

Stumpfe Scheren und präzise Werkzeuge

Der Werkzeugkasten für Genomeditierung wächst stetig

Foto: © MIKI Yoshihito/ wikimedia.org/ CC BY 2.0

Genomeditierung ist eine revolutionäre Methodik. Anstatt wie bisher aus zufällig erzeugten Mutationen die wenigen sinnvollen herauszupicken, können jetzt gezielt Eingriffe im Erbgut vorgenommen werden. Die Werkzeuge dafür werden immer präziser.

Ein bisschen kann man sich die Genomeditierung vorstellen wie das Finden und Ersetzen von Wörtern in einem langen Text. Im Fall von pflanzlicher DNA handelt es sich häufig um einen sehr, sehr langen Text.

Möchte man ein Gen gezielt verändern, muss man es zunächst finden und dann die DNA an dieser Stelle schneiden. Dieser Doppelstrangbruch ruft die zell-eigenen Reparaturenzyme auf den Plan. Sie erkennen den Schaden und machen sich daran, die DNA-Stränge wieder zu verknüpfen. Dabei treten manchmal Fehler wie Insertionen oder Deletionen auf. Dadurch verändert sich das Gen oder verliert seine Funktion.

Es gibt unterschiedliche Enzymkomplexe, die sich zur Erzeugung von Doppelstrangbrüchen und damit zur Genomeditierung eignen. Die verbreitetsten heißen Zinkfinger-nukleasen (ZFN), TALEN und CRISPR/Cas. Ihnen ist gemein, dass sie sich im Labor darauf programmieren lassen, eine beliebige DNA-Sequenz zu erkennen. Das ist die Voraussetzung dafür, dass die DNA an der richtigen Stelle ge-

schnitten wird. Die Systeme unterscheiden sich jedoch darin, wie sie die Zielsequenz in der DNA erkennen und wo genau sie das Erbgut schneiden. Zinkfinger-nukleasen, TALEN und CRISPR/Cas zählen zu den sogenannten ortsspezifischen Nukleasen, die jeweils aus zwei Elementen bestehen. Ein Element des Systems erkennt die zu verändernde Zielsequenz, ein zweites schneidet das Erbgut an eben dieser Stelle.

Zinkfinger-nukleasen

Zinkfinger-nukleasen (ZFN) sind Proteine, die aus mehreren Untereinheiten (Domänen) bestehen: den Zinkfingern und einer Nuklease. Die Zinkfinger sind dafür verantwortlich, die Zielsequenz zu erkennen und zu binden. Da ein einzelner Zinkfinger nur drei Basen erkennen kann, werden mehrere (meist drei) Zinkfinger hintereinander gekoppelt. Das erhöht die Genauigkeit, denn je mehr Basen das Enzym erkennt, desto wahrscheinlicher ist es, dass es an der richtigen Stelle andockt.

Die Nuklease Fok1 ist für das Schnei-

den verantwortlich. Sie wird aktiv, sobald sie dimerisiert. Das bedeutet: Erst wenn an beide DNA-Strängen eine Zinkfinger-nuklease gebunden hat, schneiden die Fok1-Domänen ihren Strang durch. Dabei entstehen überhängende Enden von vier Basenpaaren Länge.

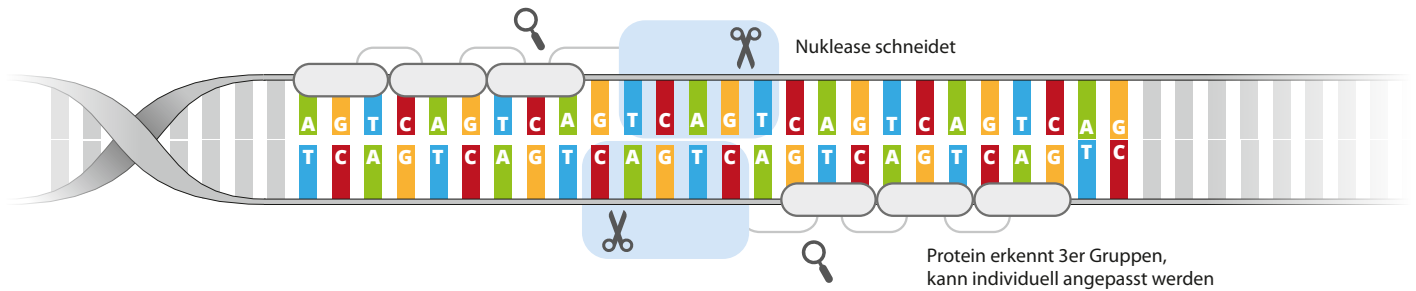
Mit Hilfe von Zinkfinger-nukleasen wurden bereits erfolgreich die Genome der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-schmalwand), von Mais und von Tabak verändert.

