

CRISPR/Cas

Induzierbares CRISPR-Kill-System zur zelltypspezifischen Gewebeeliminierung

FABIENNE GEHRKE, HOLGER PUCHTA
JOSEPH GOTTLIEB KÖLREUTER INSTITUT FÜR PFLANZENWISSENSCHAFTEN,
KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT)

Recently, the repertoire of CRISPR/Cas-based techniques has been expanded with CRISPR-Kill, enabling tissue engineering through targeted genome elimination. Through SaCas9-mediated induction of multiple double-strand breaks in evolutionary conserved repetitive genomic regions, targeted cell death can be achieved. To exert temporal control over cell ablation, a chemically inducible system has been implemented in *Arabidopsis thaliana*, providing a valuable tool for the investigation of the developmental plasticity of specific cell types.

DOI: 10.1007/s12268-024-2079-z
© Die Autorinnen und Autoren 2024

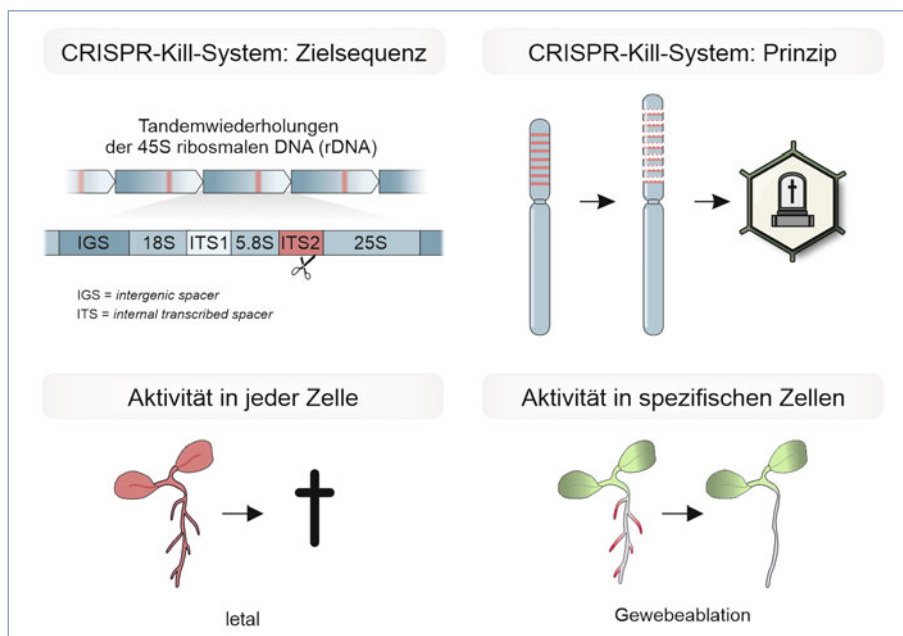
■ Die gezielte Zellablation ermöglicht es, verschiedenste entwicklungsbiologische Fragestellungen zur Zelldifferenzierung, Organbildung und -regeneration oder zur

interzellularen Signaltransduktion zu beantworten. Neben der Anwendung in der Grundlagenforschung ist die gezielte Ablation ausgewählter Organe sowie die Induktion weib-

