

Chromosome Engineering

Von Genen zu Chromosomen: Pflanzenzüchtung mit CRISPR-CAS

REBECCA WETZEL, PATRICK SCHINDELE, HOLGER PUCHTA
BOTANISCHES INSTITUT, KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE

Using the CRISPR-Cas system, it has been possible to introduce different kinds of mutations in single or multiple genes for trait improvement in crops. Last year, for the first time, the CRISPR-Cas-mediated induction of different kinds of targeted heritable chromosomal rearrangements has been achieved in plants. This novel application has the potential to revolutionize plant breeding as genetic exchange and linkage drag are now becoming controllable in a targeted manner.

DOI: 10.1007/s12268-021-1644-y
© Die Autorinnen und Autoren 2021

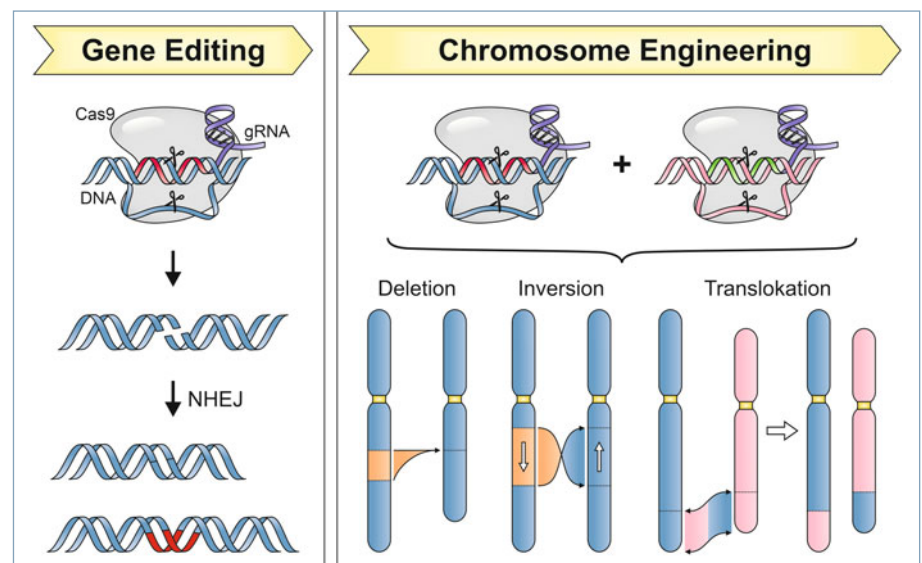
■ Schon von Anbeginn der Zeit hat die Menschheit Pflanzen mit gewünschten Eigenschaften selektiert und gezüchtet. Hierbei wurde meist auf reichen Ertrag und guten Geschmack geachtet. Andere wichtige genetische Eigenschaften, wie Stresstoleranz und Anfälligkeit gegen Krankheiten rückten dabei aber in den Hintergrund oder gingen ganz verloren [1]. Leider sind die Grenzen der herkömmlichen Züchtung erreicht, solche Merkmale wieder in unsere Kulturpflanzen einzubringen. So ist die Verbesserung von Nutzpflanzen durch herkömmliche Züchtungsmethoden eingeschränkt. Dies liegt einerseits an der geringen genetischen Vielfalt der modernen Kultursorten, andererseits an der gemeinsamen Vererbung von gewünschten mit unerwünschten Merkmalen durch die Genkopplungen bei Kreuzungen. Bei Kulturpflanzen können bereits seit einigen Jahren einzelne Eigenschaften mit der molekularen Schere CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein*) verbessert werden [2]. Die durch die Cas-Nuklease induzierten Doppelstrangbrüche (DSB) werden im Anschluss über homologe Rekombination (HR) oder die fehlerhafte nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) repariert, wobei die DSB in somatischen Zellen vorwiegend über NHEJ repariert werden [3]. Bei einzelnen DSB kommt es dabei vor allem zu kleineren Insertionen oder Deletionen an der Bruch-

stelle, sodass hierdurch offene Leserahmen zerstört werden können. Werden jedoch zeitgleich zwei DSB induziert, kann es zu chromosomalen Veränderungen kommen, wie Deletionen, Inversionen oder Translokationen (**Abb. 1**, [4]). Durch die einfache Handhabung und das vielfältige Anwendungs-

