

Hintergrundpapier: CRISPR/Cas – Beschreibung der Technik

Das CRISPR (engl.: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas (engl.: *CRISPR-associated*)-System wird im Labor dazu verwendet, zielgerichtete Veränderungen am Erbgut eines Organismus vorzunehmen (Genomeditierung/Genome Editing). Die Methode wird derzeit intensiv weiterentwickelt und findet vor allem Anwendung in der Pflanzen- und Tierzucht, der medizinischen Forschung und der Grundlagenforschung. Dieses Hintergrundpapier beschreibt zunächst die natürliche Funktion von CRISPR/Cas in Bakterien und erklärt anschließend, wie CRISPR/Cas als molekularbiologische Technik verwendet wird, um damit DNA an spezifischen Stellen des Erbguts von Zielorganismen zu schneiden. Es wird unter anderem darauf eingegangen, mit welchen Verfahren die Genscher CRISPR/Cas in pflanzliche Zellen eingeschleust werden kann und wie Veränderungen am Erbgut bewirkt werden können.

Ursprung von CRISPR/Cas in Bakterien

In Bakterien dienen natürlicherweise vorkommende CRISPR/Cas-Systeme der Immunabwehr gegen eindringende Viren [1]. CRISPR/Cas hilft Bakterien bei der „Erinnerung“ an zurückliegende Virusinfektionen und als Verteidigungsstrategie bei einer erneuten viralen Infektion. Vereinfacht gesagt werden Stücke aus dem Erbgut der Viren in das Erbgut der Bakterien eingebaut, was die Bakterien bei einer wiederholten Infektion mit den Viren befähigt, das Genom der Viren zu erkennen und zu zerschneiden [2; 3]. Dieses bakterielle System wurde eingehend untersucht und für molekularbiologische Anwendungen im Labor angepasst [4; 5]. Dabei wird das CRISPR/Cas-System aus der ursprünglichen Funktion in Bakterien herausgelöst und für die Anwendung in menschlichen, tierischen und pflanzlichen Zellen genutzt.

CRISPR/Cas-Systeme kommen natürlicherweise in vielen verschiedenen Bakterien-Gattungen vor [6]. Wissenschaftler nutzen dies, um die Genscher CRISPR/Cas als molekularbiologische Technik so weiterzuentwickeln, dass immer mehr Bereiche im Erbgut von Organismen gezielt erreicht und verändert werden können. Die am meisten verwendete Genscher ist CRISPR/Cas9, bei der die Schneidekomponente Cas9 aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* stammt. Es werden aber auch andere CRISPR-Systeme verwendet, um die Anwendungsmöglichkeiten der Genscher zu erweitern wie CRISPR/Cpf1 oder CRISPR/Cas13 zur Veränderung von RNA.

CRISPR/Cas als molekularbiologische Technik

Zu Genome Editing zählt man im Allgemeinen die zielgerichteten Genscheren (engl.: *site directed nucleases*, SDN) und die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (ODM). Die wichtigsten zielgerichteten Genscheren sind CRISPR/Cas, die TALENs, die Zinkfingernukleasen und die Meganukleasen. Mit ihnen kann DNA an ganz spezifischen Stellen des Erbguts von Zielorganismen geschnitten werden.

Der Fokus dieser Hintergrundinformationen liegt auf der Genschere CRISPR/Cas, da diese im Moment die am häufigsten verwendete Genome-Editing-Technik in Pflanzen darstellt [7; 8]. Die anderen Verfahren funktionieren nach ähnlichen Prinzipien und werden hier nicht weiter diskutiert.

Ablauf einer CRISPR/Cas-Anwendung in Pflanzen

Eine CRISPR/Cas-Anwendung in Pflanzen läuft typischerweise in einem mehrstufigen Prozess ab:

1. Zuerst muss das CRISPR/Cas-Experiment geplant, die verschiedenen Komponenten designed und zusammengesetzt werden.
2. Üblicherweise wird mit pflanzlichen Zellen oder Geweben in einer Zellkultur gearbeitet.
3. Die Genschere wird meist in Form von DNA in die pflanzlichen Zellen eingeschleust und dort gebildet („exprimiert“).
4. Wenn die Genschere im Zellkern angekommen ist, kann die Zielsequenz erkannt und geschnitten werden. Es entstehen verschiedene genomeditierte Zellen.
5. Mit Hilfe von Zell- und Gewebekulturtechniken werden aus diesen neue Pflanzen regeneriert.
6. Die Veränderungen an der Zielsequenz werden untersucht, geeignete Pflanzen vom Anwender/von der Anwenderin ausgewählt und die noch enthaltene DNA der Genschere ausgekreuzt.

Der nachfolgende Text beschreibt die unterschiedlichen Stufen genauer.

1. Design des Experiments

Das Experiment beginnt eigentlich am Computer. Hier müssen viele Entscheidungen über den Aufbau und den Ablauf des Experiments getroffen werden. Die Genschere CRISPR/Cas besteht aus einer Erkennungs- und Schneidekomponente. Mit Hilfe der Erkennungskomponente findet die Genschere die Zielsequenz auf dem Erbgut, schneidet die DNA dort und kann damit eine Veränderung der Zielsequenz bewirken.

