

Gruppenpuzzle zum Thema „Methoden der Gentechnologie“

Einführung

Die vorliegende Gruppenarbeit dient dazu, SchülerInnen mit einigen heute bedeutenden Methoden der Gentechnik vertraut zu machen. Zu Beginn jeder Aufgabe wird die nötige Hintergrundinformation gegeben.

Aufgaben / Themen / Ziele

- **Aufgabe 1:** Sequenzieren: Die SchülerInnen erarbeiten anhand eines Modellversuchs die Methode des Sequenzierens
- **Aufgabe 2:** Funktionsweise von cDNA-Chips: Die SchülerInnen können die Funktionsweise von DNA-Chips erklären.
- **Aufgabe 3:** Auswahl der Gene zur Herstellung einer transgenen Pflanze: Die SchülerInnen können die Vorgehensweise der Herstellung einer transgenen Pflanze beschreiben und erkennen die damit verbundenen Schwierigkeiten.
- **Aufgabe 4:** Züchtung einer neuen Tomatensorte: Die SchülerInnen können Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen klassischer Züchtung und Züchtung mit Hilfe der Gentechnik erläutern.

Vorgehen

Expertenrunde: mindestens 1 Lektion

Die SchülerInnen bearbeiten in 3er oder 4er-Gruppen die vorliegenden Aufgaben und entscheiden, welche Informationen sie in welcher Form an ihre KollegInnen weitergeben, damit auch diese die Lernziele erreichen.

Unterrichtsrunde: pro Aufgabe mindestens 20 Min.

Anmerkungen

Selbstverständlich können die Aufgaben auch einzeln z. B. in Partnerarbeit bearbeitet werden.

Literatur

- www.genfakten.ethz.ch

AUFGABE 1 SEQUENZIEREN MIT BÜROKLAMMERN

Lernziele

Sie erarbeiten selbstständig das Prinzip des Sequenzierens.

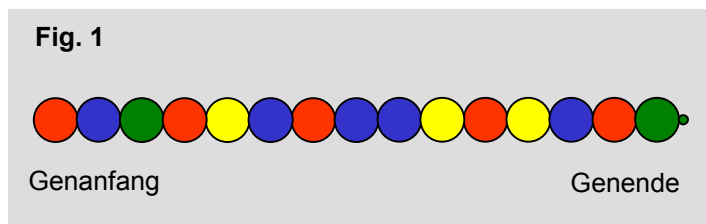
Hintergrundinformationen

Ihre Aufgabe besteht darin, bei einem Gen die Abfolge der Basen zu bestimmen. Mit anderen Worten: Sie sollen das Gen sequenzieren.

Für das Sequenzieren brauchen Sie die folgenden Zutaten: ein Gen mit **unbekannter** Sequenz (= Strang mit ca. 15 verschiedenfarbigen Büroklammern), viele Nucleotide (= einzelne Büroklammern) und ein Enzym zur DNA-Verlängerung. Die Nucleotide finden sozusagen von selber ihre passende Lage gegenüber dem Einzelstrang und werden dann durch ein Enzym, eine sogenannte Polymerase, miteinander verknüpft. Da jedoch bei Ihrer „Schreibtisch-Übung“ die Nucleotide nicht automatisch den richtigen Platz finden, müssen Sie bei diesem Prozess etwas nachhelfen. Sie selber sind in diesem Fall das Enzym, die Polymerase. Ein Teil der Nucleotide (ca. 15%) ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und zwar je nach Nucleotid (A, C, T oder G) mit einer anderen „Farbe“ (Büroklammern mit einer speziellen Markierung durch Nagellack oder Filzstift). Die Farbe hilft, die entsprechenden Nucleotide zu identifizieren.

Aufgabe

Vor Ihnen stehen vier Behälter mit bunten Büroklammern (= Nucleotide). Jeder Behälter enthält nur eine Farbsorte an Büroklammern, vermischt mit ca. 15% markierten Nucleotiden (siehe Hintergrundinformationen). Ausserdem erhalten Sie einen Strang aus etwa 15 bunt gemischten Büroklammern (= unbekanntes Gen). Das erste Nucleotid dieses Gens ist jene Klammer, bei der die gerade Seite oben liegt. Das letzte Nucleotid des Gens stellt jene Klammer dar, bei der die Spitze nach unten zeigt (Fig. 1).



1. Bauen Sie mit Hilfe der Büroklammern in den 4 Behältern eine Kette auf, die komplementär zu dem abgebildeten Gen ist. Zögern Sie nicht, wenn Sie eine Klammer aus dem passenden Behälter herausnehmen, sondern greifen Sie „spontan“ zu. Fahren Sie so fort, bis Sie das Gen vollständig „nachgebaut“ haben oder bis Sie zufälligerweise eine Klammer wählen, die mit einem „Fluoreszenzfarbstoff“ markiert ist. An eine solche Klammer lässt sich keine weitere Klammer mehr befestigen. Dies führt zu einem Kettenabbruch. Wie eine echte Polymerase beginnen Sie jetzt mit einer neuen Reaktion, indem Sie das Gen wieder von der ersten Base an komplementär nachbauen.

Farbe der Büroklammer	Nucleotid mit der Base	komplementäres Nucleotid mit der Base
rot	Adenin	Thymin
blau	Thymin	Adenin
grün	Guanin	Cytosin
gelb	Cytosin	Guanin

