

“Have a break” - DNA-Reparatur bei Pflanzen Grundlagenforschung und Grüne Biotechnologie

Michael Pacher und Holger Puchta

Botanisches Institut – Lehrstuhl II, Universität Karlsruhe (TH), Kaiserstraße 12, 76131 Karlsruhe



Einführung

Ziel der Grünen Biotechnologie ist die Herstellung von transgenen Pflanzen, welche z.B. eine verbesserte Nährstoffzusammensetzung haben, pharmazeutisch wirksame Substanzen produzieren oder industriell einfacher verwertbare Inhaltsstoffe besitzen. Dabei ist es die Absicht der daran arbeitenden Wissenschaftler, den Gehalt von Transgen-Sequenzen in diesen Pflanzen so gering wie möglich zu halten. Sowohl zum Einbau als auch zur Entfernung von Transgen-Sequenzen müssen DNA-Stränge geschnitten und wieder zusammengefügt werden. Wie kann man zur Minimierung des Transgen-Gehaltes DNA-Sequenzen aus Genomen wieder entfernen?

Eine Möglichkeit besteht in der Einführung einer Erkennungssequenz für eine sehr selten schneidende molekulare Schere ins Genom und anschließender Expression dieses Enzyms (Abb. 1A - C). Damit können hochspezifisch Brüche ins Genom einer Zelle eingeführt werden.

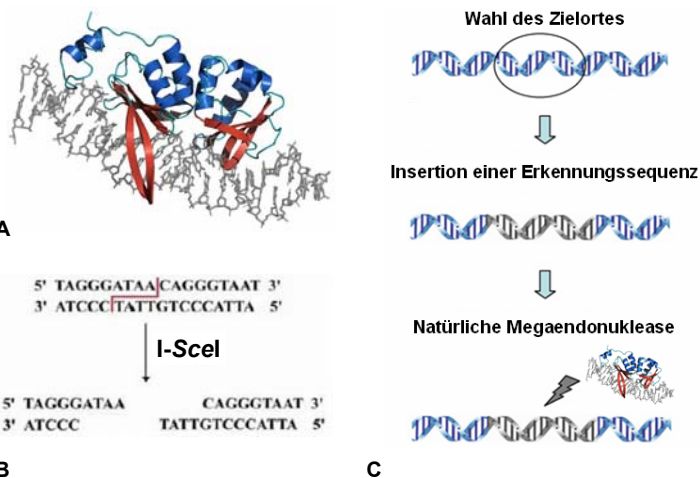


Abbildung 1: *In vivo* Induktion von DNA-Brüchen bei Pflanzen. Die Megaendonuklease I-SceI (Abb. 1A) erkennt und schneidet eine 18 Nukleotide lange DNA-Sequenz (Abb. 1B). Diese muss zur *in vivo* Induktion von Brüchen in der DNA zunächst ins Genom einer Pflanze integriert werden (Abb. 1C).

Eliminierung von Markergenen

Zur Identifizierung transgener Pflanzen werden Marker (Antibiotika- bzw. Herbizid-Resistenzgene) benötigt. Aus Sicherheitsgründen sollen diese jedoch nicht in die Umwelt ausgebracht werden. Daher ist es ein erklärtes Ziel der Biosicherheitsforschung (→ www.biosicherheit.de), Markergene aus transgenen Pflanzen gezielt zu entfernen. Bereits vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass die *in vivo* -Eliminierung von solchen Markern mit Hilfe der Megaendonuklease I-SceI möglich ist (Abb. 2). Mittels dieser Technik ist es möglich, alle unerwünschten Transgen-Sequenzen vor der Ausbringung ins Feld aus den modifizierten Pflanzen zu entfernen.

