

# Konditionale Kontrolle der CRISPR/Cas9-Funktion

Wenyuan Zhou und Alexander Deiters\*

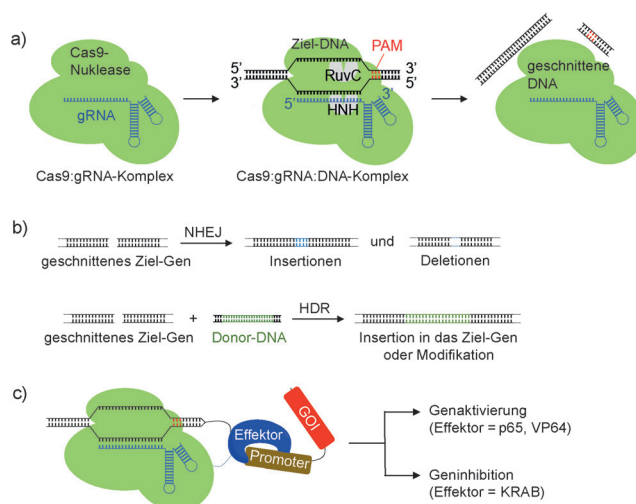
CRISPR/Cas · Gen-Editing · Kleine Moleküle ·  
Konditionale Kontrolle · Licht

**D**as CRISPR/Cas9-Endonukleasesystem, das aus einer Guide-RNA zur Erkennung einer Zielsequenz der DNA und dem Cas9-Nukleaseprotein zur Bindung und Prozessierung der Ziel-DNA besteht, wurde intensiv erforscht und findet bereits breite Anwendung im Gen-Editing, der Synthesebiologie und der transkriptionellen Modulation in Zellen und Tieren. Mit dem Ziel einer präziseren Genmodifizierung und der Weiterentwicklung des CRISPR/Cas9-Systems zu einem räumlich-zeitlich kontrollierbaren Genregulationssystem wurden kürzlich mehrere Ansätze zur konditionalen Aktivierung der Cas9-Funktion durch niedermolekulare Verbindungen („kleine Moleküle“) oder Licht entwickelt. Diese Methoden führten zu einer verbesserten Spezifität des CRISPR/Cas9-Systems im Gen-Editing und ermöglichen dessen Aktivierung mit zeitlicher und räumlicher Präzision.

## 1. Einführung zu konditional kontrolliertem CRISPR/Cas9

Das CRISPR/Cas9-Endonukleasesystem (CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeat, Cas9 = CRISPR-associated protein 9) ist ein adaptives Immunabwehrsystem vieler Bakterien und Archaeen, das eindringende mobile genetische Elemente eliminiert.<sup>[1]</sup> Das CRISPR-System Typ II erkennt und schneidet Ziel-DNA<sup>[2]</sup> mithilfe der Endonuklease Cas9, die von zwei nichtkodierenden RNAs [der CRISPR-RNA (crRNA) und der transaktivierenden crRNA (tracrRNA)],<sup>[3]</sup> die sich zu einer Guide-RNA (gRNA) verbinden können, zur Zielsequenz dirigiert wird.<sup>[4]</sup> Die gRNA rekrutiert die Cas9-Nuklease durch komplementäre Basenpaarung einer 20 Nukleotide (nt) langen Region am 5'-Ende zur Ziel-DNA. Bei diesem Prozess unterliegt der Nukleasebereich von Cas9 (der die HNH- und RuvC-Domänen enthält) einer Konformationsänderung, die zum Doppelstrangbruch (DSB) der Ziel-DNA führt (Abbildung 1 a).<sup>[5]</sup> Nach der ortsspezifischen DNA-Spaltung können nicht-homologe Strangverknüpfung („non-homologous end joining“; NHEJ) und homologiegerichtete Reparatur („homology-directed repair“; HDR) zu Geninsertion, Gendeletion und Genmutation in Eukaryoten führen.<sup>[6]</sup> Die Einfüh-

rung von Insertionen oder Deletionen („Indels“) durch NHEJ und die daraus resultierende Verschiebung des Leserahmens bewirken, dass die Expression des spezifischen Gens gehemmt wird. Durch Einführung von zwei DSBs kann die intervenierende genomische DNA deletiert werden, was die Deaktivierung oder Aktivierung (falls eine disruptive Sequenz entfernt wird) der Genfunktion ermöglicht. HDR erlaubt die hochspezifische