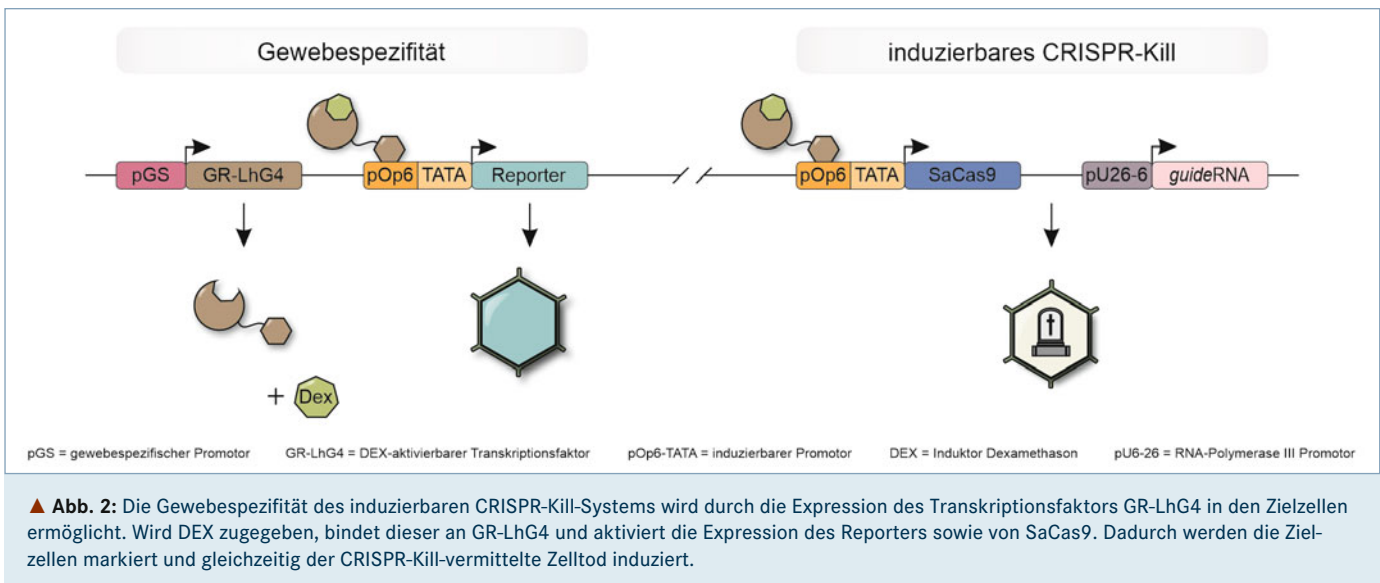
licher oder männlicher Sterilität auch in der Pflanzenzüchtung relevant. In den letzten Jahrzehnten wurden hierfür verschiedene Methoden etabliert, wie die phototoxische Induktion des Zelltods durch Laserablation oder die gewebespezifische Expression bakterieller Toxine. Das kürzlich etablierte CRISPR-Kill-System erweitert das Repertoire nun um eine DNA-basierte Methode zur gewebespezifischen Zellablation in *Arabidopsis* [1].

Das CRISPR-Kill-System: Schreddern repetitiver DNA-Bereiche

Basierend auf dem CRISPR/Cas-System ermöglicht das CRISPR-Kill-System die kontrollierte Initiierung des Zelltods durch die simultane Induktion multipler DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) in eukaryotisch hochkonservierten, funktionell aktiven Genombereichen (**Abb. 1**, [1]). Hierbei wird als Zielsequenz für die Cas9-Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (SaCas9) [2] die abundant vorkommenden Sequenzwiederholungen der 45S ribosomalen DNA (rDNA) oder der zentromerischen Satelliten verwendet, sodass multiple DSB gleichzeitig induziert werden. Wird die SaCas9-Nuklease systemisch unter der Kontrolle des *UBIQUITIN*-Promotors (pUBI) in *Arabidopsis thaliana* exprimiert, resultiert besonders die Bruchinduktion in der *internal transcribed spacer 2* (ITS2)-Sequenz der 45S rDNA in einem starken letalen Effekt. Für die Anwendung im Tissue Engineering kann durch einfaches Austauschen des pUBI-Promotors gegen einen gewebespezifischen Promotor die Induktion des Zelltods auf definierte Zelltypen beschränkt und die Organogenese blockiert werden. So konnte unter Verwendung des wurzelspezifischen *xylem pole pericycle*-Promotors (pXPP) die Bildung von Seitenwurzeln durch die Ablation von pXPP-positiven Seitenwurzelsgründerzellen an den Xylempolen blockiert werden [1]. Werden allerdings Promotoren verwendet, welche bereits in frühen oder mehreren Entwicklungsstadien aktiv sind, ist eine konstitutive Expression des CRISPR-Kill-Systems letal,



▲ **Abb. 1:** Der CRISPR-Kill-vermittelte Zelltod beruht auf der DSB-Induktion in den ITS2-Sequenzen der 45S rDNA, wobei diese simultane Induktion hunderter Brüche zur Fragmentierung des funktionellen Bereichs führt. Während eine systemische Expression des Systems letal ist, kann die gewebespezifische Expression des Systems zur präzisen Eliminierung von Zielzellen eingesetzt werden.



weshalb neben der räumlichen Regulation eine temporale Kontrolle notwendig ist.

