

# POINT Newsletter

## Aktuelles zur grünen Biotechnologie

Nr. 222  
Dezember 2020

### Inhalt

<i>Heilpflanzen: Optimierung der Produktion von natürlichen pharmazeutischen Wirkstoffen mit CRISPR/Cas</i> .....	S. 1
<i>Genome Editing: Neue Werkzeuge erweitern Bandbreite vom «Base Editing» bis hin zum «Chromosome Engineering»</i> .....	S. 2
<i>Pharming: Parkinson-Medikament L-DOPA aus Tomaten</i> .....	S. 4
<i>Ressourcen-Nutzung: USA lässt ertragsreicheren Biotech-Mais zum Anbau zu</i> .....	S. 5

### Heilpflanzen



#### **Schlafmohn – eine Quelle medizinisch relevanter Wirkstoffe**

Bild: [Otto Wilhelm Thomé, 1885 / www.BioLib.de](#)

### Optimierung der Produktion von natürlichen pharmazeutischen Wirkstoffen mit CRISPR/Cas

Schon seit Jahrtausenden nutzt der Mensch Pflanzen nicht nur als Quelle von Nahrung und Textilfasern, sondern auch für Heilzwecke. Pflanzen können eine erstaunliche Bandbreite von chemischen Stoffen mit biologischen Wirkungen produzieren. Das hat auch mit ihrer Lebensweise zu tun: sie können vor Schädlingen, Krankheitserregern und Fressfeinden nicht einfach davonlaufen, aber wehren sich mit Hilfe von pflanzlichen Substanzen, die zum Beispiel gegen Bakterien wirken.

Die Gewinnung pharmazeutischer Wirkstoffe aus Pflanzen hat eine lange Tradition, und auch das Streben nach Verbesserungen bei der Produktion. Diese können durch Fortschritte bei den agronomischen Eigenschaften der Medizinalpflanzen erzielt werden, aber auch durch Verbesserungen der Menge und Aktivität der Wirksubstanzen. Die Züchtung und die Entwicklung optimierter Sorten spielt nicht nur bei Nahrungs- und Faserpflanzen eine wichtige Rolle, sondern auch bei Medizinalpflanzen. Dabei werden zunehmend innovative Züchtungsverfahren eingesetzt, die auf der Genomeditierung z. B. mit dem CRISPR/Cas9-Werkzeug basieren. Ein aktueller Artikel von Prof. Abhijit Dey von der Presidency University in Kalkutta in der Fachzeitschrift *Pharmacological Research* gibt einen Überblick dazu.

Für die Produktion pharmazeutischer Natur-Wirkstoffe mit Hilfe von Mikroorganismen werden CRISPR/Cas9 und ähnliche Verfahren schon länger eingesetzt, um die Eigenschaften der Produktionsstämme masszuschneidern. *Streptomyces*-Bakterien produzieren zahlreiche nützliche Substanzen wie z. B. das Antibiotikum Streptomycin. Durch Genomeditierung konnten verschiedene genetische Veränderungen eingeführt werden, welche die Synthese pharmakologisch relevanter Naturstoffe und Antibiotika zu verbessern. In der Hefe *Yarrowia lipolytica*, die industriell für ihre Fähigkeit zur Produktion verschiedener Lipide genutzt wird, konnten mittels CRISPR/Cas9 vier Gene eingefügt werden. Diese stimulieren die Produktion von Lycopenen. Und in *Tatumella citrea*-Bakterien, die industriell zur Herstellung von 2-KGA, einer Vitamin-C-Vorstufe, eingesetzt werden, ermöglichte die Anwendung von CRISPR/Cas9 gezielte genetische Anpassungen.

Für Nutzpflanzen wird Genome Editing verbreitet eingesetzt, um agronomische Eigenschaften zu verbessern. Im Prinzip ist das auch für Medizinal-

pflanzen möglich, allerdings hat hier die grosse Vielfalt der verschiedenen Pflanzenarten und das Fehlen wichtiger Daten wie z. B. der Genom-Sequenz den Fortschritt im Vergleich zu verbreitet angebauten Arten wie Reis, Mais oder Tomaten bisher gebremst. Gleichwohl sind in der Fachliteratur verschiedene Ansätze beschrieben, um gezielt die Produktion pharmakologisch interessanter Substanzen durch Genome Editing zu beeinflussen.