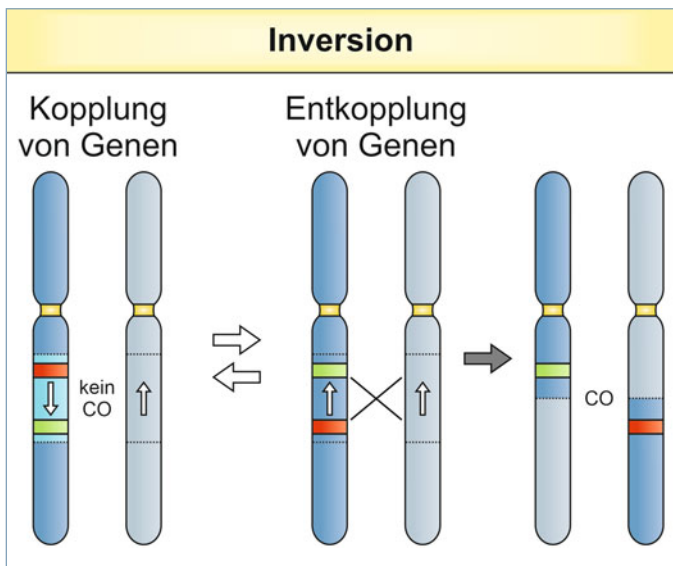
spektrum des CRISPR-Cas-Systems haben sich in den letzten Jahren immer wieder neue Ansätze zur Genomveränderung bei Pflanzen ergeben [5].

Induktion chromosomaler Veränderungen mittels CRISPR-Cas

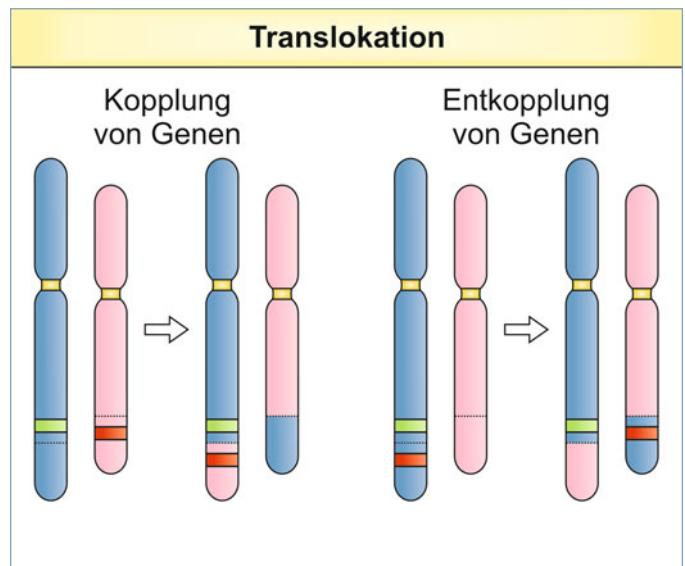
Natürliche chromosomale Veränderungen spielen eine wichtige Rolle in der Anpassung und Artenbildung von Pflanzen. So tragen sie beispielsweise zur Ausbildung genetischer Barrieren bei, da in der Meiose der genetische Austausch zwischen elterlichen Chromosomen in solchen Bereichen unterbunden ist [4]. Dieser fehlende genetische Austausch stellt aber gerade in Bezug auf die herkömmliche Pflanzenzüchtung ein großes Problem dar, da sich diese Bereiche über große Teile der Chromosomen erstrecken und somit wichtige Merkmale für die Züchtung nicht genutzt werden können [6]. Folglich ist es von großem Interesse, solche Bereiche wieder für die meiotische Rekombination und



▲ **Abb. 1:** Gene Editing versus Chromosome Engineering. Beim Gene Editing werden einzelne Doppelstrangbrüche (DSB) innerhalb von Genen induziert, infolgedessen es bei ihrer Reparatur zu kleinen Veränderungen (Insertionen bzw. Deletionen) am Bruch kommt, welche zum Funktionsverlust der genetischen Information führen können. Beim Chromosome Engineering werden mehrere DSB gleichzeitig entweder auf demselben oder auf unterschiedlichen Chromosomen induziert, infolgedessen es zu chromosomalen Umstrukturierungen kommt. NHEJ: nicht homologe Endverknüpfung.