Das induzierbare CRISPR-Kill-System

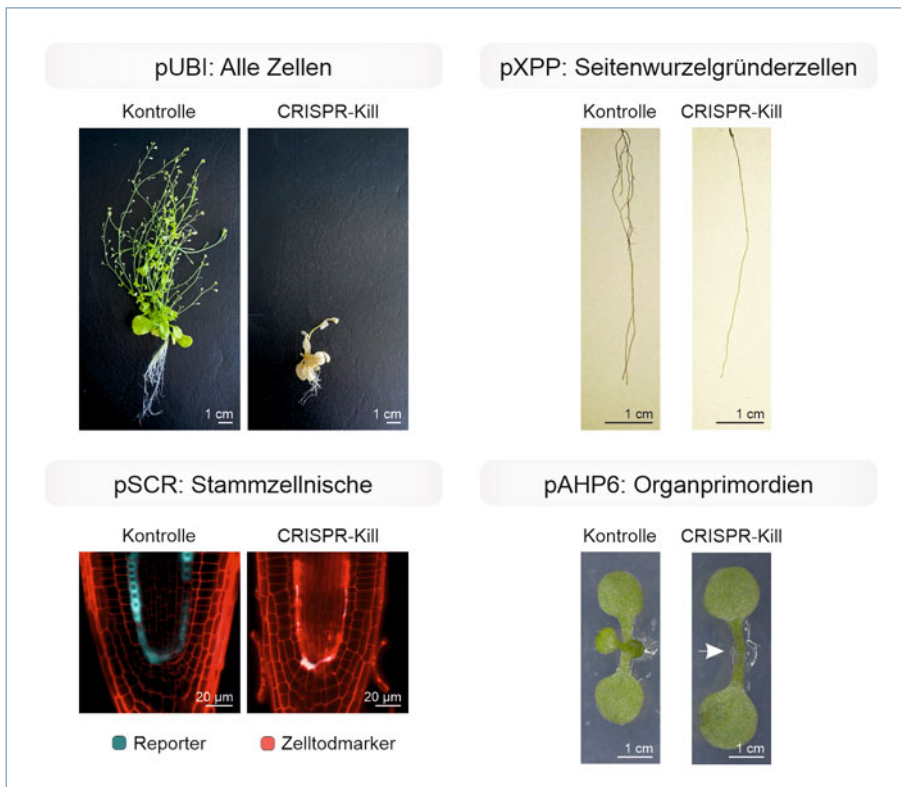
Um eine zeitlich steuerbare, gewebespezifische Induktion des Zelltods zu ermöglichen, wurde ein induzierbares CRISPR-Kill-System auf Grundlage des Dexamethason (DEX)-induzierbaren GR-LhG4/pOp6-vermittelten Transaktivierungssystems etabliert [3]. Hierbei wird die Zelotypspezifität durch einen gewebespezifischen Promotor gewährleistet, welcher die Expression des chimären Transkriptionsfaktors GR-LhG4 ausschließlich im Zielgewebe sicherstellt. In Abwesenheit des Induktors verbleibt der GR-LhG4-Transkriptionsfaktor im Zytosol der Zielzellen und wird abgebaut. Erst die Zugabe des synthetischen Glucocorticoids DEX ermöglicht den nuklearen Import des DEX-aktivierten GR-LhG4-Transkriptionsfaktors und führt zur transkriptionellen Aktivierung von Expressionskonstrukten, welche unter der Kontrolle des induzierbaren pOp6-Promotors stehen [4]. Basierend auf diesem Transaktivierungssystem wurde ein umfassendes Repertoire transgener *Arabidopsis*-Linien etabliert, wodurch ein modulares System zur induzierbaren gewebespezifischen Genexpression zur Verfügung steht [5]. Um dieses mit dem CRISPR-Kill-System zu kombinieren, wurde die codierende Sequenz der SaCas9-Nuklease unter die Kontrolle des induzierbaren pOp6-Promotors gestellt und die ITS2-spezifische *guideRNA* konstitutiv exprimiert (Abb. 2, [3]). Somit kann die Expression der SaCas9-Nuklease in den Zielzellen flexibel über den Zeitpunkt der Induktorzugabe gesteuert und dadurch neben der räumlichen

Kontrolle eine zeitliche Regulation des CRISPR-Kill-Effekts ermöglicht werden.

