Schlussbericht

ZE: Universität Karlsruhe (TH) Botanisches Institut II	Förderkennzeichen: 0313264R
Vorhabenbezeichnung: Optimierung der biologischen Sicherheit transgener Pflanzen	
Teilprojekt 2.2: Sequenzspezifische Integration und Eliminierung von Transgen-Sequenzen durch die *in vivo* Produktion von linearen DNA-Molekülen im generativen Pflanzengewebe	
Laufzeit des Vorhabens: 1. April 2005 bis 31. März 2008 (verlängert bis 30.06.2008)	

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Das Ziel des Vorhabens war die Etablierung einer neuartigen Methode zur kultursortenunabhängigen, effizienten und sequenzspezifischen Transgen-Integration ins Pflanzengenom. Eine solche Technik wäre für die pflanzliche Biotechnologie von erheblicher Bedeutung. Die Integration von transgener DNA in das Pflanzengenom erfolgt in der Regel ungerichtet und damit nicht in Sequenzbereichen, die homolog zur transferierten DNA sind (Kirik *et al*., 2000; Gisler *et al*, 2002; Orel *et al*., 2003). Die *„Gene Targeting"*-Technik, welche bei tierischen Organismen eingesetzt wird, ist bis heute in Pflanzen nicht etabliert (Übersichten in: Britt & May, 2003; Hohn & Puchta, 2003; Kumar & Fladung, 2001; Puchta, 2002; Puchta, 2003; Reiss, 2003). Ein möglicher Ansatz zur Integration fremder DNA in prädeterminierte Stellen des pflanzlichen Genoms besteht in der Verwendung von Rekombinasen (Ow, 2002; Thompson & Ow, 2006; Ow, 2007; Thompson *et al*., 2008). Alternativ hierzu wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Verfahren entwickelt, welches eine präzise Induktion eines Doppelstrangbruches *in vivo* erlaubt, in welchen sequenz-spezifisch Transgene integriert werden können (Puchta *et al*., 1996; Puchta, 1999). Mit dieser Methode konnte die homologe Integration des Transgens um zwei bis drei Größenordnungen erhöht werden. Im vorgeschlagenen Projekt sollten unsere Erfahrungen aus diesen Arbeiten mit einem zwischenzeitlich für die Fruchtfliege *Drosophila* erfolgreich etablierten Verfahren zur gezielten Transgen-Integration (Rong & Golic, 2000) kombiniert und damit diese Methode für die zielgerichtete Modifikation von Pflanzengenomen optimiert werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Vorhaben basierte konzeptionell auf einem System, welches für die ortsspezifische Transgenintegration in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entwickelt wurde (Rong & Golic, 2000) und dort sehr effizient eingesetzt wird: hierbei wird *in vivo* eine zirkuläre Transgensequenz bereitgestellt, die anschließend linearisiert wird und an beiden Enden weitläufige Sequenz-Homologien zu dem Ziel-Locus aufweist, welcher verändert werden soll. Die Integration dieser linearen Sequenz erfolgt hierbei durch die so genannte homologe Rekombination (HR), einem von zwei Wegen zur Verknüpfung von DNA-Enden. Bei dem in diesem Vorhaben zum Einsatz gekommenen System wurde bewusst auf die Freisetzung eines zirkulären Moleküls verzichtet, da bereits in früheren Arbeiten in unserer Gruppe gezeigt werden konnte, dass eine *in vivo*-Freisetzung linearer DNA-Sequenzen aus dem Pflanzengenom sehr effizient möglich ist (Siebert & Puchta, 2002). Die Grundidee des Vorhabens basierte darauf, dieses lineare Molekül zielgerichtet an einer anderen Stelle im Genom der Versuchspflanzen zu reintegrieren (Salomon & Puchta, 1998; Chilton *et al*., 2003; D´Halluin *et al*., 2008) und durch Variation des Zeitpunktes der Freisetzung der linearen Sequenz das Verfahren zu optimieren.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das experimentelle System zur Optimierung der sequenz-spezifischen Transgen-Integration ins Pflanzengenom basiert auf dem gezielten Herausschneiden eines linearen DNA-Moleküls aus einer Transgensequenz mit Hilfe der molekularen Schere I-*Sce*I, bei welcher es sich um eine extrem selten schneidende Megaendonuklease handelt (Perrin *et al*., 1993). Die beabsichtigte gerichtete Integration dieser linearen Sequenz am ebenfalls transgenen Zielort würde zur Restaurierung eines intakten Selektionsmarkergens führen und somit einen sehr einfachen Nachweis solcher Ereignisse erlauben (Abbildung 1). Die Effizienz des Herausschneidens (Exzision) der linearen DNA-Sequenz sollte mittels einer histochemischen Färbung quantifizierbar sein, um die Häufigkeit gezielter Integrations-Ereignisse in Relation zur Exzisionsrate bestimmen zu können und damit eine Optimierung der Technik zu erlauben. Der gesamte experimentelle Ansatz sollte sowohl in der gut etablierten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* als auch in Tabak durchgeführt werden, um eine kultursortenunabhängige Optimierung der angestrebten Technik zu ermöglichen.

