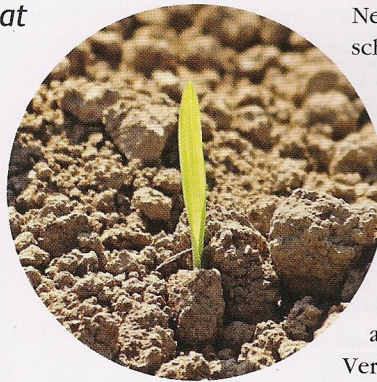


Revolution in der Pflanzenzüchtung

Das CRISPR/Cas-System

PATRICK SCHINDELE | FELIX WOLTER | HOLGER PUCHTA

Durch den Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems hat eine Revolution in der Pflanzenzüchtung begonnen. Noch nie konnten Genome so schnell, einfach und präzise verändert werden. So konnten bereits mehlttauresistente Tomaten- und Weizenpflanzen hergestellt werden. Durch stetige Neuentwicklungen haben sich die Anwendungsbereiche von Cas9 in den vergangenen Jahren vervielfältigt und weitere neu charakterisierte CRISPR/Cas-Systeme eröffnen ein noch nie da gewesenes Spektrum an zusätzlichen Einsatzmöglichkeiten.



Neben der Kreuzungszüchtung ist die klassische Mutagenese eine weitere Methode der konventionellen Pflanzenzucht. Hierbei werden mittels mutagenen Chemikalien oder radioaktiver Strahlung zahllose Mutationen gleichzeitig in der Pflanze induziert, um neue Merkmale zu erzeugen. Die auf diese Weise induzierten Mutationen werden sowohl ungezielt – also an willkürlichen Stellen im Genom – als auch ungerichtet – sprich die Qualität der Veränderung ist unbekannt – ausgelöst. Dadurch entstehen viele unerwünschte Mutationen, die durch Rückkreuzen und Screening wieder entfernt werden müssen, jedoch nicht vollständig entfernt werden können. Trotz dieses radikalen Eingriffs ins Genom mit einem „Schrotschuss“, der viele unbekannte Mutationen erzeugt, wurden erstaunliche Erfolge erzielt. Die so erzeugten Pflanzen gelten jedoch nicht als „gentechnisch manipulierte“ Organismen.

Klassische Gentechnik

Die klassische Gentechnik ermöglicht es, neben Genen artverwandter Pflanzen auch Gene artfremder Organismen in das Zielerbgut einzuführen. Mittels rekombinanter DNA werden die gewünschten Gene samt aller für deren Expression notwendigen regulatorischen Elemente in das Zielerbgut eingeführt. Dies kann bei Pflanzen über verschiedene Verfahren erreicht werden, unter anderem vermittelt über das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* und dessen sogenannter T-DNA. In diesem Mechanismus überträgt das Bakterium natürlicherweise einen spezifischen Abschnitt extrachromosomaler DNA in das Pflanzengenom, der im Labor durch jegliche gewünschte DNA ausgetauscht werden kann [1].

Im Gegensatz zur Kreuzungszüchtung können Pflanzen so zum Beispiel mit Resistenzgenen ausgestattet werden, die auch in artverwandten Pflanzen nicht zu finden sind. Die so erhaltenen Pflanzen werden, da sie fremdes Erbgut enthalten, als GVO (gentechnisch veränderte Organismen) eingestuft. Dies führt dazu, dass ihr Anbau nur nach einem aufwändigen Zulassungsverfahren und auch dann nur in einigen Ländern, vor allem in Nord- und Südamerika, erlaubt ist. In Europa werden GVOs im größerem Umfang zurzeit nur in Spanien angebaut.

Das Ziel der Pflanzenzucht ist es, vorteilhafte Merkmale von Pflanzen zu etablieren und nachteilige Merkmale zu eliminieren, um Pflanzen zu generieren, die gesteigerte Erträge bringen, qualitativ verbesserte Erzeugnisse liefern oder besser an verschiedene biotische und abiotische Umweltfaktoren angepasst sind. Bereits in den Anfängen der Pflanzenkultivierung konnten durch die gezielte Selektion unerwünschte Eigenschaften, wie zum Beispiel der Kornausfall bei Gräsern, also das frühzeitige Lösen der Körner von der Rispe, entfernt werden.

Die heutige Pflanzenzucht basiert vor allem auf der Kreuzung von Sorten, die jeweils unterschiedliche vorteilhafte Merkmale aufweisen. Ziel der Kreuzungszüchtung ist es, neue Sorten zu generieren, die die besten Eigenschaften beider Elternteile vereinen. Obwohl diese Art der Pflanzenzucht die am häufigsten angewandte Zuchtform darstellt, bringt sie dennoch auch wesentliche Nachteile mit sich: Zum einen ist das Auffinden der gewünschten Pflanzen häufig sehr zeitaufwändig und zum anderen können auch bereits vorhandene oder über Rekombination neu erzeugte nachteilige Merkmale in die Pflanzen gelangen, die allerdings nur dann identifiziert werden können, wenn sie Auswirkungen auf den direkt erkennbaren Phänotyp haben. Dies führte bei Tomaten zum Beispiel dazu, dass auf der Suche nach immer größeren Früchten viele der Geschmacksstoffe verloren gingen und somit die modernen Tomatensorten weniger geschmackvoll sind als ältere Sorten.

