

Gene Editing

Genome Engineering mit CRISPR/Cas – Revolution in der Pflanzenzüchtung

FELIX WOLTER, HOLGER PUCHTA
MOLEKULARBIOLOGIE UND BIOCHEMIE, BOTANISCHES INSTITUT, KARLSRUHER
INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT), KARLSRUHE

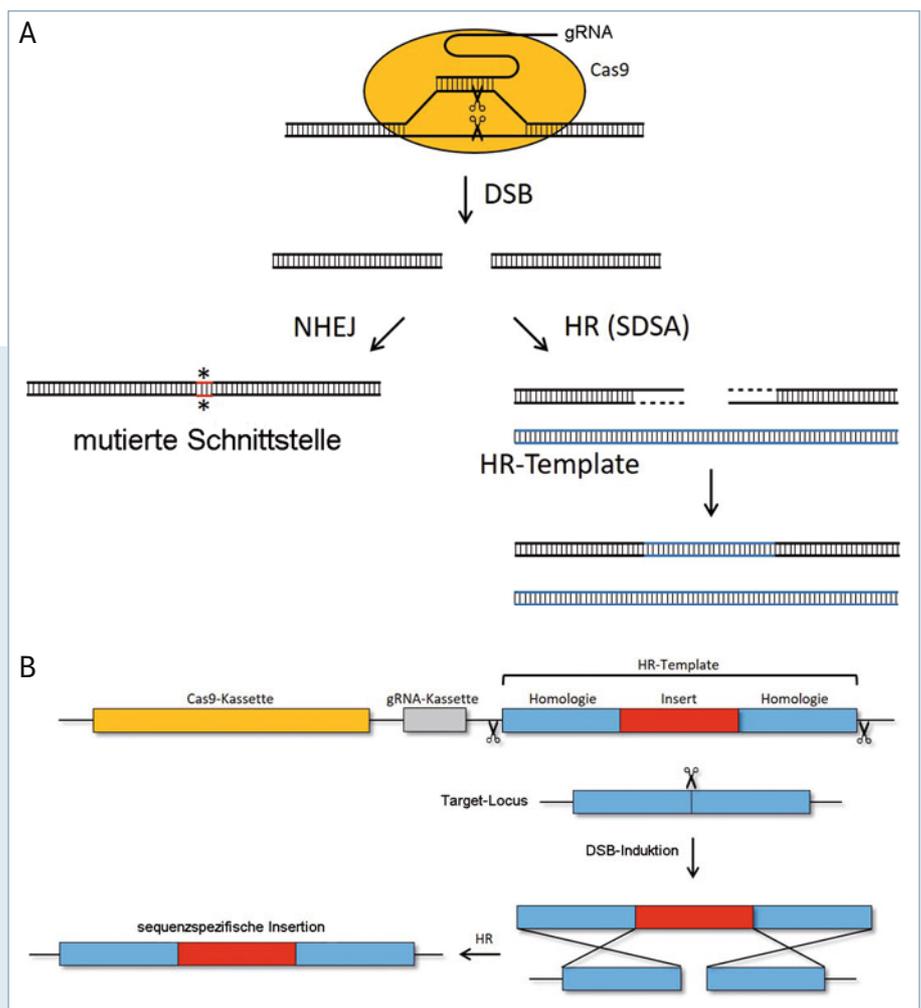
The CRISPR/Cas system has revolutionized plant genome engineering. Non homologous end joining mediated targeted mutagenesis is now a routine procedure including crop plants, and remarkable progress was made to further enhance specificity by a paired nickase approach. Moreover, predefined changes can be introduced by homologous recombination. Even more sophisticated techniques are being developed at the moment to restructure plant genomes on a more global level or to redirect gene expression.

