



Forschungsverbund: Gezielte Übertragung minimierter Transgensequenzen mit optimierter Funktion

Entwicklung neuer Methoden zur gezielten Veränderung von Genen in der Pflanze

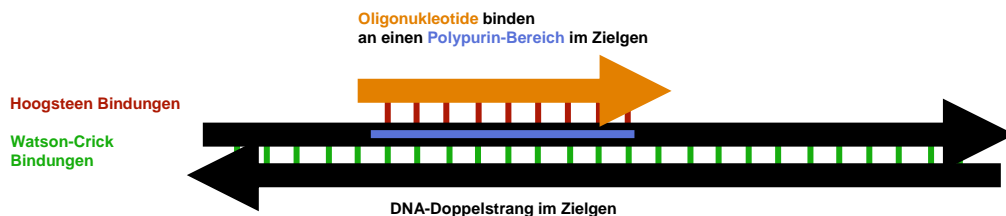
M. Swenty¹, A. Brißke-Rode¹, E. Tacke², J. Schiemann¹

¹ Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig

² BIOPLANT, Biotechnologisches Forschungslabor GmbH, Ebstorf

Förderkennzeichen: 0312627E

Es wurden verschiedene Methoden entwickelt und getestet, mit deren Hilfe bereits vorhandene Gene der Pflanze gezielt verändert werden können (= in situ-Modifikation und/oder Inaktivierung). Dazu werden Oligonukleotide (kurze DNA-Fragmente) eingesetzt, die sich an das fragliche Gen anlagern und eine gezielte Veränderung ermöglichen.



VERSUCHSBESCHREIBUNG

Es wurden folgende Versuchsschritte durchgeführt:

- 1) Design und Optimierung verschiedener Oligonukleotide, die eine direkte Veränderung von Genen ermöglichen sollen. Im Labor wird zunächst getestet, ob die Oligonukleotide an die Gene binden (und dabei sogenannte Triple Helices ausbilden). Der Nachweis erfolgt elektrophoretisch, da sich Triple Helices im Gel langsamer als die "normale" DNA-Doppelhelix bewegen. Mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs kann der Transfer der Oligonukleotide in Zellen im Mikroskop verfolgt werden.
- 2) Erstellung von Testkonstrukten mit einem inaktiven (nicht translatierbaren) Markergen (pat). Dieses Gen soll erst durch die sequenzspezifische Veränderung aktiviert (translatierbar) werden und dadurch eine Herbizid-Resistenz vermitteln. In Kontrollkonstrukten wird das Markergen sofort exprimiert.
- 3) Transformationen von Kartoffel-Pflanzen mit den verschiedenen Konstrukten. Nach der Transformation von Zellen aus Testgen-Pflanzen sollen erfolgreiche Modifikationen mit Hilfe der nun aktivierten Resistenz nachgewiesen werden.

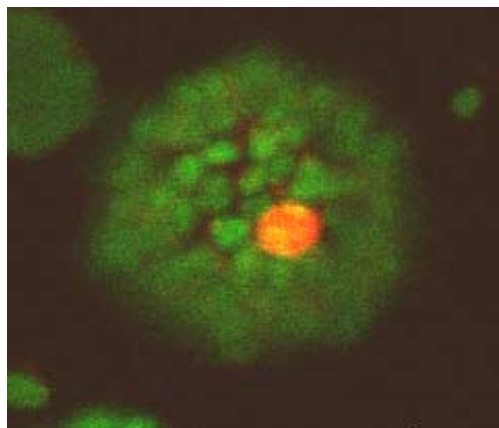
ERGEBNISSTAND

Für die Optimierung des Designs der Oligonukleotide wurde ein in-vitro-Testsystem etabliert. Mit Hilfe dieses Systems können die Oligonukleotide vor dem Einsatz in lebenden Zellen optimiert werden.

Es wurden verschiedene Oligonukleotide konstruiert. Die sequenzspezifische Bindung an das Zielgen konnte in Laborversuchen nachgewiesen werden.

Die effiziente Aufnahme von Oligonukleotiden in Kartoffelzellen und ihr rascher Transport in den Zellkern wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes gezeigt (s. Foto).

Es wurden Transformationen verschiedener Modellgene in Kartoffel-Pflanzen durchgeführt. Aus den entwickelten Modell-Pflanzen wurden Blattzellen isoliert und mit den modifizierenden Oligonukleotiden transformiert. Die daraus entstandenen Kalli (undifferenzierte Zellhaufen) werden zur Zeit auf Medium mit Herbizid auf die erfolgreiche Aktivierung des Modellgens untersucht.



Beim Projektpartner BIOPLANT wurden relevante dihaploide Zuchtlinien mit guter Gewebekultureignung identifiziert. An solchen Pflanzenlinien soll die Methode der in situ-Modifizierung angewendet werden.

Literaturverweise und weiterführende Information:

www.biosicherheit.de

Original-Projekttitle: Triple-Helix-bildende und bifunktionelle Oligonukleotide als neue Werkzeuge zur in situ-Modifizierung von Pflanzengen