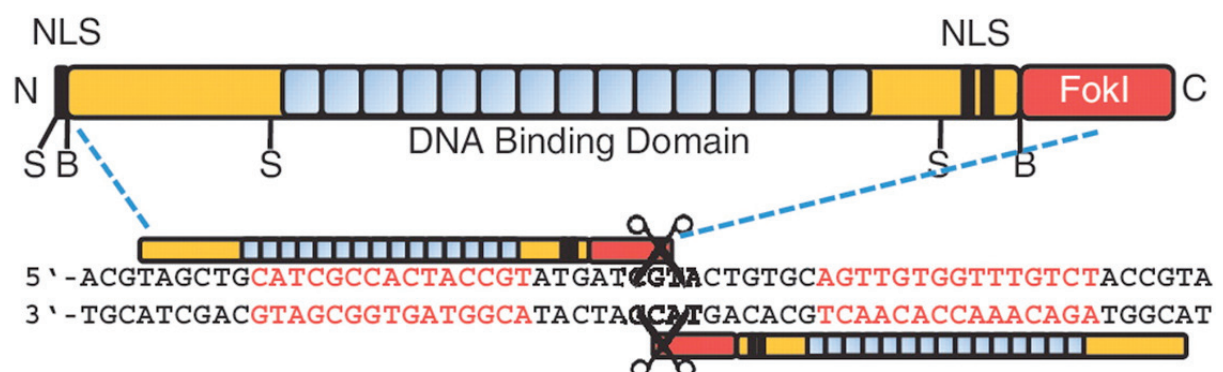
(27) Struktur und Funktion eines TAL-Effektors

TAL-Effektor „geordnet“ werden, dem auch eine Endonuklease (FokI) angekoppelt wurde (28). Falls zwei ähnliche Konstrukte genutzt werden, so wie in Abbildung 28 angedeutet, dann wird die DNA in beiden Strängen geschnitten. Da das Ganze intrazellulär vorgenommen wird, erfolgt auch sofort wiederum „automatisch“ (natürlich) Reparatursynthese. Dabei entstehen natürlicherweise Fehler,

die zu Mutationen führen. Das wollen wir uns einmal an einem relevanten Beispiel anschauen.

Ich frage mich:

Kann man TAL-Effektoren auch nutzen, um beliebige Pflanzengene auszuschalten (zu zerstören), zu reparieren oder gar umzuprogrammieren? Wenn ja, dann wären die Vorbehalte gegen „Grüne Gentechnik“ obsolet.



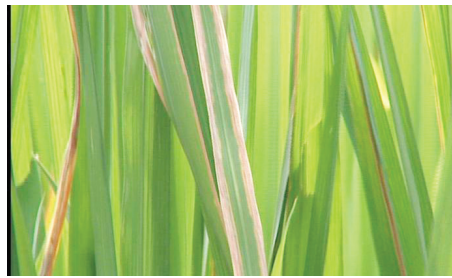
(28) Künstlicher TAL-Effektor mit gekoppelter Endonuklease: TALEN

Beispiel: Bakterienbrand

Eine der wichtigsten Erkrankungen beim Reis ist der Bakterienbrand („leaf blight“), der von *Xanthomonas oryzae* verursacht wird (29). Da in Extremfällen bis zu 70% einer Ernte verloren gehen können, müssen unbedingt resistente Sorten angebaut werden (30). Heute stellt die klassische Züchtung viele derartige Sorten zur Verfügung. Dennoch ist mit Verlusten von 2% bis 10% nach einer Infektion zu rechnen. Das ist immer noch viel zu hoch.

Was kann dagegen getan werden?

Das Os11N3 Gen von Reis kodiert einen „sucrose-efflux“ Transporter. Diese Funktion ist nicht nur für die Pflanze von Bedeutung, vielmehr ist der Zucker auch für *Xanthomonas oryzae* als Energiequelle äußerst attraktiv.



(29) Sensitiver Reis

Wenn also der Zucker nicht mehr zur Verfügung stünde, dann wäre das für *Xanthomonas* nicht mehr „interessant“. Also könnte das Gen einfach abgeschaltet oder zerstört werden, um die Pflanze vor *Xanthomonas* zu schützen. Aber was macht dann die Pflanze?

Ihr bleibt nur, das Bindemotiv im Os11N3 Gen so zu mutieren, dass es nicht mehr auf den Effektor reagiert, aber die Regulation durch das Pflanzensystem nicht behindert wird.

