

Chimäre Gene – Ihre Bedeutung für Grundlagenforschung und angewandte Pflanzenzüchtung

Chimeric Genes – Their Contribution for Molecular Biology and Plant Breeding

H.-H. Steinbiß und J. Schell

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung genetische Grundlagen der Pflanzenzüchtung, D-5000 Köln 30, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **42c**, 1011–1018 (1987); received April 27, 1987

Chimeric Genes, *Agrobacterium tumefaciens*, Genetic Engineering, Expression Vectors, Transgenic Plants

Examples have been described indicating that it is possible to construct expression vectors carrying chimeric genes that will be expressed in plants at either high or low levels, or will be expressed only in specific organs such as leaves, seeds, tubers, roots or flowers. By constructing genes the products of which are transported into chloroplasts it will be possible to protect such chloroplasts against the action of certain herbicides and perhaps to improve their photosynthetic capacity.

Wie unterscheidet sich die Gentechnologie von der klassischen Züchtungsforschung?

Erklärtes Ziel unserer Pflanzenzüchter ist die Verbesserung von Nutzpflanzen. Seit alters her geschieht das durch Kreuzung verwandter Pflanzen, die möglichst viele wertvolle Eigenschaften in sich vereinigen, und anschließende Auslese geeigneter Nachkommen. Eine vergleichsweise geringe praktische Bedeutung erlangte bisher die Züchtung mit mutationsauslösenden Chemikalien oder energiereichen Strahlen. Neuerdings besteht bei einer beschränkten Zahl Pflanzen die Möglichkeit, isolierte zellwandlose Einzelzellen (Protoplasten) verschiedener Herkunft miteinander zu verschmelzen und daraus mit Methoden der Gewebekultur fertile Pflanzen zu regenerieren (somatische Hybride). Auf diese Weise entfällt die Notwendigkeit einer sexuellen Paarung, was grundsätzlich die Überschreitung der Artengrenzen ermöglicht. Allerdings ist diese Technologie noch zu unausgereift, um eine Prognose über ihre Verwendungsfähigkeit in der Züchtung abgeben zu können. Ohne den praktischen Wert konventioneller Züchtungsmethoden schmälern zu wollen, muß man doch auf einige Nachteile hinweisen. Eine gezielte genetische Verbesserung kann nämlich nur erreicht werden, wenn das gewünschte Merkmal in einer verwandten Pflanze vorliegt und somit auf sexuellem Wege eingekreuzt werden kann. Dabei werden aber auch viele unerwünschte Merkmale mitvererbt. Somit reicht ein einmaliger Kreuzungs-

schritt nicht aus, um eine Pflanze zu züchten, welche nur die gewünschten Eigenschaften enthält. Dieser Prozeß aus Kreuzung, Rückkreuzungen und anschließender Selektion geeigneter Nachkommen benötigt gewöhnlich einen Zeitraum von 10–15 Jahren. Das bedeutet, daß der private Züchter ein hohes Risiko eingeht.

Die Gentechnologie bietet uns heute einen Katalog von zuverlässigen Techniken zur Isolierung und Neukombination von Genen an sowie einige wirkungsvolle Methoden zur Genübertragung in Pflanzen. Sie hat dadurch einen Weg zur genetischen Verbesserung von Nutzpflanzen eröffnet, der die erwähnten Einschränkungen bei konventionellen Züchtungsmethoden beseitigen helfen könnte. Die zukünftige Strategie sieht dabei zunächst die Suche nach einem vom Züchter als wertvoll eingestuften Merkmal vor, welches er gerne in eine Pflanze übertragen möchte. Dabei gibt es hinsichtlich des Spenderorganismus keine Einschränkungen. Neben Pflanzen können also auch Bakterien, Pilze und sogar Tiere in Frage kommen. Hat er erst einmal ein solches Merkmal gefunden, dann müssen Molekularbiologen versuchen, mit den Instrumenten der Gentechnologie das zugehörige Gen zu isolieren und so umzustrukturieren, daß es in der Empfängerpflanze seine Wirkung voll entfalten kann. Auf diese Weise würde nur ein Wunschgen übertragen und eine verwandtschaftliche Anpassung von Spender und Empfänger könnte entfallen sowie langfristiges Rückkreuzen und Selektieren. Die nächsten Jahre werden Aufschluß darüber geben, ob die Gentechnologie zu einer wertvollen Ergänzung der konventionellen Pflanzenzüchtung werden kann.

Reprint requests to Prof. Dr. Schell.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/87/0700–1011 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

***Agrobacterium tumefaciens* — Vom Tumorbakterium zum Vektor für Genübertragungen in Pflanzen**

Seit Beginn dieses Jahrhunderts ist das weltweit verbreitete Erdbakterium *Agrobacterium tumefaciens* als Auslöser des Wurzelhalsgallenkrebses („crown gall“) bekannt. Sein Wirtsbereich umfaßt überwiegend Vertreter der Gymnospermen und Dicotyledonen. Bei den Monocotyledonen werden (bis heute) nur einige Arten aus den eng verwandten Ordnungen der Liliales und Arales von *Agrobacterium* befallen. Das bedeutet, daß ausnahmslos alle Vertreter der für die menschliche Ernährung so bedeutsamen Getreide wie z. B. Reis, Mais, Weizen, Hafer, Hirse und Gerste keinen Wurzelhalsgallenkrebs bekommen können.