Zunächst muss die Erkennungskomponente der Genschere, auch guide RNA oder gRNA genannt, designed werden [9]. Das ist ein wichtiger Schritt, der gut durchdacht sein muss, denn bei diesem Schritt können bereits ungewollte Veränderungen im Erbgut verringert werden [10; 11] (siehe Hintergrundinformation über die Risiken). Wie gut das gelingt, hängt u.a. von dem verwendeten Computerprogramm, den Einstellungen im Programm, der Erfahrung des Anwenders/der Anwenderin ab. Die genaue Abfolge der DNA-Sequenz der zu verändernden Pflanze muss bekannt sein, um geeignete guide RNAs im Zielgen zu entwerfen. Die guide RNA wird dann von Biotechnologiefirmen synthetisiert und bei der Anwendung gemeinsam mit der Genschere in die pflanzlichen Zellen eingeschleust.

2. Arbeit in der Zellkultur

Die Komponenten der Genschere werden im Labor in sogenannten Zellkulturen in die pflanzlichen Zellen oder pflanzliches Gewebe eingebracht [12]. Die Zellkultur ermöglicht es WissenschaftlerInnen, pflanzliche Zellen außerhalb der Pflanze in einem Nährmedium zu kultivieren. Dafür werden den Pflanzen Organteile oder Gewebestückchen (auch Kallus genannt) entnommen und in ein geeignetes Nährmedium übertragen. Pflanzliche Zellen besitzen eine undurchlässige Zellwand, die bei einigen Techniken, mit denen die Genschere eingeschleust wird, zunächst entfernt werden muss, um die darunterliegende Zellmembran zugänglich zu machen. Entsprechend werden die Pflanzenzellen mit Zellwand oder ohne Zellwand als sogenannte Protoplasten in Nährmedien mit zahlreichen Stoffen für weiteres Wachstum und die weitere Verwendung kultiviert. Die Herstellung und Kultivierung von Protoplasten (Protoplastentechnik) ist derzeit jedoch nur für eine begrenzte Zahl von Nutzpflanzenarten etabliert.

3. Einschleusen der Genschere in pflanzliche Zellen

Das CRISPR/Cas-System kann in unterschiedlichen Zuständen in die Zelle eingeführt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die DNA einzubringen, die die Informationen für die Bildung der Genschere trägt (siehe Abbildung 1) [13]. Man nennt diese ringförmige DNA auch Plasmid. Aus dieser Genschere-DNA wird erst die eigentliche Genschere gebildet. Diese kann aber auch direkt als bereits im Labor hergestellter Enzymkomplex in die Zellen eingeschleust werden [12; 14; 15].

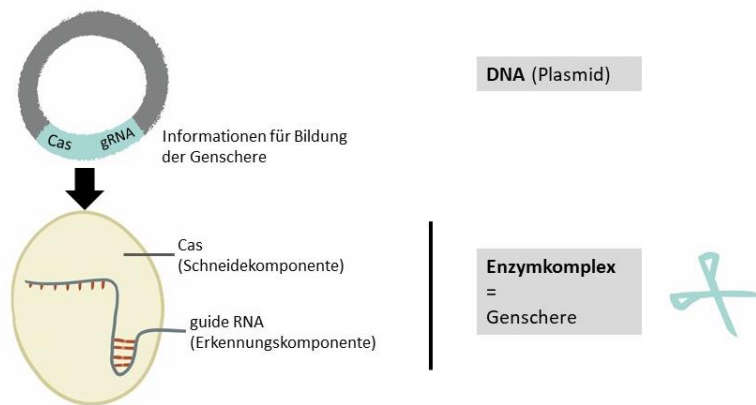


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Zustände von CRISPR/Cas.

Die Genschere kann in verschiedenen Zuständen eingeführt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die DNA einzubringen, die die Informationen für die Bildung der Genschere trägt. Man nennt diese ringförmige DNA auch Plasmid. Aus dieser Genschere-DNA wird erst die eigentliche Genschere gebildet. Die Genschere ist ein Enzymkomplex, der aus der Schneidekomponente Cas und einer Erkennungskomponente, die guide RNA genannt wird, besteht. Die guide RNA führt die Genschere zu der Stelle im Erbgut, an der sie schneiden soll, und dient dazu, eine bestimmte DNA-Sequenz des Zielorganismus zu erkennen. Die Genschere kann auch direkt als schon fertiger Enzymkomplex in die Zellen eingeschleust werden.

Es gibt verschiedene Techniken, mit denen die Genschere in pflanzliche Zellen eingeschleust werden kann. Die Wahl dieser Technik hängt sowohl von der jeweiligen Pflanzenart als auch von dem Zustand der Genschere ab. Entweder wird die DNA zur Bildung der Genschere oder die schon fertige Genschere in den Zellkern der Pflanzen eingebracht.

Die DNA der Genschere wird vor allem mit den Verfahren der alten Gentechnik eingebracht. Diese werden schon seit über 30 Jahren dazu verwendet, um DNA in pflanzliche Zellen einzuschleusen. Der Einbau der Genschere-DNA in das Erbgut der Wirtszelle erfolgt bei diesen Verfahren nicht gezielt, wodurch es oft zu ungewollten Veränderungen im Erbgut kommen kann (mehr Informationen in den Hintergrundinformationen über die Risiken von CRISPR/Cas).

Die DNA der Genschere wird bei der alten Gentechnik vor allem mit Hilfe des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens*, also eines biologischen Verfahrens, eingeschleust. Dafür werden beispielsweise Gewebestückchen (z.B. Blattstücke oder Blüten) in einer Lösung mit dem Agrobakterium getränkt. Das Agrobakterium wird als Transportmittel eingesetzt und überträgt die DNA der Genschere in die pflanzlichen Zellen.

