

## RNA-vermitteltes Silencing in transgenen Pflanzen

Ulrike Manske, Jörg Landsmann und Antje Dietz-Pfeilstetter  
Institut für die Sicherheit biotechnologischer Verfahren bei Pflanzen,  
Julius Kühn-Institut  
[ulrike.manske@jki.bund.de](mailto:ulrike.manske@jki.bund.de)

RNA-vermitteltes Silencing (RNAi) gewinnt als Technologie für die Etablierung neuer Eigenschaften in Nutzpflanzen zunehmend an Bedeutung. Das Abschalten pflanzeigener Gene ermöglicht Veränderungen im Metabolismus, die für die Landwirtschaft, den Verbraucher oder die verarbeitende Industrie von Vorteil sind. Durch die Einführung pathogen-spezifischer Silencing-Sequenzen lassen sich darüber hinaus Resistenzen gegenüber verschiedenen Schädlingen wie Viren, Insekten, Nematoden, Pilzen und parasitären Pflanzen schaffen.

Zur Identifizierung und Optimierung Silencing-auslösender dsRNA-Sequenzen werden Testsysteme benötigt, mit deren Hilfe sich die Wirksamkeit der Silencing-Konstrukte schnell und zuverlässig bestimmen lässt. Mehrere Expressionssysteme wurden auf ihre Eignung zur Testung der Silencing-Effektivität untersucht. Zielgen war das  $\beta$ -Glucuronidase (*gus*)-Reportergen. Getestet wurden drei verschiedene *gus*-spezifische Hairpin-Konstrukte, die sich sowohl in der Länge als auch im Herkunftsbereich der Silencing-auslösenden Sequenz unterschieden. Die Silencing-Fähigkeit der Hairpin-Konstrukte wurde in einem transienten Ansatz (Agroinfiltration mit anschließendem photometrischem GUS-Assay) bestimmt. Gleichzeitige Agroinfiltration des *gus*-Konstrukts mit jeweils einem der drei Hairpins zeigte, dass alle Hairpins in der Lage waren, das *gus*-Gen abzuschalten. Ein auf einem 660 bp-Fragment aus dem 3'-Bereich des *gus*-Gens basierender Hairpin (GUS HP 3) erwies sich hierbei als besonders wirksam.

GUS HP 3 wurde zur Auslösung des Silencing in folgenden Expressionssystemen eingesetzt: Transient I (Gleichzeitige Expression von *gus* und Hairpin), Transient II (Zeitlich versetzte Expression: Hairpin nach *gus*), Transient III (Zeitlich versetzte Expression: Hairpins vor *gus*), Stabil/Transient I (Transiente Expression des Hairpins in *gus*-transgenen Pflanzen), Stabil/Transient II (Transiente Expression des *gus* in Hairpin-transgenen Pflanzen), Stabil (Expression von *gus* und Hairpin in doppeltransformierten Pflanzen). Ein Silencing konnte nur in den Systemen beobachtet werden, in denen GUS HP 3 vor oder gleichzeitig mit dem *gus*-Gen exprimiert wurde (Transient I und III, Stabil/Transient II, Stabil). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der hohen Stabilität des GUS-Proteins. Vor Applikation des Hairpins gebildetes GUS könnte in den betroffenen Ansätzen (Transient II, Stabil/Transient I) einen möglichen Silencingeffekt überdecken. Die begrenzte Dauer der transienten Hairpinexpression ist für die Etablierung eines sichtbaren Silencingeffekts hier vermutlich nicht ausreichend. Ein verdeckter Silencingeffekt lässt sich mit der verwendeten Methode des GUS-Assays nicht nachweisen. Bei der Wahl des Testsystems sollten daher die Stabilität des Zielgen-Produkts und die Eignung der zum Nachweis des Silencing verwendeten Methode beachtet werden.