Zwei Eigenschaften charakterisieren das Tumorgewebe ganz besonders: Ihre Zellen benötigen zum Wachstum in der Gewebekultur keine externe Hormonzufuhr, und sie synthetisieren neuartige chemische Verbindungen (Opine), die in der Mutterpflanze nicht vorkommen und dem tumorauslösenden *Agrobacterium* als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienen können.

Für die Molekularbiologen wurde das *Agrobacterium* hochinteressant, seitdem gezeigt werden konnte, daß die Tumorbildung einen erfolgreichen Gentransfer vom Bakterium in die Pflanzenzelle dokumentiert. Ganz ohne Zweifel ist *Agrobacterium* ein kleiner perfekter Geningenieur, der es fertigbringt, Fremdgene in das Genom einer Pflanzenzelle stabil zu integrieren.

Zunächst galt es aber, den Mechanismus der Genübertragung aufzuklären. Der erste entscheidende Schritt war getan, als man einen engen Zusammenhang zwischen Tumorinduktion und dem Vorhandensein von großen Plasmiden in den Bakterien herausfand. Für sie bürgerte sich schnell der Begriff Ti-Plasmid ein (tumor-induzierendes Plasmid). Heute bietet sich uns aufgrund vieler Teilergebnisse ein recht vollständiges Bild des zweiphasigen Infektionsvorganges. Zunächst kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Pflanzenzelle und *Agrobacterium*, die schließlich zur Übertragung eines spezifischen Abschnittes des Ti-Plasmids, die sogenannte T-DNA (engl.: transferred DNA), in die Pflanzenzelle führt. Dann in der zweiten Phase wird die T-DNA stabil in das Pflanzengenom integriert [1–3].

Damit ein Gentransfer überhaupt stattfinden kann, muß *Agrobacterium* „Virulenzgene“ haben,

die es ihm ermöglichen, die Wirtspflanze zu erkennen, mit ihren Zellen in Wechselwirkung zu treten und dann die T-DNA zu übertragen. Verwundete Pflanzen scheiden niedermolekulare phenolische Verbindungen aus, welche die Virulenzgene aktivieren [4]. Sie liegen ebenfalls auf dem Ti-Plasmid, aber nicht innerhalb der T-DNA. Mit anderen Worten, der Mechanismus des Gentransfers ist unabhängig von der Natur der T-DNA. Man fand nämlich heraus, daß *Agrobacterien* mit funktionsfähigen Virulenzgenen anstelle der T-DNA auch andere DNA-Stücke übertragen, sofern sie nur auf beiden Seiten von spezifischen Integrationssequenzen (Länge: 25 Basenpaare) begrenzt sind. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Stück nun auf dem Ti-Plasmid liegt oder im Bakterienchromosom [5]. Die Genprodukte einiger Virulenzgene verursachen in den Integrationssegmenten Einstrangbrüche. Kopien der T-DNA müssen dann zwangsläufig einsträngig sein. Noch ist es nicht bekannt, wie sie in die Pflanzenzelle kommen. Im Pflanzengenom tauchen sie am Ende des Infektionsvorganges als doppelsträngiges „insert“ auf. Eine bevorzugte Integrationsstelle auf den Pflanzenchromosomen gibt es nicht. Bemerkenswert ist die Genauigkeit, mit der die T-DNA aus dem Ti-Plasmid herausgeschnitten wird. Wie schon gesagt, gilt das auch für andere DNA-Sequenzen, und zwar bis zu einer Größe von über 40 Kilobasen, genug für ca. 10 Gene.

Pflanzenmolekularbiologen haben nun versucht, Nutzen aus diesem Vorgang zu ziehen, denn ein langgehegter Wunschtraum war es, funktionierende neue Gene in Pflanzen zu integrieren. Warum nicht mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*? Dazu mußten aber erst die Gene der T-DNA, die normalerweise in der Pflanzenzelle die Tumorbildung auslösen, entfernt werden. Heute existieren viele *Agrobakterienstämme*, die alle eines gemeinsam haben: Sie können keine Tumore mehr auslösen, besitzen aber noch alle anderen Funktionen, d. h., fremde Gene zwischen den Flankierungssequenzen werden in die Pflanzenchromosomen stabil integriert und von der Pflanze weitervererbt. Das Ti-Plasmid gilt dadurch heute als das mit Abstand wirkungsvollste Vektorsystem [6–10].

Die ersten Modellgene, die mit der Hilfe von nicht mehr tumorauslösenden *Agrobacterien* in Pflanzen übertragen wurden, waren bakterielle Resistenzgene. Es stellte sich aber bald heraus, daß die Pflanzenzelle die prokaryotischen Regulationssequenzen

