

SONDERHEFT
2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**MATERIAL-
FORSCHUNG**
Gesteinsbesiedelnde
Pilze

PFLANZENGENETIK
Genomsequenzen
sichtbar machen

EXPERIMENT
Pauline und die
Ausreißer

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

CRISPR-Cas

... mehr als nur
Verteidigung

Regelmäßig BiuZ lesen?

Werden Sie Mitglied im VBIO!

Die Biologie in unserer Zeit (BiuZ)

gibt Einblicke in das weite fachliche Spektrum der Biologie. Sie ist die Mitgliederzeitschrift des VBIO und einer der guten Gründe für Ihren Beitritt zum VBIO.

Weitere gute Gründe:

- Werden Sie Teil des größten biowissenschaftlichen Netzwerkes in Deutschland.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.



www.vbio.de





Wolfgang Nellen ist für das Öffentlichkeitsprogramm „CRISPR-Whisper“ verantwortlich. Außerdem ist er Editor-in-Chief der *BiuZ*. Anita Marchfelder ist Leiterin des Instituts für Molekularbiologie und Biotechnologie der Prokaryoten der Universität Ulm und Sprecherin des DFG-Schwerpunktprogramms SPP2141. Lisa-Katharina Maier ist wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Marchfelder am Institut für Molekularbiologie und Biotechnologie der Prokaryoten.

EDITORIAL

Transparente Wissenschaft – ein *BiuZ*-Sonderheft zu CRISPR-Cas

Liebe Leserinnen und Leser, das vorliegende Heft der *BiuZ* ist nicht nur eine Sonderausgabe, es ist in vielerlei Hinsicht etwas Besonderes! Das Heft wurde durch eine Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für das Schwerpunktprogramm SPP 2141 „Weitاً mehr als nur Verteidigung: die vielen verschiedenen Funktionen des CRISPR-Cas-Systems“ möglich gemacht. Es bietet Einblicke in die Arbeit einzelner Mitglieder des SPP, aber auch anderer Wissenschaftler/-innen, die an dieser Thematik forschen. Das Sonderheft wurde vom Öffentlichkeitsprogramm „CRISPR-Whisper“ im Rahmen des SPP2141 zusammengestellt.

Es besteht wohl kein Zweifel daran, dass CRISPR-Cas und die daraus abgeleiteten molekularen Werkzeuge die gesamten Biowissenschaften revolutioniert haben: Die ersten Gentherapien sind inzwischen zugelassen, einige Nahrungsmittelpflanzen mit editiertem Genom sind auf dem Markt und viele weitere in der Erprobung. Mannigfaltige Methoden für die medizinische Diagnostik aber auch für die Grundlagenforschung wurden entwickelt und auch in der Materialforschung spielt CRISPR-Cas eine Rolle.

Aber zugleich ist nicht zu vergessen: In der Grundlagenforschung gibt es ständig neue Entdeckungen mit unerwarteten Erkenntnissen zu weiteren Funktionen dieser Systeme, die für Evolution, Biodiversität und Interaktionen zwischen verschiedenen Organismen von Bedeutung sind. Es ist unmöglich, alle diese Bereiche abzudecken; wir haben uns aber bemüht, eine möglichst große Vielfalt abzubilden.

Die Auswirkungen dieser molekularbiologischen Revolution auf unsere Gesellschaft sind fundamental und führen zu unausweichlichen Fragen: Welche Anwendungen muss man, welche kann man und welche sollte man auf keinen Fall nutzen? Ethische Betrachtungen sind zur Beantwortung nötig. Zuvor muss aber auch bedacht werden, welche Informationen die Bevölkerung braucht, um rational und sachlich fundiert urteilen zu können. Wie kann man diese Informationen einem breiten Publikum vermitteln?

Dieser Aspekt war für uns eine wichtige zusätzliche Motivation, dieses Heft zusammenzustellen. Die Leserschaft der *BiuZ* setzt sich aus Biolog/-innen zusammen, die zu etwa 1/3 aus der Wissenschaft, zu 1/3 aus der Lehre an Schulen und zu 1/3 aus der Industrie

stammen. Artikel in der *BiuZ* müssen deshalb wissenschaftlichen Ansprüchen genügen, gleichzeitig aber auch verständlich für Leser/-innen aus den unterschiedlichsten Bereichen der Biowissenschaften sein. Dieses Mal wollen wir aber noch mehr. Die einzelnen Beiträge sind auf verschiedenen Niveaus der Komplexität geschrieben: Einige sollten für jeden Laien einfach lesbar sein, andere erfordern etwas mehr Konzentration und Hintergrundwissen, um den wissenschaftlichen Gedankengängen zu folgen, erlauben aber tiefer in die Materie von CRISPR-Cas einzutauchen.

Um dabei zu helfen, haben wir ein umfangreiches Glossar erstellt, das Fachbegriffe und auch Zusammenhänge erklärt. Wir empfehlen, das Glossar auszudrucken, um beim Lesen unbekannte Begriffe schnell nachschlagen zu können. Das Sonderheft erscheint nicht nur in einer höheren Auflage als üblich. Es ist außerdem *Open Access* und damit für jedermann frei zugänglich, so dass es auch von Schulen und Schülerlaboren genutzt werden kann. Heft und Glossar finden Sie unter www.vbio.de/biuz-crispr. Sie können uns helfen, unser Ziel „transparente Wissenschaft“ zu erreichen, indem Sie diesen Link an Freunde, Bekannte und auch über Social Media verbreiten!



Nun wünschen wir Ihnen eine spannende Lektüre und freuen uns auch über Ihre Meinung und über Fragen und Anmerkungen zu unserem CRISPR-Cas-Sonderheft!

Wolfgang Nellen

A. Marchfelder

Lisa-Katharina Maier



Biologie in unserer Zeit ist die Verbandszeitschrift des Verbandes Biologie, Biowissenschaften & Biomedizin in Deutschland – VBIO e.V. Mehr Informationen finden Sie im Internet unter www.vbio.de.

Verlag:

Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin in Deutschland – VBIO e.V.
Corneliusstr. 12, 80469 München
Telefon +49 (0)89/26 02 45 73
Email: biuz@vbio.de

Alleinvertretungsberechtigter Vorstand:

Prof. Dr. Karl-Josef Dietz, Bielefeld (Präsident)
Prof. Dr. Christian Lindermayr, Friedberg (Schatzmeister)

Managing Editor:

Dr. Larissa Tetsch,
Steinröselweg 9, 82216 Maisach;
Telefon +49 (0)81 41/8 88 06 27
Email: redaktion@biuz.de

Gast-Editor:

Prof. Dr. Wolfgang Nellen (verantwortlich für den Inhalt)

Editorial Board:

Ralf Dahm, Mainz
Harald Engelhardt, Martinsried
Jacob Engelmann, Bielefeld
Monika Hassel, Marburg
Christian Körner, Basel
Ortrun Mittelsten Scheid, Wien
Wolfgang Nellen, Kassel (Chief Editor)
Hannes Petrischak, Wustermark
Felicitas Pfeifer, Darmstadt
Gabriele Pfitzer, Köln
Margarete Radermacher, Odenthal
Michael Riffel, Hirschberg
Udo Schumacher (†), Hamburg
Jennifer Selinski, Kiel
Marco Thines, Frankfurt
Björn von Reumont, Frankfurt

Herstellung:

Dr. Larissa Tetsch,
Telefon +49 (0)81 41/8 88 06 27
Email: redaktion@biuz.de

Anzeigenleitung:

Dr. Carsten Roller, Corneliusstr. 12, 80469 München
Telefon +49(0)89/26 02 45 73
Email: roller@vbio.de

Mitglieder- und Abo-Service:

VBIO e.V., Geschäftsstelle München,
Corneliusstr. 12, 80469 München
Telefon +49(0)89/26 02 45 73 · Fax +49(0)89/26 02 45 74
Email: mitgliederservice@vbio.de

Preise:

Bibliotheken und Organisationen: Bitte Rückfrage
Bei VBIO-Mitgliedschaft inklusiv
<https://vbio.de/beitritt>

Geschäftsstellen des Verbandes:**Geschäftsstelle München**

Dr. Carsten Roller, Corneliusstraße 12, 80469 München
Telefon +49(0)89/26 02 45 73, info@vbio.de

Geschäftsstelle Berlin

Dr. Kerstin Elbing, Luisenstraße 58/59, 10117 Berlin,
Telefon +49(0)30/27 89 19 16, elbing@vbio.de

Satz:

TypoDesign Hecker GmbH, Leimen.

Druck und Bindung:

ColorDruck Solutions, Leimen.

© VBIO e.V., München, 2024.

Printed in the Federal Republic of Germany.

ISSN 0045-205 X

BIOLOGIE

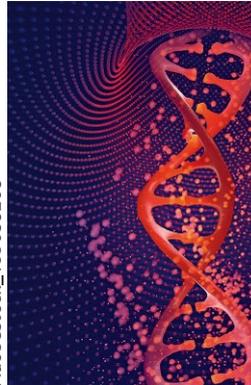
IN UNSERER ZEIT

www.biuz.de

Auf der Titelseite dieses Hefts ist ein Fehler, den wir notgedrungen in Kauf nehmen mussten. Wem ist er aufgefallen? Schicken Sie uns eine kurze „Fehlermeldung“ bis zum 20.01.2025 an info@biowisskomm.de, mit Ihrem Namen, Beruf und Postadresse und einer Kurzbeschreibung des Fehlers (nicht mehr als drei Zeilen). Unter den richtigen Einsendungen verlosen wir eine Überraschung von VBIO/BioWissKomm. Der Rechtsweg ist ausgeschlossen.

S | 2024

AdobeStock_199658268



Dieses Biuz-Sonderheft erscheint im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms SPP2141 „Weitaus mehr als nur Verteidigung: die vielen verschiedenen Funktionen des CRISPR-Cas-Systems“ und wird durch das Teilprojekt „CRISPR-Whisper – Projekt zur Sensibilisierung der Öffentlichkeit“ (Anita Marchfelder, Universität Ulm) gefördert. Mit der Durchführung von CRISPR-Whisper wurde Wolfgang Nellen mit BioWissKomm beauftragt.

Die folgenden Autor/-innen sind Mitglieder des SPP2141 oder mit dem SPP assoziiert und ihre Arbeiten werden entsprechend durch dieses Programm gefördert:

- Marcus Ziemann, Wolfgang R. Hess
- Pauline Kanngießer (AG W. Nellen, H. Ziegler)
- Finn Ole Gehlert, Lisa Hellwig, Ruth Anne Schmitz
- Uri Gophna
- Meral Kara, Selina Rust, Lennart Randau
- Philipp C. Münch (AG Alice McHardy)
- Jann Buttler (BioWissKomm)
- Lisa-Katharina Maier, Nadia di Cianni, Anita Marchfelder
- Lena Mitousis (AG Wolfgang Wohlleben)
- Axel Fehrenbach, Johannes Kippnich, Franz Baumdicker

Den folgenden Arbeitsgruppen sind wir dankbar dafür, dass sie wertvolle Beiträge zur CRISPR-Thematik außerhalb des Schwerpunktprogramms eingebracht haben:

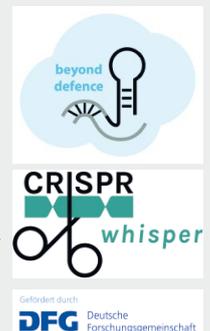
- Stefanie Grüttner
- Bhanu Prakash Potlapalli, Solmaz Khosravi, Andreas Houben
- Fabienne Gehrke, Niklas Capdeville, Laura Merker, Holger Puchta
- Sarah Esser, Alexander J. Probst
- Anna A. Gorbushina, Julia Schumacher

Wir danken dem VBIO, der die Realisierung des Sonderhefts möglich gemacht hat, Larissa Tetsch als Managing Editorin und Marga Radermacher für sorgfältiges Editing.



Das Heft erscheint in der Printversion in einer erhöhten Auflage und ist online unter www.vbio.de/biuz-crispr als Open Access für jedermann abrufbar. Wir freuen uns, wenn Sie diesen Link unter Interessierten in Ihrem Bekanntenkreis und in Ihren Netzwerken verbreiten.

Zusätzlich stellen wir (aus Platzgründen ausschließlich online als Supplementary Material) unter dem gleichen Link ein ausführliches Glossar zur CRISPR-Cas-Thematik zur Verfügung, das für Laien verständliche Erklärungen zu Fachbegriffen liefert. Unter www.biowisskomm.de werden wir versuchen, dieses Glossar in Zukunft auf einem aktuellen Stand zu halten, um der rasanten Entwicklung der Biowissenschaften Rechnung zu tragen.



- 3 Editorial**
Wolfgang Nellen, Anita Marchfelder, Lisa-Katharina Maier

ANWENDUNGEN IN MEDIZIN, PFLANZENANBAU UND MATERIALWIRTSCHAFT

- 6 Wie die CRISPR-Genschere dauerhafte Heilung verspricht**
Marcus Ziemann, Wolfgang R. Hess

- 11 CRISPR-Cas: Ein möglicher Ausweg aus der Antibiotikaresistenzkrise?**
Johannes Kippnich, Franz Baumdicker

- 13 CRISPR-Cas in Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten**
Lena Mitousis, Wolfgang Wohlleben



- 18 Wie geht es weiter mit CRISPR-Cas in der EU?**
Klaus-Dieter Jany



- 26 CRISPR-Cas für eine nachhaltigere Zukunft der Landwirtschaft**
Fabienne Gehrke, Niklas Capdeville, Laura Merker, Holger Puchta



- 37 Genomische Sequenzen sichtbar machen**
Andreas Houben, Bhanu Prakash Potlapalli, Solmaz Khosravi

- 41 CRISPR-Cas9 in der Materialforschung**
Julia Schumacher

SCHULE UND ÖFFENTLICHKEIT

- 51 „Pauline und die Ausreißer“**
Pauline Kanngiesser

- 57 Darf man in der Schule CRISPRn?**
Wolfgang Nellen

- 60 CRISPR-Whisper, das Öffentlichkeitsprojekt des SPP2141**
Wolfgang Nellen

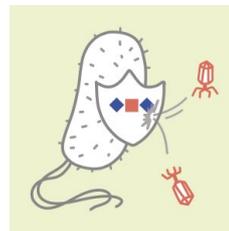


- 65 Gentechnik und Ethik**
Jann Buttlar



GRUNDLAGENFORSCHUNG AN UND MITHILFE VON CRISPR-CAS

- 77 Evolution des CRISPR-Arrays in Bakterien**
Axel Fehrenbach, Franz Baumdicker



- 82 CRISPR-Cas in unkultivierten Archaeen**
Sarah P. Esser, Alexander J. Probst

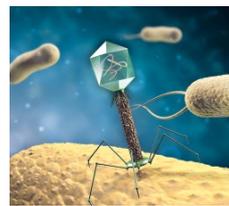
- 87 Casposons**
Finn Ole Gehlert, Lisa Hellwig, Ruth Anne Schmitz



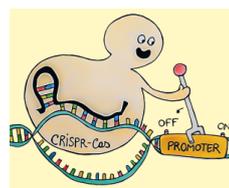
- 93 CRISPR-Cas systems on the offensive**
Uri Gophna

- 95 Schritt für Schritt ohne Schnitt**
Meral Kara, Selina Rust, Lennart Randau

- 99 Das verborgene Immunsystem unseres Mikrobioms**
Philipp C. Münch



- 104 CRISPRi mit einer Prise Salz**
Lisa-Katharina Maier, Nadia Di Cianni, Anita Marchfelder



- 112 CRISPR-Cas9: Das will ich auch!**
Stefanie Grüttner

Heilung von Sichelzellenanämie und β -Thalassämie

Wie die CRISPR-Genschere dauerhafte Heilung verspricht

MARCUS ZIEMANN | WOLFGANG R. HESS

Die Gentechnik hat in den letzten Jahrzehnten viele Fortschritte gemacht. Mit der nun zugelassenen Gentherapie gegen Sichelzellenanämie und β -Thalassämie hat sie einen weiteren Schritt nach vorne gemacht. Nach nur fünf Jahren Erprobungszeit ist es dem internationalen Team der Firma CRISPR Therapeutics gelungen, beide Krankheiten zu heilen und eine medizinische Zulassung in Großbritannien, den USA sowie innerhalb der Europäischen Union und vieler weiterer Staaten zu erhalten.

Das Phänomen der Sichelzellenanämie (auch Sichelzellenkrankheit) und ihrer genetischen Grundlagen ist vielleicht das erste Beispiel, auf das man stößt, wenn man sich mit genetisch bedingten Krankheiten beschäftigt. Das liegt zum einen daran, dass es eine auch auf der molekularen Ebene verhältnismäßig einfach zu erklärende Krankheit ist, zum anderen daran, dass Merkmalsträger eine erhöhte Resistenz gegenüber Malaria aufweisen und die Krankheit somit in Gebieten mit hoher Malariabelastung auch einen evolutionären Vorteil darstellen kann. Viele genetische Aspekte lassen sich auf der Grundlage dieses Krankheitsbildes erklären und verstehen. Gleichzeitig handelt es sich auch um die am weitesten verbreitete Krankheit, basierend auf nur einer Genmutation mit über 7,7 Millionen Betroffenen weltweit [1, 2].

Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Sichelzellenanämie nun auch das Ziel der ersten zugelassenen CRISPR-basierten Gentherapie ist [1]. Im November 2023 akzeptierte das Vereinigte Königreich die neue Therapie [3], gefolgt von den USA [4] und einer bedingten Zulassung der *European Medicines Agency* (EMA) innerhalb der EU [5]. Doch um was für eine Therapie handelt es sich?

Krankheitsbild der Sichelzellenanämie

Man kennt verschiedene Typen von Sichelzellenkrankheiten; die häufigste Ursache hierfür ist jedoch eine Punktmutation im Gen für das β -Protein von Hämoglobin (E6V) [1, 6]. Bedingt durch diese Mutation kann das atypische Hämoglobin S (HbS) bei Abgabe von Sauerstoff polymerisieren, wodurch sich die roten Blutkörperchen verformen und eine charakteristische Sichelform bilden. Diese Zellen können zu Gefäßverschlüssen führen, was sich in einer Sauerstoffunterversorgung von Geweben sowie deren dauerhafter Schädigung und starken Schmerzen äußert [6]. Die Lebenserwartung von Betroffenen liegt häufig nur bei etwa 50 Jahren [7].

Hämoglobin ist ein tetrameres Protein in roten Blutkörperchen und wird zum Transport von Sauerstoff durch den Körper benötigt. Die Struktur baut sich aus zwei α -Ketten (α_2) und einem anderen Proteinketten-Paar zusammen. In Erwachsenen ist dies zum größten Teil HbA ($\alpha_2\beta_2$) [1]. In Föten und Neugeborenen findet sich aber

IN KÜRZE

- Sichelzellenanämie wird durch **Punktmutationen im Hämoglobin- β -Gen** verursacht.
- Eine **Heilung** war bisher **nur in seltenen Fällen** möglich.
- Mit Hilfe von CRISPR-Cas wurde **erstmalig eine Umprogrammierung des fetalen Hämoglobin-F-Gens** in Sichelzellpatienten erreicht.
- **Krankheitssymptome** wurden dadurch **reduziert oder verschwanden** vollständig.
- Die Therapie wurde in den USA und in Großbritannien **bereits zugelassen**.

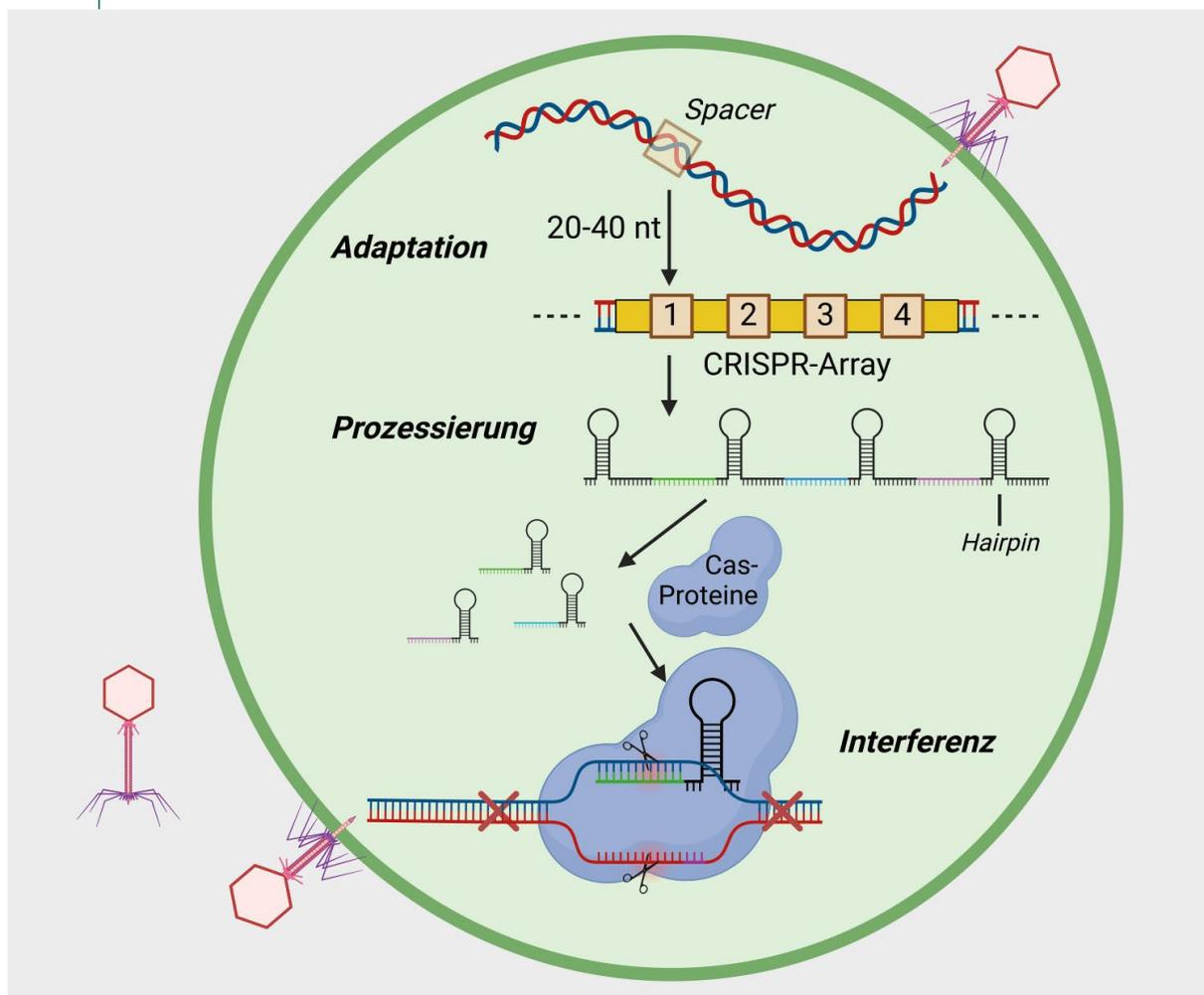
hauptsächlich das fetale Hämoglobin HbF ($\alpha_2\gamma_2$), was innerhalb der ersten Lebensmonate nach und nach durch HbA ersetzt wird. Der Grund für diesen Wechsel ist, dass HbF eine höhere Sauerstoffaffinität besitzt und dem Fötus somit eine gute Sauerstoffaufnahme ermöglicht [8]. Die Sichelzellularmutation existiert nur in der β -Kette, darum beeinflusst sie nur das HbA (bei Mutation auch als HbS bezeichnet) und äußert sich daher in Kindern erst ab etwa dem 3. Monat [1]. Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen HbF von Erwachsenen in hohen Mengen produziert wird, was die Auswirkungen von Sichelzellenanämie deutlich abmildert [9].

Beim Auftreten der HbS-Mutation muss zwischen heterozygoten und homozygoten Krankheitsbildern unterschieden werden. Personen, die nur ein mutiertes Hämoglobin-Allel (β^S) besitzen, bilden deutlich weniger Sichel-

zellen, da neben dem HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) auch HbA ($\alpha_2\beta_2$) gebildet wird, welches nicht polymerisiert und dadurch die Sichelzellenbildung blockiert [6, 10].

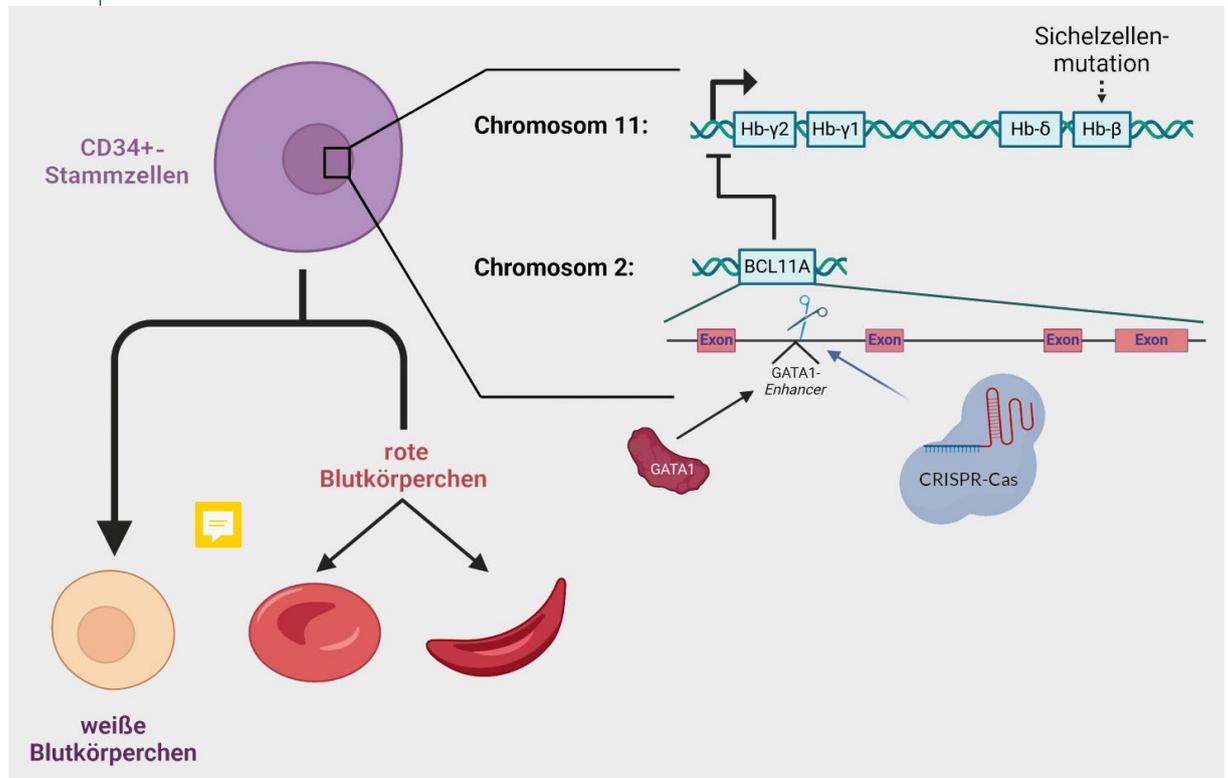
Ein verwandtes Krankheitsbild bildet die β -Thalassämie, bei der zu wenig oder fast kein Hämoglobin β produziert wird [11]. Die Patienten bilden keine Sichelzellen, leiden aber auch an ständiger Blutarmut und entwickeln dadurch Wachstumsstörungen und ein schwaches Immunsystem. Die gängige Behandlung sowohl für β -Thalassämie als auch für Sichelzellenanämie sieht regelmäßige Bluttransfusionen oder Knochenmarktransplantationen vor [11]. Letztere können eine dauerhafte Heilmethode darstellen, aber nicht für jeden Patienten kann ein geeigneter Spender gefunden werden. Hier kommt CRISPR ins Spiel.

ABB. 1 | CRISPR-CAS-SYSTEM IN EINER BAKTERIELLEN ZELLE



Der Bakteriophage infiziert die Zelle und das CRISPR-Cas-System kann einen kleinen Teil (*spacer*) des Phagenoms in den CRISPR-Array aufnehmen (**Adaptation**). Anschließend kann dieser Array transkribiert und in eine kurze RNA mit den charakteristischen *hairpin*-Strukturen prozessiert werden (**Prozessierung**). Bestimmte Enzyme erkennen diese und zerschneiden das RNA-Stück in kürzere *spacer-repeat*-Segmente, die danach den CRISPR-Cas-Komplex bilden. Bei einer erneuten Phageninfektion kann dieser Komplex dann den zum *spacer* passenden Bereich wiedererkennen und die **Phagen-DNA zerstören (Interferenz)**. Abb. erstellt mit BioRender.com.

ABB. 2 | REGULATION VON HÄMOGLOBIN IN CD34+-ZELLEN



Die Stammzelle CD34+ entwickelt sich zu verschiedenen weißen und roten Blutkörperchen. Wenn sie sich zu roten Blutkörperchen entwickelt, produziert sie Hämoglobin. Die Hämoglobingene befinden sich hauptsächlich auf Chromosom 11. Die Bildung von fetalem Hämoglobin ($\alpha_2\gamma_2$) erfordert die Produktion von γ -Hämoglobin (Hb- γ). Dessen Expression wird nach der Neugeborenenzeit bei Menschen durch BCL11A gestoppt. Dieses Gen wird von dem universellen Regulator GATA1 kontrolliert. GATA1 aktiviert das Gen *bcl11a* durch Bindung an eine *enhancer*-Region zwischen zwei Exonen innerhalb des *bcl11a*-Gens. Diese *enhancer*-Region ist die Schnittstelle der Casgevy-Therapie. Abb. erstellt mit BioRender.com.

Geneditierung mit dem CRISPR-Cas9-System

Der große Durchbruch ist mit dem CRISPR-Cas9-System gelungen. CRISPR-Cas-Systeme bilden eigentlich einen in Bakterien und Archaeen vorkommenden Mechanismus zur Abwehr von Bakteriophagen bzw. Viren. Das System agiert hierbei in drei Schritten: Integration, Prozessierung und Interaktion [12]. Der erste Schritt geschieht, nachdem die Zelle Kontakt zu einem Bakteriophagen oder Virus hatte und dessen Angriff überstanden hat. Dann kann sie ein kleineres Fragment der antagonistischen DNA von meist 20 bis 40 Nukleotiden Länge in ihr eigenes Genom einbauen. Allein dieser Schritt ist schon spektakulär: Damit baut das Bakterium einen genetischen Speicher auf, um sich später an frühere Infektionen zu „erinnern“. Diese kurzen Fragmente (genannt *spacer*) werden in Segmenten gespeichert, wo sie durch kurze, palindromische *repeats* getrennt werden (Abbildung 1). Diese CRISPR-Arrays (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) geben dem System seinen Namen und werden im zweiten Schritt in Form von RNA exprimiert und zugeschnitten. Die *repeat*-Elemente bilden durch ihre palindromische Sequenz charakteristische *hairpin*-Struktu-

ren, die durch spezifische CRISPR-assoziierte Proteine (Cas) erkannt werden, woraufhin sich der sogenannte CRISPR-Cas-Komplex ausbildet, bestehend aus den Cas-Proteinen und dem kurzen RNA-Fragment, welches sich aus dem geschnittenen *repeat* und der ursprünglichen Phagen-Sequenz zusammensetzt. Der Komplex ist nun im dritten Schritt in der Lage, Phageninfektionen zu erkennen, indem er das RNA-Fragment durch Basenpaarung mit der DNA in der Zelle vergleicht. Wenn der Komplex diese Sequenz wiedererkennt, zerschneidet er die DNA an dieser Stelle und verhindert somit die Phagenbedrohung [12].

Durch den Aufbau dieses Systems kann eine beliebige Zielsequenz in der DNA vorgegeben werden, indem eine passende Sequenz in dem CRISPR-Array eingefügt wird. Noch direkter kann das System umprogrammiert werden, wenn es eine einzige Sequenz zur Zielsuche enthält, man spricht dann von einer *single guide-RNA* [1]. Für dieses umprogrammierte CRISPR-Cas-System gibt es viele Anwendungsbereiche; der aber wohl interessanteste ist die Veränderung von genetischem Material, das sogenannte *genome editing*. Hierfür wird dem System ein Zielgen

oder eine Zielsequenz vorgegeben, welche geschnitten wird. Durch den DNA-Reparaturapparat der Zelle wird die entstandene Lücke zunächst vergrößert, dann werden die angrenzenden DNA-Abschnitte jedoch wieder zusammengefügt [13]. Wird der Zelle zusätzlich ein passendes alternatives DNA-Fragment angeboten, kann dieses in den geschnittenen Bereich inseriert werden. Hierzu wird das zu inserierende Fragment zwischen zwei DNA-Bereiche eingebettet, die den Bereichen um die Schnittstelle herum entsprechen [13]. Das Reparatursystem erkennt die Ähnlichkeit und fügt den Abschnitt an der Stelle des ursprünglichen Schnitts ein [13].

Das CRISPR-Cas-System existiert in vielen Bakterien und Archaeen, es ist aber kein universelles System. Zum heutigen Zeitpunkt sind sechs Typen mit über 33 Unterkategorien bekannt, welche auch alternative Funktionen ausüben können wie etwa die Abwehr von Plasmiden oder den Abbau von RNA [12]. Das am besten erforschte System ist der Typ II, da der CRISPR-Cas-Komplex dort nur aus einem einzigen Protein (Cas9) besteht. Dieses System wurde auch für die Sichelzellen-Gentherapie genutzt.

Die Gentherapie Casgevy zur Behandlung von Sichelzellanämie und β -Thalassämie

Die Gentherapie Casgevy (manchmal auch Exa-cel genannt) wurde in den letzten fünf Jahren zur Behandlung von Sichelzellanämie und β -Thalassämie entwickelt und ist für Patienten ab dem Alter von zwölf Jahren zugelassen [3]. Hierbei werden die Stammzellen der roten Blutkörperchen (CD34+) entnommen und durch CRISPR-Cas9-bedingtes *genome editing* außerhalb des Körpers verändert [1]. Die verbliebenen CD34+-Stammzellen im Körper des Patienten werden medikamentös unterdrückt und anschließend werden die veränderten Zellen wieder zurück zum Patienten gegeben. Durch die CRISPR-Behandlung außerhalb des Körpers wird sichergestellt, dass keine anderen Zellen von der Veränderung betroffen sind. Das in der Keimbahn der Patienten befindliche Erbgut wird nicht beeinflusst; somit betrifft die Behandlung nur den Patienten selbst und nicht dessen mögliche Nachkommen.

Das Verfahren der Casgevy-Therapie verändert jedoch nicht – wie man annehmen würde – das mutierte β -Hämoglobingen, sondern stabilisiert den Patienten stattdessen durch die Aktivierung des fetalen Hämoglobins (HbF) [1]. Es ist schon seit längerem bekannt, dass die Expression von HbF in Sichelzellpatienten nach dem Säuglingsalter zur Unterdrückung der Sichelzellenbildung führt und einzelne zugelassene Medikamente nutzen diesen Umstand bereits [9]. Um diesen Effekt dauerhaft zu erhalten, greift die CRISPR-Therapie an dem Regulator BCL11A ein, welcher für die Repression von γ -Hämoglobin und somit auch von HbF verantwortlich ist (Abbildung 2). Im Genaueren wird eine regulatorische Region, der GATA1-*enhancer*, der sich außerhalb des *bcl11A*-Leserasters befindet, zerstört [1]. Diese *enhancer*-Region ist notwendig, damit der

BCL11A-Repressor in Erythrozyten-Stammzellen produziert wird, aber nicht in anderen Blutzellen [14]. Dies hat den Vorteil, dass dem Körper dieser Regulator erhalten bleibt und nur in diesem Zelltyp ausfällt. Durch den fehlenden Repressor kann HbF produziert und die Sichelzellenbildung verhindert werden.

In Studien wurden 75 Patienten mit dieser Therapie behandelt – 44 Patienten mit β -Thalassämie und 31 mit Sichelzellanämie – und über einen längeren Zeitraum beobachtet (zum Zeitpunkt der Veröffentlichung: zwischen 1 und 36 Monaten) [15]. Keiner der Sichelzellanämie-Patienten hatte in diesem Zeitraum eine Gefäßverschlusskrise, die zuvor durchschnittlich fast vier Mal pro Jahr auftrat und lediglich zwei der β -Thalassämie-Patienten benötigten danach noch Bluttransfusionen, wobei die Zahl benötigter Transfusionen deutlich geringer ausfiel. Bei allen Patienten konnte eine gesundheitlich relevante Menge an HbF im Blut nachgewiesen werden [15]. Das heißt, die Therapie war bei allen Patienten erfolgreich.

„Was soll das wieder kosten?“

In den Medien war zu Beginn des Jahres 2024 viel über die hohen Kosten dieser Behandlung zu hören. Aktuelle Schätzungen gehen von etwa 1,5 bis 2 Millionen Euro pro Behandlung aus [3]. Dies klingt zunächst geradezu absurd teuer – eine Behandlung, die keine reguläre Person bezahlen kann. Hier muss aber bedacht werden, dass die herkömmlichen Behandlungen auch nicht kostenlos sind. Eine Studie kam zu dem Schluss, dass die lebenslangen medizinischen Kosten eines Sichelzellanämie-Patienten sich auf etwa 1,6 bis 1,7 Millionen US-Dollar belaufen (ca. 1,5 Millionen Euro) [7]. Hinzu kommen lange Krankenhausaufenthalte, ein schwächeres Immunsystem des Patienten, was diesen anfälliger gegen andere Krankheitsbilder macht, häufige und lange Arbeitsausfallzeiten usw. Es darf andererseits natürlich auch nicht vergessen werden, dass potenzielle spätere Kosten für diese Therapie noch nicht erfasst werden können. Zum Beispiel, ob die Mengen an HbF über längere Zeiträume gehalten werden können oder ob noch potenzielle Langzeitnebenwirkungen auftreten. Es ist auch zu überlegen, wie Krankenversicherungen diesen finanziellen Vorschuss kompensieren können. Unter diesem Aspekt sollte natürlich auch erwähnt werden, dass dies nicht nur eine Herausforderung für Deutschland ist. Sichelzellanämie und β -Thalassämie sind wesentlich stärker in Afrika, dem östlichen Mittelmeerraum und dem südlichen Indien verbreitet. Mittelfristig wird es eine Aufgabe sein, diese Regionen zu befähigen, Behandlungen vor Ort durchführen zu können. Eine klare finanzielle Prognose ist zur Zeit sicherlich nicht ganz einfach, aber die Therapie ist sicher nicht so unmöglich zu bezahlen, wie es auf den ersten Blick scheint.

Nicht von der Hand zu weisen ist, dass diese Therapie vielen Menschen – auch in Deutschland – helfen und ihre Lebensqualität und Lebensdauer deutlich erhöhen kann. Dies und die Tatsache, dass wir gerade erst am Anfang

dieser revolutionären medizinischen Entwicklung stehen, lässt einen optimistisch in die Zukunft schauen.

Zusammenfassung

Sichelzellanämie und β -Thalassämie sind Krankheiten, die durch Punktmutationen im Hämoglobin- β -Gen verursacht werden. Beide Krankheiten beeinträchtigen die Gesundheit der Betroffenen erheblich und sind global weit verbreitet. Mit Hilfe der CRISPR-Cas-Technologie wurde das fetale Hämoglobin-F-Gen in CD34+-Stammzellen reaktiviert, wodurch diese Form des Hämoglobins die mutierte β -Variante ersetzen kann. Die Zellen wurden für dieses Verfahren entnommen und später in den Patienten zurückgegeben, so dass die Keimbahn des Patienten nicht beeinflusst wurde. Alle behandelten Patienten bildeten eine gesundheitlich relevante Menge an Hämoglobin F und zeigten deutlich reduzierte oder gar keine Krankheitssymptome mehr. Die EU, Großbritannien und die USA haben diese erste CRISPR-Cas-Therapie bereits zugelassen.

Summary

Healing sickle cell anemia and β -thalassemia:

Sickle cell anemia and β -thalassemia are diseases caused by point mutations in the hemoglobin β gene. Both diseases significantly affect the health of patients and are widespread worldwide. Using CRISPR-Cas technology, the fetal hemoglobin F gene was reactivated in CD34+ stem cells, allowing this form of hemoglobin to replace the mutated β variant. The cells were harvested for this procedure and later returned to the patient so that the patient's germline was not affected. All treated patients produced a health-relevant amount of hemoglobin F and showed significantly reduced or no symptoms at all of the disease. The EU, the UK and the USA have already approved this first CRISPR-Cas therapy.

Schlagworte

CRISPR-Cas, Gentherapie, Sichelzellanämie, β -Thalassämie

Literatur

- [1] H. Frangoul et al. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med* 384, 252–260.
- [2] A. M. Thomson et al. (2023). Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Haematology* 10, e585–e599.
- [3] C. Sheridan (2024). The world's first CRISPR therapy is approved: who will receive it? *Nat Biotechnol* 42, 3–4.
- [4] S. Reardon (2023). FDA Approves First CRISPR Gene Editing Treatment for Sickle Cell Disease. *Scientific American*.
- [5] V. Simon. Erste Genschere-Therapie soll in der EU zugelassen werden. *tagesschau.de*, <https://www.tagesschau.de/wissen/forschung/crispr-eu-100.html>
- [6] R. E. Ware et al. (2017). Sickle cell disease. *The Lancet* 390, 311–323.
- [7] K. M. Johnson et al. (2023). Lifetime medical costs attributable to sickle cell disease among nonelderly individuals with commercial insurance. *Blood Advances* 7, 365–374.
- [8] E. Pritišanac et al. (2021). Fetal Hemoglobin and Tissue Oxygenation Measured With Near-Infrared Spectroscopy – A Systematic Qualitative Review. *Front. Pediatr.* 9, 710465
- [9] I. Akinsheye et al. (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 118, 19–27.
- [10] M. Suhail (2024). Biophysical chemistry behind sickle cell anemia and the mechanism of voxelator action. *Sci Rep* 14, 1861.
- [11] R. Origa (2017). β -Thalassemia. *Genetics in Medicine* 19, 609–619.
- [12] K. S. Makarova et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* 18, 67–83.
- [13] J. Y. Wang, J. A. Doudna (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science* 379, eadd8643.
- [14] D. E. Bauer et al. (2013). An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level. *Science* 342, 253–257.
- [15] J. De La Fuente et al. (2023). Efficacy and safety of a single dose of exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent-thalassemia and severe sickle cell disease. *HemaSphere* 7, 2–3.

Verfasst von:



Marcus Ziemann studierte von 2012 bis 2019 Biologie an der Universität Marburg. In seiner Bachelorarbeit beschäftigte er sich mit der alternativen Aminosäure Selenocystein in der Arbeitsgruppe von Johann Heider. Seine Masterarbeit thematisierte die Selbsterkennung von Typ IV CRISPR-Cas-Systemen im Labor von Lennart Randau. Seit 2019 promoviert er an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Fachbereich experimentelle Bioinformatik in der Arbeitsgruppe von Wolfgang R. Hess und forscht an CRISPR-Cas-Systemen von Cyanobakterien.



Wolfgang R. Hess studierte von 1982 bis 1987 Biologie an der Universität Rostock und der Humboldt-Universität Berlin. Nach der Promotion zum Dr. rer. nat. 1990 und Habilitation im Fach Genetik 1999 sowie Forschungsaufenthalten am Friedrich-Miescher-Institut in Basel, am CNRS-Institut in Roscoff, Frankreich und am MIT (Massachusetts Institute of Technology), USA, wechselte er 2003 zur U.S. Biotechnologiefirma New England Biolabs. Seit 2004 ist Hess Professor für Experimentelle Bioinformatik und seit 2008 Professor für Genetik an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Wolfgang R. Hess
Institut für Biologie 3
Genetik & Experimentelle Bioinformatik
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Schänzlestr. 1
79104 Freiburg
E-Mail: wolfgang.hess@biologie.uni-freiburg.de

ANTIBIOTIKARESISTENZ

CRISPR-Cas: Ein möglicher Ausweg aus der Antibiotikaresistenzkrise?

Antibiotikaresistenzen bei Bakterien stellen weltweit eine existenzielle Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar. Seit Beginn ihres Einsatzes vor etwa 70 Jahren haben antimikrobielle Arzneimittel hunderte Millionen Menschenleben gerettet. Doch die Entwicklung von Resistenzen gegen diese Medikamente durch adaptive evolutionäre Anpassung macht es Bakterien möglich, sich gegen die Wirkstoffe zu verteidigen. Dies erschwert oder verhindert die Behandlung von Infektionen durch diese Erreger erheblich.

Der übermäßige und unsachgemäße Gebrauch antimikrobieller Mittel hat in den letzten Jahrzehnten zu einer vermeidbaren Entstehung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen geführt. Weltweit werden jährlich schätzungsweise 5 Millionen Todesfälle mit resistenten Bakterien in Verbindung gebracht [1]. Mehr als eine halbe Million dieser Todesfälle treten in der europäischen Region der WHO auf, wobei besonders Süd- und Osteuropa betroffen sind. Global gesehen sind die Resistenzen besonders in Afrika, Asien und Südamerika weit verbreitet. Prognosen deuten darauf hin, dass die Zahl der mit antibiotikaresistenten Bakterien verbundenen Todesfälle in den nächsten 25 Jahren auf bis zu 10 Millionen pro Jahr steigen könnte, womit sie sogar die Mortalitätsraten durch Krebs übersteigen würde. In Anbetracht dessen ist es kaum verwunderlich, dass die WHO antibiotikaresistente Bakterien als eine der zehn größten globalen Bedrohungen für die menschliche Gesundheit einstuft.

Ausbreitung von Resistenzen

Gene, die Bakterien – wie den in Deutschland am häufigsten vertretenen resistenten Spezies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* – ihre Abwehrmechanismen gegen Antibiotika verleihen, liegen häufig auf Plasmiden. Dies sind kleine, ringförmige DNA-Mole-

küle, die neben den bakteriellen Chromosomen existieren und vererbt werden können. Viele Plasmide besitzen die Eigenschaft, ihre Gene nicht nur *vertikal*, das heißt von der Mutterzelle zu den Tochterzellen, sondern auch *horizontal* weitergeben zu können. Dabei werden die Plasmide kopiert und an benachbarte Bakterien weitergegeben. Diese Bakterien können dabei auch von anderen Bakterienstämmen oder -spezies stammen. Dieser Austausch von Resistenzgenen trägt

zur schnellen Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei und führt dazu, dass weltweit Bakterienpopulationen, die einst anfällig für Antibiotika waren, zunehmend resistent werden. Zudem haben sich hierdurch inzwischen Plasmide entwickelt, die Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika verleihen. Dadurch entstehen Bakterien, die als multiresistente Keime besonders schwer zu behandeln sind.

Traditionell konzentrierte sich die Bekämpfung resistenter Bakterien auf die Entwicklung neuer Antibiotika. Doch die Entwicklung solcher Medikamente ist in den letzten Jahren immer schwieriger geworden, während sich Resistenzen rasant ausbreiteten. Daher sind neue Ansätze dringend erforderlich.

Resistenzplasmide zerstören

Ein vielversprechender Ansatz besteht darin, die für die Antibiotikaresistenz verantwortlichen Plasmide zu zerstören oder zumindest in ihrer Funktion zu beeinträchtigen. Dazu wird ein mobiles CRISPR-Cas-

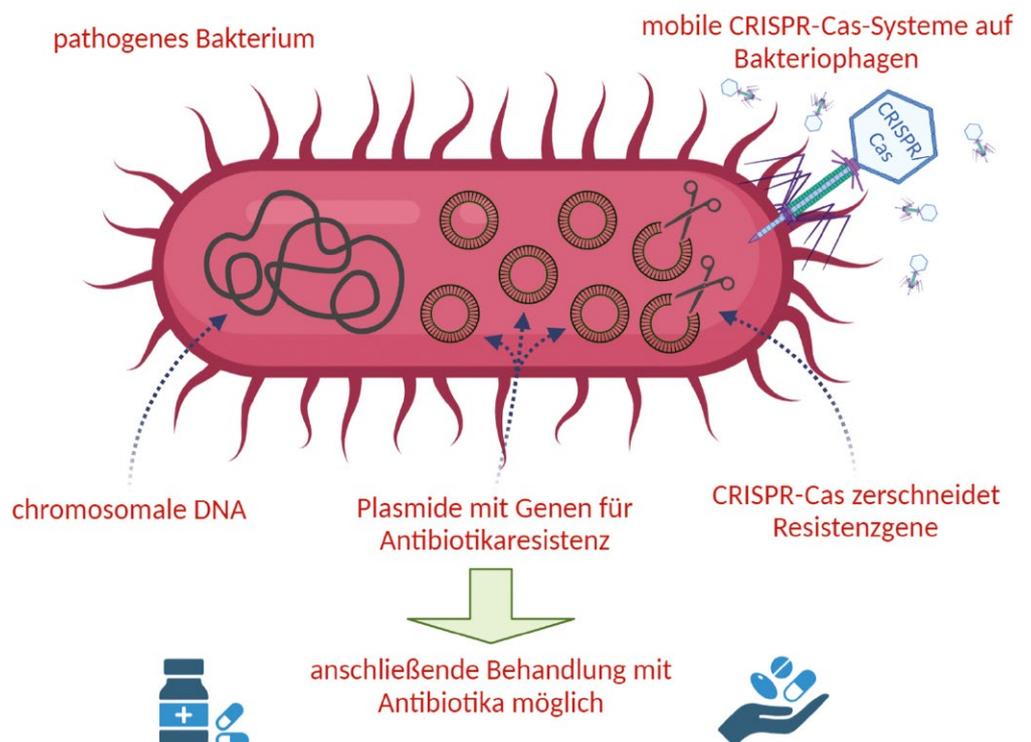


ABB. 1 Konzept eines CRISPR-Cas-basierten Verfahrens zur Behandlung von Infektionen mit antibiotikaresistenten Keimen.

System in die Bakterien eingeführt, das gezielt nach diesen Plasmiden sucht und sie zerschneidet (Abbildung 1). Auf diese Weise werden die Zellen für den Einsatz von Antibiotika resensitiviert, so dass sie anschließend wie nicht resistente Stämme behandelt werden können. Unter kontrollierten Laborbedingungen wurde dieser Ansatz bereits erfolgreich getestet [2].

Dennoch steht die Entwicklung dieser Methode erst am Anfang. Eine der herausforderndsten Aufgaben besteht darin, CRISPR-Cas-Systeme in ausreichend vielen und in den gewünschten Bakterien zu induzieren. Hierfür wurden im Labor verschiedene Methoden eingesetzt, darunter wirtsspezifische Bakteriophagen, Phagemide und Plasmide, die zu horizontalem Gentransfer fähig sind. Dabei wird bei den Bakterien das CRISPR-Cas-System entweder in das Chromosom des Bakteriums eingefügt oder es befindet sich auf einem induzierbaren Plasmid. Je nach CRISPR-Cas-Typ werden anschließend die Resistenzplasmide zerschnitten oder inaktiviert.

Um zu ermitteln, welche CRISPR-Cas-Typen für welche Resistenzplasmide am effektivsten sind, werden auch mathematische Modelle aus der Populationsgenetik herangezogen. Diese Modelle ermöglichen die Vererbung und Evolution der Plasmide vorherzusagen. Insbesondere von Interesse sind hierbei Mutationen auf den Plasmiden, welche ein erfolgreiches Erkennen und damit das Zerschneiden oder Inaktivieren des Plasmids durch das CRISPR-Cas-System verhindern. Für eine anschließende erfolgreiche Behandlung mit Antibiotika muss die Wahrscheinlichkeit, dass solche Mutationen auftreten und sich verbreiten, möglichst gering gehalten werden. Hierbei muss man besonders darauf achten, die Verbreitung der Mutationen nicht noch zusätzlich zu fördern. Es besteht nämlich die Möglichkeit, dass sich mutierte Resistenzplasmide nach dem Zerschneiden der anderen Plasmide schneller verbreiten, was die Resensitivierung der Bakterien schnell unwirksam werden lassen würde.

Sollten die Herausforderungen des effizienten Induzierens in den

Zellen und der Immunevasion durch Mutationen bewältigt werden können, könnten CRISPR-Cas-basierte Verfahren in der Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Behandlung von Infektionen mit antibiotikaresistenten Keimen darstellen.

Literatur

- [1] Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399(10325), 629–655, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- [2] P. Gholizadeh et al. (2020). How CRISPR-Cas System Could Be Used to Combat Antimicrobial Resistance. *Infection and Drug Resistance* 13, 1111–1121, <https://doi.org/10.2147/IDR.S247271>

Johannes Kippnich, Exzellenzcluster „Kontrolle von Mikroorganismen zur Bekämpfung von Infektionen“ (Controlling Microbes to Fight Infections, CMFI), Institut für Biomedizinische Informatik, Universität Tübingen

Franz Baumdicker, Exzellenzcluster „Kontrolle von Mikroorganismen zur Bekämpfung von Infektionen“ (CMFI) & Exzellenzcluster „Maschinelles Lernen für die Wissenschaft“, Institut für Biomedizinische Informatik, Universität Tübingen



Workshop der Gesellschaft für Genetik:

„Auf dem Weg zur Professur“

Themen des Workshops:

- Die Bewerbung
- Das Berufungsverfahren
- Der Probevortrag
- Das Gespräch mit der Berufungskommission

Interessiert?

Melden Sie sich bei Prof. Dr. Sandra Hake (sandra.hake@gen.bio.uni-giessen.de) an!

Information: www.gfgenetik.de

 @GfGenetik



Mitglied im VBIO

Gut geschützt durch CRISPR-Cas-Systeme

CRISPR-Cas in Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten

LENA MITOUSIS | WOLFGANG WOHLLEBEN



Aktinomyceten produzieren eine große Vielfalt an Naturstoffen, die in der Medizin und Industrie für uns Menschen von großer Bedeutung sind. Besonders Antibiotika sind unentbehrlich für die Behandlung von Infektionskrankheiten. Man geht davon aus, dass sich Aktinomyceten in ihren natürlichen Habitaten durch die Naturstoffe vor anderen Konkurrenten schützen. Es gibt aber auch andere Bedrohungen wie zum Beispiel die Infektion durch Phagen. Abwehrsysteme wie CRISPR-Cas können davor schützen. Über die Funktion von CRISPR-Cas-Systemen in Aktinomyceten ist aber bisher nur sehr wenig bekannt.

Eine der größten taxonomischen Einheiten innerhalb der Bakterien ist die Klasse der *Actinomycetes* (Abbildung 1). Sie beinhaltet grampositive, GC-reiche Bakterien mit häufig filamentösem Wachstum. Viele Aktinomyceten haben einen komplexen Lebenszyklus (Abbildung 2), während dem sich das vegetativ wachsende, verzweigte Substratmycel zu unverzweigtem Luftmycel weiter differenziert. Aus dem Luftmycel werden dann Sporen gebildet. Diese wachsen nach dem Auskeimen wiederum als vegetatives Mycel und der Zyklus beginnt von vorne. Aktinomyceten kommen häufig im Boden vor; man findet sie aber auch in anderen Habitaten wie etwa in Gewässern. In ihrem jeweiligen Ökosystem spielen sie eine wichtige Rolle. Beispielsweise im Boden sind *Streptomyces*, *Nocardia* oder *Cellulomonas* an der Humusbildung beteiligt, da sie sowohl Pilze als auch pflanzliches und tierisches Material zersetzen können. Abgesehen davon tragen dort insbesondere *Streptomyceten* auch durch die Synthese von Geosmin zum typischen waldig-erdigen Geruch von Boden bei. Es gibt auch symbiontische Aktinomyceten: So leben Stickstoff-fixierende Aktinomyceten wie Vertreter der Gattung *Frankia* mit Wurzeln von Pflanzen assoziiert. Einige Antibiotika-produzierende Arten – wie z. B. *Streptomyces*, *Pseudonocardia* oder *Amycolatopsis* – kommen dagegen gemeinsam mit Insekten (z. B. Termiten, Ameisen oder Wespen) vor. Fast alle Aktinomyceten sind harmlos; es gibt nur sehr wenige pathogene Arten. Dazu gehören unter anderem *Mycobacterium tuberculosis*, der Erreger von Tuberkulose, oder *Corynebacterium diphtheriae*, der Auslöser der Diphtherie.

Aktinomyceten als Quelle von wichtigen Naturstoffen

Die besondere Relevanz von Aktinomyceten liegt hauptsächlich in ihrem großen Potenzial, biologisch aktive Naturstoffe zu produzieren. Die Isolierung von Aktinomycin im Jahr 1941 [1] – dem ersten Antibiotikum aus Aktinomyceten – stellt nur den Anfang einer langen Erfolgsgeschichte dar. Seitdem wurden Aktinomycetenstämme aus verschiedensten Quellen mit zum Teil extremen

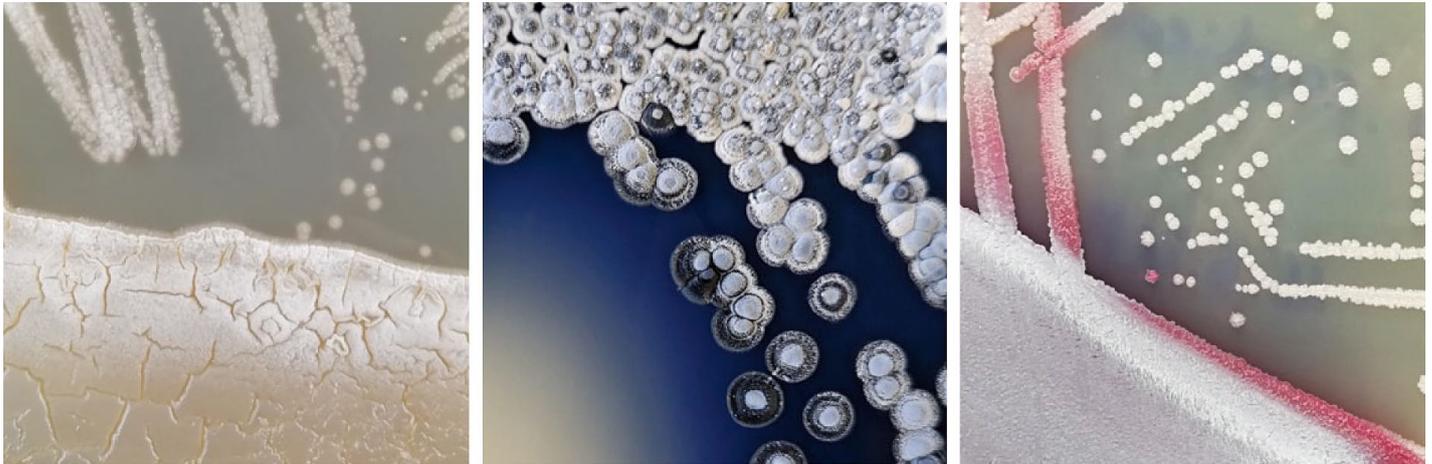


ABB. 1 Vielfältige Morphologie von Aktinomyceten. Aktinomyceten können als vegetatives Substratmycel wachsen, das meist beige ist. Unter bestimmten Bedingungen kann sich dieses Mycel zu weißlich-pudrigem Luftmycel ausdifferenzieren, woraus sich dann weißliche oder graue Sporen bilden. Manche Aktinomyceten bilden Naturstoffe, die die Zellen und den Agar bunt färben können. In dieser Abbildung zu sehen sind *Streptoalloteichus tenebrarius*, *Streptomyces albidoflavus* und *Streptomyces coelicolor*.

Bedingungen isoliert (Boden, Süß- und Salzwasser, Kalkstein, Luft, Schwämme, Wüste, Vulkanhöhlen). Diese wurden auf die Produktion von aktiven Substanzen gescreent. Zwischen 1950 und 1970 – der sogenannten „goldenen Ära der Antibiotika“ – stammten rund 60 Prozent aller Antibiotika aus Aktinomyceten, größtenteils aus *Streptomyces*-Stämmen [2]. Bis heute wurde eine sehr große Variation an unterschiedlichsten Naturstoffen in Aktinomyceten entdeckt. Darunter befinden sich vielfältige chemische Strukturen wie Glykopeptide, β -Lactame, Makrolide, Tetracycline, Rifamycine oder Aminoglycoside. Die Naturstoffe besitzen eine Vielzahl an unterschiedlichen Wirkmechanismen – sie wirken antibiotisch, fungizid, insektizid, herbizid und antiviral, hemmen Enzyme, Tumorstadium oder modulieren das Immunsystem. Heutzutage geht beinahe ein Drittel aller verwendeten Antibiotika ursprünglich auf Aktinomyceten zurück.

Genetisches Potenzial und Zugänglichkeit von Aktinomyceten

Die Gene, die für die Synthese der Naturstoffe kodieren, lassen sich in der Genomsequenz von Aktinomyceten meist in sogenannten Biosynthesegenclustern (BGC) wie-

derfinden. Das bedeutet, dass die Gene auf der DNA benachbart sind und in der Regel gemeinsam exprimiert und reguliert werden. Häufig besitzt ein BGC zusätzlich zu den Genen für die Synthese des Produktes auch die Gene für die dazugehörigen Regulatoren oder Resistenzgene. Durch bioinformatische Analysen von Aktinomyceten-Genomen weiß man, dass sie mehrere BGCs besitzen können. Im Durchschnitt findet man 16 BGCs pro Genom, wobei es auch Beispiele mit über 60 Clustern gibt [3]. Unter Standardlaborbedingungen wird oft aber nur ein Bruchteil aller BGCs exprimiert. Die inaktiven BGCs nennt man daher auch „schlafende“ Biosynthesegencluster. Es gibt verschiedene Ansätze, um dieses „versteckte“ Potenzial auszuschöpfen und die BGCs zu „wecken“. Entweder man versucht, den ursprünglichen Stamm genetisch so zu verändern, dass die Expression des „schlafenden“ BGCs aktiviert wird. Alternativ kann man die für die Synthese verantwortlichen Gene aus dem eigentlichen Stamm isolieren und in einem anderen, optimierten Stamm heterolog exprimieren. Das setzt voraus, dass man Methoden und Werkzeuge hat, um diese Stämme molekulargenetisch zu bearbeiten. Dazu gehören zum Beispiel die Isolierung von DNA, das Klonieren, der Transfer von rekombinanter DNA in die Zellen und die Selektion von Mutanten. Bei Aktinomyceten kommt es häufig vor, dass molekulargenetische Standardlabormethoden nicht oder nicht effizient funktionieren. Mögliche Ursachen dafür können unter anderem in der Aktivität von Abwehrmechanismen wie etwa dem Restriktionsmodifikationssystem oder aber auch dem CRISPR-Cas-System liegen.

CRISPR-Cas in Aktinomyceten

CRISPR-Cas ist bekannt als prokaryotisches adaptives Immunsystem. Es besteht in der Regel aus den entsprechenden *cas*-Genen und *spacer-repeat*-Einheiten, die als

IN KÜRZE

- Aktinomyceten haben oft einen komplexen Lebenszyklus und sind eine wichtige Quelle für **medizinisch und industriell relevante Naturstoffe** wie z. B. Antibiotika.
- Man findet in **etwa der Hälfte aller Aktinomyceten-Genome** CRISPR-Cas. Trotzdem ist die Funktion von CRISPR-Cas in Aktinomyceten aktuell kaum erforscht.
- Beispiele aus *Streptomyces avermitilis*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Streptoalloteichus tenebrarius* weisen **untypische Eigenschaften** auf, die zum Teil auch mit dem komplexen Lebenszyklus zusammenhängen.

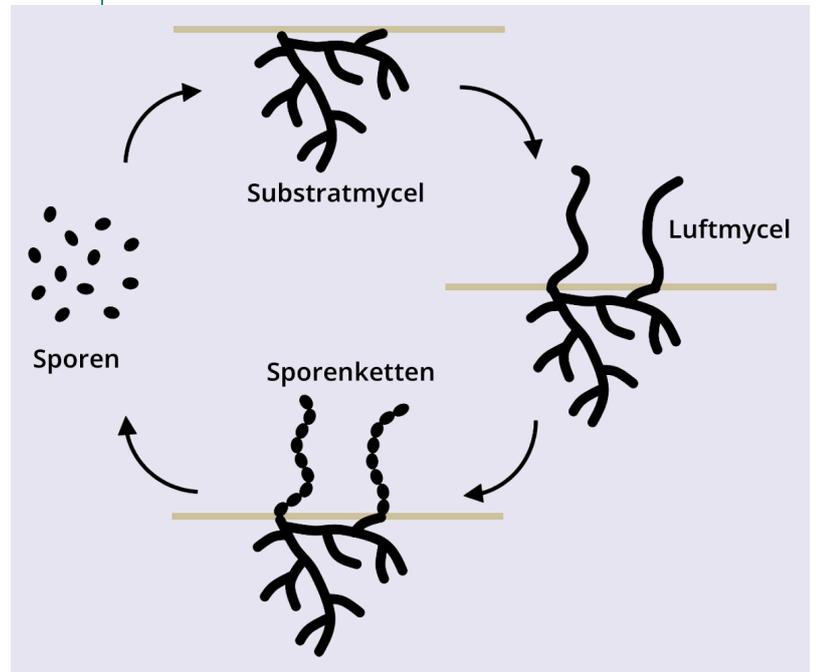
CRISPR-Array bezeichnet werden. Häufig findet man CRISPR-Arrays direkt neben den *cas*-Genen; beides gemeinsam wird als CRISPR-Locus bezeichnet. CRISPR-Arrays können auch an anderen Stellen im Genom auftauchen als in Nachbarschaft von *cas*-Genen. Es gibt auch Beispiele von CRISPR-Arrays in Stämmen, die keine *cas*-Gene besitzen. Sequenzanalysen aller vollständigen bakteriellen Genomsequenzen zeigen, dass in 41,9 Prozent der bakteriellen Genome *cas*-Gene und/oder CRISPR-Arrays kodiert sind [4]. Betrachtet man die Gruppe der Aktinobakterien, findet man CRISPR-Loci in nahezu 50 Prozent der Genome [5]. In *Streptomyces*-Genomen kommen bei 65,7 Prozent CRISPR-Arrays vor, aber nur 37,1 Prozent haben auch die entsprechenden *cas*-Gene dazu [6].

CRISPR-Cas-Systeme können in unterschiedliche Typen unterteilt werden (Typ I-VI). Analysen der Verteilung der sechs unterschiedlichen CRISPR-Cas-Typen ergeben, dass es sich in fast allen Fällen um Typ-I-Systeme, hauptsächlich Typ I-E, handelt. Obwohl die Sequenzanalysen demonstrieren, dass CRISPR-Cas-Systeme in Aktinomyzeten etwa ähnlich häufig vorkommen wie in allen bakteriellen Genomen, sind CRISPR-Cas-Systeme aus Aktinomyzeten nur sehr wenig experimentell erforscht. Nach unserem besten Wissen gibt es aktuell nur drei experimentell und funktionell charakterisierte Beispiele aus Aktinomyzeten.

Das erste Beispiel – ein CRISPR-Cas auf dem linearen *Streptomyces* Plasmid pSHK1 – wurde im Jahr 2011 von Guo et al. publiziert [7]. Das System umfasst acht *cas*-Gene mit zwei flankierenden CRISPR-Arrays (Abbildung 3) und fünf zusätzlichen Arrays über die restliche Plasmidsequenz verteilt. Es entspricht damit einem typischen Typ I-E-System, wie es auch in *Escherichia coli* vorkommt. Interessanterweise liefert das System im Laborexperiment keinen Schutz vor Phageninfektion oder Plasmiden. Außerdem konnten bisher keine Homologien zwischen *spacer*-Sequenzen einerseits und Plasmid- oder Phagensequenzen andererseits gefunden werden. Woran das liegen könnte und welche potenzielle Funktion das System stattdessen haben könnte, ist bislang nicht geklärt.

Als zweites Beispiel folgte 2016 eine Veröffentlichung von Qui et al. [8] über das erste aktive System aus Aktinomyzeten. Die Publikation beschreibt ein Typ I-E-System in *Streptomyces avermitilis* (Abbildung 3), das genetisch sehr große Ähnlichkeiten zum gut charakterisierten System aus *Escherichia coli* aufweist. Es bietet Schutz vor Phagen und Plasmiden, aber der Einbau von neuen *spacer*-Abschnitten findet generell eher selten statt. Im Vergleich mit dem bekannten System aus *E. coli* fallen Unterschiede auf, was die Bedingungen des *spacer*-Erwerbs (Adaptation) angeht. Normalerweise werden keine neuen *spacer* eingebaut, wenn es für eine fremde DNA bereits einen *spacer* mit exakter Übereinstimmung gibt. In diesem Fall kann die eingedrungene DNA sofort abgebaut werden. Für das System aus *S. avermitilis* wurde aber auch unter diesen Bedingungen der Einbau von zusätzlichen *spacer*-Abschnitten beobachtet. Am interessantesten ist aber, dass

ABB. 2 | KOMPLEXER LEBENSZYKLUS VON FILAMENTÖSEN AKTINOMYCETEN

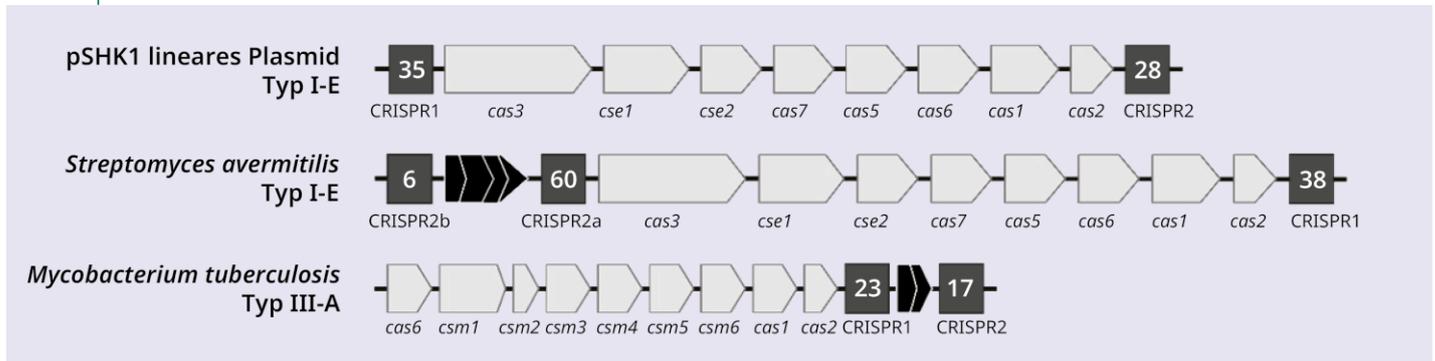


Unterhalb der Mediengrenze wächst das verzweigte Substratmycel. Dieses durchbricht die Grenze und differenziert sich zu unverzweigtem Luftmycel aus. Daraus werden einzelne runde Sporen abgeschnürt, die in Sporenketten vorliegen. Die Sporen können sich frei verteilen. Beim Auskeimen bildet sich wieder vegetatives Substratmycel und der Zyklus beginnt von vorne.

in *S. avermitilis* Zusammenhänge zwischen der CRISPR-Cas-Aktivität und der Phase des Lebenszyklus der Zellen festgestellt wurden. Die Aktivität des Abwehrsystems scheint während der Sporulation erhöht zu sein, da ein gesteigerter *spacer*-Einbau und Verlust eines fremden Plasmids nach der Sporulation der Zellen beobachtet wurde – im Gegensatz zum mycelartigen Wachstum.

Das dritte Beispiel eines funktional charakterisierten Systems in Aktinomyzeten stammt aus *Mycobacterium tuberculosis* und wurde 2019 von Wei et al. [9] beschrieben. Hier handelt es sich um ein Typ-III-A-System (Abbildung 3). Die Untersuchung der natürlichen Funktion des CRISPR-Cas-Systems belegt, dass es in der Abwehr gegen mobile genetische Elemente aktiv ist. Im Vergleich zu anderen bekannten Typ-III-A-Systemen zeigt es aber auch untypische Besonderheiten beim Reifungsprozess der crRNA. Normalerweise werden in Typ-III-Systemen die crRNAs am 3'-Ende von nicht CRISPR-Cas-spezifischen Nukleasen getrimmt. Die gereifte crRNA bildet keine Sekundärstruktur. Die crRNAs aus *M. tuberculosis* hingegen werden nicht am 3'-Ende getrimmt und bilden eine Sekundärstruktur, die somit eher an die crRNAs aus Typ-I-Systemen erinnert. Bei diesem Reifungsprozess der crRNA ist das Cas-Protein Cas6 beteiligt. Während die Aktivität in anderen Systemen unabhängig von Metallionen ist, wurde für Cas6 aus *M. tuberculosis* eine Abhängigkeit von der

ABB. 3 | CRISPR-CAS-SYSTEME AUS AKTINOMYCETEN



Übersicht der CRISPR-Cas-Systeme aus den experimentell charakterisierten Beispielen *Streptomyces*-Plasmid pSHK1, *Streptomyces avermitilis* und *Mycobacterium tuberculosis*. Die hellen Pfeile stehen für die *cas*-Gene. Die Quadrate stellen CRISPR-Arrays dar, die Zahl darin steht für die Anzahl der *spacer*. Die dunklen Pfeile stehen für andere, nicht CRISPR-Cas-spezifische Gene. Hier sind es in beiden Fällen Transposasogene.

Anwesenheit von Ca^{2+} und Mn^{2+} gezeigt. Lange Zeit vor dieser ausführlichen funktionalen Charakterisierung des CRISPR-Cas-Systems aus *M. tuberculosis* wurden die CRISPR-Array-Sequenzen bereits genauer analysiert. Durch die Aktivität des Systems liegen in unterschiedlichen Isolaten Sequenzvariationen innerhalb der CRISPR-Arrays vor. Mit Hilfe der variablen *spacer*-Sequenzen ist es möglich, *Mycobacterium*-Isolate evolutionär und epidemiologisch einzuordnen. Bereits 1997 wurde die „spoligotyping“-Methode (= *spacer oligonucleotide typing*) für *M. tuberculosis* entwickelt [10]; zehn Jahre später wurde sie auch für *Corynebacterium diphtheriae* etabliert [11].

CRISPR-Cas-Systeme aus *Streptoalloteichus tenebrarius*

Wir beschäftigen uns hauptsächlich mit Aktinomyzeten und ihren Naturstoffen. Bei der Arbeit mit unserem Laborstamm *Streptoalloteichus tenebrarius* wurde aber auch das Interesse an CRISPR-Cas in Aktinomyzeten geweckt. Der Stamm ist ein industrieller Produzent von Aminoglycosid-Antibiotika und wurde im Rahmen einer Stammentwicklung zur Steigerung der Produktion von Tobramycin, einem Breitspektrumantibiotikum, optimiert [12]. Die genetische Manipulation ist sehr herausfordernd, da viele Standardmethoden nicht oder nur sehr ineffizient funktionieren. Rekombinante DNA wird in *S. tenebrarius* nur über Konjugation aufgenommen. Die dabei verwendete DNA muss homologe Bereiche zum *S. tenebrarius*-Genom tragen und über Rekombination ins Genom integriert werden, da sie sonst nicht stabil in der Zelle bleibt. Zusätzlich ist der Stamm gegen die meisten herkömmlich verwendeten Selektionsmarker resistent, wodurch die verfügbaren Marker limitiert sind. Genauere Analysen der Genomsequenz zeigten, dass *S. tenebrarius* nicht nur 33 potenzielle BGCs trägt, sondern auch drei CRISPR-Cas-Systeme der Klasse 1. Um herauszufinden, ob eventuell die Aktivität der CRISPR-Cas-Systeme die Ursache für die Schwierigkeiten bei der genetischen Manipulation sein könnten, werden die Systeme genauer untersucht. Ziel ist es herauszu-

finden, welche Rolle CRISPR-Cas-Systeme allgemein in Aktinomyzeten spielen und inwieweit sie auch an Prozessen abgesehen von Immunität beteiligt sind. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass eines der CRISPR-Cas-Systeme einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung in *S. tenebrarius* haben könnte.

Zusammenfassung

Aktinomyzeten sind eine diverse Gruppe an Bakterien mit bedeutenden Eigenschaften für die Medizin und die Industrie. Ein Großteil der heutzutage verwendeten Antibiotika hat seinen Ursprung in Aktinomyzeten. Durch die Produktion von biologisch aktiven Naturstoffen sind Aktinomyzeten in der Umwelt gut vor Konkurrenten geschützt. Das prokaryotische Immunsystem CRISPR-Cas bietet Schutz vor Phagen und fremder DNA/RNA. Es ist in etwa 50 Prozent aller Aktinomyzeten-Genome zu finden. Die Funktionsweise von CRISPR-Cas bei Aktinomyzeten ist – bis auf wenige Beispiele – kaum untersucht. Dabei zeigen die charakterisierten Systeme aus *S. avermitilis* und *M. tuberculosis* zum Teil untypische Eigenschaften. In *S. avermitilis* hängt die Aktivität des CRISPR-Cas-Systems mit der Phase des Lebenszyklus zusammen. Bei *M. tuberculosis* ist die crRNA-Reifung anders als bei ähnlichen Systemen. Unsere Untersuchungen der CRISPR-Cas-Systeme von *S. tenebrarius* weisen auf eine potenzielle Beteiligung an der Zelldifferenzierung hin.

Summary CRISPR-Cas in antibiotics-producing actinomycetes

Actinomycetes are a diverse group of bacteria with important properties for medicine and industry. Most of the antibiotics used today originate from actinomycetes. The production of biologically active natural products protects actinomycetes against competitors in the environment. The prokaryotic immune system CRISPR-Cas offers protection against phages and foreign DNA/RNA. It is found in about 50 per cent of all actinomycetes genomes. Apart from a few

examples, the function of CRISPR-Cas in actinomycetes has barely been investigated so far. The characterized systems of *S. avermitilis* and *M. tuberculosis* show atypical features. In *S. avermitilis*, the activity of the CRISPR-Cas systems is linked to the phase of its life cycle. In *M. tuberculosis*, crRNA maturation differs from similar systems. Our studies of *S. tenebrarius* CRISPR-Cas systems suggest a possible involvement in cell differentiation.

Schlagworte:

Aktinomyceten, Antibiotika, Naturstoffe, CRISPR-Cas

Literatur

- [1] S. A. Waksman, H. B. Woodruff (1941). *Actinomyces antibioticus*, a New Soil Organism Antagonistic to Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria. *J. Bacteriol* 42, 231–249.
- [2] J. Bérdy (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot*, 65, 385–395.
- [3] R. Seshadri et al. (2022). Expanding the genomic encyclopedia of Actinobacteria with 824 isolate reference genomes. *Cell genomics* 2, 12.
- [4] C. Pourcel et al. (2019). CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers. *NAR* 48, D535-D544.
- [5] D. Burstein et al. (2016). Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems. *Nat. Commun* 7, 10613.
- [6] J. Zhang et al. (2018). Comparative Analysis of CRISPR Loci Found in *Streptomyces* Genome Sequences. *Interdiscip. sci. comput. life sci.* 10, 848–853.
- [7] P. Guo et al. (2011). Characterization of the multiple CRISPR loci on *Streptomyces* linear plasmid pSHK1. *ABBS* 43, 630–639.
- [8] Y. Qiu et al. (2016). An active type I-E CRISPR-Cas system identified in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS one* 11, e0149533-e0149533.
- [9] W. Wei et al. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* type III-A CRISPR-Cas system crRNA and its maturation have atypical features. *FASEB J* 33, 1496–1509.

- [10] J. Kamerbeek et al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907–914.
- [11] I. Mokrousov et al. (2007). *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. *Biotechnol J.* 2, 901–906.
- [12] L. Mitousis et al. (2021). Engineering of *Streptoalloteichus tenebrarius* 2444 for sustainable production of tobramycin. *Molecules* 26, 4343.

Verfasst von:



Lena Mitousis studierte Biologie und Mikrobiologie an der Universität Tübingen. Seit 2021 promoviert sie bei Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen zum Thema CRISPR-Cas-Systeme in Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten.



Wolfgang Wohlleben promovierte in Physik an der Universität Erlangen. Ab 1980 war er Gruppenleiter am Lehrstuhl Genetik der Universität Bielefeld, ab 1992 Professor an der Universität des Saarlandes und ab 1994 Professor am Lehrstuhl Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen. Seit 2019 ist er Senior-Professor an der Universität Tübingen.

Korrespondenz

Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben
 Universität Tübingen
 Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT)
 Mikrobiologie/Biotechnologie
 Auf der Morgenstelle 28
 72076 Tübingen
 E-Mail:
 wolfgang.wohlleben@biotech.uni-tuebingen.de



Die Online-Studienführer des VBIO vermitteln Ihnen den Überblick über die große Vielfalt spannender biowissenschaftlicher Studiengänge. Informieren Sie sich!

www.bachelor-bio.de
www.master-bio.de



Begrüßungsgeschenk „Perspektiven“ für Neumitglieder:
www.vbio.de/beitritt



Gentechnik und neue genomische Techniken in der Pflanzenzüchtung

Wie geht es weiter mit CRISPR-Cas in der EU?

KLAUS-DIETER JANY

ABB. 1 In Großbritannien wurde Püree der gentechnisch veränderten Flavr-Savr™-Tomate in Dosen vertrieben.



Die Landwirtschaft steht vor vielen Herausforderungen. Bedeutsam sind eine wachsende Weltbevölkerung, die Verknappung von Ackerland und die Risiken im Zusammenhang mit dem Klimawandel sowie der Verlust der biologischen Artenvielfalt. Die Pflanzenzüchtung hat sich stets den ändernden Bedingungen und Anforderungen gestellt und neue Verfahren zur Anpassung von Pflanzen in ihre Züchtungsverfahren aufgenommen. Hier zeichnet sich ein stetiges Kontinuum ab. Die neuesten Verfahren für Änderungen der genetischen Information sind die neuen genomischen Techniken (NGT). In vielen Ländern stehen bereits genomeditierte Pflanzen in der „Erprobung“ und die Ergebnisse sind vielversprechend für Lösungen der anstehenden Probleme. Ob es in der Europäischen Union zu praktischen Anwendungen kommen wird, hängt unter anderem weitgehend von der gesetzlichen Regulierung genomischer Techniken ab.

Die Gentechnik stellt eine Querschnittstechnik dar, die seit 1990 weite Bereiche der Medizin, Chemie, Landwirtschaft, Lebensmittelproduktion und des Umweltschutzes nachhaltig beeinflusst. Der Ausdruck „Gentechnik“ löst je nach Anwendungsbereich bei den Menschen sehr unterschiedliche Reaktionen aus. Im medizinischen Bereich wird die Gentechnik seit der Einführung von humanem Insulin, dem Faktor VIII und anderer gentechnisch hergestellter Medikamente positiv bewertet und ist weitgehend akzeptiert. Gentechnik wird als Fortschritt in der Gesundheitsvorsorge bis hin zur Bereitstellung von genomeditierten Organen für Transplantationen gesehen. Ein großer Anteil an verarbeiteten Lebensmitteln ist mit der Gentechnik in Berührung gekommen, aber ist selbst nicht gentechnisch verändert worden. In diesem Bereich sind Anwendungen der Gentechnik weitgehend unbekannt und werden daher auch kaum thematisiert. Im Gegensatz dazu werden Anwendungen der Gentechnik in der Landwirtschaft und beim Umweltschutz seit mehr als 30 Jahren emotional und kontrovers diskutiert. Befürworter sehen hier Möglichkeiten für eine nachhaltigere Landwirtschaft, den Herausforderungen des Klimawandels zu begegnen und zur Ernährungssicherheit beizutragen, während Kritiker mit der Gentechnik das Ende der konventionellen und insbesondere ökologischen und gentechnikfreien Landwirtschaft, die großflächige Einführung von pestizidtoleranten Pflanzen, negative Auswirkungen auf die Biodiversität sowie eine Monopolisierung der Pflanzenzüchtung befürchten. Generell sehen sie unbeherrschbare Risiken für Mensch und Umwelt.

Die Argumente für oder gegen Gentechnik haben sich im Laufe der Zeit kaum geändert, wohl aber die wissenschaftlichen Erkenntnisse über Struktur und Funktion von Genen sowie die Verfahren für genetische Veränderungen von Organismen, die sich in den letzten 30 Jahren fortentwickelt haben und in ihrem Ergebnis immer präziser wurden – von der induzierten Zufallsmutagenese durch ionisierte Strahlen oder mutagene Chemikalien über die ungerichtete Einführung funktioneller Gene bis hin zu gezielten sequenzspezifischen Änderungen im Genom. Letztere Verfahren werden unter dem Begriff „neue genomische Techniken“ (NGT) summiert. Bekannter sind hierfür auch

die Begriffe CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas)*) und TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) bzw. Genscheren.

Gentechnik und neue genomische Techniken

Bei der induzierten Zufallsmutagenese sind die genetischen Veränderungen nicht vorhersehbar und die Änderungen auf der molekularen Ebene sind nicht gezielt ausgerichtet. Hunderte von Mutationen treten auf. Mit einem *trial and error*-Ansatz und Wissen findet der Züchter die für ihn interessanten Pflanzen heraus und züchtet sie über Rückkreuzungen weiter. Trotz der vielen (unbekannten) Mutationen haben die letzten acht Jahrzehnte im Umgang mit solchen mutierten und zugelassenen Pflanzen gezeigt, dass von ihnen im Vergleich zu Pflanzen aus traditionellen Kreuzungszüchtungen keine besonderen oder andersartigen Risiken für Mensch, Tier und Umwelt ausgehen. Gegenwärtig sind etwa 3200 Sorten für 200 Pflanzenvarietäten, die aus der induzierten Zufallsmutagenese hervorgegangen sind, in der Datenbank der Internationalen Atomenergie-Organisation (IAEO) [1] registriert. Allerdings dürfte die Dunkelzahl an zufallsmutierten Pflanzen viel höher sein, da Pflanzenmaterialien aus dem *atomic garden*-Kulturareal, auf dem Pflanzen Gammastrahlen (Cobalt-60) ausgesetzt werden, um Mutationen zu erzeugen, an Hobbyzüchter und Züchterunternehmen zur Weiterzüchtung frei abgegeben wurden. Darunter befinden sich z. B. Durum-Weizen, Gerste, Hafer, Reis sowie viele Gemüse und Obstarten. Nach dem Urteil des Europäischen Gerichtshofs (EuGH) C-258/16 vom Juli 2018 [2] sind diese Pflanzen zwar gentechnisch veränderte (gv)-Organismen (GVO), aber sie sind entsprechend der Ausnahmeregelung in der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EC [3] von den Regularien der Gentechnikgesetzgebung ausgenommen. Diese GMO dürfen auch im ökologischen Landbau verwendet werden.

Mit den Erkenntnissen aus dem natürlichen Gentransfer mit dem Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* wurde es möglich, intakte funktionsfähige Gene (bzw. synthetische Genkonstrukte) in Pflanzen zu transferieren. Diese Verfahren aus der klassischen Gentechnik wurden seit 1990 genutzt, um Pflanzen mit neuen genetischen Eigenschaften wie z. B. Herbizidtoleranz oder Insektenresistenz auszustatten. In der Regel wurden hierfür Gene aus Mikroorganismen verwendet. Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten somit eine „artfremde“ genetische Information, die über klassische Züchtungsverfahren nicht übertragbar wäre. Im Mittelpunkt der gentechnischen Veränderungen standen agronomische Eigenschaften wie Herbizidtoleranzen, Insekten-, Pilz- und Virusresistenzen. Die erste kommerziell gehandelte gv-Pflanze als Lebensmittel war die Flavr-SavrTM-Tomate, die von dem Unternehmen Calgene entwickelt wurde. Sie erhielt am 19.05.1994 die Zulassung in den USA. In England wurde sie von der Firma Zeneca als Püree in den Handel gebracht (Abbildungen 1 und 2). Bei der Flavr-SavrTM-Tomate war allerdings nicht

ABB. 2 | WERBEFLYER FÜR DIE FLAVR-SAVRTM-TOMATE

MACGREGOR'S TOMATOES OUR DISCOVERY GIVES YOU SUMMERTIME TASTE... YEAR-ROUND!

At MacGregor's Tomatoes, we have dedicated ourselves to the mission of providing the highest quality fresh foods to our customers. Since 1982, the MacGregor's Tomato team of hard-working professional men and women has successfully applied the latest developments in genetic engineering, tomato plant breeding, and farming to solve an age-old problem—how to supply an abundance of great-tasting tomatoes all year long.

How did we do it? First, we made a copy of a gene which causes softening of tomatoes. Then, we put this copy into the plant—backwards—to slow down the softening gene. Simple enough. But, we have to know if this step was successful. So, we attach a gene which makes a naturally occurring protein. This protein makes Flavr SavrTM seeds resistant to the kanamycin contained in our test medium. Now, the results become very easy to read. These seeds unaffected by the kanamycin carry the reversed gene and will be planted for tomato production. No kanamycin is present in tomatoes grown from Flavr Savr seeds.

Once planted in the soil, Flavr Savr seeds will grow into delicious MacGregor's Tomatoes—tomatoes which soften more slowly, stay on the vine days longer and arrive at your store fresh and ready for you to take home and enjoy.

Along with their great taste, MacGregor's Tomatoes provide the following nutrients:

For a medium-size tomato:			
Serving size	149g	Carbohydrate	6g
Serving size	5.5oz	Fat	1g
Calories	35	Sodium	10mg
Protein	1g	Dietary fiber	1g
		Calcium	2
		Iron	2

*Contains less than 2% of the U.S. RDA of this nutrient. Source: U.S. Food and Drug Administration.

USP 4,948,838 USP 5,034,322 USP 4,801,540 USP 5,107,085

IN KÜRZE

- Die neuen genomischen Techniken wie CRISPR-Cas, TALEN usw. ermöglichen **ausgewählte sequenzspezifische Veränderungen im Genom**. In der Regel wird hierbei **kein „artfremdes“ genetisches Material** eingeführt.
- **Mehr als 60 Pflanzenarten** wurden bislang mit den NGTs bearbeitet. Pflanzenwachstum und Ertragssteigerung, Qualitätsverbesserungen und Toleranzen gegen bio- und abiotischen Stress stehen im Vordergrund.
- Nahezu alle genomeditierten Pflanzen stehen **noch im Forschungsstadium**. Lediglich fünf Pflanzen sind kommerziell auf dem Markt erhältlich.
- Die neuen genomischen Techniken (NGT) können einen Beitrag zur Lösung **anstehender Herausforderungen in der Landwirtschaft** leisten.
- In vielen Ländern werden genomeditierte Pflanzen, sofern sie keine „artfremde“ genetische Information enthalten, wie konventionelle Pflanzen reguliert. **Die EU ringt noch um eine Regelung.**

der Geschmackserhalt das Ziel der gentechnischen Veränderung, sondern eine längere Haltbarkeit bzw. eine bessere Transportfähigkeit. Dies wurde durch die „Antisense-Technik“ erreicht [4]. Hierdurch wurde die Expression des Enzyms Polygalacturonase herunterreguliert. Die Polygalacturonase ist mitverantwortlich für „Matschigwerden“ während der Reifung und Lagerung der Tomaten, indem sie die Zellwände abbaut.

Die Marktpräsenz war nur kurz; bereits drei Jahre später, 1997, war die Flavr-SavrTM-Tomate sowohl als Frischware als auch als Püree vom Markt wieder verschwunden. Die Gründe hierfür waren sicherlich mannigfaltig, aber sie wurden nie klar aufgeklärt [5]. Nach Aussagen von Gentechnikkritikern erfüllten die am Stamm gereiften Tomaten nicht die Erwartungen der US-Bürger an den Geschmack und wurden deshalb auch nicht nachgefragt; sie wurden zu einem finanziellen Verlust für Monsanto (Monsanto hatte inzwischen Calgene aufgekauft). Wahrscheinlicher ist aber folgendes Szenario: Monsanto und Zeneca hatten zunächst Streitigkeiten über entsprechende Patente, aber man einigte sich außergerichtlich darauf, dass Monsanto die Rechte zur Vermarktung der frischen Tomaten und Zeneca an den verarbeiteten Tomaten erhalten sollte. Beides funktionierte offensichtlich eine gewisse Zeit für beide Partner zufriedenstellend. Für Monsanto wurde diese Vereinbarung allerdings immer mehr zum Verlustgeschäft, da bei den frischen Tomaten immer mehr Ausschussware angeliefert wurde. Ökonomisch war das Flavr-SavrTM-Tomatenprojekt nicht mehr tragbar und wurde deshalb eingestellt. Im gleichen Zeitraum wurde in Mexiko eine Tomate mit ähnlichen Eigenschaften (eine israelische Entwicklung) angebaut und viel billiger auf den amerikanischen Markt gebracht. Beides beendete den Anbau der Flavr-SavrTM-Tomate in Amerika, da Zeneca nun Anbau und Logistik der Tomaten in Amerika sowie Transport nach Europa hätte selbst organisieren und finanzieren müssen. Dies konnte und wollte Zeneca nicht stemmen und stellte das Vorhaben ein.

Aufgrund der damaligen Gesetzeslage (Freisetzungsrichtlinie 90/200/EWG [6]) war ein Anbau in der EU nicht erlaubt, wohl aber das Inverkehrbringen von Tomatenpüree, da dieses keinen GVO darstellt. 1996 erhielten als erste gv-Pflanzen die herbizidtolerante Sojabohne (GTS 40-3-2) und der insektenresistente Mais (Bt-176) die Zulassung zur Verwendung als Lebens- und Futtermittel in der EU. Inzwischen haben in der EU 98 gv-Pflanzenvarietäten (48× Mais, 26× Sojabohne, 15× Baumwolle, 8× Raps, 1× Zuckerrüben) die Zulassung für den Import als Lebens- und Futtermittel erhalten. Der Anbau dieser Pflanzen ist explizit ausgeschlossen [7]. Jährlich werden ca. 30 Mill. Tonnen – vornehmlich gv-Sojabohnen und gv-Mais – in die EU importiert. Weltweit sind 33 gv-Pflanzen im Anbau [8], wobei die Gesamtanbaufläche gegenwärtig auf hohem Niveau (190 Mill. ha) stagniert [9].