So konnte in Leindotter-Pflanzen (*Camelina sativa*) durch gezielte Ausschaltung von Fettsäure-Biosynthese-Genen mittels Genome Editing die Zusammensetzung des aus den Samen gewonnenen Öls verbessert werden. Da *Camelina*-Pflanzen hexaploid sind, also sechs Genkopien haben, wäre es sehr schwierig, dies durch herkömmliche Züchtungsverfahren zu erreichen. Das US Landwirtschaftsministerium hat bereits erklärt, dass es diese Pflanzen nicht als «gentechnisch verändert» einstuft, da sie keine artfremde Erbinformation enthalten.

In *Nicotiana tabacum* Tabak-Pflanzen, die oft zur Produktion von Biopharmazeutika eingesetzt werden, wurden mit CRISPR/Cas9 sechs Gene ausgeschaltet, welche die chemische Veränderung von Eiweissen durch Anhängen von Zuckerresten bewirken (Glykosyltransferasen). Dadurch kann verhindert werden, dass in den Tabakpflanzen hergestellte rekombinante therapeutische Proteine unerwünschte Modifikationen aufweisen, welche ihre Wirksamkeit beeinträchtigen können.

Der Schlafmohn *Papaver somniferum* produziert von Natur aus verschiedene Alkaloide wie das Morphin, die klinische Bedeutung haben. Durch gezielte Ausschaltung eines Schlüssel-Regulatorgens für die Alkaloid-Synthese durch Genome Editing konnte der biosynthetische Fluss mehrerer Alkaloide manipuliert werden. Die Wurzeln des Rotwurz-Salbei (*Salvia miltiorrhiza*) enthalten eine grosse Zahl bioaktiver Substanzen, sie werden in der chinesischen Medizin bei Stoffwechselstörungen, Herz-Kreislaufkrankungen und Durchblutungsstörungen eingesetzt. Mehrere Publikationen berichten über gezielte «Genome Editing»-Veränderungen durch Inaktivierung von Stoffwechsel-Genen, welche deutliche Veränderungen der Inhaltsstoffe, z. B. der Rosmarinsäure, bewirkten.

Insgesamt berichtet Prof. Dey in seinem Übersichtsartikel von bisher neun Anwendungen von CRISPR/Cas9 bei Medizinalpflanzen, welche die Produktion wertvoller Stoffwechselprodukte (sekundärer Metabolite) verbessern. Er geht allerdings davon aus, dass der Einsatz des Genome Editing auch in diesem Bereich noch deutlich zunehmen wird, wenn mehr vollständige Genomsequenzen der zahlreichen Heilpflanzenarten als Grundlage zur Verfügung stehen. Neben der gerichteten Ausschaltung von Pflanzengenen kann Genome Editing auch verwendet werden, um zusätzliche Stoffwechselgene einzubauen und so das biosynthetische Spektrum zur Produktion von wertvollen Pharmazeutika und Nutraceuticals zu erweitern.

**Quelle:** Abhijit Dey 2020, [CRISPR/Cas genome editing to optimize pharmacologically active plant natural products](#), Pharmacol. Res. (04.12.2020, [doi:10.1016/j.phrs.2020.105359](#)).

