

2. Pflanzengenom-Editierungstechniken für eine nachhaltigere Landwirtschaft

Michelle Rönspies und Holger Puchta

2.1 Einführung

Nach aktuellen Schätzungen der UN könnte die Weltbevölkerung im Jahre 2030 bereits 8,5 Milliarden Menschen betragen (United Nations, 2022). Um die Lebensmittelversorgung auch zukünftig gewährleisten zu können, ist eine erhebliche Produktionssteigerung in der Landwirtschaft erforderlich (van Dijk et al., 2021). Allerdings sind die Steigerungsmöglichkeiten der Ernteerträge derzeit begrenzt: Einerseits ist die Verfügbarkeit von neuen Ackerflächen limitiert (Lan et al., 2023); andererseits ist die Ernte auf den bestehenden Anbauflächen durch die Auswirkungen des Klimawandels, z. B. in Form von Dürren, gefährdet (Rezaei et al., 2023).¹

Eine Möglichkeit, höhere Erträge auf den bestehenden Ackerflächen zu erzielen, besteht in der genetischen Optimierung von Nutzpflanzen („crop improvement“) durch Selektion (Auslese) von für den Menschen vorteilhaften Merkmalen oder das Einbringen neuer verbesserter Eigenschaften in die Pflanzen-DNA. Einerseits kann dies durch die Anwendung konventioneller Züchtungsmethoden, wie z. B. Bestrahlung, erreicht werden. Hierbei entstehen viele DNA-Veränderungen, sogenannte Mutationen, an zufälligen Stellen im Genom² und so können durch Zufall verbesserte Eigenschaften erzeugt werden. Andererseits können auch vorher definierte Mutationen gezielt mithilfe zielspezifisch programmierbarer DNA-Endonukleasen³ in die Pflanzen-DNA eingebracht werden. Mithilfe von DNA-Endonukleasen kann in beiden DNA-Strängen der DNA-Doppelhelix⁴ ein Bruch (Doppelstrangbruch, DSB) erzeugt werden. Die anschließende DNA-Reparatur durch zelleigene Reparaturmechanismen erfolgt nicht immer fehlerfrei, wodurch die genetische Information an einer bestimmten Stelle verändert werden kann. Die prominenteste und am meisten verwendete programmierbare Endonuklease ist Teil des sogenannten Clustered-regularly-interspaced-short-palindromic-Repeats (CRISPR)-/CRISPR-associated-Protein(Cas)-Systems, das spätestens seit der Auszeichnung seiner Entdeckerinnen Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna mit dem Nobelpreis für Chemie 2020 in den Fokus der Öffentlichkeit rückte.

¹ Für weitere Informationen siehe Handlungsempfehlungen, Kap. 1 und Niggli, Kap. 6.

² Das Genom ist die Gesamtheit der Erbinformation eines Individuums.

³ DNA-Endonukleasen können DNA spalten.

⁴ Die DNA hat die Form einer Doppelhelix und besteht aus zwei verdrehten Einzelsträngen, die durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin verbunden sind.

Aufgrund der Vielseitigkeit und einfachen Anwendung des CRISPR/Cas-Systems wird es inzwischen routinemäßig und weltweit in Laboren eingesetzt, um DNA gezielt zu verändern.

2.2 Geschichte der Genomeditierung in Pflanzen

Die klassische Pflanzenzüchtung beruht auf Mutationen und der Selektion der daraus entstandenen erwünschten Pflanzeigenschaften. Pflanzen mit vorteilhaften Merkmalen können miteinander gekreuzt werden, um verbesserte Sorten zu erhalten. Bei einer Kreuzung werden alle Eigenschaften der beiden Elternpflanzen neu kombiniert. Um nur die verbesserten Merkmale zu erhalten und nachteilige Eigenschaften möglichst nicht weiterzuvererben, müssen mehrere Kreuzungs- und Selektionsrunden durchgeführt werden. Seit Anbeginn der Landwirtschaft wurden auf diese Art viele der uns heute bekannten Nutzpflanzen erzeugt (Breseghello/Coelho, 2013: 8277 ff.).

Während zunächst natürlich entstandene Mutationen (ausgelöst z. B. durch die Sonnenstrahlung) für die Züchtung verbesserter Kulturpflanzen genutzt wurden, kam im 20. Jahrhundert eine neue Technik hinzu, um Mutationen künstlich zu erzeugen: die Mutagenese.⁵ Bei der ungerichteten Mutagenese wird durch Bestrahlung oder Einsatz von Chemikalien die Mutationsrate in der gesamten Pflanze erhöht, sodass viele Mutationen an zufälligen Positionen in der DNA gleichzeitig auftreten. Dabei können zufällig für den Menschen vorteilhafte Eigenschaften entstehen und diese Pflanzen für weitere Züchtungsschritte ausgewählt werden. Der Nachteil der sogenannten klassischen Mutagenese ist allerdings, dass neben erwünschten Veränderungen auch Tausende weiterer Veränderungen im Genom entstehen, die negative Auswirkungen auf Wachstum oder Ertrag haben können. Um vorteilhafte von unvorteilhaften Merkmalen zu trennen, müssen viele Rückkreuzungsversuche erfolgen, die mehrere Jahre dauern können. Es kann sogar unmöglich sein, diese Eigenschaften getrennt voneinander zu vererben, wenn die betroffenen Gene auf dem Chromosom nah beieinanderliegen. Solche sogenannten Genkopplungen werden nur selten auf natürliche Weise wieder aufgehoben.