In der EU besitzt allein der insektenresistente Mais MON 810 eine Zulassung zum kommerziellen Anbau [10].

Die Genehmigung ist zwar bereits seit 10 Jahren abgelaufen, jedoch konnten sich bislang die Mitgliedsstaaten nicht zu einer Aufhebung der Anbaugenehmigung durchringen. Allerdings dürfen die Mitgliedsstaaten über die Opt-out-Richtlinie (EU)2015/412 [11] den Anbau von gv-Pflanzen auf ihrem Staatsgebiet untersagen. In der EU werden quasi keine gv-Pflanzen kommerziell angebaut. Freisetzen von gv-Pflanzen für Forschungszwecke sind in der EU stark zurückgegangen. Von 2002 bis 2015 wurden in der EU 881 Feldversuche durchgeführt, davon etwa die Hälfte in Spanien. Von 2015 bis 2020 waren es nur noch 56 Feldstudien [12]. In Deutschland wurden seit 2012 keine gv-Pflanzen mehr freigesetzt – auch nicht für Forschungszwecke. Sicherheitsforschungen zu möglichen Auswirkungen auf die Umwelt wurden seitdem nur noch unter kontrollierten, aber artifiziiellen Bedingungen in Klimakammern oder Gewächshäusern durchgeführt. Die Sicherheitsforschung an gv-Pflanzen – insbesondere für die belebte Umwelt – wurde in der EU in den letzten 25 Jahren mit ca. 300 Mill. Euro gefördert. Trotz intensiver Forschungen konnten bislang keine negativen Auswirkungen, die sich spezifisch aus der gentechnischen Veränderung ableiten lassen, nachgewiesen werden. Weltweit ist die Mehrheit der Wissenschaftler/-innen der Auffassung, dass zugelassene gv-Pflanzen genauso sicher sind wie die vergleichbaren, konventionell gezüchteten.

Mit der bahnbrechenden Publikation der Arbeitsgruppe um Doudna und Charpentier von 2012 [13] zur Nutzung des CRISPR-Cas-Systems zur gerichteten sequenzspezifischen Veränderung im Genom wurde ab ca. 2014 die Genomeditorierung als ein weiteres Werkzeug in der Pflanzenzüchtung eingeführt. Die Verfahren der Genomeditorierung werden in der EU als neue genomische Techniken bezeichnet und beinhalten vornehmlich die Genschere CRISPR-Cas, TALEN und Zinkfinger-nukleasen. Mit ihnen können zielgerichtet genetische Veränderungen in der ausgewählten DNA-Sequenz im Pflanzengenom herbeigeführt werden. Sie reichen vom einfachen Austauschen und Entfernen einzelner (weniger) Nukleotide (*site-directed nuclease* Typ I, SDN-1), dem Einfügen einzelner sowie bis zu 20 Nukleotiden (SDN-2) bis zum Einfügen funktioneller Gene (SDN-3). Bei SDN-1 erfolgt der DNA-Doppelstrangsschnitt an einer vorbestimmten Sequenzfolge im Genom. Anschließend wird der Schnitt durch das zell-eigene Reparatursystem geschlossen. Hierbei werden einzelne Nukleotide eingefügt oder deletiert. Bei SDN-2 und SDN-3 wird eine DNA-Matrix verwendet und hier erfolgt die Reparatur durch eine homologe Rekombination. Allen gegenwärtigen Anwendungen ist gemeinsam, dass die Pflanzen keine „artfremde“ genetische Information enthalten. Die meisten Anwendungen stammen aus dem SDN-1-Bereich (ca. 95 %). Die eingeführte Mutation könnte bei diesen Pflanzen auch durch klassische Züchtungsverfahren entstehen. Eine Unterscheidung, ob die Mutation auf klassischem Wege herbeigeführt wurde oder durch die neuen genomischen Techniken, ist trotz gegenteiliger

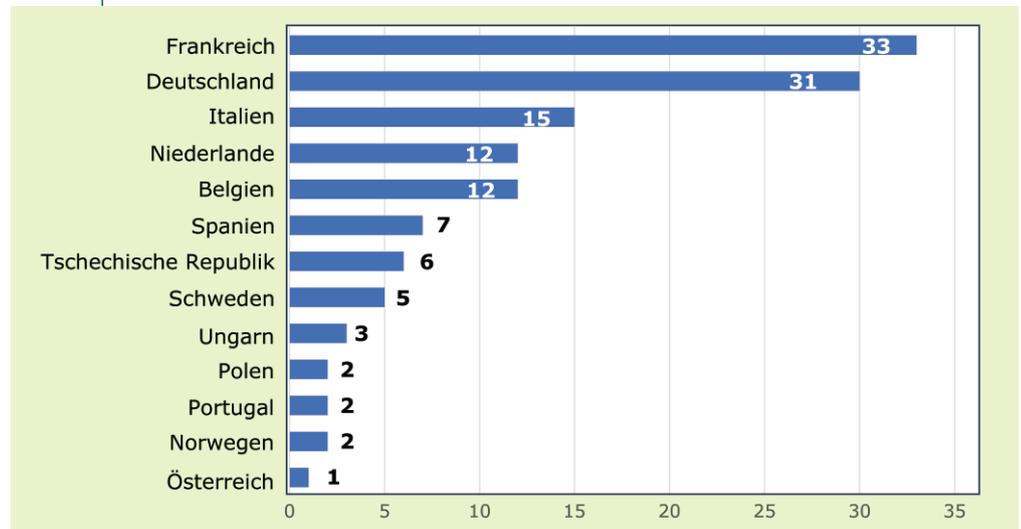
Behauptungen bislang nicht möglich [14, 15].

Entsprechend der EU-SAGE-Datenbank (EU-SAGE = *European Sustainable Agriculture through Genome Editing*) [16] sind die führenden Länder im Forschungs- und Anwendungsbereich China (498 Projekte) und die USA (174 Projekte). Länder aus der EU sind mit 131 Projekten aufgeführt, wobei Deutschland mit 31 Projekten und Österreich mit einem vertreten sind (Abbildung 3).

Anwendungen der neuen genomischen Techniken bei Pflanzen verlaufen stürmisch. Listet der von der EU-Kommission in Auftrag gegebene JRC-Report (JRC = *Joint Research Center*) von 2021 [17] knapp 500 Anwendungen auf, so befinden sich Ende April 2024 bereits 882 Forschungsprojekte in der EU-SAGE-Datenbank. Die Bandbreite der genomeditierten Nutzpflanzen ist groß; sie reicht von Reis (252 Projekte), Tomaten (108), Mais (54), Soja (46), Weizen (44), Kartoffeln (28), Tabak (24), Gerste (21) bis hin zu Zuckerrüben, Zuckerrohr, Grapefruit, Kakao, Spargel und mehr [18]. Im Vergleich zur klassischen Gentechnik haben sich die Anwendungsbereiche deutlich verschoben. Herbizidtoleranzen und/oder Insektenresistenzen sind deutlich in den Hintergrund getreten. Dafür sind Veränderungen in der stofflichen Zusammensetzung, Toleranzen gegenüber abiotischem und biotischem Stress sowie Ertragssteigerung in den Vordergrund getreten (Abbildung 4).

In den USA werden genomeditierte Pflanzen von den Gentechnikregelungen ausgenommen und können direkt auf den Markt gelangen. Der *Animal Plant Health Inspection Service* des *United States Department of Agriculture* (USDA) hat bis Ende 2023 17 Pflanzenspezies, die 63 unterschiedliche Anwendungen umfassen, die Ausnahmeregelung erteilt [19]. Auch hier stehen Anwendungen zu Qualitätsmerkmalen (30) und Ertragssteigerung (7) im Vordergrund. Karavolias und Kollegen [20] fassen spezifische Untersuchungen zur Anpassung von Pflanzen an den Klimawandel sowie für abiotische Stresstoleranzen zusammen. Reis, Mais und Tomaten mit verbesserter Trockentoleranz wurden entwickelt, was zu höheren Erträgen unter trockeneren Bedingungen führt. Die neuen genomischen Techniken werden außerdem angewandt, um den Nährwert von Nutzpflanzen durch eine Erhöhung des Gehalts an Vitaminen und Mikronährstoffen und eine Eliminierung von antinutritiven Inhaltsstoffen zu erreichen. Beispiele hierfür sind: Reis mit erhöhtem Eisengehalt, Sojabohnen mit hohem Ölsäuregehalt, Tomaten mit hohem γ -Aminobuttersäure-Gehalt oder Melonen, Reis und Bananen mit erhöhtem Vitamin-A-Gehalt.

ABB. 3 | ANZAHL DER PROJEKTE ZU GENOMEDITIERTEN PFLANZEN IN DER EU



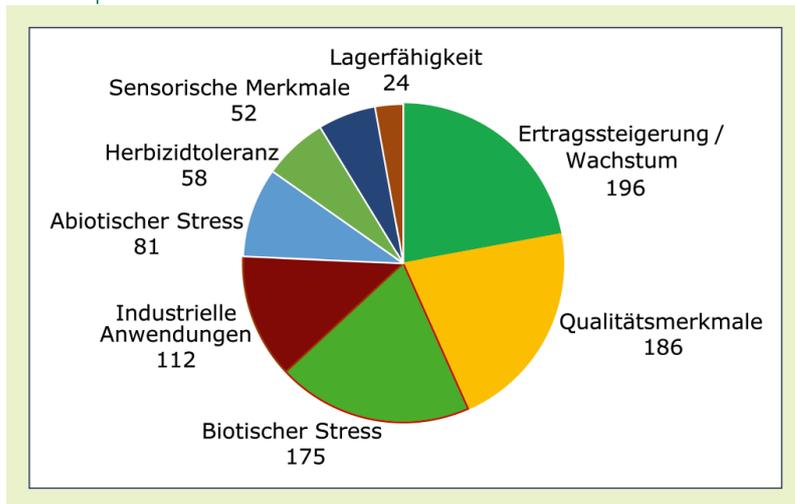
Daten aus der EU-SAGE-Datenbank (<https://www.eu-sage.eu/genome-search>), aufgerufen am 30.04.2024.

Trotz der zahlreichen Anwendungsbeispiele sind von den aufgeführten genomeditierten Pflanzen bislang nur vier bis fünf kommerziell im Handel. Die meisten befinden sich noch im Versuchsstadium, einige in einer vorkommerziellen Phase (12–15). Kommerziell erhältlich sind Sojabohnen mit erhöhtem Gehalt an Ölsäure, Tomaten mit hohem Gehalt an γ -Aminobuttersäure (GABA), Mais mit erhöhtem Amylopektin-Gehalt, Salat aus Senfblättern mit einer Reduzierung des scharfen Geschmacks durch Minimierung der Senfölbildung und langsamer braun werdende Champignons durch Inaktivierung der Phenoloxidase. In vielen Ländern der Welt sind genomeditierte Pflanzen, denen keine „artfremde“ genetische Information eingefügt wurde, von den gentechnikspezifischen Regelungen ausgenommen, so dass diese Listung unvollständig sein könnte. Im Folgenden werden exemplarisch einige Beispiele näher vorgestellt.

Tomaten mit erhöhtem Gehalt an γ -Aminobuttersäure (GABA)

Die GABA-Tomaten wurden gemeinsam von der *University of Tsukuba* und dem Biotechnologie-Unternehmen *Sanatech Seed Co., Ltd.* entwickelt [21]. Tomaten produzieren von Natur aus den Botenstoff GABA, der auch im menschlichen Körper vorkommt und dort als inhibitorischer Neurotransmitter eine zentrale Rolle im Gehirn und Nervensystem spielt. GABA blockiert bestimmte Signale im Gehirn und reduziert dadurch die Erregbarkeit von Nervenzellen. Da ihre Einnahme beruhigend auf das zentrale Nervensystem wirkt, den Blutdruck senkt und den Schlaf fördert, wird GABA auch therapeutisch eingesetzt. Allerdings wird in konventionellen Tomaten die GABA-Bildung durch einen genetischen Schalter begrenzt. Japanische Wissenschaftler fanden heraus, dass das Gen

ABB. 4 | VERTEILUNG DER ANWENDUNGSBEREICHE FÜR GENOMEDITIERTE PFLANZEN IN DER EU



Gezeigt ist die Anzahl der Projekte im jeweiligen Themengebiet. Daten aus der EU-SAGE-Datenbank (<https://www.eu-sage.eu/genome-search>), aufgerufen am 30.04.2024.

sigad3 die Synthese steuert. Durch das CRISPR-Cas9-Verfahren tauschten sie ein einziges Nukleotid in diesem Gen aus. Diese genomeditierte Tomate enthält fünf- bis sechsmal mehr GABA als konventionelle Tomaten.

Das Unternehmen *Sanatech Seed Co., Ltd.* verteilte im Mai 2021 Saatgut kostenfrei an Hobbygärtner und im Dezember des gleichen Jahres begannen Bewerbung, kommerzieller Anbau und Vertrieb der GABA-Tomate unter dem Namen „Sicilian Rouge High GABA“ (Abbildung 5) im Lebensmittelhandel. Nach den japanischen Richtlinien für Produkte aus genomeditierten Pflanzen gelten die GABA-Tomaten nicht als GVO. Sie sind das weltweit erste kommerziell angebotene – und nachgefragte – Lebensmittel, das durch das CRISPR-Cas-Verfahren entwickelt wurde.

Tomaten mit erhöhtem Gehalt an Vitamin D

Tomaten mit erhöhtem Gehalt an Vitamin D wurden vom *John Innes Centre (JIC)*, Großbritannien, und der *Seoul National University (SNU)*, Südkorea gezüchtet. Pflanzen sind *per se* keine ergiebige Vitamin-D-Quellen. Tomaten bilden zwar eine Vitaminvorstufe (Provitamin D₃), aber diese entsteht vorwiegend in den Blättern und nur in geringeren Mengen in unreifen Früchten. Wissenschaftler des *John Innes Centre (JIC)* entdeckten, dass es sich hierbei um einen Schutzmechanismus der Pflanze handelt: Das Enzym (SI7-DR2) wandelt das Provitamin D₃ in andere Pflanzenstoffe, die Esculeoside, um. Diese unterstützen die Abwehr von Schädlingen und Krankheitserregern.

Mithilfe des CRISPR-Cas9-Systems wurde genau das Gen, das für das SI7-DR2-Enzym kodiert, inaktiviert. Das Provitamin D₃ wurde nicht länger umgewandelt, sondern reichte sich nun in den Blättern und Früchten der editierten Pflanzen an. Wurden diese anschließend mit UV-

Licht (im Freiland = Sonnenlicht) bestrahlt, wandelte sich das Provitamin in Vitamin D₃ um. Die Tomaten enthielten im Mittel rund zwei Mikrogramm Vitamin D₃, etwa so viel wie 28 Gramm Thunfisch oder zwei mittelgroße Eier. Der tägliche Verzehr von zweieinhalb bis sieben dieser Tomaten würde somit die von der Weltgesundheitsorganisation empfohlene Tagesmenge an Vitamin D₃ liefern.

Im Gewächshaus hatte das Abschalten des Gens keinerlei negativen Auswirkungen auf Wachstum, Entwicklung und Ertrag der Pflanzen. Der in den Tomaten entdeckte Syntheseweg existiert auch in anderen Nachtschattengewächsen wie Paprika, Kartoffeln oder Auberginen. Diese Gemüsesorten könnten ebenfalls so verändert werden, dass sie größere Mengen von Provitamin D₃ enthalten. Einen ähnlichen Ansatz verfolgt ein Forschungsteam aus Südkorea: Mit der Genschere wurde ein einziges Gen ausgeschaltet, wodurch eine noch höhere Akkumulation an Provitamin D₃ – insbesondere in den Früchten – erreicht werden konnte. Ziel ist hier, die genomeditierten Tomaten 2026 für den Verkauf freigegeben zu können [22, 23].

Weizen mit reduziertem Gehalt an freiem Asparagin

Acrylamid ist potenziell kanzerogen und neurotoxisch. Die Acrylamidbildung tritt beim Erhitzen (Braten, Backen, Frittieren, Grillen usw.) auf – insbesondere bei Lebensmitteln mit höherem Gehalt an der Aminosäure Asparagin und an reduzierenden Zuckern wie z. B. Glucose oder Fructose. Die Reduzierung an freiem Asparagin ist daher der Ansatzpunkt für die Minderung von Acrylamidbildung. Ähnliches wird bereits in der Lebensmittelverarbeitung durch die Verwendung des Lebensmittelenzyms Asparaginase praktiziert.

Das *Rotthamsted Research Institute* griff deshalb in den Syntheseweg für Asparagin beim Weizen ein, indem es die Umwandlung der Asparaginsäure in Asparagin durch die Inaktivierung der Asparaginsynthetase blockierte. Mithilfe des CRISPR-Cas9-Verfahrens konnte das Gen *TaASN2* für die Synthetase ausgeschaltet werden. Im Gewächshausversuch wurde eine signifikante Reduktion des Asparagingehaltes im Weizenkorn demonstriert. Im Freilandversuch wurde nun nochmals die Minimierung an freiem Asparagin verifiziert. Gegenüber den Vergleichspflanzen konnte die Menge an freiem Asparagin – dem Vorläufer für die Bildung von Acrylamid in der Maillard-Reaktion – um zwischen 40 und 60 Prozent reduziert werden [24].

Gesetzliche Regelungen

Anwendungen aus der Gentechnik unterliegen weltweit gesetzlichen Regelungen und Zulassungsverfahren. Die wichtigsten Gesetze in der EU sind hier die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EC [3] und darauf aufbauend die Verordnungen EG 1829/2003 sowie EG 1830/2003 [25, 26]. Wie bereits erwähnt, orientiert sich die Freisetzungsrichtlinie im Wesentlichen an dem Kenntnisstand der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts. Die Verfahren aus den

Sicilian Rouge High GABA

Foods with Function Claims	Notification · H617
1 tomato Can lower blood pressure of people with high blood pressure	
2 tomato can relieve temporary stress from work/studies	
5-7 tomato can improve sleep quality (for example, a deeper and more refreshing sleep)	
	5-7 tomato can protect skin health by maintaining skin elasticity

GABA's Effect

ABB. 5 Die GABA-Tomate „Sicilian Rouge High GABA“ der Firma „Sanatech Seed“. Quelle: <https://sanatech-seed.com/en/221226-2/>

neuen molekularen Techniken waren damals noch nicht bekannt. Der EuGH hat 2018 auf der Grundlage des bestehenden Gentechnikrechts geurteilt, dass Pflanzen, die mithilfe der neuen Techniken gezüchtet wurden, allen Anforderungen aus der Freisetzungsrichtlinie unterliegen. Die EU-Kommission ist nach langjährigen Befragungen und Beratungen zu dem Schluss gekommen, dass das bestehende Recht den Anwendungen aus den NGTs nicht mehr gerecht wird. Sie legte im Juli 2023 einen Vorschlag für die Regulierung gewisser NGT-Pflanzen mit dem Titel „Vorschlag für eine Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates über mit bestimmten neuen genomischen Techniken gewonnene Pflanzen und die aus ihnen gewonnenen Lebens- und Futtermittel sowie zur Änderung der Verordnung (EU) 2017/625“ vor [27]. Mit dem Vorschlag möchte sie erreichen, dass einerseits ein hohes Schutzniveau für die Gesundheit von Mensch und Tier sowie für die Umwelt aufrechterhalten und andererseits das Inverkehrbringen von NGT-Pflanzen und daraus gewonnenen Erzeugnissen ermöglicht wird. Gleichzeitig möchte sie dabei den ökologischen Landbau schützen und die Nachhaltigkeitsziele des Green Deal unterstützen.

Es ist ein Vorschlag der EU-Kommission, der nun im Gesetzgebungsverfahren, dem Trilog-Verfahren über EU-Parlament und Mitgliedstaaten, in eine Verordnung überführt werden muss. Mit dem Vorschlag wird keine Deregulierung für gv-Pflanzen angestrebt, sondern es soll ein *lex specialis* für gewisse genomeditierte Pflanzen (NGT-Pflanzen) geschaffen werden. Der EU-Kommissionsvorschlag gilt ausschließlich für höhere Pflanzen,

a) die mithilfe der neuen genomischen Techniken – einschließlich der Cisgenese und Intragenese – erzeugt wurden

und

b) bei denen keine „artfremde“ genetische Information eingefügt wurde. Die neuen Informationen müssen aus dem Genpool der Züchter stammen.

Im Vorschlag ist die Einführung von zwei Kategorien von NGT-Pflanzen vorgesehen – und zwar die Kategorie der NGT-1-Pflanzen und der NGT-2-Pflanzen. NGT-1-Pflanzen sollen als gleichwertig zu konventionellen Pflanzen angesehen werden, da sie auch aus traditionellen Züchtungsverfahren hervorgehen könnten. Sie sollen aus dem Regelwerk der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EC und den Verordnungen (EG) 1829/2003 und (EG) 1830/2003 herausgenommen werden – ähnlich der mithilfe der traditionellen Zufallsmutagenese erzeugten Pflanzen. Dies bedeutet aber nicht, dass NGT-1-Pflanzen und daraus gewonnene Erzeugnisse unkontrolliert auf den Markt kommen können. Einerseits unterliegen sie allen Regularien aus den Saatgutgesetzen und andererseits den neuen Vorschriften aus dem EU-Kommissionsvorschlag. Die Produkte müssen außerdem auch den Anforderungen aus der Basisverordnung (EC) 178/2002 genügen [28].

Der Status von NGT-Pflanzen, insbesondere von NGT-1-Pflanzen, muss vor einer Freisetzung von einer kompetenten Behörde überprüft werden. Für Freisetzen zu wissenschaftlichen Zwecken ist dies eine Behörde aus dem jeweiligen Mitgliedsstaat, während für Freisetzen zum Zwecke einer späteren Vermarktung/Inverkehrbringung die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) zuständig ist. Bei dieser Überprüfung – quasi einer Notifizierung – wird festgestellt, ob die NGT-1-Pflanze der entsprechenden konventionell gezüchteten gleichwertig ist und den Kriterien aus Annex 1 (s. Kasten „Gleichstellung von NGT-1-Pflanzen

mit konventionellen Pflanzen“) entspricht. Über den Prüfprozess und sein Ergebnis werden die Mitgliedsstaaten und die EU-Kommission informiert. Letztere gibt das Ergebnis der Überprüfung im Amtsblatt bekannt. Sie trägt die NGT-1-Pflanze in ein noch zu erstellendes Register ein und vergibt eine Identifizierungsnummer. Die Entscheidung der EU-Kommission ist für alle Mitgliedsstaaten bindend. Das Register ist öffentlich zugänglich und soll zur Transparenz für alle Marktbeteiligten beitragen. Eine spezielle Kennzeichnung ist für NGT-1-Pflanzen nicht vorgesehen, aber durch die Identifizierungsnummer kann sich jeder über den Status der Pflanzen oder der Produkte informieren. Hier ist nun mehr Eigeninitiative gefordert, wie man sie auch bei konventionellen Lebensmitteln kennt, wo z. B. ein Code Informationen über Lebensmittel liefert.

Allerdings ist für die Vermarktung von NGT-1-Pflanzen als Saatgut eine Kennzeichnung mit „Cat-1-NGT“ und Angabe der Identifizierungsnummer notwendig. Hiermit sollen insbesondere der Ökolandbau und Erzeuger von gentechnikfreien Produkten vor einer Verwendung von NGT-1-Pflanzen geschützt werden. NGT-2-Pflanzen sind alle Pflanzen, die nicht als NGT-1-Pflanzen eingeordnet werden können; sie fallen unter die Kategorie 2. Für sie gelten die bestehenden gesetzlichen Regelungen für GVO, sofern nicht abweichende Vorschriften in der neuen Verordnung für sie erlassen werden.

Die Diskussionen über den EU-Kommissionsvorschlag sind auf allen Ebenen heftig. Der Vorschlag wurde inzwischen vom EU-Parlament mit zahlreichen Änderungsvorschlägen angenommen. Die Mitgliedsstaaten – der Rat – konnten sich bislang nicht auf einen gemeinsamen Standpunkt für den EU-Kommissionsvorschlag einigen. Erst wenn dies erfolgt ist, kann das Trilog-Verfahren für die Fortsetzung einer Regulation beginnen. Intensive Diskussionen stehen vor allem über eine Kennzeichnung, Absicherungen einer ökologischen und gentechnikfreien Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion sowie der Patentierbarkeit von NGT-Pflanzen an.

GLEICHSTELLUNG VON NGT-1-PFLANZEN

Kriterien zur Gleichstellung von NGT-1-Pflanzen mit konventionellen Pflanzen gemäß Annex 1 aus Kommissionsvorschlag:

1. Ersatz oder Einführung von höchstens 20 Nukleotiden
2. Entfernen einer beliebigen Anzahl von Nukleotiden
3. Sofern die genetische Veränderung die Sequenz eines endogenen Gens nicht unterbricht:
 - a) gezielte Einführung einer zusammenhängenden DNA-Sequenz in den Genpool des Züchters,
 - b) gezielter Ersatz einer endogenen DNA-Sequenz durch eine im Genpool des Züchters vorhandene zusammenhängende DNA-Sequenz.
4. Gezielte Inversion einer Abfolge beliebiger Nukleotide
5. Jede andere gezielte Veränderung jeglicher Größe unter der Bedingung, dass die resultierenden DNA-Sequenzen bereits (möglicherweise mit Veränderungen gemäß den Nummern 1 und/oder 2) bei einer Art aus dem Genpool der Züchter auftreten.

Die Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion stehen vor zahlreichen Herausforderungen, von denen die wichtigsten

- die Zunahme der Weltbevölkerung (9–10 Milliarden Menschen im Jahr 2050),
 - die Verknappung der Anbauflächen,
 - die Risiken im Zusammenhang mit dem Klimawandel und
 - der Verlust der biologischen Vielfalt
- sind. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer nachhaltigen Produktion mit geringerem Flächen- und Betriebsmitteleinsatz und einer Verringerung der Umweltauswirkungen. Die neuen genomischen Techniken können hier einen wichtigen Beitrag leisten. Alle Beteiligten aus Politik, Wirtschaft und Wissenschaft stehen hier in einer hohen Verantwortung – für das, was sie tun, aber auch für das, was sie unterlassen.

Zusammenfassung:

Kreuzen und Auslesen waren und sind Meilensteine in der Pflanzenzüchtung und beides hat große Erfolge in der Steigerung der Ernteerträge und der Sicherung der Nahrungsmittelversorgung erbracht. Immer schnellere Veränderungen (biotischer und abiotischer Art), erhöhte Anforderungen an Widerstandsfähigkeiten, Qualität usw. erfordern eine ständige Erweiterung des Methodenspektrums zur genetischen Veränderung von Pflanzen, um sie präzise, sicher und schnell an die veränderten Ansprüche anzupassen. In der Pflanzenzüchtung besteht ein Kontinuum im Methodenspektrum. Die letzten stark in der Diskussion stehenden Verfahren waren die Gentechnik und die neuen genomischen Techniken wie CRISPR-Cas und Co. Während bei der klassischen Gentechnik noch Einführungen von Herbizidtoleranzen und/oder Insektenresistenzen im Vordergrund standen, stehen nun Wachstum und Ertragssteigerungen, Qualitätsverbesserungen und Toleranzen gegenüber abiotischem und biotischem Stress im Augenmerk.

Summary:

Genetic engineering and new genomic techniques in plant breeding

Crossbreeding and selection were and are milestones in plant breeding and both have been very successful in increasing crop yields and securing food supplies. Increasingly more rapid changes (biotic and abiotic), higher demands on resistance, quality, etc. require a constant expansion of the range of methods for the genetic modification of plants in order to adapt them precisely, safely and quickly to changing requirements. In plant breeding, there is a continuum in the range of methods. The last methods – heavily discussed – were genetic engineering and the new genomic techniques such as CRISPR-Cas and Co. While classical genetic engineering focussed on the introduction of herbicide tolerance and/or insect resistance, the focus is now on growth and yield increases, quality improvements and tolerance against abiotic and biotic stress.

Schlagworte

Gentechnik, neue genomische Techniken, Genomeditierung, gentechnisch veränderte (gv)-Organismen (GVO), Pflanzenzüchtung, NGT-Pflanzen, rechtliche Regelungen

Literatur

- [1] IAEA (2023). Mutant Variety Database, <https://www.iaea.org/resources/databases/mutant-varieties-database>
- [2] EuGH-Urteil C 528/16 vom 25. Juli 2018, <https://t1p.de/shd5c>
- [3] Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. ABl. L106, 1–37 (2001), <https://t1p.de/fc3tw>
- [4] M. G. Kramer, K. Redenbaugh (1994). Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica* 79, 293–297, <https://doi.org/10.1007/BF00022530>
- [5] BIOfunk (2020): Die Antimatsch-Tomate ist tot – Schade eigentlich, <https://t1p.de/m6tju>
- [6] Richtlinie 90/220/EWG des Rates vom 23. April 1990 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderte Organismen in die Umwelt. ABl. L 15-27 vom 08.05.1990, <https://t1p.de/4zyit>
- [7] Kommission: EU Register of authorised GMOs, <https://t1p.de/b6wae>
- [8] ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) (2023). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2019, <https://t1p.de/oftna>
- [9] ISAAA (2024). GM Approval Database, <https://t1p.de/7ilcf>
- [10] Kommissionsentscheidung 98/294/EC (1998): Entscheidung der Kommission vom 22. April 1998 über das Inverkehrbringen von genetisch verändertem Mais (*Zea mays* L., Linie MON 810) gemäß der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. ABl. L 131, 32–33 (1998), <https://t1p.de/e9rea>
- [11] Richtlinie (EU) 2015/412 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. März 2015 zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG zu der den Mitgliedstaaten eingeräumten Möglichkeit, den Anbau von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in ihrem Hoheitsgebiet zu beschränken oder zu untersagen. ABl. L68, 1–7 (2015), <https://t1p.de/3s3hp>
- [12] Jany Kl.-D. (2021): Gentechnisch veränderte Pflanzen (GVO): Freisetzungen von GMO in der EU 2010-2020, <https://t1p.de/9z2zv>
- [13] M. Jinek et al. (2021). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, Issue 6096, 816–821, <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- [14] R. D. Shillito et al. (2021). Detection of genome edits in plants – from editing to seed. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 57, 595–608, <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10214-z>
- [15] T. Cardi et al. (2023). CRISPR-Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation. *Trends in Plant Science* 28 (10), 1144–1165–1146, <https://t1p.de/k5332>
- [16] EU-SAGE-Datenbank, <https://t1p.de/m5c83>
- [17] C. Parisi, E. Rodriguez Cerezo (2021). Current and future market applications of new genomic techniques, EUR 30589 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021, ISBN 978-92-76-30206-3, <https://doi.org/10.2760/02472>
- [18] O. Dima et al. (2022). Interactive database of genome editing applications in crops and future policy making in the European Union, *Trends in Plant Science* 27, 746–748.
- [19] USDA (2024). APHIS Issues Regulatory Status Review Responses, <https://t1p.de/rp92u>
- [20] N. Karavolias et al. (2021). Application of Gene Editing for Climate Change in Agriculture. *Front Sustain Food Syst* 5-2021, <https://t1p.de/7218o>
- [21] M. Matsuo, M. Tachikawa (2022). Implications and Lessons from the Introduction of genome-edited food products in Japan. *Front. Genome Ed* 4/22, <https://doi.org/10.3389/fgeed.2022.899154>
- [22] J. Li et al. (2022). Biofortified tomatoes provide a new route to vitamin D sufficiency. *Nat. Plants* 8, 611–616, <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01154-6>
- [23] WGG (2023). Tomaten mit erhöhtem Gehalt an Vitamin D, <https://t1p.de/pxkl0>
- [24] S. Raffan et al. (2023). Field assessment of genome edited, low asparagine wheat: Europe's first CRISPR wheat field trial. *Plant Biotechnology Journal*, <https://doi.org/10.1111/pbi.14026>
- [25] Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel. ABl. L 268, 1–23, <https://t1p.de/ryd9f>
- [26] Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG. ABl. L 268, 24–28, <https://t1p.de/61op3>
- [27] Kommission (2023). Vorschlag für eine VERORDNUNG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES über mit bestimmten neuen genomischen Techniken gewonnene Pflanzen und die aus ihnen gewonnenen Lebens- und Futtermittel sowie zur Änderung der Verordnung (EU) 2017/625, <https://t1p.de/3xkxw>
- [28] Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. ABl. L 31, 1–24, <https://t1p.de/h4oqs>

Verfasst von:



Wissenschaftskreis
Genomik und
Gentechnik e.V.

Klaus-Dieter Jany
(Jahrgang 1943)
studierte Biologie
und Chemie an der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und promovierte dort über die Verdauungsphysiologie magenloser Fische. An der Universität Stuttgart habilitierte er sich für die Fächer Biochemie und Allgemeine Biologie. Von 1992–2008 leitete er das Molekularbiologische Zentrum (MBZ) an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel. Bis 2018 war er dann für die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) tätig. Seit 2013 ist er der 1. Vorsitzender des Wissenschaftskreises Genomik und Gentechnik e. V. (WGG).

Korrespondenz

Prof. Dr. Klaus-Dieter Jany
Wissenschaftskreis Genomik und Gentechnik e. V.
(WGG)
Nelkenstr.36
76351 Linkenheim-Hochstetten
E-Mail: jany@wgg-ev.de

Gentechnik und neue genomische Techniken in der Pflanzenzüchtung

CRISPR-Cas für eine nachhaltigere Zukunft der Landwirtschaft

FABIENNE GEHRKE | NIKLAS CAPDEVILLE | LAURA MERKER | HOLGER PUCHTA



Der rapide Klimawandel stellt die gegenwärtige Landwirtschaft vor die enorme Herausforderung, schnell genug massive Ertragsverluste zu kompensieren und gleichzeitig den steigenden Bedarf der stetig wachsenden Bevölkerung sicherzustellen. Für eine zukunftsfähige nachhaltige Landwirtschaft werden daher innovative Handlungsstrategien benötigt. Großes Potenzial bietet dabei die biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems, da nicht nur einzelne Gene gezielt editiert, sondern auch deren Rekombination beeinflusst werden kann, wodurch eine effektive Anpassung von Nutzpflanzen im Einklang mit einer biodiversen und nachhaltigen Landwirtschaft ermöglicht wird.

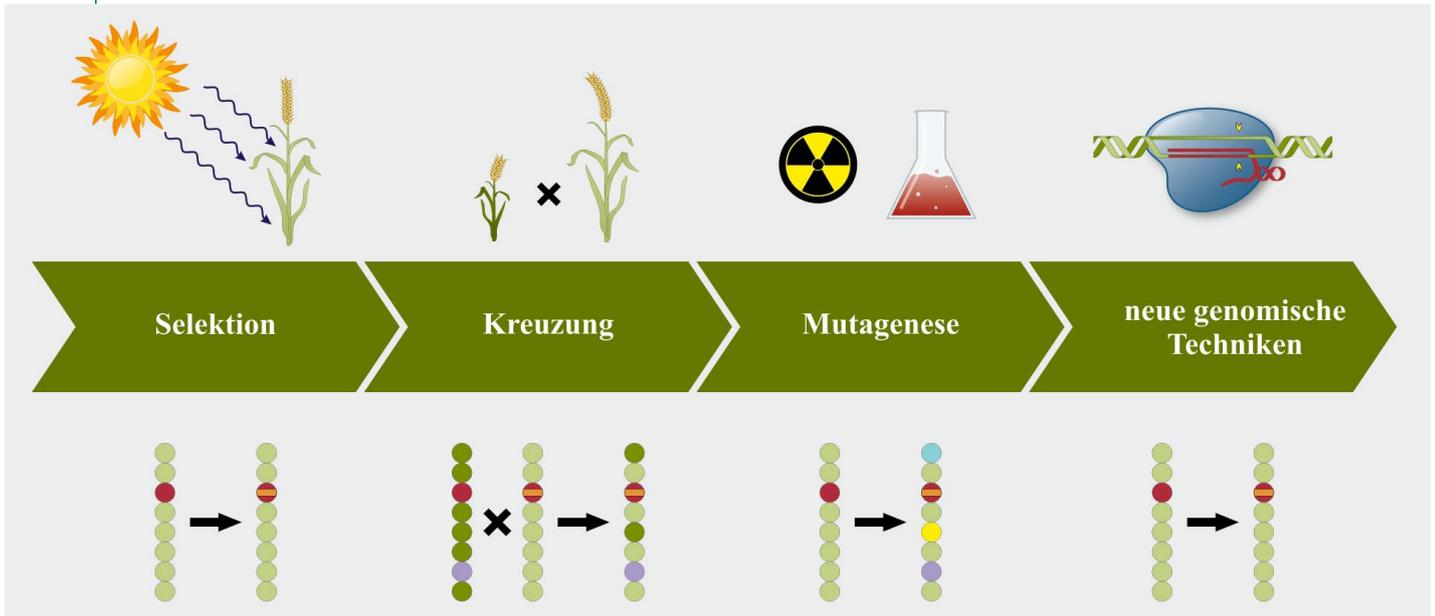
Dringend benötigte Resistenzen gegen Schadpilze könnten über CRISPR-Cas in Bananenpflanzen eingefügt werden.

Foto: PublicDomainPictures über www.pixabay.com.

Seit der Entstehung des Lebens ist der genetische Code Veränderungen unterworfen, welche auf die endogene fehleranfällige Reparatur natürlich vorkommender DNA-Schäden zurückgehen und sich in Substitutionen, Insertionen und Deletionen manifestieren. Solche Mutationen führen auch innerhalb einer einzigen Spezies zur Entstehung eines breiten genetischen Spektrums, wobei die Auswirkungen auf den Organismus von der Position der Veränderungen im Genom abhängig sind. So können Mutationen in kodierenden Bereichen zu einem *knockout*

des entsprechenden Gens führen, während Veränderungen in regulatorischen Bereichen die Expression mehrerer Gene beeinflussen können. Insgesamt resultiert jedoch lediglich etwa nur ein Prozent der natürlichen Mutationen in einer neuen Eigenschaft, welche unter entsprechendem Selektionsdruck in einer Spezies etabliert wird. Auf diese Weise prägen spontane Mutationen und der Selektionsdruck die Evolution aller Lebewesen und ermöglichen eine Anpassung an sich wandelnde Umweltbedingungen. Jahrtausendlang wurde das Auftreten spontaner

ABB. 1 | GESCHICHTE DER PFLANZENZÜCHTUNG



Jahrtausendlang beruhte die Pflanzenzucht auf der Selektion von Pflanzen, welche durch spontane Mutationen agronomisch wertvolle Eigenschaften aufwiesen. Später beschleunigten die gezielte Kreuzungszüchtung sowie die ungerichtete Mutagenese mit chemischen oder physikalischen Agenzien diesen Prozess, wobei jedoch häufig unerwünschte Veränderungen im Genom auftreten. Neue genomische Techniken (NGT) wie das CRISPR-Cas-System ermöglichen dagegen die sequenzspezifische Induktion einzelner Modifikationen.

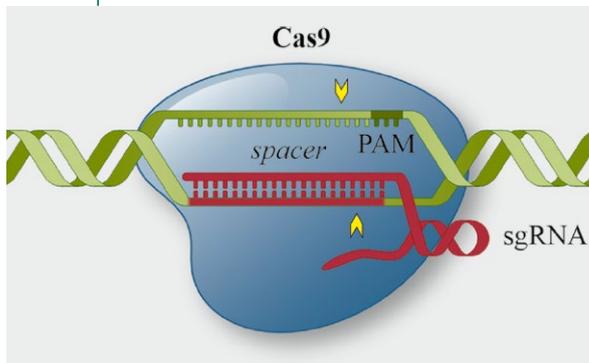
Mutationen auch zur Züchtung von Kulturpflanzen genutzt, wobei die natürliche Selektion durch die anthropogene Vermehrung von Pflanzen mit agronomisch wertvollen Eigenschaften ersetzt wurde. Später ermöglichte das Verständnis der Vererbungsgesetzmäßigkeiten eine gezielte Kreuzungs- und Hybridzüchtung, um so gewünschte Eigenschaften verschiedener Kultivare neu zu kombinieren (Abbildung 1). Da bei der zugrunde liegenden zufälligen Rekombination jedoch häufig auch agronomisch nachteilige Gene eingebracht werden, sind meist zeitaufwändige Rückkreuzungsschritte für die Etablierung des gewünschten Phänotyps notwendig. Zwar konnte auf der Grundlage dieser Züchtungsstrategien eine große Sortenvielfalt etabliert werden, jedoch ist die genetische Vielfalt heutiger Kulturpflanzen durch den vom Menschen vorgegebenen Selektionsdruck stark verarmt, so dass die Züchtung neuer leistungsfähigerer Sorten anhand dieser klassischen Methoden nur noch sehr eingeschränkt möglich ist. Um eine große Anzahl zufälliger Mutationen zu induzieren und so die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten erwünschter Eigenschaften zu erhöhen, wurde daher Anfang des 20. Jahrhunderts das Prinzip der Mutagenesezüchtung entwickelt, im Rahmen derer Pflanzen mit chemischen oder physikalischen Mutagenen behandelt werden (Abbildung 1). Heute gehen fast alle gängigen Hartweizensorten, aber auch viele andere Getreide-, Reis-, Obst-, Gemüsesorten und Hülsenfrüchte auf diese Form der Züchtung zurück. Allerdings erfordert die ungerichtete Induktion von Mutationen im gesamten Genom ebenfalls langwierige Rückkreuzungen, um unerwünschte Verände-

rungen zu kompensieren. In den 1990er Jahren wurde schließlich eine gezielte Mutagenese durch die Adaptierung natürlich vorkommender sequenzspezifischer Nukleasen ermöglicht, welche Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA induzieren und so die Entstehung von Mutationen allein an dieser Stelle fördern. Dabei beruht auch

IN KÜRZE

- Durch jahrtausendelange Selektionszüchtung ist die **genetische Vielfalt unserer Kultursorten stark verarmt**, was eine Anpassung an sich rapide ändernde klimatische und demographische Bedingungen durch konventionelle Züchtungsmethoden zunehmend erschwert.
- Für eine zukunftsfähige, nachhaltige Landwirtschaft sind innovative Handlungsstrategien erforderlich, wobei besonders die **biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems** großes Potenzial bietet.
- Um die Folgen des anthropogenen Klimawandels zu kompensieren, kann die Anwendung des CRISPR-Cas-Systems die **kostengünstige Züchtung von widerstandsfähigen Pflanzenarten** ermöglichen. Somit könnte die individuelle Anpassung weltweit verbreiteter Kultursorten an unterschiedliche abiotische Faktoren wie Salz- und Trockenstress innerhalb kürzester Zeit gestattet werden.
- Angesichts des kontinuierlichen Bevölkerungswachstums und der gleichzeitig sinkenden Verfügbarkeit von Anbauflächen spielen CRISPR-Cas-basierte Strategien zur **Optimierung der Fruchtmenge oder der Lagerfähigkeit** eine entscheidende Rolle.
- Zudem kann der **Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden reduziert** werden, indem ohne Eingriff in die Biodiversität die Vermittlung von Resistenzen oder die Optimierung der Nährstoffaufnahme erzielt wird.
- Es bleibt jedoch abzuwarten, ob die **rechtlichen Rahmenbedingungen und die Kundenakzeptanz** das Potenzial der biotechnologischen Anwendung des CRISPR-Cas-Systems in der Landwirtschaft erkennen und eine nachhaltige Bewältigung künftiger Herausforderungen ermöglichen.

ABB. 2 | DAS CRISPR-CAS9-SYSTEM



Das CRISPR-Cas9-System setzt sich aus einer RNA- und einer Proteinkomponente zusammen. Während die *single guide-RNA (sgRNA)* durch einen zur Zielsequenz komplementären Bereich (*spacer-Sequenz*) die Sequenzspezifität vermittelt, induziert die Cas9-Nuklease den DNA-Doppelstrangbruch. Zur Differenzierung zwischen Eigen- und Fremd-DNA ist zusätzlich ein spezifisches, unmittelbar an die Zielsequenz angrenzendes Sequenzmotiv (*protospacer adjacent motif, PAM*) erforderlich.

diese sequenzspezifische Mutagenese auf der endogenen fehleranfälligen Reparatur der induzierten DSB. Während der Einsatz der ersten sequenzspezifischen Nucleasen allerdings noch einen hohen Zeit- und Kostenaufwand erforderte, revolutionierte die Adaptierung des CRISPR-Cas-Systems Anfang der 2010er Jahre den Bereich der gezielten Mutagenese aufgrund der einfachen und kostengünstigen Anwendung (Abbildung 1). Dieses ursprünglich aus Prokaryoten stammende, adaptive Immunsystem gegen pathogene Nucleinsäuren setzt sich dabei aus zwei Komponenten zusammen: Einem RNA-Anteil, welcher die Zielstelle im Genom definiert, sowie einer Proteinkomponente, welche die Induktion des DSB katalysiert. Dabei besitzt die CRISPR-RNA (crRNA) einen zur Zielsequenz komplementären Bereich, die *spacer*-Sequenz, welche die Sequenzspezifität vermittelt und durch simplen Austausch das Adressieren neuer Zielstellen ermöglicht (Abbildung 2). In Verbindung mit einer Cas-Nuklease oder einem Cas-Nukleasekomplex kann so nahezu in jeder Sequenz gezielt ein DSB induziert werden, wobei die meisten Cas-Nucleasen zusätzlich ein spezifisches, unmittelbar an die Zielsequenz angrenzendes Sequenzmotiv (*protospacer adjacent motif, PAM*) zur Differenzierung zwischen Eigen- und Fremd-DNA erfordern.

Das biotechnologische Werkzeug CRISPR-Cas

Der simple modulare Aufbau der CRISPR-Cas-Systeme ermöglicht die schnelle und einfache Adaptierung für eine gezielte Genomeditoring. Dabei steht eine Vielzahl an CRISPR-Cas-Systemen zur Verfügung, welche sich durch den selektiven Druck sich ständig ändernder Pathogene entwickelt haben und anhand ihrer Effektorproteine klassifiziert werden. Am weitesten für den biotechnologischen

Einsatz verbreitet ist das als erstes adaptierte und durch die Nuklease Cas9 gekennzeichnete System (Abbildung 2). Für die einfachere Anwendung in der Molekularbiologie wurde hierbei die von Cas9 zusätzlich benötigte *trans-activating crRNA (tracrRNA)* mit der crRNA zur *single guide-RNA (sgRNA)* verbunden [1]. Da sich der Einsatz von CRISPR-Cas9 aufgrund der Anforderungen an die PAM-Sequenz auf Guanosin-(G)-reiche Zielsequenzen beschränkt, spielen auch CRISPR-Cas-Systeme, welche durch das Effektorprotein Cas12a gekennzeichnet sind, eine entscheidende Rolle im molekularbiologischen Einsatz. Durch die Erkennung Thymidin-(T)-reicher PAM-Sequenzen ermöglicht diese Nuklease auch die gezielte DSB-Induktion in A/T-reichen Genombereichen wie Promotoren und Introns. Um die Vielfalt der möglichen Zielsequenzen noch zu erhöhen, wurde zudem eine Reihe von Cas9- und Cas12a-Varianten entwickelt, welche verschiedenste PAM-Sequenzen erkennen können. Aufgrund des steigenden Einsatzes viraler Vektoren, welche nur eine beschränkte Kapazität aufweisen, sind zudem insbesondere auch kleinere Nucleasen wie die des CRISPR-Cas12f- oder CRISPR-Cas12 π -Systems von Interesse für die Pflanzenzucht und -forschung.

Aufgrund ihrer natürlichen Vielfalt in Verbindung mit der einfachen molekularbiologischen Anwendung stellen CRISPR-Cas-Nucleasen ein effizientes Werkzeug für die Pflanzenzucht dar, wobei jedoch die Effizienz verschiedener Systeme organismusspezifisch stark variiert. Insbesondere die unterschiedlichen Temperaturanforderungen stellen beim Einsatz der bakteriellen CRISPR-Cas-Systeme in Pflanzen eine Herausforderung dar, da die optimale Temperatur für die meisten Cas-Nucleasen bei 37 °C liegt, während Pflanzen meist bei deutlich geringeren Temperaturen kultiviert werden. Daher wurden verschiedene, für den Einsatz in Pflanzen optimierte Cas9- und Cas12a-Varianten entwickelt, welche eine verbesserte Sequenzspezifität oder verbesserte Schnitteffizienzen auch bei niedrigeren Temperaturen aufweisen. Insbesondere Cas12a-Nucleasen weisen eine stark temperaturabhängige Effizienz auf, so dass Varianten mehrerer Orthologe wie *enhanced AsCas12a (enAsCas12a)*, *improved ErCas12a (imErCas12a)* oder *temperature tolerant LbCas12a (ttLbCas12a)* etabliert wurden. Letztere konnte dabei weiter durch die Integration von Introns in die kodierende Sequenz optimiert werden (ttLbCas12a-i) [2].

Während sich die CRISPR-Cas-vermittelte DSB-Induktion als wertvolles Instrument für die gezielte Steigerung der genetischen Variabilität erwiesen hat, beruhen viele agronomisch wichtigen Merkmale auf Allelen mit nur wenigen Basenänderungen, weshalb die Möglichkeit, gezielt vordefinierte Sequenzänderungen zu induzieren, für die Pflanzenzüchtung von besonderem Interesse ist. Für die Induktion solcher spezifischen Mutationen wurden daher verschiedene CRISPR-Cas-basierte Werkzeuge entwickelt (Abbildung 3). So basieren *base editors* auf der Fusion von Cas-Proteinen mit Deaminasen, wodurch die Substitution

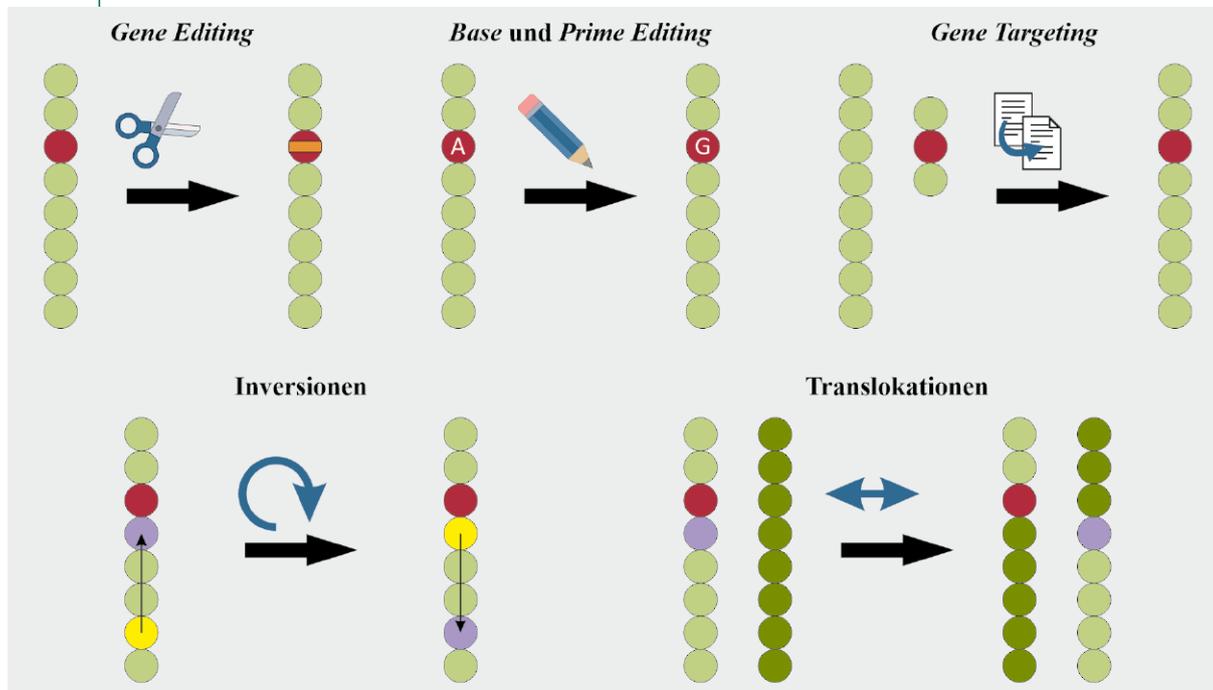
einzelner Basen ermöglicht wird. Größere Sequenzänderungen können durch den Einsatz von *prime editors* erzielt werden, wobei ein RNA-Molekül als Matrize für eine reverse Transkriptase dient, welche die Sequenz auf die Zielstelle des fusionierten Cas-Proteins überträgt [2]. Eine weitere Möglichkeit, welche auch die gezielte Integration ganzer Gene ermöglicht, stellt das auf dem DSB-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR) basierende *gene targeting* dar. Die HR spielt in somatischen Pflanzenzellen eine untergeordnete Rolle, ermöglicht aber eine fehlerfreie Reparatur, da sie auf der Verwendung von zur Bruchstelle homologen Sequenzen als Matrize beruht. Wird daher eine Donorsequenz zur Verfügung gestellt, welche die gewünschten Sequenzänderungen trägt, können diese präzise an der Zielstelle integriert werden [2].

Abgesehen von der Veränderung kodierender Sequenzen ist auch die Modifikation der Genexpression ein vielversprechender Ansatz für die Züchtung neuer Kultursorten, da die Ausprägung agronomisch wichtiger Merkmale in erster Linie von der koordinierten Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene beeinflusst wird. So bietet die Modifikation der für Transkriptionsfaktoren kodierenden Sequenzen oder deren Bindestellen in regulatorischen Bereichen die Möglichkeit, die Expression nachgeschalteter Gene zu beeinflussen, ohne diese selbst zu verändern. Besonders interessant ist dabei auch die Verwendung von

katalytisch inaktivierten Cas-Nukleasen, welche zwar spezifisch an die Zielsequenz binden, jedoch keinen Bruch induzieren und so für die gerichtete Rekrutierung unterschiedlichster Effektoren genutzt werden können. Neben der Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren und -repressoren zur temporären Modulation individueller Genexpressionsmuster können durch die Rekrutierung chromatinmodulierender Enzyme auch vererbare, epigenetische Modifikationen induziert werden [3].

Ein weiterer großer Vorteil der CRISPR-Cas-Systeme ist deren besondere Eignung für die gleichzeitige Editierung mehrerer Zielsequenzen, wodurch simultan die genetische Variabilität in verschiedenen genomischen Loci gesteigert werden kann. Dies ermöglicht zudem, erwünschte Eigenschaften wilder Sorten mit agronomisch wertvollen Merkmalen zu kombinieren, indem mehrere Mutationen, welche in für den Ertrag wichtigen Genen domestizierter Pflanzen identifiziert wurden, in Wildpflanzen nachgebildet werden. Neben der Veränderung von Merkmalen ist insbesondere auch deren Rekombination die Grundlage für die Züchtung neuer Sorten, wobei genetische Kopplungen wesentliche Hindernisse darstellen, da die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Rekombination zweier Gene sinkt, je näher diese beieinander liegen. Eine weitere Limitierung stellen chromosomale Umstrukturierungen dar, wobei insbesondere Inversionen die Anlagerung homologer Sequen-

ABB. 3 | BIOTECHNOLOGISCHE ANWENDUNGEN DES CRISPR-CAS-SYSTEMS



Durch die sequenzspezifische Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), welche durch die endogene, fehleranfällige Reparatur in spontanen Mutationen resultieren, können einzelne Gene gezielt editiert werden. Dagegen sind durch *base* und *prime editors* auch vordefinierte Sequenzänderungen möglich. Größere Modifikationen können im Rahmen des *gene targeting* durch das Einbringen einer Reparaturmatrize erzielt werden. Werden simultan zwei DSB erzeugt, können zudem Inversionen und Translokationen induziert werden, welche das Aufbrechen oder Erzeugen genetischer Kopplungsgruppen ermöglichen.

zen während der Meiose verhindern und eine Rekombination innerhalb des invertierten Bereiches reprimieren können. Dabei kann infolgedessen sogar eine reproduktive Isolation zweier Kultivare eintreten.

Um solche Genomstruktur-bedingten Einschränkungen bei der Züchtung neuer Hochleistungssorten zu umgehen, stellt die gezielte CRISPR-Cas-vermittelte Induktion chromosomaler Umstrukturierungen einen vielversprechenden Lösungsansatz dar. Dabei ermöglicht die Induktion von zwei DSB auf verschiedenen Chromosomen, gezielt gekoppelte Gene zu trennen oder neue Kopplungsgruppen zu erzeugen, indem die reziproke Translokation der Chromosomenenden begünstigt wird. Zudem kann durch die Induktion zweier DSB auf demselben Chromosom die Inversion des flankierten Bereichs erzielt werden und so die meiotische Rekombination in diesem Abschnitt beeinflusst werden, wobei sogar nahezu ganze Chromosomen ausgeschlossen werden können. Somit ermöglicht der Einsatz des CRISPR-Cas-Systems nicht nur die gezielte Induktion von Mutationen, sondern auch die Beschleunigung der Züchtung neuer Sorten, ohne die Sequenz der genetischen Information zu verändern (Abbildung 3) [4, 5].

Von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche CRISPR-Cas-vermittelte Genomeditierung ist neben der Identifikation einer geeigneten Zielsequenz das effiziente Einbringen der entsprechenden Komponenten in die Pflanzenzellen. Eine der geläufigsten Methoden ist dabei die Agrobakterien-vermittelte Transformation, im Zuge derer sich die natürliche Eigenschaft des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* zunutze gemacht wird, pflanzliche Zellen zu infizieren und die eigene DNA in deren Genom zu integrieren. So können Gene, welche für eine Cas-Nuklease und die entsprechende crRNA kodieren, stabil in das Pflanzengenom eingebracht werden. Durch anschließende Rückkreuzungsschritte können Pflanzen gewonnen werden, welche die induzierte Mutation tragen, jedoch keine artfremden Gene. Im Gegensatz zur stabilen Transformation umgeht eine transiente Transformation die Notwendigkeit solcher Rückkreuzungsschritte durch eine temporäre Expression von Genen oder das Einbringen von Ribonukleoproteinkomplexen, ohne dass eingeführte DNA dauerhaft im Genom verbleibt. Dies resultiert somit ebenfalls in transgenfreien Pflanzen, die nicht von einer Pflanze zu unterscheiden sind, welche dieselbe Mutation natürlicherweise erworben hat [6].

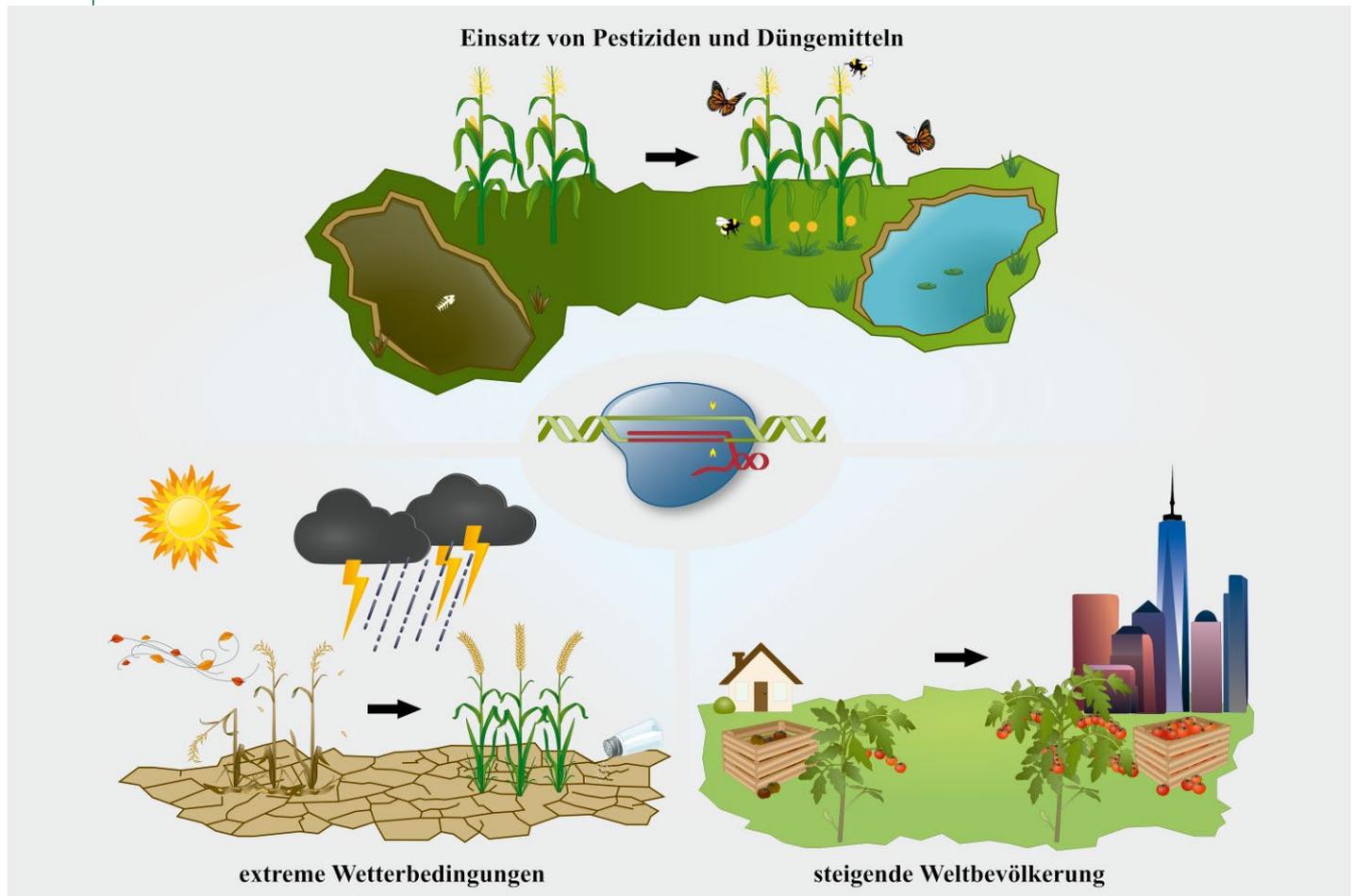
Potenzial des CRISPR-Cas-Systems für eine nachhaltige Landwirtschaft

Durch anthropogene Aktivitäten wird zunehmend mehr in das Klimasystem der Erde eingegriffen und infolgedessen eine Vielzahl von klimatischen Variablen beeinflusst, wodurch es zu weitreichenden Auswirkungen auf die Umwelt, die Ökosysteme und damit auf die menschliche Gesellschaft kommt. Deutlich wird dies unter anderem durch verstärkte Wetterereignisse, den steigenden Meeresspiegel sowie Veränderungen in der Landnutzung und der

landwirtschaftlichen Produktion. Neben der Bekämpfung der Ursachen gilt es ebenso, bereits aktuelle Auswirkungen angemessen zu bewältigen. Gerade in der Landwirtschaft bestehen vielversprechende Möglichkeiten, die Nahrungsmittelproduktion an die gegebenen Umweltbedingungen anzupassen und eine zukunftsfähige Versorgung der Weltbevölkerung sicherzustellen. Dabei weist insbesondere die Anwendung des CRISPR-Cas-Systems ein erhebliches Potenzial auf, Pflanzen effizient an die künftigen Herausforderungen des anthropogenen Klimawandels anzupassen und zu einer nachhaltigeren Landwirtschaft beizutragen (Abbildung 4).

Herausforderung: Extreme Wetterbedingungen

Der agronomische Einsatz des CRISPR-Cas-Systems als biotechnologisches Werkzeug ermöglicht eine kostengünstige Züchtung von widerstandsfähigen Pflanzenarten und gestattet die individuelle Anpassung weltweit verbreiteter Kultursorten an unterschiedliche abiotische Faktoren innerhalb kürzester Zeit (Abbildung 4). Besonders im Fokus steht dabei die Adaptierung an Stressoren wie extreme Temperaturen, Dürre und Salinität, welche für erhebliche Ernteverluste um schätzungsweise bis zu 70 Prozent in der landwirtschaftlichen Produktion verantwortlich sind [7]. Dies würde nicht nur einen vielversprechenden Ansatz zur Steigerung der Ernteerträge für die Bewältigung der global zunehmenden Lebensmittelnachfrage darstellen, sondern zugleich die Weiterverwendung von bestehenden, suboptimalen Anbauflächen ermöglichen und somit eine weitere Entwaldung verhindern. Da pflanzliche Entwicklungsprozesse maßgeblich von den klimatischen Bedingungen beeinflusst und gesteuert werden, können bereits geringe Temperaturabweichungen negative Auswirkungen auf die Pflanzenphysiologie haben. Dabei wird die Funktionalität verschiedener Enzyme, Phytohormone und anderer Signalmoleküle durch Temperaturstress beeinflusst, was sich wiederum negativ auf die Blattphotosynthese, Biomasseakkumulation und den Ertrag auswirkt. Analog zu bereits erfolgreich durchgeführten Geneditierungsstrategien in Reis, Baumwolle sowie in unterschiedlichen Gemüsesorten könnte dabei die CRISPR-Cas9-basierte Modifikation thermosensibler Signalkaskaden die Toleranz gegenüber Temperaturstress erhöhen. So konnte beispielsweise bereits in Tomaten, welche üblicherweise bei 25 °C kultiviert werden, durch die CRISPR-Cas9-vermittelte Editierung des *HyPRP1*-Gens, einem negativen Regulator der Hitzestressreaktion, die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen von bis zu 45 °C erzielt werden [8]. Neben der Modifikation von Thermosensorproteinen und Signalkaskaden kann zudem eine Modifikation der Pflanzenmorphologie die Anpassung an Wetterextreme und die daraus resultierenden sekundären Folgen unterstützen. So gehen mit erhöhten Temperaturen trockene Böden einher, welche die pflanzliche Wasserverfügbarkeit maßgeblich einschränken. Während bereits an Dürre- oder Hitzeperioden ange-

ABB. 4 | POTENZIAL DES CRISPR-CAS-SYSTEMS FÜR EINE NACHHALTIGE LANDWIRTSCHAFT


Der anthropogene Klimawandel fordert die Landwirtschaft heraus, simultan massive Ertragsverluste auszugleichen und den steigenden Bedarf der wachsenden Bevölkerung zu decken. Für eine zukunftsfähige nachhaltige Landwirtschaft bietet die biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems großes Potenzial. Dabei kann der Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden reduziert werden, wobei die Vermittlung von Resistenzen oder die Optimierung der Nährstoffaufnahme ohne Eingriff in die Biodiversität erzielt werden kann. Zusätzlich ist die kostengünstige Züchtung von widerstandsfähigen Pflanzenarten möglich und gestattet die individuelle Anpassung weltweit verbreiteter Kultursorten an unterschiedliche abiotische Faktoren innerhalb kürzester Zeit. Weiterhin spielen Strategien zur Beeinflussung der Fruchtmenge oder der Lagerfähigkeit angesichts des kontinuierlichen Bevölkerungswachstums und der gleichzeitig sinkenden Verfügbarkeit von Anbauflächen eine entscheidende Rolle für eine nachhaltige Landwirtschaft.

passte Pflanzenarten in ihren Organen Wasser speichern können, führt das intensiviertere Wurzelwachstum zum Erreichen von tieferen Bodenschichten oder die vermehrte Schließung von Stomata unzureichend angepasster Pflanzen oftmals zu einer reduzierten Stoffwechselleistung und infolgedessen zu einem gehemmten Wachstumsverhalten und verminderten Ernteertrag. Um dem entgegenzuwirken, wurde kürzlich ein CRISPR-Cas9-vermittelter Geneditierungsansatz in *Vitis vinifera* (Weinrebe) zur Manipulation der Stomatadichte verfolgt, welcher eine Anpassung der Weinrebe an künftig trockenere Umweltbedingungen ermöglichte. Dabei konnte durch den *knockout* des *VvEPFL9*-Gens die Spaltöffnungsichte im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert und somit die intrinsische Wassernutzungseffizienz der editierten Linien verbessert werden [9].

Nicht nur Temperaturen werden durch die globale Erderwärmung extremer werden, sondern auch das Niederschlagsverhalten, welches sich in Form von Stürmen und Starkregen negativ auf Erträge auswirken kann. Durch starke Unwetter werden nicht nur die für das pflanzliche Wachstum benötigten Nährstoffe aus dem Boden ausgewaschen, sondern auch physische Schäden an den Pflanzen verursacht. Um die Angriffsfläche von Pflanzen gegen extreme Winde und Unwetter zu minimieren und widerstandsfähige Kultursorten zu erzeugen, wurden bereits verschiedenste Züchtungsstrategien verfolgt. So konnte beispielsweise mithilfe eines CRISPR-Cas-basierten Geneditierungsansatzes eine kurzstielige Maissorte erzeugt werden, welche eine bis zu 40 Prozent geringere Wuchshöhe als herkömmlicher Mais aufweist und einen besseren Schutz gegen Ernteverluste bietet [10].

Die Versalzung von Böden ist ein weiteres globales Problem in der Landwirtschaft, das sich auf über 400 Millionen Hektar weltweit erstreckt und direkte Auswirkungen auf die Ernteerträge und die Ernährungssicherheit hat. Als Ursachen der zunehmend erhöhten Bodensalinität werden oftmals die übermäßige Düngung und Bewässerung von Anbaugebieten sowie die Umwandlung natürlicher Lebensräume in landwirtschaftliche Flächen angeführt. Angepasst durch jahrtausendelange Evolutionsprozesse können einige Pflanzenarten osmoprotektive Metaboliten synthetisieren oder besitzen spezifische Mechanismen zur Ausscheidung von Salzionen durch spezialisierte Strukturen. Um auch Nutzpflanzen ohne solche Mechanismen an die erhöhten Salzkonzentrationen zu adaptieren, wurde auf der Grundlage des CRISPR-Cas-Systems bereits eine Vielzahl erfolgversprechender Ergebnisse durch die Manipulation von Signalkaskaden erzielt. So konnte beispielsweise in Soja durch den CRISPR-Cas9-vermittelten *knockout* des Peroxidase-regulierenden Faktors E2 eine Salztoleranz erzielt werden, da mit dessen Verlust die Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies während der Reaktion auf Salzstress vermindert wurde. Neben der erhöhten Salztoleranz wiesen die editierten Pflanzen zudem eine verkürzte Blüte- und Reifezeit auf, wodurch die E2-Geneditierung ein ideales Ziel für die molekulare Züchtung früh reifender und salztoleranter Sojasorten darstellt [11].

Herausforderung: Kontinuierlich steigende Weltbevölkerung

Angesichts des kontinuierlichen Bevölkerungswachstums und der gleichzeitig sinkenden Verfügbarkeit von Anbauflächen spielen ertragsoptimierende Strategien eine entscheidende Rolle für eine nachhaltige Landwirtschaft (Abbildung 4). Durch die Anwendung des CRISPR-Cas-Systems stehen verschiedene Lösungsansätze für die Beeinflussung agronomisch wichtiger Faktoren wie die Pflanzenstatur oder die Fruchtmenge zur Verfügung. Als häufiges Beispiel in diesem Kontext wird die Kurzhalmigkeit bei verschiedensten Kulturpflanzen, insbesondere bei Getreidearten wie Weizen, Reis, Gerste und Hafer genannt. Während lange Halme in der Wildnis die Vermehrung durch schnelles Abbrechen und Freisetzen des Saatguts fördern, werden in der Landwirtschaft bevorzugt kurzhalmige Kultursorten angebaut, um Ertragsverluste durch Windbruch, mechanische Ernte oder Lagerung zu vermeiden. Unter den zahlreichen Faktoren, die sich auf den Ertrag auswirken, stellt die Beeinflussung der Cytokinin-Homöostase einen praktikablen Weg zur Steigerung des Getreideertrags dar. So verbesserte die C-terminale Editierung des Cytokinin aktivierenden Enzyms OsLOGL5 den Kornertrag in Reis unter verschiedenen Umweltbedingungen [12]. Neben der Optimierung bereits etablierter Kultursorten ist auch die Adaptierung von Wildpflanzen mit wünschenswerten Eigenschaften zu neuen Nutzpflanzen möglich. Eine solche *de novo*-Domestizierung von

Wildpflanzen konnte bereits innerhalb von nur einer Generation in der wilden Tomatensorte *Solanum pimpinellifolium* erzielt werden, indem CRISPR-Cas9-vermittelt sechs unabhängige Gene editiert wurden, welche am Ertrag und der Produktivität bei domestizierten Kultursorten beteiligt sind. Dabei wiesen die editierten Pflanzen bereits in der folgenden Generation eine erhöhte Fruchtgröße und Fruchtanzahl auf [13]. Neben der Ertragssteigerung zur Minimierung der benötigten Anbaufläche fokussieren sich weitere Strategien auf die Verbesserung der Lagerfähigkeit sowie des Nährstoffprofils von Lebensmitteln, um die Akzeptanz der Verbrauchenden zu erhöhen und die Lebensmittelverschwendung zu verringern. Bedauerlicherweise werden etwa ein Drittel der weltweit produzierten Lebensmittel aufgrund unbeabsichtigter Nachernteverluste oder absichtlicher Verschwendung infolge hoher ästhetischer und geschmacklicher Erwartungen nicht konsumiert. Um diesem Trend entgegenzuwirken, konnte beispielsweise bereits der natürliche enzymatische Bräunungsprozess von Obst und Gemüse durch CRISPR-Cas-basierte Editierung von Polyphenoloxidase-(PPO)-Genen verlangsamt werden. Dabei führte sowohl in Kartoffeln als auch in Auberginen die Induktion von Mutationen in solchen Genen zu einer signifikanten Verringerung der Bräunung im Vergleich zum Wildtyp [14].

Herausforderung: Einsatz von Pestiziden und Düngemitteln

Besonders im Hinblick auf den Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden stellt die Editierung mittels des CRISPR-Cas-Systems eine vielversprechende Perspektive für eine nachhaltige Landwirtschaft dar, wobei sowohl die Vermittlung von Resistenzen als auch eine optimierte Nährstoffaufnahme erzielt werden könnte (Abbildung 4). Bislang werden in der Landwirtschaft biotisch bedingte Ernteauffälle sowie Ertragsverluste aufgrund nährstoffarmer Anbauflächen mithilfe des Einsatzes synthetischer Pflanzenschutz- und Düngemittel kompensiert. Obwohl ihre Nutzung erhebliche Vorteile in Bezug auf die Ertragssummen bietet, sind die damit verbundenen negativen Auswirkungen auf die Umwelt und die Ökosysteme immens. Angesichts dessen ist es entscheidend, adäquate Handlungsstrategien zu entwickeln, die sowohl ertragreiche Ernten als auch effektiven Naturschutz ermöglichen. Neben der Schaffung von Pufferzonen sowie der Förderung nachhaltiger Landwirtschaftspraktiken wie Fruchtwechsel, Zwischenfruchtanbau und Mulchen zur Verringerung der Bodenerosion kann der Einsatz von Kulturpflanzen mit einer optimierten Nährstoffaufnahme den Bedarf an Düngemitteln reduzieren. Dabei liegt in biotechnologischen Editierungsansätzen ein besonderer Schwerpunkt auf der Anpassung des Nährstoffimports durch die Modulation von verfügbaren Transportproteinen und beteiligten Signalkaskaden. In einem CRISPR-Cas9-basierten Baseneditierungsansatz wurde beispielsweise durch den Austausch einer einzelnen Base im *OsNRT1.1B*-Gen, wel-

ches für einen transmembranen Nitrattransporter kodiert, eine erhöhte Nitrataufnahme in Reispflanzen erzielt. Ebenfalls beim Reis konnte durch den CRISPR-Cas9-vermittelten *knockout* des *OsMYB1*-Gens, das für einen auf Phosphatmangel reagierenden Transkriptionsfaktor kodiert, eine erhöhte Phosphataufnahme und -akkumulation erzielt werden, welche auf eine veränderte Expression von Transportern und Signalmolekülen zurückzuführen ist [15].

Neben dem übermäßigen Einsatz von Düngemitteln stellt auch die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln und deren Verbreitung über Wasser und Luft eine ernsthafte Bedrohung für unsere Ökosysteme dar. Deren Anreicherung kann nicht nur akute und chronische Gesundheitsprobleme bei Menschen und Tieren verursachen sowie die Resistenzbildung bei Schädlingen fördern, sondern hat auch schwerwiegende Auswirkungen auf die Biodiversität, indem sie nützliche Insektenpopulationen und andere Organismen schädigt. Anstatt pflanzenpathogene Schädlinge – sowie potenziell nützliche Organismen – durch den Einsatz von Pestiziden zu eliminieren, kann der Anbau von Kultursorten mit effizienten Abwehrmechanismen gegen Schädlingsbefall eine nachhaltige Kultivierung ermöglichen. Um solche resistenten Kultivare zu generieren, wurden sowohl diverse klassische Züchtungsmethoden als auch zahlreiche CRISPR-Cas-basierte Strategien verfolgt. Dabei konnten bereits biotechnologisch Resistenzen gegen verschiedene Pilzbefälle in einer Vielzahl von Getreidearten wie Reis, Weizen, Raps und Mais sowie in Obst- und Feldfrüchten wie Wein, Soja, Äpfeln und Kakao vermittelt werden [16]. Ein prominentes Beispiel für das Potenzial solcher Ansätze, welches zugleich die Problematik der monokulturellen Landwirtschaft verdeutlicht, ist die sogenannte Panamakrankheit, welche seit Jahren in Südostasien und Südamerika eine ernsthafte Bedrohung für den Bananenanbau darstellt. Besonders besorgniserregend ist die Tatsache, dass der Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* gegenüber gängigen Fungiziden immun ist und eine Anpassung an den Erreger mittels klassischer Zuchtmethoden bei der samenlosen Banane nicht möglich ist. Erstmals wurde dieses Problem in den 1960er Jahren deutlich, als das damalige Bananen-Kultivar „Gros Michel“ aufgrund der Panamakrankheit weltweit nicht mehr für den Anbau geeignet war. Als Reaktion darauf wechselten Bananenproduzenten zum Anbau der resistenteren Cavendish-Staude, welche jedoch seit den 1990er Jahren von der neuen Pilzrasse *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*Tropical Race 4*, TR4) befallen wird, wobei dieses Mal kein alternatives, resistentes Kultivar zur Verfügung steht (Abbildung 5). Daher werden biotechnologische Strategien als wichtige Lösungsansätze für den Bananenanbau betrachtet, um den einzig verbliebenen, samenlosen genetischen Klon Cavendish weiter anbauen zu können. Erst kürzlich konnte durch die Integration des aus der Wildbanane stammenden Resistenzgens *RG2* in die Cavendish-Staude ein TR4-resistentes QCVA4-Kultivar generiert



ABB. 5 Befall mit dem Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* führt zur Panamakrankheit: Die Bananenpflanze verwelkt, bildet keine Früchte mehr und stirbt letztlich ab. Foto: Scot Nelson über www.wikipedia.de.

werden, welches nach diversen Feldversuchen bereits zum menschlichen Verzehr in Australien zugelassen ist. Da es sich jedoch bei dem QCVA4-Kultivar um eine transgene Insertionslinie handelt und gentechnisch veränderte Produkte in vielen Ländern nicht oder nur mit Kennzeichnung zugelassen werden, könnte die Verfolgung eines CRISPR-Cas-basierten Geneditierungsansatzes zur Reaktivierung des bereits im Cavendish-Kultivar vorliegenden, inaktiven *RG2*-Gen eine erfolgversprechende Alternative für die Bananenproduzenten darstellen [17].

Technologische Limitierungen von CRISPR-Cas in der Pflanzenzüchtung

Die biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems weist aufgrund seines einfachen biochemischen Aufbaus, seiner hohen Effizienz, guten Reproduzierbarkeit sowie seiner schnellen und kostengünstigen Methodik ein beachtliches Potenzial zur effizienten Anpassung von Kulturpflanzen an gegenwärtige klimatische und demographische Herausforderungen auf. Mit zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten bietet sein Einsatz vielfältige Lösungsansätze, wie die Landwirtschaft unter dem Druck der

anthropogenen Erderwärmung rechtzeitig und nachhaltig auf die bevorstehenden Hürden reagieren kann. Nichtsdestotrotz wirkt das CRISPR-Cas-System nur als genomisches Werkzeug und weist einige Einschränkungen auf, weswegen die Anwendung des Systems eher als eine vielversprechende Erweiterung des Werkzeugkastens und weniger als die alleinige Lösung für alle agronomischen Probleme betrachtet werden sollte. Obwohl CRISPR-Cas-basierte Methoden erfolgreich zur gezielten Induktion von Mutationen, Geninsertionen und -deletionen sowie chromosomalen Umstrukturierungen zur Redefinition von Rekombinationsbarrieren angewendet wurden, befindet sich ihr Einsatz in der agrarwissenschaftlichen Forschung noch in den Anfängen und beschränkt sich größtenteils auf *proof of concept*-Ansätze. Obwohl das CRISPR-Cas-System bereits erfolgreich in mindestens 42 Pflanzenarten angewendet wurde, besteht weiterhin Bedarf an effizienten Transformationssystemen für Kulturpflanzen sowie einem universellen Werkzeug, welches eine gleichbleibend hohe Effizienz in Kombination mit einer geringen *off-target*-Aktivität in allen Zielorganismen gewährleistet. So sind die meisten Nutzpflanzen nicht für die in Modellpflanzen gut etablierte Agrobakterien-vermittelte Transformation empfänglich oder erfordern aufwendige Regenerationsverfahren. Um diese grundlegende Einschränkung in gentechnischen Ansätzen zu überwinden sowie trotz geringer Transformationseffizienzen eine erfolgreiche Editierung zu erzielen, werden kontinuierlich Wege zur Verbesserung von Transformationssystemen gesucht und Ansätze zur biochemischen Optimierung der Effizienz gängiger Cas-Nukleasen verfolgt.

Obwohl das CRISPR-Cas-System im Vergleich zu anderen Geneditierungsansätzen eine höhere Zielspezifität aufweist, besteht aufgrund ausreichender Homologien zwischen den gRNAs und *off-target*-Sequenzen die Möglichkeit, neben der Zielsequenz unbeabsichtigterweise weitere genomische Stellen zu editieren. Zwar verursachen CRISPR-Cas-Nukleasen nur wenige ungezielte Mutationen – insbesondere im Vergleich zu den Tausenden, durch herkömmliche Mutagenesezüchtung bereits etablierten Mutationen. Dennoch können bereits im Vorfeld bei der Konzeption des Editierungsansatzes effektive Maßnahmen ergriffen werden, um das Risiko einer *off-target*-Editierung zu minimieren. Während die Auswahl einer geeigneten Zielsequenz mit geringem *off-target*-Potenzial mithilfe verschiedener bioinformatischer Online-Plattformen relativ einfach sein sollte, steigt unweigerlich bei der simultanen Verwendung mehrerer Schnittstellen – wie es bei der *de-novo*-Domestikation oder der Modulation komplexer Prozesse erforderlich ist – das Risiko unbeabsichtigter Editierungen. Wird ein signifikantes *off-target*-Potenzial festgestellt, kann eine verbesserte *off-target*-Spezifität bei geringerem *off-target*-Potenzial durch den Einsatz eines alternativen CRISPR-Cas-basierten Ansatzes ermöglicht werden. In diesem Zusammenhang zeigt insbesondere der Einsatz von Typ-V-CRISPR-Cas-Systemen, von Einzelstrang-

bruch-induzierenden Cas9-Nickasen oder *prime editors* vielversprechendes Potenzial. Eine vollständige Sequenzierung des editierten Organismus und phänotypische sowie biochemische Charakterisierungen können dazu beitragen, die agronomische Bedeutung potenzieller *off-target*-Ereignisse zu bestimmen.

Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass sich trotz großer Fortschritte in der Erforschung stressinduzierter Reaktionen die meisten biotechnologischen Ansätze bisher auf die genetische Anpassung an einzelne Stressoren beschränken. Jedoch zeigen natürliche Umgebungen häufig kombinierte Stressfaktoren, deren Intensität und Häufigkeit durch den Klimawandel steigen dürften, was die Entwicklung von stressresistenten Kulturpflanzen verkomplizieren wird. Um diese biotechnologische Herausforderung anzugehen, wurden bereits vielversprechende Systeme vorgestellt, jedoch erfordert die Etablierung widerstandsfähiger Kultursorten weiterhin auch die molekularbiologische Erforschung der zugrundeliegenden Interaktionsmechanismen stressinduzierter Signalkaskaden, um die Präzisionszüchtung effektiv zu unterstützen. Obwohl die Präzisionszüchtung schneller neue Kultursorten hervorbringen kann als klassische Züchtungsmethoden, benötigt auch diese mehrere Jahre Züchtungsarbeit nach der erfolgreichen Editierung. Neben der Auswahl gewünschter Modifikationen und möglicher Rückkreuzungsschritte zur Eliminierung vorhandener Transgene, müssen die modifizierten Pflanzen umfangreich und vollständig auf ihre veränderten Eigenschaften überprüft werden, um einen sicheren Anbau und Konsum zu gewährleisten.

Während für die Überwindung der technischen Limitierungen der biotechnologischen Anwendung des CRISPR-Cas-Systems weltweit Wissenschaftler/-innen an innovativen Lösungsansätzen forschen, wird jedoch dessen universaler Einsatz durch die Anwendung des Patentrechts und verworrener, länderspezifischer Regelungen erschwert. Dabei wird nicht nur die Nutzung des CRISPR-Cas-Systems zur kommerziellen Anwendung reglementiert, auch der Anbau adaptierter Kultursorten kann sich je nach Rechtssystem als kostspielig erweisen. Obwohl die ersten Publikationen zur biotechnologischen Nutzung des CRISPR-Cas-Systems erst zwölf Jahre zurückliegen, existieren neben den umstrittenen Basispatenten mittlerweile zahlreiche zusätzliche Patente zu verschiedenen Varianten des Systems. Die kommerzielle Nutzung wird zusätzlich durch länderspezifische Auffassungen erschwert, was häufig zu Patentstreitigkeiten führt und Unternehmen vor die Frage stellt, an wen die fälligen Lizenzgebühren zu entrichten sind. Besonders im Hinblick auf bereits existierende Patentierungen großer Saatgutbetriebe, welche ein für Kleinbauern signifikantes wirtschaftliches Hindernis darstellen, äußern Kritiker Besorgnis über den rechtlichen Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO). In diesem Kontext stellt sich auch die Frage hinsichtlich der Patentierung von editierten, transgenfreien Pflanzen, welche auch unter natürlichen Bedingungen hätten entstehen können.

Rechtliche Regulierung von GVO

Für den kommerziellen Einsatz von Genomeditierungstechnologien sind unterstützende staatliche Vorschriften und die Akzeptanz der Verbraucher/-innen erforderlich, wobei das rasche Aufkommen von CRISPR-Cas-Systemen weltweit bestehende Regularien herausfordert und die Anpassung der Gesetzeslagen an diese neuartigen und chancenreichen Techniken erfordert. Während bereits einige Länder in Amerika und Asien entsprechende Richtlinien überarbeitet und erste genomeditierte Produkte für den Konsum freigegeben haben, herrschen in vielen Ländern wie in Neuseeland, Südafrika oder den Mitgliedstaaten der Europäischen Union weiterhin restriktive Vorschriften, was zu einem nicht aufeinander abgestimmten Mosaik von weltweit unterschiedlichen Regulationsmaßnahmen führt. Gerade in der EU besteht seit dem Aufkommen der Pflanzentransformation am Ende des letzten Jahrhunderts eine gewisse Skepsis hinsichtlich der potenziellen Auswirkungen von GVO auf die Umwelt, die menschliche Gesundheit und die biologische Vielfalt, welche dazu geführt hat, dass die Genehmigung und der Einsatz von GVO in der EU strengen regulatorischen Prüfungen unterliegen. So wurde unter Berücksichtigung des Vorsorgeprinzips die GVO-Richtlinie 2001/18/EG verabschiedet, welche komplexe und langfristige Bewertungen vor dem Anbau von GVO erfordert und heutzutage immer noch in Kraft ist. Diese hat dazu geführt, dass nur große Agrarkonzerne solche kostspieligen Verfahren und die damit einhergehende wirtschaftliche Bürde auf sich nehmen konnten, kaum GVOs in der Landwirtschaft eingesetzt wurden und die öffentliche Diskussion zunehmend kritischer wurde. Diese kritische Einstellung spiegelt sich in der Anzahl der EU-Mitgliedstaaten wider, welche den Anbau von GVO in ihrem Hoheitsgebiet auf der Grundlage der „Opt-out“-Richtlinie 2015/412 einschränken oder verbieten [18]. Eine fragwürdige Entwicklung in diesem Zusammenhang stellt die konstant steigende Anzahl an Importzulassungen von GVO in Europa dar, während lediglich eine einzige GVO-Pflanze, der MON180-Mais, mit rückläufigem Trend angebaut wird [19]. Trotz diverser von der Regierung und der EU finanzierter Forschungsprojekte zur Bewertung möglicher Risiken von transgenen Nutzpflanzen, welche keinen Hinweis auf ein erhöhtes Gefahrenpotenzial transgener Pflanzen gegenüber konventionell erzeugten Pflanzen ergaben, wurden die geltenden Regularien nicht angepasst. Aus wissenschaftlicher Sicht noch weniger nachvollziehbar ist das Urteil des Europäischen Gerichtshofs im Jahr 2018, welches die Neubewertung der Gesetzeslage im Hinblick auf transgenfreie, genomeditierte Pflanzen ablehnte, wodurch diese denselben Restriktionen wie transgene Pflanzen unterliegen. Obwohl diese Pflanzen nicht von natürlichen Pflanzen zu unterscheiden sind, war die Grundlage dieser Entscheidung, dass letztlich nicht das Produkt, sondern der Prozess der Züchtung rechtlich ausschlaggebend für die Einstufung ist. Um die Öffentlichkeit und die Politik von der Notwendigkeit einer wissenschaft-

lich begründeten, differenzierten Regulierung zu überzeugen, veröffentlichte eine Reihe von wissenschaftlichen Institutionen wie die deutsche Leopoldina Stellungnahmen, was zu einer Neubewertung der Gesetzeslage im Jahr 2023 führte. Im resultierenden EU-Kommissionsvorschlag werden zwei Klassen von NGT-Pflanzen (neue genomische Techniken) unterschieden, wobei Pflanzen, die als gleichwertig mit konventionell gezüchtete Pflanzen (Kategorie 1) gelten, von den GVO-Vorschriften ausgenommen werden, während für alle anderen NGT-Pflanzen (Kategorie 2) größtenteils die bestehenden Regularien erhalten bleiben. Zudem stimmte das Parlament für eine Kennzeichnungspflicht von NGT-Saatgut sowie ein Verbot von Patenten auf NGT, um neue Abhängigkeiten für Landwirte und Pflanzenzüchter zu vermeiden. Momentan steht allerdings der für eine Verabschiedung der NGT-Verordnung notwendige Mehrheitsbeschluss des Europäischen Rates noch aus. Letztendlich wird die Marktfähigkeit von genomeditierten Lebensmitteln jedoch von der Akzeptanz und dem Interesse der Öffentlichkeit geprägt [18].

Zusammenfassung

Durch die jahrtausendelange Selektionszüchtung ist die genetische Vielfalt unserer Kultursorten stark verarmt, so dass eine Anpassung an die sich immer rapider ändernden klimatischen und demographischen Bedingungen durch konventionelle Züchtungsmethoden zunehmend schwerer wird. Daher werden innovative Handlungsstrategien benötigt, um Ernteerträge unter widrigen Bedingungen – mit kleinstmöglichem Eingriff in die Biodiversität – zu erhalten und somit die Ernährungssicherheit für die wachsende Weltbevölkerung zu gewährleisten. Großes Potenzial, die Zukunft der globalen Landwirtschaft nachhaltig zu gestalten, bieten dabei CRISPR-Cas-basierte Genomeditierungsstrategien, welche es ermöglichen, Nutzpflanzen mit Präzision und Leichtigkeit zu adaptieren. Dabei können nicht nur einzelne Gene gezielt editiert, sondern auch Kopplungsgruppen durch die präzise Induktion von Translokationen und Inversionen modifiziert und neue Rekombinationsereignisse erzielt werden. Somit kann die genetische Variabilität von Kultursorten gesteigert werden, was den Grundstein für eine zukunftsfähige Pflanzenzüchtung legt. Allerdings bleibt es spannend, ob die rechtlichen Bestimmungen und die Kundenakzeptanz das Potenzial der biotechnologischen Anwendung des CRISPR-Cas-Systems in der Landwirtschaft erkennen und eine nachhaltige Bewältigung zukünftiger Herausforderungen ermöglichen.

Summary

CRISPR-Cas for a more sustainable future in agriculture

For thousands of years, selective breeding has greatly impoverished the genetic diversity of our old cultivars so that an adaptation to the ever more rapidly changing climatic and demographic conditions through conventional breeding methods is increasingly difficult. Hence, innovative

strategies are needed to maintain crop yields under adverse conditions without impairing biodiversity thus ensuring food security for the ever-growing world population. Enabling the precise and easy adaptation of crops, CRISPR-Cas-based genome editing strategies offer great potential for shaping the future of global agriculture sustainably. Not only can single genes be specifically edited, but linkage groups can be modified, too, by precisely inducing translocations and inversions, and new recombination events can be obtained. Therefore, genetic variability of cultivars can be increased, which is the basis for sustainable crop breeding. However, it remains to be seen whether legal regulations and customer acceptance will recognize the potential of the biotechnological application of the CRISPR-Cas system in agriculture and enable the sustainable mastery of future challenges.

