



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Strategies for the improvement of genome editing in *Arabidopsis thaliana*

Strunks, G.D.

Citation

Strunks, G. D. (2019, September 11). *Strategies for the improvement of genome editing in Arabidopsis thaliana*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/77743>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/77743>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/77743> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Strunks, G.D.

Title: Strategies for the improvement of genome editing in Arabidopsis thaliana

Issue Date: 2019-09-11

Chapter 7

Samenvatting

Gary Strunks

Dubbelstrengs breuken (DSB-en) zijn één van de meest schadelijke vormen van DNA schade die, indien niet gerepareerd, genomische instabiliteit en mutaties kunnen veroorzaken. Cellen hebben complexe en zeer geconserveerde mechanismen geëvolueerd om DSB-en te kunnen repareren en zo de genomische integriteit in stand te houden. Er zijn twee hoofdroutes voor DSB-reparatie: Niet-Homologe End Joining (NHEJ) en Homologe Recombinatie (HR). Reparatie via NHEJ kan soms resulteren in mutaties (inserties of deleties) op of rond de plaats van de breuk. HR zorgt voor een accurate DSB-reparatie door gebruik te maken van homologe DNA sequenties. In hogere eukaryoten wordt het grootste deel van somatische DSBs gerepareerd via NHEJ, omdat dit mechanisme in de gehele celcyclus beschikbaar is. HR is daarentegen afhankelijk van de beschikbaarheid van homologe DNA sequenties op specifieke momenten in de celcyclus (1).

Begrip van de NHEJ en HR-herstelroutes is van groot belang voor toepassingen van gerichte mutagenese en gen targeting (GT) in de moleculaire biologie en biotechnologie. **Hoofdstuk 1** geeft een gedetailleerd overzicht van de huidige kennis van DSB-reparatie via NHEJ en HR, alsook van het gebruik van deze herstelroutes in “genoomediting” in planten. De komst van kunstmatige sequentie-specifieke nucleasen (SSN-en) zoals zinc-finger nucleasen (ZFN-en), TALENs en het CRISPR/Cas systeem heeft ervoor gezorgd dat gerichte mutagenese routinematig toegepast kan worden in de plantenbiotechnologie. De ontwikkeling en toepasbaarheid van GT als genoomediting methode is echter veel lastiger gebleken. Dit komt door twee obstakels: de lage HR frequentie in somatische cellen en de lage transformatie efficiëntie in planten. Hoewel het via een aantal benaderingen was gelukt om de efficiëntie van GT te verhogen, zoals door het gebruik van SSNs en door manipulatie van de NHEJ en HR machinerie, bleven GT frequenties in het algemeen onder de 1% (2, 3). Het is daarom van belang dat er nieuwe methoden ontwikkeld worden om GT een efficiënte en haalbare toepassing te maken voor plantenbiotechnologie.

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van een *in planta* GT systeem als poging om de twee obstakels van lage HR frequentie in somatische cellen en lage transformatie efficiëntie in planten te overwinnen. Het *in planta* GT systeem is gericht op het uitvoeren van GT in meiocyten, cellen met een van nature hogere HR efficiëntie. De eerste stap in de ontwikkeling van dit systeem was de constructie en selectie van efficiënte SSNs. **Hoofdstuk 2** beschrijft het testen van twee klassen SSNs: TALENs en CRISPR/Cas9, ontwikkeld voor het maken van gerichte mutaties in de Arabidopsis genen *CRU3* en *ADH1*. Het CRISPR/Cas9 systeem presteerde duidelijk beter voor beide genen dan de TALENs, en presteerde het beste met een

GG sequentie aan het 3' uiteinde van de protospacer. Deze resultaten waren in overeenstemming met studies in *C. elegans* en humane cellen (4, 5) en kunnen wijzen op een algemene regel voor meer optimaal protospacerontwerp. De ontworpen CRISPR/Cas9 constructen voor *CRU3* en *ADH1* waren voldoende efficiënt voor gerichte mutagenese.