TALEN

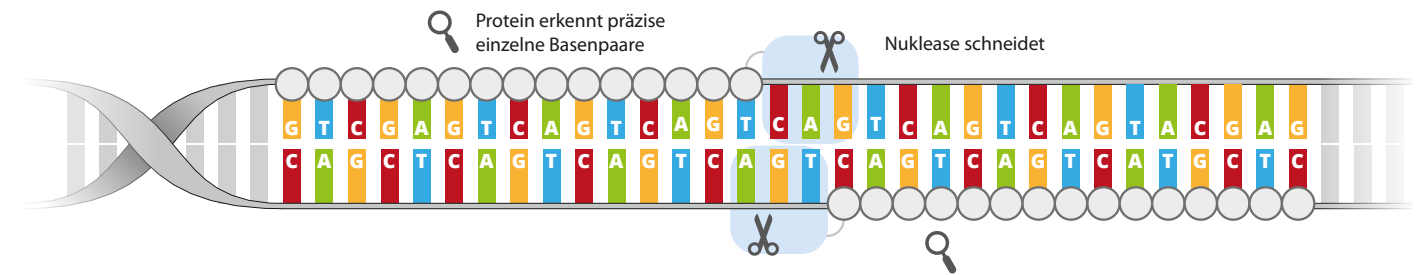
TALEN ähneln den Zinkfinger-nukleasen. Auch sie erkennen eine bestimmte DNA-Sequenz mit Hilfe von Proteinen. Diese Proteine namens TALE stammen ursprünglich aus *Xanthomonas*-Bakterien, die damit den Stoffwechsel von Wirtspflanzen beeinflussen können.

Jedes TALE-Protein bindet an eine einzelne DNA-Base. Um eine ausreichende Spezifität bei der Bindung zu erreichen, werden 15 bis 20 TALE-Domänen aneinandergesetzt. Am Ende des Strangs sitzt wieder die Nuklease Fok1, die einen Schnitt mit überhängenden Enden erzeugt.

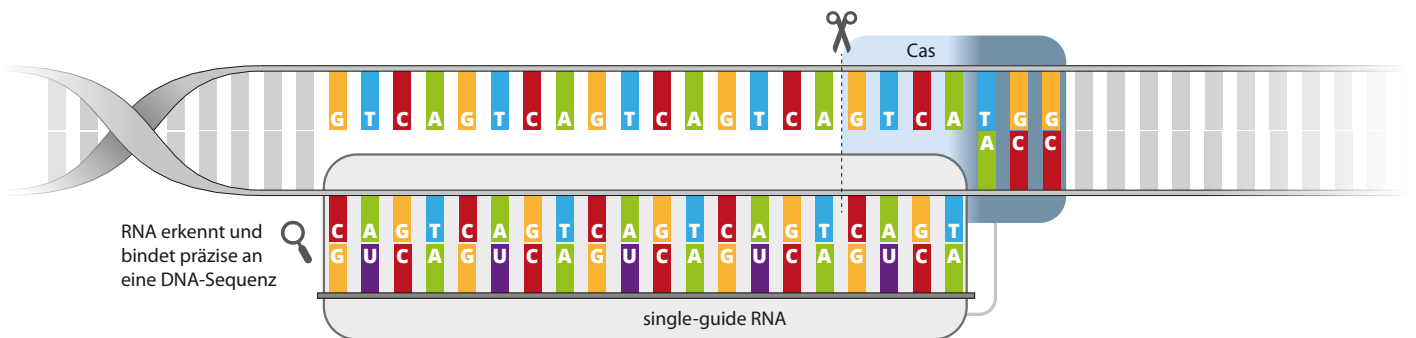
Vergleichende Studien haben gezeigt, dass TALEN im Vergleich zu ZFN effizienter sind. Wissenschaftler haben mit der Technik bereits gezielte Veränderungen in Pflanzen wie Sojabohne, Mais und Tabak vorgenommen.



