

Pressemitteilung

Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

Dr. Jan-Wolfhard Kellmann

02.02.2012

<http://idw-online.de/de/news461764>

Forschungsergebnisse, Wissenschaftliche Publikationen
Biologie
überregional



Gelbe Biotechnologie: Insekten-Gene im Hochdurchsatz mithilfe von Futterpflanzen erforschen

Durch Verwendung viraler Vektoren können mittels RNAi Genfunktionen in Insekten innerhalb kurzer Zeit studiert werden

Gelbe Biotechnologie ist die Biotechnologie mit Insekten, analog zur grünen (Pflanze) und roten (Tiere) Biotechnologie. Wirkstoffe oder Gene aus Insekten werden charakterisiert und können für die Forschung oder die Anwendung in Landwirtschaft oder Medizin eingesetzt werden. Wissenschaftler des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie, Jena, verwenden jetzt ein Verfahren, mit dem sie die ökologische Forschung an Insekten voranbringen: Sie studieren Genfunktionen in Mottenraupen, indem sie mithilfe der RNA-Interferenz-Technologie (RNAi) Gene gezielt beeinflussen. RNAi wird induziert durch Raupenfraß an Pflanzen unter Verwendung viraler Vektoren. Die neue Methode, genannt "plant virus based dsRNA producing system" (VDPS), erlaubt einen höheren Probendurchsatz verglichen mit der Verwendung gentechnisch veränderter Pflanzen.

Natürliches Gift gegen Insektenfraß

Über 200.000 Insektenarten sind Pflanzenschädlinge. Sie sind auf das Grünfutter angewiesen und haben im Lauf der Evolution ihren Stoffwechsel darauf eingestellt, pflanzliche Schutzvorkehrungen - meist Giftstoffe, mit denen sie die Schädlinge loswerden wollen - wirkungslos zu machen. Die Betriebsanweisungen solcher Entgiftungsverfahren sind in verschiedenen Genen verborgen. Insekten haben eine enorme Vielfalt an Anpassungsmechanismen entwickelt und besetzen daher fast alle Lebensräume auf diesem Planeten - was sie für ökologische Studien interessant macht. Welche Insektenart befällt welche Pflanzenart? Welche Gift- oder Signalstoffe spielen eine Rolle? Ist das Insekt an bestimmte Arten angepasst oder nutzt es unterschiedliche Pflanzenspezies? Für die Landwirtschaft ist interessant: Welche Gene sind es, dank derer sich Schädlinge wie beispielsweise Rapsglanzkäfer oder Maiswurzelbohrer auf ihren Wirtspflanzen so verheerend schadlos halten können? Die Kenntnis und das gezielte Abschalten solcher Entgiftungs-Gene mit der Folge, dass die Pflanzentoxine gegen den Schädling wirken können, ist bereits Forschungsgegenstand in der Pflanzenzüchtung. Erste Erfolge wurden schon vermeldet - dank Einsatz der RNAi-Technologie.

Wissenschaftler des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie widmen sich einem bekannten pflanzlichen Giftstoff: Nicotin. Pflanzen der Art *Nicotiana attenuata* (Kojotentabak) setzen Nicotin gegen Fraßschädlinge ein, jedoch wirkt es nicht gegen ihren ärgsten Feind: die Raupen des Tabakswärmers *Manduca sexta*. Das Insekt ist gegen das Alkaloid resistent, verantwortlich dafür sind Gene, die Nicotin abbauende Enzyme kodieren. Hierbei könnte es sich um so genannte CYP-Gene handeln, die für die Bildung von Cytochrom P450 Enzymen zuständig sind, denn deren Expression ist erhöht, sobald sich das Insekt dem Nicotin in seiner Nahrung aussetzt. Ian Baldwin und sein Team kennen die DNA-Sequenzen der CYP-Gene aus *Manduca sexta* und waren damit in der Lage, mithilfe der RNAi Technik diese Gene in den Raupen abzuschalten, indem sie CYP-Sequenzen in Pflanzen exprimierten und diese den Raupen als Nahrung anboten.

