

Gen-Schere verursacht Chaos im Erbgut von Pflanzen

Erstmals ‚Chromothripsis‘ nach Einsatz von CRISPR/Cas bei Pflanzen beschrieben

Zusammenfassung

Aktuelle Publikationen zeigen, dass der Einsatz der Gen-Schere CRISPR/Cas bei Pflanzen mit einem wesentlich höheren Risiko für tiefgreifende Störungen des Genoms verbunden ist als bisher angenommen wurde. Davon können große Regionen im Erbgut betroffen sein.

Dabei spielt die sogenannte ‚Chromothripsis‘ eine wichtige Rolle. Mit Chromothripsis wird ein Phänomen bezeichnet, bei dem sich in einem ‚katastrophischen‘ Ereignis einige hundert von genetischen Veränderungen auf einmal ereignen können. Dabei können viele Abschnitte des Erbguts vertauscht, verdreht, neu kombiniert oder auch verloren gehen. Bei Zellen von Säugetieren (und Menschen) war bereits bekannt, dass diese Effekte durch den Einsatz der Gen-Schere CRISPR/Cas ausgelöst werden können. Jetzt wurden erstmals auch chromothripsisartige Effekte bei Pflanzen nachgewiesen, deren Erbgut mit CRISPR/Cas verändert wurde.

Die genauen Mechanismen der Chromothripsis sind nicht vollständig erforscht. Bekannt ist aber, dass die gleichzeitige Durchtrennung von beiden Strängen des Erbguts ein Auslöser für diese chaotischen Effekte sein kann. Durch die Durchtrennung der beiden Stränge der DNA, wie sie in der Regel durch den Einsatz der Gen-Schere CRISPR/Cas bewirkt wird, verlieren die Chromosomen den Kontakt zu den dabei abgetrennten Enden. Misslingt die Reparatur dieses Bruchs, kann das abgetrennte Ende verloren gehen oder sich neu strukturieren und auch an anderen Stellen des Genoms eingebaut werden.

Die Häufigkeit dieses Ereignisses wird durch den Einsatz der Gen-Schere wesentlich erhöht. Zudem steigt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass auch Stellen im Erbgut betroffen sein können, die ansonsten besonders gut geschützt sind. Die möglichen Folgen umfassen eine breite Palette von Risiken wie Störung der Pflanzengesundheit, veränderte Interaktionen mit der Umwelt und unerwünschte Veränderungen von Pflanzeninhaltsstoffen.

Die jetzt vorliegenden Ergebnisse werfen ein neues Licht auf die angebliche Präzision der Gen-Schere: Zwar können mit Hilfe der Neuen Gentechnik bestimmte Orte im Erbgut gezielt angesteuert werden, um es an dieser Stelle zu durchtrennen. Doch die Folgen der ‚Schnitte‘ ins Erbgut sind nicht zu wenig vorhersagbar und nicht kontrollierbar. Unbeabsichtigte genetische Veränderungen können große Abschnitte der Chromosomen betreffen. In der Konsequenz können die aus den Verfahren der Neuen Gentechnik resultierenden Pflanzen nicht per se als ‚sicher‘ angesehen werden, sondern müssen eingehend auf Risiken geprüft werden.

Der Einsatz der Gen-Schere begünstigt das Auftreten von Chromothripsis

Treten spontane Mutationen auf, versuchen die Zellen den Defekt zu reparieren und können in vielen Fällen die ursprüngliche Funktion wiederherstellen. Da wichtige Genfunktionen oft besonders gut vor Funktionsverlusten geschützt sind, treten Mutationen nicht überall mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf (bspw. Monroe et al., 2022).

Die Neue Gentechnik (NGT) unterscheidet sich von diesen natürlichen Prozessen : Der Einsatz der Nuklease (,Gen-Schere‘) CRISPR/Cas bewirkt in der Regel, dass beide Stränge des Erbguts durchtrennt werden. Versuchen die Zellen, die ursprüngliche Genfunktion wiederherzustellen, kann die Nuklease die reparierte Zielregion erkennen, dort erneut schneiden und so die Reparaturprozesse stören. Weil insbesondere bei Pflanzen die relevanten Gene oft in mehreren Kopien vorliegen, führt der Einsatz der Gen-Schere häufig dazu, dass viele DNA-Doppelstrangbrüche im Erbgut gleichzeitig und in einem bestimmten Muster auftreten (siehe z.B. Sanchez-Leon et al., 2018). Dabei können auch Regionen im Erbgut verändert werden, die besonders gut vor Funktionsverlusten geschützt sind (Kawall, 2019).

