

SONDERHEFT
2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**MATERIAL-
FORSCHUNG**
Gesteinsbesiedelnde
Pilze

PFLANZENGENETIK
Genomsequenzen
sichtbar machen

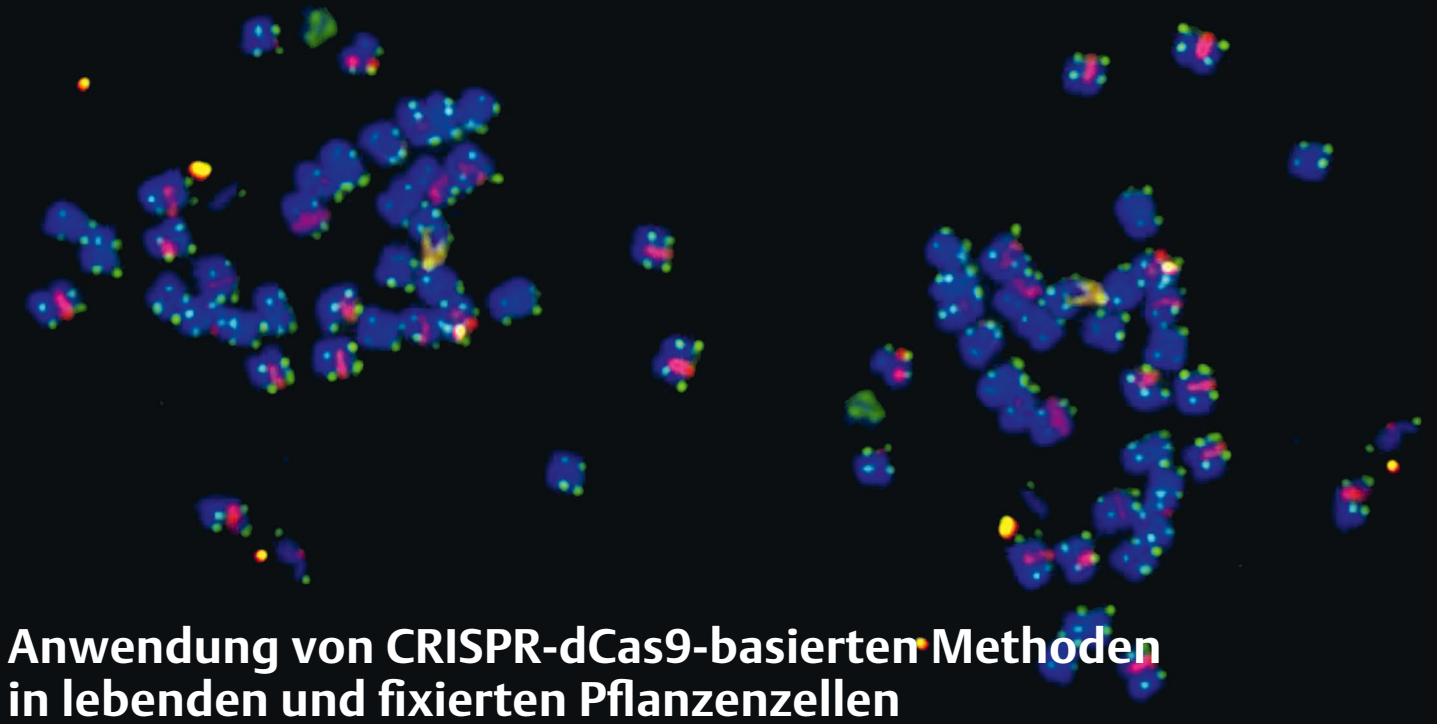
EXPERIMENT
Pauline und die
Ausreißer

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

CRISPR-Cas

... mehr als nur
Verteidigung



Anwendung von CRISPR-dCas9-basierten Methoden in lebenden und fixierten Pflanzenzellen

Genomische Sequenzen sichtbar machen

ANDREAS HOUBEN | BHANU PRAKASH POTLAPALLI | SOLMAZ KHOSRAVI

Mit der Entdeckung programmierbarer DNA-Bindungsproteine wurden Methoden entwickelt, die die Sichtbarmachung von definierten DNA-Sequenzen in lebenden Zellen und in fixierten Chromosomen und Zellkernen ermöglichen. Anwendungen und das Potenzial programmierbarer DNA-Bindungsproteine mit Schwerpunkt auf CRISPR-Cas9-basierter Chromatinmarkierung in der Pflanzenwissenschaft werden vorgestellt.

