

Hintergrund: Was ist CRISPR/Cas?

Der Text versucht über eine detailliertere Darstellung der CRISPR/Cas-Technik die üblichen vereinfachenden Vorstellungen zu präzisieren. Dabei wurden längst nicht alle möglichen Aspekte berücksichtigt. Bei dem folgenden Text handelt es sich um eine gekürzte und vereinfachte Version des Fact-Sheets „Hintergrund: CRISPR/Cas (Technik)“ von Katharina Kawall/ Fachstelle Gentechnik und Umwelt (2018)¹.

Das CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/ Cas (CRISPR-associated)-System wurde in Bakterien entdeckt und dient dort der Immunabwehr gegen eindringende Viren. Die Forschung dazu hat gezeigt, dass das System auch als molekularbiologische Methode genutzt und in verschiedenen Organismen angewandt werden kann. Im Labor wird das CRISPR/Cas-System dazu verwendet, um möglichst zielgerichtet Veränderungen am Erbgut eines Organismus vorzunehmen (Genom Editierung). Die Methode wird derzeit intensiv weiterentwickelt und wird vor allem in der Pflanzen- und Tierzucht, der medizinischen Forschung und der Grundlagenforschung angewendet.

Ursprung von CRISPR/Cas in Bakterien

In Bakterien dienen CRISPR/Cas-Systeme der Immunabwehr gegen eindringende Viren. CRISPR/Cas hilft Bakterien bei der „Erinnerung“ an zurückliegende Virusinfektionen und als Verteidigungsstrategie bei einer erneuten viralen Infektion. Vereinfacht gesagt werden Stücke aus dem Erbgut der Viren in das Erbgut der Bakterien integriert, was die Bakterien bei einer wiederholten Infektion mit den Viren befähigt, das Genom der Viren zu erkennen und zu zerschneiden. Dieses bakterielle System wurde eingehend untersucht und für molekularbiologische Anwendungen im Labor angepasst. Dabei wird das CRISPR/Cas-System aus der ursprünglichen Funktion in Einzellern herausgelöst und für die Anwendung in Zellkulturen und mehrzelligen Organismen genutzt. CRISPR/Cas-Systeme kommen natürlicherweise in vielen verschiedenen Bakterien-Gattungen vor, jeweils mit ihren eigenen strukturellen und enzymatischen Eigenschaften. Wissenschaftler*innen nutzen dies, um CRISPR/Cas als molekularbiologische Technik so weiterzuentwickeln, dass immer mehr Bereiche des Erbguts gezielt erreicht und verändert werden können. Das am meisten genutzte CRISPR/Cas-System im Bereich Genome Editing ist CRISPR/Cas9 aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes*. Es werden aber auch andere CRISPR/Cas-Varianten wie CRISPR/Cpf1 als Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten des Genome Editing oder CRISPR/Cas13 zur Veränderung von RNA verwendet.

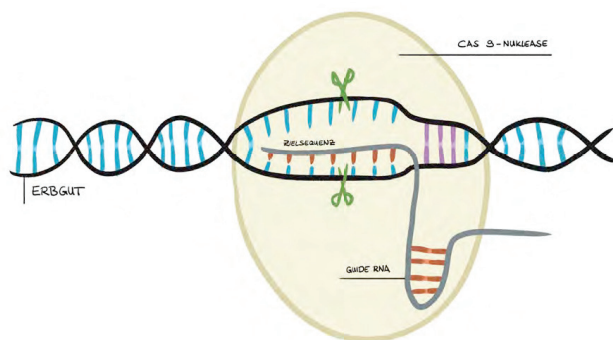


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von CRISPR/Cas9

Cas9 wird durch eine spezifische guide RNA an die Zielsequenz im Erbgut des Zielorganismus geleitet und führt dort einen Doppelstrangbruch ein. In lila ist die PAM (Protospacer Adjacent Motif)-Sequenz dargestellt. Sie fungiert als anfängliche Erkennungssequenz für das CRISPR/Cas9 System. Passt die davor liegende Sequenz zur guide RNA, wird Cas9 aktiv und schneidet dort.

Die Arbeitsweise von CRISPR/Cas

Das CRISPR/Cas-System besteht aus einer Erkennungs- und Schneidekomponente. Es gelangt zielgerichtet an eine bestimmte Stelle der DNA, schneidet sie dort und bewirkt am Ende eine Veränderung der Zielsequenz (siehe Abbildung 1).

