

Schoten dicht

Erzeugung von Ölraps mit erhöhter Schotenplatzfestigkeit

Raps ist in unseren Breitengraden die bedeutendste Ölpflanze. Landwirte beklagen jedoch große Vorernteverluste, weil viele Rapsschoten zu früh aufplatzen und die wertvollen Samen auf dem Feld verteilen. Forschenden der Universität Kiel ist es gelungen, mit Hilfe von Genomeditierung platzfestere Rapsschoten zu erzeugen.

Foto: © Janina Braatz

Goldgelb leuchtende Blüten, dazu der intensive Geruch. Ein Rapsfeld erkennt man sofort. Die Pflanzen mit den winzigen schwarzen Samenkörnern sind hierzulande wichtige Öllieferanten. Oft sieht man auch zwischen den noch grünen Ähren von

Weizen und Roggen, Gerste und Triticale gelbe Rapsblüten leuchten. Auf diesen Feldern haben sie eigentlich nichts zu suchen. Wie sind sie dorthin gekommen?

„Schuld daran sind Rapsschoten, die noch vor der Ernte die Samen freilassen“, erklärt Janina Braatz. Die Biologin hat sich während ihrer Doktorarbeit an der Christi-

an-Albrechts-Universität zu Kiel mit diesem Problem beschäftigt. Denn für die Landwirtschaft bedeutet das erhebliche Ernteeinbußen.

Aktuell sieht die Lage so aus: Etwa fünf Prozent aller Rapsschoten öffnen sich vorzeitig. Im Extremfall können es auch 25 Prozent sein. Die darin befindlichen Samen fallen auf den Acker und bleiben bis zu 15 Jahre lang keimfähig. „Wenn ein Landwirt eine neue Rapssorte anbauen möchte, die sich in der Qualität von der vorherigen unterscheidet, sind diese Durchwuchspflanzen ein großes Problem“, sagt Braatz. Eine sortenreine Ernte ist unmöglich.

Steigende Temperaturen begünstigen ein frühes Aufplatzen der Schoten noch. Da es im Zuge des Klimawandels auch bei uns immer wärmer wird, dürfte sich das Problem in Zukunft verstärken. Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler arbeiten deshalb daran, Raps mit platzfesteren Schoten zu züchten.

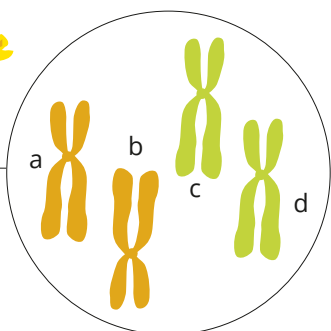
Wann sich eine Schote öffnet, wird von unterschiedlichen Genen bestimmt. Eines davon heißt Alcatraz (ALC). Es ist für die Ausbildung einer Trennschicht verantwortlich, die jede Schote in zwei Samenkammern aufteilt. Ist die Schote reif, kann sie dank dieser Trennschicht leichter aufplatzen.

Das Ziel von Janina Braatz und ihrem Team war es daher, das Alcatraz-Gen aus-

Raps



tetraploider Chromosomensatz mit vier Kopien des Alcatraz-Gens



+ CRISPR/Cas



Original	ACGCCGCTTGTG
Deletion - 2bp	ACGCCGC--GTG
Deletion - 7bp	ACG-----TG
Insertion + 1bp	ACGCCGCTTGGTG
Deletion - 1bp	ACGCCGCTT-TG

In den vier Genkopien hatte CRISPR/Cas einen Doppelstrangbruch erzeugt, der fehlerhaft repariert wurde. Es kann kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet werden. © GENOMXPRESS SCHOLÆ



Foto: © Janina Braatz

Regeneration von Rapsprossen in der Petrischale nach CRISPR/Cas-Mutagenese.

zuschalten. Die besondere Herausforderung dabei: Raps ist eine tetraploide Pflanze, besitzt also einen vierfachen Chromosomensatz. Auch das Alcatraz-Gen ist gleich vier Mal im Genom vorhanden. Je zwei homologe Kopien unterscheiden sich nur in einem Basenpaar.

Genomeditierung vs. chemische Mutagenese

Die Wissenschaftlerin Janina Braatz wendete zwei verschiedene Methoden an, um Alcatraz abzuschalten. Einerseits versuchte sie es mit herkömmlicher chemischer Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS), andererseits testete sie die Genomeditierung mit CRISPR/Cas. „Beides hat funktioniert, aber der Weg über CRISPR/Cas war wesentlich einfacher und schneller“, sagt die Biologin.