als solche nicht erkennen kann und dadurch keine Transkription der fremden DNA in eine aktive mRNA stattfindet. Aber auch Gene aus anderen Organismen wie z.B. das für die Alkoholdehydrogenase der Hefe, die Gene für β -Globin und Interferon aus Säugerzellen oder Gene mit dem „frühen“ SV-40-Promotor führten nicht zur gewünschten Proteinproduktion in der Pflanzenzelle. Ganz offensichtlich besitzen auch eukaryotische Gene zell- oder gewebespezifische Kontrollsequenzen. Will man also funktionsfähige Gene in Pflanzen übertragen, dann muß man pflanzenspezifische Signale zur Initiation der Transkription mit einem fremden Strukturgen verknüpfen, wie z.B. das Gen für Aminoglycosid phosphotransferase, welches die Pflanzenzelle resistent gegen das Antibiotikum Kanamycin macht. Auf diese Weise entstehen Mischgene (chimäre Gene), die als Nachweis eines geglückten Gentransfers herangezogen werden können und der betreffenden Pflanzenzelle einen Selektionsvorteil verschaffen (engl.: selectable marker genes). Anschließend begrenzt man das selektierbare Markergen mit den 25 Basenpaaren großen Integrationssequenzen der T-DNA und benutzt einen Agrobakteriumstamm ohne Tumorgene als Geningenieur. Auf diese Weise wurden Fremdgene in viele Pflanzen übertragen (engl.: transgenic plants) u.a. in Tabak, Petunie, Tomate, Kartoffel und kürzlich auch in Luzerne, Klee, Sojabohne und Raps. Bei genauerer Analyse fand man fast immer eine, manchmal auch mehrere Kopien der übertragenen Gene in fast unveränderter Form im Genom der Pflanzenzelle wieder, wobei es ganz offensichtlich keinen bevorzugten Integrationsort gibt. Nur wenige Beispiele belegen, daß die fremde DNA auch an mehreren Orten der Chromosomen gleichzeitig integriert sein kann. In der Regel bleiben die einmal ins Genom eingeschleusten chimären Gene auch in den nachfolgenden Generationen erhalten und werden gemäß den Mendelschen Gesetzen vererbt [6, 7, 11, 12].

Pflanzenviren als Vektoren

Die überwiegende Mehrheit der Pflanzenviren hat nicht DNA, sondern RNA als Erbsubstanz. Lediglich zwei Gruppen, die Caulimoviren und die Geminiviren, haben ein DNA-Genom. Das „*Cauliflower Mosaic Virus*“ (CaMV) ist ein typischer Vertreter der Caulimoviren. Es vermehrt sich normalerweise in völlig ausdifferenzierten Pflanzenzellen (Wirtsbe-

reich: Cruciferae und Solanaceae) und kann demzufolge das Transkriptionssystem der Wirtszelle nicht „zweckentfremden“. Das Virus verfügt deshalb über ein ganz besonderes Replikationsverfahren: Zunächst wird im Kern der Wirtszelle das CaMV-Genom (eine ca. 8 Kilobasen große, doppelsträngige DNA) durch die Polymerase II in eine genomische RNA transkribiert. In der nächsten Phase wird aus der einzelsträngigen RNA mit einem viruseigenen Enzym, der reversen Transkriptase, die doppelsträngige Virus-DNA synthetisiert. Neben diesem einmaligen Replikationsmechanismus ist die Proteinsynthese von mindestens drei Genen so verwickelt gestaltet, daß bis zum anwendungsreifen Expressionsvektor CaMV noch viele Untersuchungen notwendig sein werden. Lediglich kleine Gene bis zu 300 Basenpaaren wurden bisher mit Erfolg in Pflanzen übertragen. Das einzige Virus-Gen, welches man unter Umständen ohne Beeinträchtigung anderer Funktionen gegen ein „Wunschgen“ austauschen könnte, ist ein Virulenzgen, das für die natürliche Verbreitung des Virus essentiell ist. Zwei Beispiele für erfolgreichen Gentransfer mit dem Expressionsvektor CaMV sind das bakterielle Gen für Dihydrofolat reduktase (DHFR) und das Säugergen für Interferon (IFN α D). Besonders beliebt bei Molekularbiologen sind die beiden starken Promotoren des CaMV (19S und 35S) in chimären Genen.

Das Genom der zweiten interessanten Pflanzenvirusgruppe, die Geminiviren, besteht aus ein oder zwei ringförmigen, einsträngigen DNA-Molekülen mit einer Größe von 2,6 bis 3,0 Kilobasen. Sie wird im Zellkern der Wirtspflanze in eine doppelsträngige Replikationsform umgewandelt. Das Verfahren ist bis heute noch unbekannt. Auch liegt kein Hinweis für die Beteiligung einer reversen Transkriptase vor. Letztendlich häufen sich im Zellkern Replikationsformen in großer Zahl an. Die Geminiviren sind im Gegensatz zu den Caulimoviren außerordentlich wirtsunspezifisch und können sowohl Mono- als auch Dikotyledonen infizieren. Das ist besonders bedeutsam, wenn sie als virale Expressionsvektoren ein breites Anwendungsspektrum bekommen sollen. Nur wenig ist bisher über die Gene und Genprodukte der Geminiviren bekannt. Kürzlich konnte experimentell das Gen für das virale Hüllprotein durch ein Fremdgen ersetzt werden, ohne die normale Replikation des viralen Genoms im Pflanzenzellkern zu stören. Das Einzelchromosom des „*wheat dwarf virus*“ (WDV) ist nur etwa 2,7 Kilobasen groß. Es

kann aber Fremdgene bis zu 3 Kilobasen aufnehmen und mitreplizieren. Dadurch wird die Genomgröße des Virus mehr als verdoppelt. Drei Modellgene ließen sich bisher erfolgreich mit diesem Geminivirus in Zellkulturen von *Triticum monococcum* und *Zea mays* übertragen, nämlich die Gene für Aminoglycosid phosphotransferase und Chloramphenicol acetyltransferase sowie das β -Galaktosidase-Gen von *E. coli*. Das verdeutlicht, wie wichtig Geminiviren als sich autonom replizierende Expressionssysteme für die zukünftige Entwicklung von Vektoren sein können [11].

