

Gezielte Modifikation pflanzlicher Erbinformation mittels Designer-Endonukleasen

Jochen Kumlehn

Plant Reproductive Biology

Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)
Gatersleben



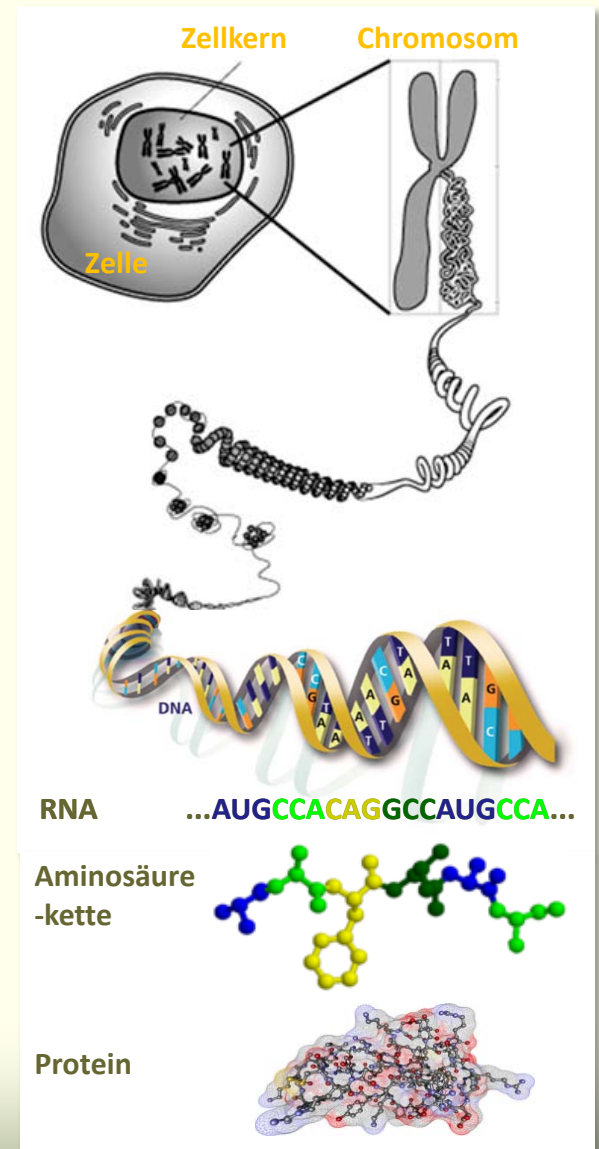
Was ist ein Gen und wie funktioniert es?

Chromosomen sind Träger der Erbinformation

- in jeder einzelnen Zelle vorhanden
- DNA \Rightarrow Schrift mit 4 verschiedenen Buchstaben
- ein höheres Lebewesen hat z.B. ca. 30 tausend Gene

Produkte der Gene sind Proteine

- Strukturproteine (Muskeln, Nerven etc.)
- Enzymproteine (Katalysatoren für biochemische Prozesse)



Natürliche genetische Veränderungen

Vier grundlegende Prinzipien

- Rekombination mütterlicher und väterlicher Erbinformation in den Nachkommen
- kleine Fehler beim Kopieren der DNA (Zellteilung)
- kleine Deletionen und Insertionen bei zellulären DNA-Reparaturen
- Chromosomenteile, ganze Chromosomen und Chromosomensätze

Der Austausch von Erbinformationen findet auf folgenden Ebenen statt

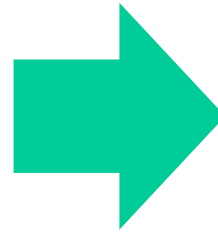
- innerhalb der gleichen Art
- zwischen verwandten Arten
- zwischen nicht verwandten Organismen

Diese Vorgänge

- erfolgen zufällig (bzgl. der Stelle im Genom und der sich ergebenden DNA-Sequenz)
- sind nicht vorhersagbar und nicht rückholbar
- essentielle Grundlage von Evolution, Domestikation und konventioneller Pflanzenzüchtung

