

## Genmodifikation

# Gezielte Manipulation des Genoms mit Zinkfingernukleasen

MELANIE MEYER, BENEDIKT WEFERS, OSKAR ORTIZ, WOLFGANG WURST, RALF KÜHN  
INSTITUT FÜR ENTWICKLUNGSGENETIK, HELMHOLTZ-ZENTRUM MÜNCHEN

**In vielen Säugetierarten gab es bis jetzt keine effektiven Werkzeuge für eine gezielte Genmodifikation. Die Entwicklung der Zinkfingernuklease-Technologie ermöglicht nun auch in diesen Organismen eine schnelle und einfache Genommanipulation.**

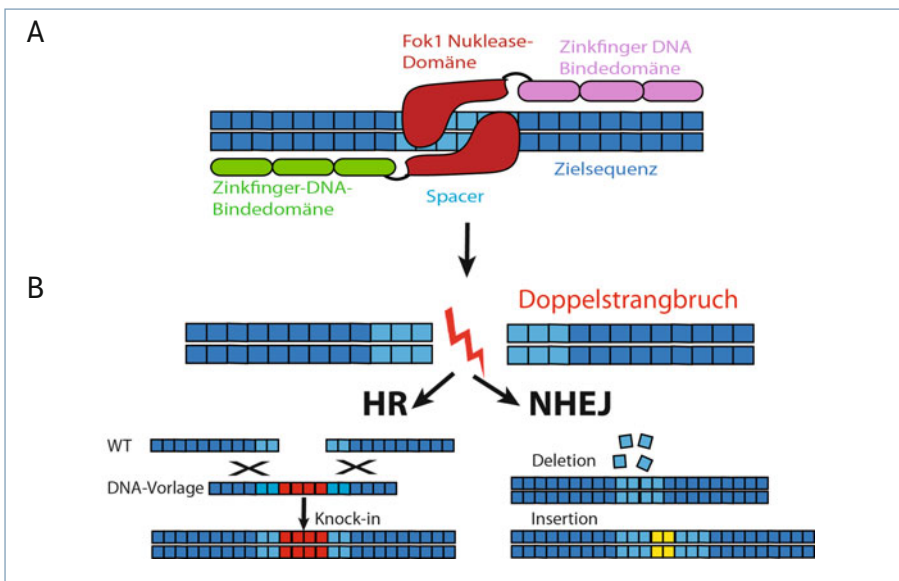
Most mammalian species lack useful tools for targeted gene modification. With the discovery of the zinc-finger nuclease technology it is now possible to achieve rapid and easy genome manipulations in mammals.

■ Die Herstellung von Tieren oder Pflanzen mit gezielten Genmodifikationen ist ein potentes Werkzeug, um die Funktion von Genen zu untersuchen, Krankheitsmechanismen zu entschlüsseln und Organismen von biotechnologischem Nutzen zu erzeugen. Während frühe Mutagenesetechniken wie die chemisch induzierte ENU(*ethyl nitroso urea*)-Mutagenese nur zufällige Mutationen erzeugen, zielen neuere Methoden auf eine spezifische, vorab planbare Manipulation des Genoms ab. Die Transgenese umfasst die Expression von Fremd-DNA oder die Veränderung des Expressionsmusters und/oder der Expressionsstärke der endogenen Gene durch gezielte Einbringung von DNA-Modifikationen. Die erste Technik der gezielten Genveränderung, das Gen-Targeting in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die in den 1980er-Jahren entwickelt wurde, beruht auf dem natürlichen DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR), der die zweite Kopie des Chromosoms als Reparaturvorlage benutzt. Die HR ist robust, jedoch im Allgemeinen, mit einer Frequenz von  $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  modifizierten Zellen, wenig effizient [1]. Bisher hat diese niedrige Frequenz der HR in Säugerzellen und die daraus resultierende Notwendigkeit von Selektions-