Eliminierung jedes Zelltyps zu jedem Zeitpunkt

Durch die Kombination des CRISPR-Kill-Systems mit dem pOp6/GR-LhG4-Transaktivierungssystem kann in Abhängigkeit des Promotors, welcher die Expression des DEX-aktivierbaren GR-LhG4-Transkriptionsfaktors reguliert, das Zielgewebe definiert werden. Wird hierbei ein systemisch-aktiver Promotor verwendet, kann nach der DEX-Zugabe die Expression der SaCas9-Nuklease und somit der Zelltod im gesamten Organismus induziert werden. So konnte durch den Einsatz des pUBI-Promotors abhängig vom Induktionszeitpunkt das Absterben der gesamten Pflanze in unterschiedlichen Entwicklungsstadien erzielt werden (Abb. 3, [3]). Wird hingegen ein gewebespezifischer Promotor verwendet, kann die Aktivität des CRISPR-Kill-Systems präzise auf definierte Zelltypen oder Organe begrenzt werden. Analog zum konstitutiven CRISPR-Kill-Ansatz kann eine pXPP-vermittelte Expression des GR-LhG4-Transkriptionsfaktors die Aktivität des induzierbaren Systems auf Seitenwurzelgründerzellen beschränken. Dabei resultierte der spezifisch in pXPP-positiven Zellen hervorgerufene Zelltod in einer drastisch reduzierten Seitenwurzelanzahl, was die Eignung des induzierbaren CRISPR-Kill-Systems zur effizienten Organablation bestätigt (Abb. 3, [3]). Auch für die Untersuchung entwicklungsbiologischer Fragestellungen eröffnet diese zeitlich und räumlich steuerbare Zelleliminierung neue Möglichkeiten, da auch in Zellen mit Stammzellcharakter effi-

zient der Zelltod induziert werden kann. So konnte bei der Verwendung des im Wurzelapikalmeristem aktiven *SCARECROW*-Promotors (pSCR) der Zelltod entlang des pSCR-typischen, U-förmigen Expressionsmusters detektiert werden (Abb. 3), was durch formative Zellteilungen in einer bemerkenswerten Störung der orientierten Zellteilungsmuster resultierte [3]. Daher scheinen umliegende Zellen erneut teilungsaktiv zu werden, um nach der Redifferenzierung den Verlust von pSCR-positiven Zellen zu kompensieren. Für die Erforschung der zugrunde liegenden Wundreaktionsmechanismen könnten die etablierten, induzierbaren CRISPR-Kill-Linien eine vielversprechende Grundlage zur Aufklärung der Signalkaskaden in der restaurativen Musterbildung darstellen. Zudem eignet sich das induzierbare CRISPR-Kill-System für die Applikation in komplexeren Kontexten, in welchen der eingesetzte Promotor in mehreren Entwicklungsstadien aktiv ist und eine konstitutive Expression des Systems letal ist. Ein solches regulatorische Element ist der *ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6*-Promotor (pAHP6), welcher sowohl in den meristematischen Zellen der Wurzel als auch des Sprosses aktiv ist. Tatsächlich konnte die Letalität eines entsprechenden konstitutiven Ansatzes durch die Anwendung des induzierbaren Systems umgangen werden und erfolgreich das Entwicklungsstadium, in welchem die pAHP6-kontrollierte CRISPR-Kill-Expression das weitere Wachstum behindert, identifiziert werden. Dabei entwickelten sich die DEX-induzierten Keimlinge zwar, stagnierten jedoch folgend in der Entwicklung, was auf eine umfassende Gewebeelimination in



▲ Abb. 3: Die Kombination eines gewebespezifischen Promotors mit dem induzierbaren CRISPR-Kill-System ermöglicht die gezielte Eliminierung jedes Zelltyps zu jedem Zeitpunkt. So führt eine systemische Expression nach der DEX-Zugabe zum Absterben des gesamten Organismus, während die Expression in Seitenwurzelgründerzellen die Ausbildung von Seitenwurzeln inhibiert. Auch in komplexeren Kontexten kann eine gezielte Zellablation induziert werden und ermöglicht die Untersuchung entwicklungsbiologischer Fragestellungen.

den Organprimordien hindeutet, welche die Ausbildung der ersten (echten) Blätter sowie weiterer Pflanzenorgane verhindert (**Abb. 3**). Weiterhin konnte der Zelltod zu späteren Zeitpunkten in pAHP6-positiven Zellen des Blütenstandmeristems sowie der Primärwurzel unabhängig voneinander induziert werden [3]. Mit dem induzierbaren CRISPR-Kill-System kann somit der Zelltod effizient und zeitlich kontrolliert zu jedem Zeitpunkt in jedem Zelltyp ausgelöst werden.

