

Hintergrund: Vergleich CRISPR/Cas – ODM – Mutagenese

Neue Genome-Editing Verfahren wie CRISPR/Cas und ODM ermöglichen es, das Erbgut von Pflanzen und Tieren gezielt zu manipulieren und sie für landwirtschaftliche Zwecke zu optimieren. Teilweise werden die durch bestimmte Verfahren an Pflanzen herbeigeführten Veränderungen mit denen der Mutagenese Züchtung gleichgesetzt. Bei genauerem Vergleich dieser Methoden zeigt sich jedoch, dass sie grundlegend verschieden sind und jedes dieser Verfahren mögliche Risiken birgt.

Dieses Hintergrund-Papier dient zur Aufklärung über die Unterschiede der Genom-Editierungsverfahren CRISPR/Cas und ODM im Vergleich mit Mutagenese-Verfahren und stellt eine kurze Zusammenfassung des aktuell vorliegenden Wissensstands dar. Es werden die Techniken, Möglichkeiten und Risiken von CRISPR/Cas, ODM und der Mutagenese in der Pflanzenzucht miteinander verglichen. Detaillierte Beschreibungen der Techniken sind den jeweiligen Hintergrund-Papieren zu entnehmen.

Das CRISPR/Cas-System

Die Technik des CRISPR/Cas-Systems kann in SDN-1 (site directed nuclease 1), SDN-2 und SDN-3 untergliedert werden. Bei allen wird das CRISPR/Cas-System in die pflanzlichen Zellen eingebracht, findet mit Hilfe einer guide RNA die Zielsequenz und ein Doppelstrangbruch wird in die DNA eingeführt. Bei SDN-1 führt dieser Schaden an der DNA zur Aktivierung der NHEJ-Reparatur (non-homologous end joining), welche fehleranfällig ist. Sie kann eine unbestimmte Veränderung einzelner Basen innerhalb der Ziel-Sequenz bewirken.

Im Unterschied dazu wird bei der SDN-2-Technik des CRISPR/Cas-Systems zusätzlich ein Oligonukleotid mit in die Zellen eingeführt, das als Reparatur-Vorlage für den Doppelstrangbruch an der DNA durch die HD-Reparatur (homology directed) dient. Durch das eingeführte Oligonukleotid werden ein gezielter Basenaustausch, kleinere Deletionen oder das Einfügen weniger Basenpaare an der Zielsequenz möglich.

Auch bei der SDN-3-Technik des CRISPR/Cas-Verfahrens wird ein synthetisches Oligonukleotid als Reparatur-Vorlage mit in die Zelle eingeführt, welches jedoch im Vergleich zu der SDN-2-Technik eine viel längere DNA-Sequenz in die Zielsequenz einfügt. Hierbei können neue Gen-Sequenzen in den Organismus integriert werden.

ODM (Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese)

Bei der ODM-Technik werden kurze Oligonukleotide in unterschiedlicher Form in die pflanzliche Zelle eingebracht. Diese können an einer Zielsequenz auf der DNA, zu der sie eine hohe Ähnlichkeit aufzeigen, die Einführung kleinerer Veränderungen der Basensequenz bewirken. Theoretisch kann mit dem ODM-Verfahren jeder Bereich eines bekannten Genoms verändert werden. Die Oligonukleotide werden anhand eines Referenzgenoms ausgewählt und dann im Labor synthetisiert. Die Effizienz, mit der eine DNA-Sequenz verändert wird, ist bei dem CRISPR/Cas-Verfahren jedoch viel höher als bei dem ODM-Verfahren (Sauer et al., 2016).

Während das CRISPR/Cas-System eine Erkennungssequenz (PAM-Sequenz) vor der eigentlichen Zielsequenz benötigt, kommt die ODM-Technik ohne eine solche Sequenz aus. Allerdings liegen manche Bereiche der pflanzlichen DNA mitunter geschlossen bzw. geschützt vor und sind für die Oligonukleotide wohl schwerer zugänglich. Tatsächlich verweist die meist geringe Effizienz der ODM auf solche Einschränkungen hin. In ersten Untersuchungen mit Mais konnte die Effizienz des ODM-Verfahrens verbessert werden, wenn die DNA der Zellen zuvor in einen genomweit offeneren Zustand überführt wurde (Tiricz et al., 2018).