2. Wiederholen Sie den Schritt 1, bis Sie etwa 10-15 unterschiedlich lange Stränge haben.
3. Mittels einer „Gelelektrophorese“ trennen Sie anschliessend Ihre Nucleotid (Büroklammer-) stränge auf. Dabei können Sie sich das Gel als ein Maschennetz vorstellen, an welches eine Spannung angelegt wird. Da die DNA negativ geladen ist, wandern die DNA-Stücke zum positiven Pol. Die kleinen DNA-Stücke werden bei ihrer Wanderung durch das Maschennetz weniger behindert als die grossen. Sie kommen deshalb schneller vorwärts und können in der gleichen Zeit eine längere Strecke zurücklegen als die grösseren DNA-Stücke.
Zur praktischen Umsetzung: Die Gelelektrophorese können Sie selber nicht durchführen. Sie können nur das Ergebnis darstellen. Zu diesem Zweck ordnen Sie Ihre Büroklammerketten so an, dass sie entsprechen ihrer Größe untereinander liegen. Die längsten Ketten befinden sich oben, die kleinsten unten.
4. Am unteren Ende des Gels müssen Sie sich nun ein Fluoreszenz-Messgerät vorstellen. Es analysiert die jeweilige Fluoreszenzfarbe der einzelnen DNA-Stücke, welche im Gel an ihm vorbeiziehen, und gibt diese Information direkt an einen angeschlossenen Computer weiter. Jene Nucleotide, die eine Fluoreszenzmarkierung aufweisen, unterscheiden sich in der Art ihrer Markierung und damit in ihrer Fluoreszenzfarbe; denn jeder der 4 Nucleotidtypen ist durch eine andere Fluoreszenzfarbe gekennzeichnet. Auf diese Weise kann man anhand des Computerausdrucks die Sequenz des zu untersuchenden Gens direkt ablesen.
Jemand aus Ihrer Gruppe kann diese Fluoreszenzmessung nachahmen. Das heisst, er bzw. sie liest bei jeder Nucleotid (Büroklammer-) kette ab, mit welchem fluoreszierenden Nucleotid-Typ diese gekennzeichnet ist. Die Ergebnisse teilt er/sie einem anderen Gruppenmitglied (= Computer) mit, das diese dann schriftlich festhält.
5. Es kann sein, dass Sie unter Ihren Nucleotid (Büroklammer-) ketten zwei gleich lange Exemplare haben. Mehrere gleich lange Ketten mit einer identischen Fluoreszenzmarkierung geben dem Computer ein stärkeres Signal. Zu einer Veränderung der wahrgenommenen Fluoreszenzfarbe kommt es jedoch nicht. Es kann ebenfalls sein, dass sich Ihre verschiedenen Nucleotid (Büroklammer-) ketten in der Länge nicht immer nur um eine Klammer, sondern gleich um mehrere Klammern unterscheiden. Es fehlen somit Nucleotid (Büroklammer-) ketten von einer bestimmten Länge und somit auch ganz bestimmte Fluoreszenzsignale. Eine fehlende Nucleotidkette kommt im Labor im Allgemeinen nur dann vor, wenn der zu sequenzierende DNA-/Gen-Bereich grösser als ca. 700-1000 Basen ist. Der Grund dafür ist, dass die Reaktion, mit der die zahlreichen Nucleotidketten von unterschiedlicher Länge erzeugt werden, viel häufiger stattfindet als es in diesem Beispiel gezeigt wird. Zudem wird das Sequenzieren eines Genbereichs mindestens zweimal durchgeführt. Simulieren Sie diesen doppelten Versuchsansatz. Vergleichen Sie hierzu Ihre Nucleotid-

bzw. Basensequenz mit derjenigen von einer Nachbargruppe. Vervollständigen Sie dann anhand der Ergebnisse der Nachbargruppe Ihre eigene Nucleotid-/Basensequenz.

6. Ihre ermittelten Sequenzierdaten sind noch nicht identisch mit der Originalsequenz des Gens.
 - a) Begründen Sie, warum dies so ist.
 - b) Was müssen Sie machen, um die Originalsequenz des Gens herauszufinden?

Hinweise für die Lehrperson, Lösungen

Vorwissen

- Aufbau der DNA (Doppelstrang, Basenpaarung)
- Funktionsweise der Replikation

Vorbereitung der Gruppenarbeit

Die Schüler/innen arbeiten in Kleingruppen von 3-4 Personen. Pro Gruppe werden folgende Materialien gebraucht:

Vier Behälter mit je 100 Büroklammern. Die Klammern sind nach Farben getrennt: rot, grün, blau und gelb. Bei je 15% der Klammern werden die spitzen Enden mit unterschiedlich farbigem Klebeband umwickelt, sodass keine weiteren Klammern mehr an diese Klammer angehängt werden können. Pro Klammersorte sollte je eine unterschiedliche Farbe verwendet werden, da der Fluoreszenzfarbstoff für die jeweilige Nucleotidsorte spezifisch ist. Gleichfarbige Büroklammern mit und ohne Klebeband werden gemischt und in einen Behälter gegeben.

Das unbekannte Gen ist ein Strang von 15 verschiedenfarbigen Büroklammern. Die Farbabfolge können Sie selber bestimmen.

Tipp

Anstelle von bunten Büroklammern können Sie auch pop-it beads verwenden. Bei Perlen für den Kettenabbruch wird der kleine Fortsatz entfernt. Um den Fluoreszenzfarbstoff zu simulieren, können diese veränderten Perlen zusätzlich mit einem Punkt (Nagellack oder wasserfester Filzstift) markiert werden. Dabei sollte pro Perlensorte je eine unterschiedliche Farbe verwendet werden, da der Fluoreszenzfarbstoff für die jeweilige Nucleotidsorte spezifisch ist (z.B. rote Perlen mit schwarzem Punkt, gelbe Perlen mit grünem Punkt, blaue Perlen mit weissem Punkt und grüne Perlen mit rotem Punkt).

Der Nachteil der Variante mit Büroklammern ist, dass die Schüler ganz klar fühlen können, ob eine Büroklammer zum Kettenabbruch führt oder nicht. So geht der Zufall etwas verloren.

Lösung zur 6. Teilaufgabe

- a) Die im Gel aufgetrennten Nucleotidketten sind von ihrer Basenabfolge komplementär zum Original.
- b) Für die herausgefundene Basenabfolge müssen die komplementären Basen aufgeschrieben werden.

Quelle

Pop-it beads können bei der Carolina Biological Supply Company für ca. US\$ 80 bestellt werden (Set Katalog Nr. WW 171112 V0208D). In einem Set befinden sich mehr als genug Perlen für 4-5 Gruppen. Die restlichen Perlen können z.B. für die Aufgabe Züchtung mit pop-it beads eingesetzt werden.

Life Sciences Netzwerk Regio Basiliensis

Carolina Biological Supply Company
2700 York Road
Burlington
NC 27215-3398
Tel.: 800-224-551
Fax: 336-584-3399
<http://www.carolina.com/>

AUFGABE 2 FUNKTIONSWEISE VON cDNA-CHIPS

Lernziel

Sie können die Funktionsweise eines cDNA-Chips erklären.