Schlagworte

CRISPR-Cas, Pflanzenzucht, genome editing, Klimawandel, Nachhaltige Landwirtschaft

Literatur

- [1] M. Jinek *et al.* (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821.
- [2] N. Capdeville *et al.* (2023). Getting better all the time – recent progress in the development of CRISPR-Cas-based tools for plant genome engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 79, 102854.
- [3] N. Capdeville *et al.* (2021). Sophisticated CRISPR-Cas tools for fine-tuning plant performance. *J. Plant Physiol.* 257, 153332.
- [4] M. Rönspies *et al.* (2021). CRISPR-Cas-mediated chromosome engineering for crop improvement and synthetic biology. *Nat. Plants* 7, 566–573.
- [5] M. Rönspies *et al.* (2022). Massive crossover suppression by CRISPR-Cas-mediated plant chromosome engineering. *Nat. Plants* 8, 1153–1159.
- [6] Z. Chen *et al.* (2022). Recent advances in crop transformation technologies. *Nat. Plants* 8, 1343–1351.
- [7] X. Li, X. *et al.* (2022). CRISPR-Cas9 Technique for Temperature, Drought, and Salinity Stress Responses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 44, 2664–2682.
- [8] A. Chakraborty *et al.* (2024). Gene editing for tolerance to temperature stress in plants: A review. *Plant Gene* 37, 100439.
- [9] M. Clemens *et al.* (2022). VvEPFL9-1 Knock-Out via CRISPR-Cas9 Reduces Stomatal Density in Grapevine. *Front. Plant Sci.* 13, 878001.
- [10] Pairwise and Bayer collaborate to CRISPR short-stem maize. European Biotechnology Life Science and Industry Magazine, <https://t1p.de/g9loa>.
- [11] H. A. Gajardo *et al.* (2023). The Potential of CRISPR-Cas Technology to Enhance Crop Performance on Adverse Soil Conditions. *Plants* 12, 1892.
- [12] C. Wang *et al.* (2020). A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice. *Plant Mol. Biol.* 102, 373–388.
- [13] A. Zsögön *et al.* (2018). De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat. Biotechnol.* 36, 1211–1216.
- [14] A. Tuncel *et al.* (2023). Genome-edited foods. *Nat. Rev. Bioeng.* 1, 799–816.
- [15] L. Sathee *et al.* (2022). Genome Editing Targets for Improving Nutrient Use Efficiency and Nutrient Stress Adaptation. *Front. Genet.* 13, 900897.
- [16] S. Tyagi *et al.* (2021). Engineering disease resistant plants through CRISPR-Cas9 technology. *GM Crops Food* 12, 125–144 (2021).

- [17] J. Dale *et al.* (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4. *Nat. Commun.* 8, 1496.
- [18] H. Puchta (2023). Regulation of gene-edited plants in Europe: from the valley of tears into the shining sun? *aBIOTECH*, <https://doi.org/10.1007/s42994-023-00130-8>.
- [19] L. Castaldi (2023). European Union: Biotechnology and Other New Production Technologies Annual, <https://t1p.de/thkxk>

Verfasst von:



Fabienne Gehrke studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2019–2023 Promotion am J. G. Költreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. Seit 2023 Postdoc am JKIP des KIT.



Niklas Capdeville studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2019–2023 Promotion am J. G. Költreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. Seit 2023 Postdoc am JKIP des KIT.



Laura Merker studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2019–2022 Promotion am J. G. Költreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. 2022–2024 Postdoc am JKIP des KIT. Seit 2024 Projektmanagerin am Steinbeis Europa Zentrum.

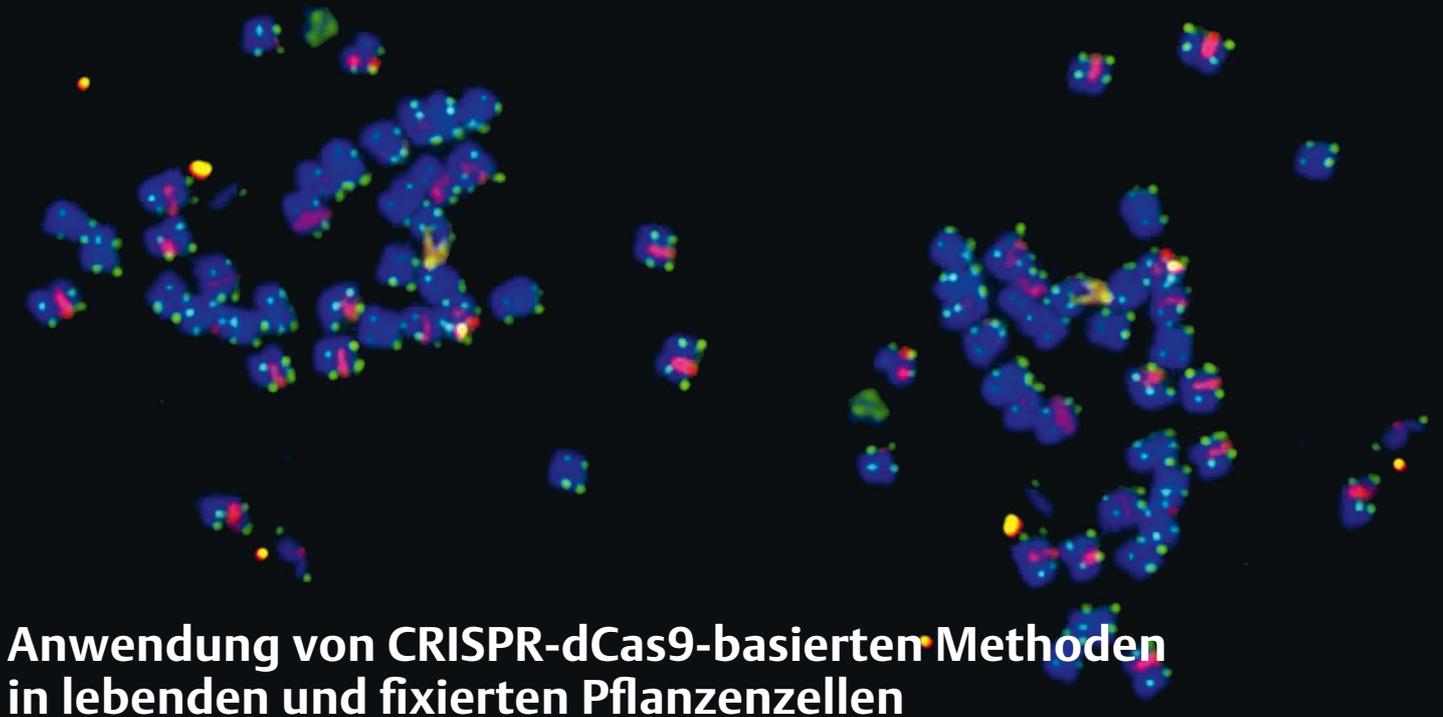


Holger Puchta studierte Biochemie an den Universitäten Tübingen und München. Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, München. 1989–1995 Postdoc am Friedrich-Miescher-Institut in Basel, Schweiz. 1995–2002 Gruppenleiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben. Seit 2002 Professor für Molekularbiologie am J. G. Költreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).



Korrespondenz

Prof. Dr. Holger Puchta
Joseph Gottlieb Költreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP), Abteilung Molekularbiologie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 4, Gbd. 30.43
D-76131 Karlsruhe
E-Mail: holger.puchta@kit.edu



Anwendung von CRISPR-dCas9-basierten Methoden in lebenden und fixierten Pflanzenzellen

Genomische Sequenzen sichtbar machen

ANDREAS HOUBEN | BHANU PRAKASH POTLAPALLI | SOLMAZ KHOSRAVI

Mit der Entdeckung programmierbarer DNA-Bindungsproteine wurden Methoden entwickelt, die die Sichtbarmachung von definierten DNA-Sequenzen in lebenden Zellen und in fixierten Chromosomen und Zellkernen ermöglichen. Anwendungen und das Potenzial programmierbarer DNA-Bindungsproteine mit Schwerpunkt auf CRISPR-Cas9-basierter Chromatinmarkierung in der Pflanzenwissenschaft werden vorgestellt.

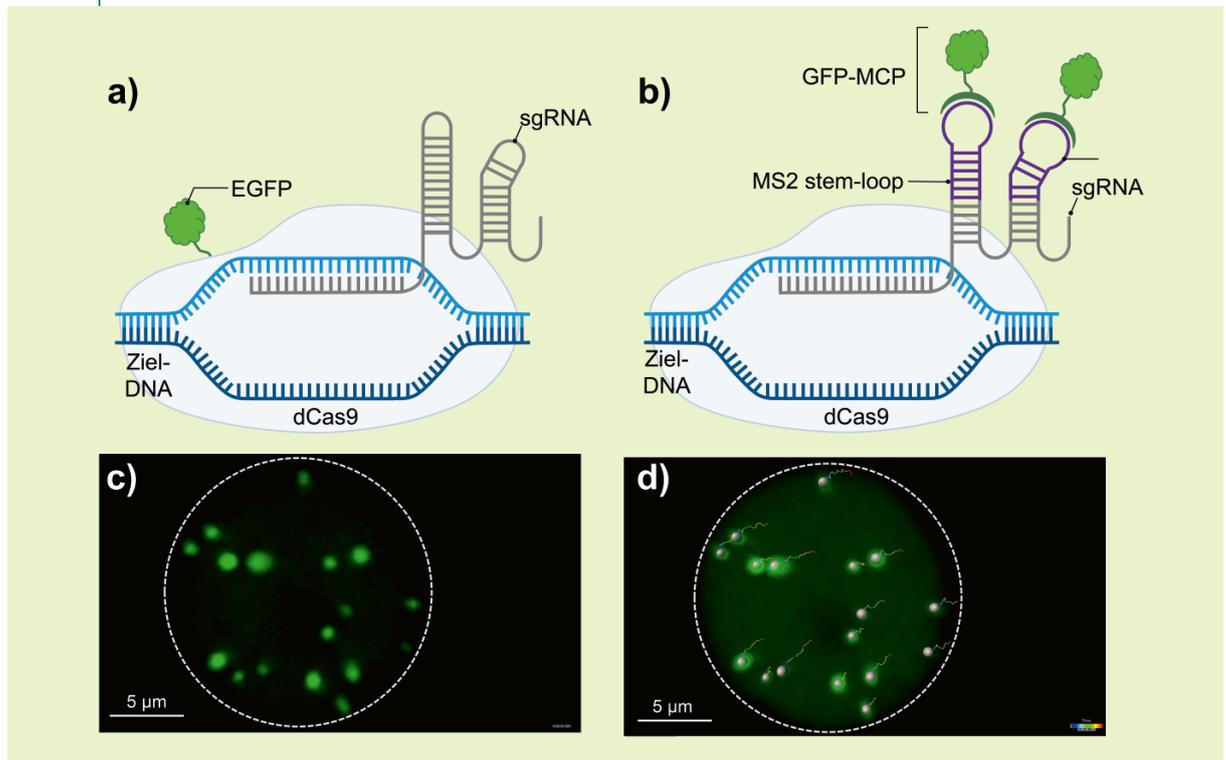
Die räumliche und zeitliche Organisation von Chromosomen und Zellkernen wird zunehmend als wichtig für die Regulierung von Funktionen wie Genexpression, DNA-Replikation und Reparatur sowie für die korrekte Segregation des genetischen Materials während der Zellteilung erkannt. Die bereits Ende der 1960er Jahre entwickelte *in-situ*-Hybridisierung ist eine bewährte und weit verbreitete Methode zur Kartierung von DNA-Sequenzen in Chromosomen und Zellkernen in Forschung und Medizin. Diese Methode basiert darauf, dass eine markierte DNA-Sonde über Basenpaarungen an die nachzuweisende DNA bindet [1]. Dadurch kommt es zur Hybridisierung von komplementären Basen auf zwei Nukleinsäureeinzel-

strängen. Zum Nachweis von fluoreszenzmarkierten Proben ist der Einsatz von Fluoreszenzmikroskopen notwendig. Der Nachweis genomischer Loci in lebenden Zellen ist aber mit dieser Methode nicht möglich.

Um definierte DNA-Sequenzen in lebenden Zellen sichtbar zu machen, wurde in jüngerer Zeit eine Reihe von Ansätzen entwickelt, die unter anderem auf programmierbaren DNA-Bindeproteinen basieren. Die Entdeckung des Typ-II-Systems der CRISPR-assoziierten Endonuklease 9 (Cas9) hat nicht nur die Etablierung neuer Werkzeuge zur gezielten Editierung von DNA-Sequenzen ermöglicht, sondern auch das Feld der Chromatin-Bildgebung revolutioniert [2]. Mutationen in zwei Domänen des Cas9-Proteins führten zur Erzeugung eines katalytisch inaktiven, sogenannten „toten“ Cas9-Proteins (dCas9, wobei „d“ für *dead* = tot steht) [2]. Das dCas9-Protein hatte damit seine DNA-Schneideaktivität verloren und konnte nach Verbindung mit einem fluoreszierenden Protein – wie zum Beispiel dem grün fluoreszierenden Protein GFP – für die DNA-Bildgebung programmiert werden [3]. Diese dCas9-Variante wurde in Kombination mit Target-spezifischer gRNA (*guide* RNA = Leit-RNA) erfolgreich für die Visualisierung repetitiver und unikaler Sequenzen in lebenden Zellen nicht-pflanzlicher Systeme eingesetzt (Übersicht in [4]).

In Pflanzen wurde CRISPR *Live Imaging* zur Sichtbarmachung von Telomer-Sequenzen in den lebenden Blattzellen der Wildtabakpflanze *Nicotiana benthamiana*

ABB. 1 | VISUALISIERUNG GENOMISCHER SEQUENZEN IN LEBENDEN ZELLEN



CRISPR-dCas9 *Live Imaging* zur Sichtbarmachung definierter genomischer Sequenzen in lebenden Zellen. a) dCas9 ist mit einem fluoreszierenden GFP-Protein direkt markiert (in Grün). **b)** Indirekte Markierung von dCas9 mit Aptameren. In das sgRNA-Gerüst (sg = *single guide*) ist eine als Aptamer bezeichnete *stem-loop*-Struktur integriert (MS2), die mit fluoreszierenden Aptamer-Bindungsproteinen erkannt werden kann (GFP-MCP, in Grün). **c)** Einzelner Zellkern von transient transformierten Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) mit CRISPR-Cas9-markierten Telomeren (grüne Punkte). **d)** Die Dynamik von Telomeren innerhalb von 15 Minuten ist graphisch dargestellt.

eingesetzt [5] (Abbildung 1a). Dieses Experiment bewies, dass Telomere in der Peripherie von Zellkernen lokalisiert sind. Darüber hinaus zeigte die Verfolgung einzelner Telomerpositionen über einen Zeitraum von 30 Minuten die dynamischen Positionsänderungen der Telomere von bis zu $\pm 2 \mu\text{m}$ (Abbildungen 1c, d). Die erfolgreiche Ko-Lokalisierung von telomeren CRISPR-Signalen und Signalen, die vom Telomerbindeprotein TRB1 stammen, zeigte, dass diese Technik auch für DNA/Protein-Interaktionsstudien verwendet werden kann.

Um die Intensität der CRISPR-Signale zu verbessern, können unter anderem Aptamer-basierte Methoden einge-

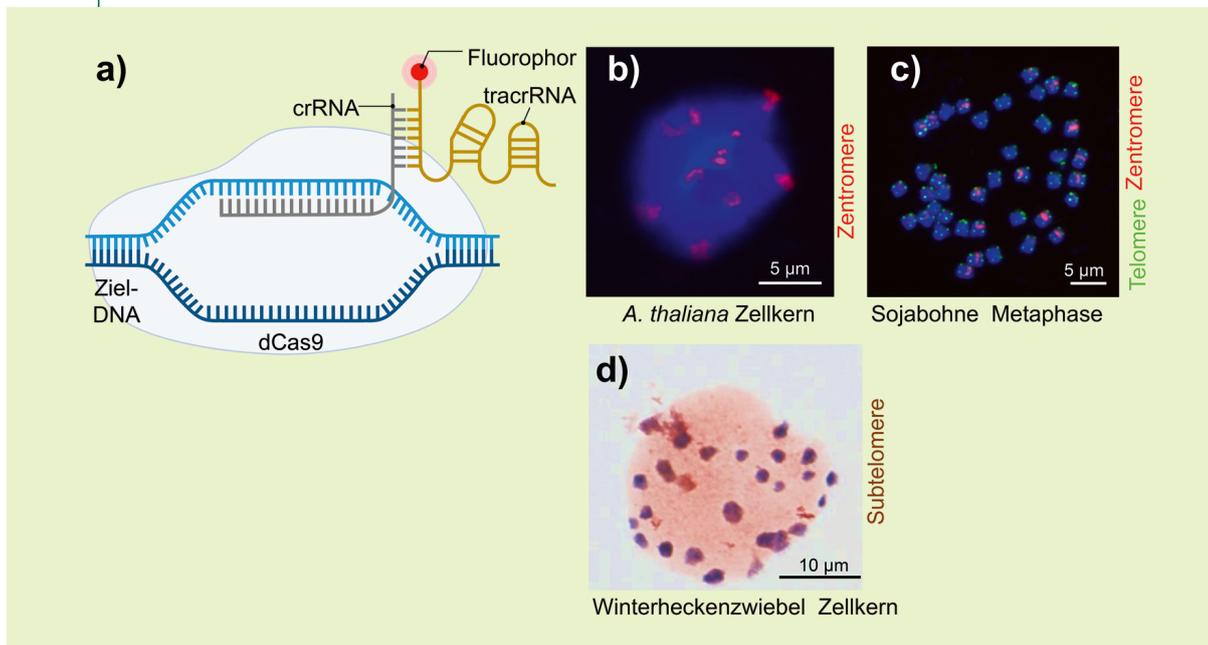
setzt werden. Aptamere sind kurze RNA-Sequenzen, die durch spezifische RNA-bindende Proteine, die mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert sind, nachgewiesen werden können (Abbildung 1b). Neben *Live Imaging* können Aptamere auch für die CRISPR-dCas9-basierte Genregulierung mit Effektorproteinen wie Transkriptionsaktivierungsdomänen, Acetyltransferase oder Methyltransferase verwendet werden. CRISPR *Live Imaging* kann bisher noch nicht für die spezifische Markierung von DNA-Sequenzen in stabil transformierten Pflanzen eingesetzt werden, was darauf hindeutet, dass eine dauerhafte Bindung des CRISPR-dCas9-Komplexes an seine Ziel-DNA die für die Pflanzenentwicklung erforderlichen Prozesse beeinträchtigt [6].

IN KÜRZE

- Mit CRISPR *Live Imaging* können **genomische Sequenzen in lebenden Zellen** fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.
- Auf diese Weise kann auch **die Dynamik** z. B. von Telomeren beobachtet werden.
- CRISPR-CID ist eine Variation, mit der DNA-Sequenzen **in fixiertem Material** in situ sichtbar gemacht werden.
- Die CRISPR-CID erfordert keine Fluoreszenzmikroskopie und ist **mit kommerziell erhältlichen Materialien** auch an Schulen durchführbar.

CRISPR-FISH ermöglicht die Markierung genomischer Sequenzen in fixierten Proben

Neben der Markierung von definierten genomischen Sequenzen in lebenden Zellen ermöglicht CRISPR-dCas9 auch den spezifischen Nachweis von DNA in fixierten Chromosomen und Zellkernen. Im Gegensatz zur klassischen *in-situ*-Hybridisierung erfordert die CRISPR-dCas9-vermittelte *in-situ*-Markierung - auch „CRISPR-FISH“ ge-

ABB. 2 | VISUALISIERUNG GENOMISCHER SEQUENZEN IN FIXIERTEN CHROMOSOMEN UND ZELLKERNEN


CRISPR-dCas9-Methoden zur Sichtbarmachung genomischer Sequenzen in fixierten Chromosomen und Zellkernen. CRISPR-FISH ist eine CRISPR-dCas9-Methode zur Fluoreszenzmarkierung genomischer Sequenzen. a) Rekombinantes dCas9-Protein wird mit fluoreszierenden *guide* RNAs (in Rot) assembliert und für die CRISPR-FISH eingesetzt. b) CRISPR-FISH-Markierung von Zentromeren (in Rot) im Zellkern (in Blau) von *Arabidopsis thaliana*. c) Die Verwendung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Leit-RNAs ermöglicht den Nachweis unterschiedlicher Sequenzen mit verschiedenen Farben. Die Leit-RNA besteht aus Ziel-spezifischer crRNA und fluoreszierender tracrRNA. Die Zentromere (in Rot) und Telomere (in Grün) der Sojabohnen-Chromosomen (in Blau) wurden markiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. d) CRISPR-CID-Nachweis von subtelomeren Sequenzen (in Braun) im Zellkern (in Rosa) der Winterheckenzwiebel. Durch die Verwendung von alkalischer Phosphatase oder Peroxidase-Enzymen wird der Einsatz von einem Standard-Durchlichtmikroskop zur Analyse CRISPR-CID markierter Zellkerne und Chromosomen ermöglicht.

nannt – keine Denaturierung der chromosomalen DNA und ermöglicht daher eine bessere Erhaltung der Chromatinstruktur (Abbildung 2a). Die Verwendung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Leit-RNAs (*guide* RNA oder gRNA) ermöglicht das *multiplexing* der CRISPR-FISH-Methode. Es können somit unterschiedliche Sequenzen mit verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops parallel nachgewiesen werden (Abbildungen 2b, c). Wichtig ist, dass die CRISPR-FISH-Reaktion bei einer Temperaturspanne von 4°C bis 37°C funktioniert und mit zusätzlichen Proteindetektions- und bildgebenden Methoden kombiniert werden kann [7, 8]. Ein weiterer Bonus ist, dass CRISPR-FISH die Echtzeit-visualisierung des CRISPR-dCas9-basierten DNA-Markierungsprozesses ermöglicht und somit die Kinetik der Reaktion mit aufzeigt. Derzeit ist die Verwendung von CRISPR-FISH auf repetitive DNA-Sequenzen beschränkt, welche beispielsweise oft in pflanzlichen Genomen gefunden werden.

CRISPR-CID ermöglicht den Einsatz von CRISPR-dCas9 in der Schule

Der fluoreszenzbasierte CRISPR-FISH-Nachweis von DNA-Sequenzen kann durch nicht-fluoreszenzbasierte

Methoden ersetzt werden. Dafür bietet sich der Einsatz der CRISPR-dCas9-vermittelten chromogenen *in-situ*-Detektion (CRISPR-CID) an. Die Detektion spezifischer Sequenzen in fixierten Chromosomen oder Zellkernen wird unter Verwendung von alkalischer Phosphatase oder Peroxidase-Enzymen und einem Standard-Durchlichtmikroskop möglich gemacht (Abbildung 2d). Diese Nachweismethode kann somit auch verwendet werden, um die Grundlagen von CRISPR-Cas9 in Bildungseinrichtungen praktisch zu demonstrieren, auch wenn kein teures Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung steht. Ein anderer wichtiger Vorteil ist, dass für die Durchführung der Experimente kein S1-Sicherheitslabor notwendig ist, da es sich um ein nicht-transgenes Verfahren handelt. Weiterhin sind alle für CRISPR-CID notwendigen Komponenten kommerziell verfügbar. Ein detailliertes Protokoll kann bei Interesse beim Korrespondenzautor angefordert werden.

Zusammenfassung

Enzymatisch inaktives dCas9 kann – mit entsprechenden gRNAs – eingesetzt werden, um spezifische Sequenzen in mikroskopischen Präparaten *in situ* anzufärben. Dazu kann dCas9 direkt mit GFP gekoppelt, die sgRNA mit einem Fluoro-

rophor beladen oder über ein Aptamer in der gRNA GFP gebunden werden. Ein großer Vorteil der Methodik ist, dass Beobachtungen *in vivo* vorgenommen werden und so auch die Dynamik der markierten Sequenzen im Zellkern beobachtet werden kann. Mit Hilfe von CID (chromogener *in situ*-Detektion) kann die Methode auch ohne teures Fluoreszenzmikroskop z. B. an Schulen durchgeführt werden.

Summary

Using CRISPR-dCas9-based methods in living and fixed plant cells: Making genomic sequences visible

Enzymatically inactive dCas9 can be used with corresponding gRNAs to stain specific sequences in microscopic preparations *in situ*. For this purpose, dCas9 can be coupled directly with GFP, the sgRNA can be loaded with a fluorophore or bound to GFP via an aptamer in the gRNA. A major advantage of the method is that observations can be made *in vivo* and thus the dynamics of the labelled sequences in the cell nucleus can also be observed. With the help of CID (chromogenic *in situ* detection), the method can also be carried out without an expensive fluorescence microscope, e. g. in schools.

Schlagnworte

Mikroskopie, *in situ*, *in vivo*, CRISPR Live Imaging, CRISPR-FISH, CRISPR-CID, Telomer, Zentromer, dCas9

Literatur

- [1] D. Dechyeva, T. Schmidt (2008). Wie FISht man Pflanzenchromosomen? *BIOspectrum* 14, 365–357.
- [2] L. S. Qi et al. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152 (5), 1173–1183, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- [3] B. Chen et al. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR-Cas system. *Cell* 155 (7), 1479–1491, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
- [4] S. C. Knight et al. (2018). Genomes in focus: Development and applications of CRISPR-Cas9 imaging technologies. *Angewandte Chemie-International Edition* 57 (16), 4329–4337, <https://doi.org/10.1002/anie.201709201>
- [5] S. Dreissig et al. (2017). Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements. *Plant J* 91 (4), 565–573, <https://doi.org/10.1111/tj.13601>
- [6] S. Khosravi et al. (2020). Application of aptamers improves CRISPR-based live imaging of plant telomeres. *Front Plant Sci* 11, 1254, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01254>
- [7] T. Ishii et al. (2019) RNA-guided endonuclease - *in situ* labelling (RGEN-ISL): a fast CRISPR-Cas9-based method to label genomic sequences in various species. *New Phytol* 222 (3), 1652–1661, <https://doi.org/10.1111/nph.15720>
- [8] B. P. Potlapalli et al. (2020). Application of Tris-HCl allows the specific labeling of regularly prepared chromosomes by CRISPR-FISH. *Cytogenet Genome Res* 160 (3), 156–165, <https://doi.org/10.1159/000506720>

Verfasst von:



Andreas Houben studierte von 1984 bis 1989 Pflanzenzüchtung und Saatgutproduktion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, wo er 1993 promovierte. Von 1993 bis 1995 war er Postdoktorand am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Ingo Schubert, und von 1996 bis 2001 an der Universität Adelaide, Australien, im Labor von Jeremy Timmis. Seit 2001 ist er Arbeitsgruppenleiter am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben.



Bhanu Prakash Potlapalli studierte von 2011 bis 2015 Gartenbauwissenschaften an der Dr. YSR Horticultural University, Hyderabad (Indien). Von 2017 bis 2020 absolvierte er einen Masterstudiengang in Nutzpflanzenwissenschaften an der Universität Hohenheim, Stuttgart. Von 2020 bis 2021 war er als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Chromosomenstruktur und -funktion am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben unter der Leitung von Andreas Houben tätig. Seit 2021 setzt er seine Arbeit als Doktorand in der gleichen Gruppe fort.



Solmaz Khosravi studierte von 2003 bis 2005 Biotechnologie an der Imam Khomeini International University, Qazvin (Iran). 2006 bis 2007 arbeitete sie für die iranische Biotechnologie-Gesellschaft. 2007–2017 war sie als Wissenschaftlerin am Forschungsinstitut für landwirtschaftliche Biotechnologie tätig. 2021 promovierte sie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Seit 2022 arbeitet sie als Postdoktorandin im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Andreas Houben.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Andreas Houben
Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben
Corrensstrasse 3
06466 Seeland
Email: houben@ipk-gatersleben.de

DIE DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR GENETIK

Profitieren Sie von einem vielfältigen, lebendigen Netzwerk im Bereich der Genetik!



WERDEN SIE MITGLIED!

<https://www.gfgenetik.de/mitgliedschaft/>

BECOME A MEMBER!

Netzwerke

Tagungen

Nachwuchsförderung

Doktorandenpreis

Den gesteinsbesiedelnden Pilzen auf der Spur CRISPR-Cas9 in der Materialforschung

JULIA SCHUMACHER



Knufia petricola auf Marmor. Foto: BAM.

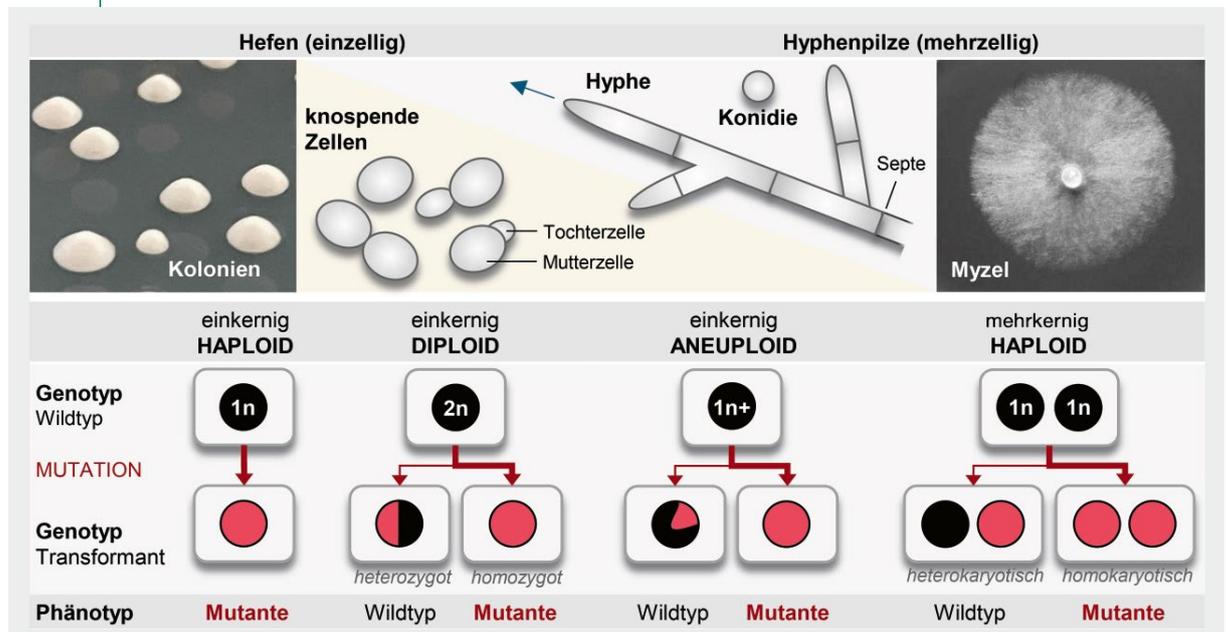
Das mikroskopische Leben auf exponierten Oberflächen ist genügsam und kooperativ. Gesteinsbesiedelnde schwarze Pilze, Grünalgen und Cyanobakterien unterstützen einander in der Eroberung von Felsen, Mauern, Denkmälern, Dächern, Fassaden und Sonnenkollektoren. Bedeutend sind die schwarzen Pilze als Gesteinszerstörer und Biofilmbildner. Ihre massiven Zellwände und ihr langsames Wachstum machen sie stresstolerant und fordern zugleich die experimentelle Forschung heraus. In der Materialforschung können Biofilme erwünscht oder unerwünscht sein. Biofilme auf Fassaden können das Innenstadtklima positiv beeinflussen, während sie auf einem Marmordenkmal unwillkommen sind. Ohne tieferes Verständnis der angepassten Mikroben ist weder ihre Bekämpfung noch ihre gezielte Förderung auf Materialien möglich. Hier treffen sich Genetik und Materialforschung: Die CRISPR-Cas9-Technologie ermöglicht es, die Genome der Pilze für funktionale Analysen zu editieren, um die Mechanismen der Materialbesiedlung und Materialschädigung zu entschlüsseln.

Pilze weisen eine erstaunliche Mannigfaltigkeit auf, angefangen bei ihrer Gestalt und Größe bis hin zu ihren Lebensräumen und Ernährungsstrategien. Dabei gibt es zwei grundlegende Wuchsformen (Abbildung 1): Hefen wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* sind Einzeller, die sich vegetativ durch Knospung vermehren, indem eine Mutterzelle eine Tochterzelle abschnürt, die schließlich zur vollen Größe heranwächst. Die Zellwände können miteinander verbunden bleiben, so dass Zellketten entstehen. Die entstehenden Kolonien ähneln denen von Bakterien. Andere Pilze hingegen wie z. B. *Botrytis cinerea* sind unkonventionelle Mehrzeller: Sie bilden langgestreckte Zellfäden (Hyphen) und ein verzweigtes Netzwerk (Myzel), durch das sich Organellen und Zellkerne frei bewegen können. Ein Myzel, das ausgehend von einer Spore wächst, stellt einen Organismus dar. Pilze können sich vegetativ (asexuell) und/oder sexuell fortpflanzen. Charakteristisch für die Schimmelpilze ist die Bildung asexueller Sporen (Konidien).

Pilzzellen können funktionierende Genkopien/Allele in unterschiedlicher Anzahl aufweisen. Viele Pilze besitzen einen einfachen Chromosomensatz (Haploidie), wodurch die Mutation eines Gens immer zu einem Phänotyp führt (sofern das Gen eine sichtbare Funktion aufweist). Es kommen aber auch Diploidie und Aneuploidie vor. Die unterschiedliche Anzahl von Genkopien kann mehrere Gründe haben wie zum Beispiel das Vorkommen von essenziellen und zusätzlichen Chromosomen, die ungleiche Verteilung der Chromosomen während der Mitose oder aber eine Genomduplikation gefolgt vom Verlust einzelner Genkopien. Ferner können die Hyphensegmente und Konidien der Hyphenpilze mehrere, ggf. auch unterschiedliche Zellkerne beinhalten, was den einfachen Chromosomensatz kompensiert und zu ihrer Anpassungsfähigkeit beiträgt. In jedem Fall, in dem es mehrere Genkopien/Allele gibt, wird die gentechnische Veränderung wie das Einfügen einer Mutation nicht direkt zur Merkmalsausprägung führen, so dass weitere Schritte für den Erhalt von homozygoten bzw. homokaryotischen Stämmen notwendig sind.

Die Nutzung der CRISPR-Cas9-Technologie in Pilzen hat – je nach Empfänger – verschiedene Vorteile [1]. Da in einem Schritt mehrere identische Genkopien/Allele mutiert werden können, ist es möglich, unmittelbar homozy-

ABB. 1 | MORPHOLOGIE UND GENETIK DER PILZE



Oben: Pilze haben zwei unterschiedliche Wuchsformen. Beispielhaft dargestellt sind hier Kolonien von *Saccharomyces cerevisiae* und vegetatives Myzel von *Botrytis cinerea*. Unten: Die Anzahl der funktionierenden Genkopien bestimmt den Phänotyp nach dem Einfügen einer Mutation in das Wildtyp-Genom. Die Verwendung der CRISPR-Cas9-Technologie verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des Mutanten-Phänotyps (dicke Pfeile).

gote bzw. homokaryotische Transformanten zu erzeugen. Davon unabhängig erhöhen Doppelstrangbrüche (DSB) die Editierungsfrequenzen durch die Aktivierung der endogenen DNA-Reparatursysteme. Die Zugabe von Donor-DNA mit einer Resistenzkassette für die Selektion ist vorteilhaft und erlaubt das Entfernen oder Inserieren von Sequenzen. Ferner können mehrere verschiedene Stellen im Genom gleichzeitig editiert werden.

Gesteinsbesiedelnde Pilze bilden kompakte schwarze Kolonien und sind extremotolerant

Die Besiedlung von exponierten Lebensräumen stellt eine besondere Herausforderung dar und erfordert häufig die Kooperation von verschiedenen Mikroorganismen [2]. Unabhängig vom Substrat sind die Mikroorganismen der Sonneneinstrahlung (UV-Strahlung), wechselnden Temperaturen und Feuchte ausgesetzt. Gesteinsoberflächen in kalten und heißen Wüsten sind extreme Lebensräume, in

denen zudem Nährstoffe rar sind. Verschiedene Vertreter der Schlauchpilze (Ascomyzeten) sind durch bestimmte morphologische und physiologische Eigenschaften an solche extremen Lebensräume angepasst. Dazu gehören einfache Entwicklungszyklen durch ausschließlich vegetative Vermehrung, also durch Zellteilung und Bildung mehrschichtiger, melanisierter Zellwände. Viele filamentöse Schlauchpilze bilden das schwarze 1,8-Dihydroxynaphthalin-(DHN)-Melanin und lagern es in die Wände von spezialisierten Infektions- oder Fortpflanzungsstrukturen ein. Im Gegensatz dazu bilden die sogenannten schwarzen Pilze – manchmal auch gesteinsbesiedelnde Pilze, mikrokoloniale Pilze oder schwarze Hefen genannt – fortwährend Melanin, das sie vor vielen abiotischen und biotischen Umweltfaktoren schützt, sie aber auch in ihrem Wachstum einschränkt [3]. Schließlich muss für die Abschnürung einer Tochterzelle die Melaninschicht wenigstens lokal aufgelöst werden. Alternativ bilden sich zwei Tochterzellen in der Mutterzelle, die durch Aufplatzen des Melaninpanzers entlassen werden (meristematisches Wachstum). Durch die Besiedlung von Gesteinen sind die schwarzen Pilze in der Bodenbildung involviert und für ihr Verwitterungspotenzial gegenüber weit verbreiteten Gesteinen wie Olivin bekannt [4, 5].

Diese Eigenschaften befähigen die schwarzen Pilze, menschengeschaffene Lebensräume – künstliche Wüsten wie Denkmäler, Gebäudefassaden, Dächer und Solaranlagen – zu besiedeln. Biofilme auf diesen Oberflächen sind mikrobielle Gemeinschaften aus schwarzen Pilzen, Bakterien und Grünalgen (Abbildung 2) und führen zur Ver-

IN KÜRZE

- **Gesteinsbesiedelnde schwarze Pilze** sind Bestandteil von grau-grünen Biofilmen.
- Schwarze Pilze sind vielfältig und in ähnlicher Weise **an extreme Umweltbedingungen angepasst**.
- Das langsame Wachstum und die massiven Zellwände der schwarzen Pilze **erschweren molekularbiologische und gentechnische Verfahren**.
- Mithilfe der **CRISPR-Cas9-Technologie** ist es jetzt möglich, die Genome schwarzer Pilze zu editieren.
- Aufgrund der zur Verfügung stehenden Methoden ist *Knufia petricola* ein **geeignetes Modell** für materialbesiedelnde Pilze.

färbung heller Oberflächen, Veränderung der Materialien und zur Reduzierung der Effizienz von Solaranlagen. Dabei tragen die Pilze zu der Verankerung des Biofilms bei und schützen die anderen Mikroorganismen durch ihre Melanisierung vor übermäßiger Lichteinstrahlung. Die schwarzen Pilze weisen mit zahlreichen Vertretern in den Klassen Arthoniomyzeten, Eurotiomyzeten und Dothideomyzeten eine außerordentliche Diversität auf, die aufgrund ihres ähnlichen Aussehens (Konvergenz) lange unterschätzt wurde. Ein laufendes Gemeinschaftsprojekt adressiert diese Wissenslücke, indem die Genome von ca. 100 bisher unbekannt Pilzen aus verschiedenen extremen Lebensräumen sequenziert werden [6] (<https://stresblackfungi.org/>). Unser Beitrag dazu sind 15 neue Arten, die von Solaranlagen in den USA und Deutschland isoliert wurden.

Etablierung von *Knufia petricola* als Modell für materialbesiedelnde Pilze

Knufia petricola (ehemals *Sarcinomyces petricola*, siehe Aufmacherbild) und andere *Knufia*-Arten wurden als Besiedler und Zersetzer von antikem Marmor im Mittelmeerraum ausgemacht [7-9]. Wurde zunächst angenommen, dass diese Vertreter sich eher in warmen Gebieten aufhalten, haben kürzlich Studien in der Antarktis gezeigt, dass sie auch Gesteine in Kaltwüsten besiedeln [10], was ihren extremotoleranten Charakter unterstreicht und auf eine weltweite Verbreitung hindeutet. Der *K. petricola*-Stamm A95 wurde in den 1990er Jahren von Anna A. Gorbushina von einer Marmoroberfläche in Athen, Griechenland, isoliert und aufgrund seines moderaten Wachstums und der einfacheren Handhabung im Vergleich zu anderen isolierten schwarzen Pilzen als Modell ausgewählt [3]. *K. petri-*

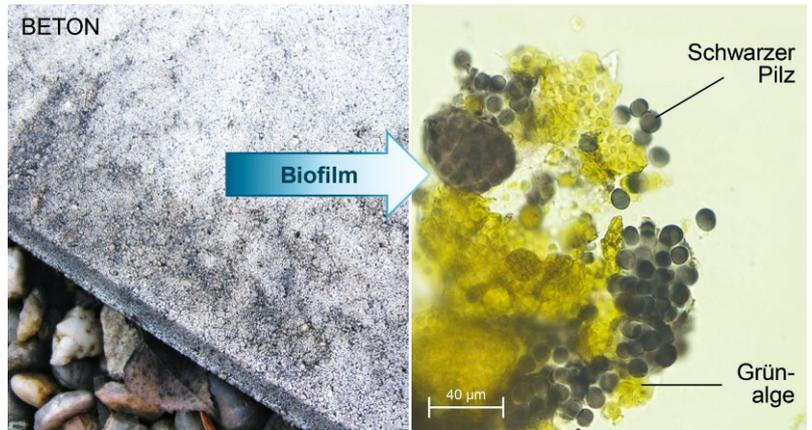
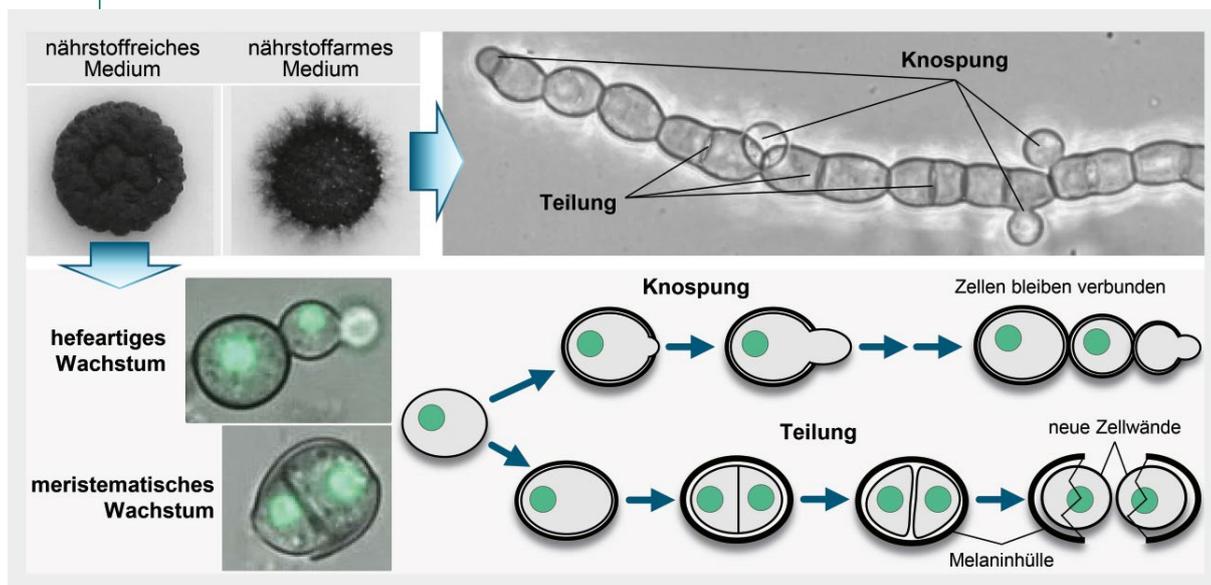


ABB. 2 Ein Biofilm mit schwarzen Pilzen und Grünalgen. Fotos: Pedro M. Martin-Sanchez.

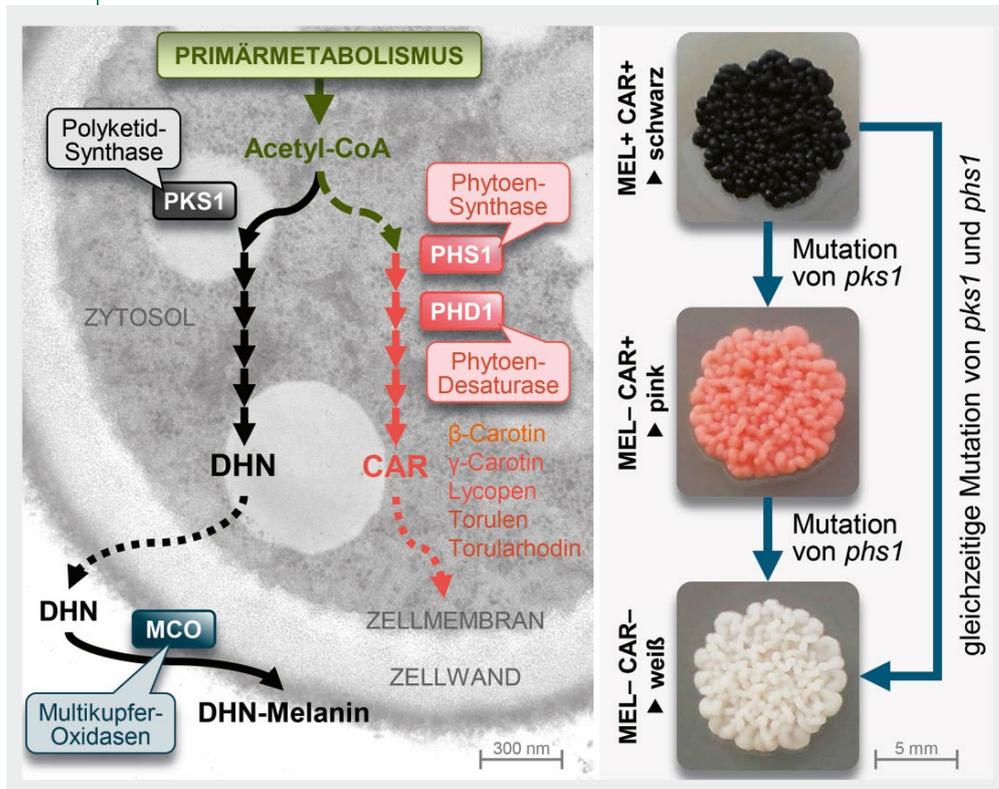
cola zeigt in Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt des Mediums unterschiedliche Wachstumsformen (Abbildung 3). So basiert das schnellere Wachstum und die Bildung kompakter Kolonien auf nährstoffreichem Medium überwiegend auf der hefeartigen Teilung, die zu miteinander verbundenen Zellketten führt. Aber auch meristematisches Wachstum tritt auf – vermutlich der bevorzugte Teilungsmodus für ältere, stärker melanierte Zellen. Auf Wasseragar bilden die Zellen Pseudohyphen als Ergebnis hefeartiger und meristematischer Teilungen. *K. petricola* weist die weiteren Charakteristika der schwarzen Pilze auf, darunter die Bildung mehrschichtiger Zellwände und schützender Metabolite wie DHN-Melanin, Carotinoide, Mycosporine und extrazelluläre Polysaccharide (EPS). Die Vorstufe des schwarzen Melanins, 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN),

ABB. 3 | MORPHOLOGISCHE EINFACHHEIT DER SCHWARZEN PILZE



***Knufia petricola* vermehrt sich durch hefeartiges oder meristematisches Wachstum. Zellkerne sind durch Expression eines Fusionsproteins aus einem Histon und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) grün markiert.** Fotos: Oliver Voigt, Schema nach [8].

ABB. 4 | PIGMENTE VON *K. PETRICOLA*



***K. petricola* produziert zwei charakteristische Pigmente. 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN) wird in der äußeren Zellwand zu DHN-Melanin polymerisiert. Die Carotinoide (CAR) werden in die Membranen eingelagert. Die Mutation der Schlüsselenzym-kodierenden Gene *pks1* und *phs1* führt zum Verlust der Pigmente.** Aufnahme links: Polina Demytyeva [11].

wird in der Zelle produziert, sekretiert und außerhalb der Zelle polymerisiert [11] (Abbildung 4). Typisch für *K. petricola* ist die stetige Bildung rötlicher Carotinoide – in anderen Pilzen entstehen diese nur in Gegenwart von Licht –, die zu einer intensiven pinken Pigmentierung nicht-melanisierter Kolonien führt [12]. Die Carotinoide werden in die Membranen eingelagert und tragen damit vermutlich zur Aufrechterhaltung der Fluidität der Membranen bei wechselnden Temperaturen bei.

Das Genom von *K. petricola* ist mit einer Größe von 28,1 Mb und ca. 10.000 Genen sehr kompakt (Heeger et al., nicht veröffentlicht). Es enthält die konservierten Gene für die Synthese der Sekundärmetabolite DHN-Melanin, Carotinoide und eines mutmaßlichen Siderophors. Darüber hinaus sind keine Gene für die Synthese von (toxischen) Sekundärmetaboliten enthalten. Diese Beobachtung passt zu der Annahme, dass *K. petricola* in seiner natürlichen Umgebung nicht in Konkurrenz mit schneller wachsenden Mikroorganismen steht und mit anderen extremotoleranten Arten in Biofilmen koexistiert oder aber in einer symbiotischen Beziehung lebt. Bemerkenswert ist die Zahl von Genen, die für lichtabsorbierende Proteine (Photorezeptoren) kodieren [13]. Demnach könnte *K. petricola* die Fähigkeit besitzen, UV-A- und Infrarot-Strahlung sowie blaues, grünes und rotes Licht wahrzunehmen und

für die Steuerung des Metabolismus, einer inneren Uhr und die Interaktion mit phototrophen Mikroorganismen zu nutzen.

Wie die Anfärbung von Zellkernen und die Genomsequenzanalyse gezeigt haben, besitzen die Zellen von *K. petricola* je einen Zellkern mit einem einfachen Chromosomensatz. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, dass Mutationen – sofern sie eingefügt werden können – zu sichtbaren Phänotypen führen.

K. petricola in den frühen Jahren – aller Anfang ist schwer

Kreativität und Ausdauer sind immer gefragt, wenn es um die Entwicklung neuer Methoden geht. Im Falle der schwarzen Pilze ist ferner viel Geduld erforderlich, denn abhängig von der Wachstumsrate des Forschungsobjekts müssen Wochen oder Monate vergehen, um genügend Biomasse zu erhalten bzw. um zu sehen, ob ein experimenteller Ansatz erfolgreich war. Neben dem langsamen Wachstum stellt das Melanin – auch als Verunreinigung – in vielen molekularbiologischen Methoden ein Problem dar.

Melanisierte Zellen bilden kompakte Kolonien und sind gut geschützt vor lysierenden Agenzien, so dass besondere (mechanische) Maßnahmen erforderlich sind, um Zellen zu trennen oder aufzuschließen. In beiden Fällen ist dennoch Feingefühl gefragt, da Zellen und Makromoleküle auch ungewollt geschädigt werden können. Daher stellen vermeintlich einfache Methoden wie die Extraktion von melaninfreier und hochmolekularer DNA für Genomsequenzierungen und diagnostischen Anwendungen schon eine Herausforderung dar. Diese wurde inzwischen für *K. petricola* gemeistert, und die gewonnenen Erfahrungen helfen bei der Übertragung auf andere schwarze Pilze. Aufgrund dieser technischen Schwierigkeiten ist bisher jedoch nicht viel über die Biologie der schwarzen Pilze bekannt.

Die größte Hürde für die Einschleusung von rekombinanter DNA (Transformation) in Pilze ist die Zellwand, die eine unterschiedliche Beschaffenheit in verschiedenen Arten aber auch in verschiedenen Zelltypen einer Art haben kann. Die wichtigste Methode stellt die Transformation von Protoplasten dar, da diese fast universell einsetzbar ist. Kritisch ist allerdings die Herstellung der Protoplasten, da nur wenige lytische Enzyme verfügbar sind, die die Zellwände verschiedener Pilze unterschiedlich gut abbauen. Sofern möglich wird junges vegetatives Myzel,

das kein Melanin oder andere Pigmente enthält, für die Zellwandlyse genutzt. Diese Möglichkeit gibt es für die schwarzen Pilze jedoch nicht. Die Parameter wurden für *K. petricola* so weit optimiert, dass Protoplasten – wenn auch nur sehr wenige – nach einer sehr langen Inkubation mit zellwandlytischen Enzymen (16 Stunden im Vergleich zu 1–2 Stunden bei nichtmelaniserten Myzelien filamentöser Pilze) erhalten werden können. Auch die Anreicherung bzw. Trennung der Protoplasten von den nicht-lysierten Zellen ist aufgrund der gleichen Größe schwierig, so dass die Protoplastensuspensionen immer noch melanisierte Zellen in unterschiedlichen Anteilen enthalten. Daher muss für die Selektion auf eine durch die Donor-DNA vermittelte Resistenz der entsprechende selektive Wirkstoff in ausreichend hoher Menge eingesetzt werden. Die erste erfolgreiche Transformation von Protoplasten führte durch ektopische (ungerichtete) Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette zu Transformanten, die in Gegenwart von Hygromycin wachsen konnten [14] (Abbildung 5). Darauf aufbauend wurde das Protokoll weiter optimiert, *nat1*/Nourseothricin als zweites Selektionsmarkersystem implementiert und Expressionskassetten für rot- und grünfluoreszierende Proteine (RFP, GFP) ektopisch in das Genom von *K. petricola* integriert. Hierdurch wurde demonstriert, dass die Detektion von RFP- und GFP-Fluoreszenz trotz der stark melanisierten Zellwände möglich ist [15].

... und dann kam die CRISPR-Cas9-Technologie und veränderte die Welt ...

Die Möglichkeit *K. petricola* zu transformieren, erlaubte die Implementierung der CRISPR-Cas9-Technologie für die effiziente gerichtete Genomeditierung. Weil neben DNA auch Proteine in Protoplasten eingeschleust werden können, sind zwei Strategien für die transiente Bereitstellung der notwendigen Komponenten – zielspezifische sgRNA (*single guide-RNA*) und Cas9 – möglich (Abbildung 6):

(i) die *in-vitro*-Synthese der zielspezifischen sgRNA, die Assemblierung mit dem aufgereinigtem Cas9 und die Zugabe des Ribonukleoproteins (RNP) mit einer Donor-DNA zu den Protoplasten,

(ii) die Klonierung eines Plasmids mit Kassetten für die Expression der zielspezifischen sgRNA und Cas9 und die Zugabe des zirkulären Plasmids mit einer Donor-DNA zu den Protoplasten für die *in-vivo*-Assemblierung des RNP. Für den *in-vivo*-Ansatz werden Plasmide genutzt, die von Mortensen & Kollegen ursprünglich für die Verwendung in *Aspergillus*-Arten konzipiert wurden [16, 17].

Für die Etablierung neuer gentechnischer Methoden eignen sich besonders gut Gene, deren Verlust zu einem sichtbaren Phänotyp führt. Bei *K. petricola* sind es die Gene, die die Schlüsselenzyme für die Synthese von DHN-Melanin (*pkc1*) und den Carotinoiden (*pbs1*) kodieren. Als erstes wurden die Effizienzen für die Deletion von *pkc1* über Austausch gegen eine Resistenzkassette mit der herkömmlichen Methode und der CRISPR-Cas9-assistierten

Strategie verglichen (Abbildung 7). Hierfür bestand die Donor-DNA aus einer Resistenzkassette, die von unterschiedlich langen 5'- und 3'-nichtkodierenden Sequenzen von *pkc1* flankiert wurde. Aufgrund der kompakten und verschieden pigmentierten Kolonien auf den Transformationsplatten konnten die Effizienzen (KO-Raten) durch das Auszählen der schwarzen und pinken Kolonien ermittelt werden. Die Ergebnisse demonstrieren sehr gut den Effekt der CRISPR-Cas9-vermittelten DSB in Schlauchpilzen.

Im Falle eines DSB im Zielgen (hier *pkc1*) kann dieser durch homologe Rekombination (HR) unter Verwendung der bereitgestellten Donor-DNA (Resistenzkassette mit homologen Sequenzen) wieder geschlossen werden, wodurch das Zielgen gegen die Resistenzkassette ausgetauscht wird. Da durch das zielgerichtete Cas9 immer ein

ABB. 5 | TRANSFORMATION VON *K. PETRICOLA*-PROTOPLASTEN

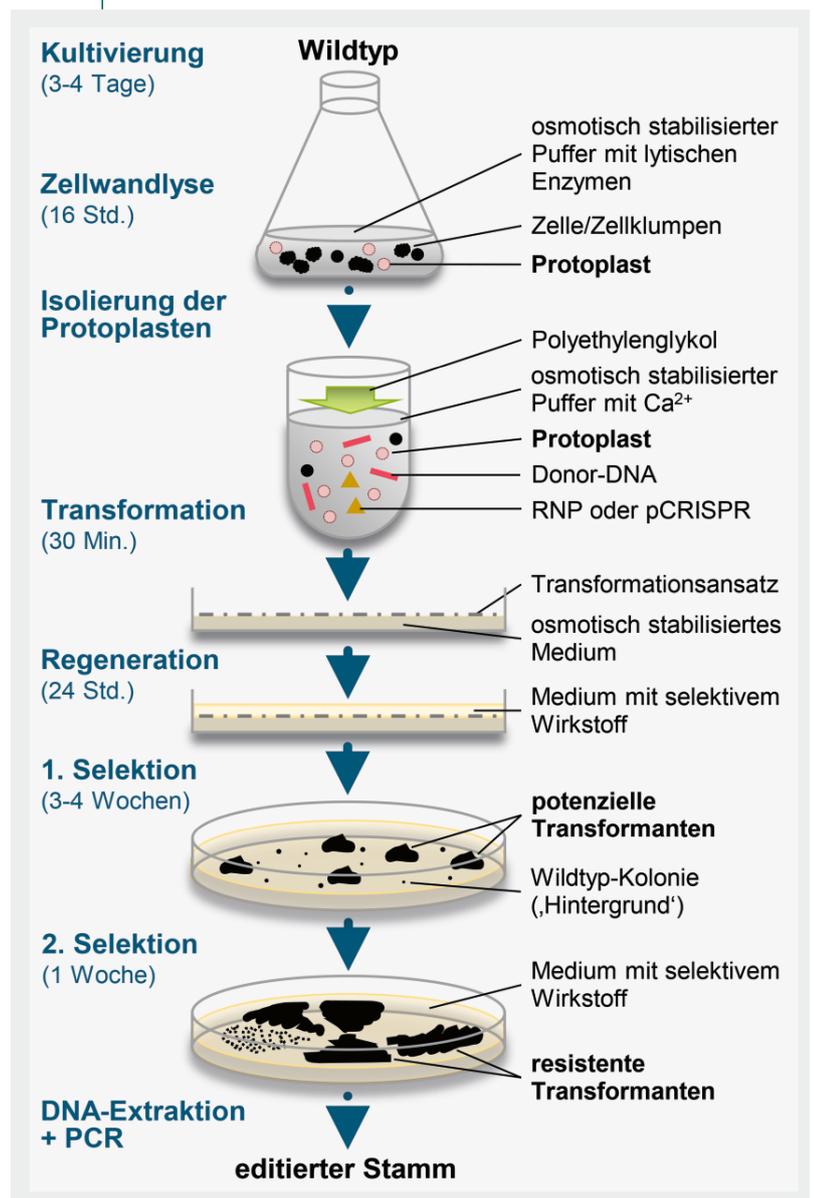
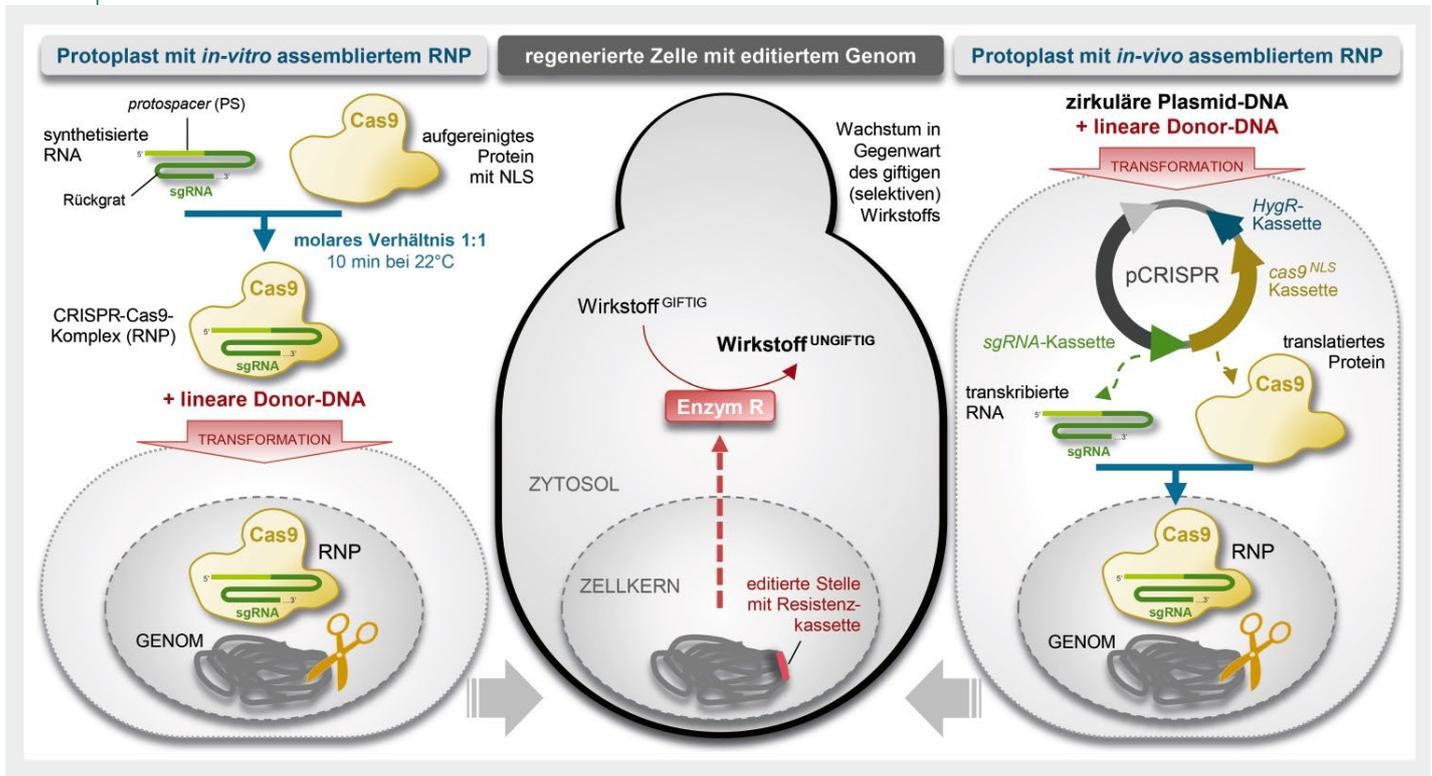


ABB. 6 | STRATEGIEN FÜR TRANSIENTES CRISPR-CAS9 BEI *K. PETRICOLA*



Protoplasten werden mit Donor-DNA für das Erzielen des gewünschten Rekombinationsereignisses sowie mit einem *in vitro* assemblierten Ribonukleoprotein (RNP) oder mit einem zirkulären Plasmid für die Expression von *cas9* und zielspezifischer *sgRNA* transformiert. Die Donor-DNA enthält eine Resistenzkassette (R) für die Selektion transformierter Zellen. Von einem Plasmid können gleichzeitig mehrere *sgRNAs* exprimiert werden (*multiplexing*), und eine transiente Selektion durch die kodierte Hygromycin-Resistenz (HygR) ist möglich. NLS (englisch: *nuclear localization signal*): Kernlokalisierungssequenz aus Simian-Virus 40.

DSB erzeugt wird, fällt die HR-Rate höher aus. Ohne CRISPR-Cas9 wird die Donor-DNA überwiegend über den Reparaturmechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) ektopisch in das Genom integriert, wodurch zwar resistente Transformanten erhalten werden, aber das Zielgen weiterhin vorhanden ist. Für den herkömmlichen Ansatz werden lange homologe Sequenzen benötigt, die in einem Klonierungsvektor mit einer Resistenzkassette fusioniert werden müssen. Resistenzkassetten mit kurzen homologen Sequenzen können dagegen klonierungsfrei in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern mit 5'-Überhängen hergestellt werden. In der Tat waren beide CRISPR-Cas9-Strategien, *in-vitro*- vs. *in-vivo*-Assemblierung, gleichermaßen effizient im Zusammenspiel mit beiden Arten von Donor-DNA, da sie fast ausschließlich pinkfarbene, d. h. $\Delta pks1$ -Transformanten hervorbrachten. Demgegenüber stehen fünf Prozent und null Prozent für die herkömmliche Methode mit langen und kurzen homologen Sequenzen.

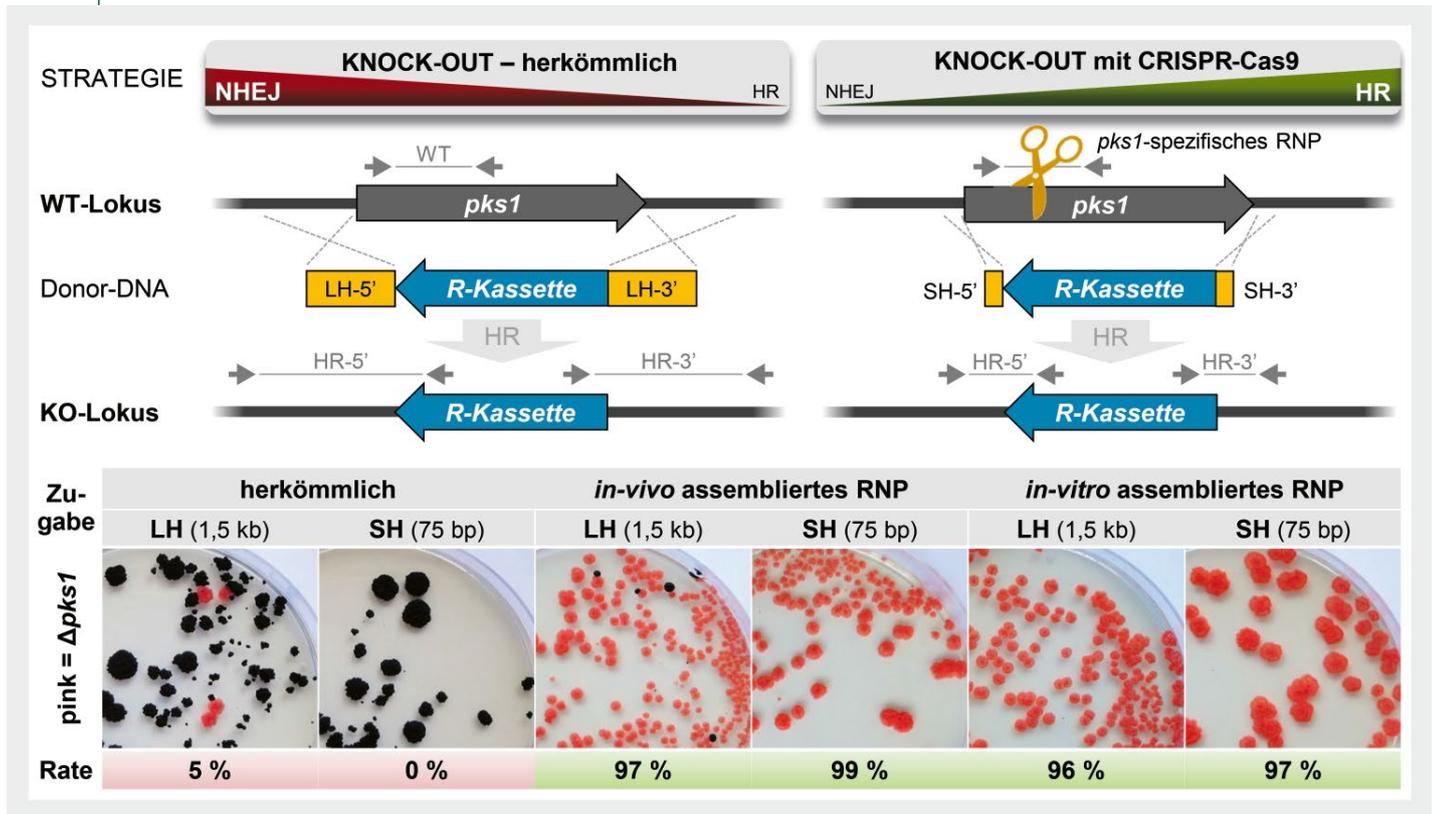
Mit beiden CRISPR-Cas9-Strategien konnten ferner durch die Transformation von Wildtyp-Protoplasten mit zwei *sgRNAs* für DSBs in *pks1* und *pbs1* und entsprechender Donor-DNA - d. h. zwei verschiedene Resistenzkasset-

ten flankiert von *pks1* bzw. *pbs1* Sequenzen - weiße Transformanten durch die gleichzeitige Deletion von *pks1* und *pbs1* erzeugt werden [15, 18]. Die Funktionalität beider Strategien, *in vitro* und *in vivo*, demonstriert ferner, dass Cas9 in beiden Fällen aufgrund der angehängten Kernlokalisierungssequenzen in den Zellkern von *K. petricola* gelangt und kurze homologe Sequenzen bereits ausreichend für maximale Geneditierungseffizienzen sind. Das Plasmid für die Expression von *sgRNA* und Cas9 hat nur eine kurze Halbwertszeit in *K. petricola* (keine Replikation), so dass es schon in den Transformanten nicht mehr nachweisbar ist. Das zeigt gleichzeitig, dass das Plasmid nicht in das Genom von *K. petricola* integriert, was zu schnell wachsenden Hygromycin-resistenten Transformanten führen würde.

K. petricola heute – ein gut gefüllter Werkzeugkasten für funktionale Analysen

Die Verfügbarkeit von gleich zwei Strategien für transientes CRISPR-Cas9 eröffnet Perspektiven, und die jeweils einfachere und kostengünstigere Strategie kann verfolgt werden. Die Verwendung von *in vitro* hergestellten RNPs ist zu bevorzugen, um Klonierungen zu umgehen. Die Nutzung von Plasmiden ist für häufig genutzte Zielgene

ABB. 7 | ENTFERNUNG VON ABSCHNITTEN AUS DEM GENOM VON *K. PETRICOLA* (KNOCK-OUT)



Herkömmlicher Ansatz und CRISPR-Cas9-assistierte Ansätze unter Verwendung von Donor-DNA mit langen (LH = *long homologous*) und kurzen homologen (SH = *short homologous*) Sequenzen für den Knock-out (KO) von *pks1*. Infolge eines Doppelstrangbruchs in *pks1* – zufällig oder durch ein *pks1*-spezifisches RNP hervorgerufen – wird *pks1* aufgrund einer homologen Rekombination (HR) gegen die Resistenzkassette (R-Kassette) ausgetauscht. Primerpaare für den Nachweis des KO (HR-5' und HR-3') und die Abwesenheit des Zielgens (WT) sind als graue Pfeile eingezeichnet. Angegeben sind die KO-Raten (pinke Kolonien/alle Kolonien). NHEJ (englisch: *non-homologous end-joining*): nicht-homologe Endverknüpfung. Nach [15].

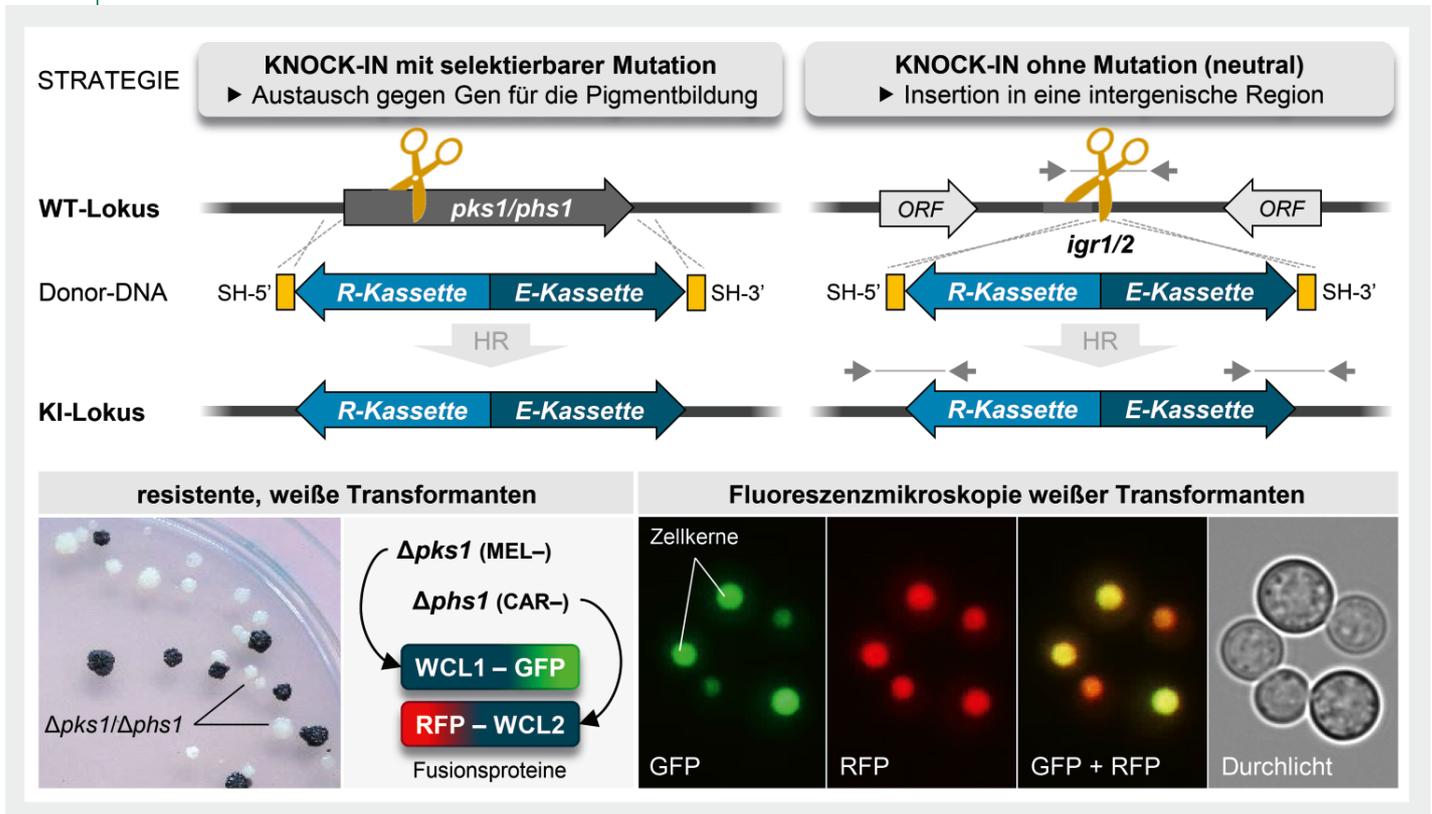
vorteilhaft, weil Plasmid-DNA kostengünstig hergestellt und einfach gelagert werden kann. Ferner ermöglicht die Expression von zwei oder mehreren sgrNAs von einem Plasmid die gleichzeitige Editierung verschiedener Stellen im Genom (*multiplexing*). Dafür wurden weitere Selektionssysteme implementiert, so dass insgesamt fünf Resistenzkassetten für *K. petricola* zur Verfügung stehen.

Im Zuge unserer Arbeiten konnten wir die Strategien für die gleichzeitige Mutation mehrerer Gene durch die Anpassung der Donor-DNA steigern. Die Zugabe eines synthetisierten einzelsträngigen DNA-Oligonukleotids, zusammengesetzt aus je 50 Nukleotiden einer homologen Sequenz zu den 5' und 3' nichtkodierenden Bereichen des Zielgens, reicht für die HR aus. Als Folge wird der kodierende Bereich des Zielgens entfernt. Über die Expression mehrerer, zielgerichteter Cas9 von einem Plasmid und die Zugabe einer Donor-DNA mit einer Resistenzkassette sowie DNA-Oligonukleotiden für alle weiteren Gene (entsprechend der zugegebenen sgrNAs) können mehrere Gene deletiert werden. Bisher wurden mit dieser Strategie vier Gene in einem Schritt ausgeschaltet, in einer zweiten Runde wurden in der Vierfachmutante weitere vier Gene

ausgeschaltet, wodurch die ersten *K. petricola*-Stämme mit acht KOs vorliegen.

Neben der Ausschaltung von Genen für die Identifizierung ihrer Funktionen im Organismus ist die Genexpression eine weitere wichtige Methode. So kann über die Expression eines fluoreszierenden Fusionsproteins die Lokalisierung eines Genprodukts ermittelt werden. Ferner kann getestet werden, ob unveränderte/veränderte Gene oder Gene aus anderen Organismen funktional sind. Herkömmlich wurden – wegen unzureichender HR-Raten in den meisten Pilzen – Expressionskonstrukte bestehend aus Resistenz- und Expressionskassette durch ektopische Integration in die Genome eingebracht. Dieses ermöglichte in vielen Fällen die Expression des gewünschten Gens, aber je nach Integrationsort im Genom konnten die Gene unterschiedlich stark exprimiert werden. Im schlimmsten Fall erfolgte die Integration in einen kodierenden Bereich und führte damit zur Unterbrechung eines Gens. Unter Verwendung der CRISPR-Cas9-Technologie können nun Expressionskonstrukte gezielt in das Genom inseriert werden, womit genetisch identische Transformanten erzeugt werden und vergleichende Expressionsstudien vereinfacht

ABB. 8 | GEZIELTE INSERTION VON KONSTRUKTEN IN DAS GENOM VON *K. PETRICOLA* (KNOCK-IN)



Oben: Expressionskassetten (E-Kassette) mit fremden oder eigenen Genen können in unterschiedlicher Weise in das Genom von *K. petricola* inseriert werden. Unten: Schwarz-Weiß-Selektion von Transformanten für die Lokalisierung von zwei kernlokalisierten Proteinen (WCL1, WCL2) durch die Fusion mit GFP oder RFP. Da nur der Austausch beider Pigmentgene gegen die Expressionskonstrukte zu weißen Transformanten führt, können diese direkt für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. KI: Knock-in. Nach [18].

werden. Für *K. petricola* stehen verschiedene Möglichkeiten für den Knock-in (KI) von Expressionskonstrukten zur Verfügung (Abbildung 8). Der Austausch eines Pigmentgens (*pks1* → Schwarz-Pink-Selektion) oder beider Pigmentgene (*pks1 + phs1* → Schwarz-Weiß-Selektion) im Wildstamm ermöglicht die Detektion erfolgreicher Integrationsereignisse aufgrund einer veränderten Pigmentierung und ist vorteilhaft für Lokalisierungs- oder Promoterstudien, für die oftmals viele verschiedene Konstrukte untersucht werden müssen. Für die neutrale Insertion in das Genom, d. h. ohne dass andere Gene beeinträchtigt werden, wurden verschiedene intergenische Regionen experimentell als geeignete Insertionsstellen validiert. Die Insertion selbst führt nachweislich zu keinem veränderten Phänotyp, da keine Sequenzen entfernt oder unterbrochen werden, so dass mögliche Phänotypen der Expressionsstämme nur auf den inserierten Genen beruhen [18]. Unter Nutzung eines Plasmids für die Expression von Cas9 und mehrerer sgRNAs und entsprechenden Donor-DNAs (ggf. auch ohne Resistenzkassette) können ebenfalls gleichzeitig mehrere Expressionskonstrukte in das Genom von *K. petricola* eingeführt werden. Ferner ist es durch Nutzung des viralen 2A-Peptids und des synthetischen Tet-On-

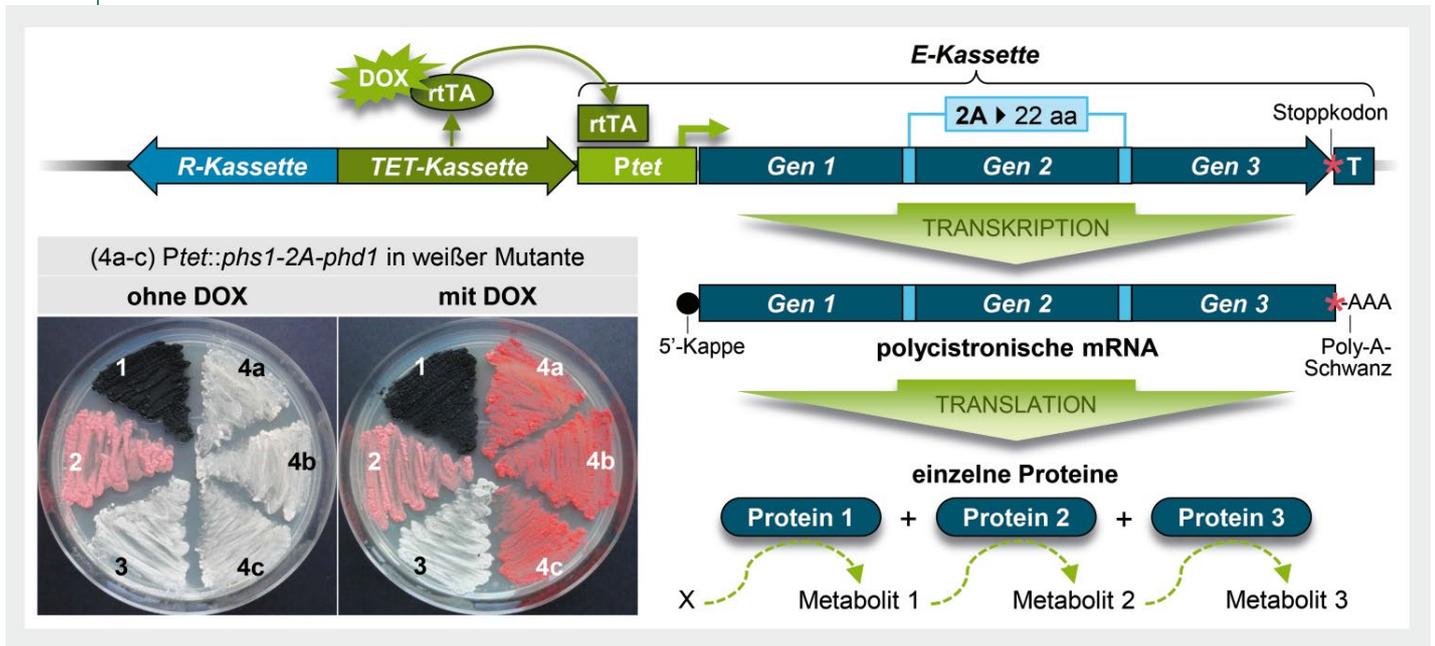
Regulationssystems möglich, mehrere Gene von einem Konstrukt in einem Genlokus kontrolliert durch Zugabe des Induktors Doxycyclin zu exprimieren [19] (Abbildung 9).

Die Zukunft – vom Stein auf (neue) Materialien, in den Fermenter oder ins All?

Mit den genannten Techniken ist es möglich, das Genom von *K. petricola* gezielt zu editieren, um Fragestellungen der Biologie der gesteinsbesiedelnden Pilze, der Biofilmbildung in urbanen Räumen, der CO₂-bindenden Technologien wie Gesteinsverwitterung und der Schädigung von Materialien zu adressieren. Dazu können Modellbiofilme, die *K. petricola* und Cyanobakterien und/oder Grünalgen in unterschiedlichen Anteilen enthalten, genutzt werden. Mit Hilfe des *K. petricola*-Modells können auch Fragen zu den bislang wenig erforschten verwandten humanpathogenen schwarzen Pilzen beantwortet werden.

Gleichzeitig machen die vorhandenen Techniken sowie seine intrinsischen Eigenschaften *K. petricola* zu einem geeigneten eukaryotischen Expressionssystem für die Produktion von Sekundärmetaboliten und (sekretier-

ABB. 9 | REGULIERBARE EXPRESSION VON EINEM ODER MEHREREN GENEN IN *K. PETRICOLA*



Das Tet-On-System enthält zwei Komponenten: eine Kassette für die stetige Expression des Transaktivators rtTA (TET) und einen rtTA-abhängigen Promoter (Ptet). rtTA verändert durch die Bindung von Doxycyclin (DOX) seine Konformation und aktiviert Ptet, wodurch das stromabwärts gelegene Gen transkribiert wird. Durch das virale 2A-Motiv können zwei oder mehr Gene fusioniert werden. Links unten: ein Beispiel für die Nutzung der Technik in *K. petricola*. Ein Tet-On-Konstrukt für die Carotinoid-Gene *phs1* und *phd1* wurde in eine weiße Mutante (3 – $\Delta pks1/\Delta phs1-phd1$) eingebracht. Die entstandenen Stämme (4a-c) überproduzieren Carotinoide bei Zugabe des Induktors DOX. 1: Wildtyp, 2: $\Delta pks1$. T: Terminator. Abb. nach [19].

ten) Proteinen. Durch den Austausch der Pigmentgene gegen Expressionskonstrukte entstehen weiße, einzeln wachsende Hefezellen, die Acetyl-CoA akkumulieren, das für andere Synthesen genutzt werden kann. Darüber hinaus besitzt der Pilz keine Gene für die Bildung weiterer unerwünschter Sekundärmetabolite oder sekretierter zellwandabbauender Enzyme, kann aber im Gegensatz zu der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* die Belastung durch konstitutive Sekundärmetabolitsynthese und Proteinsekretion tragen.

Außerdem sind die gewonnenen Erfahrungen und Protokolle nützlich für die Etablierung der gezielten Genomeditierung in anderen, bisher schwer zugänglichen Pilzen. In unserem Labor haben wir die Herausforderung angenommen, den womöglich stresstolerantesten eukaryotischen Organismus, *Cryomyces antarcticus*, genetisch zu manipulieren. *C. antarcticus* besiedelt Steine in der Antarktis und ist an niedrige Temperaturen und starke UV-Strahlung angepasst [20]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird er seit langem als Testorganismus in der astrobiologischen Forschung verwendet, um die Grenzen des Lebens unter extremen (Mars-ähnlichen) Bedingungen zu untersuchen [21]. Der Pilz wächst außerordentlich langsam – ausschließlich durch meristematische Zellteilungen –, so dass die Bildung einer Kolonie von der Größe eines Stecknadelkopfs mehr als einen Monat dauert. Folglich benötigt die Prozedur von der Produktion von Bio-

masse für die Herstellung von Protoplasten bis hin zur genotypischen Analyse 9–10 Monate. Schließlich konnten nichtmelanierte Mutanten erzeugt werden, die nun für funktionelle Untersuchungen verwendet werden [22]. Damit wurde einmal mehr die Bedeutung der CRISPR-Cas9-Technologie in Pilzen demonstriert. Denn das Genom von *C. antarcticus* enthält überwiegend Gene in zwei Kopien, wobei bis heute nicht geklärt ist, ob das Genom diploid oder aneuploid aufgrund einer Genduplikation und sukzessiven Genverlusts ist.

Zusammenfassung

Gesteinsbesiedelnde schwarze Pilze sind an das raue Leben auf Steinen in Wüsten angepasst und setzen Mineralien aus den Gesteinen frei. Die gleichen Anpassungen befähigen diese Pilze menschengeschaffene Oberflächen wie Denkmäler, Gebäudefassaden und Solaranlagen zu besiedeln. Dabei sind die schwarzen Pilze oft mit phototrophen Mikroorganismen vergesellschaftet. Das langsame Wachstum und die melanisierten Zellwände, die die Pilze vor extremen Umwelteinflüssen schützen, erschweren molekularbiologische und gentechnische Verfahren, wodurch bisher kaum etwas über die Biologie dieser Pilze bekannt ist. Der Vertreter *Knufia petricola* wurde ausgewählt, um mithilfe adaptierter Methoden wie der CRISPR-Cas9-vermittelten Genomeditierung, die Prozesse der Materialbesiedlung und -schädigung zu verstehen.

Summary

CRISPR-Cas9 in material research

Rock-inhabiting black fungi are adapted to the harsh life on rocks in deserts and release minerals from the rocks. The same adaptations enable these fungi to colonize man-made surfaces such as monuments, building facades and solar systems. Black fungi are often associated with phototrophic microorganisms. The slow growth and the melanized cell walls, which protect the fungi from extreme environmental influences, render molecular biological and genetic engineering methods difficult, which is why little is known about the biology of these fungi. *Knufia petricola* was selected to understand the processes of material colonization and damage with the help of adapted methods such as CRISPR-Cas9-mediated genome editing.

Danksagung

Großer Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitenden in der *Knufia*-Forschungsgruppe für ihre Arbeit. Besonders wichtig waren die genetischen Experimente von Steffi Noack-Schönmann, Oliver Voigt und Nicole Knabe – sie haben den Weg für die Nutzung von CRISPR-Cas9 in *K. petricola* geebnet. Alles wurde nur möglich durch die Vision von Anna A. Gorbushina, eines Tages *K. petricola* als ein Modell in der Materialforschung zu nutzen. Ferner dankt die Autorin der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) für die finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Schlagworte:

Knufia petricola, schwarze Pilze, Biofilme, Pigmente, Genomeditierung, *multiplexing*, Resistenzkassette, Transformatanten

Literatur

- [1] M. Schuster, R. Kahmann (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet Biol* 130, 43–53.
- [2] A. A. Gorbushina (2007). Life on the rocks. *Environ Microbiol* 9, 1613–1631.
- [3] D. Tesei (2022). Black fungi research: out-of-this-world implications. *Encyclopedia* 2, 212–229.
- [4] T. D. W. Corbett et al. (2024). Organic carbon source controlled microbial olivine dissolution in small-scale flow-through bioreactors, for CO₂ removal. *npj Mater Degrad* 8, 34.
- [5] R. Gerrits et al. (2020). How the rock-inhabiting fungus *K. petricola* A95 enhances olivine dissolution through attachment. *Geochim Cosmochim Acta* 282, 76–97.
- [6] L. Selbmann et al. (2020). Shed light in The daRk lineages of the fungal tree of life - STRES. *Life* 10.
- [7] A. A. Gorbushina et al. (1993). Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiol J* 11, 205–221.
- [8] U. Wollenzien et al. (1995). On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Sci Total Environ* 167, 287–294.
- [9] U. Wollenzien et al. (1997). *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 281–288.
- [10] L. Selbmann et al. (2021). Culture-dependent and amplicon sequencing approaches reveal diversity and distribution of black fungi in Antarctic cryptoendolithic communities. *J Fungi (Basel)* 7.

- [11] R. Breitenbach et al. (2022). The role of extracellular polymeric substances of fungal biofilms in mineral attachment and weathering. *npj Mater Degrad* 6, 42.
- [12] K. Flieger et al. (2018). Development of an improved carotenoid extraction method to characterize the carotenoid composition under oxidative stress and cold temperature in the rock-inhabiting fungus *Knufia petricola* A95. *J Fungi* 4, 124.
- [13] J. Schumacher, A. A. Gorbushina (2020). Light sensing in plant- and rock-associated black fungi. *Fungal Biol* 124, 407–417.
- [14] S. Noack-Schönmann et al. (2014). Genetic transformation of *Knufia petricola* A95 – a model organism for biofilm-material interactions. *AMB Express* 4, 80.
- [15] O. Voigt et al. (2020). An advanced genetic toolkit for exploring the biology of the rock-inhabiting black fungus *Knufia petricola*. *Sci Rep* 10, 22021.
- [16] C. S. Nødvig et al. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* 10, e0133085.
- [17] C. S. Nødvig et al. (2018). Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*. *Fungal Genet Biol* 115, 78–89.
- [18] E. A. Erdmann et al. (2022). Genetic engineering of the rock-inhabitant *Knufia petricola* provides insight into the biology of extremotolerant black fungi. *Front Fungal Biol* 3, 862429.
- [19] E. A. Erdmann et al. (2024). The Tet-on system for controllable gene expression in the rock-inhabiting black fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles* 28, 38.
- [20] L. Selbmann et al. (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud Mycol* 51, 1–32.
- [21] S. Onofri et al. (2020) The amazing journey of *Cryomyces antarcticus* from Antarctica to space. In *Extremophiles as astrobiological models* (Seckbach, J. et al., eds). pp. 237–254, Wiley.
- [22] I. Catanzaro et al. (2024). Deletion of the polyketide synthase-encoding gene *pks1* prevents melanization in the extremophilic fungus *Cryomyces antarcticus*. *IUBMB Life*, <https://doi.org/10.1002/iub.2895>.

Verfasst von:



Julia Schumacher studierte Biologie, wurde 2008 promoviert und habilitierte sich 2017 – alles an der Universität Münster. Seit 2018 ist sie als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Material und Umwelt der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in Berlin tätig und lehrt seit 2021 als Privatdozentin an der Freien Universität Berlin. Sie forscht zu verschiedenen Aspekten der molekularen Mykologie wie der Bedeutung von Licht für Pilze, die mit phototrophen Organismen assoziiert sind.

Korrespondenz

PD Dr. Julia Schumacher
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
Abteilung 4 Material und Umwelt
Unter den Eichen 87
12205 Berlin
E-Mail: Julia.Schumacher@bam.de

Ein “richtiges“ Experiment für die Schule „Pauline und die Ausreißer“

PAULINE KANNGIESSER



Das Schülerlabor Science Bridge hatte 2020 ein einfaches CRISPR-Cas-Experiment mit *E. coli* entwickelt, das gut für Schulen geeignet war und zuverlässig funktionierte. Überraschenderweise tauchten dabei sehr selten Kolonien mit einem Phänotyp auf, der nicht „passte“: Die Bakterien waren blau und nicht – wie erwartet – weiß. Was steckte hinter dem Geheimnis der blauen Kolonien? Im Herbst 2020 gingen wir dem Rätsel auf den Grund.

Alle Abbildungen wurden der Blog-Serie „Pauline und die Ausreißer“ auf www.crispr-whisper.de entnommen.

In einer insgesamt neunteiligen Blog-Serie haben wir Biologie-Interessierte auf eine Reise in das Themengebiet der Genscheren CRISPR-Cas mitgenommen und dabei interaktiv das Geheimnis der „blauen Ausreißer“ aufgedeckt. Die Blog-Besucher wurden dabei nahezu in Echtzeit über das Voranschreiten der Versuche informiert und konnten die weitere Vorgehensweise im Labor durch anregende Kommentare und Vorschläge mitgestalten. Die Blog-Serie liefert ein sehr schönes Beispiel für wissenschaftliches Arbeiten und Erkenntnisgewinnung und zeigt anschaulich, wie ausgehend von einer Beobachtung Fragestellungen entwickelt und in welchen Schritten diese gelöst werden können.