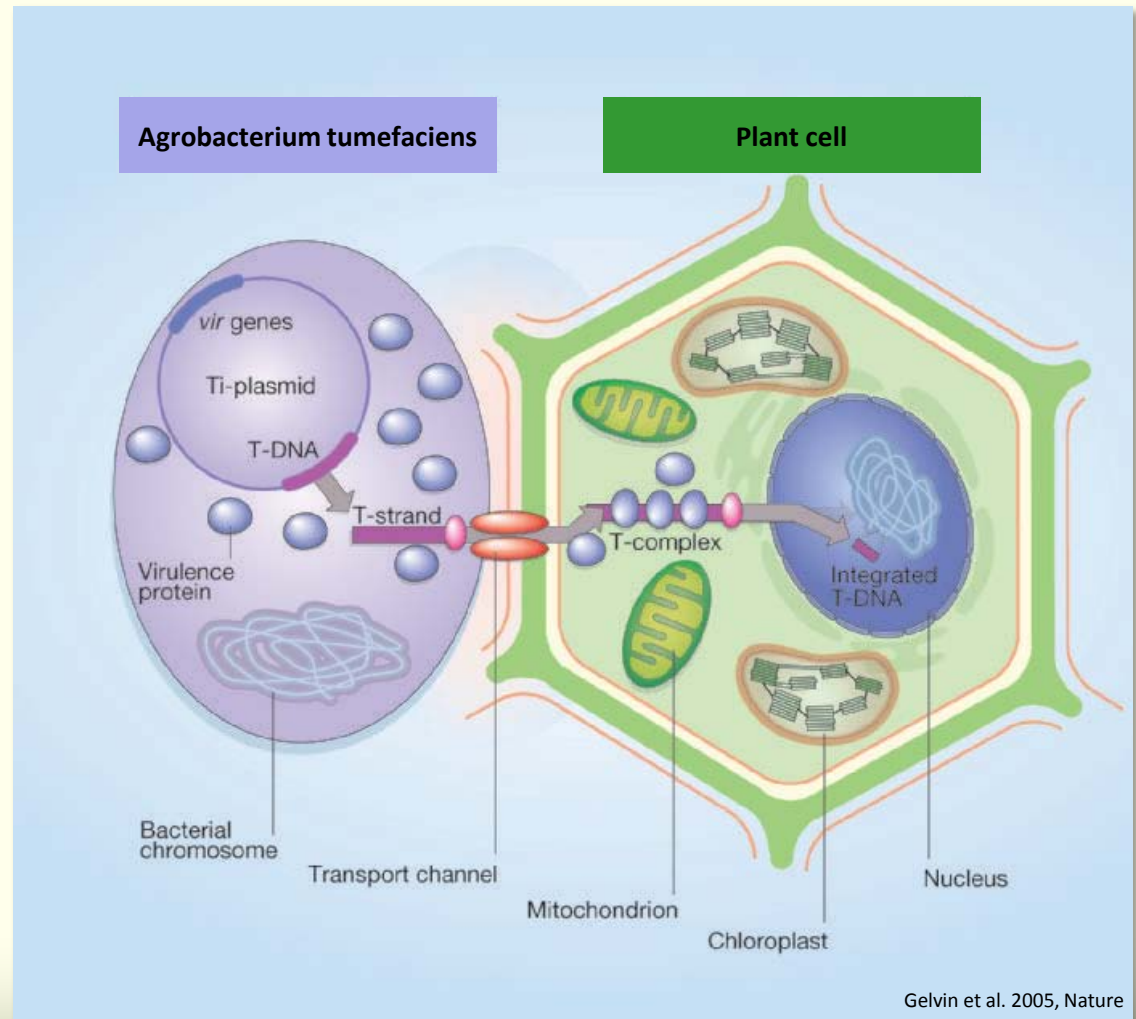
Domestikation von Kulturpflanzen und Pflanzenzüchtung

- **beruht auf drastischen genetischen Veränderungen**



Agrobakterien-vermittelte Transformation

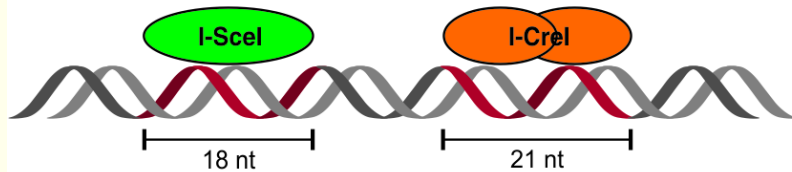
- die Genübertragung durch Agrobakterien in Pflanzenzellen ist ein natürlicher Prozess
- anstelle der bakteriellen Gene können beliebige Gene der Wahl übertragen werden
- aus einer gentechnisch veränderten Zelle wird eine ganze Pflanze regeneriert



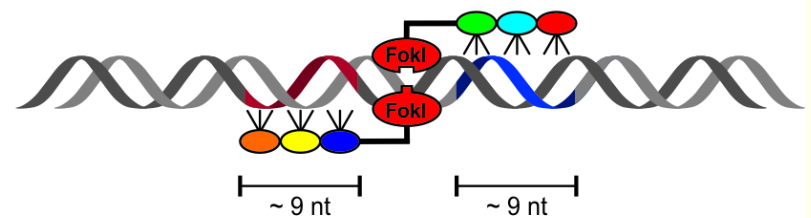
Zielsequenz-spezifische Mutagenese mittels Designer-Endonukleasen