Studien in den frühen Neunzigerjahren zeigten, dass man durch eine hochspezifische Endonuklease aus Hefe auch in pflanzlichen und tierischen Zellen DSB induzieren und so genetische Information verändern kann (Puchta et al., 1993; Rouet et al., 1994). Die Möglichkeit der gezielten DNA-Veränderung in vorher definierten Zielregionen (Genomeditierung) kam dann mit der Entwicklung programmierbarer DNA-Endonukleasen auf. Zunächst wurden die Zinkfingernukleasen (ZFNs) (Kim et al., 1996) und danach die Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektor-nukleasen (TALENs) entwickelt (Boch et al., 2009; Urnov et al., 2010). ZFNs verfügen über eine DNA-Bindungsdomäne,⁶ die zur Bindung einer spezifischen Ziel-DNA-Sequenz dient, und eine Nuklease, die die DNA an der Zielstelle spaltet. TALENs bestehen ebenfalls aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Nukleasedomäne; ihre DNA-Bindungsdomäne ist jedoch spezifischer für potenzielle Zielsequenzen als die der ZFNs. Bei beiden Werkzeugen ist die Zielprogrammierung zeit- und kostenintensiv. Als 2012 das CRISPR/Cas-

⁵ Unter Mutagenese versteht man den Prozess, Mutationen im Erbgut zu erzeugen.

⁶ Domänen sind Proteinbereiche mit spezifischen Funktionen, z. B. DNA-Bindungsdomänen, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und binden.

System entdeckt wurde, hat es ZFNs und TALENs schnell als Standardwerkzeug in vielen Laboren ersetzt, da es einfacher programmiert werden kann und die Herstellung deutlich günstiger ist. Das CRISPR/Cas-System besteht in seiner für das Labor modifizierten Form aus einer Cas-Nuklease mit zwei Domänen, die jeweils einen der beiden DNA-Stränge schneiden können, und einer sogenannten „guide RNA“,⁷ die an die gewünschte Zielsequenz bindet und dadurch die Nuklease an die Zielstelle führt, in der daraufhin ein DSB erzeugt wird (Jinek et al., 2012). Zur Programmierung der Nuklease muss nur ein kurzer Sequenzabschnitt der „guide RNA“ durch eine zielspezifische Sequenz ausgetauscht werden.

2.3 Funktionsweise des CRISPR/Cas-Systems

Das natürliche CRISPR/Cas-System dient Bakterien und Archaeen⁸ als adaptive Immunantwort gegen Vireninfektionen. Im Laufe einer Infektion werden Teile der viralen DNA in das Bakteriengenom eingebaut und bei einem erneuten Virenangriff als eine Art „Gedächtnis“ genutzt, um die fremde DNA zu erkennen und mithilfe von Cas-Nukleasen zu zerschneiden, was zum Abbau der Viren-DNA führt und den Angriff verhindert. Die Forschungsgruppen um Doudna, Charpentier und Siksnys erkannten 2012, dass man dieses System im Labor anpassen kann, um gezielt an fast jeder beliebigen Stelle im Genom einen DSB zu erzeugen (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). Hierfür muss nur der kurze DNA-Sequenzabschnitt, der normalerweise der Erkennung der fremden DNA dient, gegen eine beliebige Zielsequenz ausgetauscht werden, um die Cas-Nuklease an die gewünschte Stelle in der DNA zu führen. Dieser variable Sequenzabschnitt ist Teil der „guide RNA“. Zusätzlich muss sich in der Nähe der Zielsequenz eine bestimmte Erkennungssequenz, das „protospacer adjacent motif“ (PAM), befinden, die notwendig für die Aktivierung der Nuklease-Aktivität ist. Die PAM-Sequenz findet sich nur in der Ziel-DNA, damit das Cas-Protein nicht die eigene bakterielle DNA schneidet. Da immer eine PAM-Sequenz neben der Zielsequenz vorhanden sein muss, schränkt dies die Wahl der möglichen Editing-Ziele ein.

Es existieren viele verschiedene natürliche CRISPR/Cas-Systeme, allerdings unterscheiden sich die Editierungseffizienzen der unterschiedlichen Systeme abhängig vom Zielorganismus sehr stark. Dies liegt u. a. an unterschiedlichen Temperaturoptima, die bei den meisten Cas-Nukleasen bei 37°C liegen, während Pflanzen meist bei Temperaturen zwischen 20 und 25°C kultiviert werden (Malzahn et al., 2019). Aufgrund dessen wurden für den Einsatz in Pflanzen optimierte Cas-Varianten entwickelt, die im Vergleich zu den natürlichen Systemen auch bei den niedrigeren Kultivierungstemperaturen von Pflanzen eine hohe Schnitteffizienz aufweisen (Schindele/Puchta, 2020: 118 ff.; Grützner et al., 2021; Schindele et al., 2023).

⁷ „Leit-RNA“; RNA ist wie DNA eine Nukleinsäure, tritt aber meistens einsträngig auf. RNAs erfüllen wichtige Funktionen, z. B. sind sie an der Umsetzung der durch die DNA codierten Geninformation in Proteine beteiligt. Siehe für weitere Informationen zu RNA Fehse et al. (2022).

