

SCHULE

Darf man in der Schule CRISPRn?

Praktische Erfahrung durch CRISPR-Cas-Laborexperimente erlaubt an Schulen, aber auch in der allgemeinen Öffentlichkeit bessere Einblicke in eine Methodik, die unsere Gesellschaft wesentlich beeinflussen wird. Es wurden einige einfache und sichere Experimente entwickelt, die teilweise in zwei Schulstunden durchführbar sind. Die gesetzlichen Vorgaben in Deutschland sind jedoch so restriktiv, dass selbst professionelle Schüler- und Öffentlichkeitslabore zurückschrecken, den administrativen Aufwand zu wagen. Wir ermutigen die Labore, es trotzdem zu versuchen, und appellieren an die Politik, die unnötigen Hürden abzubauen.

Die Bedeutung von CRISPR-Cas für Medizin, Pflanzenzucht, Materialwissenschaften, Grundlagenforschung und andere Bereiche der Biowissenschaften ist so groß, dass die Methode im Biologieunterricht der Oberstufe nicht fehlen darf. Die Thematik ist in den meisten Lehrplänen für die Sekundarstufe II verankert und spielt in Abiturprüfungen (oft) eine Rolle.

Das Verständnis für dieses biologische System ist von großer Bedeutung für nachhaltige, praxisorientierte Bildung. CRISPR-Cas hat bereits 10 Jahre nach der Entdeckung revolutionäre Anwendungen im Bereich Gesundheit und ressourcenschonender Landwirtschaft erbracht. Weitere Projekte zu grüner Energie, Plastik-Recycling, umweltfreundlichem Pflanzenschutz, nachhaltigen Bio-Materialien und mehr stehen kurz vor der Markteinführung oder sind in der Erprobung. Die vielfältigen Herausforderungen des Klimawandels erfordern neue innovative Ideen, die zu einem großen Teil mit biologischen Methoden angegangen werden können. Wer sonst als die junge Generation soll diese Aufgaben lösen? Dazu sind jedoch solide Kenntnisse der Technologie erforderlich, um ihre Möglichkeiten und Grenzen realistisch einschätzen zu können und neue Lösungsmöglichkeiten zu entdecken (Abbildung 1).

Grundsätzlich gilt für alle Bürger, dass zumindest ein Grundverständnis der Methode vonnöten ist:

Sie wird uns alle betreffen und nur so kann sie wissenschaftlich diskutiert werden.

Rechtliche Voraussetzungen

Leider gibt es große Hürden, CRISPR-Cas im Experimentalunterricht (oder auch in der Öffentlichkeitsarbeit) einzusetzen, um so notwendige praxisnahe Bildungsarbeit zu leisten, die zu einer größeren Motivation und damit zu einem nachhaltigeren Lernerfolg führt. Obwohl für die Schule Versuche entwickelt wurden (s. unten), die bei entsprechender Vorbereitung durchaus in einer Doppelstunde

durchführbar sind, werden sie nur in sehr seltenen Fällen eingesetzt.

Die Genomeditierung mit CRISPR-Cas zählt in Deutschland als Gentechnikexperiment der Sicherheitsstufe 1 (keine Gefahr für Mensch und Umwelt) und erfordert ein entsprechendes Sicherheitslabor. Die Anforderungen sind zwar nicht sehr hoch, für die meisten Schulen aber finanziell und personell kaum tragbar. Wesentliche Voraussetzungen sind ein wasserdichter Boden, ein Mobiliar mit porenlosen, abwaschbaren Oberflächen sowie verschließbare Türen und Fenster. Ein Autoklav zur Sterilisierung von Abfällen muss vorhanden sein. Das erscheint zunächst einfach, kann aber je nach Gebäudebeschaffenheit und Auflagen der Landesaufsichtsbehörde kostenintensiv sein. Der finanzielle Aufwand für die Einrichtung eines S1-Labors kann sehr unterschiedlich sein; er liegt aber in der Regel um 10.000 Euro.

Anspruchsvoller ist die Bestellung eines Projektleiters, der mehrjährige Erfahrung in einem molekularbiologischen Labor nachweisen und einen Projektleiterkurs (mit regelmäßigen, kostenpflichtigen



ABB. 1 Ob Schulkurs, Lehrerfortbildung oder Öffentlichkeitslabor: Die Laborerfahrung schafft ein tieferes Verständnis für Wissenschaft und einen direkten Kontakt zu Wissenschaftlern – auf Augenhöhe. Foto: W. Nellen, öffentlicher CRISPR-Kurs in Regensburg.

