

SONDERHEFT  
2024

**VBio**

Verband | Biologie, Biowissenschaften  
& Biomedizin in Deutschland

**MATERIAL-  
FORSCHUNG**  
Gesteinsbesiedelnde  
Pilze

**PFLANZENGENETIK**  
Genomsequenzen  
sichtbar machen

**EXPERIMENT**  
Pauline und die  
Ausreißer

# BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

## CRISPR-Cas

... mehr als nur  
Verteidigung

# Ein “richtiges“ Experiment für die Schule „Pauline und die Ausreißer“

PAULINE KANNGIESSER



Das Schülerlabor Science Bridge hatte 2020 ein einfaches CRISPR-Cas-Experiment mit *E. coli* entwickelt, das gut für Schulen geeignet war und zuverlässig funktionierte. Überraschenderweise tauchten dabei sehr selten Kolonien mit einem Phänotyp auf, der nicht „passte“: Die Bakterien waren blau und nicht – wie erwartet – weiß. Was steckte hinter dem Geheimnis der blauen Kolonien? Im Herbst 2020 gingen wir dem Rätsel auf den Grund.

Alle Abbildungen wurden der Blog-Serie „Pauline und die Ausreißer“ auf [www.crispr-whisper.de](http://www.crispr-whisper.de) entnommen.

In einer insgesamt neunteiligen Blog-Serie haben wir Biologie-Interessierte auf eine Reise in das Themengebiet der Genscher CRISPR-Cas mitgenommen und dabei interaktiv das Geheimnis der „blauen Ausreißer“ aufgedeckt. Die Blog-Besucher wurden dabei nahezu in Echtzeit über das Voranschreiten der Versuche informiert und konnten die weitere Vorgehensweise im Labor durch anregende Kommentare und Vorschläge mitgestalten. Die Blog-Serie liefert ein sehr schönes Beispiel für wissenschaftliches Arbeiten und Erkenntnisgewinnung und zeigt anschaulich, wie ausgehend von einer Beobachtung Fragestellungen entwickelt und in welchen Schritten diese gelöst werden können.

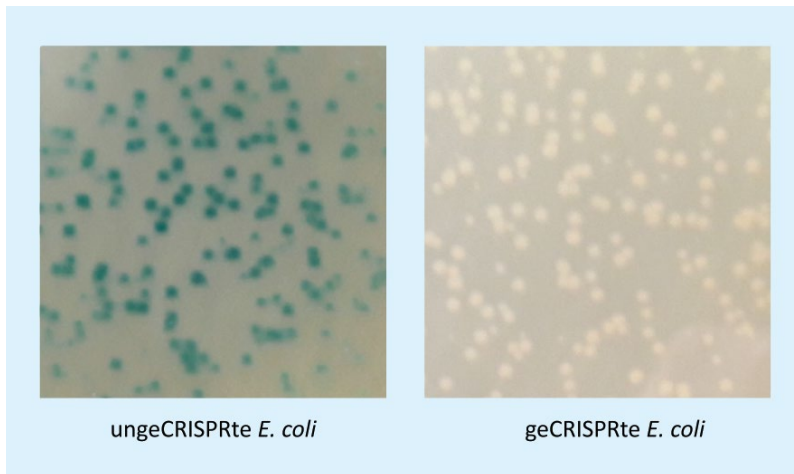
## Aus Blau mach Weiß – das Experiment im Überblick

Das Blog-Format „Pauline und die Ausreißer“ entwickelte sich aus einem Schülerexperiment des Vereins *Science Bridge* e.V. zur Genscher Cas9 [1]. Einige Bakterien – darunter auch das Darmbakterium *Escherichia coli* – sind dazu in der Lage, den Milchzucker Lactose als Energiequel-