⁸ Archaeen bilden eine der drei Domänen der Lebewesen. Bakterien und Archaeen werden zu den Prokaryoten zusammengefasst, die keinen Zellkern besitzen.

2.4 Techniken der Genomeditierung

2.4.1 Erzeugung verbesserter Nutzpflanzen

Verbesserte Nutzpflanzen werden normalerweise in zwei Schritten erzeugt: Zunächst muss die gewünschte Veränderung, z. B. ein Gen, durch Transformation⁹ in die Pflanzenzellen eingebracht werden und oft folgt darauf ein Regenerationsschritt, in dem sich aus den modifizierten Zellen in Gewebekultur¹⁰ wieder vollständige Pflanzen entwickeln, die in jeder Zelle die gewünschte DNA-Veränderung tragen. Viele Pflanzenarten können bisher aber noch nicht effizient transformiert und regeneriert werden.

Mittels Transformation werden die für das jeweilige Experiment benötigten CRISPR/Cas-Komponenten oft als Transfer-DNA (T-DNA) mithilfe des Bodenbakteriums *Agrobacterium*, das natürlicherweise Pflanzen infizieren kann, in die Pflanzenzellen eingebracht. Alternativ können als Träger auch Plasmide, kleine ringförmige DNA-Moleküle oder Ribonukleoprotein-Komplexe, bestehend aus der „guide RNA“ und dem Cas-Protein, verwendet werden. Während die T-DNA und die Plasmid-DNA normalerweise stabil ins Genom integriert werden, ist dies bei der Verwendung von Ribonukleoproteinen nicht der Fall: Da keine fremde DNA eingebracht wird, kann diese auch nicht in der Ziel-DNA zurückbleiben. Die so mutierten, aber transgenfreien¹¹ Pflanzen sollten deshalb gegenüber klassischen transgenen Pflanzen sowohl für die behördliche Zulassung (siehe Dederer, Kap. 3) als auch bei der Akzeptanz bei Konsumenten und Konsumentinnen deutliche Vorteile haben. Um die Effizienz der Transformation zu erhöhen, können auch virale DNA-Moleküle als Träger der gewünschten Modifikation verwendet werden. Aufgrund ihrer natürlichen Fähigkeit, effizient in Pflanzenzellen einzudringen und ihr genetisches Material schnell freizusetzen, sind Pflanzenviren attraktive Werkzeuge für den Transport und die Vermehrung der CRISPR/Cas-Bestandteile in der Pflanze (C. Zhang et al., 2022).

Um die geringe Regenerationseffizienz vieler Nutzpflanzen zu umgehen, hat es sich bewährt, Gene, die an der Kontrolle von Pflanzenwachstum und -entwicklung beteiligt sind, gleichzeitig mit den CRISPR/Cas-Komponenten in die Pflanze einzubringen und diese so zu verändern, dass sie dauerhaft aktiv sind. Ein Beispiel für ein solches Zielgen ist *Wuschel2*, das eine wichtige Rolle in der Initiierung der somatischen¹² Embryobildung in Gewebekultur spielt. So konnte beispielsweise durch die gleichzeitige Transformation mit *Wuschel2* nicht nur die Transformationseffizienz, sondern auch die Häufigkeit der Genomeditierung in Sorghumhirse erhöht werden (Che et al., 2022).

Ein zur Generierung verbesserter Nutzpflanzen wichtiger Vorteil des CRISPR/Cas-Systems ist u. a., dass nicht nur ein, sondern auch mehrere DSB gleichzeitig erzeugt werden können. Somit können mehrere Zielstellen gleichzeitig angesteuert werden. Dies kann z. B. vorteilhaft sein, wenn mehrere agronomisch interessante Merkmale gleichzeitig verbessert wer-

⁹ Transformation meint die genetische Veränderung einer Zelle durch Aufnahme oder Einbringung fremder DNA.

¹⁰ Pflanzen können sich aus einzelnen Zellen oder Pflanzenteilen neu entwickeln und sich so ungeschlechtlich vermehren. In einer Gewebekultur können sich unter sterilen Bedingungen und mithilfe spezieller Nährmedien so wieder vollständige Pflanzen entwickeln.

¹¹ Ein Transgen ist ein Gen einer anderen Spezies, das mit gentechnischen Verfahren in das Erbgut eines Organismus eingebracht wurde.

¹² Somatische Zellen sind alle Körperzellen mit Ausnahme der Geschlechtszellen.