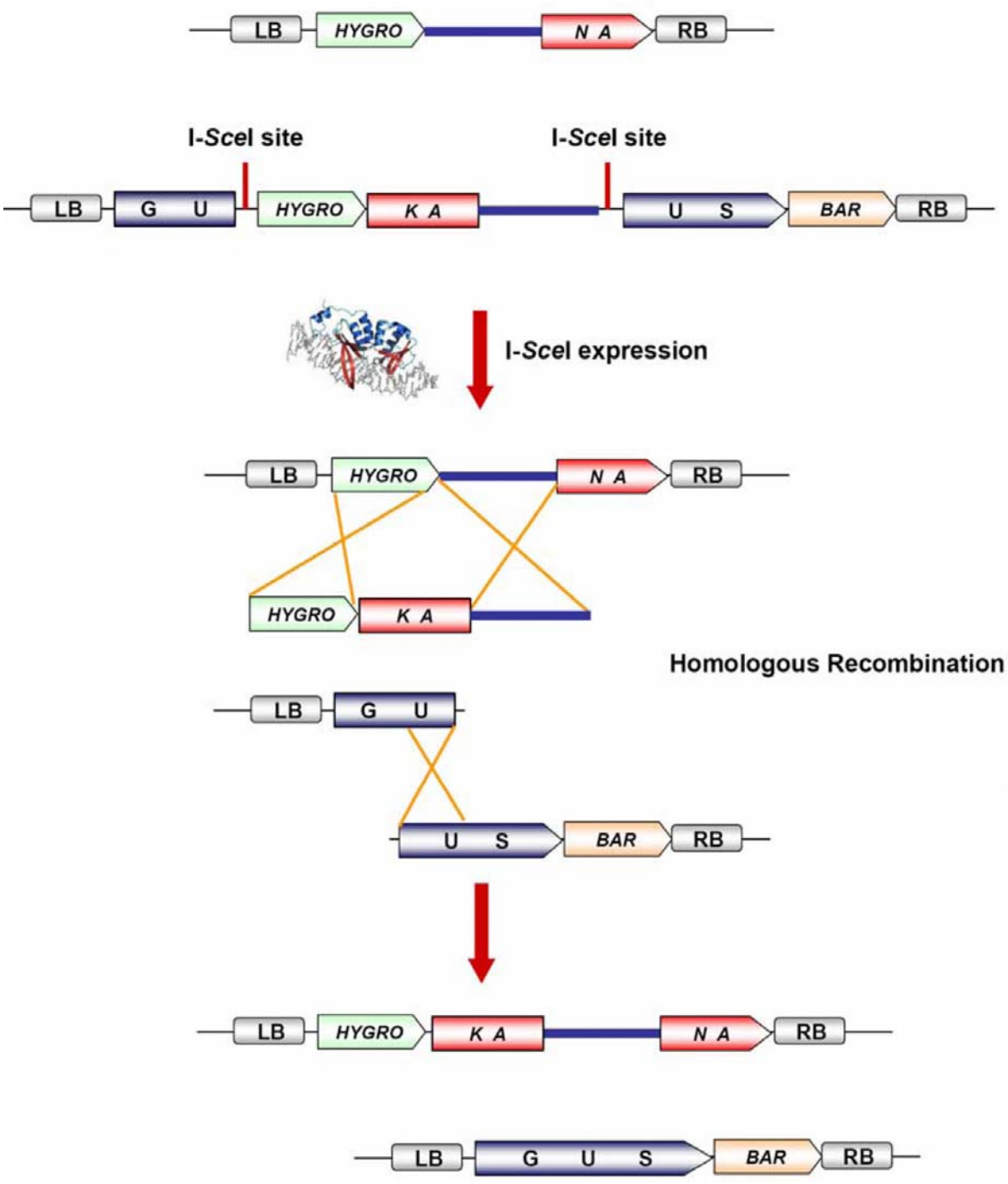

Abbildung 1: Prinzip des *Gene Targeting* Assays. Die Aktivität der extrem selten schneidenden Endonuklease I-*Sce*I führt zur Freisetzung einer linearen *Targeting Sequenz* aus dem *Targeting Vektor*. Die Reparatur des hierbei entstehenden Doppelstrangbruches durch homologe Rekombination führt zur Restaurierung eines β-Glucuronidase-Reportergens, dessen Aktivität mittels histochemischer Färbung nachgewiesen werden kann. Kommt es zu einer ortsspezifischen Integration der linearen *Targeting Sequenz* in den *Targeting Locus*, entsteht ein funktionelles Kanamycin-Resistenz-Gen, auf dessen Vorhandensein einfach selektiert werden kann.

In beiden Pflanzenspezies sollten verschiedene Zeitfenster in der Pflanzenentwicklung hinsichtlich der Effizienz des zu etablierenden Verfahrens getestet werden, in dem die Expression der molekularen Schere I-*Sce*I und damit die Freisetzung der linearen DNA-Sequenz zeitlich variiert wurde.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn der Arbeiten

Seit dem ersten Bericht vor 20 Jahren (Paszkowski *et al*., 1988) wurden vielfältige Versuche zur Etablierung einer „Gene Targeting" Technik in somatischen Zellen höherer Pflanzen unternommen (Übersichten in: Kumar und Fladung, 2001; Puchta, 2002; Hohn und Puchta, 2003; Puchta, 2003). Mittels dieser Technik können in verschiedenen Organismen durch homologe Rekombination zwischen einer in die Zelle eingebrachten DNA und dem Kerngenom kontrolliert Gene ausgetauscht bzw. an dieser Stelle eingebaut werden. *„Gene Targeting"* wird seit langem routinemäßig in Bakterien, Hefe und Maus angewandt. Bis heute konnte jedoch keine effiziente Methode hierzu in höheren Pflanzen etabliert werden (Übersichten in: Puchta, 2002; Puchta, 2005). So liegen die bisher erreichten Frequenzen um mehrere Größenordnungen unterhalb derer, die in anderen Organismen routinemäßig erzielt werden.

Ein vor allem in den vergangenen Jahren verfolgter Ansatz war der Versuch, die pflanzliche Enzymmaschinerie dahingehend zu modifizieren, dass homologe Rekombination effizienter stattfinden sollte. Hierzu wurden zum Einen bakterielle Proteine, welche in homologe Rekombinationsvorgänge involviert sind, *in planta* exprimiert. In der Tat konnte durch dieses Vorgehen die HR-Frequenz in somatischen Pflanzenzellen erhöht werden (Shalev *et al*., 1999), eine Steigerung der „Gene Targeting"-Frequenz gelang allerdings nicht (Reiss *et al*., 2000). Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der ortsspezifischen Transgen-Integration basierte auf dem Einsatz chimärer DNA-RNA-Oligonukleotide (Übersicht in: Hohn & Puchta, 1999). Die Ergebnisse dieser Studien ließen sich jedoch nicht reproduzieren und werden in der wissenschaftlichen Gemeinschaft inzwischen kontrovers diskutiert (Taubes, 2002). Des Weiteren stellte die Entdeckung, dass in dem Moos *Physcomitrella patens* die homologe Integration von DNA mit hoher Effizienz abläuft, einen wichtigen Fortschritt für die Grundlagenforschung bei niederen Pflanzen dar (Schaefer & Zyrd, 1997; Strepp *et al*., 1998). Der Grund hierfür ist allerdings nach wie

vor nicht verstanden (Reski, 1998), so dass diese Tatsache der Entwicklung einer entsprechenden Technik in höheren Pflanzen nicht dienlich ist.

Aus diesem Grunde ist die Erprobung und Weiterentwicklung neuer, teilweise in anderen Organismen bereits mit Erfolg angewandter Techniken für das *„Gene Targeting“* unerlässlich, um auch für höhere Pflanzen eine effiziente Methode zur gerichteten Transgen-Integration zu etablieren. Diese würde sowohl der Grundlagenforschung als auch der angewandten Grünen Biotechnologie neue technische Dimensionen eröffnen (Puchta, 2005).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Verlaufe des durchgeführten Vorhabens wurden während der regelmäßigen Statusseminare sowie telefonisch oder per eMail die neuesten Ergebnisse und Probleme mit den anderen Verbundpartnern diskutiert. Ein besonders intensiver Informationsaustausch fand mit den Verbundpartnern Reinhard Hehl und Matthias Fladung in Bezug auf die Verwendung induzierbarer Promotoren statt.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Zunächst wurden die dem experimentellen System zu Grunde liegenden Pflanzentransformations-Vektoren (*Targeting Locus*, „TL“ bzw. *Targeting Vektor*, „TV“ und verschiedene I-*Sce*I-Expressions-Konstrukte) kloniert, sequenziert und stabil in die Versuchspflanzen *Arabidopsis* bzw. Tabak transformiert.

Der *Targeting Vektor* besteht u.a. aus der *Targeting Sequenz*, welche von Erkennungsstellen für die selten schneidende Megaendonuklease I-*Sce*I flankiert wird. Die *Targeting Sequenz* unterteilt ein β-Glucuronidase-Reportergen (GUS) in zwei Hälften mit partieller Sequenz-Homologie zueinander. Aus diesem Grunde kann die I-*Sce*I-vermittelte Exzision der linearen Sequenz sehr einfach durch dessen Restauration mittels homologer Rekombination histochemisch nachgewiesen werden. Die freigesetzte *Targeting Sequenz* sollte anschließend ebenfalls vermittelt durch HR in den *Targeting Locus* integriert werden und hierbei zur Restaurierung

eines intakten Kanamycin-Resistenzgens führen, worauf sehr einfach selektiert werden kann (Abbildung 1).

Für beide Versuchsorganismen und verwendete Konstrukte wurden zahlreiche Primärtransformanden erhalten. Diese wurden durch Selbstung vermehrt und anschließend die Nachkommen anhand von Segregations-Analysen hinsichtlich einer Transgen-Integration an einem Locus getestet. Da für die geplanten Arbeiten das Vorhandensein von intakten Einzelkopien der Konstrukte *TL* und *TV* im Genom der jeweiligen Versuchspflanzen erforderlich war, wurden die oben beschriebenen Linien einer ausführlichen Southern Blot-Analyse unterzogen, in deren Rahmen auch die Funktionalität der beiden I-*Sce*I-Schnittstellen in *TV* getestet wurde. Anhand dieser Untersuchungen wurden für *Arabidopsis* vier *TL*- bzw. fünf *TV*-Linien etabliert, für Tabak wurden fünf *TL*- und sechs *TV*-Linien bereitgestellt.