**Abbildung 1.** a) Durch gRNA dirigierte Doppelstrangspaltung mittels Cas9-Nuklease. PAM: „protospacer adjacent motif“, ein Cas9-Erkennungsmotiv (5'-NGG-3'), das am 3'-Ende der Ziel-DNA-Sequenz vorhanden sein muss; HNH und RuvC: Nukleasedomänen. b) Genmutation durch nicht-homologe Strangverknüpfung (NHEJ) und Geninsertion durch homologiegerichtete Reparatur (HDR). c) Aktivierung der Transkription mithilfe eines dCas9-Effektor-Fusionsproteins. GOI: interessierendes Gen; p65: p65-Transkriptionsaktivator-domäne; VP64: tetramere VP16-Transkriptionsaktivator-domäne; KRAB: Krüppel-assoziierte Box-Domäne.

[\*] W. Zhou, Prof. Dr. A. Deiters  
Department of Chemistry, University of Pittsburgh  
Pittsburgh, PA 15260 (USA)  
E-Mail: deiters@pitt.edu  
Homepage: <http://www.pitt.edu/~deiters/>

Insertion von kleinen oder großen DNA-Sequenzen aus einer entsprechenden Reparaturmatrize an einer vorbestimmten Stelle nach der Bildung eines DSB (Abbildung 1b). Durch weitere Modifizierung der Cas9-Nuklease zu einer Nickase-Variante konnten unspezifische Off-Target-Effekte reduziert werden. Hierbei kommt eine paarweise Strategie zum Einsatz, bei der eine erfolgreiche Genexzision die Erkennung von zwei unterschiedlichen gRNAs an jedem Strang der Ziel-DNA-Sequenz erfordert.<sup>[6c]</sup> Eine katalytisch inaktive Variante, bezeichnet als dCas9 (d für „dead“), wurde als sequenzspezifischer Transkriptionsrepressor<sup>[7]</sup> und, gekoppelt mit verschiedenen Arten genomischer Effektoren, als genomischer Anker für die ortsspezifische transkriptionale Regulation entwickelt, sowie auch, gekoppelt mit anderen Nukleasen, für die präzisere DNA-Spaltung (Abbildung 1c).<sup>[8]</sup>

Das CRISPR/Cas9-System hat mehrere Vorteile gegenüber früheren Gen-Editing-Systemen, wie etwa der Zinkfinger-nuklease, den Transkriptionsaktivator-artigen Effektor-nukleasen, Meganukleasen und Rekombinasen (z. B. das Cre/loxP-System).<sup>[9]</sup> Mit ihrem gezielt anpassbaren gRNA-Design (was Protein-Engineering zur Ansteuerung unterschiedlicher DNA-Sequenzen oder vorinstallierte Sequenzen wie z. B. loxP überflüssig macht), ihrer Spezifität, Effizienz und Multiplexfähigkeit haben die Cas9-Nuklease und ihre Varianten ein enormes Potenzial für die Erzeugung genetisch modifizierter Zelllinien und Organismen, für die Analyse dynamischer Genfunktionen, für verbesserte Gentherapien und für andere Anwendungen.<sup>[7,10]</sup>

Die nächste Stufe wird sein, den Nutzen dieser Anwendungen durch die Entwicklung von konditional kontrollierbaren CRISPR/Cas9-Systemen, die schnelles Ansprechverhalten, räumlich-zeitliche Spezifität und Reversibilität zeigen, weiter auszudehnen. Durch konditionale Aktivierung und reversible Kontrolle kann die Cas9-Aktivität auf ein bestimmtes Zeitfenster beschränkt werden, was über die Verminderung von Off-Target-Effekten, wie sie durch lang andauernde Cas9-Aktivität verursacht werden, einen Ansatz für sicherere Gentherapien bietet. Ein schnelles Ansprechen auf exogene Signale könnte die Synchronisation der CRISPR/Cas9-Aktivität mit präzise orchestrierten genetischen Netzwerken ermöglichen, z. B. im zirkadianen Rhythmus oder in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstufen. Schließlich könnten orthogonal induzierbare Cas9-Moleküle als Bausteine für synthetische transkriptionale Netzwerke genutzt werden. Die zahlreichen Forschungen auf diesem Gebiet haben jüngst verschiedene Strategien zur konditionalen