Eine weitere Möglichkeit, die Genschere-DNA einzuschleusen, ist der Partikelbeschuss der pflanzlichen Zellen mit sehr kleinen Metallpartikeln (Gold, Wolfram) durch eine Genkanone. Die Partikel sind mit der Genschere-DNA beschichtet und werden mit hohem Druck in die pflanzlichen Zellen hineingeschossen. Dabei wird die DNA im Zellkern abgeladen, wenn dieser durch die Partikel getroffen wurde. Allerdings können beim Partikelbeschuss auch andere Teile der Zelle getroffen werden, zum Beispiel sogenannte Chloroplasten. Chloroplasten sind in der Zelle für die Photosynthese zuständig und besitzen ihre eigene DNA (mehr Informationen in den Hintergrundinformationen über die Risiken von CRISPR/Cas). Außerdem kann die DNA durch die Behandlung mit der Chemikalie PEG eingebracht werden.

Die fertige Genschere (Enzymkomplex), die ausgehend von der DNA der Genschere außerhalb der Pflanzen im Labor synthetisiert wurde, kann entweder durch den Partikelbeschuss mit der Genkanone oder durch eine Behandlung mit PEG in pflanzliche Zellen eingeschleust werden. Für beide Verfahren, also Partikelbeschuss und PEG, braucht es Protoplasten, also Zellen ohne Zellwand. Ihre nachfolgende Regeneration zu ganzen Pflanzen ist nicht trivial und nicht für alle Nutzpflanzenarten erprobt und etabliert, was die Anwendung immer noch einschränkt [15].

Befinden sich die jeweiligen Zustände der Genschere (DNA oder Enzymkomplex) in der Zelle, gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie CRISPR/Cas aktiv wird.

Wird die DNA der Genschere in pflanzliche Zellen eingeschleust, kann sie in das Erbgut der Zelle eingebaut und an nachfolgende Zellen weitergegeben werden (Abbildung 2). Es entsteht dabei ein transgener Organismus, der die Erbinformation zur Bildung der Genschere in sich trägt. Im nächsten Schritt wird die Genschere also erst gebildet und kann dann die Zielsequenz erkennen und schneiden. Im letzten Schritt wird die eingebaute Genschere-DNA wieder herausgekreuzt, so dass nur die Veränderungen an der Zielsequenz im Erbgut verbleiben. Es ist allerdings auch möglich, dass unbeabsichtigte Veränderungen im Erbgut entstehen und bestehen bleiben (siehe Hintergrundinformationen über die Risiken von CRISPR/Cas). Der Einbau der Genschere-DNA in das Erbgut der Pflanzen ist im Moment der am häufigsten durchgeführte Weg, um die Genschere in pflanzlichen Zellen einzubringen.

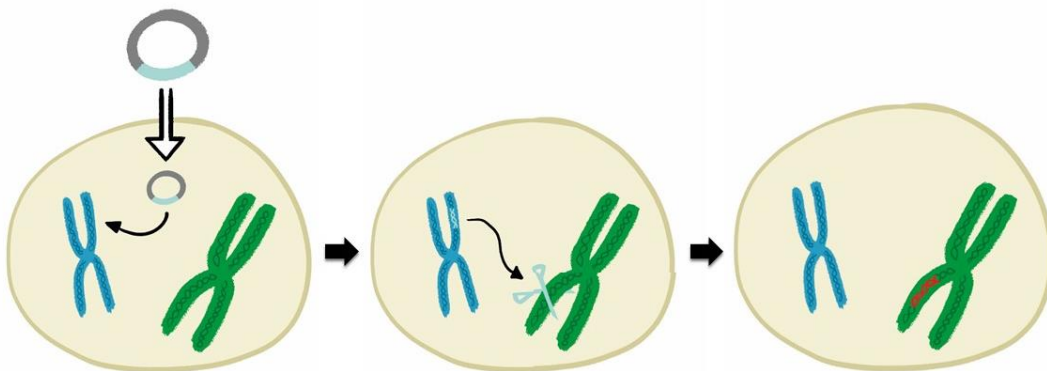


Abbildung 2: Einbau der DNA für die Genschere in das Erbgut.

Die Genschere-DNA wird zunächst in das hier blau dargestellte Chromosom eingebaut. Es entsteht ein transgener Organismus, der die Erbinformation zur Bildung der Genschere in sich trägt. Die Genschere wird dann erst gebildet und schneidet die Zielsequenz am hier grünen Chromosom. Im letzten Schritt wird die eingebaute Genschere-DNA wieder herausgekreuzt, so dass nur die Veränderungen an der Zielsequenz im Erbgut verbleiben.

Im Fall, dass CRISPR/Cas als Enzymkomplex in die Zelle eingeschleust wird, kann dieser direkt in der Zelle aktiv werden und die Zielsequenz erkennen und dort schneiden (Abbildung 3). Der Enzymkomplex wird nach einer gewissen Zeit von der Zelle wieder abgebaut und wird nicht weiter vererbt [16; 17]. Bei dieser Variante entsteht also kein transgener Organismus.

Dennoch können unbeabsichtigte Veränderungen im Erbgut der Pflanze bewirkt werden (siehe Hintergrundinformationen über die Risiken von CRISPR/Cas) Die Effizienz des eingeschleusten Enzymkomplex ist im Vergleich mit der in das Erbgut der Zielpflanze eingebauten Genscheren-DNA viel geringer und hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab [15]. Daher wird immer noch überwiegend die Genscheren-DNA in das Erbgut der Zielpflanzen eingebaut.

