



Stellungnahme der DGfZ zu Chancen und Risiken des Gen-Editings bei Nutztieren

Für landwirtschaftliche Nutztiere, wie Rind, Schwein, Pferd und Schaf liegen inzwischen informative Genkarten vor, die in Verbindung mit innovativen Techniken der Hochdurchsatz-Genotypisierung die Grundlage für die Entwicklung neuer Züchtungskonzepte bilden. Ein prominentes Beispiel ist die schnelle Einführung des genomischen Zuchtwerts, insbesondere in der Rinderzucht, was die Selektion züchterisch wertvoller Vatertiere erheblich effizienter und kostengünstiger gemacht hat. Genomweite Assoziationsstudien mit sehr dichten Markerkarten ermöglichen es zudem, merkmalsrelevante Varianten im Genom auf die Base genau zu positionieren. Da bei landwirtschaftlichen Nutztieren noch keine echten, d.h. keimbahngängigen pluripotenten embryonalen Stammzellen vorliegen und auch die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) noch deutlich in der Entwicklung gegenüber Maus, Ratte und Mensch zurückliegt, war die Züchtung von Nutztieren mit zielgenauen Veränderungen (Gen-Targeting) bisher kaum möglich. Die Situation hat sich mit der Verfügbarkeit der DNA-Nukleasen geändert. Der Einsatz von DNA-Nukleasen wird auch als Gen-Editing bezeichnet.

DNA-Nukleasen

DNA-Nukleasen, wie Zinkfinger Nukleasen (ZFNs), Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) und Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas) sind molekulare Scheren, die aus einer Teilungsdomäne und einer hoch spezifischen DNA-Bindungsdomäne bestehen. Die Ziel-DNA wird bei ZFNs und TALEN über die Aktivität des Enzyms Fok1 mutiert, beim CRISPR/Cas System über das Cas9 System. Alle drei Systeme führen zu zielgenauen genetischen Veränderungen, indem sie die Mutationsrate der DNA durch eine gesteigerte Rate an Doppelstrangbrüchen an vorbestimmten genomischen Stellen signifikant erhöhen. Im Vergleich zu konventionellen Verfahren der homologen Rekombination können molekulare Scheren die Targeting-Rate um bis zu 10.000-fach erhöhen. Die nach dem Mutationsvorgang einsetzenden DNA-Reparaturvorgänge erlauben entweder die korrekte Wiederherstellung des betreffenden DNA-Strangs (Homology Directed Repair, HDR) oder durch eine so genannte NHEJ (Non-homologous endjoining) Reparatur, die mit Veränderungen in der DNA-Basenabfolge verbunden ist. In Abhängigkeit vom Umfang der DNA-Mutationen kommt es zu Veränderungen des Leserahmens bis hin zum Funktionsverlust des Zielgens (Knockout des Gens). Durch entsprechende Selektion auf die verschiedenen Ergebnisse der DNA-Reparatur kann entweder der Knockout eines Gens oder der zielgenaue Einbau eines neuen Gens erreicht werden; auch genetische Modifikationen wie die Induktion von Polymorphismen (SNPs) oder die Reparatur von Erbfehlern sind mit Hilfe von DNA-Nukleasen möglich.

Meganukleasen waren die zuerst entdeckten molekularen Scheren, die eingesetzt wurden, um DNA innerhalb eines Wirtgenoms gezielt zu schneiden. Die neuen, synthetisch hergestellten molekularen Scheren wie ZFNs, TALENs und CRISPR/Cas können entweder direkt (Injektion) in die Zielzellen (Oozyten oder frühe Embryonen) oder über Transfektion in somatische Zellen eingebracht werden, wo sie zu den gewünschten genetischen Mutationen führen.