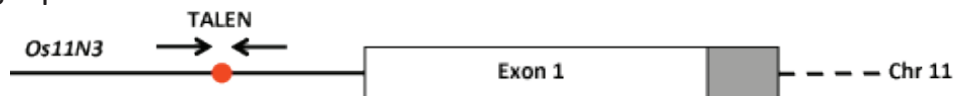


(30) Resistente und sensitive Reispflanzen

Das in die Zelle eingebrachte rekombinante Protein, die TALE-N (Nuklease) könnte nach der Reparatur des DNA-Doppelstrangbruchs (28) zielgenau Mutationen generieren (31).

Im vorliegenden Beispiel wurden 2 leicht versetzte TALENs genutzt und so ein Spektrum von kleinen Deletions- / Insertions- Mutationen oder Kombinationen hiervon erhalten. Zwei der zehn Mutanten, zeigten Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae*.

Das Ziel ist erreicht!



CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccccctccaaccaaccagggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
gtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccccctc AAA gtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTA AGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccccct CATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAA CGATC CTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccc aggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccc aaccagggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccccctcaa ggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccccctcc cagggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
CTTCCTTCCTAGCTATATAAAccccctccaaccaaccagggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC	
TTTATATA	

Xanthomonas-sensitiv: Bakterienbrand

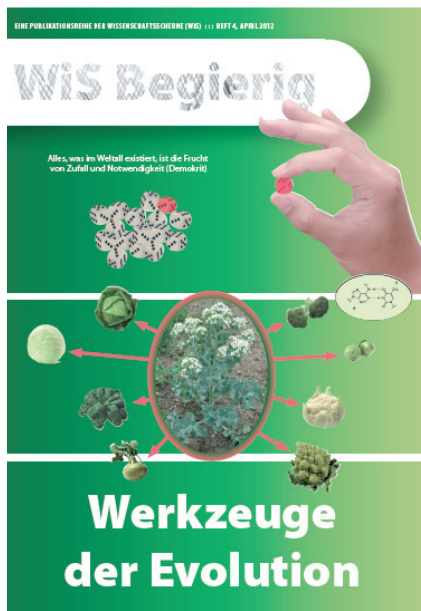
Xanthomonas-resistent

Nature Biotechnology 30, 390-392 (2012)

(31) TALEN generierte Mutationen im „sucrose-efflux transporter“ Gen von Reis

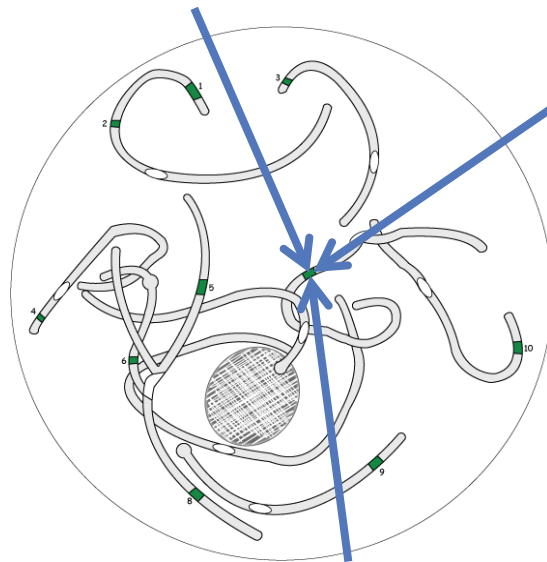
TALEN - zielgenaue Mutagenese

Mutationen in einem vorgegeben Gen sind natürlicherweise selten und entstehen bei der Reparatur von Basenfehlpaarungen während der Replikation des Erbmateri- als oder durch die Aktivität von Transposons (WiS Begierig Heft 4 „Werkzeuge der Evolution“). Die Häufigkeit von Mutationen



kann durch UV- oder radioaktive Strahlen ebenso erhöht werden wie durch geeignete Chemikalien. In jedem Fall sind die hierdurch ausgelösten Mutationen zufällig im Genom verteilt.

Die so entstandenen Mutationen werden in der klassischen Züchtung eingesetzt.



(32) TALEN macht's möglich

Mutagenese durch TALEN ist nicht nur zielgenau, sondern auch häufig. Zielgenau: weil die Zahl der Schleifen im TALEN-Protein der DNA-Zielsequenz biochemisch angepasst werden kann. Bei wiederholter Injektion finden die mutativen Veränderungen immer an gleicher Position im Gen statt (31, 32). Häufig: weil das gentechnisch hergestellte rekombinante TALEN Proteine in die Pflanzenzellen injiziert und die anschließend zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Alternativ können die DNA-Konstrukte auch in die Pflanzen gentechnisch eingebracht werden und nach Segregation der Marker eine „Fremd-Genfreie“ Pflanze isoliert werden.