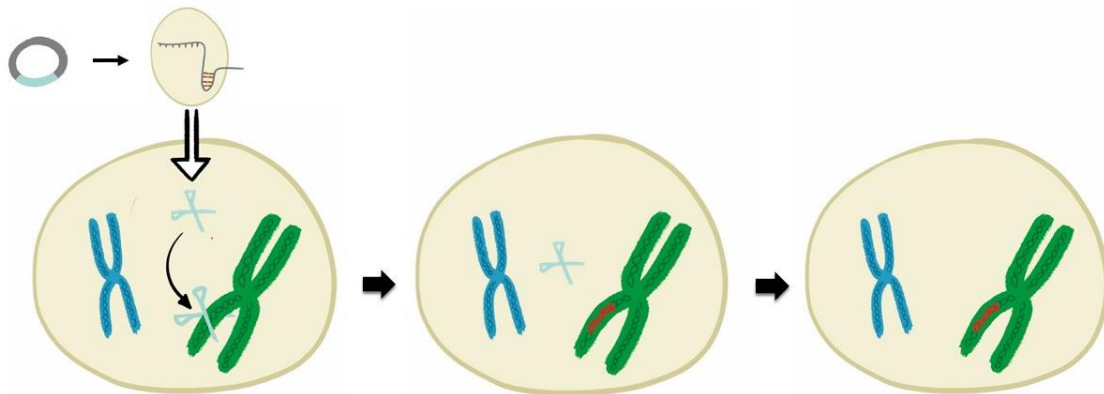


Abbildung 3: Die Genschere wird als Enzymkomplex eingeschleust.

Bei dieser Möglichkeit wird die Genschere als fertiger Enzymkomplex eingeschleust. Der Komplex wird ausgehend von der DNA im Labor synthetisch hergestellt und dann in den Zellkern eingebracht. Dort wird die Genschere direkt aktiv und führt zur Veränderung der Zielsequenz auf dem grün dargestellten Chromosom. Nach einer gewissen Zeit wird die Genschere abgebaut.

4. Die Wirkweise von CRISPR/Cas

Nachdem die Genschere im Zellkern angekommen ist, sucht sie mit Hilfe der guide RNA das Erbgut nach der Zielsequenz ab (siehe Abbildung 4). Als Stoppsignal für den Enzymkomplex dient eine sogenannte PAM-Sequenz (engl.: *protospacer adjacent motif*). Sie ist eine spezifische DNA-Sequenz und liegt benachbart zu der Zielsequenz auf dem Erbgut. Der Enzymkomplex stoppt an der PAM-Sequenz und prüft mit der guide RNA, ob die davor liegende DNA-Sequenz mit dieser zusammenpasst. Die guide RNA erkennt zum einen den Zielbereich auf der DNA und bindet zum anderen die Schneidekomponente, das Cas-Protein, und bringt es in Position zum Schneiden. Wenn die Zielsequenz erkannt wurde, schneidet die Genschere an dieser Stelle und bricht den Doppelstrang der DNA auseinander. Der Doppelstrangbruch ist ein Schaden an der DNA und damit ein Alarmsignal für die Zelle. Dieses Signal aktiviert zelleigene Reparaturmechanismen, um den DNA-Schaden so schnell wie möglich zu verschließen. Die Hauptaufgabe von CRISPR/Cas ist es also, einen Doppelstrangbruch zu verursachen, alles Weitere übernimmt die Zelle selbst.

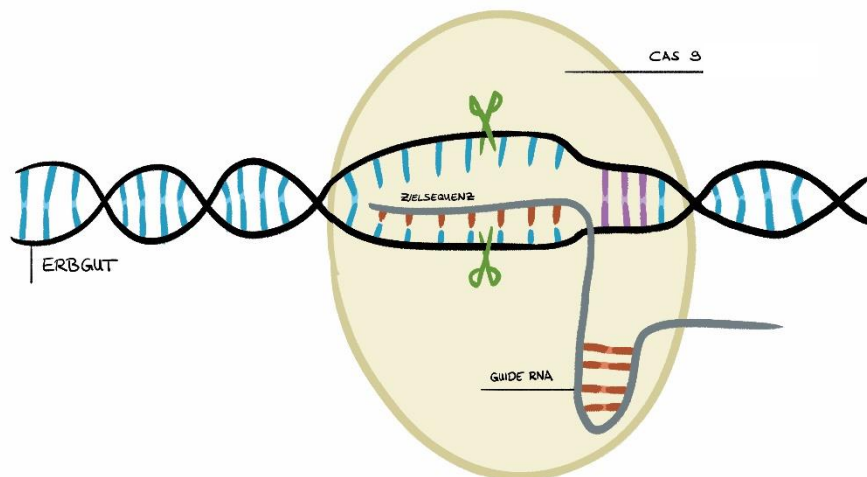


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von CRISPR/Cas.

CRISPR/Cas wird durch eine spezifische guide RNA an die Zielsequenz im Erbgut des Zielorganismus geleitet und führt dort einen Doppelstrangbruch ein. In Lila ist die PAM (engl.: *protospacer adjacent motif*)-Sequenz dargestellt. Sie fungiert als anfängliche Erkennungssequenz für die Genschere. Passt die davor liegende Sequenz zur guide RNA, wird Cas9 aktiv und schneidet dort.