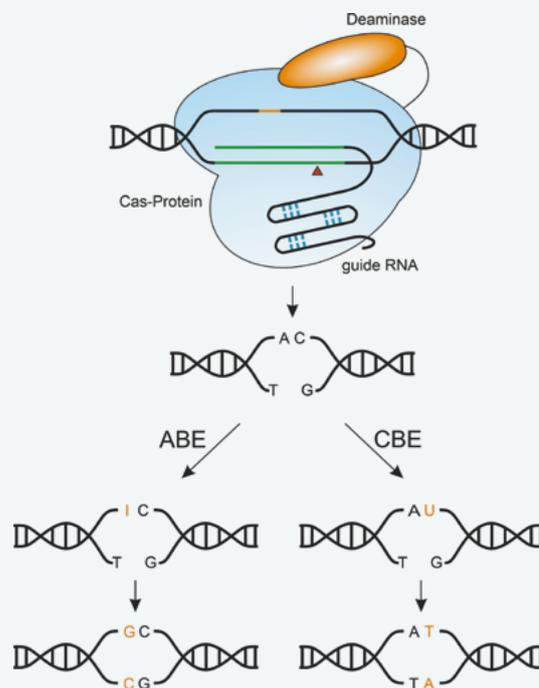
den sollen. Die Anwendbarkeit dieses sogenannten Multiplexing wurde 2018 zum ersten Mal von Zsögön et al. eindrucksvoll demonstriert, die innerhalb von nur einer Generation eine mit unserer Kulturtomate verwandte wilde Tomate durch die simultane Editierung sechs sogenannter Domestizierungsgene, also Gene, die z. B. für erhöhte Ernteerträge sorgen, domestizieren konnten (Zsögön et al., 2018).

Seit der Etablierung des CRISPR/Cas-Systems als Werkzeug zur gezielten DSB-Induktion wurden CRISPR/Cas-basierte Anwendungen ständig weiterentwickelt, um die DNA immer effizienter zu modifizieren. Heutzutage kann das Pflanzengenom auf eine Weise modifiziert werden, die vor einigen Jahren noch unvorstellbar war. In den folgenden Abschnitten werden einige dieser Methoden vorgestellt.

2.4.2 Base-Editing

Die Technik des Base-Editing (Komor et al., 2016; siehe Abb. 1) beruht auf der Verwendung einer modifizierten Cas-Nuklease, um gezielt einzelne DNA-Bausteine (Nukleotide) gegeneinander auszutauschen, also eine sogenannte Punktmutation zu erzeugen. Das veränderte Cas-Protein kann die Zielsequenz mithilfe der „guide RNA“ nur noch spezifisch binden und einen der beiden Stränge schneiden, aber keinen DSB mehr erzeugen. Das Cas-Protein ist mit einer sogenannten Deaminase kombiniert, die Basen chemisch verändern und somit in andere Basen umwandeln kann. Es gibt zwei Hauptarten von Base-Editoren, Cytosin-Base-Editoren (CBE) und Adenin-Base-Editoren (ABE). CBE nutzen eine Cytidin-Deaminase, um das Cytidin (C), das normalerweise eine Basenpaarung mit Guanosin (G) eingeht, in Uracil (U) umzuwandeln. Im Laufe der DNA-Reparatur wird dieses durch Thymidin (T) ersetzt, das eine Basenpaarung mit Adenosin (A) eingeht. Somit kommt es zu einer Änderung des Basenpaares C-G zu T-A. ABE verwenden hingegen eine Adenosin-Deaminase, die eine Umwandlung von Adenosin (A) in Inosin (I) verursacht. Im Rahmen der DNA-Reparatur wird dieses durch Guanosin (G) ersetzt. In der Folge wird also das Basenpaar A-T in G-C umgewandelt. Die Editierung kann nur innerhalb eines bestimmten Editierungsfensters von einigen Basenpaaren erfolgen, wobei in diesem Bereich jedes vorhandene Cytidin (CBE) bzw. Adenosin (ABE) umgewandelt werden kann.

Da viele Krankheiten auf Punktmutationen beruhen, hat Base-Editing großes Potenzial in der Humanmedizin (Porto et al., 2020). Aber auch in der Pflanzenzucht ist diese Technik von großer Bedeutung, da z. B. viele Herbizidresistenzen auf einzelnen Punktmutationen beruhen. So konnte beispielsweise Weizen durch Base-Editing des Acetolactat-Synthase-Gens resistent gegen mehrere Herbizide gemacht werden, deren Wirkung darauf beruht, die Herstellung wichtiger Aminosäuren durch die Acetolactat-Synthase zu verhindern (R. Zhang et al., 2019). Auch können Qualität oder Geschmack von Kulturpflanzen durch Base-Editing verbessert werden. So wurde beispielsweise in einer Erdbeersorte durch Einführung einer Punktmutation der Zuckergehalt deutlich erhöht (Xing et al., 2020).

Abbildung 1: Übersicht über den Mechanismus des Base-Editing

Das veränderte Cas-Protein kann die Zielsequenz (grün) mithilfe der „guide RNA“ noch spezifisch binden, aber schneidet nur den Strang, der nicht editiert werden soll (rotes Dreieck). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass der geschnittene Strang von den zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen als defekt erkannt wird und nach Vorlage des zuvor editierten nicht geschnittenen DNA-Strangs „repariert“ wird. Somit enthalten nach der Reparatur beide Stränge die modifizierte DNA. Das Cas-Protein ist mit einer Deaminase kombiniert, die Punktmutationen erzeugen kann. Die Editierung kann nur innerhalb eines bestimmten Editierungsfensters von einigen Basenpaaren (orange) erfolgen, wobei in diesem Bereich jedes vorhandene Cytidin (CBE) bzw. Adenosin (ABE) umgewandelt werden kann.