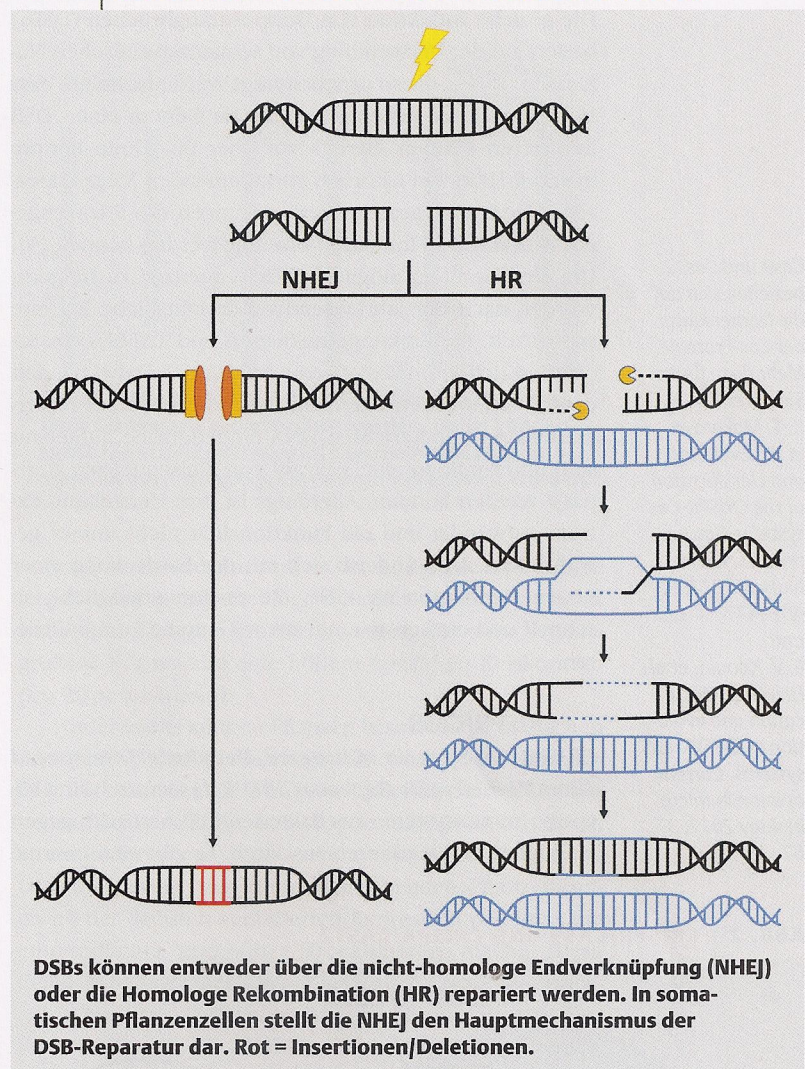
Genome Editing

Beim *Genome Editing* können im Gegensatz zu den herkömmlichen Züchtungsmethoden zielgerichtet und präzise Veränderungen an der DNA vorgenommen werden, um neue Merkmale zu erzeugen. Grundlage hierbei ist die Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch sequenzspezifische Nukleasen (SSNs) und die dadurch vermittelte Aktivierung der zelleigenen Reparaturmechanismen. DSBs können durch zwei unterschiedliche Mechanismen repariert werden: der homologen Rekombination (HR) und der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ = non-homologous end joining) (Abbildung 1) [2].

Bei der klassischen HR basiert die Reparatur auf der Verwendung von homologen Donorsequenzen, die die verlorene Sequenzinformation beinhalten. Diese können dem Schwesterchromatid oder dem homologen Chromosom entstammen. Nach der Induktion eines DSBs werden durch Reparaturproteine zunächst Einzelstrangüberhänge generiert, wobei anschließend einer dieser Überhänge in die homologieaufweisende Donorsequenz einwandert. Die homologe Donorsequenz dient nun als Matrize zur Synthese der verlorengegangenen DNA. Der neu synthetisierte Strang wandert wieder zurück ins Ausgangsmolekül und dient nun als Template zur Synthese des komplementären Strangs. Im Gegensatz zur klassischen HR verläuft die klassische NHEJ unabhängig von Homologien ab. Nach der Induktion des DSBs werden die entstandenen Enden oft nach Verlust oder dem zusätzlichen Einbau einiger weniger Nukleotide wieder zusammengefügt.

