

Hintergrund: ODM – Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese

Die **Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (Oligonucleotide directed mutagenesis, ODM)** ist eine molekularbiologische Technik, bei der mit Hilfe von kurzen DNA-Stücken (Oligonukleotiden) gezielte Veränderungen an einem Genom vorgenommen werden können. Sie wird in der Grundlagenforschung und der Pflanzenzucht angewendet. Das Verfahren ermöglicht es, einzelne Basen (Bausteine der DNA) auszutauschen. Somit können kurze DNA-Sequenzen eingefügt bzw. gelöscht werden. Im Resultat können so Gene ausgeschaltet oder aktiviert werden. Auch die Genexpression, das Ablesen von Genen, kann verändert oder die Zusammensetzung der Genprodukte, in der Regel Proteine, beeinflusst werden. Dieses Hintergrundpapier dient zur allgemeinen Aufklärung und Charakterisierung des ODM-Verfahrens und ist eine kurze Zusammenfassung des aktuell vorliegenden Wissensstands. Es werden wichtige Begriffe des Verfahrens erläutert, die Technik charakterisiert und Anwendungsbereiche der ODM dargestellt. Abschließend wird noch auf Risiken, die bei der Anwendung von ODM entstehen können, eingegangen.

Begriffserklärung: Oligonukleotide

Die kleinste Einheit unseres Erbgutes (der DNA) ist ein Nukleotid. Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker, einem Phosphatrest und einer sogenannten Base. Das „Rückgrat“ der DNA setzt sich aus diesem Zucker (Desoxyribose) und Phosphatresten zusammen, die wiederholt hintereinander, kettenartig miteinander verknüpft sind. Am Zucker gebunden ist jeweils eine organische Base. Bei der DNA sind das Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Werden einzelne Nukleotide zu einer Kette verknüpft, so spricht man von einer Nukleinsäure. Zwei Ketten können sich aneinander anlagern und einen Doppelstrang bilden, wobei sich immer die komplementären Basen Adenin mit Thymin und Cytosin mit Guanin paaren. Die Abfolge der Basen im DNA-Strang (z.B. AATTCGCATTTGC) enthält Information und steckt wegen der komplementären Basen auch im komplementären DNA-Strang. Eine weitere Nukleinsäure ist RNA, welche wichtige Funktionen als Bindeglied zwischen Genen und der Bildung von Proteinen einnimmt und zusätzlich noch regulatorische Funktionen in der Zelle hat. RNA besteht aus einem anderen Zucker (Ribose) als DNA und trägt die komplementären Basen Adenin/Uracil und Cytosin/Guanin, d.h. Uracil tritt bei RNA an die Stelle von Thymin bei DNA. Oligonukleotide sind Nukleinsäureketten, aus meist 10-200 Nukleotiden. Oligonukleotide können aus DNA oder RNA bestehen und einzel- oder

doppelsträngig vorliegen. Sie werden im Labor chemisch hergestellt und werden routinemäßig für molekularbiologische Techniken verwendet. Dabei können die Wissenschaftler genau bestimmen, welche DNA-Sequenz in den Oligonukleotiden enthalten ist.

Verwendung der Oligonukleotide beim Genome Editing

Bei dem ODM-Verfahren werden im Labor hergestellte Oligonukleotide in eine Zelle eingeschleust. Diese Oligonukleotide werden so ausgewählt, dass sie zu einem DNA-Zielbereich im Erbgut bis auf einen beziehungsweise wenige Unterschiede (1-4 Basen) identisch sind. In der Regel sind die bei der ODM verwendeten Oligonukleotide 20 bis 200 Nukleotide lang und können aus DNA, RNA oder einer Mischung aus DNA/RNA-Molekülen bestehen. Bindet ein Oligonukleotid an die Zielsequenz im Erbgut, kommt es zu einer Fehlpaarung an der Stelle, wo sich Oligonukleotid und Erbgut unterscheiden. Die Fehlpaarung bewirkt eine strukturelle Unregelmäßigkeit und aktiviert einen oder mehrere zelleigene DNA-Reparaturmechanismen, welche das eingeführte Oligonukleotid als Reparatur-Vorlage erkennen und die erwünschten Veränderungen in das pflanzliche Erbgut übertragen können. Das Oligonukleotid selber wird nicht in das Erbgut der Pflanze integriert, sondern seine genetische Information wird sozusagen in das Genom „kopiert“. Die Oligonukleotide verbleiben noch eine Zeit in der pflanzlichen Zelle und werden dann abgebaut. Durch weitere Reparaturmechanismen kann die auf einem DNA-Strang eingeführte Veränderung auf den komplementären DNA-Strang übertragen und somit in nachfolgenden Zellteilungen an Tochterzellen weitergegeben werden.

