

NEUE VERFAHREN IN DER PFLANZENZÜCHTUNG

DIE NEUEN GENSCHEREN: ZIELGERICHTET UND PRÄZISE

Während bei der klassischen Mutagenese mit Hilfe von Röntgen-, UV-, Gamma-Strahlen oder Chemikalien zufällige Mutationen erzeugt werden, ermöglicht es die zielgerichtete Mutagenese, Mutationen an definierten Stellen im Genom zu erzeugen. Durch einfach anzuwendende Verfahren wie der Genschere CRISPR-Cas und die rasche Umsetzung von Züchtungserfolgen gewinnt die zielgerichtete Mutagenese zunehmend an Bedeutung.

Margit Laimer

Bisher wurden die meisten Genfunktions-Analysen mittels RNAi und Transgenese erzielt, die zwar wirksam, aber nicht zielgerichtet waren. Seit kurzem werden verschiedene Methoden von Genome-Editing zur gezielten Veränderungen im Genom von Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und auch beim Menschen eingesetzt. Das Genome-Editing kann mit unterschiedlichen Techniken durchgeführt werden, wobei immer an vorherbestimmten Stellen gezielt DNS-Strangbrüche entstehen. Diese Maßnahmen können zu Insertionen, Deletionen (Indels) oder zum Austausch von DNS-Sequenzen an spezifischen Orten führen. So kann Genome-Editing zum gezielten Ausschalten (Knock-out) oder Einführen eines Gens an einer spezifischen Stelle (Knock-in), oder zur Korrektur einer Punktmutation verwendet werden.

TECHNOLOGIEN IM ÜBERBLICK

ZFN Genome-Editing. Die künstlich erzeugten Zinkfingernukleasen (ZFN) bestehen aus einer Zinkfingerdomäne, die spezifisch an DNS bindet, und einem Restriktionsenzym, welches die DNS schneidet. Danach aktiviert die Zelle ihren Reparaturmechanismus, der zu kleinen Veränderungen (Indels) in der Gensequenz führen kann. Daher sind ZFN besonders wirksam, um Genfunktionen auszuschalten. Die Enzyme fanden aber keine breite Anwendung, weil sie schwierig herzustellen und sehr teuer sind.

TALEN Genome-Editing. Die „Transcription activator-like effector Nucleasen“ (TALEN) bestehen ebenfalls aus einer DNS-bindenden Domäne und einem Restriktionsenzym (FokI). Mittels TALEN können an einer bestimmten Stelle im Erbgut gezielte punktuelle Mutation herbeigeführt werden, ohne dass in der Pflanze fremdes Genmaterial enthalten ist.

Meganukleasen. Meganukleasen vom Typ Homing-Endonukleasen erkennen im Gegensatz zu Restriktionsenzymen wie FokI längere Sequenzen von 20 bis 30 Basenpaaren. Dadurch wird eine Nukleinsäure auch bei einzelnen auftretenden Punktmutationen in der Erkennungssequenz noch geschnitten.

CRISPR. „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat“ (CRISPR) wurde ursprünglich als prokaryotisches Abwehrsystem entdeckt. 2012 zeigten Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier's Forschungsarbeiten, dass man mit dem CRISPR-Cas-System relativ einfach punktgenaue Veränderungen der Erbsubstanz vornehmen kann.

CRISPR funktioniert ganz anders als die bisher bekannten Systeme. Mit einer

„Sonde“ (CRISPR) kann man DNS-Bausteine punktgenau ansteuern und mit einer molekularen „Schere“ (Cas9) den DNS-Doppelstrang dort durchtrennen. Grundlage dafür ist das Restriktionsenzym namens Cas9, das mit Hilfe einer kurzen „guide RNA“ an seine Ziel-DNS geleitet wird. Während der folgenden Reparatur durch den zelleigenen Reparaturmechanismus treten Lesefehler auf, wodurch Gene ausgeschaltet (Knock-out), gewünschte Sequenzen eingefügt (Knock-in) oder Modifikationen erzielt werden können.