Direkte Genübertragung in Protoplasten

Mit dem Ti-Plasmid als Vektor haben wir heute eine sehr wirkungsvolle Möglichkeit an der Hand, neukombinierte chimäre Gene in Wirtspflanzen des *Agrobacterium*s zu testen. Wie schon gesagt, gehören die Getreide nicht zu diesem Kreis. Darum werden auch weiterhin große Anstrengungen unternommen, um aus ihren Einzelzellen (Protoplasten) mit Methoden der Gewebekultur neue Pflanzen zu regenerieren, so wie es beim Tabak schon seit vielen Jahren möglich ist. Für diese Modellpflanze wurden schon einige Methoden zur direkten Übertragung chimärer Gene entwickelt, das heißt ohne Einsatz von Vektoren. Auch in andere Pflanzen wie Petunie, Karotte und kürzlich Mais und *Triticum monococcum* kann man direkt fremde Gene einbauen, wenn auch mit viel niedrigerer Frequenz als beim Modellsystem Tabak [7, 12–16]. In der Gewebekultur erweist sich der Einsatz von selektierbaren Markergenen (z.B. durch Kombination des starken 35-S-Promotors vom *cauliflower mosaic virus* mit dem Strukturgen für Aminoglycosid Phosphotransferase) als besonders vorteilhaft, denn nur Zellen, die das fremde Gen auch ausreichend exprimieren, überleben in einem kanamycinhaltigen Kulturmedium und können dadurch herausselektioniert werden. Eingehende Untersuchungen an regenerierten Pflanzen des Tabaks haben ergeben, daß gewöhnlich nur eine oder gelegentlich auch mehrere willkürlich miteinander verknüpfte Kopien des Fremdgens im Tabakgenom nachweisbar waren, wobei wie beim Agrobakteriumtransfer kein bevorzugter Integrationsort beobachtet werden konnte. In den meisten Fällen verlief die Vererbung gemäß den Mendelschen Regeln. Ganz offensichtlich unterliegt die fremde DNA, bevor sie in das Pflanzengenom integriert wird, einer massiven Umstrukturierung [7].

Injektion eines selektierbaren Markergens in die Basis einer reifenden Roggenähre

Ganz ohne Zweifel zählen die Getreide zu den wichtigsten Nahrungspflanzen unserer Erde. Die Molekularbiologen hegen schon lange den Wunsch, ihre neuen Techniken und chimären Gene auch bei diesen Pflanzen anzuwenden. Die Methoden des direkten vektorlosen Gentransfers können nur Erfolg haben, wenn die Probleme der Regeneration aus Einzelzellen gelöst sind. Somit ist es zu begrüßen, daß auch weiterhin nach Alternativmethoden zur Genübertragung in Getreide gesucht wird. Dazu zählen wie oben beschrieben die DNA-Viren, direktes Aufsaugen von rekombinierter DNA durch quellende und keimende Pollenkörner oder die Injektion von DNA-Lösungen in Blüten oder Blütenstände, wie das folgende Beispiel belegen soll [17]: Spritzt man 14 Tage vor der ersten meiotischen Teilung ein funktionstüchtiges Resistenzgen (Aminoglycosid phosphotransferase) in die Basis einer reifenden Roggenähre, so diffundiert die DNA bis in die sich entwickelnden Keimzellen. Daß niedermolekulare Substanzen wie Kaffein und Kolchizin auf dieselbe Art in die Blüten gelangen und die Meiose sichtbar schädigen können, ist nicht weiter überraschend. Daß aber Makromoleküle wie unser chimäres Gen diesen Weg unbeschadet zurücklegen können, trotz Membranbarrieren und den allgegenwärtigen DNA-sen, ist nur schwer zu erklären, wären da nicht in einer Zahl von 3000 Roggenkeimlingen (aus 70 Injektionen) immerhin 3 Pflanzen gewesen, die das injizierte Resistenzgen enthielten. Natürlich müssen diese Resultate noch durch weitere Experimente bestätigt werden. Sie beweisen aber schon jetzt, daß auch einfache Gentransfermethoden durchaus erfolgversprechend sein können.

Transponierbare Elemente als Vektoren

In den fünfziger Jahren beobachteten Barbara McClintock, Peter Peterson und andere Genetiker, daß Gensequenzen beim Mais ihre Position im Genom sehr häufig und recht willkürlich verändern. Solche transponierbaren Elemente sind auch inzwischen bei anderen Pflanzen wie z.B. dem Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) beschrieben worden. Mit Hilfe der modernen Molekularbiologie ist es heute möglich, diese Elemente biochemisch zu isolieren. Zur Zeit wird experimentell geprüft, ob man sie zusammen mit einem selektierbaren Markergen ins Pflanzengenom integrieren kann, z.B. nach

Mikroinjektion in Blütenstände oder durch direkte Genübertragung in Tabakprotoplasten [18–22].

