

Genom-Editierung in Bäumen

Durch neueste Techniken der Genom-Editierung können Pflanzen zielgerichtet verändert und reproduziert werden, die von Nachkommen aus der Kreuzungszüchtung nicht zu unterscheiden sind. Der Forschungsschwerpunkt für diese neuen Methoden liegt bislang auf Kulturpflanzen zur Nahrungsmittelproduktion. Im Thünen-Institut für Forstgenetik in Großhansdorf wird allerdings daran gearbeitet, die Genom-Editierung auf Baumarten zu übertragen und damit die Techniken von morgen auch für die Forstpflanzenzüchtung zu etablieren.

Tobias Brüggemann, Matthias Fladung

In Zeiten des fortschreitenden Klimawandels steht auch die Forstpflanzenzüchtung vor drängenden Herausforderungen. Viele einheimische Baumarten geraten durch Wetterextreme mit hohen Temperaturen und ausgedehnten regenarmen Perioden in große Schwierigkeiten. Zudem siedeln sich neuartige Schadorganismen (Insekten, Pilze, Bakterien) in Mitteleuropa an, die unsere einheimischen Baumarten in ihrer Existenz bedrohen. Allerdings ist die Resistenzzüchtung aufgrund der langen Generationszeiten von Bäumen in ihren Möglichkeiten begrenzt, schnell auf die durch den Klimawandel verursachten Gefahren zu reagieren. Gleichzeitig ist der Fortschritt im Bereich der DNA-Entschlüsselung (Sequenzierung) von tierischem und pflanzlichem Erbgut (Genom) rasant. Obwohl die Sequenzierung von Bäumen aufgrund der großen, komplexen Genome besondere Schwierigkeiten birgt, sind mittlerweile zahlreiche Baumgenome entschlüsselt. Unter Baumarten mit wirtschaftlichem Interesse in Europa sind hier zu nennen: *Populus trichocarpa* (Westliche Balsampappel; entschlüsselt 2006 [1]), *Malus domestica* „Golden Delicious“ (Kulturapfel; 2010 [2]), *Eucalyptus grandis* (2011 [3]), *Picea abies* (Gemeine Fichte; 2013 [4]), *Picea glauca* (Weißfichte; 2013 [5]), *Pinus taeda* (Weihrauchkiefer; 2014 [6]) und *Betula pendula* (Hängebirke; 2017 [7]). Die Verfügbarkeit der genomischen DNA-Sequenz ist die unverzichtbare Grundlage für die Methoden der Genom-Editierung in Bäumen.

Genscheren arbeiten zielgenau

Eine Genom-Editierung ist die zielgerichtete Veränderung genetischer Informationen mithilfe sogenannter Genscheren.

Die bekannteste Genscheren heißt „Cas9“ und findet Anwendung in der Technik „CRISPR/Cas9“. „CRISPR“ steht für „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“, ein in Bakterien vorkommendes Immunsystem zum Schutz vor Viren. Die „Cas9“ ist eine Endonuklease, also ein Enzym, das DNA zerschneiden kann. Sie wird mithilfe eines RNA-Moleküls, der sogenannten „Guide-RNA“, an eine gewünschte Stelle im Genom geleitet. Dort schneidet die Endonuklease aber nicht wahllos, sondern an einer vorher genau definierten Stelle. Die Guide-RNA dient hierbei als Schablone. Nachdem die DNA geschnitten wurde, wird das natürliche Reparaturprogramm der Zelle angeschaltet mit dem Ziel, die zerschnittene DNA wieder zusammenzufügen. Hierbei können aber Fehler passieren: An der Schnittstelle werden entweder einzelne DNA-Bausteine (Nucleotide) zusätzlich eingebaut oder es gehen welche verloren. Diese Fehler in der DNA-Sequenz werden als Mutationen bezeichnet. Lotst die Guide-RNA die Endonuklease Cas9 zu einer DNA-Region, die ein Gen verschlüsselt (kodiert), und wird diese Region geschnitten und anschließend fehlerhaft repariert, mutiert das Gen. Je nach Mutation kann das Gen daraufhin seine Funktion verlieren: Ein „Gen-Knockout“ ist entstanden.