UNTERSCHIEDE ZU BISHERIGEN METHODEN

Die Einstufung von TALEN, ZFN und CRISPR-Cas zur züchterischen Verbesserung von Nutzpflanzen ist für die Anwendbarkeit dieser Methoden in der



Pflanzenzüchtung von eminenter Bedeutung. Aus wissenschaftlicher Sicht sind mittels Gen-Editing erzeugte Pflanzen nicht automatisch als GVOs (Genetisch Veränderte Organismen) zu betrachten, vor allem wenn bei der Behandlung keine zusätzlichen DNS-Bausteine eingebaut werden. Dies wäre nämlich typisch für GVOs, wie sie in den RL 90/220/EEC und 82/472/EEC definiert wurden. Gelingt es aber z.B. mittels CRISPR-Cas die Mutation als eine Deletion oder einen Austausch von Basen zu erzielen, so tragen diese Pflanzen keine zusätzlichen neuen DNS-Bausteine.

Universitätsprofessor Stefan Jansson von der Universität Umea hat der Königlichen Schwedischen Akademie der Wissenschaften (KVA) und den schwedischen Behörden anhand von fünf Arabidopsis PsbS Mutanten (siehe Kasten 1: „A GMO or not a GMO?“) die Frage gestellt, welche davon einer Einstufung als GVO unterliegen würden. Mutanten A und B sind von der Europäischen GVO-Richtlinie nicht betroffen. Mutante C ist, obwohl die T-DNS-Sequenzen in Pflanzen wie Tabak und Süßkartoffel natürlich vorkommen, als GVO eingestuft. Mutante D enthält noch Fremd-DNS und wird daher als GVO betrachtet. Mutante E enthält keine Fremd-DNS und ihr fehlen nur einige Basenpaare im PsbS Gen.

Bedeutet dieses Entfernen einiger Basenpaare eine Neukombination von genetischem Material? Wahrscheinlich nicht. Im Vergleich zu Mutanten A und B wäre es unlogisch, Genom-editierte Pflanzen den

Anforderungen der GVO Richtlinie zu unterwerfen. Die schwedischen Behörden waren der Empfehlung der KVA gefolgt und hatten die CRISPR-Pflanzen (D&E), ebenso wie die Bestrahlungsmutante (A) und die chemisch induzierte Mutante (B) im Gegensatz zur transgenen Mutante (C) als nicht unter die GVO Gesetzgebung fallend beurteilt. Warum sollten mittels CRISPR-Cas erzeugte Pflanzen, die eine vergleichbare Mutation tragen wie sie durch Bestrahlung oder chemische Mutagenese erzeugt wurde, anders reguliert werden?

A GMO OR NOT A GMO?

Welche derselben Arabidopsis thaliana PsbS Mutanten, die mit Hilfe von verschiedenen Methoden (A–E) hergestellt wurden, fallen unter die GVO-Gesetze der EU? Das Protein Photosystem II Subunit S (PsbS) spielt in der Photosynthese eine Rolle als Sicherheitsventil“. Pflanzen ohne dieses Protein zeigen eine reduzierte Fitness und geringere Samenproduktion. Mutanten, denen das Gen fehlt oder die ein dysfunktionales Protein produzieren, wurden mit verschiedenen Methoden erzeugt.

A. Bestrahlungsmutante

Die erste PsbS-Mutante wurde durch Bestrahlung mit schnellen Neutronen erzeugt. Die dadurch erzeugten Schäden (Brüche) in der DNS werden von der zelleigenen Reparaturmaschinerie ausgebessert. Während dieses Reparaturvorgangs wurde beispielsweise das ganze PsbS-Gen entfernt und fehlte daher in der gesamten Pflanze. Auch in anderen Genen könnten Veränderungen aufgetreten sein.

B. Chemisch induzierte Mutante

Die zweite PsbS-Mutante wurde durch Behandlung mit Ethylmethansulfonat (EMS) erzeugt. Ein Buchstabe im PsbS Gen wurde ausgetauscht, was zu einem dysfunktionalen Protein führte.