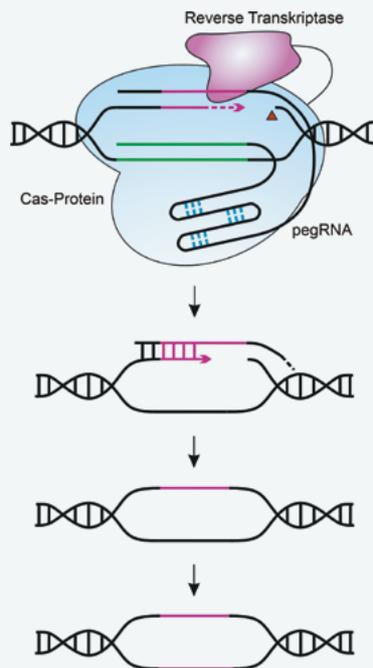
2.4.3 Prime-Editing

Prime-Editing ist eine weitere Technik, die es ermöglicht, gewünschte DNA-Veränderungen gezielt ins Genom einzubringen (Anzalone et al., 2019; siehe Abb. 2). Dies können nicht nur wie beim Base-Editing einzelne Basen, sondern auch größere Deletionen oder Insertionen sein. Auch bei dieser Anwendung wird eine modifizierte Cas-Nuklease verwendet. Hierbei wird die Nuklease so modifiziert, dass nur noch ein Strang geschnitten wird (Nickase). Zusätzlich wird eine modifizierte „guide RNA“ („prime editing guide RNA“) verwendet, die nicht nur die Zielspezifität des CRISPR/Cas-Systems vermittelt, sondern auch die genetische Information für die gewünschte DNA-Veränderung trägt. Der dritte Bestandteil des Systems ist eine Reverse Transkriptase, die RNA in DNA umschreiben kann und so die gewünschte DNA-Veränderung, die auf der „prime editing guide RNA“ liegt, auch in die Zielstelle einfügt. Im Rahmen der zelleigenen DNA-Reparatur kann der nicht editierte Strang nach Vorlage des zuvor editierten Strangs „repariert“ werden. Somit enthalten nach der Reparatur beide Stränge die modifizierte DNA.

Prime-Editing wird in Pflanzen bisher noch selten angewendet, da die Effizienz in pflanzlichen Zellen deutlich geringer als in tierischen Zellen ausfällt und sich diese zwischen ver-

schiedenen Pflanzenarten und Zielsequenzen stark unterscheidet (Vats et al., 2024). Wenn die Technik in Zukunft aber für den Einsatz in Pflanzen optimiert werden kann, hat sie großes Potenzial, eine wichtige Rolle im „crop improvement“ zu spielen, da weitreichendere Veränderungen erzielt werden können als mit der Base-Editing-Methode.

Abbildung 2: Übersicht über den Mechanismus des Prime-Editing



Es wird eine modifizierte Cas-Nuklease verwendet, die die Zielsequenz (grün) mithilfe der „guide RNA“ noch spezifisch binden kann, aber nur noch einen Strang schneidet (rotes Dreieck). Zusätzlich wird eine modifizierte „guide RNA“ („prime editing guide RNA“, „pegRNA“) verwendet, die nicht nur die Zielspezifität des CRISPR/Cas-Systems vermittelt, sondern auch die genetische Information für die gewünschte DNA-Veränderung (z. B. größere Insertionen oder Deletionen) trägt (lila).

2.4.4 Gene-Targeting

Mittels der Gene-Targeting-Technik können gezielt Gene verändert werden. Dabei können nicht nur Punktmutationen, sondern auch größere Sequenzänderungen erreicht oder komplett neue Gene in das Genom eingebracht werden. Die Methode beruht auf dem DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR), der sequenzidentische, also homologe, DNA-Sequenzen im Genom gegeneinander austauschen kann (siehe Abb. 3). Um ein neues Gen oder eine Genveränderung mithilfe der HR an einer vorher festgelegten Position in das Pflanzengenom einzubringen, muss die gewünschte Modifikation an beiden Seiten von DNA-Sequenzen flankiert sein, die identisch zu der genomischen DNA-Sequenz sind, in die die Modifikation integriert werden soll (Puchta et al., 1996). Dieser DNA-Abschnitt ist Teil des sogenannten Donor-Templates, das zusammen mit der Cas-Nuklease in den Zielorganismus eingebracht wird, sodass es während der DNA-Reparatur des durch Cas induzierten DSB als Reparaturvorlage für die HR zur Verfügung steht.