Begriffserklärung: Rekombinante Nukleinsäuren

Derzeit wird u.a. darüber gestritten ob Pflanzen, die mit dem ODM-Verfahren verändert wurden, in den Regelungsbereich des Gentechnikgesetzes fallen oder nicht. Eine strittige Frage ist hier, ob die verwendeten Oligonukleotide als rekombinante Nukleinsäuren zu definieren sind. Eine eindeutige naturwissenschaftliche Definition der Wortbedeutung ist jedoch nicht möglich. Rekombinant wird häufig als neue Kombination von genetischem Material definiert. Hier muss zwischen grundlegend verschiedenen Prozessen unterschieden werden.

- a) Rekombinante Organismen können zum einen durch eine neue genetische Zusammensetzung bei dem natürlichen Vorgang der Kreuzung bei der sexuellen Fortpflanzung entstehen. Hier kommt es im Ergebnis immer zu einer „Rekombination“ der elterlichen Veranlagungen. Die elterlichen Chromosomen werden dabei zufällig auf die Zellen verteilt und es findet ein sogenanntes Crossing Over statt, bei dem Stücke der homologen Chromosomen (das sind

strukturgleiche Chromosomen väterlicher und mütterlicher Herkunft mit gleicher Abfolge der Gen-Orte) ausgetauscht werden.

- b) Wie erwähnt können DNA-Sequenzen auch künstlich im Labor (*in vitro*) hergestellt und neu kombiniert werden, auch sie sind damit rekombinant. Ein Organismus, der eine solche DNA-Sequenz enthält, ist ein rekombinanter Organismus.

Effizienz der ODM-Technik

Entscheidend für die Effizienz der ODM-Technik sind vor allem die Eigenschaften und die verwendete Menge der Oligonukleotide. Die Oligonukleotide können sich in der Art der Zusammensetzung der Nukleinsäuren unterscheiden und strukturell unterschiedlich aufgebaut sein. So können die Nukleotide aus DNA, RNA oder einer Kombination aus DNA und RNA zusammengesetzt sein und einzel- oder doppelsträngig eingesetzt werden. Die Enden der Oligonukleotide können kleine biochemische oder strukturelle Anhänge tragen, welche diese vor einem frühzeitigen Abbau schützen (Dong, Beetham, Vincent, & Sharp, 2006; Pierce et al., 2003). Dies und die Länge der verwendeten Nukleotide sind je nach zu veränderndem Organismus zu ermitteln, um eine optimale Effizienzrate zu erreichen. Die ODM-Methode ist zudem stark abhängig von einer hohen Konzentration des eingesetzten Oligonukleotids (Sauer et al., 2016). Damit sind Erfolg, aber auch Risiken von Fall zu Fall unterschiedlich zu beurteilen.

Beteiligte Reparaturmechanismen bei ODM

Natürlicherweise entstehen im Verlauf des Zellzyklus und durch Umwelteinflüsse Schäden an der DNA, die zum Fortbestand der betroffenen Zelle stetig repariert werden müssen. Das können strukturelle Schäden an einem der beiden DNA-Stränge sein, oder Veränderungen an beiden DNA-Strängen wie Doppelstrangbrüche. Für beide Szenarien existieren unterschiedliche Reparaturmechanismen, bei denen viele verschiedene Proteine und Enzyme durch den Schaden an der DNA aktiviert und herangezogen werden.

Es ist noch nicht endgültig geklärt, welche Reparaturprozesse genau bei ODM in Pflanzen beteiligt sind und dazu führen, dass die Geninformation verändert wird. Es kommen mehrere zelleigene Reparaturwege in Frage, wie die Mismatch-Reparatur, die Nukleotid-Exzision-Reparatur und die NHEJ-Reparatur.