Anschließend wurden für beide Versuchsorganismen die homozygoten *TL*-Linien mit verschiedenen I-*Sce*I-Expressionskonstrukten retransformiert (*Arabidopsis*: 2x35S-Promotor-I-*Sce*I zur konstitutiven Expression, SPO11-1-Promotor-I-*Sce*I zur Expression der Meganuklease in meiotischem Gewebe sowie DMC1-Promotor-I-*Sce*I zur Expression in generativem Gewebe; Tabak: 35S-Promotor-I-*Sce*I zur konstitutiven Expression, DC3-Promotor-I-*Sce*I zur Expression der Meganuklease in generativem Gewebe). Diese Strategie wurde gewählt, da anzunehmen ist, dass abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanzen die für das *„Gene Targeting“* essentielle HR unterschiedlich effizient abläuft. In der Folge wurden mit I-*Sce*I-Expressionskonstrukten retransformierte *TL*-Linien für beide Versuchsorganismen identifiziert und vermehrt. Mittels Segregations-Analyse der F_2-Generation (bzgl. der I-*Sce*I-Expressionskasetten) wurden solche Linien charakterisiert, welche das Expressionskonstrukt an einem Locus trugen. Mittels quantitativer Real-time PCR konnten aus diesen *TL*--I-*Sce*I-Linien diejenigen identifiziert werden, welche das höchste relative I-*Sce*I-Expressionsniveau aufwiesen. Für jede *TL*-Linie wurden die folgenden Experimente mit zwei unabhängigen I-*Sce*I-Expressions-Loci bezogen auf den verwendeten Promotor durchgeführt.

Die Linien *TV* und *TL*--I-*Sce*I wurden miteinander gekreuzt, um alle drei Transgene miteinander zu vereinigen. Da hierbei verschiedene Linien miteinander kombiniert wurden, führte dies im Falle von *Arabidopsis* zu insgesamt 68 Kreuzungen

(davon 16 Kontrollen) bzw. 144 Tabak-Kreuzungen (davon 30 Kontrollen). Die F_1-Nachkommen aus diesen Kreuzungen wurden angezogen und einer histochemischen Färbung unterzogen, um die Exzisions-Effizienz der linearen „*Targeting Sequenz*“ aus dem „*Targeting Vektor*“ zu bestimmen (Abbildung 2).

GT-Experimente in *Arabidopsis thaliana*

Hierbei wurde gefunden, dass die Exzisionsrate im Falle der untersuchten *Arabidopsis*-Linien so hoch war, dass eine Quantifizierung nicht durchgeführt werden konnte (es wiesen ganze Pflanzen / Blätter eine vollständige Blaufärbung auf). Interessanterweise wurde dabei keinerlei Korrelation zwischen der Exzisions-Effizienz und dem zur Expression von I-*Sce*I verwendeten Promotor gefunden. Des Weiteren konnte ebenfalls kein Positionseffekt in Bezug auf die verschiedenen Transgen-Loci für *TL* und *TV* gefunden werden. Aus diesem Grunde wurden alle F_1-Nachkommen weiter vermehrt, um die F_2-Generation auf *Gene Targeting*-Ereignisse zu untersuchen. Die ersten Ergebnisse des Screenings auf *GT*-Ereignisse fielen sehr vielversprechend aus, da für alle Linien bei der hierzu angewandten Kanamycin-Selektion zahlreiche augenscheinlich resistente Pflanzen identifiziert werden konnten (Abbildung 3). Diese wurden mittels PCR hinsichtlich der ortsgerichteten Transgen-Integration untersucht. Überraschenderweise ergab keine einzige der mehreren Hundert getesteten Pflanzen ein für *GT*-Ereignisse charakteristisches Signal.

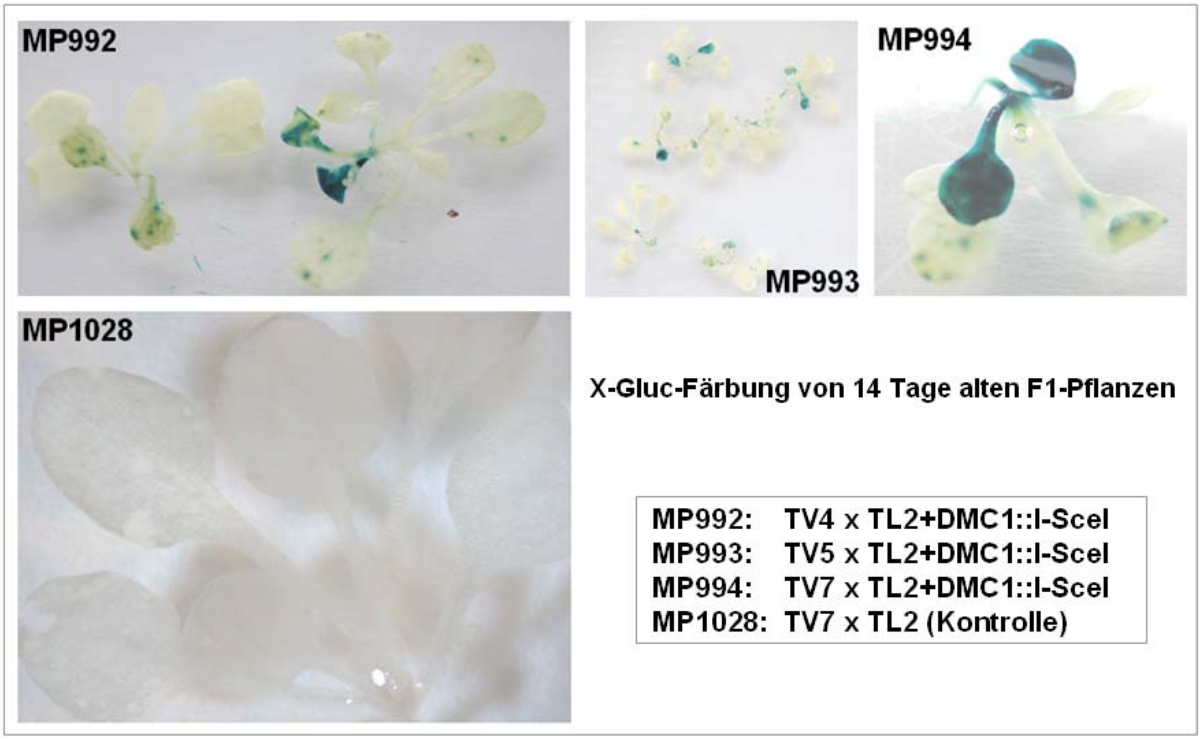

Abbildung 2: Exzision der *Targeting Sequenz* durch I-*Sce*I-vermittelte DSB-Induktion. Gezeigt sind die Ergebnisse der histochemische Färbung von F_1-Pflanzen aus drei verschiedenen experimentellen Kreuzungen sowie einer Kontrollkreuzung. Es ist zu erkennen, dass die durch I-*Sce*I induzierten DSBs zur Exzision der linearen *Targeting Sequenz* in den Linien MP992, MP993 und MP994 durch HR-vermittelte Reparatur zu einer Restaurierung des β-Glucuronidase-Gens führen. Die Reaktion ist in manchen Pflanzenteilen derart effizient, dass ganze Blätter blau gefärbt sind. Im Falle der Kontrolle (MP1028, ohne I-*Sce*I-Expression) ist deutlich zu erkennen, dass keine Restauration des β-Glucuronidase-Gens stattgefunden hat.