(Genome engineering)

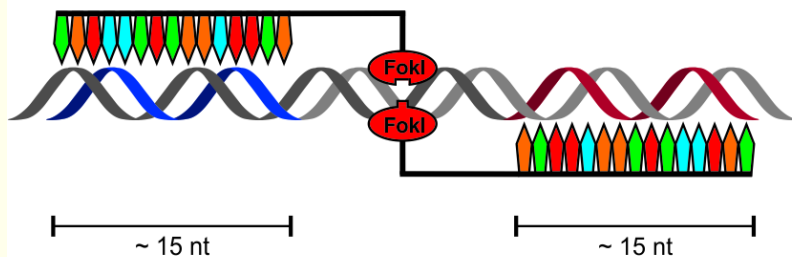
Meganucleases



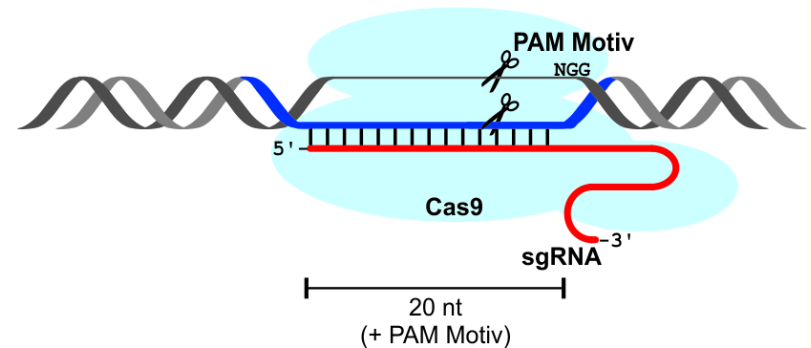
ZFNs



TALENs



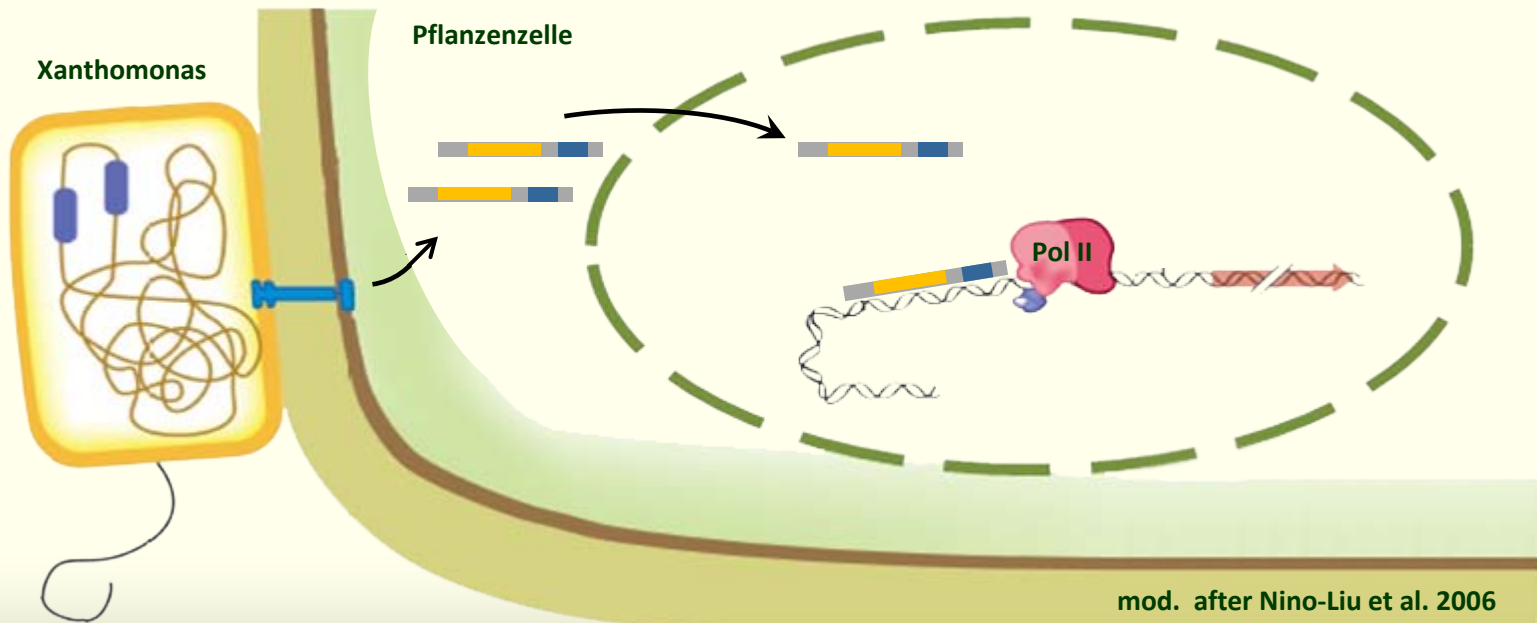
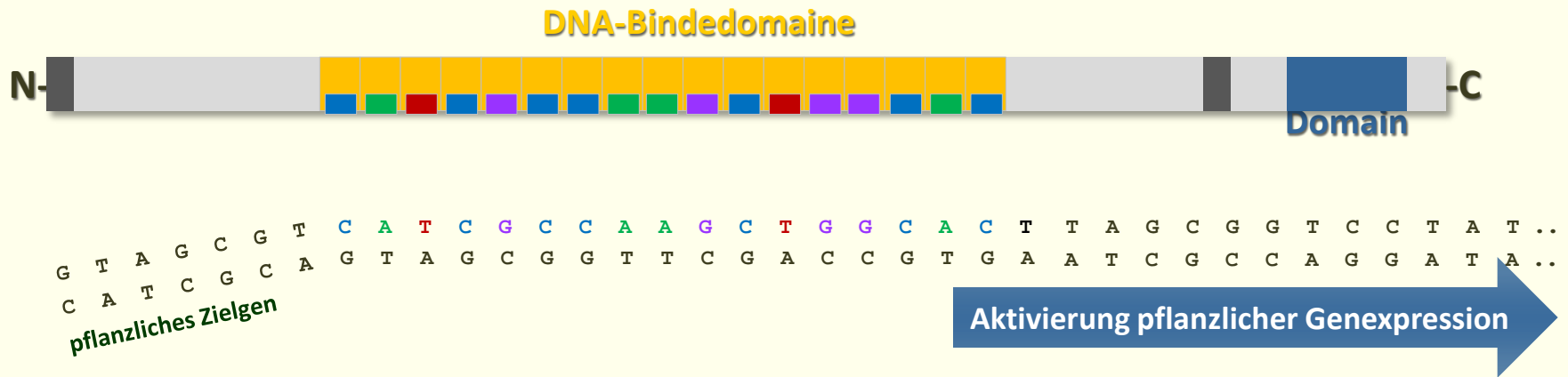
CRISPR/Cas System