TAB 1. SCHÜLERLABORE IN DEUTSCHLAND, DIE CRISPR-CAS-EXPERIMENTE ANBIETEN

Labor	Webseite	E-Mail
Gläsernes Labor Berlin	https://www.glaesernes-labor.de/	
Vienna Open Lab, Wien	https://www.viennaopenlab.at	
MINT-Labs Regensburg	https://www.mint-labs-regensburg.de/	crispr@mint-labs.de
XLAB Göttingen	https://xlab-goettingen.de	buchung@xlab-goettingen.de
experimenta Heilbronn	https://www.experimenta.science/	Thomas.Wendt@experimenta.science
Grünes Labor Gatersleben	www.gruenes-labor.de	info@gruenes-labor.de

Das Gläserne Labor Berlin stellten wir in BiUZ 2/21 als außerschulischen Lernort vor.

Das Göttinger XLAB stellten wir in BiUZ 1/24 als außerschulischen Lernort vor.

Nachschulungen) absolvieren muss. Der Projektleiter hat Nutzer des Labors über die Gentechniksicherheitsverordnung zu belehren, Experimente akribisch aufzuzeichnen und kann persönlich für Unregelmäßigkeiten und Verstöße gegen das Gentechnikgesetz verantwortlich gemacht werden.

Zusätzlich ist ein externer, unabhängiger Beauftragter für biologische Sicherheit (BBS) erforderlich, der die Einhaltung von Sicherheitsvorschriften, die Lagerung von gentechnisch veränderten Organismen und die Aufzeichnungen überprüft. Die Aufsichtsbehörde ist gehalten, die gentechnische Anlage regelmäßig zu begehen und zu prüfen. Diese Voraussetzungen und Auflagen sowie der Arbeitsaufwand schrecken viele Schulen von der Einrichtung ab. Arbeit und Kosten können reduziert werden, wenn zwei oder drei Schulen gemeinsam ein S1-Labor einrichten.

Eine Alternative besteht darin, ein entsprechendes Schülerlabor in der Region für gentechnische Experimente zu besuchen. Außerhalb der Ballungszentren und vor allem im

ländlichen Raum wird das jedoch schwierig. Zudem bieten nur wenige Schülerlabore ein „echtes“ CRISPR-Cas-Experiment an. Die Aufstellung in Tabelle 1 ist wahrscheinlich nicht ganz vollständig, sie zeigt aber bereits, dass das Angebot dünn gesät ist.

Welche Experimente gibt es?

Experimentierkits werden in Deutschland von der Firma Biorad („Out of the Blue“, <https://t1p.de/jeprb>, ab ca. 300 Euro für eine Schulklasse) und der Firma miniPCR-Bio („Knockout!“, <https://t1p.de/5lr8e>, ab ca. 225 Euro, Vertrieb in Deutschland und Österreich über BioWissKomm, www.biowisskomm.de) angeboten. Mit etwas Zeit und Erfahrung können die biologischen Materialien selbst auch kostengünstiger hergestellt werden. Das Kit „Knockout!“ wurde von *Science Bridge/BiowissKomm* entwickelt [1] (das ausführliche Protokoll kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden).

In beiden Kits wird durch eine Transformation in *E. coli* ein CRISPR-Cas9-System (Cas9-Nuklease und eine CRISPR-RNA (crRNA)) eingebracht, um das *lacZ*-Gen auszuschalten. Das primäre Ergebnis ist, dass ein (mit X-Gal) blau anfärbbarer Bakterienstamm die β -Galactosidaseaktivität verliert und nicht mehr färbbar ist - die Zellen bleiben weiß. Ein entsprechendes Kontrollexperiment ist in den Kits enthalten.

Mit Erweiterungen kann durch ein „Cracking-Gel“ der Verlust des *lacZ*-Plasmids nachgewiesen werden, ebenso durch Plasmidisolierung und einen Restriktionsverdau. Mit

Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) kann die Abwesenheit des *lacZ*-Gens im Experiment, nicht aber in der Kontrolle gezeigt werden. Der Versuch erlaubt somit mehrere Nachweise mit verschiedenen Methoden der Molekularbiologie. Das XLAB in Göttingen, eines der größten Schülerlabore in Deutschland, hat ein eigenes Experiment entwickelt, in dem auf ähnliche Weise das Markergen RFP (rot fluoreszierendes Protein) in humanen Zellkulturen mit CRISPR-Cas ausgeschaltet wird.