Durch TALEN veränderte Pflanzen sind nicht verändert im Sinne des Gentechnik-Gesetzes, denn sie enthalten keine „Fremd-DNA“.

Zielgenaue Mutagenese in Pflanzen macht Akzeptanzvorbehalte gegenüber modernen Züchtungsprodukten überflüssig.

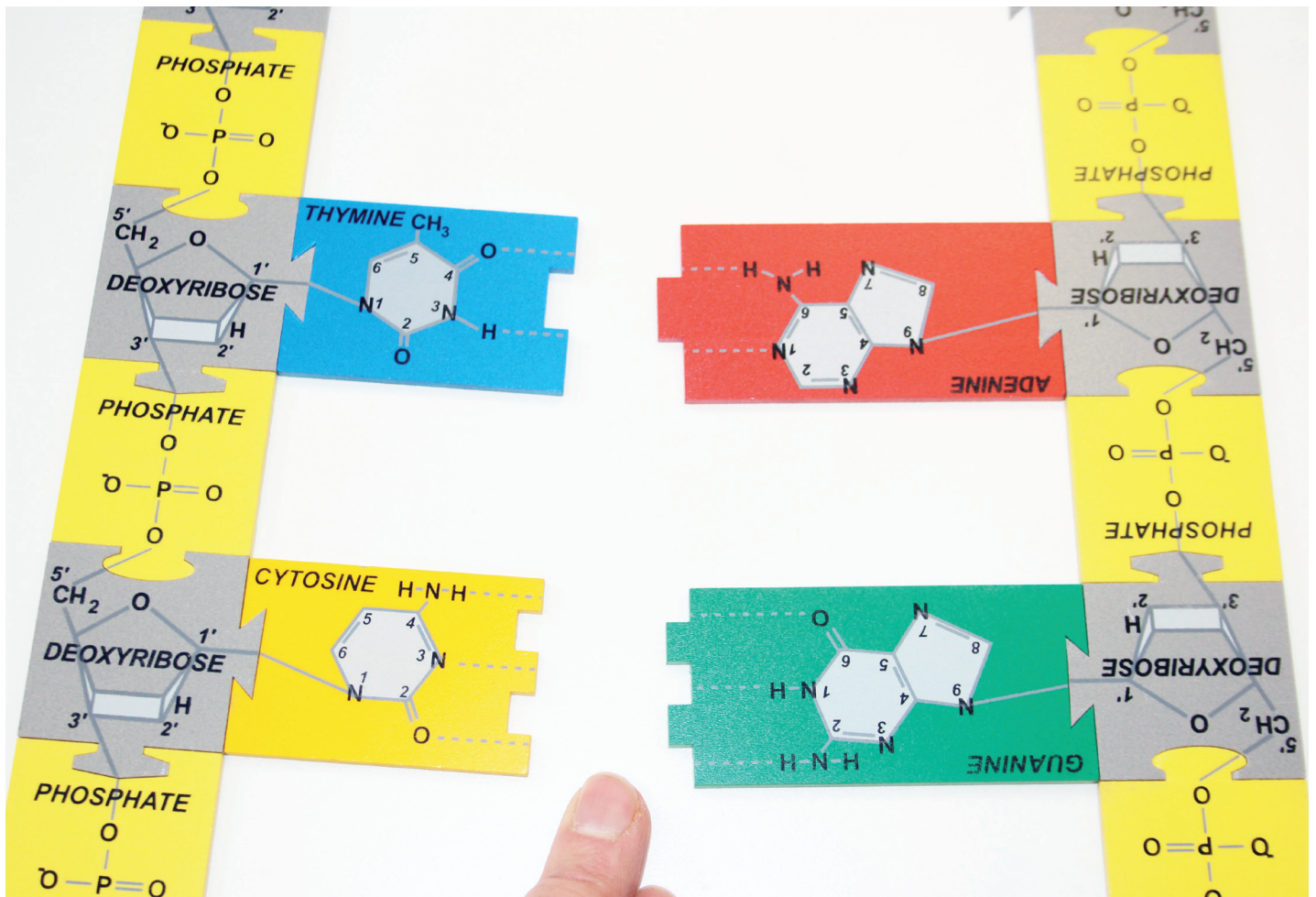
Darüberhinaus ist eine Kombination aus TALEN und gentechnischer Veränderung in einem Schritt möglich, wenn z.B. während der Reparatursynthese gleichzeitig ein Template (RNA) eines Fremdenkonstruktes zugefügt wird.

Das Ergebnis wäre: Integration eines Fremdgens an vorausbestimmter Stelle im Chromosom.