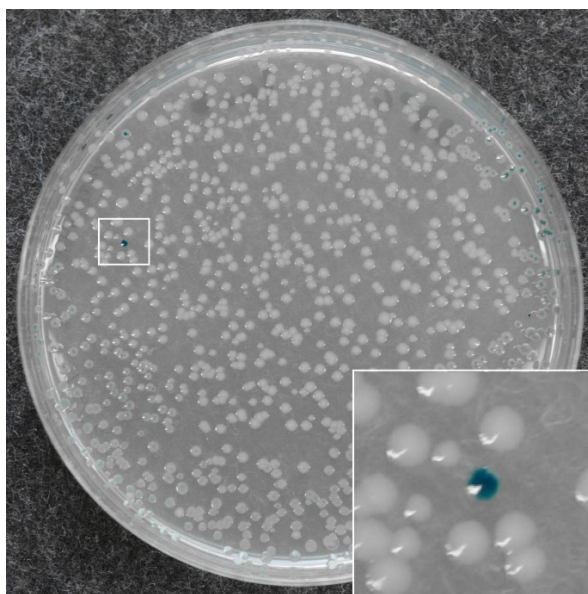
le zu nutzen. Hierfür stellen sie ein Protein namens  $\beta$ -Galaktosidase (Lactase) her, welches den Zweifachzucker Lactose in seine beiden Bestandteile Glucose und Galactose spaltet. Das Gen, welches für die Lactase kodiert, wird *lacZ* genannt [2].

Der im Schülerexperiment verwendete *E. coli*-Stamm besitzt ein Plasmid, welches für dieses *lacZ*-Gen kodiert (*lacZ*-Plasmid). Die Induktion des Gens führt also zur Expression des Proteins  $\beta$ -Galaktosidase, welches nicht nur Lactose abbauen, sondern auch eine zugesetzte, farblose Substanz namens X-Gal spalten kann. Dabei entstehen sowohl der Einfachzucker Galaktose als auch der Farbstoff 4-Chlor-3-Brom-Indigo: Die Bakterienkolonien werden dadurch gut erkennbar blau gefärbt. X-Gal dient damit als Indikator für ein funktionierendes *lacZ*-Gen.

Im Zuge des Experimentes wird nun ein zweites Plasmid in die Bakterien eingebracht. Dieses enthält zum einen die kodierende Sequenz für die Genscher Cas9 sowie eine spezifische CRISPR-RNA (crRNA), die die Genscher zum *lacZ*-Gen leitet. Das CRISPR-Cas9-System findet also die zur crRNA komplementäre Sequenz und schneidet die DNA



**ABB. 1** Das Ergebnis des Science Bridge-Schülerexperimentes: Aus blauen Bakterien (links) entstehen mithilfe der Genschere CRISPR-Cas9 weiße Kolonien (rechts).



**ABB. 2** Eine blaue Kolonie inmitten vieler weißer. Was steckt wohl hinter dem Geheimnis der Ausreißer?

## IN KÜRZE

- In einem Schulexperiment zu CRISPR-Cas wurden einige Bakterienkolonien gefunden, bei denen die Geneditierung **nicht wie beabsichtigt** funktioniert hatte.
- Dazu wurde ein Forschungsprojekt durchgeführt, um die **Ursache für diese „Ausreißer“** zu verstehen.
- Als **ergebnisoffenes, interaktives Online-Projekt** sollten Hypothesen entwickelt und geeignete Methoden vorgeschlagen werden, um die Hypothesen experimentell zu überprüfen.
- Die jeweiligen Ergebnisse wurden **nahezu in Echtzeit** online gestellt.
- Das Projekt kann als Anregung z. B. für einen **Leistungskurs Biologie** verwendet werden.

innerhalb des *lacZ*-Gens. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen kann ein Schnitt durch Cas9 in den verwendeten *E. coli*-Stämmen nicht repariert werden. Deshalb wird das *lacZ*-Plasmid vollständig abgebaut und die Bakterien verlieren die Fähigkeit, den blauen Farbstoff herzustellen. Aus blauen Kolonien entstehen somit weiße (Abbildung 1).

### Ein digitales Mitmachprojekt entsteht

Während der Durchführung der Schülerversuche konnten wir ab und an ein merkwürdiges Phänomen beobachten: Unter den „geCRISPRten“ weißen Bakterien fand sich bei genauem Hinsehen die ein oder andere blaue Kolonie (Abbildung 2). Anscheinend funktionierte das CRISPR-Cas9-System bei einigen wenigen Bakterien nicht. Dem Geheimnis dieser Ausreißer wollten wir natürlich auf die Spur kommen.