Das Problem, dass diese Experimente nur in einem Sicherheitslabor (S1) durchgeführt werden dürfen, kann mit dem Kit „Chopped!“ von miniPCR-Bio umgangen werden (<https://t1p.de/uh6sd>). Bei „Chopped!“ wird ein vorgefertigter Komplex aus Cas9 und einer crRNA geliefert. Damit wird ein DNA-Doppelstrang *in vitro* geschnitten. Es handelt sich nicht um ein Gentechnikexperiment, fällt nicht unter das Gentechnikgesetz und darf in jedem Labor durchgeführt werden. Die Produkte werden auf einem Gel aufgetrennt. Das Kit ist mit ca. 135 Euro günstiger, allerdings unterscheidet sich das Ergebnis kaum von einem einfachen Restriktionsverdau. Zudem ist der Effektor Komplex (Cas9 und crRNA) sehr empfindlich und die Haltbarkeit des Kits geringer. Auch „Chopped!“ kann über BioWissKomm bezogen werden.

Eine weitere Möglichkeit ohne S1 zu CRISPRn, besteht mit TXTL (*cell-free transcription-translation*). Das sind zellfreie Extrakte aus *E. coli*, die *in vitro* zugegebene DNA transkribieren und die RNA in

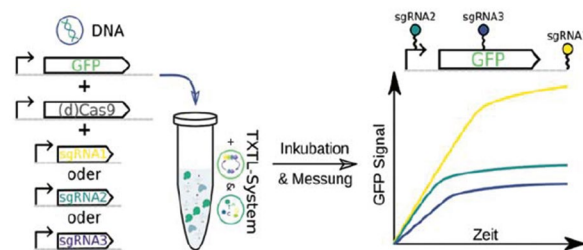


ABB. 2 Aufbau eines TXTL-Experiments. Links der Input: Gene bzw. Plasmide für den Reporter GFP, Cas9 bzw. das enzymatisch inaktive dCas9 und verschiedene sgRNAs. Rechts die erwarteten Ergebnisse der Fluoreszenzmessung mit Cas9 und den drei verschiedenen sgRNAs. Abb. Aus [2] mit freundlicher Genehmigung von MNU Journal.

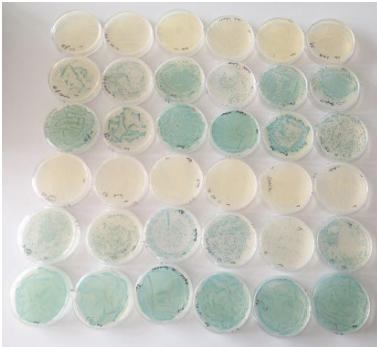


ABB. 3 Ergebnisse eines Kurses mit 12 Arbeitsgruppen, die jeweils drei Platten mit Bakterien ausgestrichen haben. Die obere Reihe zeigt die Bakterien, die mit dem Knockout-Plasmid transformiert wurden: Alle Bakterienkolonien sind weiß. Die zweite Reihe zeigt Bakterien, die mit dem Kontrollplasmid transformiert wurden: Alle Bakterienkolonien sind blau. Die dritte Reihe zeigt den plattierten Ausgangsstamm: Die Platten zeigen einen Rasen blauer Bakterien. Die drei Reihen darunter stammen von den weiteren sechs Gruppen in gleicher Folge.

Protein translatieren. Zu den Extrakten werden Plasmide mit verschiedenen Genkonstrukten gegeben: das GFP-Gen (grün fluoreszierendes Protein) als Reporter, dessen Expression über Fluoreszenzmessung quantifiziert werden kann, dann das Cas9-Gen und Abschnitte, von denen verschiedene single guide-RNAs (sgRNAs) abgelesen werden, die vor, innerhalb und hinter der GFP kodierenden Region Zielsequenzen haben. Eine interessante Variante ist die zusätzliche Verwendung des enzymatisch inaktiven dCas9 (d = dead), das zwar nicht mehr schneiden kann, aber bei Bindung an den GFP-Promotor den Zugang der RNA-Polymerase sterisch blockiert.