Neben Genen, die direkt für die Ausprägung bestimmter Merkmale verantwortlich sind, bieten Gene, die an der Kontrolle von Zellprozessen (Transkriptionsfaktoren) beteiligt sind, weitere interessante Möglichkeiten der Anwendung der Genom-Editierung. Transkriptionsfaktoren regulieren die Aktivität von Genen und bestimmen so, wann, wie stark und in welchem Gewebe sie zur Ausprägung gelangen. Wenn Mutationen in Transkriptionsfaktoren platziert wer-

Schneller Überblick

- Genscheren wie CRISPR/Cas9 funktionieren auch in Bäumen
- Die Genscheren fügen zielgerichtet Mutationen ein, die Gene in ihrer Ausprägung stilllegen oder stärken
- Genomeditierte Pflanzen sind nicht von Pflanzen aus der Kreuzungszüchtung zu unterscheiden

den, die die Ausprägung von bestimmten kodierenden Genen hemmen, wirkt auch diese Herunterregulation nicht mehr. Die kodierenden Gene können dadurch im Gegensatz zu ausgeschalteten Genen zu einer stärkeren Ausprägung gebracht werden.

Die Genom-Editierung unterscheidet sich grundlegend von allen bisher angewendeten, konventionellen Methoden, die eine Hemmung der Genausprägung zum Ziel haben. Gene kommen zur Ausprägung, indem die genomische DNA in eine RNA übersetzt wird und die RNA schließlich in eine Aminosäurekette, die dann zu einem Protein gefaltet wird. Transgene Ansätze waren dafür konzipiert die RNA abzufangen, bevor sie zu einem Protein übersetzt werden kann. Die Genom-Editierung setzt hingegen direkt an der DNA an.

Eine DNA-Veränderung rufen auch die Methoden der Mutagenese hervor, bei denen mit Chemikalien oder nach UV- oder Röntgenbestrahlung zufällige Mutationen in Pflanzenzellen entstehen. Es ist dabei nicht möglich, Veränderungen in der DNA zielgerichtet vorzunehmen. Das CRISPR/Cas9-System ermöglicht es zum ersten Mal, gewünschte Gene gezielt anzusteuern und ein- oder auszuschalten [8].

Gen-Name	SOCI	SOCI-Paralog 1	SOCI-Paralog 2	AGL8.1	AGL8.2
Unveränderte Linie	CCACAGATG-CGCTGG CCACAGATG-CGCTGG	ATCTTCCTT-CACAGG ATCTTCCTT-CACAGG	ATCTTCCTTCACAGG ATCTTCCTTCACAGG	TGAGTTCAA-GGGCGG TGAGTTCAA-GGGCGG	TGTGTTAA-GGGCGG TGTGTTAA-GGGCGG
Editierte Linie A	CCACAGATGCGCTGG CCACAGATGCGCTGG	ATCTTCCTTCACAGG ATCTTCCTT-CACAGG	ATCTTCCTTCACAGG ATCTTCCTTCACAGG	TGAGTTCAAAGGGCGG TGAGTTCAAAGGGCGG	TGTGTTAA-CGG TGTGTTAA-GGGCGG
Editierte Linie B	CCACAGATGCGCTGG CCACAGATGCGCTGG	ATCTTCCTTCACAGG ATCTTCCTT-CACAGG	ATCTTCCTTCACAGG ATCTTCCTTCACAGG	TGAGTTCAAAGGGCGG TGAGTTCAAAGGGCGG	TGTGTTAAAGGGCGG TGTGTGTA-GGACGG