verfahren die Anwendung dieser Technik auf ES-Zellen beschränkt. Außerdem wurden ES-Zellen, die pluripotent sind und bleiben, bis jetzt nur in Maus, Ratte und Mensch charakterisiert. Durch die Verwendung der I-SceI-Meganuklease aus Hefe konnte gezeigt werden, dass die Erzeugung eines Doppelstrangbruchs (DSB) innerhalb des Genoms die HR am Ziellocus in einer hohen Frequenz ermöglicht, indem die natürlichen DNA-Reparaturmechanismen stark aktiviert werden. Die beobachtete Frequenz liegt hier bei  $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$  modifizierten Zellen [2]. Kürzlich wurde jedoch eine neue Technik zur Erzeugung von DSB, basierend auf der Verwendung von sequenzspezifischen Zinkfingernukleasen (ZFN), entwickelt und für die Herstellung von Organismen mit Genmodifikationen benutzt.

### Mechanismus der Zinkfingernukleasen

Um für die Genommanipulation von Nutzen zu sein, muss eine Endonuklease spezielle Anforderungen erfüllen. Sie muss einzigartige Zielsequenzen spezifisch erkennen und an jeden beliebigen Locus angepasst werden können. Die ZFN erfüllen diese Bedingungen, da sie aus zwei funktionellen Domänen aufgebaut werden:



▲ **Abb. 1:** Wirkmechanismus der Zinkfinger-Nukleasen (ZFN). **A**, modularer Aufbau und spezifische Bindung der ZFN zur Dimerisierung und anschließenden Aktivierung der Fok I-Endonukleasen. **B**, *non-homologous end joining* (NHEJ) und homologe Rekombination (HR), zwei Mechanismen der natürlichen Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruchs (DSB), führen zu Nukleotidinsertionen, -deletionen oder zum Knock-in exogener DNA.

einer DNA-bindenden, modularen Zinkfinger(ZF)-Domäne und der DNA-schneidenden Nukleasedomäne des *FokI*-Restriktionsenzym (Abb. 1A). Die ZF-Domäne leitet somit die unspezifisch wirkende Nukleasedomäne an eine spezifisch ausgewählte DNA-Zielsequenz. Da die Nuklease nur als Dimer enzymatisch aktiv ist, ist die Entstehung eines DSB abhängig von der Dimerisierung der ZFN. Diese erfolgt durch die Bindung von zwei heterodimeren ZFN an benachbarte Zielsequenzen, getrennt durch eine sechs Basenpaare lange Spacerregion (Abb. 1A). Die in der Literatur beschriebenen ZFN besitzen drei oder vier ZF-Domänen; da ein Zinkfinger drei Nukleotide der DNA-Sequenz erkennt, binden solche ZFN-Einheiten an neun bis zwölf Basen lange Zielsequenzen. Es gibt zurzeit

zwei Technikplattformen, um benutzerdefinierte Zinkfinger mit hoher Spezifität zu erzeugen: die Plattform der Firma Sangamo Bioscience [3], und die frei verfügbare *oligomerized pool engineering* (OPEN)-Plattform, die von den akademischen Labors des Zinkfinger-Konsortiums bereitgestellt wird [4]. Die Reparatur eines DSB, der durch ein ZFN-Paar induziert wurde, kann durch einen von zwei möglichen, natürlich vorkommenden Mechanismen wieder repariert werden: entweder durch *non-homologous end joining* (NHEJ) oder HR (Abb. 1B). In Abwesenheit einer DNA-Vorlage ist das NHEJ der bevorzugte Weg. Es führt zu Nukleotidinsertionen und/oder Deletionen, durch die das ursprüngliche Leseraster des Zielgens zerstört wird, was in vielen Fällen zur Expression von verkürzten und/oder

