

1. Prinzip und Revolution

Den entscheidenden Durchbruch für die Anwendung der CRISPR/Cas-Technologie erzielten EMMANUELLE CHARPENTIER und JENNIFER DOUDNA im Jahr 2012. Es gelang ihnen das ursprünglich bakterielle Abwehrsystem in eine vereinfachte Form zu überführen, die im Labor gezielt zur Veränderung DNA einsetzbar ist, vor allem auch bei Eukaryoten. Der Möglichkeiten sind in der vollständigen Tragweite noch gar nicht absehbar. Nach außergewöhnlich kurzer Zeit, bereits im Jahr 2020 bekamen beide Forscherinnen den Nobelpreis für Chemie „für die Entwicklung einer Methode zur Genom-Editierung.“ Die Erkenntnisse von DOUDNA und CHARPENTIER, die die neue Ära ermöglichten, lauten zusammengefasst:

1. Das CRISPR/Cas9-System schneidet auch eukaryotische DNA. Die hierfür benötigte RNA kann leicht und kostengünstig hergestellt werden..
2. Die zu verändernde Stelle der DNA kann weitgehend frei und hochselektiv über die RNA-Sequenz angesteuert werden.
3. Die DNA-Stelle kann in vielfacher Weise gezielt und bleibend verändert werden, man spricht deshalb allgemein von der **Genom-Editierung (genome editing)**. Meist wird an der Stelle die editiert werden soll, zuvor ein Schnitt durchgeführt, weshalb man bei CRISPR/Cas9 auch von der „**programmierbaren Genschere**“ spricht. Dort kann man dann Basensequenzen entfernen, ergänzen oder verändern.



Abb. 1.1: EMMANUELLE CHARPENTIER und JENNIFER DOUDNA Q:

wikicommons, A. links (Charpentier): Bianca Fioretti&Hallbauer, A. rechts (Doudna): Christopher Michel

Zentrale Innovation ist die Nutzung einer Einzelstrang-RNA – der sogenannten (single) guide-RNA (sgRNA oder gRNA) –, die die beiden natürlich vorkommenden RNA-Moleküle (crRNA und tracrRNA) zu einer einzigen, funktionsfähigen Einheit fusioniert.

Diese sgRNA dient dem Cas9-Endonuklease-Komplex als programmierbare Zielvorgabe, indem sie über Basenpaarung eine spezifische DNA-Sequenz erkennt. Cas9 durchtrennt die Ziel-DNA dabei exakt an einer Stelle, vorausgesetzt, unmittelbar stromabwärts befindet sich das **Protospacer adjacent motif (PAM)**. Beim häufigsten eingesetzten Cas-Protein, dem Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*, besteht das PAM aus der Sequenz NGG (N = beliebiges Nucleotid).

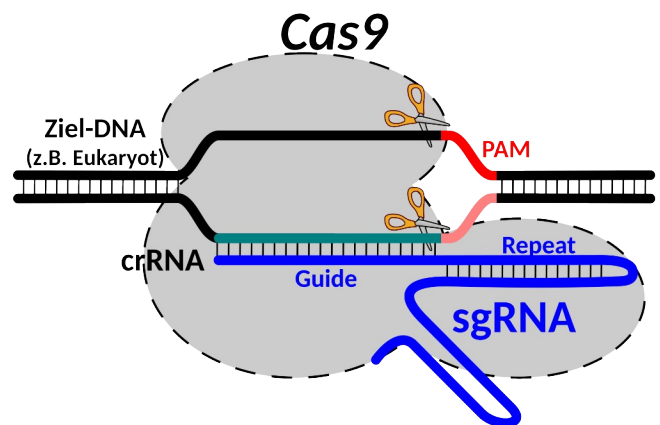


Abb. 1.2: Single Guide RNA (sgRNA) mit der Guide- und der Repeat-Region. Q: eW

2. Möglichkeiten der Einflussnahme auf Erbgutebene des CRISPR-Cas9-Systems (mit unverändertem Cas9)

Nach dem Schnitt durch Cas9 wird die **natürliche DNA-Reparatur der Zelle** aktiv. Dabei kommt es zu den gewünschten Veränderungen. Es gibt vor allem zwei Möglichkeiten:

1. **Genom-Editierung (Genome Editing):** Gezielte Veränderung der DNA: Insertion, Deletion, Ersetzung von einzelnen Basen bis ganzer (artfremder) Gene (vgl. Abb. 3.1)
 - **Gen-Knockout:** Vollständige Inaktivierung (engl. knock-out = „außer Gefecht setzen“) eines Gens durch Deletion oder Insertion einzelner Basen. (vgl. Abb. 3.1). Diese Variante der Genom-Editierung

beruht auf der gewünschten Fehleranfälligkeit der zelleigenen Reparatur, der *non-homologous end-joining* (NHEJ, deutsch: nicht-homologe Verknüpfung der Enden) .

Anmerkung (in Abb. 3.1 nicht dargestellt): Wenn hier zusätzlich größere DNA-Fragmente vorliegen, können sie beim Zusammenbau integriert werden. Wenn in der Ziel-DNA in der Nähe ein weiterer Schnitt durchgeführt wurde, kann der herausgeschnittene Bereich verloren gehen.

- **Veränderung einzelner oder weniger Basen „gezielte Mutation“ und ganzer Gene (Gen-**

Knockin) Hierzu wird beim Schnitt zusätzlich ein DNA-Fragment mit der gewünschten Mutation oder ganzen Genen eingebracht, flankiert von DNA-Bereichen mit identischer („homologer“) Basensequenz wie an der Schnittstelle. Durch einen Fehlerkorrektur-Mechanismus („homologie Reparatur“), werden teile DNA-Fragments mit dem Mutationsbereichs mit verbaut. vgl. Abb. 3.1).

2. **Allgemeine Erhöhung der Mutationsrate an einem bestimmten Ort** durch Schneiden der DNA. Bei der Reparatur kommt es den gewünschten Fehlern. Ziel: Gezielte Erzeugung von vielen verschiedenen Mutanten in

einem bestimmten Gen und Auslese geeigneter Exemplare (z.B. Pflanzenzucht). Früher konnten Mutationen nur unspezifisch im gesamten Genom induziert werden.

In jedem Fall sollen **off-target-Effekte** vermieden werden, das Schneiden außerhalb der vorgesehenen Zielregionen. Off-Target-Effekte entstehen, wenn dort zufällig dieselbe oder eine sehr ähnliche Sequenz besitzen. Selbst bei einem gewissen Anteil an Basenfehlpaarungen kann es fälschlicherweise zum Schnitt kommen. Mithilfe von Sequenzdatenbanken kann man gezielt die Schneideregion so auswählen, dass es möglichst wenige off-target-Schnitte gibt.