Zinkfinger Nukleasen (ZFNs)

Ein typischer Zinkfinger besteht aus etwa 30 Aminosäuren, die zwei antiparallel verlaufende β -Ketten in Bindung zur α -Helix enthalten. Ein Zinkfinger enthält meist jeweils zwei Cystein- und zwei Histidin-Elemente, die ein Zinkion binden und dadurch eine kompakte globuläre Domäne bilden. Das Zinkfingermotiv ist in der Lage, bis zu drei spezifische Basenpaare in der DNA-Grube zu binden. Zinkfinger können so hergestellt werden, dass sie im Prinzip an alle denkbaren DNA-Triplets binden können. Die Bildung multipler Zinkfinger führt zu größeren DNA-Erkennungsdomänen, die dann auch die Spezifität und Effizienz der gewünschten genetischen Modifikation erhöhen. Normalerweise sind zwei ZFN-Moleküle für eine genetische Modifikation erforderlich, da die Fok1-Nuklease dimerisieren muss, um die DNA zu schneiden.

Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs)

TALEs werden natürlicherweise von Gram-negativen, phytopathogenen Bakterien produziert. TALEs binden an ihre Ziel-DNA, wirken als Transkriptionsfaktoren und aktivieren die Expression von Zielgenen in Pflanzen, die eine bakterielle Infektion unterstützen. Pflanzen haben dagegen einen Abwehrmechanismus entwickelt, der TALE Elemente enthält. Ausgewählte TALE-repeats können genutzt werden, um DNA-Bindungsdomänen zu entwickeln, die dann bestimmte endogene DNA-Sequenzen in Säugerzellen erkennen können. Solche TALENs können erfolgreich eingesetzt werden, um endogene Gene zu modifizieren und die DNA effektiv zu schneiden, was dann zum NHEJ und in Folge zu den gewünschten Mutationen führen kann. TALENs und ZFNs unterscheiden sich im Wesentlichen in drei Aspekten: (a) TALEN-repeats sind bei einer Berechnung pro Basenpaar drei- bis viermal länger als ZFNs. Dies kann das Einbringen in die Zielzellen beeinflussen. (b) Das Intervall zwischen den beiden Bindungsstellen ist bei TALENs variabel und nicht auf eine bestimmte Länge eingestellt, was das Design gelegentlich schwieriger machen kann. (c) Im Gegensatz zu ZFNs erfordern TALENs kein spezifisches Archiv (Bibliothek) mit definierten Modulen für das Gen-Targeting, da Interaktionen zwischen den einzelnen Zinkfingern die Erkennung der Ziel-DNA-Sequenz beeinträchtigen können.

RNA-vermittelte genetische Modifikationen über CRISPR/Cas

Das CRISPR System stammt aus Bakterien und Archaeen, wo es das RNA geleitete adaptive Immunsystem induziert, um Fremd-DNA zu zerstören. Das am meisten verwendete CRISPR System stammt von *Streptococcus pyogenes* und benötigt ein NGG Protospacer adjacent motif (PAM), wobei N im Prinzip jedes beliebige Nukleotid darstellen kann. Die Guide-RNA erkennt hochspezifisch die Zielsequenz, welche dann durch die Cas-Enzymaktivität geschnitten wird. CRISPRs scheinen eine ähnliche Spezifität und Effizienz wie ZFNs und TALENs zu besitzen, sind jedoch einfacher herzustellen und leichter zu

handhaben und sind zudem sehr effizient und relativ kostengünstig zu erstellen. Durch bestimmte molekulare Modifikationen kann die Spezifität weiter verbessert werden, z.B. durch die Entwicklung von CRISPR-Vektoren mit Nickase-Aktivität.

Anwendung von DNA-Nukleasen bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Grundsätzlich lassen sich die vorgestellten Methoden der genetischen Modifikationen von landwirtschaftlichen Nutztieren für folgende Bereiche nutzen:

- a) Aufdeckung von Genregulierungen und Genfunktionen,
- b) Biomedizinische Anwendungen wie Produktion rekombinanter Arzneimittel oder Organe für die Xenotransplantation,
- c) Modellierung von humanen Krankheiten,
- d) Erbfehlerkorrekturen
- e) Verbesserung des genetischen Potentials in züchterisch schwer zu bearbeitenden Merkmalskomplexen wie Krankheitsresistenz, Tierverhalten und Tierschutz, Ressourceneffizienz sowie Produktqualität.