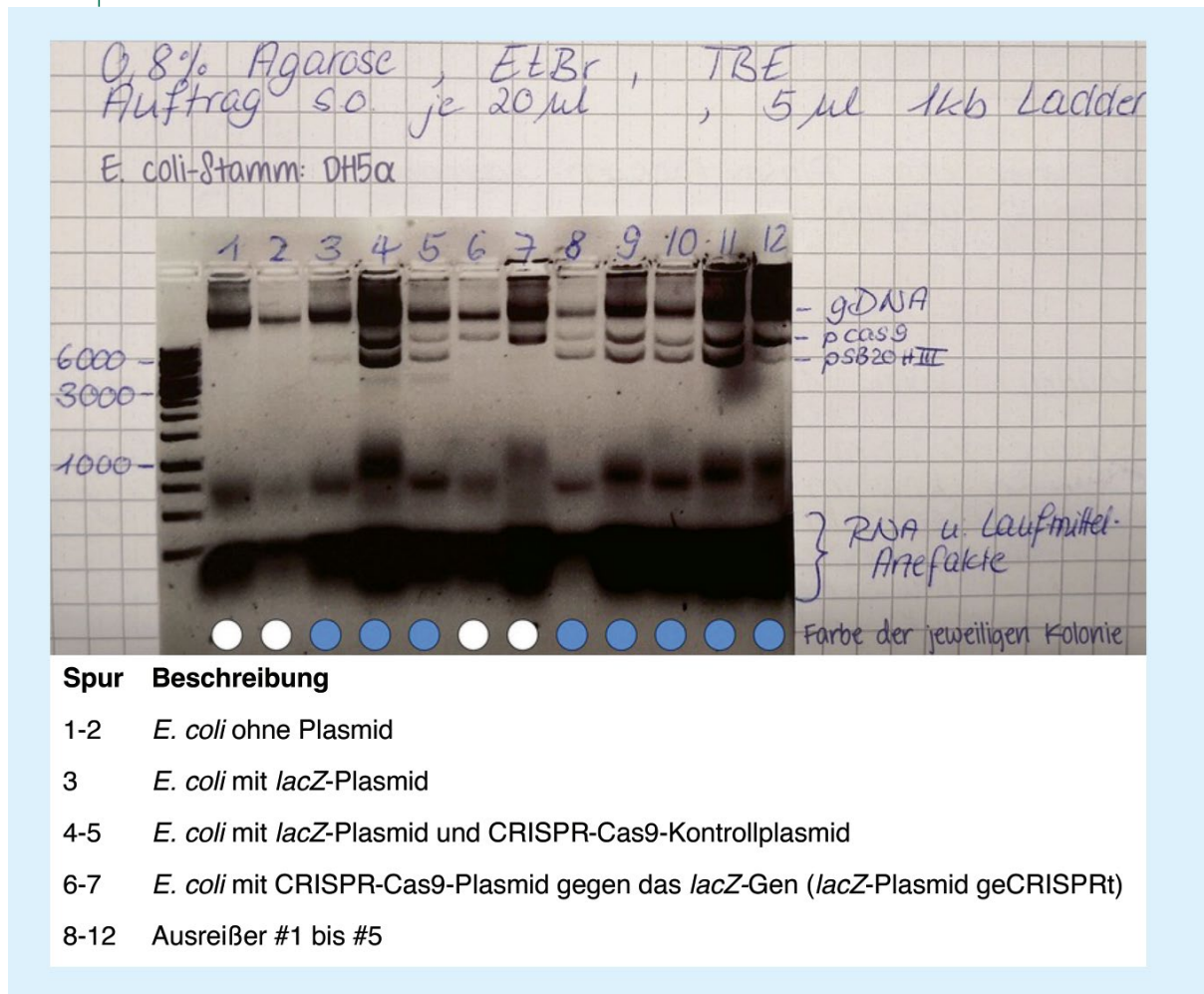
Damit wollten wir im Herbst 2020 beginnen, aber die COVID-19-Pandemie nahm beständig an Fahrt auf und ein Lockdown folgte dem nächsten. Warum aus dem Geheimnis der Ausreißer also nicht ein digitales Mitmachprojekt entwickeln, um die Community in ein kleines Forschungsprojekt mitzunehmen? So wurden ab November 2020 regelmäßig Video- und Textbeiträge auf dem CRISPR-Whisper-Blog (<https://www.crispr-whisper.de/category/laborleben/>) hochgeladen, in denen nahezu in Echtzeit über die Fortschritte der Experimente berichtet wurde, die wir im Labor durchführten. Über die Kommentarfunktion hatten Leserinnen und Leser die Möglichkeit, weiterführende Ansätze und Experimente zu diskutieren und so unser Vorgehen mitzugestalten.