C. Transgene Mutante mittels T-DNS

Die dritte PsbS-Mutante wurde durch T-DNS-Transfer mithilfe des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* erzeugt. Die T-DNS wurde in das pflanzliche PsbS-Gen eingebaut, was zu einer Unterbrechung und damit Funktionsverlust des Gens führte.

D. & E. Genom-editierte Mutanten

Die neueste Methode zur Erzeugung von PsbS Mutanten ist das Genomeditieren durch die CRISPR-Cas-Methode. Dieses System erzeugte zwei Doppelstrangbrüche an vorherbestimmten Stellen im PsbS-Gen. Die DNS-Reparaturmaschinerie reparierte den Bruch und entfernte ein Stück DNS, was zu einem dysfunktionalen PsbS Protein führte. Die intermediäre Mutante (D) enthielt noch Fremd-DNS zur Produktion des CRISPR-Cas-Komplexes, der zum Doppelstrangbruch führte. Die finale Mutante (E) entstand aus Mutante D durch Selbstbestäubung, enthielt keine Fremd-DNS und unterschied sich von der Ausgangspflanze nur durch eine kleine Deletion im PsbS Gen.

DAS BESONDERE POTENZIAL DER NEUEN METHODEN

Mit Hilfe dieser neuen zielgerichteten Methoden können Punktmutationen zielgenau eingefügt werden und die Züchtung ist weniger vom Zufall abhängig. Die Züchtung ist heute auf relativ wenige Arten fokussiert, damit könnten nun auch weniger domestizierte Pflanzen effizient bearbeitet werden. Die menschliche Ernährung könnte ausgewogener und variabler gemacht werden; Pflanzen könnten für ökologische Nischen und besondere Umweltbedingungen adaptiert werden und so besser mit veränderlichen Klimabedingungen zurechtkommen.

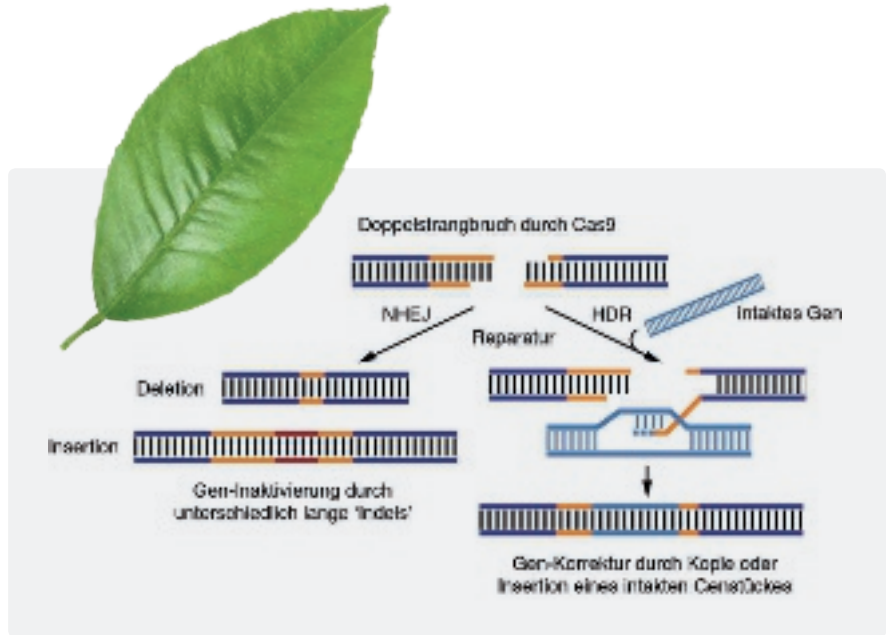
Das wohl augenscheinlichste Beispiel für einen möglichen unmittelbaren Vorteil sind mittels CRISPR-Cas editierte Nutzpflanzen mit reduziertem Allergengehalt, z.B. Äpfel, Erdnüsse, Pfirsiche, aber auch Reis, Weizen und Mais. Bei Biodieselpflanzen könnten mittels CRISPR-Cas die Ölzusammensetzung verändert und der Toxin- und Allergengehalt verringert werden, um einerseits verfütterbare Presskuchen zu gewinnen und andererseits die Exposition bei der Bearbeitung zu verringern.