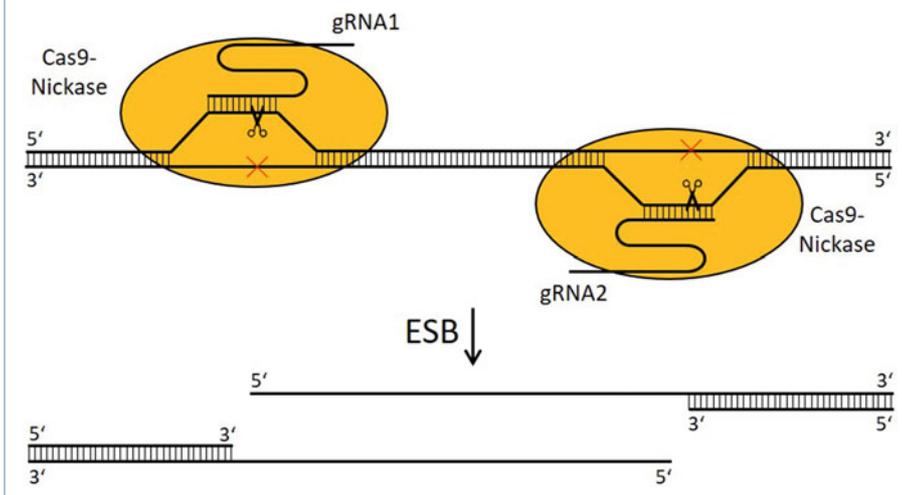
DOI: 10.1007/s12268-017-0782-8
© Springer-Verlag 2017

Die genetische Information unterliegt ständigen Veränderungen, den Mutationen. Dies macht sich der Mensch bereits seit Tausenden von Jahren zunutze. Er verändert das Genom der Nutzpflanzen in gerichteter Weise, zunächst passiv durch Auslesezüchtung, später kamen sukzessive Kreuzungszüchtung und Mutagenesezüchtung dazu. Letztere leistete einen wesentlichen Beitrag zur Ertrags-

steigerung des letzten Jahrhunderts. Bei der Mutagenesezüchtung nutzt man Mutagene, die ungerichtet zahlreiche Mutationen im Genom auslösen, etwa Ethylmethansulfonat (EMS) oder Röntgenstrahlung. Anschließend werden durch Screening gewünschte Mutationen identifiziert. Durch die ungerichtete Mutagenese werden allerdings neben den wenigen nützlichen Mutationen zahllose weitere Mutationen im Genom induziert, die schädlich sind und die aufwendig durch Rückkreuzung mit dem ursprünglichen Genotyp entfernt werden müssen, aber niemals vollständig entfernt werden können [1]. Viel kontrollierter und vorhersagbarer sind dagegen die neuen Pflanzenzüchtungstechnologien.

Abb. 1: CRISPR-vermitteltes *Genome Engineering* in Pflanzen. **A**, Das Protein Cas9 ist in der Lage, einen Komplex mit einer kurzen RNA (gRNA) einzugehen. Die gRNA lässt sich an ein beliebiges Ziel anpassen. Dort induziert Cas9 einen Doppelstrangbruch (DSB). Dieser wird in den meisten Fällen über *non-homologous end-joining* (NHEJ) repariert, wodurch kleine Insertionen oder Deletionen an der Schnittstelle resultieren. Anderenfalls wird der DSB über homologe Rekombination (HR) repariert. Als Template kann natürlicherweise das homologe Chromosom, das Schwesterchromatid oder eine ektopische Sequenz dienen. Hier wird der Bruch fehlerfrei repariert. Auch ein artifizielles DNA-Fragment mit Modifikation kann als Template dienen, wodurch sequenzspezifische Modifikation möglich ist (*gene targeting*, GT). **B**, präzise, sequenzspezifische Modifikation, in diesem Fall Insertion, durch *in planta*-GT. Das Reparaturtemplate wird stabil ins Genom integriert und durch Cas9 freigesetzt, womit es für homologe Rekombination (HR) an der Zielstelle zur Verfügung steht.





▲ **Abb. 2:** Erhöhung der Spezifität durch gepaarte Nickase. Zwei benachbarte Einzelstrangbrüche (ESB) resultieren in einem versetzten, mutagenen Doppelstrangbruch (DSB).

Statt unkontrolliert das gesamte Genom zu mutieren und auf die gewünschte Mutation zu selektieren, wird die gewünschte Mutation direkt präzise induziert. Wie ist das möglich?