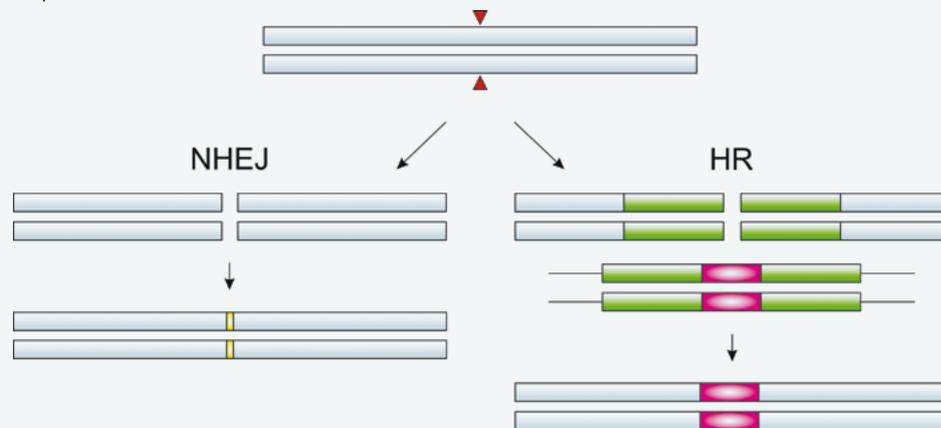
In Pflanzen stellt Gene-Targeting derzeit keine effiziente Editieremethode dar, weil die HR nicht der dominante DNA-Reparaturmechanismus in somatischen Pflanzenzellen ist (Puchta, 2005). Trotzdem konnten mit dieser Technik beispielsweise eine Herbizidresistenz in Pflanzen eingebracht werden (Sauer et al., 2016) und die Ernteerträge in Mais erhöht werden (Shi et al., 2017).

2.4.5 Chromosome-Engineering

In der Pflanzenzüchtung steht nicht nur die Veränderung einzelner Eigenschaften, sondern ebenso die Kombination vorteilhafter Eigenschaften im Fokus. Normalerweise wird während der geschlechtlichen Fortpflanzung genetische Information zwischen den elterlichen Chromosomen ausgetauscht, was in den Nachkommen zur Neukombination von Eigenschaften führen kann. Dies ist aber nicht möglich, wenn die Gene nahe beieinander auf einem Chromosom liegen, also genetisch gekoppelt sind, oder wenn die Gene im Vergleich zum Kreuzungspartner in einem invertierten Bereich eines Chromosoms liegen. Natürliche Inversionen treten bei Kulturpflanzen relativ häufig auf. Daher wäre es für Züchter/-innen von großem Interesse, durch chromosomale Umstrukturierungen Austausch zwischen gekoppelten Genen zu ermöglichen oder natürliche Inversionen gezielt umzukehren, um in den Nachkommen dann erwünschte Eigenschaften kombinieren zu können. Für diese Art der Genomveränderung wurde die CRISPR/Cas-vermittelte Chromosome-Engineering-Technik in Pflanzen entwickelt (Rönspies et al., 2021). Mithilfe des CRISPR/Cas-Systems und zweier „guide RNAs“ können zwei DSB gleichzeitig ins Genom eingeführt werden. In somatischen Pflanzenzellen werden diese DSB hauptsächlich durch die „Nicht-homologe Endverknüpfung“ (NHEJ) repariert (siehe Abb. 3). Wenn die DSB auf demselben Chromosom eingebracht werden, können im Laufe einer fehlerhaften DNA-Reparatur Inversionen oder Deletionen, also der Verlust des herausgeschnittenen DNA-Abschnitts, entstehen. Wenn die DSB auf zwei unterschiedlichen Chromosomen eingebracht werden, können Translokationen entstehen, bei denen sich die abgetrennten Chromosomenteile am jeweils anderen Chromosom anlagern und so die genetisch gekoppelten Gene räumlich voneinander getrennt und damit entkoppelt werden.

In Pflanzen wurde diese Technik bereits mehrfach angewendet, um neuartige chromosomale Umstrukturierungen zu erzeugen. Die erste gerichtete chromosomale Translokation in Pflanzen wurde 2020 erzeugt (Beying et al., 2020). Kurz darauf konnte zum ersten Mal eine natürlicherweise vor ca. 5.000 Jahren entstandene Inversion in Arabidopsis mittels Chromosome-Engineering umgekehrt und für genetische Austausch wieder zugänglich gemacht werden (Schmidt et al., 2020). Gezielte Inversionen wurden auch schon in Mais (Schwartz et al., 2020) und Reis erreicht (Lu et al., 2021). Die Technik kann aber auch verwendet werden, um große chromosomale Inversionen künstlich ins Pflanzengenom einzubringen. Hierbei wurde fast das gesamte Chromosom 2 von Arabidopsis invertiert, wobei ein Chromosomenabschnitt von etwa 17 Millionen Basen fast vollständig dem genetischen Austausch entzogen werden konnte (Rönspies et al., 2022a). Somit ist es nun möglich, durch Chromosome-Engineering die Vererbung in Pflanzen auf verschiedene Weisen zu beeinflussen.

Abbildung 3: Reparatur von DSB



DSB können entweder mittels des NHEJ-Reparaturwegs oder via HR repariert werden. Die Positionen der CRISPR/Cas-vermittelten Strangbrüche sind mit roten Dreiecken dargestellt. Links: Im Laufe der Reparatur mittels NHEJ wird entweder die originale DNA-Sequenz wiederhergestellt oder es entstehen kleinere Veränderungen (Verlust oder Einfügen weniger Basen; siehe gelbe Box). Rechts: Für die DSB-Reparatur mittels HR wird eine homologe Reparaturvorlage benötigt. Um eine Genveränderung (pink) mithilfe der HR an einer vorher festgelegten Position in das Pflanzengenom einzubringen, muss die gewünschte Modifikation an beiden Seiten von DNA-Sequenzen flankiert sein, die identisch zu der genomischen DNA-Sequenz sind, in die die Modifikation integriert werden soll (grün). Die homologen DNA-Sequenzen können dann gegeneinander ausgetauscht werden.