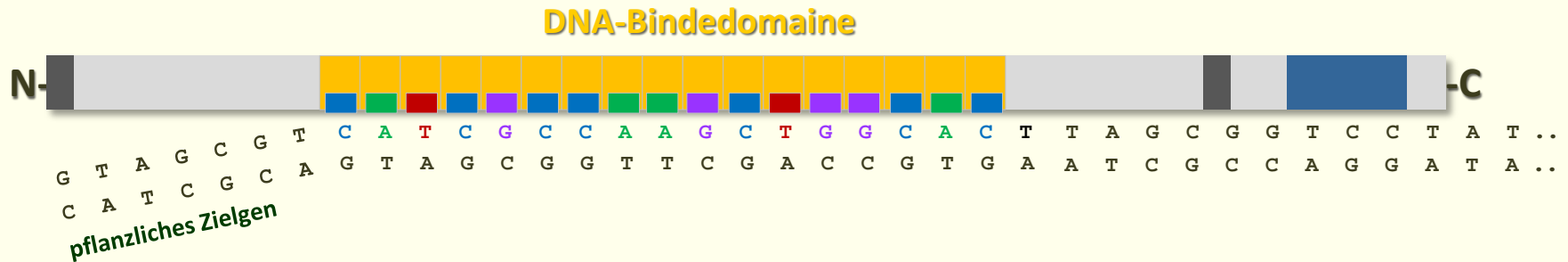
- ZFNs Zinc-Finger Nucleases
- TALENs Transcription Activator-Like Effector Nucleases
- CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- Cas CRISPR-associated, RNA-guided Endonuclease

Puchta and Fauser (2014) The Plant Journal

TAL-Effektoren von *Xanthomonas*-Arten



TAL-Effektoren von *Xanthomonas*-Arten



Vier verschiedene Bausteine:



Spezifisch gebundene Nukleotide:

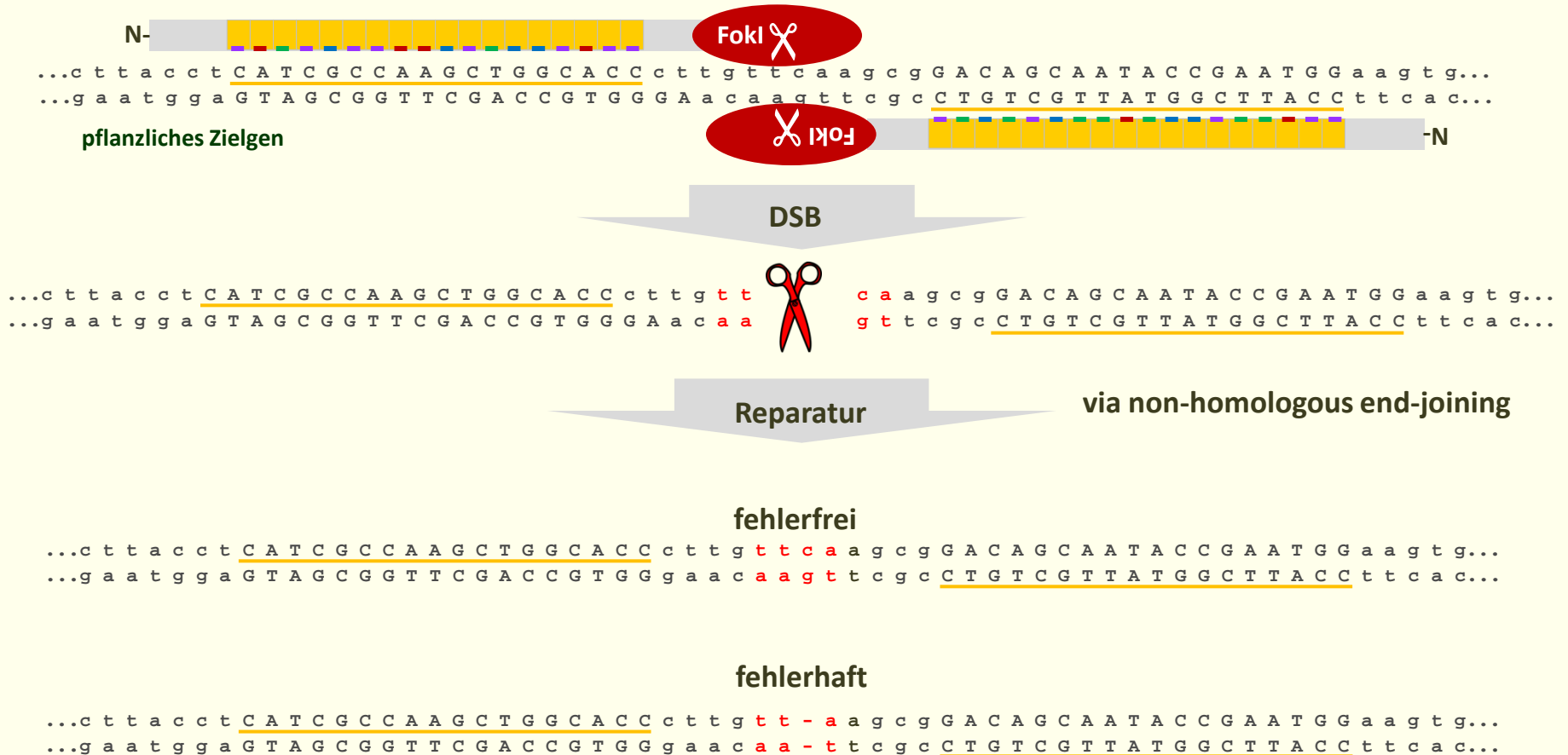
A T G C




DNA-Bindedomänen können für jede beliebige genomische Zielsequenz designt werden; dafür codierende DNA kann generiert und in einem beliebigen Organismus exprimiert werden

Boch et al., Science 2009

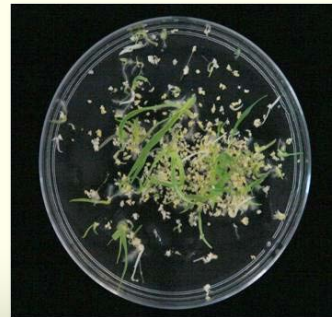
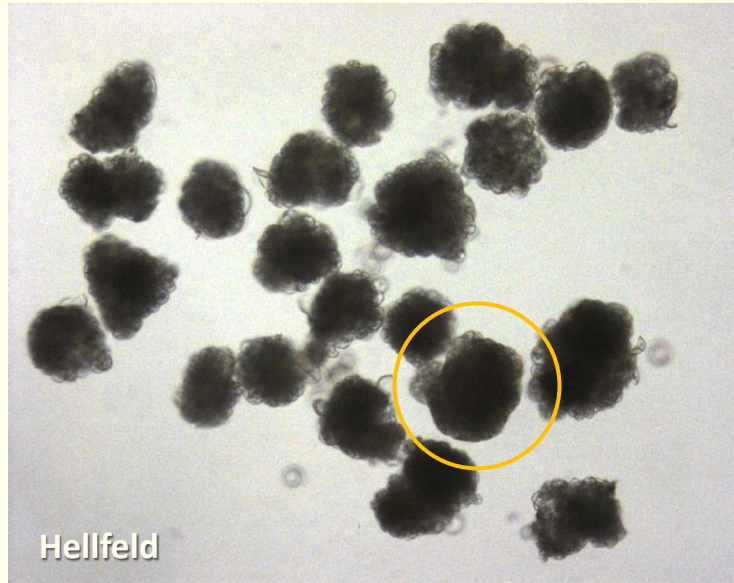
Zielsequenz-spezifische Mutagenese mittels Designer-Endonukleasen