Der Schlüssel zur gewünschten Genomveränderung sind programmierbare sequenzspezifische Nucleasen (SSN). Diese Proteine lassen sich so programmieren, dass sie an gewünschter Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch (DSB) induzieren. Die natürlichen DSB-Reparaturprozesse der Zelle können auf diese Weise gezielt angeregt werden, um die gewünschte Genomveränderung zu erreichen. DSB-Reparatur wird in zwei Kategorien eingeteilt: (1) die homologiebasierte Reparatur (homologe Rekombination, HR) und (2) die nicht auf Homologie basierende Reparatur (*non-homologous end-joining*, NHEJ) (**Abb. 1A**). NHEJ ligiert einfach die beiden Enden des Doppelstrangbruchs wieder zusammen. Dabei entstehen oft Fehler, etwa kleine Insertionen oder Deletionen, die häufig zur Zerstörung der offenen Leseraster von Protein-codierenden Sequenzen führen können. HR nutzt die Sequenzinformation eines homologen DNA-Fragments und erreicht dadurch eine fehlerfreie Reparatur. Präzise Genomveränderungen, etwa Insertion oder Punktmutation an spezifischer Stelle, können erreicht werden, indem ein DNA-Fragment mit Sequenzhomologie und der gewünschten Modifikation gleichzeitig zum DSB bereitgestellt werden (**Abb. 1B**). Dies wird als *gene targeting* (GT) bezeichnet. Schon vor 20 Jahren wurde gezeigt, dass beide Reparaturprozesse für gezielte Genomveränderungen in Pflanzen genutzt werden können [2, 3]. Allerdings standen zu dieser Zeit noch keine effizienten SSN zur Verfügung. Dies hat sich in den letzten Jahren geändert. Ein Durchbruch in der Entwicklung von SSN war die biochemische Charakterisierung und Modifikation des CRISPR/Cas-Systems.

Das CRISPR/Cas-System basiert auf einem adaptiven Immunsystem aus Bakterien. CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Arrays wurden bereits vor 30 Jahren im *Escherichia coli*-Genom entdeckt, allerdings ohne dass eine Funktion bekannt war. Der Übergang des CRISPR/Cas-Systems von biologischem Phänomen zu einem biotechnologischen Werkzeug vollzog sich im Jahr 2012 [4], als gezeigt wurde, dass sich die Spezifität verleihende RNA reprogrammieren lässt und zusätzlich das System für biotechnologische Zwecke modifiziert wurde. Seitdem sind für die sequenzspezifische Induktion eines Doppelstrangbruchs lediglich zwei Komponenten notwendig: ein Protein (Cas9) und eine an das Ziel angepasste RNA (*guide RNA*, gRNA) (**Abb. 1A**).

Genome Engineering bei Pflanzen mit CRISPR

Bereits das NHEJ-vermittelte Ausschalten von Genen, was mit CRISPR mittlerweile Routine ist, kann agronomisch interessante Eigenschaften verbessern [1]. Durch Ausschalten von Genen, die Pflanzen anfällig für Pathogene machen, können resistente Sorten entwickelt werden, wie z. B. Mehltau-resistenter Weizen [5]. Präzisere genomische Eingriffe wie das *gene targeting* benötigen die HR und sind ungleich aufwendiger in Pflanzen zu erreichen. Ursächlich dafür ist, dass somatische Pflanzenzellen fast alle Doppelstrangbrüche mittels NHEJ, und nicht HR, reparieren. Ein Lösungsansatz für diese Herausforderung ist die *in planta*-GT-Methode [6, 7]. Hier wird das HR-Template stabil ins Pflanzengenom integriert. Zusätzlich zum Doppelstrangbruch an der zu modifizierenden Stelle wird das Template durch flankierende Doppelstrangbrüche freigesetzt, sodass es für die HR verfügbar ist. Der Vorteil: Man ist

unabhängig von effizienten Transformationsmethoden. Nachdem das Template ins Genom integriert wurde, wird es von der Pflanze automatisch durch Zellteilung vermehrt und kann in jeder Zelle freigesetzt werden. Die Samen der nächsten Generation können dann auf keimbahngängige GT-Ereignisse gescreent werden (**Abb. 1B**).