2.5 Risiken und Limitierungen

Ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Genomeditierung ist die Transformierbarkeit und Regenerierbarkeit der entsprechenden Pflanzenart. Hier kann es gerade bei einzelnen Kultursorten der gleichen Pflanzenspezies zu großen Unterschieden kommen.

Unabhängig davon, welche Pflanzenart genetisch modifiziert werden soll, ist es weiterhin wichtig, dass die jeweiligen Zielsequenzen mit hoher Effizienz durch die Cas-Nuklease geschnitten werden. Größere chromosomale Umstrukturierungen, wie Inversionen und Translokationen, können oft nur mit geringer Effizienz von unter 1% induziert werden (Rönspies et al., 2022b). Die Effizienz, mit der die jeweiligen Zielsequenzen durch die Cas-Nuklease geschnitten werden, sollte daher vor Beginn des eigentlichen Experiments in einem Vorversuch ermittelt werden.

Auch die Wahl einer effizient schneidenden Cas-Nuklease spielt für die jeweilige Anwendung eine wichtige Rolle. Inzwischen wird das Cas12a-System aus *Lachnospiraceae bacterium* häufig für die Genomeditierung verwendet, nachdem das Enzym für die Verwendung in Pflanzen optimiert wurde (Schindele/Puchta, 2020: 1118 ff.; Schindele et al., 2023). Bei CRISPR/Cas-vermittelten Experimenten können Off-Targets auftreten. Dabei werden der Zielsequenz ähnliche DNA-Abschnitte im Genom ebenfalls geschnitten. Dies kann unerwünschte zusätzliche Mutationen oder chromosomale Umstrukturierungen verursachen. Der Grund für das Auftreten von Off-Target-Effekten ist, dass Cas-Nukleasen auch nicht perfekt zur „guide RNA“ passende Sequenzen als Ziel akzeptieren können, abhängig davon, an welcher Stelle der „guide RNA“/DNA-Paarung diese Abweichungen auftreten und wie viele Abweichungen vorhanden sind. Um die Wahrscheinlichkeit von Off-Target-Effekten

sehr gering zu halten, können mithilfe computerbasierter Methoden die Zielsequenzen so gewählt werden, dass eine Bindung von ähnlichen Sequenzen durch die Cas-Nuklease unwahrscheinlich ist (Schindele et al., 2020). Generell treten mit hoher Wahrscheinlichkeit deutlich weniger Off-Targets als z. B. unerwünschte strahlungsinduzierte Mutationen auf und diese lassen sich mithilfe moderner Sequenzierungstechniken zuverlässig identifizieren, woraufhin sie, ebenso wie durch klassische Mutagenese entstandene unerwünschte Mutationen, durch Rückkreuzungen wieder eliminiert werden können.

2.6 Fazit

Da konventionelle Züchtungsmethoden nur begrenzt die Ernteerträge auf den bestehenden Ackerflächen werden weiter erhöhen können, haben neue Ansätze wie die Genomeditierung großes Potenzial, angesichts des Klimawandels und einer stetig wachsenden Erdbevölkerung die Nahrungsmittelversorgung weiterhin gewährleisten zu können. Insbesondere das CRISPR/Cas-System hat sich als ein effizientes Werkzeug etabliert, mit dem das Genom von Nutzpflanzen zielgenau und schnell verändert werden kann. Hierbei können sowohl kleine Modifikationen von wenigen Basenpaaren eingeführt werden als auch Gene sowie deren Position und Reihenfolge verändert werden. Hierdurch können neue Gen-Kopplungsgruppen gebildet oder bestehende aufgelöst werden, um die Vererbung von Genen zu steuern. Außerdem kann durch Einführung von großen chromosomalen Umstrukturierungen mittels Chromosome-Engineering der genetische Austausch beeinflusst werden.

2.7 Literaturverzeichnis

- Anzalone, A. V. et al. (2019):** Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. In: *Nature* 576(7785): 149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- Beying, N. et al. (2020):** CRISPR–Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in Arabidopsis. In: *Nature Plants* 6(6): 638–645. DOI: 10.1038/s41477-020-0663-x.
- Boch, J. et al. (2009):** Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-Type III effectors. In: *Science* 326(5959): 1509–1512. DOI: 10.1126/science.1178811.
- Breseghele, F./Coelho, A. S. G. (2013):** Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(35): 8277–8286. DOI: 10.1021/jf305531j.
- Che, P. et al. (2022):** Wuschel2 enables highly efficient CRISPR/Cas-targeted genome editing during rapid de novo shoot regeneration in sorghum. In: *Communications Biology* 5(1): 344. DOI: 10.1038/s42003-022-03308-w.
- Gasiunas, G. et al. (2012):** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(39): E2579–E2586. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.
- Grützner, R. et al. (2021):** High-efficiency genome editing in plants mediated by a Cas9 gene containing multiple introns. In: *Technology and Applications in Plants* 2(2): 100135. DOI: 10.1016/j.xplc.2020.100135.
- Fehse, B. et al. (Hrsg.) (2022):** Im Fokus: RNA. Eine aktuelle Bestandsaufnahme der Arbeitsgruppe Gentechnologiebericht. DOI: 10.17169/refubium-36831.
- Jinek, M. et al. (2012):** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science* 337(6096): 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Kim, Y. G. et al. (1996):** Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(3): 1156–1160. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1156.
- Komor, A. C. et al. (2016):** Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. In: *Nature* 533(7603): 420–424. DOI: 10.1038/nature17946.
- Lan, Y. et al. (2023):** Food security and land use under sustainable development goals: Insights from food supply to demand side and limited arable land in China. In: *Foods* 12(22): 4168. DOI: 10.3390/foods12224168.