¹ Die Fachstelle Gentechnik und Umwelt (FGU) bereitet relevante Informationen wissenschaftlich fundiert und allgemein verständlich auf. Sie ist von der Industrie unabhängig.

Originaltext mit Quellenangaben: https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/CRISPR_Technik.pdf



Dem Zielbereich voran gestellt ist immer eine sogenannte PAM-Sequenz. Sie ist charakteristisch für jedes Cas-Enzym und notwendig für die anfängliche Erkennung und das Aufschmelzen des Zielbereichs. Das Cas-Protein spaltet die DNA im Zielbereich auf und führt einen Doppelstrangbruch ein. Proteine, die DNA-Stränge zerschneiden, werden auch Nukleasen genannt. Die Zelle erkennt den entstandenen Doppelstrangbruch als Schaden und aktiviert zelleigene DNA-Reparaturmechanismen (siehe unten). Durch ihre Arbeit wird letztlich die DNA-Sequenz verändert.

Einige dieser Reparaturmechanismen arbeiten mitunter ungenau. Dabei können falsche Basen (die Bausteine der DNA) an dem Zielbereich eingebaut werden, kleinere Bereiche der DNA herausgenommen oder kleine DNA-Stücke eingeführt werden. So können eine bis wenige Basenpaare der DNA verändert und Gene (die funktionellen Einheiten der DNA) ausgeschaltet beziehungsweise manipuliert werden. Diese Technik wird häufig als SDN-1 (site directed nuclease-1) bezeichnet (siehe Abbildung 2) und meint also eine ortsspezifische, aber zufällige Veränderung weniger Basenpaare.

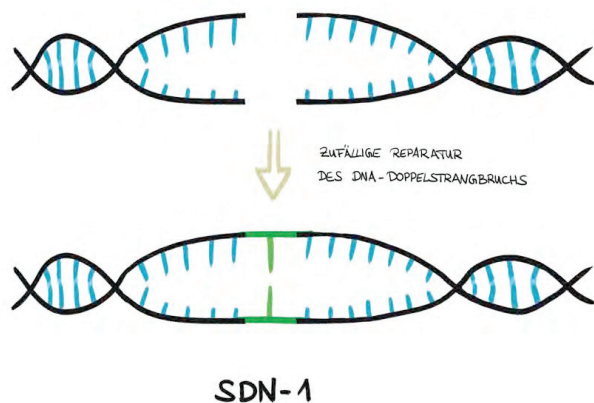


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Veränderung durch SDN-1 (Site-Directed-Nuclease-1).

Die durch das CRISPR/Cas-System (und anderen Nukleasen des Genome Editing) eingeführten Doppelstrangbrüche der DNA an einer Zielsequenz führen zur Aktivierung von zelleigenen Reparaturmechanismen. Bei der SDN-1 Technik können durch die Aktivierung der NHEJ-Reparatur (Non-Homologous End Joining) kleine Veränderungen an der Basensequenz der DNA eingeführt werden. Die NHEJ-Reparatur arbeitet häufig fehlerhaft und kann dazu führen falsche Basen an der Zielsequenz einzubauen oder kleinere DNA-Bereiche einzuführen oder herauszunehmen.

CRISPR/Cas kann auch dazu verwendet werden, gezielte und größere Veränderungen an der DNA vorzunehmen. Hierfür werden im Labor unterschiedlich lange DNA-Stücke hergestellt, die als Reparatur-Vorlagen für den Bereich rund um den eingeführten DNA-Bruch dienen. Die DNA-Stücke werden zusammen mit dem CRISPR/Cas-System in die Zelle eingeschleust und sind mit dem Zielbereich der DNA bis auf die erwünschte Veränderung der Basen identisch. Die zelleigenen Reparaturmechanismen erkennen die Reparatur-Vorlage und bauen diese in das Erbgut ein. Natürlicherweise, also ohne extern eingebrachte DNA-Stücke, werden Doppelstrangbrüche der DNA anhand des unversehrten Schwesterchromatids repariert.

Das Einführen von gerichteten Veränderungen wird als SDN-2 Technik (kürzere Abschnitte) und SDN-3 Technik (Einführen längerer Abschnitte) bezeichnet (vergleiche Abbildung 3).