Beide Reparaturmechanismen können ausgenutzt werden, um gezielt Veränderungen in einem Ziel-Lokus zu induzieren. Werden homologieaufweisende DNA-Moleküle in die Zelle eingeführt, können diese als Matrize für eine HR-vermittelte Reparatur des DSBs dienen. So können gezielt neue Sequenzinformation in den Ziel-Lokus eingeführt werden. Die NHEJ birgt bereits aufgrund ihres fehleranfälligen Mechanismus das Potenzial, um an der Bruchstelle Mutationen zu induzieren. Geschieht dies in dem offenen Leserahmen eines Gens, kann es zur Verschiebung des offenen Leserahmens und damit häufig zur Expression eines nicht funktionellen Proteins kommen. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen findet ständig auch unter natürlichen Bedingungen in allen Organismen statt, sodass die durch sequenzspezifische Nukleasen eingeführten Mutationen sich molekular nicht von natürlich vorkommenden Mutationen unterscheiden lassen. Es ist also nicht möglich, durch nachträgliche Untersuchungen eine mit *Genome Editing* hergestellte Pflanze in einem Feld von natürlichen Artgenossen zu identifizieren. Nur bei klassischen GVOs ist dies möglich, da man dort im Genom integrierte fremde (oder „zusätzliche“) DNA nachweisen kann. Deshalb wurden vor kurzem auch die ersten genom-editierten Kulturpflanzen in den USA, Kanada, Argentinien und Israel nicht als GVOs eingestuft, sondern klassisch gezüchteten Sorten gleichgestellt.

ABB. 1 | REPARATUR VON DOPPELSTRANGBRÜCHEN (DSBS)



IN KÜRZE

- Die molekulare Schere CRISPR/Cas ermöglicht die hochpräzise **Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs)** im Genom.
- Die **zelleigenen DNA-Enzyme reparieren die Brüche**, so können Genome in kontrollierter und gerichteter Weise verändert werden.
- Da keine „fremde“ DNA zurückbleibt und nur die natürlichen DNA-Reparaturprozesse genutzt werden, ist die so erzielte genomische Veränderung **nicht von spontanen Mutationen** zu unterscheiden.
- Zahlreiche mit CRISPR/Cas hergestellte Kulturpflanzenarten belegen den Reifegrad, den die Technologie bereits heute hat, z. B. Sorten mit **Resistenz gegen Mehltau oder erhöhter Toleranz gegen Trockenstress**.
- In Zukunft werden auch genomische Umstrukturierungen in größerem Maßstab möglich sein, wie etwa die **Translokation ganzer Chromosomenabschnitte**, um vorteilhafte Eigenschaften zu kombinieren oder unvorteilhafte zu trennen.
- Das CRISPR/Cas-System lässt sich nicht nur zur DSB-Induktion nutzen, sondern ist als hochflexibler, **molekularer Werkzeugkasten** einsetzbar, um bestimmte Stellen im Genom spezifisch anzusteuern und so z.B. Genexpression zu regulieren.
- Dank CRISPR/Cas findet zurzeit eine grundlegende **Revolution** der gesamten Biologie und Biotechnologie statt.

Sequenzspezifische Nukleasen

Die gezielte Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSBs) basiert auf der Verwendung von sequenzspezifischen Nukleasen (SSNs), die so programmiert werden können, dass sie fast an jeder beliebigen Stelle im Genom einen DSB induzieren können. Bereits vor über 20 Jahren konnte man mit Hilfe von natürlich vorkommenden Meganukleasen zeigen, dass gezielte Veränderungen des Pflanzengenoms durch DSB-Induktion erreicht werden können [3]. Um die Anzahl an möglichen Zielsequenzen zu steigern, wurden nach der Jahrtausendwende künstliche Enzyme entwickelt, die Zinkfinger-nukleasen und TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*). Dabei handelt es sich um synthetische Nukleasen, die aus einer Nukleasedomäne und variablen DNA-Bindedomänen aufgebaut sind und somit an eine Vielzahl von Zielsequenzen angepasst werden können. Allerdings ist ihre Herstellung extrem aufwändig und die Funktionalität nicht immer gewährleistet. Dies änderte sich mit der Entdeckung einer neuen Generation an SSNs, die es nun ermöglicht, so schnell und einfach wie nie zuvor Genome zu modifizieren.

CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas-Systeme (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*) sind adaptive Immunsysteme aus Bakterien und Archaeen gegen pathogene Nukleinsäuren aus Viren. Es gibt eine enorme

Vielfalt verschiedener Typen, die sich teils stark, teils nur geringfügig unterscheiden. Am besten untersucht sind CRISPR/Cas-Systeme, die sich der Nuklease Cas9 bedienen. In diesem Abwehrmechanismus wird zunächst ein Teil einer invasiven Fremd-DNA als *Spacer* in den CRISPR-Lokus des Wirtsgenoms eingebaut. Der CRISPR-Lokus wird anschließend transkribiert und prozessiert, sodass kleine RNA-Moleküle entstehen, die CRISPR-RNAs (*crRNAs*), die den eingebauten Teil der Fremd-DNA, den *Spacer*, enthalten. Mithilfe einer weiteren RNA, der *trans-activating crRNA* (*tracrRNA*) wird die Cas9 Nuklease rekrutiert und zur Ziel-DNA transportiert. Dort bindet die *crRNA* mittels des komplementären *Spacers*, woraufhin die DNA durch die Cas9-Nuklease geschnitten und somit unschädlich gemacht wird.