 **jede beliebige Stelle in der Erbinformation kann gezielt mutiert werden, kleine Modifikationen sind von 'natürlichen' genetischen Veränderungen nicht unterscheidbar**

Konzept zur Methodenentwicklung bei Gerste

- *Green Fluorescent Protein (GFP)* wird als Modellgen verwendet
- Die TALENs werden während der Pflanzenregeneration aus unreifen Pollen exprimiert



TALEN-vermittelte Mutagenese bei Gerste

Maia Gurushidze, Götz Hensel, Stefan Hiekel, Sindy Schedel, Andrea Müller, Ingrid Otto

Auswahl eines geeigneten
Zielmotivs im GFP-Gen



TALEN-codierende Sequenz



Plasmide zur Transformation



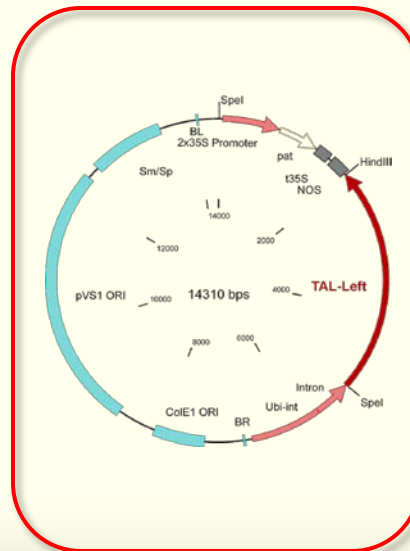
Transformation
GFP-transgener Gerste

>synthetic gfp full protein coding seq

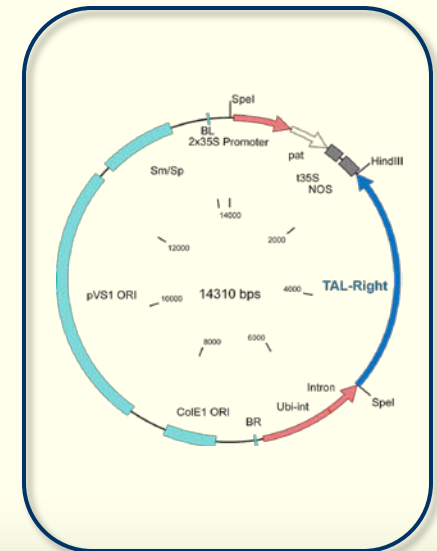
```

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAA
ACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT
CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCACCTCGTGACCACCTTGACCTACGGCGTGCAGT
GCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAC
ACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGGATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTGGGGCACAAG
CTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAAGGT
TTCAAGACCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCAT
CGGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCC
AACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA
GCTGTACAAGGGATCCCATCACCACCATCACCATAAAGACGAACTCTAG
    
```

Agrobacterium mit Plasmid
für linke TALEN-Einheit



Agrobacterium mit Plasmid
für rechte TALEN-Einheit



Deletionen und Insertionen in TALEN-exprimierenden Pflanzen

Hannes Trautwein, Maia Gurushidze

GFP-WT AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA

48/1a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGA-----CTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -15

49/3a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGA-----CTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -15

49/3b AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----CAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -10

43/3a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -4/fs

56/1a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -4/fs

48/1b AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -4/fs

49/3c AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -4/fs

53/3a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -4/fs

39/4a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -4/fs

49/3e AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---GACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -5/+1/fs

49/3f AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAG-----CTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -14/fs

49/3g AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----AGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -15

49/3h AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -1/fs

53/3b AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG-----AGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -49/fs

53/3c AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG--TCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -2/fs

53/3d AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGA-----CTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -15

53/3e AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA-----CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -6

53/3f AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----GAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -15

7/1a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----GAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -15

56/1b AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----GAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -15

7/1c AGTTC-----TGAGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -42/+3

7/1d AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----ACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -7/fs

56/1c AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----ACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -7/fs

58/4a AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG---CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -3

58/4b AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGA-----CTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -25/fs

58/4c AGTTCGAGGGCGAC-----TTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -36

58/4d AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TGTAACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -43/+1/fs

39/4c AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGA-----CTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -10/fs

39/4d AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----CTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -8/fs