▲ **Abb. 2:** Bedeutung von Inversionen für die Pflanzenzucht. Invertierte Bereiche sind für den genetischen Austausch über Crossover (CO) zwischen elterlichen Chromosomen nicht zugänglich. Über die gezielte Induktion von Inversionen können nun bisher genetisch nicht zu trennende Merkmale einzeln für die Züchtung zugänglich gemacht werden, sodass sie unabhängig voneinander vererbt werden. Ebenso können chromosomale Bereiche invertiert und so attraktive Merkmale miteinander genetisch gekoppelt werden.



▲ **Abb. 3:** Bedeutung von Translokationen für die Pflanzenzucht. Merkmale, die auf einem Chromosom nah beieinanderliegen, werden mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt. Über die Induktion von reziproken Translokationen können diese Merkmale gezielt genetisch voneinander getrennt werden. Ebenso ist auch eine Neukopplung von attraktiven Merkmalen möglich.

somit den genetischen Austausch zugänglich zu machen (**Abb. 2**). Darüber hinaus ist der genetische Austausch nur dann für die Züchtung nutzbar, wenn die Gene für wünschenswerte und nachteilige Merkmale nicht nah beieinander auf ein und demselben Chromosom liegen. Ist dies der Fall, sind die Gene genetisch gekoppelt und beide Merkmale werden immer gemeinsam an Nachkommen vererbt. Dank CRISPR-Cas ist es nun möglich, gezielte Veränderungen auf der Chromosomenebene zu induzieren, um diese räumliche Nähe aufzuheben.

Kürzlich konnte erstmals in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass sich mithilfe des CRISPR-Cas9-Systems chromosomale Veränderungen tatsächlich im Mbp-Bereich induzieren und Pflanzen, die diese chromosomalen Veränderungen stabil tragen, erzeugen lassen. Kleine Inversionen im kbp-Bereich konnten zuvor bereits erfolgreich in Pflanzen induziert werden [7]. Diese erste Untersuchung zeigte, dass chromosomale Veränderungen im Gegensatz zu einfachen Mutationen nur sehr selten vererbt werden. Um die Effizienz zu steigern, wurde deshalb die sehr potente Cas9-Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (SaCas9) unter der Expression eines einzellspezifischen Promotors verwendet, um so für eine effiziente Vererbung der Veränderungen zu sorgen. Eben-

so wurde ein *bulk screening*-Verfahren angewandt, um dann so die relativ seltenen Chromosomenveränderungen optimal in einer größeren Zahl von Nachkommen zu detektieren. Überraschenderweise wurde bei dieser Studie auch festgestellt, dass bei den Inversionen die Bruchenden meist ohne Verlust von Basen perfekt miteinander ligiert wurden. Die wohl bekannteste natürliche Inversion in *A. thaliana* ist die paracentrische Inversion des *hk4S*, welche sich auf Chromosom 4 befindet. Dabei handelt es sich um einen heterochromatischen Bereich mit der Größe von 1,17 Mbp, der vor ca. 4.000 Jahren entstanden ist und u. a. im Ökotyp Columbia vorkommt. Eine Reihe an anderen Ökotypen, wie beispielsweise Landsberg, trägt das Chromosom noch unverändert im Originalzustand. Deshalb ist auch ein genetischer Austausch zwischen diesen beiden Ökotypen in diesem Bereich während der Meiose nicht mehr möglich. Mit der neu etablierten Technologie konnte diese natürliche Inversion in *A. thaliana* jetzt wieder revertiert werden. So konnten dann zum ersten Mal überhaupt genetische Austausche zwischen den beiden Ökotypen in diesem Chromosomenbereich erhalten werden [8]. Zusätzlich zu diesen Erfolgen ist es bereits gelungen, die erste chromosomale Veränderung in einer Kulturpflanze zu induzieren. C. Schwartz *et al.*

konnten hier erfolgreich eine 75,5 Mbp große Inversion in einer Maissorte revertieren, welche ungefähr ein Drittel des gesamten Chromosoms 2 umfasst [9]. Diese Region ist damit auch wieder für den genetischen Austausch bei Kreuzungen zugänglich.

