

Markergene

Mittels Gentechnik werden fremde Gene in Zellen der zu transformierenden Organismen eingeschleust. Dabei werden neben dem eigentlichen Zielgen i.d.R. weitere DNA-Sequenzen in die Zelle eingebracht. Zum Beispiel sogenannte Markergene. Sie "markieren" erfolgreich transformierte Zellen und dienen damit der Identifikation und Selektion derjenigen Zellen, bei denen der gewünschte Gentransfer funktioniert hat.

Bei Pflanzenzellen werden häufig Antibiotika-Resistenz-Gene als Marker verwendet. Dabei werden die Zellen nach der Transformation mit bestimmten Antibiotika behandelt. Die Zellen, bei denen der Gentransfer erfolgreich war, die also das Antibiotika-Resistenzgen in sich tragen, überleben diese Behandlung, die anderen Zellen werden durch das Antibiotikum abgetötet.

Die Verwendung von Antibiotika-Resistenz-Genen (ABR-Gene) ist sehr umstritten, da eine verstärkte Resistenzbildung bei Antibiotika befürchtet wird.

In der EU ist die Nutzung von Antibiotika-Resistenzgenen als Markergene in drei Gruppen eingeteilt

1. uneingeschränkt verwendbar:
ABR-Gene, die in der Human- und Tiermedizin von geringer Bedeutung und in der Natur bereits weit verbreitet sind, z.B. *nptII* (*Kanamycin-Resistenz-Gen*)
2. erlaubt für Freisetzungsversuche, aber nicht für den kommerziellen Anbau:
ABR-Gene gegen Antibiotika, die z.B. gegen diverse Infektionskrankheiten eingesetzt werden, z.B. das *Ampicillin-Resistenz-Gen*
3. verboten:
ABR-Gene gegen Antibiotika, die in der Humanmedizin von großer Bedeutung sind, z.B. *nptIII* (*Antikacin-Resistenz-Gen*)

Aktuell wird verstärkt nach Alternativen zu Antibiotika-Resistenz-Markern geforscht.

Alternative Markersysteme:

- Herbizid-Resistenz-Gene
z.B. bei Round-Up-Ready-Soja; erfolgreich transformierte Zellen, tragen das Zielgen zur Erzielung von Herbizidresistenz in sich, sie überleben die Selektion mit einer Unkrautvernichtungsmittel-Behandlung
- Mannose-Marker / Mannose System
z.B. bei Mais; Pflanzen können durch das eingeschleuste *PMI-Gen* den Zucker *Mannose* verwerten, nicht erfolgreich transformierte Zellen sterben ab. Dieses System ist nicht für alle Pflanzenarten verwendbar, da einige - u.a. Tabak - *Mannose* von Natur aus verwerten können
- Palatinose-System
Versuche mit Tabak; erfolgreich transformierte Zellen überleben auf einem *Palatinose*-Nährmedium, normale Pflanzen gehen darauf ein.
- Gene für die Produktion von Eiweißen, die Schwermetalle binden
erfolgreich transformierte Pflanzen überleben dann z.B. eine Cadmium-Behandlung
- optische Marker
z.B. ein erfolgreich eingebautes *GFP-Gen* lässt gv-Pflanzen unter UV Licht grün leuchten. (Optische Marker werden auch als Reportergene eingesetzt)
- 2-DOG Markersystem
Versuche u.a. bei Kartoffel; basiert auf einem *2-DOG-Zucker* abbauenden Enzym, welches Resistenz gegen die sonst für Pflanzen toxische Zuckerart vermittelt

- **Negative Marker:**
Pflanzenzellen werden Co-transformiert. Ziel- und Markergene werden gemeinsam, aber getrennt voneinander eingeschleust. Die DNA-Sequenz mit dem Marker erhält zusätzlich noch einen negativen Selektionsmarker. Nach der Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzen erzeugt man vollständige Pflanzen. Deren sexuell erzeugte Nachkommen unterzieht man einer Behandlung mit einer Induktorsubstanz, die den negativen Selektionsmarker aktiviert. Dadurch sterben alle Pflanzen mit dem Selektionsmarker ab. Übrig bleiben die Pflanzen, die nur das Zielgen in sich tragen. (System des induzierbaren Zelltodes)
- **Markergen-Eliminierung durch Androgenetische Segregation**
z.B. bei Gerste und Weizen: hier werden zwei separate DNA-Abschnitte (einer mit dem Zielgen und einer mit dem Markergen) in die zu transformierenden Zellen übertragen (Co-Transformation). Danach Ermittlung derjenigen Zellen, die beide Gene in sich tragen. Die Zellen werden in speziellen Kulturen zu Pflanzen herangezogen. Aus den sexuellen Nachkommen dieser Pflanzen werden dann diejenigen herausgesucht, die reinerbig sind und nur noch das Zielgen in sich tragen.

Molekulare Scheren:

Die Markergene werden nach Gebrauch durch sogenannte Molekulare Scheren entfernt. Diese Schneidmechanismen sind derzeit meist nur in einzelnen Pflanzenarten wirksam und in der Regel praktisch noch nicht einsetzbar.

- z.B. Versuche mit dem *cre/loxP*-Rekombinations-System bei Wein. Hierbei schneidet das durch Vireninfektion aktivierte Enzym *Cre-Rekombinase* das - zwischen zwei *loxP*-Erkennungssequenzen lokalisierte - Markergen (*nptII*) aus. Der Erfolg des Enzyms ist an einem unter UV-Licht gelb leuchtenden Reporter-gen (*YFP*) absehbar, das blockiert wird, solange das Markergen intakt ist. Zum Schluss wird die Vireninfektion durch eine Thermobehandlung eliminiert.
(Für eine Maissorte, bei der das Markergen mittel *Cre/lox* entfernt wurde, wurde die Zulassung für die EU beantragt.)
- z.B. *Ac/Ds*-Transposon-System ("springende Gene", z.B. bei Zuckerrübe)
Die Pflanze, die transformiert werden soll, erhält einen Vektor mit zwei Abschnitten: zum einen mit dem Zielgen, das von zwei flankierenden *Ds-Sequenzen* markiert wird, sowie dem zu eliminierenden Markergen und dem *Ac-Gen*. In der Pflanze erzeugt das *Ac-Gen*, ein Enzym, die *As-Transposase*, die das Genkonstrukt an den Stellen der *Ds-Sequenzen* auftrennt. Das zwischen diesen Sequenzen befindliche Zielgen wird an eine andere Stelle des Genoms transportiert und dort integriert. Es ist "gesprungen".
Durch die räumliche Trennung von Ziel- und Markergen werden unter den nach erfolgter Selektion sexuell erzeugten Nachkommen auch Pflanzen sein, die nur das Zielgen tragen.

Verzicht auf Marker:

- Versuche zur Etablierung der Transformationsmethode der Mikroinjektion bei Pflanzen. Diese Methode ist bei Pflanzen derzeit nicht einsetzbar. Durch die Mikroinjektion würde der Transfer des Zielgens ohne Markergen möglich.

Autorin: Martina Adams, Weilburg, Pomologen-Verein e.V.

Quellen:

www.biosicherheit.de
www.transgen.de