

Züchtungskunde, 88. (1) S. 19–31, 2016, ISSN 0044-5401  
© Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Original Article

## Chancen und Risiken neuer Züchtungstechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren

H. NIEMANN<sup>1</sup> und B. PETERSEN<sup>1</sup>

### Zusammenfassung

Für die landwirtschaftlichen Nutztiere, wie Rind, Schwein, Pferd und Schaf liegen inzwischen informative Genkarten vor, die die Grundlage für die Entwicklung neuer Züchtungskonzepte und gezielte genetische Modifikationen bilden. In den letzten Jahre sind zudem sogenannte molekulare Scheren, wie Zinkfinger Nukleasen (ZFNs), TALEN (Transcription-activator like effector nuclease) und CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) entwickelt worden, die gezielte genetische Veränderungen induzieren können. Dies geschieht im Wesentlichen durch Steigerung der DNA Mutationsrate über Induktion von Doppelstrangbrüchen an vorbestimmten genomischen Stellen. Die Anwendung dieser molekularen Scheren wird auch Gen Editing genannt. Im Vergleich zu konventionellen homologen Rekombinationstechniken können molekulare Scheren die Targeting Rate um bis zu 10.000fach erhöhen und die Ausschaltung eines Gens über mutagene DNA Reparaturmechanismen wird mit ähnlicher Frequenz stimuliert. Der erfolgreiche Einsatz der molekularen Scheren ist in unterschiedli-

tere und Mensch, gezeigt worden. Das CRISPR/Cas System kann sogar multiple Sequenzen in einem Ansatz mutieren und scheint in dieser Hinsicht ZFNs oder TAL überlegen zu sein. Die zurzeit vorliegenden Resultate zeigen, dass die molekularen Scheren für jedes Gen in jedem Organismus erfolgreich eingesetzt werden können und damit wertvolle Hilfsmittel für Studien zum Verständnis komplexer biologischer Systeme, zur Produktion genetisch modifizierter Tiere sowohl für landwirtschaftliche als auch für biomedizinische Zielsetzungen, zur Erstellung spezifischer Zelllinien, für die Züchtung genetisch modifizierter Pflanzen, und sogar für die Behandlung humaner genetischer Erkrankungen sind. Der vorliegende Artikel gibt einen aktuellen Überblick zu den molekularen Scheren als neue Hilfsmittel zukunftsorientierter Zuchtstrategien, nennt die zugrundeliegenden Mechanismen und beschreibt neue Möglichkeiten für die Erstellung genetisch modifizierter Nutztiere.

**Schlüsselwörter:** Zinkfinger-Nukleasen Transcription-activator like Endonucleasen, CRISPR/Cas9, Molekulare Scheren, DNA Doppelstrang Brüche, Gen Editing.

<sup>1</sup> Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee, 31535 Neustadt, E-Mail: heiner.niemann@fli.bund.de



## Summary

### Opportunities and potential risks of novel breeding tools for livestock production

Informative genomic maps have become available for the main farm animals which provide the basis for novel molecular based breeding concepts and targeted genetic modifications. Molecular scissors (MS), incl. Zinc Finger Nucleases (ZFNs), Transcription-activator like endonucleases (TALENs) and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas) mediate targeted genetic alterations by enhancing the DNA mutation rate via induction of double-strand breaks at a predetermined genomic site. The application of these MS is called gene editing. Compared to conventional homologous recombination based gene targeting, MS can increase the targeting rate 10,000-fold, and gene disruption via mutagenic DNA repair is stimulated at a similar frequency. The successful application of different MS has been shown in different organisms, including insects, amphibians, plants, nematodes, and mammals, including various livestock species and humans. The CRISPR/CAS9 system is capable of targeting even multiple genomic sites in one shot and thus could be superior to ZFNs or TALEN. Current results indicate that MS can be successfully employed for virtually any gene in any organism which renders them useful for improving the understanding of complex physiological systems, producing genetically modified animals, for both agricultural and biomedical purposes, creating specific cell lines, and plants, and even for treating human genetic diseases. This article provides an update on molecular scissors as new tools for precision breeding of livestock, their underlying mechanism and focuses on new opportunities for generating genetically modified farm animals.

