

Neue Methoden zur gezielten Genomveränderung und Pflanzenzüchtung

Frank Hartung

Julius Kühn Institut, Institut für Sicherheit in der Gentechnik, Quedlinburg

In den letzten Jahren wurden verschiedene Technologien entwickelt, die dazu dienen sollen Pflanzen über die normale Kreuzungszüchtung hinausgehend gezielt zu verändern. Für viele der neuen Technologien ist es unklar, ob sie unter die Regulierung durch die EU Richtlinie 2001/18 fallen oder nicht, da nicht in jedem Fall eindeutig eine gentechnische Arbeit vorliegt. Die Technologien, die im Augenblick auf ihre Gentechnikregulierung hin diskutiert werden sind: Nuklease-Technologie, Oligo directed mutagenesis (ODM), Cisgenese, Propfung auf GM-Unterlagen, RNA-abhängige DNA-Methylierung (RdDM), Reverse Breeding, Agroinfiltration und Synthetic Genomics. Dies sind keine äquivalenten Technologien, sondern verschiedene Ebenen. Als Basis-Technologie kann man die verändernden Methoden wie Nukleasen, ODM und RdDM bezeichnen, wohingegen Agroinfiltration und Propfung eindeutig Transfer-Technologien sind und Cisgenese, Reverse Breeding und Synthetic Genomics konzeptionelle Ideen darstellen.

Als eine der herausragenden neuen Technologien ist die Herstellung und Anwendung sequenzspezifischer Nukleasen in Pflanzen zu sehen. Mit Hilfe von Meganukleasen, Zinc Finger Nukleasen (ZFN) und neuerdings TALE Nukleasen (Transcription Activator Like Element) ist es erstmals möglich in dem Genom einer Pflanze gezielt einen Doppelstrangbruch (DSB) zu setzen ohne dieses Genom vorher verändern zu müssen. Das Prinzip dabei ist, die Nuklease durch eine fusionierte DNA-Bindedomäne an eine bestimmte Stelle im Genom zu dirigieren, damit sie dort ihren Schnitt setzen kann. Die Reparatur des DSBs ist dann allein vom zellulären Mechanismus der Pflanze abhängig und führt in der Regel zur direkten Religation oder zur nicht homologen End zu End Verknüpfung (NHEJ). Bei der NHEJ kommt es zu Fehlern, die sich in Form von Punktmutationen oder Insertionen/Deletionen manifestieren. Nur ein sehr geringer Anteil (ca. 0,01%) der DSBs wird über Homologe Rekombination (HR) repariert. Um diesen sehr geringen Anteil zu erhöhen muß man auf dem gleichen Konstrukt, auf dem die Nuklease in die Pflanzenzelle gebracht wird eine DNA klonieren, die homolog zu den Bereichen links und rechts vom DSB ist. Mit Hilfe dieser Homologien ist es möglich die HR-Rate um das 10-100fache (evtl. 1000fache) zu steigern und somit eine gezielte nachweisbare Integration zu erreichen.