

GENOMFORSCHUNG

Transgenfreie Genomeditierung dank mobiler RNAs – CRISPR on the move

Durch eine Kombination der CRISPR/Cas9-Technologie zum Einführen von gezielten Mutationen im Genom und der klassischen Methode des Pfropfens können genomeditierte Pflanzen hergestellt werden, die keine Transgene tragen. Dazu werden die RNA für die Cas9-Nuklease sowie die guide-RNAs, die die Cas9-Nuklease an die zu verändernde Sequenz im Genom dirigieren, aus einer transgenen Wurzel in einen nicht transgenen Spross transportiert, wo sie Mutationen erzeugen, ohne Spuren zu hinterlassen.

Passgenaue Veränderungen im Genom mittels CRISPR (*clustered regularly interspersed short palindromic repeats*)/Cas9 (*CRISPR associated*) sind ein wichtiges Werkzeug zur Modifizierung von Nutzpflanzen [1]. Die Cas9-Nuklease durchtrennt die DNA in der Zelle an ganz bestimmten Stellen. An diese Stellen wird sie durch sogenannte *guide*-RNAs (gRNA, im Deutschen auch Leit-RNA) dirigiert. Die Doppelstrangbrüche in der DNA werden sehr schnell, aber ungenau repariert, wobei Nukleotide entfernt oder eingefügt werden können, d. h. es kommt zu Mutationen in dem

Gen. Durch die Wahl von geeigneten gRNAs kann man also die Cas9-Nuklease so programmieren, dass sie Mutationen in ein ganz bestimmtes Gen einführt. Werden zwei gRNAs für ein Gen eingesetzt, kommt es zu zwei Doppelstrangbrüchen, so dass der dazwischenliegende Bereich deletiert wird.

Derzeit werden gentechnische Methoden eingesetzt, um die Genschiere und die entsprechenden gRNAs, die die Genschiere an die vorgesehene Position dirigieren, in die Pflanze einzubringen. Dabei wird hauptsächlich das Bodenbakterium

Agrobacterium tumefaciens verwendet, in das man die Bauanleitung für die gRNAs und die Cas9-Nuklease einführt, und das diese Gene quasi als trojanisches Pferd in die Pflanze überträgt. Die Gene werden in das Genom der Pflanze eingebaut, so dass eine transgene Pflanze entsteht. Um letztendlich eine Pflanze zu erhalten, die nur noch die durch die Cas-Nuklease vorgenommenen Veränderungen enthält und in der in nachfolgenden Generationen keine weiteren unerwünschten Editierungsereignisse stattfinden, müssen die Gene für die Nuklease und die gRNAs ausgekreuzt werden.

Es ist auch gelungen, die Cas9-Nuklease und die gRNAs als vorgefertigten RNA-Protein-Komplex direkt in Weizenembryonen oder Protoplasten, also Zellen ohne Zellwand, zu bringen. Damit kann der Komplex Veränderungen am Genom vornehmen, ohne dass Transgene zurückbleiben [2]. Der Nachteil dieses Ansatzes besteht darin, dass ganze Pflanzen regeneriert werden müssen, was ein langwieriger Prozess ist und bisher nicht bei allen Pflanzen gelungen ist.

Genomeditierung ohne Rückkreuzung

Ein neuartiger Ansatz, der sowohl auf Rückkreuzungen als auch auf Regeneration verzichtet, um transgenfreie genomeditierte Pflanzen zu erhalten, wurde vom Team um Fritz Kragler am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie entwickelt [3]. Dabei haben die Forscher ausgenutzt, dass RNAs in der Pflanze über längere Distanzen transportiert werden können. Für diese Mobilität sind bestimmte Sequenzmotive verantwortlich [4]. So ein Sequenzmotiv wurde in das Gen für die Cas9-Nuklease und für die gRNA eingebaut. Auf den Wurzelstock einer transgenen *Arabidopsis*-Pflanze, die diese mobilen RNAs exprimiert, wurde der Spross einer untransformierten *Arabidopsis*-Pflanze gepfropft (Abbildung 1). Tatsächlich konnten in dem Spross die RNAs für die Cas9-Nuklease und die gRNA nachgewiesen werden. Insbe-