Het ophelderen van de interactie tussen NHEJ en HR in planten kan meer inzicht geven in hoe deze routes kunnen worden benut voor “genome editing”. In **hoofdstuk 3** hebben we gerichte mutagenese uitgevoerd met CRISPR/Cas9 voor de Arabidopsis *CRU3* en *PPO* genen en de hersteluitkomsten geanalyseerd in planten die deficiënt zijn voor de klassieke NHEJ factor KU80 en de alternatieve end joining (A-EJ) factoren PARP1 en PARP2. Afwezigheid van KU80 resulteerde in grotere deleties en bevestigde een rol voor KU80 in de preventie van DSB-uiteinde resectie. De afwezigheid van PARP1/2 leek echter geen significant effect te hebben op de hersteluitkomsten, wat duidde op een activiteit van een KU- en PARP-onafhankelijk A-EJ mechanisme. We stelden voor dat Polymerase θ (POLQ) betrokken is bij deze activiteit, omdat POLQ een essentiële factor is voor willekeurige T-DNA integratie bij DNA breuken in *Arabidopsis thaliana* (6).

Omdat de GT frequentie in hogere planten laag is, zijn hoge transformatiefrequenties voor de reparatiesjabloon nodig voor GT experimenten. Veel gewassen kunnen echter niet gemakkelijk worden getransformeerd. Om deze beperking te ondervangen, ontwikkelde de groep van Holger Puchta de *in planta* GT strategie (7). Deze strategie is gebaseerd op de gelijktijdige inductie van een DSB op een gen van interesse en DSB-inductie op sequenties flankerend aan een stabiel geïntegreerd reparatiesjabloon. Dit resulteert in het vrijkomen van het reparatiesjabloon uit het genoom voor het gebruik van DSB herstel via HR. GT events die in de kiembaan plaatsvinden, worden doorgegeven aan de volgende generatie. Met GT frequenties van 0,14% (8) was er echter nog steeds behoefte aan verdere verbetering. In **hoofdstuk 4** beschrijven we een poging om de GT efficiëntie te verbeteren met de *in planta* strategie door GT te laten plaatsvinden in meiocyten, welke een intrinsiek hogere HR frequentie zouden moeten hebben en vervolgens zouden kunnen leiden tot meer overerfbare GT-events. We hebben ons *in planta* GT systeem ontwikkeld voor het zaad specifieke Arabidopsis *CRU3* gen op basis van het GT systeem ontwikkeld door Shaked *et al.* (9), en gebruikten het efficiënte Cas9-CRU construct beschreven in hoofdstuk 2 voor DSB inductie. Een GFP-sequentie in het GT-reparatiesjabloon werd gebruikt om “GT events” te detecteren als GFP-fluorescerende zaden. Om GT in meiocyten te laten plaats vinden, werd Cas9 tot expressie gebracht onder de *SPO11-1*-, *RPS5a*- en *SPL* promotors, die actief zijn tijdens meiose. Planten die een CRU-GFP-

reparatiesjabloon bevatten werden gekruist met planten die meiose/kiemlijn-specifieke Cas9-expressiecassettes bevatten. GT zou nu kunnen plaatsvinden in de meiocyten van deze F1 nakomelingen, en fluorescente F2 zaden moeten opleveren.

Opmerkelijk genoeg werd GFP-fluorescentie al gedetecteerd in F1 zaden afkomstig van alle kruisingen. Moleculaire analyse van planten verkregen uit deze zaden liet echter een onveranderd *CRU3* gen zien in deze planten. Zaden gevormd door deze F1 nakomelingen na zelfbevruchting (F2 zaden) waren ook niet fluorescent, maar echte “GT events” werden met PCR analyse wel gedetecteerd in F2 planten. Dergelijke “GT events” werden met name gedetecteerd in planten waarin de reparatiesjabloon uit het genoom kon worden geknipt, wat suggereert dat excisie van het reparatiesjabloon GT bevordert. Dit is ook in eerder onderzoek aangetoond (3, 7, 8), maar het is geen vereiste (10). “GT events” die werden gedetecteerd met PCR analyse konden niet worden bevestigd met Southern blot analyse. Dit kan erop duiden dat de gedetecteerde recombinaties somatische gebeurtenissen waren die slechts in een klein aantal somatische cellen voorkwamen, en daarom alleen detecteerbaar waren met PCR en niet met Southern blot. Dit is ook waargenomen door anderen (11). Het is ook in overeenstemming met de waarneming dat de meeste somatische mutaties, die plaatsvonden in F2 planten die Cas9 constitutief tot expressie brachten niet overerfbaar waren.