Kontrolle der CRISPR/Cas9-Funktion hervorgebracht, einschließlich der Aktivierung von Cas9-Proteinen durch kleine Moleküle oder Licht.

## 2. Kontrolle der Casg-Funktion durch kleine Moleküle

Eine Regulation von Cas9 durch kleine Moleküle wurde mithilfe verschiedener Ansätze erreicht, die auf früheren Entwicklungen vollständig charakterisierter und bequem modularisierbarer Bindedomänen für kleine Moleküle basierten.<sup>[11]</sup> Zum Beispiel wurden selbstspaltende Inteine entwickelt, die durch kleine Moleküle aktiviert werden können.<sup>[12]</sup> Wenn ein 412 Aminosäuren großes Intein entweder an Position Ser219 oder Cys574 des Cas9-Proteins inseriert wurde, war das Enzym solange inaktiv bis das Intein durch 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) aktiviert und durch eine selbstspaltende Reaktion entfernt wurde (Abbildung 2a).<sup>[13]</sup> Je nach Stelle der Intein-Insertion und dem Ziel-Gen variierten die Aktivierungseffizienzen zwischen 3- und 10-fach, bei geringer Indelbildung von 2–5 % (Abbildung 2b).<sup>[13]</sup> Zusätzlich zur innovativen zeitlichen Kontrolle des Gen-Editing wurde eine bis zu 25-fache Verbesserung des On/Off-Target-Verhältnisses im Vergleich zum Wildtyp(wt)-Cas9 beobachtet, was die verbesserte Spezifität und verminderte Off-Target-Effekte des inteinmodifizierten Cas9 belegt (Abbildung 2b).

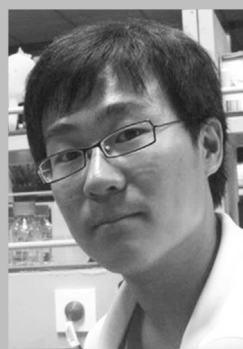
Ein zweiter Ansatz zur Herstellung von durch kleine Moleküle regulierbaren Cas9-Proteinen beruht auf der Verwendung eines Split-Protein-Systems.<sup>[14]</sup> Split-Cas9-Proteine wurden an zwei unterschiedlichen Stellen erzeugt, Arg535 und Glu573,<sup>[14]</sup> und bei jedem Paar wurde das C- und N-terminale Cas9-Fragment mit der FKBP12- bzw. FRB-Domäne fusioniert.<sup>[15]</sup> Die durch Rapamycin induzierte Heterodimerisierung (Abbildung 2c) ermöglichte die konditionale Rekonstitution und Aktivierung von Split-Cas9, was zu Indelbildung an spezifischen Loci führte, mit geringen Mutationshäufigkeiten an Off-Target-Stellen (OT-1 und OT-2) (Abbildung 2d).

Durch die Kombination von Split-dCas9 (katalytisch inaktives Cas9) mit einer VP64-Domäne wurde die Split-Protein-Strategie außerdem zur Herstellung eines durch ein kleines Molekül regulierbaren Transkriptionsaktivators verwendet.<sup>[14]</sup>

