

---

## 2 Züchtungsmethodik

---

### CRISPR/Cas9 und andere Genome Editing Techniken

*CRISPR/Cas9 and other techniques for genome editing*

**Frank Hartung, Jochen Schiemann, Thorben Sprink**

Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,  
Institut für die Sicherheit biotechnologischer Verfahren bei Pflanzen, Erwin-Baur-Str. 27,  
06484 Quedlinburg

E-mail: frank.hartung@julius-kuehn.de

DOI 10.5073/jka.2017.457.006



#### Zusammenfassung

CRISPR/Cas9 und andere Nukleasetechniken ermöglichen es seit relativ kurzer Zeit erstmals gezielte sequenzspezifische Veränderungen an Pflanzengenomen durchzuführen. Im Moment gibt es vier verschiedene Nukleasetechniken, die Meganukleasen, Zink Finger und TALE-gesteuerte Nukleasen, die durch ein Protein an ihre Zielsequenz dirigiert werden, sowie CRISPR/Cas9, die zu den RNA-gesteuerten Nukleasen gehört. Von diesen Nukleasen hat sich CRISPR/Cas9 auf Grund seiner einfachen Herstellung und Applikation als die effizienteste Technik durchgesetzt. In den 3-4 Jahren seit der Beschreibung der Technik für die Anwendung in Eukaryonten hat sich CRISPR/Cas9 weltweit ausgebreitet und wird in Tausenden Laboren zur Forschung sowie in der Pflanzenzüchtung und in medizinischen Anwendungen benutzt. In diesem Artikel werden die verschiedenen Nukleasen, die für das Genome Editing eingesetzt werden vorgestellt und einige der bereits erfolgreichen Anwendungen im Pflanzenbereich.

**Stichwörter:** Meganukleasen, TALEN, Zink Finger

#### Abstract

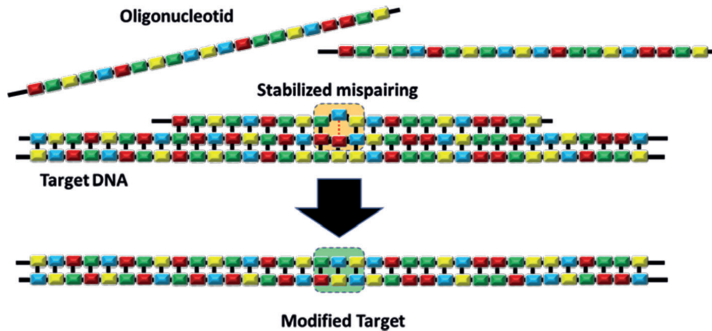
Due to the application of CRISPR/Cas9 and other nucleases it is now for the first time possible to address sequence alteration in plant genomes specifically. There are four different nuclease techniques, the meganucleases, zinc finger- and TALE-nucleases which are all protein guided nucleases as well as CRISPR/Cas9, which belongs to the RNA guided nucleases. From these four different nucleases, CRISPR/Cas9 is the easiest in construction and application and it turns out to be the most efficient one used in research. In 2012 the first application of CRISPR/Cas9 in eucaryotes was published and since then it has spread over thousands of research labs worldwide and was successfully applied in plant breeding and first medical treatments. In this article the different nucleases used for genome editing and some of their first successful application in plant breeding and research are presented.

**Keywords:** meganucleases, TALEN, zinc finger

#### Einleitung

Unter Genome Editing (GE) versteht man die Veränderung der DNA-Sequenz in einem Genom und zwar an bestimmten Orten, die man gezielt ansteuern kann. Für diese Technik kommen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz. Die Oligonukleotid gerichtete Mutation (ODM) und die induzierte Mutation durch Erzeugung eines gezielten DNA-Bruches unter Verwendung von ortsspezifischen Nukleasen (SDN).

Bei der ODM-Technik wird ein kurzes Oligonukleotid, das aus modifizierten DNA-Basen, RNA oder aus einer Mischung von beiden bestehen kann, in die Zelle eingebracht. Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu der vorab gewählten Zielsequenz, die verändert werden soll. Durch die Modifikationen bindet das Oligonukleotid sehr spezifisch an die Zielsequenz und verdrängt den komplementären DNA-Strang. Das Oligonukleotid ist dabei so konstruiert, dass mindestens eine der Basen (möglich sind bis zu vier Basen) nicht zu der genomischen DNA passt und sich somit eine oder mehrere Fehlpaarungen ergeben (Abb. 1).