### Auf den Spuren der blauen Ausreißer

Zuerst stellten wir uns die Frage, ob das Auftauchen der Ausreißer ein reproduzierbares Ereignis darstellt und falls ja, mit welcher Häufigkeit dieses auftritt. Zu Beginn des Forschungsprojektes wurde das Schülerexperiment daher mehrmals und unabhängig voneinander durchgeführt. Nach zwölf Wiederholungen und fast 28.000 ausgezählten Kolonien ergab sich ein prozentualer Anteil von rund 0,1 Prozent, also durchschnittlich eine blaue Kolonie pro 1000 weißen. Die natürliche Mutationsrate als Ursache der Ausreißer kam somit eher nicht in Frage, liegt diese doch mit etwa 0,00001 Prozent pro Gen und pro Generation deutlich niedriger [3]. Es handelte sich also um ein reproduzierbares Phänomen, das mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit auftrat.

Könnte es sein, dass die blauen Ausreißer schlicht und ergreifend kein CRISPR-Cas9-Plasmid besitzen? Diese Frage stellte sich auch ein Leser aus der Community. Allerdings war diese Erklärung relativ unwahrscheinlich: Das CRISPR-Cas9-Plasmid enthält neben dem *cas9*-Gen und der spezifischen crRNA zusätzlich ein Gen für eine Antibiotikaresistenz und die blauen Kolonien wuchsen problemlos auf einem Medium mit diesem Antibiotikum. Trotzdem musste zweifelsfrei geklärt werden, ob das Plasmid vorhanden war.

ABB. 3 | KOLONIE-CRACKING-GEL



Ein Auszug aus dem Laborbuch zeigt das Ergebnis des „Kolonie-Cracking-Gels“: Alle untersuchten Ausreißer (Spuren 8–12) besitzen zwei Plasmide. Die übrigen Spuren 1–7 zeigen verschiedene Kontrollen: Das Kontrollplasmid in den Spuren 4 und 5 ist nicht gegen das *lacZ*-Gen gerichtet, in den Spuren 6 und 7 ist das untere *lacZ*-Plasmid abgebaut.

Wir stellten deshalb ein sogenanntes „Kolonie-Cracking-Gel“ her. Dabei werden die Bakterienzellen durch Kochen aufgebrochen und die enthaltene DNA wird freigesetzt. Mithilfe eines Agarosegels kann dann ganz einfach überprüft werden, ob beide Plasmide in den Kolonien vorhanden sind oder ob es zum Verlust eines Plasmids gekommen ist. Das Ergebnis: In allen untersuchten Ausreißern können – neben der genomischen DNA der Bakterien (gDNA, oberste Bande) – beide Plasmide nachgewiesen werden (Abbildung 3). Das CRISPR-Cas9-Plasmid war also in der Tat in den Bakterienzellen vorhanden, allerdings hatte der Abbau des *lacZ*-Plasmids aus irgendeinem Grund nicht funktioniert.

Was man im „Cracking-Gel“ nicht erkennen kann, wären zum Beispiel kleinere Mutationen, Deletionen oder Insertionen in dem einen oder dem anderen Plasmid. Dafür ist die Größenauflösung in einem „Cracking-Gel“ nicht gut genug. So könnte zum Beispiel ein DNA-Abschnitt des

*lacZ*-Genes verändert sein, ohne dass die Funktion des Proteins verloren geht. Ein Fehler innerhalb der CRISPR-Erkennungssequenz könnte die Erkennung durch die entsprechende crRNA beeinträchtigen und den Abbau des *lacZ*-Plasmids verhindern. Im nächsten Schritt wurde daher eine Kolonie-PCR durchgeführt, in der der DNA-Abschnitt des *lacZ*-Genes mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt wurde. Auch hier konnten keine Auffälligkeiten unter den blauen Ausreißern festgestellt werden: Die Zielsequenz im *lacZ*-Gen scheint – auf den ersten Blick – die „richtige“ Länge zu besitzen.