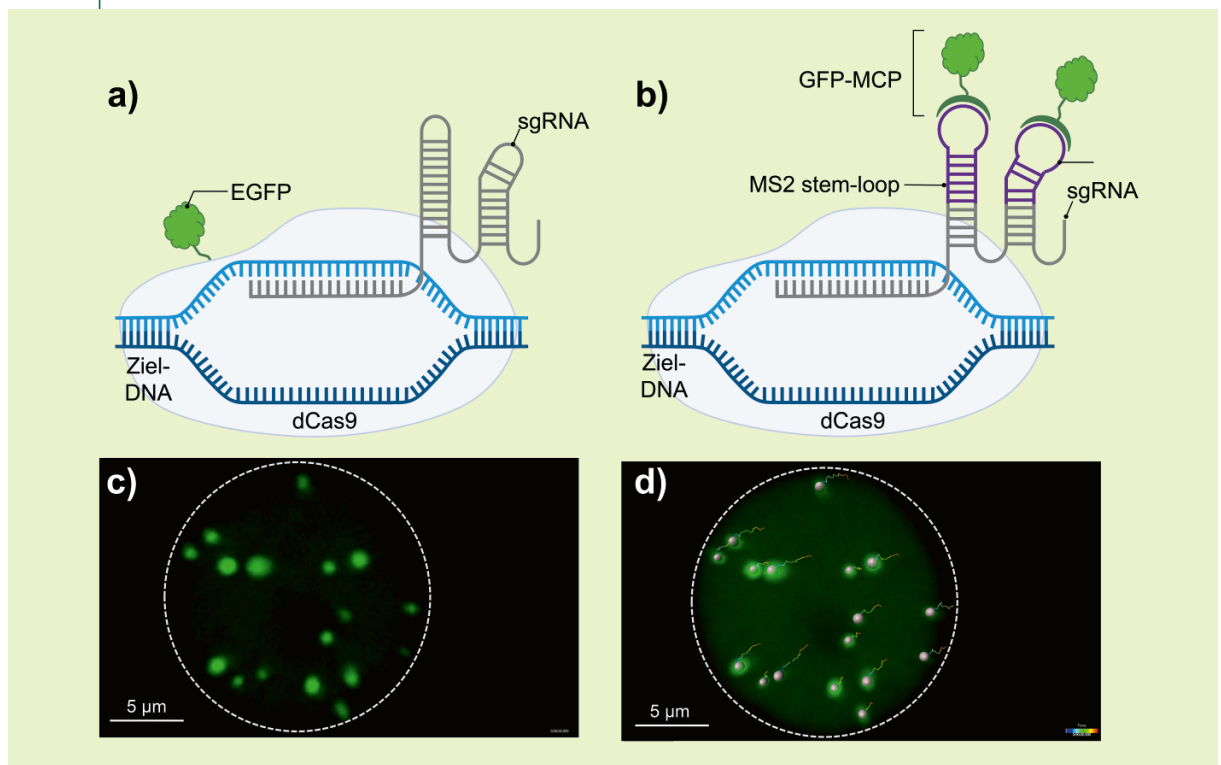
Die räumliche und zeitliche Organisation von Chromosomen und Zellkernen wird zunehmend als wichtig für die Regulierung von Funktionen wie Genexpression, DNA-Replikation und Reparatur sowie für die korrekte Segregation des genetischen Materials während der Zellteilung erkannt. Die bereits Ende der 1960er Jahre entwickelte *in-situ*-Hybridisierung ist eine bewährte und weit verbreitete Methode zur Kartierung von DNA-Sequenzen in Chromosomen und Zellkernen in Forschung und Medizin. Diese Methode basiert darauf, dass eine markierte DNA-Sonde über Basenpaarungen an die nachzuweisende DNA bindet [1]. Dadurch kommt es zur Hybridisierung von komplementären Basen auf zwei Nukleinsäureeinzel-

strängen. Zum Nachweis von fluoreszenzmarkierten Proben ist der Einsatz von Fluoreszenzmikroskopen notwendig. Der Nachweis genomischer Loci in lebenden Zellen ist aber mit dieser Methode nicht möglich.

