

- [1] J. C. Phillips, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 2090–2091.
[2] Magische Zahlen sind nach einem Vorschlag von Bondybey nur für Systeme zulässig, die unter thermodynamisch gesteuerten Reaktionsbedingungen entstanden sind.
[3] K. Raghavachari, C. McMichael Rohlfsing, *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2219–2234.
[4] Rechnungen mit der Tight-Binding-Methode: D. Tomanek, M. A. Schlüter, *Phys. Rev. B* **1987**, *36*, 1208; *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 1055.
[5] G. A. Thompson, F. Tischler, D. M. Lindsay, *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 5946.
[6] a) J. C. Phillips, *Bonds and Bands in Semiconductors*, Academic Press, New York, **1973**; b) M. T. Yin, M. L. Cohen, *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45*, 1004.
[7] a) Y. Liu, Q. L. Zhang, F. K. Tittel, R. F. Curl, R. E. Smalley, *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 7434; b) Q. L. Zhang, Y. Liu, R. F. Curl, F. K. Tittel, R. E. Smalley, *ibid.* **1988**, *88*, 1670.
[8] J. L. Elkind, J. M. Alford, F. D. Weiss, R. T. Laaksonen, R. E. Smalley, *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 2397.
[9] H. Kupka, K. Jug, *Chem. Phys.* **1989**, *130*, 23.
[10] J. R. Chelikowsky, J. C. Phillips, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *63*, 1653.
[11] J. C. Phillips, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 3330.
[12] Siehe die Highlights in dieser Zeitschrift: J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 73; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *31*, 70; F. Diederich, *ibid.* **1991**, *103*, 695 bzw. **1991**, *30*, 678.
[13] D. A. Jelski, Z. C. Wu, T. F. George, *J. Cluster Sci.* **1990**, *1*, 143.
- [14] W. D. Reents, M. L. Mandich, V. E. Bondybey, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *131*, 1; b) M. L. Mandich, V. E. Bondybey, W. D. Reents, *J. Chem. Phys.* **1987**, *96*, 4245; c) W. D. Reents, A. M. Muisce, V. E. Bondybey, M. L. Mandich, *ibid.* **1987**, *86*, 5568.
[15] M. L. Mandich, W. D. Reents, V. E. Bondybey, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 2315.
[16] a) M. F. Jarrold, J. E. Bower, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1979; b) K. M. Creegan, M. F. Jarrold, *ibid.* **1990**, *112*, 3768.
[17] a) Y. Kabe, M. Kuroda, Y. Honda, O. Yamashita, T. Kawase, S. Masamune, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1793; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1725; b) siehe auch die Übersicht: T. Tsumuraya, S. A. Batcheller, S. Masamune, *ibid.* **1991**, *103*, 916 bzw. **1991**, *30*, 902; c) M. Weidenbruch, F. T. Grimm, S. Pohl, W. Saak, *ibid.* **1989**, *101*, 201 bzw. **1989**, *28*, 198.
[18] A. Sekiguchi, C. Kabuto, H. Sakurai, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 97; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 55.
[19] Im Vergleich zu ihren C-Analoga besitzen diese Silicium-Clusterverbindungen erheblich geringere Spannungsenergien: S. Nagase, T. Kudo, M. Aoki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 1121.
[20] a) Erste experimentelle Hinweise: H. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* **1985**, *318*, 162; siehe auch den Aufsatz von H. Kroto in diesem Heft. Beschreibung der Isolierung makroskopischer Mengen; b) W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, D. R. Hufman, *ibid.* **1990**, *347*, 354; siehe auch die Zuschrift von M. Jansen et al. in diesem Heft.