Bereits bekannt war, dass durch den Einsatz der Gen-Schere die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Chromothripsis bei Zellen von Säugetieren (und Menschen) wesentlich erhöht wird (Ledford 2020; Leibowitz et al., 2021; Amendola et al., 2022). Es gibt wegen diesen katastrophischen DNA-Veränderungen, die auch als ,CRISPRthripsis‘ bezeichnet werden, schwerwiegende Bedenken in Bezug auf mögliche klinische Anwendungen von CRISPR/Cas9 (Amendola et al., 2022). Jetzt wurden diese Effekte erstmals auch bei Pflanzen in Folge der Anwendung von CRISPR/Cas bestätigt. Bereits zuvor war Chromotripsis bei Pflanzen in Zusammenhang mit anderen gentechnischen Verfahren entdeckt worden (Chu & Agapito-Tenfen, 2022).

Die Mechanismen der Chromothripsis

Nach einer aktuellen Publikation (de Groot et al. 2023) sind Doppelstrangbrüche ein Auslöser für Chromothripsis. Zwar wird der Vorgang noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Aber es besteht kein Zweifel daran, dass insbesondere der Einsatz der Nuklease CRISPR/Cas die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieser Effekte wesentlich erhöhen kann.

Es wird angenommen, dass gestörte Reparaturprozesse eine entscheidende Rolle spielen (de Groot et al., 2023): Gelingt es den Zellen nicht sofort, die voneinander getrennten Enden der DNA wieder miteinander zu verbinden, können in den von den Chromosomen abgetrennten Enden verschiedene Prozesse ablaufen. Diese können große Teile der Chromosomen betreffen und erhebliches Chaos verursachen. Dabei werden Abschnitte des Erbguts verdreht eingebaut, vervielfältigt oder können auch ganz verloren gehen. In manchen Fällen verbinden sich die Enden der DNA der betroffenen Chromosomen trotz dieser Veränderungen wieder, in anderen Fällen werden neue Verbindungen zu anderen Abschnitten der Chromosomen aufgebaut, was zu größeren Veränderungen in der Struktur des Erbguts führen kann. Es ist auch möglich, dass große Abschnitte des Erbguts verloren gehen.