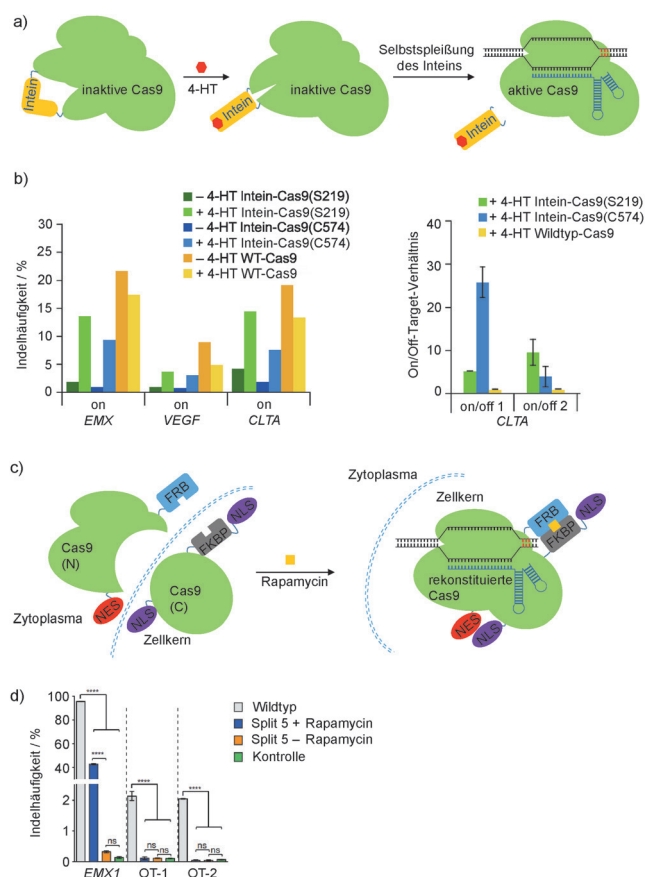
Bei beiden Ansätzen wurde ein Screening mehrerer Mutanten eingesetzt, mit dem Ziel, gesplante Cas9-Enzyme zu



Alexander Deiters promovierte im Jahr 2000 an der Universität Münster (bei Prof. Hoppe) und war anschließend Postdoktorand an der University of Texas (bei Prof. Martin) und am Scripps Research Institute (bei Prof. Schultz). 2004 begann er seine unabhängige Laufbahn an der North Carolina State University und wechselte 2012 an die University of Pittsburgh. Seine Forschungsinteressen liegen an der Schnittstelle von Chemie und Biologie, mit Schwerpunkt auf der optischen Kontrolle der Oligonukleotid- und Proteinfunktion.



Wenyan Zhou erhielt seinen B.S. in Chemical Biology an der Peking University. 2014 begann er seine Promotion bei Prof. Deiters an der University of Pittsburgh, wo er sich mit der optischen Kontrolle von Proteinfunktionen befasst.



**Abbildung 2.** a) Die Bindung von 4-HT löst die Selbstspaltung des insertierten Inteins aus, und die aktive Cas9-Struktur und -Funktion wird wiederhergestellt. b) Indelhäufigkeit, bestimmt durch DNA-Sequenzierung von amplifizierten genomischen On-Target-Stellen (*EMX*, *VEGF* und *CLTA*) und ihrem On/Off-Target-Verhältnis (zwei *CLTA*-Stellen). Wiedergabe nach Lit. [13] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Chemical Biology, Copyright 2015. c) Die durch Rapamycin induzierte Dimerisierung der FKBP- (Rapamycin FK506-bindendes Protein) und FRB-Domänen (FKBP-Rapamycin-bindendes Protein) ermöglicht den NLS-vermittelten Kerneintritt des Cas9-Proteins und die Bindung an die Ziel-DNA. d) Indelhäufigkeit, gemessen durch Sequenzierung am *EMX*-Locus und dessen zwei Off-Target (OT)-Stellen. Wiedergabe nach Lit. [15] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Biotechnology, Copyright 2015.