Nachdem der DNA-Doppelstrangbruch durch die Genschere bewirkt wurde, können in der Folge verschiedene Möglichkeiten eintreten, genauer, es können zwei verschiedene Reparaturmechanismen aktiviert werden. Zum einen ist das ein Reparaturmechanismus namens NHEJ (engl.: *non-homologous end joining*) (siehe Abbildung 5), der den DNA Doppelstrangbruch möglichst schnell wieder zusammenfügen will. Dabei können Fehler auftreten, beispielsweise können zusätzlich einzelne Basen oder kleinere DNA-Abschnitte eingebaut oder kleinere Bereiche an der Zielsequenz gelöscht werden.

Es kann entweder der Originalzustand der Zielsequenz wiederhergestellt oder kleine Veränderungen der DNA-Sequenz an der Schnittstelle herbeigeführt werden. Wird der Originalzustand wiederhergestellt, so besteht die Möglichkeit, dass CRISPR/Cas erneut an der Zielsequenz bindet und dort wieder schneidet. Die Zielsequenz wird bei dieser Anwendung im Endergebnis also höchstwahrscheinlich verändert [18], was auch der gewünschte Effekt dieses Verfahrens ist. Diese Art der Anwendung wird auch unter dem Begriff SDN-1 (engl.: *site directed nuclease-1*) zusammengefasst und bezeichnet kleine, ungerichtete Veränderungen an der Zielsequenz. Dabei kommt es zu einer ortsspezifischen und ungerichteten Reparatur des DNA-Schadens.

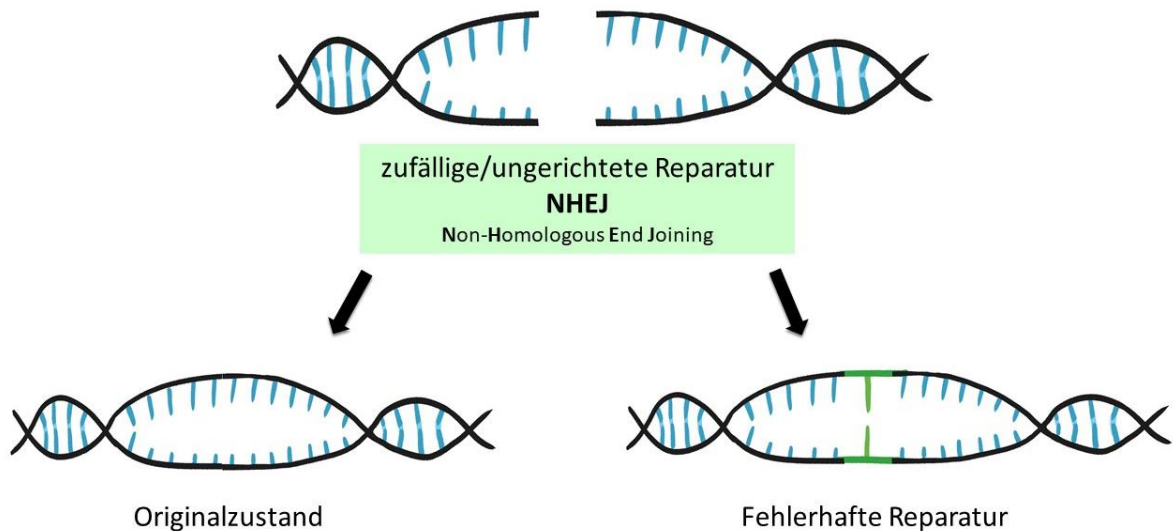


Abbildung 5: Darstellung der Veränderung durch SDN-1-Anwendungen (engl.: *site-directed nuclease-1*).

Die durch die Genschere bewirkten Doppelstrangbrüche der DNA an der Zielsequenz aktivieren zelleigene Reparaturmechanismen. Bei der SDN-1-Technik stellt die NHEJ-Reparatur (engl.: *non-homologous end joining*) entweder den Originalzustand wieder her oder bewirkt kleine Veränderungen an der Zielsequenz des Erbguts, da sie mitunter fehleranfällig arbeitet.

Neben SDN-1 gibt es auch SDN-2-Anwendungen (engl.: *site directed nuclease-2*), bei denen der DNA-Schaden durch einen anderen Reparaturmechanismus, das HDR-System (engl.: *homology directed repair*), repariert wird (siehe Abbildung 6, links). Die HDR wirkt durch homologe Rekombination, also einem Austausch von DNA-Sequenzen zwischen identischen DNA-Bereichen. Natürlicherweise werden Doppelstrangbrüche der DNA anhand des unversehrten Schwesterchromatids repariert [19]. Für SDN-2-Anwendungen der Genschere werden DNA-Vorlagen im Labor synthetisch hergestellt und durch AnwenderInnen zusätzlich zum Enzymkomplex in die Zellen eingebracht. Die DNA-Vorlagen stimmen zu einem großen Teil mit der DNA-Sequenz um die Zielsequenz herum überein. Dadurch ist die HDR-Reparatur in der Lage, die DNA-Sequenz der DNA-Vorlage mit einer gewünschten Veränderung in den Zielbereich einzubauen. Anders als bei SDN-1 wird also bei SDN-2-Anwendungen der durch die Genschere erzeugte Doppelstrangbruch mit Hilfe einer eingebrachten Vorlage repariert.