Um definierte DNA-Sequenzen in lebenden Zellen sichtbar zu machen, wurde in jüngerer Zeit eine Reihe von Ansätzen entwickelt, die unter anderem auf programmierbaren DNA-Bindeproteinen basieren. Die Entdeckung des Typ-II-Systems der CRISPR-assoziierten Endonuklease 9 (Cas9) hat nicht nur die Etablierung neuer Werkzeuge zur gezielten Editierung von DNA-Sequenzen ermöglicht, sondern auch das Feld der Chromatin-Bildgebung revolutioniert [2]. Mutationen in zwei Domänen des Cas9-Proteins führten zur Erzeugung eines katalytisch inaktiven, sogenannten „toten“ Cas9-Proteins (dCas9, wobei „d“ für *dead* = tot steht) [2]. Das dCas9-Protein hatte damit seine DNA-Schneideaktivität verloren und konnte nach Verbindung mit einem fluoreszierenden Protein – wie zum Beispiel dem grün fluoreszierenden Protein GFP – für die DNA-Bildgebung programmiert werden [3]. Diese dCas9-Variante wurde in Kombination mit Target-spezifischer gRNA (*guide* RNA = Leit-RNA) erfolgreich für die Visualisierung repetitiver und unikaler Sequenzen in lebenden Zellen nicht-pflanzlicher Systeme eingesetzt (Übersicht in [4]).

In Pflanzen wurde CRISPR *Live Imaging* zur Sichtbarmachung von Telomer-Sequenzen in den lebenden Blattzellen der Wildtabakpflanze *Nicotiana benthamiana*

ABB. 1 | VISUALISIERUNG GENOMISCHER SEQUENZEN IN LEBENDEN ZELLEN



CRISPR-dCas9 *Live Imaging* zur Sichtbarmachung definierter genomischer Sequenzen in lebenden Zellen. a) dCas9 ist mit einem fluoreszierenden GFP-Protein direkt markiert (in Grün). **b)** Indirekte Markierung von dCas9 mit Aptameren. In das sgRNA-Gerüst (sg = *single guide*) ist eine als Aptamer bezeichnete *stem-loop*-Struktur integriert (MS2), die mit fluoreszierenden Aptamer-Bindungsproteinen erkannt werden kann (GFP-MCP, in Grün). **c)** Einzelner Zellkern von transient transformierten Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) mit CRISPR-Cas9-markierten Telomeren (grüne Punkte). **d)** Die Dynamik von Telomeren innerhalb von 15 Minuten ist graphisch dargestellt.

eingesetzt [5] (Abbildung 1a). Dieses Experiment bewies, dass Telomere in der Peripherie von Zellkernen lokalisiert sind. Darüber hinaus zeigte die Verfolgung einzelner Telomerpositionen über einen Zeitraum von 30 Minuten die dynamischen Positionsänderungen der Telomere von bis zu $\pm 2 \mu\text{m}$ (Abbildungen 1c, d). Die erfolgreiche Ko-Lokalisierung von telomeren CRISPR-Signalen und Signalen, die vom Telomerbindeprotein TRB1 stammen, zeigte, dass diese Technik auch für DNA/Protein-Interaktionsstudien verwendet werden kann.

Um die Intensität der CRISPR-Signale zu verbessern, können unter anderem Aptamer-basierte Methoden einge-