- Lu, Y. et al. (2021):** A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice. In: *Nature Plants* 7(11): 1445–1452. DOI: 10.1038/s41477-021-01019-4.
- Malzahn, A. A. et al. (2019):** Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis. In: *BMC Biology* 17(1): 9. DOI: 10.1186/s12915-019-0629-5.
- Porto, E. M. et al. (2020):** Base editing: Advances and therapeutic opportunities. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 19(12): 839–859. DOI: 10.1038/s41573-020-0084-6.
- Puchta, H. (2005):** The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. In: *Journal of Experimental Botany* 56(409): 1–14. DOI: 10.1093/jxb/eri025.
- Puchta, H. et al. (1993):** Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. In: *Nucleic Acids Research* 21(22): 5034–5040. DOI: 10.1093/nar/21.22.5034.
- Puchta, H. et al. (1996):** Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(10): 5055–5060. DOI: 10.1073/pnas.93.10.5055.
- Rezaei, E. E. et al. (2023):** Climate change impacts on crop yields. In: *Nature Reviews Earth & Environment* 4(12): 831–846. DOI: 10.1038/s43017-023-00491-0.
- Rönspies, M. et al. (2021):** CRISPR-Cas-mediated chromosome engineering for crop improvement and synthetic biology. In: *Nature Plants* 7(5): 566–573. DOI: 10.1038/s41477-021-00910-4.
- Rönspies, M. et al. (2022a):** Massive crossover suppression by CRISPR-Cas-mediated plant chromosome engineering. In: *Nature Plants* 8(10): 1153–1159. DOI: 10.1038/s41477-022-01238-3.
- Rönspies, M. et al. (2022b):** CRISPR-Cas9-mediated chromosome engineering in Arabidopsis thaliana. In: *Nature Protocols* 17(5): 1332–1358. DOI: 10.1038/s41596-022-00686-7.
- Rouet, P. et al. (1994):** Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(13): 6064–6068. DOI: 10.1073/pnas.91.13.6064.
- Sauer, N. J. et al. (2016):** Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. In: *Plant Physiology* 170(4): 1917–1928. DOI: 10.1104/pp.15.01696.
- Schindele, P./Puchta, H. (2020):** Engineering CRISPR/LbCas12a for highly efficient, temperature-tolerant plant gene editing. In: *Plant Biotechnology Journal* 18(5): 1118–1120. DOI: 10.1111/pbi.13275.
- Schindele, P. et al. (2020):** CRISPR guide RNA design guidelines for efficient genome editing. In: *Methods in Molecular Biology* 2166: 331–342. DOI: 10.1007/978-1-0716-0712-1_19.
- Schindele, P. et al. (2023):** Enhancing gene editing and gene targeting efficiencies in Arabidopsis thaliana by using an intron-containing version of ttLbCas12a. In: *Plant Biotechnology Journal* 21(3): 457–459. DOI: 10.1111/pbi.13964.
- Schmidt, C. et al. (2020):** Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. In: *Nature Communications* 11(1): 4418. DOI: 10.1038/s41467-020-18277-z.
- Schwartz, C. et al. (2020):** CRISPR-Cas9-mediated 75.5-Mb inversion in maize. In: *Nature Plants* 6(12): 1427–1431. DOI: 10.1038/s41477-020-00817-6.
- Shi, J. et al. (2017):** ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. In: *Plant Biotechnology Journal* 15(2): 207–216. DOI: 10.1111/pbi.12603.
- United Nations [Department of Economic and Social Affairs, Population Division] (2022):** World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3. Unter: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org/development/desa/pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf [10.07.2024].
- Urnov, F. D. et al. (2010):** Genome editing with engineered zinc finger nucleases. In: *Nature Reviews Genetics* 11(9): 636–646. DOI: 10.1038/nrg2842.
- van Dijk, M. et al. (2021):** A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. In: *Nature Food* 2(7): 494–501. DOI: 10.1038/s43016-021-00322-9.
- Vats, S. et al. (2024):** Prime editing in plants: Prospects and challenges. In: *Journal of Experimental Botany*: erae053. DOI: 10.1093/jxb/erae053.
- Xing, S. et al. (2020):** Fine-tuning sugar content in strawberry. In: *Genome Biology* 21(1): 230. DOI: 10.1186/s13059-020-02146-5.
- Zhang, C. et al. (2022):** Virus-induced gene editing and its applications in plants. In: *International Journal of Molecular Sciences* 23(18): 10202. DOI: 10.3390/ijms231810202.
- Zhang, R. et al. (2019):** Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. In: *Nature Plants* 5(5): 480–485. DOI: 10.1038/s41477-019-0405-0.
- Zsögön, A. et al. (2018):** De novo domestication of wild tomato using genome editing. In: *Nature Biotechnology* 36(12): 1211–1216. DOI: 10.1038/nbt.4272.