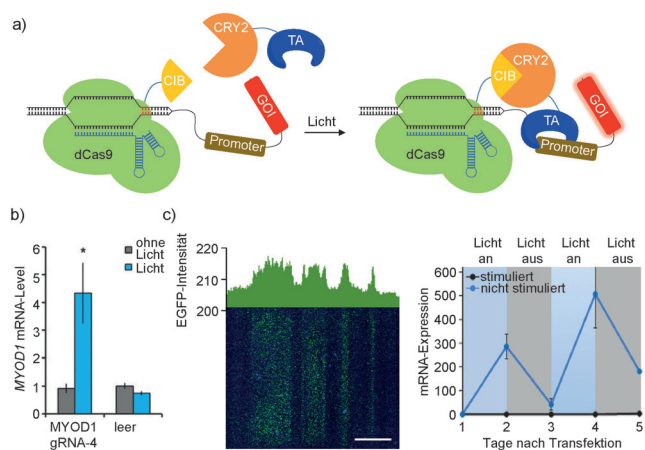
identifizieren und ihre Funktion wiederherzustellen. Die Systeme der ersten Generation wiesen einige Nachteile auf: 1) Hintergrundaktivitäten in Abwesenheit von Rapamycin (15–30% der Aktivität von wt-Cas9) aufgrund von spontaner Selbstorganisation der beiden Split-Cas9-Fragmente.<sup>[14]</sup> 2) Cas9-Rekonstitution durch 4-HT führte zu einer niedrigeren Aktivität im Vergleich zu wt-Cas9 aufgrund von unvollständigem Spleißen und einer relativ langsamen Spleiß-kinetik.<sup>[13]</sup> Das Selbstspalten dieses Inteins hat eine maximale Ausbeute von 80% in Säugerzellen, die nach 24 h erreicht wird.<sup>[12b]</sup> Um das erste Problem zu umgehen, wurden die Split-Cas9-Fragmente durch Fusion mit einer Kernexportsequenz (NES) und eine Kernlokalisationssequenz (NLS) sequestriert und so in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten räumlich separiert (Abbildung 2c).<sup>[14]</sup> Dies ermöglichte ein verbessertes Schaltverhalten, da die Hinter-

grundaktivitäten unter die Nachweisgrenze gedrückt wurden. Außerdem verbesserte diese Maßnahme die Spezifität im Gen-Editing verglichen mit wt-Cas9 (Abbildung 2d). Insgesamt stellt die Regulation von Cas9 durch kleine Moleküle einen wichtigen Fortschritt auf diesem Gebiet dar, auch wenn einige Herausforderungen verbleiben: So mangelt es der Induktion durch kleine Moleküle an räumlicher Spezifität, und sie hängt von den kinetischen und biochemischen Eigenschaften der Inducerspezies und den funktionalisierenden Domänen ab (z.B. den Geschwindigkeiten und Effizienzen des Inteinpleißens sowie der Irreversibilität der Proteinspleißprozesse und der Rapamycin-induzierten Proteindimerisierung).

### 3. Optische Kontrolle der Cas9-Funktion

Licht wurde vielfach für die Induktion von Proteinfunktionen genutzt, da es nicht invasiv ist und räumliche und zeitliche Spezifität sowie Reversibilität des untersuchten Systems gestattet. Ein Ansatz für die optische Regulation der Genfunktion war die gezielte Entwicklung eines CRISPR/Cas9-basierten transkriptionsaktivierenden Systems. Die Cas9-Funktion wurde in diesem Fall nicht direkt mit Licht reguliert, vielmehr wurde eine katalytisch inaktive Cas9 (dCas9) als genomischer Anker (mit einer entsprechenden gRNA) verwendet, um einen Transkriptionsaktivator (z.B. VP64 oder p65) zu rekrutieren. Die beiden Proteine wurden jeweils an lichtkontrollierte Proteindimerisatoren fusioniert (im Speziellen das CRY2/CIB-Paar, das ausgiebig charakterisiert und zur Induktion der Proteindimerisation als Reaktion auf blaues Licht genutzt wurde),<sup>[16]</sup> was das lichtinduzierte genomische Targeting des Transkriptionsaktivators ermöglichte (Abbildung 3a). Unter Verwendung dieses innovativen Ansatzes berichteten zwei Forscherteams kürzlich unabhängig voneinander über zwei ähnliche photoaktivierbare Systeme zur Transkriptionsregulation: ein p65-CRY2/dCas9-CIB-Konstrukt<sup>[17]</sup> und ein VP64-CRY2/CIB-dCas9-CIB-Konstrukt.<sup>[18]</sup> Beide demonstrierten erfolgreich die lichtinduzierte Aktivierung der Expression des Ziel-Gens mit minimaler Hintergrundaktivität,<sup>[17]</sup> die räumlich lokalisierte Aktivierung in Submillimetrauflösung und Reversibilität. Im ersten Ansatz<sup>[17]</sup> wurde p65 (die Aktivatordomäne von NF- $\kappa$ B) an den C-Terminus von dCas9 rekrutiert, anschließend wurde mit Licht bestrahlt. In Kombination mit MYOD1-gRNA-4 aktivierte die p65-Domäne die Transkription des *MYOD1*-Gens, während ohne Bestrahlung lediglich basale Genexpression nachgewiesen wurde (Abbildung 3b). Unter Verwendung einer EGFP-Reporters wurden die lokalisierte Aktivierung und Reversibilität des Systems demonstriert, mit einer räumlichen Auflösung von mindestens 1.5 mm sowie Induktionszeiten von 18 h für die Deaktivierung und 9 h für die Reaktivierung. Beim zweiten Ansatz<sup>[18]</sup> wurde der VP64-Aktivator sowohl an den N- als auch den C-Terminus von dCas9 rekrutiert. Auch hier wurden räumliche Kontrolle, Reversibilität (Abbildung 3) und lediglich basale Hintergrundaktivität demonstriert (im Vergleich zu Experimenten ohne VP64). Wurden transfizierte Zellen durch eine Photomaske mit 0.2–3.0 mm breiten Schlitzen bestrahlt,