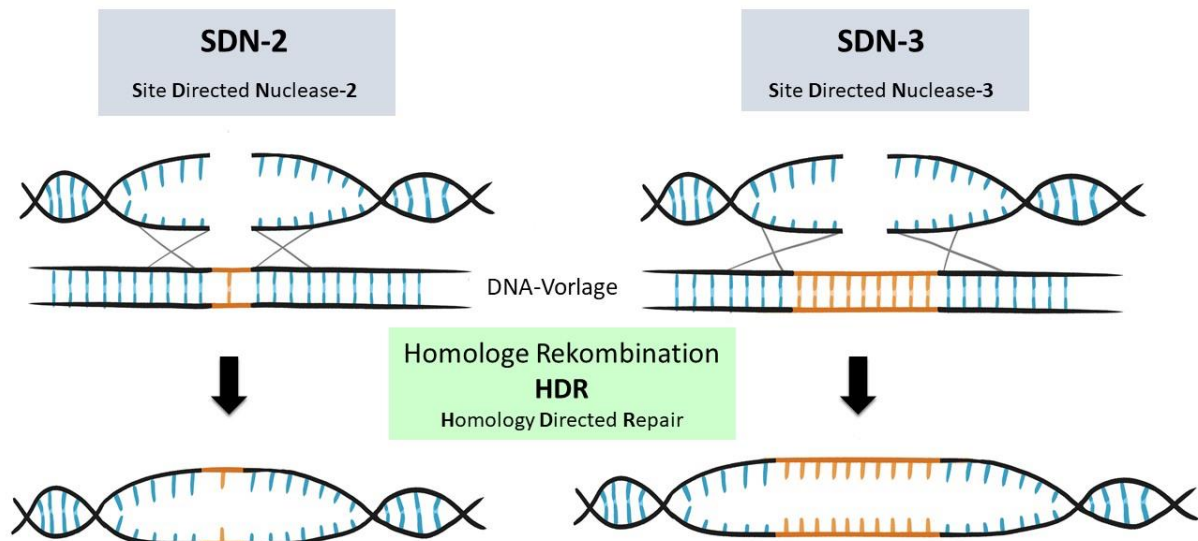


Abbildung 6: Darstellung der Veränderung durch SDN-2- (engl.: *site-directed nuclease 2*) und SDN-3-Anwendungen (engl.: *site-directed nuclease 3*).

Bei SDN-2- und SDN-3-Anwendungen werden zusammen mit den Komponenten der Genschere auch synthetisch hergestellte DNA-Vorlagen mit in die Zelle eingebracht, die mit der Zielsequenz zu großen Teilen identisch sind. Durch den DNA-Doppelstrangbruch können die Komponenten der zelleigenen HDR (engl.: *homology directed repair*)-Reparatur aktiviert werden und zum Einbau der DNA-Vorlage in die Zielsequenz führen. Hierdurch wird es möglich, in der DNA-Vorlage kleine gezielte Veränderungen (SDN-2) oder ganze Gene (SDN-3), hier in Orange dargestellt, an der Zielsequenz einzuführen.

Es können auch große DNA-Vorlagen (z.B. mit ganzen Genabschnitten) eingeschleust werden und gezielt im Bereich des Bruches der Zielsequenz eingebaut werden. Diese Art der Veränderung wird unter SDN-3 zusammengefasst (engl.: *site directed nuclease-3*) (siehe Abbildung 6, rechts). Der Unterschied zwischen SDN-2- und SDN-3-Anwendungen ist die Länge der mit der Vorlage eingeführten DNA-Sequenz. Bei SDN-2 werden nur wenige Basenpaare eingebracht, bei SDN-3 längere Stücke, zum Beispiel vollständige Gene.

Die HDR-Reparatur erfolgt nur in einer relativ kurzen Zeitspanne des Zellzyklus. Die NHEJ-Reparatur dagegen ist fast immer aktiv. Im Vergleich zu Tieren ist die HDR-Reparatur in Pflanzen auch weniger effizient. Die meisten DNA-Schäden werden daher ungewollt durch NHEJ bearbeitet. Die SDN-2- sowie die SDN-3-Technik sind deswegen weniger effizient als SDN-1. Das spiegelt sich auch in der Verteilung der Anwendungen in Pflanzen wieder (siehe Abbildung 7). Es werden in erster Linie SDN-1-Anwendungen durchgeführt und nur zu einem geringen Anteil SDN-2 und SDN-3 [20; 7]. Am häufigsten wird CRISPR/Cas und zu einem geringeren Teil TALENs und ZNF verwendet. Es ist daher zu berücksichtigen, dass der Großteil der Anwendungen in Pflanzen zwischen 2014 und 2019 entstanden sind, also nachdem die Genschere CRISPR/Cas9 das erste Mal in Pflanzen angewandt wurde.

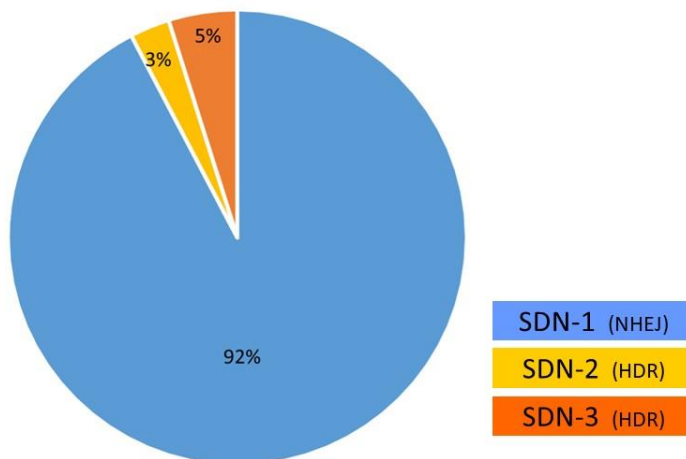


Abbildung 7: Verteilung der Anwendung in Pflanzen (aus [7]).