Hintergrundinformationen

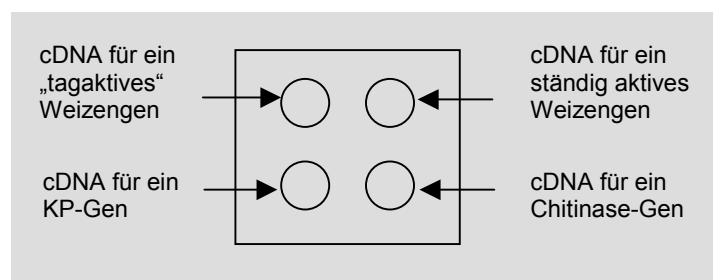
Mit einem cDNA-Chip* kann man feststellen, ob eine Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt oder unter bestimmten Wachstumsbedingungen eine spezifische mRNA bildet. So lässt sich mit einem solchen Chip beispielsweise überprüfen, wann in einer gentechnisch veränderten Pflanze die neuen Gene aktiv sind.

** Einen Chip kann man mit einem Objektträger vergleichen. Die Objekte auf diesem Träger sind verschiedene cDNAs. Identische Kopien von einer bestimmten cDNA sind jeweils an einem bestimmten Punkt des Chips aufgetragen. Jeder Punkt entspricht somit einer anderen cDNA-Sorte. Der Begriff cDNA bedeutet, dass es sich bei dieser DNA um eine Copie (c) der entsprechenden mRNA handelt. Die Basenabfolge ist somit komplementär zu der jeweiligen mRNA.*

Aufgabe

Sie haben einen Chip mit 4 verschiedenen cDNAs. Die cDNAs entsprechen folgenden Genen:

1. einem Weizengen, das nur tagsüber aktiv ist und die entsprechende mRNA bildet.
2. einem Weizengen, das immer (tagsüber und nachts) aktiv ist.
3. einem KP-Gen, einem Gen, welches die Pflanze spezifisch vor Brandpilz-Befall schützt.
4. einem Chitinase-Gen, einem Gen, welches die Pflanze vor Pilzbefall schützt.



Sie haben ausserdem 6 verschiedene Weizenpflanzen

- A) eine herkömmliche Weizenpflanze.
- B) wie A), aber mit Stinkbrand infiziert.
- C) eine gentechnisch veränderte Weizenpflanze, die ein KP-Gen enthält, welches ständig aktiv. Das Genprodukt des KP-Gens schützt die Pflanze vor Brandpilz-Befall.
- D) wie C), aber mit Stinkbrand infiziert.

- E) eine gentechnisch veränderte Weizenpflanze, die ein Chitinase-Gen enthält, welches nur bei Pilzbefall aktiv ist. Das Genprodukt des Chitinase-Gen schützt die Pflanze generell vor Pilzbefall.
- F) wie E), aber mit Stinkbrand infiziert.

Die nicht infizierten Pflanzen A, C, und E werden bereits vor Sonnenaufgang geerntet, die infizierten Pflanzen B, D und F dagegen erst um die Mittagszeit.

Aus den Pflanzen isolieren Sie die mRNA und markieren sie mit einem Farbstoff. Anschliessend geben Sie die markierte mRNA zu den Chips. Sofern sich unter den mRNA-Molekülen einige Exemplare befinden, die komplementär zu den cDNA-Molekülen auf dem Chip sind, binden beide aneinander. Die mRNA-Moleküle, die nicht an die cDNA gebunden haben, werden abgewaschen. Die gebundene mRNA kann aufgrund ihrer Farbmarkierung sichtbar gemacht werden.

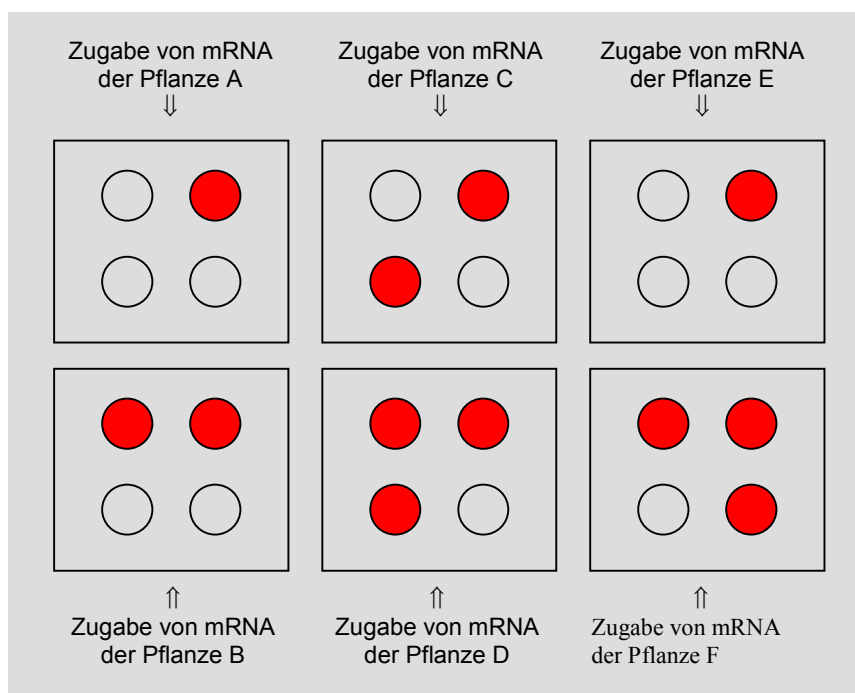
Zeichnen Sie bei den Chips mit roter Farbe ein, an welchen Stellen es zu einem Farbsignal kommt.