### Des Rätsels Lösung

Also was nun? Letztendlich konnten wir das Rätsel der blauen Kolonien mithilfe der in der Community vorgeschlagenen DNA-Sequenzierung lösen. Diese deckte zunächst auf, dass die CRISPR-Zielsequenz innerhalb des *lacZ*-Genes bei allen untersuchten Ausreißern intakt ist.



den, warum einzelne Bakterienkolonien nicht geCRISPRt wurden und blau geblieben sind. Das ist zwar spannend, aber was hat der ganze Aufwand genutzt? War es letztendlich nur ein Zeitvertreib für neugierige Wissenschaftler? Diese Frage kann klar mit Nein beantwortet werden. Wir haben gelernt, dass crRNAs aus einem CRISPR-Array verloren gehen können – und zwar mit einer größeren Wahrscheinlichkeit als durch „normale“ Mutationen. Dieses Erkenntnis ist auch in der Anwendung von Bedeutung und muss – beispielsweise bei potenziellem Einsatz des CRISPR-Cas9-Systems als medizinisches Therapeutikum – bedacht werden. Und man sollte hier sogar weitere Forschungen anstellen. Was wäre zum Beispiel, wenn die wenigen nicht geCRISPRten Zellen, die anfangs kaum aufgefallen sind, ein kleines bisschen schneller wachsen würden? Sie könnten die geCRISPRten Zellen nach einiger Zeit verdrängen und daran könnte letztlich eine zunächst erfolgreiche Therapie scheitern. Wir wissen jetzt, warum das so sein könnte. Das ist noch keine Lösung, aber den Grund zu kennen ist die Voraussetzung dafür, eine Lösung zu finden.

### Was kann man mit diesem Projekt in der Schule erreichen?

In der Schule werden wichtige Teile der wissenschaftlichen Arbeit kaum realistisch dargestellt. Experimentelles Arbeiten mit offenem Ausgang ist sehr selten. In den meisten Fällen werden etablierte Experimente durchgeführt, die „funktionieren“ – das entspricht aber nicht der wissenschaftlichen Realität, denn sehr häufig liefern Experimente nicht die Ergebnisse, die man gerne hätte.

Optimal wäre eine solche Aufgabe in einer Schule mit einem molekularbiologisch ausgestatteten S1-Labor. Aber auch ohne das können Hypothesen aufgestellt und die entsprechenden Experimente vorgeschlagen werden, deren Planung, Aufbau und Durchführung aus dem theoretischen Unterricht bekannt sind. Lehrer können denkbare Ergebnisse grafisch vorbereiten und zur Diskussion stellen. Auch so können grundlegende, wesentliche Konzepte und Denkweisen der Naturwissenschaft Biologie im Bereich der Erkenntnisgewinnung Eingang in den Unterricht finden und bei den Lernenden Wissenschaftsverständnis und wissenschaftliches Denken fördern. Zusammengefasst können die folgenden Lernergebnisse erzielt werden:

1. Wissenschaftliche Fragestellungen ergeben sich (oft) aus guter Beobachtung: Man erkennt ein Phänomen als ungewöhnlich und will es untersuchen.
2. Für ein Forschungsprojekt muss ein Phänomen reproduzierbar sein. Einzelne Zufallsbeobachtungen sind dafür nicht geeignet.
3. Man muss Hypothesen aufstellen. Das sind keine „wildes Spekulationen“, sondern sorgfältige Überlegungen, wie dieses Phänomen zustande kommen könnte. Dabei ist wichtig, dass eine Hypothese experi-

mentell überprüfbar sein muss. Die Hypothese „Aliens haben das CRISPR-Gen verhext“ ist nicht überprüfbar.

4. Eine Hypothese wird verworfen, wenn sie experimentell nicht bestätigt werden kann. Das bedeutet nicht, dass die Hypothese schlecht war, sie erklärt aber nicht das beobachtete Phänomen.
5. Eine zutreffende Hypothese erklärt ein Phänomen nicht unbedingt vollständig. Im Falle unserer Ausreißer ist der größte Teil der blauen Kolonien durch eine Deletion der crRNA-Sequenz zu erklären, für andere Kolonien gilt das aber nicht. Das heißt, es müssen weitere Hypothesen entwickelt werden, um diese zu erklären.
6. Vorwissen hilft: Die Häufigkeit der Ausreißer liegt hier z. B. weit über der natürlichen Mutationsrate. Dadurch ist es sehr unwahrscheinlich (aber nicht völlig auszuschließen), dass eine Punktmutation im Cas9-Gen für die blauen Kolonien verantwortlich ist.
7. Kontrollen: Keines der beschriebenen Experimente ist ohne entsprechende Kontrollen auswertbar. Bei der Plasmidanalyse ist z. B. immer ein Vergleich zwischen blauen und weißen Kolonien oder mit den ursprünglichen Plasmiden erforderlich.