Entwicklung von Expressionsvektoren

A. Konstitutive (nicht regulierte) Promotoren

Eukaryotische Gene besitzen einen einheitlichen Aufbau: Kernstück ist das Strukturgen, welches in seinen Basenpaaren den Bauplan für das Endprodukt Protein enthält. Dem Watson-Crick-Modell zufolge liegt die DNA als Doppelwendel (Doppelhelix) vor. Das Rückgrat dieser Wendel bilden Ketten, die abwechselnd aus Pentosezucker und Phosphat bestehen. Betrachtet man eine solche Kette aus Nukleotiden genauer, dann findet man an einem Ende immer ein 3'-Hydroxyl frei und am anderen Ende ein 5'-Phosphat. Somit ergibt sich eine Polarität, die zur unmißverständlichen Darstellung von Genen herangezogen werden kann. So spricht man in der Laborsprache ganz kurz von einem 5'-Ende und versteht darunter DNA-Sequenzen, die dem Strukturgen vorgeschaltet sind und für den korrekten Start des Transkriptionsvorganges verantwortlich sind (upstream-Sequenzen). Dazu gehört auch der Promotor. Das andere Ende des Strukturgens bezeichnet man als 3'-Ende und die angrenzenden Nukleotide als „downstream-Sequenzen“. Zu ihnen zählen Sequenzen, die das Ende des Transkriptionsvorganges signalisieren und außerdem die korrekte Polyadenylierung des fertigen Transkriptes vornehmen.

Gesetzt den Fall, dieses allgemeine Grundschemata trifft nicht nur für Hefe und tierische Organismen zu, sondern auch für höhere Pflanzen und keine zusätzlichen Regulationssequenzen liegen in den Introns und Exons des Strukturgens oder sogar im 3'-Ende verborgen, dann müßte es doch möglich sein, funktionstüchtige chimäre Gene auf die folgende Art und Weise zu konstruieren: Man nimmt ein Strukturgen, welches man in die Pflanzen-DNA einbauen möchte, und hängt daran die 5'-upstream- und 3'-downstream-Sequenzen aus Genen, von denen man genau weiß, daß sie in Pflanzen zur Expression kommen können.

Gemäß dieser Strategie wurden zunächst alle chimären Gene konstruiert. Man benutzte in der Regel die Regulationssequenzen von *Agrobacterium*-(T-DNA)-Genen oder dem Gen VI des DNA-Virus *cauliflower mosaic virus* und setzte statt des ursprünglichen Strukturgens einen Polylinker dazwischen. Unter einem Polylinker hat man einen che-

misch synthetisierten DNA-Doppelstrang zu verstehen, der zahlreiche Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen enthält und somit das Einsetzen eines x-beliebigen Strukturgens erleichtert. Viele dieser Konstruktionen haben sich schon in der Laborpraxis bewährt. Sie enthalten selektierbare Markergene wie Aminoglycosid phosphotransferase, Hygromycin phosphotransferase, Dihydrofolat reductase, Chloramphenicol acetyltransferase und verschiedene Herbizidresistenzgene.

Für die Nutzanwendung ist es sehr bedeutsam zu wissen, daß Gene mit konstitutivem Promotor nicht regulierbar sind, also gewöhnlich in allen Zellen der Empfängerpflanze zur Expression kommen. Gelegentlich versagen aber auch diese Promotoren aus ganz unterschiedlichen Gründen. So könnte die fremde DNA durch Zufall in einem ruhenden Abschnitt der Empfänger-DNA integriert oder die Regulationssequenzen des 5'-Endes durch Methylierung inaktiviert worden sein.

B. Regulierbare Expressionsvektoren

Unregulierte Gene sind für die praktische Nutzanwendung oftmals nicht sehr nützlich. Die Frage lag nahe, ob man auch chimäre Gene mit Kontrollsequenzen von Pflanzengenen konstruieren kann, die von der Empfängerpflanze entsprechend ihrer ursprünglichen Funktion reguliert werden können. Dazu wurden die 5'-upstream-Sequenzen verschiedener Gene isoliert, Vektoren konstruiert und in Modellpflanzen getestet.

1. Lichtregulierte Gene

Das Gen für die kleine Untereinheit der Ribulosebiphosphat-carboxylase (RuBisCo) oder das Gen für Chlorophyll *a/b* (light harvesting chlorophyll *a/b* protein = LHCP) sind im Kern der Pflanzenzelle zu finden. Ihre Produkte müssen zunächst in die Chloroplasten transportiert werden, um funktionsfähig werden zu können. Diese beiden Gene werden vom Licht aktiviert, jedoch nicht direkt. Vielmehr sind Vermittler wie z. B. das Phytochrom dazwischengeschaltet. Diese Gene sind aber nur in Geweben aktiv, die voll ausgebildete Chloroplasten enthalten.

Die Kontrollregionen dieser beiden angesprochenen Gene sind im Hinblick auf den Regulationsmechanismus eingehend untersucht worden: In einigen hundert Basenpaaren stromaufwärts (upstream) vom Transkriptionsstart dieser Gene verbergen sich alle

Regulationssequenzen für eine lichtinduzierbare Genexpression. Dadurch wurde es möglich, chimäre Gene herzustellen, die nur in photosynthetisch aktiven Geweben zur Expression kommen und auch nur in der Lichtphase [23–27].