## Genome Editing

### Neue Werkzeuge erweitern Bandbreite vom «Base Editing» bis hin zum «Chromosome Engineering»

Die Beschreibung des CRISPR/Cas9 Systems als Werkzeug für gezielte genetische Veränderungen im Erbgut von Lebewesen im Jahr 2012 hat einen enormen Technologieschub in vielen Bereichen der Life Sciences

ausgelöst. Nicht umsonst wurden die beiden Entwicklerinnen des Systems, Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier im Oktober 2020 mit dem Nobel-Preis ausgezeichnet. Im Bereich der Pflanzenzüchtung haben die neuen Methoden des Genome Editings neue Möglichkeiten zur Erzeugung genetischer Variabilität für eine wesentlich schnellere und präzisere Anpassung von Pflanzen-Eigenschaften ermöglicht. Diese reichen vom Austausch eines einzelnen Buchstabens im langen Text der Erbinformation im Genom bis hin zur Verschiebung ganzer Buchregale in der genetischen Bibliothek. Eine Reihe von Publikationen von Holger Puchta vom Karlsruher Institut für Technologie (D) und seinen Mitarbeitenden geben einen guten Überblick.

Die gerichtete Mutagenese, also das gezielte Ausschalten einzelner Pflanzengene, wurde bereits seit der Mitte der 1990er Jahre mit Nukleasen (z. B. ZFN, TALENs) verfolgt, welche an vorbestimmten Positionen gezielte Schnitte in das Pflanzengenom einführen konnten. Solche Schnitte werden oft durch Einbau oder Verlust kurzer Sequenzabschnitte (Insertionen oder Deletionen – «Indels») fehlerhaft repariert, und führen so zur Zerstörung der Genfunktion. CRISPR/Cas9 ermöglicht es jetzt, die gewünschte Schnittstelle wesentlich einfacher als zuvor programmieren, technische Weiterentwicklungen mit Varianten des Systems machen inzwischen fast alle Positionen des Erbguts für die Schnitte zugänglich.

Mit einem als «Multiplexing» bezeichneten Ansatz können parallel mehrere Erbgutschnitte eingeführt werden, was die Arbeiten deutlich beschleunigt. Bei Reis wurde die gleichzeitige Veränderung von acht Genombereichen beschrieben, die dadurch erzielte grosse Zahl von möglichen Kombinationen führt zu einer deutlichen, gerichteten Erweiterung der genetischen Variabilität als Grundlage für eine abgestufte Veränderung der Pflanzeigenschaften.

Durch molekularbiologische Anpassungen konnte die Schneidefunktion des CRISPR/Cas Systems inaktiviert und gegen eine ortsspezifische chemische Veränderung einzelner Buchstaben des genetischen Codes ausgetauscht werden. Dieses als «Base Editing» bezeichnete Verfahren ermöglicht es, ohne die schwer vorhersehbaren Folgen eines DNA Strangbruchs ganz gezielt Punktmutationen einzuführen, und so nicht nur eine Inaktivierung sondern auch eine gezielte Funktionsänderung des Zielgens zu bewirken.

Beim «Prime Editing» Verfahren wird eine kurze Matrize der gewünschten Veränderung zusammen mit der Genome Editing Maschinerie eingeführt, dies ermöglicht sowohl gezielte Veränderungen einzelner Buchstaben als auch vorbestimmte kurze Insertionen und Deletionen – ähnlich der «Suchen und Ersetzen»-Funktion in einem Textverarbeitungsprogramm.

«Gene Targeting» durch homologe Rekombination umfasst einen gerichteten Schnitt des Genoms an vorbestimmter Position, zusammen mit der Einbringung eines Reparaturkonstrukts, dessen Enden Ähnlichkeit zu den Sequenzen auf beiden Seiten des Schnitts aufweisen. Durch zelluläre Reparaturprozesse kann dieses Konstrukt an der Schnittposition eingebaut werden. So können auch grössere, zuvor geplante und im Reagenzglas zusammengestellte Veränderungen in das Pflanzenerbgut eingebaut werden, zum Beispiel umfangreiche Anpassungen des Zielgens an mehreren Stellen, oder auch zusätzliche genetische Informationen.