Verfahren, um die Oligonukleotide in die Zelle einzubringen

Es gibt unterschiedliche Methoden, um die Oligonukleotide in pflanzliche Zellen einzubringen. Die Effizienz dieser Methoden ist abhängig von der Art der Pflanze, der Beschaffenheit und der Konzentration des Oligonukleotids und dem zellulären System, in das die Oligonukleotide eingebracht werden sollen. Üblicherweise wird ein biolistisches Verfahren (Partikelbeschusstechnik) verwendet, bei dem pflanzliche Zellen mit kleinen Metallpartikeln (Gold oder Wolfram) beschossen werden, die mit den Oligonukleotiden beschichtet sind. Trifft ein solches Partikel den Zellkern, dann werden die Oligonukleotide abgeladen und können an die Zielsequenz der DNA gelangen (Beetham, Kipp, Sawycky, Arntzen, & May, 1999; Okuzaki & Toriyama, 2004).

Pflanzliche Zellen besitzen eine stabile Zellwand, die bei einigen Techniken (z.B. durch die chemische Substanz PEG oder Elektroporation) zunächst entfernt werden muss, um die Zelle manipulieren zu können. Eine pflanzliche Zelle ohne Zellwand wird auch als Protoplast bezeichnet. Diese Protoplasten können nur innerhalb eines künstlichen *in vitro*-Systems im Labor überleben, da ihnen die Zellwand als Schutz vor mechanischen Einwirkungen fehlt und sie unter physiologischen Bedingungen mit Nährmedium versorgt werden müssen. Eine häufig verwendete Methode ist die direkte Einführung der Oligonukleotide in Protoplasten durch die chemische Substanz Polyethylenglycol (PEG). PEG bewirkt, dass die Oligonukleotide durch Einstülpungen in der Zellmembran in die Zelle gelangen können.

Aus den manipulierten Protoplasten kann nach der Regeneration der Zellwand eine vollständige Pflanze wiederhergestellt werden. Dabei werden die manipulierten pflanzlichen Zellen in bestimmten Nährmedien gehalten, die das Wachstum einer kompletten neuen Pflanze bewirken.

Anwendungsmöglichkeiten der Technik

Das ODM-Verfahren kann dazu genutzt werden, einzelne Basen auszutauschen, kurze DNA-Sequenzen einzufügen oder zu löschen. Dadurch können Gene ausgeschaltet oder aktiviert werden, die Genexpression von Genen kann verändert oder Eigenschaften von Proteinen beeinflusst werden. Angewendet wird das Verfahren in der Grundlagenforschung und in der Pflanzenzucht. In der Forschung wird ODM zum Beispiel genutzt, um Gene zu verändern, die an der Ausprägung von Krankheiten beteiligt sind. So wurde die ODM-Technik erfolgreich im Mausmodell angewendet, um einen Basenaustausch vorzunehmen, der ein Gen (Dystrophin) korrigiert, das für die Bildung der Muskeldystrophie Duchenne verantwortlich ist (Bertoni, Morris, & Rando, 2005). Allerdings gibt es bisher keine entsprechende medizinische Anwendung am Menschen. Mit ODM ist es auch möglich, mehrere Oligonukleotide, passend zu verschiedenen Zielsequenzen auf der DNA, zur selben

Zeit einzubringen und so mehrere Bereiche der DNA gleichzeitig zielgerichtet zu verändern.

Anwendung in der Pflanzenzucht

Das ODM-Verfahren ist bereits im Labor zur Veränderung einiger Kulturpflanzen wie Raps, Mais, Weizen und Tabak verwendet worden (Beetham, Kipp, Sawycky, Arntzen, & May, 1999; Okuzaki & Toriyama, 2004; Zhu et al., 1999). Bisher wurde ODM in der Pflanzenzucht zur Erzeugung von Herbizidtoleranz verwendet. Die Firma Cibus hat eine Rapsorte mit der ODM-Technik hergestellt, die resistent gegen das Unkrautbekämpfungsmittel Sulfonylharnstoff ist. Derzeit wird in der EU weiterhin kontrovers über die Frage debattiert, ob es sich bei Pflanzen, die mit dem ODM-Verfahren verändert wurden, um gentechnisch veränderte Organismen handelt und ob diese durch das Gentechnikgesetz reguliert werden müssen.