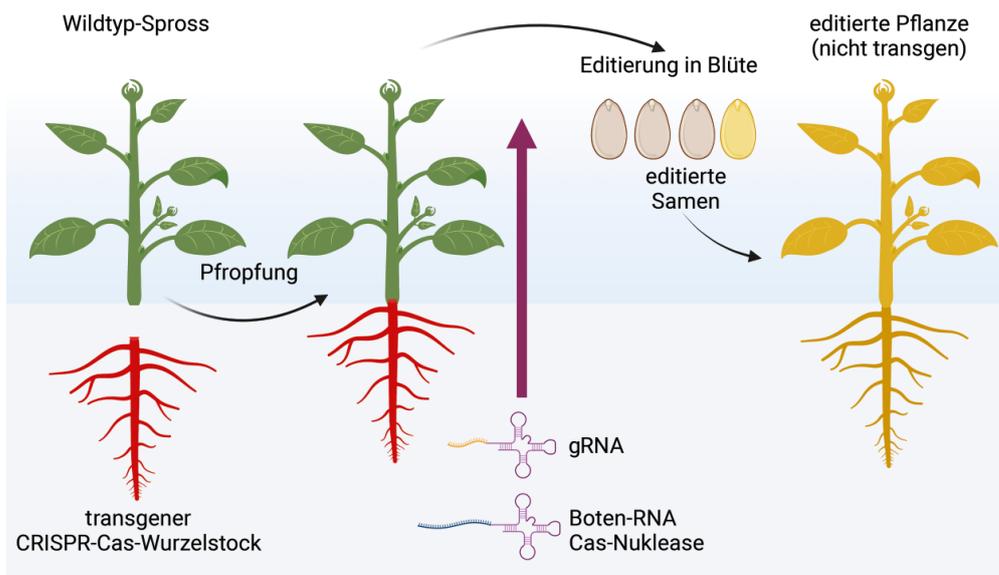


ABB 1. Genomeditierung durch mobiles CRISPR/Cas9. Die Gene für die Cas9-Nuklease und die gRNA (Leit-RNA) für das zu editierende Gen werden mit einer Sequenz versehen, die dafür sorgt, dass die RNAs in der Pflanze mobil werden. Auf den Wurzelstock einer transgenen *Arabidopsis*-Pflanze wird eine Wildtyp-Pflanze gepfropft, woraufhin die mobilen RNAs, die für die Cas9-Nuklease bzw. die gRNAs kodieren, in den Spross und die Blüten wandern. Die Cas9-Nuklease führt die Genomeditierung aus, und die entsprechenden Mutationen lassen sich in der nächsten Generation nachweisen.

sondere waren die RNAs auch in den Schoten und Blüten zu finden. Wenn die gRNAs auf das Gen für die Nitratreduktase zugeschnitten waren, traten in den Nachkommen von den gepfropften Wildtyp-Sprossen mit einer geringen Frequenz homozygote Nitratreduktase-Mutanten auf. Das bedeutet, dass in den Blüten die Gensche hergestellt wird und aktiv ist, so dass die Editierungsereignisse in den Samen gefunden werden.

Damit konnten durch eine Kombination aus klassischem Pfropfen und der neuen CRISPR/Cas9-Technologie genomeditierte Pflanzen hergestellt werden, ohne dass Gewebekultur oder aufwändiges Rückkreuzen zur Eliminierung der Transgene notwendig waren. Andererseits muss für jede geplante Mutation eine neue

transgene Pflanze hergestellt werden, deren Wurzelstock eingesetzt werden kann.

Pfropfen dient in der Landwirtschaft routinemäßig zur Veredelung von Obstbäumen oder Reben und funktioniert auch zwischen weiter entfernten verwandten Arten. Tatsächlich konnten durch Pfropfen von Wildtyp-Sprossen von *Brassica rapa* (Rübsen) auf einen transgenen *Arabidopsis*-Wurzelstock genomeditierte Rübsen-Pflanzen erhalten werden.

