

Das CRISPR-Fieber erobert die RNA-Welt: Ein bakterielles Verteidigungssystem ermöglicht die präzise Manipulation von DNA und RNA**

Andrea Rentmeister*

Cas9 · CRISPR · RNA · RNA-Erkennung ·
RNA-Manipulation

Die spezifische Modifikation einer Zielsequenz im Genom eines Organismus (Genom-Engineering) ist von unschätzbarem Wert für die Grundlagenforschung und beeinflusst auch unser tägliches Leben. Das Genom-Engineering findet Anwendung bei der Identifizierung der Funktion von Genen, sowie bei der Veränderung von Mikroorganismen und Nutzpflanzen. Es kann verwendet werden, um Krankheits-assoziierte Mutationen in Zellkulturen, Tiermodellen und in Zukunft möglicherweise auch in Menschen zu korrigieren. Schon seit längerer Zeit sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, wie man Gene in verschiedene Organismen einfügen oder daraus entfernen kann. Dieser Gentransfer ermöglicht es aber nicht, die Position der Insertion innerhalb des Genoms zu kontrollieren. Die präzise Manipulation einzelner Gene in Zellen und Organismen ist jedoch erforderlich, um unvorhersehbare und unerwünschte Effekte zu vermeiden und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Proteine mit großem Erfolg für die präzise Manipulation des Genoms entwickelt. Dazu gehören insbesondere die Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und die Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektor-nukleasen (transcription activator-like effector nucleases, TALENs), zusammengefasst in Lit. [1].

Innerhalb der letzten Jahre wurde dieser Forschungsbe-reich allerdings durch das CRISPR-System revolutioniert. Das CRISPR-System basiert auf RNA-vermittelter Erken-nung und funktioniert ebenso gut wie die Protein-basierten Ansätze, lässt sich aber schneller und einfacher etablieren.^[2] CRISPR steht für „clustered, regularly interspaced, short, palindromic repeats“ (gruppierte, in regelmäßigen Abstand vorkommende, kurze palindromische Wiederholungen) und stellt eigentlich ein adaptives bakterielles Verteidigungs-system gegen Fremd-Nukleinsäuren dar.^[3]

Sequenzen, die von eingedrungener Fremd-DNA stam-men, werden dabei in das bakterielle Genom integriert und dienen so als Aufzeichnung früherer Infektionen. Transkripte dieser Regionen können in Form eines Komplexes mit einer oder mehreren Proteinkomponenten (im einfachsten Fall mit einer einzelnen Endonuklease Cas9) komplementäre Ziel-DNA identifizieren und spalten.

Basierend auf dem einfachen Typ-II-CRISPR-System wurde die CRISPR-Technologie entwickelt, die sich als effi-ziente Methode zum programmierbaren Schneiden von dsDNA in vitro und in einer Vielzahl von Zellen und Orga-nismen erwiesen hat (Abbildung 1). Hierbei werden für das

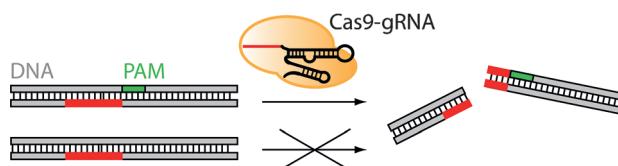


Abbildung 1. Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Cas9-gRNA. Cas9 kann dsDNA erkennen und schneiden, entsprechend dem in rot gezeigten Bereich der gRNA. Für die Erkennung und Spaltung durch Cas9 ist ein kurzes, an die Zielsequenz angrenzendes PAM (gezeigt in grün) auf dem Gegenstrang nötig.

Editieren eines Genoms lediglich zwei Komponenten benötigt: die Cas9-Nuklease und eine duale Guide-RNA (gRNA), bestehend aus einer für die Zielsequenz maßgeschneiderten CRISPR-RNA und einer unveränderlichen trans-aktivierenden CRISPR-RNA. Die Wahl der Zielsequenz wird lediglich durch die Notwendigkeit eines kurzen Motivs, genannt PAM (protospacer adjacent motif), in unmittelbarer Nähe limitiert. PAM ist speziespezifisch – z. B. erkennt das am häufigsten genutzte Typ-II-CRISPR-Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* die Sequenz 5'-NGG-3'. Eine Ziel-DNA ohne angrenzende PAM-Sequenz (wie das eigene Genom) wird durch CRISPR-Cas9 nicht geschnitten (Abbildung 1).