Inhibierung der Fruchtreifung durch Antisense-RNA-Technologie

Von Peter Eckes*

Ziel der Pflanzenzüchtung ist es, die Qualität von Pflanzen oder pflanzlichen Produkten zu verbessern. Zu den Qualitätskriterien zählen unter anderem die Resistenz der Pflanzen gegen Pflanzenschädlinge, der Ernteetrag und der Geschmack der pflanzlichen Produkte. Die Qualitätsmerkmale einer Pflanze werden hauptsächlich durch ihr Erbgut bestimmt. Demzufolge versucht der Pflanzenzüchter durch Veränderung des Erbgutes einer Pflanze, neue Eigenschaften zu erzeugen. Dies geschieht bisher meist durch Kreuzung mit anderen Sorten oder nahe verwandten Spezies und anschließender Selektion des gewünschten Merkmals. Dies ist ein mühsamer und langwieriger Prozeß, da durch das Vermischen der gesamten Erbinformation zweier Pflanzenarten natürlich auch nicht erwünschte Eigenschaften auf die zu verbessernde Pflanze übertragen werden. Die unerwünschten Eigenschaften müssen dann durch erneute Kreuzungen mit der Mutterpflanze wieder entfernt werden. Deshalb wäre es vorteilhaft, wenn diese Qualitätsverbesserungen gezielter durchgeführt werden könnten.

Hier bietet die Molekularbiologie neue Perspektiven: So führt die Einschleusung spezifischer Gene in das pflanzliche Genom zu Pflanzen, die neue Merkmale aufweisen, beispielsweise die Herbizidtoleranz oder den Schutz gegen Insektenbefall. Ebenso ist denkbar, die Pflanze durch gezielte Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Stoffwechselwege mit neuen Qualitätseigenschaften zu versehen.

Eine molekularbiologische Methode, die zur Verhinderung der Expression spezifischer Gene führen kann, ist die sogenannte Antisense-RNA-Technologie. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bildung einer Antisense-Ribonu-

cleinsäure (Antisense-RNA) in einem Organismus. Diese Antisense-RNA ist komplementär zur RNA des zu inhibierenden Proteins (Sense-RNA), wodurch die Translation dieser RNA zum Protein blockiert und damit die Ausprägung einer bestimmten Eigenschaft verhindert wird (Abb. 1).

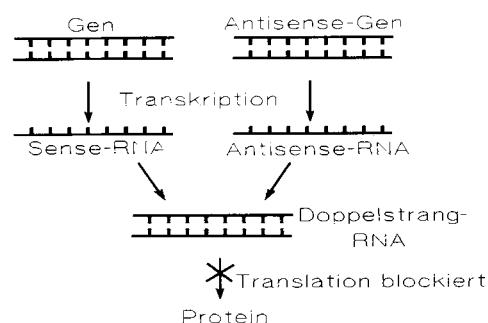


Abb. 1. Modell der Inaktivierung einer Eigenschaft durch Antisense-Wirkung.

Es gibt prinzipiell zwei Methoden, Antisense-RNA in die Zelle einzuführen. Einerseits wird im medizinischen Bereich versucht, kurze, zur Ziel-RNA komplementäre Oligonucleotide direkt in eukaryontische Zellen zu schleusen^[1], andererseits versucht man, speziell in Pflanzen, ein Antisense-Gen in das Genom einzubauen, von dem dann die Antisense-RNA abgelesen wird. Bei der Oligonucleotidmethode ist das zielgerichtete Verabreichen ausreichender Mengen und die Instabilität der Nucleotide in der Zelle sehr problematisch. Die Methode des Einbaus von Antisense-Genen in das Genom birgt, zumindest beim Menschen, neben rein technischen auch ethische Probleme. Sie ist aber im Bereich der Pflanzen durchaus erstrebenswert und wird auch praktiziert.

[*] Dr. Peter Eckes
Biologische Forschung C, H 872
Hoechst AG
W-6230 Frankfurt 80

Die Regulation der Genexpression durch Antisense-RNA ist ein Vorgang, der auch in der Natur in Prokaryonten vorkommt^[2]. In dem Bakterium *Escherichia coli* wird z.B. die Replikation von Plasmiden durch Interaktion von Sense- und Antisense-RNA kontrolliert.