Im Zeitraum zwischen Januar 1996 und Juni 2019 wurden 231 marktorientierte Studien in Pflanzen untersucht [7]. Die meisten Studien verwenden SDN-1 (ca. 92%), nur wenige SDN-2 (ca. 3%) oder SDN-3 (ca. 5%). Am häufigsten wird CRISPR/Cas und zu einem geringeren Teil TALENs und ZNF verwendet, daher ist zu berücksichtigen, dass der Großteil der Anwendungen in Pflanzen zwischen 2014 und 2019 entstanden sind.

5. Regeneration von Pflanzen

Pflanzen können ihr gesamtes Leben lang wachsen und so neue Blätter, Wurzeln und Sprosse bilden. Pflanzliche Zellen besitzen damit die Fähigkeit, beschädigte oder verloren gegangene Teile zu ersetzen. In der Pflanzenzucht wird diese Eigenschaft genutzt, um aus einzelnen pflanzlichen Zellen oder Gewebestückchen mit Hilfe von bestimmten Nährmedien ganze Pflanzen zu regenerieren [21]. Auch pflanzliche Zellen, in denen die Genschere verwendet wurde, werden zu ganzen Pflanzen regeneriert, um im nächsten Schritt zu überprüfen was für Veränderungen an der Zielsequenz herbeigeführt wurden. In vielen Nutzpflanzenarten ist es jedoch noch immer nicht möglich ganze Pflanzen aus Einzelzellkulturen zu regenerieren, weshalb die Anwendung der Genschere in solchen Pflanzen nicht möglich ist. Es wird im Moment an der Entwicklung neuer Verfahren gearbeitet, die die Arbeit mit Einzelzellen umgehen soll (mehr dazu in den Hintergrundinformationen über die Möglichkeiten von CRISPR/Cas).

6. Identifizierung der gewünschten Veränderung

Im letzten Schritt müssen diejenigen genomeditierten Pflanzen identifiziert werden, bei denen die Zielsequenz wie gewünscht verändert wurde. CRISPR/Cas-Experimente werden nicht mit nur einer pflanzlichen Zelle durchgeführt, sondern mit einem Zellhaufen, der aus vielen Zellen besteht. Nur in einen Bruchteil von ihnen kann die Genschere als DNA oder als fertiger Enzymkomplex eingeführt werden, und in diesen Zellen wird die Zielsequenz zudem unterschiedlich verändert. Um schnell die gewünschten Editierungsereignisse zu erhalten,

werden die transformierten Zellen zu Pflänzchen regeneriert, Gewebestückchen entnommen und mit Hilfe von PCR-Verfahren wird der DNA-Bereich an der Zielsequenz sequenziert. Das bedeutet, dass die Abfolge der DNA-Basen ermittelt und die genaue molekulare Veränderung an der Zielsequenz bestimmt wird [22; 23]. Jetzt können die Pflanzen mit den gewollten Veränderungen ausgewählt werden.

Falls zu Beginn – wie meist üblich – nicht der fertige Enzymkomplex, sondern die Genscheren-DNA in die Zellen eingeführt und in ihr Erbgut eingebaut wurde, kann diese DNA in nachfolgenden Kreuzungsschritten mit den regenerierten Pflanzen wieder entfernt werden. Dieser Vorgang wird Segregation genannt.

Was kann mit der Genschere bewirkt werden?

Am häufigsten werden mit der Genschere kleine Veränderungen, also Punktmutationen, kurze Insertionen oder Deletionen, an der Zielsequenz herbeigeführt, um ein oder mehrere Zielgene auszuschalten. Die kleinen Fehler an der DNA können beispielsweise bewirken, dass ein Zielgen nicht mehr abgelesen wird. Man spricht hier auch von Gen-Knockout. WissenschaftlerInnen können damit untersuchen, wie sich das Ausschalten bestimmter Gene auf eine Pflanze auswirkt.

Außerdem können mit kleinen Sequenzveränderungen die Genprodukte der Zielgene, in der Regel Proteine, verändert und möglicherweise in ihrer Wirkung und Funktion beeinflusst werden.

Einzelne oder mehrere Gene können deletiert, also aus dem Erbgut entfernt werden. Das wird beispielsweise dadurch erreicht, dass zwei guide RNAs gleichzeitig verwendet werden. Schneidet die Genschere beide Zielsequenzen, kann der DNA-Bereich dazwischen gelöscht werden. Eine DNA-Region mit Zielgenen, die gelöscht werden sollen, kann also einfach „herausgeschnitten“ werden, wenn rechts und links davon zwei Schnitte in der DNA herbeigeführt werden.

Außerdem kann die Genexpression, also das Ablesen der Gene, so verändert werden, dass mehr, weniger oder gar kein Genprodukt gebildet wird. Das gelingt zum Beispiel, in dem regulatorische Elemente der DNA durch die Genschere verändert werden. Zusätzlich ist es noch möglich, die Genexpression direkt über die Veränderung epigenetischer Marker zu beeinflussen. Epigenetische Marker sind kleine Anhängsel an der DNA und auch an Proteinen, die die Genexpression steuern. Es gibt Anwendungen der Genschere, bei denen spezielle Enzyme an die Genschere gekoppelt sind, die nur die epigenetischen Marker an der jeweiligen Zielsequenz verändern können ohne den DNA-Doppelstrang zu schneiden [24].