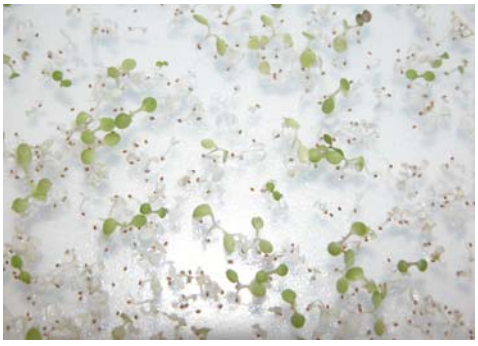

Abbildung 3: Kanamycin-Seketion.
F2-Sämlinge wurden auf Kanamycin-Selektionsmedium ausgebracht und angezogen. Es ist deutlich zu erkennen, dass zahlreiche Pflänzchen augenscheinlich resistent sind. Diese Pflänzchen wurden auf Anzuchtsplatten ohne Kanamycin umgesetzt, um sie weiter wachsen zu lassen. Anschließend wurde Blattmaterial für molekularbiologische Analysen geerntet. Die PCR-basierten Untersuchungen hinsichtlich eines restaurierten Kanamycin-Resistenzgens zeigten kein Vorhandensein solcher Ereignisse (nicht gezeigt).

Aus diesem Grunde wurden die Samen der F_2-Generation in weniger dichter Art auf GM-Kanamycin-Medium ausgebracht. Wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, konnten weder für die Negativkontrolle noch für die GT-Kreuzungsnachkommen resistente Pflänzchen erhalten werden.

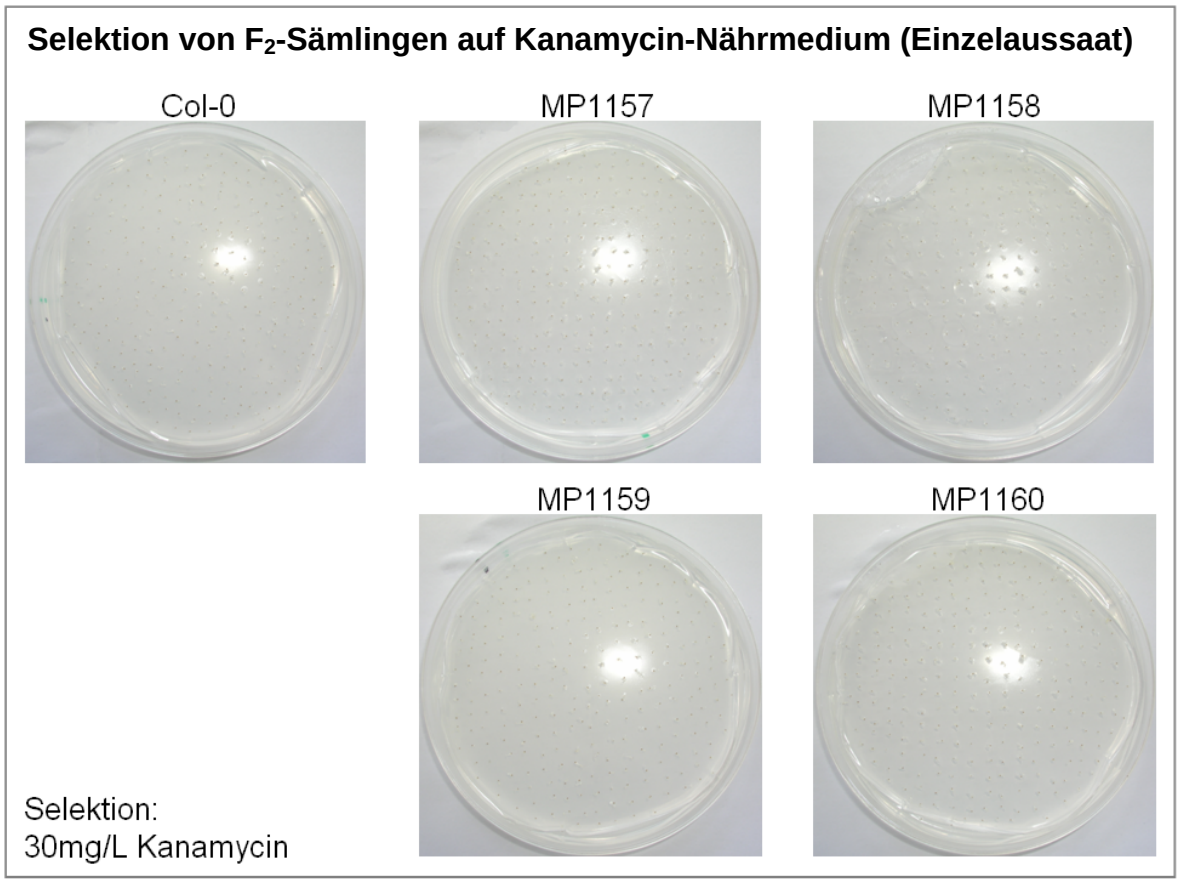

Abbildung 4: Screening auf *Gene Targeting*-Ereignisse. F_2-Sämlinge aus vier verschiedenen experimentellen Kreuzungen sowie der Wildtyp (Col-0) als Kontrolle wurden einzeln auf GM-Nährmedien mit 30 mg/L Kanamycin ausgesät, um GT-Ereignisse zu identifizieren. Es konnten jedoch keine resistenten Pflänzchen identifiziert werden. Das Experiment wurde mit gleichem Ausgang für F_3-Sämlinge wiederholt (Daten nicht gezeigt).

Es konnte also gezeigt werden, dass die Exzision der *Targeting Sequenz* in *Arabidopsis* nicht den limitierenden Faktor darstellt, wogegen das *GT* in dem angewandten System offensichtlich zu ineffizient ist, um detektiert zu werden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Aktivität des durch *GT* restaurierten Kanamycin-Resistenzgens, dessen zwei Exons durch ein artifizielles Intron unterbrochen sind, zu niedrig ist, um ein Screening auf Sämlings-Ebene zu erlauben. Da dieses artifizielle Gen im Rahmen von Tabak-Zellkulturen bereits in der Vergangenheit erfolgreich zur Anreicherung Kanamycin-resistenter Zellen (Paszkowski *et al*., 1992) bzw. Kanamycin-resistenter Pflanzen (Pacher *et al*., 2007) angewendet worden war, wurde eine neue Strategie entwickelt (Abbildung 5).