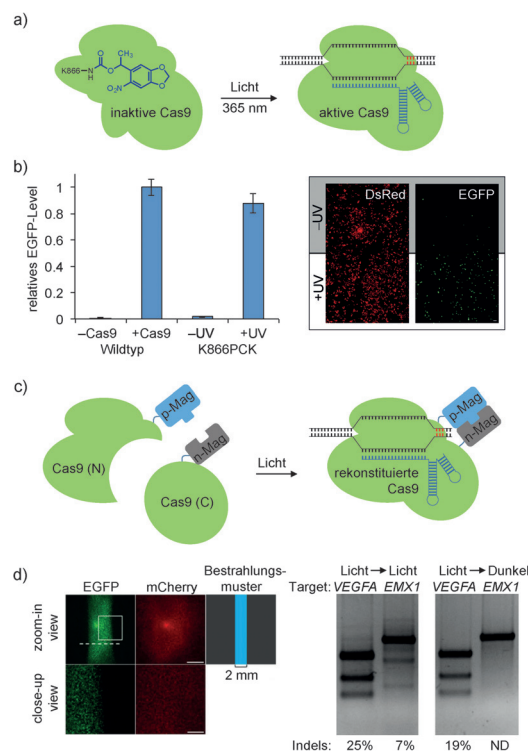


**Abbildung 3.** a) Überblick über das dCas9-basierte photoaktivierbare System: Ein oder zwei Transkriptionsaktivatoren (TAs) werden mittels Proteindimerisierung von CRY2 (cryptochrome circadian clock 2) und CIB (cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix) zu dCas9 rekrutiert. b) Lichtaktivierte Expression des MYOD1-Gens, gemessen mittels qPCR. Wiedergabe nach Chemistry & Biology, Lit. [17], Copyright 2015, mit Genehmigung von Elsevier. c) Ein EGFP-Reporter verdeutlicht die räumliche Spezifität und Reversibilität des dCas9-basierten Photoaktivierungssystems. Skalierung: 2 mm. Wiedergabe nach Lit. [18] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Chemical Biology, Copyright 2015.

konnte die gemusterte Expression von EGFP infolge der lokalisierten Aktivierung des Ziel-Gens beobachtet werden. Auch konnte das photoaktivierbare dCas9-Transkriptionsaktivatorsystem durch Anwendung eintägiger Intervalle mit oder ohne Lichtbestrahlung zwischen der stimulierten und nicht-stimulierten Form geschaltet werden.