Schliesslich können durch zeitgleiche Schnitte im Pflanzenerbgut an weit voneinander entfernten Positionen umfangreiche Veränderungen des Genoms ausgelöst werden. Das «Chromosome Engineering» kann zum Verlust

grosser Erbgutabschnitte zwischen den Schnitten führen (Deletion), aber auch zu einer Umkehr des dazwischenliegenden Segments (Inversion) oder zu einem reziproken Austausch ganzer Abschnitte zwischen verschiedenen Chromosomen. Derartige Änderungen sind für die Pflanzenzüchtung besonders relevant. Natürlich vorkommende Inversionen in Pflanzen behindern bei der Kreuzungszüchtung den Austausch und die Neu-Kombination genetischer Informationen zwischen zwei Eltern-Linien. Dadurch lassen sich erwünschte Eigenschaften nicht mehr zusammenbringen. Durch eine Umkehrung der Inversion mittels «Chromosome Engineering», so dass die Abfolge der Gene in beiden Kreuzungspartnern wieder gleich ist, wird die Blockade des Informationsaustauschs wieder rückgängig gemacht, der ganze Erbgutbereich wird für klassische Züchtungsansätze (welche die Neukombination von vielen tausenden von Genen umfassen) wieder zugänglich.

Zusätzlich zu strukturellen Veränderungen des Erbguts – also Punkt-Mutationen sowie kleinen und grösseren Insertionen, Deletionen und Rearrangements – kann die gezielte, programmierbare Bindung von CRISPR/Cas Varianten auch zur Veränderung der Genablesung eingesetzt werden. Eine Kombination der ortsspezifischen Binde-Proteine mit Aktivatoren oder Repressoren der Transkription kann gezielt die Ablesung einzelner Gene beeinflussen, ohne das Genom direkt zu verändern. Auch gerichtete chemische Modifikationen, z. B. durch Methylierung der DNA oder Acetylierung der Histon-Eiweisse, welche das Erbgut verpacken, können nachhaltige Auswirkungen auf die Ablesung spezifischer Gene haben.

Die Bandbreite der genetischen Veränderungen aufgrund der neuen Züchtungsverfahren in Pflanzen ist bereits gross, und wird durch die technischen Weiterentwicklungen noch weiter zunehmen. Dies ermöglicht ganz neue Ansätze für gezielte Anpassungen der Eigenschaften von Nutzpflanzen, und eröffnet so Chancen zur Lösung für Herausforderungen der Landwirtschaft, wie der steigenden Nachfrage bei limitierten Ressourcen und Anbauflächen.

Die Autoren betonen allerdings die dringende Notwendigkeit einer wissenschafts-basierten Regulierung für genomeditierte Nutzpflanzen, damit Züchter diese bedeutenden Werkzeuge weltweit einsetzen können. Dies auch, um den immer schwieriger werdenden Umweltbedingungen aufgrund des Klimawandels entgegenzutreten.

**Quellen:** Niklas Capdeville et al. 2020, [Sophisticated CRISPR/Cas tools for fine-tuning plant performance](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153332), J. Plant Physiol. (online 15.12.2020, doi:10.1016/j.jplph.2020.153332); Michelle Rönspies 2020, [CRISPR/Cas-mediated chromosome engineering: opening up a new avenue for plant breeding](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa463), Journal of Experimental Botany (online 01.12.2020, doi:10.1093/jxb/eraa463); Carla Schmidt et al. 2020, [Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2448-1), Nature Communications 11:4481, 2020; [Vererbung bei Pflanzen lässt sich nun gezielt steuern](https://www.kit.edu/News/Vererbung-bei-Pflanzen-laesst-sich-nun-gezielt-steuern), Presseinformation Karlsruher Institut für Technologie KIT, 04.09.2020

## Pharming

### Parkinson-Medikament L-DOPA aus Tomaten

Die ungewöhnliche Aminosäure L-DOPA, die im Gehirn zu dem wichtigen Botenstoff Dopamin umgewandelt wird, ist das wichtigste Medikament für die Behandlung der Parkinson-Erkrankung. Die bisherigen Produktionsverfahren sind relativ aufwändig und teuer. Ein Forscherteam vom britischen John Innes Centre und vom Max-Planck-Institut Potsdam-Golm (D) berichtet jetzt über einen alternativen Produktionsansatz: sie programmierten

Tomaten so um, dass sie in ihren Früchten L-DOPA produzieren.