Potenzial des CRISPR-Kill-Systems

Das CRISPR-Kill-System ermöglicht die kontrollierte Induktion des Zelltods in jedem Zelltyp zu genau definierten Zeitpunkten, sodass wertvolle Einblicke in die Entwicklungsplastizität bestimmter Zelltypen, aber auch in die zellulären sowie molekularen Reaktionen auf die Zelleliminierung in Kombination mit Positionssignalen und der interzellulären Kommunikation gewonnen werden können. Dabei stellt das induzierbare CRISPR-Kill-System eine präzise und leicht kontrollierbare Alternative zu bisherigen Ablationsansätzen dar. Neben dem Einsatz

für vielfältige Fragestellungen in der Grundlagenforschung, wäre eine Anwendung des CRISPR-Kill-Systems ebenfalls in der synthetischen Biologie oder der Landwirtschaft denkbar. So könnte eine gewebespezifische Zelleliminierung die Manipulation des pflanzlichen Sekundärmetabolismus ermöglichen oder eine frühzeitige, kontrollierte Ablation von infizierten, transgenen Wirtszellen die Ausbreitung von pflanzenspezifischen Pathogenen sowie entsprechende physiologischen Folgen unterbinden. Aufgrund der hochkonservierten Zielsequenzen sollte das CRISPR-Kill-System zudem relativ leicht für die Anwendung in anderen mehrzelligen Eukaryoten adaptiert werden können, wobei kürzlich veröffentlichte Daten zur Eliminierung von Krebszellen durch die Induktion multipler DSB in nicht-codierenden repetitiven Sequenzen [6] diese These stützen. Da das CRISPR-Kill-System auf dem Anvisieren spezifischer Genombereiche basiert, weist es neben Anwendungen im Tissue Engineering zudem ein beachtliches Potenzial in Genome Engineering-Ansätzen auf und schafft die Möglichkeit, durch eine chromosomenspezi-

fische Induktion multipler DSB einzelne Chromosomen zu eliminieren. ■

Literatur

- [1] Schindele A, Gehrke F, Schmidt C et al. (2022) Using CRISPR-Kill for organ specific cell elimination by cleavage of tandem repeats. *Nature Commun* 13: 1502
- [2] Steinert J, Schiml S, Fauser F et al. (2015) Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J* 84: 1295–1305
- [3] Gehrke F, Ruiz-Duarte P, Schindele A et al. (2023) An inducible CRISPR-Kill system for temporally controlled cell type-specific cell ablation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 239: 2041–2052
- [4] Samalova M, Brzobohaty B, Moore I (2005) pOp6/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco. *Plant J* 41: 919–935
- [5] Schürholz A-K, López-Salmerón V, Li Z et al. (2018) A Comprehensive Toolkit for Inducible, Cell Type-Specific Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 178: 40–53
- [6] Tan IL, Perez AR, Lew RJ et al. (2023) Targeting the non-coding genome and telomerase signature enables CRISPR-mediated glioma oncogenesis. *Cell Rep* 42:113339

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Holger Puchta
 J. G. Költreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP)
 Abteilung Molekularbiologie
 Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
 Fritz-Haber-Weg 4
 D-76131 Karlsruhe
 holger.puchta@kit.edu

AUTORINNEN UND AUTOREN



Fabienne Gehrke

2014–2019 Studium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
 2019–2023 Promotion am J. G. Költreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. Seit 2023 PostDoc am JKIP des KIT.



Holger Puchta

Biochemiestudium an den Universitäten Tübingen und München. Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 1989–1995 PostDoc am Friedrich-Miescher-Institut in Basel, Schweiz. 1995–2002 Gruppenleiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben. Seit 2002 Professor für Molekularbiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).