https://mail.gen-ethisches-netzwerk.de/node/3847

Gen-ethischer Informationsdienst

Genome Editing ohne Risiko?

Argumente aus der Wissenschaft zum Genome Editing

AutorIn
Katharina Kawall



Versuchsfläche – Betreten Verboten (c) Christof Potthof

Neue Gentechnikverfahren, insbesondere die Techniken des Genome Editing, gelten gegenüber früheren Gentechniken als präziser. Doch auch mit ihrer Nutzung sind Risiken verbunden.

Die Regulierung sogenannter Genome Editing-Verfahren wird derzeit in der Europäischen Union, wie auch in anderen Teilen der Welt, intensiv diskutiert.1 Sie werden zu den neuen Gentechnik-Verfahren gezählt. Das Genome Editing ermöglicht ein gezieltes Eingreifen in das Erbgut von Zielorganismen. Die wichtigsten Verfahren sind die sogenannten SDN-Techniken, das sind insbesondere die sogenannten Zinkfinger-Nukleasen, die TALENs-Technik und das CRISPR-Cas-System.2 Der Fokus in diesem Text liegt vorrangig

auf dem Genome Editing in der Pflanzenzucht. Die Erwartungen der Pflanzenzüchter*innen und Wissenschaftler*innen – insbesondere an CRISPR-Cas sind immens: Sie hoffen mit diesen Werkzeugen neue Sorten zu entwickeln.

Funktion und Aufbau von Genome Editing-Verfahren

Gemein ist den SDN-Techniken eine Erkennungskomponente, die den Bereich des Erbgutes, der verändert werden soll, gezielt entdeckt. Mit deren Hilfe findet die zweite Komponente, die sogenannte Nuklease, zu ihrer Zielregion in der DNA – eben dem Ort im Erbgut, der verändert werden soll. Bei ZFN und TALENs basieren die Erkennungskomponenten, die die Zielregion spezifisch erkennen, auf Proteinbereichen. Das Design und die Optimierung dieser Erkennungskomponenten ist ein relativ teurer und langwieriger Prozess.

Einsatz des CRISPR-Cas-Systems

Das CRISPR-Cas-System stammt ursprünglich aus Bakterien und dient ihnen als eine Art Immunsystem gegen eindringende Viren. Verschiedene Bakterienarten haben jeweils eigene Cas-Varianten, die durch Forscher*innen in zwei große Klassen und innerhalb derer in weitere Subtypen unterteilt wurden. Die Varianten benötigen jeweils eine charakteristische DNA-Erkennungssequenz (PAM-Sequenz), damit die Nuklease den Zielbereich mit der guide RNA (siehe Kasten Seite 10) abtasten und im Falle einer Übereinstimmung schneiden kann. Im Falle von Cas9 kann jede DNA-Sequenz verändert werden, der ein sogenanntes NGG vorausgeht, eine ganz bestimmte Sequenz, die aus zwei Guanin-Bausteinen in Verbindung mit einem beliebigen weiteren Nukleotid besteht. Somit sind mit Cas9 nicht uneingeschränkt alle Bereiche des Erbguts editierbar. Die rasante Entwicklung und Charakterisierung neuer Cas-Varianten mit unterschiedlichen PAM-Sequenzen erweitert das Spektrum des Genome Editing jedoch immer weiter. Die Grundlage ist, dass die DNA-Region, die verändert werden soll bekannt ist und ausgehend von dieser dann eine PAM-Sequenz und ein passender Zielbereich ausgesucht werden.
Die Möglichkeiten für den Einsatz des CRISPR-Cas-Systems sind vielfältig: Es hat die molekularbiologische Arbeit in den Laboren der Welt revolutioniert und ermöglicht das gezielte Umschreiben des Erbgutes von sowohl tierischen als auch pflanzlichen Zellen in – verglichen mit anderen Verfahren – sehr kurzer Zeit. Genome Editing wird in der Grundlagenforschung, der angewandten medizinischen Forschung und in der Entwicklung neuer Pflanzen- und Tiersorten eingesetzt. Zum Beispiel sollen die Tiere den Bedingungen der Massentierhaltung angepasst und die Verträglichkeit bestimmter tierischer Produkte für den Menschen verbessert werden. Die Zulassung solcher Produkte steht allerdings derzeit noch nicht zur Diskussion und wird noch einige Zeit dauern.