**Abb. 1** Schematische Darstellung der Oligonucleotid gerichteten Mutagenese (ODM). Die farbigen Kästen symbolisieren die Basen der DNA. Durch Fehlpaarung des Oligonucleotids mit der genomischen DNA ergibt sich ein Hybrid-Template für die Fehlpaarungsreparatur, diese kann in Einzelfällen ein modifiziertes Ziel ergeben.

**Fig. 1** Schematic diagram of the Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM). The coloured boxes symbolize the bases of DNA. Imprecise pairing of the oligonucleotide with the genomic DNA results in a hybrid template during the repair process. Therefore, modified targets occur in particular cases.

Solche Fehlpaarungen werden von dem zelleigenen Fehlpaarungsreparatur-Mechanismus erkannt und repariert. Bei dieser Reparatur können Fehler auftreten, was dazu führt, dass die auf dem Oligonucleotid kodierte nicht passende Base die neue Sequenz bestimmt. Hierdurch können Punktmutationen sehr spezifisch eingebaut werden. In der Regel wird diese Technik für die Erzeugung von Herbizidresistenzen eingesetzt (SAUER et al., 2016).

Die für das GE eingesetzten Nuklease-Techniken, die in den letzten Jahren im Labor entwickelt wurden, sind im Prinzip nur weiterentwickelte Varianten von Systemen, die in der Natur vorkommen. Es gibt dafür im Moment vier Haupttechniken, die auf unterschiedlichen Nuklease-Systemen beruhen.

### Meganukleasen

Die Meganukleasen (MN) sind im Prinzip Restriktionsenzyme wie sie bei Bakterien lange bekannt sind. Sie schneiden an einer spezifischen Sequenz und bestehen aus einem Protein, das DNA bindet und diese restringiert. Der Begriff Mega- bezieht sich dabei auf die lange Erkennungssequenz (15-25 Basen) dieser Enzyme, da eine kurze Basenabfolge zu oft im Genom von Eukaryonten vorkommen würde. Man findet diese Nukleasen üblicherweise in Hefe oder Algen. Durch *in vitro* Selektion ist es möglich, die Erkennungssequenz von Meganukleasen zu modifizieren und somit für neue Erkennungs-Sequenzen zu optimieren (GRIZOT et al., 2009). Dieses Verfahren ist allerdings zeit- und kostenaufwändig. Daher haben sich Meganukleasen nicht als Standard im GE durchgesetzt. Ihre hohe Genauigkeit könnte allerdings dafür sorgen, dass MN im Bereich der menschlichen Gentherapie Anwendung finden.

### Zink Finger- und TALE-Nukleasen

Zink Finger- (ZFN) und TALE-Nukleasen (Transcription activator like effectors) bestehen aus zwei Protein-Komponenten, der DNA-Bindungsdomäne (ZF oder TALE) sowie einer Nuklease (meistens FokI aus dem *Flavobacterium okeanoikoites*; SANDER et al., 2011; BOCH et al., 2009). Das Prinzip der beiden Systeme ist sehr ähnlich, wobei die ZFN mit ihren einzelnen Fingern jeweils drei Basen gleichzeitig und die TALEs mit jeder Bindedomäne nur eine Base erkennen (SPRINK et al., 2014). Dadurch sind TALEN leichter an neue Erkennungssequenzen anzupassen und ermöglichen es, eine größere Anzahl an verschiedenen Stellen im Genom zu adressieren. Die häufig verwendete FokI-Nuklease ist unspezifisch und kann nur als Dimer schneiden, wodurch jeweils zwei Zink Finger bzw. TALE-Proteine binden müssen.

## CRISPR/CAS9

CRISPR steht als Akronym für "clustered regularly interspaced short palindromic repeats". Diese Nuklease-Technik beruht auf einem anderem Erkennungs- und Bindsystem. Anstatt dass ein Teil des Proteins die DNA-Sequenz erkennt und bindet, macht dies in dem CRISPR/Cas9 System eine kurze RNA-Sequenz, die sogenannte single guide RNA (sgRNA). Üblicherweise ist diese sgRNA 20nt lang und bindet an die komplementären 20 Basen in der genomischen DNA (JINEK et al., 2012). Dieser Komplex wird von dem CRISPR-assoziierten Protein (Cas9) erkannt und geschnitten, sofern sich eine sogenannte Protospacer benachbarte Sequenz (PAM) direkt dahinter im Genom befindet. Die Herstellung von neuen CRISPR/Cas9-Nukleasen ist denkbar einfach und beschränkt sich darauf, jeweils eine neue sgRNA zu definieren. Diese wird dann einfach als Oligonukleotid bestellt und in den Vektor, in dem sich das Cas9-Protein befindet, kloniert. Auf Grund dieser extrem einfachen Adressierung neuer Schnittstellen in der Genomsequenz hat sich CRISPR/Cas9 in kurzer Zeit (seit 2012) durchgesetzt, so dass die meisten GE-Anwendungen heutzutage damit durchgeführt werden.

