

„Gentherapie“ bei Pflanzen oder Analyse von Mutanten in biochemischen Reaktionsketten.



Abb. 1: Levkoje (Matthiola)
<http://www.blumeninschwaben.de>

Hintergrundinformationen

In vielen Fällen resultiert ein Phänotyp aus der Unterbrechung einer biochemischen Reaktionskette. Das Fehlen verschiedener Enzyme in einer Kette (d.h. verschiedene Mutationen) kann deshalb zum selben Phänotyp führen, der bei den verschiedenen Mutanten nur durch das Fehlen des Endprodukts zum Ausdruck kommt.

Ein Beispiel ist die Blutgerinnung bei der letztlich ein Polymer aus Fibrin entsteht, das den Thrombus, das feste Blutgerinnsel bildet, welches eine Wunde verschließt. Zur Bildung von Fibrin ist aber eine lange Kaskade von Enzymen erforderlich (Blutgerinnungsfaktoren), bei denen einer den nächsten aktiviert. Fehlt einer dieser Faktoren oder ist durch eine Mutation nicht funktionsfähig, so ist die Blutgerinnung gestört. Die betroffene Person ist „Bluter“. Therapeutisch kann das Fehlen eines Blutgerinnungsfaktors (meist Faktor VIII oder Faktor IX) durch Verabreichung (Spritzen) des Proteins kompensiert werden. Dazu werden heute rekombinante (gentechnisch hergestellte) Blutgerinnungsfaktoren verwendet. In diesem Fall wird eine biochemische Wirkkette durch ein fehlendes Enzym (Genprodukt) „repariert“.

In anderen Fällen wird nicht ein fehlendes Enzym als Therapeutikum verwendet, sondern das Produkt dieses Enzyms. Ein natürliches Beispiel ist das Fehlen des Enzyms L-Galactonolacton-Oxidase beim Menschen. Dieser Mangel muss durch die Zufuhr von Ascorbinsäure (Vitamin C) kompensiert werden. Schweine besitzen das Gen für L-Galactonolacton-Oxidase und produzieren selbst Ascorbinsäure.

Die vielleicht bekannteste Gen-Wirkkette ist die Synthese von Arginin im Brotschimmel *Neurospora crassa*. George Wells Beadle und Edward Lawrie Tatum klärten in der Ein-Gen-ein-Enzym Hypothese den Syntheseweg mit den beteiligten Enzymen und Zwischenprodukten auf. Sie erhielten dafür 1958 den Nobelpreis (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1958/).

Experiment

Das hier im Experiment verwendete Beispiel ist die unten dargestellte Anthocyan synthese, die bei Levkojen und anderen Pflanzen zur Rotfärbung führt. Das Schema in Abb. 2 zeigt bereits drei essentielle Enzyme, die für die Produktion von Anthocyan erforderlich sind. Der Funktionsverlust jedes einzelnen dieser Enzyme führt zu weißen Blüten.

Der genetische Defekt kann kompensiert werden, wenn die Pflanze mit dem Produkt des fehlenden Enzyms versorgt wird.

Sie erhalten in diesem praktisch sehr einfachen Experiment Blütenstände von drei verschiedenen Levkojen, die in unterschiedlichen Genen mutiert und deshalb weiß sind (Stamm 17, 18, 19). Weiterhin erhalten Sie eine 0,05%ige Dihydroquercetin-Lösung (Taxifolin).

Pipettieren Sie je 400µL der Lösung in ein 500µl PCR-Eppendorfgefäß

Schneiden Sie je eine Blüte von den mutanten Stämmen möglichst tief ab und stellen sie in die beschrifteten Eppendorfgefäße. Achten Sie darauf, dass der Stiel möglichst tief in das Gefäß eintaucht.

Notieren Sie die Uhrzeit und protokollieren Sie alle 2 Stunden und nach Inkubation über Nacht Ihre Beobachtungen.

Beginnen Sie das Experiment möglichst früh am Tag. Bevor Sie abends das Labor verlassen, füllen Sie die Gefäße noch einmal mit Wasser auf.