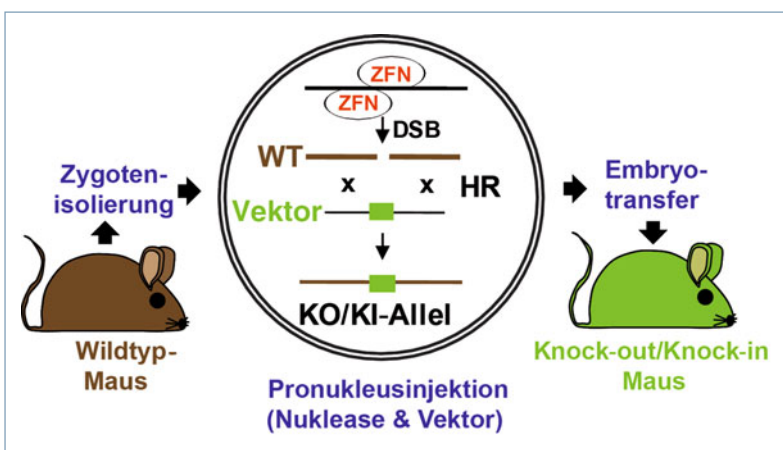
nicht funktionsfähigen Proteinen führt. Die Reparatur des DSB durch die HR unter Verwendung einer DNA-Vorlage resultiert dagegen entweder in einer perfekten Reparatur oder, falls es sich um eine modifizierte Vorlage handelt, in einem Knock-in, also einem Einfügen zusätzlicher genetischer Information.

### Zinkfinger-Nukleasen-vermittelte Genmodifikation

Der einfachste Weg der gezielten Genommanipulation ist die Erzeugung von Knock-out-Allelen. Mit diesen kann man am schnellsten dauerhaft die phänotypischen Eigenschaften einer Zelle verändern und damit die Genfunktion bestimmen. Die ZFN liefern durch das NHEJ eine effiziente Methode, um einen gezielten Knock-out in Säugerzellen zu erzeugen. Diese Methode macht sich Fehler zunutze, die während der DNA-Reparatur eingebracht werden. Dieser Ansatz wurde bereits in verschiedenen Spezies (Zebrafisch [5], Ratte [6] und Maus [7]) und im zellulären Kontext (CHO [*chinese hamster ovary*] - [8], ES- und iPS [induzierte pluripotente Stamm]-Zellen [7, 9]) angewandt, um nutzerspezifische Gene in einem einzigen Schritt und ohne Selektionsverfahren auszuschalten.

ZFN wurden z. B. benutzt, um das Dihydrofolat-Reduktase (*Dhfr*)-Gen in CHO-Zellen zu modifizieren [8]. In dieser Studie wurde der Knock-out des *Dhfr*-Gens mit einer Frequenz von über einem Prozent ohne den Einsatz eines Selektionsmarkers erzielt. Sequenzanalysen zeigten, dass durch die ZFN Insertionen und Deletionen im Bereich von +2 bis -302 Basenpaaren hervorgerufen wurden.

Bis zu 32 Prozent der Zebrafischembryonen, denen ZFN spezifisch für das Gen *golden* injiziert wurden, enthalten in den Augen unpigmentierte Zellen, was einen Verlust des



◀ **Abb. 2:** Schema der Pronukleusinjektion. Zygoten werden aus Wildtyp(WT)-Mäusen isoliert, anschließend werden Gen-Targeting-Vektor und Zinkfinger-Nukleasen(ZFN)-mRNA in den männlichen Vorkern injiziert. Die Zygoten werden dann in scheinchwangere Mäuse transferiert und deren Nachkommen auf Knock-in- und Knock-out-Ereignisse untersucht. DSB: Doppelstrangbruch; HR: homologe Rekombination; KO/KI: Knock-in/ Knock-out.

golden-Proteins widerspiegelt. Diese Mutationen wurden außerdem an einen signifikanten Anteil (über sieben Prozent) der Nachkommen weitervererbt [5].