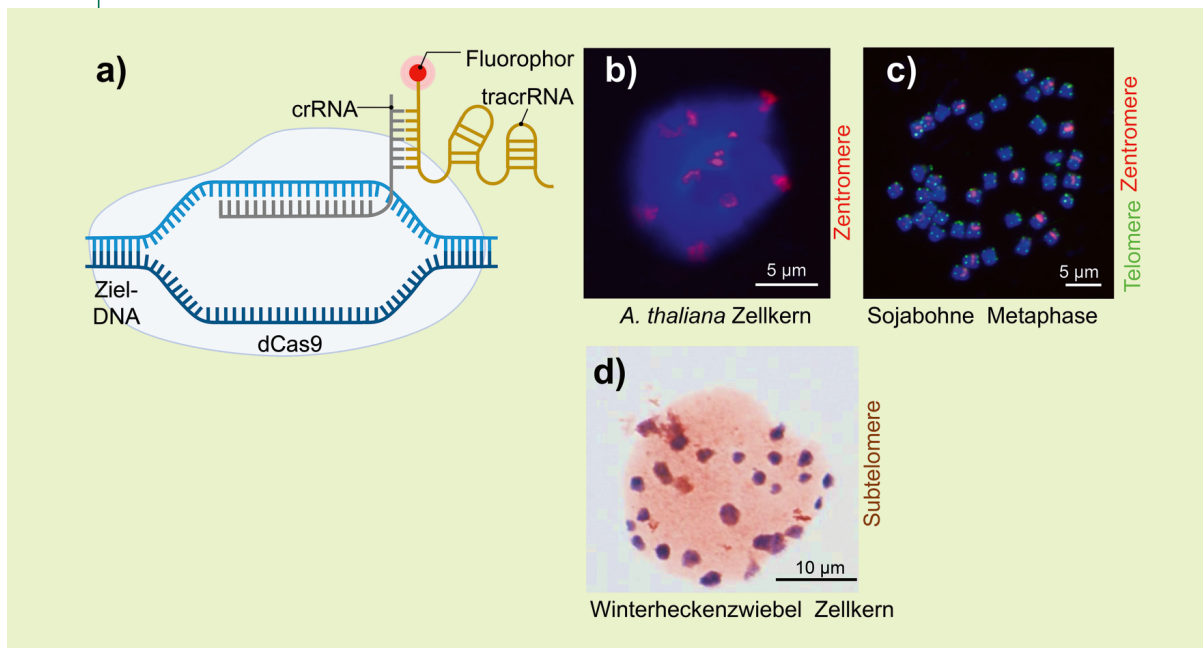
setzt werden. Aptamere sind kurze RNA-Sequenzen, die durch spezifische RNA-bindende Proteine, die mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert sind, nachgewiesen werden können (Abbildung 1b). Neben *Live Imaging* können Aptamere auch für die CRISPR-dCas9-basierte Genregulierung mit Effektorproteinen wie Transkriptionsaktivierungsdomänen, Acetyltransferase oder Methyltransferase verwendet werden. CRISPR *Live Imaging* kann bisher noch nicht für die spezifische Markierung von DNA-Sequenzen in stabil transformierten Pflanzen eingesetzt werden, was darauf hindeutet, dass eine dauerhafte Bindung des CRISPR-dCas9-Komplexes an seine Ziel-DNA die für die Pflanzenentwicklung erforderlichen Prozesse beeinträchtigt [6].

IN KÜRZE

- Mit CRISPR *Live Imaging* können **genomische Sequenzen in lebenden Zellen** fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.
- Auf diese Weise kann auch **die Dynamik** z. B. von Telomeren beobachtet werden.
- CRISPR-CID ist eine Variation, mit der DNA-Sequenzen **in fixiertem Material** *in situ* sichtbar gemacht werden.
- Die CRISPR-CID erfordert keine Fluoreszenzmikroskopie und ist **mit kommerziell erhältlichen Materialien** auch an Schulen durchführbar.

CRISPR-FISH ermöglicht die Markierung genomischer Sequenzen in fixierten Proben

Neben der Markierung von definierten genomischen Sequenzen in lebenden Zellen ermöglicht CRISPR-dCas9 auch den spezifischen Nachweis von DNA in fixierten Chromosomen und Zellkernen. Im Gegensatz zur klassischen *in-situ*-Hybridisierung erfordert die CRISPR-dCas9-vermittelte *in-situ*-Markierung - auch „CRISPR-FISH“ ge-