Komplexe Veränderungen des Erbgutes möglich

CRISPR bietet die Möglichkeit, gleichzeitig oder sukzessiv, mehrere Zielsequenzen der DNA zu verändern. Unterschiedliche guide RNAs werden hierfür gleichzeitig oder nach und nach in den Zielorganismus eingebracht. Das wird in der Fachsprache als „Multiplexing“ bezeichnet. Durch Multiplexing können zum Beispiel mehrere Gene gleichzeitig ausgeschaltet werden. Auch können durch Multiplexing große Bereiche des Genoms gelöscht werden, indem die Sequenz, die zwischen zwei Zielsequenzen liegt, entfernt wird. So können relativ schnell ganz neue Kombinationen genetischen Materials hergestellt werden. Die Eingriffstiefe 3 mit der hier gearbeitet wird, kann durch konventionelle Züchtung – insbesondere in einem vergleichbar kurzen Zeitrahmen – nicht erreicht werden. Aufgrund der Schnelligkeit mit der Veränderungen bewirkt werden können und der erhöhten Eingriffstiefe dieser Verfahren ist es wichtig, Genom editierte Organismen eingehend zu untersuchen und zu prüfen. Einzelne Veränderungen (und Kombinationen davon) können zelluläre Effekte nach sich ziehen, die auf den ersten Blick nichts mit der ursprünglichen Veränderung zu tun haben. Proteine interagieren innerhalb von Signalwegen miteinander. Darin können sie sich beispielsweise gegenseitig in ihrer Wirkung hemmen oder verstärken oder sie können ihre Bildung gegenseitig regulieren. Wird eine Komponente in diesem Netzwerk verändert, hat das somit meist auch Auswirkungen auf andere

Signal- und Stoffwechselwege. Diese können aus dem Gleichgewicht geraten. Werden mehrere Veränderungen eingebracht, vergrößern sich solche Effekte. Die Veränderungen sollten also niemals isoliert und linear betrachtet werden, sondern immer im Kontext eines im Gleichgewicht stehenden biologischen Systems. Die Zielgenauigkeit der Verfahren bedeutet nicht automatisch, dass die Auswirkungen auf ein komplexes, biologisches System vorhersagbar, geschweige denn sicher sind. Die Möglichkeiten sind groß, die Folgen allerdings schwer abschätzbar.
Ein Beispiel für die Komplexität möglicher Effekte und die gegenwärtige Unwissenheit darüber kommt aus der medizinischen Forschung: Es konnte unabhängig voneinander in zwei Studien gezeigt werden, dass durch die DNA-Doppelstrangbrüche, die durch CRISPR-Cas herbeigeführt wurden, ein Notfall-System der Zelle aktiviert wird.[4], [5] Ein zentrales Protein darin wird als „p53“ bezeichnet. Wird dieses Protein gewollt oder ungewollt ausgeschaltet, können sich schädliche Mutationen im Erbgut anreichern, denn die Zelle kann nicht mehr prüfen, ob der Schaden am DNA-Doppelstrang repariert werden soll oder die Zelle kontrolliert abstirbt. Ist dieses Notfall-System deaktiviert, können effizienter gezielte Veränderungen (SDN-2 und SDN-3 Veränderungen; siehe Kasten Seite 10) am Erbgut vorgenommen werden, denn die Zellen werden nicht in den Notfall-Ruhestand versetzt. Gleichzeitig können sich aber an anderer Stelle im Genom Mutationen anhäufen. In Pflanzen gibt es das Protein p53 nicht, hier wurde erst vor kurzem ein Protein identifiziert, das anscheinend ähnliche Funktionen übernimmt. Auch hier sind also entsprechende Effekte denkbar.
Eine weitere Möglichkeit, die CRISPR den Anwender*innen bietet, ist die schnelle und gleichzeitige Veränderung von mehreren Kopien eines Gens. Pflanzenarten, wie beispielsweise Weizen oder Mais, besitzen mehr als zwei Chromosomensätze, was in der Biologie als Polyploidie bezeichnet wird. Weiterhin kommen im pflanzlichen Genom sogenannte Genfamilien vor, innerhalb derer die Gene in ihrer Sequenz identisch oder sich sehr ähnlich sind. Das CRISPR-Cas-System kann mehrere bis alle Genorte mit identischer oder sehr ähnlicher Genstruktur auf einmal verändern. Ausschlaggebend ist hier das verwendete Protokoll nach dem gearbeitet und wie genau diesem gefolgt wird – zum Beispiel in Bezug auf die Konzentration der beteiligten Proteine oder der Temperatur. Die Methoden werden gleichzeitig an mehreren Pflanzenzellen durchgeführt und nicht in jeder funktionieren sie gleich. Aus jeder dieser Zellen kann eine komplette Pflanze regeneriert werden. So können sich Wissenschaftler*innen am Ende die Zelle mit dem gewünschten Ausmaß an Veränderungen einfach aussuchen und mit dieser weiterarbeiten. Dafür gibt es Standard-Screeningmethoden. Komplexere Veränderungen sind mit konventionellen Züchtungsmethoden – wenn überhaupt – nur in einem sehr langwierigen Prozess umsetzbar, oft jedoch bisher gar nicht zu realisieren.