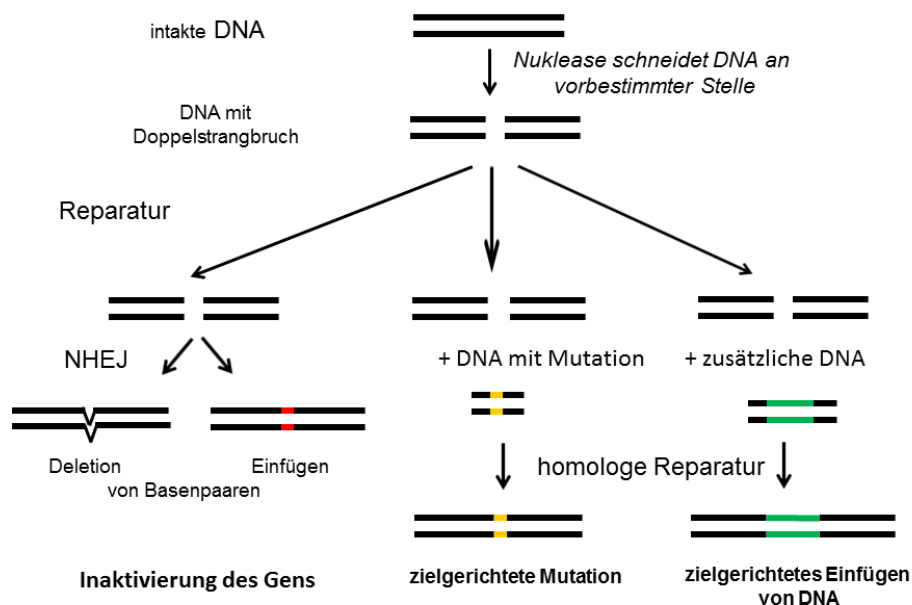


Abb. 2.1: Möglichkeiten der Genom-Editierung. Q: wikicommons A: Gerhard Ryffel

3. Herstellung und Einbringen des Schneidesystems am Beispiel von CRISPR-Cas9

Die Veränderungen werden heute meistens außerhalb des Organismus (in vitro) durchgeführt. Nach Veränderung werden die entnommenen Zellen anschließend wieder in den Organismus implantiert. Es werden aber zunehmend Methoden entwickelt, die direkt im Zielorganismus (z.B. Versuchstier) durchgeführt werden, in somatischen Zellen oder in der Keimbahn.

Typische Arbeitsschritte

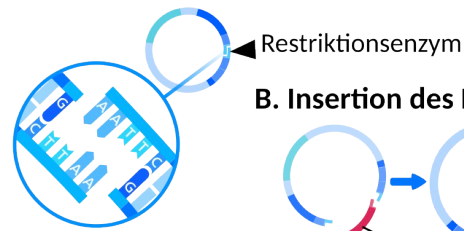
1. **„Designen“ der guide RNA:** D.h. Identifizierung einer einzigartigen Schnittstelle, um off-Target-Effekte auszuschließen. und Schließen auf die hierfür erforderlichen guide-Region der sgRNA. Wegen der notwendigen PAM-Sequenz des Cas9 von *Streptococcus pyogenes* (Sequenz: NGG, N = beliebiges Nucleotid) in unmittelbarer Nähe zur Schnittstelle ist man nicht ganz so frei - es gibt aber Alternativen zum diesem Cas9. Länge der konzipierten guide RNA: 20 - 30 bp.
2. Bei einem Händler wird die Sequenz in Form von Einzelsträngen bestellt. Solche DNA-Einzelstränge werden **Oligonucleotide** (kurz: **Oligos**) genannt und nahezu fabrikmäßig in kommerziellen Speziallaboren hergestellt. Hierfür bedient sich die Oligo-Fabrik Synthesetechniken aus der organischen Chemie, in denen jeweils das nächste gewünschte Nucleotid an das wachsende Oligo angehängt wird. Der Dienstleister fragt bei der Bestellung die gewünschte Nukleotidsequenz (z.B. 5'-GGATGATCGATGGATCGATC-3') ab. **Es werden immer zwei Einzelstränge bestellt, die komplementär zueinander sein (Oligo-Paar).** Das Oligo-Paar wird meist so synthetisiert, dass an den Enden **Sticky Ends (Überhänge)** vorhanden sind, die mit den gewünschten Restriktionsstellen im Plasmid kompatibel sind, in die es später eingeschleust wird (siehe unten).

3. **Insertion in ein Plasmid:** Die angelieferten Oligonukleotide werden erhitzt und langsam abgekühlt, damit sie sich zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment verbinden (*Annealing*). Das Plasmid wird mit dem entsprechenden Restriktionsenzym, das zu den Sticky Ends zum DNA-Fragment kompatibel ist, geschnitten. Nach der spontanen Anlagerung, werden die Enden mit DNA-Ligase verknüpft. Das Plasmid enthält bereits in der Regel einen Promotor, der die Expression der sgRNA in eukaryotischen Zellen steuert. Häufig enthält das gleiche Plasmid aus bereits das Cas9-Gen.

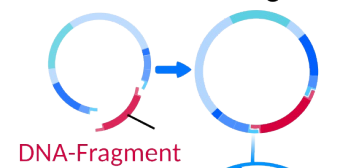
4. **Transformation und Kultivierung in Bakterien:** Das Plasmid mit der eingebrachten sgRNA-Sequenz wird in Bakterienzellen transformiert, zumeist *E. coli*. Diese Bakterien werden auf einem selektiven Medium kultiviert, damit nur diejenigen Zellen erhalten werden, die das Plasmid besitzen. Anschließend werden die Plasmide aus den Bakterienkulturen isoliert (**Plasmidpräparation**).