Die lichtinduzierte Rekrutierung einer Transkriptionseffektordomäne (Aktivator oder Repressor) an ein katalytisch inaktives Cas9 ermöglicht zwar die Regulation der Genexpression, es ist aber noch keine Methode für optisch induziertes Gen-Editing. Zwei Ansätze wurden entwickelt, um dieses Ziel zu erreichen: 1) der ortsspezifische Einbau eines photolytisch freisetzbaren („caged“) Lysins in Cas9 und 2) die Erzeugung eines Split-Cas9-Proteins, das durch Bestrahlung rekonstituiert werden kann.

Unter Verwendung eines erweiterten genetischen Codes in Säugerzellen wurden zahlreiche lichtaktivierbare Proteine durch ortsspezifischen Einbau von „caged“ Aminosäuren hergestellt.<sup>[19]</sup> Wir haben diesen Ansatz für die erstmalige optische Kontrolle der Cas9-Funktion genutzt. Ein essenzieller Lysinrest (K866) wurde identifiziert und zu einem „caged“ Lysin (PCK) mutiert; auf diese Weise wird das Enzym durch eine minimale Modifikation inaktiv gemacht – das Molekulargewicht der Caging-Gruppe (238 Da) ist sehr viel niedriger als das der lichtresponsiven Proteindomänen. Die UV-induzierte Photolyse der Caging-Gruppe erzeugte wt-Cas9, das vollständig aktiv war und die gRNA-dirigierte DNA-Spaltung ermöglichte (Abbildung 4a).<sup>[20]</sup> Hohe Aus/An-Verhältnisse wurden beobachtet, mit vollständiger Inaktivität vor dem Lichteinfall und einer vergleichbaren enzymatischen Aktivität wie wt-Cas9 nach Abspaltung der Caging-Gruppe. Durch musterförmige UV-Bestrahlung von Zellen wurde ein räumlich kontrolliertes Schalten der Genexpression von DsRed zu



**Abbildung 4.** a) Ein ortsspezifisch eingebautes „caged“ Lysin (Caging-Gruppe blau dargestellt) blockiert die Cas9-Funktion. Nach photochemischer Abspaltung der Caging-Gruppe wird das aktive wt-Cas9 wiederhergestellt. b) Die UV-induzierte Aktivierung des „caged“ Cas9 führt zur fast vollständigen Wiederherstellung der Nukleaseaktivität in einem Fluoreszenzreporterassay und ermöglicht ein räumlich kontrolliertes Gen-Editing. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [20], Copyright 2015 American Chemical Society. c) Magnets-vermittelte Split-Cas9-Aktivierung mittels lichtinduzierter Rekonstitution von Cas9 durch Dimerisierung der N- und C-terminalen Domänen. d) Räumliche Spezifität und Reversibilität im Gen-Editing bei Verwendung von Magnets-vermitteltem Split-Cas9. Wiedergabe nach Lit. [21] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Biotechnology, Copyright 2015.

EGFP in einem dualen Reportersystem demonstriert (Abbildung 4b). Die Modifizierung von Cas9 durch Einführung einer „caged“ Aminosäure kann kinetische Vorteile gegenüber anderen Methoden bieten, welche die Rekrutierung von komplementären Domänen/Splitfragmenten erfordern, da nämlich die Rekonstitution einer aktiven Konformation auf eine räumlich begrenzte Region des Proteins beschränkt wird und eine vollständige Aktivierung durch die photochemische Erzeugung des Wildtyp-Enzyms gewährleistet ist. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass diese Strategie die Expression der modifizierten tRNA-Synthase und kognaten tRNA zum Einbau des „caged“ Lysins erfordert, was ein limitierender Faktor sein kann. Zu bedenken ist auch, dass UV-Licht eine phototoxische Wirkung haben kann, bei kürzlich eingeführten Lysinanaloga kann die Caging-Gruppe jedoch durch sichtbares Licht abgespalten werden.<sup>[19d]</sup>