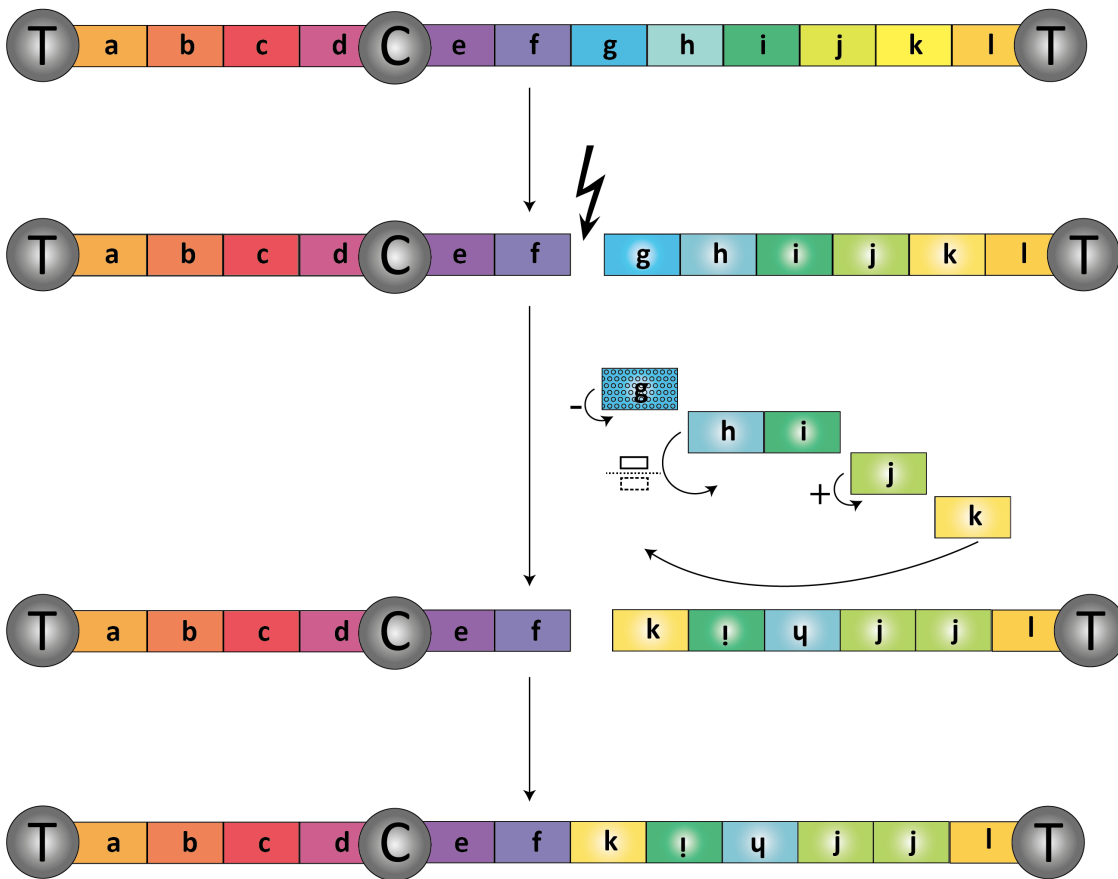


Abbildung: Mögliche Folgen der Chromothripsis: In den von den Chromosomen abgetrennten Teilen des Erbgut können verschiedene Prozesse gleichzeitig ablaufen. Dabei werden Abschnitte des Erbguts verdreht eingebaut, vervielfältigt oder können auch ganz verloren gehen (adaptiert von de Groot et al., 2023).

Bei Säugetieren (und Menschen) können diese Prozesse u.a. Krebskrankheiten auslösen (Leibowitz et al., 2021). Bei Pflanzen kann die Aktivität von Genen verändert und Stoffwechselprozesse gestört werden. Es können auch neue Inhaltsstoffe in den Pflanzen entstehen. Damit gehen möglicherweise negative Folgen für Mensch und Umwelt oder die Gesundheit und Widerstandskraft der Pflanzen einher. Die Risiken sind vorab nicht generell abschätzbar, sondern müssen in jedem Einzelfall untersucht werden.

Beobachtungen bei Pflanzen

In einer aktuellen Publikation von WissenschaftlerInnen aus Israel (Samach et al., 2023) wird über Versuche an Tomaten berichtet. Zur Identifizierung von Chromothripsis nach Einsatz der Gen-Schere CRISPR/Cas wurden zunächst zusätzliche Gene inseriert, die einen gut erkennbaren Farbstoff produzieren.

Bei diesen Pflanzen wurde mit Hilfe der Gen-Schere der Teil der DNA vom Rest der Chromosomen getrennt, auf dem das Gen für den künstlichen Marker inseriert war. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Zellen diesen Schnitt so reparieren, dass nur diese Stelle verändert ist. Die Genabschnitte davor und danach sollten unverändert bleiben.

In einem Teil der Pflanzen veränderte sich danach aber die Konzentration des Farbstoffes, was darauf hindeutet, dass keineswegs nur die Zielregion vom Einsatz der Gen-Schere betroffen war: Der Farbstoff ging entweder verloren oder wurde, in wenigen Fällen, sogar intensiver exprimiert. Bei diesen Pflanzen wurde das Erbgut genauer untersucht. Dabei stellte man eine große Palette unbeabsichtigter Effekte fest:

- In wenigen Fällen fand sich der künstliche Gen-Marker jetzt auf beiden Strängen der DNA, d.h. nach dem Bruch der DNA hatte sich der betroffene Genabschnitt verdoppelt (das Merkmal war also homozygot). Die resultierenden Tomaten zeigten eine intensive Veränderung der Farbe in ihren Blüten und Früchten.
- In mehreren Fällen ging der Farbstoff verloren, weil der jeweilige Chromosomenabschnitt von Chromothripsis betroffen war. In diesen Fällen wurden der Verlust des gesamten Chromosoms oder aber größere Umlagerungen von DNA, der Verlust von größeren Teilen des Erbguts sowie neue Kombinationen von Genabschnitten beobachtet.