Hinweise für die Lehrperson, Lösungen

Vorwissen

- Ablauf von Transkription und Translation
- bekannte Begriffe: komplementäre Basen, cDNA, Promotor, KP- & Chitinase-Gen (vgl. Aufgabe 3a)
- zur Klärung der Begriffe „KP-Gen“ und „DNA-Chip“ siehe auch Hintergrundtext (<http://www.genfakten.ethz.ch/~w3gendia/index.php?pageid=23>) und Interview 1 vom Nov. 2001 (<http://www.genfakten.ethz.ch/~w3gendia/index.php?pageid=16>)

Lösung



Pflanze A

mRNA von	ist in den geernteten Weizenpflanzen vorhanden / nicht vorhanden	Begründung
„tagaktivem“ Gen	ist nicht vorhanden	da die Pflanze A vor Sonnenaufgang geerntet wurde und die mRNA dieses Gens nur tagsüber gebildet wird
ständig aktivem Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die mRNA dieses Gens ständig in den Zellen der Pflanze A gebildet wird
KP-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze A kein entsprechendes Gen besitzt
Chitinase-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze A kein entsprechendes Gen besitzt

Pflanze B

„tagaktivem“ Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die Pflanze B tagsüber geerntet wurde
ständig aktivem Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die mRNA dieses Gens ständig gebildet wird
KP-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze B kein entsprechendes Gen besitzt
Chitinase-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze B kein entsprechendes Gen besitzt

Pflanze C

„tagaktivem“ Gen	ist nicht vorhanden	da die Pflanze C vor Sonnenaufgang geerntet wurde
ständig aktivem Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die mRNA dieses Gens ständig gebildet wird
KP-Gen	<i>ist vorhanden</i>	(a) da die Weizenpflanze C gentechnisch verändert wurde und ein KP-Gen enthält, (b) da das KP-Gen ständig aktiv ist
Chitinase-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze C kein entsprechendes Gen besitzt

Pflanze D

„tagaktivem“ Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die Pflanze D tagsüber geerntet wurde
ständig aktivem Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die mRNA dieses Gens ständig gebildet wird
KP-Gen	<i>ist vorhanden</i>	(a) da die Weizenpflanze C gentechnisch verändert wurde und ein KP-Gen enthält, (b) da das KP-Gen ständig aktiv ist
Chitinase-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze D kein entsprechendes Gen besitzt

Pflanze E

mRNA	ist in den geernteten Weizenpflanzen vorhanden / nicht vorhanden	Begründung
„tagaktivem“ Gen	ist nicht vorhanden	da die Pflanze E vor Sonnenaufgang geerntet wurde
ständig aktivem Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die mRNA dieses Gens ständig gebildet wird
KP-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze E kein entsprechendes Gen besitzt

Chitinase-Gen	ist nicht vorhanden	die Weizenpflanze E wurde zwar gentechnisch verändert und besitzt ein Chitinase-Gen, jedoch ist dieses Gen nicht aktiv, da kein Pilzbefall vorliegt.
---------------	---------------------	--

Pflanze F

„tagaktivem“ Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die Pflanze F tagsüber geerntet wurde
ständig aktivem Gen	<i>ist vorhanden</i>	da die mRNA dieses Gens ständig gebildet wird
KP-Gen	ist nicht vorhanden	da die Weizenpflanze F kein entsprechendes Gen hat
Chitinase-Gen	<i>ist vorhanden</i>	(a) da die Weizenpflanze F gentechnisch verändert wurde und ein Chitinase-Gen enthält, (b) da bei der Pflanze F mit Stinkbrand infiziert wurde und das Chitinase-Gen nur bei Pilzbefall aktiv ist

AUFGABE 3 AUSWAHL DER GENE ZUR HERSTELLUNG EINER TRANSGENEN PFLANZE

Lernziele

Sie können

- die Zusammensetzung eines Genkonstrukts beschreiben: Promotor - Markergen - Promotor - interessierendes Gen (hier: Resistenzgen).
- erläutern, welche speziellen Informationen aus den verschiedenen Untersuchungsschritten mit den transgenen Pflanzen gewonnen werden können.

Hintergrundinformationen

Stellen Sie sich vor, Sie wollen selber eine gentechnisch veränderte Weizenpflanze herstellen. Die Weizenpflanze soll vor Stinkbrandbefall geschützt sein. Sie benötigen hierfür ein entsprechendes Resistenzgen. Ausserdem brauchen Sie ein Markergen*. Dieses Gen zeigt Ihnen, ob die Pflanze die fremden Gene stabil in ihr Erbgut eingebaut hat. Für beide Gene müssen Sie auch je einen Promotor aussuchen. Hierbei handelt es sich um einen DNA-Bereich, der dem Gen vorgeschaltet ist und der bestimmt, wann das Gen aktiv ist und wann nicht.

Zusatzinformation:

** Als Markergene werden oftmals solche Gene genutzt, die zu einer Unempfindlichkeit gegenüber einem Antibiotikum oder einem Pflanzenvernichtungsmittel (Totalherbizid) führen. Zellen, bei denen diese Markergene ins Erbgut eingebaut werden und dort aktiv sind, können somit auf einem Nährboden überleben, der das entsprechende Antibiotikum oder Pflanzenvernichtungsmittel enthält. Neuerdings gibt es auch ein Markergen, das den Zellen ermöglicht, Mannose (dies ist eine bestimmte Zuckerart) als Kohlenhydrat-Quelle zu nutzen. Normalerweise können Pflanzenzellen dies nicht. Auf einem Nährmedium, bei dem der Rohrzucker gegen Mannose ausgetauscht wurde und Mannose somit die einzige Kohlenhydrat-Quelle darstellt, überleben folglich nur jene Zellen, die das Mannose-Markergen in ihrem Erbgut enthalten.*

Aufgaben

Aufgabe A

- Sie haben die folgenden drei Genkonstrukte zur Auswahl, die Sie in ihre Weizenpflanzen einführen können. Suchen Sie das optimale Genkonstrukt heraus. Begründen Sie Ihre Wahl.

- A) P_{BLATT} - G_{HERBIZID} - P_{TOTAL} - G_{CHITINASE}
B) P_{TOTAL} - G_{MANNOSE} - P_{PILZ} - G_{KP}
C) P_{TOTAL} - G_{ANTIBIOTIKA} - P_{TOTAL} - G_{ATMUNG}

Erklärungen der Genkonstrukt-Bestandteile

P _{BLATT}	Ein Promotor, der nur in den Blättern aktiv ist.
P _{TOTAL}	Ein Promotor, der in jeder Pflanzenzelle aktiv ist.
P _{PILZ}	Ein Promotor, der nur bei Pilzbefall aktiv ist.
G _{ANTIBIOTIKA}	Ein Gen, das zu einer Unempfindlichkeit gegenüber einem Antibiotikum führt.

G _{HERBIZID}	Ein Gen, das zu einer Unempfindlichkeit gegenüber einem Pflanzenvernichtungsmittel führt.
G _{MANNNOSE}	Ein Gen, das die Nutzung von Mannose als einziger Zuckerquelle erlaubt.
G _{KP}	Ein KP-Gen, das ursprünglich von einem Virus stammt und dessen Genprodukt spezifisch vor Brandpilz-Befall schützt. Das KP Gen wurde von einem amerikanischen Team entdeckt und benannt. KP steht für „Killer Protein“.
G _{CHITINASE}	Ein Chitinase-Gen, dessen Genprodukt die Zellwände von Pilzen zerstört.
G _{ATMUNG}	Ein Gen, dessen Genprodukt ein wichtiges Enzym der Atmungskette hemmt.