Essenziell für die Induktion des Schnitts ist ein in der Ziel-DNA direkt stromabwärts der Zielsequenz liegendes kurzes Motiv, das *protospacer-adjacent motif* (PAM). Um dieses System für den Gebrauch im Labor zu adaptieren, wurden die beiden RNAs (*tracr-* und *crRNA*) zu einer einzelnen RNA, der *single guide RNA* (*sgRNA*), fusioniert und somit ein einfach zu handhabendes 2-Komponenten-System aus Cas9 und *sgRNA* kreiert [4]. Indem ausschließlich die 20 Nukleotid lange *Spacer* Sequenz ausgetauscht wird, kann fast jedes beliebige Ziel im Genom adressiert werden. Im Gegensatz zu früheren SSNs wird die Zielort-Spezifität im CRISPR/Cas-System also durch eine vom Protein separate RNA determiniert, wobei das Protein stets konstant bleibt. Dadurch vereinfacht sich der Herstellungsprozess enorm, was den großen Vorteil des CRISPR/Cas-Systems ausmacht. Der DSB wird drei Nukleotide stromaufwärts des PAMs in Form eines stumpfen Endes induziert (Abbildung 2a).

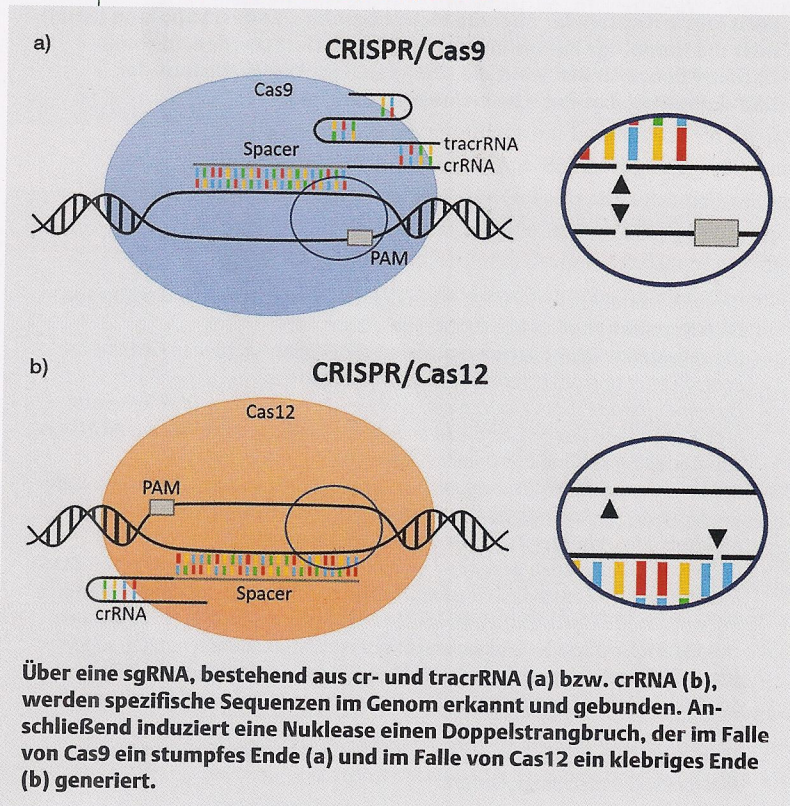
CRISPR/Cas12

Die CRISPR/Cas-Systeme werden in zwei Klassen unterteilt, wobei die Systeme der zweiten Klasse von besonderem Interesse für *Genome Editing*-Anwendungen sind, da sie nur ein einzelnes Protein als Effektor verwenden. Neben dem CRISPR/Cas9-System wurde in den letzten Jahren ein weiteres dieser Systeme charakterisiert, das CRISPR/Cas12-System, ehemals bezeichnet als CRISPR/Cpf1-System (*CRISPR from Prevotella and Francisella 1*) (Abbildung 2b).

Das CRISPR/Cas12-System basiert auf einem ähnlichen Funktionsprinzip wie das CRISPR/Cas9-System, weist jedoch grundlegende Unterschiede auf [5]. Anstatt einer Kombination an zwei RNAs wird in diesem System ausschließlich eine RNA benötigt, um DNA schneiden zu können. Das essenzielle PAM befindet sich stromaufwärts der Zielsequenz und ist im Gegensatz zu den Guanin/Cytosin-reichen PAMs des CRISPR/Cas9-Systems Thymin/Adenin-reich. Dadurch ist es möglich auch die Thymin/Adenin-reichen Sequenzen im Genom, wie zum Beispiel Promotoren oder Introns als Ziele auszuwählen, was vorher nur eingeschränkt möglich war. Im Prinzip können

Cas9 und Cas12 beziehen sich auf die Nomenklatur der Cas-Proteine. Mehr dazu finden Sie unter K. S. Makarova et al., *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems*, *Nature reviews. Microbiology* 2011, 9, 467–477 und E. V. Koonin, et al., *Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems*, *Current opinion in microbiology* 2017, 37, 67–78.