**Keywords:** Zincfinger nucleases, Transcription-activator like endonucleases, CRISPR/Cas9, Molecular scissors, DNA double strand breaks, gene targeting

## Einleitung

In den vergangenen 15 bis 20 Jahren haben rasante Fortschritte in der Molekulargenetik, die Genomsequenzierung und -annotierung, die Geburt des Schafes „Dolly“, dem ersten geklonten Säugetier, sowie die Generierung pluripotenter Stammzellen aus somatischen Körperzellen (sog. induzierte pluripotente Stammzellen) die Naturwissenschaften auf eine neue Grundlage gestellt. Dies betrifft immer intensiver auch die Tierzucht. Inzwischen sind die Genome wichtiger landwirtschaftlicher Nutztiere sequenziert und annotiert worden, sodass informative und weitgehend vollständige Genkarten für Rind, Pferd, Schwein, Schaf, Huhn, Hund und Biene vorliegen (siehe PETERSEN und NIEMANN, 2015b). Zusammen mit den bereits seit längerem komplett sequenziert vorliegenden Genomen von Mensch, Maus und Ratte erlaubt dies sowohl vergleichende Analysen des Genoms der landwirtschaftlichen Nutztiere, als auch deren Nutzung für Modifikationen mittels neuer gentechnologischer Verfahren. Damit können genetisch modifizierte Tiere deutlich effizienter und zielgenauer produziert werden. Da bei landwirtschaftlichen Nutztieren noch keine echten, d.h. keimbahngängigen pluripotenten embryonalen Stammzellen vorliegen und auch die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen noch deutlich in der Entwicklung gegenüber Maus, Ratte und Mensch zurückliegt, war die Erstellung von Nutztieren mit zielgenauen Veränderungen (Gen-Targeting) bisher kaum möglich. Diese Situation hat sich in den letzten 4–5 Jahren mit der Entwicklung von DNA-Nukleasen, wie ZFNs, TALEN und CRISPR/Cas deutlich verbessert (PETERSEN und NIEMANN, 2015b). Damit sind Basenpaar-genaue genetische Modifikationen auch beim Nutztier mit hoher Effizienz möglich geworden.



### 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 meist aus einer Teilungsdomäne und einer DNA-Bindungsdomäne, die so angelegt werden kann, dass sie im Prinzip jede DNA-Sequenz hoch spezifisch binden kann, bestehen. Die Mutation der Ziel-DNA geschieht bei ZFNs und TALEN über die Aktivität des Enzyms FokI, beim CRISPR/Cas System im Wesentlichen über das Cas9 System (PETERSEN und NIEMANN, 2015a). 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 (ROUET et al., 1994). 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 NHEJ (Non-homologous end-joining) eine Reparatur, die mit Veränderungen in der DNA Basenabfolge verbunden ist (Abb. 1). In Abhängigkeit vom Umfang der DNA Mutationen kommt es zu Veränderungen des Leserahmens bis hin zum Funktionsverlust des Zielgens. 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 (PETERSEN und NIEMANN, 2015a).

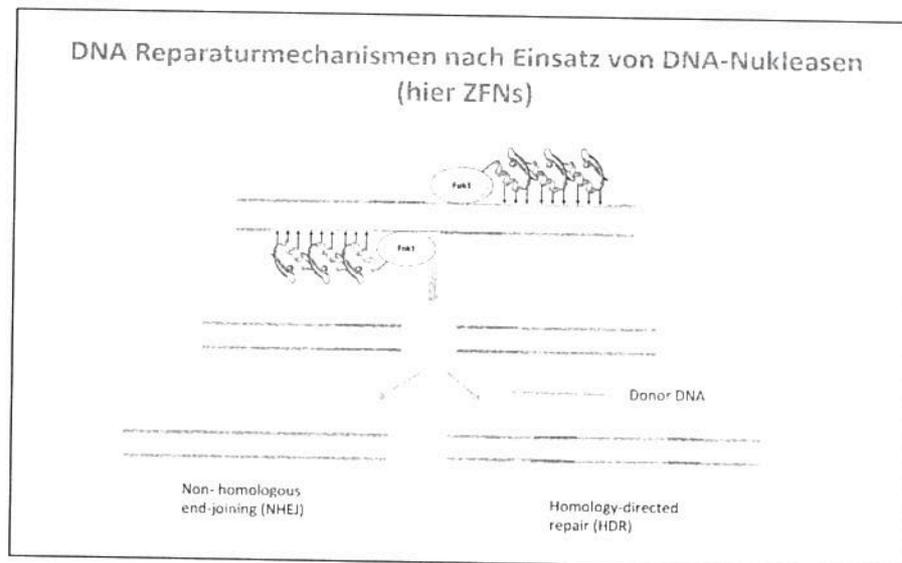


Abb. 1. DNA repair mechanisms after use of DNA nucleases (here: ZFNs)