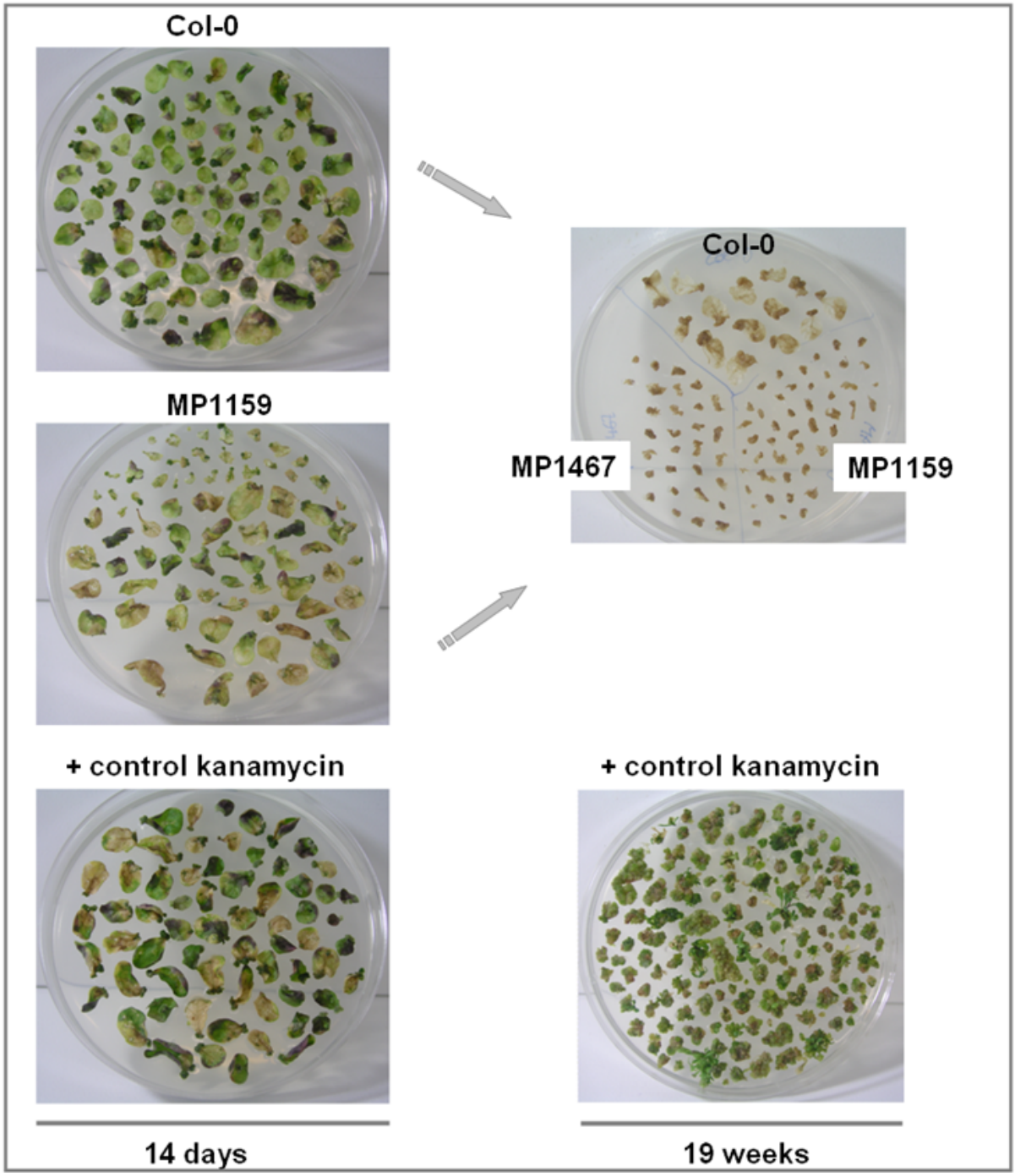

Abbildung 5: *Arabidopsis* Zellkultur. Blätter von F_1 Sämlingen zweier verschiedener Kontrollkreuzungen nach transienter I-*Sce*I-Expression sowie Positiv- & Negativ-Kontrollen wurden auf Kallus-induzierendem Medium (CIM) mit 30 mg/L Kanamycin angezogen. Die Aufnahmen wurden 14 Tage bzw. 19 Wochen nach dem Transfer der Blätter auf dieses Medium gemacht. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Falle der Positivkontrolle nach 19 Wochen grüne *Arabidopsis*-Kalli entstanden sind, während dies bei der Negativkontrolle (Col-0) sowie den beiden experimentellen Ansätzen (MP1159 und MP1467) nicht der Fall ist.

Hierzu wurden *Arabidopsis*-Pflanzen aus ursprünglichen Kontroll-Kreuzungen (*TL* x *TV*) mit einem Agrobakterien-Stamm inokuliert, um transient I-*Sce*I unter der Kontrolle des doppelten 35S-Promotors zu exprimieren. Nach dieser Inokulation wurden Blättchen der entsprechenden Sämlinge abgeschnitten und einer Zellkultur mit Phytohormon-haltigem Kanamycin-Selektions-Medium unterzogen. Diese Zellkultur wurde über einen Zeitraum von 19 Wochen unter Selektionsdruck aufrecht erhalten. Während die eingesetzte Positivkontrolle in der Tat zur Entstehung von Kalli führte, konnte bei keiner der auf diese Weise getesteten *GT*-Linien ein vergleichbarer Phänotyp gefunden werden (Abbildung 5). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass einzelne Kanamycin-resistente Zellen in diesem Ansatz durch katabole Produkte umgebender absterbender Zellen abgetötet werden. Um dies auszuschließen, wurde ein weiterer Ansatz verfolgt. Bei diesem sollten einige jener F_1-Linien, welche bei der oben genannten histochemischen Färbung nach I-*Sce*I-Expression eine besonders intensive Blaufärbung (hohe Exzisions-Effizienz) aufwiesen, für eine Flüssigzellkultur eingesetzt werden. Hierzu wurde eine Flüssiggewebekultur der entsprechenden Linien etabliert und über mehrere Monate alle vier Wochen passagiert (Daten nicht gezeigt). Trotz kontinuierlichem Selektionsdruck über mehrere Monate gelang es auch mit diesem Ansatz nicht, GT-Ereignisse mittels PCR zu detektieren.

GT-Experimente in Tabak

Wie oben beschrieben, konnten wir zeigen, dass die Exzision in unserem *GT*-Assay in *Arabidopsis* sehr effizient ist. Dagegen zeigten die Ergebnisse der histochemischen Färbung von Tabak-Pflanzen der F_1-Generation überraschenderweise nahezu keine apparenten Rekombinations-Ereignisse. Für die meisten der Linien konnten nur 0 – 1 Ereignis pro Pflanze nachgewiesen werden. In einigen wenigen Linien wurden bis zu 26 Exzisions-Ereignisse detektiert. Daher konnte darauf geschlossen werden, dass das Ausschneiden der *Targeting Sequenz* in Tabak den limitierenden Faktor darstellt. Auch in diesem Ansatz konnten – wie oben bereits für *Arabidopsis* beschrieben – keine Unterschiede bei der Exzision in Bezug auf die verwendeten I-*Sce*I-Promotoren gefunden werden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich zumindest partiell auf einen Positions-Effekt zurückführen, welcher sich durch die unterschiedliche Zugänglichkeit der I-*Sce*I-Erkennungs-Sequenzen im *Targeting Vektor* für die Meganuklease ausdrückt. Aus diesem

Grunde wurden Linien ausgewählt, welche die höchste Zahl an Exzisions-Ereignissen aufwiesen (Linien, welche mit *TV-2* bzw. *TV-6* gekreuzt worden waren). F_2-Nachkommen dieser Linien wurden auf MS-Medium mit Kanamycin zur Selektion von GT-Ereignissen angezogen. Hierbei konnten jedoch keine resistenten Pflanzen gefunden werden. Dies war wenig überraschend, da selbst die Vorfahren dieser Linien nur sehr wenige apparente Rekombinations-Ereignisse aufwiesen und es daher sehr unwahrscheinlich ist, dass zufällig eine solche Zelle in die Keimbahn eingeht.

Es konnte also für den *GT*-Ansatz in Tabak selbst mit allen getesteten Transgen-Kombinationen keine effiziente Exzision der *Targeting Sequenz* erreicht werden. Dies erklärt, weshalb auch keine *GT*-Ereignisse gefunden werden konnten. Die derzeit beste Begründung hierfür ist, dass die I-*Sce*I-Expression in allen Linien der limitierende Faktor ist. Daher wurden zwei Kontroll-Populationen ausgewählt (*TL* x *TV*), welche nach der I-*Sce*I-Expression die höchste Anzahl apparenter Rekombination-Ereignisse aufgewiesen hatten. Diese Pflanzen wurden für zwei Wochen angezogen und anschließend mit Agrobakterien inokuliert, um eine 2x35S-I-*Sce*I-Kassette stabil ins Genom der Pflanzen zu integrieren. Nach der Regeneration von für I-*Sce*I-Expressionskonstrukte transgenen Pflanzen wurden Blätter abgeschnitten und auf Kallus-induzierendes Medium mit Kanamycin zu Selektion überführt. Einige dieser Blättchen wurden zur Kontrolle der Exzisions-Effizienz einer histochemischen Färbung unterzogen. Hierbei wurde im Vergleich zum ursprünglichen Ansatz keine Zunahme der Exzisions-Effizienz gefunden. Folglich verhindert die extrem niedrige Exzisions-Effizienz in Tabak den Nachweis von *GT*-Ereignissen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der experimentelle Ansatz, unter welchem das hier dargestellte Vorhaben durchgeführt wurde, offensichtlich nicht zur effizienten und sequenzspezifischen Transgen-Integration ins Pflanzengenom geeignet ist.