ABB. 2 | CRISPR/CAS9 UND CRISPR/CAS12



über die Verwendung beider Nukleasen, also Cas9 und Cas12, alle Bereiche des Genoms editiert werden. Weiterhin unterscheidet sich das CRISPR/Cas12-System noch in der Art des induzierten DSBs. Während Cas9 ein stumpfes Ende generiert, erzeugt Cas12 Einzelstrangüberhänge, sogenannte klebrige Enden. Die so erzeugten Überhänge sind von Vorteil für die Insertion als auch die Deletion von DNA-Fragmenten, da zueinander komplementäre Überhänge sehr viel leichter miteinander verknüpft werden können. So sollten – unabhängig von Methoden, die auf homologer Rekombination basieren – sowohl Insertionen als auch Deletionen mit größerer Genauigkeit induziert werden können.

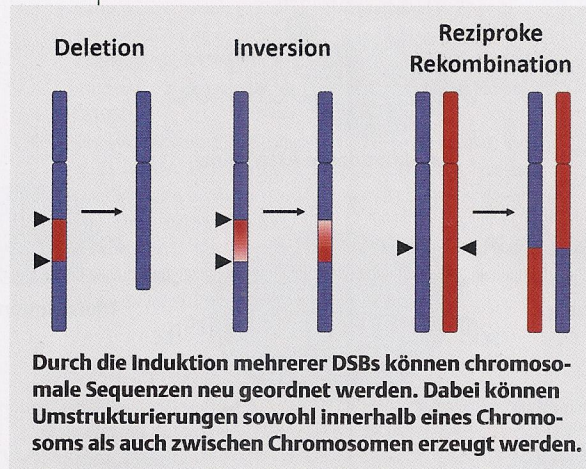
Wichtig für die Züchtung: Chromosomale Umstrukturierung

Die Induktion eines einzelnen DSBs ermöglicht es bereits, Veränderungen in das Pflanzengenom einzuführen. Die Induktion mehrerer DSBs hat das Potenzial, umfangreiche Veränderungen zu induzieren, bis hin zur vollständigen Umstrukturierung der Chromosomen (Abbildung 3) [3]. Die Induktion von zwei DSBs auf dem gleichen Chromosom kann zum Beispiel zur Deletion oder Inversion des dazwischenliegenden Bereichs führen. Dadurch können negative Eigenschaften eliminiert oder agronomisch attraktive Merkmale genetisch verknüpft werden. Die Induktion zweier DSBs auf unterschiedlichen Chromosomen kann zum reziproken Austausch und somit der Rekombination von DNA-Sequenzen führen. Die Induktion der reziproken Rekombination in Bereichen, in denen keine oder kaum natürliche Rekombination stattfindet, könnte es ermöglichen, die genetische Kopplung zwischen bestimmten Genen aufzulösen. So könnten Merkmale getrennt werden, die sonst nur zusammen vererbt werden, was von besonderer Bedeutung ist, wenn ein dieser Merkmale unerwünscht ist.

Erfolgreiche Anwendungen in der Landwirtschaft

Die in den vergangenen Jahrzehnten stark ansteigende Verfügbarkeit von Genomsequenzen und die Identifizierung und Charakterisierung von Genen und ihrer Funktion haben den Weg für die effiziente Editierung von Pflanzengenomen geebnet. So konnten mittels SSNs bereits in diversen Kulturpflanzen erfolgreich verbesserte agronomische Eigenschaften etabliert werden. Die Ziele der genetischen Veränderung beschränken sich dabei nicht ausschließlich auf die Steigerung der Erträge, sondern auch auf die Änderung der Produktqualität. Zu den bereits editierten Pflanzen zählen vor allem Nutzpflanzen, darunter Tomaten, Sojabohnen und Zitrusfrüchte oder auch die weltweit wichtigsten Nahrungspflanzen Mais, Reis, Weizen und Kartoffel [6]. Um eine Steigerung des Ertrags zu erreichen, können einerseits direkt die Gene, die an der Regulierung des Ernteprodukts beteiligt sind, modifiziert werden. In Reis konnten über die simultane Mutagenese