Zusammenfassend kann man also sagen, daß diese lichtregulierten Sequenzen die Funktion eines genetischen Elementes ausüben und nur Gensequenzen beeinflussen, die auf demselben DNA-Molekül liegen (*cis*-Wirkung). Im vorliegenden Fall wird die Transkription im Licht stimuliert (enhancer-Wirkung) und in der Dunkelphase sowie in nichtchlorophyllhaltigen Pflanzenteilen praktisch abgeschaltet [28, 29].

Das Chalkonsynthasegen repräsentiert einen anderen Typ lichtregulierter Gene. Sein Produkt ist ein Schlüsselenzym (Chalkonsynthase) der Flavonoidsynthese. Zu dieser in höheren Pflanzen weit verbreiteten Stoffgruppe gehören z. B. Blütenfarbstoffe und antimikrobielle Schutzsubstanzen, die sogenannten Phytoalexine. Glycosidische Flavonoidverbindungen sind aber auch in der Lage, UV-Strahlen zu absorbieren und in intakten Pflanzen das darunterliegende Gewebe so vor schädlichen Wirkungen der Strahlen zu schützen.

Nimmt man nun die 5'-upstream-Regulationssequenzen des Chalkonsynthasegens vom Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) und konstruiert damit ein chimäres Gen, dann bleibt dieses Gen in Tabakkeimlingen so lange abgeschaltet, bis man es für etwa 20 Stunden einer UV-Strahlung ausgesetzt hat. Danach kann die Empfängerzelle das vom Fremdgen kodierte Protein in großer Menge synthetisieren, solange die UV-Strahlung anhält [30].

2. Organspezifische Gene

Bis heute wurden mit großem Erfolg in chimären Genen die 5'-upstream-Kontrollsequenzen von Pflanzengenen benutzt, die ausschließlich im Samen, in photosynthetisch aktiven Geweben, in Kartoffelknollen oder in Wurzelknöllchen der Leguminosen wirksam sein können. Alle diese Konstruktionen werden in der Empfängerpflanze genauso reguliert wie in der Spenderpflanze, aus der die 5'-upstream-Regionen entnommen wurden. Die Herkunft des Strukturgens spielt dabei keine Rolle. So konnte man das Patatingen, welches für eines der Hauptspeicherproteine der Kartoffelknolle kodiert, auch in den Blättern der Kartoffelpflanze oder sogar im Ta-

baksproß zur Expression bringen, indem man seine ursprünglichen 5'-upstream-Kontrollsequenzen abtrennte und durch blattspezifische des Tabaks ersetzte. Außerdem wird das für Bohnen charakteristische Speicherprotein Phaseolin auch im Tabaksamen synthetisiert, wenn regulierbare Kontrollsequenzen vorgeschaltet sind [31–34].

3. Hitzeinduzierte Gene

Viele Organismen reagieren auf eine intensive Hitzebehandlung (z. B. ca. 1 h bei 40–50 °C) mit der Synthese von Schockproteinen, denen man allgemein eine Art Schutzfunktion zuschreibt. Nimmt man nun von diesen Proteingenen die 5'-upstream-Kontrollsequenzen und bildet damit ein chimäres Gen, dann wird die Transkription des Strukturgens erst gestartet, wenn ein entsprechender Hitzeschock auf die Empfängerpflanze ausgeübt wird. Bei normalen Temperaturen bleibt das Gen hingegen „abgeschaltet“ [35].

4. Gensequenzen für den Proteintransport in Chloroplasten

Im Abschnitt über lichtinduzierte Kontrollsequenzen wurde das Gen für die kleine Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-carboxylase (RuBisCo) bereits erwähnt. Als Genprodukt entsteht ein Protein, welches im Cytoplasma synthetisiert und anschließend in die Chloroplasten transportiert wird, wo es sich mit einer zweiten, größeren Untereinheit zum fertigen Enzym zusammenschließt. Die ersten Aminosäuren der kleinen Untereinheit bilden einen Fortsatz mit Signalcharakter. Dieser Fortsatz sorgt dafür, daß die Peptidkette vom Cytoplasma in die Chloroplasten gelangt. Während der Membranpassage oder kurz danach wird der Fortsatz (engl.: transit-peptide) abgespalten. Die Aminosäuresequenz dieses Fortsatzes ist in den ersten Nukleotiden der entsprechenden Gensequenz im Kern kodiert. Koppelt man nun das Gen für die Neomycin phosphotransferase an die Signalsequenz der kleinen Untereinheit und integriert dieses chimäre Gen in das Genom des Tabaks, dann wird das neusynthetisierte Enzym tatsächlich vom Cytoplasma in die Chloroplasten transportiert. Somit ergibt sich die Möglichkeit, bestimmte Proteine in den Chloroplasten anzuhäufen, was im Hinblick auf Resistenz gegen Herbizidwirkung eine große praktische Bedeutung erlangen könnte [36–38].

Gentechnologie und Pflanzenschutz

Die Entwicklung chimärer Gene und wirkungsvoller Vektoren haben die Voraussetzung dafür geschaffen, daß wir heute fremde Gene in einige wichtige Kulturpflanzen wie z.B. Tabak, Tomate, Kartoffel und Raps übertragen können. Verständlicherweise wird man zunächst mit sehr einfachen und möglichst nur von einem Gen kontrollierten Systemen arbeiten wollen.