Die homologe Rekombination (HR) tritt natürlicherweise nur sehr selten auf. Die experimentelle Induktion von HRs hat aber zahlreiche Anwendungsbereiche, wie das Studium grundlegender Mechanismen in der Säugerentwicklung und Physiologie, die Produktion von transgenen Tieren, die eine wichtige Rolle in der Xenotransplantation spielen können, als Modell für humane Erkrankungen dienen, oder zur Erzeugung von rekombinanten, pharmazeutisch aktiven Proteinen dienen (PETERSEN und NIEMANN, 2015a). Auch zur Leistungsverbesserung bei Nutztieren kann die Induktion der homologen Rekombination bei bestimmten Genen beitragen. Es ist seit langem bekannt, dass in embryonalen Stammzellen HR induziert werden kann, in dem z.B. eine antibiotische Selektionskassette mit langen homologen genomischen Armen homolog rekombiniert und dadurch das Zielgen ausgeschaltet wird (Gen-Knockout). 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. Der Ablauf in der Produktion von genetisch veränderten Tieren mit Hilfe von DNA-Nukleasen ist in Abb. 2 gezeigt (PETERSEN und NIEMANN, 2015a).

### Zinkfinger Nukleasen (ZFNs)

Ein typischer Zinkfinger besteht aus etwa 30 Aminosäuren, die zwei antiparallel verlaufende  $\beta$ -Ketten in Bindung zur  $\alpha$ -Helix enthalten. Ein Zinkfinger enthält meist jeweils zwei Cystein- und zwei Histidin-Elemente, die ein Zinkion binden und dadurch eine

#### Ablauf beim Einsatz von DNA Nukleasen

1. Design der genspezifischen DNA Nukleasen,
2. Erstellung geeigneter Plasmide mit genspezifischen DNA Nukleasen,
3. Einbringen der Plasmide/Nukleasen in Zellen (somatisches Klonen), Oozyten oder frühe Embryonen (Mikroinjektionen),
4. Überprüfung der Effizienz der Transfektion oder Mikroinjektion (Anteil mono- und biallelischer genetischer Veränderungen),
5. Anreicherung und Aufreinigung der Zellen mit der gewünschten genetischen Veränderung,
6. Sequenzierungen der jeweiligen Zielgene zur Darstellung der genetischen Modifikationen,
7. Überprüfung auf Off-target Veränderungen,
8. Charakterisierung des Phänotyps der genetischen Modifikation.

Abb. 2. Steps involved in the application of DNA nucleases



kompakte globuläre Domäne bilden. Das Zinkfingermotiv ist in der Lage, bis zu drei spezifische Basenpaare in der DNA-Grube zu binden (HAUSCHILD-QUINTERN et al., 2013a). 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 FokI-Nuklease dimerisieren muss, um die DNA zu schneiden (HAUSCHILD-QUINTERN et al., 2013a). Die beiden Zinkfinger-Moleküle binden an die Ziel-DNA in einer Schwanz-zu-Schwanz Orientierung, separiert durch 5–7 Basenpaare; die Doppelstrang-DNA wird dann in der Spacer Region geschnitten (Abb. 3).

ZFNs sind bereits vielfach eingesetzt worden, um genetische Modifikationen beim Nutztier zu induzieren (HAUSCHILD-QUINTERN et al., 2013a). Es konnten die ersten lebenden Schweine mit einem biallelischen Knockout eines endogenen Gens mit Hilfe von ZFNs und somatischen Klonen vor einigen Jahren produziert werden (HAUSCHILD et al., 2011). Dazu wurden fetale Fibroblasten mit einem Paar von Zinkfinger Plasmiden, die spezifisch gegen Exon 8 des  $\alpha 1$ , 3 Galactosyltransferase Gens (GGTA1/ $\alpha$ Gal) gerichtet waren, transfiziert. Dies führte zu Zellen mit ~1% biallelischen Mutationen; die GGTA1-KO Zellen konnten anschließend mit Hilfe von magnetischen Kügelchen angereichert und dann im Kerntransfer verwendet werden. Es wurden mehrere lebende GGTA1-KO Schweine nach Klonen von fetalen Fibroblasten mit dem mutierten Genort geboren. Die Sequenzierung des Gal-Genorts ergab zwei homozygote und drei heterozygote Mutationen. Tiere mit einem biallelischen Knockout wiesen keine Gal-Epitope mehr auf ihren Zelloberflächen auf und zeigten die gewünschten biologischen Effekte, indem  $\alpha$ Gal-KO Zellen in einem In-vitro Test gegen komplementvermittelte Lysis resistent waren (HAUSCHILD et al., 2011). Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgversprechenden Einsatz solcher Tiere in der Xenotransplantation (NIEMANN und PETERSEN, endogenes Gen bereits innerhalb von nur 6 Monaten produziert werden können, was