39/4e AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---TCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -3

39/4f AGTTCGAGGGCGACACCCCTGG-----CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -25/fs

39/4g AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCCATCGAGCTGAAGG-----CACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -35/fs

56/1d AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----CACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -35/fs

39/4h AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----TACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -48

39/4i AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG-----TACAACCTACAAGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -33

56/1e AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----GGACAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -28/+5/fs

56/1f AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG--TCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -2/fs

56/1g AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---AGGACTTCAAGGAG-----TACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -35/+2

43/3b AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG---AGGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -5/+2

43/3c AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCT-----CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -10/fs

48/1c AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCG-----CGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -33

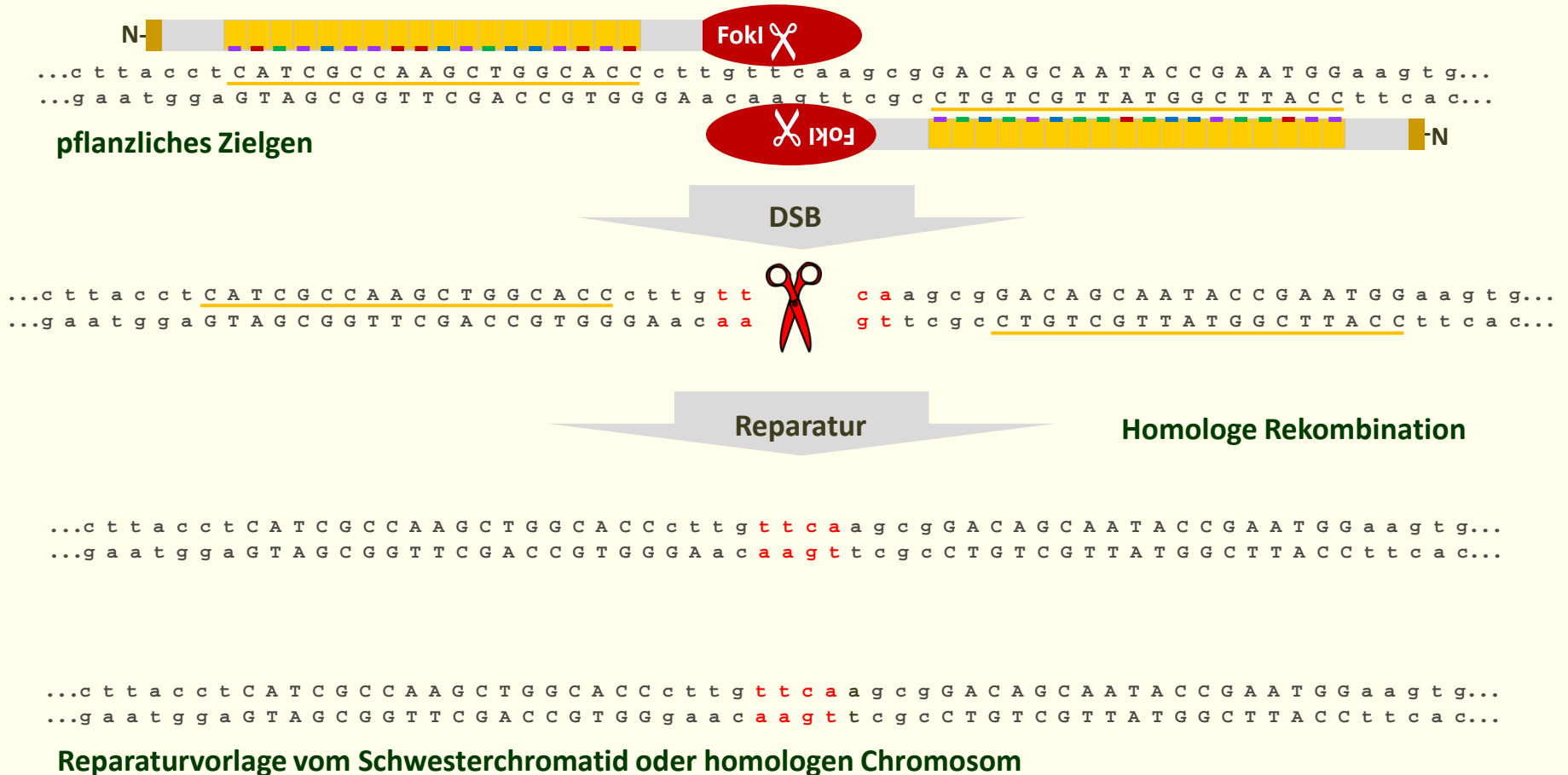
48/1d AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGA-----ACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -14/fs

43/3d AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGTACTGGGGCACAAGGAGGACGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -5/+19/fs