- Wenn Sie bei den anderen beiden Genkonstrukten einen Bestandteil austauschen, dann können Sie die Konstrukte ebenfalls zum Schutz der Weizenpflanzen vor Pilzbefall einsetzen. Notieren Sie den Bestandteil des Genkonstrukts, der ausgetauscht werden muss. Begründen Sie, warum dieser Bestandteil ungeeignet ist. Suchen Sie sich einen anderen Bestandteil aus, den Sie stattdessen in das Genkonstrukt einbauen möchten.

Aufgabe B

Nachdem Sie Ihr Genkonstrukt in die Weizenembryonen eingebracht haben, lassen Sie die Embryonen auf einem Selektionsmedium (einem Nährboden, dem z.B. ein Antibiotikum zugesetzt wurde) wachsen. Überleben werden nur diejenigen Zellen, die das Genkonstrukt eingebaut haben und in denen das Markergen aktiv ist. Aus 1000 beschossenen Embryonen gehen ca. 10 transgene Pflanzen hervor.

In diesen Pflanzen wird

- A) das Pilzresistenzgen nachgewiesen;
- B) jenes neue Protein nachgewiesen, welches den Stinkbrandbefall hemmt.

Beide Methoden A) und B) sind relativ arbeitsintensiv. Sie lassen sich gut bei einer kleinen Zahl von Pflanzen anwenden. Problematisch wird es jedoch, wenn man Hunderte von Pflanzen untersuchen muss.

- a) Warum ist der Versuch A notwendig, obwohl mittels des Markergens sichergestellt wurde, dass die Pflanzen gentechnisch verändert sind? Nennen Sie einen Grund.
- b) Warum führt man den Versuch B durch, obwohl das Vorhandensein des Pilzresistenzgens bereits durch Versuch A gezeigt wurde? Geben Sie eine Begründung an.
- c) Warum müssen zusätzlich zu dem Versuch B die transgenen Pflanzen bzw. ihre Samen mit Stinkbrand infiziert werden? Welche neue Information erhält man dadurch?
- d) Bei der Bewilligung eines Freilandversuchs sehen die zuständigen Behörden es oftmals als nachteilig an, wenn die gentechnisch veränderten Pflanzen bestimmte Markergene, wie z.B. Antibiotikums-Resistenzgene, enthalten. Ideal wäre es dagegen, wenn man generell ohne Markergene auskäme. Überlegen Sie sich einen Grund, warum man heute noch nicht auf Markergene verzichten will?

Hinweise für die Lehrperson, Lösungen

Vorwissen

- der Ablauf von Transkription und Translation
- bekannte Begriffe: Markergen, Resistenzgen, Promotor, Atmungskette, Enzym

Lösungen zur Aufgabe A

- Das Genkonstrukt B „ $P_{TOTAL} - G_{MANNOSE} - P_{PILZ} - G_{KP}$ “ ist das geeignetste.
Begründung:
Der Promotor des Markergens ist bereits in den undifferenzierten Embryo- bzw. Kalluszellen aktiv. Es wird somit schon zu diesem Zeitpunkt ein Genprodukt gebildet, welches das Wachstum der transformierten Zellen auf einem Mannose-haltigen Medium erlaubt.
Der Promotor vor dem KP-Gen wird durch Pilzbefall aktiviert. Es wird somit spezifisch in den befallenen Zellen das KP-Protein gebildet, welches das Pilzwachstum hemmt.
- Beim Genkonstrukt A „ $P_{BLATT} - G_{HERBIZID} - P_{TOTAL} - G_{CHITINASE}$ “ muss der Promotor des Markergens (P_{BLATT}) ersetzt werden. Dieser Promotor ist nur in Blättern aktiv, aber nicht in undifferenzierten Zellen. Die transformierten Embryozellen könnten somit nicht auf einem Nährboden überleben, der das entsprechende Pflanzenschutzmittel enthält. Zur Optimierung des Genkonstrukts sollte anstelle von P_{BLATT} der Promotor P_{TOTAL} gewählt werden.
- Beim Genkonstrukt C „ $P_{TOTAL} - G_{ANTIBIOTIKA} - P_{TOTAL} - G_{ATMUNG}$ “ besteht das Problem darin, dass das Genprodukt von G_{ATMUNG} ein Enzym der Atmungskette hemmt. Es schädigt somit nicht nur den Pilz, sondern auch die Pflanze. Pflanzenzellen, in denen dieses Genprodukt ständig gebildet wird (was beim Promotor P_{TOTAL} der Fall ist), sind somit gar nicht überlebensfähig. Das Genkonstrukt kann auf zweierlei Weise optimiert werden: (a) Man ersetzt G_{ATMUNG} durch das Gen G_{KP} oder $G_{CHITINASE}$. (b) Man ersetzt den Promotor von G_{ATMUNG} (P_{TOTAL}) durch P_{PILZ} . Die Pflanzenzellen würden somit nur dann absterben, wenn sie vom Pilz befallen sind. Dadurch verhindern sie eine Ausbreitung des Pilzes. Dieser Mechanismus wird auch als „hypersensitive Reaktion“ bezeichnet.

Weitergehende Informationen für Lehrpersonen zu einigen Promotoren und Genen

P_{BLATT}	Dieser Promotor in Verbindung mit einem Chitinase-Gen würde sich dazu eignen, bei einer Pflanze einen Rostpilzbefall zu verhindern. Rostpilze infizieren eine Pflanze unter anderem über die Blätter.
P_{TOTAL}	Man kennt heute mehrere Promotoren dieser Art. Der Vorteil ist, dass einige von ihnen gut untersucht sind und zu einer hohen Transkriptionsrate führen. Der Nachteil ist, dass das Protein auch in Zellen produziert wird, in denen es nicht benötigt wird. Dies stellt für die Pflanze möglicherweise eine zusätzliche Belastung dar und wird von den Konsumenten meistens nicht gewünscht.
P_{PILZ}	Ob heute bereits solche Promotoren in transgenen Pflanzen eingesetzt werden, entzieht sich unserer Kenntnis. Wichtig ist jedoch, dass diese Promotoren sehr schnell auf Pilzbefall reagieren und die Transkription des nachfolgenden Gens veranlassen. Auf Mykorrhiza-Befall sollten die Promotoren jedoch nicht reagieren, so dass die Transkription des nachfolgenden Gens ausbleibt.