Die erste erfolgreiche Demonstration von ZFN in Rattenzygoten bestand in der Mutation eines GFP-Transgens [6]. Die Frequenz des erfolgreichen Knock-outs lag hier bei 20 Prozent der transferierten Zygoten und resultierte in einer gezielten Mutation in den Tieren. Die Mutationen wurden in einer hohen Frequenz über die Keimbahn an die Nachkommen weitergegeben.

In einem ähnlichen Experiment in Mauszygoten konnten wir eine vergleichbare Frequenz (22 Prozent) mit ZFN erzielen, die spezifisch für den *Rosa26*-Locus entwickelt wurden, erzielen [7]. Diese ersten Meilensteine in der Säugetier-Transgenese wurden durch die pronukleare oder zytoplasmatische Injektion von ZFN-mRNA in Zygoten erreicht.

Somit führt die Mikroinjektion von ZFN in Zygoten zum gezielten, schnellen, permanenten und vererbaren Knock-out von Genen. Die Anwendung der ZFN zur gezielten Herstellung von Knock-outs in Organismen, bei denen keine ES-Zellen oder andere Klonierungstechniken verfügbar sind, ist somit eine wichtige Entwicklung um fundamentale biologische Fragen beantworten und Tiermodelle von ökonomischem Interesse etablieren zu können. Außerdem könnte diese Methode in zukünftigen therapeutischen Anwendungen genutzt werden, um den gezielten Knock-out von dominant mutierten Allelen zu erreichen.

### Gene Targeting mit Zinkfingernukleasen in Zygoten

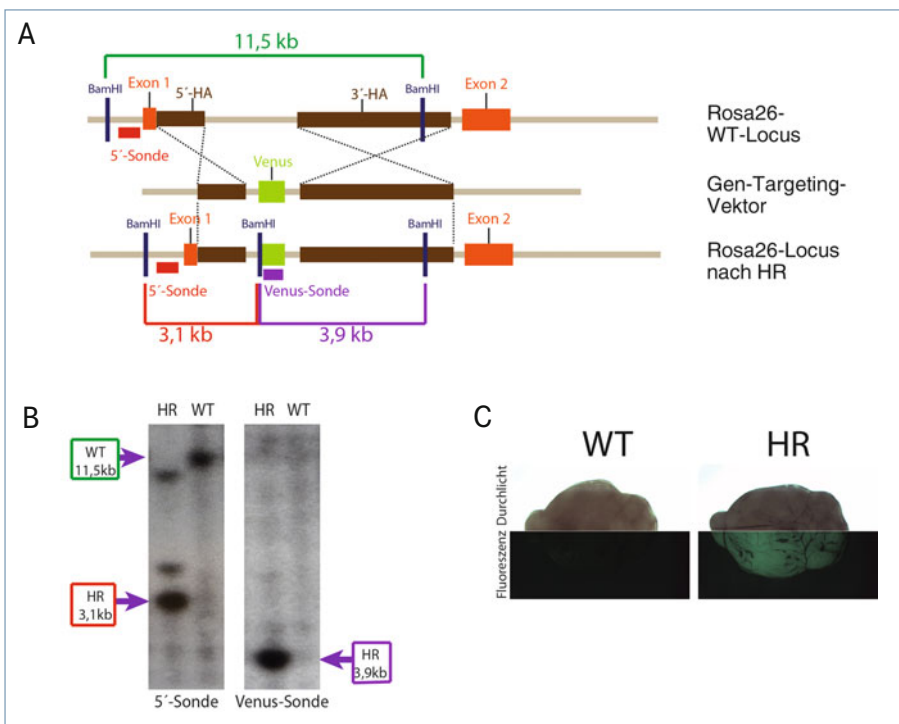
Gene Targeting beruht auf der Rekombination zwischen einem endogenen Ziellokus und einem exogen eingebrachten Gene Targeting-Vektor, welcher als homologes DNA-Fragment der HR als Reparaturmatrize dienen soll. Das ZFN-vermittelte Gene Targeting ermöglicht es somit, exogene DNA-Sequenzen zielgerichtet und schnell an die vorherbestimmten Stellen im Genom zu positionieren (Knock-in). ZFN wurden bereits benutzt, um Knock-ins in Säugerzellen [3, 7–10], *Drosophila melanogaster* [11] und vielen weiteren Spezies zu erzeugen.