Die Kosten für eine Tagesdosis des herkömmlich produzierten L-DOPA betragen etwa 2 US\$ - zu teuer für viele Patienten in weniger wohlhabenden Ländern. Auch führt herkömmlich produziertes L-DOPA bei manchen damit Behandelten zu unerwünschten Nebenwirkungen. Das motivierte die Pflanzenforscher, ein alternatives Herstellungsverfahren zu entwickeln. Sie machten sich dabei ein kürzlich entdecktes Gen für ein Enzym (Tyrosinase) aus der Rote Beete zunutze. Dieses wandelt in den Pflanzenknollen die verbreitete Aminosäure Tyrosin zu L-DOPA um, das im Stoffwechsel dann umgehend zu Betalin – dem typischen roten Farbstoff – weiterverarbeitet wird.

Die Forscher koppelten das Rote-Beete-Gen mit einer Promotorsequenz aus der Tomate, welche eine Ablesung spezifisch in Tomatenfrüchten steuert, und übertrugen das Genkonstrukt in Tomaten. Tatsächlich war das Rote-Beete-Gen in den Früchten der transgenen Pflanzen aktiv, und sorgte dort für die Produktion von L-DOPA. Da in den Tomatenfrüchten die weiterführenden Stoffwechselschritte aus den Beete-Knollen zum roten Farbstoff nicht vorhanden sind, reicherte sich L-DOPA in den Früchten an. Bis zu 0.27% des Trockengewichts wurden gemessen – bei diesen Mengen würden etwa 200 g getrocknete Tomaten die erforderliche L-DOPA Tagesdosis enthalten. Es gibt Ansätze, um diese Menge weiter zu steigern.

Aus den Früchten lässt sich L-DOPA relativ einfach in chemisch reiner Form gewinnen. Dieses Produktionsverfahren ist wenig aufwändig, und lässt sich leicht mengenmässig erweitern. So könnte L-DOPA preiswert und lokal gewonnen werden, was sich speziell für Länder mit beschränkter Verfügbarkeit von kommerziellen Medikamenten anbieten würde. So könnten auch Patienten Zugang zu L-DOPA erhalten, für die das aktuell aus Preis- oder Verfügbarkeitsgründen nicht möglich ist. Möglicherweise ist der in Pflanzen hergestellte Wirkstoff auch besser verträglich als jener aus herkömmlicher Produktion, klinische Versuche wurden allerdings bisher noch nicht durchgeführt.

«Wir haben gezeigt, dass die Verwendung der Tyrosinase-exprimierenden Tomaten als Quelle für L-DOPA möglich ist. Es ist eine weitere Demonstration der Tomate als eine starke Option für die synthetische Biologie. Zusätzlich gab es überraschende vorteilhafte Effekte, einschließlich der Verbesserung der Haltbarkeit und erhöhter Aminosäurespiegel, die wir untersuchen können», sagte der Erstautor der Studie Dr. Dario Breitel.

**Quellen:** Dario Breitel et al. 2020, [Metabolic engineering of tomato fruit enriched in L-DOPA](#), Metabolic Engineering (online 23.11.2020, [doi:10.1016/j.ymben.2020.11.011](#)); [Tomatoes offer affordable source of Parkinson's disease drug](#), John Innes Centre press release, 09.12.2020.

## Ressourcen- Nutzung

### USA lässt ertragsreicheren Biotech-Mais zum Anbau zu

Bei den weltweit angebauten gentechnisch veränderten Nutzpflanzen dominieren bisher die Eigenschaften Herbizidtoleranz und Insektenresistenz. Allerdings befinden sich zahlreiche Pflanzensorten mit neuartigen, verbesserten Eigenschaften in Entwicklung. Im Rahmen einer effizienteren Ressourcen-Nutzung spielt dabei die Steigerung der Erträge eine wichtige Rolle. Das US Landwirtschaftsministerium USDA hat jetzt eine gentechnisch veränderte Maissorte mit deutlich höheren Erträgen zugelassen.