1. Resistenz gegen Herbizide

Beispielhaft für die ganze Gruppe der sogenannten Breitbandherbizide soll hier das Herbizid Glyphosat näher besprochen werden, welches die Wirksubstanz im Handelspräparat Round-up der Firma Monsanto darstellt. Es blockiert die Synthese von aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Pflanzen, Bakterien und Pilze werden durch den Entzug dieser lebenswichtigen Aminosäuren getötet. Tiere und Menschen hingegen müssen diese Aminosäuren täglich mit der Nahrung aufnehmen und sind deshalb nicht direkt von der Wirkung des Herbizids betroffen. Nimmt man nun ein in Mikroorganismen identifiziertes Resistenzgen (EPSP = 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphat synthase) und verpackt es in einen Expressionsvektor unter der Kontrolle des *Cauliflower-mosaic-virus*-Promotors, dann kann man Tabakpflanzen mit integriertem Fremdgen bekommen, die eine viel größere Menge des Glyphosats ohne äußerlich erkennbare Schädigung vertragen können.

Eine Schwierigkeit wird bei diesem Experiment deutlich. Die aromatischen Aminosäuren werden nämlich in den Chloroplasten synthetisiert, was bedeutet, daß die Resistenzgene analog dem RuBisCo-Gen über die transportspezifischen Signalsequenzen verfügen müssen. Aber ganz unabhängig von diesem

speziellen Transportproblem ist heute schon mehrfach bewiesen worden, daß man mit chimären Genen Kulturpflanzen herbizidresistent machen kann [39].

2. Virusresistenz durch Gentransfer

Ein sehr eindrucksvolles Beispiel für die Möglichkeiten chimärer Genprodukte ist die Verbesserung der Resistenz von Tabakpflanzen gegenüber dem *Tabak-Mosaik-Virus* (TMV). In diesem Fall wurde das Gen für das Virushüllprotein verwendet. Mit diesem Gen im Genom synthetisieren Tabakpflanzen eine große Menge des fremden Proteins. Bei einem Befall mit dem TMV zeigen diese Pflanzen keine oder nur sehr geringe Krankheitssymptome, was inzwischen durch mehr als 1000 Pflanzen statistisch abgesichert wurde. Es ist schon lange bekannt, daß Pflanzen viel besser gegen Virusschäden geschützt sind, wenn sie zunächst von einer abgeschwächten Form des Virus befallen worden sind (Cross-protection). Ob wir es in dem vorliegenden Fall mit einem vergleichbaren Phänomen zu tun haben, müssen weitere Untersuchungen erst noch beweisen [40, 41].

3. Resistenz gegen Insektenfraß

Bacillus thuringiensis synthetisiert ein kristallines Protein, das z.B. außerordentlich giftig für Raupen von *Pieris brassicae* (großer Kohlweißling) oder *Manduca sexta* ist. Das Gen, welches für dieses Giftprotein kodiert, wurde inzwischen isoliert. Überträgt man es als chimäres Gen mit Hilfe des *Agrobacterium* in Tabakpflanzen, dann sind diese sehr effektiv gegen Insektenfraß geschützt. Wir wissen heute, daß wir noch eine große Auswahl an toxischen Proteinen in Wildtypen des *Bacillus thuringiensis* zur Verfügung haben, die einen sehr großen Schutzbereich ermöglichen [42].