Da die CRISPR-Technologie erfreulich einfach und effi-zient bei der sequenzspezifischen Manipulation von DNA innerhalb ganzer Genome ist, hofften viele Forscher auf ein ähnliches System für die sequenzspezifische RNA-Manipu-lation. Eine ssRNA wird von dem gängigen *S. pyogenes*

[*] Prof. Dr. A. Rentmeister

Universität Münster, Institut für Biochemie und Exzellenzcluster Cells-in-Motion (EXC1003-CiM)
Wilhelm-Klemm-Straße 2, 48149 Münster (Deutschland)

[**] A.R. dankt Stefanie Kellermann für die Übersetzung des Manu-skripts aus dem Englischen und der Deutschen Forschungsge-meinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Emmy Noether-Programms (RE 2796/2) und innerhalb des Exzellenz-clusters Cells in Motion (DFG EXC 1003).

CRISPR-Cas9-System aber weder gebunden noch geschnitten, wenngleich RNA-Erkennung bei ein paar anderen CRISPR/Cas-Systemen gefunden werden konnte.^[4]

Jennifer Doudna und Mitarbeiter entdeckten bei einer detaillierten Untersuchung der Cas9-Target-Erkennung einen Trick, mit dem sie *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 für RNA nutzbar machen können.^[5] Das PAM (in dsDNA auf dem entgegengesetzten Strang nahe der Zielsequenz lokalisiert, Abbildung 1) ist entscheidend für die Rekrutierung von Cas9-gRNA und das Auslösen der RNA-Spaltung.^[6] Die Erkennung durch PAM löst die Katalyse möglicherweise durch allosterische Wechselwirkung aus, denn ssDNA-Targets können plötzlich geschnitten werden, wenn ein PAM-präsentierendes Oligonukleotid (PAMmer) separat („in trans“) hinzugefügt wird.^[6a] Tatsächlich bewirkte die Zugabe eines DNA-PAMmers in trans zu einem ssRNA-Target die Spaltung der Ziel-RNA (Abbildung 2).^[5] Auf diese Weise kann

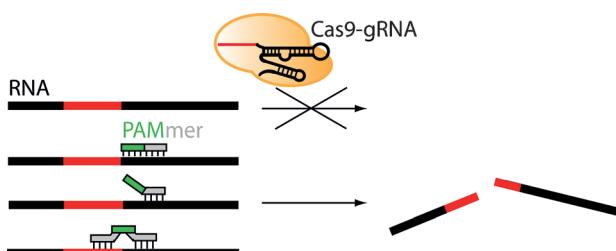


Abbildung 2. Sequenzspezifische Spaltung von RNA durch Cas9-gRNA. Normalerweise wird ssRNA nicht von *S. pyogenes* Cas9-gRNA gespalten. Zugabe eines kurzen DNA-Oligonukleotids in trans (PAMmer), welches das PAM enthält, löst die sequenzspezifische RNA-Erkennung und -Spaltung durch Cas9-gRNA aus. Das PAM muss keine Basenpaare mit der RNA bilden und kann als Überhang oder Brücke an das PAMmer angefügt werden. Dies ermöglicht die Spaltung von RNA ohne dabei die entsprechende DNA zu schneiden. Ein Brücken-PAMmer, das sich bis in die Zielsequenz erstreckt, erhöht die Spezifität der Bindung von Cas9-gRNA an ssRNA.

RNA unter Verwendung von Cas9-gRNA und einem zusätzlichen PAMmer in einer einfach zu programmierenden Art sequenzspezifisch geschnitten werden.

Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit, RNA zu manipulieren ohne dabei die entsprechende DNA zu binden oder zu schneiden – eine Eigenschaft, die für die Anwendung in Zellen, wo sowohl DNA als auch RNA vorhanden sind, benötigt wird. Dies gelingt, da das PAM selbst keine Basenpaarung mit der ssRNA eingehen muss. Dementsprechend kann ein fehlgepaartes PAM durch ein PAMmer eingeführt werden, was die Spaltung von ssRNA ohne ein revers-komplementäres PAM im Zielstrang ermöglicht, während dsDNA-Targets ohne angrenzendes PAM intakt bleiben. Dies gelingt sogar in einem Gemisch aus dsDNA und ssRNA.

Für dsDNA stellt die katalytisch inaktive Doppelmutante dCas9 im Komplex mit gRNA eine vielseitige Plattform dar, um Effektordomänen an eine bestimmte Zielregion im Genom zu steuern. Dies wurde bereits zur Genregulation, zur Veränderung der DNA-Methylierungen und zur Fluoreszenzmarkierung von Genloci mithilfe fusionierter fluoreszierender Proteine genutzt (Abbildung 3 A, zusammengefasst