ABB. 2 | VISUALISIERUNG GENOMISCHER SEQUENZEN IN FIXIERTEN CHROMOSOMEN UND ZELLKERNEN


CRISPR-dCas9-Methoden zur Sichtbarmachung genomischer Sequenzen in fixierten Chromosomen und Zellkernen. CRISPR-FISH ist eine CRISPR-dCas9-Methode zur Fluoreszenzmarkierung genomischer Sequenzen. a) Rekombinantes dCas9-Protein wird mit fluoreszierenden *guide* RNAs (in Rot) assembliert und für die CRISPR-FISH eingesetzt. b) CRISPR-FISH-Markierung von Zentromeren (in Rot) im Zellkern (in Blau) von *Arabidopsis thaliana*. c) Die Verwendung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Leit-RNAs ermöglicht den Nachweis unterschiedlicher Sequenzen mit verschiedenen Farben. Die Leit-RNA besteht aus Ziel-spezifischer crRNA und fluoreszierender tracrRNA. Die Zentromere (in Rot) und Telomere (in Grün) der Sojabohnen-Chromosomen (in Blau) wurden markiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. d) CRISPR-CID-Nachweis von subtelomeren Sequenzen (in Braun) im Zellkern (in Rosa) der Winterheckenzwiebel. Durch die Verwendung von alkalischer Phosphatase oder Peroxidase-Enzymen wird der Einsatz von einem Standard-Durchlichtmikroskop zur Analyse CRISPR-CID markierter Zellkerne und Chromosomen ermöglicht.

nannt – keine Denaturierung der chromosomalen DNA und ermöglicht daher eine bessere Erhaltung der Chromatinstruktur (Abbildung 2a). Die Verwendung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Leit-RNAs (*guide* RNA oder gRNA) ermöglicht das *multiplexing* der CRISPR-FISH-Methode. Es können somit unterschiedliche Sequenzen mit verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops parallel nachgewiesen werden (Abbildungen 2b, c). Wichtig ist, dass die CRISPR-FISH-Reaktion bei einer Temperaturspanne von 4°C bis 37°C funktioniert und mit zusätzlichen Proteindetektions- und bildgebenden Methoden kombiniert werden kann [7, 8]. Ein weiterer Bonus ist, dass CRISPR-FISH die Echtzeit-visualisierung des CRISPR-dCas9-basierten DNA-Markierungsprozesses ermöglicht und somit die Kinetik der Reaktion mit aufzeigt. Derzeit ist die Verwendung von CRISPR-FISH auf repetitive DNA-Sequenzen beschränkt, welche beispielsweise oft in pflanzlichen Genomen gefunden werden.

CRISPR-CID ermöglicht den Einsatz von CRISPR-dCas9 in der Schule

Der fluoreszenzbasierte CRISPR-FISH-Nachweis von DNA-Sequenzen kann durch nicht-fluoreszenzbasierte

Methoden ersetzt werden. Dafür bietet sich der Einsatz der CRISPR-dCas9-vermittelten chromogenen *in-situ*-Detektion (CRISPR-CID) an. Die Detektion spezifischer Sequenzen in fixierten Chromosomen oder Zellkernen wird unter Verwendung von alkalischer Phosphatase oder Peroxidase-Enzymen und einem Standard-Durchlichtmikroskop möglich gemacht (Abbildung 2d). Diese Nachweismethode kann somit auch verwendet werden, um die Grundlagen von CRISPR-Cas9 in Bildungseinrichtungen praktisch zu demonstrieren, auch wenn kein teures Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung steht. Ein anderer wichtiger Vorteil ist, dass für die Durchführung der Experimente kein S1-Sicherheitslabor notwendig ist, da es sich um ein nicht-transgenes Verfahren handelt. Weiterhin sind alle für CRISPR-CID notwendigen Komponenten kommerziell verfügbar. Ein detailliertes Protokoll kann bei Interesse beim Korrespondenzautor angefordert werden.

Zusammenfassung

Enzymatisch inaktives dCas9 kann – mit entsprechenden gRNAs – eingesetzt werden, um spezifische Sequenzen in mikroskopischen Präparaten *in situ* anzufärben. Dazu kann dCas9 direkt mit GFP gekoppelt, die sgRNA mit einem Fluor-

rophor beladen oder über ein Aptamer in der gRNA GFP gebunden werden. Ein großer Vorteil der Methodik ist, dass Beobachtungen *in vivo* vorgenommen werden und so auch die Dynamik der markierten Sequenzen im Zellkern beobachtet werden kann. Mit Hilfe von CID (chromogener *in situ*-Detektion) kann die Methode auch ohne teures Fluoreszenzmikroskop z. B. an Schulen durchgeführt werden.