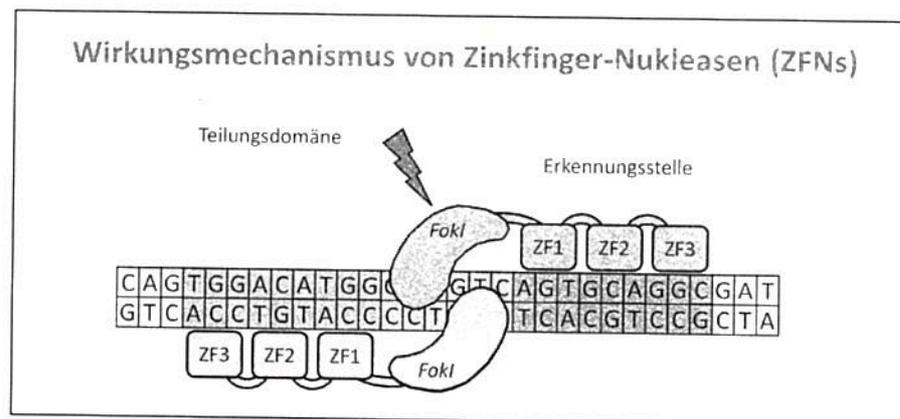


Abb. 3. Biological function of Zinc-finger nucleases (ZFNs)



wesentlich schneller ist als mit konventionellen homologen Rekombinationsverfahren. Die Effizienz der Zinkfinger war durch das Geschlecht der Zielzellen nicht beeinflusst, was die Produktion von Knockout-Schweinen für beide Geschlechter mit gleicher Effizienz ermöglicht (HAUSCHILD-QUINTERN et al., 2013b).

Weitere genetische Veränderungen bei Nutztieren mit Hilfe von ZFNs wurden berichtet. So wurde der transgene EGFP Locus mit Hilfe eines ZFN Plasmids ausgeschaltet. Obwohl das Transgen in mehreren Kopien im Genom vorhanden war, war die EGFP Fluoreszenz stark reduziert; nur vereinzelt war noch Fluoreszenz in mutierten Zellen zu erkennen, was darauf hindeutet, dass einzelne Kopien nicht stillgelegt worden waren (WHYTE et al., 2011). Dies Ergebnis zeigt, dass Transgene von DNA-Nukleasen ausgeschaltet werden können und zudem die Möglichkeit der Beeinflussung multipler Genloci besteht. Das Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma (PPAR- $\gamma$ ) Gen ist monoallelisch im Schwein mit Hilfe spezifischer ZFNs ausgeschaltet worden. Es wurden zwei lebende Schweine mit einer Mutation in einem der beiden PPAR- $\gamma$  Allele berichtet (YANG et al., 2011). PPAR- $\gamma$  mutierte Schweine werden als wichtiges Modell für grundlegende Arbeiten über kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen angesehen.

BLG ist ein Hauptmolkeprotein und zudem das Hauptallergen in der Rindermilch. Das BLG-Gen wurde mit Hilfe von ZFNs ausgeschaltet; 3% der Zellkolonien zeigten einen biallelischen Knockout (BLG-KO). Mutierte Zellen wurden im Kerntransfer eingesetzt und mehrere genetisch veränderte Tiere geboren, die auch den gewünschten Phänotyp aufwiesen (YU et al., 2011). Diese Ergebnisse zeigen, dass Genom Editing eingesetzt werden kann, um gezielte Veränderungen in der Milchzusammensetzung zu erreichen.

### Transcription Activator-like Effector Nucleasen (TALENs)

duziert. 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 TAL Erepeats können genutzt werden, um DNA-Bindungsdomänen zu entwickeln, die dann bestimmte endogene DNA-Sequenzen in Säugerzellen erkennen können (Abb. 4). 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 (PETERSEN und NIEMANN, 2015a):

- (a) TALEN repeats sind drei- bis viermal länger als ZFNs, bei einer Berechnung pro Basenpaar. 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 (DEFRANCESCO, 2011).

TALENs sind eingesetzt 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 wurden inzwischen Rinder und Schafe mit TALEN induzierten Mutationen im Myostatin-Gen mit einem entsprechenden Phänotyp berichtet (CARLSON et al., 2012; PROUDFOOT et al., 2015). 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 (CARLSON et al., 2012). Mehrere Nachkommen mit mono- und biallelischen Mutationen des LDL Gens konnten erstellt werden, die als Modell für die familiäre Hypercholesterolämie beim Menschen dienen. Das DMD-Gen konnte in einem hohen Anteil der Zellen mutiert werden; auch der Anteil an bi-allelischen Mutationen war mit ~30% sehr hoch. Damit können Schweine mit einem Phänotyp der Duchenne Muscular Dystrophie erstellt werden.