Wie bereits erwähnt sind sich die Nuklease-Systeme von der Wirkung her sehr ähnlich, sie induzieren jeweils einen Doppelstrangbruch (DSB) in der DNA, dieser wird anschließend von zelleigenen Reparatursystemen behoben, da solche Brüche für die Zellen sehr gefährlich sind. Sie behindern nicht nur das Ablesen der Gene, sondern sie verleihen der Erbsubstanz auch Instabilität. Daher haben Organismen im Laufe ihrer Evolution Reparatursysteme hervorgebracht, die solche Brüche möglichst schnell beseitigen.

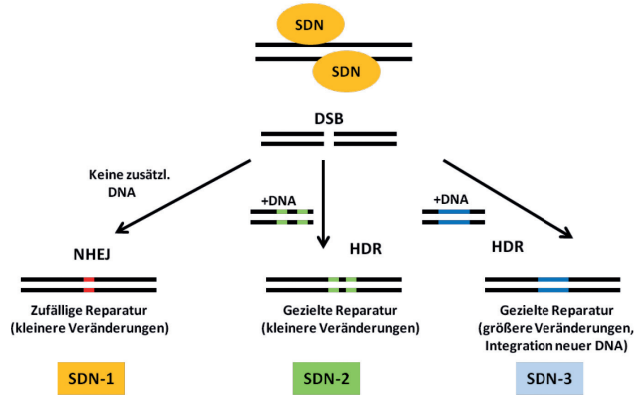
In einem Pflanzen genom werden DNA-Doppelstrangbrüche fast ausschließlich durch den zelleigenen Mechanismus des „Non-homologous end joining“ (NHEJ) repariert (>99 %). Bei dieser Reparatur werden die DNA-Brüche entweder direkt durch ein Enzym (Ligase) wieder zusammengefügt oder die Bruchenden werden vor dem Zusammenfügen verkürzt. NHEJ umfasst zwei Spielarten: Das klassische NHEJ, welches fehlerfreie Reparaturen ermöglicht, und das alternative NHEJ, bei dem es zu Fehlern bei der Reparatur kommen kann (BÉTERMIER et al., 2014). Die Häufigkeit der Fehler ist schwer zu berechnen, da keine Daten darüber vorliegen, wie oft korrekt repariert wird. Nach bisher vorliegenden Erkenntnissen führen etwa 2/3 dieser Reparaturfehler zu einem funktionellen Ausschalten des betroffenen Gens. Folgende Fehler können auftreten:

- Insertion oder Deletion von einzelnen Basen,
- Insertion oder Deletion von Sequenzen unterschiedlicher Länge,
- Basen-Substitutionen,
- DNA-Inversionen (Herausbrechen, Verdrehen und Wiedereinfügen eines DNA-Stückes) und Translokationen (DNA-Segmente brechen heraus und werden an anderer Stelle wieder eingefügt).

Diese Art Fehler treten ohne weitere Einflussnahme des Menschen zufällig auf. Bietet man der Zelle jedoch Sequenzen an, die Homologie zu dem Bereich der DNA in dem der DSB stattfindet zeigen, dann kann die Reparatur in eine Richtung getrieben werden, die als „homology directed repair“ (HDR) bezeichnet wird. Bei der HDR nutzt die Zelle eine sogenannte Donor-DNA, die man als Template oder Matrize anbieten kann.