In diesen Bereichen wurden die drei DNA-Nukleasen bereits vielfach eingesetzt, um genetische Modifikationen bei Nutztieren zu induzieren. Der Anteil an Tieren mit einem bi-allelischen (homozygoten) Knockout des Zielgens ist sehr hoch, sowohl nach Verwendung mutierter Zellen im somatischen Klonen als auch nach Injektion des jeweiligen Nuklease-Plasmids in frühe Embryonen. Im Folgenden werden einige Beispiele für den Einsatz des Gen-Editings bei Nutztieren genannt.

Einer der ersten erfolgreichen Einsätze von ZFNs führte zu Schweinen mit einem homozygoten Knockout des Galactosyltransferase-Gens. Tiere mit einem bi-allelischen Knockout wiesen keine Galaktose (Gal)-Epitope mehr auf ihren Zelloberflächen auf. Das Fehlen dieser Zuckerstrukturen ist eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgversprechenden Einsatz solcher Tiere in der Xenotransplantation. Das Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma (PPAR- γ) Gen ist mono-allelisch im Schwein mit Hilfe spezifischer ZFNs ausgeschaltet worden. PPAR- γ mutierte Schweine werden als wichtiges Modell für grundlegende Arbeiten über kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen angesehen. Mit Hilfe von DNA-Nukleasen können Schweine mit einem bi-allelischen Knockout für ein endogenes Gen bereits innerhalb von nur 6 Monaten entwickelt werden, was wesentlich schneller ist als mit konventionellen homologen Rekombinationsverfahren. ZFNs sind erfolgreich eingesetzt worden, um gezielte Veränderungen in der Milchezusammensetzung beim Rind zu erreichen. Das bovine Lactoglobulin (BLG-)Gen wurde mit Hilfe von ZFNs bi-allelisch ausgeschaltet, mutierte Zellen wurden im Kerntransfer eingesetzt und mehrere genetisch veränderte Tiere geboren, die auch den gewünschten Phänotyp aufwiesen.

TALENs sind verwendet worden, um Rinder mit genetischen Modifikationen in verschiedenen Genen, wie ACAN und GDF-8 zu erstellen. GDF-8 (growth differentiation factor 8 oder auch Myostatin) ist ein negativer Regulator des Muskelwachstums. Ein nicht funktionales Myostatin-Gen ist bekannt als Mutation in den Rassen *Weißblaue Belgier* und *Piedmonteser Rind* und führt zu verstärktem Muskelwachstum. Es wurde inzwischen über Rinder, Schafe und Schweine mit TALEN induzierten Mutationen im Myostatin-Gen mit

einem entsprechenden Phänotyp berichtet. Beim Schwein ist über TALEN vermittelten Knockout bei einer Reihe von Genen berichtet worden, die besonders für die Erstellung von Krankheitsmodellen für bedeutsame humane Erkrankungen relevant sind. Dies betrifft insbesondere das LDL (Low density lipoprotein receptor) Gen und das DMD (dystrophin) Gen.

Eine vielversprechende Anwendung des Gen-Editings kann die Induktion oder die Erhöhung der genetischen Resistenz gegen verschiedene Erkrankungen sein. Durch TALEN vermittelte Modifikation des RELA-Gens (V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A) soll eine erhöhte Resistenz gegen das Virus der afrikanischen Schweinepest im Hausschwein induziert werden. Die RELA-Variante im afrikanischen Warzenschwein kann nach derzeitigem Erkenntnisstand vermutlich zu einer Resistenz gegenüber Erkrankungen durch das Afrikanische Schweinepest (ASP) Virus zu führen. Zurzeit ist noch offen, ob Hausschweine mit der gewünschten Variante gegen Infektionen mit ASP-Virus wirklich resistent sind; Infektionsversuche stehen noch aus. Nach Anwendung von TALENs für den Knockin des SP110 nuclear body protein aus der Maus über homologe Rekombination in bovine Zellen und deren Verwendung im somatischen Klonen konnten Rinder mit stark erhöhter Resistenz gegenüber einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* produziert werden. Die Expression dieses Gens führte die infizierten Zellen vermehrt in die Apoptose anstatt in die im Wild-Typ übliche Nekrose. Die Anzahl der für TB charakteristischen pathologischen Veränderungen war stark reduziert.