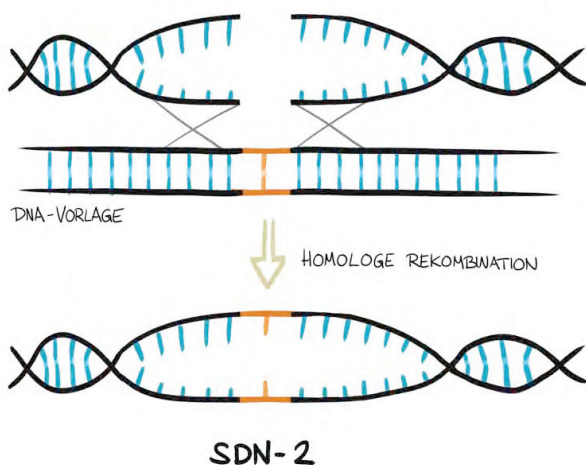


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Veränderung durch SDN-2 und SDN-3

Bei der SDN-2 /SDN-3 -Technik werden zusammen mit den CRISPR/Cas-Komponenten auch synthetisch hergestellte DNA-Vorlagen mit in die Zelle eingebracht, die der Zielsequenz zu großen Teilen identisch sind. Durch den DNA-Doppelstrangbruch können die Komponenten der zelleigenen HDR (Homology Directed Repair)-Reparatur aktiviert werden und zum Einbau der DNA-Vorlage in die Zielsequenz führen. Hierdurch wird es möglich in der DNA-Vorlage gezielte Veränderungen an der Zielsequenz einzuführen.



Das CRISPR/Cas-System kann in unterschiedlichen Formen in der Zelle eingebracht werden

Grundsätzlich kann das CRISPR/Cas-System in unterschiedlichen Formen in die Zelle eingebracht werden: 1.) in Form von DNA, die für die Nuklease Cas und die guide RNA kodiert, oder 2.) als bereits im Labor hergestellter Ribonukleoprotein-Komplex (fertiger Komplex aus dem Cas-Protein und der guide RNA). Das Verhalten der beiden Formen ist unterschiedlich: 1.) Wird die DNA von Cas eingeführt, kann diese entweder in das Erbgut der Zelle integriert und an nachfolgende Zellen weitergegeben werden oder sie liegt als vorübergehendes, zusätzliches Stück DNA im Zellkern vor. Erst in der Zelle wird mit der eingebrachten DNA das Cas-Protein gebildet, welches dann mit Hilfe der guide RNA die Zielsequenz erkennt und schneidet. 2.) Im Fall, dass CRISPR/Cas als Proteinkomplex in die Zelle eingeschleust wird, kann dieser direkt in der Zelle aktiv werden. Der Proteinkomplex wird jedoch relativ schnell von der Zelle abgebaut und wird nicht an nachfolgende Zellen weitergegeben.

Beispielhafte Verfahren, um das CRISPR/Cas-System in pflanzliche Zelle einzubringen

Es gibt verschiedene Techniken, wie das CRISPR/Cas-System in die Zellen des Ziel-Organismus eingeschleust werden kann. Die Wahl dieser Technik hängt sowohl vom jeweiligen Zielorganismus als auch von der Form (DNA/ Protein) ab. Häufig wird das natürlicherweise im Boden vorkommende Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* genutzt, um die DNA des CRISPR/Cas-Systems in pflanzliche Zellen einzuführen.

Das Bakterium infiziert die Zielpflanze und überträgt die DNA des CRISPR/Cas-Systems in die Zellen. Pflanzliche Zellen besitzen eine undurchlässige Zellwand, die bei einigen Techniken zunächst entfernt werden muss, damit die darunterliegende Zell-Membran zugänglich wird. Eine pflanzliche Zelle ohne Zellwand wird auch als Protoplast bezeichnet. Bei vielen Pflanzenarten können diese Verfahren allerdings nicht angewendet werden, da von ihren Zellen gegenwärtig noch keine Protoplasten hergestellt werden können. Eine weitere Möglichkeit zum Einbringen von DNA stellt der Partikelbeschuss der Zellen mit sehr kleinen Metallpartikeln (Gold, Wolfram) dar. Die Partikel sind mit der DNA des CRISPR/Cas-Systems beschichtet und werden mit hohem Druck in die pflanzlichen Zellen hineingeschossen. Dabei wird die DNA im Zellkern abgeladen, wenn dieser durch die Partikel getroffen wurde. Beide Verfahren (*Agrobacterium* Transformation und Partikelbeschuss) werden auch in der bisherigen Gentechnik verwendet. Hierbei erfolgt der Einbau der Gene nicht gezielt, wodurch es viele ungewollte Veränderungen im Erbgut geben kann.