- [1] A. Caplan, L. Herrera-Estrella, D. Inze, E. Van Haute, M. Van Montagu, J. Schell und P. Zambryski, *Science* **222**, 815–821 (1983).
- [2] G. Kahl und J. Schell (Hrsg.), *Molecular Biology of Plant Tumors*, Academic Press, New York 1982.
- [3] E. W. Nester, M. P. Gordon, R. M. Amasino und M. F. Yanofsky, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 387–413 (1984).
- [4] S. E. Stachel, E. Messens, M. Van Montagu und P. Zambryski, *Nature* **318**, 624–629 (1985).
- [5] K. Wang, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu und P. Zambryski, *Cell* **38**, 455–462 (1984).
- [6] M. De Block, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J. Schell und P. Zambryski, *EMBO J.* **3**, 1681–1689 (1984).
- [7] R. Hain, P. Stabel, A. P. Czernilofsky, H.-H. Steinbiß, L. Herrera-Estrella und J. Schell, *Mol. Gen. Genet.* **199**, 161–168 (1985).
- [8] R. B. Horsch, J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers und R. T. Fraley, *Science* **227**, 1229–1231 (1985).
- [9] P. Zambryski, L. Herrera-Estrella, M. De Block, M. Van Montagu und J. Schell, in: *Genetic Engineering, Principles and Methods* (A. Hollaender und J. Setlow, Hrsg.), S. 253–278, Plenum Press, New York 1984.
- [10] Cs. Koncz und J. Schell, *Mol. Gen. Genet.*, im Druck.
- [11] A. P. Czernilofsky, B. Baker, B. Gronenborn, R. Hain, C. Leaver, V. Matzeit, I. Moore, J. Schalk, U. Wirtz und J. Schell, in: *Tailoring Genes for Crop Improvement: An Agricultural Perspective* (G. Brueining, T. Kosuge, J. Harada und A. Hollaender, Hrsg.), S. 189–195, Plenum Press, New York 1987.
- [12] I. Potrykus, J. Paszkowski, M. Saul, S. Krüger-Lebus, T. Müller, R. Schocher, I. Negrutiu, P. Künzler und R. D. Shillito, *UCLA Plant Genet.* **35**, 181–200 (1985).
- [13] B. Baker, J. Schell und H. Lörz, *UCLA Plant Genet.* **35**, 201–211 (1985).
- [14] H. Lörz, B. Baker und J. Schell, *Mol. Gen. Genet.* **199**, 178–182 (1985).
- [15] I. Potrykus, M. W. Saul, J. Petruska, J. Paszkowski und R. D. Shillito, *Mol. Gen. Genet.* **199**, 169–177 (1985).
- [16] V. Walbot, V. Chandler und L. Taylor, *UCLA Plant Genet.* **35**, 333–342 (1985).
- [17] A. De la Pena, H. Lörz und J. Schell, *Nature* **325**, 274–276 (1987).
- [18] B. Baker, J. Schell, H. Lörz und N. Fedoroff, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 4844–4848 (1986).
- [19] N. Fedoroff, in: *Mobile Genetic Elements* (J. A. Shapiro, Hrsg.), S. 1, Academic Press, New York 1983.
- [20] M. Freeling (Hrsg.), *Plant Genetics (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol. 35)*, Alan R. Liss Inc., New York 1985.
- [21] H. Saedler und P. Nevers, *EMBO J.* **4**, 585–590 (1985).
- [22] H. Saedler, Zs. Schwarz-Sommer und A. Gierl, *UCLA Plant Genet.* **35**, 271–281 (1985).
- [23] G. Coruzzi, R. Broglie, C. Edwards und N.-H. Chua, *EMBO J.* **3**, 1671–1679 (1984).
- [24] L. Herrera-Estrella, G. Van den Broeck, R. Maenhaut, M. Van Montagu und J. Schell, *Nature* **310**, 115–120 (1984).
- [25] G. Morelli, F. Nagy, R. T. Fraley, S. G. Rogers und N.-H. Chua, *Nature* **315**, 200–204 (1985).
- [26] G. Morelli, F. Nagy, R. T. Fraley, S. G. Rogers und N.-H. Chua, *Nature* **318**, 579 (1985).
- [27] J. Simpson, M. P. Timko, A. R. Cashmore, J. Schell, M. Van Montagu und L. Herrera-Estrella, *EMBO J.* **4**, 2723–2729 (1985).
- [28] J. Simpson, J. Schell, M. Van Montagu und L. Herrera-Estrella, *Nature* **323**, 551–554 (1986).
- [29] M. P. Timko, A. P. Kausch, C. Castresana, J. Fassler, L. Herrera-Estrella, G. Van den Broeck, M. Van Montagu, J. Schell und A. R. Cashmore, *Nature* **318**, 579–582 (1985).
- [30] H. Kaulen, J. Schell und F. Kreuzaler, *EMBO J.* **4**, 1–8 (1986).
- [31] R. N. Beachy, Z.-L. Chen, R. B. Horsch, S. G. Rogers, N. J. Hoffmann und R. T. Fraley, *EMBO J.* **4**, 3047–3053 (1985).
- [32] P. Eckes, J. Schell und L. Willmitzer, *Mol. Gen. Genet.* **199**, 216–244 (1985).
- [33] J. C. Kamalay und R. B. Goldberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **81**, 2801–2805 (1984).
- [34] S. Rosahl, P. Eckes, J. Schell und L. Willmitzer, *Mol. Gen. Genet.* **201**, 368–373 (1986).
- [35] A. Spena, R. Hain, U. Ziervogel, H. Saedler und J. Schell, *EMBO J.* **4**, 2739–2743 (1985).
- [36] G. Van den Broeck, M. P. Timko, A. P. Kausch, A. R. Cashmore, M. Van Montagu und L. Herrera-Estrella, *Nature* **313**, 358–363 (1985).
- [37] A. Cashmore, L. Szabo, M. Timko und A. Kausch, *Biotechnology* **3**, 803–808 (1985).
- [38] P. H. Schreier, E. A. Seftor, J. Schell und H. J. Bohner, *EMBO J.* **4**, 25–32 (1985).
- [39] D. M. Shah, R. B. Horsch, H. J. Klee, G. M. Kishore, J. A. Winter, N. E. Tumer, C. M. Hironaka, P. R. Sanders, C. S. Gasser, S. Aykent, N. R. Siegel, S. G. Rogers und R. T. Fraley, *Science* **233**, 478–481 (1986).
- [40] P. Powell-Abel, R. S. Neldon, D. E. Barun, N. Hoffmann und S. G. Rogers, *Science* **232**, 738 (1986).
- [41] R. T. Fraley und R. N. Beach, *Science* **232**, 738 (1986).
- [42] M. Vaecck, H. Höfte, A. Reynaerts, J. Leemans, M. Van Montagu, M. Zabeau, *UCLA-Symposium „Molecular strategies for Crop Protection“*, Steamboat Spring, Colorado, USA, 1986.