Aus Blau mach Weiß – das Experiment im Überblick

Das Blog-Format „Pauline und die Ausreißer“ entwickelte sich aus einem Schülerexperiment des Vereins *Science Bridge* e.V. zur Genscheren Cas9 [1]. Einige Bakterien – darunter auch das Darmbakterium *Escherichia coli* – sind dazu in der Lage, den Milchzucker Lactose als Energiequel-

le zu nutzen. Hierfür stellen sie ein Protein namens β -Galaktosidase (Lactase) her, welches den Zweifachzucker Lactose in seine beiden Bestandteile Glucose und Galactose spaltet. Das Gen, welches für die Lactase kodiert, wird *lacZ* genannt [2].

Der im Schülerexperiment verwendete *E. coli*-Stamm besitzt ein Plasmid, welches für dieses *lacZ*-Gen kodiert (*lacZ*-Plasmid). Die Induktion des Gens führt also zur Expression des Proteins β -Galaktosidase, welches nicht nur Lactose abbauen, sondern auch eine zugesetzte, farblose Substanz namens X-Gal spalten kann. Dabei entstehen sowohl der Einfachzucker Galaktose als auch der Farbstoff 4-Chlor-3-Brom-Indigo: Die Bakterienkolonien werden dadurch gut erkennbar blau gefärbt. X-Gal dient damit als Indikator für ein funktionierendes *lacZ*-Gen.

Im Zuge des Experimentes wird nun ein zweites Plasmid in die Bakterien eingebracht. Dieses enthält zum einen die kodierende Sequenz für die Genscheren Cas9 sowie eine spezifische CRISPR-RNA (crRNA), die die Genscheren zum *lacZ*-Gen leitet. Das CRISPR-Cas9-System findet also die zur crRNA komplementäre Sequenz und schneidet die DNA

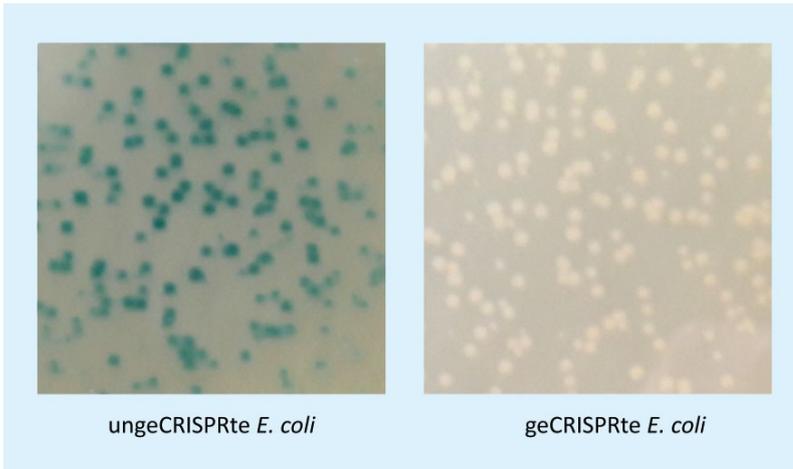


ABB. 1 Das Ergebnis des Science Bridge-Schülerexperimentes: Aus blauen Bakterien (links) entstehen mithilfe der Genschere CRISPR-Cas9 weiße Kolonien (rechts).

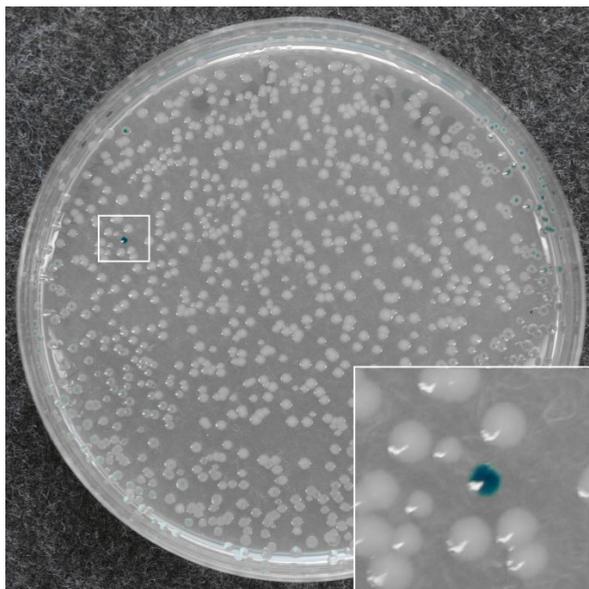


ABB. 2 Eine blaue Kolonie inmitten vieler weißer. Was steckt wohl hinter dem Geheimnis der Ausreißer?

IN KÜRZE

- In einem Schulexperiment zu CRISPR-Cas wurden einige Bakterienkolonien gefunden, bei denen die Geneditierung **nicht wie beabsichtigt** funktioniert hatte.
- Dazu wurde ein Forschungsprojekt durchgeführt, um die **Ursache für diese „Ausreißer“** zu verstehen.
- Als **ergebnisoffenes, interaktives Online-Projekt** sollten Hypothesen entwickelt und geeignete Methoden vorgeschlagen werden, um die Hypothesen experimentell zu überprüfen.
- Die jeweiligen Ergebnisse wurden **nahezu in Echtzeit** online gestellt.
- Das Projekt kann als Anregung z. B. für einen **Leistungskurs Biologie** verwendet werden.

innerhalb des *lacZ*-Gens. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen kann ein Schnitt durch Cas9 in den verwendeten *E. coli*-Stämmen nicht repariert werden. Deshalb wird das *lacZ*-Plasmid vollständig abgebaut und die Bakterien verlieren die Fähigkeit, den blauen Farbstoff herzustellen. Aus blauen Kolonien entstehen somit weiße (Abbildung 1).

Ein digitales Mitmachprojekt entsteht

Während der Durchführung der Schülerversuche konnten wir ab und an ein merkwürdiges Phänomen beobachten: Unter den „geCRISPRten“ weißen Bakterien fand sich bei genauem Hinsehen die ein oder andere blaue Kolonie (Abbildung 2). Anscheinend funktionierte das CRISPR-Cas9-System bei einigen wenigen Bakterien nicht. Dem Geheimnis dieser Ausreißer wollten wir natürlich auf die Spur kommen.

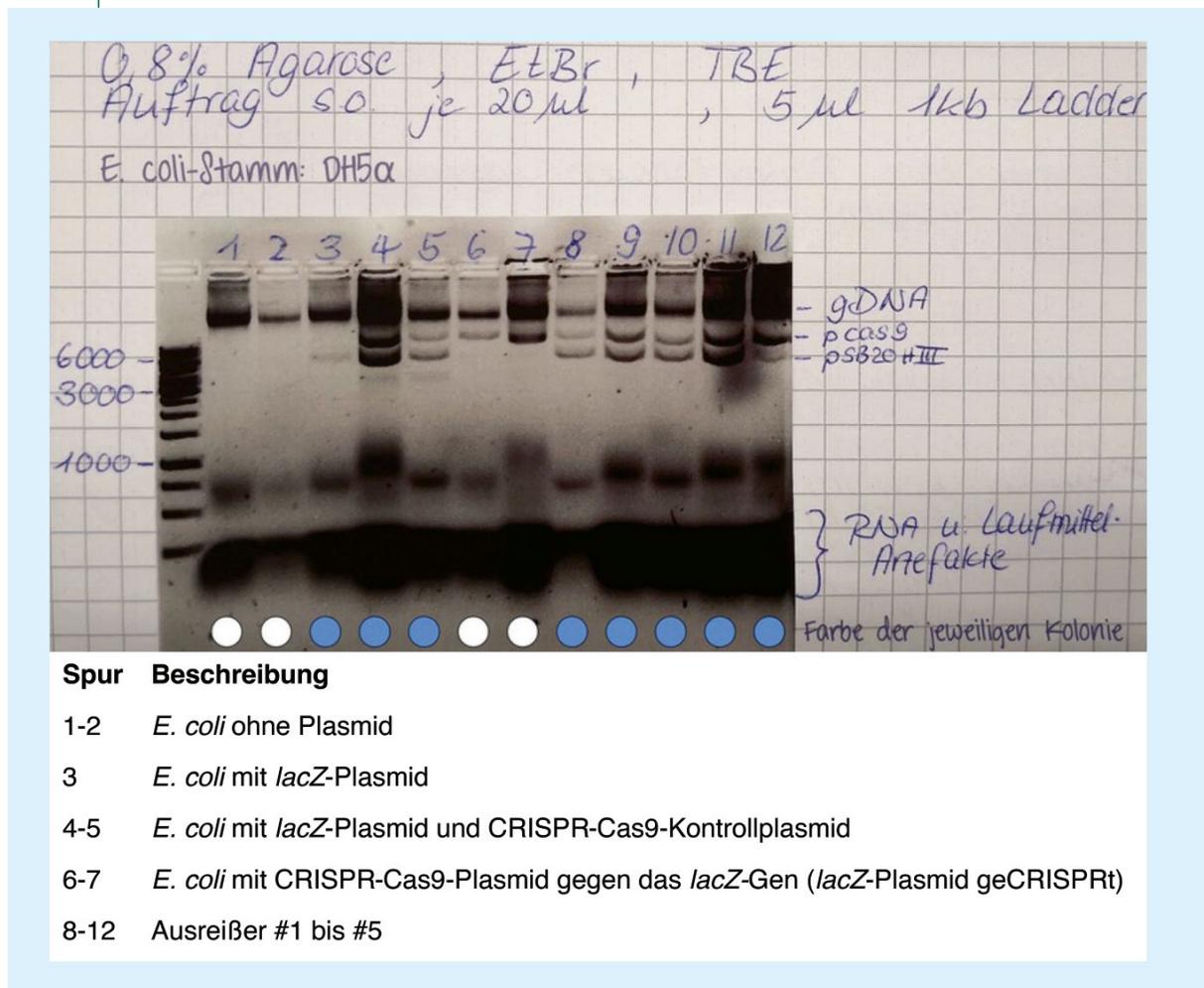
Damit wollten wir im Herbst 2020 beginnen, aber die COVID-19-Pandemie nahm beständig an Fahrt auf und ein Lockdown folgte dem nächsten. Warum aus dem Geheimnis der Ausreißer also nicht ein digitales Mitmachprojekt entwickeln, um die Community in ein kleines Forschungsprojekt mitzunehmen? So wurden ab November 2020 regelmäßig Video- und Textbeiträge auf dem CRISPR-Whisper-Blog (<https://www.crispr-whisper.de/category/laborleben/>) hochgeladen, in denen nahezu in Echtzeit über die Fortschritte der Experimente berichtet wurde, die wir im Labor durchführten. Über die Kommentarfunktion hatten Leserinnen und Leser die Möglichkeit, weiterführende Ansätze und Experimente zu diskutieren und so unser Vorgehen mitzugestalten.

Auf den Spuren der blauen Ausreißer

Zuerst stellten wir uns die Frage, ob das Auftauchen der Ausreißer ein reproduzierbares Ereignis darstellt und falls ja, mit welcher Häufigkeit dieses auftritt. Zu Beginn des Forschungsprojektes wurde das Schülerexperiment daher mehrmals und unabhängig voneinander durchgeführt. Nach zwölf Wiederholungen und fast 28.000 ausgezählten Kolonien ergab sich ein prozentualer Anteil von rund 0,1 Prozent, also durchschnittlich eine blaue Kolonie pro 1000 weißen. Die natürliche Mutationsrate als Ursache der Ausreißer kam somit eher nicht in Frage, liegt diese doch mit etwa 0,00001 Prozent pro Gen und pro Generation deutlich niedriger [3]. Es handelte sich also um ein reproduzierbares Phänomen, das mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit auftrat.

Könnte es sein, dass die blauen Ausreißer schlicht und ergreifend kein CRISPR-Cas9-Plasmid besitzen? Diese Frage stellte sich auch ein Leser aus der Community. Allerdings war diese Erklärung relativ unwahrscheinlich: Das CRISPR-Cas9-Plasmid enthält neben dem *cas9*-Gen und der spezifischen crRNA zusätzlich ein Gen für eine Antibiotikaresistenz und die blauen Kolonien wuchsen problemlos auf einem Medium mit diesem Antibiotikum. Trotzdem musste zweifelsfrei geklärt werden, ob das Plasmid vorhanden war.

ABB. 3 | KOLONIE-CRACKING-GEL



Ein Auszug aus dem Laborbuch zeigt das Ergebnis des „Kolonie-Cracking-Gels“: Alle untersuchten Ausreißer (Spuren 8–12) besitzen zwei Plasmide. Die übrigen Spuren 1–7 zeigen verschiedene Kontrollen: Das Kontrollplasmid in den Spuren 4 und 5 ist nicht gegen das *lacZ*-Gen gerichtet, in den Spuren 6 und 7 ist das untere *lacZ*-Plasmid abgebaut.

Wir stellten deshalb ein sogenanntes „Kolonie-Cracking-Gel“ her. Dabei werden die Bakterienzellen durch Kochen aufgebrochen und die enthaltene DNA wird freigesetzt. Mithilfe eines Agarosegels kann dann ganz einfach überprüft werden, ob beide Plasmide in den Kolonien vorhanden sind oder ob es zum Verlust eines Plasmids gekommen ist. Das Ergebnis: In allen untersuchten Ausreißern können – neben der genomischen DNA der Bakterien (gDNA, oberste Bande) – beide Plasmide nachgewiesen werden (Abbildung 3). Das CRISPR-Cas9-Plasmid war also in der Tat in den Bakterienzellen vorhanden, allerdings hatte der Abbau des *lacZ*-Plasmids aus irgendeinem Grund nicht funktioniert.

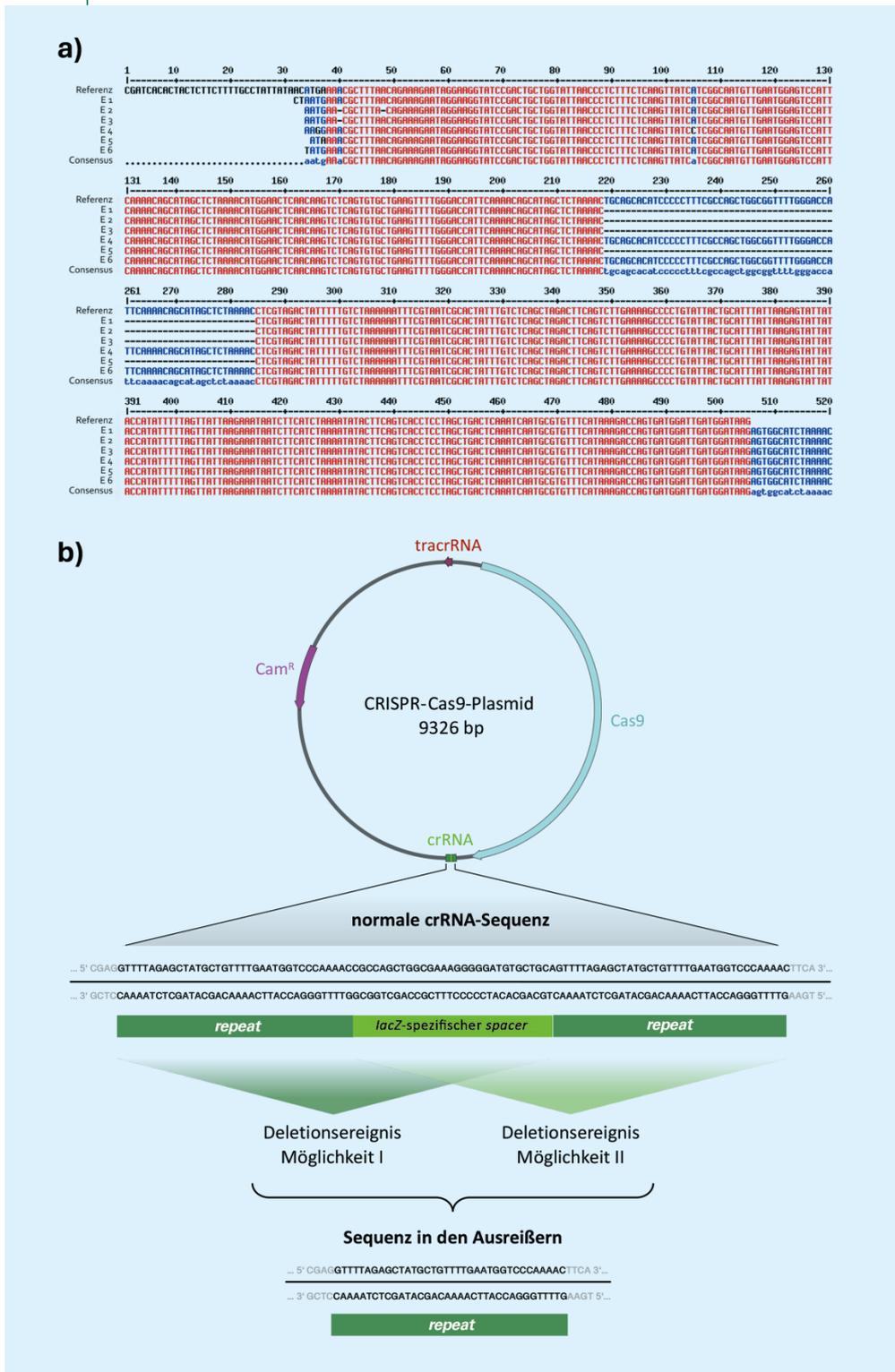
Was man im „Cracking-Gel“ nicht erkennen kann, wären zum Beispiel kleinere Mutationen, Deletionen oder Insertionen in dem einen oder dem anderen Plasmid. Dafür ist die Größenauflösung in einem „Cracking-Gel“ nicht gut genug. So könnte zum Beispiel ein DNA-Abschnitt des

lacZ-Genes verändert sein, ohne dass die Funktion des Proteins verloren geht. Ein Fehler innerhalb der CRISPR-Erkennungssequenz könnte die Erkennung durch die entsprechende crRNA beeinträchtigen und den Abbau des *lacZ*-Plasmids verhindern. Im nächsten Schritt wurde daher eine Kolonie-PCR durchgeführt, in der der DNA-Abschnitt des *lacZ*-Genes mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt wurde. Auch hier konnten keine Auffälligkeiten unter den blauen Ausreißern festgestellt werden: Die Zielsequenz im *lacZ*-Gen scheint – auf den ersten Blick – die „richtige“ Länge zu besitzen.

Des Rätsels Lösung

Also was nun? Letztendlich konnten wir das Rätsel der blauen Kolonien mithilfe der in der Community vorgeschlagenen DNA-Sequenzierung lösen. Diese deckte zunächst auf, dass die CRISPR-Zielsequenz innerhalb des *lacZ*-Genes bei allen untersuchten Ausreißern intakt ist.

ABB. 4 | DES RÄTSELS LÖSUNG



a) Abgleich der crRNA-Sequenzen einer Kontrolle mit intakter crRNA („Referenz“) und sechs Ausreißern („E1“- „E6“). Sequenzen, die mit dem erwarteten Sequenz übereinstimmen, sind rot gekennzeichnet, Abweichungen blau. Ungenauigkeiten am Anfang und am Ende einer Sequenzierung treten häufig auf (Positionen 33 bis 40) und haben keine Aussagekraft. Die Abweichung/Mutation in Position 105 in Clon E4 hat keine Auswirkung. b) Schematische Darstellung des Deletionsereignisses in den Ausreißern. Es fehlen jeweils der lacZ-spezifische spacer sowie eine der beiden repeat-Sequenzen.

Also richteten wir unser Augenmerk auf das CRISPR-Plasmid. Und in der Tat: Vier der sechs Ausreißer zeigen eine identische Deletion von insgesamt 64 Basenpaaren innerhalb der crRNA (Abbildung 4a)!

Eine normale crRNA-Sequenz besitzt neben einer spezifischen Erkennungssequenz, dem sogenannten *spacer*, zusätzlich zwei *repeats*, also sich wiederholende DNA-Abschnitte, die vor und nach der eigentlichen Erkennungssequenz liegen (Abbildung 4b) [4]. In unserem Experiment ist der *spacer* der crRNA komplementär zu einer 30 Basenpaaren großen Region innerhalb des *lacZ*-Gens. Unsere Auswertung deckte auf, dass in den vier Ausreißern jeweils einer der *repeats* sowie die *lacZ*-Erkennungssequenz fehlen. Durch die fehlerhafte crRNA kann die Genschere Cas9 das *lacZ*-Gen nicht finden und deshalb findet kein CRISPRn in den blauen Ausreißern statt. Dabei scheinen die beiden sich wiederholenden Sequenzen der *repeats* Rekombinationsereignisse zu begünstigen, was erklären würde, weshalb die Mutationereignisse mit höherer Frequenz stattfinden als gewöhnlich. Mit dieser Erkenntnis sind wir des Rätsels Lösung gemeinsam ein gutes Stück nähergekommen. Zwei Drittel der Ausreißer unserer kleinen Probenzahl können damit erklärt werden (vier von sechs Kolonien). Die Zahl 2/3 ist damit nicht statistisch abgesichert, man kann aber schon sagen, dass „ein großer Teil“ der Ausreißer auf einer Deletion der *spacer*-Sequenz beruht.

Und was ist nun die Ursache für die Blaufärbung der übrigen Ausreißer? Tja, diese Frage bleibt bis heute ein Geheimnis - und könnte ein neues Schulprojekt sein. Wer neugierig geworden ist, kann die ganze Blog-Serie auf www.crispr-whisper.de unter der Kategorie „Laborleben“ nachlesen.

Ein kurzes Fazit zur Blog-Serie

Mithilfe einiger grundlegender Experimente konnten wir also herausfin-

den, warum einzelne Bakterienkolonien nicht geCRISPRt wurden und blau geblieben sind. Das ist zwar spannend, aber was hat der ganze Aufwand genutzt? War es letztendlich nur ein Zeitvertreib für neugierige Wissenschaftler? Diese Frage kann klar mit Nein beantwortet werden. Wir haben gelernt, dass crRNAs aus einem CRISPR-Array verloren gehen können – und zwar mit einer größeren Wahrscheinlichkeit als durch „normale“ Mutationen. Dieses Erkenntnis ist auch in der Anwendung von Bedeutung und muss – beispielsweise bei potenziellem Einsatz des CRISPR-Cas9-Systems als medizinisches Therapeutikum – bedacht werden. Und man sollte hier sogar weitere Forschungen anstellen. Was wäre zum Beispiel, wenn die wenigen nicht geCRISPRten Zellen, die anfangs kaum aufgefallen sind, ein kleines bisschen schneller wachsen würden? Sie könnten die geCRISPRten Zellen nach einiger Zeit verdrängen und daran könnte letztlich eine zunächst erfolgreiche Therapie scheitern. Wir wissen jetzt, warum das so sein könnte. Das ist noch keine Lösung, aber den Grund zu kennen ist die Voraussetzung dafür, eine Lösung zu finden.

Was kann man mit diesem Projekt in der Schule erreichen?

In der Schule werden wichtige Teile der wissenschaftlichen Arbeit kaum realistisch dargestellt. Experimentelles Arbeiten mit offenem Ausgang ist sehr selten. In den meisten Fällen werden etablierte Experimente durchgeführt, die „funktionieren“ – das entspricht aber nicht der wissenschaftlichen Realität, denn sehr häufig liefern Experimente nicht die Ergebnisse, die man gerne hätte.

Optimal wäre eine solche Aufgabe in einer Schule mit einem molekularbiologisch ausgestatteten S1-Labor. Aber auch ohne das können Hypothesen aufgestellt und die entsprechenden Experimente vorgeschlagen werden, deren Planung, Aufbau und Durchführung aus dem theoretischen Unterricht bekannt sind. Lehrer können denkbare Ergebnisse grafisch vorbereiten und zur Diskussion stellen. Auch so können grundlegende, wesentliche Konzepte und Denkweisen der Naturwissenschaft Biologie im Bereich der Erkenntnisgewinnung Eingang in den Unterricht finden und bei den Lernenden Wissenschaftsverständnis und wissenschaftliches Denken fördern. Zusammengefasst können die folgenden Lernergebnisse erzielt werden:

1. Wissenschaftliche Fragestellungen ergeben sich (oft) aus guter Beobachtung: Man erkennt ein Phänomen als ungewöhnlich und will es untersuchen.
2. Für ein Forschungsprojekt muss ein Phänomen reproduzierbar sein. Einzelne Zufallsbeobachtungen sind dafür nicht geeignet.
3. Man muss Hypothesen aufstellen. Das sind keine „wildes Spekulationen“, sondern sorgfältige Überlegungen, wie dieses Phänomen zustande kommen könnte. Dabei ist wichtig, dass eine Hypothese experi-

mentell überprüfbar sein muss. Die Hypothese „Aliens haben das CRISPR-Gen verhext“ ist nicht überprüfbar.

4. Eine Hypothese wird verworfen, wenn sie experimentell nicht bestätigt werden kann. Das bedeutet nicht, dass die Hypothese schlecht war, sie erklärt aber nicht das beobachtete Phänomen.
5. Eine zutreffende Hypothese erklärt ein Phänomen nicht unbedingt vollständig. Im Falle unserer Ausreißer ist der größte Teil der blauen Kolonien durch eine Deletion der crRNA-Sequenz zu erklären, für andere Kolonien gilt das aber nicht. Das heißt, es müssen weitere Hypothesen entwickelt werden, um diese zu erklären.
6. Vorwissen hilft: Die Häufigkeit der Ausreißer liegt hier z. B. weit über der natürlichen Mutationsrate. Dadurch ist es sehr unwahrscheinlich (aber nicht völlig auszuschließen), dass eine Punktmutation im Cas9-Gen für die blauen Kolonien verantwortlich ist.
7. Kontrollen: Keines der beschriebenen Experimente ist ohne entsprechende Kontrollen auswertbar. Bei der Plasmidanalyse ist z. B. immer ein Vergleich zwischen blauen und weißen Kolonien oder mit den ursprünglichen Plasmiden erforderlich.

Zusammenfassung

In einem CRISPR-Experiment wurden vereinzelt Zellen gefunden, in denen die Genomedition nicht stattgefunden hatte. Verschiedene Hypothesen wurden aufgestellt und experimentell geprüft. Für den größten Teil der Zellklone konnte eine punktgenaue Deletion der entsprechenden spacer-repeat-Einheit im CRISPR-Array als Ursache festgestellt werden. Hypothesen, Experimente und Schlussfolgerungen wurden als partizipatives Online-Projekt auf der Webseite www.crispr-whisper.de nacheinander veröffentlicht. Dieses dient als Anregung für Schulen, Forschung an offenen Fragen zu präsentieren und verständlich zu machen.

Summary

A suitable experiment for school “Pauline and the runaways”

In a CRISPR experiment, occasionally cells have been found in which genome editing had not taken place as expected. Various hypotheses to explain the observation were put forward and tested experimentally. For the majority of cell clones, a pinpoint deletion of the corresponding spacer repeat unit in the CRISPR array was identified as the cause. Hypotheses, experiments and conclusions were published one after the other as a participatory online project on the website www.crispr-whisper.de. It serves as a stimulus for schools to present research on the basis of open questions and make it understandable.

Danksagung:

Besonderer Dank gilt Dr. Heike Ziegler für wertvolle Hinweise zur Planung und Durchführung der Experimente.

Schlagworte

CRISPR-Cas, Wissenschaftskommunikation, Schulversuche, Hypothese, Gentechnik, Polymerasekettenreaktion (PCR), wissenschaftliches Arbeiten, *lacZ*-Gen

Literatur

- [1] H. Ziegler, W. Nellen (2020). CRISPR-Cas experiments for schools and the public. *Methods* 172, 86–94, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.08.009>
- [2] D. H. Juers et al. (2012). LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *The Protein Society* 21(12), 1792–807.
- [3] H. Lee et al. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (41), E2774–E2783.

- [4] D. Bhaya et al. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics* 45, 273–297.

Verfasst von:



Pauline Kanngießer ist Masterstudentin der Biologie an der Universität Kassel und war über mehrere Jahre aktives Mitglied bei Science Bridge e. V.

Korrespondenz:

Pauline Kanngießer
Auf der Schubach 76a
34130 Kassel
E-Mail: pauline.k@me.com



STIFTERVERBAND



ARS LEGENDI- FAKULTÄTENPREIS

Mathematik und Naturwissenschaften 2025

Zum zwölften Mal loben der Stifterverband, die Deutsche Mathematiker-Vereinigung, die Deutsche Physikalische Gesellschaft, die Gesellschaft Deutscher Chemiker und der Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin in Deutschland den Ars legendi-Fakultätenpreis aus. Der Preis wird in den Kategorien Biowissenschaften, Chemie, Mathematik und Physik vergeben. Ausgezeichnet werden Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen für herausragende und innovative Leistungen in Lehre, Prüfung, Beratung und Betreuung an Hochschulen.

DER PREIS IST MIT JEWEILS 5.000 EURO DOTIERT.

Fakultäten und Fachbereiche, lokale Vertretungen der jeweiligen Fachgesellschaften und Fachschaften können Vorschläge einreichen; Eigenbewerbungen sind zulässig.

BEWERBUNGSSCHLUSS: 26. JANUAR 2025

Nähere Informationen und die Ausschreibungsunterlagen unter:

www.stifterverband.org/ars-legendi-mn



SCHULE

Darf man in der Schule CRISPRn?

Praktische Erfahrung durch CRISPR-Cas-Laborexperimente erlaubt an Schulen, aber auch in der allgemeinen Öffentlichkeit bessere Einblicke in eine Methodik, die unsere Gesellschaft wesentlich beeinflussen wird. Es wurden einige einfache und sichere Experimente entwickelt, die teilweise in zwei Schulstunden durchführbar sind. Die gesetzlichen Vorgaben in Deutschland sind jedoch so restriktiv, dass selbst professionelle Schüler- und Öffentlichkeitslabore zurückschrecken, den administrativen Aufwand zu wagen. Wir ermutigen die Labore, es trotzdem zu versuchen, und appellieren an die Politik, die unnötigen Hürden abzubauen.

Die Bedeutung von CRISPR-Cas für Medizin, Pflanzenzucht, Materialwissenschaften, Grundlagenforschung und andere Bereiche der Biowissenschaften ist so groß, dass die Methode im Biologieunterricht der Oberstufe nicht fehlen darf. Die Thematik ist in den meisten Lehrplänen für die Sekundarstufe II verankert und spielt in Abiturprüfungen (oft) eine Rolle.

Das Verständnis für dieses biologische System ist von großer Bedeutung für nachhaltige, praxisorientierte Bildung. CRISPR-Cas hat bereits 10 Jahre nach der Entdeckung revolutionäre Anwendungen im Bereich Gesundheit und ressourcenschonender Landwirtschaft erbracht. Weitere Projekte zu grüner Energie, Plastik-Recycling, umweltfreundlichem Pflanzenschutz, nachhaltigen Bio-Materialien und mehr stehen kurz vor der Markteinführung oder sind in der Erprobung. Die vielfältigen Herausforderungen des Klimawandels erfordern neue innovative Ideen, die zu einem großen Teil mit biologischen Methoden angegangen werden können. Wer sonst als die junge Generation soll diese Aufgaben lösen? Dazu sind jedoch solide Kenntnisse der Technologie erforderlich, um ihre Möglichkeiten und Grenzen realistisch einschätzen zu können und neue Lösungsmöglichkeiten zu entdecken (Abbildung 1).

Grundsätzlich gilt für alle Bürger, dass zumindest ein Grundverständnis der Methode vonnöten ist:

Sie wird uns alle betreffen und nur so kann sie wissenschaftlich diskutiert werden.

Rechtliche Voraussetzungen

Leider gibt es große Hürden, CRISPR-Cas im Experimentalunterricht (oder auch in der Öffentlichkeitsarbeit) einzusetzen, um so notwendige praxisnahe Bildungsarbeit zu leisten, die zu einer größeren Motivation und damit zu einem nachhaltigeren Lernerfolg führt. Obwohl für die Schule Versuche entwickelt wurden (s. unten), die bei entsprechender Vorbereitung durchaus in einer Doppelstunde

durchführbar sind, werden sie nur in sehr seltenen Fällen eingesetzt.

Die Genomeditierung mit CRISPR-Cas zählt in Deutschland als Gentechnikexperiment der Sicherheitsstufe 1 (keine Gefahr für Mensch und Umwelt) und erfordert ein entsprechendes Sicherheitslabor. Die Anforderungen sind zwar nicht sehr hoch, für die meisten Schulen aber finanziell und personell kaum tragbar. Wesentliche Voraussetzungen sind ein wasserdichter Boden, ein Mobiliar mit porenlosen, abwaschbaren Oberflächen sowie verschließbare Türen und Fenster. Ein Autoklav zur Sterilisierung von Abfällen muss vorhanden sein. Das erscheint zunächst einfach, kann aber je nach Gebäudebeschaffenheit und Auflagen der Landesaufsichtsbehörde kostenintensiv sein. Der finanzielle Aufwand für die Einrichtung eines S1-Labors kann sehr unterschiedlich sein; er liegt aber in der Regel um 10.000 Euro.

Anspruchsvoller ist die Bestellung eines Projektleiters, der mehrjährige Erfahrung in einem molekularbiologischen Labor nachweisen und einen Projektleiterkurs (mit regelmäßigen, kostenpflichtigen



ABB. 1 Ob Schulkurs, Lehrerfortbildung oder Öffentlichkeitslabor: Die Laborerfahrung schafft ein tieferes Verständnis für Wissenschaft und einen direkten Kontakt zu Wissenschaftlern – auf Augenhöhe. Foto: W. Nellen, öffentlicher CRISPR-Kurs in Regensburg.

TAB 1. SCHÜLERLABORE IN DEUTSCHLAND, DIE CRISPR-CAS-EXPERIMENTE ANBIETEN

Labor	Webseite	E-Mail
Gläsernes Labor Berlin	https://www.glaesernes-labor.de/	
Vienna Open Lab, Wien	https://www.viennaopenlab.at	
MINT-Labs Regensburg	https://www.mint-labs-regensburg.de/	crispr@mint-labs.de
XLAB Göttingen	https://xlab-goettingen.de	buchung@xlab-goettingen.de
experimenta Heilbronn	https://www.experimenta.science/	Thomas.Wendt@experimenta.science
Grünes Labor Gatersleben	www.gruenes-labor.de	info@gruenes-labor.de

Das Gläserne Labor Berlin stellten wir in BiUZ 2/21 als außerschulischen Lernort vor.

Das Göttinger XLAB stellten wir in BiUZ 1/24 als außerschulischen Lernort vor.

Nachschulungen) absolvieren muss. Der Projektleiter hat Nutzer des Labors über die Gentechniksicherheitsverordnung zu belehren, Experimente akribisch aufzuzeichnen und kann persönlich für Unregelmäßigkeiten und Verstöße gegen das Gentechnikgesetz verantwortlich gemacht werden.

Zusätzlich ist ein externer, unabhängiger Beauftragter für biologische Sicherheit (BBS) erforderlich, der die Einhaltung von Sicherheitsvorschriften, die Lagerung von gentechnisch veränderten Organismen und die Aufzeichnungen überprüft. Die Aufsichtsbehörde ist gehalten, die gentechnische Anlage regelmäßig zu begehen und zu prüfen. Diese Voraussetzungen und Auflagen sowie der Arbeitsaufwand schrecken viele Schulen von der Einrichtung ab. Arbeit und Kosten können reduziert werden, wenn zwei oder drei Schulen gemeinsam ein S1-Labor einrichten.

Eine Alternative besteht darin, ein entsprechendes Schülerlabor in der Region für gentechnische Experimente zu besuchen. Außerhalb der Ballungszentren und vor allem im

ländlichen Raum wird das jedoch schwierig. Zudem bieten nur wenige Schülerlabore ein „echtes“ CRISPR-Cas-Experiment an. Die Aufstellung in Tabelle 1 ist wahrscheinlich nicht ganz vollständig, sie zeigt aber bereits, dass das Angebot dünn gesät ist.

Welche Experimente gibt es?

Experimentierkits werden in Deutschland von der Firma Biorad („Out of the Blue“, <https://t1p.de/jeprb>, ab ca. 300 Euro für eine Schulklasse) und der Firma miniPCR-Bio („Knockout!“, <https://t1p.de/5lr8e>, ab ca. 225 Euro, Vertrieb in Deutschland und Österreich über BioWissKomm, www.biowisskomm.de) angeboten. Mit etwas Zeit und Erfahrung können die biologischen Materialien selbst auch kostengünstiger hergestellt werden. Das Kit „Knockout!“ wurde von *Science Bridge*/BiolWissKomm entwickelt [1] (das ausführliche Protokoll kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden).

In beiden Kits wird durch eine Transformation in *E. coli* ein CRISPR-Cas9-System (Cas9-Nuklease und eine CRISPR-RNA (crRNA)) eingebracht, um das *lacZ*-Gen auszuschalten. Das primäre Ergebnis ist, dass ein (mit X-Gal) blau anfärbbarer Bakterienstamm die β -Galactosidaseaktivität verliert und nicht mehr färbbar ist - die Zellen bleiben weiß. Ein entsprechendes Kontrollexperiment ist in den Kits enthalten.

Mit Erweiterungen kann durch ein „Cracking-Gel“ der Verlust des *lacZ*-Plasmids nachgewiesen werden, ebenso durch Plasmidisolierung und einen Restriktionsverdau. Mit

Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) kann die Abwesenheit des *lacZ*-Gens im Experiment, nicht aber in der Kontrolle gezeigt werden. Der Versuch erlaubt somit mehrere Nachweise mit verschiedenen Methoden der Molekularbiologie. Das XLAB in Göttingen, eines der größten Schülerlabore in Deutschland, hat ein eigenes Experiment entwickelt, in dem auf ähnliche Weise das Marker-gen RFP (rot fluoreszierendes Protein) in humanen Zellkulturen mit CRISPR-Cas ausgeschaltet wird.

Das Problem, dass diese Experimente nur in einem Sicherheitslabor (S1) durchgeführt werden dürfen, kann mit dem Kit „Chopped!“ von miniPCR-Bio umgangen werden (<https://t1p.de/uh6sd>). Bei „Chopped!“ wird ein vorgefertigter Komplex aus Cas9 und einer crRNA geliefert. Damit wird ein DNA-Doppelstrang *in vitro* geschnitten. Es handelt sich nicht um ein Gentechnikexperiment, fällt nicht unter das Gentechnikgesetz und darf in jedem Labor durchgeführt werden. Die Produkte werden auf einem Gel aufgetrennt. Das Kit ist mit ca. 135 Euro günstiger, allerdings unterscheidet sich das Ergebnis kaum von einem einfachen Restriktionsverdau. Zudem ist der Effektor-komplex (Cas9 und crRNA) sehr empfindlich und die Haltbarkeit des Kits geringer. Auch „Chopped!“ kann über BioWissKomm bezogen werden.

Eine weitere Möglichkeit ohne S1 zu CRISPRn, besteht mit TXTL (*cell-free transcription-translation*). Das sind zellfreie Extrakte aus *E. coli*, die *in vitro* zugegebene DNA transkribieren und die RNA in

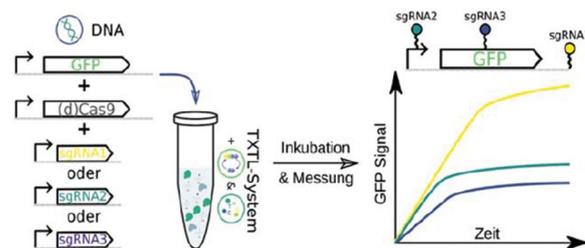


ABB. 2 Aufbau eines TXTL-Experiments. Links der Input: Gene bzw. Plasmide für den Reporter GFP, Cas9 bzw. das enzymatisch inaktive dCas9 und verschiedene sgRNAs. Rechts die erwarteten Ergebnisse der Fluoreszenzmessung mit Cas9 und den drei verschiedenen sgRNAs. Abb. Aus [2] mit freundlicher Genehmigung von MNU Journal.

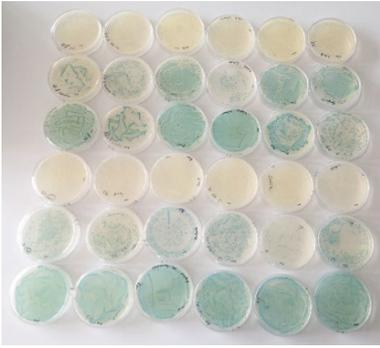


ABB. 3 Ergebnisse eines Kurses mit 12 Arbeitsgruppen, die jeweils drei Platten mit Bakterien ausgestrichen haben. Die obere Reihe zeigt die Bakterien, die mit dem Knockout-Plasmid transformiert wurden: Alle Bakterienkolonien sind weiß. Die zweite Reihe zeigt Bakterien, die mit dem Kontrollplasmid transformiert wurden: Alle Bakterienkolonien sind blau. Die dritte Reihe zeigt den plattierten Ausgangsstamm: Die Platten zeigen einen Rasen blauer Bakterien. Die drei Reihen darunter stammen von den weiteren sechs Gruppen in gleicher Folge.

Protein translatieren. Zu den Extrakten werden Plasmide mit verschiedenen Genkonstrukten gegeben: das GFP-Gen (grün fluoreszierendes Protein) als Reporter, dessen Expression über Fluoreszenzmessung quantifiziert werden kann, dann das Cas9-Gen und Abschnitte, von denen verschiedene single guide-RNAs (sgRNAs) abgelesen werden, die vor, innerhalb und hinter der GFP kodierenden Region Zielsequenzen haben. Eine interessante Variante ist die zusätzliche Verwendung des enzymatisch inaktiven dCas9 (d = dead), das zwar nicht mehr schneiden kann, aber bei Bindung an den GFP-Promotor den Zugang der RNA-Polymerase sterisch blockiert.

Ein entsprechendes Experiment (Abbildungen 2 und 3) wurde an der Technischen Universität Darmstadt entwickelt. Es ist sehr gut aufgebaut, verschafft ein gutes Verständnis für die Funktionsweise von CRISPR-Cas und enthält mehrere sinnvolle Kontrollen [2]. Wir kennen allerdings kein Schülerlabor, in dem der Versuch routinemäßig für Schulkurse oder Lehrerfortbildungen eingesetzt wird. Möglicherweise liegt das dar-

an, dass die käuflichen TXTL-Extrakte relativ teuer sind (ca. 275 Euro für 25 Reaktionen). In Zusammenarbeit mit einem Forschungslabor können TXTL-Extrakte selbst kostengünstiger hergestellt werden (<https://t1p.de/7lr6r>).

Unsere Erfahrung zeigt, dass Laborexperimente nach guter theoretischer Vorbereitung das Gelernte wesentlich vertiefen und vor allem einen differenzierten, wissenschaftlichen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten geben können. Nur so ist dann auch eine sachlich fundierte Diskussion über relevante Themen der Ethik und Ökologie möglich.

Hürden abbauen

Die ungewöhnlich restriktive Gesetzgebung in Deutschland erschwert diese schulische Erfahrung und vermittelt den Eindruck, dass solche Experimente gefährlich sind. Dabei stellt das Gesetz ausdrücklich fest, dass Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 keine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellen. Bei der obligatorischen Sicherheitsbelehrung vor einem Laborkurs erscheint es dann auch den meisten Teilnehmern widersprüchlich, dass ein Experiment ohne Gefahren in einem speziellen Sicherheitslabor durchgeführt werden muss.

Ebenso dokumentiert der erforderliche amtliche Sachkundenachweis mit regelmäßigen Schulungen für Projektleiter (inklusive Leiter eines Schülerlabors) ein tiefes Misstrauen der Gesetzgebung in unser Bildungssystem: Ein abgeschlossenes Studium der Biologie (BSc oder MSc) wird als Nachweis der Sachkunde nicht anerkannt. Auch eine Promotion in Molekularbiologie bescheinigt keine ausreichende Sachkunde. Selbst eine Professur in Molekularer Genetik reicht nicht aus, um die Behörden zu überzeugen, dass Experimente kompetent und verantwortungsvoll durchgeführt werden. Wissenschaftler mit vielen Jahren praktischer Laborerfahrung müssen die Schulbank drücken und werden dann von be-

hördlicher Seite mit einer Klausur auf ihre Sachkunde geprüft.

Gerade in Schülerlaboren werden i. d. R. Experimente durchgeführt, die seit Jahren etabliert sind. Dank der akribischen Aufzeichnungen weiß man, dass in den vergangenen 30 Jahren kein einziges Vorkommnis mit gentechnischer Sicherheitsrelevanz in den ca. 5000 S1-Laboren in Deutschland zu verzeichnen war.

Verschiedene Wissenschaftsorganisation – u. a. die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die Deutsche Akademie der Wissenschaften Leopoldina, der Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin e. V. (VBIO) und andere – bemühen sich seit vielen Jahren um eine realistische Anpassung des Gentechnikgesetzes – bisher ohne Erfolg. Erst kürzlich hat die Senatskommission der DFG wieder eine Entbürokratisierung und Erleichterungen für Gentechnikexperimente der Sicherheitsstufe 1 gefordert (<https://t1p.de/g7xqv>). Die Empfehlungen der DFG nennen nicht explizit, dass die Gesetzgebung die Einrichtung von Schülerlaboren behindert. Auf Anfrage wurde jedoch mitgeteilt, dass dieses Problem in den anstehenden Gesprächen auf ministerieller Ebene ausdrücklich angesprochen wird.

Es bleibt die Hoffnung, dass es schließlich – wie weltweit in vielen anderen Ländern – eine Einsicht gibt und die so oft geforderte Bürgerbeteiligung an der Wissenschaft auch im Labor leichter realisierbar wird.

Literatur

- [1] H. Ziegler, W. Nellen (2020). CRISPR-Cas experiments for schools and the public. *Methods* 172, 86-94, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.08.009>
- [2] G. Klees, L. Bezenberger, J. Kabisch (2020). Lehrexperimente zum CRISPR-Cas-System im zellfreien synthetischen Expressionssystem. *MNU Journal* 06.2020, 502-505 – ISSN 0025-5866.



Wolfgang Nellen,
BioWissKomm,
w.nellen@biowisskomm.de

WISSENSCHAFTSKOMMUNIKATION

CRISPR-Whisper, das Öffentlichkeitsprojekt des SPP2141

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) ist Wissenschaftskommunikation ein relevantes Anliegen. Dabei hat sie erkannt, dass Konsortien wie Sonderforschungsbereiche und Schwerpunktprogramme gute Möglichkeiten bieten, aktuelle Forschung für die Öffentlichkeit transparent zu machen. Sie hat dazu Module geschaffen, mit denen – neben den wissenschaftlichen Förderanträgen – eigenständige Public-Outreach-Projekte finanziert werden können, die die Wissenschaftskommunikation zur Thematik eines Konsortiums durchführen. In diesem Artikel beschreibe ich für das „CRISPR-Whisper“-Team, was ein solches Projekt leisten kann, aber auch was Herausforderungen sind und welche Probleme auftreten können.

Verständliche Wissenschaft für Schulen und die allgemeine Öffentlichkeit zugänglich zu machen, ist eine Forderung, die von Politik, Gesellschaft und auch den Wissenschaftsorganisationen mit Recht gestellt wird. Ein wesentliches Hindernis dabei ist, dass Wissenschaftler/-innen neben ihren Hauptaufgaben in Lehre, Forschung und Verwaltung (!) die Wissenschaftskommunikation nicht in dem erwarteten Umfang „einfach nebenher“ leisten können. Selbst für von der DFG geförderte Projekte des Moduls Wissenschaftskommunikation ist es äußerst schwierig, eine universitäre Arbeitsgruppe mit „doppelter Kompetenz“ (spezieller wissenschaftlicher Expertise und Erfahrungen mit Wissenschaftskommunikation) zu finden. Einzelaktionen wie eine Webseite oder eine „Lange Nacht der Forschung“ sind zwar einfacher zu organisieren, aber weniger nachhaltig, wenn sie nicht in einen größeren Kontext eingebunden sind.

Für das Schwerpunktprogramm SPP2141 (CRISPR-Cas – mehr als nur Verteidigung) ergab sich zufällig eine ideale Kombination. Meine Abteilung „Genetik“ an der Universität Kassel hatte einen Forschungsschwerpunkt auf dem Gebiet der RNA-Biologie. Aus anderen Förderprogrammen stand ich in gutem Kontakt zu vielen Mitgliedern des

damals geplanten SPP. Zusätzlich leitete ich bereits viele Jahre das Schüler- und Öffentlichkeitslabor *Science Bridge*. *Science Bridge* war eng an meine universitäre Arbeitsgruppe assoziiert und nutzte die vorhandene Infrastruktur. Gleichzeitig diente es interessierten Student/-innen als Experimentierlabor, um Forschung in vielfältiger Form in der Praxis auszuprobieren und in die Öffentlichkeit zu kommunizieren. Über die Jahre bildete sich ein Team aus kurz- und längerfristigen BSc-, MSc- und Promotionsstudent/-innen, die viel Erfahrung ansammelten und weitergaben. Obwohl *Science Bridge* als gemeinnütziger Verein keine Institution der Universität war, wurden wir vom damaligen Universitätspräsidium ideell, teilweise auch finanziell unterstützt.

Ich konnte folglich als universitäre Abteilung „Genetik“ einen Förderantrag im Rahmen des SPP stellen. Dabei war auch für die DFG offensichtlich, dass der wesentliche Teil der Arbeit (unter meiner Leitung) vom Team „*Science Bridge* e.V. an der Universität Kassel“ geleistet wurde.

Der Antrag unter dem Namen „CRISPR-Whisper“ war ambitioniert und umfangreich. Geplant waren

- eine Webseite mit einem Blog, der sowohl allgemeine Informationen zu CRISPR-Cas lieferte, als auch verständliche (!) Berichte

über aktuelle Forschungsgebiete der SPP-Mitglieder. Der Blog sollte durch Postings auf Social Media unterstützt werden.

- Projekte zwischen Wissenschaft und Kunst sprechen eine andere Zielgruppe als die der üblichen Wissenschaftsinteressierten an. Dafür sollten Künstler angeworben werden, die Arbeiten für den Blog erstellen und/oder bei anderen Projekten Beiträge leisten.
- eine „Roadshow“, mit der an verschiedenen Standorten der SPP-Mitglieder innerhalb von 3 Tagen verschiedene Formate (Vorträge, Laborkurse, ein *Science Café*, ein Projekt zu Kunst und Wissenschaft u. a.) angeboten werden.
- das Angebot an SPP-Mitglieder, Bürgerfragen, Interviewanfragen und andere Aufgaben mit Öffentlichkeitsrelevanz an uns zu delegieren, um die Forschung zu entlasten.
- in der Region Kassel – aber auch darüber hinaus – sowohl Lehrerfortbildungen und exemplarische Schulkurse als auch Laborkurse für die allgemeine Öffentlichkeit durchzuführen.

Der Antrag überzeugte offensichtlich die Gutachter/-innen der DFG und er wurde inklusive einer Stelle für eine wissenschaftliche Koordinatorin sowie Stundensätze für studentische und wissenschaftliche Hilfskräfte bewilligt.

Wie bei wissenschaftlichen Projekten weichen die Ergebnisse manchmal von der Planung ab. Was tatsächlich erreicht wurde, wird weiter unten beschrieben. Die erste Förderperiode des „CRISPR-Whisper“-Projekts lief erfolgreich und auch seine Fortsetzung wurde nach Begutachtung bewilligt.

Unerwartete Probleme und Lösungen

An der Universität Kassel bekam das Projekt jedoch nicht mehr die hinreichend hohe Priorität und Unterstützung. Für die zweite

Förderperiode wurde deshalb von der Sprecherin des SPP die Durchführung an der Universität Ulm beantragt.

In der Zwischenzeit hatte ich mit BioWissKomm eine Nachfolgeorganisation gegründet, die das Know-How des Vereins erhalten sollte. Auch ehemalige *Science Bridge*-Student/-innen standen als freie Mitarbeiter/-innen zur Verfügung. So wurde dann BioWissKomm mit der Durchführung der Wissenschaftskommunikation beauftragt.

Was geht gut? Was geht weniger gut?

Pläne ändern sich und müssen jeweils an die Gegebenheiten und an aktuelle Ergebnisse angepasst werden. Das kennt die DFG aus der Forschungsförderung und so war sie auch bei diesem Projekt großzügig, wenn sinnvolle Modifikationen vorgenommen wurden.

Ein ganz wesentlicher Beitrag war die Entwicklung eines einfachen, aber robusten **CRISPR-Cas-Experiments** zu Beginn der ersten Förderperiode. Dieser Laborversuch wurde in den Roadshows und bei anderen Veranstaltungen (Lehrerfortbildungen, Schul- und Öffentlichkeitskursen) sehr oft eingesetzt. Das Experiment wird inzwischen auch vielfach in anderen Schülerlaboren verwen-



ABB. 1 Comic eines gestressten Bakteriums. Das Bild wurde auch bei Laborkursen verwendet, um den Stress bei der Bakterientransformation zu zeigen. Illustration: Lukas Kummer.

det (siehe auch „Darf man in der Schule CRISPRn?“, Seite 57).

Eine **Webseite** ist für ein Wissenschaftskommunikationsprojekt unverzichtbar. Nachdem sie ansprechend eingerichtet war, begannen wir mit einfachen Artikeln zu den Grundlagen, von denen unsere breit aufgestellte Zielgruppe viele brauchte, um sich später speziellere Forschungsvorhaben aus dem SPP erklären zu können. Das lief problemlos, denn das erforderliche Fachwissen war ja im Team vorhanden. Um die aktuelle Forschungsarbeit darzustellen, brauchten wir aber Artikel der SPP-Mitglieder. Das erwies sich als schwieriger. Die Arbeitsgruppen waren zwar im Prinzip interessiert, aber die wissenschaftlichen Arbeiten hatten verständlicherweise sowohl für die Doktorand/-innen als auch für die Gruppenleiter/-innen Priorität vor der Wissenschaftskommunikation. Es gab nur sehr wenige spannende Geschichten aus dem Forschungsalltag, die sich direkt für Zielgruppen außerhalb der Wissenschaft eigneten. Interviews mit Arbeitsgruppenleiter/-innen waren zwar weniger zeitaufwändig, fanden aber auch weniger Interesse bei den Leser/-innen.

Aufwind gab es, als wir eine kleine Gruppe von drei Comiczeichner/-innen der Kunsthochschule Kassel für das Projekt begeistern konnten. Eine ganze Comicserie von Lukas Kummer fand sehr guten Zuspruch. Zusammen mit den Beiträgen der beiden anderen entstand das gedruckte Heft „**CRISPR goes Comic**“ mit vielen witzigen Zeichnungen (Abbildung 1), aber auch mit ernsthaften wissenschaftlichen Erklärungen. Die 1000er Auflage wurde hauptsächlich von Schulen und Schülerlaboren bestellt und war bald vergriffen.

Die Blogserie „**Pauline und die Ausreißer**“ beruhte auf einer unerwarteten Beobachtung in unserem CRISPR-Cas-Experiment (Abbildung 2, s. Artikel „Pauline und die Ausreißer“). Wir machten eine Fort-



ABB. 2 Blogbeitrag einer 9-teiligen Serie. Beitrag verfügbar unter <https://t1p.de/y4kf8>

setzungsgeschichte aus der Beobachtung und versuchten die Leser/-innen zu motivieren, Vorschläge für die Lösung einer echten wissenschaftlichen Fragestellung zu machen. Im Gegensatz zu vorgefertigten Experimenten mit bekanntem Resultat, sollte eine reale, offene Frage experimentell beantwortet werden, indem Hypothesen im Labor überprüft wurden. Die Laborarbeiten sollten aufgrund der Leser-vorschläge von uns im damaligen *Science Bridge*-Labor durchgeführt werden. Entgegen unserer Hoffnung wurde diese Herangehensweise an richtige Forschung von Schulen und Schüler/-innen kaum angenommen. Bei einigen Laborkursen gab es allerdings Interesse, besonders dann, wenn einzelnen Teilnehmer/-innen selbst die unerwartete Beobachtung machten. Vermutlich haben wir das Wissenschaftsverständnis und den „Forscherdrang“ an Schulen überschätzt. Es bietet sich an, in Zukunft einen stärkeren Fokus auf *Nature of Science* zu legen. Wie Wissenschaft „funktioniert“, wie man von einer Beobachtung zu einer Hypothese und dann zu einem Experiment kommt, ist nicht ausreichend bekannt. Auch in den Laborkursen fiel uns auf, dass die Teilnehmer/-innen die Notwendigkeit z. B. von Kontrollexperimenten meist erst nach einer Erklärung verstanden.

Als sehr guter Erfolg kann die Einrichtung eines **Glossars** zu den Blogartikeln gewertet werden. Die Zugriffszahlen sind unerwartet hoch, obwohl man alle Begriffe



The world of CRISPR with Khalid! - Die Genschere CRISPR-Cas9

ABB. 3 YouTube-Video von Khalid Abdullah aus einer Serie von fünf Filmen. Film verfügbar unter <https://t1p.de/4gd2f>



ABB. 4 Science Café in der Kasseler Kneipe Steckenpferd. Hier standen die Besucher/-innen teilweise auf der Straße, weil der Gastraum überfüllt war.



ABB. 5 Als S1-Labor auf dem Science Festival „Children of Doom“ diente ein angemietetes ABC-Sicherheitszelt der Bundeswehr.

auch mühelos googeln kann. Wir haben dieses Glossar jetzt wesentlich erweitert und stellen es zu diesem BiuZ-Heft, aber auch auf der

CRISPR-Whisper-Webseite zur Verfügung.

Ein weiterer glücklicher Zufall war die Begegnung mit Khalid Abdullah, einem indonesischen Biologiestudenten, der **Stopp-Motion-Videos** machte (Abbildung 3). Er drehte fünf ansprechende und informative Kurzfilme zu CRISPR-Cas und einigen, aus CRISPR-Cas entwickelten Werkzeugen, die auf der Webseite vorgestellt wurden. Die Videos erreichten bisher insgesamt knapp 10.000 Views.

Die „Roadshow“ wurde zunächst in **Kassel** mit *Science Café* (Abbildung 4), Laborkurs und „Dialogvortrag“ erfolgreich getestet. Der Dialogvortrag ist ein neues Format, in dem ein wissenschaftlicher Vortrag mit dem eines (vorgebildeten) Laien kombiniert wird. In diesem Fall erklärte der Zeichner Lukas Kummer mit Hilfe von Comics noch einmal den Fachvortrag von Prof. Lennart Randau (Universität Marburg). Die Kombination der beiden Vorträge wurde vom Publikum sehr gut angenommen.

Aufgrund guter Kontakte wurden dann drei Roadshows in Berlin durchgeführt: eine in Zusammenarbeit mit dem Naturkundemuseum, das für den Dialogvortrag (Prof. Detlef Weigel, Universität Tübingen, und die Zeichnerin Sheree Domingo, Kassel) im Sauriersaal eine großartige Kulisse für mehr als 200 Zuhörer/-innen bot. Die zweite Veranstaltung mit Prof. Dina Grohmann und Sheree Domingo im Zeiss-Planetarium und mit Unterstützung des Landesverbandes Berlin-Brandenburg im VBIO war ebenfalls sehr gut besucht.

Laborkurse wurden gemeinsam mit dem Gläsernen Labor in Berlin Buch durchgeführt. Ein *Science Café* mit der Slammerin Karla Hajman war dagegen sehr schwach besucht. Das lag keinesfalls an der Qualität des Auftritts, der in Kassel sehr guten Zuspruch gefunden hatte. Die Teilnahme an Veranstaltungen, die etwas außerhalb der üblichen Community eines wissenschaftsinteres-

sierten Publikums liegen, ist schwer vorhersehbar und hängt stärker von gezielter Werbung und von konkurrierenden Veranstaltungen ab.

Die dritte Veranstaltung in Berlin fand auf Einladung des experimentellen *Science Festivals* „Children of Doom“ statt (Abbildung 5). Dort wurde mit Hilfe der Veranstalter/-innen das wohl erste S1-Labor in einem Zelt aufgebaut, was uns erlaubte, CRISPR-Cas-Experimente mit den Festival-Besucher/-innen durchzuführen. Zusätzlich wurde das von „Wissenschaft im Dialog“ entwickelte Planspiel zum *Gene Drive* angeboten. Beide Veranstaltungen wurden von dem überwiegend jungen Publikum sehr gut angenommen und die Atmosphäre am Hafen Rummelsburg war großartig.

Als sehr großen Erfolg betrachten wir, dass bei den Laborkursen für die allgemeine Öffentlichkeit ein sehr breites Spektrum erreicht wurde. Unter den Teilnehmer/-innen waren z. B. Bauern, Verwaltungsangestellte, Ingenieure, Künstler, Ärzte, Betriebswirte etc. Sehr erfreulich war die Teilnahme von halbwüchsigen Kindern, die in Begleitung ihrer Väter und Mütter kamen. Mit diesem sehr gemischten Publikum war die Atmosphäre in den Kursen ausgesprochen freundlich, kooperativ und engagiert. Teilnehmer/-innen mit einem Hintergrund in den Geistes- und Sozialwissenschaften waren eher selten. Es ist notwendig, neue Wege zu finden, diese wichtige Gruppe in der Bevölkerung gezielter anzusprechen und zu motivieren.

In den letzten Monaten wurde die Theaterperformance „Micro* Scope“ von Miriam Flick integriert. Sie stellt mit Pantomime, Musik, Film und Tanz das Laborleben dar und beleuchtet besonders die Rolle von Frauen am Beginn ihrer Karriere in der Wissenschaft.

In den *Science Cafés* brachten wir anfangs unterhaltsame Vorträge, in den letzten Monaten aber ein mehr interaktives Format mit dem

Titel „Wir CRISPRn uns durch die Apokalypse“ (Abbildung 6). Dabei geht es satirisch, aber auch wissenschaftlich um die Frage, wie (und ob!) man Menschen gentechnisch auf verschiedene apokalyptische Szenarien vorbereiten und „optimieren“ kann/soll. Das ist ein provokativer Balanceakt zwischen ernster Wissenschaft und Wissenschaftsethik einerseits und satirischen Horrorvisionen andererseits. Das Publikum nahm diese Herausforderung sehr gut an: Es gab sowohl absurd-witzige Vorschläge als auch ernsthafte wissenschaftliche Fragen.

In der zweiten Förderperiode wurden Roadshows in Wien und Regensburg mit gutem bis sehr gutem Erfolg durchgeführt; weitere in Kiel, Ulm und Marburg sind zurzeit in Vorbereitung. Der Erfolg der Roadshows hängt sehr stark von den lokalen Partner/-innen, ihren Werbeaktivitäten und der Konkurrenz zu anderen Veranstaltungen ab. Ein Modul (z. B. Laborkurse) kann in einer Stadt frühzeitig ausgebucht sein und ist in einer anderen Stadt nur schwach belegt. Ein bestimmtes Veranstaltungsmodul aufzugeben, weil es in einer oder zwei Roadshows schlecht besucht war, ist nicht unbedingt sinnvoll. Es kann beim nächsten Mal durchaus ein Highlight werden.

In der Regel hätten wir uns eine größere Unterstützung durch die Pressestellen der Universitäten gewünscht. BioWissKomm musste lokale Medien weitgehend selbst recherchieren und anschreiben. Laborkurse wurden auch als Fortbildungen für Lehrkräfte angeboten. In manchen Fällen leistete die Didaktik der Biologie an der jeweiligen Universität hervorragende Hilfe bei der Bewerbung, in anderen Fällen weniger. Obwohl die Roadshows insgesamt als guter Erfolg zu werten sind, ist es unvorhersehbar, welche der einzelnen Module an einem bestimmten Ort guten und welche weniger guten Zuspruch finden. Ob es sich lohnt, professionelle

Werbung lokal zu engagieren, muss geprüft werden.

Den Arbeitsgruppen des SPP wurde angeboten, dass wir **Anfragen und Wünsche aus der Öffentlichkeit** bearbeiten, um die Forschung zu entlasten. Dieses Angebot wurde bisweilen, aber nicht oft aufgegriffen. Auch wiederholte Aufrufe an die Öffentlichkeit (Social Media und auf den Roadshows), uns zu kontaktieren, Meinungen zu äußern oder Vorschläge zu machen, brachten nur geringe Resonanz. In persönlichen Gesprächen – z. B. nach den Vorträgen, während der Laborkurse und während des *Science Cafés* – war das anders. Es gab gute Fragen und angeregte Diskussionen. Der direkte Kontakt auf Augenhöhe ist essenziell, um Bürger/-innen die Scheu vor der Wissenschaft zu nehmen. Wir haben deshalb nach den Vorträgen und der Theaterperformance eine „Nachsitzung“ eingerichtet. Dabei werden Getränke angeboten und die Sprecher/-innen bzw. Künstler/-innen und beteiligte Wissenschaftler/-innen stehen im Rahmen einer „Stehtparty“ für zwanglose Gespräche zur Verfügung. Dieses Konzept hat sich bei den letzten Roadshows sehr gut bewährt. In kleinen Gruppen wurde intensiv gefragt und diskutiert.

Folgen dieser Aktivitäten und der Bewerbung auf Social Media waren viele Anfragen an uns – verknüpft mit der Bitte um zusätzliche **Einzelveranstaltungen**. Dazu gehörten Lehrerfortbildungen und Vorträge an Schulen, Schüler/-innen, die Rat für Hausarbeiten suchten, Schülerlabore, die einen Austausch zur experimentellen Arbeit wünschten, Podiumsdiskussionen mit Bundestagsabgeordneten und bei politischen Parteien und vieles mehr. Ein Highlight war ein Laborkurs für Bundestagsabgeordnete, den wir in Zusammenarbeit mit dem Gläsernen Labor in Berlin durchführten.

In vielen Fällen legen von der DFG geförderte Forschungsverbände ihren Abschlussbericht in Form wissenschaftlicher Publikationen im



ABB. 6 Plakat zum Science Café „Wir CRISPRn uns durch die Apokalypse“. Abb. erstellt von BioWissKomm by Mid-journey.

Special Issue einer Fachzeitschrift vor. Wir haben mit diesem **Sonderheft der Biuz** einen zusätzlichen Weg genommen, um die spezialisierte Forschung des SPP2141 nicht nur Biolog/-innen aus anderen Fachgebieten, sondern auch der allgemeinen Öffentlichkeit zugänglich zu machen. BioWissKomm und die Redaktion der Biuz haben sich sehr bemüht, die Manuskripte, die zu einem großen Teil von wissenschaftlichen Mitarbeiter/-innen geschrieben wurden, konstruktiv zu begutachten und zu revidieren. Wir betrachten dies auch als einen kleinen „Lehrgang“, der Wissenschaftler/-innen in einer frühen Karrierestufe die Wissenschaftskommunikation näherbringt.

Fazit

Das Projekt CRISPR-Whisper ist aus unserer Sicht nicht nur ein schöner Erfolg für den SPP2141. Es ist gleichzeitig ein Experiment, das für andere Projekte zur Wissenschaftskommunikation wertvolle Hinweise liefern kann:

- Online-Angebote wie Blogs und die Bedienung von Social Media sind notwendig, können aber effektiver gestaltet werden, in-

dem z. B. Expert/-innen für Webseitenoptimierung einbezogen werden.

- Direkter, persönlicher Kontakt zur Öffentlichkeit schafft Vertrauen und Gesprächsbereitschaft. Unsere Roadshows haben sich dabei als erfolgreich erwiesen.
- Forschungskonsortien sind sehr speziell ausgerichtet. Für ein allgemeines Publikum ist viel grundlegende Information erforderlich. Wenn es zu speziell wird, verliert man viele Leser/-innen!
- Das Ziel ist, die Allgemeinheit und Menschen aus allen Bildungsschichten zu erreichen. Das In-

teresse ist zweifellos vorhanden. Es gilt jedoch, dieses Publikum zu erreichen und zu motivieren. Dies erfordert umfangreiche Pressearbeit, Werbemaßnahmen und gute, professionelle Partner/-innen aus verschiedenen gesellschaftlichen Bereichen.

- Die Kombination aus Wissenschaft und Kunst war erfolgreich und vielversprechend. Sie hat außerhalb der ohnehin wissenschaftsinteressierten Community zusätzliche Teilnehmer/-innen gewinnen können.
- Interaktive Formate (Laborkurse, *Science Café*, formlose Nachsit-

zungen) sind „Eisbrecher“ und schaffen Kommunikation.

- Der Erfolg dieses BiuZ-Sonderheftes bleibt abzuwarten. Die bisherige Nachfrage ist vielversprechend. Wir werden besonders die Klickzahlen auf die Online-Ausgabe beobachten und analysieren.
- Das Dilemma der „doppelten Qualifikation“ (Wissenschaft und Wissenschaftskommunikation) für ein Public-Outreach-Team bleibt bestehen. Dazu müssen realistische Lösungen gefunden werden.



Wolfgang Nellen,
BioWissKomm,
w.nellen@
biowisskomm.de

- ↪ **Du magst die „Biologie in unserer Zeit“ (BiuZ)?**
- ↪ **Du hast Spaß an biowissenschaftlichen Themen?**
- ↪ **Du bist kommunikativ und organisierst gerne?**

Bewirb Dich als studentisches Mitglied im Editorial Board der BiuZ!

Was kommt auf Dich zu?

- Du nimmst pro Jahr an zwei Treffen des BiuZ-Kuratoriums teil (davon eine Präsenzsitzung).
- Du beteiligst dich an der Themenfindung und bringst eigene Ideen ein.
- Zusammen mit anderen Studierenden koordinierst Du die studentischen Beiträge für die Ausgabe 3 – die besondere BiuZ zum Start des Wintersemesters.

Deine Bewerbung

...schickst Du bitte **bis zum 1. Februar 2025** an den Chief Editor der BiuZ, Prof. Dr. Wolfgang Nellen (w.nellen@biowisskomm.de). Deine Bewerbung sollte einen kurzen Lebenslauf und ein Motivationsschreiben enthalten. Überzeuge uns, warum wir Dich auswählen sollten. Vielleicht hast Du ja schon erste Ideen für die Weiterentwicklung der BiuZ?





Prominente Wissenschaftler, Philosophen, Befürworter und Gegner von Gentechnik und was sie zu Gentechnik sagen würden: Von links nach rechts, obere Reihe: Sokrates, Ingo Potrykus, Immanuel Kant, Dirk Zimmermann, Victoria Gray. Mittlere Reihe: Richard J. Roberts, Vandana Shiva, George M. Church, Jennifer Doudna, Gregor Mendel, Aristoteles. Untere Reihe: Albert Schweitzer, Hans Jonas, Christoph Then, Hugh Grant, Imperator Palpatine, Craig Venter, Konrad Ott. Collage: J. Buttlar.

Zwischen Ängsten, Chancen und Wirrungen: Ein Plädoyer für genaueres Hinschauen

Gentechnik und Ethik

JANN BUTTLAR

In Deutschland wurde in der allgemeinen Öffentlichkeit über viele Jahre eine kollektive Skepsis gegenüber dem Begriff „Gentechnik“ entwickelt. Gentechnik – vor allem grüne Gentechnik – sei unnatürlich, gefährlich und moralisch nicht vertretbar. Befürworter hingegen betonen Vorteile – etwa in Richtung Nachhaltigkeit, Wirtschaftlichkeit oder Gesundheit. Aber wie kann man zwischen Bedenken und Chancen abwägen?

Ist die Anwendung von Gentechnik ethisch vertretbar? Um es gleich vorwegzunehmen: Die Antwort ist leider alles andere als einfach. Eine allgemeingültige Antwort ist nach Ansicht des Autors praktisch sogar unmöglich. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Einerseits ist „Gentechnik“ nur ein Überbegriff für diverse Verfahrenstechniken, die in unterschiedlichsten Bereichen eingesetzt werden – ob in der Forschung, der Industrie, der Medizin, den Materialwissenschaften, der Landwirtschaft oder in anderen Bereichen. Es gilt daher, ganz unterschiedliche Situationen zu bewerten. Wenn man Gentechnik nicht schon kategorisch ablehnen würde – einige Argumente hierfür sollen später noch genannt werden – müsste man also jeden Fall

einzelnen bewerten. Andererseits gibt es eine Vielzahl von Akteuren aus z. B. Interessensverbänden, Vereinen, selbsternannten „Instituten“, der Wissenschaft sowie Unternehmen oder der Politik, die Begriffe und Kriterien unterschiedlich definieren und bewerten.

In Deutschland hat die breite Allgemeinheit in den letzten Jahrzehnten eine eher ablehnende Haltung gegenüber Gentechnik, vor allem der grünen Gentechnik, eingenommen. Der neuesten Naturbewusstseinsstudie von 2021 nach sind 70 Prozent der Befragten der Meinung, „der Mensch hat kein Recht, Pflanzen und Tiere gezielt gentechnisch zu verändern“ [1]. Das sind 14 Prozent weniger als zwei Jahre zuvor, was zeigt, dass ein Wandel im



Gänge ist – vor allem bei jüngeren Menschen, auch wenn die Ablehnung noch sehr hoch ist. Unter den meisten (Bio)-Wissenschaftlern ist die Meinung hingegen genau umgekehrt: Die Allianz der Wissenschaftsorganisationen (u. a. die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Leopoldina, Max-Planck-Gesellschaft, Fraunhofer-Gesellschaft) befürwortet z. B. gemäß dem neuen EU-Vorschlag [2] Erleichterungen im Gentechnikrecht und eine Anpassung an den Stand der Wissenschaft.

Diskussionen sind zudem oft von Emotionen wie Ängsten aufgeladen, was eine rationale Debatte erschwert. Emotionen an sich sind natürlich nicht einfach wegzudenken. Gleichzeitig mangelt es jedoch in der breiten Öffentlichkeit oft an Fachwissen, was zu Unsicherheiten führt. Die Intentionen der verschiedenen Akteure einzuschätzen – geschweige denn den Wahrheitsgehalt ihrer Aussagen – ist eine Herausforderung. Angst und Unsicherheit können jedoch nicht als einzige Kriterien in einer ethischen Debatte herangezogen werden. Wohlwissend, dass das Themenfeld riesengroß ist und einige Aspekte hier höchstens oberflächlich angerissen werden können, möchte dieser Artikel dazu einladen, sich intensiver mit dem Thema zu beschäftigen. Dabei geht es um Beispiele aus der grünen Gentechnik, also gentechnische Veränderungen an Pflanzen, und aus der roten Gentechnik, also gentechnische Anwendungen in der Medizin.

Moral und Ethik – was ist der Unterschied?

Doch zunächst einmal zu den ethischen Grundbegriffen, bevor wir uns mit den eigentlichen Argumenten beschäf-

tigen. Grob definiert bezeichnet „**moralisch**“ etwas, was man als sittlich, tugendhaft oder schlichtweg als „gut“ empfindet. Hier fließen verschiedene kulturelle Faktoren wie Erziehung, Gebräuche, Religion, gesellschaftliche Vorstellungen und Wissensstand mit ein – Faktoren, die je nach Erfahrung und individuellem Hintergrund sehr unterschiedlich sein können. Wie sehr die eigene Lebenssituation einen ethischen Standpunkt beeinflussen kann, hängt zudem von der persönlichen Betroffenheit ab. Als Beispiel sei genannt: Jemand, der an einer Krankheit leidet, würde einen gentechnischen Eingriff am Menschen sicherlich eher befürworten, wenn davon seine Gesundheit abhinge.

Die **Ethik** ist wiederum lediglich die Lehre von sittlichem Verhalten, also die Wissenschaft, die sich mit dem Moralischen auseinandersetzt. Sie unterteilt sich in verschiedene Disziplinen: Die **deskriptive Ethik** beispielsweise untersucht, was in einer bestimmten Gesellschaft zu einem bestimmten Zeitpunkt moralisch vertretbar ist und welche Werte und Normen dabei gelten.

Bei der **Metaethik** hingegen geht es darum, ob eine Frage überhaupt ethisch geklärt werden kann. Hier könnte man sich fragen, wie viel man überhaupt wissen kann oder ob es überhaupt jenseits der subjektiven Realität andere Realitäten und Werte geben kann. Dazu werden auch Sprachanalysen betrieben und verwendete Begriffe wie beispielsweise „gut“, „schlecht“, „Freiheit“, „Sicherheit“, „Natur/Natürlichkeit“ oder „Nachhaltigkeit“ überhaupt erst einmal definiert.

Jedoch soll es im Folgenden vor allem um eine dritte Disziplin, nämlich die **normative Ethik**, gehen, die unabhängig von dem Ist-Zustand nach dem sucht, *wie es sein soll*. Dazu stellt sie Werte und Normen auf. Innerhalb der normativen Ethik ist hier für uns die **angewandte Ethik** besonders interessant, die versucht, pragmatische Antworten auf konkrete Fragen zu liefern und dazu mit Prinzipien und Argumenten arbeitet, die immer wieder gegeneinander abgewogen werden. Gewöhnlich können Argumente dabei entweder einer deontologischen oder teleologischen Ethik zugewiesen werden, was wir in Hinblick auf Gentechnik ausführen werden.

In der **deontologischen Ethik** (griechisch δέον (*deon*) = „das Erforderliche; die Pflicht“) geht es nicht um die Konsequenzen einer Handlung, sondern darum, ob eine Handlung intrinsisch, also „in sich“ ethisch vertretbar ist oder nicht. Ethiker reden hier oft von Pflichtethik und intrinsischen Bedenken. Im Sinne von Immanuel Kants kategorischem Imperativ könnte dies bedeuten, dass man niemals lügen sollte, weil Lügen an sich einfach „schlecht“ ist – selbst, wenn ein Mörder einen fragt, ob man eine von ihm bedrohte Person im Haus versteckt.

In der **teleologischen Ethik** (gr. *télos* = „Ziel“) hingegen werden lediglich die Folgen betrachtet und man wertet Risiken und Vorteile miteinander ab. Ethiker reden hier auch von Konsequentialismus und extrinsischen Bedenken. Im Sinne des Utilitarismus („gut ist, was nutzt“,

IN KÜRZE

- Gentechnik, vor allem die grüne Gentechnik, ist in Deutschland sehr umstritten. Um jedoch auf eine inhaltliche Ebene zu kommen, hilft es, **Begriffe, Werte, Chancen und Risiken zu definieren und abzuwägen**.
- In der ethischen Diskussion unterscheidet man zwischen **deontologischen und teleologischen Argumenten**.
- **Deontologische oder auch „intrinsische“ Argumente** betrachten nicht die Folgen einer Anwendung, sondern **die Handlung „in sich“**. Dies beinhaltet Bedenken, die Gentechnik **kategorisch ablehnen** würden, wie bspw. **Natürlichkeit von Organismen, Integrität von Genomen, Artüberschreitung oder Technizismus**. Oftmals wird diesen Argumenten jedoch vorgeworfen, dass sie **realitätsfern** seien. Beispielsweise kommen Mutationen und Artüberschreitungen auch in der Natur vor und ein kompletter Verzicht auf Technologien würde nicht hinnehmbare Folgen für unsere Gesellschaft haben.
- Bei **teleologischen oder „extrinsischen“ Argumenten** stehen **Folgen wie Risiken und Chancen von gentechnischen Anwendungen** im Mittelpunkt. Hier werden Unsicherheiten und Risiken traditionell oftmals mehr Raum gegeben als Vorteilen. Fraglich ist jedoch, ob das bloße Vorhandensein von Risiken (die nicht die Größe eines Schadens, sondern nur die Wahrscheinlichkeit eines Eintretens betrachten) als Argument reicht, oder ob auch das **Unterlassen einer Technologie**, die potenziell Gutes (Leben retten, Nachhaltigkeit, Biodiversität) bewirken könnte, ethisch vertretbar wäre.
- Um zu einer ethischen Entscheidung zu kommen, können schließlich verschiedene Moraltheorien, Werte und Prinzipien diskutiert werden. Klar wird, dass es **keine globale einheitliche ethische Beurteilung** geben kann, eine Diskussion dennoch zur Bildung der eigenen Meinung sehr wertvoll ist.

oder „der Zweck heiligt die Mittel“) könnte man beispielsweise sagen, dass eine Lüge erlaubt wäre, wenn man bei dem genannten Beispiel das Leben der versteckten Person schützt.

Deontologische Ethik und intrinsische Bedenken

Natürlichkeit von Organismen

Ein oftmals vorgebrachtes Argument ist die Natürlichkeit von Lebewesen, die als „gut“ und wertvoll angesehen wird. Werden Lebewesen durch Menschen künstlich verändert, seien sie jedoch nicht mehr natürlich; eine gentechnische Veränderung wäre damit „schlecht“. Man könnte sagen, dass veränderte Organismen dadurch weniger wert oder zumindest in ihrer Natürlichkeit gestört wären. Problematisch ist allerdings, dass „Natürlichkeit“ kein klar definierter Begriff ist (Abbildung 1). Kulturhistorisch bedingt finden sich hier unterschiedliche Vorstellungen, die weit über biologische Aspekte hinausgehen und teils symbolischen Charakter haben. Dabei werden in unserer Gesellschaft heutzutage vor allem positive Begriffe wie Harmonie, Nachhaltigkeit, Unversehrtheit und eine gewisse (wenn auch chaotische) Ordnung mit „Natur“, dem Wortstamm der „Natürlichkeit“, in Verbindung gebracht. „Natürlichen“ Dingen bringt man somit ein intuitives Vertrauen entgegen, das (meistens) ein Gefühl von Sicherheit schafft. Dass dieses Bild jedoch nicht nur subjektiv ist, sondern sich auch im Laufe der Jahrhunderte stark änderte, verdeutlicht die „Zähmung“ der Natur durch Landwirtschaft und Wissenschaft: Vor der Domestizierung von Wildtieren und der Entwicklung von Kulturpflanzen könnte „Natur“ vor allem eher als Herausforderung gesehen werden, die es zu überleben und der es etwas Essbares abzurufen galt. Krankheiten, die Menschen, Tiere und Pflanzen befielen und noch bis ins 18. Jahrhundert (und teilweise heute) zu katastrophalen Missernten oder Pandemien führten, wurden als Bedrohung empfunden – selbst wenn sie einen „natürlichen“ Ursprung hatten.

Technizismus

Oft verbunden mit der Ablehnung von künstlichen, „unnatürlichen“ Veränderungen sind zudem Vorbehalte gegen Technologien im Allgemeinen, da sie den Menschen immer mehr von der Natur entfernen würden. Diese Bedenken sind immanent mit dem Begriff „Gentechnik“ verbunden, da „Technik“ ja bereits im Namen steckt. Ein wichtiger Aspekt von Technik und Technologie im Allgemeinen ist dabei der Fortschritt, wobei die angestrebte Optimierung von Prozessen oder Produkten zu einer ständigen Verbesserung und sogar zu einer regelrechten Entwicklungsspirale führen kann. Bedenken sind dann, dass Entwicklungen aus dem Ruder laufen können und dass komplizierte Technologien – sofern sie gut etabliert sind – von der breiten Masse angewendet werden können, obwohl die Theorie hinter den Anwendungen nur von einem kleinen Teil der Bevölkerung

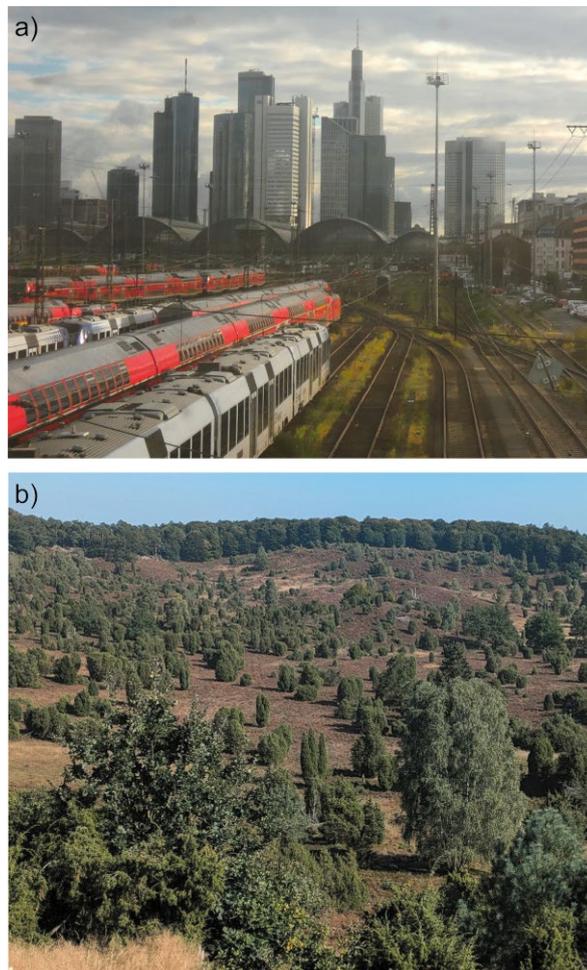


ABB. 1 Das Problem der Natürlichkeit. Auf welchem Bild hat der Mensch bewusst in die Natur eingegriffen? Die Antwort lautet: auf beiden! Die Lüneburger Heide verdankt ihre Erscheinung einer extensiven Beweidung beispielsweise durch Heidschnucken, ohne die dort dichter Wald wäre. Wo ist also die Grenze zwischen „natürlich“ und „künstlich“? Fotos: Frankfurt Skyline – J. Buttler, Lüneburger Heide – S. Calliebe.

verstanden wird. Dies kann wiederum zu Unsicherheiten, Gefühlen von Kontrollverlust und zu einer Undurchsichtigkeit von Prozessen führen. Schließlich ist noch die Zwecklichung von Lebewesen ein intrinsisches Bedenken, sofern ein Subjekt mit Hilfe einer Technologie ein anderes Lebewesen modifiziert und dieses somit zum Objekt macht und damit beispielsweise die ursprünglichen „Zwecke“ des Objekts verändert.

Demut vor dem Telos von Lebewesen

Bioethiker (und vor allem Biozentristen) argumentieren oft, dass jedes Lebewesen an sich einen intrinsischen, also einen „inneren Wert“ hat. Dieser ist losgelöst von Zwecken Dritter, sondern der Wert dient nur als Zweck an sich selbst. Eng damit verbunden ist das „Telos“ eines Lebewesens. Ein „Telos“ beschreibt dabei eine von innen kommende Zielgerichtetheit, wie beispielsweise das Bestreben von Pflanzen zu wachsen und sich zu vermehren – also alles, was zum Wohl oder der Ausbreitung des Organismus und seiner Art führt. Nun besteht ein Argument von Gentechnikgegnern darin, dass das inhärente Telos durch Gentechnik verändert beziehungsweise in Frage gestellt wird.



Problematisch ist dabei, dass man zunächst einmal ein Telos definieren muss, es als Mensch jedoch durchaus schwierig sein kann, sich in andere Arten hineinzusetzen, um Bedürfnisse und Ziele einer anderen Art zu formulieren. In der grünen Gentechnik könnte man sich fragen: Woher kann ein Mensch wissen, wie sich eine Pflanze fühlt? Haben Pflanzen überhaupt Bedürfnisse und Ziele? Jedoch wäre dies eher ein Problem der Metaethik. Halten wir aber fest, dass in vielen Fällen das vermutliche Telos durch gentechnische Modifikationen nicht unbedingt gestört, sondern teilweise sogar befördert werden könnte: In der grünen Gentechnik dienen gentechnische Eingriffe oftmals eher einem besseren Wachstum oder der Verbesserung von Resistenzen gegen Schädlinge.

Anders wäre es jedoch beispielsweise, wenn gentechnische Veränderungen zu einer Verminderung der Fitness oder gar zu einer Unfruchtbarkeit und somit zum Aussterben eines Organismus oder von ganzen Arten führen. Dies ist der Fall bei *gene-drive*-Anwendungen, durch die krankheitsübertragende Mücken ausgerottet werden sollen. Aussetzungen ins Freiland fanden bereits 2014 in Brasilien statt, um Dengue- und Zika-Virus-Infektionen einzudämmen,

sowie 2024 in Afrika, um die Übertragung von Malaria einzudämmen. Das Besondere an *gene-drive*-Anwendungen ist, dass die gentechnischen Veränderungen je nach Konstrukt nur an männliche Mücken weitergegeben werden, während die weiblichen Larven sterben. Der Vorteil ist, dass die entsprechenden Gene länger in der Population verbleiben und nicht immer neue veränderte Mücken ausgesetzt werden müssen.



ABB. 2 Anwendung von CRISPR am Menschen. Victoria Gray, der erste Mensch weltweit, der durch eine CRISPR-Cas-Behandlung von Sichelzellenanämie geheilt wurde. Das Foto entstand 2023 bei ihrer Rede auf dem dritten internationalen Treffen zu Genomeditierung am Menschen in London. Foto: Syriol Jones/ The Royal Society.

Telos und Wahlfreiheit des Menschen

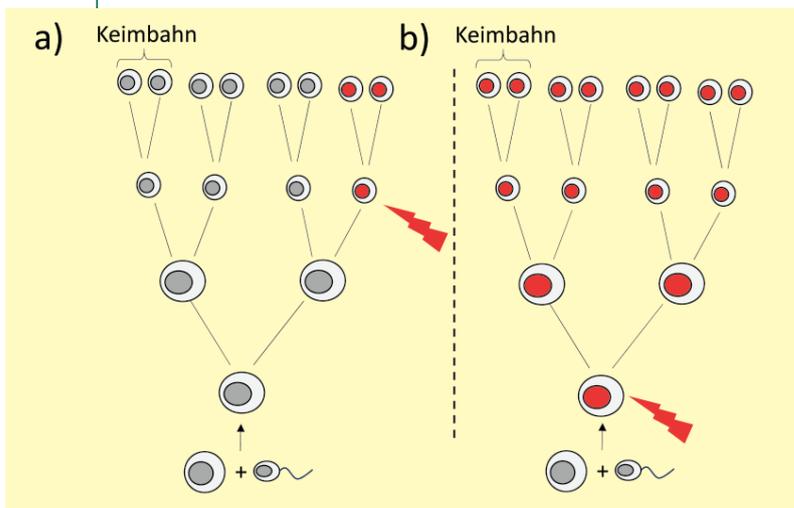
Bei gentechnischen Veränderungen am Menschen unterscheidet man zwischen therapeutischen Anwendungen zur Behandlung von Krankheiten und *Human Enhancement*, also der „Verbesserung“ von Eigenschaften des Menschen. Therapeutische gentechnische Anwendungen gibt es bereits seit einigen Jahrzehnten. Die ersten Genthapien wurden bereits 1989 durchgeführt. Am häufigsten ging es um die Behandlung von Krebs, am zweithäufigsten um monogenetische Krankheiten, also

Erbkrankheiten, die durch die Veränderung von nur einem einzigen Gen entstehen. Selbst CRISPR-Cas wurde bereits erfolgreich am Menschen durchgeführt (Abbildung 2).

In Bezug auf das Telos des Menschen, das mindestens genauso viele Aspekte aufweist wie das einer Pflanze, könnte man hier argumentieren, dass eine therapeutische Anwendung ethisch gerechtfertigt wäre, da sie Leid verhindert und eher zum Wohlbefinden eines Individuums führt. Wichtig ist hierbei, dass bei allen therapeutischen Anwendungen die Menschen sich trotz der Risiken bewusst für die Behandlung entscheiden.

Anders sieht es aus, wenn man befruchtete Eizellen oder Embryonen zur Verbesserung von Eigenschaften oder zur Reparatur genetischer Defekte gentechnisch verändern würde (Abbildung 3). Im Gegensatz zu somatischen Eingriffen, bei denen nur bestimmte Gewebe oder Körperzellen eines Menschen verändert werden, und es technisch unmöglich ist, alle Zellen zu modifizieren, kann eine gentechnische Anwendung in der Keimbahn alle Zellen des Körpers betreffen. Technisch gesehen bringt das zwar Vorteile, ethisch jedoch Herausforderungen. Hier könnte man erstens diskutieren, ob das Telos des Menschen in der Umsetzung seiner Ziele bestärkt wird oder ob der Mensch dadurch verzwecklicht wird – beispielsweise indem man besonders starke Menschen „züchtet“, die in körperlich anstrengenden Berufen eingesetzt werden sollen. Oder indem man Eigenschaften ver-

ABB. 3 | MODIFIKATION VON SOMATISCHEN VS. KEIMBAHZZELLEN



a) Bei der Modifikation von somatischen Zellen (Körperzellen) am Menschen, beispielsweise an Knochenmarkszellen, findet sich die Veränderung nur in dem behandelten Gewebe. Nachkommen dieser Menschen sind nicht von der Veränderung betroffen. b) Findet die Modifikation jedoch direkt nach der Befruchtung der Eizelle statt, so sind alle Zellen des heranwachsenden Menschen betroffen – auch die Keimbahnzellen. Nachkommen würden die Modifikation ebenfalls tragen. Abb.: J. Buttlar.

bessert, die einen „Super-Soldaten“ hervorbringen würden – eine Vorstellung, die Wladimir Putin bereits 2017 während eines Jugend- und Studentenfestivals in Sotschi äußerte [3].

Zweitens hat man das Problem, dass der Mensch zum Zeitpunkt der Modifikation – also als Embryo – nicht mündig ist. Hier ergeben sich Probleme mit Werten wie dem Recht auf Selbstbestimmung und der Wahlfreiheit. Menschen nehmen dabei insofern eine besondere Rolle ein, da ihnen im Gegensatz zu Pflanzen und den meisten Tieren ein ausgeprägtes Bewusstsein und die Gabe zur Selbstreflexion gegeben ist. Für Menschen ist das Recht auf Selbstbestimmtheit, individuelle Entfaltung und auf freie Entscheidungen somit ein hohes Gut. Im Gegensatz zu therapeutischen Eingriffen an erwachsenen Menschen würde man dem entstehenden Menschen die Wahlfreiheit nehmen, ob er überhaupt diese Veränderung möchte. Die veränderten Eigenschaften unterliegen somit der Willkür der Eltern beziehungsweise des behandelnden Arztes. Auch für die Gesellschaft könnten gentechnische Eingriffe in der Keimbahn Folgen haben – doch dazu später mehr.