Zinkfingernukleasen (ZFNs) bestehen aus zwei getrennten Elementen. Die Zinkfingerproteine erkennen spezifisch die zu verändernde Erbgutsequenz in Blöcken von drei Basen. Das zweite Element, eine unspezifische zusätzlich angehängte Nuklease, schneidet diese Sequenz. Da die Nuklease nur als Paar schneidet, sind immer zwei ZFNs nötig, um eine Sequenz im Erbgut anzusteuern und zu schneiden. © GENOMXPRESS SCHOLÆ



Transcription Activator Like Effector Nucleasen (TALEN) sind den ZFNs sehr ähnlich. Sie bestehen aus einem erkennenden und einem schneidenden Element. Auch TALEN funktionieren nur als Paar. Der Unterschied zwischen TALEN und ZFN liegt in der Erkennung: TALEN lassen sich viel spezifischer anpassen als ZFNs, da das Erbgut in einzelnen Basen erkannt wird. © GENOMXPRESS SCHOLÆ



Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) – Systeme bestehen aus zwei Elementen: Eines erkennt die Erbgutsequenz (CRISPR-RNA) und das zweite, die Nuklease, schneidet diese (Cas). Der Unterschied zu ZFNs und TALEN besteht darin, dass für die Erkennung eine kurze RNA anstelle von Proteinen genutzt wird. Das macht das System einfacher, flexibler und durch den einfachen Aufbau auch kostengünstiger. Das CRISPR/Cas-System braucht keinen Partner, um den Doppelstrang zu schneiden. © GENOMXPRESS SCHOLÆ

TALEN ist die Kurzform für *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*.

CRISPR/Cas

Über kaum eine andere molekularbiologische Technik wurde in den letzten Jahren so viel geschrieben wie über CRISPR/Cas (sprich: Crisper) und meistens ist damit das System CRISPR/Cas9 gemeint. CRISPR steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*.

Das Anwendungspotential des Enzym-RNA-Komplexes ist erst vor wenigen Jahren von der französischen Wissenschaftlerin Emmanuelle Charpentier erkannt worden. Er stammt ursprünglich aus Bakterien, die sich damit gegen Viren verteidigen.

Gemeinsam mit der US-amerikanischen Biochemikern Jennifer Doudna gelang es ihr, die Struktur der Genschere aufzuschlüsseln und ihren genauen Wirkmechanismus zu beschreiben.

Anders als bei den beiden vorherigen Methoden wird die zu modifizierende Zielsequenz in der pflanzlichen DNA nicht von Proteinen, sondern mit Hilfe von RNA gebunden. Diese sogenannte *single-guide* RNA (sgRNA) kann an unterschiedliche Nucleasen gekoppelt werden. Besonders häufig kommt die Nuklease Cas9 zum Einsatz. Der Komplex aus sgRNA und Cas9 wandert die DNA entlang und sucht nach sogenannten PAM-Sequenzen (kurz für: *Protospacer Adjacent Motive*). Immer wenn Cas9 solch ein Basentriplett erkennt, hält

es an. Die sgRNA entwindet die DNA und testet, ob sie eine komplementäre DNA-Region gefunden hat. Falls nein, zieht das Enzym weiter. Falls ja, schneidet Cas9 die DNA und erzeugt dabei stumpfe Enden.

Der große Vorteil von CRISPR/Cas ist, dass die sgRNA wesentlich schneller, einfacher und günstiger herzustellen ist als Zinkfingernucleasen oder TALEN. Unerwünschte Mutationen, auch als Off-target-Mutationen bezeichnet, sind gerade in Pflanzen sehr selten.

Gentechnisch verändert oder nicht?

Alle soeben vorgestellten Enzymkomplexe müssen zunächst in die pflanzlichen Zellen eingebracht werden. Am einfachs-



Die Entdeckerin

Prof. Dr. Emmanuelle Charpentier

Die Entwicklung von CRISPR/Cas als molekularbiologisches Präzisionswerkzeug ist eines der bahnbrechendsten wissenschaftlichen Ereignisse unserer Zeit. Die französische Molekularbiologin Emmanuelle Charpentier gilt mit ihrer Arbeit auf dem Gebiet der Virenabwehr von Bakterien als die Entdeckerin der Genschere, die biologische und medizinische Forschung revolutionierte.

Bakterien eliminieren feindliche Viren, indem sie deren DNA zerschneiden. Die CRISPR/Cas-Methode ahmt dieses Verhalten nach. Emmanuelle Charpentier erkannte das machtvolle Potential des zell-eigenen genetischen Mechanismus für die Wissenschaft. Sie wollte CRISPR/Cas genau verstehen und als universelles Werkzeug weiterentwickeln.

Zusammen mit ihrer amerikanischen Kollegin Jennifer Doudna veröffentlichte sie im Jahr 2012 den entscheidenden Forschungsartikel in einem der renommiertesten naturwissenschaftlichen Journale.

Seit 2015 ist Emmanuelle Charpentier Direktorin am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin und dort seit 2018 auch Leiterin der Max-Planck-Forschungsstelle für die Wissenschaft der Pathogene. Sie wurde bereits mit zahllosen wissenschaftlichen Ehrungen und Würdigungen bedacht.