Ein entsprechendes Experiment (Abbildungen 2 und 3) wurde an der Technischen Universität Darmstadt entwickelt. Es ist sehr gut aufgebaut, verschafft ein gutes Verständnis für die Funktionsweise von CRISPR-Cas und enthält mehrere sinnvolle Kontrollen [2]. Wir kennen allerdings kein Schülerlabor, in dem der Versuch routinemäßig für Schulkurse oder Lehrerfortbildungen eingesetzt wird. Möglicherweise liegt das dar-

an, dass die käuflichen TXTL-Extrakte relativ teuer sind (ca. 275 Euro für 25 Reaktionen). In Zusammenarbeit mit einem Forschungslabor können TXTL-Extrakte selbst kostengünstiger hergestellt werden (<https://t1p.de/7lr6r>).

Unsere Erfahrung zeigt, dass Laborexperimente nach guter theoretischer Vorbereitung das Gelernte wesentlich vertiefen und vor allem einen differenzierten, wissenschaftlichen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten geben können. Nur so ist dann auch eine sachlich fundierte Diskussion über relevante Themen der Ethik und Ökologie möglich.

Hürden abbauen

Die ungewöhnlich restriktive Gesetzgebung in Deutschland erschwert diese schulische Erfahrung und vermittelt den Eindruck, dass solche Experimente gefährlich sind. Dabei stellt das Gesetz ausdrücklich fest, dass Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 keine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellen. Bei der obligatorischen Sicherheitsbelehrung vor einem Laborkurs erscheint es dann auch den meisten Teilnehmern widersprüchlich, dass ein Experiment ohne Gefahren in einem speziellen Sicherheitslabor durchgeführt werden muss.

Ebenso dokumentiert der erforderliche amtliche Sachkundenachweis mit regelmäßigen Schulungen für Projektleiter (inklusive Leiter eines Schülerlabors) ein tiefes Misstrauen der Gesetzgebung in unser Bildungssystem: Ein abgeschlossenes Studium der Biologie (BSc oder MSc) wird als Nachweis der Sachkunde nicht anerkannt. Auch eine Promotion in Molekularbiologie bescheinigt keine ausreichende Sachkunde. Selbst eine Professur in Molekularer Genetik reicht nicht aus, um die Behörden zu überzeugen, dass Experimente kompetent und verantwortungsvoll durchgeführt werden. Wissenschaftler mit vielen Jahren praktischer Laborerfahrung müssen die Schulbank drücken und werden dann von be-

hördlicher Seite mit einer Klausur auf ihre Sachkunde geprüft.

Gerade in Schülerlaboren werden i. d. R. Experimente durchgeführt, die seit Jahren etabliert sind. Dank der akribischen Aufzeichnungen weiß man, dass in den vergangenen 30 Jahren kein einziges Vorkommnis mit gentechnischer Sicherheitsrelevanz in den ca. 5000 S1-Laboren in Deutschland zu verzeichnen war.

Verschiedene Wissenschaftsorganisation – u. a. die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die Deutsche Akademie der Wissenschaften Leopoldina, der Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin e. V. (VBIO) und andere – bemühen sich seit vielen Jahren um eine realistische Anpassung des Gentechnikgesetzes – bisher ohne Erfolg. Erst kürzlich hat die Senatskommission der DFG wieder eine Entbürokratisierung und Erleichterungen für Gentechnikexperimente der Sicherheitsstufe 1 gefordert (<https://t1p.de/g7xqv>). Die Empfehlungen der DFG nennen nicht explizit, dass die Gesetzgebung die Einrichtung von Schülerlaboren behindert. Auf Anfrage wurde jedoch mitgeteilt, dass dieses Problem in den anstehenden Gesprächen auf ministerieller Ebene ausdrücklich angesprochen wird.

Es bleibt die Hoffnung, dass es schließlich – wie weltweit in vielen anderen Ländern – eine Einsicht gibt und die so oft geforderte Bürgerbeteiligung an der Wissenschaft auch im Labor leichter realisierbar wird.

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] G. Klees, L. Bezenberger, J. Kabisch (2020). Lehrexperimente zum CRISPR-Cas-System im zellfreien synthetischen Expressionssystem. *MNU Journal* 06.2020, 502-505 – ISSN 0025-5866.



Wolfgang Nellen,
BioWissKomm,
w.nellen@biowisskomm.de