5. **Produktion der viralen Vektoren:** Zusammen mit Helferplasmiden mit den notwendigen Genen für die Virusproduktion, die im CRISPR/Cas-Plasmid aus Sicherheitsgründen selbst fehlen, werden sie in eine Produktionszelllinie (HEK-Zellen) transfiziert. [Transfektion: Einbringen von Fremd-DNA in Tierzellen].
 - **Variante A:** Die Zelllinie transkribiert nun die Plasmide. Sie produziert die Virus-Verpackungsbausteine und die sgRNA und die Cas9-mRNA. Durch Selbstorganisation entstehen fertige virale Partikel, die beide RNAs enthalten. Sie können abgeerntet werden.
 - **Variante B:** Diese Zelllinie exprimieren anhand der Helferplasmide die Virus-Verpackungsbausteine. Sie verpacken das CRISPR-Cas-Plasmid in die virale Partikel. Da die Helferplasmide nicht die Sequenzen enthalten, die in den Viren verpackt sind und das CRISPR-Cas-Plasmid keine Gene für die Bildung von Virus-Verpackungsbausteinen enthält, entstehen **replikationsdefekte virale Vektoren**. Das bedeutet, die gebildeten Viren können die Zielzellen infizieren und die CRISPR-Cas-Plasmide einschleusen, sich aber nicht selbst in den Zielzellen vermehren.
6. **Einbringen in die Zielzellen:** Nach Infektion der Zielzellen kommt es bei Variante A zur Translation und Bildung von Cas9-Protein. sgRNA ist ja bereits vorhanden. Bei Variante B bildet sich durch die Transkription erst die sgRNA und durch die Translation Cas9. In beiden Fällen entsteht die Bindung zwischen sgRNA und Cas9 spontan.

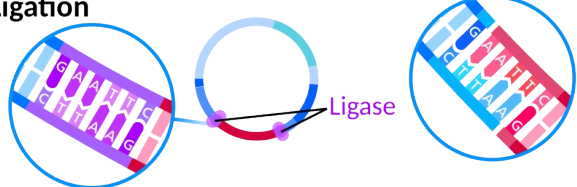
A. Aufschneiden des Plasmids



B. Insertion des Fragments



C. Ligation



D. Transformation. Selektive Kultivierung

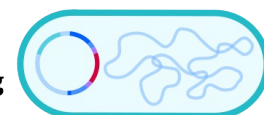


Abb. 3.1: Klonierung

Q: eW, basierend auf Grafik-Modulen von Kelvinsong von wikicommons.

Alternativen im Werkzeug und in der Einbringung

- Statt über virale Vektoren gibt es auch die Möglichkeit das intakte Schneidewerkzeug oder die CRIPR-Cas-Plasmide über **Mikroinjektion** oder **Elektroporation** in die Zelle zu bringen.
- Es gibt gentechnisch modifizierte Formen von Cas9, die eine alternative PAM-Sequenz benötigen oder die mehrere verschiedene PAM-Sequenzen tolerieren. Weitere gentechnisch veränderte Cas9-Versionen erzeugen Stick Ends oder besitzen gar keine Nuklease-Funktion mehr, sondern lagern sich nur an die DNA-Zielregion an und blockieren vorübergehend die Transkription.
- Statt Cas9 gibt es weitere nutzbare Cas-Protein(komplex)e. Die wichtigsten Alternativen (Stand: 2025):
 - **Cas12:** kleiner als Cas9. Vor allem in der grünen Gentechnik. Mehrere Subtypen. Einige davon ohne Notwendigkeit von PAM.
 - **Cas13:** Spalten spezifisch **RNA** (!) ⇒ z.B. zur RNA Editierung ohne Veränderung des Genoms. Zur gezielten Bekämpfung von RNA-Viren (antivirales Medikament).