G _{ANTIBIOT.}	<p>In der Öffentlichkeit bestehen Bedenken, dass Bakterien dieses Resistenzgen aus den gentechnisch veränderten Pflanzen aufnehmen und es hinter einen bakteriellen Promotor einbauen könnten. Die Bakterien könnten dann das dazugehörige Genprodukt produzieren und wären resistent gegenüber dem entsprechenden Antibiotikum. Problematisch wird es dann, wenn es sich bei diesen Bakterien um Krankheitserreger handelt. Dieser Vorgang, der sogenannte „horizontale Gentransfer“, ist sehr selten und konnte bis heute noch nicht unter natürlichen Bedingungen nachgewiesen werden.</p> <p>Sehr viel einfacher als eine Genübertragung von Pflanzen zu Bakterien erfolgt eine Genübertragung von einem Bakterium auf ein anderes. Da Antibiotikums-Resistenzgene ursprünglich aus Bakterien stammen, konnten diese Gene bereits seit Langem zwischen verschiedenen Bakterien ausgetauscht werden. Obwohl Antibiotikums-Resistenzgene den Bakterien im Boden keinen Überlebensvorteil bringen, so sind sie trotzdem in einigen von ihnen vorhanden. In 1 Gramm Erde kommen beispielsweise 10 000 Bakterien vor, die natürlicherweise unempfindlich gegenüber Ampicillin sind.</p>
G _{HERBIZID}	<p>Eine generelle Befürchtung ist, dass sich die gentechnisch veränderten Pflanzen mit Wildpflanzen auskreuzen und das Herbizid-Resistenzgen an letztere weitergeben könnten. Dann wären die Wildpflanzen mit dem entsprechenden Pflanzenvernichtungsmittel nicht mehr zu bekämpfen. Sie lassen sich aber trotzdem noch mit anderen Herbiziden bekämpfen. Im Fall von Weizen ist die Gefahr einer Auskreuzung mit Wildpflanzen für Mitteleuropa sehr gering. Die nächste wilde Verwandte von Weizen ist Aegilops. Aegilops kommt jedoch nördlich der Alpen nicht vor.</p>
G _{MANNOSE}	<p>Dieses Markergen wird zur Zeit als sehr wenig umweltschädigend eingestuft. Allerdings befinden sich zur Zeit noch keine Pflanzen auf dem Markt, in die dieses Markergen eingebaut wurde. Es ist insofern noch nicht so gut getestet wie z.B. ein Herbizid-Resistenzgen.</p>
G _{CHITINASE}	<p>In Verbindung mit dem P_{TOTAL}-Promotor würde die Chitinase in allen Zellen gebildet werden. Ob sich dies negativ auf symbiotische Pilze, wie z.B. Mykorrhizapilze, auswirkt, ist unseres Wissens noch nicht geklärt.</p>

Lösungen zu Aufgabe B

- a) Versuch A) ist notwendig, um sicher zu sein, dass das Genkonstrukt vollständig in das Erbgut der Embryozellen eingebaut wurde. Es kann nämlich passieren, dass nur ein Teil des Genkonstrukts, z.B. nur das Markergen, in das Erbgut integriert wird.
- b) Versuch B) ist notwendig, um sicher zu sein, dass das Pilzresistenzgen auch funktioniert und ein entsprechendes Genprodukt in Form eines Proteins gebildet wird. Hinweis für die Lehrperson: Durch Methylierung könnte das Gen z.B. inaktiviert werden.
- c) Eine Pilzinfektion ist notwendig, um sicher zu sein, dass das Genprodukt in den transgenen Pflanzen auch funktionsfähig ist und zu einem reduzierten Pilzbefall führt.
- d) Auf Markergene kann man nicht verzichten, da die Transformationsrate bei Kulturpflanzen zur Zeit noch relativ niedrig ist. Es wäre sehr arbeitsaufwändig, alle Pflanzen, die sich aus den zahlreichen beschossenen Embryonen entwickelt haben, auf das Vorhandensein des Pilzresistenzgens und des entsprechenden Proteins zu untersuchen.

Wenn man ganze Embryonen mit der Gen-Kanone beschiesst, kann man auf den Selektionsschritt mit Markergenen nicht verzichten. Dieser Selektionsschritt bewirkt, dass sich die neuen Pflanzen nur aus solchen Zellen entwickeln, die das Markergen auch wirklich aufgenommen haben. Entfällt dieser Selektionsschritt, bestehen die neuen Pflanzen sowohl aus gentechnisch veränderten als auch aus unveränderten Embryozellen. Es handelt sich somit um Chimären.

AUFGABE 4

Züchtung einer neuen Tomatensorte

Lernziele

Sie lernen

- den Ablauf der klassischen Züchtung und damit die Rückkreuzung kennen.
- einige Unterschiede der klassischen Züchtung im Vergleich zur Gentechnik kennen.

Hintergrundinformationen

Heutige Tomaten sind leider oft geschmacklos, da bei der Züchtung in den letzten Jahren mehr Wert auf Ertrag, Festigkeit und Krankheitsresistenz als auf Geschmack gelegt wurde. Das Ziel sollte jedoch sein, eine Tomate zu züchten, welche alle diese Eigenschaften in sich vereint. Ein Forschungsprojekt zu diesem Thema wurde an der University of California in Davis durchgeführt. Dort hat man herausgefunden, dass der Zuckergehalt einer Tomate neben vielen anderen Stoffen wesentlich zum guten Aroma beiträgt.