Unveränderlichkeit von Molekülen und Artgrenzen

Des Weiteren ist die „**Unveränderlichkeit von Genomen**“ ein kategorisches Argument gegen Gentechnik. Hier geht es darum, dass genetische Veränderungen (die ja das Ziel von Gentechnik sind) im Allgemeinen nicht zulässig wären, weil Genome eine sogenannte Integrität hätten. Dies bedeutet, dass man nicht nur Respekt und Demut vor einem lebendigen Organismus (wie im vorherigen Abschnitt), sondern bereits vor einer genetischen Sequenz einer Art oder eines Individuums haben sollte, weil sie an sich wertvoll sei. Dies ist eines der Hauptargumente der internationalen Vereinigung der ökologischen Landbaubewegungen (IFOAM = *International Federation of Organic Agriculture Movements*), die gentechnisch veränderte Pflanzen strikt ablehnt [4]. Allerdings könnte man hier mit dem Umweltethiker Konrad Ott entgegenhalten: „Genetische Programme sind bewusstlos kodierte Information. Ein genetisches Programm kann nicht gedemütigt, gekränkt oder beleidigt werden“ [5]. Zudem lässt sich dieses Argument nicht mit der Evolution in Einklang bringen. Gäbe es keine Mutationen, gäbe es auch keine Evolution und wir würden bestenfalls als präbiotische Moleküle in der Ursuppe herumschwimmen. Genome sind nicht in Stein gemeißelt, sondern seit jeher zu einem gewissen Teil dynamisch.

Schließlich sei erwähnt, dass Kritiker meinen, dass eine **Artüberschreitung** ethisch nicht vertretbar wäre, weil sie nicht in der Natur vorkommt. Artüberschreitungen finden bei der Herstellung transgener Organismen statt, bei denen Gene von einer anderen Art auf den Zielorganismus hinüber („*trans*“) transferiert werden. Beispielsweise werden bei der Generierung von gentechnisch modifizierten Organismen oftmals Antibiotikaresis-

tenzen als Marker übertragen oder eben ganz neue Gene, die die Bildung bestimmter Stoffwechselprodukte ermöglichen. Das Argument, dass Artüberschreitungen in der Natur nicht vorkommen, ist allerdings nicht ganz haltbar, da man mittlerweile Vorgänge aus der Natur kennt, bei denen Organismen der gleichen, aber auch verschiedener Arten über **horizontalen Gentransfer** Gene oder Genfragmente austauschen. Dies findet regelmäßig bei Bakterien untereinander statt, aber ebenso zwischen Bakterien und Pflanzen (beispielsweise über das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*, das auch im Labor verwendet wird, Abbildung 4b) und hin und wieder sogar zwischen Bakterien und Tieren. Überdies spielen Viren beim horizontalen Gentransfer eine wichtige Rolle. Man nimmt sogar an, dass ein großer Teil des menschlichen Genoms (etwa 44 %) ursprünglich auf virale Sequenzen zurückgeht, die sich dann weiter ausbreiteten [6]. In den letzten Jahren wird zunehmend häufiger horizontaler Gentransfer zwischen Pflanzen und Tieren (Wirt und Parasit) beobachtet oder vermutet [7]. Selbst in der konventionellen Züchtung, (beispielsweise beim Pfropfen von Obstbäumen, Abbildung 4a) ist horizontaler Gentransfer nachgewiesen.

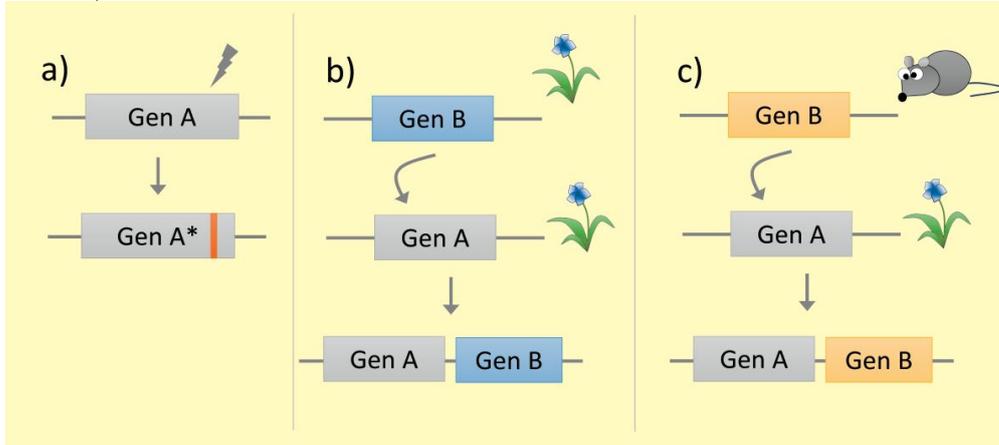
Ein weiterer Punkt ist, dass die Artdefinition und somit die Abgrenzung zu anderen „Arten“ mit zunehmender Kenntnis von molekularbiologischen Vorgängen und dem Aufbau von Genomen deutlich komplizierter geworden ist. Es wird deutlich, dass der Artbegriff eher ein wissenschaftliches Konstrukt zur Ordnung von Organismen ist als eine natürliche Kategorie. Irrelevant ist dieser Punkt übrigens bei **intragenischen** Modifikationen (Abbildung 5), bei denen einzelne Basen oder Sequenzen innerhalb des Genoms eines Organismus verändert oder gelöscht werden, sowie bei **cisgenischen** Modifikationen, bei denen Gene oder Genfragmente von anderen Organismen der gleichen Art übertragen werden.



ABB. 4 Horizontaler Gentransfer in der Natur. Ein HGT zwischen verschiedenen Arten kann beim Pfropfen oder Veredeln von Kernobstsorten (a), aber auch natürlicherweise bei der Infektion von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens*, die knollige Wucherungen auslöst (b), vorkommen. Fotos: a) <http://kentorchards.org.uk/advice/grafting/grafting-and-budding-methods/>, (CC BY-NC 4.0), b) S. Nelson (CC0).



ABB. 5 | VARIANTEN VON GENTECHNISCHEN VERÄNDERUNGEN



Bei intragenischen Modifikationen (a) werden in dem betreffenden Gen direkt einzelne oder mehrere Basen gelöscht, hinzugefügt oder verändert. Bei intergenischen Modifikationen (b) werden Gene oder Genfragmente aus der gleichen Art übertragen. Bei transgenen Modifikationen (c) werden Gene oder Fragmente (sogenannte Transgene) aus einer fremden Art übertragen. Man spricht von transgenen Organismen. Abb.: J. Buttlar.

ein Selbstverständnis des Menschen und außerdem um ein Verhältnis zu einer übernatürlichen (und übermächtigen) Wesenheit und ihrer Schöpfung. Der Ausspruch in der Alltagsmoral, dass man nicht „Gott spielen“ soll, bezieht sich dabei vor allem auf die durch Technologien erhöhte Macht des Menschen – beziehungsweise, dass man sich anmaßt, alle Konsequenzen seiner Taten wie ein Gott vorhersehen zu können. Insgesamt haben Religionen vor allem einen wichtigen Einfluss auf das Zusammenleben von Menschen und vermitteln grundlegende Moralvorstellungen gegenüber anderen Menschen und der „Schöpfung“. In den christlichen und auch in anderen Religionen meint „Schöpfung“, dass alles Existierende – unsere Welt und das Universum – von Gott geschaffen wurde

und von sich aus „gut“ ist. Einigen Theologen zufolge ist diese Schöpfung jedoch noch nicht von Anfang an vollkommen oder statisch, sondern auch zur Entwicklung fähig [8]. Der Mensch – ebenfalls als Teil der Schöpfung – habe dabei den Auftrag, die Schöpfung nicht nur zu bewahren, sondern auch weiterzuentwickeln und zu gestalten (Abbildung 6).



ABB. 6 Wenn Religion auf Wissenschaft trifft: Bei einem Treffen von dem Golden Rice-Miterfinder Ingo Potrykus und Papst Franziskus am 07. November 2013 im Vatikan gab letzterer dem Golden Rice seinen persönlichen Segen. Zwar muss man hier zwischen einem persönlichem und einem offiziell vom Vatikan unterstützten Segen unterscheiden, doch ist diese positive Haltung des höchsten Vertreters der katholischen Kirche (und zugleich gelerntem Chemietechnikers) bemerkenswert. Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Humanitarian Board Golden Rice, <http://www.goldenrice.org/>

Kritik an deontologischen Argumenten

So wertvoll und wichtig Argumente aus der deontologischen Ethik sind, so sind sie dennoch nicht unantastbar. Ganz im Gegenteil: Ein häufiger Vorwurf ist, dass die deontologische Ethik sehr realitätsfern sei. Wie bereits erwähnt, ergibt sich nämlich das Problem, dass viele Begriffe, auf die sich die deontologische Ethik stützt, nicht klar zu definieren sind. Dazu zählen „Natürlichkeit“, „Künstlichkeit“, „Telos“, „Verantwortung“, „Naturgesetze“, „Schöpfungsauftrag“ und „Würde“. Andererseits würden sich weitreichende Folgen ergeben, sofern man einige Argumente der Pflichtethik in aller Konsequenz umsetzt, so wie es der Kant'sche kategorische Imperativ fordert.

Würde man aus Gründen der Natürlichkeit von Arten und aus Achtung vor der molekularen Integrität von Genomen beispielsweise auf künstlich veränderte Pflanzen verzichten, so müsste man ebenso die konventionelle Pflanzenzüchtung (im Prinzip jegliche Züchtung) unterlassen, da sie ebenfalls auf der Veränderung von Genomen, auf zufälligen Mutationen, auf Durchmischung von Genomen und Rekombinationsereignissen beruht. So gut wie alle Kulturpflanzen (Abbildung 7), die wir heute kennen, unterscheiden sich morphologisch und genetisch deutlich von ihren ursprünglichen Wildformen, die meist wenig ertragreich und zudem voll von Bitterstoffen und Giften

Religiöse Bedenken und Schöpfung bewahren

Weiterhin müssen religiöse Bedenken erwähnt werden, zumal sie kulturell bedingt auch in die nicht religiöse Argumentation einfließen. Dabei geht es weniger um eine direkte Kritik durch historische religiöse Schriften, da weder Bibel, Talmud oder Koran zu ihrer jeweiligen Entstehungszeit von Gentechnik wussten. Vielmehr geht es um



ABB. 7 Gentechnik im Alltag. Durch Gentechnik hergestelltes (rekombinantes) Humaninsulin und Insulinanaloge helfen gegen Diabetes mellitus. Aber auch die rote Grapefruit sowie fast alle Braugerste- und Hartweizensorten, aus denen in Deutschland Bier hergestellt wird, gehen auf ungerichtete Mutagenese und damit Gentechnik zurück.

Fotos: Insulinanalog – U. Schneider, rote Grapefruit & Bier – J. Buttler.

und daher weder schmackhaft noch bekömmlich waren. Über 10.000 Jahre kultivierte, kreuzte und selektierte der Mensch sehr sorgfältig Pflanzen, bis die heutigen Sorten entstanden. In der „Natur“ wären die heutigen Kulturpflanzen also niemals entstanden. Bei konventionellen Züchtungsmethoden handelt es sich also ebenfalls um „Techniken“, mit denen der Mensch künstlich Arten verändert. Ein Verzicht wäre unvorstellbar.

Ein interessantes Beispiel zur Gentechnik stellt die Bierbraukultur (Abbildung 7) in Deutschland dar, die in der Vermarktung auf symbolische Bilder von Reinheit, Vertrauen und Natürlichkeit setzt: Fast alle Braugerste- und Hartweizensorten hierzulande gehen auf Mutagenesezüchtung zurück. Dabei handelt es sich eindeutig um Produkte der Gentechnik. Jedoch werden sie gesetzlich wie „konventionell produziert“ behandelt, weil sie bereits sehr lange im Umlauf sind und aus der Erfahrung keine Gefahr von ihnen ausgeht. Verallgemeinert könnte man daraus schließen, dass frühere Züchtungen und Mutageneseprodukte zum damaligen Zeitpunkt vielleicht ethisch fragwürdig waren, durch die Erfahrung aber eine ethische Legitimation erhalten haben.

Würde man schließlich aufgrund von technizistischen Bedenken die Verwendung von Technologien insgesamt stoppen, hätte dies dramatische Auswirkungen auf die gesamte Menschheit. Würde man lediglich die Entwicklung neuer Technologien verbieten, würde dies einen Stillstand von Forschung und Entwicklung bedeuten und drängende Entwicklungen zur Ernährungssicherheit, Energiewende oder zu Pflanzen, die an den Klimawandel angepasst sind, deutlich verzögern. Wäre es ethisch, auf Entwicklungen zu verzichten, die Menschenleben retten könnten oder zur Nachhaltigkeit beitragen, nur weil sie „neu“ und „technologisch“ sind?

Teleologische Ethik und extrinsische Bedenken

Würde man Gentechnik nicht aus den vorherigen Gründen kategorisch ablehnen, dann blieben immer noch extrinsische Bedenken und Argumente, bei denen

es vor allem um die Folgen und Risiken, aber auch um die Vorteile geht. In den folgenden Absätzen dienen vor allem Beispiele aus der grünen Gentechnik zur Verdeutlichung.

Präzision und Eingriffstiefe

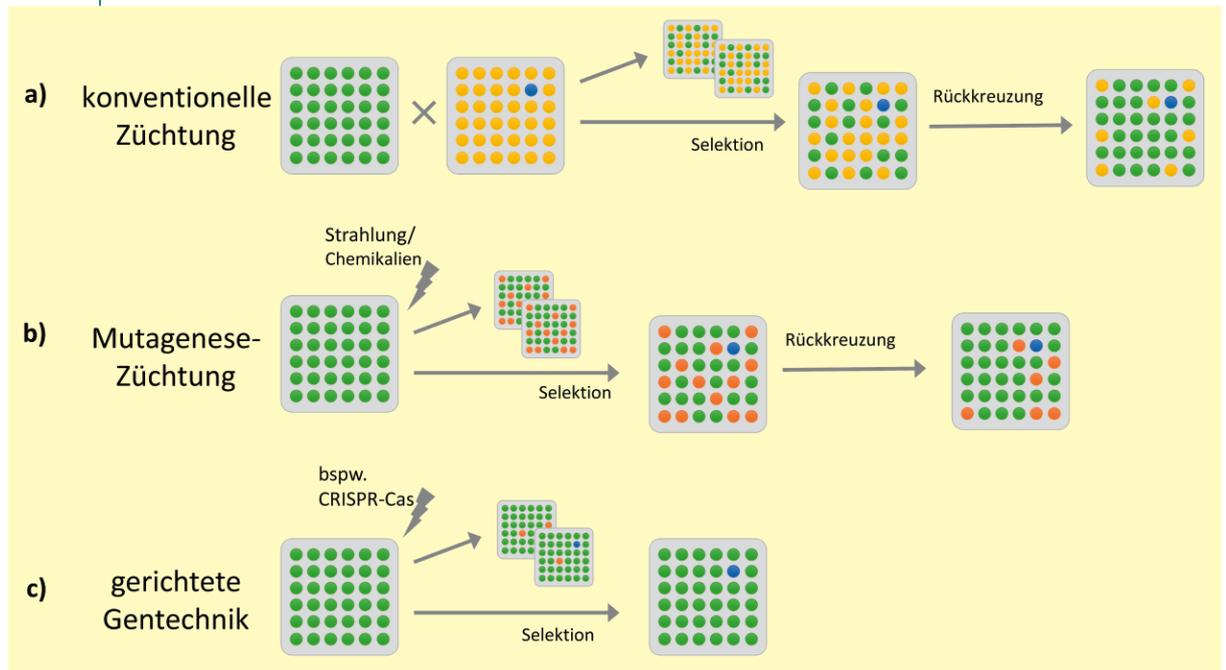
Ein wichtiges Bedenken betrifft die **Präzision** einer gentechnischen Anwendung und dass man nicht vorhersehen kann, was in dem Organismus sonst noch verändert wird (Abbildung 8). Verbunden damit ist oft eine Angst vor einer ungewollten Ausbreitung der Mutation und deren Folgen für andere Organismen und Ökosysteme. Das Argument der Präzision gilt besonders für die ungezielte Mutagenese, die in den 1960er und 1970er Jahren durchgeführt wurde. Auch bei anderen älteren molekularbiologischen Techniken konnte man den Ort der Modifikation nicht genau vorherbestimmen. Indem ungewollt weitere Gene unterbrochen oder modifiziert werden, können sogenannte **off-target-Effekte** entstehen. Mit neueren Methoden wie CRISPR-Cas können jedoch – in Abhängigkeit von der Einzigartigkeit der „programmierten“ Zielsequenz – sehr genaue Schnitte und Modifikationen gesetzt werden. Zudem können mit den heutigen Technologien ganze Genome sehr kostengünstig sequenziert und auf **off-target-Effekte** untersucht werden. Dabei werden ebenfalls natürlicherweise auftretende Mutationen entdeckt, die mitunter häufiger als **off-target-Effekte** und von diesen oft nicht unterscheidbar sind.

Gesundheitliche Bedenken durch gentechnisch veränderte Nahrungsmittel

Ein weiteres extrinsisches Argument ist der Einfluss von gentechnisch veränderten Pflanzen auf die **Gesundheit** des Konsumenten – also Tieren inklusive Menschen. In der Forschung und bei der Sicherheitsbeurteilung werden daher gentechnisch veränderte Pflanzen genauer überprüft als konventionelle Züchtungen. Beim Vergleich der amerikanischen Bevölkerung, die in großem Umfang gentechnisch veränderte Nahrungsmittel konsumiert, mit der europäischen, die nur sehr wenig GVO (gentechnisch



ABB. 8 | VERSCHIEDENE ZÜCHTUNGSMETHODEN BEI PFLANZEN



Bei der konventionellen Züchtung (a) versucht man durch Kreuzen mit anderen Sorten der gleichen (oder selten fremden) Art gewünschte Merkmale (blau) zu übertragen. Die Nachkommen werden auf das erwünschte Merkmal selektiert und für Rückkreuzungen verwendet, um andere eingebrachte unerwünschte Merkmale (gelb) wieder zu beseitigen. Bei der ungerichteten Mutagenese (b) entsteht durch Strahlung oder Chemikalien eine Vielzahl von Mutationen (orange), die ebenfalls ausselektiert und eventuell zurückgekreuzt werden. Neue gentechnische Methoden (c) hingegen sind sehr präzise. *Off-target*-Effekte – und somit unerwünschte Merkmalsvarianten – treten hier deutlich seltener auf, können aber auch ausselektiert werden. Abb.: J. Buttler.

veränderte Organismen)-haltige Nahrung konsumiert, fanden Studien jedoch keinerlei Einfluss auf die Gesundheit [9]. Anders kann es sich hingegen bei transgenen Pflanzen verhalten, die so modifiziert wurden, dass sie zusätzliche Stoffe enthalten. Ein Beispiel ist der *Golden Rice*, der entwickelt wurde, um Vitamin-A-Mangel zu bekämpfen. *Golden Rice* enthält eine große Menge an Provitamin-A, einer Vorstufe von Vitamin A, die den Reis gelblich wirken lässt. Ebenso wie bei Anthocyan-reichen Tomaten wurden bei der Überprüfung positive Gesundheitseffekte festgestellt. Eventuelle negative Nebeneffekte könnten nur in Langzeitstudien mit sehr großen Kohorten festgestellt werden.

Gentechnik, Ökolandbau und große Firmen

Im ökologischen Biolandbau wird Gentechnik strikt abgelehnt (Abbildung 9). Einige der wichtigsten Argumente, die „Integrität molekularer Sequenzen“ sowie die „Künstlichkeit“, widersprechen jedoch wissenschaftlichen Erkenntnissen über die Evolution beziehungsweise konventionelle

Züchtungsmethoden. Was spricht also dagegen, gentechnisch hergestellte Pflanzen mit ökologischem Landbau zu kombinieren? Immerhin ist es ein gemeinsames Ziel vieler Forscher und des Biolandbaus, Kulturpflanzen nachhaltiger zu machen.

Neben den hier genannten intrinsischen und extrinsischen Bedenken liegt ein Problem darin, dass Gentechnik oftmals automatisch mit intensiverer Landwirtschaft und mit einem erhöhten Einsatz von Pestiziden in Verbindung gebracht wird. Auch wird der kapitalistisch kommerzielle Umgang mit Patenten und Saatgut kritisiert, der Kleinbauern wirtschaftlich von den Herstellern abhängig machen und die Produktionskosten beeinflussen könnte. Es handelt sich hier also um wirtschaftliche und soziale Bedenken, die als Folge von Firmen- und Patentpolitik angesehen werden können. Gentechnik an sich muss jedoch nicht automatisch damit in Verbindung gebracht werden: Genauso könnte man an öffentlichen Forschungseinrichtungen die Entwicklung von Sorten fördern, die besser an den Klimawandel angepasst sind und zum Klimaschutz beitragen. Dies geschieht zwar, hat für den Markt in Deutschland aufgrund der gesetzlichen und gesellschaftlichen Ablehnung jedoch kaum Relevanz. Neuere Techniken sind zudem so günstig, dass selbst kleine Firmen sich diese leisten können, was zu einer regelrechten Demokratisierung der Technik führen kann.



ABB. 9 Gentechnik und „Öko“. Die Ablehnung von Gentechnik im Ökolandbau, dem sich auch der Anbauverband Bioland verpflichtet fühlt, ist groß. Auf diesem Schild wird direkt das extrinsische Bedenken durch Patente genannt. Foto: J. Buttler.

Gerade nach der Etablierung der CRISPR-Cas-Methodik wurden in der Gentechnik neue Akzente gesetzt. Wurde bisher überwiegend mit Transgenen gearbeitet, die Insektizide ersetzen oder Toleranz gegenüber synthetischen Herbiziden vermitteln, so wird heute verstärkt auf Cisgenese gesetzt. Dabei sollen Pflanzeigenschaften wiederbelebt werden, die natürliche Resistenzen gegen Fraßfeinde sowie bessere Nährstoff- und Wasserverwertung erlauben. Vielfach sind diese Eigenschaften bei konventionellen Kreuzungen unbemerkt verloren gegangen.

Der ehemalige Direktor des schweizerischen Forschungsinstituts für biologischen Landbau (FiBL), Urs Niggli, beschäftigte sich über 30 Jahre mit Biolandbau und gilt als Vordenker. Ihm zufolge ist eines der Probleme des Biolandbaus das Marketing, das einen Einsatz von Gentechnik dogmatisch verneine und dazu führe, dass eine plötzliche Meinungsänderung den Kunden nur schwer zu vermitteln sei [10]. Gleichzeitig wäre aber gerade im Biolandbau die gentechnische Züchtung von unschätzbarem Vorteil, da sie deutlich schneller neue Sorten produziert als die konventionelle Züchtung. Genau diese neuen Sorten wären aber nötig, um dem Wassermangel, dem Hitzestress sowie der Trockenheit des Klimawandels zu begegnen. Neue Sorten würden außerdem dabei helfen, dass der Biolandbau wettbewerbsfähig bleibt. Zwar ist er deutlich umweltfreundlicher als die konventionelle Intensivlandwirtschaft und hat sich der Nachhaltigkeit verschrieben, jedoch ist der Ertrag pro Fläche geringer.

Extrinsische Argumente zu roter Gentechnik

Interessanterweise spielen die bisher genannten Bedenken vor allem in der Diskussion um die grüne Gentechnik eine große Rolle. In der roten Gentechnik hingegen zeigt sich teilweise ein anderes Bild: Gentechnisch hergestellte Medikamente wie Insulin oder Blutgerinnungsfaktoren sind unverzichtbar. Der gentechnische Eingriff in Bakterien oder Hefezellen, die die Stoffe produzieren, wird als wenig problematisch empfunden. Dies hängt einerseits damit zusammen, dass es im Vergleich zu früheren Herstellungsverfahren, bei denen beispielsweise Insulin aus Schweinen und Rindern isoliert wurde, weniger Nebenwirkungen gibt. Andererseits kann es aber auch an einem Gewöhnungseffekt und einem Vertrauensaufbau liegen, der ebenfalls als eine Art Natürlichkeit interpretiert werden kann. Zudem ist der Nutzen unmittelbar spürbar und es gibt konkrete Gesundheitsvorteile.

Bei der gentechnischen Behandlung direkt am Menschen sind *off-target*-Effekte nicht auszuschließen. Bei der Beurteilung der Behandlung bestimmter Erbkrankheiten wie β -Thalassämie und Sichelzellenanämie (siehe Artikel „Wie die CRISPR-Genschere dauerhafte Heilung verspricht“, S. 6) überwiegen jedoch anscheinend die Vorteile gegenüber den ethischen Bedenken wie gesundheitlichen Risiken einer Behandlung. Ein wichtiges Argument

bleibt jedoch die Zugänglichkeit und gerechte Verteilung der Technologie, da solche Eingriffe eben sehr teuer sind. Dieses vor allem wirtschaftliche und soziale Bedenken ist valide. Es ist jedoch fraglich, ob ein Verbot der Technologie soziale Probleme löst.

Therapeutische gentechnische Modifikationen in der Keimbahn hat selbst der deutsche Ethikrat bislang nicht kategorisch abgelehnt [11]. Jedoch ergibt sich hier in den allermeisten Fällen gar nicht die Notwendigkeit zur gentechnischen Modifikation, da durch eine Vorselektion jene Embryonen mit schwerwiegenden Erbkrankheiten einfach aussortiert werden können – auch wenn man hier natürlich wieder andere ethische Bedenken anbringen kann. Problematischer hingegen wird es beim *Human Enhancement*. Neben dem deontologischen Problem zur Wahlfreiheit und der Veränderung des Telos kommen in der teleologischen Ethik weitere Bedenken hinzu: Die meisten Eigenschaften des Menschen werden durch eine Vielzahl von Genen bestimmt. Zudem sind einzelne Gene an der Ausprägung verschiedener Eigenschaften beteiligt. Unerwünschte Nebeneffekte sind wahrscheinlich, aber nur sehr schwer vorherzusagen. Daneben gibt es weiterhin soziokulturelle Bedenken wie die Diskriminierung von Menschen mit anderen Allelen. Wer entscheidet, welche Genvarianten „gut“ oder „schlecht“ sind? Vermutlich wären Eingriffe überdies nicht allen Menschen gleich zugänglich.

Bisher sind übrigens weltweit nur drei Fälle von Menschen bekannt, bei denen gentechnische Eingriffe in der Embryonalphase und damit auch in der Keimbahn vorgenommen wurden. 2018 veröffentlichte der chinesische Forscher He Jiankui (Abbildung 10) die Geburt von zwei (später drei) Kindern, bei denen das Gen des CCR5-Rezep-

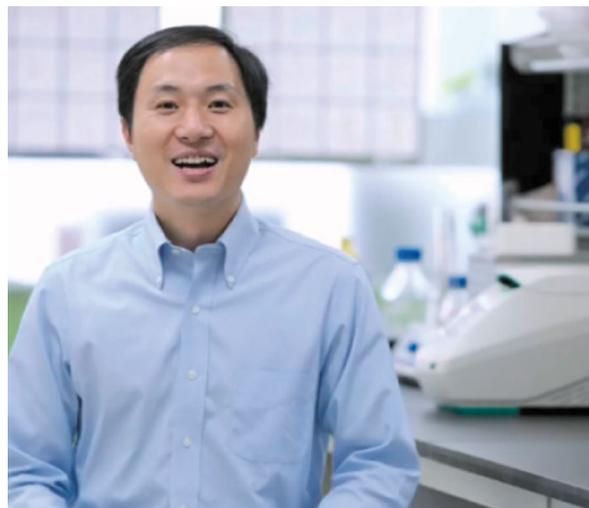


ABB. 10 Eingriffe in die menschliche Keimbahn. In einem aufsehenerregenden Video verkündete der chinesische Wissenschaftler He Jiankui 2018 erstmals die Geburt von zwei Babys, die aus Eizellen entstanden, welche kurz nach der Befruchtung gentechnisch behandelt wurden.

Quelle: <https://www.youtube.com/watch?v=th0vnOmFltc>



tors veränderte wurde. Der Eingriff sollte die Kinder resistent gegen HIV machen. Allerdings kann die eingebrachte Mutation auch weitere positive Auswirkungen haben: So führt das veränderte *CCR5*-Gen zu einer besseren Regeneration von Nervenzellen und damit Erholung von einem Schlaganfall und sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen zu einer besseren Gedächtnisleistung. Man könnte vermuten, dass diese „Nebenwirkungen“ den chinesischen Forschern sehr wohl bewusst waren. Was mit dieser Forschung langfristig bezweckt werden soll, wie es den modifizierten Kindern geht und ob sie wirklich schlauer sind, das weiß man nicht.

Wie soll man sich jetzt entscheiden?

Nachdem wir nun verschiedene Argumente und Bedenken der deontologischen und teleologischen Ethik kennengelernt haben, stellt sich schließlich die Frage: Wie soll man nun abwägen? Darauf gibt es keine einheitliche Antwort; jedoch kann man sich verschiedener Ethikformen, Moraltheorien oder Prinzipien bedienen, die man entsprechend seiner persönlichen Werte und Ideale unterschiedlich präferieren kann.

Vorsorgeprinzip vs. Nachsorgeprinzip

In Deutschland wird bekanntlich das Prinzip der Vorsorge dem der Nachsorge gegenüber deutlich favorisiert. Bezogen auf die Gentechnik sieht man dies an einem umfassenden Gesetz, das strenge Sicherheitskontrollen vorschreibt. Bevor ein Schaden durch ein potenziell gesundheitsgefährdendes Produkt entsteht, lässt man dieses lieber gar nicht erst zu. Dabei handelt es sich um eine passive Vorsorge, indem man eine Handlung schlichtweg unterlässt. Dem kann man eine aktive Vorsorge gegenüberstellen. Beispielsweise wäre die Erhöhung der Deiche an Elbe und Nordsee eine aktive Vorsorge, um stärkeren Überschwemmungen und Sturmfluten als Folgen des Klimawandels zu trotzen. Die Kosten solcher Deiche sind zwar enorm, jedoch im Vergleich zu dem potenziellen Schaden einer Sturmflut oder einer Überschwemmung ein geringeres Übel. In Bezug auf gentechnisch hergestellte Therapeutika könnte man dies so interpretieren, dass ethische Bedenken gegen veränderte Bakterien der Gesundheit des betroffenen Individuums untergeordnet werden. Der Patient nimmt Risiken in Kauf, weil der Verzicht auf die Medikamente deutlich schlimmere Folgen hätte. Im Grunde genommen geht es also auch um das Abwägen von Risiken. In Bezug auf GVOs wäre zu argumentieren, dass diese ebenso bei der Ernährungssicherung oder der Minderung des Klimawandels zur Vorsorge beitragen könnten. Wäre es nach dem Vorsorgeprinzip nicht ethisch geboten, alle Möglichkeiten auszuschöpfen, um die Zukunft sicherer zu gestalten?

Der Unterschied zwischen Risiko und Gefahr

Wichtig in ethischen Abwägungen ist der Unterschied zwischen „Risiko“ und „Gefahr“, der keineswegs trivial ist.

Dazu gibt es in verschiedenen Wissenschaften unterschiedliche Auslegungen der jeweiligen Begriffe. Doch überspringen wir dies und bedienen uns einfach der gängigen Definitionen, um den Unterschied mithilfe von ein paar Beispielen zu verdeutlichen. Ein Risiko beschreibt demnach die Wahrscheinlichkeit, dass eine Gefahr eintritt. Eine Gefahr hingegen beschreibt eine Bedrohung. Ein Tiger stellt für einen Menschen eine Gefahr dar, er muss aber nicht unbedingt ein Risiko sein, wenn er in einem sicheren Käfig sitzt. Überdies kann das Potenzial des Schadens einer Gefahr unterschiedlich groß sein. Das Risiko, sich im Sommer einen Sonnenbrand zu holen, kann groß sein. Die Gefahr, die vom Sonnenbrand ausgeht, ist jedoch deutlich kleiner, als die eines hungrigen Tigers, auch wenn das Risiko, diesem im Freibad zu begegnen, wiederum deutlich kleiner ist.

Auf unsere Debatte um Gentechnik kann dies einen wichtigen Einfluss haben. In der teleologischen Ethik dienen Risiken oftmals als Gegenargument oder gar als Ausschlusskriterium. Wenn man sich jedoch klar macht, dass ein Risiko nicht gleichzeitig eine große Gefahr darstellt und umgekehrt, können Argumente eine andere Gewichtung bekommen. Beispielsweise kann man das Risiko von *off-target*-Effekten und damit verbundene Auswirkungen nie ganz ausschließen. Doch ist hier nicht nur das Risiko relevant, sondern auch, welche vermeintlichen Gefahren von einer gentechnischen Modifikation oder der Ausbreitung des GVO ausgehen.

Würde man sich nur nach Risiken richten, dürfte man salopp gesagt nicht das Bett verlassen, da es immer ein gewisses Risiko gibt, dass ein Schadensfall eintreten könnte. Im Jahr 2023 starben 2.839 Menschen in Deutschland im Straßenverkehr [12]. Aber würde deshalb ein Großteil der Bevölkerung darauf verzichten, Auto zu fahren oder die Regierung den Individualverkehr mit Autos sogar gesetzlich verbieten? Die Aussage hier ist, dass Risiken oftmals unvermeidbar sind und durchaus toleriert werden können, sofern ein gewisser Mehrwert entsteht.

Ein weiteres fiktives Beispiel: Man induziert in einer Gerste gentechnisch eine Resistenz gegen das Gelbmosaikvirus, das bei Befall zu massiven Ernteaufällen führt (woran tatsächlich geforscht wird). Man stellt dann fest, dass es ein gewisses Risiko gibt, dass sich resistente Gerste-Pflanzen auf benachbarten Feldern ausbreiten. Dann wäre zu untersuchen, welche Gefahr von der Ausbreitung ausgeht (bzw. welcher Schaden dabei entsteht). Dieser wäre zu vergleichen mit dem Schaden, der entstehen würde, wenn die Gerste nicht resistent gegen das Gelbmosaikvirus wäre.

Schließlich sei noch erwähnt, dass es neben bekannten Risiken natürlich unbekanntes Risiken gibt. Diese „unkalkulierbaren Risiken“ spielen eine große Rolle in der ethischen Debatte um GVOs. Man sollte jedoch bedenken, dass auch eine Reise mit der Bahn oder ein Waldspaziergang eine Unmenge unbekannter, unkalkulierbarer Risiken beinhaltet.

Das Problem des Nicht-Tuns

Indem man etwas nicht tut, könnte man gewisse Risiken für Gefahren minimieren. Jedoch nicht nur das Tun erzeugt Konsequenzen, sondern auch das Unterlassen einer Handlung hat Folgen. In Deutschland handelt es sich bei einer unterlassenen Hilfeleistung rechtlich gesehen sogar um eine Straftat (entsprechend dem Strafgesetzbuch §323c). Als Beispiel aus der grünen Gentechnik bietet sich der *Golden Rice* an. Obwohl die Entwicklung abgeschlossen war, suchten verschiedene Organisationen über Jahre nach Argumenten, um den Anbau zu verhindern. Dabei wurden immer wieder Restrisiken angeführt, die natürlich nicht zu 100 Prozent ausgeräumt werden konnten. Eine pragmatische Abwägung der Risiken und Gefahren von Tun und Nicht-Tun erschien unmöglich, weil die oft angeführten „unkalkulierbaren Risiken“ eben nicht in die Kalkulation eingehen konnten. Eine eindeutige Bilanz wird man erst ziehen können, wenn der Reis in großem Umfang auf dem Markt ist. Im Erfolgsfall wäre dann die Frage zu stellen, wer die Verantwortung für die unterlassene Freigabe und die Opfer dieser Unterlassung trägt.

Weitere Moraltheorien

Die Diskussion könnte nun sehr lange weitergehen; deshalb sollen einige Moraltheorien nur kurz angerissen werden. Beispielsweise könnte man sich des **Utilitarismus** bedienen, der oftmals auf die Formel „Gut ist, was nützt“ heruntergebrochen wird. Hier vereinen sich im Prinzip mehrere bereits genannte Aspekte, nämlich dass es neben offensichtlichen Vor- und Nachteilen durchaus Risiken geben kann, die nie völlig ausgeräumt werden. Solange eine bestimmte Handlung jedoch unterm Strich einen Vorteil, also etwas „Gutes“ bewirkt, sind Nachteile und Risiken durchaus tolerierbar.

In einer weiteren Moralphilosophie, der **Wertethik**, geht es vor allem um die Aufrechterhaltung und Wahrung bestimmter bewusster (und unterbewusster) Wertvorstellungen. Ein wichtiger Aspekt ist hier, dass die Werte, die es zudem erst einmal zu definieren gilt, auch hierarchisch geordnet werden können. Man könnte „Natürlichkeit“ und „molekulare Integrität“ als obersten Wert festlegen und danach erst Versorgungssicherheit, Fortschritt und andere. So würde man die Anwendung von Gentechnik als unethisch bewerten. Würde man jedoch Versorgungssicherheit, Fortschritt und Schutz der Biodiversität (beispielsweise durch die Reduzierung von Pestiziden) an die Spitze der Wertehierarchie setzen und Natürlichkeit und die molekulare Integrität an das Ende, so könnte man Gentechnik befürworten, solange die jeweils erzeugten GVOs die entsprechenden Werte unterstützen.

In der **Tugendethik** geht es weder um die intrinsischen ethischen Aspekte einer Handlung (Deontologie) noch um Konsequentialismus (Teleologie), sondern um die handelnde Person selbst und ihre Motivation. Hier werden also keine Regeln für ethisches Handeln aufge-

stellt, sondern es kommt auf die inneren Neigungen des Handelnden an, aus denen wiederum Einstellungen und Haltungen resultieren. Tugenden bezeichnen dabei erstrebenswerte Eigenschaften oder Haltungen, die eine Person wiederum dazu befähigen, etwas „Gutes“ zu tun.

Als Gegenentwurf zu einer **Individualethik**, die sich also durch ethische Werte, Konzepte und Entscheidungen eines einzelnen Individuums auszeichnet, sei noch die **Diskursethik** erwähnt. Hier handelt es sich vor allem um eine Verfahrensethik, die in einem Diskurs zwischen verschiedenen Teilnehmenden einen Konsens erreichen möchte. Grundlage ist hier, dass sich die Beteiligten auf bestimmte Kommunikationsregeln einlassen – beispielsweise einer fairen Beteiligung der Anwesenden und auf eine Anerkennung rationaler Argumente. Hier gibt es jedoch eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es nicht zu einem konstruktiven Konsens, sondern zu einem Kompromiss kommt.

Spätestens jetzt sollte klar sein, dass eine globale einheitliche Ethik illusorisch ist. Dennoch möchte ich Sie, liebe Leserin, lieber Leser, nun vorerst mit den Worten des Forschers, Arztes und Philosophen Albert Schweitzer entlassen: „Ich bin Leben inmitten von Leben, das leben will.“ Stellt sich lediglich die Frage, was das für die Ethik bedeutet ...

Zusammenfassung:

Gentechnik, vor allem die grüne Gentechnik, ist in Deutschland sehr umstritten. In der ethischen Diskussion kann man zwischen deontologischen und teleologischen Argumenten unterscheiden. Erstere beinhalten intrinsische Argumente, die Gentechnik „in sich“ kategorisch ablehnen, wie bspw. Natürlichkeit von Organismen, Integrität von Genomen, Artüberschreitung oder Technizismus. Bei zweiteren stehen Folgen wie Risiken und Chancen von gentechnischen Anwendungen im Mittelpunkt. Um zu einer ethischen Entscheidung zu kommen, können verschiedene Moraltheorien, Werte und Prinzipien diskutiert werden.

Summary

Genetic engineering and ethics

Genetic engineering, particularly green genetic engineering, is highly controversial in Germany. In the ethical debate, one can distinguish between deontological and teleological arguments. The former include intrinsic arguments that categorically reject genetic engineering “in itself”, such as the naturalness of organisms, the integrity of genomes, transgression of species boundaries, or technicism. The latter focus on the consequences, such as the risks and opportunities of genetic engineering applications. To reach an ethical decision, various moral theories, values, and principles can be discussed.

Schlagworte

Ethik, Gentechnik, Risiken, grüne Gentechnik, rote Gentechnik, intrinsische Bedenken, extrinsische Bedenken



ABA

Austrian Biologist Association

Verein österreichischer Biologinnen und Biologen

VERNETZUNG

- Vernetzung von BiologInnen unterschiedlicher Berufsgruppen
- Informationsaustausch
- Exkursionen

ÖFFENTLICHKEITSBILDUNG

- Wissenschaftskommunikation
- Online-Magazin bioskop Podcasts
- Bildungsarbeit

BERUFSINFORMATION

- Berufsinformation für biologische Berufe
- Berufsbild Biologie



www.austrianbiologist.at
info@austrianbiologist.at

Literatur

- [1] BfN (2021). <https://t1p.de/tmucx>
- [2] <https://t1p.de/ffktv>
- [3] <https://www.youtube.com/watch?v=TCPI7ftLajA>
- [4] IFOAM (2020). <https://t1p.de/hzuzp>
- [5] K. Ott (2003). Ethische Aspekte der ‚grünen‘ Gentechnik. In M. Düwll und K. Steigleder (Hg.) Bioethik. Suhrkamp, Frankfurt am Main, S. 363f.
- [6] E. S. Lander et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- [7] T. Mishina et al. (2023). Massive horizontal gene transfer and the evolution of nematomorph-driven behavioral manipulation of mantids. Current Biology 33, 4988-4994.
- [8] Pflanzen.Forschung.Ethik, <https://t1p.de/rz4d4>
- [9] National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2016). Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/23395>.
- [10] ARD Audiothek (2024). <https://t1p.de/z5bjy>
- [11] Deutscher Ethikrat (2019). <https://t1p.de/zbq3d>
- [12] Statista. <https://t1p.de/5swjg>

Verfasst von:



Jann Buttlar studierte Biologie an der Universität Kassel und an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Seit 2023 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand an der Uni Kassel in der Arbeitsgruppe molekulare Pflanzenphysiologie. Nebenberuflich ist er als Lehrbuchautor und Bildungsreferent für Themen im Bereich Klimawandel, Nachhaltigkeit und Molekularbiologie unterwegs. In seinem Masterstudium belegte er als Nebenfach Philosophie mit einem Schwerpunkt auf Ethik, worin er sich seitdem vertieft und stets über neue Argumente freut.

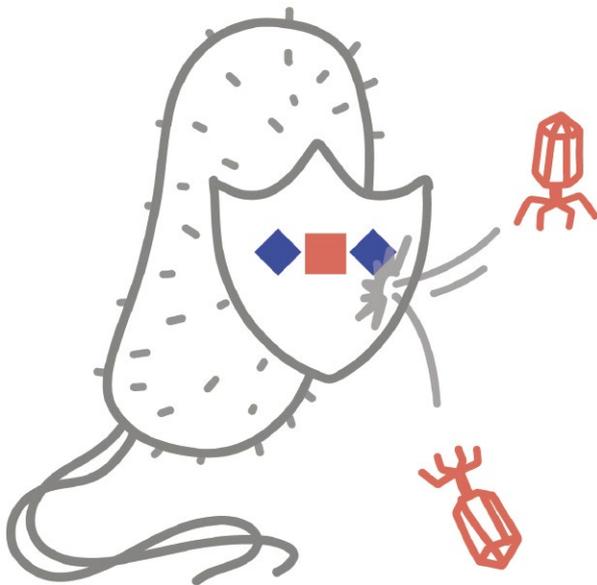
Korrespondenz

Jann Buttlar
 Doktorand und Wissenschaftskommunikator
 BioWissKomm
 E-Mail: j.buttlar@biowisskomm.de

Das Gedächtnis des bakteriellen Immunsystems

Evolution des CRISPR-Arrays in Bakterien

AXEL FEHRENBACH | FRANZ BAUMDICKER



Copyright: <https://genomeadvisory.com/resources> lizenziert unter <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

CRISPR-Cas wurde ursprünglich in Bakterien gefunden und ist primär als Verteidigungssystem gegen Invasionen von Phagen tätig. Kern dieses Systems ist – neben den cas-Genen – der CRISPR-Array, der dem System als ein vererbbares, immunologisches Gedächtnis dient. Die Evolution von CRISPR-Arrays weist besondere Merkmale auf, die Gegenstand aktueller Forschung sind und den Einsatz neuer bioinformatischer und mathematischer Methoden erfordern.

Die Grundlage für die Entwicklung der revolutionären CRISPR-Cas-Methode für die Genomeditoring wurde ursprünglich in der DNA von Bakterien und Archaeen gefunden. Bereits 1987 fanden Forscher die sich wiederholende *repeat*-Struktur des CRISPR-Arrays in *Escherichia coli* [1]: CRISPR-Arrays bestehen aus sich wiederholenden kurzen (~35 bp), palindromischen *repeats*, die durchbrochen werden durch kleine Stücke variierender Sequenzen (~35 bp), den sogenannten *spacer*. Die Funktion dieser *spacer* war lange unbekannt – bis Forscher 2005 herausfanden, dass viele dieser *spacer* der DNA von Bakteriophagen (Viren) zugeordnet werden können. Bemerkenswerterweise gelingt es Phagen anschließend nicht, Bakterien mit entsprechenden *spacer*-Einheiten zu infizieren [2].

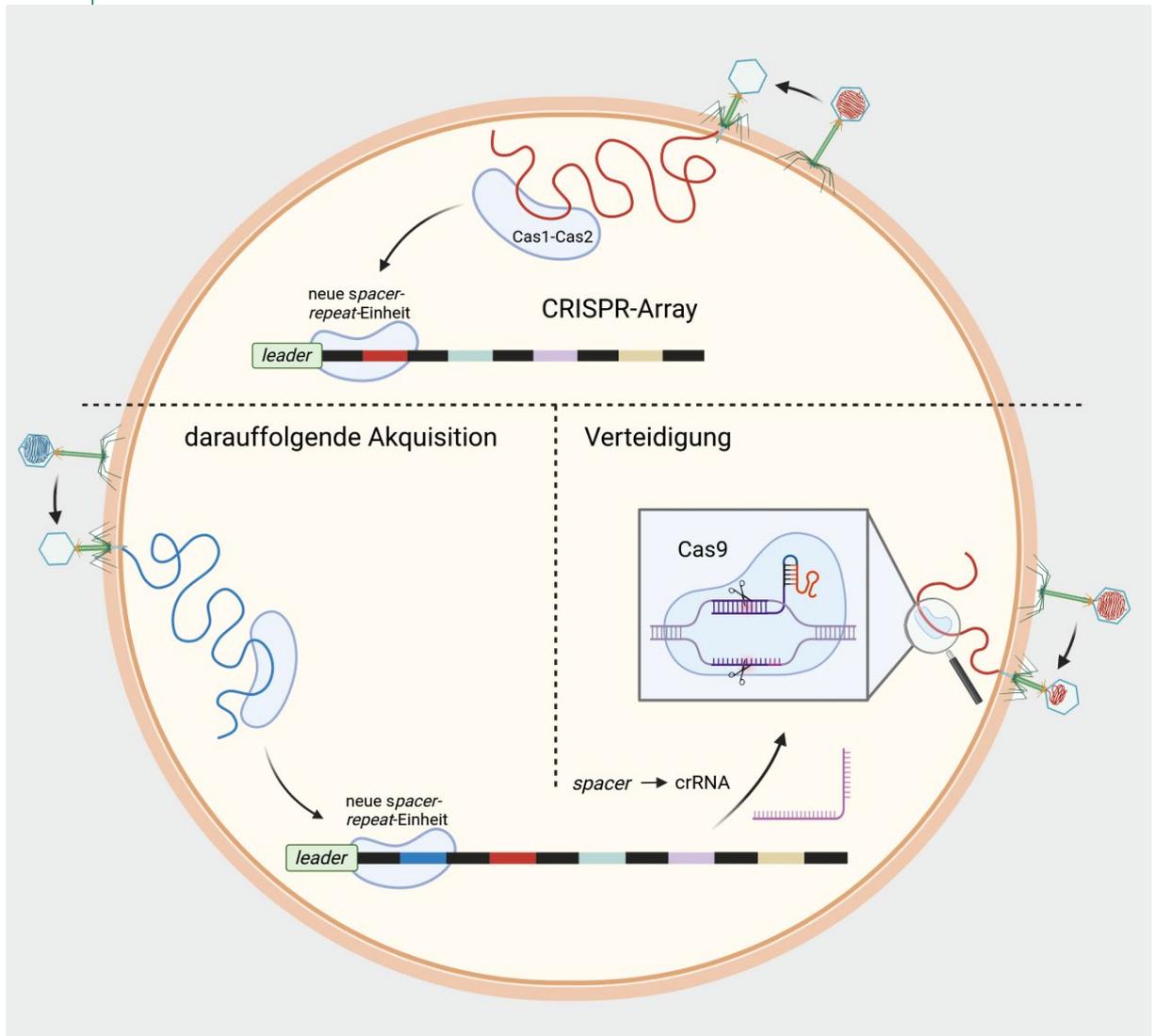
In folgenden Studien wurde klar, dass die Bakterien mithilfe von zugehörigen CRISPR-assoziierten (Cas)-Proteinen (z. B. Cas1 und Cas2) in der Lage sind, kleine Fragmente der DNA von Phagen – sogenannte *protospacer* – zu kopieren und als *spacer* zwischen *repeat*-Einheiten in den CRISPR-Array einzusetzen (Abbildung 1, links) [3]. Bei einer erneuten Infektion können diese *spacer* als sogenannte CRISPR-RNA (crRNA) repliziert werden und in Cas-

Proteinkomplexe (z. B. Cas9) eingesetzt werden. Die crRNAs dienen sozusagen als Wegweiser für die Proteinkomplexe. Diese können dadurch korrespondierende *protospacer* mit großer Präzision erkennen und – je nach CRISPR-Cas-Typ – blockieren oder zerschneiden (Abbildung 1, rechts) [4]. Das bedeutet, dass CRISPR-Cas-Systeme eine Art adaptives, antivirales Immunsystem in Bakterien sind. In diesem Sinne entspricht der CRISPR-Array einem generationenübergreifenden Gedächtnis des CRISPR-Cas-Immunsystems: Denn als Teil der DNA kann der Array relevante *spacer* über lange Zeit erhalten und an die nächsten Generationen weitergeben.

CRISPR-Arrays als chronologisches Gedächtnis

Bei genaueren Untersuchungen des Prozesses zur Aneignung (Akquisition) fremder DNA wurde eine erstaunliche Eigenschaft von CRISPR-Arrays festgestellt: Neue *spacer* werden (fast) immer an einem Ende des Arrays, neben einem DNA-Motiv – dem sogenannten *leader* – eingesetzt [4, 5]. Deshalb ist aus dem CRISPR-Array sogar eine chronologische Historie der eingefügten *spacer* bzw. der Phagen-

ABB. 1 | SPACER-AKQUISITION UND VERTEIDIGUNG GEGEN PHAGEN



Vereinfachte Darstellung eines Bakteriums mit einem CRISPR-Array, der durch Akquisition von spacer-Einheiten eine anschließende Immunreaktion gegen eine Phageninvasion ermöglicht. Alle Abbildungen erstellt mit BioRender.com.

invasionen ablesbar. Dies gibt der Evolution von CRISPR-Arrays eine bemerkenswerte Struktur, die sehr nützlich für die Modellierung und Analyse von CRISPR-Arrays ist.

Verlust von spacer-Einheiten

Die Expression von *spacer*-Einheiten im vorderen Teil des Arrays findet häufiger statt, d. h. die Effizienz des Arrays als Immunantwort ist für neu hinzugefügte *spacer* am stärksten und reduziert sich, je länger der Array wird. Darüber hinaus ist klar, dass die Kosten für den Erhalt und die Replikation des Arrays steigen, je größer der Array ist. Folglich kann ein Array zwar theoretisch beliebig viele neue *spacer* aufnehmen, der regelmäßige Verlust von *spacer*-Einheiten verhindert jedoch, dass das System an Effizienz einbüßt.

Während das Einfügen von *spacer*-Einheiten und die Funktion von (einigen) Cas-Proteinen in diesem Prozess relativ gut verstanden sind, ist der Mechanismus des „Verlusts“ (engl. *deletion*) bisher wenig untersucht. Dies liegt unter anderem daran, dass dieser Prozess im Unterschied zur aktiven Initiation einer *spacer*-Akquisition nur indirekt zu beobachten ist. Dennoch gibt es bereits Theorien da-

IN KÜRZE

- CRISPR-Cas-Systeme dienen Bakterien als Immunsysteme.
- Der CRISPR-Array ist dabei das vererbte Gedächtnis dieses Immunsystems und erlaubt Rückschlüsse auf die zeitliche Abfolge von Phageninfektionen.
- Dieser Array evolviert über die Akquisition und den Verlust von sogenannten spacer-Einheiten.
- Durch mathematische Modelle ist es uns möglich, die CRISPR-Arrays von gemeinsamen Vorfahren einer Population von Bakterien zu rekonstruieren.
- Die Erforschung dieser Ahnenrekonstruktionen erlaubt uns, neue Erkenntnisse über den Verlustprozess zu gewinnen und die Umgebung von Bakterien zu erforschen.

rüber, wie Verluste ausgelöst werden. Es wird vermutet, dass die sich wiederholende *repeat*-Struktur des CRISPR-Arrays verantwortlich ist. Während der Replikation des CRISPR-Arrays können *repeats* aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit „aneinanderkleben“, wodurch eine Schleife entstehen kann, die *spacer* (und weitere *repeats*) enthält (Abbildung 2) [5]. Wenn nun die DNA kopiert wird, kann der Inhalt dieser Schleifen übersehen werden und in der Folge entsteht ein Strang ohne die enthaltenen *spacer*. Bestimmten Cas-Proteinen konnte bisher noch keine Rolle in diesem Verlustprozess zugeordnet werden.

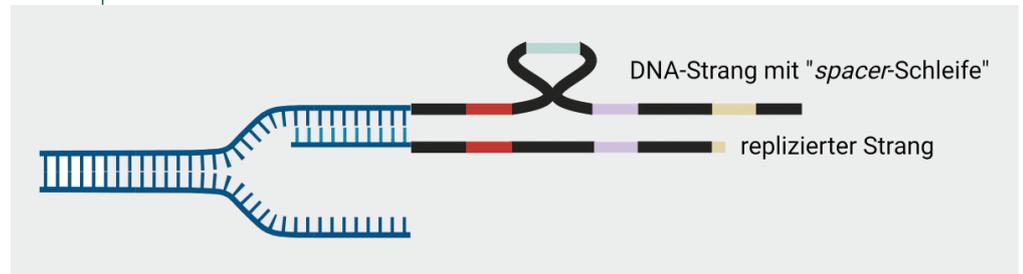
Ahnenrekonstruktion von CRISPR-Arrays

Der besondere Einfügungsprozess und Verlustprozess von *spacer*-Einheiten motivierte uns dazu, mathematische Modelle zu erstellen, um die besonderen Auswirkungen dieser Prozesse zu verstehen und die beobachtete Struktur von *spacer*-Arrays besser interpretieren zu können [6]. Speziell interessiert uns, die historischen Veränderungen nah verwandter CRISPR-Arrays zu rekonstruieren – d. h. entlang des Stammbaums die Akquisitions- und Verlustereignisse zu rekonstruieren, die die derzeitigen CRISPR-Arrays gebildet haben (Abbildung 3). Diese, beziehungsweise ihre Stammbäume, stammen oft aus Laborversuchen, d. h. sie sind in der Regel in einem Zeitraum von Tagen, Wochen und Monaten entstanden. Aber es gibt auch Datensätze, bei denen die CRISPR-Arrays im Abstand von mehreren Jahren sequenziert wurden.

Um die Evolution zu modellieren, nutzen wir stochastische Prozesse, sogenannte „stetige Markovprozesse“. Ein stochastischer Prozess modelliert ein System (in diesem Fall den *spacer*-Array), das sich in verschiedenen Zuständen befinden kann und mit gewissen Wahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen wechselt. Ein Markovprozess ist dabei ein spezieller stochastischer Prozess, bei dem die Wahrscheinlichkeiten für den nächsten Zustand des Systems/Arrays nur von einer begrenzten Vorgeschichte (in unserem Fall dem aktuellen Zustand) abhängt. Dadurch wird für Prognosen über zukünftige Zustände kein Wissen über die gesamte Vorgeschichte des Prozesses benötigt. Bei einem „stetigen“ Markovprozess ändern sich die Zustände nicht zu festen, sondern zu zufälligen Zeitpunkten, d. h. die Übergänge zwischen den Zuständen können sich ständig ereignen. Die Häufigkeit der Übergänge wird dabei durch sogenannte „Raten“ beschrieben.

Zur Vereinfachung beginnen wir mit einem relativ simplen Evolutionsmodell. In unserem Modell für CRISPR-Arrays können *spacer* mit einer gewissen „Einfügsrate“ überall (zwischen jedem bestehenden *spacer*) gewonnen werden und existierende *spacer* können mit einer anderen „Verlustrate“ verloren werden. Allerdings be-

ABB. 2 | SPACER-VERLUSTE WÄHREND DER DNA-REPLIKATION



Schematische Darstellung eines *spacer*-Verlusts durch „Schleifenbildung“ während der Replikation der DNA.

rücksichtigt dieses Modell die Akquisition am *leader* nicht. Entlang des Stammbaums kann mit diesem Modell effizient zurückgerechnet werden, an welchem Ast mit welcher Wahrscheinlichkeit *spacer* gewonnen und verloren werden. Mit einer sogenannten Maximum-Likelihood-Methode können wir so die wahrscheinlichste Konfiguration von Ereignissen rekonstruieren, die zu der beobachteten Population geführt haben.

Solche Methoden – Markovprozesse und Maximum-Likelihood-Methoden – haben eine lange Tradition in der Rekonstruktion von Stammbäumen und werden für DNA-Sequenzen häufig genutzt.

Verlangen wir von dem Modell, dass *spacer* nur am *leader* eingefügt werden können, dann stoßen diese Methoden jedoch an ihre Grenzen, da die Reihenfolge der Ereignisse, die den Array ändern, zeitlich voneinander abhängt. Genauer: Wenn ein *spacer* zu einem Zeitpunkt existiert, können danach nur *spacer* gewonnen werden, die vor dem existierenden *spacer* im Array stehen. Andererseits können alle *spacer* hinter dem existierenden *spacer* nur verloren werden. Wenn man in der Zeit zurückrechnet, um die Ahnen-Arrays zu rekonstruieren, erzeugen diese Abhängigkeiten eine nicht (effizient) auflösbare Komplexität von möglichen Abfolgen von Akquisitions- und Verlustereignissen.

Es gibt jedoch eine Möglichkeit, die bisherige – mit dem einfachen Modell erfolgte Rekonstruktion – zu verbessern, indem wir die rekonstruierten Ereignisse und Wahrscheinlichkeiten so modifizieren, dass die Teile der Akquisitionsreihenfolge, die wir aus den CRISPR-Arrays selbst ablesen können, zu jedem Zeitpunkt berücksichtigt werden. Nun sind wir mit einem Algorithmus [6] ausgerüstet, der uns erlaubt, aus verwandten CRISPR-Arrays, die Array-Ahnen oder – äquivalent dazu – die evolutionären Ereignisse, die zu den beobachteten Arrays geführt haben, zu rekonstruieren.

Mit „Ahnenforschung“ den Verlustprozess verstehen

Die rekonstruierten Ahnen-Arrays ermöglichen uns nun, die Evolution genauer zu verstehen und unsere evolutionären Modelle zu verbessern sowie besondere Muster in den beobachteten Daten zu erkennen [6]. Dabei konzentrieren wir uns im Folgenden auf den Verlustprozess.

Verlustraten und Blockverluste

Eine Facette ist die Möglichkeit, dass mehrere benachbarte *spacer* und *repeats* in Blöcken verlorengehen. Weil beide relativ kurz sind, ist es möglich, dass *repeats*, die weiter als ein *spacer* voneinander entfernt liegen, „zusammenkleben“. Zusammen bilden sie somit eine Schleife, die mehrere *spacer* (und *repeats*) enthält. Um dies zu untersuchen, haben wir einen Markovprozess entwickelt, der genau diesen Umstand modelliert [6]. Sobald ein Verlust stattfindet, wird nicht nur ein *spacer*, sondern ein ganzer Block verloren, dessen Länge nach einer (geometrischen) Wahrscheinlichkeitsverteilung verteilt ist. Dieses Modell hat nun neben den Gewinn- und Verlustraten einen weiteren Parameter: die durchschnittliche Länge von Verlusten. Mithilfe eines statistischen (Likelihood-Quotienten-)Tests können wir nun das Modell mit einzelnen Verlusten mit dem Modell mit Blockverlusten vergleichen. Wir tun dies anhand der Ahnenrekonstruktionen, die wir bestimmt haben. Genauer gesagt: Wir tun dies anhand der rekonstruierten Verlustereignisse, deren Häufigkeit und deren Länge.

In einer Studie über einen großen Datensatz von CRISPR-Arrays waren wir in der Lage, das Modell der einzelnen Verluste in einer signifikanten Anzahl von Fällen zu verwerfen [6]. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass bei den meisten CRISPR-Arrays Blockverluste auftreten. Darüber hinaus ermöglicht uns das Modell, die Verlustrate sowie deren durchschnittliche Länge zu schätzen. Diese Parameter können dann mit der durchschnittlichen Mutationsrate verglichen werden, um vorherzusagen, wie schnell CRISPR-Arrays evolvieren.

Wir fanden heraus, dass die durchschnittliche Verlustrate pro *spacer* ca. 370-mal der Mutationsrate pro Nukleotid entspricht. Das bedeutet, dass CRISPR-Arrays deutlich schneller durch Verluste evolvieren als durch Mutationen. Daraus resultiert auch gleich ein Anwendungsfall für die

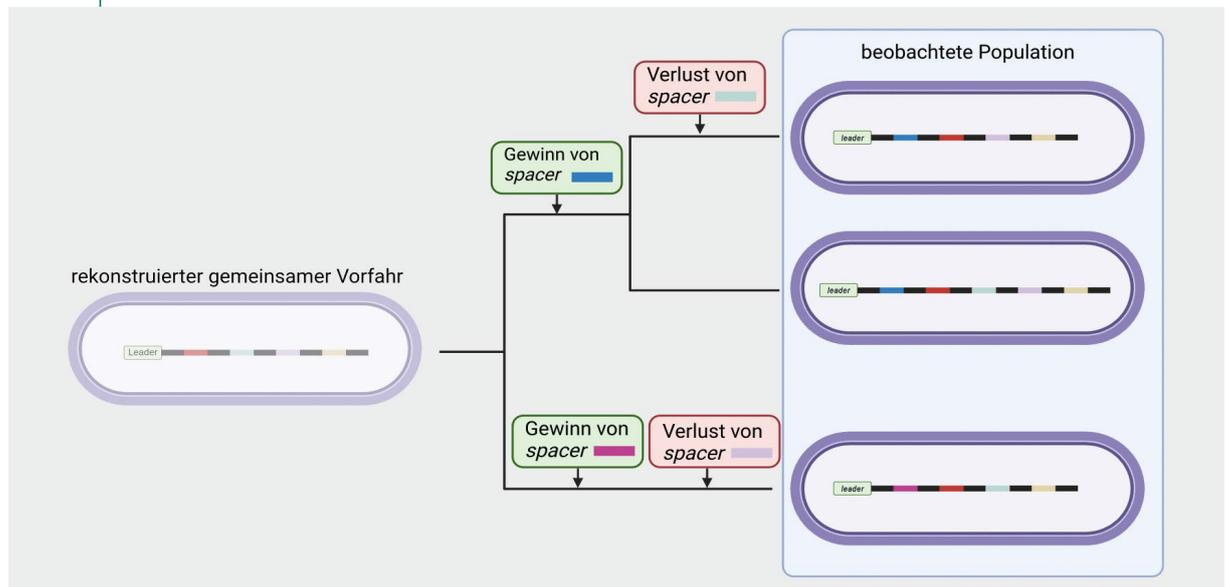
Ahnenrekonstruktion von CRISPR-Arrays, nämlich das Verfolgen der Verwandtschaft von untersuchten Bakterien anhand deren CRISPR-Arrays mit einer höheren Auflösung als anhand von Mutationsmustern, z. B. in einem epidemiologischen Kontext. Darüber hinaus stellten wir fest, dass die Verlustparameter unabhängig sind von den in der Nähe der Arrays gefundenen *cas*-Genen. Das unterstützt die bisherigen experimentellen Beobachtungen, dass *cas*-Genen noch keine Rolle bei der Entstehung von Verlusten zugeordnet werden konnte.

Verlustmechanismus und Selektion

Die Rekonstruktionen erlauben auch, genauer zu untersuchen, wo Verluste im Array auftreten [6]. Es lässt sich beobachten, dass Verluste weniger oft an den Rändern des Arrays auftreten. Dies passt zum vermuteten *repeat*-basierten Verlustmechanismus durch Schleifenbildung. Denn *repeats* am Rande des Arrays können nur mit weniger anderen *repeats* eine Schleife bilden, da auf einer Seite weniger (oder keine) Partner vorhanden sind. Dies ist ein symmetrischer Effekt, der also sowohl für den Anfang des Arrays (beim *leader*) als auch für das Ende des Arrays gilt.

Überraschender ist ein anderer Effekt, den wir beobachten. Es stellt sich heraus, dass keine komplette Symmetrie in diesem Effekt zu beobachten ist. Am Beginn des Arrays werden *spacer* öfter verloren als erwartet oder alternativ: Alte *spacer* am Ende des Arrays werden weniger oft verloren. Das deutet darauf hin, dass junge neu gewonnene *spacer* öfter verloren werden. Vorstellbar wäre hier, dass die ersten *spacer* im Array aufgrund der höheren Expressionsrate solch eine Bedeutung für die akute Verteidigung haben, dass ein Verlust von im Moment unwichtigen *spacer*-Einheiten an dieser Stelle im Array besonders vorteilhaft ist, damit der Array gegen die akut relevanten Bedrohungen effizient und aktiv bleibt.

ABB. 3 | AHNENREKONSTRUKTION VON CRISPR-ARRAYS



Beispiel für die Rekonstruktion von *spacer*-Akquisitions- und Verlustereignissen entlang eines Stammbaumes für eine beobachtete Population von CRISPR-Array tragenden Bakterien.

Anwendungen und Zukunft

Wir haben bereits einen möglichen Nutzungsfall für CRISPR-Array-Evolution beschrieben. Durch die schnelle Evolution der CRISPR-Arrays und die relative Einfachheit, ebendiese Arrays zu sequenzieren, könnten CRISPR-Arrays es ermöglichen, die Evolution von pathogenen Bakterien genauer zu verfolgen. Dies könnte – je nach Aktivität der CRISPR-Arrays – auch in einem epidemiologischen Kontext (über Wochen, Monate und Jahre) stattfinden.

Durch die *spacer*-Phagen-Beziehung besteht außerdem die Möglichkeit, die Umgebung von Bakterien und deren Interaktionen besser zu verstehen. Neben der Untersuchung der Phagenbiodiversität in natürlichen Ökosystemen könnte dies insbesondere im Kontext von Bioreaktoren auch einen wirtschaftlichen Wert haben. Denn Bioreaktoren zur Herstellung von wichtigen Grundstoffen für pharmakologische Produkte mit Bakterien können zum Beispiel durch Virenbefall kollabieren. Anhand der CRISPR-Arrays könnten diese geschlossenen Systeme genauer analysiert werden. Beispielsweise könnte durch wiederholte Probeentnahme und Analyse der CRISPR-Arrays untersucht werden, wann und wie stark Bakteriophagen Druck auf die Bakterienpopulation ausüben. Nach einem Kollaps könnte außerdem durch Analyse der *spacer* der überlebenden Bakterien festgestellt werden, welche Phagen für den Kollaps verantwortlich waren. In den überlebenden Bakterien wird man mit hoher Wahrscheinlichkeit *spacer* gegen genau diese Phagen finden.

Nicht zuletzt ist das Verstehen von CRISPR-Cas als Verteidigungsmechanismus von Bakterien und Archaeen sowie deren Phagen ein faszinierendes Forschungsprojekt, das aufzeigt, wie oft hochkomplexe Immunprozesse schon in den kleinsten Lebewesen stattfinden.

Zusammenfassung

Bakterien beherbergen ein erstaunliches Immunsystem, das mit einem vererbaren Gedächtnis, dem CRISPR-Array ausgerüstet ist. Dieser Array gewinnt neue Sequenzen, sogenannte *spacer*, die mit Sequenzen invasiver Phagen korrespondieren. Deshalb erlaubt der Array Rückschlüsse auf die zeitliche Abfolge von Phageninfektionen. Da der Array als Teil der DNA nicht unbegrenzt wachsen kann, müssen auch wieder *spacer* verlorengehen. Während der Mechanismus des *spacer*-Erwerbs recht gut verstanden ist, weiß man wenig darüber, wie *spacer* eliminiert werden. Die Untersuchung des Arrays erfordert jedoch neue mathematische Modelle, die Hinweise darauf geben, wie diese Vorgänge stattfinden.

Summary

The evolution of the CRISPR array in bacteria

Bacteria harbour a remarkable immune system with an inheritable memory known as the CRISPR array as part of their DNA. This array acquires new segments - so called "spacers" – which correspond to segments of invasive phages. Thus, the array allows to infer a chronological sequence of infec-

tions by bacteriophages. However, being a part of bacterial DNA, the array cannot grow indefinitely and therefore spacers must get lost again. Whereas the mechanism of spacer acquisition is fairly well understood, little is known about how spacers are deleted. However, studying the array requires new mathematical models that provide new clues as to how these processes take place.

Schlagworte:

Evolution, CRISPR-Array, *leader*, *repeats*, *spacer*, Bakterien, Phagen, bakterielles Immunsystem, mathematische Modelle, Stammbaum

Literatur

- [1] Y. Ishino et al. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 169(12), 5429–33, <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433>
- [2] F. J. Mojica et al. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60(2), 174–82, <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- [3] J. K. Nuñez et al. (2014). Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat Struct Mol Biol* 21(6), 528–34, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
- [4] R. Barrangou et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819), 1709–12, <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- [5] S. C. Garrett (2021). Pruning and Tending Immune Memories: Spacer Dynamics in the CRISPR Array. *Front Microbiol* 12, 664299, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664299>
- [6] A. Fehrenbach et al. (2024). SpacerPlacer: Ancestral reconstruction of CRISPR arrays reveals the evolutionary dynamics of spacer deletions. *Nucleic Acids Research*, gkae772, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae772>

Verfasst von:



Axel Fehrenbach ist Doktorand im Cluster of Excellence „Controlling Microbes to Fight Infections“ an der Universität Tübingen. Im Zuge seiner Promotion beschäftigt er sich mit der Evolution des CRISPR-Arrays als Teil des bakteriellen Immunsystems. Dafür nutzt er mathematische Modelle sowie computergestützte Simulationen und Analysen von großen Datensätzen.



Dr. Franz Baumdicker ist Gruppenleiter im Cluster of Excellence „Controlling Microbes to Fight Infections“ an der Universität Tübingen. Seine Forschung beschäftigt sich mit der Diversität innerhalb bakterieller Populationen. Um die Dynamiken der bakteriellen Evolution zu entschlüsseln, entwickelt er mathematische Modelle und machine learning-Algorithmen für die Analyse großer genetischer Datensätze.

Korrespondenz

Axel Fehrenbach
Mathematical and Computational Population Genetics
Sand 14
72076 Tübingen
E-Mail: axel.fehrenbach@uni-tuebingen.de
franz.baumdicker@uni-tuebingen.de

Vielfältige Funktionen von CRISPR-Cas-Systemen

CRISPR-Cas in unkultivierten Archaeen

SARAH P. ESSER | ALEXANDER J. PROBST



ABB. 1 Der Crystal Geyser ist ein durch CO₂ angetriebener Kaltwasser-Geysir im US-amerikanischen Bundesstaat Utah. In seinem Wasser leben die beiden DPANN-Archaeen *Ca. Altiarchaeum crystalense* und *Ca. Huberiarchaeum crystalense* in einer symbiotischen Beziehung. Der hier gezeigte Ausbruch fand am 11. Oktober 2005 statt. Foto: Gouveia2, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org>

Manche Archaeen auf unserem Planeten gehören zu den am geringsten verstandenen Lebensformen. Viele leben unter extremen Bedingungen, manche sogar in Tiefen der Erde unter hohem Druck, ohne Sauerstoff und vor allem mit CO₂ als Kohlenstoffquelle. In den meisten Fällen kennt man die genauen Bedingungen, unter welchen diese Mikroorganismen leben, nicht. Zu diesen Bedingungen zählen – neben vielen weiteren Umweltfaktoren wie Temperatur, Druck und Nährstoffangebot – auch Interaktionen mit anderen Organismen. Deshalb sind viele von diesen Archaeen derzeit noch nicht kultivierbar. Dazu gehö-

Während circa 50 Prozent der Bakterien CRISPR-Cas-Systeme haben, weisen ungefähr 80 Prozent aller Archaeen diese Systeme auf. Komplexe Interaktionen innerhalb der Immunabwehr und vielfältige Einsatzmöglichkeiten von CRISPR-Cas-Systemen in der Biotechnologie wurden über die Jahre immer bekannter und bedeutsamer. Neben der klassischen Abwehr von viralen Infektionen sind auch zellinterne Mechanismen zur Genregulation für einige Mikroorganismen bekannt, jedoch ist unklar, ob CRISPR-Cas-Systeme und deren Interaktionswege symbiotische Beziehungen zwischen Mikroorganismen beeinflussen. In tiefen terrestrischen Aquiferen (Grundwasserleitern) findet man eine symbiotische Partnerschaft zwischen *Ca. Altiarchaeum* und *Ca. Huberiarchaeum*. Basierend auf neuen Ergebnissen wird angenommen, dass diese symbiotische Beziehung für Teilpopulationen dieser Archaeen in Aquiferen durch CRISPR-Cas-Systeme evolutionär beeinflusst wird.

ren etwa die meisten Vertreter der DPANN-Archaeen [1], wobei DPANN ein Akronym darstellt, bestehend aus den ersten benannten Archaeen dieses Superphylums (*Diapherotrites*, *Parvarchaea*, *Aenigmarchaea*, *Nanoarchaea* und *Nanobaloarchaea*). Kultivierte Repräsentative sind zum Beispiel *Nanoarchaeum equitans* [2] und *Candidatus Micarchaeum A-DKE* [3]. Die meisten DPANN-Archaeen sind als „Episymbionten“ bekannt – mit der Ausnahme von z. B. *Ca. Altiarchaeum*, das als ein freilebendes, CO₂-fixierendes Archaeon aus der aquatischen, tiefen Biosphäre beschrieben wurde [4, 5]. Es bleibt jedoch unklar,

ob das Zusammenleben (hier als Symbiose bezeichnet) mutualistisch, parasitisch oder neutralistisch ist. Die Symbiose ist für die meisten DPANN-Archaeen jedoch absolut notwendig, da sie nur begrenzte metabolische Funktionen in ihrem Genom kodieren und ohne symbiotische Partnerschaften somit nicht alle notwendigen Nährstoffe erhalten und keine Energie gewinnen können. Neben einem kleinen Genom haben Archaeen des DPANN-Superphylums auch nur eine kleine Zellgröße und sind meist kugelförmig [6–8]. Aufgrund der Tatsache, dass sie als Symbionten in der Natur vorkommen, sind sie nur selten zu kultivieren, und Studien im eigentlichen Ökosystem sind notwendig, um ihre Biologie besser zu verstehen.

Im Nachfolgenden wird die Studie „*A predicted CRISPR-mediated symbiosis between uncultivated archaea*“ – erschienen in *Nature Microbiology* 2023 [9] – beleuchtet. In dieser Studie wurde basierend auf von Metagenomik (Rekonstruktion der Genome aus Umwelt-DNA) und Transkriptionsanalysen die symbiotische Natur zweier DPANN-Archaeen untersucht – mit dem Ergebnis, dass das CRISPR-Cas-System eines DPANN-Archaeons eine entscheidende Rolle für das Zusammenleben in Hunderten von Metern tief im Erdinneren spielt.

Symbiose zweier DPANN-Archaeen

Die Studie beschreibt die Analyse von Genomen zweier DPANN-Archaeen – *Ca. Altiarchaeum* und *Ca. Huberiarchaeum* –, welche metagenomisch aufgelöst wurden und zuvor bereits als symbiotische Partner beschrieben worden waren [10, 11]. Diese symbiotische Beziehung wurde zuerst anhand von Korrelationen ihrer Häufigkeit über die Zeit im *Crystal Geyser* (CG, Utah, USA) vermutet [10, 11]. In dieser Symbiose gilt *Ca. Altiarchaeum crystalense* als Wirt, während *Ca. Huberiarchaeum crystalense* als Symbiont beschrieben wurde [10, 11]. Dies erfolgte aufgrund der basierend auf den Genomen vorhergesagten Eigenschaften, wobei *Ca. A. crystalense* prinzipiell alleine leben kann (und dies ist auch in anderen Ökosystemen weltweit der Fall [12, 13]). Der Symbiont *Ca. Huberiarchaeum* ist jedoch auf die Nährstoffe und Energie des Wirtes angewiesen.

Aufgrund der Präsenz der beiden Mikroben *Ca. Altiarchaeum horonobense* und *Ca. Huberiarchaeum juliae* in metagenomischen Datensätzen des *Horonobe Underground Research Laboratory* (HURL, Hokkaido, Japan) wurde dieses Ökosystem als Vergleich ausgewählt, um festzustellen, ob die vorhergesagten symbiotischen Interaktionen auch in anderen Systemen zur Anwendung kommen. Beide Ökosysteme, CG und HURL, sind tief liegende Grundwasserleiter, und *Ca. Altiarchaeum* ist einer der am häufigsten nachweisbaren Mikroorganismen in diesen Ökosystemen. Beide Ökosysteme haben auch eine erhöhte CO₂-Konzentration im Vergleich zu anderen Aquiferen; CG ist sogar durch periodische Eruptionen von Grundwasser zur Oberfläche gekennzeichnet, die rein durch frei werdendes CO₂ im Untergrund angetrieben werden [14, 10] (Abbildung 1).

Unterstützt durch Ergebnisse einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung haben die Forscher der Studie von Schwank et al. 2019 [11] die Hypothese aufgestellt, dass der Transfer von Metaboliten durch direkten cytoplasmatischen Kontakt von Wirt und Symbiont erfolgen kann. Diese Fusion des Cytoplasmas wurde auch von anderen Forschern beschrieben [15–18]. Der Transfer der Metabolite ist notwendig, da das Genom des Symbionten *Ca. Huberiarchaeum* einen sehr eingeschränkten zellulären Metabolismus kodiert [11]. Weder Nukleotide noch Aminosäuren können vollständig synthetisiert werden. Dementsprechend wurde für die hier beschriebene Studie [9] angenommen, dass der Symbiont für eine erfolgreiche Vermehrung vom Wirt abhängig ist und dass zwischen Wirt und Episymbiont direkter cytoplasmatischer Kontakt besteht, um Metabolite zu transferieren.

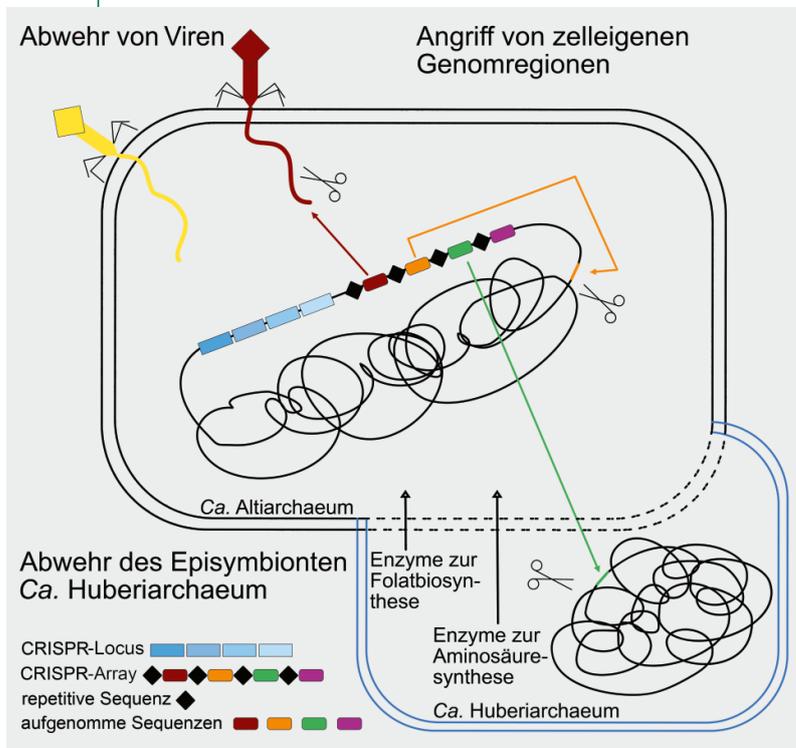
Drei Wege der CRISPR-Cas-Interaktionen

Während in CG ein Wirt-Symbionten-Verhältnis von 11:1 kalkuliert wurde, liegt dieses Verhältnis in HURL bei 6:1. Dies bedeutet, dass in CG weniger Zellen von *Ca. Altiarchaeum* einen symbiotischen Partner aufweisen als in HURL, was darauf hindeutet, dass die symbiotische Beziehung in HURL dominanter ist als in CG. Zudem zeigten metagenomische Analysen, dass *Ca. Altiarchaeum crystalense* zwei CRISPR-Systeme (Typ I-B und eines, das nicht präzise identifizierbar ist) kodiert. Für das zweite nicht spezifizierte CRISPR-System konnte keine zusammenhängende DNA-Sequenz gefunden werden, bei der der CRISPR-Array auf demselben Abschnitt lag wie die kodierten *cas*-Gene. Im Nachfolgenden werden beide Systeme zur Vereinheitlichung als CRISPR-Cas-Systeme adressiert. Durch eine Überprüfung, ob die repetitiven Sequenzen des CRISPR-Arrays des Archaeons *Ca. Altiarchaeum crystalense* auch in anderen einzeln sequenzierten Genomen (*single amplified genomes*; SAGs) gefunden werden können, wurde festgestellt, dass diese Sequenzen nur in Genomen von *Ca. Altiarchaeum crystalense* vorhanden sind. Dies zeigte, dass beide CRISPR-Cas-Systeme dem richtigen Mikroorganismus zugeordnet wurden und dass die beiden durch Metagenomik vorhergesagten CRISPR-Cas-Systeme einzigartig für das Archaeon in dem Ökosystem CG sind. Die repetitiven

IN KÜRZE

- **Symbiotische Beziehungen der Archaeen** *Ca. Altiarchaeum* und *Ca. Huberiarchaeum* werden von der Funktion des CRISPR-Cas-Systems beeinflusst.
- Eine Teilpopulation des Symbionten *Ca. Huberiarchaeum* kann die durch das CRISPR-Cas-System des Wirtes bei diesem selbst **ausgeschalteten metabolischen Funktionen** übernehmen.
- Die symbiotische Beziehung scheint sich für Teile der Population, auf Basis der CRISPR-Cas-Interaktionen, **von parasitisch zu mutualistisch** zu verändern.
- CRISPR-Cas-Systeme scheinen eine **erweiterte Rolle in der Evolution** zu übernehmen. Diese Hypothese muss allerdings durch die Analyse weiterer Systeme gestützt werden.

ABB. 2 | ANGRIFFSPUNKTE DES CRISPR-CAS-IMMUNSYSTEMS IN *Ca. ALTIARCHAEUM*



Neben der klassischen Virenanabwehr und dem Angriff auf das eigene Genom in *Ca. Altiarchaeum* wird auch der Episymbiont *Ca. Huberiarchaeum* angegriffen. Während des Angriffs des eigenen Genoms von *Ca. Altiarchaeum* kann der Symbiont spezifische metabolische Funktionen, welche ausgeschaltet wurden, theoretisch übernehmen.

Sequenzen der beiden CRISPR-Cas-Systeme konnten nahezu mit 100-%iger Ähnlichkeit identifiziert werden (eine Basenvarianz der repetitiven Sequenz des CRISPR-Cas-Systems I-B war systematisch zwischen den Ökosystemen HURL und CG vorhanden). Dies zeigt, dass die CRISPR-Cas-Systeme des *Ca. Altiarchaeum* selbst über Kontinente hinweg im Genom sehr konserviert sind.

Bei einer Standardanalyse der Zuordnung von Viren zu Wirten werden die *spacer* in CRISPR-Cas-Systemen mit potenziellen *protospacer*-Abschnitten bioinformatisch verglichen. Dadurch können vergangene Infektionen von Viren im Immunsystem identifiziert werden. Genau bei dieser Analyse wurden nicht nur insgesamt 64 virale Genome mit Infektionsvergangenheit bei *Ca. Altiarchaeum crystalense* gefunden [9], sondern auch ein Immunangriff auf das Genom des Wirtes *Ca. Altiarchaeum crystalense* selbst. Darüber hinaus wurden mehr als 1400 Treffer des Immunsystems gegen das Genom des Episymbionten gefunden. Da eine CRISPR-Cas-Immunantwort gegen DPANN-Archaeen zuvor nicht bioinformatisch gezeigt worden war, wurde die Analyse auf diese spezielle Interaktion hin fokussiert. Die Schemata der postulierten verschiedenen CRISPR-Cas-Interaktionen sind in Abbildung 2 vereinfacht zusammengefasst.

Um zu bestimmen, welche Einflüsse die Immunabwehr auf das Genom des Wirtes und das Genom des Episymbionten haben, wurde der Metabolismus der Mikroorganismen auf Basis der identifizierten Gene des jeweiligen Genoms modelliert. Im Genom des Episymbionten sind unter anderem Gene für eine CTP-Synthase und eine DNA-Methyltransferase (N-4/N-6-Domäne) Ziele des CRISPR-Cas-Systems. Eine erfolgreiche Immunabwehr in diesen Regionen würde diese Gene und damit deren Expression ausschalten, so dass zum Beispiel die Synthese von Cytidintriphosphat (CTP) aus Uridintriphosphat (UTP) verringert oder vollständig verhindert wird. Eine derartige metabolische Veränderung wäre letal für den Episymbionten.

Während des Immunangriffs gegen das eigene Genom von *Ca. Altiarchaeum* wurde zum Beispiel die Phenylalanin-tRNA-Synthase angegriffen. Unter der Annahme, dass das CRISPR-Cas-System aktiv ist und die Funktion der Synthase in *Ca. Altiarchaeum* ausgeschaltet wurde, muss man davon ausgehen, dass die ausgeschaltete Funktion in irgendeiner Weise komplementiert werden muss. Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass der Symbiont – trotz seines sehr limitierten Metabolismus – genau diese Funktion komplementieren kann. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil der Population evolutionär von einer parasitischen Symbiose zu einer mutualistischen Symbiose gewechselt ist. Ähnliche Interaktionen zwischen *Ca. Altiarchaeum* und *Ca. Huberiarchaeum* konnten nicht nur in CG gefunden werden, sondern auch in metagenomischen Datensätzen von HURL. In zuvor beschriebenen und kultivierten symbiotischen Partnerschaften wie der zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* [19-21] wurden diese CRISPR-Cas-basierten Interaktionen dagegen nicht gefunden.

Parasitismus oder Symbiose?

Entscheidend für das Verständnis der Symbiose der beiden Organismen ist die Analyse des sogenannten *protospacer adjacent motives* (PAM). Diese Sequenz, die neben der Zielsequenz des CRISPR-Cas-Systems liegt, ist ausschlaggebend dafür, ob das CRISPR-Cas-System an der entsprechenden Stelle schneiden kann. Analysen der PAMs von Viren und Episymbionten von *Ca. Altiarchaeum* zeigten, dass diese hoch konserviert sind und damit ein Angriff in der Theorie erfolgreich sein sollte. Dies ist jedoch anders für die Zielsequenzen im eigenen Genom des Wirtes *Ca. Altiarchaeum*. Hier ist die Sequenz nicht konserviert, so dass die Inaktivierung des Zielgens vermutlich nur in einer Teilpopulation des *Ca. Altiarchaeum* – und zwar derjenigen, die das PAM besitzt –, stattfindet und die oben beschriebene Komplementierung durch den Episymbionten dementsprechend nur für diese notwendig ist. Somit schlussfolgerten die Studienautor/-innen, dass es sich im Falle von *Ca. Huberiarchaeum* vor allem um Parasitismus handeln muss. Wenn nun die Wirt-Symbionten-Verhältnisse in den beiden Ökosystem zusammen mit den Mechanismen der Immunabwehr verbunden werden, dann kann

davon ausgegangen werden, dass die Interaktionen für eine Teilpopulation der beiden Archaeen zutreffen. Dabei scheint mit einem Verhältnis von 1:11 (*Ca. Huberiarchaeum*: *Ca. Altiarchaeum*) in CG ein kleinerer Teil der Population in der symbiotischen Partnerschaft zu leben als in HURL mit einem Verhältnis von 1:6. Dies deutet darauf hin, dass die Veränderung von einer parasitischen zu einer mutualistischen Beziehung in HURL weiter fortgeschritten sein könnte als in CG.

Die anschließende Frage war, ob die Immunabwehr gegen andere Archaeen ein Einzelfall ist, oder ob die CRISPR-Cas-Systeme anderer Archaeen auch potenzielle Angriffe gegen Fremdgenome starten könnten. Um dies zu untersuchen, wurden mehr als 7000 archaeelle Genome der öffentlichen Datenbank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) herangezogen und deren CRISPR-Cas-Systeme mithilfe bioinformatischer Methoden identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem in aquatischen Systemen CRISPR-Cas-Interaktionen zwischen Archaeen vorhanden waren. Diese Interaktionen schlossen u. a. auch andere DPANN-Archaeen ein wie z. B. *Ca. Aenigmarchaeum* und *Ca. Diapherotrites*. Spezies, die zur Familie *Ca. Aenigmarchaeum* und *Ca. Diapherotrites* gehören, weisen wie andere DPANN-Archaeen eine limitierte metabolische Kapazität auf. Deshalb wird auch für diese Familien von einer symbiotischen Partnerschaft ausgegangen [22, 23].

Schlussfolgernd wurde vermutet, dass die CRISPR-Cas-Systeme von *Ca. Altiarchaeum* nicht nur eine Verteidigungslinie gegen invasive Viren sind, sondern auch dazu genutzt werden können, gegen parasitäre Interaktionen mit symbiotischen Partnern zu agieren. Allerdings kann die symbiotische Beziehung zwischen *Ca. Altiarchaeum* und *Ca. Huberiarchaeum* auch von Vorteil sein, da die metabolische Modellierung gezeigt hat, dass *Ca. Huberiarchaeum* die vom CRISPR-Cas-System ausgeschalteten metabolischen Funktionen des Wirts komplementieren kann – zumindest in der Theorie. Setzt man die hier vorliegenden Mechanismen des Immunangriffs mit der Evolution in Zusammenhang, dann scheint vor allem der Immunangriff auf das eigene Genom des Wirtes intuitiv von Nachteil für den Wirt zu sein. Warum die Immunabwehr zwischen den beiden Archaeen in dieser Form stattfindet – zumindest den metagenomischen und metatranskriptomischen Daten zufolge – ist noch unklar. Langfristig sollte die Vielfältigkeit von CRISPR-Cas-Systemen und ihre individuelle Nutzung gegen symbiotische Partner tiefgreifender analysiert werden, wobei eine Anzucht der beiden Organismen im Labor das allgemein hier vorgestellte Konzept noch verifizieren oder falsifizieren muss. Zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung werden viele Kultivierungsmethoden experimentell getestet, um die bis heute unkultivierten Mikroorganismen im Labor vermehren zu können. Da aber die Kultivierungsbedingungen nahezu identisch zu den Bedingungen im Ökosystem sein müssen, ist dies eine große Herausforderung.