Quelle: T. Brüggemann

Abb. 1: Editierte Genregionen in den fünf Zielgenen aus der Blühzeitpunkt-Regulation. Die Cas9-Nuklease setzt drei Nukleotide vor einer Signalsequenz („PAM-Sequenz“, türkis) einen Schnitt in die DNA. Durch fehlerhafte Reparatur entstanden vor allem hier Mutationen, aber auch im näheren Umfeld der Schnittstelle. Abgebildet sind jeweils zwei zusammengehörige Sequenzen der zwei diploiden Allele, wovon eins von jedem Elternteil stammt. Die editierten Bereiche sind rot markiert. Kasten 1: An der Schnittstelle können einzelne Nukleotide eingefügt werden, entweder die gleichen in beiden Allelen (homozygote Insertion, oben) oder zwei unterschiedliche (heterozygote Insertion, unten). Kasten 2: Monoallelische Mutationen treten auf, wenn nur ein Allel editiert wurde und das andere Allel unverändert bleibt. Kasten 3: Auch größere Sequenzabschnitte können gelöscht (Deletion), aber auch eingefügt werden.

Aus dem Immunsystem von Bakterien

Die CRISPR/Cas9-Technik basiert auf Erkenntnissen aus den 1980er-Jahren. 1987 wurde der zugrunde liegende Mechanismus in Bakterien entdeckt, wobei seine Funktion damals noch unbekannt war. Erst mit der Entdeckung der Cas9-Nuklease im Jahr 2005 wurde das CRISPR/Cas9-System mit der Immunabwehr von Bakterien gegen Viren in Verbindung gebracht. Schließlich gelang 2012 Wissenschaftlern in den USA der Durchbruch, indem sie das System umprogrammierten und auch in pflanzlichen und tierischen Zellen zur Anwendung bringen konnten. Seitdem wurde das CRISPR/Cas9-System immer weiter verfeinert und steht heute, nur wenige Jahre später, für die Genom-Editierung in vielen Organismen aus dem Pflanzen- und Tierreich für eine praxisreife Anwendung zur Verfügung.

Als weitere Methoden der Genom-Editierung sind Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese, Zinkfinger-Nukleasen und TALEN zu nennen [9]. Bei Zinkfinger-Nukleasen und TALEN handelt es sich, wie bei Cas9, um Endonukleasen, die an einer festgelegten Stelle des Erbguts einen DNA-Schnitt einfügen [10]. Auch hierbei kommt es durch fehlerhafte Reparaturen der Schnittstellen zu Mutationen.

Genom-Editierung in Bäumen seit 2015

Im Jahr 2015 wurden die ersten Publikationen zur Genom-Editierung in Bäumen

veröffentlicht. Hierfür wurde mit hoher Effizienz ein Gen (Phytoen-Desaturase PDS) gezielt ausgeschaltet, was in der Folge zu weißen Pflanzen (Albinos) führt [10]. In Deutschland wurden die ersten CRISPR/Cas9-Versuche an Bäumen 2016 am Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf, durchgeführt. Als Modellorganismus diente hierfür die molekularbiologisch gut erforschte Hybridpappel *Populus x canescens* (Graupappel). Im ersten Ansatz sollten hier zeitgleich fünf Gene ausgeschaltet werden, deren Funktionen in der Blühzeitpunkt-Regulation gut bekannt sind. Im Rahmen einer Doktorarbeit wurde aber ihre Bedeutung für die Biomassebildung in Pappeln erforscht. Die gesteigerte Ausprägung dieser Gene führte zu einem deutlich verminderten Pflanzenwachstum [11]. Über Genom-Editierung sollten gezielt Mutationen in die fünf ausgewählten Gene eingefügt