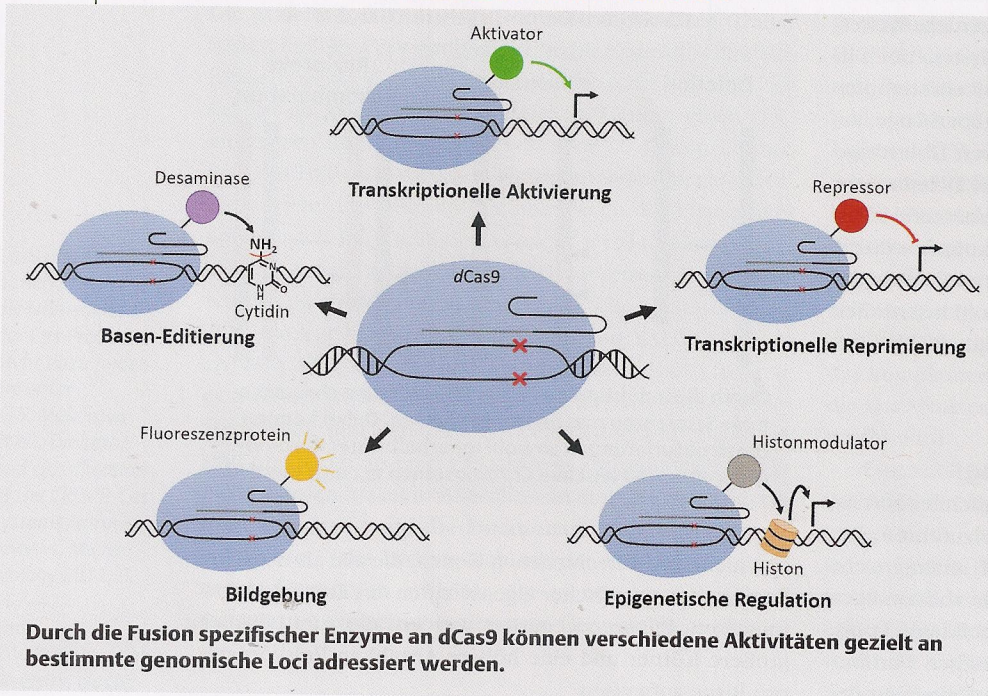
ABB. 3 DURCH CRISPR/CAS MÖGLICHE CHROMOSOMALE UMSTRUKTURIERUNGEN



von mehreren verschiedenen Genen, die alle als negative Regulatoren spezifischer Eigenschaften des Ernteprodukts fungieren, Pflanzen generiert werden, die zum Beispiel größere Körner und eine höhere Anzahl an Reiskörnern pro Rispe aufweisen.

Andererseits können Pflanzen besser an die biotischen und abiotischen Faktoren angepasst werden, die Ernteauffälle und somit einen Ertragsverlust verursachen. In Mais konnte der natürliche Promotor des ARGOS8-Gens durch einen anderen aus Mais stammenden Promotor ausgetauscht werden, was die entsprechenden Pflanzen aufgrund der dadurch veränderten Expression des Gens unempfindlicher gegenüber Trockenstress macht. Diese Pflanzen liefern einen gleichbleibenden Ertrag bei normaler Wässerung, aber einen erhöhten Ertrag unter Stress. Sowohl Orangen als auch Tomaten und Weizen konnten mittels SSNs resistent gegenüber Pflanzenkrankheiten gemacht werden. Zitrusfrüchte können von Bakterien befallen werden, die den sogenannten Zitruskrebs auslösen, eine Krankheit, die erhebliche Verluste in Regionen der Welt verursacht, in denen Zitrusfrüchte angebaut werden. Indem die Angriffsstelle des Pathogens im Promotor des LOB1 Gens editiert wurde, konnte die Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber Zitruskrebs stark verringert werden. Ernteverluste von Tomaten und Weizen werden vor allem von Mehltau, einer Pilzkrankheit, verursacht. Als Virulenzfaktor dient hierbei das von den Wirtspflanzen eigens produzierte Protein MLO1, das dem Pilz das Eindringen in die Zellen ermöglicht. In Tomaten wurden mittels SSNs zwei DSBs im MLO1 Gen induziert und dadurch ein Teil des Gens deletiert, wodurch das Genprodukt seine Funktion verliert. Diese Pflanzen konnten von dem Pathogen, das Mehltau auslöst, nicht mehr befallen werden. Durch Mehltau verursachte Ertragsverluste in Weizen stellen ein besonderes Problem dar, da Weizen mit ca. 20 % aller von Menschen konsumierten Kalorien eine der wichtigsten Nahrungspflanzen darstellt, um die heutigen und drastisch steigenden Bedürfnisse einer wachsenden Weltbevölkerung

ABB. 4 | ANWENDUNGEN VON KATALYTISCH INAKTIVEM CAS9



verschiedenste andere Anwendungen eingesetzt werden. Indem die katalytischen Domänen der Enzyme durch Mutationen inaktiviert werden, werden diese Enzyme in DNA-Bindeproteine umgewandelt. Ausschließlich die Fähigkeit, DNA zu schneiden geht verloren, jedoch nicht die Fähigkeit, DNA sequenzspezifisch zu binden. Diese Bindeproteine können dann dazu verwendet werden, andere Moleküle zielgenau an bestimmte Stellen des Genoms zu transportieren und deren jeweilige Funktion dort auszuüben. (Abbildung 4) [7-10]. Indem diese Varianten, genannt *dead-Cas9* (dCas9) und *deadCas12* (dCas12), beispielsweise mit transkriptionellen Regulatoren fusioniert werden, können abhängig von der Art der Regulatoren, Gene aktiviert oder reprimiert werden. Durch die Fusion von epigenetischen Regulatoren wie zum Beispiel Histon-Methylasen oder -Acetyl-

transferasen kann so über die Veränderung der Chromatinstruktur die Genexpression gefördert oder gehemmt werden. Zusätzlich zur Regulation der Genexpression können die CRISPR-Systeme für *Imaging* Applikationen angewendet werden. Indem anstelle von Regulatoren Fluoreszenzproteine fusioniert werden, können spezifische Bereiche des Genoms markiert werden, was von besonderem Interesse für Grundlagenforschung ist.