Eine viel versprechende 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 Reticulo endotheliosis 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 Resis-

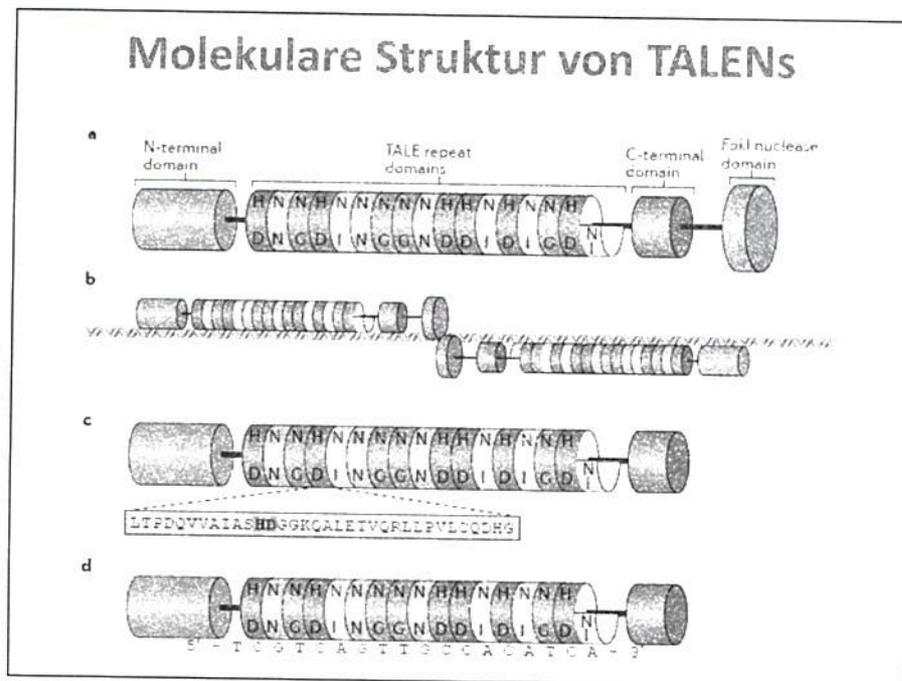


Abb. 4. Molecular structure of TALENs



tenz gegenüber Erkrankungen durch das Afrikanische Schweinepest (ASP) Virus führen. Zurzeit ist noch offen, ob Hausschweine mit der gewünschten Variante gegen Infektionen mit ASP Virus wirklich resistent sind; Infektionsversuche stehen noch aus (PALGRAVE et al., 2011; LILLICO et al., 2013). Nach Anwendung von TALENs für den Knockin des SP110 nuclearbodyprotein 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 (Wu et al., 2015).

### RNA-vermittelte genetische Modifikationen über CRISPR/Cas

Das CRISPR System entstammt 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 adjacentmotif (PAM), wobei N im Prinzip jedes beliebige Nukleotid darstellen kann (BHAYA et al., 2011; TERNS und TERNS, 2011; WIEDENHEFT et al., 2012) (Abb. 5). CRISPR 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 (SHEN et al., 2014).

Das CRISPR/Cas System ist auch bereits bei landwirtschaftlichen Nutztieren eingesetzt worden. Durch CRISPR induzierte Mutation im Exon 5 des von-Willebrand-Faktor

schen Knockout des vWF-Gens produziert werden (HAI et al., 2014). Die Schweine haben normale Vitalität, was anzeigt, dass die Mutation nicht mit der embryonalen und fetalen Entwicklung interferiert. Tiere mit einer Mutation im vWF-Gen können als Krankheitsmodell für Koagulationsstörungen oder in der Xenotransplantationsforschung von Bedeutung sein. Auch der porcine p65 Locus konnte mit Hilfe von CRISPR/Cas in fetalen Fibroblasten erfolgreich mutiert werden (TAN et al., 2013), ebenso wie das APC (Adenomatous-polyposis-coli) Gen. Zielsetzung dieser Experimente ist es ein Großtiermodell für die Ausbildung bestimmter Tumoren, die beim Menschen häufiger auftreten, zu erstellen. Mit Hilfe von CRISPR/Cas wurden Schweine mit einem Knockout des MHC, Klasse 1-Systems berichtet (REYES et al., 2014). Zellen mit einem biallelischen KO wurden im Kerntransfer verwendet und Schweine ohne MHC Klasse 1 Proteine auf der Zelloberfläche geboren. Die Schweine hatten reduzierte CD4-CD8T-Zellen im peripheren Blut, entwickelten sich aber trotzdem normal (REYES et al., 2014). Diese Schweine sind für die immunologische Grundlagenforschung von großer Bedeutung.