Die WissenschaftlerInnen (Samach et al., 2023) schließen daraus, dass der Einsatz der Gen-Schere zum ‚katastrophischen Ereignis‘ der Chromothripsis führte. Bisher war dieser Effekt bei Pflanzen in Zusammenhang mit der Gen-Schere unbekannt, vermutlich auch deswegen, weil bisher keine derartigen Untersuchungen durchgeführt wurden. Tatsächlich sind die Effekte der Chromothripsis nicht immer einfach zu entdecken: geht nach dem Einsatz der Gen-Schere wie erwartet eine bestimmte Eigenschaft verloren, kann dies durch den beabsichtigten Schnitt im Erbgut oder aber auch chromothripsisartige Veränderungen verursacht werden, die viel größere Abschnitte im Erbgut betreffen.

Zwar ist der Peer-Review der Publikation von Samach et al. (2023) noch nicht abgeschlossen, aber die Ergebnisse sind plausibel und stimmen mit anderen Untersuchungen über die Auslösemechanismen und die Effekte von Chromothripsis überein. Deswegen sollten die Versuchsergebnisse in der weiteren Diskussion über die Regulierung des Einsatzes der Neuen Gentechnik bei Pflanzen berücksichtigt werden.

Bewertung im Hinblick auf Regulierung

Bei Zellen von Säugetieren (und Menschen) werden die Effekte der CRISPRthripsis, die durch den Einsatz der Gen-Schere ausgelöst werden, schon seit einigen Jahren intensiv erforscht, weil sie unter anderem zu Entwicklungsstörungen und Krebskrankheiten führen können (siehe u.a. Leibowitz et al., 2021).

Dagegen wurden sie bei Pflanzen erst jetzt in Zusammenhang mit dem Einsatz der Gen-Schere CRISPR/Cas nachgewiesen (Samach et al., 2023). Hier können sie zu erheblichen Veränderungen im Stoffwechsel von Pflanzen führen, die auch negative Auswirkungen auf die Sicherheit von Mensch und Umwelt haben und die Zukunft der Pflanzenzucht gefährden können.

Daraus ergibt sich ein erhöhter Regulierungsbedarf: Zwar können (Doppel-)Strangbrüche der DNA auch durch andere Ursachen ausgelöst werden, wie z.B. hoch dosierte radioaktive Bestrahlung. Ob diese Veränderungen aber an denselben Orten mit der gleichen Häufigkeit auftreten und zu ähnlichen Wirkungen führen, muss bezweifelt bzw. untersucht werden.

Generell kann man davon ausgehen, dass durch den Einsatz von physikalischen und chemischen Mitteln zur Auslösung von ungezielten genetischen Veränderungen, die der Erhöhung der genetischen Vielfalt dienen, keine Ereignisse ausgelöst werden, die nicht auch natürlicherweise zu erwarten wären (siehe bspw. EFSA 2021).

Anders verhält es sich bei der Neuen Gentechnik: Es ist bekannt, dass die durch biotechnologische Mutagene (wie der Gen-Schere) herbeigeführten genetischen Veränderungen und die daraus resultierenden Muster sich deutlich von denen unterscheiden können, die aus ‚zufälligen‘ Prozessen zu erwarten sind (Übersicht bei Koller et al., 2023). Diese Effekte beeinflussen zwangsläufig auch den Ort und die Häufigkeit des Auftretens von Chromothripsis. Zudem erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass die Wechselwirkungen der Gen-Schere mit den Reparaturprozessen in der Zelle das Auftreten und den Verlauf der Chromothripsis begünstigen bzw. verstärken können.