In weiteren neuen Anwendungen können einzelne Basen editiert werden, indem Deaminasen fusioniert werden. So können Mutationen auch ohne das gleichzeitige Induzieren von Brüchen ins Genom eingeführt werden. Durch die einfache Programmierung der verschiedenen CRISPR-Systeme mittels der *sgRNA* bzw. *crRNA* ist es möglich, verschiedene Loci gleichzeitig anzusteuern, einen Vorgang den man *Multiplexing* nennt. Über unterschiedliche Ansätze kann man hierbei gleiche oder verschiedene Aktivitäten an mehrere Loci bringen. Diese Vielfalt macht die CRISPR/Cas-Systeme nicht nur zu einem wertvollen Werkzeug für die Pflanzenzucht, sondern Organismusübergreifend für die gesamte Biotechnologie und Medizin.

Da Weizen einen hexaploiden, also sechsfachen Chromosomensatz aus drei verschiedenen Vorläuferformen besitzt und somit drei Ausführungen jedes Gens aufweist, war es mit den konventionellen Züchtungsmethoden bisher nicht möglich resistente Sorten zu erzeugen. Mittels SSNs gelang es, alle drei homologen MLO1-Gene gleichzeitig zu editieren und so Mehltau-resistenten Weizen zu erzeugen. Neben den Erträgen kann auch die Produktqualität verbessert werden. Sojabohnen enthalten einen hohen Anteil der vielfach ungesättigten Linol- und Linolensäure, aus denen in der Weiterverarbeitung unerwünschte Transfettsäuren entstehen. Durch die gezielte Mutagenese der Gene, die für die Synthese dieser Fettsäuren verantwortlich sind, konnten ihre Mengen stark reduziert werden. Kartoffeln sind nicht nur als Nahrungsmittel, sondern aufgrund ihres Stärkegehalts auch für industrielle Anwendungen bedeutsam. Stärke ist aus den beiden Molekülen Amylose und Amylopektin aufgebaut, wobei für industrielle Zwecke vor allem Amylopektin eine wichtige Rolle spielt. Wie Weizen stellt auch die Kartoffel einen polyploiden Organismus dar, wodurch mehrere homologe Gene gleichzeitig editiert werden müssen. Mittels SSNs konnten alle Ausführungen des GBSS-Gens, das für die Synthese von Amylose verantwortlich ist, mutiert werden und so Kartoffeln produziert werden, die ausschließlich Amylopektin als Stärkemolekül aufweisen.

CRISPR/Cas als Universalwerkzeug

Die Entwicklungen der vergangenen Jahre haben das eigentliche Potenzial der verschiedenen CRISPR/Cas-Systeme aufgedeckt. Jenseits ihrer ursprünglichen Funktion als sequenzspezifische DNasen können diese Systeme für

verschiedenste andere Anwendungen eingesetzt werden. Indem die katalytischen Domänen der Enzyme durch Mutationen inaktiviert werden, werden diese Enzyme in DNA-Bindeproteine umgewandelt. Ausschließlich die Fähigkeit, DNA zu schneiden geht verloren, jedoch nicht die Fähigkeit, DNA sequenzspezifisch zu binden. Diese Bindeproteine können dann dazu verwendet werden, andere Moleküle zielgenau an bestimmte Stellen des Genoms zu transportieren und deren jeweilige Funktion dort auszuüben. (Abbildung 4) [7-10]. Indem diese Varianten, genannt *dead-Cas9* (dCas9) und *deadCas12* (dCas12), beispielsweise mit transkriptionellen Regulatoren fusioniert werden, können abhängig von der Art der Regulatoren, Gene aktiviert oder reprimiert werden. Durch die Fusion von epigenetischen Regulatoren wie zum Beispiel Histon-Methylasen oder -Acetyl-

transferasen kann so über die Veränderung der Chromatinstruktur die Genexpression gefördert oder gehemmt werden. Zusätzlich zur Regulation der Genexpression können die CRISPR-Systeme für *Imaging* Applikationen angewendet werden. Indem anstelle von Regulatoren Fluoreszenzproteine fusioniert werden, können spezifische Bereiche des Genoms markiert werden, was von besonderem Interesse für Grundlagenforschung ist.