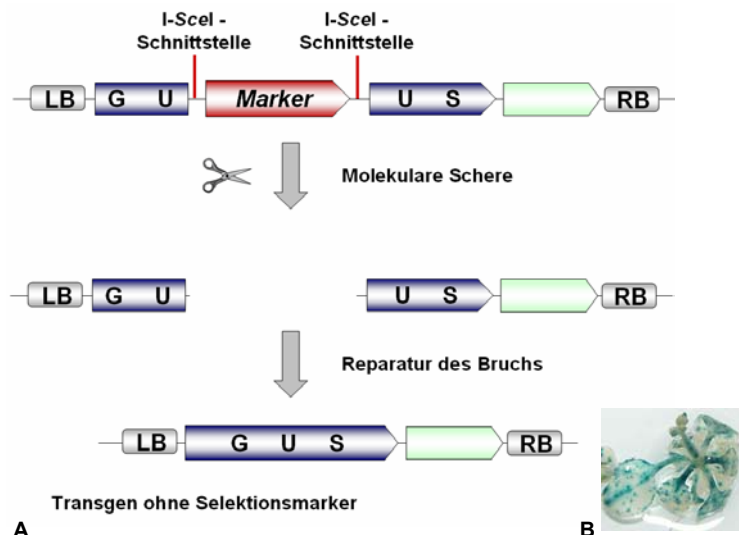


Abbildung 2: Markergen-Eliminierung. Mit Hilfe der hochspezifischen Megaendonuklease I-SceI ist es möglich, Markergene *in vivo* aus dem Genom herauszuschneiden. Hierzu wurde in transgenen Pflanzen (Transgen: der Bereich zwischen LB und RB in Abb. 2A, oben) I-SceI exprimiert, wodurch ein Antibiotika-Resistenzgen entfernt wurde. Der entstandene Bruch wird mit Hilfe der homologen Sequenzbereiche in dem Konstrukt („U“) durch Homologe Rekombination repariert, wodurch ein funktionelles Reporter-gen (GUS, kodiert für die β - Glucuronidase) gebildet werden kann. Dieses kann histochemisch (Blaufärbung) nachgewiesen werden (Abb. 2B).

I-SceI – induzierte Chromosomen – Translokationen: eine Vorlage für die Gentechnologie?

Unter Verwendung der molekularen Schere I-SceI wurde gezeigt, dass es möglich ist, Chromosomenarme gegeneinander auszutauschen (Abb. 3). Worin liegt hier die biotechnologische Anwendung? Oft werden aus praktischen Gründen mehrere Transgene (z.B. „Wunschgen“ + Selektionsmarkergene) auf einmal in eine Pflanze eingebracht. Durch Aufhebung der Kopplung zwischen den Transgenen ist es relativ einfach möglich, diese in der folgenden Generation auszukreuzen. Dies stellt eine Alternative zu der in Abb. 2 beschriebenen direkten Markergen-Eliminierung dar.

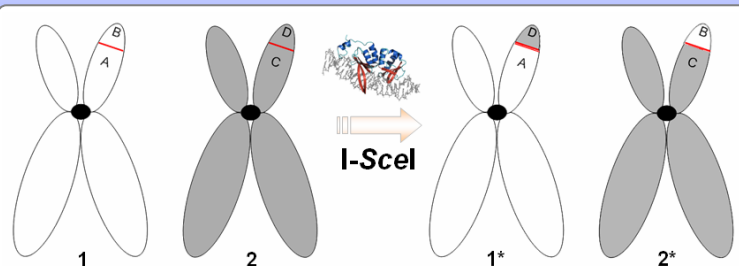


Abbildung 3: I-SceI – induzierte Chromosomentranslokationen. In transgenen Tabakpflanzen, welche auf zwei unterschiedlichen Chromosomen (1 & 2) verschiedenen Transgenen (A-B und C-D) trugen, wurde I-SceI exprimiert. Da beide Transgen-Sequenzen eine Erkennungssequenz für die Megaendonuklease enthalten (roter Balken), wurden die Chromosomenarme abgetrennt. Die Verknüpfung der Enden A und D führte zur Bildung einer Resistenz gegen Kanamycin. Nach Selektion von resistenten Pflanzen konnte gezeigt werden, dass gegenseitige Austausche häufig sind (Kopplung von A-D und B-C).