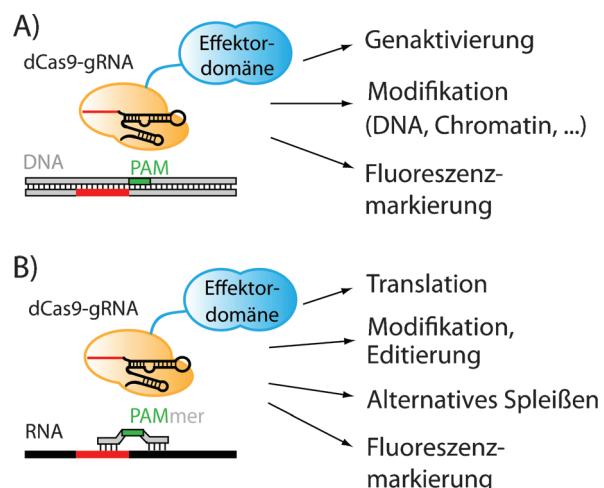


Abbildung 3. Die inaktive Variante dCas9 stellt eine Plattform dar, um verschiedene Proteinfunktionen mit Sequenzspezifität für Nukleinsäure-Targets zu versehen. A) Effektor-domänen, bei denen verschiedene Funktionen an dCas9 fusioniert sind, wurden erfolgreich für die sequenzspezifische Manipulation von dsDNA eingesetzt. B) Die Fusion verschiedener Effektor-domänen an dCas9 wird in Kombination mit PAMmeren eine neue Möglichkeit zur sequenzspezifischen Manipulation von RNA bieten.

in Lit. [7]). Es wäre erstrebenswert, eine gleichermaßen einfache, programmierbare und genetisch kodierbare Plattform für die sequenzspezifische Detektion und Manipulation von RNA zu haben. Ein solches System könnte den sequenzspezifischen Abbau von RNA (Knockdown) in Organismen ermöglichen, die nicht für RNA-Interferenz geeignet sind, und vorhandene Ansätze für die sequenzspezifische RNA-Manipulation ergänzen.

Tatsächlich bindet das katalytisch inaktive dCas9 in Anwesenheit des PAMmers auch an ssRNA. Allerdings erfordert die hochaffine Bindung von dCas9 an ssRNA keine korrekte Basenpaarung zwischen der gRNA und der ZielssRNA. Die fehlende Spezifität der Bindung ist für eine gezielte Modifikation hinderlich, kann jedoch mithilfe von verbrückten PAMmeren, die sich bis in die Zielregion erstrecken, behoben werden (Abbildung 2 und 3B). Wie weit man die PAMmer am besten verlängert, um den besten Kompromiss zwischen ssRNA-Bindungsaffinität und Spezifität zu erreichen, muss man empirisch herausfinden. Trotz dieser Hürden könnte die Kombination aus verbrückten PAMmeren und dCas9 eine flexible Plattform darstellen, um ssRNA sequenzspezifisch zu manipulieren (Abbildung 3 B).

In einer ersten Machbarkeitsstudie verwendeten die Autoren biotinyliertes dCas9, um Ziel-mRNA aus Säuger-Total-RNA und Zelllysat zu isolieren. Während die Isolierung aus Total-RNA gut funktionierte, führte die Isolierung mit DNA-PAMmeren aus Zellen zu beträchtlicher Degradation, bedingt durch die Spaltung des RNA-DNA-Heteroduplex durch RNase H. Glücklicherweise wurden einige modifizierte PAMmer ebenfalls von dCas9 toleriert (darunter LNAs, 2'-OMe- und 2'-F-Modifikationen an den Enden und an verschiedenen Positionen innerhalb der Oligonukleotide). Die Kombination aus dCas9 mit einem mehrfach 2'-OMe-modi-

fizierten PAMmer (circa jedes zweite Nukleotid) ermöglichte die direkte Isolierung von Ziel-mRNA aus HeLa-Zellen, ohne dass es zur Spaltung durch RNase H kam. Auch wenn die Verwendung von dCas9-gRNA/PAMmer sicherlich eine Verbesserung der Oligonukleotid-vermittelten Isolierung von RNA darstellt (weil es unter physiologischen Salzbedingungen und ohne Crosslinking funktioniert), handelt es sich dabei nur um den Beginn der Entwicklung von neuen potentiellen Anwendungen, die in Zukunft zu erwarten sind (Abbildung 3B).

Die Fusionierung von dCas9 mit Effektordomainen könnte es ermöglichen, die Translation bestimmter mRNAs zu stimulieren, RNAs sequenzspezifisch zu modifizieren (z.B. Methylierung, Demethylierung, A-zu-I-Editierung), die Verwendung alternativer Spleißstellen zu erhöhen oder zu verringern oder RNA sequenzspezifisch zu markieren. Bislang wurde eine programmierbare RNA-Manipulation oder -Markierung durch hybridisierungsbasierte Ansätze (z.B. durch kovalente Verknüpfung einer gRNA mit einem Effektorprotein^[8] oder durch die Herstellung von anschaltbaren proteinfreien Sonden^[9]) oder durch die genetische Fusion mit veränderten RNA-bindenden Proteinen realisiert.^[10] Beide Ansätze haben sich als nützlich erwiesen und beinhalten nennenswerte Beispiele wie transkriptspezifische Translationssteigerung,^[10b] A-zu-I-Editierung,^[8] Regulierung des Spleißens^[11] sowie mehrere Ansätze zur RNA-Markierung.^[9] Allerdings haben beide Ansätze ihre Limitierungen. Hybridisierungsbasierte Ansätze benötigen üblicherweise modifizierte Oligonukleotide, und zelluläre Anwendungen sind hauptsächlich durch die Transfektion begrenzt. Proteinbasierte Ansätze können mithilfe der Zell-eigenen Synthesemaschinerie realisiert werden, sind jedoch erheblich aufwendiger in der Realisierung neuer Zielspezifitäten.^[12]

