Gezielte Übertragung minimierter Transgensequenzen mit optimierter Funktion

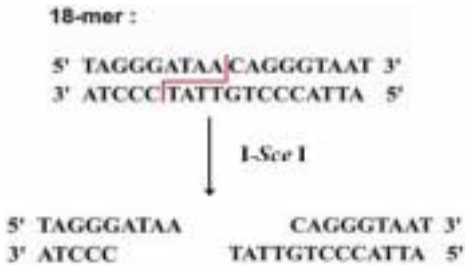
Gezielter Einbau von Genen an bestimmten Stellen im Pflanzengenom

Dipl.-Biol. Michael Pacher, Dr. Dorit Zeuske, Prof. Dr. Holger Puchta

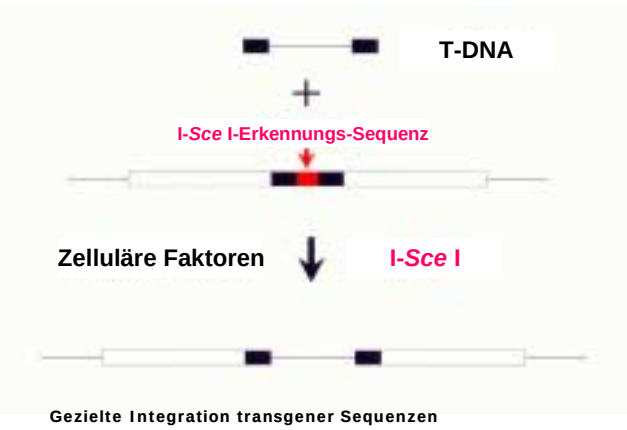
Universität Karlsruhe, Botanik II

Förderkennzeichen 0312627A

Ziel der pflanzlichen Gentechnologie ist die Herstellung von transgenen Pflanzen, die so wenig wie möglich Transgensequenzen an bestimmten Stellen in ihrem Genom enthalten. Zum Einbau und zur Entfernung von DNA-Sequenzen müssen die DNA-Stränge geschnitten und wieder zusammengefügt werden. Wir haben eine Technik entwickelt, mit der man spezifisch an ganz bestimmten Stellen im Pflanzengenom die DNA scheiden kann. Dazu verwenden wir als molekulare Schere das Restriktionsenzym I-*Sce* I. Durch Setzen eines Schnittes im Genom konnten wir so an dieser Stelle neue DNA integrieren, durch das Setzen von zwei Schnitten konnten wir DNA aus dem Genom herausschneiden.



Die molekulare Schere: Erkennungs-Sequenz der Endonuklease I-*Sce* I und das Reaktionsprodukt



Gezielte Integration transgener Sequenzen

VERSUCHSBESCHREIBUNG

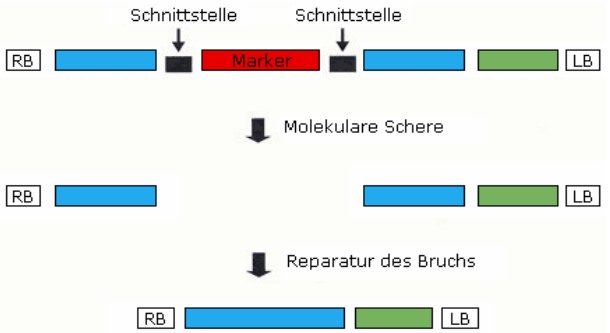
Es soll experimentell überprüft werden, in wie weit der Einbau von fremder DNA ins Pflanzengenom optimiert werden kann.

- In einem ersten Schritt haben wir gezeigt, dass durch einen Schnitt im Pflanzengenom tatsächlich der Einbau an die so bestimmte Stelle erreicht werden kann, wenn auch nur in einigen Fällen.
- In einem zweiten Schritt wurden Faktoren isoliert, von denen bekannt ist, dass sie bei anderen Organismen wie Hefe für den ungerichteten Einbau von DNA verantwortlich sind.
- Es wurden transgene Pflanzen hergestellt, bei denen die Funktion dieser Faktoren unterbunden werden sollte.

Zur Zeit werden diese Pflanzen noch abschließend dahingehend untersucht, ob dadurch tatsächlich eine weitere Erhöhung des Einbaus neuer DNA-Sequenzen an bestimmten Stellen in ihrem Genom erreicht werden kann.

ERGEBNISSTAND

Es konnte eine weltweit völlig neue Technik etabliert werden, mit deren Hilfe durch die Verwendung der molekularen Schere I-*Sce* I Transformationsmarkergene effizient aus dem Genom eliminiert werden können. Dabei ist der große Vorteil, dass im Gegensatz zu anderen Systemen die Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms nicht im Pflanzengenom zurückbleibt. Damit können mit der selben Technik bei Bedarf weitere Veränderungen erreicht werden. Mit dieser Technik können alle ungewollten Sequenzen (z.B. Antibiotika- oder Herbizidresistenzen) aus transgenen Pflanzen vor der Aus-bringung ins Feld entfernt werden. Eine Verbreitung solcher Sequenzen ist deshalb von Vornherein ausgeschlossen.



I-*Sce* I – vermittelte Markergen-Exzision

Literaturverweise und weiterführende Information:

Hohn B., Levy A. and Puchta H. (2001): Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 139-143.

Puchta H. (2002): Gene replacement by homologous recombination in plants. *Plant Mol. Biol.* **48**, 173-182.

Puchta H. (2003): Towards the ideal GMP: Homologous recombination and marker gene excision. *J. Plant Physiol*. **160**, 743-754.

Puchta H. (2003): Marker-free transgenic plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **74**, 123-134