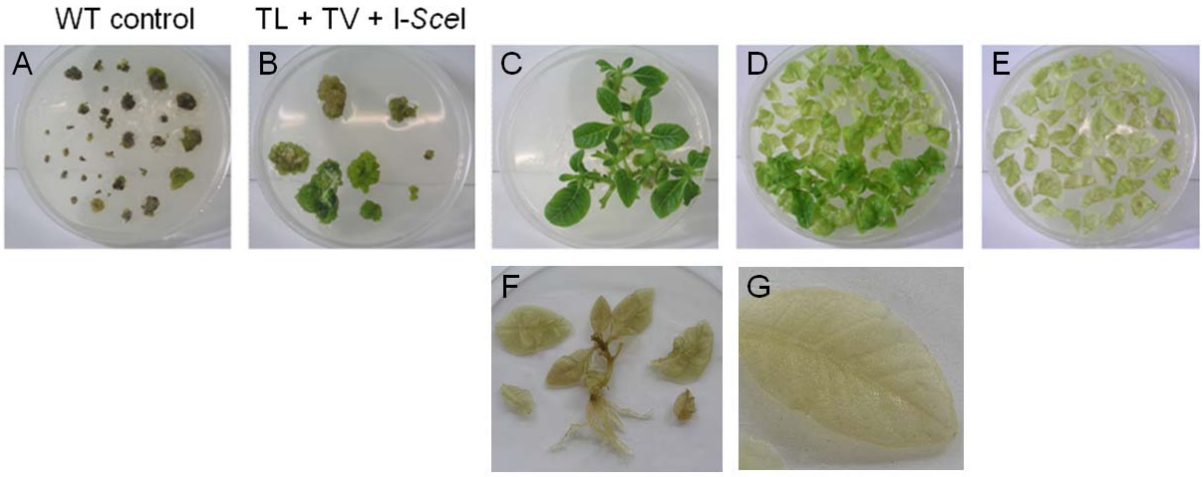

Abbildung 6: Tabak Zellkultur. Tabak-Linien, welche homozygot sowohl für den *Targeting Locus* als auch den *Targeting Vektor* waren, wurden mit einem 2x35S CaMV-I-*Sce*I Konstrukt retransformiert, um alle drei Transgene in ein und demselben Genom zu vereinen. Zunächst wurden für die I-*Sce*I-Expressionskassette transgene Kalli erhalten (A, B). Aus diesen wurden Pflänzchen regeneriert (C) und einige Zeit unter axenischen Bedingungen angezogen. Von diesen Pflänzchen wurden Blätter auf Zellkulturmedium mit Kanamycin überführt (D), um *Gene Targeting*-Ereignisse selektiv anreichern zu können. Nach mehreren Wochen konnten jedoch keine Kanamycin-resistenten Zellen gefunden werden (E). Daher wurde die Exzisions-Effizienz durch histochemische Färbung der Blätter kontroliert (F, G). Hierbei wurde gefunden, dass auch dieser Ansatz nicht zu einer Steigerung der Exzisionsrate in Tabak geeignet ist.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Insgesamt wurden in der dreijährigen Förderperiode Ausgaben von 317172.75 € abgerechnet. Dabei wurde 165.147.71 € für wissenschaftliches und 105.299,38 für technisches Personal aufgewendet (jeweils eine Stelle für die gesamte Förderperiode). Daneben wurden 45.000,00 € für Verbrauchsmaterial und für 1.725,66 € für Dienstreisen ausgegeben.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wie oben beschrieben ist es trotz unterschiedlicher Anstrengungen verschiedener Arbeitsgruppen weltweit noch nicht gelungen, für Pflanzen eine effiziente Technik zur zielgerichteten Transgen-Integration in das Genom zu etablieren. Da die Verwirklichung einer solchen Technik von immenser Bedeutung sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die angewandte Grüne Biotechnologie haben würde, ist die Etablierung und Validierung neuartiger Ansätze zur Beseitigung dieses Missstandes von erheblichem akademischen und wirtschaftlichem Interesse. In

diesem Zusammenhang sind die vom ZE verwendeten Zuwendungen - wie in der Vorhabensbeschreibung beschrieben - zweckdienlich eingesetzt worden. Auch ist die geleistete Arbeit in Bezug auf das Vorhaben trotz des ernüchternden Endergebnisses als angemessen zu bewerten: so konnte gezeigt werden, dass der vom ZE durchgeführte Ansatz im pflanzlichen Organismus nicht zu den selben Erfolgen führt, wie das in anderen experimentellen Systemen (Maus, Fruchtfliege) der Fall ist. Aufbauend auf dieser Erkenntnis lassen sich weitere Strategien entwickeln, um das ursprüngliche Ziel in künftigen Projekten zu erreichen.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die erhaltenen im technischen Sinne negativen Ergebnisse lassen kein Potenzial für eine Patentanmeldung erkennen.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens und bei anderen Stellen

Weltweit wurden während des gesamten Projekt-Zeitraumes keine vergleichbaren experimentellen Ansätze zu den in diesem Vorhaben angewandten verfolgt. Allerdings wurden in neuerer Zeit erhebliche Fortschritte unter Verwendung von "Zinkfinger"-Nukleasen zur Erzeugung ortsspezifischer Doppelstrangbrüche zwecks Integration transgener Sequenzen an unterschiedlichen Stellen ins Pflanzen-Genom erzielt (Lloyd *et al*., 2005; Wright *et al*., 2005). Die Erkennungssequenz der Nuklease wird hierbei durch die entsprechenden DNA-bindenden "Zinkfinger" Domänen definiert. Diese Domänen können jeweils durch relative aufwendige Vorexperimente für unterschiedliche Sequenzmotive konzipiert werden (Übersichten in: Durai *et al*., 2005; Papworth *et al*., 2005). So ist es im Prinzip möglich, an verschiedenen präderminierten Stellen im Genom Brüche zu erzeugen. Trotz Fortschritten auf diesem Gebiet besteht nach wie vor jedoch das Problem, dass diese Nukleasen auch unspezifisch im Genom schneiden, was neben Mutationen auch zu Letalität führen kann (Szczepek *et al*. 2007). Alternativ zu den „Zinkfinger“-Nukleasen wird ebenfalls seit einigen Jahren intensiv und mit ersten Erfolgen an der Herstellung und Anwendung maßgeschneiderter sequenzspezifischer Meganukleasen gearbeitet, um

ortsspezifische Rekombination zu induzieren (Bibikova *et al*., 2003; Chames *et al*., 2005; Arnould *et al*., 2006, 2007; Smith *et al*., 2006).

Ein weiterer Ansatz besteht wie oben beschrieben in der Veränderung der Enzymmaschinerie in Pflanzen zur Steigerung der Effizienz der homologen Rekombination und damit zur Begünstigung des „Gene Targeting". In der Tat konnte eine solche auf Stimulation der homologen Rekombination zurück zu führende Steigerung der „Gene Targeting"-Frequenz erstmals vor kurzem in der Arbeitsgruppe von Avi Levy (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) erzielt werden: Shaked *et al*. (2005) konnten durch die Überexpression des Rad54 Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* in *Arabidopsis* eine Steigerung der „Gene Targeting"-Frequenz um mehr als eine Größenordnung erreichen. Allerdings wurde die heterologe Expression des Rad54 Gens aus Hefe sehr effizient durch pflanzeneigene Enzyme abgeschaltet, so dass es inzwischen zweifelhaft erscheint, dass mit diesem Gen durch heterologe Überexpression eine generelle Verbesserung der „*Gene Targeting*"-Frequenz in Pflanzen erreicht werden kann (Avi Levy, persönliche Mitteilung). Generell erscheint die Strategie, durch die Expression von die homologe Rekombination fördernden Proteinen die „*Gene Targeting*"-Frequenz zu steigern, viel versprechend zu sein. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Überexpression pflanzeneigener Proteine im homologen Wirt nicht zu den für die heterologe Überexpression beobachteten Problemen führt.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die bezüglich des geplanten Vorhabens negativen Ergebnisse führten zu keinerlei Publikationen. Da der experimentelle Ansatz in künftigen Arbeiten nicht weiter verfolgt wird, ist auch in Zukunft nicht mit publizierbaren Daten zu rechnen.