Neben Inversionen spielen bei der Genom evolution auch Translokationen eine wichtige Rolle, die ebenso zur Einschränkung des genetischen Austauschs in Pflanzen und zur Spezifikation beitragen [4, 10]. Zudem sind sie ein wichtiges Werkzeug, um die genetische Kopplung von Genen zu regulieren, wodurch sie besonders interessant für die Pflanzenzüchtung sind. So ist es auf der einen Seite möglich, unerwünschte genetische Kopplungen aufzuheben, aber auf der anderen Seite eben auch Gene zu koppeln, die gemeinsam vererbt werden sollen (**Abb. 3**). Auch bei Translokationen konnte dank CRISPR-Cas kürzlich ein Meilenstein erreicht werden. N. Beying *et al.* konnten erstmals in Pflanzen vererbare, reziproke Translokationen zwischen heterologen Chromosomen im Mbp-Bereich induzieren [10]. Hierbei wurde ein ähnlicher Ansatz wie bei der Reversion der Inversion verwendet. Die Autoren konnten so reziproke Chromosomenarm austausche zwischen Chromosom 1 und 2 sowie 1 und 5 erzielen, die auch beide vererbt wurden.

Fazit

Mit den hier beschriebenen Studien wurde eine neue Ebene der Anwendung von CRISPR-Cas für die Pflanzenzüchtung, aber auch die Grundlagenforschung erreicht. Die hier vorgestellten Fortschritte werfen natürlich noch weitreichendere Fragen auf, was in Zukunft machbar, aber eben für die Pflanzenzüchtung sinnvoll ist. So scheint es nun im Bereich des Möglichen, dass wir mit dieser Technologie nicht nur die Anzahl der Chromosomen in Pflanzenspezies ändern, sondern auch durch globale Chromosomenrestrukturierungen neue Spezies erhalten können [11]. ■

Literatur

- [1] Wolter F, Schindele P, Puchta H (2019) Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. *BMC plant biology* 19: 176
- [2] Wolter F, Puchta H (2017) Genome Engineering mit CRISPR/Cas – Revolution in der Pflanzenzüchtung. *BIOSpektrum* 23: 159–161
- [3] Puchta H (2005) The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* 56: 1–14
- [4] Schmidt C, Schindele P, Puchta H (2020) From gene editing to genome engineering: restructuring plant chromosomes via CRISPR/Cas. *aBIOTECH* 1: 21–31
- [5] Schindele A, Dorn A, Puchta H (2020) CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane. *Curr Opin Biotechnol* 61: 7–14
- [6] Rönspiess M, Dorn A, Schindele P et al. (2021) CRISPR-Cas-mediated chromosome engineering for crop improvement and synthetic biology. *Nat Plants* 7:566–573

- [7] Schmidt C, Pacher M, Puchta H (2019) Efficient induction of heritable inversions in plant genomes using the CRISPR/Cas system. *Plant J* 98: 577–589
- [8] Schmidt C, Franz P, Rönspiess M et al. (2020) Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nat Commun* 11: 4418
- [9] Schwartz C, Lenderts B, Feigenbutz L et al. (2020) CRISPR-Cas9-mediated 75.5-Mb inversion in maize. *Nat Plants* 6: 1427–1431
- [10] Beying N, Schmidt C, Pacher M et al. (2020) CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in Arabidopsis. *Nat Plants* 6: 638–645
- [11] Lee K, Wang K (2020) Level up to chromosome restructuring. *Nat Plants* 6: 600–601

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Holger Puchta
Botanisches Institut
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 4
D-76128 Karlsruhe
holger.puchta@kit.edu

AUTORINNEN UND 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 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).



Rebecca Wetzel

2013–2018 Studium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Seit 2019 Promotion am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie des KIT.



Patrick Schindele

2011–2016 Studium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2016–2020 Promotion am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie am KIT. Seit 2020 Postdoc am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie am KIT.

Hier steht eine Anzeige.



Springer