Der erste Beweis, daß das Antisense-RNA-Prinzip zur Inaktivierung der Genexpression auch bei Eukaryonten eingesetzt werden kann, wurde 1984 erbracht. Izant und Weintraub^[3] konnten zeigen, daß die Expression eines Thymidinkinase-Gens, das in kultivierten Mäusezellen injiziert worden war, signifikant reduziert wurde, wenn ein Plasmid, das die Antisense-RNA des gleichen Gens produzierte, mit injiziert wurde. Diese Experimente führten zu der Idee, durch Antisense-RNA die Ausprägung natürlich vorkommender Gene in höheren Organismen zu unterbinden und damit den Phänotyp (Erscheinungsbild) des Organismus zu ändern.

Für Pflanzen wurde dies erstmals im Jahre 1988 publiziert^[4]. In einer Petunie wurde das Chalcon-Synthase-Gen, dessen Genprodukt an der Bildung der Blütenpigmente wesentlich beteiligt ist, durch Einschleusen eines Chalcon-Synthase-Antisense-Gens ausgeschaltet. Daraus resultierten Petunienpflanzen, die, entsprechend dem Grad der Geninaktivierung, unterschiedlich starke Verluste der Blütenpigmentierung aufweisen (Abb. 2).

Einer amerikanischen Arbeitsgruppe ist es kürzlich gelungen, den Reifungsprozeß von Tomatenfrüchten mit der Antisense-RNA-Technologie zu unterdrücken^[5]. Der Reifezustand ist ein wichtiges Kriterium für die Lager- und Transportfähigkeit von Früchten wie Bananen, Pfirsichen, Orangen oder Tomaten. Diese Früchte werden im unreifen Zustand geerntet, reifen während des Transportes und müssen dann sofort an den Endverbraucher weitergegeben werden. Längere Transportzeiten oder ungenügende Kühlung führen dazu, daß die Früchte erst im überreifen oder gar angefaulten Zustand zum Händler kommen und dann nicht mehr verkauft werden können. Speziell in wärmeren Klimaten resultieren daraus große Ernteverluste.

Der Reifungsprozeß der Tomate wird durch den Signalstoff Ethylen induziert. Ethylen wird über mehrere Zwischenprodukte in der Pflanze aus Methionin gebildet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ethylenbiosynthese wird von dem Enzym Aminocyclopropancarbonsäure-Synthase (ACC-Synthase) katalysiert. Dabei wird S-Adenosylmethionin in 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure, den direkten Vorläufer des Ethylen, umgewandelt. Der amerikanischen Arbeitsgruppe gelang es, die Bildung der ACC-Synthase in transgenen Tomatenpflanzen spezifisch zu inhibieren, so daß der Anteil an Ethylen in den Früchten um 99.5% reduziert wurde und damit die Reifung ausblieb.

Bei ihren Versuchen gingen die Autoren folgendermaßen vor: Ein isoliertes ACC-Synthase-Gen aus Tomaten wurde als cDNA in invertierter Orientierung unter die Kontrolle eines in Pflanzen konstitutiv wirkenden Promotors (35S-Transkript-Promotor des Blumenkohlmosaik-Virus) gebracht. Dieses Konstrukt wurde mit molekulärbiologischen Methoden in das Genom von Tomatenpflanzen integriert und sollte die ACC-Synthase-Antisense-RNA exprimieren.