Literatur

Arnould S., Chames P., Perez C., Lacroix E., Duclert A., Epinat J.C., Stricher F., Petit A.S., Patin A., Guillier S., Rolland S., Prieto J., Blanco F., Bravo J., Montoya G., Serrano L., Duchateau P. und Pâques F. (2006) Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J. Mol. Biol*. **355**, 443–458.

Arnould S., Perez C., Cabaniols J.P., Smith J., Gouble A., Grizot S., Epinat J.C., Duclert A., Duchateau P. und Pâques F. (2007) Engineered I-*Cre*I derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *J. Mol. Biol*. **371**, 49-65.

Bibikova M., Beumer K., Trautman J.K. und Carroll D. (2003) Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* **300**, 764.

Britt A.B. und May G.D. (2003) Re-engineering plant gene targeting. *Trends Plant Sci*. **8**, 90-95.

Chames P., Epinat J.-C., Guillier S., Patin A., Lacroix E. und Pâques F. (2005) *In vivo* selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. **33**, e178.

Chilton M.D., Epinat J.-C., Guillier S., Patin A., Lacroix E. und Pâques F. (2003) Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-strand breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol*. **133**, 956-965.

D'Halluin K., Vanderstraeten C., Stals E., Cornelissen M. und Ruiter R. (2008) Homologous recombination: a basis for targeted genome optimization in crop species such as maize. *Plant Biotech. J.* **6**: 93–102.

Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H. und Chandrasegaran S. (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. **33**, 5978-5990.

Gisler B., Salomon S. und Puchta, H. (2002) The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells. *Plant J.* **32**, 277-284.

Hohn B. und Puchta H. (1999) Gene therapy in plants. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8321-8323.

Hohn B. und Puchta H. (2003) Some like it sticky: gene targeting in rice. *Trends Plant Sci*. **6**, 155-159.

Kirik A., Salomon S. und Puchta H. (2000) Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. *EMBO J.* **19**, 5562-5566.

Kumar S. und Fladung M. (2001) Controlling transgene integration in plants. *Trends Plant Sci.* **6**, 155-159.

Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D. und Drews G.N. (2005) Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2232–2237.

Orel N., Kirik A. und Puchta H. (2003) Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J.* **35**, 604-612.

Ow DW. (2002) Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant. Mol. Biol.* **48**, 183-200.

Ow DW. (2007) GM maize from site-specific recombination technology, what next? *Curr. Opin Biotechnol.* **18**:115-120.

Pacher M., Schmidt-Puchta W. und Puchta H. (2007) Two unlinked double-strand breaks can induce reciprocal exchanges in plant genomes *via* homologous recombination and nonhomologous end joining. *Genetics* **175**, 21-29.

Papworth M., Kolasinska P. und Minczuk M. (2005) Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* **366**, 27-38.

Paszkowski J., Baur M., Bogucki A. und Potrykus I. (1988) Gene targeting in plants. *EMBO J.* **7**, 4021-4026.

Paszkowski J, Peterhans A, Bilang R und Filipowicz W (1992). Expression in transgenic tobacco of the bacterial neomycin phosphotransferase gene modified by intron insertions of various sizes. *Plant Mol. Biol.* **19**: 825–836.

Perrin A, Buckle M und Dujon B (1993). Asymmetrical recognition and activity of the I-*Sce*I endonuclease on its site and on intron-exon junctions. *EMBO J.* **12**: 2939–2947.

Puchta H., Dujon B. und Hohn B. (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5055-5060.

Puchta H. (1999) Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* **152***,* 1173-1181.

Puchta H. (2002) Gene replacement by homologous recombination in plants. *Plant Mol. Biol.* **48**, 173-182.

Puchta H. (2003) Towards the ideal GMP: Homologous recombination and marker gene excision. *J. Plant Physiol*. **160**, 743-754.

Puchta H. (2005) The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J. Exp. Bot.*, **56**: 1- 14.

Reiss B., Schubert I., Köpchen K., Wendeler E., Schell J. und Puchta H. (2000) RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3358-3363.

Reiss B (2003). Homologous recombination and gene targeting in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **228**: 85–139.

Reski R. (1998) *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends Plant Sci.* **3**, 209-210.

Rong Y.S. und Golic K.G. (2000) Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* **288**, 2013-2018.

Salomon S. und Puchta H. (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* **17**, 6086-6095.

Shaked H., Melamed-Bessudo C. und Levy A.A. (2005) High-frequency gene targeting in *Arabidopsis* plants expressing the yeast RAD54 gene *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**,12265-12269.

Shalev G., Sitrit Y., Avivi-Ragolski N., Lichtenstein C. und Levy A.A. (1999) Stimulation of homologous recombination in plants by expression of the bacterial resolvase RuvC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7398-7402.

Siebert, R. und Puchta, H. (2002) Efficient repair of genomic double-strand breaks *via* homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* **14**, 1121-1131.

Schaefer D.G. und Zryd J.P. (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **11**, 1195-1206.

Smith J., Grizot S., Arnould S., Duclert A., Epinat J.C., Chames P., Prieto J., Redondo P., Blanco F.J., Bravo J., Montoya G., Pâques F. und Duchateau P. (2006) A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, e149.

Strepp R., Scholz S., Kruse S., Speth V. und Reski R. (1998) Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division fort he homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4368-4373.

Szczepek M., Brondani V., Buchel J., Serrano L., Segal D.J. und Cathomen T. (2007) Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **25**, 786-793.

Taubes G. (2002) The strange case of chimeraplasty. *Science* **298**, 2116-2002.

Thomson J.G, Ow D.W. (2006) Site-specific recombination systems for the genetic manipulation of eukaryotic genomes. *Genesis* **44**: 465-476.

Thomson J.G., Yau Y.Y., Blanvillain R., Chiniquy D., Thilmony R., Ow D.W. (2008) ParA resolvase catalyzes site-specific excision of DNA from the Arabidopsis genome. *Transgenic Res.* Epub ahead of print.

Wright D., Townsend J., Winfrey R., Irwin P., Rajagopal J., Lonosky P., Hall B., Jondle M. und Voytas D. (2005) High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*. **44**, 693–705.

III. Erfolgskontrollbericht

ZE: Universität Karlsruhe (TH) Botanisches Institut II	Förderkennzeichen: 0313264R
Vorhabenbezeichnung: Optimierung der biologischen Sicherheit transgener Pflanzen	
Teilprojekt 2.2: Sequenzspezifische Integration und Eliminierung von Transgen-Sequenzen durch die *in vivo* Produktion von linearen DNA-Molekülen im generativen Pflanzengewebe	
Laufzeit des Vorhabens: 1. April 2005 bis 31. März 2008 (verlängert bis 30.06.2008)	

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen

Das Ziel des Vorhabens war die Etablierung einer neuartigen Methode zur kultursortenunabhängigen, effizienten und sequenzspezifischen Transgen-Integration ins Pflanzengenom. Eine solche Technik wäre für die pflanzliche Biotechnologie von erheblicher Bedeutung. Die Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens machen deutlich, dass die mit einem vergleichbaren Ansatz bei der Fruchtfliege *Drosophila* erzielten Erfolge hinsichtlich der gezielten Transgen-Integration nicht ohne Weiteres auf den Organismus Pflanze übertragen werden können. So konnten wir eindeutig zeigen, dass die *in vivo* Freisetzung linearer DNA-Moleküle mit Hilfe selten schneidender Endonukleasen sehr effizient möglich ist. Offensichtlich ist das Vorhandensein eines solchen Substrates für die Rekombinationsmaschinerie in den verwendeten Versuchspflanzen jedoch nicht geeignet, um dieses effizient an einer vorherbestimmten Stelle andernorts im Genom mittels homologer Rekombination zu integrieren. Somit wurden die förderpolitischen Ziele dieses Vorhabens nicht erreicht.