So wurden z. B. mit der ZFN-Technologie in humanen Zellen gezielte Integrationen

an einem spezifischen Locus mit einer Frequenz von fünf bis 15 Prozent ohne Selektionsverfahren erzielt [10]. Da humane Erkrankungen schon länger das Ziel gentherapeutischer Anwendungen sind, wurde an einem Beispiel die Nutzbarkeit der ZFN-vermittelten Genkorrektur demonstriert [3]. Es wurden gezielte Veränderungen in mehr als 18 Prozent der HEK-293-Zellen ohne vorherige Selektion erzielt.

Die Verwendung von Zygoten stellte den nächsten logischen Schritt bei der Modifikation der Keimbahn bei Säugetieren dar. Während die Vorkerninjektion von DNA routinemäßig eingesetzt wird, um transgene Mäuse, Ratten und andere Säugetiere durch zufällige, genomische Integration des Transgens herzustellen, war das Gene Targeting in Zygoten aufgrund der niedrigen Frequenz der spontanen HR bisher nicht etabliert. Da die Maus das am besten etablierte Modellsystem der Säuger ist, haben wir untersucht, ob ein gezielter Knock-in direkt durch die ZFN-unterstützte HR in Zygoten nach der Ko-Injektion von ZFN-mRNAs und einem Gene Targeting-Vektor in den männlichen Pronukleus erreicht werden kann (**Abb. 2**, [7]).

Dazu nutzten wir einen Targeting-Vektor, der ein 1,1 Kilobasen großes *Venus*-Reportergen in den *Rosa26*-Locus einführt (**Abb. 3A**). Die Southern-Blot-Analyse der daraus resultierenden Mäuse zeigte die Anwesenheit eines rekombinierten Allels; es wurde durch die 3,1 Kb-BAMHI-Bande (nachgewiesen mit einer 3'-Hybridisierungs-sonde) und durch die 3,9 Kb-BAMHI-Bande (nachgewiesen mit einer *Venus*-Sonde) gezeigt (**Abb. 3B**). Die *Venus*-Reporterkassette wurde aus der genomischen DNA mittels PCR amplifiziert und durch Sequenzanalysen als intakt bestätigt. Wir konnten keine Mutationen in der analysierten Region beobachten, was zeigt, dass die ZFN-vermittelte HR mit einer hohen Genauigkeit erfolgt. Zudem wurde die Integrität der *Venus*-Reporterkassette durch den Nachweis der GFP-Fluoreszenz bestätigt (**Abb. 3C**). Verglichen mit einer früheren Arbeit über HR in Mauszygoten, die eine Rate der spontanen Rekombination von unter 0,1 Prozent beschreibt [12], zeigten unsere Ergebnisse, dass das Gene Targeting im Pronukleus von Zygoten in einer höheren Frequenz (1,7 bis 4,5 Prozent) erreicht werden kann, wenn es von ZFN unterstützt wird. Die ZFN-Expression, die



▲ **Abb. 3:** Homologe Rekombination (HR) im *Rosa26*-Locus. **A**, Struktur des *Rosa26*-Locus vor und nach der HR sowie des Targeting-Vektors mit den Homologiearmen (HA) und der Reporter-kassette. **B**, Southern Blots einer positiv rekombinierten DNA (HR) und einer Wildtyp-DNA (WT), verdaut mit *Bam*HI, hybridisiert mit der 5'- und der Venus-Sonde. **C**, Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme vom Gehirn einer Wildtyp-Maus und einer Knock-in-Maus nach der HR. Nach der erfolgreichen HR konnten wir die GFP-Fluoreszenz des Gehirns und damit die Funktionsfähigkeit des *Venus*-Gens zeigen.