Der wichtigste Vorteil: **CRISPR-Cas ist einfach und günstig anzuwenden und daher auch für kleine Firmen zugänglich.** Inzwischen wurden erstaunlich viele Weiterentwicklungen und Verbesserungen, die mögliche Schwachpunkte wie etwa das Off-Target-Spalten verhindern, entwickelt.

AKTUELLE ANWENDUNGSBEREICHE

Genome-Editing wird bei Kulturpflanzen, aber auch bei Zierpflanzen eingesetzt. Dabei geht es zum Beispiel um die Verbesserung der Lebens- bzw. Futtermittelqualität, die Verbesserung der Toleranz gegen abiotische und biotische Stressfaktoren, die Modifikation agronomisch relevanter Merkmale, die industrielle Nutzung und die Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen. Über die Datenbank des United States Department of Ag-





Abdruck mit freundlicher Genehmigung der Trillium GmbH, Medizinischer Fachverlag

riculture (USDA) „Am I Regulated?“ kann man bei der US Behörde anfragen, ob neue Pflanzenzüchtungen als GVOs eingestuft werden oder nicht. Genom-editierte Pflanzen ohne „artfremdes“ Genmaterial werden in der Regel nicht als GVO eingestuft und können ohne Genehmigung freigesetzt und vermarktet werden. Bis August 2018 wurden 25 Anfragen zu Genom-editierten Pflanzen (13 Kulturarten) als Nicht-GVO eingestuft, etwa Mehltau-resistente Tomaten und Weizen (CRISPR), Weizen mit niedrigem Glutengehalt (CRISPR), besser lagerfähige Kartoffeln, Raps mit verbesserter Fettsäurezusammensetzung und Schockenfestigkeit (CRISPR), von Tieren besser verdaubare Luzerne, Mais mit spezieller Stärkezusammensetzung, Leindotter mit höheren Ölgehalt und Champignons, die nicht verfärben (CRISPR) sowie Soja mit verändertem Ölgehalt (TALEN).

Derzeit werden mehr als 50 Kulturpflanzenarten mit den neuen Genome-Editing-Verfahren beforscht, angeführt von Reis, gefolgt von Mais, Weizen, Sojabohnen, Kartoffel und Tomaten, aber auch Gemüsearten, Obst, Wein und Zierpflanzen. Bei 80 Prozent der etwa 1200 Publikationen handelt es sich um Grundlagenforschung.

In einer Studie des Julius Kühn-Instituts, des deutschen Bundesforschungsinstituts für Kulturpflanzen vom September 2018 sind 102 Züchtungsprojekte angeführt, die als „marktorientiert“ oder „marktreif“ eingestuft sind. Die meisten stammen federführend aus China (541), gefolgt von den USA (387), Japan (87) und Deutschland(81).

In den USA sind 2018 erstmals Genom-editierte Sojabohnen geerntet worden, die in den letzten fünf Jahren von Calyxt mittels TALEN entwickelt wurden. Diese Sojabohnen enthalten weniger gesättigte Fettsäuren, dafür deutlich mehr der gesundheitlich wertvolleren Ölsäure. Der große Vorteil daraus gewonnener Speiseöle und -fette: Bei hohen Temperaturen bilden sich weniger Trans-Fettsäuren. Im nächsten Jahr kommen davon Speiseöle oder Müsliriegel in den Handel – vor allem im Segment hochwertiger Produkte für gesundheitsbewusste Verbraucher. Auch bei Weizen, Kartoffeln, Raps und Alfalfa (Luzerne) hat Calyxt das TALEN-Verfahren angewandt. Konzerne wie DuPont, Pioneer und Syngenta, aber auch mehrere kleine Technologieunternehmen (Arcadia) oder Startups (Yield10, Bioscience) arbeiten an Markteinführungen.

Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruchs. Der über Cas9 eingeführte Doppelstrang muss in der Zelle möglichst schnell repariert werden. Dies passiert entweder über eine Verknüpfung der Enden (non-homologous end-joining, NHEJ) oder über homologe Rekombination (homology-directed repair, HDR). Im ersten Fall wird meist die genetische Information an der Stelle durch Deletionen oder Insertionen einzelner Nukleotide zerstört. Im zweiten Fall kann eine neue Gensequenz den Fehler reparieren.

ENTSCHEIDUNG DES EUROPÄISCHEN GERICHTSHOFS

Experten aus verschiedenen Ländern haben vorgeschlagen, dass Gen-editierte Pflanzen, sofern sie keine Fremd-DNS enthalten, Pflanzen aus konventioneller Züchtung gleichzustellen sind. Zurzeit ist es in der EU allerdings noch unklar, ob Gen-editierte Organismen als GVOs einzustufen und somit die für GVO gelten Richtlinien anzuwenden sind.

Für Aufsehen sorgte daher die Entscheidung des Europäischen Gerichtshofs vom 25. 7. 2018, dessen Beantwortung einer französischen Anfrage weder der Meinung des Generalstaatsanwalts vom Jänner 2018 noch der Schwedischen Behörden und der KVA entsprach. Der Europäische Gerichtshof urteilte, dass Mutationen im Pflanzengenom, die mit neuen Züchtungstechniken wie CRISPR-Cas erzeugt werden, als Gentechnik einzustufen sind. Dazu werden aber voraussichtlich noch weitere Klärungen der gesetzlichen Auslegung dieses Bescheides erforderlich sein. Der Entscheid des EUGH ist auch hinsichtlich der Definition der Ausnahme der bestrahlten Mutanten schwer nachvollziehbar, denn er betrachtet diese zwar als GVOs, nimmt sie aber von der Regulierung aus. Ansonsten würden viele im Biolandbau verwendete Sorten stark unter Druck geraten.

Die aktuelle Diskussion bringt daher eher zum Ausdruck, dass sich die EU ehrlicherweise zu einer produktorientierten Bewertung der Gen-editierten Pflanzen im Gegensatz zum bisher praktizierten methodenorientierten Bewertungsansatz

hinbewegen bzw. weiterentwickeln sollte. Tatsächlich bietet eine produktorientierte Bewertung, wie sie z.B. in den USA, aber noch viel mehr in Kanada für alle Neuzüchtungen gilt, für die Konsumentinnen eine äquivalente Sicherheit, denn die Endprodukte müssen sorgfältig geprüft werden, bevor sie auf den Markt gelangen.

MÖGLICHE KONSEQUENZEN

Neben den USA und Kanada wollen viele große Agrarproduzenten außerhalb der EU, etwa Argentinien, Brasilien, Kolumbien, Chile, Israel und Australien in jedem Einzelfall über neue Genom-editierte Pflanzen entscheiden. Wenn keine fremde DNS neu eingeführt wurde, dann fallen sie in der Regel nicht unter die Bestimmungen für GVOs und dürfen ohne weitere Auflagen angebaut werden. In etlichen weiteren Ländern laufen Diskussionen zur rechtlichen Einordnung.

Dies wird unweigerlich Konsequenzen für Handelsbeziehungen mit sich bringen. Je mehr Genom-editierte Pflanzen in Ländern außerhalb der EU auf die Felder kommen, umso größer werden die Herausforderungen. In Zukunft wird es kaum zu verhindern sein, dass Genom-editierte Pflanzen in Importen von ausländischen Agrarprodukten unerkannt nach Europa gelangen.

Univ.-Prof. Dr. Margit Laimer, Universität für Bodenkultur Wien, Department Biotechnologie, Abteilung für Pflanzenbiotechnologie, Muthgasse 18, 1190 Wien, margit.laimer@boku.ac.at