Zusammenfassung

*Kleine symbiotische Archaeen aus dem DPANN-Superphylum gehören zu den mysteriösesten Lebensformen auf Erden. Um diese meist unkultivierten Organismen besser zu verstehen, wurde kürzlich (2023) in einem Artikel in Nature Microbiology unter dem Titel „A predicted CRISPR-mediated symbiosis between uncultivated archaea“ die natürliche Interaktion zweier solcher Organismen beschrieben [9]. In der auf Metagenomik und Metatranskriptomik basierenden Studie wurden der freilebende Wirt, das DPANN-Archaeon *Ca. Altiarchaeum*, welcher zwei verschiedene CRISPR-Cas-Systeme kodiert, und dessen Episymbiont *Ca. Huberiarchaeum* in zwei unterschiedlichen Ökosystemen analysiert. In beiden richtete sich die Immunabwehr des Wirtes *Ca. Altiarchaeum* nicht nur gegen Viren, sondern auch gegen das Genom des Episymbionten. Unter der Annahme eines direkten zytoplasmatischen Kontakts konnte mittels metabolischer Modellierung gezeigt werden, dass der Episymbiont ohne Wirt nicht überleben kann und dass das CRISPR-targeting für ihn tödlich sein kann. Diese Art der CRISPR-Cas-basierten Immunabwehr konnte auch in Genomen anderer Archaea aus aquatischen Ökosystemen bioinformatisch identifiziert werden. Insgesamt deuten die Analysen darauf hin, dass die Funktionsweisen der CRISPR-Cas-Systeme komplexer sein können als bisher bekannt; allerdings ist ein direkter Nachweis im Labor aufgrund fehlender Kultivierungsmethoden dieser Organismen noch ausstehend.*

Summary

The diverse functions of CRISPR-Cas systems in uncultivated Archaea

*Small symbiotic archaea of the DPANN superphylum are some of the most mysterious organisms on earth. To better understand these mostly uncultivated organisms, the natural interaction of two such DPANN archaea – the free living DPANN archaeon *Ca. Altiarchaeum* and its episymbiont *Ca. Huberiarchaeum* – was described in a recent article entitled „A predicted CRISPR-mediated symbiosis between uncultivated archaea“, published in Nature Microbiology in 2023 [9]. In this study based on metagenomics and metatranscriptomics, the host *Ca. Altiarchaeum* encoding two different CRISPR-Cas systems and its episymbiont *Ca. Huberiarchaeum* were analysed in two different ecosystems. In both of them, the immune system of the host did not only target viruses but also the genome of the episymbiont. Assuming a direct cytoplasmic contact, metabolic modeling clearly demonstrated that the episymbiont cannot survive without its host and that the CRISPR-targeting can even be lethal. This kind of immune defense – based on CRISPR-Cas – could be identified bio-informatically in the genomes of other Archaea in aquatic ecosystems. All things considered, the analyses indicate that CRISPR-Cas systems and the way they function can be more complex than previously known. However, a direct proof in a laboratory by cultivating these organisms is still due because of a lack of suitable cultivation methods.*

Schlagworte:

DPANN-Archaeen, symbiotische Beziehungen, Immunabwehrmechanismen

Literatur

- [1] C. Rinke et al. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499, 431–437. <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- [2] H. Huber et al. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63–67. <https://doi.org/10.1038/417063a>
- [3] S. Krause et al. (2022). The importance of biofilm formation for cultivation of a Micrarchaeon and its interactions with its Thermoplasmatales host. *Nat Commun* 13, 1735. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29263-y>
- [4] A. J. Probst et al. (2013). Tackling the minority: sulfate-reducing bacteria in an archaea-dominated subsurface biofilm. *The ISME Journal* 7, 635–651. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.133>
- [5] A. J. Probst, C. Moissl-Eichinger (2015). "Altiarchaeales": uncultivated archaea from the subsurface. *Life (Basel)* 5, 1381–95. <https://doi.org/10.3390/life5021381>
- [6] C. J. Castelle et al. (2018). Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature Reviews Microbiology* 16, 629–645. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0076-2>
- [7] N. Dombrowski et al. (2019). Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea. *FEMS Microbiology Letters* 366.
- [8] Li Liangzhi et al. (2021). Comparative Genomics Provides Insights into the Genetic Diversity and Evolution of the DPANN Superphylum. *mSystems* 6, 10.1128/msystems.00602-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00602-21>
- [9] S. P. Esser et al. (2023). A predicted CRISPR-mediated symbiosis between uncultivated archaea. *Nature Microbiology* 8, 1619–1633. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01439-2>. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz008>
- [10] A. J. Probst et al. (2018). Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nature Microbiology* 3, 328–336. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0098-y>
- [11] K. Schwank et al. (2019). An archaeal symbiont-host association from the deep terrestrial subsurface. *The ISME Journal* 13, 2135–2139. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0421-0>
- [12] R. Henneberger et al. (2006). New Insights into the Lifestyle of the Cold-Loving SM1 Euryarchaeon: Natural Growth as a Monospecies Biofilm in the Subsurface. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 192–199. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.192-199.2006>
- [13] C. Moissl et al. (2005). The unique structure of archaeal 'hami', highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Molecular Microbiology* 56, 361–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04294.x>
- [14] A. W. HERNSDORF et al. (2017). Potential for microbial H₂ and metal transformations associated with novel bacteria and archaea in deep terrestrial subsurface sediments. *The ISME Journal* 11, 1915–1929. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.39>
- [15] B. J. Baker et al. (2010). Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8806–8811. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914470107>
- [16] L. R. Comolli, J. F. Banfield (2014). Inter-species interconnections in acid mine drainage microbial communities. *Frontiers in Microbiology* 5, 367. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00367>
- [17] J. N. Hamm et al. (2019). Unexpected host dependency of Antarctic Nanohaloarchaeota. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 14661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905179116>
- [18] T. Heimerl et al. (2017). A Complex Endomembrane System in the Archaeon *Ignicoccus hospitalis* Tapped by *Nanoarchaeum equitans*. *Frontiers in Microbiology* 8, 1072. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01072>
- [19] P. Forterre et al. (2009). Happy together: genomic insights into the unique *Nanoarchaeum/Ignicoccus* association. *Journal of Biology* 8, 7. <https://doi.org/10.1186/jbiol110>
- [20] H. Huber et al. (2000). *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2093–2100. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2093>
- [21] W. Paper et al. (2007). *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans.' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 803–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64721-0>
- [22] Li Yu-Xian et al. (2021). Deciphering Symbiotic Interactions of "Candidatus Aenigmarchaeota" with Inferred Horizontal Gene Transfers and Co-occurrence Networks. *mSystems* 6, 10.1128/msystems.00606-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00606-21>
- [23] N. H. Youssef et al. (2015). Insights into the metabolism, lifestyle and putative evolutionary history of the novel archaeal phylum 'Diapherotrites.' *ISME J* 9, 447–460. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.141>

Verfasst von:



Sarah P. Esser ist wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Duisburg-Essen am Lehrstuhl für Umweltmetagenomik des Research Centers One Health Ruhr der Universitätsallianz Ruhr. Sowohl der Bachelor- als auch der Masterabschluss wurden in Water Science an der Universität Duisburg-Essen erlangt. Die Doktorarbeit wurde thematisch zum Archaeon Ca. Altiarchaeum und dessen Interaktionen mit dem Episymbionten Ca. Huberia archaeum in verschiedenen Ökosystem angefertigt.



Alexander J. Probst ist Forschungsprofessor für Umweltmetagenomik am Research Center One Health Ruhr der Universitätsallianz Ruhr und ordentlicher Professor an der Fakultät Chemie der Universität Duisburg-Essen. Seinen Doktorgrad erlangte er an der Universität Regensburg unter Reinhard Wirth und Christine Moissl-Eichinger, bevor er als Postdoktorand an der University of California UC Berkeley bei Jill Banfield forschte. 2018 wurde er Professor für Aquatische Mikrobielle Ökologie an der Universität Duisburg-Essen. Seit 2024 ist Alexander Probst auch Affiliate Scientist am Lawrence Berkeley National Laboratory in den USA.

Korrespondenz

Dr. Sarah P. Esser
Lehrstuhl für Umweltmetagenomik
Research Center One Health der Universitätsallianz Ruhr
Fakultät Chemie
Universität Duisburg-Essen
45141 Essen
E-Mail: sarah.esser@uni-due.de

Die evolutionäre Wurzel der CRISPR-Cas-Systeme

Casposons

FINN OLE GEHLERT | LISA HELLWIG | RUTH ANNE SCHMITZ

Casposons tragen alle Strukturen mobiler genetischer Elemente außer Transposasen oder Integrasen. Sie kodieren Enzyme ähnlich der Cas1-Enzyme des CRISPR-Cas-Systems und werden daher als evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme betrachtet. Diese Enzyme werden als Cas1-solo oder Casposase bezeichnet und sind separat vom CRISPR-Cas-System lokalisiert. Die Funktion von Casposons wurde nun abschließend in vitro und in vivo untersucht und nachgewiesen.



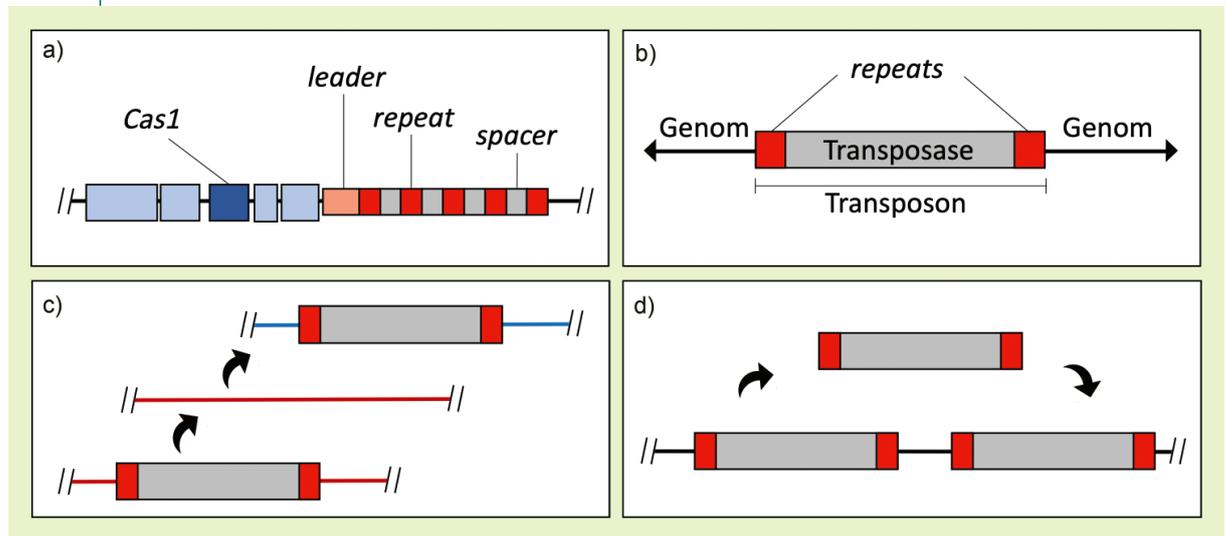
CRISPR-Cas-Systeme sind eine sehr gut untersuchte Klasse von Verteidigungsmechanismen der Prokaryoten gegen verschiedene mobile genetische Elemente. Basierend auf ihrer Fähigkeit, Fragmente der genetischen Information eines Angreifers z. B. eines Bakteriophagen im Erbgut der angegriffenen Zelle und damit in der Population zu speichern, werden sie auch als adaptive Immunsysteme der Bakterien und Archaeen bezeichnet. Als ein Schlüsselenzym, welches zentral für die Integration neuer DNA-Fragmente in die sogenannten CRISPR-Arrays ist, wurde Cas1 identifiziert. Es ist daher in nahezu allen heute bekannten CRISPR-Cas-Systemen vorhanden. Unerwarteterweise zeigten neueste bioinformatische Analysen jedoch auch das Vorkommen von Cas1 verwandten Genen, die alleinstehend außerhalb von CRISPR-Cas-Systemen in Transposon-ähnlichen Strukturen vorliegen. Die entsprechenden Genprodukte wurden daher als Cas1-solo-Proteine bezeichnet. Basierend auf der Tatsache, dass keine weiteren Transposase kodierenden Gene innerhalb der Elemente identifiziert werden konnten, wurden die Cas1-solo-Proteine als Schlüsselenzyme für die Aktivität dieser Transposon-ähnlichen Elemente angesehen, die man in Folge auch als Casposons bezeichnet. Auf dieser Grundlage werden Casposons als evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme diskutiert. Die CRISPR-Cas-Evolution könnte also Parallelen zur Entwicklung der Immunsysteme höherer Organismen haben, da auch hier eine ehemalige Transposase (RAG1) aus Transib-Transposons eine entscheidende Rolle bei der Neukombination variabler Regionen von Antikörpern spielt [1]. Um diese Paral-

len in der Evolution weiter zu erforschen, wurden die Casposons in ihrer Funktionsweise näher charakterisiert. Erst kürzlich gelang es, ihre Aktivität in lebenden Zellen nachzuweisen. Alle vorangegangenen Analysen konzentrierten sich zunächst ausschließlich auf bioinformatische Ansätze und auf die *in vitro*-Charakterisierung der Enzymaktivitäten. Der folgende Artikel umfasst einen Überblick über die *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung von Casposons.

CRISPR-Cas als prokaryotische Verteidigungssysteme

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) und mit CRISPR assoziierte Proteine (Cas) sind vielfältige Verteidigungssysteme von Prokaryoten, die gegen alle möglichen Arten von mobilen genetischen Elementen gerichtet sein können. Die Systeme werden nach ihrer Enzymausstattung und ihren Zielmolekülen in verschiedene Klassen, Typen und Subtypen unterteilt. So sind einzelne Systeme optimiert, um fremde RNA oder DNA zu erkennen und effizient zu zerstören. Dabei wird unterschieden, ob die Hauptaktivität der Systeme von Proteinkomplexen (Klasse I) oder einzelnen großen Proteinen ausgeht (Klasse II) [2, 3]. Die Targets können bei allen Systemen sehr divers sein wie z. B. Bakteriophagen/Viren oder auch Plasmide [2, 3]. Dabei unterteilt sich die CRISPR-Cas-Aktivität in drei funktionale Phasen [2, 3]. In der ersten Phase der Adaptation werden beispielsweise die Fremd-DNA eines Bakteriophagen erkannt und Fragmente seines Genoms vom Adaptationsmodul – zumeist

ABB. 1 | CRISPR-CAS-SYSTEME UND TRANSPOSONS



a) Darstellung der genetischen Struktur der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) mit assoziierten Protein-(Cas)-Systemen mit Fokus auf Cas1 als Teil des Adaptationsmoduls und dem Aufbau des CRISPR-Arrays bestehend aus der *leader*-Sequenz, den *spacer*-Einheiten und den *repeats*. **b)** Aufbau einfacher DNA-Transposons bestehend aus den terminalen invertierten *repeats* (TIRs) und des Transposase-Gens. **c)** Exzision und Translokation von Transposons von einer Genomposition zu einer neuen Position. Die Kopienanzahl der Transposons bleibt gleich. **d)** Kopieren eines Transposons von einer bekannten Position zu einer weiteren Position. Die Kopienanzahl der Transposons steigt mit ihrer Aktivität.

bestehend aus Cas1 und Cas2 in Verbindung mit weiteren Cas-Proteinen wie zum Beispiel Cas4 – an bestimmten Erkennungsmotiven (*protospacer adjacent motif*, PAM) des jeweiligen CRISPR-Cas-Systems identifiziert, geschnitten und in das CRISPR-Array integriert (Abbildung 1a). In der Expressionsphase werden der CRISPR-Array und seine Cas-Proteine exprimiert. Es entsteht die prä-crRNA (crRNA = CRISPR-RNA), das Transkript des CRISPR-Arrays, das nur die kurzen *spacer*-Sequenzen, die das Erbgut vergangener Angreifer repräsentieren, und die dazwischenliegenden Wiederholungssequenzen (*repeats*) enthält. Diese RNA des Arrays wird durch verschiedene Cas-Proteine prozessiert, bis reife crRNAs vorliegen, die jeweils einen einzelnen *spacer* repräsentieren. Insgesamt stellen alle verschiedenen, reifen crRNAs, die so in der Expressionsphase entstehen, also einen Pool von Sequenzen dar, der auf alle jemals erfassten ehemaligen Angreifer zurückgeht. In der Interfe-

renzphase kommt es dann zur spezifischen Basenpaarung der entsprechenden crRNA mit dem jeweiligen Genom des Angreifers in den sogenannten Cascade-/Interferenz-Komplexen [2, 3]. Innerhalb dieser Komplexe erfolgt dann der gezielte enzymatische Abbau des fremden Erbguts.

Neben den Cas1-Proteinen, deren Gene elementarer Teil der CRISPR-Cas-Systeme sind, wurden weitere Gene der Cas1-Familie identifiziert, deren genomische Position jedoch weit außerhalb von CRISPR-Cas-Systemen liegt und deren genomische Umgebung Charakteristika von transponierbaren Elementen aufweist [4].

Transposons

Transponierbare Elemente oder kurz Transposons wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Barbara McClintock zuerst bei verschiedenen Pflanzen entdeckt und näher untersucht [5]. Transposons sind mobile genetische Elemente, die ihre Position in ihrem jeweiligen Genom verändern können; häufig verändert sich dabei ebenfalls ihre Kopienanzahl (Abbildung 1b–d). Es gibt eine große Bandbreite von transponierbaren Elementen, die in der Regel alle für ihre Funktion benötigten Gene tragen [6]. Transposons werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt, deren Nomenklatur mit der weiteren Untersuchung und der weiteren Entdeckung neuer mobiler Elemente ständigen Veränderungen unterworfen ist. Allgemein gilt jedoch, dass Transposons danach unterteilt werden, ob sie ein RNA-Intermediat aufweisen, wie dies bei Klasse-I-Transposons (Retrotransposons) der Fall ist, oder ob sie kein RNA-Intermediat aufweisen und somit zu den

IN KÜRZE

- Casposons tragen alle Strukturen **mobiler genetischer Elemente** außer Transposasen oder Integrasen.
- Sie kodieren Enzyme ähnlich der Cas1-Enzyme des CRISPR-Cas-Systems und werden daher als **evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme** betrachtet.
- Diese Enzyme werden als **Cas1-solo oder Casposase** bezeichnet und sind separat vom CRISPR-Cas-System lokalisiert.
- Die **Funktion von Casposons** wurde nun abschließend in vitro und in vivo untersucht und nachgewiesen.

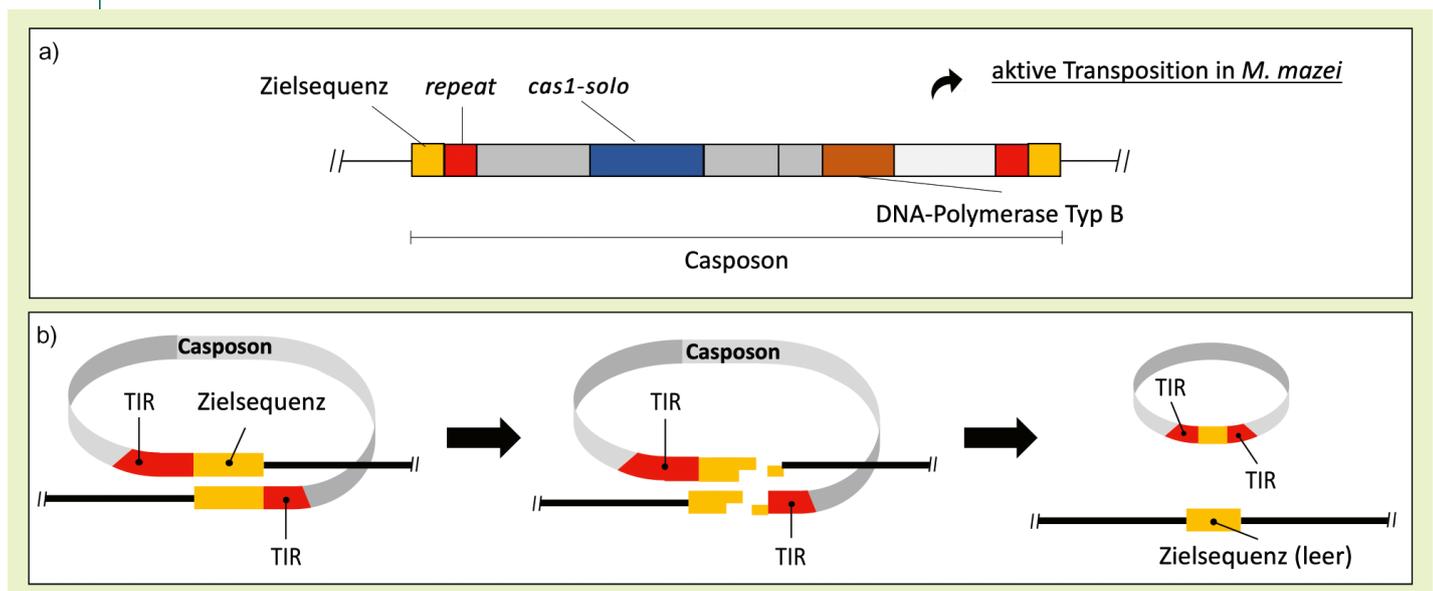
Klasse-II-Transposons gehören (DNA-Transposons) [6]. Die Minimalausstattung der DNA-Transposons, die sogenannten IS-Elemente (Insertionselemente), beinhaltet die kodierende Sequenz der Transposase sowie direkt flankierende Bereiche, die invertierte Sequenzen aufweisen (*terminal inverted repeats*; TIRs) [6] (Abbildung 1b). Die Transposase erkennt die TIRs an den Transposonenden und kann das transponierbare Element aus seiner aktuellen Position herauschneiden oder es durch weitere Mechanismen replizieren und es an anderer Stelle wieder in das Genom einfügen (Abbildung 1c, d). Die Transposasen werden je nach Funktion unterteilt. Typische Transposasen sind Serin- oder Tyrosin-Transposasen. Hier ist die jeweilige Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms namensgebend, die entscheidend für den nukleophilen Angriff auf das DNA-Molekül ist und abschließend eine vorübergehende kovalente Bindung mit dem freiwerdenden DNA-Ende eingeht [6]. Ein Beispiel für DNA-Transposons aus Eukaryoten sind die sogenannten *Mavericks*. Diese Elemente umfassen mehrere Kilobasen an Nukleotiden und werden ebenfalls durch TIRs begrenzt. Sie kodieren mehrere Gene, unter anderem eine Integrase und eine eigene DNA-Polymerase vom Typ B, weshalb davon ausgegangen wird, dass diese Transposons sich selbst unabhängig vom Wirtsgenom replizieren können [7].

Casposons

Die Entdeckung von *cas1-solo*-Genen in genetischen Elementen, die von TIRs begrenzt werden und keine weiteren Gene für Transposasen oder Integrasen aufwiesen,

führte zur Hypothese, dass diese Cas-Proteine eine Schlüsselrolle für die Aktivität der als Casposons bezeichneten Elemente spielen (Abbildung 2a) [4, 8]. Casposons wurden in verschiedenen Organismen gefunden und vor allem in Archaeen der Gattung *Metbanosarcina* untersucht [8, 9]. Die Elemente werden anhand ihrer Enzymarchitektur und der Taxonomie ihrer Wirtsorganismen in vier verschiedene Familien eingeteilt [4, 8]. Casposons der ersten Familie sind charakteristisch für Thaumarchaeota und kodieren typischerweise eine *protein-primed* Typ B DNA-Polymerase (PolB), die in hohem Maße Ähnlichkeiten zu den Polymerasen von archaeellen Viren aufweist, wie dies beispielsweise für die Viren His1 und His2 gezeigt werden konnte [10]. Casposons der zweiten und dritten Familie hingegen nutzen *RNA-primed* PolBs und werden zudem nach ihren jeweiligen Wirtsorganismen unterschieden [4, 8]. So wurden Familie-2-Casposons in einer großen Bandbreite von Euryarchaeota wie zum Beispiel *Aciduliprofundum boonei* T469 identifiziert [11]. Im Gegensatz dazu kommen Familie-3-Casposons nur bei Actinobacteria und Proteobacteria vor [4, 8]. Die letzte Gruppe von Casposons, zugehörig zur Familie 4, wurde bisher nur in *M. mazel*-Stämmen gefunden [4, 8]. Erste hypothetische Modelle für die Casposon-Aktivität gingen davon aus, dass die Transposition ähnlich zum Mechanismus der *Mavericks* ablaufen könnte, da beide Elemente ähnlich groß sind, eine ähnliche Komplexität mit mehreren Genen aufweisen und ebenfalls eigene DNA-Polymerasen vom selben Typ kodieren (Abbildung 2a). Ausgehend von dieser Ähnlichkeit postulierten Krupovic und

ABB. 2 | STRUKTUR VON CASPOSONS



a) Darstellung der Struktur von Casposons anhand des MetMAZ-C1-Casposons aus *M. mazel*. MetMAZ-C1 besitzt terminale invertierte repeats (TIRs) und eine Duplikation der Zielsequenz. Seine Sequenz kodiert acht verschiedene Proteine, zu denen neben Cas1-solo ebenfalls eine DNA-Polymerase vom Typ B gehört. b) Hypothetisches Modell der Casposon-Translokation über ein zirkuläres Intermediat, basierend auf der Beobachtung von einer einzelnen übrigbleibenden Zielsequenz nach der Exzision und dem Übertragen einer Zielsequenz zu einer neuen Genomposition bei der Casposon-Reintegration.

Kollegen, dass Casposons nur während der Replikation des Wirts aktiv sein könnten. Sie gingen davon aus, dass nach dem Entwinden der *supercoiled* doppelsträngigen DNA in der Replikation eine Basenpaarung der Casposon-Enden (TIRs) stattfinden könnte, die notwendig wäre, um von Cas1-solo erkannt und aus dem entsprechenden Einzelstrang ausgeschnitten zu werden [4]. Die anschließende Replikation des Genoms würde zu einer Genomkopie ohne Casposon mit direkt verknüpfter verdoppelter Zielsequenz führen. Gleichzeitig könnte sich das ausgeschnittene Casposon mit der eigenen DNA-Polymerase replizieren und somit wieder den eigenen Doppelstrang herstellen [4]. Das Team um Krupovic postulierte eine hohe Ähnlichkeit innerhalb der Funktion von Cas1-solo und CRISPR-Cas1 und somit ebenfalls eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Casposon-Integration ähnlich abläuft wie die Integration neuer *spacer*-Sequenzen in die CRISPR-Arrays [4].

Untersuchungen zur Aktivität der Casposons

Nach diesen Vorhersagen wurde die Funktion der Casposons in mehreren *in vitro*-Studien untersucht, die sich auf einzelne Casposons und ihre Schlüsselenzyme konzentrierten. Ein intensiv untersuchtes Beispiel stammt von *A. boonei* [11]. Das hier identifizierte Cas1-solo-Protein katalysierte eine ortsspezifische Integration von Einzelsträngen (Oligonukleotiden) und synthetischen Mini-Casposons, wenn die native Zielsequenz zur Verfügung stand [12]. Casposons wurden in großen Mengen in Methanoarchaea wie *Methanosarcina*-Arten und -Stämmen gefunden wie z. B. MetMaz1FA1A3-C2 und MetMaz-C1 [4, 8]. Hier zeigte das Cas1-solo (WP_011035139.1) des Casposons MetMaz1FA1A3-C2 ebenfalls, dass sowohl die Casposon-Enden als auch ein breites Spektrum an Substraten, z. B. ssDNA und ssRNA (ss = *single-stranded*, einzelsträngig), aktiv erkannt und ortsspezifisch integriert wurden [9]. Darüber hinaus ergab die Strukturanalyse des Casposase-DNA-Komplexes eine Tetramerbildung sowie einzelne strukturelle Unterschiede zwischen der CRISPR-Cas-Integrase und Cas1-solo [9].

Für den *in vivo*-Aktivitätsnachweis von Casposons wurde das Casposon MetMaz-C1 von *M. mazei* Gö1 mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. So wurde die aktive Translokation mittels *nested*-PCRs (PCR = Polymerasekettenreaktion) und zum anderen mittels eines Mini-Casposons nachgewiesen [13].

Nachweis aktiver Translokation mit nested-PCR

Die Aktivität wurde mittels Lokalisierung im Genom durch *nested*-PCR nachgewiesen. *Nested*-PCRs sind PCRs, bei der zwei hintereinander geschaltete PCRs mit demselben Template ablaufen, um eine höhere Produktmenge zu erzeugen. Für den Nachweis der Casposon-Aktivität wurden PCR-Primer abgeleitet, die links und rechts der bekannten Casposon-Position im *M. mazei* Genom binden konn-

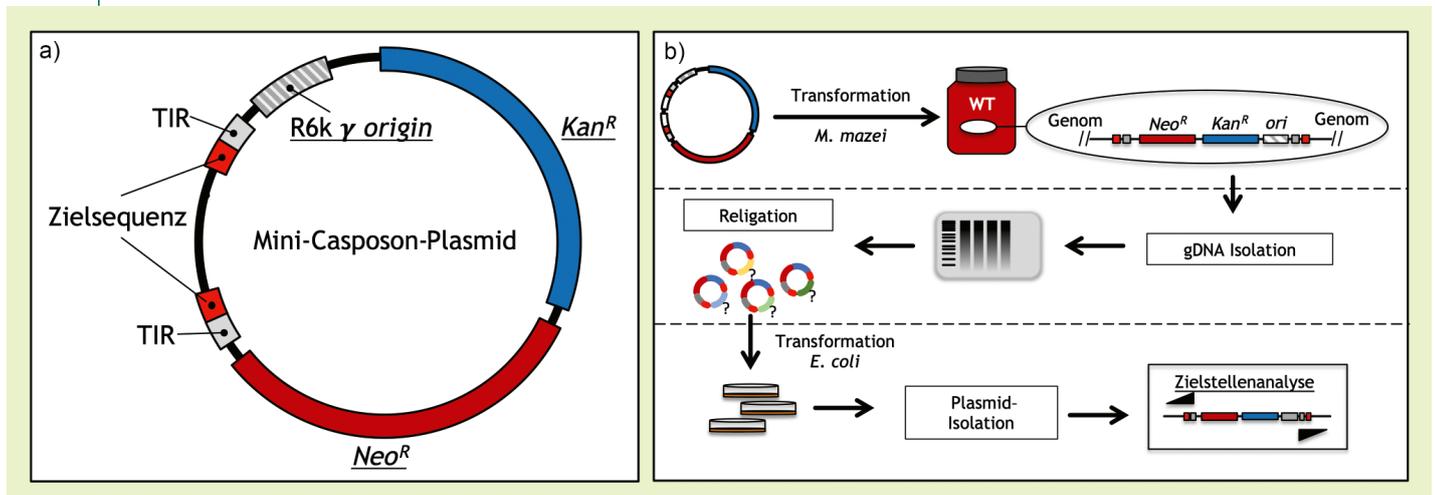
ten [13]. Die Elongationszeit wurde so kurz gewählt, dass nur dann ein PCR-Produkt erzeugt wurde, wenn das Casposon seine ursprüngliche Position durch Transposition verlassen hatte (Exzision). Als PCR-Template wurde genomische DNA von zwei verschiedenen *M. mazei*-Stämmen verwendet [13]. Die *nested*-PCR zeigte, dass in einer normalen *M. mazei*-Population einzelne Zellen Genome mit leeren Zielsequenzen trugen. Dies bedeutete, dass eine geringe basale Casposon-Aktivität vorlag [13]. Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte unerwarteterweise, dass keine Verdoppelung der Zielsequenz vorlag, sobald das Casposon sich aus der bekannten Position ausgeschnitten hatte. Die ursprüngliche Zielsequenz wurde wiederhergestellt, ohne Hinweise auf das vorherige Vorhandensein eines Casposons zurückzulassen (Abbildung 2b; [13]). Dies deutete erstmalig auf einen anderen Mechanismus hin als von Krupovics Team vorhergesagt.

Zusätzlich wurde die potenzielle Casposon-Reintegration in das Wirtsgenom mit weiteren *nested*-PCRs untersucht. Mögliche Zielsequenzen waren bereits durch die bioinformatische Analyse von verschiedenen Casposons in der Literatur beschrieben worden [8]. Hier wurden die Primer so abgeleitet und zusammengestellt, dass die *forward*-Primer *upstream* der potenziellen neuen Zielsequenz binden konnten und die *reverse*-Primer innerhalb der Casposon-Sequenz. Die PCR konnte also nur ein Produkt bilden, wenn das Casposon erfolgreich in die neue Zielsequenz integrierte. Dies konnte in mindestens einem Fall bestätigt werden, in dem das Casposon in das distale Ende eines *tRNA-Leu*-Gens integrierte [13]. Ähnliches Verhalten wurde bereits für weitere Transposons gezeigt wie zum Beispiel für das prokaryotische Tn7-Transposon [14]. Die Sequenzierung der hier erzeugten PCR-Produkte deutete eine mögliche Übertragung der ursprünglichen Zielsequenz zur neuen Casposon-Position im Genom an. Auch dies wies auf einen möglicherweise anderen Mechanismus der Translokation hin [13].

Nachweis mittels generiertem Mini-Casposon

Ein weiterer unabhängiger Nachweis der *in vivo*-Casposon-Aktivität wurde mittels eines synthetischen Mini-Casposons erbracht. Hierbei wurde ein Plasmid generiert, auf dem die nativen Zielsequenzen und die TIRs einen *origin of replication* (*ori*) für *E. coli*, eine Kanamycin-Resistenzkassette und eine Neomycin-Resistenzkassette einrahmten (Abbildung 3) [13]. Das Plasmid wurde über eine Liposomen-vermittelte Transformation in *M. mazei* eingebracht und konnte sich hier aufgrund eines fehlenden *M. mazei* *origins* nicht replizieren (*suicide vector*). Nur im Falle einer Casposon-Aktivität konnte das Plasmid-kodierte Mini-Casposon aus dem Plasmid ausgeschnitten und in das *M. mazei*-Chromosom an typischen Integrationsstellen integrieren. In diesem Falle sind die resultierenden Zellen gegen Neomycin resistent und können angereichert und isoliert werden [13]. Die Kanamycin-Resistenz ist für *M. mazei* unbrauchbar, da dieses Antibiotikum – anders als Neomycin – keinen Einfluss auf Archaea hat. Neomycin ist

ABB. 3 | MINI-CASPOSON-ANSATZ



a) Plasmid-Karte des Mini-Casposon-Plasmids. Das Plasmid trägt ein synthetisches Mini-Casposon bestehend aus der Zielsequenzduplikation und den TIRs, die einen R6k γ -origin, eine Kanamycin- und eine Neomycinkassette einschließen. b) Design des Mini-Casposon-Experiments. Das Mini-Casposon-Plasmid wird in *M. mazei* transformiert, so dass das Mini-Casposon von seinem Plasmid in das *M. mazei*-Genom integrieren kann. Das übrige Plasmid geht verloren, da es keinen *M. mazei* origin of replication kodiert (suicide vector). Aus den positiven, gegen Neomycin resistenten Zellen wird genomische DNA (gDNA) isoliert. Diese DNA wird fragmentiert und mit sich selbst religiert, um Plasmid-ähnliche DNA-Fragmente zu erzeugen, die möglicherweise bekannte oder unbekannte Zielsequenzen enthalten. Diese Plasmide werden dann in *E. coli* transformiert. Hier wird dann mit Kanamycin selektiert; Plasmide der Einzelklone werden mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert und analysiert.

eines der wenigen Antibiotika, die das Wachstum von *M. mazei* beeinflussen können. Die genomische DNA der Neomycin-resistenten Kulturen wurde dann für ein *rescue cloning* verwendet, um die potenziellen Integrationsstellen zu identifizieren. Hierbei wurde die genomische DNA mit dem Enzym AccI behandelt und so in über 1000 verschiedene DNA-Fragmente unterschiedlichster Längen zerlegt, welche dann mit sich selbst ligiert und in *E. coli* transformiert wurden. Jene Zellen, die ein so entstandenes zirkuläres DNA-Fragment aufgenommen hatten, konnten nur dann in Anwesenheit des Antibiotikums wachsen, wenn das zirkuläre DNA-Fragment den R6K γ -origin beinhaltet und gleichzeitig die Kanamycin-Resistenzkassette [13], da sich in diesem Fall das DNA-Fragment wie ein Plasmid stabil repliziert und eine Antibiotika-Resistenz vermittelt. Über Selektion auf Kulturmedium mit Kanamycin wurden so positive Einzelklone identifiziert und ihre Plasmide über Sanger-Sequenzierung mit Primern sequenziert, die aus dem Mini-Casposon heraus gerichtet waren. Es zeigte sich, dass das Mini-Casposon die bereits besetzte Zielsequenz des nativen Casposons MetMaz-C1 erneut als Integrationsstelle nutzte und somit eine Tandemstruktur entstand, bei der beide Casposons durch eine gemeinsame Zielsequenz in der Mitte voneinander getrennt waren [13]. Dies wurde durch bioinformatische Analysen bereits vorhergesagt, da in einzelnen untersuchten *M. mazei*-Stämmen ebenfalls Strukturen beschrieben worden sind, in denen mehrere Casposons hintereinanderlagen [8]. Das Mini-Casposon transponierte somit ebenfalls aktiv und zielgerichtet.

Zusätzlich zu dieser Aktivität zeigte das Experiment außerdem, dass andere von *M. mazei* kodierte transponierbare Elemente ebenfalls aktiv waren.

Fazit

Die hier zusammengefassten Daten ermöglichen einen ersten tieferen Einblick in die Aktivität eines Casposons *in vivo*. Die Daten deuten auf eine geringe Casposon-Aktivität in einzelnen Zellen einer *M. mazei*-Population hin. MetMaz-C1 und das verwendete Mini-Casposon zeigten eine starke ortsspezifische Integration, wie bereits für verschiedene Casposons durch Charakterisierung ihrer Schlüsselenzyme *in vitro* vermutet wurde. Dass die ehemalige leere Zielsequenz von MetMaz-C1 nach der Exzision keine bleibende Duplikation aufwies und dass die Sequenzierung von potenziellen neuen Insertionsstellen die ursprüngliche Zielsequenz zeigte, deutete auf einen Mechanismus hin, bei dem die ursprüngliche Zielsequenz übertragen wird (Abbildung 2b, [13]). In Kombination mit einem erwarteten überhängenden Schnitt innerhalb der Zielsequenz deuten unsere Daten auf ein zirkuläres Casposon-Intermediat hin (Abbildung 2b) [4, 13]. Das Mini-Casposon-Experiment belegte, dass die Integration in dieselbe MetMaz-C1-Zielsequenz zu Tandemstrukturen führte, was möglicherweise als weiteres Argument für die evolutionäre Rolle der Casposons innerhalb der Entstehung der CRISPR-Arrays gelten kann. Solche Tandemstrukturen wurden für eine Vielzahl von transponierbaren Elementen und sogar für einige Casposon-Verwandte in verschiedenen *Methanosarcina*-Arten festgestellt (nachzulesen in [8, 15]). Insgesamt lieferte die aktuel-

le Studie nicht nur erste experimentelle Beweise für die *in vivo*-Aktivität von MetMaz-C1, sondern auch Hinweise auf ein neues Casposon-Translokationsmodell [4] und konnte somit die Rolle von Casposons als evolutionäre Ursprünge der CRISPR-Cas-Systeme weiter hervorheben.

Zusammenfassung

Casposons wurden erst kürzlich *in silico* in vielen Archaea entdeckt. Dabei handelt es sich um transponierbare Elemente, die bisher nur in bioinformatischen Analysen und *in vitro*-Assays mit Schwerpunkt auf der Aktivität ihrer Schlüsselenzyme, der Cas1-solo-Enzyme, untersucht wurden. Aufgrund dieser Enzyme gelten die Casposons als evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme. Jüngste Experimente mit *Methanosarcina mazei* bestätigen ihre *in vivo*-Aktivität – Exzision und Reintegration – mittels nested-PCRs. Die Ergebnisse legen die Existenz eines zirkulären Casposon-Intermediats nahe. Weiterhin wurde die Integration eines synthetischen, Plasmid-kodierten Mini-Casposons – bestehend aus einem R6K γ -origin und zwei Antibiotika-Resistenzkassetten – in das *M. mazei*-Chromosom festgestellt und näher analysiert. Das Mini-Casposon bildete nach erfolgreicher Integration eine Tandemstruktur mit dem nativen Casposon MetMaz-C1.

Summary

Casposons: The evolutionary root of CRISPR-Cas systems

Only recently, casposons have been discovered *in silico* in many archaea. So far, these transposable elements have only been studied by bioinformatic analyses and *in vitro* assays focusing on the activity of their key enzymes, the Cas1-solo enzymes. Due to these enzymes, casposons are considered to be the evolutionary origin of CRISPR-Cas systems. Recent experiments with *Methanosarcina mazei* confirmed their *in vivo* activity – excision and reintegration – using nested PCRs. The results suggest the existence of a circular casposon intermediate. Furthermore, the integration of a synthetic, plasmid-encoded mini-casposon – consisting of an R6K γ origin and two antibiotic-resistance cassettes – into the *M. mazei* chromosome was detected and analyzed in more detail. After successful integration, the mini-casposon was found to form a tandem structure with the native casposon MetMaz-C1.

Schlagworte

Methanosarcina mazei, CRISPR-Cas, Casposon, Translokation, Transposons, Mini-Casposons, nested-PCR

Literatur

- [1] V. V. Kapitonov et al. (2005). RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol* 3 (6), e181.
- [2] K. S. Makarova et al. (2017). SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell* 168 (1), 328–328, e1.
- [3] K. S. Makarova et al. (2017). SnapShot: class 1 CRISPR-Cas systems. *Cell* 168 (5), 946–946, e1.
- [4] M. Krupovic et al. (2014). Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. *BMC Biology* 12.
- [5] B. McClintock (1984). The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science* 226 (4676), 792–801.
- [6] M. J. Curcio et al. (2003). The outs and ins of transposition: from mout to kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Bio* 4 (11), 865–877.
- [7] E. J. Pritham et al. (2007). Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* 390 (1–2), 3–17.
- [8] M. Krupovic et al. (2016). Recent Mobility of Casposons, Self-Synthesizing Transposons at the Origin of the CRISPR-Cas Immunity. *Genome Biol Evol* 8 (2), 375–86.
- [9] A. B. Hickman et al. (2020). Casposase structure and the mechanistic link between DNA transposition and spacer acquisition by CRISPR-Cas. *Elife* 9.
- [10] C. Bath et al. (2006). His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus. *Virology* 350 (1), 228–39.
- [11] A. B. Hickman et al. (2015). The casposon-encoded Cas1 protein from *Aciduliprofundum boonei* is a DNA integrase that generates target site duplications. *Nucleic Acids Res* 43 (22), 10576–87.
- [12] P. Beguin et al. (2019). Sequence motifs recognized by the casposon integrase of *Aciduliprofundum boonei*. *Nucleic Acids Res* 47 (12), 6386–6395.
- [13] F. O. Gehlert et al. (2023). Active *in vivo* translocation of the *Methanosarcina mazei* Go1 Casposon. *Nucleic Acids Research* 51 (13), 6927–6943.
- [14] J. E. Peters et al. (2001). Tn7: Smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2 (11), 806–814.
- [15] P. Siguier et al. (2015). Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiol Spectr* 3 (2), MDNA3-0030-2014.

Verfasst von:



Finn O. Gehlert, Jahrgang 1992, ist an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel promovierter Mikrobiologe.



Lisa Hellwig, Jahrgang 1986, promovierte Mikrobiologin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.



Ruth A. Schmitz, Jahrgang 1965, promoviert an der Philipps-Universität Marburg, habilitiert an der Georg-August-Universität Göttingen, seit 2004 Lehrstuhlinhaberin ‚Molekulare Mikrobiologie‘ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Ruth A. Schmitz
Am Botanischen Garten 1–9
24118 Kiel
E-Mail: rschmitz@ifam.uni-kiel.de

HOST-PARASITE INTERACTION

CRISPR-Cas systems on the offensive

CRISPR-Cas systems are known as bacterial immune systems for protection against phage infections and plasmids. However, many of these mobile genetic elements have obtained partial or complete CRISPR-Cas systems from their hosts and use them for their own purposes e. g. to eliminate competitors. These observations provide impressive insights into the evolution of host-parasite interaction and the subtle border between parasites and symbionts.

CRISPR-Cas systems are generally perceived as microbial immune systems that protect bacteria and archaea against viruses (called bacteriophages if they infect bacteria) [1]. These systems take pieces of viral DNA and store them as immune memory encoded as DNA spacers in one or more specific places in the microbial genome termed CRISPR arrays. Each of these arrays is continuously transcribed to make a long RNA molecule in the microbial cell. This long RNA molecule is then processed to mature CRISPR-RNAs (crRNAs). Together with proteins that bind, it “scans” all DNA in the cell. If any of these crRNAs matches a foreign DNA, the crRNA-bound protein will digest and destroy it, thus generally stopping viral infection in its early stages. Another variety of these systems does not cut the DNA, but rather binds to it and prevents its transcription into messenger RNA thereby silencing the gene that their spacers match [2].

However, it is not only viruses that threaten a cell. There are other mobile genetic elements like plasmids (selfish DNA elements that behave like independent mini-chromosomes). They are often in-between parasites and symbionts: They exploit their bacterial host for their reproduction, but often also encode genes that are beneficial for the host. In addition, different plasmids compete with each other. If more than one type of plasmid occupies a cell, they have to share the resources of the host which is disadvantageous for them. Therefore,

they may try to eliminate incoming competitors.

However, paradoxically, many CRISPR-Cas systems, in both bacteria and archaea, are themselves encoded on mobile genetic elements, such as viruses or plasmids. Since premature host death will prevent the plasmid from spreading further (both to daughter cells when cells divide and horizontally to sister cells), it is in a plasmid’s “best interest” to protect its host from viruses. Consequently, plasmids often encode multiple anti-phage defence systems, and some

of them – like CRISPR-Cas – also protect against competing plasmids.

Some bacteriophages also encode CRISPR-Cas systems. This can be attributed to the fact that in dense microbial communities quite often more than a single phage tries to infect a bacterial cell at the same time, leading to competition. The vast majority of bacteriophages that encode CRISPR only encode the CRISPR arrays (the immune memory without any associated proteins) [3]. These CRISPR arrays generally have spacers matching the genomes of competing bacteriophages that can also infect the same host. These arrays are DNA that the bacteriophage somehow “picked up along the way”, presumably when it infected a previous host that had CRISPR-Cas. Once a phage that has such a CRISPR array enters a host with a CRISPR-Cas system this will result in continuous protection against those phage competitors whose DNA matches those spacers.

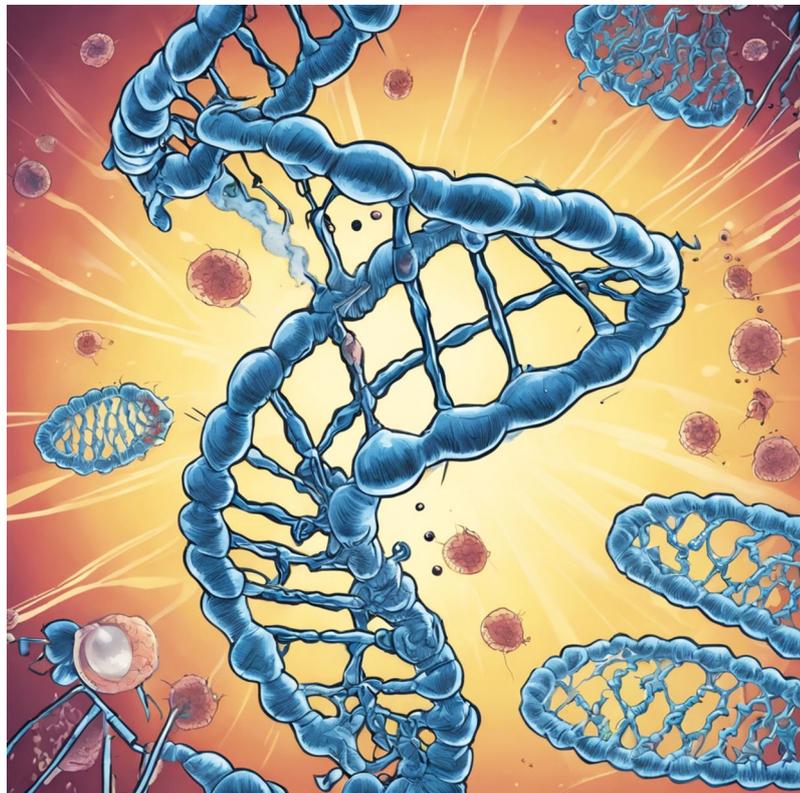


FIGURE 1 DNA conflicts between selfish elements can be mediated by CRISPR-Cas systems. Figure generated with Artificial Intelligence.

These stand-alone CRISPR arrays are therefore a way to direct the bacterial CRISPR-Cas-based immune response away from the phage and against potential competitor bacteriophages.

CRISPR-Cas systems used to eliminate competitors

Less than ten percent of bacteriophages [3] actually have the additional genetic capacity to produce CRISPR-associated proteins. Thus, these viruses can either acquire new immune memory from other viruses, digest the DNA of competitors in the cell using their own CRISPR-Cas machines, or, rarely, even perform both of these functions. These systems are encoded by gene clusters that were “stolen” from the host and have later evolved for a bacteriophage lifestyle. An example for such an evolutionary process was observed in a class of CRISPR-Cas systems that when expressed by a bacterium not only digest RNA and DNA of the invading phage but also degrade the RNA of the bacterium. These systems, when activated by infection, eventually make the cells enter a dormant lifeless state that does not support bacteriophage replication. Such a “suicidal” activity would not benefit a bacteriophage and consequently phage-encoded systems of that type have accumulated mutations so that the dormancy-inducing part of the system has become totally inactive.

Bacteriophages also tend to generally have shorter proteins than

their hosts and they are encoded by short genes. Presumably, having shorter genes is beneficial for bacteriophages since the DNA that can be packaged into a capsid is limited in size, and possessing shorter genes means that the phage can encode more of them. Additionally, replicating shorter DNA genomes may allow faster replication of the bacteriophage. In line with such genome size minimization benefits, some bacteriophages have unusually compact CRISPR-Cas systems based on a single protein that is very small and yet capable of both processing the crRNA and digesting the DNA of competitors [3].

Some bacteriophages with full CRISPR-Cas systems can use their systems to attack the host bacterium rather than just their competitors. These phages have CRISPR spacers that match the DNA of key host genes, indicating that they either silence host genes [4] or simply cut the DNA of the host as part of the infection process in which they rapidly overwhelm and kill the bacterium. This has been shown for a bacteriophage that infects the known pathogen *Vibrio cholerae* [5]. In this fascinating example, the phage system attacks and neutralizes a host region of the genome that defends against bacteriophages by cutting its DNA. This is a striking case of a defence system used by a bacteriophage to attack the host and eventually destroy not only its defensive capability but also its entire DNA.

In summary, CRISPR-Cas systems can be considered as “guns for hire” [6], DNA-digesting and DNA-silencing weapons that can be used by and against diverse genetic elements. They are thus an important part of an ongoing molecular arms race that continuously occurs in microbial life.

Literatur

- [1] E. V. Koonin et al. (2017). Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 71, 233–261.
- [2] X. Guo et al. (2022). Characterization of the self-targeting Type IV CRISPR interference system in *Pseudomonas oleovorans*. *Nat Microbiol* 7, 1870–1878.
- [3] B. Al-Shayeb et al. (2022). Diverse virus-encoded CRISPR-Cas systems include streamlined genome editors. *Cell* 185, 4574–4586 e4516.
- [4] B. Al-Shayeb et al. (2020). Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. *Nature* 578, 425–431.
- [5] K. D. Seed et al. (2013). A bacteriophage encodes its own CRISPR-Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 494, 489–491.
- [6] E. V. Koonin et al. (2020). Evolutionary entanglement of mobile genetic elements and host defence systems: guns for hire. *Nat Rev Genet* 21, 119–131.



Prof. Dr. Uri Gophna,
Microbial Ecology and
Evolution, Tel-Aviv
University, Tel Aviv,
Israel, urigo@tauex.
tau.ac.il

Typ-IV-A-CRISPR-Interferenz

Schritt für Schritt ohne Schnitt

MERAL KARA | SELINA RUST | LENNART RANDAU

*CRISPR-Cas-Systeme der Klasse 1 sind bei Prokaryoten weit verbreitet und durch Effektor Komplexe gekennzeichnet, die aus mehreren Cas-Protein-Untereinheiten bestehen. Hierbei zeigen Typ-IV-A-CRISPR-Cas-Systeme Interferenz gegen Plasmid-Ziele, ohne diese DNA zu degradieren. Noch viel ungewöhnlicher: Das Typ-IV-A1-System aus *Pseudomonas oleovorans* ist dabei auch gegen das eigene Bakteriengenom gerichtet und reguliert gezielt die Genexpression des Wirts. Der Mechanismus dieses ungewöhnlichen CRISPR-Cas-Systems bietet vielseitige Ansätze für gene silencing.*

Im Jahr 2011 wurde ein CRISPR-Cas-System aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* erstmals als neuartiger CRISPR-Typ (Typ-U) klassifiziert [1]. Es gab keine Kenntnisse über Mechanismen, die Struktur oder eine mögliche Verwendung. Doch welche Merkmale zeichnen diese inzwischen als Typ-IV benannten Systeme aus? Ähnlich wie bei einigen Typ-III-Systemen werden keine Adaptationsproteine wie Cas1 und Cas2 kodiert. Diese Enzyme schneiden DNA-Fragmente fremder DNA und integrieren sie in die CRISPR-Arrays, welche bei Typ-IV-Systemen oftmals nicht direkt neben den *cas*-Genen liegen oder vollständig fehlen. Typ-IV-Systeme sind in der Regel auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden und nicht auf dem Bakterienchromosom kodiert. Sie besitzen keine Endonuklease (wie z. B. Cas3 oder Cas9), die die Ziel-DNA oder -RNA

schneidet, wehren aber fremde DNA durch einen Interferenz-Mechanismus ab. Anders als bei Cas9 besteht der CRISPR-Ribonukleoprotein-Effektor Komplex (crRNP) dabei aus mehreren Proteinen.

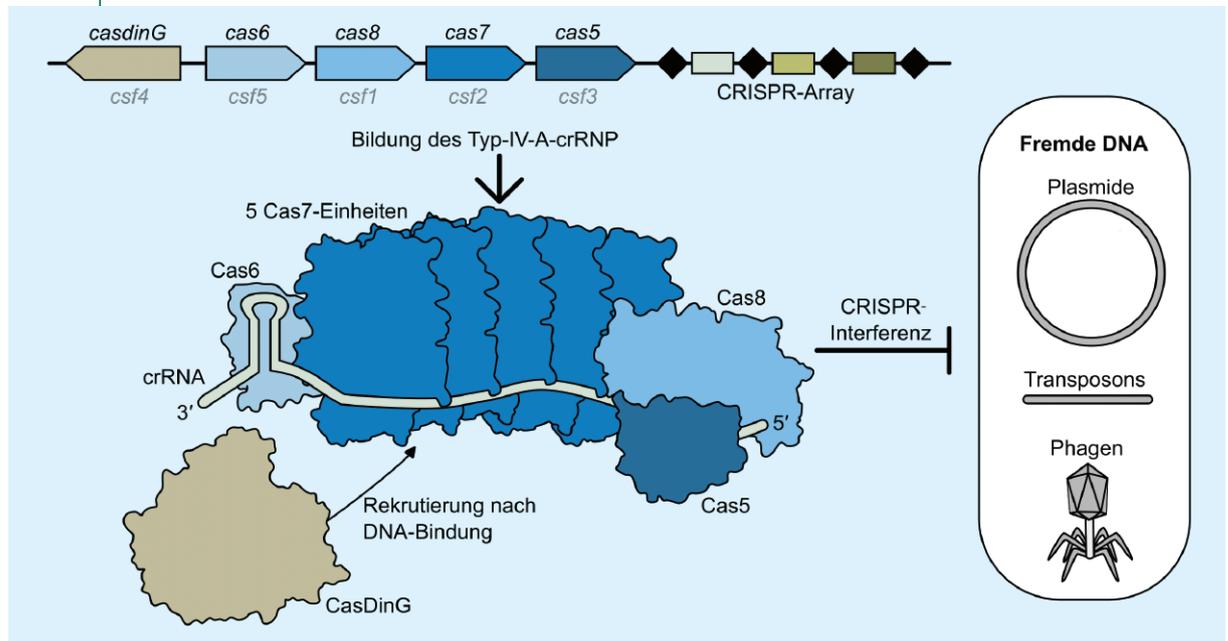
Durch Unterschiede in Sequenz, Struktur und Vorkommen der Effektorproteine konnten innerhalb weniger Jahre mehrere Untergruppen des Typ IV unterschieden werden [2, 3]. Anschließend wurden viele weitere Typ-IV-CRISPR-Cas-Systeme entdeckt, die unterschiedliche genomische Strukturen aufweisen. Daraufhin wurde vorgeschlagen, das Typ-IV-System in fünf Subtypen einzuteilen [4]. Der Fokus dieses Beitrags liegt dabei auf dem verbreiteten Typ-IV-A-CRISPR-Cas-System.

Ein CRISPR-Cas-System, welches (nicht) adaptieren kann

Das gramnegative, aerobe Gamma-Proteobakterium *Pseudomonas oleovorans* kodiert – neben einem Typ-IE- und Typ-IF-System auf dem Wirtsgenom – ein CRISPR-Cas-System des Typ-IV-A1 auf einem Megaplasmid (Abbildung 1). Obwohl den Typ-IV-CRISPR-Cas-Systemen Proteine zur Adaptation fehlen, besitzen die meisten dennoch einen eigenen CRISPR-Array. Dieser deutet darauf hin, dass das System einst in der Lage war oder noch ist, sich an fremde DNA anzupassen. Doch wie ist dies ohne ein Adaptationsmodul möglich? Eine Erklärung zur *spacer*-Akquisition ist die Kommunikation des Typ-IV-Systems mit den anderen CRISPR-Cas-Systemen der Zelle. So sind zum Beispiel Typ-IE-CRISPR-Cas-Systeme bekannt dafür, eine identische PAM-Sequenz wie das Typ-IV-A1-System zu verwenden und werden mit hoher Wahrscheinlichkeit auch zur Adaptation des Typ-IV-A genutzt. Die PAM – ein dem *protospacer* angrenzendes Motiv – ist normalerweise für jeden CRISPR-Cas-Typ spezifisch und umfasst dabei zwei bis fünf Basen. Die Verwendung einer identischen PAM gibt somit Hinweise auf eine Verbindung des Typ-IV-A-Systems zum Typ-IE [5].

***Escherichia coli*-Kolonien zeigen eine räumlich begrenzte *lacZ*-Reportergenaktivität nach DNA-Interferenz durch ein Typ-IV-CRISPR-Cas-System.**

ABB. 1 | AUFBAU DES TYP-IV-A1-CRISPR-CAS-SYSTEMS AUS *P. OLEOVORANS*



Nachdem die *cas*-Gene exprimiert wurden, assoziieren die Proteine mit einer durch Cas6 gereiften CRISPR-RNA (crRNA) zum crRNP-Effektorkomplex. Dieser besitzt fünf Untereinheiten des Cas7-Proteins, welche das Rückgrat des Komplexes bilden und die crRNA halten. Nach Bindung des Komplexes mit komplementärer DNA, neben welcher sich eine PAM-Sequenz befindet, wird CRISPR-Interferenz vermittelt.

Typ-IV-A und Plasmide

Typ-IV-A bildet eine Reihe von Effektorproteinen, darunter Cas8 (Csf1), Cas7 (Csf2), Cas5 (Csf3) und Cas6 (Csf5)¹. Darüber hinaus kodieren Typ-IV-A-Loci für eine assoziierte Helikase der DinG-Familie (Csf4), welche in diesem Zusammenhang auch als CasDinG bezeichnet wird. Gene für Adaptationsproteine fehlen dabei völlig. Erste Einblicke in die Funktionsweise und den Aufbau von Cas6 gab es durch Untersuchungen des Bakteriums *Aromatoleum aromaticum* EbN1 [6]. Dabei ist Cas6 unverzichtbar für die Reifung (Prozessierung) von crRNAs, welche spezifisch in crRNPs (CRISPR ribonucleoprotein) des Typ-IV-A eingebaut werden.

In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Plasmide durch das Typ-IV-A1-System aus *P. aeruginosa* effektiv abgewehrt werden können [7]. Plasmide scheinen bei Typ-IV-Systemen eine große Rolle zu spielen, da insbe-

sondere Typ-IV-A-Systeme auf sehr großen Plasmiden – sogenannten Megaplasmiden (>200 kb) – zu finden sind. Es wird angenommen, dass die Systeme hierbei Plasmide mit Antibiotikaresistenzen stabilisieren, während invasive Plasmide attackiert werden [8].

CRISPR-Interferenz ohne DNA-Degradation?

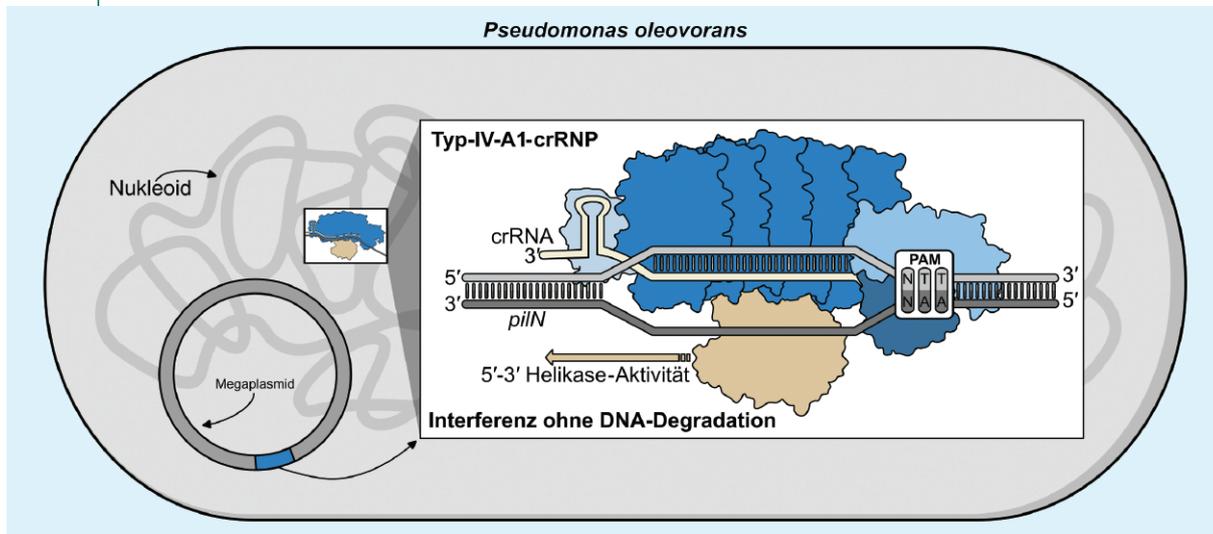
Der CRISPR-Interferenz geht die Prozessierung von prä-crRNAs durch Cas6 voraus. Reife crRNAs, welche sich in ihren *spacer*-Sequenzen unterscheiden, geleiten den crRNP anschließend zur Ziel-DNA, welche sich auf Plasmiden, Transposons oder viralen Genomen findet. Analysiert man die *spacer*-Motive der fremden DNA, findet sich immer ein AAG-Motiv am 5'-Ende des *protospacer*-Abschnitts. Dieses Motiv wurde als PAM-Sequenz identifiziert und wird gebraucht, um die fremde DNA von der DNA des Wirtsorganismus zu unterscheiden. Es wurde nachgewiesen, dass die PAM-Sequenz zwingend erforderlich ist, damit das Typ-IV-A-System Interferenz vermittelt [9].

Diese PAM-abhängige CRISPR-Interferenz konnte durch Experimente mit synthetischen crRNAs, welche auf Plasmide abzielten, im nativen System bestätigt werden. Das Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System aus *P. oleovorans* wurde anschließend in *Escherichia coli* BL21-AI rekonstruiert und rekombinante crRNPs wurden produziert. Den Zellen wurden Plasmide mit einem passenden *protospacer* und unterschiedlichen PAM-Sequenzen zugeführt,

IN KÜRZE

- Typ-IV-CRISPR-Cas-Systeme erkennen meistens Zielsequenzen in Plasmiden und besitzen keine DNA-Schneideaktivität.
- Die Effektor Komplexe dieser Systeme können auch eingesetzt werden, um gezielt die Expression von bakteriellen Wirtsgenen zu unterbinden.
- *Pseudomonas oleovorans* nutzt diese Aktivität, um die Produktion von Typ-IV-Pili zu inhibieren.
- Diese natürliche Zielerkennung von Plasmiden und genomischer DNA zeigt evolutionäre Anpassungen des antiviralen Immunsystems CRISPR-Cas.

¹ Die Bezeichnungen in Klammern geben eine alternative Nomenklatur an.

ABB. 2 | AKTIVITÄT DES TYP-IV-A1-CRISPR-CAS-SYSTEMS AUS *P. OLEOVORANS*


Das Typ-IV-A-CRISPR-Cas-System von *Pseudomonas oleovorans* richtet sich gegen das eigene Genom. Der CRISPR-Lokus befindet sich auf einem Megaplasmid, wobei eine der nativen *spacer*-Sequenzen identisch zu einer DNA-Sequenz des Wirtsgens *pilN* ist. Da sich neben dieser Sequenz auch ein passendes PAM-Motiv befindet, wird der *protospacer* vom Typ-IV-A1-crRNP erkannt. Die spezifische Bindung des Effektor-Komplexes führt zu einer CRISPR-Interferenz im eigenen Genom, ohne dass die DNA abgebaut wird.

wobei erkannt wurde, dass das Motiv 5'-AAN-3' (N = jedes beliebige Nukleotid) als geeignete PAM-Sequenz gilt und Plasmide eliminiert werden können.

In weiteren Untersuchungen wurden crRNAs eingesetzt, die das *lacZ*-Gen im *E. coli*-Genom binden können. Bei Aktivität des Typ-IV-A1-Systems sollte damit eine Veränderung der β -Galaktosidase-Expression erkennbar sein. Da das Protein für die Spaltung von X-Gal zuständig ist, kann Blau-Weiß-Screening zur Analyse genutzt werden. Wird die β -Galaktosidase nicht blockiert, entstehen hier blaue Kolonien auf den Agarplatten. Bei einer Inhibierung der β -Galaktosidase entstehen hingegen weiße Kolonien. Bei den Untersuchungen wurde ersichtlich, dass es keine Rolle spielte, ob die crRNA den kodierenden oder nicht-kodierenden DNA-Strang angriff: Bei funktionellen crRNAs waren in allen Fällen weiße Kolonien zu sehen, die durch die Reduzierung der β -Galaktosidase-Aktivität entstanden. Die genomische DNA der weißen Kolonien wurde anschließend untersucht und es war hier kein Abbau der DNA zu sehen [9]. Anders als Systeme mit Cas3 oder Cas9 agiert das Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System somit womöglich durch Blockade der Transkription und nicht durch DNA-Degradation.

Wird die Transkription – beispielsweise durch Proteine, die sich an die DNA anlagern – behindert, kann das Gen nicht oder nicht vollständig abgelesen werden. Das Gen selbst bleibt dabei jedoch intakt. Wird die Transkription unterbunden, findet auch keine Produktion der Proteine (Translation) statt. Durch Inhibition der Transkription kann somit die Bildung von Proteinen beeinflusst werden. Im Falle vom Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System wird CasDinG dabei eine bedeutende Rolle zugeschrieben.

CasDinG – Ein wichtiger Faktor

CasDinG ist ein Signaturprotein des Typs IV-A und maßgeblich daran beteiligt, die Aufnahme von Plasmiden zu verhindern [5, 9, 10]. Diese ATP-abhängige 5'-3'-DNA-Helikase entwindet *in vitro* sowohl dsDNA (doppelsträngige DNA) mit einem 5'-Überhang als auch DNA-RNA-Hybride. CasDinG wird – wie Cas3 in Typ-I-Systemen – nach Zielerkennung durch den Typ-IV-A-Komplex rekrutiert (Abbildung 2) und ermöglicht eine gezielte Entwindung der Regionen um die Ziel-DNA [11, 12]. Erst kürzlich wurde bekannt, dass CasDinG nicht immer für eine erfolgreiche CRISPR-Interferenz benötigt wird [5]. Befindet sich die Zielsequenz der crRNA in einer Promoterregion, kann ein Typ-IV-A-crRNP die Transkriptionsinitiation auch in Abwesenheit von CasDinG unterbinden. Dabei wird vermutet, dass der crRNP-Komplex den Zugang des Promoters für die RNA-Polymerase blockiert. CasDinG wird jedoch zwingend benötigt, wenn eine crRNA eine Zielsequenz innerhalb eines Gens angreift. Der genaue Mechanismus ist hierbei noch nicht ganz verstanden, aber es scheint plausibel, dass die Helikase-Aktivität von CasDinG benötigt wird, um das Signal der erfolgten Zielerkennung über eine größere Distanz zu verbreiten. In zukünftigen Arbeiten soll hierbei die Interaktion der Helikase mit transkribierenden RNA-Polymerasen genauer untersucht werden.

Interferenz im eigenen Genom

Eine Besonderheit des nativen Typ-IV-A1-CRISPR-Arrays in *P. oleovorans* ist die Übereinstimmung des ersten *spacer* zu einem *protospacer* im Wirtsgen *pilN*, welches für ein Protein des Typ-IV-Pilus kodiert. Die Existenz einer 5'-AAG-3'-PAM-Sequenz neben dem *pilN-protospacer* deu-

tet darauf hin, dass das Typ-IV-A1-System in *P. oleovorans* sich selbst angreifen kann. In einem Stamm mit einer CRISPR-Array-Deletion (Δ CRISPR) wurde eine signifikant erhöhte Transkriptmenge von *pilN* festgestellt, die das sogenannte *self-targeting* bestätigte [8]. Die Regulierung der Genexpression ist hierbei nur möglich, weil das Typ-IV-A1-System nicht in der Lage ist, DNA zu schneiden (Abbildung 2). Typ-IV-Pili sind in den Prozess der Aufnahme von Nucleinsäuren involviert. Die Reduktion der Expression von Piluskomponenten kann damit die Aufnahme fremder DNA verringern und den Abwehrmechanismus des CRISPR-Cas-Systems verstärken [10, 13].

Zusammenfassung

Das Typ-IV-A-CRISPR-Cas-System aus *P. oleovorans* vermittelt PAM-abhängige DNA-Erkennung und kann zur Inhibition der Genexpression in Abwesenheit von DNA-Nuklease-Aktivität verwendet werden. Dieser Mechanismus ähnelt der CRISPRi-Methode, bei der CRISPR-Cas-Proteine mit inaktivierten katalytischen Zentren oder fehlenden Nucleasen verwendet werden, um Ziele stabil zu binden und die Transkriptionsmaschinerie zu blockieren. Synthetische crRNAs wurden verwendet, um CRISPR-Interferenz durch das native *P. oleovorans* Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System zu induzieren. Diese speziellen CRISPR-Cas-Systeme können damit zur Regulierung der Expression von Wirtsgenen genutzt werden und bieten neue Möglichkeiten, gegen pathogene Organismen vorzugehen.

Summary

Type-IV-A CRISPR interference

P. oleovorans type IV-A CRISPR-Cas system targets DNA in a PAM-dependent manner and can be applied to inhibit gene expression in the absence of DNA nuclease activity. This mechanism resembles the CRISPRi method that utilizes CRISPR-Cas proteins with inactivated catalytic sites or missing nucleases to stably bind targets and block the transcription machinery. Synthetic crRNAs were used to induce CRISPR interference of the native *P. oleovorans* Type IV-A1 CRISPR-Cas system. Thus, these special CRISPR-Cas systems can be applied to regulate the expression of host genes and they offer possibilities to take action against pathogenic organisms.

Schlagworte

CRISPR-Cas, *Pseudomonas*, *self-targeting*, Typ-IV-A

Danksagung

Wir danken dem CRISPR-Team unserer Arbeitsgruppe (Nathalie Klein, Steffi Nguyen, Lisa Pavel, Mariana Sanchez-Londono, Hannah Wege) und Kooperationspartnern. Die CRISPR-Forschung unserer Arbeitsgruppe wurde durch die DFG (SPP 2141 und Heisenberg-Programm) finanziert.

Literatur

- [1] K. S. Makarova et al. (2011). *Nat Rev Microbiol* 6, 467–477, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- [2] K. S. Makarova et al. (2015). *Nat Rev Microbiol* 13, 722–736, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- [3] K. S. Makarova et al. (2020). *Nat Rev Microbiol* 2020, 18, 67–83, <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.
- [4] R. Pinilla-Redondo et al. (2020). *Nucl Acids Res* 48, 2000–2012, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1197>.
- [5] F. Benz et al. (2023). *bioRxiv* 2023, 2023.06.23.546257, <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546257>.
- [6] A. Özcan et al. (2019). *Nat Microbiol* 4, 89–96, <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0274-8>.
- [7] V. M. Crowley et al. (2019). *CRISPR J* 2, 434–440, <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0048>.
- [8] W. M. Li et al. (2010). *FEBS J* 2010, 277, 627–641, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07488.x>.
- [9] X. Guo et al. (2022). *Nat Microbiol* 2022, 7, 1870–1878, <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01229-2>.
- [10] H. Harvey et al. (2018). *Nat Microbiol* 3, 47–52, <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0061-y>.
- [11] N. Cui et al. (2023). *Mol Cell* 83, 2493–2508.e5, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.05.036>.
- [12] H. Domgaard et al. (2023). *Nucl Acids Res* 2023, 51, 8115–8132, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad546>.
- [13] E. J. van Schaik et al. (2005). *J Bacteriol*, 187, 1455–1464, <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005>.

Verfasst von:



Meral Magdalena Kara, Jahrgang 2000, studiert im Master Molekularbiologie an der Philipps-Universität Marburg und fertigt eine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lennart Randau an. Fokus der Arbeit ist die CRISPR-Cas-Aktivität der Klasse I, insbesondere des Typs I-Fv und des Typs IV-A1.



Selina Rust, Jahrgang 1997, studierte Molekularbiologie an der Philipps-Universität Marburg und promovierte im Fachbereich der Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lennart Randau. Der Forschungsschwerpunkt liegt hier auf dem Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System in *P. oleovorans*.



Lennart Randau, Jahrgang 1978, studierte Biologie und promovierte 2006 am Institut für Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig. Nach einer Postdoc-Zeit an der Yale Universität war er ab 2010 Leiter einer Forschungsgruppe am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg. Seit 2019 ist er Heisenberg-Professor für Genetik an der Philipps-Universität Marburg.

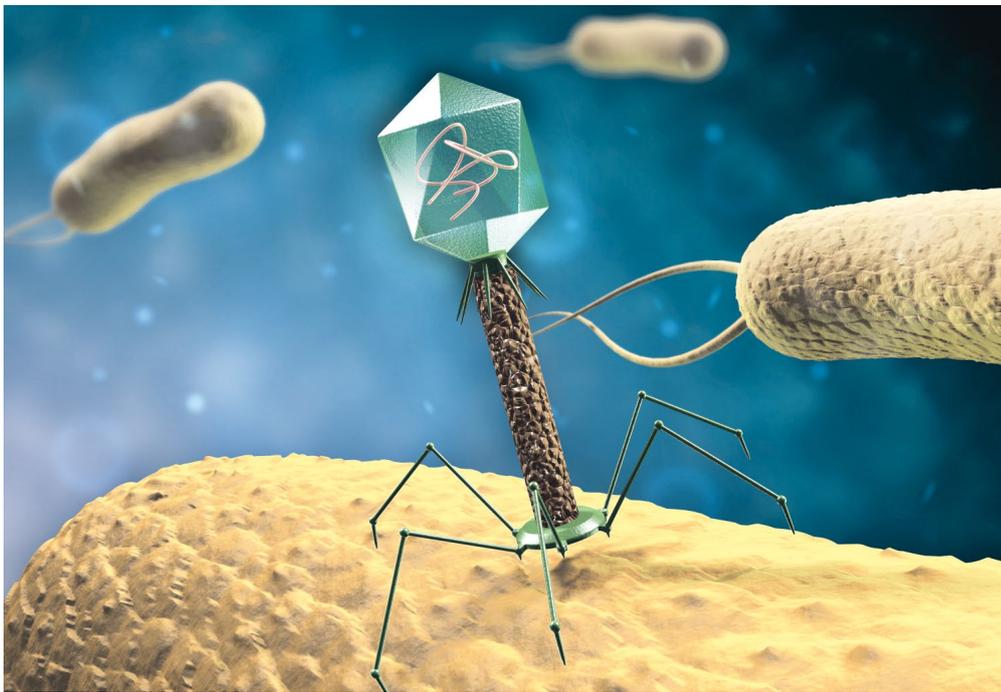
Korrespondenz

Prof. Dr. Lennart Randau
Hans-Meerwein-Straße 6
35032 Marburg
Email: lennart.randau@staff.uni-marburg.de

Neue Einblicke in das bakterielle Immungedächtnis durch Metagenomik

Das verborgene Immunsystem unseres Mikrobioms

PHILIPP C. MÜNCH



Ein Phage greift eine Bakterienzelle an. Das Bild wurde von einer KI generiert und für den Artikel von Adobe-Stock lizenziert (<https://stock.adobe.com/de/images/bacteriophage/48605537>).

Bakterien sind überall – auch in und auf unserem Körper. Die Gesamtheit dieser Mikroben, unser Mikrobiom, spielt eine entscheidende Rolle für unsere Gesundheit. Doch auch diese nützlichen Bakterien sind ständig der Bedrohung durch Viren ausgesetzt, sogenannten Bakteriophagen. Diese Viren infizieren Bakterien und nutzen sie, um sich zu vermehren, was oft zum Tod der Wirtszelle führt. Um zu überleben, haben Bakterien verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, darunter auch das faszinierende CRISPR-Cas-System.

CRISPR steht für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* und funktioniert wie ein adaptives Immunsystem. Wird eine Bakterienzelle von einem Vi-

rus infiziert, baut sie Teile der viralen DNA als *spacer* zwischen sich wiederholenden CRISPR-Sequenzen in ihr eigenes Genom ein. Bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Virus dienen diese *spacer* als eine Art Gedächtnis: Sie werden abgelesen und bewirken die gezielte Zerstörung der viralen DNA durch CRISPR-assoziierte (Cas)-Proteine.

Dieses System ist nicht nur ein beeindruckendes Beispiel für die Evolutionsleistung von Bakterien, sondern hat auch große Bedeutung für die Biotechnologie. Modifizierte CRISPR-Cas-Systeme werden heute als vielseitige Werkzeuge verwendet, um gezielt Gene zu verändern – eine Revolution in der Genetik und Medizin. Doch wie verbreitet und divers sind CRISPR-Cas-Systeme in natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften wie dem menschlichen Mikrobiom? Um das herauszufinden, braucht es neue Ansätze wie den der Metagenomik.

Die Herausforderung: Ein Großteil der mikrobiellen Vielfalt – schätzungsweise mehr als 80 Prozent – lässt sich nicht im Labor kultivieren. Klassische mikrobiologische Methoden stoßen hier an ihre Grenzen. Die Metagenomik

ermöglicht es jedoch, die gesamte genetische Information einer mikrobiellen Probe zu erfassen, ohne die einzelnen Organismen isolieren zu müssen. Durch Sequenzierung und bioinformatische Analyse lässt sich so ein umfassendes Bild der mikrobiellen Diversität und Funktion gewinnen – auch der verborgenen CRISPR-Cas-Systeme.

In unserer Studie haben wir diesen Ansatz auf das menschliche Mikrobiom angewandt. Wir haben 2355 metagenomische Datensätze von 265 gesunden Personen analysiert, die im Rahmen des *Human Microbiome Project* gesammelt wurden. Diese Proben stammen von verschiedenen Körperstellen, darunter Mundhöhle (z. B. Zunge, Zahnbelag), Darm, Haut (z. B. hinter dem Ohr) und Urogenitaltrakt. Mithilfe spezieller Software haben wir in diesen Daten nach CRISPR-Sequenzen und den zugehörigen *cas*-Genen gesucht, um ihre Verbreitung, Diversität und mögliche Funktion zu untersuchen.

Unterschiedliche Immunaktivität je nach Körperregion

Insgesamt fanden wir fast 3 Millionen einzigartige CRISPR-*spacer* in den 2355 Mikrobiomproben – eine Zahl, die unsere Erwartungen bei weitem übertraf. Dies ist nicht nur ein quantitativer Sprung im Vergleich zu früheren Studien an kultivierten Bakterien, sondern auch ein qualitativer, denn die metagenomischen Daten ermöglichen eine viel umfassendere und unverzerrtere Sicht auf die CRISPR-Diversität.

Interessanterweise war die Verteilung dieser *spacer* alles andere als gleichmäßig. Sowohl zwischen den verschiedenen Körperregionen als auch zwischen den einzelnen Probanden gab es erhebliche Unterschiede in der *spacer*-Dichte, also der Zahl der *spacer* pro Probe (Abbildung 1). Die mit Abstand höchste Dichte fanden wir in den Mikrobiomen der Mundhöhle, insbesondere in Proben aus Zahnbelag und von der Zunge. Hier kamen wir auf erstaunliche 93 *spacer* pro Million *sequencing*

reads – ein Hinweis auf eine extrem hohe CRISPR-Aktivität in diesen Lebensräumen. Im Vergleich dazu war die *spacer*-Dichte im Darm deutlich geringer, lag aber immer noch bei beachtlichen 43 *spacer*-Abschnitten pro *sequencing reads* im Durchschnitt. Die geringsten Werte fanden wir auf der Haut und im Urogenitaltrakt, wo manchmal nur ein bis zwei *spacer* pro Million *reads* zu finden waren.

Diese Unterschiede sind höchst signifikant und deuten auf fundamentale Unterschiede in der Ökologie und Evolutionsdynamik der verschiedenen Körper-Mikrobiome hin. Eine naheliegende Erklärung ist, dass die CRISPR-Aktivität mit dem Infektionsdruck korreliert, dem die Bakterien in den jeweiligen Lebensräumen ausgesetzt sind. Tatsächlich ist die Viruslast in der Mundhöhle besonders hoch, während sie auf der Haut und im Urogenitaltrakt vergleichsweise gering ist. Der hohe „Immunstatus“ der oralen Mikroben könnte eine Anpassung an diese Bedrohungslage sein.

Aber es gibt auch noch andere Faktoren, die eine Rolle spielen könnten. So ist die bakterielle Diversität in der Mundhöhle und im Darm deutlich höher als auf der Haut und im Urogenitaltrakt. Eine höhere Diversität bedeutet auch mehr potenzielle Wirte für Viren und damit mehr Möglichkeiten für CRISPR-Cas-Systeme, neue *spacer* zu akquirieren. Auch die höhere Zelldichte und die bessere Nährstoffversorgung in den „feuchten“ Schleimhaut-assoziierten Mikrobiomen könnten die CRISPR-Aktivität begünstigen.

Bemerkenswert ist auch, dass zwischen einzelnen Personen die Unterschiede in der *spacer*-Dichte innerhalb einer Körperregion oft größer waren als die Unterschiede zwischen den Regionen. Dies deutet darauf hin, dass auch Faktoren auf der Ebene des individuellen Wirts wie Ernährung, Hygiene oder Immunstatus einen starken Einfluss auf die CRISPR-Aktivität haben können. Hier sind weitere Studien nötig, um diese Zusammenhänge aufzuklären.

Auf der Suche nach den Angreifern

Die *spacer* in CRISPR-Arrays sind mehr als nur eine Kuriosität – sie sind ein Archiv der Virusinfektionen, die eine Bakterienpopulation in ihrer evolutionären Vergangenheit durchgemacht hat. Jeder *spacer* entspricht einem viralen Sequenzfragment, einer sogenannten *protospacer*-Sequenz. Durch die Analyse dieser *spacer* können wir also auf die Jagd nach den korrespondierenden Angreifern gehen – in den meisten Fällen sollten dies Bakteriophagen sein: Viren, die Bakterien infizieren.

Das ist leichter gesagt als getan, denn die meisten Phagen in unserem Mikrobiom sind noch völlig unbekannt. Klassische Verfahren zu ihrer Isolation und Charakterisierung sind aufwändig und oft nicht erfolgreich. Hier bietet die Metagenomik eine elegante Lösung: In den Billionen von DNA-Fragmenten, die wir aus den Mikrobiomproben sequenziert haben, sollten auch die Genome der Phagen versteckt sein – und damit die *protospacer*-Sequenzen, die

IN KÜRZE

- Um die Verbreitung von CRISPR-Cas-Systemen in natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften wie dem menschlichen Mikrobiom zu analysieren, ist die Metagenomik ein wichtiges Werkzeug.
- Bei der Durchsichtung von 2355 metagenomischen Datensätzen des Human Microbiome Projects wurden fast 3 Mio. CRISPR-*spacer* gefunden.
- Besonders hoch war die *spacer*-Dichte in Proben aus der Mundhöhle. Möglicherweise ist dies eine Anpassung des Mikrobioms an die hohe Viruslast in der Mundhöhle.
- Einige CRISPR-Sequenzen richten sich aber nicht gegen Viren, sondern gegen bakterielle Genome. Ihre Funktion ist noch unklar.
- Das Vorhandensein spezieller CRISPR-Cas-Subtypen in bestimmten Bakteriengruppen, spricht für eine Koevolution zwischen den Systemen und ihren Wirten.
- Das Verständnis der Beeinflussung mikrobieller Gemeinschaften durch CRISPR-Cas-Systeme eröffnet faszinierende Perspektiven für die Mikrobiom-Medizin der Zukunft.

von den bakteriellen CRISPR-Cas-Systemen ins Visier genommen werden.

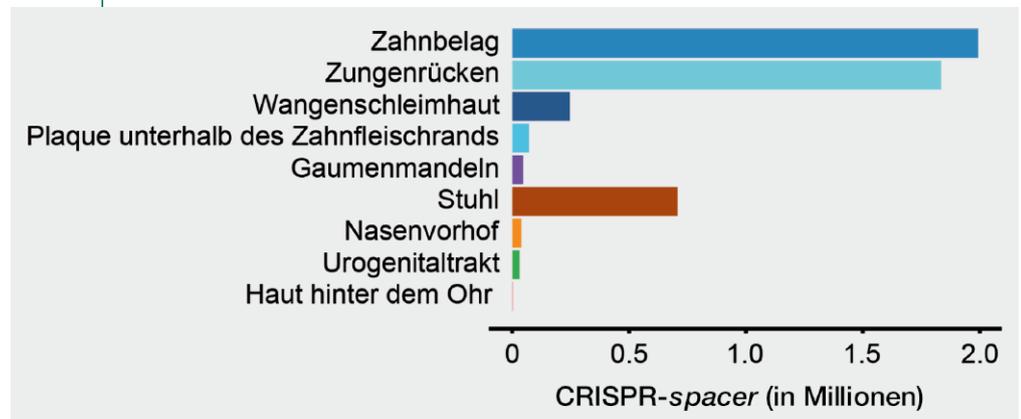
Um diese Angreifer aufzuspüren, haben wir die *spacer*-Sequenzen mit den metagenomischen Daten verglichen. Mit überraschend hoher Trefferquote fanden wir tatsächlich passende virale Sequenzen. Die Mehrheit davon kodierte für Komponenten des Viruskapsids oder für Proteine, die an der Verpackung der viralen DNA beteiligt sind. Durch Annotationsvergleich konnten wir sogar rekonstruieren, welcher Virusfamilie die jeweiligen *protospacer* angehörten. So gelang es uns, ohne eine einzige Phagenkultur ganze Virus-Wirt-Interaktionsnetzwerke im menschlichen Mikrobiom zu kartieren.

Es wäre jedoch zu einfach, CRISPR-Cas-Systeme nur als eine Art „Phagenabwehr“ zu betrachten. Neuere Studien deuten darauf hin, dass diese faszinierenden Systeme noch andere, vielleicht überraschende Rollen spielen könnten. So fanden wir in unseren Daten auch eine beträchtliche Zahl von *spacer*-Abschnitten, die nicht auf Phagen, sondern auf bakterielle Genome abzielten. Besonders häufig waren Zielgene, die für DNA-Methylierung und Restriktions-Modifikations-Systeme kodieren – also ebenfalls Systeme, die an der Abwehr von fremder DNA beteiligt sind.

Das wirft spannende neue Fragen auf: Sind CRISPR-Cas-Systeme mehr als nur eine Virenabwehr? Spielen sie vielleicht auch eine Rolle in der Konkurrenz zwischen verschiedenen Bakterienarten, indem sie die Expression von Abwehrgenen der Konkurrenten unterdrücken? Oder dient dieses *self-targeting* der Regulation eigener Gene – als eine Art genetischer Schalter? Für einige Bakterien konnte bereits gezeigt werden, dass CRISPR-Cas-Systeme tatsächlich die Expression von Virulenzgenen und anderen wichtigen Funktionen beeinflussen können. Unsere Daten deuten darauf hin, dass solche regulatorischen Funktionen im menschlichen Mikrobiom weit verbreitet sein könnten.

Insgesamt zeigt unsere Studie, dass metagenomische Analysen ein mächtiges Werkzeug sind, um das verborgene Schlachtfeld der Mikroben und Viren in uns zu beleuchten. Die Wechselbeziehungen zwischen mikrobiellen CRISPR-Cas-Systemen und ihren Angreifern erweisen sich als viel vielfältiger und dynamischer als bisher angenommen – mit weitreichenden Konsequenzen für unser Verständnis von mikrobieller Evolution, Ökologie und Genregulation. Je tiefer wir graben, desto komplexer und faszinierender erscheint die Welt der Mikroben in unserem Körper. Es bleibt spannend zu sehen, welche Überraschungen künftige Studien in diesem faszinierenden Forschungsfeld noch bereithalten.

ABB. 1 ANZAHL DER CRISPR-SPACER IN MIKROBEN AUS VERSCHIEDENEN KÖRPERREGIONEN



Die Verteilung der gefundenen CRISPR-*spacer*-Abschnitte variiert stark zwischen den Körperregionen. Mit bis zu 2 Millionen einzigartigen Sequenzen finden sich die mit Abstand höchsten Werte in den Mikrobiomen der Mundhöhle (Zahnbelag, Zunge), während Darm, Urogenitaltrakt und Haut deutlich geringere Zahlen aufweisen. Diese regionalen Unterschiede könnten die unterschiedliche Ökologie und CRISPR-Aktivität der jeweiligen Bakteriengemeinschaften widerspiegeln.

Die Vielfalt der CRISPR-Cas-Systeme

Wenn wir über CRISPR sprechen, meinen wir oft die charakteristischen *repeat-spacer*-Arrays. Diese sind aber nur die eine Hälfte der Geschichte. Die andere Hälfte sind die Cas-Proteine, die eigentlichen molekularen Maschinen des CRISPR-Cas-Systems. Sie sind es, die die *spacer* aus Fremd-DNA herauschneiden, in das CRISPR-Array einbauen und schließlich die Ziel-DNA erkennen und zerschneiden. Ohne Cas-Proteine wäre CRISPR nur ein merkwürdiges genetisches Muster ohne Funktion. Aber nicht alle CRISPR-Cas-Systeme sind gleich. Im Laufe der Evolution haben Bakterien und Archaeen eine erstaunliche Anzahl von Systemen entwickelt, die sich in der Zusammensetzung und Funktion ihrer Cas-Proteine unterscheiden. Nach der aktuellen Klassifikation gibt es zwei Klassen, sechs Typen und 33 Subtypen von CRISPR-Cas-Systemen – eine schier überwältigende Vielfalt.

Die beiden Hauptklassen unterscheiden sich in der Zahl und Komplexität ihrer Cas-Proteine. Klasse-1-Systeme haben viele verschiedene Cas-Proteine, die zusammenarbeiten, um die Fremd-DNA zu schneiden. Klasse-2-Systeme kommen mit weniger Proteinen aus, dafür sind diese oft größer und komplexer. Das bekannteste Beispiel ist Cas9, das Arbeitstier der gentechnischen CRISPR-Anwendungen. Innerhalb dieser Klassen gibt es dann die verschiedenen Typen und Subtypen, die sich in den spezifischen Cas-Proteinen und ihrer Anordnung unterscheiden. So haben Typ-I-Systeme immer die Proteine Cas1, Cas2, Cas3 und Cas6, während Typ-III-Systeme stattdessen Cas10 und Cas11 verwenden. Manche Systeme haben zusätzlich ungewöhnliche Cas-Proteine mit Sonderfunktionen wie das RNA-schneidende Cas13.

Diese Vielfalt ist nicht nur akademisch interessant – sie hat auch praktische Bedeutung. Die verschiedenen

CRISPR-Cas-Typen unterscheiden sich in ihrer Effizienz, Spezifität und den Arten von Nukleinsäuren, die sie angreifen können. Manche Systeme schneiden bevorzugt DNA, andere RNA. Einige Systeme sind auf bestimmte Erkennungssequenzen angewiesen, andere sind flexibler. Diese Eigenschaften beeinflussen, wie effektiv ein bestimmtes CRISPR-Cas-System in einem bestimmten ökologischen Kontext arbeiten kann. Die ökologische Anpassung der CRISPR-Cas-Systeme ist ein faszinierendes, aber noch wenig verstandenes Forschungsfeld. Welcher Typ in welcher Umgebung am besten funktioniert, hängt von vielen Faktoren ab: von der Vielfalt und Häufigkeit der Viren über die Wachstumsraten der Bakterien bis hin zu physikalisch-chemischen Parametern wie Temperatur und pH-Wert. All diese Faktoren können die Aktivität und Evolution der CRISPR-Cas-Systeme beeinflussen.

Hier kommt unsere Studie ins Spiel: Indem wir nicht nur die CRISPR-Arrays, sondern auch die zugehörigen *cas*-Gene in den menschlichen Mikrobiomproben analysiert haben, konnten wir zum ersten Mal ein umfassendes Bild der CRISPR-Cas-Diversität in diesem faszinierenden Ökosystem zeichnen. Wir fanden eine erstaunliche Vielfalt von Cas-Genen aller bekannten Typen und Subtypen – mit einigen klaren ökologischen Trends. So waren zum Beispiel Typ-II-Systeme, die das berühmte Cas9-Protein verwenden, besonders häufig in den Bakteriengemeinschaften des Mundraums und des Urogenitaltrakts. Das könnte daran liegen, dass diese Systeme besonders effektiv gegen die dort häufigen Viren sind. Oder es könnte mit der hohen Dynamik und Konkurrenzdichte in diesen Lebensräumen zusammenhängen, die schnelle und effiziente Abwehrmechanismen erfordern.

Im Darm hingegen fanden wir eine Dominanz von Typ-I-Systemen, insbesondere des Subtyps I-C. Diese Systeme sind dafür bekannt, dass sie auch gegen fremde DNA aus anderen Bakterien wirken und so möglicherweise zur Stabilität und Resilienz der Darmgemeinschaft beitragen. Interessanterweise waren einige Subtypen fast ausschließlich in bestimmten Bakteriengattungen zu finden, was auf eine enge Koevolution von CRISPR-Cas-Systemen und ihren Wirten hindeutet.

Diese Erkenntnisse sind nicht nur faszinierend, sondern auch praktisch relevant. Je besser wir verstehen, welche CRISPR-Cas-Systeme in welchen mikrobiellen Lebensgemeinschaften funktionieren, desto gezielter können wir sie nutzen und optimieren – sei es für die Entwicklung neuer Werkzeuge für die Gentechnik oder für die Modulation des menschlichen Mikrobioms zu therapeutischen Zwecken. Die ökologische Analyse der CRISPR-Cas-Systeme eröffnet hier spannende neue Perspektiven an der Schnittstelle von Grundlagenforschung und angewandter Biotechnologie.