Das Typ-II-CRISPR/Cas9-System weckt große Erwartungen, da es einfach und flexibel ist. Die Sequenzspezifität des Systems basiert auf komplementären Basenpaaren von Ziel-RNA und gRNA, welche einfach entworfen werden können, und es wird lediglich ein Protein (Cas9) benötigt, welches an verschiedene Effektorproteine fusioniert werden kann (Abbildung 3). Die gRNA ist unmodifiziert und kann daher von der zellulären Maschinerie produziert werden, was ein attraktiver Ansatz für die Manipulation von RNA in Zellen ist. Allerdings ist die Modifikation von RNA durch das *S. pyogenes* CRISPR/Cas9-System komplizierter als die Modifikation von dsDNA. Zum einen ist das PAMmer eine ssDNA oder ein Gemisch aus ssDNA und modifizierten Oligonukleotiden, die beide nicht von der zellulären Maschinerie produziert werden können. Daher wird, genau wie

bei den hybridisierungsbasierten RNA-Modifizierungsansätzen, eine effiziente Transfektion mit dem PAMmer benötigt. Zum anderen sind mehrere Kopien einer bestimmten mRNA in der Zelle vorhanden. Es wird daher interessant sein, wie effizient die an Cas9 fusionierten Effektorproteine tatsächlich arbeiten, wenn mehrere RNA-Kopien umgesetzt werden müssen, und ob es dadurch zu Nebeneffekten kommt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CRISPR-Cas9 zweifelsohne einen der bedeutendsten Fortschritte im Genom-Engineering darstellt. Die Ausweitung des Systems zur programmierbaren RNA-Erkennung wird, obwohl sich die Komplexität des Systems erhöht (PAMmere), viele aufregende Entwicklungen auslösen und könnte zu einem allgemeinen Ansatz für die sequenzspezifische RNA-Manipulation führen.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4710–4712
Angew. Chem. **2015**, *127*, 4792–4794

- [1] T. Gaj, C. A. Gersbach, C. F. Barbas III, *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 397–405.
- [2] E. Pennisi, *Science* **2013**, *341*, 833–836.
- [3] R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath, *Science* **2007**, *315*, 1709–1712.
- [4] a) C. R. Hale, P. Zhao, S. Olson, M. O. Duff, B. R. Graveley, L. Wells, R. M. Terns, M. P. Terns, *Cell* **2009**, *139*, 945–956; b) T. R. Sampson, S. D. Saroj, A. C. Llewellyn, Y. L. Tzeng, D. S. Weiss, *Nature* **2013**, *497*, 254.
- [5] M. R. O'Connell, B. L. Oakes, S. H. Sternberg, A. East-Seletsky, M. Kaplan, J. A. Doudna, *Nature* **2014**, *516*, 263–266.
- [6] a) S. H. Sternberg, S. Redding, M. Jinek, E. C. Greene, J. A. Doudna, *Nature* **2014**, *507*, 62–67; b) C. Anders, O. Niewoehner, A. Duerst, M. Jinek, *Nature* **2014**, *513*, 569–573.
- [7] J. D. Sander, J. K. Joung, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 347–355.
- [8] T. Staffor, M. F. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11166–11169; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11329–11332.
- [9] a) F. Hövelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19025–19032; b) G. Bao, W. J. Rhee, A. Tsourkas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 25–47.
- [10] a) C. G. Cheong, T. M. T. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13635–13639; b) A. Cooke, A. Prigge, L. Opperman, M. Wickens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 15870–15875; c) T. Ozawa, Y. Natori, M. Sato, Y. Umezawa, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 413–419; d) S. J. Kellermann, A. K. Rath, A. Rentmeister, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 200–204.
- [11] Y. Wang, C. G. Cheong, T. M. T. Hall, Z. F. Wang, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 825–U863.
- [12] Z. Abil, C. A. Denard, H. M. Zhao, *J. Biol. Eng.* **2014**, *8*, 7.

Eingegangen am 20. Januar 2015
Online veröffentlicht am 27. Februar 2015