Summary

Using CRISPR-dCas9-based methods in living and fixed plant cells: Making genomic sequences visible

Enzymatically inactive dCas9 can be used with corresponding gRNAs to stain specific sequences in microscopic preparations *in situ*. For this purpose, dCas9 can be coupled directly with GFP, the sgRNA can be loaded with a fluorophore or bound to GFP via an aptamer in the gRNA. A major advantage of the method is that observations can be made *in vivo* and thus the dynamics of the labelled sequences in the cell nucleus can also be observed. With the help of CID (chromogenic *in situ* detection), the method can also be carried out without an expensive fluorescence microscope, e. g. in schools.

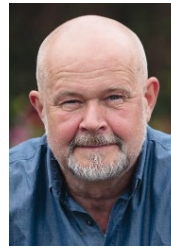
Schlagnworte

Mikroskopie, *in situ*, *in vivo*, CRISPR Live Imaging, CRISPR-FISH, CRISPR-CID, Telomer, Zentromer, dCas9

Literatur

- [1] D. Dechyeva, T. Schmidt (2008). Wie FISht man Pflanzenchromosomen? *BIOspectrum* 14, 365–357.
- [2] L. S. Qi et al. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152 (5), 1173–1183, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- [3] B. Chen et al. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR-Cas system. *Cell* 155 (7), 1479–1491, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
- [4] S. C. Knight et al. (2018). Genomes in focus: Development and applications of CRISPR-Cas9 imaging technologies. *Angewandte Chemie-International Edition* 57 (16), 4329–4337, <https://doi.org/10.1002/anie.201709201>
- [5] S. Dreissig et al. (2017). Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements. *Plant J* 91 (4), 565–573, <https://doi.org/10.1111/tj.13601>
- [6] S. Khosravi et al. (2020). Application of aptamers improves CRISPR-based live imaging of plant telomeres. *Front Plant Sci* 11, 1254, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01254>
- [7] T. Ishii et al. (2019) RNA-guided endonuclease - *in situ* labelling (RGEN-ISL): a fast CRISPR-Cas9-based method to label genomic sequences in various species. *New Phytol* 222 (3), 1652–1661, <https://doi.org/10.1111/nph.15720>
- [8] B. P. Potlapalli et al. (2020). Application of Tris-HCl allows the specific labeling of regularly prepared chromosomes by CRISPR-FISH. *Cytogenet Genome Res* 160 (3), 156–165, <https://doi.org/10.1159/000506720>

Verfasst von:



Andreas Houben studierte von 1984 bis 1989 Pflanzenzüchtung und Saatgutproduktion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, wo er 1993 promovierte. Von 1993 bis 1995 war er Postdoktorand am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Ingo Schubert, und von 1996 bis 2001 an der Universität Adelaide, Australien, im Labor von Jeremy Timmis. Seit 2001 ist er Arbeitsgruppenleiter am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben.



Bhanu Prakash Potlapalli studierte von 2011 bis 2015 Gartenbauwissenschaften an der Dr. YSR Horticultural University, Hyderabad (Indien). Von 2017 bis 2020 absolvierte er einen Masterstudiengang in Nutzpflanzenwissenschaften an der Universität Hohenheim, Stuttgart. Von 2020 bis 2021 war er als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Chromosomenstruktur und -funktion am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben unter der Leitung von Andreas Houben tätig. Seit 2021 setzt er seine Arbeit als Doktorand in der gleichen Gruppe fort.



Solmaz Khosravi studierte von 2003 bis 2005 Biotechnologie an der Imam Khomeini International University, Qazvin (Iran). 2006 bis 2007 arbeitete sie für die iranische Biotechnologie-Gesellschaft. 2007–2017 war sie als Wissenschaftlerin am Forschungsinstitut für landwirtschaftliche Biotechnologie tätig. 2021 promovierte sie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Seit 2022 arbeitet sie als Postdoktorandin im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Andreas Houben.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Andreas Houben
Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben
Corrensstrasse 3
06466 Seeland
Email: houben@ipk-gatersleben.de

DIE DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR GENETIK

Profitieren Sie von einem vielfältigen, lebendigen Netzwerk im Bereich der Genetik!



WERDEN SIE MITGLIED!

<https://www.gfgenetik.de/mitgliedschaft/>

BECOME A MEMBER!

Netzwerke

Tagungen

Nachwuchsförderung

Doktorandenpreis



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