Insektengene abschalten durch Pflanzen

Die zum Abschalten von CYP Genen in Raupen erforderliche RNA-Interferenz (RNAi) wurde ausgelöst, indem rund 300 Basenpaare umfassende doppelsträngige RNA (dsRNA) in den Zellen von Tabakpflanzen gebildet wird. Durch Fressen an diesen Pflanzen gelangte die RNA in den Darm der Raupen. In den Experimenten trug die dsRNA Gen-Sequenzen von CYP6B46, einer speziellen Cytochrom P450 Oxidoreduktase des Tabakschwärmers. Die dsRNA wird im nächsten Schritt enzymatisch in kleine RNA-Abschnitte zerlegt, und ein spezieller Enzymkomplex namens RISC ("RNA-induced silencing complex"), der einzelne dieser RNA-Abschnitte aufnimmt, bindet an die Boten-RNA (mRNA) des CYP6B46-Gens und zerlegt sie derart, dass das Cytochrom P450-Enzym nicht mehr gebildet werden kann. "Wir waren begeistert von der hohen Spezifität dieser RNAi-Experimente. Denn die Überprüfung der mRNA Transkriptmengen eng verwandter CYP6-Gene ergab, dass ausschließlich das CYP6B46-Gen 'gesilenced', also abgeschaltet worden war. RNAi zeigte keinerlei Kollateralschäden", so Baldwin.

Interessant waren die Ergebnisse nach Verwendung verschiedener CYP-RNAi-Sonden: Junge Raupen, die dsRNA des Gens CYP4M3 mit der Nahrung aufgenommen hatten, nahmen innerhalb von 14 Tagen signifikant weniger an Gewicht zu als Raupen, die auf Vergleichspflanzen geschlüpft waren - wahrscheinlich eine Folge des Nicotiningifts, dessen Wirkung durch das Abschalten des CYP-Gens wieder hergestellt worden war. Diese RNAi-Experimente waren mithilfe pflanzenviraler Vektoren durchgeführt worden. Im Gegensatz zu gentechnisch veränderten Tabakpflanzen, in denen CYP-dsRNA konstitutiv, also ständig erzeugt wird, wird mit der Vektor-Methode die dsRNA in Wildtyp-Tabakpflanzen transient, also nur übergangsweise, erzeugt. Beide Methoden erwiesen sich als praktikabel, wobei allerdings das "plant virus based dsRNA producing system (VDPS) einen viermal schnelleren Durchsatz von RNAi-Proben erlaubt. Mit der Etablierung der VDPS-Methode können jetzt viele noch unbekannte Funktionen verschiedener Insektengene, die für die Anpassung der Tiere an ihre Umwelt eine Rolle spielen, untersucht werden.

Noch unklar ist, wie genau die einzelnen Schritte des hier verwendeten RNAi-Mechanismus, angefangen durch Erzeugung von dsRNA in den Pflanzenzellen über deren Aufnahme in den Insektendarm beim Fressen der Blätter bis hin zum Abschalten von Entgiftungsgenen ablaufen müssen, um eine optimale Wirkung hervorzurufen. Ein Experiment lieferte Hinweise: Wird in Versuchspflanzen der enzymatische Schritt, der die dsRNA in kleine Abschnitte zerteilt, unterbunden, ist die Transkriptmenge des Entgiftungsgens stärker reduziert. Das "plant virus based dsRNA producing system" wirkt in Mottenraupen demnach besser, wenn diese die komplette, noch unzerteilte dsRNA in ihren Darm befördern, von wo aus dann der RNAi-Mechanismus startet. [JWK]

Originalveröffentlichung:

Kumar, P., Pandit, S.S., Baldwin, I.T.: Tobacco Rattle Virus vector: A rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. PLoS ONE, DOI: 10.1371/journal.pone.0031347

Weitere Informationen:

Prof. Dr. Ian T. Baldwin: baldwin@ice.mpg.de, Tel.: +49 3641 75 1101

Bildmaterial:

Angela Overmeyer M.A., Tel. 03641 - 57 2110, overmeyer@ice.mpg.de
oder per Download via <http://www.ice.mpg.de/ext/735.html>



Die nicotinresistente Raupe des Tabakswärmers *Manduca sexta* ist dank eines neuen, auf RNAi basierenden Verfahrens nun Versuchsobjekt für die Erforschung noch unbekannter Gen-Funktionen von Motten.
Jan-Peter Kasper (mit freundlicher Genehmigung)