### Zusammenfassung

*In einem CRISPR-Experiment wurden vereinzelt Zellen gefunden, in denen die Genomedition nicht stattgefunden hatte. Verschiedene Hypothesen wurden aufgestellt und experimentell geprüft. Für den größten Teil der Zellklone konnte eine punktgenaue Deletion der entsprechenden spacer-repeat-Einheit im CRISPR-Array als Ursache festgestellt werden. Hypothesen, Experimente und Schlussfolgerungen wurden als partizipatives Online-Projekt auf der Webseite [www.crispr-whisper.de](http://www.crispr-whisper.de) nacheinander veröffentlicht. Dieses dient als Anregung für Schulen, Forschung an offenen Fragen zu präsentieren und verständlich zu machen.*

### Summary

#### *A suitable experiment for school “Pauline and the runaways”*

*In a CRISPR experiment, occasionally cells have been found in which genome editing had not taken place as expected. Various hypotheses to explain the observation were put forward and tested experimentally. For the majority of cell clones, a pinpoint deletion of the corresponding spacer repeat unit in the CRISPR array was identified as the cause. Hypotheses, experiments and conclusions were published one after the other as a participatory online project on the website [www.crispr-whisper.de](http://www.crispr-whisper.de). It serves as a stimulus for schools to present research on the basis of open questions and make it understandable.*

### Danksagung:

Besonderer Dank gilt Dr. Heike Ziegler für wertvolle Hinweise zur Planung und Durchführung der Experimente.

## Schlagworte

CRISPR-Cas, Wissenschaftskommunikation, Schulversuche, Hypothese, Gentechnik, Polymerasekettenreaktion (PCR), wissenschaftliches Arbeiten, *lacZ*-Gen

## Literatur

- [1] H. Ziegler, W. Nellen (2020). CRISPR-Cas experiments for schools and the public. *Methods* 172, 86–94, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.08.009>
- [2] D. H. Juers et al. (2012). LacZ  $\beta$ -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *The Protein Society* 21(12), 1792–807.
- [3] H. Lee et al. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (41), E2774–E2783.

- [4] D. Bhaya et al. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics* 45, 273–297.

## Verfasst von:



Pauline Kanngießer ist Masterstudentin der Biologie an der Universität Kassel und war über mehrere Jahre aktives Mitglied bei Science Bridge e. V.

### Korrespondenz:

Pauline Kanngießer  
Auf der Schubach 76a  
34130 Kassel  
E-Mail: [pauline.k@me.com](mailto:pauline.k@me.com)



STIFTERVERBAND



# ARS LEGENDI- FAKULTÄTENPREIS

## Mathematik und Naturwissenschaften 2025

Zum zwölften Mal loben der Stifterverband, die Deutsche Mathematiker-Vereinigung, die Deutsche Physikalische Gesellschaft, die Gesellschaft Deutscher Chemiker und der Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin in Deutschland den Ars legendi-Fakultätenpreis aus. Der Preis wird in den Kategorien Biowissenschaften, Chemie, Mathematik und Physik vergeben. Ausgezeichnet werden Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen für herausragende und innovative Leistungen in Lehre, Prüfung, Beratung und Betreuung an Hochschulen.

### DER PREIS IST MIT JEWEILS 5.000 EURO DOTIERT.

Fakultäten und Fachbereiche, lokale Vertretungen der jeweiligen Fachgesellschaften und Fachschaften können Vorschläge einreichen; Eigenbewerbungen sind zulässig.

**BEWERBUNGSSCHLUSS: 26. JANUAR 2025**

Nähere Informationen und die Ausschreibungsunterlagen unter:

[www.stifterverband.org/ars-legendi-mn](http://www.stifterverband.org/ars-legendi-mn)





Verband | Biologie, Biowissenschaften  
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM  
FÜR DIE**

**BIEWISSENSCHAFTEN**

### **Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:**

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



[www.vbio.de](http://www.vbio.de)

**Jetzt beitreten!**