In eigenen Untersuchungen war der CRISPR/Cas vermittelte Gen-Knockout für  $\alpha$ -Gal etwa 10-mal häufiger als mit ZFNs und führte zu 10% fetalen porcinen Fibroblasten mit einem homozygoten Knockout für das  $\alpha$ -Gal Gen. Das CRISPR/Cas System kann auch eingesetzt werden, um multiple genetische Modifikationen in einem Experimentalansatz zu induzieren. Kürzlich wurde über den Knockout von 62 PERV Loci (Porcine endogenous Retrovirus) in einer porcinen Zelllinie berichtet (YANG et al., 2015). Dies bedeutet, dass mit Hilfe von CRISPR/Cas alle PERVs ausgeschaltet werden können, was die Sicherheit porciner Xenotransplantate deutlich erhöhen würde. Über die Vitalität dieser Zellen und ihre Fähigkeit, nach somatischem Klonen zu lebenden Nachkommen zu führen, ist noch nichts bekannt.



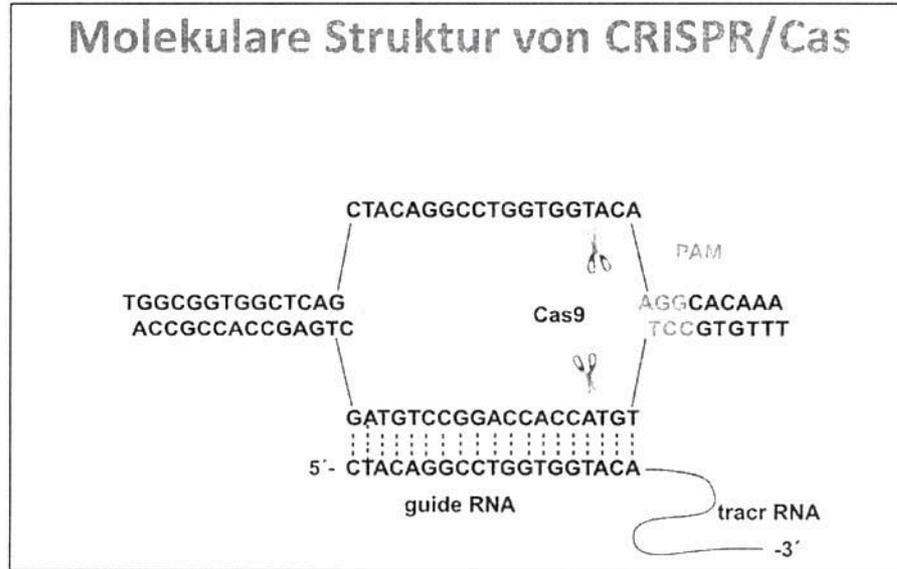


Abb. 5. Molecular structure of CRISPR/Cas 9

### Zusammenfassende Betrachtung und zukünftige Entwicklung

Die molekularen Scheren, wie ZFNs, TALENs und CRISPR/Cas sind dabei, die naturwissenschaftliche Forschung zu revolutionieren und insbesondere in der individuellen Medizin zu großen Fortschritten zu führen. Sie sind ferner von großer Bedeutung für die Entwicklung von Großtiermodellen für wichtige humane Erkrankungen und die Entwicklung neuer Therapieformen dafür, für die Generierung funktionaler Xenotransplantate, oder die Produktion rekombinanter pharmazeutisch aktive Proteine. Das Hauschwein ist besonders gut geeignet für diese Zwecke, weil es in genetischer, anatomischer als auch physiologischer Hinsicht zahlreiche Ähnlichkeiten mit den Menschen aufweist (NIEMANN, 2013).

Der erfolgreiche Einsatz von DNA-Nukleasen erfordert aber eine Reihe von wichtigen Voraussetzungen. Besonders bedeutsam ist ein höchst möglicher Grad an Spezifität. 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.

Die verschiedenen Nuklease Systeme haben bestimmte Vor- und Nachteile (Abb. 6). Die Selektion einer DNA-Nuklease für einen spezifischen Zweck sollte in Abhängigkeit



#### Vor- und Nachteile von DNA Nucleasen zur Induktion von genetischen Modifikationen bei Nutztieren

- Keine genomische Integration des Vektors (transiente Transfektion);
- Keine Antibiotika Selektionskassette;
- Hohe Effizienz beim Gen Targeting;
- Biallelischer Gen Knockout möglich in einem Ansatz
- DNA Nucleasen können in Wirtszellen (Oozyten, Embryonen) injiziert oder in somatische Zellen transfiziert werden;
- Somatische Zellen scheinen weniger „gestresst“ zu sein als nach konventionellem Gen Targeting;
- In Verbindung mit der Selektion über magnetische Kugeln sehr effektiv zur Produktion reiner Zellpopulationen mit dem angestrebten Knockout;
  
- Mögliche Off-target Mutationen;
- Qualität der DNA-Nucleasen ist abhängig vom bioinformatischen Programm;
- Die Verwendung genspezifischer DNA Nucleasen kann mit patentrechtlichen Limitationen verbunden sein, kann ggf. teuer sein.