Mutagenese

In der Pflanzenzüchtung werden Mutationen durch das Anwenden von ionisierenden Strahlen oder den Einsatz bestimmter Chemikalien induziert, um das Auftreten von Mutationen zu beschleunigen und die genetische Vielfalt zu erhöhen. Bei diesen Mutagenese-Verfahren können Mutationen entstehen, die sowohl positive als auch negative Eigenschaften für die Pflanzen darstellen. Nach gewünschten Eigenschaften wird in Screening-Verfahren gesucht und mit den geeigneten Pflanzen dann weiter gezüchtet.

Vergleich CRISPR/Cas – ODM

Bei der SDN-1-Technik kann die zelleigene NHEJ-Reparatur fehleranfällig arbeiten und die eingeführten Veränderungen erfolgen zufällig. Sie sind also im direkten Vergleich zur ODM-Technik nicht durch Oligonukleotide festgelegt, sondern vom Ergebnis her derzeit noch zufällig und entstehen während des Reparaturprozesses. Definiert wird jedoch auch bei SDN-1 die DNA-Sequenz, das heißt der Zielbereich, der verändert wird. Am ehesten kann man das ODM-Verfahren mit der SDN-2-Technik vergleichen, da bei beiden Verfahren nicht nur die Zielsequenz (also wo verändert wird) vorgegeben ist (durch die guide RNA bei CRISPR/Cas und Oligonukleotide bei ODM), sondern durch die in die Zellen eingebrachten Vorlagen (bei beiden Oligonukleotide) auch wie verändert werden soll. Oft wird das Endprodukt der Verfahren (CRISPR/Cas: SDN-1/SDN-2 und ODM) miteinander gleichgesetzt.

Vergleich CRISPR/Cas – ODM – Mutagenese

Zwischen Genome Editing und der Mutagenese-Züchtung bestehen sowohl im Prozess als auch in den Möglichkeiten der Methoden erhebliche Unterschiede. Sowohl das ODM-Verfahren als auch CRISPR/Cas ermöglichen gezielt zu bestimmen, an welcher Position des Erbgutes eine Veränderung erfolgen soll, in vielen Fällen auch, wie das Erbgut verändert wird.

Bei der Mutagenese sind die Mutationen zufällig und ungerichtet: weder ist die Zielsequenz im Erbgut der Pflanze festgelegt, noch wie es verändert wird.

Bei der Mutagenese-Züchtung werden keine Nucleinsäuren oder Enzyme in die Zelle eingebracht, sondern die Zelle wird mit Strahlung oder chemischen Substanzen behandelt, die wie ein unspezifischer Reiz wirken. Im Gegensatz dazu greifen alle Techniken der Genom-Editierung auf den Einsatz synthetischer Nucleinsäuren zurück. Entweder wird die DNA von CRISPR/Cas direkt mit speziellen Verfahren in die Zellen des Zielorganismus eingebracht und die Zellen stellen daraus dann das Werkzeug für ihre Veränderung selbst her, oder das CRISPR/Cas Werkzeug wird außerhalb der Zelle anhand ihrer DNA hergestellt und anschließend in die Zellen eingeschleust. Bei dem ODM-Verfahren werden kurze DNA-Stücke (die Oligonukleotide) außerhalb der Zelle synthetisiert und dann in diese gebracht. Die jeweiligen Komponenten können gezielt eine Veränderung der Sequenz der DNA im Zellkern des Zielorganismus bewirken.

Bei der Mutagenese-Züchtung werden durch die Strahlung oder die Chemikalien Schäden an der DNA-Struktur verursacht, wie Strangbrüche, Fehlpaarungen der Basen oder anderes. Das aktiviert die Reparatursysteme der Zelle, die versuchen, die Schäden möglichst schnell wieder zu beheben. Dabei können Fehler auftreten und falsche Basen eingebaut werden oder aber der ursprüngliche Zustand wieder hergestellt und bleibt erhalten. Veränderungen, die durch CRISPR/Cas eingeführt werden, können auch durch die Reparatursysteme erkannt und rückgängig gemacht werden. Das CRISPR/Cas-System kann in diesem Falle die Zielsequenz jedoch wieder erkennen und diese erneut schneiden.