Natürlich wirft unsere Studie auch viele neue Fragen auf. Warum sind manche CRISPR-Cas-Typen in manchen Mikrobiomen so dominant? Wie genau beeinflussen die ökologischen Bedingungen die Aktivität und Evolution der

CRISPR-Cas-Systeme? Und welche Rolle spielen sie ihrerseits durch ihren Einfluss auf die Viren- und Bakterienpopulationen bei der Gestaltung mikrobieller Ökosysteme? Um diese Fragen zu beantworten, brauchen wir noch viele weitere Studien, die CRISPR-Ökologie und -Evolution im Detail untersuchen – eine Herausforderung, die Mikrobiologen, Ökologen und Bioinformatiker gleichermaßen begeistern wird.

Ausblick: Von Grundlagen zu Anwendungen

Unsere Studie ist ein Meilenstein in der Erforschung der CRISPR-Cas-Systeme im menschlichen Mikrobiom. Mit fast 3 Millionen entdeckten *spacer*-Abschnitten und über 9000 *cas*-Genvarianten ist sie die bisher umfassendste Bestandsaufnahme dieser faszinierenden Systeme in einem natürlichen ökologischen Kontext. Sie zeigt, wie metagenomische Analysen unser Verständnis der mikrobiellen Welt revolutionieren und völlig neue Einblicke in die Komplexität und Dynamik mikrobieller Abwehrsysteme ermöglichen. Aber dies ist erst der Anfang. Unsere Ergebnisse eröffnen eine Fülle von Möglichkeiten für weitere Forschung, sowohl grundlagenwissenschaftlich als auch anwendungsorientiert.

Auf der Grundlagenseite wird es spannend sein, die ökologischen und evolutionären Muster, die wir beobachtet haben, im Detail zu untersuchen. Warum sind bestimmte CRISPR-Typen in bestimmten Körperregionen so dominant? Wie genau beeinflussen Faktoren wie Virendiversität, Bakteriendichte und Umweltbedingungen die Aktivität und Diversität der CRISPR-Cas-Systeme? Und wie wirken sich letztere ihrerseits auf die Zusammensetzung und Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaften aus? Um diese Fragen zu beantworten, brauchen wir Folgestudien, die gezielt einzelne Mikrobiome und CRISPR-Cas-Systeme unter die Lupe nehmen und experimentell manipulieren – eine Herausforderung, bei der klassische mikrobiologische Methoden und moderne Omics-Ansätze Hand in Hand gehen müssen.

Mindestens ebenso spannend sind die potenziellen Anwendungen, die sich aus unseren Erkenntnissen ergeben. Die metagenomischen CRISPR-Daten sind eine wahre Schatzkiste für die Biotechnologie. Die Millionen von *spacer*-Abschnitten sind nicht nur interessante ökologische Marker, sondern auch potenzielle Werkzeuge für die Gentechnik und die synthetische Biologie. Jeder *spacer* ist im Grunde eine maßgeschneiderte Gensonde, die hochspezifisch eine bestimmte Virus- oder Bakteriensequenz erkennt. Durch geschickte Kombination und Modifikation dieser natürlichen *targeting modules* könnten neuartige CRISPR-Werkzeuge entstehen, die noch präziser und vielseitiger sind als die bisherigen.

Auch für medizinische Anwendungen sind die CRISPR-Daten höchst relevant. Sie könnten helfen, antibakterielle und antivirale Strategien zu entwickeln, die gezielt die CRISPR-Cas-Systeme der Krankheitserreger ins Visier nehmen. Umgekehrt könnten wir das natürliche CRISPR-Arse-

nal des menschlichen Mikrobioms anzupfen, um Infektionen zu bekämpfen oder das Mikrobiom gezielt zu modulieren. Wenn wir verstehen, wie CRISPR-Cas-Systeme die Zusammensetzung und Stabilität mikrobieller Gemeinschaften beeinflussen, eröffnet das faszinierende Perspektiven für die Mikrobiom-Medizin der Zukunft.

Nicht zuletzt sind die CRISPR-Daten auch eine einzigartige Ressource für die Evolutionsforschung. Die *spacer*-Archive erzählen die Geschichte uralter Konflikte zwischen Mikroben und Viren, die sich über Millionen von Jahren im menschlichen Körper abgespielt haben. Durch sorgfältige Analyse dieser Archive können wir die Evolutionsdynamik von Wirt-Virus-Interaktionen in bisher unerreichter Auflösung nachvollziehen. Aber CRISPR-Cas-Systeme beeinflussen nicht nur das Verhältnis zwischen Bakterien und Phagen. Da sie die Aufnahme von fremder DNA begrenzen, haben sie auch Auswirkungen auf den horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien. Dieser wiederum spielt eine Schlüsselrolle bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen. Interessanterweise können auch Phagen, die ja eigentlich von CRISPR-Cas-Systemen bekämpft werden, als Vektoren für Resistenzgene dienen. Die komplexen Wechselwirkungen zwischen CRISPR-Cas, Phagen und horizontalem Gentransfer beeinflussen also das evolutionäre Schicksal von Bakterien auf vielfältige Weise. Ein tieferes Verständnis der natürlichen CRISPR-Dynamik im menschlichen Mikrobiom könnte daher auch neue Einblicke liefern, wie sich Antibiotikaresistenzen entwickeln und in Bakterienpopulationen ausbreiten – eine der drängendsten Herausforderungen der modernen Medizin.

All dies zeigt: Die metagenomische Erforschung der CRISPR-Cas-Systeme ist nicht nur ein faszinierendes Grundlagenthema, sondern hat das Potenzial, viele Bereiche der Biologie und Medizin zu revolutionieren. Unsere Studie liefert dafür die Grundlage und setzt neue Maßstäbe für die ökologische Genomik des menschlichen Mikrobioms. Sie ist ein beeindruckendes Beispiel dafür, wie moderne Omics-Technologien und bioinformatische Methoden unser Verständnis der unsichtbaren mikrobiellen Welt erweitern und vertiefen.

Aber sie ist auch eine Einladung an die Forschungsgemeinschaft, diese Schätze zu heben und weiterzuentwickeln. Je mehr wir über die natürlichen CRISPR-Cas-Systeme lernen, desto besser können wir ihre erstaunlichen Fähigkeiten nutzen – sei es für die Entwicklung neuer Biotechnologie-Werkzeuge, für ökologische Eingriffe in mikrobielle Gemeinschaften oder für medizinische Anwendungen, von denen wir heute noch nicht zu träumen wagen. Die Zukunft der CRISPR-Forschung ist hell und voller Verheißungen. Sie hat gerade erst begonnen.

Zusammenfassung

Das menschliche Mikrobiom liefert interessante und medizinisch wichtige Einblicke in die Interaktionen zwischen Menschen und Mikroorganismen. Eine weitere Ebene ist die Interaktion zwischen den Bakterien des Mikrobioms mit

seinen Parasiten, den Bakteriophagen. Die Metagenomik erlaubt es, über umfangreiche Sequenzdaten diese Interaktionen und ihre Dynamik zu analysieren. Dazu wurden CRISPR-Cas-Systeme aus Metagenomen bioinformatisch untersucht. Anhand der spacer-Sequenzen in CRISPR-Arrays können sowohl Phagenpopulationen verschiedener Habitate in und auf menschlichen Individuen bestimmt als auch dominante CRISPR-Cas-Systeme identifiziert werden.

Summary

The hidden immune system of our microbiome

The human microbiome provides interesting and medically important insights into the interactions between humans and microorganisms. Another level is the interaction between the bacteria of the microbiome with their parasites, the bacteriophages. Metagenomics allows researchers to analyze these interactions and their dynamics using extensive sequence data. For this purpose, CRISPR-Cas systems from metagenomes have been bioinformatically analyzed. The spacer sequences in CRISPR arrays can be used for determining phage populations of different habitats in and on human individuals as well as for identifying dominant CRISPR-Cas systems.

Schlagworte

Adaptives Immunsystem, Mikrobiom, Mikrobiom-Medizin, Bakterien, Bakteriophagen, Ökologie, Evolution

Danksagung

Bei der Erstellung des Textes wurde das generative Modell Claude (Opus, Anthropic) verwendet.

Literatur

Dieser Beitrag ist eine vereinfachte Zusammenfassung und Übersicht zum folgenden frei zugänglichen wissenschaftlichen Originalartikel: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(20\)30573-4](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(20)30573-4)

Verfasst von:

Philipp C. Münch studierte Epidemiologie in München. Nach seiner Promotion an der LMU arbeitete er als Wissenschaftler am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) und an der Harvard School of Public Health in den USA. Seine Forschungsschwerpunkte liegen in der Entwicklung von Methoden zur Erfassung evolutionärer Prozesse und maschinellen Lernverfahren für die Bioinformatik.

Korrespondenz

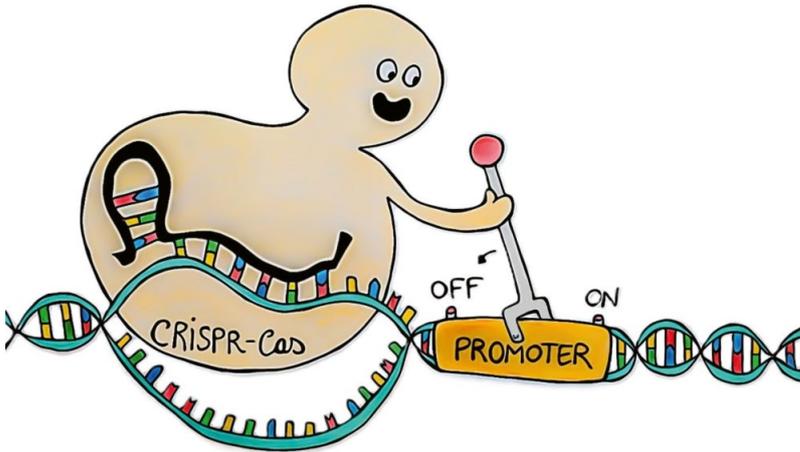
Dr. Philipp C. Münch
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
Inhoffenstraße 7
38124 Braunschweig
E-Mail: philipp.muench@helmholtz-hzi.de



CRISPR-Cas-Werkzeuge für Haloarchaea

CRISPRi mit einer Prise Salz

LISA-KATHARINA MAIER | NADIA DI CIANNI | ANITA MARCHFELDER



CRISPRi erlaubt es, den Cascade-Komplex als „Schalter“ zur Regulation der Genexpression einzusetzen.

Alle Abbildungen erstellt mit Bio-Render.com.

Auch extremophile Archaea können sich im Werkzeugkasten der CRISPR-Cas-Systeme bedienen, denn gene silencing geht auch mit Multiproteinkomplexen. Cas-Proteine der endogenen CRISPR-Cas-Systeme sorgen für starke Bindung und CRISPR-RNAs (crRNAs) für die Sequenzspezifität, um mit dem Multiproteinkomplex Cascade die RNA-Polymerase und damit die Transkription zu blockieren.

CRISPR-Cas-Systeme und von ihnen abgeleitete molekularbiologische Werkzeuge sind in aller Munde und mittlerweile in nahezu jedem Forschungslabor zu finden. Die im Jahr 2020 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnete Technologie revolutioniert die moderne biologische und medizinische Forschung. Das vererbte Immunsystem der Archaeen und Bakterien dient in seiner natürlichen Form der Abwehr von Fremdnukleinsäuren – seien es Viren oder Plasmide. Obwohl der Großteil aller Prokaryoten ein solches System besitzt, ist ihre Funktion erst 2007 beschrieben worden. Da immer wieder neue Varianten der CRISPR-Cas-Systeme entdeckt werden, ist noch nicht abschließend klar, wie groß die CRISPR-Cas-Familie ist, was zu einer kontinuierlichen Erweiterung und Verfeinerung der Klassifikation führt [1].

Alle CRISPR-Cas-Systeme – egal wie verschieden sie voneinander sind – funktionieren nach demselben Grundprinzip: Eine eingedrungene, fremde Nukleinsäure (z. B.

ein Phage oder Plasmid) wird durch eine kurze RNA (crRNA), die an einen Komplex aus Cas-Protein(en) gebunden ist, sequenzspezifisch erkannt (Abbildung 1a). Anschließend wird der Angreifer durch eine Endonuklease abgebaut (Abbildung 1b). Derzeit werden zwei Hauptklassen, sechs Typen und über 30 Subtypen unterschieden, die sich in Art, Anzahl und Zusammensetzung der Cas-Proteine unterscheiden [1]. In Klasse-1-Systemen wird die crRNA von einem Multiproteinkomplex gebunden (wie Cascade bei Typ-I-Systemen), wohingegen in Klasse-2-Systemen ein einziges Cas-Protein die crRNA bindet (wie Cas9 bei Typ-II-Systemen).

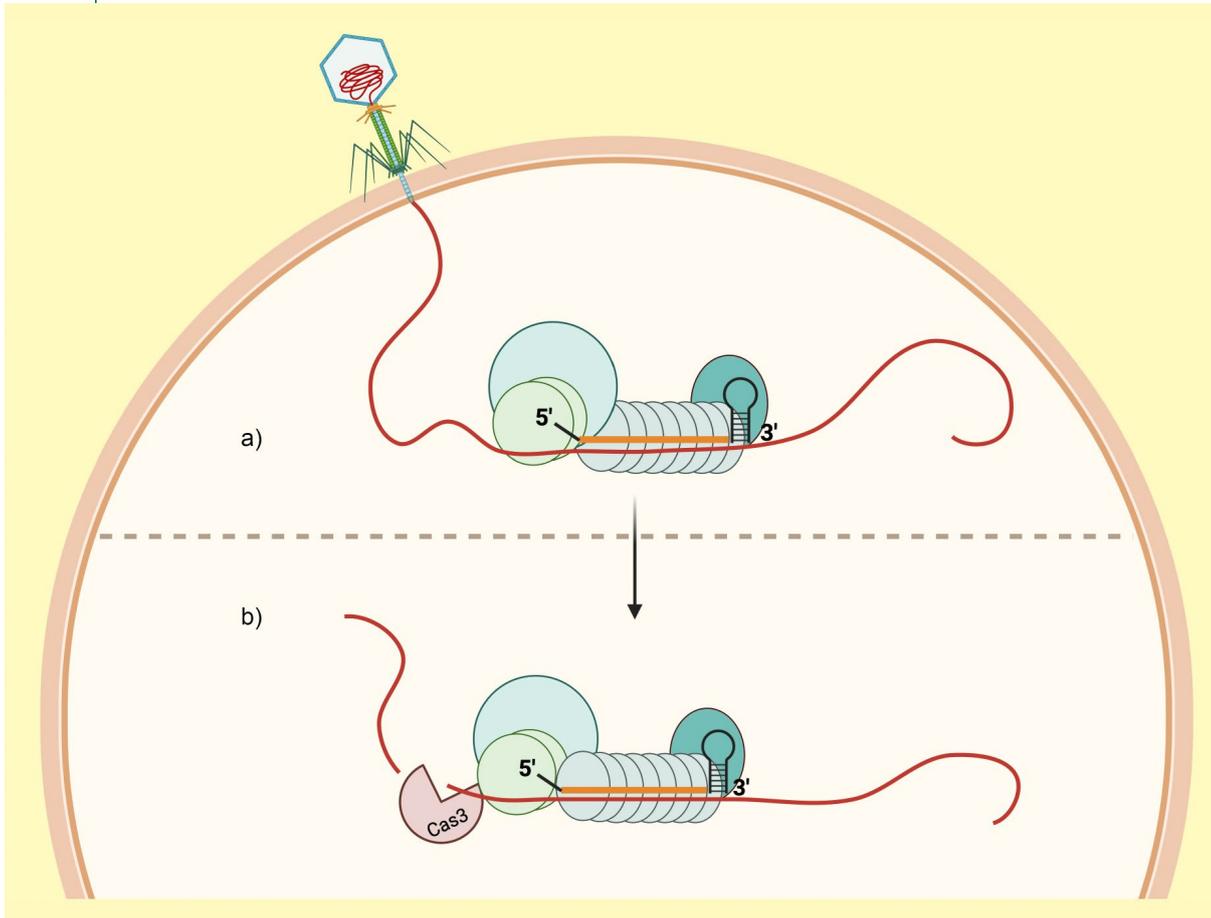
Der CRISPR-Lokus kodiert die crRNA, die die Fremdnukleinsäure als Ziel erkennt. Das System kann sich gegen neue Angreifer immunisieren, indem kleine Stücke der Fremdnukleinsäuren in die CRISPR-Loci integriert werden. Der Effektor-Komplex kann also immer wieder neu programmiert werden, um andere Sequenzen zu erkennen und abzubauen. Die Analogie dieses Prinzips zum RNA-Interferenz-Mechanismus der Eukaryoten (RNAi) hat früh die Entwicklung von CRISPR-Cas-basierten *gene silencing*-Techniken befeuert, die folglich CRISPRi (CRISPR-Interferenz) genannt wurden [2–3].

Allerdings wurden zunächst nur die wesentlich weniger komplexen Klasse-2-Systeme mit nur einem Effektorprotein als Werkzeug eingesetzt. Das Typ-II-Signaturprotein Cas9 kann für CRISPRi genutzt werden, indem es durch Mutation inaktiviert wird (das inaktivierte Cas9 wird dCas9 genannt), um so den Abbau der Fremd-DNA zu verhindern [3]. dCas9 (d = dead) kann in eukaryotischen, aber auch bakteriellen Systemen leicht zur Expression gebracht und als Schalter zur Regulation der Genexpression in vielen medizinisch, industriell oder wissenschaftlich interessanten Spezies eingesetzt werden.

Problematisch wird die Expression von dCas9-Varianten und anderen Klasse-2-Effektoren in der Domäne der Archaea [4]. Bisher sind nur in Metagenomsequenzen unkultivierbarer Nanoarchaeota Typ-II-Systeme gefunden worden, deren Cas9 homolog ist, die aber nicht ohne weiteres heterolog genutzt werden konnten [4]. Für die Geneditierung von Archaea müssten also bakterielle Systeme verwendet werden. Allerdings sind aber viele Archaea und insbesondere archaale Modellorganismen Extremophile, in denen mesophile bakterielle Proteine nicht aktiv sind.

Somit können in extremophilen Archaea herkömmliche Ansätze zur Genommanipulation und enzymatische Techniken und Werkzeuge, die für mesophile Bakterien

ABB. 1 | NATÜRLICHE FUNKTION DES CRISPR-CAS-SYSTEMS



a) Fremd-DNA wird durch die crRNA-Komponente des Cascade-Multiproteinkomplexes sequenzspezifisch erkannt.
b) Anschließend wird die Endonuklease Cas3 rekrutiert und die Fremd-DNA abgebaut.

entwickelt wurden, nicht benutzt werden. Nur in mesophilen Archaeen wie *Methanosarcina acetivorans* gelang bisher die heterologe Anwendung eines Cas9-Systems [4]. Für andere Archaea wie *Haloferax volcanii*, das an hohe Salzkonzentrationen angepasst ist, oder dem hyperthermophilen *Sulfolobus solfataricus* müssen alternative CRISPR-Cas-Werkzeuge entwickelt werden [5–7]. Zumeist wird dann ein bereits in dem Organismus vorhandenes CRISPR-Cas-System so verändert, dass es eine neue Funktion als Werkzeug ausüben kann.

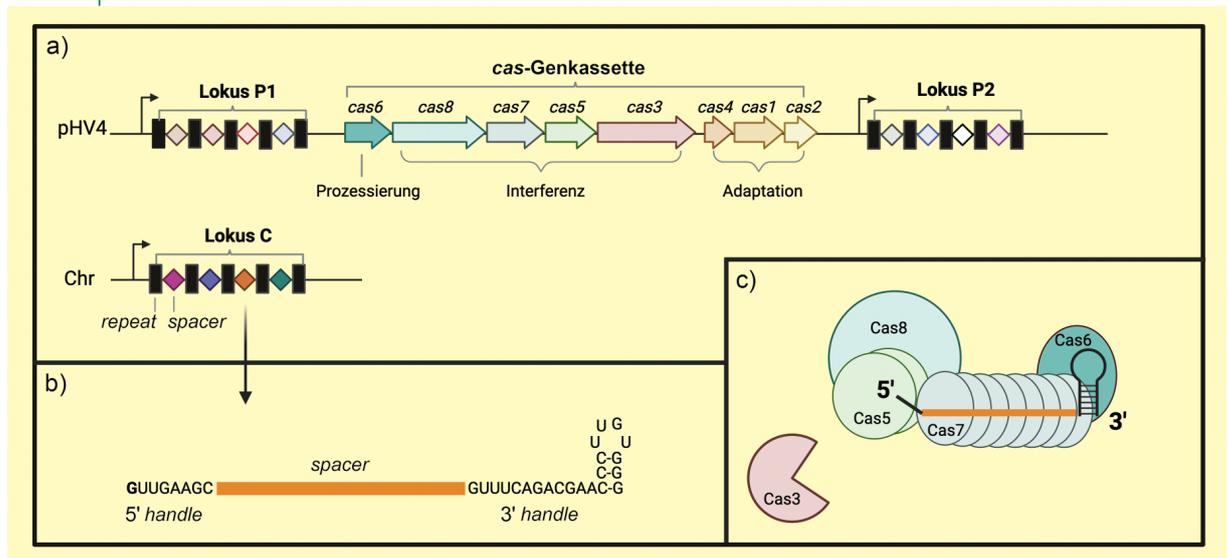
Das Prinzip, den Interferenzschritt nach der Bindung des Effektors an die Ziel-DNA einzufrieren, lässt sich bei Multiproteinsystemen der Klasse 1 noch einfacher realisieren, da die Effektornuklease ein eigenständiges Protein ist, wie das Beispiel des Typ-IE-Systems bei *Escherichia coli* zeigt [2, 8]. Die Entwicklung von CRISPRi-Werkzeugen in Archaea erweitert die Forschungsmöglichkeiten immens, da es oft die einzige Möglichkeit zur schnellen und gezielten Regulation der Genexpression ist. Die Umwidmung eines endogenen CRISPR-Cas-Systems vom Abwehrsystem (durch Zerschneiden der DNA) zum CRISPRi-Genregulationswerkzeug wurde von unserem Labor

erstmals für ein Archaeon – das Haloarchaeon *H. volcanii* – etabliert und bereits in ähnlicher Weise für andere Typ-I-Systeme in Archaeen übernommen [7–9].

IN KÜRZE

- Ein flexibler Genexpressionsschalter für Archaea: Auch endogene CRISPR-Cas-Systeme können so umgestaltet werden, dass sie sich als **Werkzeug zur Genrepression** eignen.
- Voraussetzung für CRISPRi-Anwendungen ist die **Deletion der Endonuklease (Cas3)**. Dadurch bindet der Cascade-Komplex zwar an die Ziel-DNA, ihr Abbau bleibt aber aus.
- Die Technik CRISPRi beruht darauf, eine künstliche crRNA einzubringen, die gegen die Promotorregion des Zielgens gerichtet ist. Cascade bindet dann dort und blockiert den Zugang für die DNA-Polymerase – **die Transkription unterbleibt**.
- CRISPRi ist **effizient und flexibel**, da nur die künstliche crRNA ausgetauscht werden muss.
- CRISPRi im Haloarchaeon *Haloferax volcanii* kann die Transkription auf nur 1,1 Prozent reduzieren und **Gene im Hauptchromosom, aber auch auf Plasmiden oder in Operons** ansteuern.
- Repression statt Deletion erlaubt es Forschenden, auch **essenzielle Gene zu studieren**, die nicht aus dem Genom entfernt werden können.

ABB. 2 | DAS TYP-I-B-CRISPR-CAS-SYSTEM VON *H. VOLCANII*



a) Die Komponenten des CRISPR-Cas-Systems werden im Genom in den CRISPR-Loci und der *cas*-Genkassette kodiert. *H. volcanii* besitzt drei CRISPR-Loci: Einer liegt auf dem Hauptchromosom (Chr) und zwei flankieren die *cas*-Genkassette auf dem Minichromosom pHV4. In einem Locus wechseln sich die *repeat*-Einheiten gleicher Sequenz mit spezifischen Abschnitten (*spacer*) ab. Im Adaptationsschritt passt sich das System einem neuen Angreifer an, indem ein Abschnitt der Fremd-DNA als neuer *spacer* in den Locus integriert wird. Da es sich um ein Typ-I-B-System handelt, kodiert die *cas*-Genkassette für acht Cas-Proteine; diese stellen die Proteinaktivität für die einzelnen Phasen der Immunantwort zur Verfügung (Adaptation-Prozessierung-Interferenz). Die CRISPR-Loci werden ausgehend von einem Promotor (Pfeil) als Ganzes transkribiert. Diese prä-crRNA wird dann durch Cas6 in der *repeat*-Sequenz geschnitten, um die reifen crRNAs freizusetzen. b) Die reife crRNA besteht aus dem *spacer*, der die Sequenzinformation der zuvor integrierten Fremd-DNA trägt, und den Resten der *repeat*-Sequenzen, die ihn als 5' und 3' *handle* flankieren. c) Die crRNA wird dann in den Multiproteinkomplex Cascade integriert, der aus den Cas-Proteinen (grün) des Interferenzmoduls aufgebaut ist. Wird die zum *spacer* der crRNA komplementäre Fremd-DNA erkannt, so wird Cas3 (rot) rekrutiert und damit der Abbau der Fremd-DNA eingeleitet.

Cascade: Vom DNA-Abbau- zum DNA-Binde-Komplex

Die endogene Immunantwort im Modellarchaeon *H. volcanii* wird von einem Typ-I-B-System vermittelt (zusammengefasst in [10]). Dieses umfasst neben drei CRISPR-Loci eine *cas*-Genkassette, die für die acht Cas-Proteine Cas1-8b kodiert (Abbildung 2). Die Reifung der von den CRISPR-Loci transkribierten prä-crRNAs erfolgt durch Cas6-vermittelte Prozessierung der *repeat*-Abschnitte, und die reifen crRNAs werden dann in einen Cascade genannten Multiproteinkomplex aus den Proteinen Cas5, 6, 7 und 8b integriert. Dieser Komplex erkennt und bindet Fremd-DNA spezifisch und rekrutiert dann die Effektor nuklease Cas3, die den Abbau einleitet, wobei Cascade wieder freigesetzt wird (Abbildungen 1 und 2).

In den Multiprotein-Effektor-Systemen Typ I und III kann die DNA prozessierende Aktivität entweder durch Inaktivieren des *cas3*-Gens oder durch Deletion des Gens entfernt werden [2-8]. Der in einer $\Delta cas3$ -Mutante verbliebene Cascade-Komplex kann also weiterhin die Ziel-DNA erkennen und binden; der Abbau erfolgt allerdings nicht, da keine Cas3-Endonuklease rekrutiert werden kann. Damit stellt der Cascade-Komplex ein an den Matrizenstrang gebundenes Hindernis dar, das diesen DNA-

Abschnitt blockiert. Wird nun Cascade an der besonders zentralen Stelle der Transkriptionsinitiation platziert, so versperrt er der RNA-Polymerase und den Transkriptionsfaktoren den Zugang zum Promotor (Abbildung 3).

Programmieren von Cascade: So einfach lässt sich die Zielsequenz ändern

Die Bindung des Cascade-Komplexes wird durch die im Cascade gebundene crRNA gesteuert. Eine reife crRNA des *Haloferax*-Typ-I-B-Systems umfasst immer eine 5' und 3' *handle*-Sequenz, die bei allen crRNAs eines CRISPR-Lokus gleich ist und die *spacer*-Sequenz umschließt [11] (Abbildung 2b). Die *handle*-Sequenzen stammen aus der Prozessierung der *repeat*-Einheiten durch das Cas6-Protein und flankieren den individuellen *spacer*-Abschnitt, dessen Sequenz invers komplementär zur Zielsequenz der angegriffenen DNA ist (Abbildung 4). Wenn der enzymatisch inaktive Cascade-Komplex des CRISPRi-Stammes gegen eine Wunschsequenz gerichtet werden soll, so muss eine crRNA mit entsprechendem *spacer* in den Stamm eingebracht werden. Dazu wird ein Plasmid mit einer Kassetten zur Expression einer künstlichen crRNA benutzt, das – wie unten beschrieben – eine Reifung der crRNA unabhängig von der Cas6-Endonuklease erlaubt [7] (Abbil-

dung 5). Es wird ein *Haloferax*-Stamm ohne *cas6*-Gen benutzt, denn es hat sich gezeigt: Steht die „neue“ crRNA in Konkurrenz zu endogenen crRNAs, die von den CRISPR-Loci des Systems kodiert werden und ebenfalls an den Cascade-Komplex binden können (etwa bei *H. volcanii* 51), dann kann experimentell keine signifikante Reduktion des Expressionslevels eines Reportergens erreicht werden [7]. Es muss also sichergestellt sein, dass die Wunsch-crRNA nicht nur eine von vielen ist und dass sich möglichst viele – für eine ideale Repression alle – Cascade-Komplexe gegen das Zielgen richten. Dieses System wird bei uns im Labor standardmäßig erfolgreich benutzt und soll hier näher beschrieben werden.

crRNA-Reifung mit tRNA prozessierenden Enzymen

In diesem CRISPRi-System verbleiben die endogenen CRISPR-Loci unverändert im Genom, aber das *cas6*-Gen wird deletiert. Dies hebt die natürliche Reifung der

Vorläufer-crRNAs aus, und es werden keine zelleigenen crRNAs mehr gebildet [7]. Jeder verfügbare Cascade-Komplex kann so die mit dem Plasmid eingebrachte Wunsch-crRNA aufnehmen – es gibt keine Konkurrenz mehr und alle endogenen CRISPR-Immunreaktionen sind ausgeschaltet. Die künstliche crRNA muss nun aber auf anderem Wege bereitgestellt werden.

Die Reifung der crRNA muss präzise erfolgen, da insbesondere die 5' *handle*-Sequenz essentiell für das Funktionieren der crRNA ist [13]. Hierzu enthält die CRISPRi-Kassette sogenannte t-Elemente (Abbildung 5). Diese Sequenzabschnitte falten sich nach der Transkription zu tRNA-ähnlichen Strukturen, die die Erkennungsstelle für die endogenen Enzyme der tRNA-Reifungsmaschinerie nachahmen (Abbildung 6). Das 5'-Ende der crRNA wird durch die tRNase Z, die stromabwärts des ersten t-Elements schneidet, erzeugt, und das 3'-Ende der crRNA entsteht durch die Aktivität der RNase P, die das zweite t-Element am 5'-Ende prozessiert (Abbildung 6) [13]. Die

ABB. 3 | PRINZIP VON CRISPR-INTERFERENZ

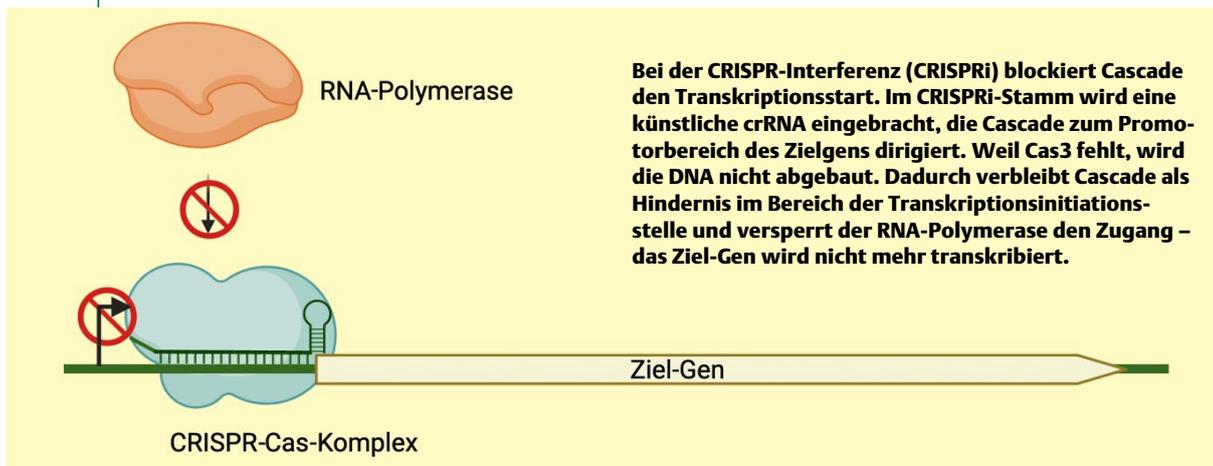
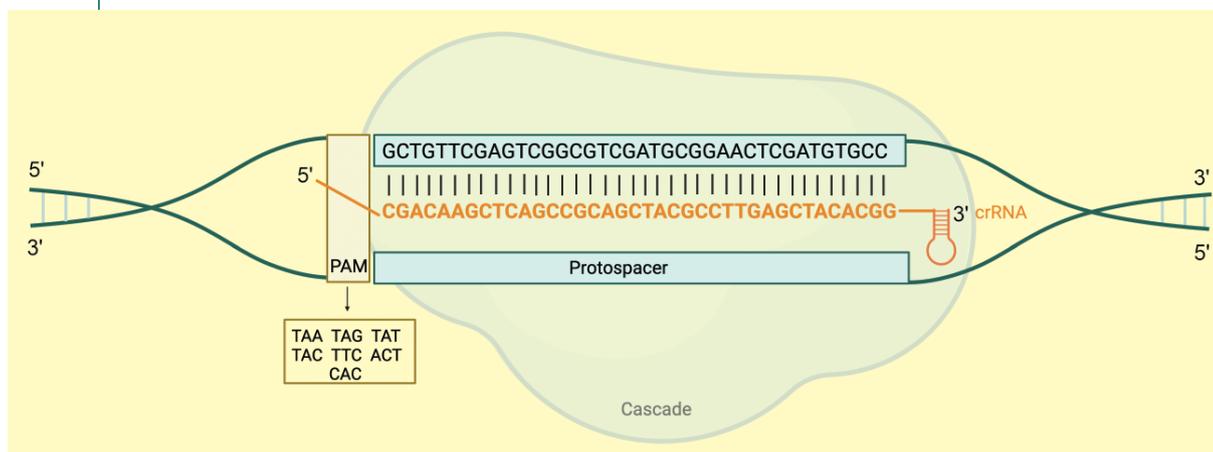


ABB. 4 | BINDUNG DER ZIEL-DNA DURCH DEN CASCADE-KOMPLEX

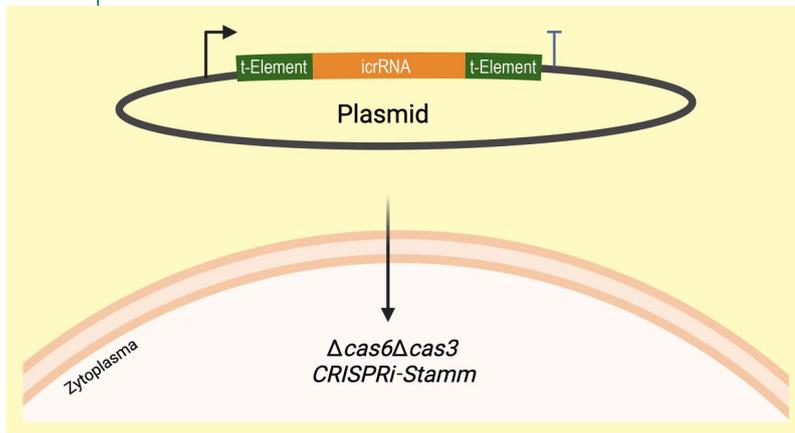


Die im Cascade gebundene crRNA (orange) sorgt mit dem *spacer* für die sequenzspezifische Erkennung der Ziel-DNA (grün). Der zum *spacer* invers komplementäre Abschnitt der DNA heißt *protospacer*. Er liegt auf dem nicht gebundenen Strang und muss neben einem PAM liegen. *H. volcanii* besitzt sieben PAMs.

Reifung der crRNA ist also ein Nebenprodukt der natürlichen Aktivität des tRNA-Metabolismus von *H. volcanii*. Die so erzeugte crRNA kann dann in den Cascade von

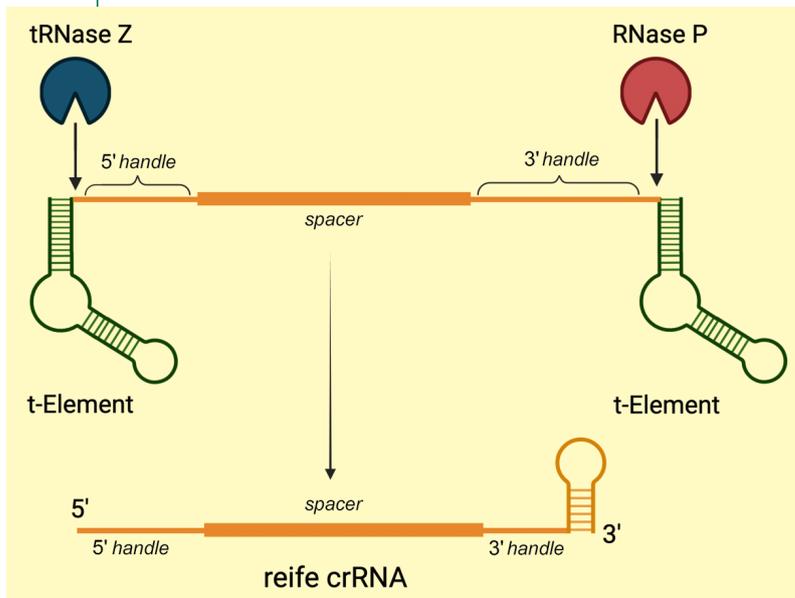
H. volcanii aufgenommen werden und eine Immunreaktion des Systems auslösen, die nicht von der endogenen zu unterscheiden ist [13].

ABB. 5 | DAS CRISPRi-PLASMID



Das Gen für die Wunsch-crRNA wird mittels eines Plasmids in den CRISPRi-Stamm ($\Delta cas3\Delta cas6$) eingebracht. Die Kasette zur Expression der crRNA setzt sich zusammen aus einem synthetischen, konstitutiv aktiven Promotor (Pfeil) gefolgt von einem t-Element (grün), der kodierenden Sequenz der crRNA bestehend aus 5' handle – spacer – 3' handle (orange), einem weiteren t-Element und einem Terminator (blau). Die spacer-Sequenz dieser Kasette kann leicht durch eine neue Sequenz ausgetauscht werden, was eine schnelle und effiziente Klonierung eines neuen CRISPRi-Konstruktes erlaubt.

ABB. 6 | REIFUNG DER crRNA



Die crRNA wird durch die tRNA-Prozessierungsenzyme gereift. Die crRNA wird als längerer Vorläufer ausgehend von einem konstitutiven Promotor transkribiert. Alle Elemente einer reifen crRNA (5' handle, spacer, 3' handle, orange) sind in der Vorläufer-RNA stromauf und -abwärts von t-Elementen (grün) flankiert. Diese t-Elemente falten sich in eine 3D-Struktur, die von den Enzymen der tRNA-Reifungsmaschinerie für eine tRNA gehalten wird. Dementsprechend wird das 3'-Ende der t-Elemente von der tRNase Z und das 5'-Ende der t-Elemente von der RNase P prozessiert. Durch das „Abschneiden“ der t-Elemente werden die Enden der crRNA freigesetzt.

Wie wähle ich die Zielregion für CRISPRi aus?

Die vom CRISPR-Cas-System erkannte Region der Ziel-DNA wird *protospacer* genannt; sie wird von einem *protospacer adjacent motif* (PAM) flankiert (Abbildung 4). Für das Typ-I-B-System von *H. volcanii* wurden sieben verschiedene solcher Motive beschrieben (zusammengefasst in [10]). Eines von ihnen muss stromaufwärts des *protospacer*-Abschnitts liegen und bei Erkennung der Zielsequenz von Cascade identifiziert werden, um sie als *bonafide*-Ziel auszuweisen. Als Wunsch-*protospacer* kommen also nur Sequenzen in Frage, die stromabwärts von einer der sieben PAM-Sequenzen liegen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass CRISPRi in *H. volcanii* relevante Effekte zeigt, wenn die Zielsequenz im Bereich der Transkriptionsstartstelle liegt (-70 → +20) [14]. Die besten Ergebnisse wurden mit crRNAs erzielt, deren *spacer* im Promotorbereich binden [14]. Dies führt zur Annahme, dass der Cascade-Komplex in *Haloflex* den Elongationsprozess nur unzureichend aufhalten kann [12], wohl aber die Initiation durch die RNA-Polymerase. Die Erfahrung mit den bisher in unserem Labor durchgeführten CRISPRi-Experimenten zeigt weiter, dass der Matrizenstrang als Ziel zu bevorzugen ist [14]. Ist also ein zu reprimierendes Gen ausgewählt, so müssen:

- (1) der Transkriptionsstart identifiziert werden,
- (2) PAMs in diesem Bereich auf dem kodierenden Strang ausgewählt und
- (3) 36 Nukleotide stromabwärts als potenzielle *spacer*-Sequenz aufgenommen werden.

Experimentelle Erfahrung des Marchfelder-Labors zeigt, dass es in der Regel ausreicht, drei so konzipierte crRNAs zu testen, um eine signifikante Reduktion des Transkriptlevels des Wunschlokus zu erzielen.

Anwendungsbeispiele aus dem Labor

Nach Klonierung der Wunsch-*spacer*-Einheit in die CRISPRi-Kasette wird das Expressionsplasmid mittels Transformation in den CRISPRi-Stamm ($\Delta cas3\Delta cas6$) eingebracht. Anschließend können die erhaltenen Zellen analysiert werden. Mittels einer *Northern-Blot*-Analyse oder mit RT-qPCR (Reverse Transkriptase-quantitative Polymerasekettenreaktion) kann das Transkriptlevel des Zielgens direkt überprüft und quantifiziert werden (Abbildung 7). Ist das mRNA-Level reduziert, so kann dann mit der Charakterisierung bzw. Untersuchung der CRISPRi-Mutante fortgefahren werden. Eine detaillierte Methoden-Beschreibung ist zusammengefasst in [14]. Auf diese Weise konnte die Plasmid-basierte Expression des für die β -Galaktosidase kodierenden Reportergens *bgaHa* um 47 Prozent reduziert werden [7]. Liegt das Zielgen im Genom von *H. volcanii*, so ergibt sich in der Regel eine noch stärkere Reduktion der mRNA-Menge.

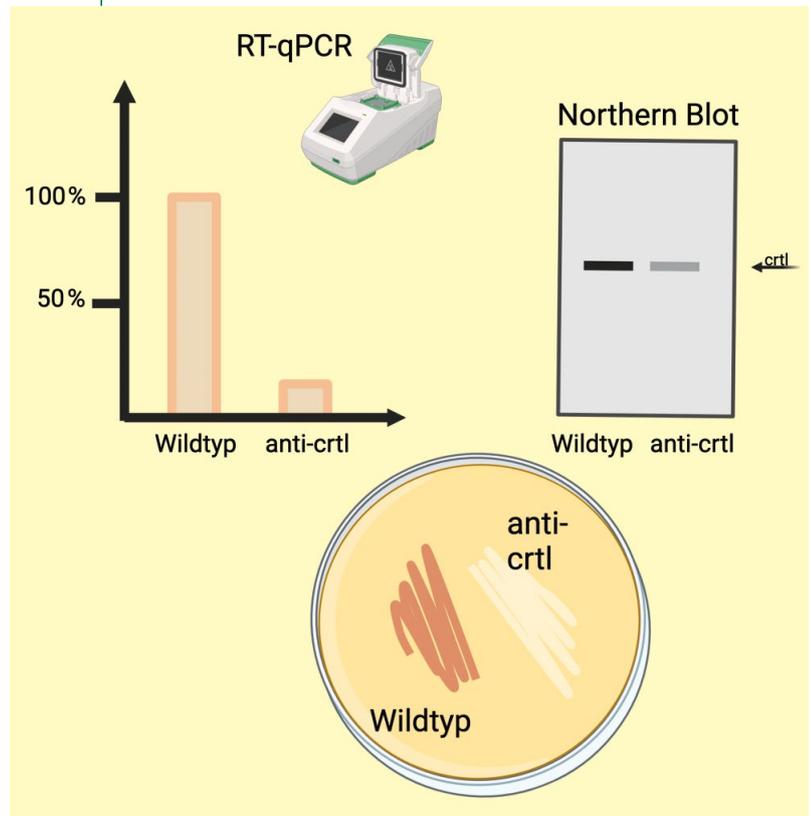
Im Beispiel des mRNA-Prozessierungsfaktors *epf1* reduziert CRISPRi die RNA-Menge auf weniger als 20 Prozent [7]. Im Fall des für die Karotinoid-Biosynthese essenziellen *crtI*-Operons konnte durch CRISPRi gegen den Promotorbereich des *crtI*-Gens auch der Phänotyp der Zellen verändert werden. Wildtyp-*Haloferax*-Zellen sind rot, die Reduktion der Menge an *crtI*-mRNA mit CRISPRi auf nur acht Prozent führt dazu, dass die Zellen weiß bleiben (Abbildung 7) [7]. Der Promotor stromaufwärts des *crtI*-Gens steuert alle drei Gene des Operons, und die RNA-Mengen der anderen beiden Gene sind ebenfalls deutlich einschränkt (35% oder weniger). Das zeigt, dass der Transkriptionsblock auch für polycistronische Transkripte effektiv ist. Dass die Transkriptlevel des zweiten und drittens Gens weniger stark reduziert wurden, lässt sich dadurch erklären, dass innerhalb des Operons weitere Transkriptionsstartstellen nachgewiesen werden konnten, die nicht durch den am *crtI*-Promotor platzierten Cascade blockiert werden [7]. CRISPRi ist also ein mächtiges Instrument um die Expression genomischer, aber auch Plasmid-kodierter Gene herunterzuregulieren – seien sie einzeln oder in Operons organisiert.

Die Untersuchung essenzieller Gene ist im wissenschaftlichen Alltag eine Herausforderung. Hier ist die Anwendung von CRISPRi optimal. Wenn ein Gen essenziell ist, wäre ein Knock-out letal; durch CRISPRi aber kann die Transkription so weit eingeschränkt werden, dass ein basales mRNA-Level erhalten bleibt, die Zellen also noch überleben. Anschließend kann der resultierende Phänotyp analysiert und so die Funktion des Genprodukts entschlüsselt werden.

Ein Beispiel aus unserem Labor ist die Repression des für das kleine Protein CdrS kodierenden Gens. Wird die Transkription hier um bis zu 60 Prozent reduziert, treten ein schwerer Wachstumsdefekt und eine Dysregulation der Zellteilung auf, was sich in einer stark veränderten Zellmorphologie zeigt [15]. Mit Hilfe von Transkriptom- und Proteomanalysen des CRISPRi-Repressionsstammes konnte letztlich CdrS als Transkriptionsfaktor in einem regulatorischen Netzwerk identifiziert werden, das Stoffwechsel und Zellteilung koordiniert [15]. Die bisher stärkste Repression konnte für die ebenfalls essenzielle *splicing*-Endonuklease *endA* erreicht werden. Ihr Genprodukt konnte auf eine Restmenge von 1,1 Prozent gesenkt werden [16]. Der betroffene Stamm zeigte starke Wachstumseinbußen, und es kam unter anderem durch die Anreicherung von unprozessierten Vorläufern ribosomaler RNAs sowie von tRNAs zu vielfältigen Effekten auf eine große Anzahl von mRNAs.

Der durch CRISPRi erzielte Repressionseffekt ist abhängig von der jeweiligen crRNA und kann stark variieren (vgl. *bgaHa*) [12]. In Bezug auf essenzielle Gene ist das sogar von Vorteil, denn es kann diejenige crRNA ermittelt werden, die einen (maximalen) phänotypischen Effekt erzielt, das Überleben der Zelle aber zulässt und so überhaupt die Untersuchung essenzieller Gene ermöglicht.

ABB. 7 | TYPISCHE ERGEBNISSE EINES CRISPRi-EXPERIMENTS



Am Beispiel der Repression des für die Karotinoidbiosynthese essenziellen *crtI*-Gens lassen sich die Auswirkungen der Genrepression illustrieren. In CRISPRi-Zellen (*anti-crtI*) wird durch die verringerte Transkription des *crtI*-Gens weniger Protein synthetisiert und damit weniger Karotinoid. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen, die die für *H. volcanii* charakteristische Rotfärbung zeigen, ist die Zellfarbe der CRISPRi-Zellen deshalb weiß. Die Reduktion der Transkriptmenge kann mittels Northern Blot oder RT-qPCR nachgewiesen werden; hier erscheint das Signal des CRISPRi-Stammes (*anti-crtI*) deutlich schwächer als im Wildtyp.

Wenn die Repression plötzlich stoppt – „Escaper“-Klone

Die Genexpression kann in *H. volcanii* durch CRISPRi effektiv reguliert werden; aber es gibt gelegentlich Zellen, die dieser Repression entkommen. Diese „Escaper“ können sich schnell in der Kultur ausbreiten, insbesondere wenn die Repression des Zielgens das Zellwachstum beeinträchtigt. Sie weisen Mutationen in Komponenten des CRISPRi-Weges auf, die dazu führen, dass die Ziel-DNA nicht erkannt wird, die crRNA nicht gebildet wird oder Cascade nicht mehr an die DNA binden kann. Diese Mutationen können durch Punktmutationen in den *cas*-Genen, dem crRNA-Expressionsplasmid oder den umgebenden Bereichen verursacht werden [7]. Am häufigsten kommt es aber wegen der hohen Rate homologer Rekombination in *H. volcanii* zum Verlust von relevanten Genabschnitten. Besonders gefährdet ist hier die *cas*-Genkassette, die im Genom von den beiden CRISPR-Loci mit ihren *repeat*-Sequenzen flankiert wird. Aber auch die crRNA kodierende Sequenz, die von zwei identischen t-Elementen einge-

rahmt ist, kann deletiert werden (Abbildungen 2a und 5). Um die „Escape“-Ereignisse zu überwachen, ist während eines CRISPRi-Experiments ein PCR-Monitoring erforderlich [14].

Ausblick

Typ-I-Systeme – wie der hier für *H. volcanii* beschriebene Typ I-B – sind neben Typ I-A und I-D die in Archaea vorherrschenden CRISPR-Cas-Systeme. Für viele archaeale Spezies sollte es also möglich sein – wie hier beschrieben – CRISPRi zur Genregulation einzusetzen. Für *Haloferax mediterranei* konnte z. B. ein analoges CRISPRi-Werkzeug umgesetzt werden, um so als Wegbereiter einer biotechnologischen Anwendung den Kohlenstofffluss gezielt zu modifizieren [9].

Neben dem Einsatz als „Sperre“ für die Transkription kann ein nur bindender, aber nicht schneidender Cascade auch genutzt werden, um z. B. an ihn gebundene Proteine zu bestimmten Genomabschnitten zu bringen. Diese Art von Werkzeugen wird basierend auf Klasse-2-Effektoren bereits weit verbreitet eingesetzt. Darüber hinaus wurde speziell für die Anwendung in Archaea auch das RNA-abbauende Typ-III-CRISPR-Cas-System zum Genregulationswerkzeug umgestaltet [4], [5]. In *Sulfolobus*-Spezies wird ein mit einer künstlichen crRNA versehener Typ-III-Cascade eingesetzt, um gezielt bestimmte RNAs abzubauen: ein Weg, um Genexpression posttranskriptional zu reprimieren (zusammengefasst in [4, 14]). Die archaeale CRISPR-Cas-Werkzeugkiste füllt sich also zunehmend und macht so diese faszinierende prokaryotische Domäne molekular-genetisch zugänglicher. Diese erweiterte Toolbox wird es zukünftig ermöglichen, archaeale Regulations- und Stoffwechselleistungen zu verstehen und ihr volles Potenzial auszuschöpfen.

Zusammenfassung

Aufgrund ihrer komplexen und ungewöhnlichen Biologie ist die Entwicklung von Werkzeugen für Archaea nicht einfach, und bisher stand kein Werkzeug zur Genrepression zur Verfügung. Fast alle Archaea besitzen jedoch CRISPR-Cas-Systeme, die eine exzellente Quelle für die Entwicklung von Methoden sind. Wie wir am Beispiel des Haloarchaeons Haloferax volcanii zeigen, können diese CRISPR-Cas-Systeme in Werkzeuge zur Genrepression verwandelt werden: Entfällt nach Deletion der Effektornuklease Cas3 der Abbau der Ziel-DNA, bleibt der Cascade-Komplex gebunden und blockiert den Zugang für die RNA-Polymerase (CRISPRi). Genrepression mittels Cascade ist ein effizientes und wertvolles Werkzeug, um auch in Archaea essentielle Gene studieren zu können. CRISPRi ist modular und kann schnell und einfach durch den Austausch der crRNA gegen ein anderes Zielgen gerichtet werden. Hier fassen wir die Schritte zur Umnutzung des CRISPR-Cas-Systems von H. volcanii zusammen und berichten von Anwendungen aus unserem Labor.

Summary

CRISPR-Cas tools for Haloarchaea

Due to their complex and unusual biology, the development of tools for archaea is not simple and so far, no tool for the regulation of gene repression has been available. However, all of archaea have CRISPR-Cas systems, which are an excellent source for the development of new methods. Using haloarchaeon Haloferax volcanii as an example, we show that these CRISPR-Cas systems can be transformed into tools for gene repression: If the degradation of the target DNA does not take place upon deletion of the effector nuclease Cas3, the Cascade complex remains bound and blocks the access for RNA polymerase (CRISPRi). Cascade-based gene repression is an efficient and valuable tool to study essential genes in archaea. CRISPRi is highly modular and can quickly and easily be directed towards a different target gene by the exchange of the crRNA. Here we summarize the steps to repurpose the CRISPR-Cas system of H. volcanii and report on applications in our laboratory.

Schlagworte:

CRISPRi, crRNA, gene silencing, gene repression, Archaea, CRISPR-Cas, Cascade, *Haloferax volcanii*

Literatur

- [1] E. V. Koonin, K. S. Makarova (2022). Evolutionary plasticity and functional versatility of CRISPR systems. *PLOS Biology* 20 (1), e3001481, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001481>.
- [2] D. Rath et al. (2015). Efficient programmable gene silencing by Cascade. *Nucleic Acids Research* 43 (1), 237–246, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1257>.
- [3] L. S. Qi et al. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152 (5), 1173–1183, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>.
- [4] U. Gophna et al. (2017). Finally, Archaea Get Their CRISPR-Cas Toolbox. *Trends in Microbiology* 25(6), 430–432, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.03.009>.
- [5] Z. Zebec et al. (2016). Efficient CRISPR-Mediated Post-Transcriptional Gene Silencing in Hyperthermophilic Archaeon Using Multiplexed crRNA Expression. *G3 Genes | Genomes | Genetics*. 6 (10), 3161–3168, <https://doi.org/10.1534/g3.116.032482>.
- [6] J. Bost et al. (2023). Application of the endogenous CRISPR-Cas type I-D system for genetic engineering in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Frontiers in Microbiology* 14, Zugriff: 18. März 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1254891>
- [7] A.-E. Stachler, A. Marchfelder (2016). Gene Repression in Haloarchaea Using the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas I-B System“. *Journal of Biological Chemistry* 291(29), 15226–15242, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.724062>.
- [8] M. L. Luo et al. (2015). Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression. *Nucleic Acids Research* 43 (1), 674–681, <https://doi.org/10.1093/nar/gku971>.
- [9] L. Lin et al. (2021). Optimising PHBV biopolymer production in haloarchaea via CRISPRi-mediated redirection of carbon flux. *Commun Biol* 4, 1007, <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02541-z>.
- [10] L.-K. Maier et al. (2019). The nuts and bolts of the *Haloferax* CRISPR-Cas system I-B“. *RNA Biology* 16 (4), <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1460994>.

- [11] L.-K. Maier et al. (2013). Essential requirements for the detection and degradation of invaders by the *Haloferax volcanii* CRISPR-Cas system I-B*, *RNA Biology* 10 (5), <https://doi.org/10.4161/rna.24282>.
- [12] A.-E. Stachler et al. (2020). CRISPRi as an efficient tool for gene repression in archaea. *Methods* 172, 76–85, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.023>.
- [13] L.-K. Maier et al. (2015). An Active Immune Defense with a Minimal CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) RNA and without the Cas6 Protein*, *Journal of Biological Chemistry* 290 (7), 4192–4201, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617506>.
- [14] T. S. Schwarz et al. (2022). CRISPR Interference as a Tool to Repress Gene Expression in *Haloferax volcanii*. In: *Archaea* 2522, S. Ferreira-Cerca, Hrsg. in *Methods in Molecular Biology* 2522, New York, NY, Springer US, 57–85. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2445-6_4.
- [15] Y. Liao et al. (2021). CdrS Is a Global Transcriptional Regulator Influencing Cell Division in *Haloferax volcanii*, *mBio* 12 (4), e01416–21, <https://doi.org/10.1128/mBio.01416-21>.
- [16] T. S. Schwarz et al. (2020). Splicing Endonuclease Is an Important Player in rRNA and tRNA Maturation in Archaea, *Front Microbiol.* 11, 594838, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.594838>.



Nadia Di Cianni, Masterabschluss in Functional Genomics an der Universität Triest, Italien, 2018. Danach Research Assistant am Danish Archaea Centre, Kopenhagen, Dänemark und seit 2019 Doktorandin in der AG Marchfelder an der Universität Ulm.



Anita Marchfelder, Diplomarbeit 1988 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin, Promotion 1992 am Institut für Genbiologische Forschung Berlin, 1993–1994 Postdoktorandin in Stanford bei D. A. Clayton, 2001–2007 Leitung einer Nachwuchsgruppe gefördert von der VolkswagenStiftung, 2007 Heisenberg-Stipendium, 2008 Heisenberg-Professur, seit 2011 Professorin an der Universität Ulm, seit 2024 Leiterin des Instituts für Molekularbiologie und Biotechnologie der Prokaryoten der Universität Ulm. Anita Marchfelder ist Mitglied der GBM (www.gbmonline.de), der VAAM, des VBIO und der GfG (www.gfgenetik.de) und unterstützt die Studiengruppen RNA-Biochemie (www.rnabiochemistry.de) und GEN-AG Regulatorische RNAs. Die CRISPR-Cas-Forschung der AG Marchfelder wird gefördert durch die DFG im Rahmen des SPP 2141 – CRISPR-Cas functions beyond defence.



Verfasst von:



Lisa-Katharina Maier, Biologiestudium an der Universität Ulm, 2010 Diplom mit Schwerpunkt Molekularbiologie. 2015 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marchfelder. Seit 2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Marchfelder mit Forschungsschwerpunkt zum RNA-Metabolismus und zur Immunabwehr bei Haloarchaeaen.

Korrespondenz

Dr. Lisa-Katharina Maier
Molekularbiologie und Biotechnologie der Prokaryoten
Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11
89081 Ulm
Email: lisa-katharina-1.maier@uni-ulm.de



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

Berufsfelder Biologie – hier gibt es den Überblick

Der VBIO hat achtzig spannende Porträts von Biowissenschaftlerinnen und Biowissenschaftlern im Beruf zusammengestellt. Berufsfeldübersichten, Kontaktadressen, Tipps und Internet-Links ergänzen die „Perspektiven“.

Perspektiven – Berufsbilder von und für Biologen und Biowissenschaftler

- Herausgegeben vom VBIO
- 11. überarbeitete Auflage, DIN A5, 312 Seiten, ISBN 978-3-9810923-3-2
- 16,80 Euro (inkl. Versand) 15,00 Euro (VBIO-Mitglieder)
- Direktbestellung über info@vbio.de



Weitere Infos:

www.vbio.de/perspektiven

PERSPEKTIVEN BERUFSFELD BIOLOGIE



Überlegungen zur Etablierung des CRISPR-Cas9-Systems in *Neurospora crassa*

CRISPR-Cas9: Das will ich auch!

STEFANIE GRÜTTNER

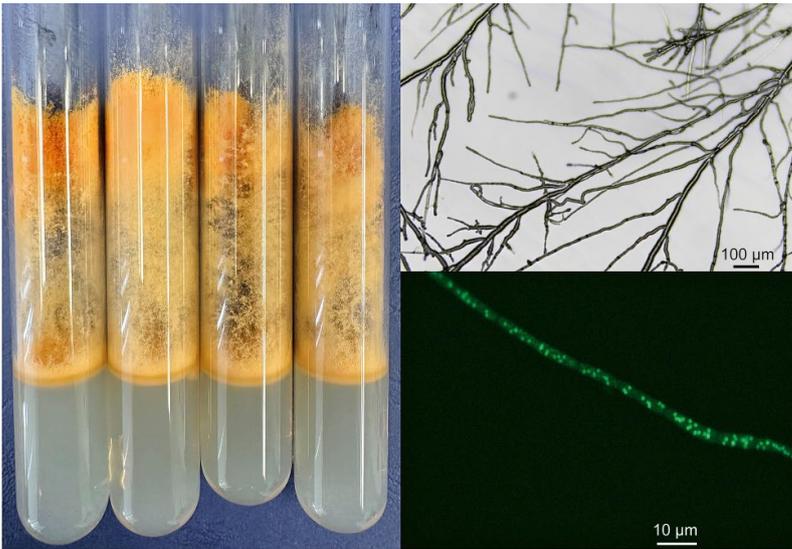


ABB. 1 *Neurospora crassa* im Labor: als Anzucht in Reagenzgläsern (links), Hyphen unter dem Mikroskop (rechts oben) und eine Hyphe mit grün fluoreszierenden Zellkernen (rechts unten). Fotos: S. Grüttner.

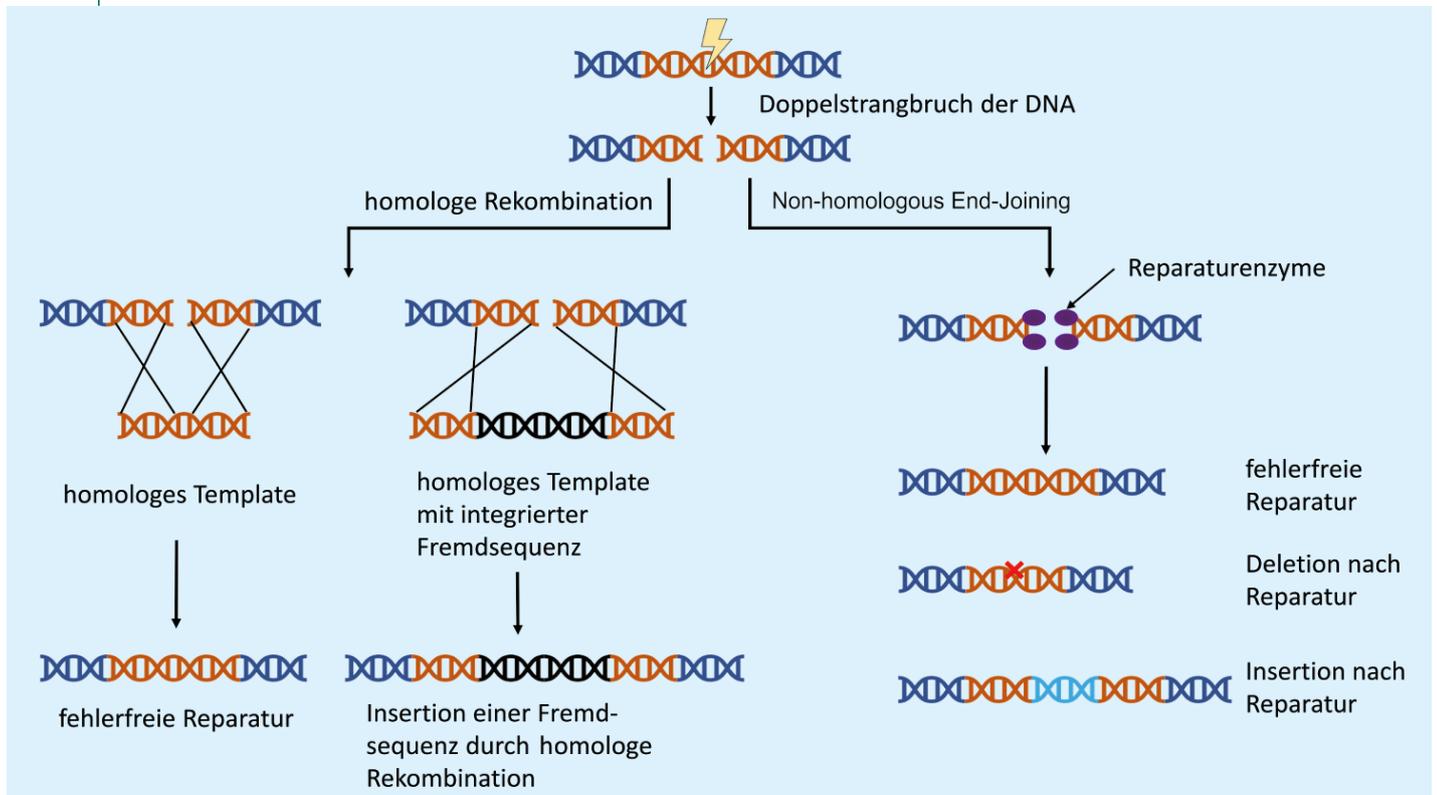
CRISPR-Cas9 ist ein System zur gezielten Veränderung von Genen, dessen Entdeckung Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna 2020 den Chemie-Nobelpreis einbrachte und die Funktionsanalyse von Genen revolutionierte. Seit der Entdeckung wurde CRISPR-Cas9 bereits vielfach auch in Modellorganismen eingesetzt. Die einfache Handhabung und die Effizienz der Methode sorgen dabei für ihre Beliebtheit. Da wäre es doch super, wenn man dieses System auch für Untersuchungen am eigenen Forschungsobjekt verwenden könnte! Wie man herausfindet, ob CRISPR-Cas9 in einem „Organismus von Interesse“ genutzt werden kann und welche Strategien dazu zum Einsatz kommen, soll hier am Beispiel des Modellorganismus *Neurospora crassa* näher erörtert werden.

Pilze begegnen uns in vielen Lebenslagen – sei es in der Natur als Destruent, Symbiont oder Pathogen, in der Biotechnologie in der Herstellung von u. a. Enzymen, Antibiotika und Arzneimitteln oder auf unserem Teller als Speisepilz. Auch in der Wissenschaft spielen sie eine große Rolle, da sie sich hervorragend als Modellorganismen für verschiedenste Untersuchungen eukaryotischer Zellen eignen. Auch *Neurospora crassa*, der rote Brotschimmel, ist solch ein Modellorganismus (Abbildung 1). Er gehört zu den Schlauchpilzen (Ascomycota) und wurde zum ersten Mal 1843 als Verursacher eines orangenen Schimmelbefalls in französischen Bäckereien beschrieben. In den späten 1920er Jahren wurde er von Bernard O. Dodge und Carl C. Lindgren im Labor etabliert und entwickelte sich dann über die Zeit zu einem wichtigen Modellorganismus der biochemischen Genetik [1]. So verhalf er beispielsweise George W. Beadle und Edward L. Tatum 1941 zum Nobelpreis für die Aufstellung der revolutionären „Ein-Gen-ein-Enzym“-Hypothese [2].

Zudem erfreut sich *N. crassa* in zahlreichen weiteren Forschungsfeldern großer Beliebtheit wie z. B. in der Physiologie, Molekularen Zellbiologie, Entwicklungsbiologie, Epigenetik sowie in der Erforschung der circadianen Rhythmik. Der Grund für diese zahlreichen Anwendungen liegt darin, dass *N. crassa* sehr einfach im Labor kultiviert werden kann. Er wächst sehr schnell und hat nur geringe Ansprüche an das Wachstumsmedium. Zum anderen werden genetische Analysen dadurch vereinfacht, dass das Genom von *N. crassa* vollständig sequenziert ist. Da der Pilz ein haploides Genom aufweist, sind auch genetische Modifikationen vergleichsweise einfach durchzuführen. Weitere Vorteile liegen in der großen bereits etablierten Methodenvielfalt sowie dem Vorhandensein einer Sammlung von Stämmen, bei denen einzelne Gene des Pilzes ausgeschaltet sind, und die fast alle bekannten Gene abdeckt [1–2].

Obwohl bereits sehr viele zelluläre Prozesse bei *N. crassa* erforscht sind, bietet der Pilz diverse Möglichkeiten, um weitere Forschungsfragen zu untersuchen, deren Ergebnisse potenziell auf andere Organismen wie Säugetiere oder auch den Menschen übertragbar sind. So konnten z. B. wichtige Erkenntnisse zur epigenetischen Regulierung durch DNA-Methylierung mithilfe von *N. crassa* gewonnen werden [3]. Derartige Untersuchungen sind mit Mäusen und anderen Modellorganismen, bei denen die Funktion

ABB. 2 | ZELLEIGENE DNA-REPARATURMECHANISMEN



Wenn sich ein DNA-Doppelstrangbruch ereignet, greift entweder die **homologe Rekombination (HR, links)** oder das **non-homologous end-joining (NHEJ, rechts)**. Bei der HR wird eine homologe DNA-Sequenz als Vorlage für die Reparatur genutzt. Beinhaltet diese zusätzliche DNA-Bereiche, werden diese bei der Reparatur miteingefügt. Beim NHEJ werden die Stränge ohne Vorlage zusammengefügt; dabei können Fehler entstehen: **Deletionen (Basen fehlen)** oder **Insertionen (Einfügen zusätzlicher Basen)**.

der DNA-Methylierung eine lebenswichtige Rolle spielt, nicht möglich, da Tiere mit manipulierter DNA-Methylierung nicht überlebensfähig sind. Zudem stellen Pilze wichtige Organismen in der Biotechnologie dar. Auch wenn *N. crassa* selbst dort eher selten verwendet wird, lassen sich Erkenntnisse, die an dem Modellorganismus gewonnen werden, auf Produktionsstämme übertragen.

Never change a running system?

Um die Funktion bestimmter Gene zu analysieren, bedient man sich in der Regel des Ausschaltens von Genen. Anschließend wird untersucht, welche Prozesse sich im Organismus von Interesse verändern, wenn das entsprechende Gen nicht mehr funktionsfähig ist. Daraus können Rückschlüsse auf die Funktion des einzelnen Gens gezogen werden. Man spricht hier auch von reverser Genetik. Diese ist allerdings nicht immer ganz trivial, da oft nicht nur ein einziges Genprodukt für einen Prozess verantwortlich ist, sondern es eines Zusammenspiels verschiedener Genprodukte bedarf. Anstatt Gene auszuschalten, können auch Gene in den Organismus eingebracht werden, um ihre Funktion zu untersuchen. Das können sowohl eigene (endogene) Gene des Organismus als auch auch fremde (exogene) Gene sein.

Das Ausschalten der Gene kann auf verschiedenen Wegen geschehen. In Pilzen wird häufig die Methode der homologen Rekombination verwendet. Dabei macht man sich – ähnlich wie bei dem CRISPR-Cas9-System – einen zelleigenen Reparaturmechanismus zunutze, der Doppelstrangbrüche in der DNA erkennt und diese durch die Verwendung einer homologen DNA-Sequenz (identische Sequenz) als Vorlage repariert (Abbildung 2). Liefert man der Zelle eine alternative DNA-Sequenz, bei der sich

IN KÜRZE

- *Neurospora crassa* ist ein wichtiger Modellorganismus in der Genetik, Molekularbiologie und vielen weiteren Forschungsgebieten.
- Das CRISPR-Cas9-System für *N. crassa* bietet einige Vorteile für die Forschungsgemeinschaft, wie die Möglichkeit, mehrere Gene gleichzeitig zu modifizieren und den **Arbeitsaufwand zu minimieren**.
- Die Etablierung des Systems erfordert viel Vorbereitung und Abwägungen. Besonders wichtig ist die Überlegung, wie die einzelnen **CRISPR-Cas9-Komponenten in die Zelle gelangen** bzw. von ihr synthetisiert werden können.
- Wenn die **generelle Funktionalität** des entwickelten Systems durch Tests und entsprechende Kontrollen nachgewiesen wurde, kann es für spezifische Analysen bei *N. crassa* angewendet werden.

inmitten der homologen Sequenzen eine andere DNA-Sequenz befindet, wird auch die fremde DNA mit kopiert und so in das Genom eingebaut. Dadurch wird dann das ursprüngliche Gen an dieser Position entweder zerstört oder komplett ersetzt und ist somit ausgeschaltet.

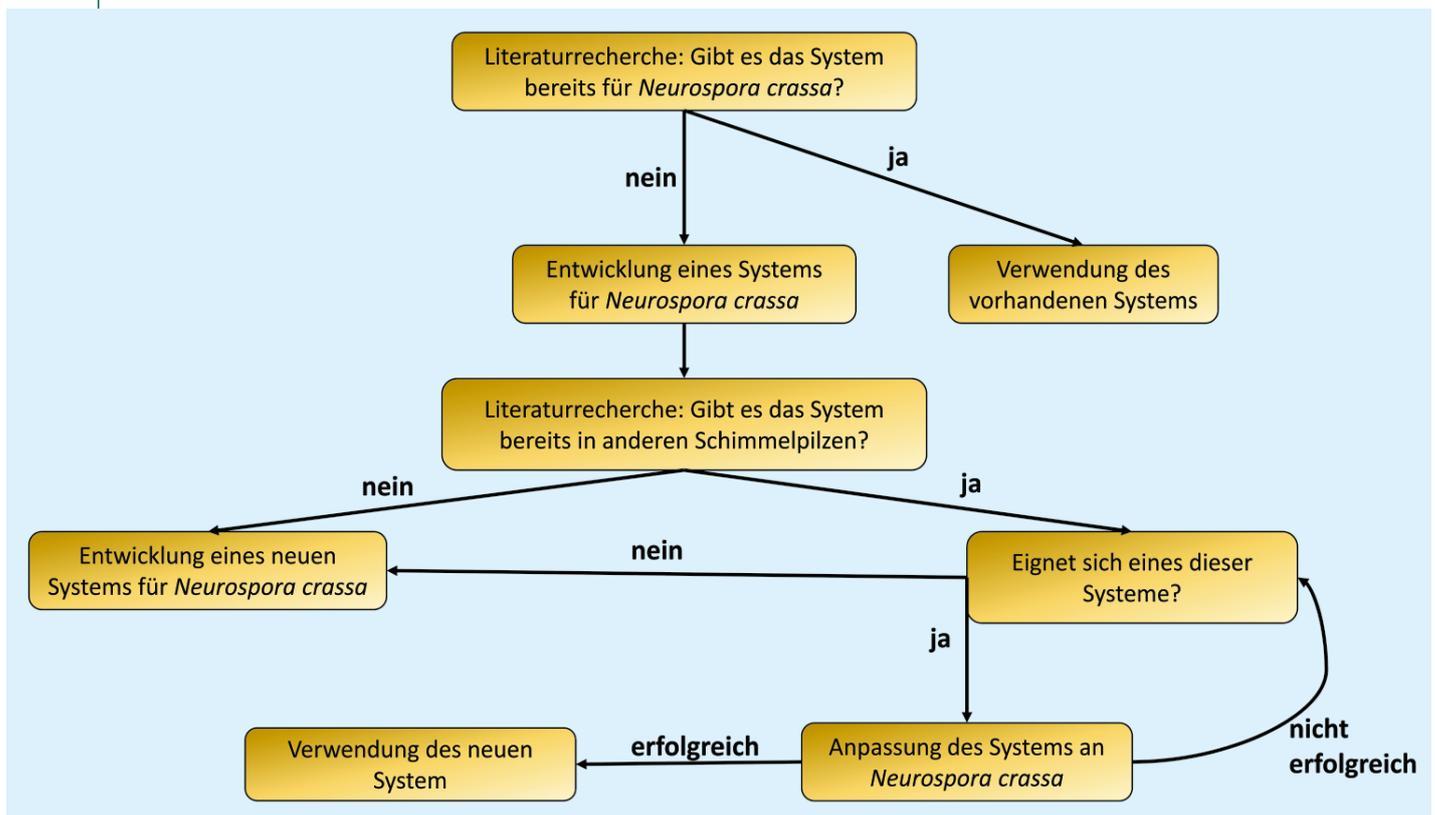
Die homologe Rekombination ist allerdings ein sehr aufwendiger Prozess und erfolgt zudem in *N. crassa* nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit, da in der Regel ein zweiter Reparaturmechanismus von der Zelle genutzt wird: das sogenannte *non-homologous end-joining* (kurz NHEJ), das ebenfalls bei CRISPR-Cas9 eine Rolle spielt [4-5] (Abbildung 2). Bei diesem Mechanismus werden die zwei auseinandergebrochenen DNA-Stränge ohne Vorlage einfach wieder zusammengefügt. Dieser Reparaturweg erlaubt es allerdings nicht, fremde DNA in das Genom einzubringen. Will man also mit hoher Effizienz neue DNA-Sequenzen in das Genom von *N. crassa* einbringen – sei es, um Gene auszuschalten oder neue einzubringen –, muss man eine Mutante verwenden, bei der das NHEJ ausgeschaltet ist. Der Nachteil hierbei ist, dass man am Ende zwar einen Stamm erhält, der die gewünschte DNA-Sequenz trägt, bei diesem allerdings auch ein wichtiger Reparaturmechanismus nicht mehr funktionsfähig ist. Dies kann unter Umständen dazu führen, dass nachfolgende Analysen beeinflusst werden und falsche Schlüsse bezüglich des untersuchten Gens gezogen werden. Um das zu umgehen, muss man den neu erzeugten Stamm mit

einem Wildtyp – also einem unveränderten Stamm – kreuzen, um so die mutierten NHEJ-Gene zu entfernen („auszukreuzen“), während die neu eingebrachte Sequenz erhalten bleibt. Das klingt nicht nur mühselig, das ist es auch! Daher wäre ein einfacheres System zur Veränderung des *N. crassa*-Genoms eine wirklich sinnvolle Ergänzung des vorhandenen Methodenkastens. Hier kommt nun also das CRISPR-Cas9-System ins Spiel. Es verspricht einen viel geringeren Arbeitsaufwand und könnte dem Experimentator einiges an Zeit einsparen. Nur leider gibt es bisher noch kein gut funktionierendes CRISPR-Cas9-System für *N. crassa* und das, obwohl dieser doch ein beliebter Modellorganismus ist.

Abgucken erlaubt!

Somit wären wir also bei der Frage angekommen, wie man das CRISPR-Cas9-System für *N. crassa* etablieren kann. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte, die hier näher erläutert werden sollen. Zunächst muss man sich mit der Frage auseinandersetzen, ob es wirklich sinnvoll ist, das System zu etablieren, da es ja bereits Methoden gibt, um *N. crassa* genetisch zu modifizieren. Schließlich ist es mit viel Schweiß und Arbeit verbunden, ein neues System in einem Organismus zum Laufen zu bringen. Im Fall von *N. crassa* lohnt sich der Aufwand aber definitiv. Die Community wartet bereits sehnsüchtig darauf, dass es endlich jemand schafft, das System prak-

ABB. 3 | ENTWICKLUNG DES CRISPR-CAS9-SYSTEMS IN *N. CRASSA*



tikabel im Modellorganismus zu etablieren. Nicht nur würde ein funktionierendes CRISPR-Cas9-System dem Experimentator eine Menge Zeit und Aufwand im Vergleich zur klassischen Methode der homologen Rekombination sparen. Ein weiterer Vorteil wäre die Möglichkeit, mit diesem System mehr als ein Gen zur selben Zeit zu verändern. Dies ist mit der homologen Rekombination nicht so einfach durchzuführen, da hier jedes Gen einzeln und nacheinander ausgeschaltet oder eingekreuzt werden muss. Zudem muss man mit der CRISPR-Cas9-Methode nicht den *N. crassa*-Stamm mit dem defekten NHEJ-System benutzen. Die Verwendung der Cas9-Nuklease in Verbindung mit der entsprechenden guideRNA (gRNA) und Donor-DNA erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es zur homologen Rekombination kommt, nämlich bereits ausreichend.

Bevor man mit der Etablierung des Systems beginnt, sollte man sich mit seinem Wirkprinzip auseinandersetzen: Welche Komponenten benötige ich und wie funktioniert das System? Im Fall des CRISPR-Cas9-Systems werden zwei Hauptkomponenten benötigt: die Nuklease Cas9 zur Erzeugung des Doppelstrangbruchs der DNA und die gRNA, um die Nuklease an die entsprechende Stelle im Genom, an der die Veränderung stattfinden soll, zu rekrutieren. Die Frage dabei ist, wie diese beiden Komponenten in die Zelle hineingelangen können. Und nicht nur das: Damit eine Genomedition stattfinden kann, müssen die Komponenten des CRISPR-Cas9-Systems auch in den Zellkern gelangen und dort funktionsfähig sein. Dabei gibt es einiges zu beachten:

- 1) In welcher Form werden die Komponenten in die Zelle eingebracht?
- 2) Mit welcher Methode werden die Komponenten eingebracht?
- 3) Welche Eigenschaften müssen die Komponenten aufweisen, damit sie auch in der pilzlichen Zelle funktionsfähig sind und an den richtigen Ort gelangen?

Da das CRISPR-Cas9-System bereits in anderen Organismen angewandt wird, muss das Rad zum Glück nicht komplett neu erfunden werden. Man muss lediglich herausfinden, welche der bereits verwendeten Varianten sich auch für *N. crassa* eignen könnten. Hierzu beginnt man mit einer Literaturrecherche. Für den Anfang eignen sich Übersichtsartikel (*Reviews*) sehr gut, da sie einen groben Überblick über den aktuellen Stand der Dinge liefern können. Mit ein bisschen Glück stößt man dabei auf einen Artikel, der beschreibt, welche verschiedenen Methoden bereits bei Schlauchpilzen (Ascomyceten), zu denen ja auch *N. crassa* gehört, angewendet werden. Je näher verwandt die Organismen sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass die beschriebene Methode auch im Versuchsorganismus funktioniert. Da bereits 2015 die ersten CRISPR-Cas9-Anwendungen bei *Trichoderma reesei* und einigen *Aspergillus*-Arten (beide gehören zu den Schlauchpilzen) verwendet wurden [6–7] und viele

weitere folgten, findet man einige Übersichtsartikel zu den verschiedenen Methoden. Aber welche davon passt am besten zu *N. crassa*?

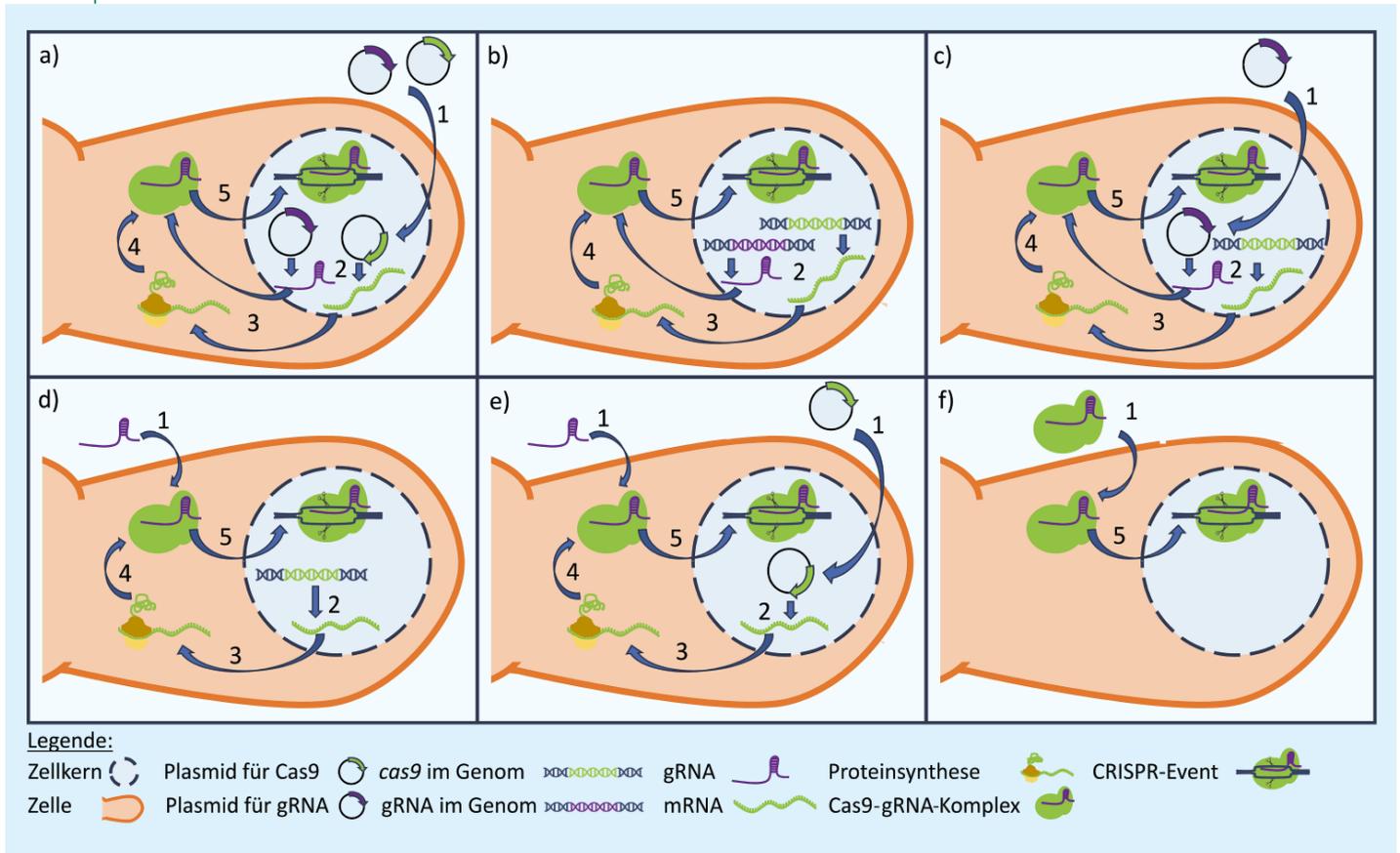
Wer die Wahl hat, hat die Qual

Wie die einzelnen Komponenten – Cas9 und die gRNA – in die Zelle gelangen bzw. von der Zelle synthetisiert werden können, ist in Abbildung 4 zusammengefasst und im Folgenden näher beschrieben: Bei Möglichkeit a) werden sowohl die *cas9*- als auch die gRNA-Sequenz in Form eines Plasmids in die Zellen eingebracht. Das Plasmid dient hier quasi als ein Transportmittel, über das die DNA-Sequenzen in die Zelle gelangen. Innerhalb der Zelle können dann die jeweiligen DNA-Sequenzen abgelesen werden. Auf diese Weise werden die gRNA bzw. das Cas9-Protein von der Zelle selbst gebildet. Die Möglichkeit b) sieht es vor, dass die für Cas9 und für die gRNA kodierenden Sequenzen zunächst direkt in das Genom des Pilzes integriert werden. Danach folgen die gleichen Schritte wie in Fall a): Die Sequenzen werden abgelesen und Cas9 bzw. die gRNA direkt von der Zelle synthetisiert. Im Fall c) handelt es sich um eine Kombination aus a) und b), bei der die Sequenz einer Komponente (entweder Cas9 oder die gRNA) im Genom integriert und die entsprechend andere als Plasmid in die Zelle eingebracht wird. Bei der Variante d) liegt die *cas9*-Sequenz bereits im Genom integriert vor. Die gRNA gelangt hier nicht in Form von DNA, sondern als RNA in die Zelle. Man umgeht damit also die RNA-Synthese durch die Zelle und verwendet stattdessen eine im Labor synthetisierte RNA. Variante e) ist eine leichte Abwandlung von d), bei der die *cas9*-Sequenz nicht ins Genom integriert wird, sondern als Plasmid in die Zelle eingebracht wird. Die gRNA gelangt parallel als RNA in die Zelle. Im Fall f) werden Cas9 und die gRNA als sogenannter Ribonukleoprotein-Komplex (RNP-Komplex) aus synthetisierten Komponenten im Reagenzglas zusammengesetzt und in die Zelle eingebracht. Damit wird bereits der vollständige Cas9-gRNA-Komplex in die Zelle transferiert, so dass die Zelle keine der Komponenten selbst synthetisieren muss.

Alle aufgezählten Varianten haben ihre Vor- und Nachteile, die man nun abwägen muss. Im Falle der Integration der Sequenzen ins Genom – Varianten b–d) – verbleiben diese im Genom und sind somit immer vorhanden. Dies kann zu sogenannten *off-target*-Effekten führen, bei denen es zu unerwünschten Veränderungen im Genom durch die Cas9-Nuklease kommt. Verwendet man hingegen Plasmide – hier die Varianten a), c) und e) – dann gehen diese im Laufe der Zeit verloren. Man spricht deshalb von einer transienten Transformation, mit der man das Risiko der *off-target*-Effekte minimieren kann. Voraussetzung hierfür ist, dass passende Plasmide verwendet werden, die im jeweiligen Organismus abgelesen und repliziert werden.

Bei der Synthese der Komponenten kann es verschiedene Probleme geben. Vor allem die Lokalisierung im

ABB. 4 | EINBRINGEN VON CRISPR-CAS9-KOMPONENTEN IN DIE ZELLE



Das Schema zeigt verschiedene Methoden, um die einzelnen Komponenten, Cas9 und die gRNA, in die Zelle zu bringen bzw. von der Zelle synthetisieren zu lassen. a) Die cas9- und gRNA-Sequenz werden als Plasmide in die Zelle eingebracht. b) Die cas9- und gRNA-Sequenz werden in das Genom des Pilzes integriert. c) Eine Sequenz wird als Plasmid eingebracht, die entsprechend andere ist im Genom integriert. d) Die cas9-Sequenz ist im Genom integriert, die gRNA wird als RNA in die Zelle transferiert. e) Die cas9-Sequenz wird als Plasmid und die gRNA als RNA in die Zelle transferiert. f) Der fertige Cas9-gRNA-Komplex wird direkt in die Zelle eingebracht. 1: Die Komponenten werden in der angegebenen Form in die Zelle transformiert; 2: gRNA und/oder cas9-mRNA werden im Zellkern synthetisiert; 3: Transport der RNAs in das Cytoplasma; 4: Proteinbiosynthese von Cas9 und Komplexbildung mit gRNA; 5: Transfer des Komplexes in den Zellkern.

Zellkern ist hier kritisch. Damit ein Protein in den Zellkern gelangt, benötigt es ein sogenanntes Lokalisierungssignal. Das Cas9-Protein stammt aber aus Bakterien, die keinen Zellkern besitzen. Das entsprechende Gen enthält folglich keine Information für eine Kernlokalisierung. Diese Information muss also nachträglich hinzugefügt werden. Auch hier gibt es wieder verschiedenste Möglichkeiten, die sich von Organismus zu Organismus unterscheiden. So muss man bestimmte Signalsequenzen auswählen und entscheiden, ob man diese am Anfang oder am Ende des Proteins anfügen möchte. Diese Entscheidung kann später einen großen Einfluss auf die Funktionalität von Cas9 innerhalb der Zelle haben.

Neben dem Lokalisationssignal des Proteins muss auch sichergestellt werden, dass der Organismus das Protein problemlos synthetisieren kann. Proteine bestehen aus einer durch die DNA-Sequenz festgelegten Aneinanderreihung von Aminosäuren. Die DNA-Sequenz bestimmt diese Abfolge durch die einzelnen Basen Adenin (A), Cyto-

sin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Jede Aminosäure wird durch drei Basen kodiert – die Aminosäure Glutaminsäure beispielsweise durch die Abfolge GAG. Allerdings können diese Triplets variieren, d. h. mehrere Triplets kodieren für ein und dieselbe Aminosäure (Redundanz beim genetischen Code). Im Fall der Glutaminsäure wären das GAG und GAA. Die Schwierigkeit hierbei ist, dass jeder Organismus seine „Favoriten“ hat, die bevorzugt verwendet werden. Eventuell muss man also die kodierende Proteinsequenz dahingehend verändern, dass diese Favoriten bevorzugt vorliegen.

Probleme bei der Synthese kleiner RNAs – wozu gRNAs zählen – lassen sich umgehen, wenn man die gRNA als RNA und nicht in Form von DNA in die Zelle einbringt wie bei den Varianten d) und e). Allerdings ist es auch nicht ganz trivial, intakte RNA in die Zelle einzubringen und diese über einen gewissen Zeitraum stabil in der Zelle zu behalten. Die optimalste Version stellt die Verwendung von RNP-Komplexen dar (Variante f), weil

hier nichts mehr von der Zelle selbst synthetisiert werden muss und die Verweildauer des Komplexes begrenzt ist. Dies ist aber auch die komplexeste und komplizierteste Methode, da sich der große Komplex nur schwer ohne Funktionsverlust in die Zelle transferieren lässt. Es gibt also viel zu beachten, bevor man sich für eine Methode entscheiden kann.

Die Entscheidung ist gefallen

Hat man sich nach einiger Vorarbeit für eine Methode entschieden, folgt endlich der praktische Teil, in dem getestet wird, ob die ausgewählte Methode funktioniert. Vorsichtshalber sollte man immer einen Backup-Plan parat haben, sich also im Vorfeld Gedanken über Alternativen gemacht haben, falls ein Schritt nicht funktioniert, damit man nicht komplett von vorne anfangen zu muss. Anschließend muss man überlegen, wie sich am besten nachweisen lässt, dass die Methode prinzipiell funktioniert. Hier geht es um den sogenannten *proof of principle* und noch nicht um eine spezifische Anwendung der Methode, bei der ein Gen ausgeschaltet wird, dessen Funktion man näher charakterisieren möchte. Für den *proof of principle* würde sich z. B. anbieten, bei der Auswahl des Zielgens eines zu wählen, auf das man selektieren oder screenen kann. Das bedeutet, man erhält bereits über den Phänotypen einen Anhaltspunkt dafür, ob die Methode erfolgreich war oder nicht, ohne zunächst weitere komplexe Analysen durchzuführen. Dafür eignet sich beispielsweise ein Gen in einem bestimmten Stoffwechselweg, dessen Verlust zu einer Auxotrophie (lebenswichtige Stoffe wie bestimmte Aminosäuren können nicht mehr selbst synthetisiert werden und müssen von außen aufgenommen werden) führt. Eine weitere Möglichkeit wäre es, ein Gen zu verändern, bei dem die Veränderung dazu führt, dass der Pilz unter Bedingungen wachsen kann, unter denen er sonst nicht überlebt. So lässt sich bereits ohne eine Sequenzierung des betroffenen Bereichs die Vermutung aufstellen, dass die Veränderung des Genoms mittels Cas9 erfolgreich war.