Erzeugung eines DSB und die HR erfolgen in wenigen Stunden, bevor die DNA-Replikation und die Fusion der beiden Vorkerne beendet sind. Außerdem beeinträchtigt die ZFN-Expression und die daraus resultierende Genmodifikation nicht die Vitalität und Fertilität der Knock-in-Mäuse.

### Schlussfolgerung

Die Möglichkeit, routinemäßig Gene in Zelllinien und Tieren gezielt zu verändern, ist seit Langem das Ziel vieler Wissenschaftler auf der Suche nach einem besseren Verständnis der komplexen Funktion der verschiedenen Gene. Die Anwendung dieses Wissens kann genutzt werden, um neue Medikamente zu entwickeln, eine verbesserte Produktivität von Nutztieren oder -pflanzen zu erreichen und humane Erkrankungen durch eine mögliche Gentherapie zu behandeln oder sogar zu heilen. In ihrer Gesamtheit zeigen die aufgeführten Arbeiten, dass die ZFN-Technologie es ermöglicht, dieses Ziel zu erreichen, indem in effizienter Weise präzise genetische Veränderungen in das Genom von z. B. humanen Stammzellen,

Pflanzen und Säugetieren integriert werden können.

Bei der Anwendung in Zygoten bieten die ZFN eine attraktive und schnelle Alternative zur Genmanipulation in Maus-ES-Zellen und zum Kernttransfer. Darüber hinaus ermöglicht die ZFN-Technologie aber auch erstmals die Erzeugung von gezielten Mutanten in Säugern, wie dem Kaninchen [13], bei denen ES-Zellen nicht etabliert sind und bisher keine gezielten Mutagenesemethoden zur Verfügung standen. ■

### Literatur

- [1] Capecchi, MR (1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5:70–76
- [2] Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A et al. (1998) I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 18:1444–1448
- [3] Urnov FD, Miller JC, Lee YL et al. (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435:646–651
- [4] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A et al. (2008) Rapid 'open-source' engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* 31:294–301
- [5] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC et al. (2008) Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26:702–708

- [6] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y et al. (2009) Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325:433
- [7] Meyer M, Hrabé De Angelis M, Wurst W et al. (2010) Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15022–15026
- [8] Santiago Y, Chan E, Liu PQ et al. (2008) Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5809
- [9] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C et al. (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27:851–857
- [10] Moehle EA, Rock JM, Lee YL et al. (2007) Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3055
- [11] Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A et al. (2008) Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19821–19826
- [12] Brinster RL, Braun RE, Lo D et al. (1989) Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7087
- [13] Flisikowska T, Thorey IS, Offner S et al. (2011) Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One* 6:e21045

### Korrespondenzadresse:

Melanie Meyer  
 Institut für Entwicklungsgenetik  
 Helmholtz-Zentrum München  
 Ingolstädter Landstraße 1  
 D-85764 München-Neuherberg  
 Tel.: 089-3187-2273  
 Fax: 089-3187-3099  
 melanie.meyer@helmholtz-muenchen.de

### AUTOREN



Ralf Kühn, Benedikt Wefers, Melanie Meyer, Oskar Ortiz und Wolfgang Wurst (v. l. n. r)

Die Autoren arbeiten im Institut für Entwicklungsgenetik des Helmholtz-Zentrums München. Hauptziel ihrer Forschung ist die Erstellung und Untersuchung genetischer Mausmodelle für neurodegenerative und psychiatrische Erkrankungen. Dazu zählt auch die Entwicklung und Erprobung neuer Technologien zur vereinfachten Erzeugung genetischer Modelle.