Abb. 6. Advantages and disadvantages of DNA nucleases for induction of genetic modifications in farm animals

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-Nucleasen 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, deutlich höher ist als mit der Injektionsmethode. Hervorzuheben ist die Möglichkeit, mit einem Ansatz Tiere mit einem biallelischen Knockout zu erstellen.

Eine vergleichende Darstellung der Vor- und Nachteile der drei Klassen der hier beschriebenen DNA-Nuklease ist in Abb. 7 zu finden (PETERSEN und NIEMANN, 2015a). ZFNs, TALENs und CRISPR/Cas sind 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 Gendefekten. Die Verwendung von DNA-Nucleasen erfordert die Integration in die vorhandenen



**Vergleichende Darstellung der wesentlichen Merkmale von DNA-Nukleasen**

	ZFN	TALEN	CRISPR
Targeting Domäne	Zinkfinger Proteine	Transcription activator-like effector	CRISPR RNA oder Einzelketten guide RNA
Nuclease	FokI	FokI	Cas9/FokI
Biallelischer Knockout	Ja	Ja	Ja
Durchschnittliche Mutationsrate	++	+++	+++
Länge der Erkennungsdomäne	18-36bp	30-40bp	20bp
Restriktion an der Zielstelle	G-reich	Start mit T und Ende mit A	Protospacer adjacent motif (NGG or NAG) am Ende oder Zielsequenz
Komplexität des Vektor Designs	-	+	+++
Auftreten von Off-target Mutationen	Niedrig, variabel	niedrig	variabel, nicht zu bestimmen
Zytotoxizität	Variabel, niedrig	niedrig	niedrig
Anzahl der notwendigen Plasmide	2	2	1 (2 im Falle eines CRISPR/FokI Konstrukts)
Kosten	+++	++	+--

+: niedrig ++: mäßig; +++: hoch  
aus: Petersen & Niemann, Transg. Res. 2015a

Abb. 7. Overview on characteristics of DNA nucleases

Zuchtssysteme, die auf dem genomischen Zuchtwert basieren. Erste Berechnungen zur Integration in vorhandene Zuchtssysteme liegen bereits vor und zeigen ein großes Potential für genetische Fortschritte, insbesondere bei multipler Verwendung des Gen-Editings (JENKO et al., 2015). 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; sind aber ebenso vielversprechend zur Verbesserung der landwirtschaftlichen Tierproduktion.

### Literatur

- BHAYA, D., M. DAVISON und R. BARRONGOU, (2011): CRISPR/Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 273–297.
- CARLSON, D.F., W. TAN, S.G. LILICO, D. STVERAKOVA, C. PROUDFOOT, M. CHRISTIAN, D.F. VOYTAS, C.R. LONG, C.B. WHITELAW und S.C. FAHRENKRUG, (2012): Efficient TALEN mediated gene knockout in livestock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 17382–17387.
- DEFRANCESCO, L., (2011): Move over ZFNs. *Nature Biotechnology* **29**, 681–684.
- HAI, T., F. TENG, R. GUO, W. LI und Q. ZHOU, (2014): One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res.* **25**, 372–375.