Stammzelltherapie von menschlichen Patienten ist in Deutschland auch nicht ohne Akzeptanzprobleme. Auch hier scheint sich die punktgenaue Mutagenese zum Mittel der Wahl zu entwickeln. Patienteneigene Stammzellen könnten mittels TALEN verändert werden, bevor sie dem Patienten wieder zugeführt und ihn somit von seiner Krankheit befreien würden.

Ich freue mich auf eine Diskussion mit dir in der WiS des MPI für Pflanzenzüchtungsforschung.

*Bis bald,
Budo*





Willkommen in der WIS

Ein Beispiel aus unserem vielfätigem Programm:

Station 21: Zukunft der Gentechnik



Bei der klassischen Züchtung wird die Gesamtheit der Gene beider Eltern gemischt und anschließend die gewünschte Merkmalskombination ausgewählt. Bei der Gentechnik werden der Hochertragslinie nur einzelne Fremd-Gene zugefügt. Eine Selektion der gewünschten Merkmale ist daher nicht notwendig. Dennoch stößt dieses zeitsparende Verfahren auf gesellschaftliche Ablehnung in Zentraleuropa. Wieso das?

Medien und Aktivitäten

- Prinzipien der Genübertragung
- Animation und Experimente
- Fakten zur Anwendung
- Probleme von Glaubwürdigkeit (Test und Diskussion)
- Verändert TALEN die Welt?

ein Besuch unter **www.wissenschaftsscheune.de** lohnt sich immer!

WissenschaftsScheune



ÜBER DIE WISSENSCHAFTSSCHEUNE

Die WissenschaftsScheune (WiS) ist eine Einrichtung des Max-Planck-Instituts für Pflanzenzüchtungsforschung (MPIPZ), in der Besucher Wissenschaft hautnah erleben können.

Die Bandbreite der Forschung reicht vom DNA Molekül bis zum Anbau neuer Kultursorten. Themen der Grundlagenforschung und ihre

Anwendung können Besucher in Erlebniswelten sowohl in der Scheune des Gutshofs als auch im Schaugarten spielerisch entdecken.

Weitere Details finden Sie auf unserer Homepage:

www.wissenschaftsscheune.de



Der „Verein der Freunde und Förderer des Max-Planck-Instituts für Pflanzenzüchtungsforschung e.V.“ betreut die WiS und ist Herausgeber der Broschüre „WiS Begierig“.

Alle Personen, die das Projekt WissenschaftsScheune unterstützen wollen, sind herzlich eingeladen, Mitglied im „Verein der Freunde und Förderer des MPIPZ e.V.“ zu werden.

Kontakt:
info@wissenschaftsscheune.de
Tel. 0221 5062-672 (Vormittag)

IMPRESSUM

Text:
Heinz Saedler

Redaktion:
Hiltrud Kupczyk

Bilder und Zeichnungen:
Heinz Saedler, Anna Johann

Layout:
Anna Johann, CGN Corporate

Referenzen

Referenzen

- Ref.1: Meyer P. et al. (1992): Molec. Gen. Genetics 231, 345-352
Ref.2: Meyer P. et al. (1993): Plant Journal 4, 89-100
Ref.3: Ting Li et. A. (2012): Nature Biotechnology 30, 390-392
Ref. 4: Boch et al. (2009): Science 326, 1509
Ref. 5: Qaim (2009): Ann. Rev. of Resource Economics 1, 665

Bildnachweise

- eigene Bilder: 1, 3, 4, 5, 6, 7 + 8 (Ref.1), 9 (Ref.2), 10, 11, 17, 18, 21 nach Ref.5, 22, 23, 26, 27 (Ref.4), 31 (Ref.3), 32
(2) www.agron.missouri.edu/mn/68/139/dorweiler.html
(12) <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d3/Genegun.jpg/220px-Genegun.jpg>
(13) <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/McDonald/Heliosgun.gif>
(14) <http://www.biosicherheit.de/data/media/398/445x208.png>
(15) <http://www.biokurs.de/skripten/bilder/tiplasmid4.gif>

- (16) <http://www.biokurs.de/skripten/bilder/whg.jpg>
(19, 20) <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/pptslides/Brief44slides.pdf>
(24) <http://www.biosicherheit.de/aktuell/575.mais-schadlingsfrass-mykotoxine.html>
(25) <http://www.seiten.faz-archiv.de/fas/20120826/sd1201208263602083.html>
(28) https://tale-nt.cac.cornell.edu/files/Cermak_NAR_2011_TALEN_pair.png
(29) <http://agropedia.iitk.ac.in/sites/default/files/uas%20raichur/diseases%20of%20paddy/bib00.jpg>
(30) <http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/image22.jpg>