Das CRISPR/Cas System ist trotz der erst kurzen Verfügbarkeit auch bereits bei landwirtschaftlichen Nutztieren eingesetzt worden. Schweine mit einem bi-allelischen Knockout für verschiedene Gene wie vWF (von Willebrand Faktor), den porcinen p65 Locus, das APC (Adenomatous-polypsis-coli) Gen, oder Galactosyltransferase sind bereits beschrieben worden. Zielsetzung dieser Experimente ist es, ein Großtiermodell für das Studium wichtiger humaner Erkrankungen (Gerinnungsstörungen, Tumoren, u.a.) zu schaffen. Schweine, mit einem CRISPR/Cas vermittelten Knockout des MHC, Klasse 1-Systems können für die immunologische Grundlagenforschung von großer Bedeutung sein. Mit Hilfe des CRISPR/Cas Systems wurde der Knockout von 62 PERV Loci (Porcine endogenous Retrovirus) in einer porcinen Zelllinie bewerkstelligt, was die Sicherheit porciner Xenotransplantate deutlich erhöhen könnte. Allerdings ist über die Vitalität dieser Zellen und ihre Fähigkeit, nach somatischem Klonen zu lebenden Nachkommen zu führen, noch nichts bekannt. Ebenfalls mittels CRISPR/Cas9 wurde ein Gen (CD169) aus dem Schweinegenom entfernt, dessen Produkt als Eintrittspforte für den PRRS-Erreger fungiert. Schweine, welche die so editierte Version des Genoms tragen, sind tatsächlich resistent gegen das PRRS-Virus.

Diese kurze Darstellung zeigt bereits ein breites Anwendungsspektrum des Gen-Editings bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Voraussetzungen für die Anwendung von DNA-Nukleasen

- Besonders bedeutsam ist ein höchst möglicher Grad an Spezifität der jeweiligen DNA-Nuklease. Es muss sichergestellt sein, dass sogenannte Off-target-DNA-Änderungen (d.h. Mutationen der DNA, die nicht die Ziel-DNA betreffen) ausgeschlossen sind. Diese

können mit Hilfe von speziellen Algorithmen identifiziert und das Vorhandensein kann molekulargenetisch geprüft werden. Alle bisherigen Arbeiten haben ergeben, dass sowohl bei ZFNs, TALENs und CRISPR nur ein sehr geringer Anteil an Off-target Mutationen zu erwarten ist.