Genome Editing kann, im Vergleich zur Mutagenese-Züchtung, mehrere kleine gezielte Veränderungen zur gleichen Zeit oder seriell am Erbgut des Zielorganismus einführen. Dies wird als Multiplexing bezeichnet und ermöglicht es, gezielt in kürzester Zeit verschiedene Orte des Genoms durch den Einsatz von mehreren guide RNAs bzw. Oligonukleotiden zu verändern. Auch wenn die einzelnen Veränderungen dabei nur kleine Abschnitte der DNA umfassen, können diese Veränderungen in der Summe zu erheblichen Veränderungen in den Eigenschaften der Organismen führen. Solche Veränderungen erschaffen komplett neue Kombinationen an genetischen Eigenschaften, die mit Mutagenese nicht oder nur in

Ausnahmen erstellt werden können.

Außerdem ist es mit Genome Editing-Verfahren möglich, alle DNA-Bereiche zu verändern, die sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich bzw. identisch sind. Speziell Pflanzen haben oft ein redundantes Genom, das heißt Gen-Informationen wiederholen sich. Mit CRISPR/Cas können alle Gen-Sequenzen/Gen-Cluster mit der gleichen Gen-Information auf einmal verändert werden, was bei der Mutationszüchtung nicht möglich ist. Ist die Zielsequenz bzw. der Zielort der Veränderung durch Genome Editing bekannt, so können diese Veränderungen durch Standardverfahren im Labor nachgewiesen werden (Duensing et al., 2018). Zudem sind Veränderungen, die alle bzw. mehrere Kopien beziehungsweise Gen-Orte einer Zielsequenz betreffen, gemeinsam mit einer dort identifizierbaren PAM-Sequenz ein eindeutiges Indiz dafür, dass diese Bereiche mit einem CRISPR/Cas-System verändert wurden.

Mit CRISPR/Cas (und anderen Genom-Editierungsverfahren wie TALENs und ZFNs) können Wissenschaftler das Erbgut sowohl von Pflanzen als auch Nutztieren verändern. Durch den Einsatz von Genom-Editierung sollen Krankheiten in Viehbeständen verhindert werden (Burkard et al., 2017), das Muskelwachstum der Tiere erhöht (Lillico et al., 2013), Allergene für Konsumenten (z.B. in Eiern und Milch) ausgelöscht (Oishi, Yoshii, Miyahara, Kagami, & Tagami, 2016; Zhou et al., 2017) und die Haltungsbedingungen der Tiere erleichtert werden (Carlson et al., 2016). Mutagenese wird dagegen in Nutztieren nicht angewendet, ausschließlich bei Pflanzen und Labortieren (Fruchtfliegen, Zebrafische).

Im Vergleich zur Genom-Editierung entstehen bei der Mutagenese durch den Einsatz von Chemikalien oder Strahlung viel häufiger Mutationen im Erbgut von Pflanzen. Es kann nicht vorhergesagt werden, wo genau im Erbgut sie auftreten und welche Auswirkungen sie auf den Organismus haben. Die genetische Vielfalt wird allerdings erhöht, was dazu genutzt werden kann, die Pflanzen auf Eigenschaften hin zu selektionieren, die eventuell ursprünglich nicht beabsichtigt waren. Es können hierbei jedoch auch Mutationen auftreten, welche die Pflanzen ungeeignet für die Ernährung und den Anbau machen. Es wird bisweilen gefordert, auch solche Pflanzen, die aus der Mutationszüchtung kommen, von Fall zu Fall genauer zu untersuchen, da je nach der eingesetzten Chemikalie die Mutationsrate extrem gesteigert werden kann. Es wird in Frage gestellt, ob alle Techniken der Mutagenese tatsächlich unbedenklich sind. In der EU sind Pflanzen, die aus der bisherigen Mutationszüchtung stammen, von einer Regulierung ausgenommen.