Von dreißig so produzierten transgenen Pflanzen zeigten drei eine starke Reduktion der C₂H₄-Synthese und eine Verzögerung der Fruchtreife. Molekulärbiologische Analysen wurden an homozygoten (mit gleichen Erbanlagen versehenen) Nachkommen derjenigen Pflanze durchgeführt,

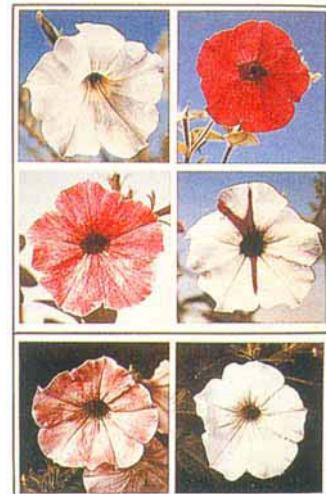


Abb. 2. Blüten von Petunienpflanzen mit unterschiedlichem Grad der Inaktivierung der Synthese der Chalcon-Synthase durch Antisense-RNA [7].

die die stärkste Inhibition der C₂H₄-Synthese aufwies. DNA-Untersuchungen mit der sogenannten Southern-Blot-Methode zeigten, daß im Genom dieser transgenen Pflanzen zehn Kopien des ACC-Synthase-Antisense-Gens integriert waren. Vom natürlich vorkommenden ACC-Synthase-Gen war bekannt, daß es nur einmal im Genom vorliegt. Wie erwartet produzierten die transgenen Früchte, im Gegensatz zu Früchten von nichttransgenen Kontrollpflanzen, ACC-Synthase-Antisense-RNA. Die entsprechende Sense-RNA konnte in transgenen Tomaten, wiederum verglichen mit Kontrollpflanzen, nur noch in äußerst geringen Mengen detektiert werden. Die RNA eines Polygalacturonase-Gens, dessen Genprodukt ebenfalls an der Fruchtreifung beteiligt ist, wurde nicht beeinflußt.

Die Ethylenproduktion in Tomatenfrüchten beginnt 48 bis 50 Tage nach der Befruchtung, nach weiteren zehn Tagen sind die Früchte rot und ausgereift. In den Früchten mit Antisense-RNA war die C₂H₄-Synthese um 99.5% reduziert und selbst 120 Tage nach Befruchtung waren diese noch nicht gereift. Der Reifungsprozeß der transgenen Früchte konnte durch mehrtägiges Begasen mit Ethylen oder Propylen (je 10 µl pro L Luft) ausgelöst werden. Ein- oder zweitägiges Begasen führte nicht zu diesem Ergebnis. Nach sieben-tägigem Begasen waren die Früchte rot und weich und hatten ihr natürliches Aroma entwickelt. Expression der Antisense-RNA und Inhibition der Sense-RNA wurde durch die Begasung nicht beeinflußt. Die Umkehrung der Antisense-Wirkung durch Begasen mit C₂H₄ zeigt, daß Ethylen ein Auslöser der Fruchtreife ist und nicht nur ein Beiprodukt.

Die vorliegenden Experimente sind ein Beispiel, wie die Synthese eines Stoffwechselproduktes in Pflanzen durch die Antisense-RNA-Technologie effizient blockiert werden kann. Aufgrund der sehr geringen Halbwertszeit von ca. 25 Minuten eignet sich die ACC-Synthase gut für diese Methode, da ständig neues Enzym nachproduziert werden muß. Inhibition der Translation (Proteinbiosynthese) führt dann sehr schnell zu einem Mangel an Enzym.

Eine mit der Ethylenproduktion in Tomaten vergleichbare Inhibition gelang Hamilton et al.^[6] durch Inhibition der Synthese der ACC-Oxidase, dem Enzym, das ACC in Ethylen umwandelt. Dies wurde ebenfalls durch Antisense-RNA-

Technologie erreicht. Die Möglichkeit, die durch Antisense-RNA verhinderte Fruchtreifung durch Begasen der Früchte mit Ethylen wieder zu aktivieren, macht gerade dieses System kommerziell attraktiv. Da nun der genaue Zeitpunkt der Fruchtreife bestimmt werden kann, werden die Verluste durch Verfaulen der Früchte aufgrund langer Transportzeiten oder mangelhafter Kühlung reduziert.