- Über epigenetische Veränderungen nach Einsatz von DNA-Nukleasen ist bisher noch nicht berichtet worden. Mögliche epigenetische Effekte des Einsatzes von DNA-Nukleasen sollten untersucht werden, um die Auswirkungen auf den Phänotyp des Tieres zu erfassen.
- Die Selektion einer DNA-Nuklease für einen spezifischen Zweck sollte in Abhängigkeit von der gewünschten Fragestellung erfolgen. Alle drei Systeme können in somatischen Zellen eingesetzt werden, was dann das somatische Klonen für die Produktion von Tieren mit den gewünschten genetischen Veränderungen erforderlich macht. Die DNA-Nukleasen können aber auch durch Injektion in Oozyten oder frühe Embryonen (Zygoten) eingebracht werden, die dann nach Übertragung auf Empfängertiere zu Nachkommen mit den gewünschten genetischen Veränderungen führen können. Ein Vorteil des Klonansatzes ist, dass auf der zellulären Ebene vorab die gewünschte genetische Modifikation identifiziert und die Zellen entsprechend selektiert werden können, sodass die Wahrscheinlichkeit, relativ zeitnah ein Tier mit der gewünschten genetischen Modifikation zu erstellen, zurzeit noch höher ist als mit der Injektionsmethode. Allerdings deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass die zweite Generation von CRISPR/Cas, die sich durch spezifische molekulare Modifikationen auszeichnet, auch nach Injektion zu hohen Erfolgsraten führt.
- Viele Anwendungsperspektiven des Gene-Editings (Insertion von Punktmutationen (SNPs), hetero- oder homozygoter Knockout von Genen, homologe Rekombination, Reparatur von Gendefekten, u.a.) fallen nicht unter die geltenden Regelungen des Gentechnikgesetzes, was eine direkte Anwendung bei landwirtschaftlichen Nutztieren erlauben würde. Allerdings wird zurzeit auf EU Ebene über mögliche gesetzliche Regelungen diskutiert, während im außereuropäischen Ausland das Gen-Editing nicht gesetzlich reguliert ist und zunehmend Verbreitung findet.
- Die wirtschaftliche Anwendung von DNA-Nukleasen kann mit patentrechtlichen Restriktionen verbunden sein. Zentrale Patente für ZFNs liegen bei der Fa. *Sangamo Biosciences*, CA, USA, für TALEN bei der Fa. *Recombinetics*, MN, USA, und für CRISPR/Cas bei *CRISPR-Therapeutics* (Humanmedizin) und *Bayer-Leverkusen* (andere Anwendungsbereiche). Vor züchterischer Anwendung sollte deshalb unbedingt eine Klärung erfolgen.

Anwendungsperspektiven für Gen-Editing in der Tierzucht

Die zurzeit vorliegenden Resultate zeigen, dass die molekularen Scheren für jedes Gen in jedem Organismus erfolgreich eingesetzt werden können. ZFNs, TALENs und CRISPR/Cas sind daher innerhalb von kurzer Zeit zu wertvollen Hilfsmitteln geworden, um genetische Modifikationen auch im komplexen Säugerorganismus zu induzieren und studieren zu können. Sie werden auch für die Nutztierzucht von großer Bedeutung sein, zum einen für die

Produktion von Nutztieren mit neuen genetischen Eigenschaften für die Biomedizin, aber auch für die Induktion genetischer Polymorphismen (SNP) mit züchterischer Bedeutung, oder zur Korrektur bestimmter Gendefekte. Das Gen-Editing kann künftig auch die schnelle Korrektur ungünstiger Allelkombinationen und damit die Auflösung von Merkmals-antagonismen ermöglichen. Die Verwendung von DNA-Nukleasen erfordert die Integration in die vorhandenen Zuchtsysteme, die auf dem genomischen Zuchtwert basieren. Erste Berechnungen zur Integration in vorhandene Zuchtsysteme liegen bereits vor und zeigen ein großes Potential für genetische Fortschritte, insbesondere bei multipler Verwendung des Gen-Editings.

ZFNs, TALEN und CRISPR/Cas sind wertvolle neue Hilfsmittel zur Erforschung und Veränderung der Genome, um dadurch genetische Erkrankungen besser zu verstehen und behandeln zu können; sie sind aber ebenso vielversprechend zur qualitativen Verbesserung der landwirtschaftlichen Tierproduktion, insbesondere im Hinblick auf eine effiziente, nachhaltige und zielgenaue Produktion, was angesichts der globalen Herausforderungen an die landwirtschaftliche Tierproduktion dringend erforderlich ist.

Die DGfZ befürwortet deshalb - unter Einbeziehung ethischer Aspekte und Kosten-Nutzen Abschätzungen - eine verantwortungsvolle Weiterentwicklung des Gen-Editings in der Nutztierzucht, insbesondere um genetisch bedingte Eigenschaften mit Bezug zu erhöhter Krankheitsresistenz und Tierschutz schneller in einer Population zu verankern.

Prof. Dr. med. vet. habil. Heiner Niemann,
Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Loeffler-Instituts Mariensee

Prof. Dr. Hans Rudolf Fries,
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München

Dr. Ernst Tholen,
Tierzucht und Tierhaltung/Haustiergenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Mai 2016