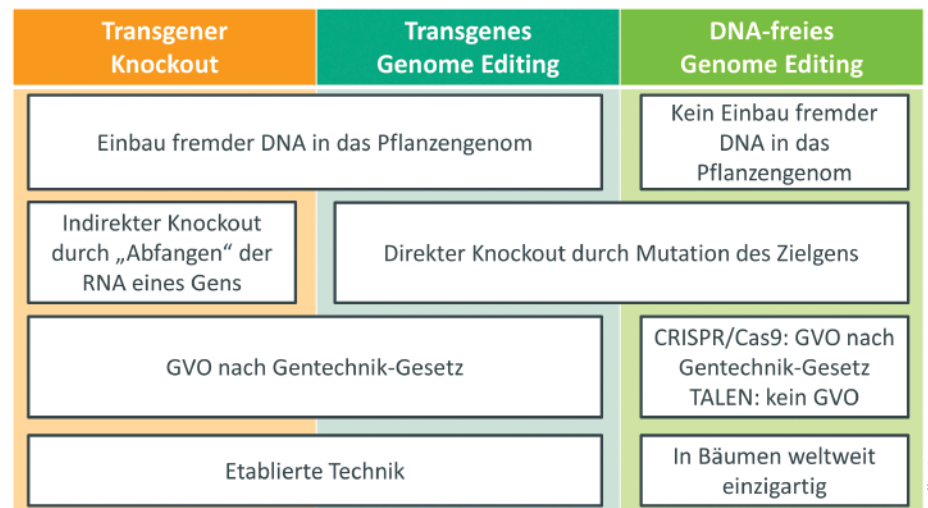
werden, sodass sie ihre Funktion verlieren. Das Ziel war, dadurch eine gesteigerte Holzbildung zu erreichen. Tatsächlich gelang es in diesem ersten Ansatz, vier der fünf Gene gleichzeitig zu editieren (Abb. 1). Die abschließende Auswertung der Wachstumsparameter steht noch aus.

Für einen zweiten Ansatz wurden vier Gene ausgewählt, deren Proteine als Rezeptoren auf der Zelloberfläche fungieren, mit denen der Kontakt zu Pilzen von der Pflanze erkannt wird. Ihre Bedeutung wird in der Interaktion zwischen der Pappel und Pilzen vermutet. Das ist von Interesse, da Mykorrhiza-Pilze förderlich für das Baumwachstum sind, während Pilze der Gattung *Melampsora* den Pappelrost auslösen, der erhebliche Schadbilder zur Folge haben kann.

Genom-Editierung ohne DNA

Ein neues, innovatives Projekt, das zurzeit am Thünen-Institut für Forstgenetik in Großhansdorf bearbeitet wird, verfolgt ein in Bäumen weltweit einzigartiges Ziel: die Genom-Editierung ohne Einführung von „Fremd-DNA“. In der Praxis wurden bisher für die Ausprägung der Endonuklease Cas9 das hierfür kodierende Gen sowie die Sequenz für die Guide-RNA in das Pflanzengenom eingebaut. Daraufhin produzierte die Pflanzenzelle von sich aus das Cas9-Enzym sowie die Guide-RNA als Schneideschablone. Hierbei handelt es sich um klassisch transgene Pflanzen, da fremde DNA-Abschnitte verwendet wurden (Abb. 2).

In dem neuen Projekt „aProPop“ wird die Endonuklease, beladen mit der Guide-RNA, als intaktes und funktionsfähiges