Eine Entdeckung der pflanzenmolekularbiologischen Grundlagenforschung – die Sequenzmotive, die die Mobilität von RNAs in der Pflanze vermitteln – erweitert den Werkzeugkasten der CRISPR/Cas9-vermittelten Genomeditierung von Pflanzen beträchtlich.

Literatur

- [1] P. Schindele et al. (2018). Das CRISPR/Cas-System. *Biologie in unserer Zeit* 48(2), 100–105.
- [2] Z. Liang et al. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 8, 14261.
- [3] L. Yang et al. (2023). Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nature Biotechnology* <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01585-8>
- [4] J. Kehr et al. (2022). Long-Distance Transported RNAs: From Identity to Function. *Annu Rev Plant Biol* 73, 457–474.

Dorothee Staiger,
Lehrstuhl für RNA Biologie und
Molekulare Physiologie,
Fakultät für Biologie,
Universität Bielefeld,
Dorothee.staiger@uni-bielefeld.de

CHEMISCHE ÖKOLOGIE

Ozonexposition stört Partnerwahl bei Taufliiegen

Mit der Oxidation des männlichen Sexualpheromons der Taufliergie *Drosophila melanogaster* zerstört Ozon ein wichtiges Erkennungsmerkmal, das Männchen als Paarungspartner bzw. Konkurrenten ausweist. Im Laborexperiment sorgt das bei der Paarung für Verwirrung. Im Freiland könnte der Fortpflanzungserfolg von Insektenarten gefährdet sein, deren Geschlechter über weite Entfernungen mit Pheromonen kommunizieren.

Der Ozonhaushalt in der Erdatmosphäre zeigt folgeschwere vom Menschen verursachte Veränderungen: Die Ozonschicht der Stratosphäre, lebenswichtiger Schutzschild gegen UV-Strahlen, nimmt bekanntlich unter dem Einfluss halogener Kohlenwasserstoffe ab. Die Folge ist ein im Sommer über das natürliche Maß hinaus vergrößertes Ozonloch. In den bodennahen Luftschichten der Troposphäre dagegen erhöhen anthropogene Emissionen bei austauscharmen Wetterlagen im Sommer die Ozonkonzentration. Dies geschieht weniger durch direkte Ozonemissionen als durch Stickoxide und andere

oxidierend wirkende Schadstoffe aus Verbrennungsprozessen, unter deren Einfluss sich die von der Sonnenstrahlung getriebene Ozonbildung verstärkt [1].

Obwohl die bodennahen Ozonkonzentrationen erst seit kurzem systematisch erfasst werden und global gesehen bis heute nicht flächendeckend, lassen Modellrechnungen vermuten, dass sich im Vergleich zur vorindustriellen Zeit die durchschnittliche Ozonbelastung global mindestens verdoppelt hat. Als geringe Belastung gelten Volumenanteile in der Größenordnung von 2×10^{-8} , bei Smog sind temporär zehnfach höhere Werte möglich.

Besonders der südliche Teil der Nordhalbkugel ist davon betroffen – mit in Ostasien einschließlich Japan überwiegend steigender Tendenz, während in manchen Regionen Nordamerikas und Europas die Maßnahmen zur Luftreinhaltung inzwischen Erfolge zeigen [2].

Während die Folgen für die Gesundheit des Menschen – vor allem Reizungen der Atemwege – hinlänglich bekannt sind, kommen die ökologischen Auswirkungen erhöhter Ozonwerte in Bodennähe erst nach und nach ans Licht: Ozon-exponierte Pflanzen wachsen langsamer. Weiterhin verlieren ihre Blüten an Attraktivität für Bestäuber, weil Duftstoffe durch Ozon oxidativ abgebaut werden. Bestäuber wie Hummeln oder Wespen wiederum zeigen unter Ozoneinwirkung in elektrophysiologischen Untersuchungen abnehmende Empfindlichkeit der olfaktorischen Wahrnehmung [3]. All diese Effekte betreffen auch die Landwirtschaft, deren Erträge sinken.

Wissenschaftler vom Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena berichten jetzt am Beispiel der