Egal welche Nukleasetechnik verwendet wird, bieten sich also mehrere Möglichkeiten, welche Veränderung der Sequenz nach der Reparatur des DSB entstehen kann. Lässt man die Nuklease ohne „Anleitung“ (d. h. ohne zugegebene Matrize) schneiden, dann repariert die Zelle per NHEJ und es können die oben erwähnten Veränderungen auftreten (Abb. 2, links). Diesen Vorgang nennt man SDN-1 für „Site Directed Nuclease 1“ (EFSA, 2012). Gibt man eine Sequenz hinzu, die als Matrize für die gezielte Veränderung benutzt werden kann, dann geht die Reparatur vermehrt in Richtung HDR und es können beabsichtigte Veränderungen der bestehenden Sequenz erzielt werden, dies nennt man SDN-2 (Abb. 2, Mitte). Gibt man eine Matrize hinzu, die an ihren beiden Enden mindestens 500bp Homologie zu der Sequenz im Bereich des DSB hat, dann nennt man dies SDN-3 und die gesamte Sequenz innerhalb der Homologiebereiche kann in den DSB hineinkopiert werden. Dieser

letzte Vorgang ist am ehesten mit der Einführung von Transgenen zu vergleichen, es können aber auch Gene aus kreuzbaren Partnern an dem homologen Locus eingebracht werden, dann nennt man das Cisgenese (Abb. 2, rechts).



**Abb. 2 Schematische Darstellung der drei SDN-Typen.** Je nachdem, ob zu dem durch die „Site Directed Nuclease“ (SDN) induzierten Doppelstrangbruch (DSB) eine DNA-Matrize zugegeben wird, ergeben sich verschiedene Reparaturmöglichkeiten (NHEJ = SDN-1 oder HDR). Je nach Sequenz der DNA-Matrize kann dies zu kleineren gezielten Veränderungen führen (SDN-2) oder zur Integration längerer Sequenzen (SDN-3). Abkürzungen: NHEJ = Non Homologous End Joining; HDR = Homology Directed Repair.

**Fig. 2 Schematic diagram of three SDN types.** Depending on the case, if a DNA matrix is added to the double strand break induced by a „Site Directed Nuclease“ (SDN), different repair pathways (NHEJ = SDN-1 or HDR) are possible. According to the sequence of the DNA matrix this yields small directed variations (SDN-2) or the integration of longer sequences (SDN-3). Abbreviations: NHEJ = Non Homologous End Joining; HDR = Homology Directed Repair.

## Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit den neuen Technologien zum Genome Editing möglich ist, an einem bekannten Genlocus in einer Pflanze nahezu jede beliebige Veränderung vorzunehmen. Hierdurch können bekannte gewünschte Eigenschaften innerhalb von Arten oder über Artgrenzen hinweg völlig neu kombiniert werden. Durch den Einsatz des sehr einfach herzustellenden und sehr effizienten CRISPR/Cas9-Systems ist es damit auch möglich, Veränderungen am Genom in Pflanzen zu erzeugen, die nicht zu den „cash crops“ gehören und dies ist zudem auch kleineren und mittelständischen Unternehmen und nicht nur den Großkonzernen möglich.

## Literatur

- BOCH, J., SCHOLZE, H., SCHORNACK, S., LANDGRAF, A., HAHN, S., KAY, S., LAHAYE, T., NICKSTADT, A. UND U. BONAS, 2009: Breaking the Code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509-1512.
- EFSA. European Food Safety Authority Panel on Genetically Modified Organisms, 2012: Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using zinc finger nuclease 3 and other site-directed nucleases with similar function. *EFSA J.* **10**, 2943.
- GRIZOT, S., SMITH, J., DABOUSSI, F., PRIETO, J., RENDONDO, P., MERINO, N., VILLATE, M., THOMAS, S., LEMAIRE, L., MONTOYA, G., PLANCO, F.J., PAQUES, F. UND P. DUCHATEAU, 2009: Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease. *Nucleic Acids Res* **37** (16), 5405-5419.
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J.A. UND E. CHARPENTIER, 2012: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.
- SANDER, J.D., DAHLBORG, E.J., GOODWIN, M.J., CADE, L., ZHANG, F., CIFUENTES, D., CURTIN, S.J., BLACKBURN, J.S., THIBODEAU-BEGANNY, S., QI, Y., PIERICK, C.J., HOFFMAN, E., MAEDER, M.L., KHAYTER, C., REYON, D., DOBBS, D., LANGENAU, D.M., STUPAR, R.M., GIRALDEZ, A.J., VOYTAS, D.F., PETERSON, R.T., YEH, J.R. UND J.K. JOUNG, 2011: Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods* **8** (1), 67-69.
- SAUER, N.J., MOZORUK, J., MILLER, R.B., WARBURG, Z.J., WALKER, K.A., BEETHAM, P.R. SCHOPKE, C.R. UND G.F.W. GOCAL, 2016: Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotech. J.*, **14**, 496-502.
- SPRINK, T., METJE, J. UND F. HARTUNG, 2014: Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Curr. Opin. Biotech.* **32**, 47-53.