Die Entwicklung der CRISPR/Cas-Methode ist ein Beispiel, das eindringlich darauf hinweist, dass in der Grundlagenforschung ein Schlüssel zu großen wissenschaftlichen Innovationen liegt.

M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821, PMID 22745249

ten ist das, wenn man nicht die Proteine selbst in die Zellen einschleust, sondern lediglich ihre Baupläne in Form von DNA. In Pflanzen bedient man sich dabei häufig der Transformation mit Agrobakterium. Die Sequenzen für Zinkfinger-nukleasen, TALEN oder CRISPR/Cas werden in ein DNA-Plasmid eingebracht. Das Bakterium verfrachtet dieses Plasmid in die Pflanzenzelle. Pflanzliche Ribosomen stellen dann gemäß dieser Vorlage die benötigten Proteine her, die dann die gewünschten Schnitte im Erbgut ausführen.

Sind Pflanzen, die mit Hilfe von Genomeditierung erzeugt wurden, nun also gentechnisch verändert oder nicht? Rechtlich gesehen ist die Antwort eindeutig: in Europa gelten genomeditierte Pflanzen als gentechnisch verändert (siehe Modul 2). Aus naturwissenschaftlicher Sicht ist die Antwort nicht so einfach. In jeder Zelle kommt es ständig zu Mutationen. Die durch Genomeditierung ausgelösten Veränderungen wie Basenaustausch, Deletionen oder Insertionen könnten demzufolge auch ohne menschliches Eingreifen stattfinden.

Jedoch muss man bedenken, dass Pflanzen häufig Teile des Rückgrats der Plasmid-DNA oder die Sequenzen für die Enzymkomplexe in ihr eigenes Genom integrieren. Diese Pflanzen sind eindeutig gentechnisch verändert.

Kreuzt man die mit CRISPR/Cas erzeugten Pflanzen mit der Ausgangspflanze, dann lassen sich bereits in der nächsten Generation Pflanzen erzeugen, die keine Transgene mehr enthalten, sondern nur noch die erwünschte Mutation. Diese Pflanzen sind von durch natürliche Mutation entstandenen Pflanzen nicht mehr zu unterscheiden, gelten aber nach derzeitigem EU-Recht als transgen.

Mit Hilfe der Genomeditierung lassen sich jedoch auch gezielt neue DNA-Sequenzen in Pflanzen einfügen. Diesen Effekt erreicht man, wenn man zusätzlich zum CRISPR/Cas-System einen weiteren DNA-Strang in die Zellen einbringt, der an beiden Enden etwa 300 bis 500 Basen enthält, die komplementär zur pflanzlichen DNA sind. Dann kann es passieren, dass die Reparaturenzyme diese neue Sequenz mittels homologer Rekombination ins pflanzliche Genom integrieren.

Stammt ein neues Gen aus der gleichen Pflanzenart, spricht man von cis-genen Pflanzen. Wurde ein artfremdes Gen eingebracht, heißen die Pflanzen transgen.



Zum Weiterlesen und Recherchieren:



Was ist Genom-Editierung?

Pflanzenforschung.de
<https://bit.ly/2YmEYOP>

Die neue Gen-Revolution:

Was man zu CRISPR/Cas wissen sollte

<https://bit.ly/2n5qWhq>

Funkkolleg Biologie und Ethik

Die Crispr-Revolution: genetisch veränderte Pflanzen

Podcast (MP3-Audioformat, 25:27 Min., 46.6 MB)
<https://bit.ly/2Wm4O8g>

Genome Editing in der Pflanzenzüchtung.

Wie funktioniert das?

Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) erklärt.
Video (02:28 Min)
<https://bit.ly/2E1LEds>

Themenportal der Max-Planck-Gesellschaft zur Genomeditierung

www.mpg.de/genom-editierung



Arbeitsaufträge

1. Beschreiben Sie, welche grundlegenden Schritte nötig sind, wenn man ein Gen gezielt verändern möchte.
2. Erläutern Sie, wie heute prinzipiell ein Gen gezielt durch Genomeditierung verändert wird.
3. Bilden Sie drei Gruppen und stellen Sie sich gegenseitig jeweils ein Werkzeug zur Genomeditierung vor. Wie sind die Werkzeuge aufgebaut? Welche Funktionen übernehmen die einzelnen Elemente?
4. Erklären Sie, was Off-target-Mutationen sind.
5. Beschreiben Sie den Unterschied zwischen cis-genen und transgenen Pflanzen.