Das Potential von CRISPR/Cas

Genome Editing

Das Forschungsfeld um CRISPR/Cas entwickelt sich derzeit rasant weiter. Am häufigsten wird CRISPR/Cas bisher genutzt, um am Erbgut von Zielorganismen gezielt kleine Veränderungen einzelner Basenpaare vorzunehmen, kleine DNA-Bereiche zu entfernen oder neue einzuführen (z.B. ganze Gensequenzen). Damit können Gene stillgelegt werden, zusätzliche Gene eingebaut und die Genexpression, also das An- beziehungsweise Abschalten von Genen, verändert werden.

Mit dem CRISPR/Cas-System ist es zudem möglich, mehrere Zielsequenzen der DNA durch das Einführen unterschiedlicher guide RNAs gleichzeitig zu verändern (vorwiegend durch SDN-1), was als Multiplexing bezeichnet wird. Durch Multiplexing können mit dem Einsatz von mehreren guide RNAs mehrere Gene gleichzeitig ausgeschaltet werden. Mit CRISPR/Cas ist es außerdem auch möglich, alle DNA-Bereiche zu verändern, die sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind. Speziell Pflanzen haben oft ein redundantes Genom, das heißt Gene liegen oft mehrfach und als Varianten (Allele) vor. Alle Gen-Sequenzen/Gen-Cluster mit den gleichen Gen-Informationen können auf einmal verändert werden, so dass keine Sicherheitskopie mehr verbleibt.

CRISPRa/CRISPRi

Es wurden CRISPR/Cas-Systeme mit einer inaktiven Schneidekomponente (dCas9, dead Cas9) entwickelt. Wenn eine dCas9, von der guide RNA geleitet, an die regulatorischen DNA-Bereiche eines Zielgens bindet, behindert es dort den Zugang und damit die Genexpression; d.h., das entsprechende Protein wird nicht mehr gebildet. Dabei wird die DNA-Sequenz nicht verändert und der Einsatz von dead Cas9 ist auf der Ebene der DNA nicht nachweisbar. Alternativ können an das Cas9 Enzyme gekoppelt werden, die durch Änderung der Zielsequenz die Genexpression aktivieren oder inaktivieren (CRISPRa/CRISPRi).



Base Editing

Durch die Entwicklung einer Methode namens Base Editing wurde die Möglichkeit geschaffen, ohne Strangbruch und damit unabhängig von der HDR-Reparatur, gezielt einzelne Basen der Zielsequenz zu verändern. So kann ein Basenpaar gezielt in ein anderes Basenpaar enzymatisch umgewandelt werden. Hierfür wurde wiederum dCas9 an Enzyme gekoppelt, welche bestimmte Basen (z.B. Adenine) biochemisch über weitere enzymatische Schritte in eine andere Base (z.B. Guanin) umwandeln. So wird aus dem ursprünglichen Basenpaar A-T ein G-C. Die Base Editing-Systeme sind jedoch noch nicht weit genug entwickelt, um die Zielsequenz punktgenau zu verändern. Es kann passieren, dass alle Basen derselben Art (z.B. alle Cytosine) in einem Umkreis von bis zu 5 Basen an der Zielsequenz verändert werden. Derzeit werden Base Editing-Systeme entwickelt, die diese Limitierung aufheben sollen.