Die chemischen Mutagenese mit EMS hat schätzungsweise 100 000 Mutationen pro Pflanze verursacht, wild verteilt über das gesamte Genom. Viele dieser Mutationen haben gute Gene getroffen und ausgeschaltet. Die Folge: Einige Pflanzen waren zwergwüchsig, andere Albinos ohne den grünen Pflanzenfarbstoff Chlorophyll. Wieder andere bildeten fehlerhafte Blütenstände aus.

Als erstes musste Janina Braatz die Pflanzen identifizieren bei denen rein zufällig das Alcatraz-Gen mutiert ist. Anschließend kreuzte sie diese Pflanzen sechs Mal mit gesunden Rapsorten, um

einen Großteil der unerwünschten Mutationen wieder aus dem Genom zu entfernen. Da jedoch bei jeder Kreuzung die Gene der Elternpflanzen zufällig auf die Nachkommen verteilt werden, besteht immer die Gefahr, dass auch das veränderte Alcatraz-Gen verschwindet.

Mit Hilfe von Genomeditierung mit CRISPR/Cas hingegen war es ihr möglich, von Anfang an nur die eine erwünschte Mutation im Rapsgenom zu erzeugen. Dafür sorgt die sgRNA, welche die Endonuklease Cas an die richtige Stelle im Genom leitet.

Anforderungen an die perfekte sgRNA:

- Etwa 20 Nukleotide lang
- in der Nähe einer PAM-Sequenz
- möglichst perfekte Basenpaarung mit der Zielsequenz in der DNA
- wenig Homologie zu anderen DNA-Abschnitten, da sonst unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können

Da die beiden homologen Alcatraz-Gene nicht identisch sind, entwickelte Janina Braatz eine sgRNA, die einmal exakt und einmal mit 95-prozentiger Genauigkeit an den entsprechenden Genabschnitt bindet. Mit Hilfe dieser sgRNA gelang es ihr, in einer Pflanze gleichzeitig alle vier Kopien des Alcatraz-Gens auszuschalten.

Vier Genkopien auf einen Streich

In allen vier Genkopien hatte CRISPR/Cas einen Doppelstrangbruch erzeugt, der von den Reparaturenzymen fehlerhaft geflickt

worden war. Genauere genetische Analysen zeigten Folgendes: In drei Allelen kam es zu Deletionen von ein, zwei beziehungsweise sieben Basenpaaren. Das vierte Allel erhielt eine Insertion von einem Basenpaar. Alle diese Fehler hatten den gleichen Effekt. Das Ableseraster des Alcatraz-Gens verschob sich. Es konnte kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet werden. Und es kommt noch besser: CRISPR/Cas hat wirklich nur diese Veränderung bewirkt und keine einzige unerwünschte Mutation ausgelöst.

Blieb noch zu klären, ob die alc-Pflanzen tatsächlich platzfestere Schoten produzierten als Wildtyp-Pflanzen. Versuche im Gewächshaus zeigten, dass bei Schoten mit einer Länge zwischen drei und fünf Zentimetern kein Unterschied bestand. Doch sobald die Schoten länger sind als fünf Zentimeter, waren die Schoten der alc-Mutanten platzfester. „Dieses Ergebnis freut uns, denn Raps produziert im Feld sowieso meist solche längeren Schoten“, erklärt Janina Braatz.

Ein Problem gilt es noch zu lösen: Die DNA für den CRISPR/Cas-Komplex wurde mit Hilfe eines DNA-Rings, Plasmid genannt, in die Pflanzen eingebracht. Teile der Plasmid-DNA, auch Plasmid-Rückgrat genannt, haben sich in das Rapsgenom integriert. Die Pflanzen mit defektem Alcatraz-Gen können daher nicht als transgenfrei klassifiziert werden. Durch Kreuzungen mit herkömmlichen Rapsorten kann die Plasmid-DNA wieder aus dem Rapsgenom entfernt werden. Daran arbeiten die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler der Universität Kiel zurzeit.



Arbeitsaufträge

1. Überlegen Sie, weshalb es eine besondere Herausforderung ist, ein Gen beim Raps zu mutieren.
2. Recherchieren Sie, was es bedeutet, ein Gen „abzuschalten“.
3. Vergleichen Sie das Mutieren und damit Abschalten des Alcatraz-Gens im Raps (a) mit Hilfe der chemischen Mutagenese durch Ethylmethansulfonat (EMS) und (b) mit Hilfe der Genomeditierung.
4. Warum sind die mit Hilfe von CRISPR/Cas entstandenen Rapspflanzen transgen? Weshalb sind es die Pflanzen, die durch chemische Mutagenese mit EMS entstanden sind aber nicht? Diskutieren Sie mit der Klasse, wie sinnvoll Sie diese Unterscheidung finden.