Quelle: T. Brüggemann

Abb. 2: Biotechnologische Methoden im Vergleich

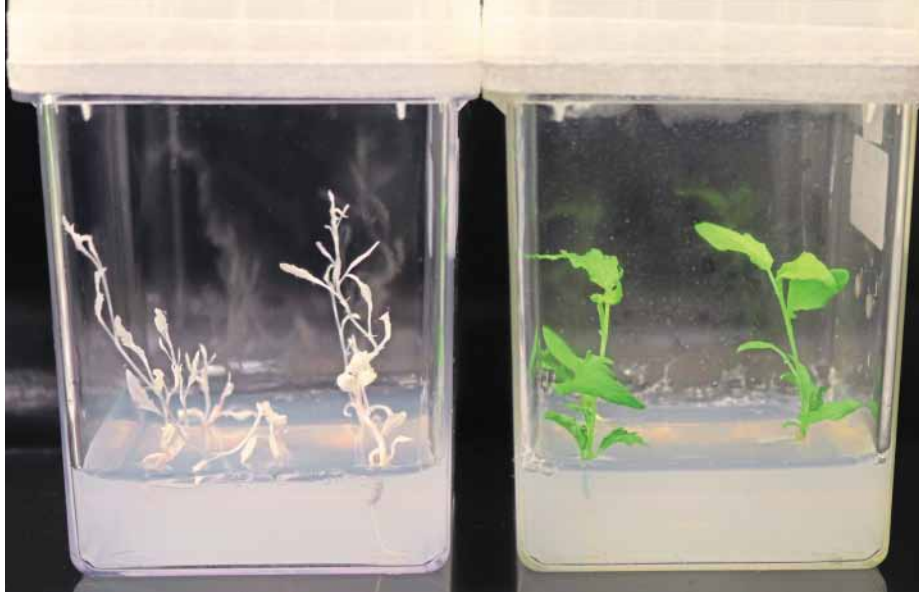


Foto: T. Brüggemann

Abb. 3: Genomeditierte Pappeln, in denen das Gen PDS ausgeschaltet ist, produzieren kein Chlorophyll und sind daher weißbleibende Albinos (links). Nicht-editierte Pappeln entwickeln sich im gleichen Zeitraum (zwei Monate) in der Gewebekultur zu kleinen, grün gefärbten Pflanzen (rechts).

Protein in die Pflanzenzellen übertragen. Die Integration fremder Erbinformation in die DNA der Pflanze wird damit ausgeschlossen. Durch den DNA-Schnitt der Endonuklease soll das Zielgen in seiner Sequenz verändert werden. Kurze Zeit später wird die Endonuklease und die Guide-RNA von zelleigenen Mechanismen restlos abgebaut. Am Ende werden genomeditierte Zellen erhalten, die al-

Literaturhinweise:

[1] TUSKAN, GA.; DIFAZIO, S.; JANSSON, S. et al. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313(5793):1596–1604. doi: 10.1126/science.1128691. [2] VELASCO, R.; ZHARKIKH, A.; AFFOURTIT, J. et al. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42(10):833. doi: 10.1038/ng.654. [3] MYBURG, AA.; GRATTAAPAGLIA, D.; TUSKAN, GA. et al. (2014): The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510(7505):356. doi: 10.1038/nature13308. [4] NYSTEDT, B.; STREET, NR.; WETTERBOM, A. et al. (2013): The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497(7451):579. doi: 10.1038/nature12211. [5] BIROL, I.; RAYMOND, A.; JACKMAN, SD et al. (2013): Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. *Bioinformatics* 29(12): 1492–1497. doi: 10.1093/bioinformatics/btt178. [6] ZIMIN, A.; STEVENS, KA; CREPEAU, MW et al. (2014): Sequencing and Assembly of the 22-Gb Loblolly Pine Genome. *Genetics* 196(3):875–890. doi: 10.1534/genetics.113.159715. [7] SALOJÄRVI, J.; SMOLANDER, O-P; NIEMINEN, K. et al. (2017) Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch. *Nature Genetics* 49(6): 904. doi: 10.1038/ng.3862. [8] TRAVIS, J. (2015): Making the cut. *Science* 350(6267): 1456–1457. doi: 10.1126/science.350.6267.1456. [9] FLADUNG, M. (2016): Neue Methoden der Pflanzenzüchtung: Biotechnologie 3.0. *AFZ-DerWald* 23/2016, S. 54–58. [10] GAJ, T.; GERSBACH, CA.; BARBAS, CF. (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* 31(7):397–405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004. [11] BRÜGMANN, T. (2017): Genetische Modifikation von SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1), FRUITFULL (FUL) und weiterer Kandidatengene in Pappelhybriden (*Populus spec.*). Dissertation, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg. [12] FAN, D.; LIU, T.; LI, C.; JIAO, B.; LI, S.; HOU, Y.; LUO, K. (2015): Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation. *Sci Rep* 5:12217. doi: 10.1038/srep12217. [13] FLADUNG, M. (2011): Genetisch veränderte Bäume für eine nachhaltige, umweltverträgliche und ressourcenschonende Produktion von Holz für die Energiegewinnung. *Gesunde Pflanzen* 63(3):101–110. doi: 10.1007/s10343-011-0253-y.