Die Maissorte DP202216 war vom Unternehmen Pioneer Hi-Bred entwickelt

worden. Durch eine erweiterte Ablesung des Mais-Regulatorgens *zmm28* in den Pflanzen konnten in zahlreichen Feldversuchen in verschiedenen Klimaregionen Ertragssteigerungen von bis zu 10% im Vergleich zu unveränderten Maissorten erzielt werden (siehe [POINT 211, Dezember 2019](#)).

Als wichtige Zulassungs-Voraussetzung wurde der Gehalt der Maispflanzen an Nährstoffen, Fetten, Vitaminen, Faserstoffen, Mineralien und anderen wertgebenden Inhaltsstoffen im Vergleich zu unveränderten Maissorten untersucht. Für die meisten untersuchten Substanzen zeigten sich vergleichbare Werte. Für wenige Stoffe zeigten sich, möglicherweise aufgrund des verwendeten Statistik-Verfahrens, geringfügige Unterschiede. Diese lagen aber innerhalb des für andere Maissorten üblichen Schwankungsbereichs, und sind daher biologisch nicht bedeutsam. Die Nähr- und Inhaltsstoffe von DP202216 sind daher gleichwertig mit denen in unveränderten Maissorten.

Zusätzlich zu diesen detaillierten chemischen Analysen fordern einige Länder und Regionen, so z. B. die EU, die Durchführung von 90-tägigen Fütterungsversuchen mit Nagetieren, um mögliche nachteilige Gesundheitsauswirkungen von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) als Lebens- oder Futtermittel zu erkennen. Dieser Test ist wissenschaftlich umstritten, da er zu einem unnötigen Verbrauch an Versuchstieren führt. Bei unveränderter Futter-Zusammensetzung gibt es keinen Grund, eine schädliche Auswirkung der gentechnischen Veränderungen zu vermuten, und tatsächlich wurde so etwas bei diesen Fütterungsstudien auch nie beobachtet. Um den Anforderungen der Behörden nachzukommen, wurden Ratten trotzdem 90 Tage lang mit DP202216-Mais ernährt. Wie erwartet, zeigten sich keine nachteiligen Gesundheitsauswirkungen.

Das US Landwirtschaftsministerium beurteilte, ob die ertragsreichere Maissorte ein Risiko für andere Pflanzen oder die Umwelt darstellen könnte, und fand keine zu erwartenden nachteiligen Auswirkungen. Daher wurde DP202216 nach einer öffentlichen Vernehmlassung für einen unbeschränkten Anbau in den USA zugelassen. Im Jahr 2019 wurde auch in der EU ein Import-Antrag eingereicht, ein Anbau dort ist nicht vorgesehen. Vor einem breiten Einsatz der verbesserten Maissorte und damit einer Steigerung der Lebens- und Futtermittelproduktion müssen allerdings noch die Import-Zulassungen in wichtigen Handelspartnern der USA abgewartet werden.

**Quellen:** [USDA Announces Deregulation of Enhanced Yield, Herbicide Tolerant Corn Variety Developed Using Genetic Engineering](#), USDA-APHIS, 18.12.2020; Jennifer A Anderson et al. 2019, [Composition of forage and grain from genetically modified DP202216 maize is equivalent to non-modified conventional maize \(Zea mays L.\)](#), GM Crops Food 10(2):77-89; Anne B.C arlson et al. 2020, [DP-202216-6 maize does not adversely affect rats in a 90-day feeding study](#), Regulatory Toxicology and Pharmacology 117:104779

## Kontakt und Impressum

POINT erscheint monatlich in elektronischer Form ([Archiv](#) der vorherigen Ausgaben). Der Newsletter fasst aktuelle Meldungen aus Forschung und Anwendung rund um die grüne Biotechnologie zusammen. Für ein kostenloses Abonnement können Sie sich per e-mail [anmelden](#) und natürlich auch [abmelden](#). Wir freuen uns auf Ihre Fragen und Anregungen!

Text und Redaktion: [Jan Lucht](#)

scienceindustries, Postfach, CH-8021 Zürich

Telefon: 044 368 17 63

e-mail: [jan.lucht@scienceindustries.ch](mailto:jan.lucht@scienceindustries.ch)