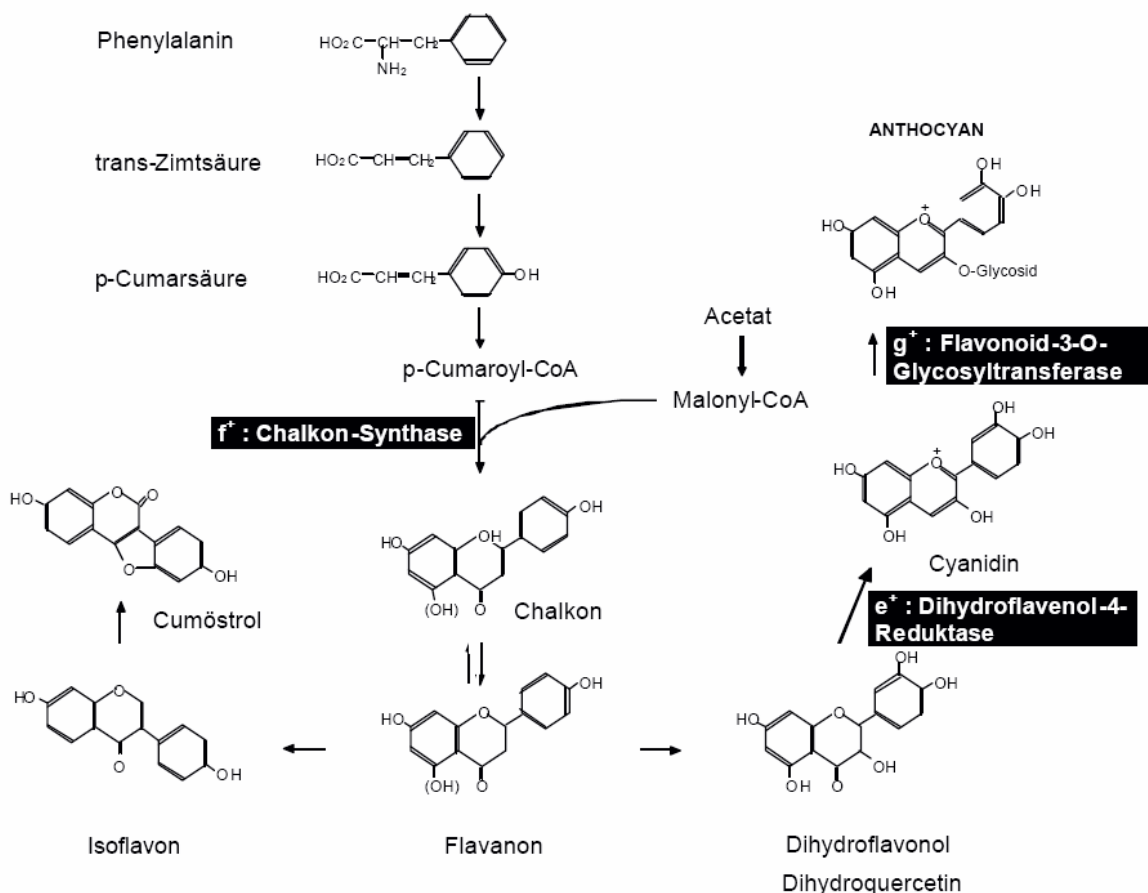


Abb. 2: Biochemischer Syntheseweg zur Anthocyanproduktion.