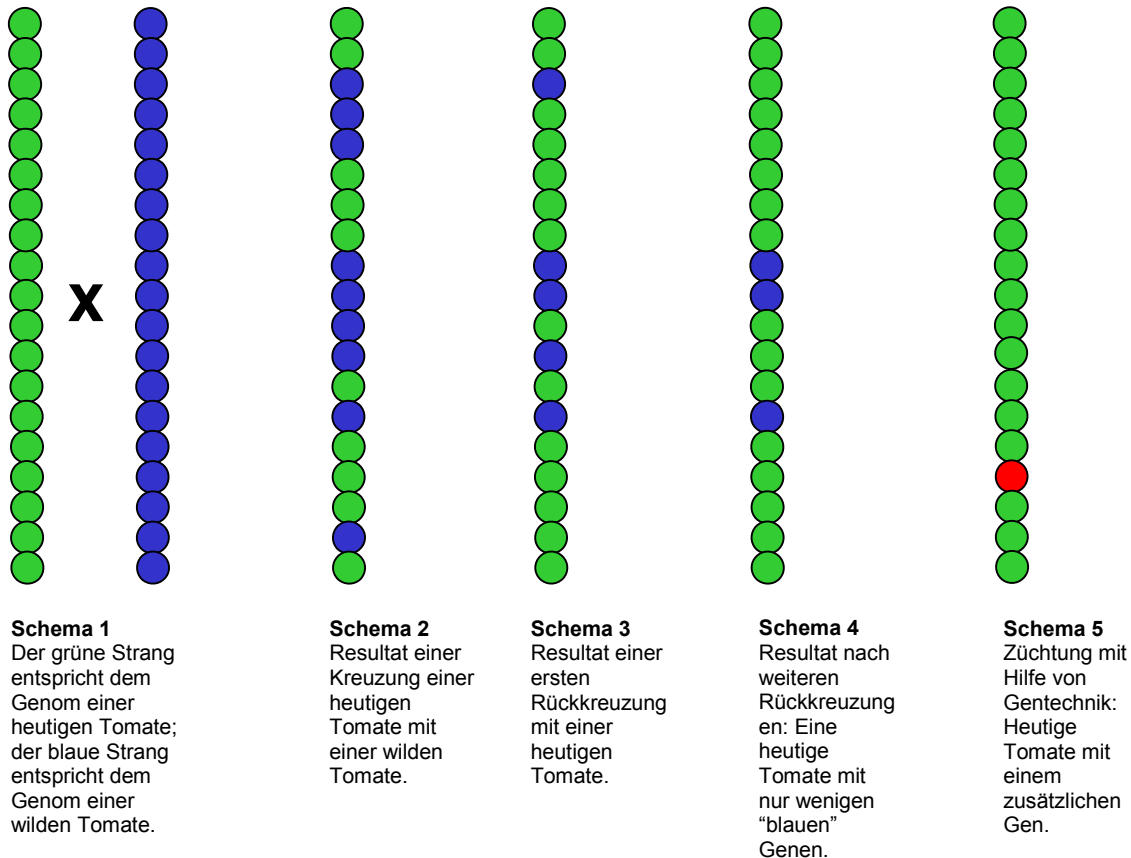
Klassische Züchtung

Um eine gängige Tomatensorte geschmacklich zu optimieren, wird sich ein klassischer Züchter für Kreuzungsexperimente eine wilde Tomatensorte suchen. Diese Wildpflanze ist wahrscheinlich nicht sehr ertragreich und enthält vielleicht sogar hohe Konzentrationen an Solanin, einem natürlichen Gift der Tomate, aber sie ist sehr süss (blauer Strang). Sie enthält also neben der gewünschten Eigenschaft (Süsse) auch viele unerwünschte Eigenschaften (Giftigkeit, wenig Ertrag, kleine Grösse). Das Ziel ist es, eine Tomate zu züchten, die möglichst alle Eigenschaften einer heutigen Tomate aufweist, aber zusätzlich so süss wie eine wilde Tomate ist. Um die Eigenschaften der beiden Tomatensorten zu mischen, muss eine Kreuzung zwischen der heutigen Tomate (grüner Strang) und der wilden Tomate (blauer Strang) durchgeführt werden (Schema 1). In unserem Modell, wird das Genom einer Tomatenpflanze als Strang von 20 grünen, resp. blauen, Perlen dargestellt.

Nach der Kreuzung ergeben sich genetisch verschiedene Tomatenpflanzen (der Grund dafür ist die Mischerbigkeit der Elternpflanzen). Alle enthalten jedoch in ihrer Erbsubstanz je zur Hälfte "grüne" und "blaue" Gene (Schema 2). Aus diesen Tomatenpflanzen wählt man jene mit den grössten, süssesten und solaninärmsten Früchten aus und verwendet sie zur weiteren Züchtung. Man führt mit ihnen eine sogenannte "Rückkreuzung" durch: Dabei werden die ausgewählten Nachkommen wieder mit der heutigen Tomatensorte gekreuzt. Durch die Rückkreuzung treten die Eigenschaften der heutigen Tomatensorte vermehrt in den Nachkommen auf (Schema 3). Das Resultat sind Tomaten, welche schon deutlich mehr "grüne" als "blaue" Gene enthalten und somit auch mehr einer heutigen Tomate ähneln. Im nächsten Schritt werden wieder möglichst grosse, süsse Tomaten ausgesucht und mit einer heutigen Tomatensorte gekreuzt. Durchschnittlich nach 6 – 8 Zyklen erhält man so die gewünschte Tomate, welche nur noch einige wenige "blaue" Gene enthält (Schema 4). Eines (oder ev. mehrere) davon ist für den guten Geschmack, die Süsse, der Tomate verantwortlich. Ob weitere "blaue" Gene vorhanden sind und welche Funktion diese Gene haben, ist nicht bekannt. Das Resultat ist eine grosse, rote Tomate mit gutem Ertrag und gutem Geschmack!

Gentechnik

Bei der Gentechnik wählt man einen anderen Ansatz. Zuerst wird untersucht, welches Gen für die Süsse verantwortlich ist. Da der genetische Code universell ist, also alle Gene in derselben "Sprache" geschrieben sind, spielt es keine Rolle, in welchem Organismus ein solches Gen gefunden wird. Das zuständige Gen wird isoliert und mit Hilfe der Gentechnik in eine heutige Tomate eingebracht. Das Resultat ist eine heutige Tomate mit einem zusätzlichen, z.B. einem "roten" Gen (Schema 5). Wo im grünen Strang sich dieses Gen befindetet, lässt sich nicht beeinflussen.



Aufgabe

Beantworten Sie die Fragen zu den unterschiedlichen Ergebnissen der Züchtungen.