berdings nicht im herkömmlichen Sinne transgen sind, da sie keine Fremd-DNA (Transgene) enthalten. Die hieraus regenerierten, genomeditierten Pflanzen sind nicht mehr von Pflanzen zu unterscheiden, die natürlicherweise mutiert oder durch Kreuzungszüchtung entstanden sind. Dieses Forschungsprojekt, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung, hat im Sommer 2018 begonnen und läuft zwei Jahre. Als Zielgen wurde die gleiche wie in [12] beschriebene Phytoen-Desaturase ausgewählt, die an der Bildung des grünen Blattfarbstoffs Chlorophyll beteiligt ist. Genomeditierte Pflanzen lassen sich besonders einfach erkennen: Sie sind Albinos (Abb. 3). Nach Etablierung der Methode lässt sich die Guide-RNA einfach gegen eine andere Schneideschablone austauschen, sodass auch andere Gene als Zielgene editiert werden können.

Folgerungen

Nach der anfänglichen Entwicklung der Genom-Editierung für Kulturpflanzen mit kürzeren Generationszeiten wurde gezeigt, dass CRISPR/Cas9 auch in Pappeln funktioniert. In Kombination mit Fortschritten in Sequenzierungstechniken für Baum-Genome bieten die Methoden zur Genom-Editierung große Potenziale für die Forstpflanzenzüchtung, insbesondere im Hinblick auf die drängenden Herausforderungen des Klimawandels. Die praktische Anwendung genomeditierter Bäume wird von den juristischen Aspekten abhängen, deren Klärung ansteht. Im Urteil des Europäischen Ge-

richtshofs (EuGH) vom 25. Juli 2018 wurde die Genom-Editierung unter die gleichen Richtlinien wie konventionelle gentechnische Verfahren gestellt. Momentan steht dies aber nicht im Einklang mit dem gültigen deutschen Gentechnikgesetz (GenTG). Obwohl die Endprodukte der Genom-Editierung von Pflanzen aus konventionellen Mutageneseverfahren (z. B. radioaktive Bestrahlung) oder der Kreuzungszüchtung nicht zu unterscheiden sind, handelt es sich um gentechnische Organismen, weil eine Nukleinsäure in die Pflanzenzelle eingebracht wurde. Methoden wie TALEN, bei denen nur ein Protein zur Genom-Editierung in Pflanzenzellen eingeschleust wird, sind derzeit von den Regelungen des GenTG nicht abgedeckt. Obwohl die juristischen Fragen derzeit nicht abschließend geklärt sind, können Forstpflanzenzüchtung und Genom-Editierung dennoch Hand in Hand arbeiten. Die molekularbiologische Pflanzenforschung kann durch Funktionsanalysen und Modellversuche Kandidatengene für gezielte Kreuzungszüchtung bereitstellen und damit das Züchtungsziel schneller erreichen.

Mögliche Anwendungsfelder sind zahlreich vorhanden: Das Eschentriebsterben zeigt eindrucksvoll, dass Schadorganismen den Bestand ganzer Baumarten gefährden können. Eine genetisch induzierte Toleranz gegen den Erreger würde die Esche vor dem Aussterben bewahren. Kommerzielles Potenzial bieten genomeditierte Pappeln und Weiden mit erhöhtem Ertrag, die für Kurzumtriebsplantagen zur Produktion von nachwachsenden Rohstoffen genutzt werden könnten. Ferner können Pappeln mit der nötigen „genetischen Ausstattung“ verwendet werden, um Schadstoffe aus kontaminierten Böden herauszulösen [13].

Dr. T. Brüggemann,
tobias.brueggemann@thuenen.de,
forscht als wissenschaftlicher
Mitarbeiter am Thünen-Institut für
Forstgenetik im Bereich Genom-
Editierung in Bäumen. PD Dr. Mat-
thias Fladung ist stellvertretender
Institutsleiter des Instituts.