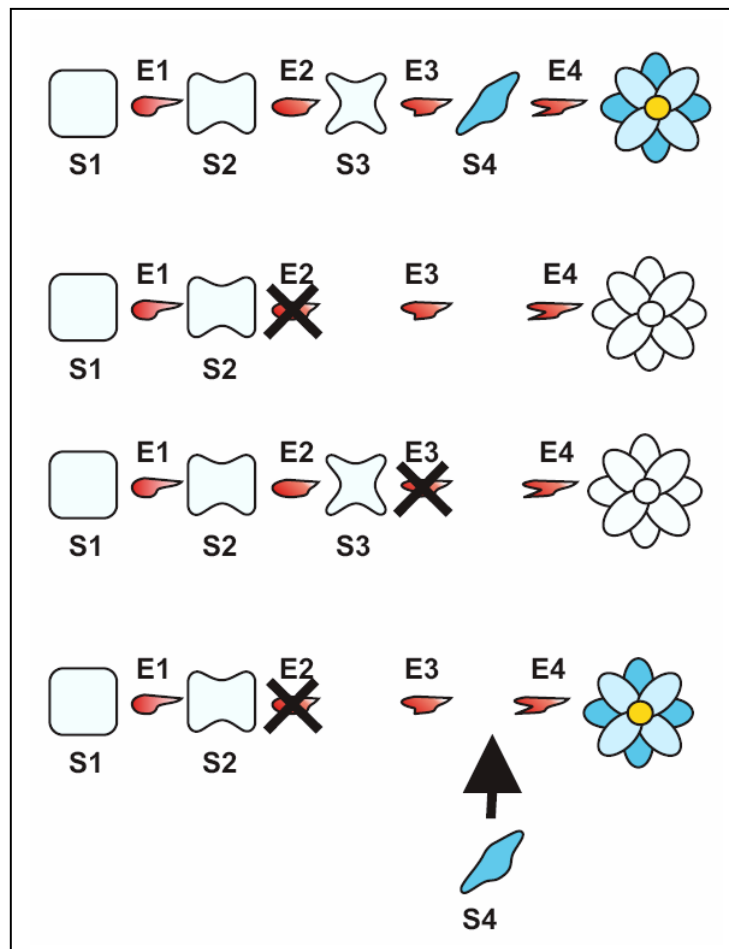


Abb. 3: Vereinfachte Form eines biochemischen Synthesewegs: die Enzyme E1 bis E4 verwandeln das Substrat S1 in S2 und weiter bis zum blauen Blütenfarbstoff, der durch E4 in die Blüte gebracht wird. Der Ausfall von E2 führt ebenso zum Verlust der Blütenfarbe wie der Ausfall von E3. In beiden Fällen kann durch Zugabe von S4 die Blütenfarbe wiederhergestellt werden.

Literatur:

R. A. Zufall and M. D. Rausher: The Genetic Basis of a Flower Color Polymorphism in the Common Morning Glory (*Ipomoea purpurea*). Journal of Heredity 2003: 94:442-448

<http://jhered.oxfordjournals.org/cgi/content/full/94/6/442>

Die Idee zu diesem Experiment, Abb. 2 und die Levkojenstämme wurden freundlicherweise von Prof. K Sperling, Charité, FU Berlin, zur Verfügung gestellt.

Materialien:

Die Anzucht der Levkojen dauert drei Monate. Eine rechtzeitige Anmeldung ist erforderlich, um blühende Exemplare zu erhalten. Bei kurzfristigen Anfragen können möglicherweise auch kleine Mengen für Demonstrationsversuche zur Verfügung gestellt werden.

Für Demonstrationsversuche empfehlen wir jeweils einen halben Blütenstand in einem 2ml Eppendorfgefäß mit 1,5ml Taxifolin anzusetzen. Die Kosten für drei Pflanzen und 5ml Taxifolin (0,05%) belaufen sich auf **10€**.

Für ein Klassenexperiment (10 Gruppen) werden Einzelblüten in 0,5ml Eppendorf PCR Röhrchen verwendet. Die Kosten für 7,5ml Taxifolin (0,1%) und jeweils 1 bis 2 blühende Pflanzen pro Stamm belaufen sich auf **25€**.

Gruppen können auch unterschiedliche Taxifolinkonzentrationen ansetzen und verwenden (0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,01%).

Die Materialien können nach Rücksprache abgeholt werden. Bei Postversand (nicht zu empfehlen!) kommen entsprechende Kosten hinzu.

MW Taxifolin (Dihydroquercitin): 304,24 g/mol,
löslich in EtOH,
in Wasser ca. 0,1%

Das Experiment kann vermutlich auch mit dem Flavanon Naringenin (MW: 272,26 g/mol) durchgeführt werden. Die Löslichkeit in Wasser ist jedoch sehr gering. Die Verwendung von Naringenin wird zurzeit noch getestet.

Bezugsquelle: Serva



Arbeitsblatt

Die folgenden Fragen können, abhängig von den Themenschwerpunkten im Unterricht, so oder ähnlich eingesetzt werden. Molekulargewichte von Taxifolin und Naringenin können angegeben werden oder als Aufgabe im Internet recherchiert werden.

1. Welche Molarität hat die 0,05%ige Dihydroquercitin (Taxifolin) - Lösung?
2. Sind die Stämme 17, 18 und 19 nach Ihrer Ansicht homozygot oder heterozygot für die jeweilige Mutation? Begründen Sie Ihre Annahme.
3. In welchen Genen der im Schema angegebenen Gene (f, e, g) des Anthocyan synthesewegs können die Stämme 17, 18 und 19 mutiert sein, in welchen nicht?
4. Welche Nachkommen (Genotyp und Phänotyp) erwarten Sie, wenn Sie eine homozygote f⁻ Pflanze mit einer homozygoten g⁻ Pflanze kreuzen? Begründen Sie Ihre Erwartung.
5. Was erwarten Sie in der F2 Generation, wenn Sie die F1 Generation kreuzen? (nehmen Sie an, dass die Merkmale ungekoppelt vererbt werden). Geben Sie die Genotypen und Phänotypen an (Punnett-Square).
6. Können Sie die weißen Phänotypen der F2 Generation experimentell bestimmten Genotypen zuordnen?
7. Nennen Sie genetisch bedingte Erkrankungen des Menschen, bei denen auf ähnliche Weise Mängel in biochemischen Reaktionsketten kompensiert werden.