RNA Editing

Mittlerweile kann auch RNA mit Hilfe von CRISPR/Cas gezielt manipuliert werden. In einer Zelle fungiert RNA (unter anderem) bei der Übersetzung von DNA-Sequenzen (Genen) in die entsprechenden Proteine als Zwischenprodukt. Die DNA-Sequenz wird von zellulären Komponenten als Vorlage verwendet, um RNA-Stücke zu bilden, die dann genutzt werden, um Proteine herzustellen. Proteine sind aus einer Kette von Aminosäuren aufgebaut. Jede Aminosäure wird von bestimmten Kombinationen aus 3 Basen kodiert, was heißt, dass die Abfolge der Basensequenz der DNA die genaue Reihenfolge der Aminosäuren in einem Protein festlegt. Die Basenkodierung aller natürlichen Aminosäuren bildet zusammen den genetischen Code; er ist - von Ausnahmen abgesehen - in allen Organismen gleich, er ist universell.

Die Cas-Variante Cas13a funktioniert ähnlich wie die Cas9, nur dass Cas13a RNA statt DNA schneidet. Die zugehörige guide RNA heißt hier crRNA (crRNA steht für CRISPR RNA). Damit kann die Bildung bestimmter Proteine auf Ebene der RNA reguliert bzw. die Menge an Protein vermindert werden. Eine enzymatisch inaktive Version von Cas13 (dCas13, dead Cas13) kann, in Anlehnung an dCas9, eine Ziel-RNA spezifisch binden, ohne diese aber zu spalten. dCas13 kann dazu genutzt werden, um gekoppelte Enzyme an die Zielsequenz zu transportieren und bestimmte Arten von Basen in eine andere Base zu verändern (z.B. Adenosin in Inosin). Damit können Veränderungen an der RNA und Proteinen vorgenommen werden, ohne das Erbgut dauerhaft in seiner Basensequenz zu verändern. Die durch CRISPR/Cas 13 veränderte RNA wird dann natürlicherweise im Organismus abgebaut.

Epigenetische Veränderung durch CRISPR/Cas (Epigenome Editing)

Der Begriff Epigenetik beschreibt Veränderungen am Erbgut, die nicht direkt an der DNA-Sequenz erfolgen. Epigenetik reguliert die Expression von Genen und bestimmt damit das Schicksal jeder individuellen Zelle eines Organismus. Die genomische DNA ist eng assoziiert mit regulatorischen Proteinen (Histone), welche einen Einfluss auf die räumliche Struktur der DNA und damit auf die Regulation der Genexpression haben können. Histone können unterschiedliche kleine Anhänge tragen (Histonmodifikationen) und damit die Expression von Genen an- oder abschalten. Beim sogenannten Epigenome Editing wird CRISPR/Cas genutzt, um mit Hilfe von guide RNA und an dead Cas9 gekoppelte Enzyme die Histone bestimmter DNA-Zielsequenzen zu verändern. Solche Veränderungen können die Eigenschaften der DNA-Histon-Komplexe und damit auch die Genregulation beeinflussen. Ein weiterer „epigenetischer Faktor“ neben den Histonen sind bestimmte Markierungen an den Basen der DNA (z.B. Methylgruppen an der Base Cytosin): ob bestimmte Basen markiert sind oder nicht, hat Einfluss auf die Genexpression. Auch hier wurde das dCas9-System bereits genutzt, um Markierungen herbeizuführen oder zu entfernen.

Nicht alle Bereiche des Erbguts können durch CRISPR/Cas verändert werden. Die guide RNA ist der Wegweiser des CRISPR/Cas Systems und leitet die Nuklease an die gewünschte Zielsequenz. Eine Voraussetzung für das Erkennen der Zielsequenz ist eine 3 Basenpaar lange Sequenz (die sogenannte PAM-Sequenz), die vor der eigentlichen Zielsequenz liegt. Ohne diese kurze Erkennungssequenz ist es nicht möglich, dass die DNA-Doppelhelix geöffnet wird und die guide RNA vollständig binden kann. Beim Design einer geeigneten guide RNA anhand von Referenzgenomen tritt daher die Limitierung auf, dass vor der eigentlichen Zielsequenz eine PAM-Sequenz vorhanden sein muss. Das heißt, dass nicht alle Bereiche des Erbguts frei durch das CRISPR/Cas-System verändert werden können.

Um die Auswahl an möglichen Zielsequenzen zu erhöhen, werden neue Cas-Nukleasen isoliert und weiterentwickelt, die unterschiedliche Erkennungssequenzen benötigen. Diese Cas-Nukleasen werden aus verschiedenen Bakterienstämmen isoliert und für den molekularen Einsatz im Labor genutzt.