Risiken

Einige Aspekte des ODM-Verfahrens sind noch nicht ausreichend wissenschaftlich erforscht, vor allem besteht ein Mangel an wissenschaftlichen Studien, die sich mit den molekularen Prozessen in pflanzlichen Systemen (v.a. die beteiligten Reparaturmechanismen) auseinandersetzen.

Ein Risiko stellt die hohe Menge an eingeführten Oligonukleotiden dar, von denen auch nicht näher bekannt ist, mit welcher Geschwindigkeit sie in den Zellen abgebaut werden. Dies unterscheidet sich jedoch von Fall zu Fall, je nach Zelltyp und Art des Oligonukleotids. In tierischen Zellen konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass Oligonukleotide sequenz-unabhängig Schäden an der DNA wie Doppelstrangbrüche bewirken können (Bonner, Strouse, Applegate, Livingston, & Kmiec, 2012; Olsen, Solhaug, Booth, Gelazauskaite, & Krauss, 2009). Aufgrund der langen Oligonukleotid-Sequenz gilt das Verfahren in Hinblick auf die Entstehung von Off-Target-Effekten als relativ präzise. Vollständig ausgeschlossen sind solche Effekte jedoch nicht. Off-Target-Effekte können entstehen, wenn die Oligonukleotide an einer falschen Stelle des Erbgutes binden und dort eine Veränderung einführen.

Gene können durch Duplikation in mehreren Kopien im Erbgut vorliegen und sich somit vielfach im Genom wiederholen. Diese Sequenzen können entweder in Gencluster zusammenbleiben oder über das gesamte Erbgut verteilt sein (auf dem ursprünglichen Chromosom, aber auch auf verschiedenen Chromosomen). Oligonukleotide können alle Genorte mit derselben DNA-Sequenz erkennen und an allen Bereichen des Erbgutes, die diese Sequenz tragen, Veränderungen einführen. Die Folgen für Pflanzen, bei denen alle Genkopien auf einmal verändert werden, sind schwer abschätzbar. Auch wenn die einzelnen Veränderungen dabei nur kleine Abschnitte der DNA umfassen, kann die Gesamtheit der Veränderungen zu

ungewollten Eigenschaften führen, die nicht anhand der einzelnen Genorte vorhersagbar sind.

Das Zusammenspiel von regulatorischen Elementen, Signalwegen und Genexpression innerhalb einer Zelle ist komplex und jede Veränderung kann darauf einen weitreichenden Einfluss haben. Die Möglichkeit, durch das ODM-Verfahren viele Bereiche der DNA gezielt gleichzeitig zu verändern, erhöht hierbei noch die Wahrscheinlichkeit, dass ungewollt in zelluläre Prozesse eingegriffen wird.

Stand Juli 2018

Referenzen

- Beetham, P. R., Kipp, P. B., Sawycky, X. L., Arntzen, C. J., & May, G. D. (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(15), 8774-8778.
- Bertoni, C., Morris, G. E., & Rando, T. A. (2005). Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing. *Hum Mol Genet*, *14*(2), 221-233. doi: 10.1093/hmg/ddi020
- Bonner, M., Strouse, B., Applegate, M., Livingston, P., & Kmiec, E. B. (2012). DNA damage response pathway and replication fork stress during oligonucleotide directed gene editing. *Mol Ther Nucleic Acids*, *1*, e18. doi: 10.1038/mtna.2012.9
- Dong, C., Beetham, P., Vincent, K., & Sharp, P. (2006). Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Rep*, *25*(5), 457-465. doi: 10.1007/s00299-005-0098-x
- Okuzaki, A., & Toriyama, K. (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep*, *22*(7), 509-512. doi: 10.1007/s00299-003-0698-2
- Olsen, P. A., Solhaug, A., Booth, J. A., Gelazauskaite, M., & Krauss, S. (2009). Cellular responses to targeted genomic sequence modification using single-stranded oligonucleotides and zinc-finger nucleases. *DNA Repair (Amst)*, *8*(3), 298-308. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.11.011
- Pierce, E. A., Liu, Q., Igoucheva, O., Omarrudin, R., Ma, H., Diamond, S. L., & Yoon, K. (2003). Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther*, *10*(1), 24-33. doi: 10.1038/sj.gt.3301857
- 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
- Zhu, T., Peterson, D. J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczyński, C. L., & Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(15), 8768-8773.