Mutagenese-Verfahren erhöhen die Wahrscheinlichkeit für das ungerichtete Auftreten von Mutationen im Erbgut. Dabei gibt es jedoch zelluläre Mechanismen (wie z.B. Reparaturmechanismen), die die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von lokalen

Mutationen in bestimmten Genomabschnitten reduzieren. Vereinfacht gesagt: die Zelle schützt bestimmte Bereiche vor Veränderungen. Genome-Editing-Verfahren haben dagegen das Potential, alle Bereiche des Erbguts mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu verändern, als dies mit Mutationszüchtung bisher möglich ist. Auch beim Einführen von Doppelstrangbrüchen an der DNA durch Genome-Editing-Verfahren zeigen diese zellulären Mechanismen ihre Wirkung. Bei der Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands kann die Zielsequenz jedoch erneut erkannt, geschnitten und eine Veränderung eingeführt bzw. erzwungen werden. Somit werden durch GE-Verfahren alle Bereiche des Genoms mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit veränderbar.

Die Möglichkeiten für Wissenschaftler, Veränderungen am Erbgut durch neue Genome-Editing-Verfahren vorzunehmen, sind immens gestiegen und um einiges einfacher und schneller umzusetzen als mit bisherigen Mutagenese-Verfahren. Diese neuen Technologien können in sehr kurzer Zeit und mit wenig Aufwand Organismen hervorbringen, die eine ganz neue Kombination von Veränderungen im Erbgut tragen. Bereits etablierte Verfahren (Omics-Verfahren, siehe Hintergrundpapier CRISPR/Cas: Risiko) können dafür eingesetzt werden, ungewollt auftretende Nebeneffekte zu untersuchen, um die Gesundheit von Menschen, Tieren und Pflanzen sicherzustellen.

Stand Juli 2018

Referenzen

- Caldwell, D. G., McCallum, N., Shaw, P., Muehlbauer, G. J., Marshall, D. F., & Waugh, R. (2004). A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J*, *40*(1), 143-150. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02190.x
- Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H., . . . Henikoff, S. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*, *164*(2), 731-740.
- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., Beetham, P. R., . . . Gocal, G. F. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol J*, *14*(2), 496-502. doi: 10.1111/pbi.12496
- Tiricz, H., Nagy, B., Ferenc, G., Torok, K., Nagy, I., Dudits, D., & Ayaydin, F. (2018). Relaxed chromatin induced by histone deacetylase inhibitors improves the oligonucleotide-directed gene editing in plant cells. *J Plant Res*, *131*(1), 179-189. doi: 10.1007/s10265-017-0975-8
- Burkard, C., Lillico, S. G., Reid, E., Jackson, B., Mileham, A. J., Ait-Ali, T., . . . Archibald, A. L. (2017). Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog*, *13*(2), e1006206. doi: 10.1371/journal.ppat.1006206
- Carlson, D. F., Lancto, C. A., Zang, B., Kim, E. S., Walton, M., Oldeschulte, D., . . . Fahrenkrug, S. C. (2016). Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol*, *34*(5), 479-481. doi: 10.1038/nbt.3560
- Duensing, N., Sprink, T., Parrott, W. A., Fedorova, M., Lema, M. A., Wolt, J. D., & Bartsch, D. (2018). Novel Features and Considerations for ERA and Regulation of Crops Produced by Genome Editing. *Front Bioeng Biotechnol*, *6*, 79. doi: 10.3389/fbioe.2018.00079
- Lillico, S. G., Proudfoot, C., Carlson, D. F., Stverakova, D., Neil, C., Blain, C., . . . Whitelaw, C. B. (2013). Live pigs produced from genome edited zygotes. *Sci Rep*, *3*, 2847. doi: 10.1038/srep02847
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H., & Tagami, T. (2016). Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, *6*, 23980. doi: 10.1038/srep23980
- Zhou, W., Wan, Y., Guo, R., Deng, M., Deng, K., Wang, Z., . . . Wang, F. (2017). Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PLoS One*, *12*(10), e0186056. doi: 10.1371/journal.pone.0186056