Naast *in planta* GT werden ook andere manieren onderzocht om de GT efficiëntie te verbeteren. **Hoofdstuk 5** beschrijft pogingen om planten met een hogere GT frequentie te identificeren met behulp van de “genome interrogation” methode. Eerder werd deze methode met succes toegepast in *Arabidopsis* om nieuwe fenotypen te ontdekken, waaronder verhoogde somatische HR, hoge zouttolerantie en verbeterde groeikenmerken (12–14). We gebruikten in onze GT experimenten een collectie plantenlijnen met 3F-EAR “genome interrogation” effectoren. GT experimenten (voor het *PPO* locus) met deze planten leverde een aantal “GT events” op, waaruit de 3F-EAR sequenties konden worden geïsoleerd. Met de geïsoleerde 3F-EAR sequenties werden opnieuw planten getransformeerd, zodat gereconstitueerde 3F-EAR planten werden verkregen.

Bij screening voor GT (opnieuw op het *PPO* locus) in deze gereconstitueerde 3F-EAR planten, detecteerden we een toename in GT frequentie in planten die het 3F-EAR4 construct bevatten. We konden echter geen significante GT verbetering vinden in gereconstitueerde 3F-EAR4 planten wanneer GT was gericht op de *CRU3* en *ADH1* genen. Op basis van deze resultaten kunnen we niet uitsluiten dat 3F-EAR4 inderdaad voor een GT verbetering kan zorgen, maar om statistisch significante GT frequenties te vinden moet dit experiment op

grotere schaal worden uitgevoerd. Hoewel “genome interrogation” een krachtige methode is gebleken voor het vinden van nieuwe fenotypen, bleek het gebruik van deze methode in combinatie met GT experimenten op grotere schaal tijdrovend en logistiek uitdagend te zijn.

Concluderend beschrijft dit proefschrift de ontwikkeling van nieuwe tools voor de verbetering van “genome editing” in planten, in het bijzonder GT. Het combineren van kiemlijn-specifieke Cas9 expressie en inactivatie of repressie van NHEJ sleutelcomponenten zoals POLQ (6, 15) zou uiteindelijk kunnen leiden tot GT frequenties die het mogelijk maken om genmodificatie en genvervanging routinematig toe te passen in land- en tuinbouwgewassen.

Referenties

1. Mao Z, et al. (2008) DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 7(18):2902–2906.
2. Steinert J, Schiml S, Puchta H (2016) Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. *Plant Cell Rep* 35(7):1–10.
3. Wolter F, Klemm J, Puchta H (2018) Efficient in planta gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus*. *Plant J* 94(4):735–746.
4. Farboud B, Meyer BJ (2015) Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics* 199:959–971.
5. Malina A, et al. (2015) PAM multiplicity marks genomic target sites as inhibitory to CRISPR-Cas9 editing. *Nat Commun* 6:10124.
6. van Kregten M, et al. (2016) T-DNA integration in plants results from Polymerase Theta-mediated DNA repair. *Nat Plants* 2:1–6.
7. Fauser F, et al. (2012) In planta gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(19):7535–40.
8. Schiml S, Fauser F, Puchta H (2014) The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. *Plant J* 80:1139–1150.
9. Shaked H, Melamed-Bessudo C, Levy AA (2005) High-frequency gene targeting in Arabidopsis plants expressing the yeast RAD54 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34):12265–12269.
10. de Pater S, Klemann BJPM, Hooykaas PJJ (2018) True gene-targeting events by CRISPR/Cas-induced DSB repair of the PPO locus with an ectopically integrated repair template. *Sci Rep* 8(1):3338.
11. Feng Z, et al. (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(12):4632–7.
12. Lindhout BI, Pinas JE, Hooykaas PJJ, Van Der Zaal BJ (2006) Employing libraries of zinc finger artificial transcription factors to screen for homologous recombination mutants in Arabidopsis. *Plant J* 48(3):475–483.
13. van Tol N, Pinas J, Schat H, Hooykaas PJJ, van der Zaal BJ (2016) Genome interrogation for novel salinity tolerant Arabidopsis mutants. *Plant Cell Environ*. doi:10.1111/pce.12805.

14. Tol N Van, et al. (2017) Enhancement of Arabidopsis growth characteristics using genome interrogation with artificial transcription factors. *PLoS One* 12(3):e0174236.
15. Mara K, et al. (2019) POLQ plays a key role in the repair of CRISPR / Cas9-induced double-stranded breaks in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytol* 222:1380–1391.