1. Welche Züchtungsmethode (klassische Züchtung oder Gentechnik) führt schneller zum Ziel? Welche Schritte im Züchtungsprozess wirken sich am stärksten auf die benötigte Zeit aus?
2. Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich Pflanzen entwickeln, die mit klassischen Methoden nicht machbar sind. Nennen Sie zwei Gründe für diesen Unterschied.
3. Bei beiden Züchtungsmethoden (Gentechnik und klassische Züchtung) können unter Umständen auch giftige Pflanzen entstehen. Beschreiben Sie in beiden Fällen, wie es hierzu kommen kann. Bei welcher Methode ist die Gefahr grösser? Wie lässt sich die Gefahr reduzieren, dass Neuzüchtungen, die verstärkt Giftstoffe bilden, versehentlich auf den Markt kommen?

Hinweise für Lehrpersonen

Vorwissen

- mendelsche Gesetze
- Zusammenhang Gen-Phänotyp
- bekannte Begriffe: Mutation, Gen

Antworten

1. Man kann nicht eindeutig beurteilen, welche Züchtungsmethode schneller zum Ziel führt.

Bei der klassischen Züchtung sind folgende Schritte sehr zeitintensiv:

- Es müssen zahlreiche Kreuzungen durchgeführt werden, um eine Pflanze mit den gewünschten Eigenschaften zu erhalten.
- Wenn in der Wildpflanze das Gen, welches für die gewünschte positive Eigenschaft codiert, direkt neben einem Gen liegt, das für eine negative Eigenschaft codiert, dann lassen sich diese Gene durch Kreuzungen kaum voneinander trennen. Dies war bei der beschriebenen Züchtung an der University of California in Davis leider der Fall: Nach etlichen Rückkreuzungen erhielt man zwar grosse, aromatische Früchte, doch immer nur einige wenige pro Pflanze. Dieser tiefe Ertrag konnte auch in weiteren Rückkreuzungen nicht verbessert werden.
- Manchmal findet man keine Wildpflanze, welche die gesuchte positive Eigenschaft hat und gleichzeitig mit der Kulturpflanze kreuzbar ist. Es müssen aus einer solchen Kreuzung auf jeden Fall fortpflanzungsfähige Nachkommen hervorgehen. Dies ist meist nur bei verwandten Arten möglich.

Bei der gentechnischen Züchtung sind folgende Schritte sehr zeitintensiv:

- Ein Gen, das für die gewünschte Eigenschaft codiert, muss zuerst gefunden und isoliert werden.
 - Die transgenen Pflanzen müssen zahlreiche Sicherheitstests durchlaufen.
 - Für den Gentransfer verwendet man oftmals nicht die gängigen Sorten, sondern solche, die sich für die Transformation sowie die Regeneration gut eignen. Hat man eine transgene Pflanze hergestellt, so muss man diese mit den gängigen Sorten kreuzen, um das interessierende Gen in letztere einzubringen.
2. Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich Gene in eine Kulturpflanze einschleusen, die von völlig anderen Lebewesen stammen, mit welchen die Kulturpflanze weder verwandt noch kreuzbar ist.
Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich einzelne Gene übertragen. Wenn in einer Wildpflanze ein positives und ein negatives Gen dicht beieinander liegen, so kann man das positive Gen allein isolieren und es anschließend in die Kulturpflanze übertragen.
 3. Pflanzen mit einer erhöhten Konzentration an Giftstoffen können in der klassischen Züchtung dadurch entstehen,
 - dass der Kreuzungspartner in Form einer Wildpflanze entsprechende Gene besitzt, die zur Bildung von Giftstoffen führen.

- dass inaktive Gene, welche für Giftstoffe codieren, z.B. durch crossing-over aktiviert werden.

Pflanzen mit einer erhöhten Konzentration an Giftstoffen können in der gentechnischen Züchtung dadurch entstehen,

- dass das neue Gen, welches in die Kulturpflanze eingebaut wurde, ein Genprodukt bildet, welches auch andere Stoffwechselwege beeinflusst.
- dass das neue Gen an einer Stelle im Genom der Kulturpflanze eingebaut wurde, an der es ein anderes Gen aktiviert bzw. inaktiviert. Dieses andere Gen kann z.B. für die Bildung eines Giftstoffes codieren oder aber für einen Inhibitor in einem Giftstoff-Syntheseweg.

Man kann nicht sagen, bei welcher Züchtungsmethode die Gefahr größer ist. So gab es auch schon mit der klassischen Züchtungsmethode unerwartet Zwischenfälle: 1970 musste beispielsweise eine Kartoffelsorte vom Markt genommen werden, deren Knollen sehr hohe Alkaloidgehalte (Solanin) aufwiesen. Diese sind jedoch selten.

Im Vergleich zu klassisch gezüchteten neuen Sorten werden gentechnisch veränderte Pflanzen besonders gründlich untersucht, bevor sie angebaut und verkauft werden. Fütterungsstudien können einen Hinweis darauf geben, ob möglicherweise Giftstoffe in höheren Konzentrationen in den Pflanzen enthalten sind. Falls man bereits Giftstoffe kennt, die z.B. in verwandten Pflanzen der neu gezüchteten Kulturpflanze auftreten, so kann man die Kulturpflanze auch direkt auf das Vorkommen dieser Giftstoffe untersuchen.

Lehrerpräsentation

Mit Hilfe zweier ca. 1 m langer Stränge pop-it beads (zusammenhängende, farbige Plastikperlen von ca. 1 cm Durchmesser) in zwei verschiedenen Farben kann die klassische Züchtung mit der Züchtung durch Gentechnik verglichen werden. Jeder Strang symbolisiert das Genom einer Pflanze, jede Kugel ein Gen. Höhere Pflanzen enthalten etwa 30'000 Gene. In Wirklichkeit müsste so ein Strang also 300 m lang sein! Dabei wird zur Vereinfachung nicht zwischen haploid und diploid unterschieden – jedes Genom wird durch einen einzelnen Strang dargestellt.

Als billigere Alternative können auch farbige Büroklammern verwendet werden.

Quelle

Pop-it beads können bei der Carolina Biological Supply Company für ca. US\$ 80 bestellt werden (Set Katalog Nr. WW 171112 V0208D). Tipp: Sie können nur in relativ grossen Mengen bestellt werden. Diese reichen für mehrere Gruppen auch für das "Sequenzieren mit pop-it beads".

Carolina Biological Supply Company

2700 York Road

Burlington

NC 27215-3398

Tel.: 800-224-551

Fax: 336-584-3399

<http://www.carolina.com/>