- HAUSCHILD, J., B. PETERSEN, Y. SANTIAGO, A.L. QUEISSER, J.W. CARNWATH, A. LUCAS-HAHN, L. ZHANG, X. MENG, P.D. GREGORY, R. SCHWINZER, G.J. COST und H. NIEMANN, (2011): Efficient generation of a biallelic knockout in pig using zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 29, 12013 – 12017, doi: 10.1073/pnas.1106422108.
- HAUSCHILD-QUINTERN, J., B. PETERSEN, G.J. COST und H. NIEMANN, (2013a): Gene knockout and knockin by zinc-finger nucleases: current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci.* **70**, 2969–2983.
- HAUSCHILD-QUINTERN, J., B. PETERSEN, A.L. QUEISSER, A. LUCAS-HAHN, R. SCHWINZER und H. NIEMANN, (2013b): Gender non-specific efficacy of ZFN mediated gene targeting in pigs. *Transgenic Res.* **22**, 1–3.
- JENKO, J., G. GORJANC, M.A. CLEVELAND, R.K. VARSHNEY, C.B.A. WHITELAW, J.A. WOOLLIAMS und J.M. HICKEY, (2015): Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. *Genetics Sel. Evolution* **47**, 55.
- LILICO, S., C. PROUDFOOT, D.F. CARLSON, D. STVERAKOVA, C. NEIL, C. BLAIN, T. KING, W.A. RITCHIE, S. TAN, A. MILEHAM, D. MCLAREN, S.C. FAHRENKRUG und B. WHITELAW, (2013): Live pigs produced from genome edited zygotes. *Scientific Reports* **3**: 2847/doi:10.1038/srep02847.
- NIEMANN, H., (2013): Pigs as model systems for biomedical research. In: Rodriguez-Martinez H, Soede NM, Flowers WL (eds.) *Control of Pig Reproduction IX*. Context Products Ltd., Leicestershire, UK, ISBN 978-1-89907-3484, pp. 267–286.
- NIEMANN, H. und B. PETERSEN, (2016): The production of multi-transgenic pigs: Update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res.* (in press).
- PETERSEN, B. und H. NIEMANN, (2015a): Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Res.* **24**, 381–396.
- PETERSEN, B. und H. NIEMANN, (2015b): The future of transgenic farm animal production with emphasis on pigs. *CAB-Reviews* **9**, 44.
- PETERSEN NIEMANN  
using zinc-finger nucleases (ZFN). *Chromosome Res.* **23**, 7–15.
- PALGRAVE, C.J., L. GILMOUR, C.S. LOWDEN, S.G. LILICO, M.A. MELLENCAMP und C.B. WHITELAW, (2011): Species-specific variation in RELA underlies differences in NF- $\kappa$ B activity: a potential role in African swine fever pathogenesis. *J. Virol.* **85**, 6008–6014.
- PROUDFOOT, C., D.F. CARLSON, R. HUDDART, C.R. LONG, J.H. PRYOR, T.J. KING, S.G. LILICO, A.J. MILEHAM, D.G. MCLAREN, C.B. WHITELAW und S.C. FAHRENKRUG, (2015): Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res.* **24**, 147–153.
- REYES, L.M., J.L. ESTRADA, Z.Y. WANG, R.J. BLOSSER, R.F. SMITH, RA. SIDNER, L.L. PARIS, R.L. BLANKENSHIP, C.N. RAY, A.C. MINER, M. TECTOR und A.J. TECTOR, (2014): Creating class I MHC-Null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *J. Immunology* **193**, 5751–5757.
- ROUET, P., F. SMITH und M. JASIN, (1994): Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6064–6068.
- SHEN, B., W. ZHANG, J. ZHANG, J. ZHOU, J. WANG, L. CHEN, L. WANG, A. HODGKINS, V. IYER, X. HUANG und W.C. SKARNES, (2014): Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods* **11**, 399–402.
- TERNS, M.P. und R.M. TERNS, (2011): CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 321–327.
- WATANABE, M., K. UMEYAMA, H. MATSUNARI, S. TAKAYANAGI, E. HARUYAMA, K. NAKANO, T. FUJIWARA, Y. IKEZAWA, H. NAKAUCHI und H. NAGASHIMA, (2010): Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 14–18.



- WHYTE, J.J., J. ZHAO, K.D. WELLS, M.S. SAMUEL, K.M. WHITWORTH, E.M. WALTERS, M.H. LAUGHLIN and R.S. PRATHER, (2011): Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Molecular Reproduction and Development* **78** (1): 2. doi:10.1002/mrd.21271.
- WIEDENHEFT, B., S.H. STERNBERG und J.A. DOUDNA, (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**, 331–338.
- WU, H., Y. WANG, Y. ZHANG, M. YANG, J. LV, J. LIU und Y. ZHANG, (2015): TAL Nuclease-mediated *SP110* knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *PNAS* doi: 10.1073/pnas.1421587112/-/DCS supplement.
- YANG, D., H. YANG, W. LI, B. ZHAO, Z. QUYANG, Z. LIU, Y. ZHAO, N. FAN, J. SONG, J. TIAN, F. LI, J. ZHANG, L. CHANG, D. PEI, Y.E. CHEN und L. LAI, (2011): Generation of PPAR gamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res.* doi: 10.1038/cr.2011.70.
- YANG, L., M. GUELL, D. NIU, H. GEORGE, E. LESHA, D. GRISHIN, J. AACH, E. SHROCK, W. XU, J. POZI, R. CORTAZIO, R.A. WILKINSON, J.A. FISHMAN und G. CHURCH, (2015): Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science Express* doi/10.1126/science.aad1191.
- YU, S., J. LUO, Z. SONG, F. DING, Y. DAI und N. LI, (2011): Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.* **21**, 1638–1640.