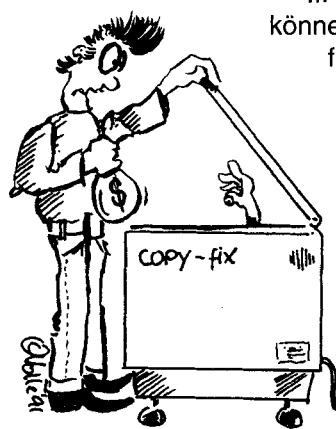
Die Antisense-RNA-Technologie ist zum Ausschalten ungewünschter Genaktivitäten theoretisch breit anwendbar, und entsprechende Versuche werden demzufolge auch in vielen molekularbiologischen Arbeitsgebieten durchgeführt. So wird beispielsweise versucht, die Gene human- oder pflanzenpathogener Viren durch entsprechende Antisense-Moleküle zu blockieren, um so eine Ausbreitung des Virus zu verhindern; Antisense-Moleküle könnten ebenfalls zum Abschalten von Onkogenen führen und damit für die Krebstherapie relevant sein. Diese Versuche sind allerdings noch lange nicht kommerziell anwendbar, da der Grad der Wirksamkeit noch nicht ausreichend vorhersagbar ist. Damit ist ein allgemeines Problem der Antisense-Technologie verbunden, nämlich daß der Mechanismus in höheren Organismen noch ziemlich unverstanden ist. Die gängige Vorstellung ist, daß die Sense-RNA an die komplementäre Antisense-RNA bindet und daß das entstehende doppelsträngige Molekül sehr schnell durch Nuklease abgebaut wird. Anders als

in bakteriellen Systemen konnte bisher jedoch nicht die Existenz einer Doppelstrang-RNA aus Sense- und Antisense-RNA eindeutig nachgewiesen werden. Neuerdings hat man entdeckt, daß nach Einschleusen von zusätzlichen Sense-Genen in das Genom von Pflanzen ebenfalls eine Inaktivierung der Genexpression, beobachtet werden kann, so daß das gesuchte Prinzip der Antisense-Wirkung noch komplexer wird.

Trotzdem zeigt das Beispiel der Inhibition der Fruchtreife mit der Antisense-RNA-Technologie, daß Prinzipien, die in der Natur gefunden werden (z.B. Kontrolle der Plasmidreplikation durch Antisense-RNA in Bakterien), nach Modifikation durch molekularbiologische Methoden auf andere Systeme (z.B. Pflanzen) übertragen werden und zu einer Verbesserung von Qualitätseigenschaften führen können.

- [1] U. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613.
- [2] P. J. Green, O. Pines, M. Inouye, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 569.
- [3] J. G. Izant, H. Weintraub, *Cell* **1984**, *36*, 1007.
- [4] A. R. van der Krol, P. E. Lenting, J. Veenstra, I. M. van der Meer, R. E. Koes, A. G. M. Gerats, J. N. M. Mol, A. R. Stuitje, *Nature* **1988**, *333*, 866.
- [5] P. W. Oeller, L. M. Wong, L. P. Taylor, D. A. Pike, A. Theologis, *Science* **1991**, *254*, 437.
- [6] A. J. Hamilton, G. W. Lycett, D. Grierson, *Nature* **1990**, *346*, 284.
- [7] A. R. van der Krol, L. A. Mur, P. de Lange, J. M. N. Mol, A. R. Stuitje, *Plant Mol. Biol.* **1990**, *14*, 457.

Nur Kopieren ist teurer...



... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für zehn Mark und ein paar Zerquetschte jeden Monat druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als acht Pfennige pro Seite!

Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Schork an (Tel. 0 62 01 / 6 06 - 1 99) oder schicken ihr ein Fax (0 62 01 / 6 06 - 1 84). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:

VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 6940 Weinheim