Mit Hilfe der HDR-Reparatur und spezifischen DNA-Vorlagen können kleine Veränderungen der DNA-Sequenz (durch SDN-2- Anwendungen) oder ganze Gene gezielt ins Erbgut eingebracht werden (durch SDN-3-Anwendungen).

Stand Mai 2021

Referenzen

- 1.Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60 (2):174-182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
- 2.Nussenzweig PM, Marraffini LA (2020) Molecular Mechanisms of CRISPR-Cas Immunity in Bacteria. *Annual Review of Genetics* 54 (1):93-120. doi:10.1146/annurev-genet-022120-112523
- 3.Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315 (5819):1709-1712. doi:10.1126/science.1138140
- 4.Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346 (6213):1258096. doi:10.1126/science.1258096
- 5.Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337 (6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829
- 6.Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnys V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, van der Oost J, Barrangou R, Koonin EV (2020) Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* 18 (2):67-83. doi:10.1038/s41579-019-0299-x
- 7.Modrzejewski D, Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., Wilhelm R. (2019) What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. *Environ Evid* 8 (27). doi:10.1186/s13750-019-0171-5
- 8.Eckerstorfer MF, Dolezel M, Heissenberger A, Miklau M, Reichenbecher W, Steinbrecher RA, Wassmann F (2019) An EU perspective on biosafety considerations for plants developed by genome editing and other new genetic modification techniques (nGMs). *Front Bioeng Biotechnol* 7:31. doi:10.3389/fbioe.2019.00031
- 9.Gerashchenkov GA, Rozhnova NA, Kuluev BR, Kiryanova OY, Gumerova GR, Knyazev AV, Vershinina ZR, Mikhailova EV, Chemeris DA, Matniyazov RT, Baimiev AK, Gubaidullin IM, Baimiev AK, Chemeris AV (2020) Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Mol Biol (Mosk)* 54 (1):29-50. doi:10.31857/s0026898420010061
- 10.Modrzejewski D, Hartung F, Lehnert H, Sprink T, Kohl C, Keilwagen J, Wilhelm R (2020) Which Factors Affect the Occurrence of Off-Target Effects Caused by the Use of CRISPR/Cas: A Systematic Review in Plants. *Frontiers in Plant Science* 11 (1838). doi:10.3389/fpls.2020.574959
- 11.Agapito-Tenfen SZ, Okoli AS, Bernstein MJ, Wikmark OG, Myhr AI (2018) Revisiting risk governance of GM plants: The need to consider new and emerging gene-editing techniques. *Front Plant Sci* 9:1874. doi:10.3389/fpls.2018.01874
- 12.Zhu H, Li C, Gao C (2020) Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (11):661-677. doi:10.1038/s41580-020-00288-9
- 13.Zhang S, Zhang R, Song G, Gao J, Li W, Han X, Chen M, Li Y, Li G (2018) Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biol* 18 (1):302. doi:10.1186/s12870-018-1496-x
- 14.Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalan C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33 (11):1162-1164. doi:10.1038/nbt.3389
- 15.Zhang Y, Iaffaldano B, Qi Y (2021) CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants. *Plant Communications* 2 (2):100168. doi:https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100168
- 16.Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Mark Cigan A (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 7:13274. doi:10.1038/ncomms13274
- 17.Bhandawat A, Sharma V, Rishi V, J KR (2020) Biolistic delivery of programmable nuclease (CRISPR/Cas9) in bread wheat. *Methods Mol Biol* 2124:309-329. doi:10.1007/978-1-0716-0356-7_17
- 18.Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B (2018) Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Mol Cell* 70 (5):801-813 doi:10.1016/j.molcel.2018.04.016
- 19.Symington LS, Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45:247-271. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132435
- 20.Modrzejewski D, Hartung, F., Sprink, T., Menz, J., Kohl, C., Delventhal, R., Wilhelm, R. (2020) Aktualisierung der Übersicht über Nutz- und Zierpflanzen, die mittels neuer molekularbiologischer Techniken für die Bereiche Ernährung, Landwirtschaft und Gartenbau erzeugt wurden – marktorientierte Anwendungen. .

https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Landwirtschaft/Gruene-Gentechnik/NMT_Uebersicht-Zier-Nutzpflanzen.pdf?__blob=publicationFile&v=3.

21. Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143 (9):1442-1451. doi:10.1242/dev.134668
22. Peng C, Wang H, Xu X, Wang X, Chen X, Wei W, Lai Y, Liu G, Godwin ID, Li J, Zhang L, Xu J (2018) High-throughput detection and screening of plants modified by gene editing using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Plant J* 95 (3):557-567. doi:10.1111/tpj.13961
23. Liu Q, Wang C, Jiao X, Zhang H, Song L, Li Y, Gao C, Wang K (2019) Hi-TOM: a platform for high-throughput tracking of mutations induced by CRISPR/Cas systems. *Sci China Life Sci* 62 (1):1-7. doi:10.1007/s11427-018-9402-9
24. Mercé C, Bayer PE, Tay Fernandez C, Batley J, Edwards D (2020) Induced Methylation in Plants as a Crop Improvement Tool: Progress and Perspectives. *Agronomy* 10 (10). doi:10.3390/agronomy10101484