CRISPR-vermitteltes *Genome Engineering* ist um viele Größenordnungen präziser als traditionelle Mutagenesezüchtung. Doch die Spezifität lässt sich durch ausgeklügelte Methoden noch weiter erhöhen. Anfangs war die Sorge groß, dass Cas9 mit verringerter Effizienz auch an Stellen schneidet, die keine perfekte Sequenzhomologie zur Zielsequenz der gRNA aufweisen (*off-Target*-Aktivität). Dieses Problem lässt sich elegant lösen: Cas9 hat zwei katalytische Zentren, die jeweils einen der beiden DNA-Stränge schneiden. Durch Punktmutation in einem der beiden katalytischen Zentren konvertiert man Cas9 von einer Nuclease, die einen DSB induziert, in eine Nickase, welche einen Einzelstrangbruch (ESB) induziert. Verwendet man nun zwei gRNAs, deren Zielsequenz nah beieinander in bestimmter räumlicher Orientierung vorliegt, resultieren die beiden räumlich nahen ESB letztlich in einem versetzten DSB (**Abb. 2**), der einerseits vergleichbar mutagen ist, andererseits interessanter Ausgangspunkt für andere Genomeditierungen wie *gene targeting* sein kann. Der Vorteil von Einzelstrangbrüchen: Sie sind einzeln nicht mutagen, denn sie werden fehlerfrei von der Zelle repariert. Das heißt, einzelne ESB an potenziellen *off-Target*-Stellen haben keine Auswirkungen. Die Spezifität kann so um Größenordnungen erhöht werden. Interessanterweise spielt die DNA-Reparatur von benachbarten ESB auch eine Rolle in der Evolution der Pflanzengenome: Mithilfe der Cas9-Nickase wurde gezeigt, dass Tandemduplikationen von kürzeren DNA-Abschnitten, die man häufig in vielen der heutigen Genome findet, so entstehen können [8].

Die Zukunft: Genome Engineering auf mehreren Ebenen

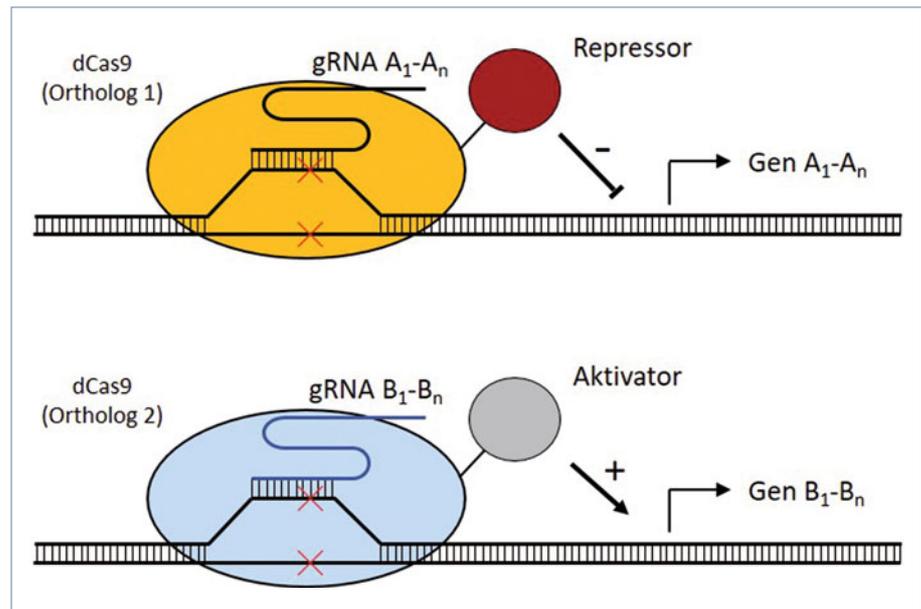
Was mit früheren sequenzspezifischen Nucleasen kaum möglich war, ist bei CRISPR ein Leichtes, denn es ist eine systeminhärente Eigenschaft: das „Multiplexing“, also das gleichzeitige adressieren mehrerer Ziele. Anstatt unterschiedlicher Proteine muss für jedes Ziel lediglich eine weitere gRNA exprimiert werden. Aber es kommt noch besser:

CRISPR ermöglicht nicht nur, zahlreiche Ziele zu adressieren, sondern auch unterschiedliche Enzymfunktionen gleichzeitig zu verwenden und jeweils auf bestimmte genomische Ziele zu beschränken. Die bakteriellen CRISPR/Cas-Systeme sind hochdivers, und bisher ist nahezu ausschließlich das spezielle System aus *Streptococcus pyogenes* eingesetzt worden. Kürzlich wurde gezeigt, dass weitere CRISPR/Cas-Systeme in Pflanzen funktional sind [9]. Interessanterweise besitzen die verschiedenen Cas9-Orthologe jeweils eine spezifische gRNA, die keine Interaktion mit anderen Cas9-Orthologen eingeht. Dies eröffnet spannende neue Möglichkeiten: Werden beide Nukleasedomänen von Cas9 deaktiviert, mutiert Cas9 zu einem spezifischen DNA-Bindeprotein (dCas9), an das andere Effektoren, z. B. Transkriptionsaktivierungs- oder Repressionsdomänen, fusioniert werden können. Leitet man ein solches Cas9-Fusionsprotein in die Promotorregion eines Gens, lässt sich dessen Expression beeinflussen. Auf diese Weise lässt sich mit einem ersten Cas9-Ortholog die Expression einer Reihe von Genen drosseln und gleichzeitig mit einem anderen Cas9-Ortholog eine andere Klasse von Genen einschalten. So ist der Weg zu einem synthetischen Transkriptom begehbar geworden (**Abb. 3**, [10]).

Bisher beschränkte sich die Anwendung des CRISPR/Cas-Systems auf die Modifikation einzelner Pflanzengene und wäre somit passender als *Gene Engineering* zu bezeichnen. Das Potenzial reicht jedoch viel weiter: Die gleichzeitige Induktion mehrerer Doppelstrangbrüche erlaubt Umstrukturierungen im genomischen Maßstab, also *Genome Engineering* in seiner wahren Bedeutung [10]. Zwei Brüche auf demselben Chromosom können zu chromosomalen Deletionen und Inversionen führen, während zwei Brüche auf unterschiedlichen Chromosomen zu reziprokem Austausch der Chromosomenarme führen können. Mithilfe solcher Umstrukturierungen könnten in der Pflanzenzüchtung die ungewünschte Kopplung von günstigen mit ungünstigen Merkmalen aufgehoben oder die Kopplung günstiger Merkmale stabilisiert werden. Mit der CRISPR/Cas-Technologie sollte es also langfristig möglich sein, den in der Natur vorhandenen gesamten Genpool einer Pflanzenspezies viel besser als bisher für eine nachhaltige Landwirtschaft zu nutzen. ■

Literatur

[1] Pacher M, Puchta H (2016) From classical mutagenesis to nuclease-based breeding – directing natural DNA repair for a natural end-product. *Plant J*, doi: 10.1111/tpj.13469



▲ **Abb. 3:** Transkriptionsregulation durch Fusion von Aktivator- bzw. Repressordomänen an Nuklease-defizientes Cas9 (dCas9). Durch die Verfügbarkeit mehrerer Cas9-Orthologe können beide Funktionen gleichzeitig in derselben Zelle durchgeführt werden, und durch Multiplexing können jeweils mehrere Gene mit beiden Funktionen adressiert werden.

[2] Salomon S, Puchta H (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J* 17:6086–6095

[3] Puchta H, Dujon B, Hohn B (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5055–5060

[4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821

[5] Wang Y, Cheng X, Shan Q et al. (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32:947–951

[6] Fauser F, Roth N, Pacher M et al. (2012) In planta gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7535–7540

[7] Schiml S, Fauser F, Puchta H (2014) The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nicks for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J* 80:1139–1150

[8] Schiml S, Fauser F, Puchta H (2016) Repair of adjacent single-strand breaks is often accompanied by the formation of tandem sequence duplications in plant genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:7266–7271

[9] Steinert J, Schiml S, Fauser F et al. (2015) Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J* 84:1295–1305

[10] Puchta H (2016) Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Curr Opin Plant Biol* 36:1–8

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Holger Puchta
Lehrstuhl Molekularbiologie und Biochemie der Pflanze
Botanisches Institut
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
D-76131 Karlsruhe
Tel.: 0721-608-48894
Fax: 0721-608-44874
holger.puchta@kit.edu

AUTOREN



Holger Puchta

Biochemiestudium an den Universitäten Tübingen und München. Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 1989–1995 Postdoc am Friedrich-Miescher-Institut in Basel, Schweiz. 1995–2002 Gruppenleiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben. Seit 2002 Professor für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).



Felix Wolter

2010–2015 Studium der Biologie und Agrarwissenschaft an den Universitäten Göttingen und Hohenheim. Seit 2015 Promotion am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanze des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).