Nebeneffekte bei der CRISPR-Anwendung

Auch bei der Anwendung des CRISPR-Cas-Systems können ungewollte Veränderungen der DNA an Stellen auftreten, an denen Sie nicht vorgesehen waren. Das System arbeitet nicht immer hundertprozentig genau, sondern toleriert eine gewisse Anzahl an Fehlpaarungen zwischen den Basen der guide RNA und denen der Zielsequenz. Diese Art von nicht beabsichtigten Änderungen wird als Off-Target-Effekt bezeichnet. Basierend auf Referenzgenomen lassen sich mit Hilfe von Computerprogrammen in gewissem Umfang mögliche Bereiche der DNA vorherbestimmen, in denen Off-Target-Effekte mit einer höheren Wahrscheinlichkeit stattfinden können als in anderen. In vielen Untersuchungen wird im Genom der „editierten Organismen“ nur in diesen Bereichen nach ungewollten Veränderungen gesucht. Studien in Ratten und Mäusen haben jedoch gezeigt, dass auch in den anderen Bereichen des Genoms Off-Target-Veränderungen auftreten können.[6]
Es können sich auch ungewollte Veränderungen durch den Einbau von zellfremder DNA in das Genom der Pflanze ergeben. Ein potentielles Risiko birgt hier zum Beispiel das Einschleusen der DNA in die Zelle, die als Vorlage für die Herstellung der Cas-Nuklease dient. Die DNA sollte eigentlich rasch abgebaut werden, teilweise verbleibt sie jedoch für einen längeren Zeitraum innerhalb der Zellen. Teile dieser DNA können am Zielort (man spricht dann von On-Target-Effekten), als auch an anderen Off-Target-Bereichen der DNA unbeabsichtigt in das Erbgut einfügt werden. Da häufig nur an der Zielsequenz nach möglichen Resten der DNA für die Nuklease gesucht wird oder an Bereichen die der Zielsequenz sehr ähnlich sind, besteht die Gefahr, dass solche Off-Target-Veränderungen übersehen werden.

EuGH: Genome Editing ist Gentechnik

Das Urteil des Europäischen Gerichtshofes (EuGH) hat alle Organismen, die durch Verfahren des Genome Editing verändert wurden, als gentechnisch veränderte Organismen definiert. Sie werden durch das bestehende Gentechnikgesetz reguliert und müssen einer eingehenden Risikoprüfung unterzogen werden. Auch wenn Genome Editing viele neue Möglichkeiten bietet, ist es noch viel zu früh deren Präzision vollständig zu bestätigen. Es bestehen zu viele Unwägbarkeiten, die bislang noch schwer abzuschätzen sind und im Laufe der Jahre eingehend untersucht werden müssen.
Einzelne Punktmutationen, die natürlicherweise in einzelnen Pflanzen entstehen und sich im Laufe der Evolution etablieren, als natur-identisch gleichzusetzen mit gezielten Veränderungen durch Genome Editing, herbeigeführt im Labor, ist irreführend. Es ist ein großer Unterschied, ob eine Punktmutation in einer Pflanze in der Natur auftritt, oder in Pflanzen gezielt erzeugt wurde und über viele Hektar auf einem Feld ausgebracht wird.

- 1Siehe dazu zum Beispiel: CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union. Nature news, 25.07.18, www.nature.com. [letzter Zugriff: 23.10.18].
- 2Die Abkürzungen leiten sich wie folgt ab: SDN (Site directed nucleases); ZFN (Zinkfinger-Nukleasen); TALENs (Transcrition activator-like effector nucleases); CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR associated).
- 3Die Eingriffstiefe ist ein Kriterium der Technikfolgenabschätzung, sie bewertet die gezielte technische Manipulation von elementaren Strukturen, an der Molekülstruktur und am Erbgut. Vgl. Gleich, A. von (1996): Äquivalente Risiken – mit und ohne Gentechnik? Zeitschrift für Technikfolgenabschätzung in Theorie und Praxis, Nr. 1, Jg. 5. www.tatup-journal.de/tadn961_diskus3.php [letzter Zugriff: 24.10.18].
- 4Haapaniemi, E./Botla, S./Persson, J./Schmierer, B./Taipale, J. (2018): CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. In: Nature Medicine, 24, 927-930, doi: 10.1038/s41591-018-0049-z [letzter Zugriff: 23.10.18].
- 5Ihry, R. J./Worringer, K. A./Salick, M. R./Frias, E./Ho, D./Theriault K./Kaykas, A. (2018): p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. In: Nature Medicine, 24, 939-946, doi: 10.1038/s41591-018-0050-6 [letzer Zugriff: 23.10.18].
- 6Anderson, K. R./Haeussler, M./Watanabe, C./Janakiraman, V./Lund, J./Modrusan, Z./Warming, S.(2018): CRISPR off-target analysis in genetically engineered rats and mice. In: Nature Methods, 15, 512-514, doi: 10.1038/s41592-018-0011-5 [letzter Zugriff: 23.10.18].

Informationen zur Veröffentlichung

Erschienen in:
GID Ausgabe 247 vom November 2018
Seite 9 - 12