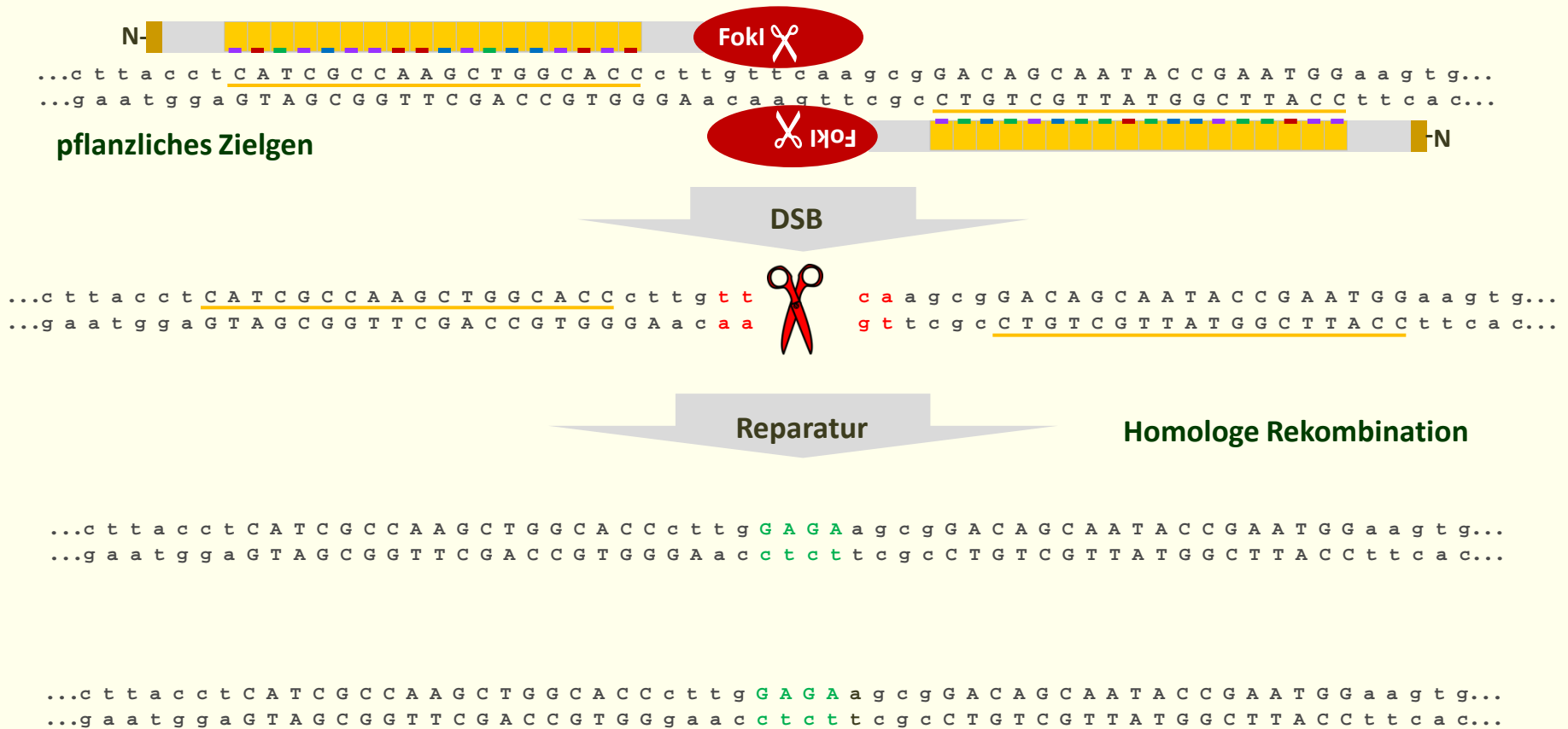
48/1e AGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -19/+36/fs

58/4e AGTTCAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGTACAACCTACATGTATACCTATCCTAGATCGATATTTCCATCCATCTTAACTCGTAACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGCTCTATA -8/+57/fs

Präzise Genom-Editierung mit Designer-Endonukleasen



Präzise Genom-Editierung mit Designer-Endonukleasen



Reparaturvorlage mit **Modifikation der Wahl**



Optionen: Korrektur, Insertion, Eliminierung, Austausch jeder beliebigen Zielsequenz mit jeder Sequenz der Wahl

Zielsequenz-spezifische Mutagenese

- Erforschung von Genfunktionen
- Herstellung funktioneller Varianten eines Gens
- Modifikation von Anfälligkeitsfaktoren für virale und pilzliche Pflanzenkrankheiten
- Verhinderung der Biosynthese unerwünschter Substanzen (Toxine, Allergene)

Präzise Editierung der Erbinformation

- ...