In weiteren neuen Anwendungen können einzelne Basen editiert werden, indem Deaminasen fusioniert werden. So können Mutationen auch ohne das gleichzeitige Induzieren von Brüchen ins Genom eingeführt werden. Durch die einfache Programmierung der verschiedenen CRISPR-Systeme mittels der *sgRNA* bzw. *crRNA* ist es möglich, verschiedene Loci gleichzeitig anzusteuern, einen Vorgang den man *Multiplexing* nennt. Über unterschiedliche Ansätze kann man hierbei gleiche oder verschiedene Aktivitäten an mehrere Loci bringen. Diese Vielfalt macht die CRISPR/Cas-Systeme nicht nur zu einem wertvollen Werkzeug für die Pflanzenzucht, sondern Organismusübergreifend für die gesamte Biotechnologie und Medizin.

Zusammenfassung

Die Pflanzenzucht nutzte bisher ungezielte und zeitintensive Verfahren, um Verbesserungen in den agronomischen Eigenschaften unserer Kulturpflanzen zu erreichen. Dies hat sich in den vergangenen Jahren grundlegend geändert, denn mit dem CRISPR/Cas-System steht nun ein hochpräzises und zuverlässiges Werkzeug zur Verfügung, um diese Ziele schnell und effizient zu erreichen. Durch die programmierbare Induktion von Doppelstrangbrüchen können gezielt an fast jeder beliebigen Stelle im Genom die gewünsch-

ten Veränderungen vorgenommen werden, die sich nicht mehr von natürlichen Veränderungen unterscheiden lassen. So entstanden bereits eine Reihe von Kulturpflanzen mit agronomisch interessanten Eigenschaften. Die momentane Charakterisierung weiterer CRISPR/Cas-Systeme erweitert nicht nur unseren molekularen Werkzeugkasten, sondern beginnt die gesamte Biotechnologie und Biologie grundlegend zu verändern.

Summary

The CRISPR/Cas system

Up to this point plant breeding was based on the utilization of unspecific and time-consuming procedures to accomplish improvements in the agronomic traits of our crop plants. This fundamentally changed the last years since the CRISPR/Cas system now provides a highly precise and reliable tool to achieve these goals in a fast and efficient way. The programmable induction of double-strand breaks enables the targeted introduction of favored changes at almost any desired site within the genome that cannot be distinguished from naturally occurring variations any longer. This already enabled the generation of crop plants with agronomically interesting traits. The current characterization of additional CRISPR/Cas systems not only expands our molecular toolbox which allows us to regulate the cell metabolism on very different levels but also starts changing the entire biotechnology and biology fields fundamentally.

Schlagworte

Pflanzenzucht, Genome Editing, SSNs, CRISPR, Cas9, Cas12

Literatur

- [1] A. Q. Rao, A. Bakhsh, S. Kiani, K. Shahzad, A. A. Shahid, T. Husnain, S. Riazuddin, The myth of plant transformation, *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6), 753–763.
- [2] A. Knoll, F. Fauser, H. Puchta, DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences, *Chromosome Res*, 2014, 22, 191–201.
- [3] H. Puchta und F. Fauser, Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future, *Plant J*, 2014, 78, 727–741.
- [4] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 2012, 337(6096), 816–821.
- [5] B. Zetsche, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin, F. Zhang, Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system, *Cell*, 2015, 163(3), 759–771.
- [6] A. Scheben, F. Wolter, J. Batley, H. Puchta, D. Edwards, Towards CRISPR/Cas crops-bringing together genomics and genome editing, *New Phytol*, 2017, 216(3), 682–698.
- [7] H. Puchta, Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come, *Curr Opin Plant Biol*, 2017, 36:1–8.
- [8] X. Tang, L. G. Lowder, T. Zhang, A. A. Malzahn, X. Zheng, D. F. Voytas, Z. Zhong, Y. Chen, Q. Ren, Q. Li, E. R. Kirkland, Y. Zhang, Y. Qi, A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants, *Nat Plants*, 2017, 3:17103.
- [9] S. Dreissig, S. Schiml, P. Schindele, O. Weiss, T. Rutten, V. Schubert, E. Gladilin, M. F. Mette, H. Puchta, A. Houben, Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements, *Plant J*, 2017, 91(4), 565–573.
- [10] R. J. Plummer, Y. Guo, Y. Peng, A CRISPR reimagining: New twists and turns of CRISPR beyond the genome-engineering revolution, *J Cell Biochem*, 2017, doi: 10.1002/jcb.26406.

Die Autoren



Patrick Schindele studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Seit 2016 Doktorand am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen des KIT.



Felix Wolter studierte Biologie und Agrarwissenschaft an den Universitäten Göttingen und Hohenheim. Seit 2015 Doktorand am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen des KIT.



Holger Puchta studierte Biochemie an den Universitäten Tübingen und München. Diplom und Doktorarbeit am Max Planck Institut für Biochemie, München. Postdoc am Friedrich Miescher Institut, Basel, dann Gruppenleiter am Leibniz Institut IPK Gatersleben. Im Jahr 2002 Habilitation in Genetik an der Universität Halle. Seit 2002 Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

Korrespondenz:

Prof. Dr. Holger Puchta
Botanisches Institut
Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 4 Geb. 30.43
D-76133 Karlsruhe
E-Mail: holger.puchta@kit.edu