Es ist auch sehr wichtig, dass man entsprechende Kontrollen durchführt, mit denen man sicherstellen kann, dass dieser Phänotyp nicht auf andere zufällige Ereignisse zurückzuführen ist. Dafür kann man z. B. einen Pilz verwenden, der ganz genauso behandelt wird wie der, mit dem die CRISPR-Cas9-Technik getestet wird, der aber keine der CRISPR-Komponenten enthält. Je nach gewählter Methode könnten die Kontrollen zusätzlich aus Pilzen bestehen, die jeweils nur eine Komponente des CRISPR-Cas9-Systems enthalten. Sollte man dann die gleichen Effekte wie bei dem Pilz mit vollständigem CRISPR-Cas9-System beobachten, kann ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen im Genom des Pilzes tatsächlich auf die CRISPR-Anwendung zurückzuführen sind. Stellt sich aber heraus, dass die Kontrollen keine Veränderungen aufweisen, der Pilz mit CRISPR-Cas9

allerdings schon, dann kann man davon ausgehen, dass das System funktionsfähig ist. In diesem Fall kann die Methode dann endlich dafür eingesetzt werden, Gene von Interesse zu untersuchen, um neue Forschungsfragen zu beantworten.

Lohnt sich die Mühe?

Wie das in der Wissenschaft eben ist, dürfen wir noch nicht verraten, welche Methode uns den Erfolg brachte. Denn das Manuskript für unsere Publikation ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ganz fertig. Soviel sei aber verraten: Ja, die Mühe lohnt sich!

Zusammenfassung

Neurospora crassa ist ein bedeutender Modellorganismus für die Genetik, Molekularbiologie und weitere Forschungsgebiete. Um neue Erkenntnisse in diesen Gebieten zu gewinnen, wird oft das Prinzip der reversen Genetik verwendet, wobei z. B. Gene ausgeschaltet werden, um deren Funktion zu analysieren. Für N. crassa nutzt man hierfür die homologe Rekombination als gängige Methode. Diese ist jedoch aufwendig und ineffizient. Das CRISPR-Cas9-System stellt eine effizientere Alternative dar, steht für N. crassa aber noch nicht zur Verfügung. Die Etablierung erfordert viel Vorarbeit, Literaturrecherche und viele Abwägungen. Aspekte, die für eine erfolgreiche Etablierung des Systems in N. crassa berücksichtigt werden müssen, sind die Auswahl der Methode, um die CRISPR-Cas9-Komponenten in die Zelle einzubringen, die Optimierung der Genexpression von cas9 bzw. der gRNA sowie die Minimierung von Nebeneffekten. Nach der Auswahl und Optimierung der Methode muss die Funktionalität des Systems durch Tests und geeignete Kontrollen bestätigt werden, bevor es dann für spezifische Analysen eingesetzt wird.

Summary

Thoughts on establishing the CRISPR-Cas9 system in Neurospora crassa

Neurospora crassa is a significant model organism for genetics, molecular biology, and other research areas. To gain new insights in these fields, the principle of reverse genetics is often used, i. e. switching off genes in order to analyze their function. Regarding N. crassa, homologous recombination is commonly used for this purpose, but it is time-consuming and inefficient. The CRISPR-Cas9 system offers a more efficient alternative, but it is not yet available for N. crassa. Establishing this system requires extensive preparatory work, literature research, and careful considerations. Factors to be considered for a successful implementation of the system in N. crassa include selecting the method to introduce the CRISPR-Cas9 components into the cell, optimizing the expression of cas9 and gRNA, and minimizing side effects. After having selected and optimized the method, the functionality of the system must be confirmed through tests and appropriate controls before it can be used for more specific analyses.

Literatur

- [1] K. A. Borkovich et al. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 1.
- [2] C. M. Roche et al. (2014). *Neurospora crassa*: Looking back and looking forward at a model microbe. *American Journal of Botany* 101, 2022–2035.
- [3] R. Aramayo, E. U. Selker (2013). *Neurospora crassa* a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, 17921–17922.
- [4] S. Wang et al. (2017). Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 8063–8075.
- [5] Y. Ninomiya et al. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 33, 12248–12253.
- [6] R. Liu et al. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR-Cas9 system. *Cell Discov* 1, 15007.
- [7] C.S. Nødvig et al. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* 10, 7.

Verfasst von:



Stefanie Grüttner ist seit 2022 Postdoktorandin in der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel. Sie hat an der CAU Biologie studiert und promoviert. Während der Promotion hat sie sich mit den Regulierungsmechanismen der Genexpression pflanzlicher Mitochondrien beschäftigt – im Genaueren mit der Translationsregulierung durch Pentatricopeptide-Repeat-Proteine (PPR-Proteine). Für die Postdoktorandenzeit hat sich ihr Forschungsinteresse auf die Molekularbiologie des Ascomyceten *Neurospora crassa* verschoben. Sie fokussiert sich auf die Entwicklung und Optimierung eines CRISPR-Cas9-Systems in *N. crassa* und die Anwendung dieses Systems in Bezug auf die Beantwortung neuer Forschungsfragen.

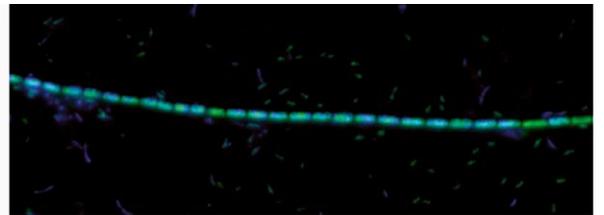


Korrespondenz

Dr. Stefanie Grüttner
Botanisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Abt. Botanische Genetik und Molekularbiologie
Am Botanischen Garten 1–9
24118 Kiel
E-Mail: sgruettner@bot.uni-kiel.de

MIKROBE DES
JAHRES 2024

Kabelbakterium
Electronema



- lebende Stromleiter
- Zellketten mit Arbeitsteilung
- Ökosystem-Ingenieur im Sediment
- Bio-Kabel statt Elektroschrott?



<http://mikrobe-des-jahres.de>



Glossar

(Stand: 2.7. 2024)

Dieses Glossar bezieht sich auf das Biuz-Sonderheft zu CRISPR-Cas (Link einfügen). Dafür sind zum Verständnis auch Begriffe aus anderen Gebieten der Biologie erforderlich und sie sind hier teilweise erklärt. Mit Einschränkungen ist das Glossar deshalb auch für andere Themen der Biologie nutzbar.

Einige Schlagwörter beziehen sich speziell auf die CRISPR-Thematik und können in anderen Zusammenhängen eine andere/weitere Bedeutung haben.

Das Glossar erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Erklärungen sind meistens vereinfacht, um sie für Nicht-Experten verständlich zu machen. Fehler können wir, trotz aller Bemühungen, nicht ausschließen. Wir nehmen aber gerne Hinweise an (info@biowisskomm.de) und werden die in einem späteren Update ggf. berücksichtigen.

Das Glossar wird gleichzeitig auf der Webseite www.biowisskomm.de veröffentlicht (genauer Link folgt). Dort werden wir uns, im Rahmen unserer Kapazitäten, bemühen, es zu erweitern und zu aktualisieren. Aus technischen Gründen ist eine Aktualisierung auf www.biuz.de leider nicht möglich.

Adaptation: Der Vorgang, aus einer Virus-DNA kurze Stücke auszuschneiden und in den
-> **CRISPR-Array** einzubauen. Dafür sind
-> **Cas-Proteine** erforderlich, die ein eindringendes Virus erkennen und passende Stücke neben einer -> **PAM-Sequenz** ausschneiden. Häufige Adaptations-Proteine sind Cas 1 und Cas 2.

Akquisition: ähnlich der Adaptation, dabei bezeichnet der Ausdruck genauer, dass der CRISPR-Array einen neuen Spacer hinzugewinnt.

Aptamer: Meist eine synthetische RNA, die durch ihre Sekundärstruktur (Faltung) spezifisch an Proteine oder andere Moleküle (Liganden) binden kann. In Kombination mit anderen RNA-Sequenzen (z.B. crRNAs) können z.B. Aptamere, die an GFP binden, genutzt werden, um spezifische RNAs in vivo zu markieren. Natürliche Aptamere dienen u.a. als molekulare Schalter: nach der Bindung an den Liganden verändern sie ihre Sekundärstruktur und blockieren oder erleichtern die Translation einer mRNA, der sie vorgeschaltet sind.

Archaea / Archaeen: Eine Domäne des Lebens, die viele Mikroorganismen beinhaltet, die sich häufig durch sehr spezielle Lebensweisen und ausgefallene Habitate auszeichnen wie zum Beispiel die Methanogenen oder die Extremophilen. Neben verschiedenen Alleinstellungsmerkmalen wie beispielsweise eines speziellen Zellwandaufbaus, vereinen Archaeen häufig verschiedene Eigenschaften von Bakterien und Eukaryoten miteinander und gelten daher als evolutionär ursprüngliche Gruppe.

Bisher wurden die Archaea als eine von drei Domänen betrachtet, in die alle zellulären Lebewesen eingeteilt werden (Bakterien, Archaea, Eukaryota). Heute geht man von zwei Domänen aus, wobei die Eukaryoten als Abkömmlinge der Archaea gesehen werden. Archaea und Bakterien sind Prokaryoten, das heißt, sie verfügen über keinen Zellkern, ihre Erbinformation liegt ohne eine Kernmembran im Cytoplasma vor. Früher wurden Archaea auch „Archaeobakterien“ genannt, weil sie zunächst, wie Bakterien aussehen. Erst die Sequenzierung ihrer ribosomalen DNA und später dann ganzer Genome zeigte, dass sie einem völlig neuen Reich der Organismen angehören und viele Ähnlichkeiten mit den Eukaryoten, den

weiterentwickelten Lebewesen mit einem Zellkern haben. Nach den neuesten Erkenntnissen haben sich die Eukaryoten aus einer archaealen Zelle entwickelt. Unter den Archaea befinden sich viele Organismen, die unter extremen Umweltbedingungen leben: in Salz-, Alkali und Säureseen und bei Temperaturen über 80°C. Aber auch in normalen Habitaten stellen sie einen großen Anteil der Biomasse dar, d.h. es gibt auch viele „mesophile“ Archaeen. Sie sind auch Teil des menschlichen Mikrobioms, pathogene Archaeen sind jedoch bisher nicht gefunden worden, es ist also die freundlichste Domäne! Viele Archaea sind nicht nur für die Grundlagenforschung interessant. Sie produzieren auch Enzyme, die z. B. in Waschmitteln angewendet werden, um bei niedrigen Temperaturen Fett- und Eiweißflecken aufzulösen oder bei anderen technischen Prozessen bei hohen Temperaturen zu arbeiten.

Bakteriophagen: -> Phagen

Base-Editors: Bei der Genom-Editierung mit CRISPR-Cas9, wird ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB = double strand break) induziert. Ein solcher DSB wird von der zelleigenen Machinerie entweder durch den fehleranfälligen Prozess der nichthomologen Endverbindung (NHEJ = non-homologous end joining) oder aber homologer Rekombination (HDR = homology directed repair) repariert. Dennoch sind DSB gefährlich für eine Zelle: die offenen Enden der DNA an der Bruchstelle können zu großen Deletionen führen oder sogar falsch zusammengebaut werden, wenn beispielsweise gleichzeitig ein Bruch an einer anderen Stelle passiert ist. 2016 hat die US-amerikanische Forschergruppe um David Liu (Video) an der Harvard Universität eine CRISPR-Cas-basierte Methode entwickelt, die ohne Doppelstrangbrüche auskommt und darüber hinaus in der Lage ist, punktuell einzelne Basen an beliebiger Position im Genom einer lebenden Zelle auszutauschen. Das heißt, dass man eine Punktmutation gezielt reparieren kann, ohne die DNA zu schneiden. Diese Methode ist seitdem unter dem Begriff „Base Editing“ bekannt und wurde bereits erfolgreich angewendet.

Die vielen verschiedenen Varianten dieser Technik lassen sich einer von zwei Klassen zuordnen: den Cytosin Base Editors (CBEs), die die Umwandlung

eines C•G Basenpaars zu einem T•A Basenpaar katalysieren, und den Adenin Base Editors (ABEs), die ein A•T Basenpaar zu G•C Basenpaar konvertieren.

Das grundlegende Prinzip besteht darin, dass eine katalytisch inaktive Cas9-Nuklease (nCas9 oder dCas9) mit einer Deaminase fusioniert wird. Die Entfernung einer NH₃ Gruppe (Deaminierung) macht aus einem Cytidin ein Uracil, das von der Zelle wie ein Thymidin erkannt wird. Das C•G Basenpaar wird letztlich zu einem T•A Basenpaar umgeschrieben. Während die Cytidin-Deaminase natürlicherweise vorkommt, musste im Fall der ABEs die Adenosin-Deaminase (z.B. TadA) erst künstlich hergestellt werden. Mit guten Kenntnissen zur Struktur und Funktion ähnlicher Enzyme kann man deren katalytische Aktivität tatsächlich gezielt verändern. Die Adenosin-Deaminase macht aus einem Adenosin ein Inosin, das von der Zelle wie ein Guanosin erkannt wird. Das A•T Basenpaar wird letztlich in ein G•C Basenpaar umgeschrieben.

dCas9 in den Base Editors verursacht keinen DSB, weil die Schneideaktivität ausgeschaltet wurde. Mithilfe der Leit-RNA wird aber die gewünschte Stelle im Genom gefunden. Die per „Huckepack“ mitgeführte Deaminase wandelt das entsprechende Adenosin in ein Guanosin um bzw. das Cytosin in ein Thymidin. Der gegenüberliegende, nicht editierte Strang wird von der Zelle als fehlgepaart erkannt und entsprechend verändert., sodass wieder ein korrektes Basenpaar entsteht.

Bei genetischen Erkrankungen des Menschen ist die Entwicklung der Base Editors ein weiterer Durchbruch. Sehr viele solcher Mutationen sind Punktmutationen einzelner Nukleotide. Base-Editors können nicht bei allen dieser Mutationen eingesetzt werden, theoretisch könnte man aber ca. 60% erfassen.

Biofilm: Populationen von verschiedenen Mikroorganismen bilden auf Oberflächen bei der Besiedelung oft einen Biofilm. Aus Wasser und von den Organismen abgesonderten Substanzen bildet sich ein schleimiges Gel, das mehrere Funktionen hat: Die Bakterien bleiben an einem Ort und werden nicht fortgespült. Der Film schützt vor Einflüssen der Umgebung und dient zudem als

Kommunikationsmedium für Signale innerhalb der Population.

Wir betrachten Prokaryoten meist als einzelne Zellen, die unabhängig voneinander im Wasser oder im Boden leben. Unter bestimmten Umständen entwickeln Bakterien jedoch ein „soziales Leben“. Sie können sich mit Hilfe von Pili an Oberflächen festsetzen und bilden dann z. B. den Zahnbelag, ein Biofilm auf den Zähnen oder auch auf Steinen und Mauerwerk. Biofilme bestehen oft aus verschiedenen Bakterienarten, die gemeinsam eine Population bilden und die ganz anderen Eigenschaften als die frei lebenden Einzelorganismen zeigen. Gemeinsam produzieren sie eine „extrazelluläre Matrix“ aus Zuckermolekülen (Polysaccharide), in die auch noch Mineralien und andere organische Materialien eingebaut werden können. Daraus entsteht eine Schutzschicht, die es sehr schwer macht, Biofilme (z. B. an chirurgischen Instrumenten) zu beseitigen. Auch für Antibiotika ist der Biofilm kaum durchdringbar und die Zellen sind dadurch weitgehend resistent.

Eine große Rolle bei der Biofilm-Bildung spielt das „Quorum sensing“. Bakterien kommunizieren miteinander über chemische Signale, sie können damit die Dichte ihrer Population messen, induzieren die Produktion der extrazellulären Matrix und können freischwimmende Bakterien anlocken, sich der Gemeinschaft im Biofilm anzuschließen.

Cascade -Komplex: Im Gegensatz zu Klasse 2 CRISPR-Cas Systemen besteht der Effektor-Komplex der Typ I Systeme aus mehreren verschiedenen Cas Proteinen, in die die crRNA eingebettet wird. Die Art und Anzahl der im Komplex enthaltenen Cas Proteine ist Subtyp-spezifisch. Cascade-Komplexe können sowohl mit einer Nuklease-Aktivität die Ziel-DNA zerschneiden, in manchen Fällen blockieren sie aber nur den Zugang für andere Enzyme und verhindern z.B. die Transkription. Dies wird als CRISPR-Interferenz -> **CRISPRi** bezeichnet. Funktionen wie die Erkennung der Zielsequenz und das Zerschneiden der Zielsequenz liegen i.d.R. auf verschiedenen Proteinen des Cascade-Komplexes, während sie in Klasse 2 Systemen in einem Protein (wie z.B. Cas9) vereinigt sind.

Cas9: Das bekannteste Cas Protein, das vielfach für gentechnische Anwendungen verwendet wird. Cas9 gehört zu einem Typ II CRISPR-Cas System, bei denen der Effektor-Komplex nur ein Protein enthält. Cas9 ist eine DNase, die mit zwei Nukleaseaktivitäten in einem Molekül (RuvC und HNH) einen Doppelstrangbruch in der DNA setzt. Cas9 bindet eine crRNA und eine -> **tracrRNA**, die das Protein an eine spezifische Sequenz leiten. Bei vielen Anwendungen und auch in der Grundlagenforschung werden crRNA und tracrRNA synthetisch zu einem Molekül, der sgRNA (single guide RNA) verbunden – das vereinfacht die Sache. Struktur und Funktion von Cas9 sind sehr genau bekannt und können gentechnisch verändert werden. Daraus entstanden (und entstehen) neue Werkzeuge für die Gentechnik wie z.B. die „Nickase“ die nur einen DNA-Strang schneidet und das inaktive -> **dCas9**, mit dem verschiedenste angekoppelte Proteine an spezifische Sequenzen gebracht werden können.

Cas-Gene: “CRISPR-associated genes”, Gene, die für Proteine codieren, die der Funktion des Systems dienen. Sie liegen i.d.R. in der Nachbarschaft der CRISPR-Arrays. Zu den Cas-Genen gehört z.B. das bekannte Cas9, das mit Hilfe einer crRNA eine Ziel-DNA erkennt und schneidet. Weiterhin sind es Gene, die für das Ausschneiden eines -> **Protospacers** aus der DNA eines Angreifers zuständig sind und Gene, die dieses DNA-Stück in den CRISPR-Array einbauen. Verschiedene CRISPR-Systeme können weitere Gene mit speziellen Funktionen enthalten.

Casposon: Vergleichsweise seltenes DNA-Transposon, das in einigen Bakterien und Archaeen gefunden wurde und als Besonderheit anstelle von Integrasen oder -> **Transposasen** Cas1-Proteine kodiert.

Centromer: „Mittelstück“ eines eukaryotischen Chromosoms (das aber nicht unbedingt in der Mitte liegen muss!). Centromere sind kompakte DNA-Strukturen, die in speziellen Centromer-Proteinen verpackt sind. An den Centromeren setzen die Spindelfasern an, die bei der Zellteilung die Chromosomen korrekt auf die beiden Tochterzellen verteilen.

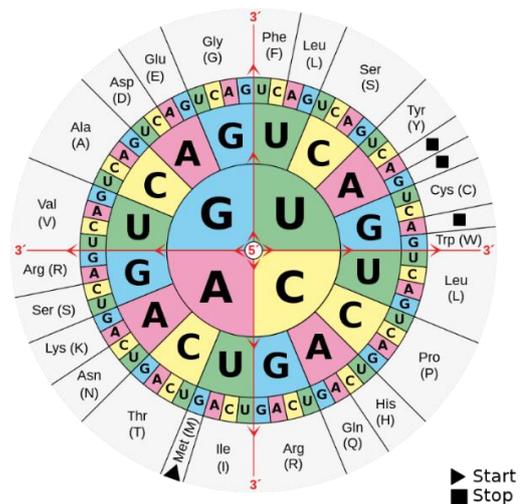
Chromatin: In **-> Eukaryoten** liegt die DNA eng in Proteine verpackt im Zellkern vor. Die wesentlichen Chromatinproteine sind die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 von denen es wiederum verschiedene Varianten gibt. H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen scheibenförmigen Komplex, um den die DNA aufgewickelt ist (Nukleosom). H1 sitzt als Linker-Histon zwischen den Nukleosomen. Die DNA ist durch die Verpackung vor äußeren Einflüssen geschützt. Das Chromatin hat jedoch noch weitere Aufgaben und ist an der Regulation der Gene beteiligt. Enzyme, die Teil des Chromatins bilden, können Nukleosomen verschieben oder auflösen (Chromatin-Remodeller), andere Proteine dienen als Transkriptionsfaktoren mit denen Gene aktiviert oder inhibiert werden. Weiterhin wird die DNA ständig von Reparaturenzymen „patroulliert“, die Brüche oder Mutationen reparieren. In **-> Prokaryoten** ist die DNA ebenfalls verpackt, jedoch nicht mit den komplexen Nukleosomen.

CID: chromogene in-situ Detektion. Eine Methode, bei der ein Enzym (z.B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase) an eine Sonde gekoppelt wird. Die Sonde kann u.a. Cas9 oder eine sgRNA sein. Nach der Bindung der Sonde wird ein Substrat zugegeben, das von dem Enzym in eine farbige Substanz umgesetzt wird. Diese Umsetzung passiert an Stellen, an denen die Sonde gebunden hat. In mikroskopischen Präparaten kann so gezeigt werden, wo im Zellkern die Telomere lokalisiert sind. Für CID muss ein Präparat fixiert werden, d.h. die Zellen sind tot und zeigen keine Dynamik mehr an.

Codon: In einem Gen (nach der Transcription in einer mRNA) bilden jeweils drei Nukleotide ein Codon, das von einer spezifische **->tRNA** erkannt und bei der **->Translation** in eine spezifische Aminosäure übersetzt wird. Aus den vier verschiedenen Nukleotiden sind 64 verschiedene 3er-Codons möglich. Davon codieren 61 für eine Aminosäure und drei signalisieren den Abbruch der Translation (Stopp Codons). Mit einer „Codon-Sonne“ oder Codon-Tabelle kann eine DNA oder RNA manuell in eine Aminosäuresequenz „übersetzt“ werden.

Beachte: wird die Zahl der Nukleotide in einem Gen durch eine Mutation (Deletion oder Insertion) um eins

oder zwei verändert, ändert sich der Leserahmen. Hinter der Mutation sind alle Codons „falsch“! Eine solche „Leserahmen-Mutation“ (frameshift mutation) führt meistens dazu, dass das codierte Protein vollständig ausfällt.



Quelle: Wikipedia

CRISPR: „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“, eine Ansammlung von kurzen, palindromischen Sequenzen, die regelmäßig durch andere, „unique“ (d.h. einmalige, nicht wiederholte Sequenzen) unterbrochen werden. Diese „unique Sequenzen“ werden als Spacer bezeichnet. Die Spacer stammen aus der DNA früherer Angreifer (z.B. **->Phagen**) und stellen das „Adress-Label“ für die Abwehr dar. CRISPR oder auch **-> CRISPR-Array** ist eine der zwei Hauptkomponenten der CRISPR-Cas Systeme, der CRISPR Locus ist das genetische Element, das den Promotor und die Sequenzinformation für die Transkription der (prä)crRNAs enthält.

CRISPR-Array: Abschnitt im Genom (oder auch auf Plasmiden) von Bakterien und Archaea der aus Spacern und Repeats besteht. Spacer sind Sequenzstücke, die aus Viren stammen und als molekulares Gedächtnis dienen. Repeats sind immer gleiche Sequenzen zwischen den Spacern. Sie dienen u.a. der Bindung der RNA an Cas-Proteine. CRISPR-Arrays werden von einem Promotor meist als lange RNA transkribiert und dann zu kleinen Stücken (bestehend aus einem Spacer

und Teilen des davor und danach liegenden Repeats) prozessiert.

CRISPR-Cas-Systeme: Die Immunsysteme aus Bakterien und Archaeen sind sehr vielfältig. Obwohl ähnlich, unterscheiden sie sich in ihren Funktionen und ihrem Aufbau. Sie werden in zwei Klassen mit jeweils mehreren Typen und Subtypen eingeteilt. Klasse 1 enthält Systeme, in denen vor allem die Bindung der crRNA, die Zielerkennung und das Schneiden der DNA von verschiedenen Proteinen in einem großen Komplex bewerkstelligt wird. In der Klasse 2 sind hingegen viele Funktionen in einem relativ kleinen Protein (wie z.B. Cas9) vereinigt. Innerhalb der Klasse 2 gibt es auch Enzyme wie Cas13, die statt DNA RNA schneiden können (Abb. S. unten).

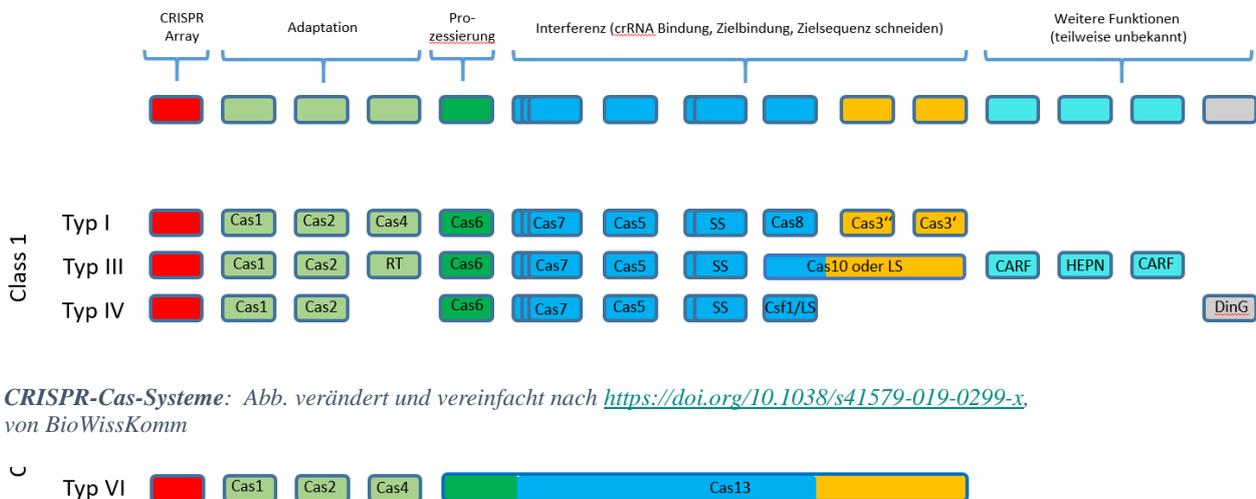
CRISPRi: = CRISPR Interferenz bezeichnet einen Mechanismus, bei dem ein Cas Protein nicht an der Zielsequenz schneidet, sondern alleine durch seine Bindung an die DNA den Zugang anderer Proteine verhindert. So kann z.B. die Transcription einer RNA blockiert werden, weil die RNA-Polymerase nicht an die DNA binden kann. CRISPRi verändert nicht die DNA-Sequenz und ist reversibel. Wenn die Bindung an die DNA aufgehoben wird, funktioniert ein Gen wieder wie zuvor.

CRISPRi kommt natürlich in CRISPR-Cas Systemen vor, die keine Nukleaseaktivität haben, es kann aber auch konstruiert werden, indem die Nukleaseaktivität

eine Cas-Proteins gezielt mutiert wird. Das bekannteste Beispiel dafür ist -> dCas9 bei dem beide Nukleaseaktivitäten im Cas9 Protein ausgeschaltet wurden.

CRISPR-Locus: Ein oder mehrere Orte im Genom oder auf Plasmiden, an denen sich CRISPR-Arrays und Cas-Gene befinden. Meist liegen die Cas-Gene vor dem CRISPR-Array, aber es gibt viele Variationen. Manche CRISPR-Loci enthalten keine Cas-Gene, andere keine CRISPR-Arrays, manchmal sind Cas-Gene an anderen Stellen des Genoms zu finden und manchmal ist die Reihe der Cas-Gene durch andere Gene unterbrochen, die anscheinend keine Funktion im CRISPR-Mechanismus haben (oder man hat diese Funktion noch nicht entdeckt). Einige CRISPR-Loci können miteinander interagieren. So können, unter bestimmten Bedingungen, Cas-Gene eines Locus die crRNAs eines anderen Locus verwenden oder Cas-Gene eines Locus können die Adaptation (das Einfügen neuer Spacer) an einem anderen Locus übernehmen.

Chromatin: Die DNA in einer Zelle liegt nicht nackt vor, sondern ist als Chromatin stark kondensiert und verpackt. In Eukaryoten besteht das Chromatin (neben der DNA) hauptsächlich aus Histon-Proteinen, aber auch aus vielen weiteren Proteinen, die zur Regulation der Transcription beitragen. Durch Modifikation der Histon-Proteine (z.B. das Anhängen von Phosphat-, Methyl-, Acetyl- und anderen chemischen Gruppen)



CRISPR-Cas-Systeme: Abb. verändert und vereinfacht nach <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>, von BioWissKomm

wird die Zugänglichkeit der DNA für die Transcriptionsmaschinerie reguliert. Diese Regulationsmechanismen zählen zur Epigenetik, weil sie Einfluss auf die Genetik nehmen, aber nicht in der DNA-Sequenz manifestiert sind. Mit Hilfe von CRISPR-Cas (-> dCas9) können Histon-modifizierende Enzyme an definierte Stellen des Chromatins gebracht werden und so die Genexpression verändern, ohne den genetischen Code zu verändern.

crRNA: eine kleine RNA die aus dem langen Transcript des -> CRISPR-Array herausgeschnitten wird und als „Adressaufkleber“ für eine Cas-Nuklease dient. Die crRNA besteht aus einem Spacer und einem Teil eines Repeats, der für die Bindung an das Cas-Protein erforderlich ist. Der Begriff -> gRNA (guide RNA) hat eine ähnliche Bedeutung. Die -> sgRNA (single guide RNA) hat die gleiche Funktion, sie ist nur synthetisch aus zwei verschiedenen RNA-Molekülen zusammengesetzt, weil in Klasse 2 Systemen Sequenzerkennung und Bindung an eine Cas-Nuclease auf separaten RNAs vorliegen.

dCas9: Das Cas9-Protein besteht aus mehreren Domänen, also Abschnitten in der Aminosäure-Kette, die einzelne Funktionen ausführen. RuvC und HNH sind die zwei Domänen in Cas9, die unabhängig voneinander die beiden Stränge der Ziel-DNA schneiden, sie werden daher als Nuklease-Domänen bezeichnet. Man kennt den Mechanismus der Schneideaktivität sehr gut und kann deshalb sagen, dass in der RuvC-Domäne die Aminosäure D10 (Asparaginsäure in Position 10) essentiell für das Schneiden ist. Tauscht man sie gegen die Aminosäure Alanin aus, kann RuvC nicht mehr schneiden. Der Austausch wird als D10A bezeichnet. Die Funktion aller anderen Domänen bleibt erhalten. Das modifizierte Cas9-Protein kann deshalb nach wie vor eine Zielsequenz erkennen, dort aber nur einen der beiden DNA-Stränge schneiden, also „einen Nick“ setzen. Man bezeichnet diese Mutante deshalb als „nCas9“ oder „Nickase“. Die Nickase wird für verschiedene Anwendungen eingesetzt, z.B. beim „Base-Editing“ oder „Prime-Editing“ und wird verwendet, um versetzte DNA-Schnitte zu erzeugen, die eine präzisere Editierung erlauben. Ähnlich wie bei der RuvC-Domäne, kann in der HNH-

Domäne die Aminosäure H810 (Histidin in Position 810) gegen ein Alanin ausgetauscht werden (H810A), um die Schneideaktivität von HNH zu zerstören. Damit wäre eine andere Nickase erzeugt.

Werden beide Nuklease-Domänen (RuvC und HNH) mutiert, so entsteht ein Cas9-Protein, das keine Schneideaktivität mehr hat und als „dCas9“ oder „dead Cas9“ bezeichnet wird. Weil alle anderen Funktionen erhalten bleiben, kann dCas9 nach wie vor an spezifische Stellen der DNA geleitet werden. Durch die bloße Bindung an die DNA kann für andere Proteine (z.B. Aktivatoren der Genexpression) der Zugang blockiert werden.

Außerdem können andere Proteine an dCas9 gekoppelt werden und z.B. epigenetischer Veränderungen im Genom bewirken, ohne die Basensequenz der DNA zu verändern.

<https://www.youtube.com/watch?v=AZn3Nj1vq1c>

DNA-Sequenzierung: Die DNA-Sequenzierung, d.h. das Lesen der genetischen Information, ist seit 1977 möglich. Anfangs war die Technologie aufwändig, teuer und langwierig: Ein Wissenschaftler brauchte etwa 1 Jahr, um 1.000 Basen eines DNA-Moleküls zu lesen. Die Technologie entwickelte sich aber sehr schnell: Heute ist es kein Problem mehr, ein menschliches Genom mit rund 3 Milliarden Basen an einem Tag zu sequenzieren. Das aktuelle Problem ist eher, diese Datenflut zu verarbeiten, auszuwerten und in für jeden zugänglich in öffentlichen Datenbanken zu hinterlegen.

Die Kosten für die Sequenzierung sind gewaltig gesunken: kostete die erste Sequenzierung des menschlichen Genoms noch ca. 3,5 Mrd. Euro, so ist das heute für unter 1.000€ machbar. Damit sind aber auch die Ansprüche an die Forschung gestiegen. Heute werden hunderte von menschlichen Genomen sequenziert um seltene Krankheiten zu diagnostizieren und Medikamente zu entwickeln. Die Kenntnis von Pflanzengenomen ist vor allem für die Landwirtschaft von Bedeutung. Die Genome fast aller relevanten Nutzpflanzen sind heute sequenziert, teilweise mit verschiedenen Unterarten. Tiere, Pflanzen, Pilze und -> Prokaryoten werden auch sequenziert, um Biodiversität und ihre Veränderungen zu erforschen, aber auch um technische Anwendungen zu erkunden.

In der Sequenzieretechnik gab es große Durchbrüche: die

ersten manuellen Sequenzierungen beruhen auf chemischen Reaktionen der verschiedenen Nukleotide, dann gab es enzymatische Reaktionen, bei denen eine DNA-Kette Nukleotid um Nukleotid verlängert und so lesbar wurde. Diese Methode wurde automatisiert und führte zur „Hochdurchsatz-Sequenzierung“ bei der viele Proben parallel und maschinell analysiert wurden. Manche der heutigen Sequenziergeräte haben die Größe eines USB-Sticks und sequenzieren, indem ein einzelner DNA-Strang mechanisch durch eine Nanopore gezogen wird. Die Daten werden in Echtzeit auf die Speicherplatte eines Computers übertragen (<https://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierung>). Viele Hersteller von Sequenziergeräten bieten anschauliche Grafiken und Filme im Netz an (z.B. <https://nanoporetech.com/how-it-works>).

Doppelstrangbruch: DNA besteht aus einem Doppelstrang (Doppelhelix). Durch Strahlung, Chemikalien und andere Umwelteinflüsse passieren ständig „Unfälle“, bei denen einer oder beide Stränge zerbrechen. Wenn nur ein Strang gebrochen wird (Einzelstrangbruch), kann das leicht durch eine **Ligase** repariert werden. Brechen jedoch beide Stränge an ungefähr derselben Stelle, gibt es ungeschützte offenen Enden an denen DNA abbauende Enzyme ansetzen. Eine ganze Gruppe von Reparaturenzymen patrolliert ständig die DNA nach solchen Brüchen und repariert sie. Die Reparatur ist jedoch nicht perfekt. Es entstehen Fehler, die als Mutationen starke Auswirkungen auf den Organismus haben können (aber nicht müssen!). Siehe auch Reparaturmechanismen **NHEJ** und **HDR**.

DPANN Archaeen: Akronym für die ersten benannten Archaeen dieses Superphylums: Diapherotrites, Parvarchaea, Aenigmarchaea, Nanoarchaea und Nanohaloarchaea. Sie gehören zu den am wenigsten untersuchten Organismen und leben meist unter extremen Bedingungen, manche in der Tiefe der Erde unter hohem Druck, ohne Sauerstoff und vor allem mit CO₂ als Kohlenstoffquelle. Die meisten DPANN Archaeen sind bisher **unkultivierbar**, d.h. sie können im Labor nicht in einer Reinkultur vermehrt werden. Oft kennt man nur ihre DNA Sequenz aus **Metagenomen**.

Effektorkomplex: Darunter versteht man den Komplex aus einem (Klasse 2 Systeme) oder mehreren (Klasse 1 Systeme) Proteinen und einer crRNA (in einigen Fällen zusätzlich einer tracrRNA). Dieser Komplex scannt die DNA (in manchen Fällen auch die RNA) einer Zelle und zerschneidet/zerstört die Nukleinsäure, wenn eine Homologie zur crRNA gefunden wird. Einige Effektorkomplexe haben die Fähigkeit zum Schneiden verloren, binden aber noch an die DNA. Sie können so z.B. die Transkription viraler Gene verhindern, ohne die Nukleinsäure direkt zu zerstören.

Bei Klasse 1 Systemen wird der Effektorkomplex als **Cascade-Komplex** bezeichnet. Wir in Klasse 1 Systemen das Nukleaseprotein entfernt oder in Klasse 2 Systemen die Nukleaseaktivität mutiert, bleibt vom Effektorkomplex nur noch das **Targeting Module**, das die spezifische Sequenz erkennt und bindet.

Endogene Gene: „von innen kommend“. In diesem Zusammenhang Gene, die im eigenen Genom bzw. der eigenen Spezies codiert sind. Weil Gene innerhalb einer Art verschiedene Varianten haben können, versteht man darunter auch Genvarianten, die aus einem anderen Individuum derselben Art stammen können. Bei Pflanzen und Tieren können z.B. in einer Wildform einzelne Gene aktiv sei, die in einer Zuchtform nicht mehr aktiv oder verändert vorliegen. Beide Varianten werden als endogene Gene bezeichnet.

Epigenetik: Ein komplexes Gebiet der Genetik, das eine Regulation von Genen beschreibt, die nicht auf einer Veränderung der DNA Sequenz beruht. Man unterscheidet verschiedene Aktionsebenen der Epigenetik, die jedoch auch voneinander abhängig sind. Bei der DNA-Methylierung werden vor allem Cytosinbasen mit einem Methylrest versehen. Das hat Auswirkungen auf die Verpackung der DNA und die Zugänglichkeit für Enzyme wie z.B. RNA-Polymerasen. Histone sind das Verpackungsmaterial der DNA in Eukaryoten und bilden die Nukleosomen. Das sind globuläre Proteinkomplexe, um die die DNA aufgewickelt ist. Nukleosomen bestimmen die Dichte der Verpackung und damit die Zugänglichkeit der DNA für die Genaktivierung. Histone können enzymatisch vielfältig modifiziert werden (z.B. durch Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung und andere Seitengruppen) und damit sehr spezifische funktionelle

Veränderungen im Chromatin bewirken.

Eine weitere Gruppe epigenetischer Akteure sind Chromatin-Modifizierer, die Nukleosomen verschieben, ablösen oder einfügen können.

Kleine regulatorische RNAs spielen ebenfalls eine Rolle in der Epigenetik. Small interfering RNAs (siRNAs), Micro-RNAs (miRNAs) und andere können Gene auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene regulieren.

Eukaryot: Organismus der aus einer oder vielen Zellen mit einem Zellkern besteht. Im Gegensatz zu -> Prokaryoten ist die Erbinformation zusätzlich durch die Membran des Zellkerns geschützt. Zellkern und Cytoplasma sind zwei getrennte Kompartimente, die durch einen regulierten Transport durch die Kernmembran verbunden sind. So müssen z.B. mRNAs, die im Zellkern transkribiert werden, aktiv in das Cytoplasma transportiert werden, um sie dort in Protein zu übersetzen (-> Translation). Andererseits müssen Proteine, die im Zellkern benötigt werden, aktiv aus dem Cytoplasma dorthin transportiert werden.

Exogene Gene: „von außen kommend“. In diesem Zusammenhang sind das Gene, die aus einem anderen Organismus stammen. Wegen des universellen genetischen Codes können solche „Fremd“-Gene in der Regel problemlos exprimiert werden. Ein bekanntes Beispiel ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus einer Qualle, das in Bakterien, Tieren und Pflanzen eingesetzt werden kann und diese grün fluoreszieren lässt.

Extremophil: Unter extremophilen Organismen versteht man solche, die unter Lebensbedingungen existieren, unter denen „normale“ (mesophile) Organismen nicht lebensfähig sind. Zu Extrembedingungen zählen u.a. hohe Temperaturen (80°C und mehr), niedrige Temperaturen (-10°C und weniger), hoher Salzgehalt, sehr saure und sehr alkalische Biotope und mehr. Extremophile findet man hauptsächlich unter Prokaryoten und dort besonders unter Archaeen. In den meisten Fällen sind Extremophile unter mesophilen Bedingungen nicht lebens- und vermehrungsfähig, das macht ihre Haltung unter Laborbedingungen schwierig und aufwändig. Extremophile Organismen haben ihren Metabolismus

und ihre Enzyme an extreme Umweltbedingungen angepasst und sind deshalb auch von Interesse, weil sie z.B. industriell nützliche Enzyme produzieren, die bei besonders hohen oder besonders niedrigen Temperaturen optimal arbeiten oder auch unter sehr sauren oder alkalischen Bedingungen noch funktionsfähig sind. Andererseits sind Enzyme oder andere Proteine aus Extremophilen in Mesophilen meist nicht funktionsfähig – und umgekehrt.

FISH: Fluorescence in situ hybridization. Eine Methode mit der in mikroskopischen Zell-Präparaten DNA Sequenzen durch fluoreszierende Farbstoffe sichtbar gemacht werden. In den meisten Fällen beruht die Methode darauf, dass ein DNA-Strang mit Fluoreszenz-Markierung mit einer komplementären Sequenz in dem Präparat hybridisiert (Basenpaarung eingeht). Dazu ist es erforderlich, dass die DNA im Präparat chemisch denaturiert (einzelsträngig gemacht) wird. Diese Präparate sind folglich tot. Der CRISPR-Cas Komplex erkennt DNA-Sequenzen jedoch auch in intakten Zellen, d.h. in doppelsträngiger DNA und sogar in -> Chromatin. Die Fluoreszenzmarkierung kann dabei auf unterschiedliche Art sowohl am Cas-Protein als auch an der sgRNA angebracht werden. Damit ist es möglich, in lebenden Zellen die Dynamik des Chromatins zu beobachten.

Genomics: Analyse und Vergleich von Genomen. Mit den Fortschritten der Sequenziermethoden werden immer mehr Genome vollständig sequenziert. Vergleiche innerhalb einer Art ermöglichen detaillierte Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse (nicht nur innerhalb einer Familie, sondern auch zwischen verschiedenen Ethnien), über die Verbreitung von Spezies, über genetische Ursachen von Krankheiten und Resistenzen gegen Krankheiten. Vergleiche zwischen Arten geben Aufschluss über Evolution und Biodiversität.

Genotyp: Der Genotyp umfasst die genetische Information eines Organismus. Er unterscheidet sich vom -> **Phänotyp** darin, dass Veränderungen in der genetischen Information meistens nicht offensichtlich in einem Organismus zu erkennen sind.

Genregulation: Alle Zellen in einem Organismus tragen das gleiche Erbgut in sich. Trotzdem erfüllen sie verschiedene Funktionen und sind unterschiedlich aufgebaut. In jeder Zelle wird nur eine Teilmenge der Erbinformation transkribiert. Die „Auswahl“ erfolgt über verschiedene Mechanismen wie spezifische Transkriptionsfaktoren (Proteine), die Organisation des -> Chromatins sowie regulatorische RNAs, die mRNAs abbauen oder ihre Translation verhindern können.

Gentherapie: Medizinischer Eingriff, bei dem die genetische Ursache einer Erkrankung behandelt wird. Bei der somatischen Gentherapie wird in erwachsenen Menschen die Erbinformation in einem betroffenen Zelltyp (z.B. Blutzellen) repariert oder umprogrammiert. Große Erfolge wurden bei der Behandlung von -> Sichelzellanämie erzielt. Eine Schwierigkeit besteht noch im „Targeting“, d.h. ein entsprechendes CRISPR-Cas Konstrukt gezielt in ein betroffenes Organ bzw. einen bestimmten Zelltyp zu leiten. Bei der somatischen Gentherapie wird die genetische Veränderung nicht auf die Nachkommen übertragen.

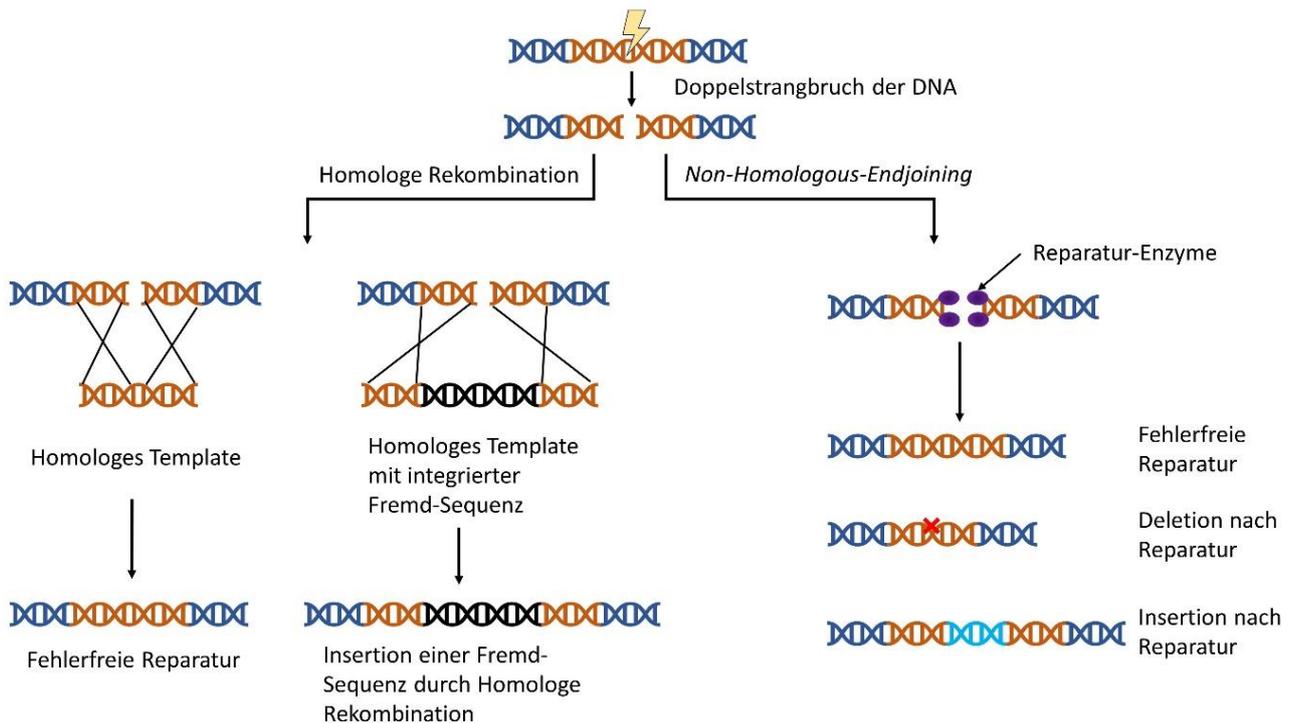
Bei der Keimbahntherapie wird die genetische Information in Keimzellen oder in der befruchteten Eizelle durchgeführt. Die Veränderung ist erblich. Ein spezielles Targeting ist nicht erforderlich. Alle Zellen des Embryos (und damit des wachsenden Menschen) werden genetisch verändert. Die Keimbahntherapie zur Korrektur erblicher Krankheiten ist ethisch äußerst fragwürdig und in den allermeisten Fällen medizinisch nicht angemessen (pränatale Diagnostik und ggf. eine Abtreibung wären weniger belastend). Für einen sehr geringen Teil der Fälle hat der Deutsche Ethikrat eine Keimbahntherapie nicht absolut ausgeschlossen.

gRNA: guide-RNA (s. crRNA)

Homology directed repair (HDR)

Durch Strahlung oder andere äußere Einwirkungen kann die DNA-Schaden nehmen bis hin zu einem kompletten Bruch des DNA-Doppelstrangs. In der Zelle gibt es Reparaturmechanismen für solche Fälle, einer davon heißt „homology directed repair“, kurz „HDR“. Im Gegensatz zu „non-homologous end joining“, kurz: „NHEJ“, wird bei HDR der DNA-Strang so repariert, dass er dem ursprünglichen DNA-Strang gleicht. Dazu

dient ein weiterer DNA-Strang als Matrize für die Reparatur. Die Wirkungsweise von CRISPR-Cas9 beruht darauf, dass zielgenau ein Doppelstrangbruch erzeugt wird, der dann entweder über HDR oder NHEJ repariert wird.



Homology directed repair (HDR) - Quelle: Stefanie Grüttner, BiuZ-Sonderheft „CRISPR-Cas“ (2024)

Horizontaler Gentransfer: Genetische Information wird üblicherweise von einer Generation zur nächsten übertragen, d.h. wenn sich ein einzelliger Organismus teilt oder wenn Gene bei sexueller Fortpflanzung durch Spermium und Eizelle auf die nächste Generation übertragen werden (vertikaler Gentransfer). In Ausnahmefällen (die gar nicht so selten sind), können Teile der genetischen Information auch von einem Individuum auf ein anderes übertragen werden. Dies ist vor allem bei Prokaryoten bekannt, die z.B. **-> Plasmide** über **-> Konjugation** austauschen können. Dabei können auch Artgrenzen überschritten und genetische Informationen von einer Spezies auf eine andere übertragen werden. Plasmide sind von besonderem medizinischen Interesse, weil sie oft Resistenzen gegen ein oder mehrere Antibiotika tragen und so die Behandlung bakterieller Infektionen sehr erschweren.

Horizontaler Gentransfer wird zunehmend auch in höheren Organismen gefunden: so gibt es auch horizontalen Gentransfer zwischen Parasiten und ihren Wirten und bei der Pflanzung von Pflanzen werden Gene zwischen Unterlage und Edelreis ausgetauscht. Ein weiteres bekanntes Beispiel ist die Übertragung von Genen des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* in

das Genom eines pflanzlichen Wirts, um dort Tumore auszulösen.

Integrase: Schlüsselenzym von einigen genetischen Elementen u. a. Retroviren, welches essenziell ist, um das virale Erbgut in das Wirtsgenom zu integrieren.

In-vivo: „im lebenden Organismus“. Experimente wie z.B. Arzneimitteltests aber auch Experimente der Grundlagenforschung können in-vitro (im Reagenzglas) oder in-vivo durchgeführt werden. In-vitro Experimente können jedoch nicht die gesamten komplexen Interaktionen in einem höheren Organismus wie Tier oder Mensch abbilden.

In-vitro: „im Reagenzglas“. Experimente bei denen mehr oder weniger komplett die Situation im lebenden Organismus nachgestellt wird. Im einfachsten Fall ist das eine enzymatische Reaktion, bei der die Umsetzung eines Substrats zu einem Produkt beobachtet wird. Komplexer werden Experimente, bei denen z.B. Zellextrakte eingesetzt werden, um bestimmte Effekte zu erreichen. Zellextrakte werden zwar standardisiert, sie sind aber nicht vollständig definiert, weil man nicht alle Bestandteile bis ins Detail kennt. Ein weiterer

Schritt sind Organoide, das sind kultivierte Zellen, die dazu induziert werden „Mini-Organ“ zu bilden, die bis zu einem gewissen Grad ein Organ nachbilden und die Effekte einer Behandlung (z.B. mit einem Medikament) besser abbilden als eine Kultur von Einzelzellen. Organoide können jedoch auch nicht die Interaktionen mit anderen Organen in einem ganzen Organismus nachstellen.

Kernlokalisierungssignal: Englisch NLS (nuclear localisation signal). Eine kurze Aminosäuresequenz, die sich oft am Anfang eines Proteins befindet und dieses in den Zellkern leitet. Weil in Eukaryoten Proteine im Cytoplasma synthetisiert werden, müssen einige von ihnen aktiv in den Zellkern transportiert werden (z.B. DNA-Polymerasen). NLS sind gut untersucht und können gentechnisch zuverlässig eingesetzt werden, indem man z.B. die DNA-Sequenz, die für ein NLS codiert, vor ein gewünschtes Gen setzt. Bei der Anwendung von CRISPR-Cas in Eukaryoten muss das Cas9 Protein in den Zellkern, um dort die DNA an der gewünschten Stelle zu schneiden. Für solche Anwendungen wird Cas9 mit einem NLS versehen.

Ko-Evolution: bezeichnet die evolutionäre Entwicklung von verschiedenen Arten, die stark miteinander interagieren. Die Selektion innerhalb einer Art hängt davon ab, wie erfolgreich die Individuen mit der anderen Art interagieren.

Oft ist Ko-Evolution wie ein unendliches Wettrüsten: Ein Organismus A infiziert Organismus B. Daraufhin entwickelt sich in B ein Abwehrmechanismus. A findet einen Weg, den Abwehrmechanismus zu umgehen. Nachkommen von B, die es schaffen, den neuen Infektionsweg von A zu blockieren, haben eine bessere Überlebenschance und dann ist wieder A gefordert, einen neuen Weg zu finden, B zu infizieren. Dies ist jedoch keine gezielte Entwicklung, sondern beruht auf zufälligen Mutationen, die ein besseres Überleben – oder auch ein schnelleres Wachstum – ermöglichen. Ein Beispiel sind Anti-CRISPR Proteine, die von manchen Phagen produziert werden. Sie können u.a. das Schneideenzym blockieren und so der bakteriellen Abwehr entgehen.

Konjugation: Austausch genetischer Information unter Prokaryoten. Voraussetzung ist ein F-Faktor auf einem Plasmid oder im Chromosom des Prokaryoten. Der F-Faktor codiert für F-Pili (-> Pilus), die eine Brücke zwischen zwei Zellen bilden können (einer F⁺ und einer F⁻-Zelle). Über diese Brücke können dann Teile des Chromosoms oder Plasmide auf die F⁻-Zelle übertragen werden. Die Konjugation ist nicht auf Prokaryoten einer Spezies beschränkt, sie kann auch zwischen verschiedenen Arten stattfinden. Weil Plasmide oft Resistenzgene gegen Antibiotika enthalten, ist dieser horizontale Gentransfer wesentlich für die Entstehung multiresistenter Keime verantwortlich. F-Pili sind oft auch das Ziel verschiedener -> Phagen, die durch Injektion ihres Erbmateri als in den Pilus einen Prokaryoten infizieren.

Ligase: Ein Enzym, das zwei DNA-Stränge (z.B. nach einem Einzel- oder -> Doppelstrangbruch) verbindet („ligiert“). Zwischen dem letzten Nukleotid des einen und dem ersten Nukleotid des zweiten Strangs entsteht dabei eine Phosphodiesterbindung.

Mesophile: Organismen, die unter „normalen“, moderaten Bedingungen leben. Dazu gehören, mit wenigen Ausnahmen, alle Eukaryoten. Im Gegensatz dazu stehen die -> Extremophilen, die nur oder vorzugsweise unter extremen, üblicherweise lebensfeindlichen Bedingungen existieren.

Metagenomics: Mit den rasanten Fortschritten der DNA-Sequenzierung können heute Unmengen an DNA in kürzester Zeit sequenziert werden. Bei Metagenomics wird die gesamte DNA z.B. aus einer Umweltprobe präpariert und sequenziert. D.h. es werden keine einzelnen Organismen isoliert, sondern man sequenziert alles, was in der Probe enthalten ist. Damit werden auch Mikroorganismen erfasst, die im Labor nicht kultivierbar sind und die man nie gesehen hat. Mit Hilfe der Bioinformatik können die DNA-Sequenzen zum größten Teil funktionalen Genen und/oder bekannten Organismen zugeordnet werden. Besonders interessant: Metagenome geben Aufschluss über mikrobielle Ökosysteme und ihre Veränderung in einem Boden, in See-, Meer- oder Flusswasser. Von medizinischer Bedeutung ist das mikrobielle Metagenom (Mikrobiom) des Menschen das deutliche Unterschiede zwischen

Individuen und verschiedenen Körperstellen (Haut, Mundhöhle, Darm usw.) aufweist.

Mikrobiom: Die Gesamtheit der Mikroorganismen in einem bestimmten Habitat. Dazu wird **das -> Metagenom** durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Mikrobiome haben einen großen Einfluss auf andere Lebewesen. Beim Menschen sind sie wichtige Indikatoren für Gesundheit, im Boden sorgen sie für Stoffkreisläufe und damit auch für die Fruchtbarkeit auf landwirtschaftlichen Flächen. Wir stehen erst am Anfang, die Diversität von Mikrobiomen, ihre Bedeutung und ihre Veränderungen zu verstehen.

Mini-Casposon: Synthetisches Casposon, dass neben den begrenzenden Elementen - Wiederholungssequenzen und Zielsequenz-Duplikation *E. coli* Gene enthält.

Mismatch: fehlerhafte Basenpaarung, die z.B. bei der Replikation der DNA oder durch Mutation einzelner Basen entsteht. In den meisten, aber nicht in allen Fällen werden Mismatches von zellulären Reparatursystemen repariert. Wird ein Mismatch vom Reparatursystem „übersehen“ (oder auch falsch repariert), entsteht eine Mutation.

Als Mismatch werden auch Fehlpaarungen zwischen RNA und DNA bezeichnet. Bei CRISPR-Cas Systemen kann es dadurch zu **-> off-target Effekten** kommen.

Modellorganismus: Laien mögen sich manchmal wundern, wieviel Zeit und Geld in aufwändige Untersuchungen an scheinbar irrelevanten Organismen gesteckt wird. Modellorganismen sind Stellvertreter für andere Organismen. Sie haben auch ihren eigenen Wert, sind aber in erster Linie einfacher, schneller, ethisch vertretbarer und weniger aufwändig zu untersuchen als die Organismen, über die man wirklich etwas lernen will. In der Medizin spielt z.B. das „Mausmodell“ eine große Rolle, um physiologische Prozesse und menschliche Krankheiten zu verstehen. Selbst die Taufliege *Drosophila* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben wesentliche Beiträge zum Verständnis menschlicher Krankheiten geleistet. In der Botanik und der grünen Gentechnik werden vielfach das „Unkraut“ *Arabidopsis thaliana* und der Tabak eingesetzt. Für verschiedene Fragestellungen werden verschiedene

Modellorganismen eingesetzt, die spezielle Vorteile haben. Wichtig sind z.B. eine schnelle Reproduktionszeit um mehrere Generationen genetisch verfolgen zu können, eine einfache und kostengünstige Haltung im Labor und leichte Zugänglichkeit z.B. für gentechnische Methoden. Auch andere Merkmale können bei der Auswahl von Modellorganismen eine Rolle spielen: die Embryonen des Zebrafisches *Danio rerio* sind z.B. durchsichtig und erlauben eine einfache mikroskopische Beobachtung der Embryonalentwicklung.

Ergebnisse aus Modellorganismen sind natürlich nicht zu 100% auf andere Organismen übertragbar. Aus den detaillierten Untersuchungen weiss man jedoch, wo man mit wesentlich schwierigeren Versuchen in der Medizin und bei Nutzpflanzen ansetzen muss.

Nanoarchaeota: sehr kleine Archaeen mit reduziertem Genom, die meist parasitisch oder symbiotisch mit anderen Archaeen leben. Sie gehören zur Gruppe der **-> DPANN Archaeen** (Akronym für die ersten benannten Archaeen dieses Superphylums: Diapherotrites, Parvarchaea, Aenigmarchaea, Nanoarchaea und Nanohaloarchaea).

nCas9: s. -> dCas9

nested-PCR: PCR-Technik, bei der eine zweite PCR innerhalb einer PCR durchgeführt wird. Dadurch wird die Empfindlichkeit und Spezifität der Amplifikation deutlich gesteigert.

NGT: „Neue genomische Techniken“. Darunter werden Methoden wie CRISPR-Cas, TALENS und Zinkfinger-Nukleasen zusammengefasst, die zielgenau Doppelstrangbrüche in der DNA setzen und damit zielgenaue Mutationen auslösen können. Juristisch werden drei Kategorien unterschieden: bei NGT-1 wird (meistens) nur ein Schnitt gesetzt, der durch endogene Mechanismen repariert wird. Dabei kommt es zu kleinen Deletionen oder Insertionen, mit denen ein Gen z.B. inaktiviert wird. Wenn bis zu 20 Nukleotide verändert werden, zählt der Eingriff zur Kategorie NGT-1. NGT-1 Organismen sind nicht von Organismen zu unterscheiden, die durch natürliche Mutationen entstanden sind. Organismen der Kategorien NGT-1 enthalten keine DNA von anderen Organismen und

werden als cis-gen bezeichnet. Der derzeitige Vorschlag der EU sieht vor, dass für NGT-1 Organismen (hier Pflanzen) die strenge Regulierung nach dem alten Gentechnikgesetz entfällt, u.a. weil ein Nachweis des gentechnischen Eingriffs nicht eindeutig möglich ist.

NGT-2 und NGT-3 Organismen enthalten zusätzliche, größere Abschnitte fremder DNA, auch Gene oder Genabschnitte aus anderen Arten. Sie werden deshalb als trans-gen bezeichnet. Nach dem gegenwärtigen EU-Vorschlag sollen solche Organismen weiterhin der bisherigen Regulierung für gentechnisch veränderte Organismen (GVO) unterliegen.

NLS: nuclear localisation signal →
Kernlokalisierungssignal

Non-homologous end joining (NHEJ): Durch Strahlung oder andere äußere Einwirkungen kann die DNA-Schaden nehmen bis hin zu einem kompletten Bruch des DNA-Doppelstrangs. In der Zelle gibt es Reparaturmechanismen für solche Fälle, einer davon heißt „non-homologous end joining“, kurz: „NHEJ“. Dabei setzen Reparatur-Enzyme an den Enden an, entfernen Nukleotide oder fügen neue hinzu. Auch wenn die losen Enden der DNA wieder zusammengefügt werden, können dabei Mutationen (sogenannte Indels = Insertionen oder Deletionen) entstehen. Die genetische Information wird verändert und es entsteht eine Mutation. (s. auch → **HDR** = homology directed repair)

Nukleotid: Die Bausteine der DNA und RNA werden als Nukleotide bezeichnet. Sie bestehen aus einem Zucker (der Ribose bei RNA und der Desoxyribose bei DNA), einer Base (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, in der RNA ist Thymin durch Uracil ersetzt) und einem Phosphorsäure-Rest. Freie Nukleotide liegen (meist) als energiereiche Triphosphate vor. Bei der Synthese von DNA oder RNA wird die Energie für den Einbau durch die Abspaltung von zwei Phosphatgruppen gewonnen.

off-target Effekt: crRNAs steuern eine Zielsequenz sehr genau an. Aber nichts ist zu 100% perfekt! Manchmal werden einzelne → **Mismatches** zwischen crRNA und der Zielsequenz auf der DNA toleriert und

es kommt zu einem Doppelstrangbruch an einer ähnlichen, aber nicht beabsichtigten Sequenz. Off-target Effekte können durch verschiedene Optimierungen reduziert aber niemals ausgeschlossen werden. Wenn man ganz sicher sein will (z.B. bei medizinischen Anwendungen und in der grünen Gentechnik) wird inzwischen oft das komplette Genom der gentechnisch veränderten Zellen oder Organismen sequenziert (→ **DNA Sequenzierung**), um eventuelle off-target Effekte auszuschließen.

Omics: steht für verschiedene Methoden der Biologie, bei den sehr großen Datenmengen erfasst und mit der Bioinformatik verarbeitet werden. Damit können u.a. Verwandtschaftsverhältnisse in großem Rahmen, Interaktionen in Ökosystem oder Zusammenhänge bei komplexen Erkrankungen untersucht werden. Siehe → **Genomics**, → **Transcriptomics**, → **Metagenomics**. (Metabolomics, Proteomics und andere sind noch nicht im Glossar aufgenommen).

PAM: (Protospacer Adjacent Motif) ist eine kurze Sequenz von meist 2-6 Nukleotiden, die auf dem gegenüberliegenden Strang der Ziel-DNA an die die crRNA binden kann. Die PAM-Sequenz ist nicht Teil der crRNA!

Sie gibt dem Komplex aus Schneideenzym (Nuklease, z.B. Cas9) und crRNA eine Vorauswahl, um seine Zielsequenz zu finden. Damit der Komplex mit hoher Geschwindigkeit über die DNA laufen kann, wird nicht an jeder Stelle ein Abgleich mit der crRNA gemacht. Nur wenn er über eine PAM-Sequenz läuft hält der Komplex kurz an und die crRNA versucht mit der danebenliegenden Sequenz eine Basenpaarung. Wenn die Sequenz passt, „rastet“ das Enzym ein und der Schneidevorgang findet statt. Passt die Sequenz nicht, läuft der Komplex weiter und stoppt erst wieder am nächsten PAM

(<https://www.youtube.com/watch?v=b4c2sqLtlbs>).

In der Anwendung bedeutet das, dass man zwar jede beliebige crRNA synthetisch herstellen kann, aber nicht jede Sequenz ist als Ziel geeignet: es muss immer ein PAM daneben liegen.

Wenn Bakterien einen neuen → **Spacer** aus einem angreifenden Virus ausschneiden, dann ist das keine ganz zufällige Sequenz. Es werden nur Stücke ausgeschnitten, die neben einem PAM liegen. Die

ausgeschnittenen Stücke heißen Protospacer und stellen die zukünftigen Zielsequenzen auf dem Virusgenom dar. Das Ausschneiden erfolgt durch die Proteine Cas1 und Cas2, die in der viralen DNA die PAM-Sequenz erkennen. Ebenso erkennt das Schneideenzym (Nuklease, z.B. Cas9) die PAM-Sequenz. Dabei erfolgt die Erkennung nicht über Basenpaarung, sondern über wenige Aminosäuren im Cas-Protein, die eine bestimmte Basensequenz erkennen und binden können. Die Cas-Proteine aus unterschiedlichen Organismen erkennen unterschiedliche PAM-Sequenzen. Um den Anwendungsbereich zu vergrößern, wurden Cas-Proteine molekulargenetisch so verändert, dass sie verschiedene PAM-Sequenzen erkennen können.

Parasitismus, Parasiten: Als Parasitismus bezeichnet man das Zusammenleben verschiedener Organismen, bei denen einer mehr oder ausschließlich von dieser Interaktion profitiert. Obligate Parasiten können ohne ihren Wirt nicht leben, fakultative Parasiten können das schon. Parasiten können ihren Wirt bis zu dessen Tod ausnutzen, andere schwächen den Wirt mehr oder weniger, töten ihn aber nicht. Parasitismus kann sich im Laufe der Evolution zu einer **-> Symbiose** wandeln, dabei profitieren beide Partner von dem Zusammenleben und sind mitunter alleine nicht mehr lebensfähig.

PCR: Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*). Standardverfahren der Molekularbiologie zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann RNA in DNA umgeschrieben und so auch in einer PCR eingesetzt werden. Unter qPCR (quantitative PCR) versteht man eine Abwandlung des Verfahrens, mit der die Kopienzahl eines DNA-Abschnitts, meistens aber die Menge einer DNA bestimmt werden kann.

Phagen: Ursprünglich Bakteriophagen (= Bakterienfresser) sind im engeren Sinne keine Lebewesen, weil sie keinen eigenen Stoffwechsel und auch nicht die genetischen Anlagen dafür haben. Sie sind Viren, die auf -> Prokaryoten als Wirt angewiesen sind. Sie sind sehr spezifisch und befallen meist nur eine bestimmte Bakterienart. Mit Hilfe des Wirtes können sie sich (parasitisch) vermehren, dabei wird der Wirt getötet (lysiert). Phagen mit DNA als Erbmaterial

können in das Genom des Wirts eingebaut werden und dort lange Zeit als „selbstsüchtige DNA“ (-> **selfish DNA**) ruhen. Phagen mit RNA als Erbmaterial können diese in DNA umschreiben (Retroviren) und dann in die Wirts-DNA einbauen. Die Evolution hat viele Abwehrmechanismen gegen Phageninfektion hervorgebracht, dazu zählen auch -> CRISPR-Cas Systeme. Manche Phagen haben Teile von CRISPR-Cas Systemen von ihren Wirten gestohlen und nutzen sie u.a., um ihren Wirt zu schädigen oder um konkurrierende Phagen abzuwehren. Weil es Phagen sowohl für Archaea als auch für Bakterien gibt, beschreibt der Begriff „Bakteriophage“ nur eine Familie von Phagen.

Phänotyp: Der Phänotyp umfasst zunächst sämtliche äußeren Merkmale eines Organismus inklusive seines Verhaltens. Der Begriff ist etwas diffus geworden, denn dazu zählen auch Eigenschaften des Stoffwechsels, die man mit geeigneten Methoden messen kann. Grundsätzlich kann man sagen „der Phänotyp ist das, wonach man schaut“. Ein Verhalten muss am lebenden Organismus beobachtet werden, um eine Enzymaktivität messen zu können, braucht man entsprechende Messmethoden. Im Prinzip kann man auch eine Punktmutation als Phänotyp bezeichnen, wenn man die DNA-Sequenz durch eine Sequenzierung sichtbar macht. In den meisten Fällen wird aber noch zwischen **-> Genotyp** und Phänotyp unterschieden.

Pilus: (Mehrzahl: Pili) sind haarförmige Anhängsel an Prokaryoten, die, je nach Zusammensetzung, verschiedene Funktionen haben. Bekannt sind die F-Pili, die Kontakte zwischen Zellen herstellen und den Austausch genetischer Information ermöglichen. Pili dienen aber auch dem Kontakt mit Oberflächen, an denen sie sich festsetzen können. Dadurch können Biofilme aus mehreren verschiedenen Arten von Prokaryoten entstehen. Beim Kontakt mit eukaryotischen Zellen spielen Pili oft eine wichtige Rolle bei der Pathogenität. Manche Viren (Bakteriophagen) heften sich an Pili an und nutzen sie als Eingangspforte, um einen Prokaryoten zu infizieren.

Plasmide: meist zirkuläre DNA-Sequenzen, die in Bakterien, Archaeen, aber auch in einigen einzelligen Eukaryoten vorkommen. Bakterien und Archaeen

können Plasmide auf andere übertragen und dabei sogar Artgrenzen überschreiten. Plasmide können auch als mobile, parasitäre DNA-Elemente bezeichnet werden. Sie nutzen für ihre Vermehrung die zelluläre Maschinerie ihres Wirts. Plasmide haben komplexe Mechanismen entwickelt, die ihren Wirt daran hindern, sie zu eliminieren. Plasmide können Gene enthalten, die dem Wirt dienlich sind. Dazu gehören Resistenzgene gegen Antibiotika aber auch Gene für Stoffwechsellenzyme, die ein Überleben des Wirts unter besonderen Umweltbedingungen erlauben. Dabei verschwimmt die Grenze zwischen **-> Symbiose** und Parasitismus. Manche Plasmide enthalten auch eigene CRISPR-Cas Systeme.

Plasmide sind ein Routine-Werkzeug in der Molekularbiologie. Sie können **-> in-vitro** zusammengesetzt werden und Kombinationen verschiedener genetischer Elemente (codierende Regionen, Promotoren, funktionale RNA-Gene wie CRISPR-Arrays) enthalten.

Primer: Kurze DNA- oder RNA-Sequenzen, die an spezifische DNA-Regionen binden und von hieraus die DNA-Synthese innerhalb der PCR (künstlich) oder Replikation (natürlich) initiieren.

Prokaryot: Zu den Prokaryoten gehören die Bakterien und die Archaea. Beide haben gemeinsam, dass sie keinen Zellkern besitzen. Dadurch entfallen u.a. Transportvorgänge zwischen Cytoplasma und Zellkern, die bei **-> Eukaryoten** erforderlich sind. In Prokaryoten kann z.B. die **-> Translation** schon während der mRNA Synthese (**-> Transkription**) beginnen.

Protospacer: Als Protospacer bezeichnet man einen DNA-Abschnitt in einem Virus, der von den Proteinen Cas1 und Cas2 ausgeschnitten und dann in den CRISPR-Locus als neuer Spacer eingebaut werden kann. Voraussetzung ist, dass im viralen Genom daneben eine **-> PAM**-Sequenz liegt.

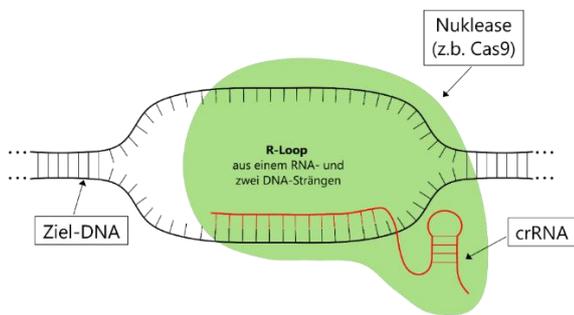
Prozessierung: die meisten RNAs werden nach der Transkription weiterverarbeitet, indem Stücke abgeschnitten oder herausgeschnitten werden oder auch Nukleotide angehängt werden. In CRISPR-Cas Systemen wird i.d.R. ein langes Transkript des CRISPR-Arrays in Einheiten zerlegt, die sowohl am 5'-

Ende als auch am 3'-Ende einen Teil des vorhergehenden als auch des nachfolgenden Repeats enthalten. Dazwischen liegt der Spacer, der die Zielsequenz definiert. Die Repeatsequenzen werden auch als 5'- und 3'-Handle bezeichnet. Sie sind für die Bindung der crRNA an den **-> Effektor-Komplex** erforderlich.

Replikation: Der Vorgang, bei dem eine DNA-Doppelhelix (meist vor einer Zellteilung) verdoppelt wird. Dabei werden die beiden DNA-Stränge getrennt und jeder Strang dient als Vorlage (Template) für eine DNA-Polymerase, die den komplementären Strang synthetisiert.

Ribonukleoprotein-Komplex: (RNP) Eine spezifische Zusammenlagerung von einem oder mehreren Proteinen mit einem oder mehreren RNA-Molekülen zu einer funktionalen Einheit. RNPs sind wesentliche, evolutionär sehr alte Funktionseinheiten des Lebens. Essenzielle biologische Vorgänge wie die **-> Translation** finden an RNPs (hier: Ribosomen) statt. Cas-Nukleasen bilden zusammen mit der crRNA ein RNP.

R-Loop: Eine doppelsträngige DNA ist ziemlich stabil. Um die beiden Stränge lokal zu trennen (durch entwinden oder aufschmelzen), ist ein Enzym und Energie notwendig. Enzyme, die doppelsträngige Nucleinsäuren entwinden bezeichnet man als Helikasen. Eine solche Helikaseaktivität ist auch in Cas9 und anderen CRISPR-Cas-Nukleasen enthalten. Wird die Ziel-DNA aufgeschmolzen, so fädelt sich die crRNA ein und bildet Basenpaare mit einem der beiden DNA-Stränge. Der zweite DNA-Strang bleibt einzelsträngig. Weil eine Basenpaarung zwischen DNA und RNA fester ist, bleibt dieser Komplex, den man als R-Loop bezeichnet (Abb. 1), ziemlich stabil. Erst wenn der Schnitt erfolgt ist, zerfällt er wieder.



R-Loop aus Ziel-DNA, crRNA und Nuklease (Cas9)
(Abb.: Science Bridge)

RNA-Interferenz, RNAi: Die RNA-Interferenz ist ein molekularer Regulationsmechanismus, der auf kleinen (etwa 20 Nukleotide langen) nicht-codierenden RNAs beruht (siRNAs = small interfering RNAs). Diese RNAs sind komplementär zu Abschnitten auf mRNAs und können diese mit Hilfe entsprechender Enzyme zerstören. Es handelt sich dabei um einen posttranscriptionellen Regulationsmechanismus: es gibt keinerlei Veränderung der DNA-Sequenz, nur die Menge an mRNA wird reduziert. siRNAs haben ihren Ursprung in längeren Antisense-Transkripten, die durch das Enzym DICER in die kleinen siRNAs zerlegt werden.

RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus, man findet in fast allen Organismen eine große und vielfältige Zahl an siRNAs, die oft an der Regulation von Transposons beteiligt sind. RNAi wird aber auch gentechnisch als Medikament eingesetzt und ist für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft geplant. Die Ähnlichkeit mit CRISPR-Cas Systemen ist offensichtlich und zeigt sich auch in ähnlichen, verwandten Enzymen, die an beiden Reaktionen beteiligt sind. Ein etwas ausführlicher Artikel zu RNAi ist hier zu finden:

<https://www.biowisskomm.de/2024/04/wie-man-gene-zum-schweigen-bringt/>

RNA Polymerase: ein Enzym, das von der Vorlage eines DNA Strangs eine RNA synthetisiert (transkribiert). RNA-Polymerasen sind aus mehreren Proteinen (Untereinheiten) aufgebaut. In Eukaryoten unterscheidet man grob zwischen RNA Polymerase I, II und III, die (hauptsächlich) rRNA (ribosomale RNA), mRNA (messenger RNA) und tRNA transkribieren.

RNA-Polymerasen werden durch spezifische Promotoren und zusätzliche Proteinfaktoren zum Startpunkt der Transcription geleitet. Dabei spielt auch die Chromatinstruktur (Zugänglichkeit eines Promotors) eine Rolle (-> Epigenetik). Bakterien haben nur eine RNA-Polymerase die jedoch durch zusätzliche Proteinuntereinheiten für bestimmte Promotoren spezifiziert werden kann. Archaeen haben hingegen RNA-Polymerasen, die ähnlich aufgebaut sind wie die der Eukaryoten.

RNase: eine Vielzahl von Enzymen, die RNA abbauen oder an bestimmten Stellen schneiden. Sie sind wichtig für die Prozessierung von Transkripten wie z.B. den langen RNAs, die vom -> CRISPR-Array, der präzise in Einheiten zerlegt wird, die aus -> Spacer und einem Teil der Repeats besteht. Eine andere Aufgabe der RNasen besteht im Recycling von RNAs, die sie in einer Zelle mehr oder weniger schnell abbauen. Die dabei freigesetzten Nucleotide werden danach mit energiereichen Phosphatgruppen beladen und wiederverwendet.

RNA-Sequenzierung: RNA wird aus technischen Gründen nicht direkt sequenziert. Sie wird im Reagenzglas zunächst mit dem Enzym Reverse Transcriptase in DNA umgeschrieben und dann wie bei der -> DNA-Sequenzierung verarbeitet. RNA-Sequenzierung erlaubt die Erstellung und den quantitativen Vergleich von -> Transcriptomen z.B. unter verschiedenen Umweltbedingungen oder bei Erkrankungen.

Screening: Aus den Nachkommen einer Kreuzung oder aus einer Population werden die Individuen ausgesucht, die im Phänotyp eine gewünschte Eigenschaft haben. Das kann sehr mühsam sein, weil z.B. eine gewünschte Mutation sehr selten auftritt. Wenn möglich, wird man eine -> Selektion vornehmen, bei der nur die Organismen lebensfähig sind, die die gewünschte Eigenschaft haben.

Selektion: Das „Aussortieren“ von Organismen, die eine bestimmte Eigenschaft haben. Bei Bakterien werden Plasmide eingebracht, um bestimmte DNA-Sequenzen zu vermehren oder gewünschte Gene zu exprimieren. Nur wenige Bakterien nehmen im

Experiment ein **-> Plasmid** auf. Deshalb enthalten Plasmide zusätzlich meist ein Gen, das Resistenz gegen ein Antibiotikum vermittelt. Auf einem Medium, das dieses Antibiotikum enthält, können nur Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Als Selektion wird auch die Auswahl von Tieren oder Pflanzen mit gewünschten Eigenschaften aus einer Population bezeichnet: man wählt die dicksten Tomaten oder die größten Fische für die weitere Vermehrung aus. Eigentlich handelt es sich dabei um ein **-> Screening**. Bei Selektion wären die unerwünschten Tiere oder Pflanzen nicht lebensfähig.

Selfish DNA: als „selbstsüchtige DNA“ bezeichnet man DNA-Sequenzen, die ihrem Wirt (zunächst) keine Vorteile bieten und ihn ausschließlich zur eigenen Vermehrung nutzen. Dazu zählen mobile DNA-Elemente wie **->Transposons**, **->Plasmide**, Viren und **->Phagen**. Sekundär können diese Elemente jedoch Funktionen annehmen und damit symbiotisch werden. Transposons haben oft strukturelle Aufgaben als **->Centromere** und **->Telomere** in eukaryotischen Chromosomen übernommen. Plasmide tragen häufig Resistenzgene gegen Antibiotika und schützen damit ihren Wirt.

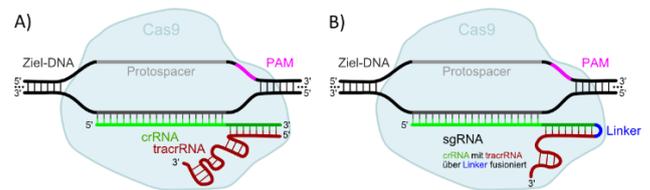
Self-targeting: Die überraschende Beobachtung, dass es **-> Spacer** gibt, die gegen Gensequenzen aus dem eigenen Bakteriengenom gerichtet sind. Wenn es sich dabei um essenzielle Gene handelt, käme das einem „Selbstmord“ gleich. Die Funktion von Self-targeting ist noch nicht vollständig geklärt. In manchen CRISPR-Cas Systemen wird das eigene Gen nicht zerstört, sondern nur runterreguliert – das Self-targeting hat damit eine Funktion bei der Genregulation. In anderen Fällen werden nicht-essenzielle Gene abgeschaltet, was unter bestimmten Umständen einen Vorteil bedeuten kann. Es besteht noch viel Forschungsbedarf, um die Bedeutung von Self-Targeting zu klären.

Sequencing reads (of auch nur “reads”): Bei der **-> DNA-Sequenzierung** wird im Prinzip die Basenabfolge eines spezifischen DNA Abschnitts bestimmt („gelesen“). Mit dem Fortschritt der Sequenzierungsmethodik werden heute mehrere tausend oder Millionen Abschnitte parallel gelesen. Damit werden u.a. Lesefehler korrigiert, indem viele Reads ein

und derselben Sequenz verglichen werden.

Bei der **-> RNA-Sequenzierung** kann aus der Anzahl der Reads die relative Menge eines bestimmten Transcripts (z.B. einer mRNA oder einer crRNA) bestimmt werden.

sgRNA: Die Klasse II CRISPR-Cas-Systeme brauchen neben der crRNA noch eine tracrRNA, um an das Schneideenzym (z.B. Cas9 im Bakterium *Streptococcus pyogenes*) zu binden und es zur Ziel-DNA zu leiten (Abb. A). Das ist für die Anwendung umständlich. Deshalb hat man aus zwei RNAs eine gemacht und crRNA und tracrRNA mit einem kurzen Zwischenstück (Linker) verbunden. Diese RNA nennt man „single guide“ oder sgRNA (Abb. B).



(Abb.: Science Bridge)

Sichelzellanämie: Eine Blutkrankheit, die durch eine Mutation im β -Globin verursacht wird. Das veränderte Protein verklumpt und die Sauerstoffaufnahme der roten Blutkörperchen ist stark beeinträchtigt. Die Krankheit ist autosomal-rezessiv, nur homozygote Patienten sind betroffen. Heterozygote sind weitgehend symptomfrei. Die Sichelzellanämie ist inzwischen mit einer CRISPR-Cas Therapie heilbar. Dabei wird das fetale Hämoglobin F, das normalerweise nach der Geburt abgeschaltet wird, reaktiviert. Der Gesundheitszustand aller behandelten Patienten hat sich nach der Therapie wesentlich verbessert, einige sind inzwischen völlig symptomfrei.

Spacer: Spacer (Abstandhalter) sind DNA-Trennsequenzen zwischen Funktionsabschnitten auf der DNA. CRISPR-Systeme enthalten im „CRISPR-Array“ kurze, sich wiederholende identische DNA-Sequenzen (Repeats), die von den variablen Spacern getrennt werden. Spacer sind kurze DNA-Stücke, die (meistens) aus Viren herausgeschnitten und in den CRISPR-Array eingebaut wurden. Zusammen mit einer Repeat-Sequenz werden sie zu crRNAs transkribiert und dienen

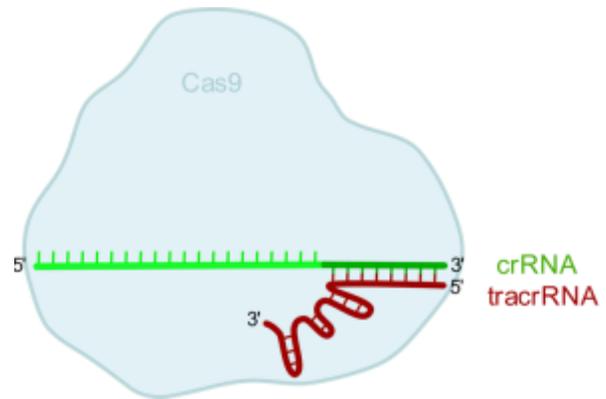
als „Adress-Label“ um ein Cas-Enzym an eine bestimmte DNA zu leiten.

Symbiose: eigentlich „Zusammenleben“, der Begriff wird aber meist als ein Zusammenleben verwendet, bei dem Wirt und Symbiont davon profitieren. Das unterscheidet Symbiose vom -> Parasitismus. In vielen, aber nicht in allen Fällen sind die Partner voneinander abhängig und nicht mehr alleine lebensfähig.

Telomer: Ende eines (eukaryotischen) Chromosoms. Telomere sind eigentlich „offene DNA-Enden“ die ein Ziel für Nukleasen (DNA abbauende Enzyme) darstellen. Telomere bestehen aus vielfach wiederholten DNA-Sequenzen, die durch komplizierte „Knotenstrukturen“ vor diesem Abbau geschützt sind. Bei jeder Verdopplung der DNA (Replikation) werden die Telomere jedoch jedes Mal etwas kürzer, weil die Replikationsmaschinerie nie ganz bis zum Ende die DNA verdoppeln kann. Das wird durch die Telomerase kompensiert, ein Enzym, das die wiederholten Sequenzen an den Enden verlängern kann. Weil Telomerasen im Alter an Aktivität verlieren, ist die Verkürzung der Telomere eine Alterserscheinung.

Targeting Module: siehe -> Effektorkomplex.

TracrRNA: Die tracrRNA (trans-activating crRNA) ist eine kurze RNA, die mit ihrem 5' Ende über Basenpaarung an die Repeat Sequenzen von crRNAs bindet. Erinnern wir uns: die crRNA besteht aus einem Stück, das spezifisch auf eine Virus-DNA passt und einem Stück „Repeat“, das bei allen crRNAs gleich ist. Das andere Ende der tracrRNA weist eine starke Faltung (Sekundärstruktur) auf und ist notwendig, damit der Komplex aus crRNA und tracrRNA an das Schneideenzym (Cas9) binden kann. Für eine einfachere Anwendung können tracrRNA und crRNA künstlich zu einer „single guide“ oder sgRNA verbunden werden.



(Abb.: Science Bridge)

tRNA-Synthase: tRNAs (Transfer RNAs) sind für die Übersetzung von mRNAs (Messenger RNAs) in ein Protein essentiell. Sie tragen an der einen Seite ein Basen-Triplett (Anti-Codon), das ein spezifisches Codon auf der mRNA erkennt. An der anderen Seite tragen sie die entsprechende Aminosäure, in die dieses Codon übersetzt werden soll. Im Ribosom, der zellulären „Protein-Synthese-Maschine“ wird die Aminosäure auf die wachsende Aminosäurekette (Protein) übertragen.

tRNAs werden recycelt. Nach der Abgabe der Aminosäure im Ribosom wird die tRNA neu beladen. Dafür sind die tRNA-Synthasen zuständig. Diese Enzyme müssen die Struktur der tRNA erkennen und sehr genau das Anti-Codon „lesen“ können. Die falsche Beladung einer tRNA wäre fatal! Der genetische Code besteht aus 61 Codons, die für Aminosäuren codieren (plus drei Stopp-Codons, für die es keine tRNAs gibt). Es muss also 61 verschiedene tRNA-Synthasen geben, die 61 verschiedene tRNAs spezifisch beladen können. Der Verlust einer tRNA-Synthase kann für einen Organismus tödlich sein.

Transkription: Das Ablesen einer RNA-Kopie von der DNA. Die Synthese der RNA erfolgt durch eine RNA-Polymerase. Sie erkennt und bindet an eine DNA-Sequenz, die vor einem Gen liegt und als -> Promotor bezeichnet wird. Während oder nach der Transkription werden RNAs i.d.R. noch prozessiert, d.h. es werden Stücke herausgeschnitten, Stücke angehängt oder einzelne Basen modifiziert. Es werden nicht nur RNAs Protein-codierender Gene transkribiert, sondern auch

viele weitere regulatorische RNAs und RNAs mit anderen Funktionen (z.B. ribosomale RNA, tRNA).

Transkriptom: -> Transcriptomics

Transcriptomics: Bezeichnet die Sequenzierung und bioinformatische Analyse aller RNAs, die unter definierten Bedingungen in einem Organ synthetisiert (transkribiert) wurden. Die Gesamtheit aller RNAs wird als Transkriptom bezeichnet. Im Gegensatz zu Genomics werden dabei nur die aktiven Gene erfasst. Mit Hochdurchsatz-Sequenzierung kann auch die relative Menge an RNA bestimmt werden, die von jedem Gen abgelesen wird. So kann z.B. die Entwicklung eines Tumors frühzeitig erkannt werden, weil sich die Genexpression von normalem Gewebe unterscheidet.

Translation: „Übersetzung“ der genetischen Information in ein Protein. Die „Translationsmaschinen“ sind die Ribosomen, in denen mit Hilfe von tRNAs der genetische Tripletcode in Aminosäuren umgesetzt wird. In -> **Eukaryoten** müssen mRNAs nach der Transkription aus dem Zellkern in das Cytoplasma, dem Ort der Translation transportiert werden. In -> **Prokaryoten** beginnt die Translation meist bereits schon während der Transkription.

Transposase: Schlüsselenzym von DNA-Transposons, essentiell für das Ausschneiden und Wiedereinsetzen von Transposonsequenzen aus, bzw. in ein Genom.

Transposon: Mobiles genetisches Element (-> **selfish DNA**), welches sowohl seine Position als auch oft seine Kopienanzahl innerhalb des Genoms verändern kann. Besteht meist aus der kodierenden Sequenz verschiedener Enzyme z. B. Transposase und flankierenden Bereichen (repeats). DNA- Transposons werden in der Regel aus dem Genom ausgeschnitten und an anderer Stelle (bei bestimmten Zielsequenzen) wieder eingesetzt („springende Gene“. Ihre Kopienzahl im Genom bleibt relativ konstant, sie können aber bei einer Transposition andere Gene zerstören oder beeinflussen. Bei RNA-Transposons (Retrotransposons) wird die transkribierte RNA in DNA umgeschrieben und dann in das Genom eingebaut. Die Kopienzahl von Transposons in einer Zelle kann ansteigen. Transposons

sind zumindest teilweise Abkömmlinge von Viren oder Phagen.

Unkultivierbare Mikroorganismen, unkultivierte Mikroorganismen: der größte Teil der Mikroorganismen kann nicht in einer Reinkultur im Labor gezüchtet werden. Das liegt z.B. daran, dass diese Organismen unter extremen Bedingungen leben, die im Labor schwer nachzustellen sind (z.B. Organismen, die sich nur bei hohen Temperaturen, unter Sauerstoffausschluss oder unter hohem Druck vermehren). Andere können möglicherweise nur in -> **Symbiose** mit anderen Organismen leben. Bei vielen kennt man die erforderlichen Nährstoffe und Spurenelemente nicht. Durch Versuch und Irrtum versucht man ständig, „unkultivierbare“ Mikroorganismen doch noch kultivierbar zu machen – Manchmal gelingt das.

Aber woher kennt man dann unkultivierbare Mikroorganismen überhaupt? In den meisten Fällen aus der -> **Metagenomik**, bei der die gesamte DNA eines bestimmten Biotops sequenziert wird. Beim Abgleich mit riesigen Datenbanken kann man meistens Verwandtschaften zu bekannten Organismen finden, nicht aber genau diese DNA-Sequenz. Das heißt, man hat einen neuen Organismus entdeckt, den man aber nie direkt gesehen hat.

Impressum:

BioWissKomm – Wolfgang Nellen
Geschw. Scholl Platz 5,
34225 Baunatal
info@biowisskomm.de
+49 1523 2705202

Das Projekt „CRISPR-Whisper“ wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP2141 gefördert.



JAHRESTAGUNG

der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie **2025**



SAVE THE DATE

23–26 MARCH 2025
BOCHUM | GERMANY

www.vaam-kongress.de

Main topics

Microbial interactions
Biocatalysis
Microbial cell biology
Regulation (RNA)
Specialized metabolites





Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

Auf dem Laufenden bleiben mit Online-Angeboten des VBIO

VBIO Dialogforum

Expert/-innen kommen über kontrovers diskutierte Themen mit Bezug zu den Biowissenschaften ins Gespräch.

Faszination Biologie

Wissenschaftler/-innen berichten zu ihrem Forschungsfeld und treten in den Dialog.

Berufsfeld Info-Abende

Berufspraktiker/-innen informieren über ihren Berufsalltag und beantworten Fragen zu konkreten Einstiegschancen.

Softskill-Seminare

Erfahren Sie mehr über die eigene Persönlichkeit, eigene Fähigkeiten und ihre Außenwirkung.

Aktuelle Termine



Jetzt unter www.vbio.de beitreten!





Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