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens, erreichte Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen

Im Rahmen des abgeschlossenen Forschungsvorhabens konnten wir eindeutig zeigen, dass die Freisetzung linearer DNA-Moleküle aus dem *Arabidopsis*-Genom sehr effizient möglich ist. Eine Reintegration dieses Moleküls mittels homologer Rekombination zwecks ortsspezifischer Transgen-Integration war jedoch zu ineffizient, um detektiert werden zu können. Dagegen scheint im Falle der verwendeten Spezies Tabak bereits die Freisetzung des linearen DNA-Moleküls ein

limitierender Faktor zu sein. Zusammenfassend zeigt dies, dass die Übertragung der von für die Fruchtfliege *Drosophila* gefundenen sehr effizienten Möglichkeiten zur Durchführung des *Gene Targeting* nicht ohne Weiteres auf Pflanzen übertragen werden können. Somit sollten künftig andere Ansätze zur Verwirklichung des förderpolitischen Ziels verfolgt werden, um diese Technik auch für Pflanzen zur Verfügung zu stellen.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Das im technischen Sinne negative Ergebnis dieses Forschungsvorhabens erlaubt keinerlei Anmeldung von Erfindungen oder Patenten und lässt keine weiteren Verwertungsmöglichkeiten erkennen.

Da der im Rahmen des Forschungsvorhabnes verfolgte Ansatz nicht weiter verfolgt wird, bestehen weder wissenschaftliche noch wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende.

Eine Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase zur Umsetzung dieser Ergebnisse ist insofern gegeben, als das künftig andere Ansätze zur Erreichung des angestrebten Ziels, der gezielten Gen-Integration ins Pflanzengenom verfolgt werden können.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Abweichend von der ursprünglichen Planung wurden nach Erhalt der ersten – negativen – Ergebnisse bezüglich *Gene Targeting* Ereignissen im Rahmen des geplanten Projektablaufes für beide Versuchsorganismen neue Ansätze unter Verwendung von Zellkulturen entwickelt. Jedoch konnte auch hierbei kein Erfolg in Bezug auf die förderpolitischen Ziele dieses Vorhabens erreicht werden.

5. Präsentationsmöglichkeiten

Das Forschungsvorhaben wurde projektbegleitend und wird auch nach Abschluss des Vorhabens auf der Webseite www.biosicherheit.de aktuell und umfassend dargestellt.

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Das Forschungsvorhaben wurde nach Absprache mit dem Projektträger drei Monate verzögert begonnen bzw. abgeschlossen, da die mit der Durchführung der Arbeiten betrauten Mitarbeiter erst drei Monate nach offiziellem Projektbeginn zur Verfügung standen (kostenneutrale Verlängerung). Die Zeitplanung wurde gemäß der Vorhabensskizze eingehalten, wenngleich die molekularbiologische Analyse von *Gene Targeting*-Ereignissen auf Grund der im wissenschaftlichen und technischen Sinne negativen Ergebnisse ersetzt wurde durch die Planung und Durchführung alternativer Ansätze (Zellkulturen).

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart **Schlussbericht**

3a. Titel des Berichts
„Optimierung der biologischen Sicherheit transgener Pflanzen - Sequenzspezifische Integration und Eliminierung von Transgen-Sequenzen durch die *in vivo* Produktion von linearen DNA-Molekülen im generativen Pflanzengewebe“

3b. Titel der Publikation

4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n))
Puchta, Holger
Pacher, Michael

4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))

5. Abschlussdatum des Vorhabens
Juni 2008

6. Veröffentlichungsdatum
- keine -

7. Form der Publikation
-

8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)

Universität Karlsruhe (TH)
Botanisches Institut II
Fritz-Haber-Weg 4
76131 Karlsruhe
Tel.: 0721-608-3833
Fax: 0721-608-4874

9. Ber. Nr. Durchführende Institution
- keine -

10. Förderkennzeichen *) **0313264R**

11a. Seitenzahl Bericht
18

11b. Seitenzahl Publikation
- - -

12. Literaturangaben
43

13. Fördernde Institution (Name, Adresse)

Bundesministerium für
Bildung und Forschung (BMBF)

53170 Bonn

14. Tabellen
0

15. Abbildungen
6

16. Zusätzliche Angaben **- keine -**

17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)
- - -

18. Kurzfassung

Das Ziel des Vorhabens war die Etablierung und Optimierung einer neuartigen Methode zur kultursortenunabhängigen, effizienten und sequenzspezifischen Transgen-Integration ins Pflanzengenom, welche für die pflanzliche Biotechnologie von erheblicher Bedeutung wäre, da die bei tierischen Organismen eingesetzte *„Gene Targeting“*-Technik bis heute in Pflanzen nicht erfolgreich angewandt wird. Das angestrebte Verfahren kombiniert dabei früher etablierte Techniken zur *in vivo*-Freisetzung von Markergenen durch die Aktivität einer hoch-spezifischen molekularen Schere, der Restriktionsmegaendonuklease I-*Sce*I, mit einem für die Fruchtfliege *Drosophila* erfolgreich etablierten Verfahren zur gezielten Transgen-Integration. Zur Etablierung des experimentellen Systems wurden Pflanzentransformationsvektoren kloniert, welche einen *Targeting Locus* (TL), einen *Targeting Vektor* (TV) bzw. I-*Sce*I-Expressionskassetten enthielten. Das *TV*-Konstrukt besteht aus einer von zwei I-*Sce*I-Schnittstellen flankierten *Targeting-Sequenz*, welche ein β-Glucuronidase-Reportergen (GUS) in zwei Hälften unterbricht, die partiell homologe Sequenzabschnitte zueinander aufweisen. Eine I-*Sce*I-vermittelte Exzision dieser linearen *Targeting-Sequenz* kann sehr einfach durch die Reparatur des dabei entstehenden Doppelstrangbruches (DSBs) mittels homologer Rekombination nachgewiesen werden, da dabei das GUS-Reportergen restauriert wird. Die daraus resultierende Aktivität der *β-Glucuronidase* lässt sich durch eine histochemische Färbung nachweisen. Die *Targeting Sequenz* sollte anschließend durch homologe Rekombination in den *Target Locus* integriert werden und hierbei zur Entstehung eines vollständigen Kanamycin-Resistenzgens führen, auf welches selektiert werden kann. Es wurden für *TV* und *TL* transgene *Arabidopsis*- und Tabak-Linien etabliert und mit Hilfe molekularbiologischer Techniken hinsichtlich einzelner und vollständig intakter Kopien der Konstrukte charakterisiert. Die *TL*-Linien wurden anschließend mit I-*Sce*I-Expressionslinien gekreuzt, welche das Gen für die Meganuklease unter der Kontrolle verschiedener Promotoren enthielten, um eine DSB-Induktion konstitutiv, im generativen Gewebe bzw. während der Meiose zu gewährleisten. Die *TL*--I-*Sce*I-Linien wurden dann mit *TV*-Linien gekreuzt, um die lineare T*argeting-Sequenz in vivo* freizusetzen. Mehrere Folgegenerationen dieser Experimente wurden sowohl hinsichtlich der Exzisions-Effizienz als auch in Bezug auf *Gene Targeting*-Ereignisse (*GT*) untersucht. Die Exzision in *Arabidopsis* war sehr effizient – jedoch konnten keine *GT*-Ereignisse detektiert werden. Dies gilt ebenfalls für den experimentellen Ansatz in Tabak, bei welchem die Exzision der linearen *Targeting Sequenz* den limitierenden Faktor darstellte.

19. Schlagwörter
Gene Targeting, Homologe Rekombination, Doppelstrangbruch-Reparatur, Markergen-Exzision, I-*Sce*I, *Arabidopsis*, Tabak

20. Verlag **- - -**	21. Preis **- - -**

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.