Viele AkteurInnen hoffen, dass der Einsatz der Gen-Schere zu einer Beschleunigung der Züchtung führen wird, weil ihr Einsatz einfach, präzise und nebenwirkungsfrei sei. Die neuen Forschungsergebnisse zeigen aber, dass dies so nicht zu halten ist: CRISPR/Cas kann zu zahlreichen, weitreichenden und unerwarteten genetischen Veränderungen führen, die nicht nur im Hinblick auf die Sicherheit, sondern auch im Hinblick auf die Folgen für die weitere Züchtung eingehend geprüft werden müssen.

Bisher scheint die Politik darauf zu setzen, dass es ausreichend wäre, bei der Risikoprüfung von Pflanzen aus Neuer Gentechnik nur die beabsichtigten genetischen Veränderungen zu berücksichtigen (siehe bspw. Testbiotech, 2023). Im Resultat würden die Effekte der Chromothripsis in vielen Fällen unerkannt bleiben. Ob und wie sie sich dann langfristig auswirken, kann von vielen Faktoren wie bestimmten Genkombinationen und Umwelteinflüssen abhängen. Die Veränderungen könnten auch über längere Zeit unerkannt in den Zuchtpopulationen akkumulieren und so die Pflanzenzucht der Zukunft belasten und die Ernährungssicherheit gefährden.

Referenzen

Amendola M., Brusson M., Miccio A. (2022) CRISPRthripsis: the risk of CRISPR/Cas9-induced chromothripsis in gene therapy. *Stem Cells Transl Med*, 11_ 1003-1009.

<https://doi.org/10.1093/stcltm/szac064>

de Groot, D., Spanjaard, A., Hogenbirk, M.A., Jacobs, H. (2023) Chromosomal rearrangements and chromothripsis: the alternative end generation model. *Int J Mol Sci*, 24, 794.

<https://doi.org/10.3390/ijms24010794>

Chu, P. & Agapito-Tenfen, S.Z. (2022) Unintended Genomic Outcomes in Current and Next Generation GM Techniques: A Systematic Review. *Plants*, 11, 2997.

<https://doi.org/10.3390/plants11212997>

EFSA GMO Panel (2021) In vivo and in vitro random mutagenesis techniques in plants. *EFSA J*, 19(11): 6611. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6611>

Kawall K. (2019) New possibilities on the horizon: genome editing makes the whole genome accessible for changes. *Front Plant Sci*, 10: 525. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00525>

Koller F., Schulz M., Juhas M., Bauer-Pankus A., Then C. (2023) The need for assessment of risks arising from interactions between NGT organisms from an EU perspective,. *Environ Sci Eur*, 35(1): 27. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00734-3>

Ledford, H. (2020), CRISPR Gene Editing in Human Embryos Wreaks Chromosome Mayhem, *Nature* 583, 17-18, <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01906-4>

Leibowitz M.L., Papathanasiou S., Doerfler P.A., Blaine L.J., Sun L., Yao Y., Zhang C.-Z., Weiss M.J., Pellman D. (2021) Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Genet*, 53(6): 895-905. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00838-7>

Monroe G., Srikant T., Carbonell-Bejerano P., Becker C., Lensink M., Exposito-Alonso M., Klein M., Hildebrandt J., Neumann N., Kliebenstein D., Weng M.-L., Imbert E., Ågren J., Rutter M.T., Fenster C.B., Weigel D. (2022) Mutation bias reflects natural selection in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 602: 101-105. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04269-6>

Samach A., Mafessoni F., Gross O., Melamed-Bessudo C., Filler-Hayut S., Dahan-Meir T., Amsellem Z., Pawlowski W.P., Levy A.A. (2023) A CRISPR-induced DNA break can trigger crossover, chromosomal loss and chromothripsis-like rearrangements. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.05.22.541757>

Sanchez-Leon S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Gimenez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*, 16: 902-910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>

Testbiotech (2023) The mandate of EFSA and unintended genetic changes caused by NGTs, letter to the EU Commission, [https://www.testbiotech.org/sites/default/files/Letter%20Testbiotech Commission May %202023.pdf](https://www.testbiotech.org/sites/default/files/Letter%20Testbiotech%20Commission%20May%202023.pdf)