Ein photoaktivierbares Split-Cas9 wurde durch Screening von 18 potenziellen Split-Stellen und mehreren lichtinduzierbaren Heterodimerisierungsdomänen erhalten.<sup>[21]</sup> Ein als Magnets<sup>[22]</sup> bezeichnetes Domänenpaar erwies sich als am

effektivsten, da der Magnets-Ansatz eine geringere sterische Hinderung und schwächere Homodimerisierung im Vergleich zum CRY2/CIB1-System bedingt.<sup>[23]</sup> Dieses neuartige, optisch induzierbare Split-Cas9-System (Abbildung 4c,d) zeigte im Gen-Editing vergleichbare Spezifitäten wie Vollängen-Cas9, bei allerdings reduzierter Effizienz. Wichtig ist, dass nur niedrige Hintergrundaktivitäten beobachtet wurden, vergleichbar zu leeren, negativen Kontrollvektoren. Des Weiteren wurden räumliche Kontrolle und lichtinduzierte Reversibilität des Systems demonstriert. Nach Modifikationen des *VEGFA*-Gens (Indelhäufigkeiten von 25 % und 19 %) durch Lichtaktivierung führte die anschließende Transfektion einer zweiten, das *EMX*-Gen targetierenden gRNA nur unter Lichtbestrahlung zu erfolgreicher Modifikation (Indelhäufigkeit von 7 %) (Abbildung 4d).

Katalytisch inaktives dCas9 wurde nach dem gleichen Prinzip ebenfalls in ein Splitprotein umgewandelt und an Magnets-Domänen fusioniert.<sup>[21]</sup> Dessen Anwendung als zielspezifischer genomischer Silencer ergab eine Repressionseffizienz von 60 % des Vollängen-dCas9, ähnlich der Effizienz von photoaktiviertem Split-Cas9 im Vergleich zum wt-Cas9. Zu erwähnen ist, dass die Reversibilität dieses Systems einem optischen An- und Ausschalter entspricht. Diese kontrollierte Reduktion der Cas9-Aktivität könnte zur Minimierung von Off-Target-Effekten genutzt werden.<sup>[13]</sup>

#### 4. Andere Ansätze zur konditionalen Kontrolle der Cas9-Funktion

Neben der posttranslationalen konditionalen Regulation des CRISPR/Cas9-Systems für die räumliche und zeitliche Kontrolle wurden auch regulatorische Mechanismen auf der Ebene der Transkription genutzt. Ein TRE<sup>3G</sup>-IRES-Cas9-Konstrukt wurde eingeführt,<sup>[24]</sup> dessen Transkription durch Doxycyclin gesteuert wurde, um durch konstitutiv aktives Cas9 verursachte embryonale Letalität und genetischen Mosaizismus in Mäusen zu vermeiden. Die zeitliche Kontrolle war erheblich langsamer im Vergleich zur konditionalen Kontrolle auf posttranslationaler Ebene, jedoch wurde eine gute räumliche Kontrolle mit gewebespezifischen Promotoren in Zebrafischembryos erzielt,<sup>[25]</sup> wobei gut verfügbare, hoch modularisierte und fein abgestimmte Promotorsätze zur Verwendung kamen.<sup>[26]</sup> Ebenfalls berichtet wurde über eine hitzeschockinduzierbare Cas9-Expression zur zeitlichen Kontrolle in *C. elegans*<sup>[27]</sup> und *D. rerio*.<sup>[28]</sup>

#### 5. Zusammenfassung und zukünftige Forschungsrichtungen

Als Teil der schnell voranschreitenden CRISPR-Forschung und basierend auf jüngsten Ergebnissen zur molekularen Struktur, zum Mechanismus und zu Anwendungen des Cas9-Systems wurde eine effiziente und gut charakterisierte konditionale Kontrolle der Cas9-Funktion entwickelt. Eine präzise räumliche und zeitliche Regulation wurde in Gewebekultur erzielt, und dank reduzierter Off-Target-Effekte ist man zu einer verbesserten genomischen Spezifität gelangt.

Mittels posttranslationaler Kontrolle wurde eine schnelle Reaktion auf Inducerspezies, einschließlich kleiner Moleküle und Licht, erzielt.

Die innovativen Konzepte der hier diskutierten posttranslationalen Kontrolle der CRISPR/Cas9-Funktion folgen ähnlichen allgemeinen Prinzipien: Störung der aktiven Cas9-Konformation entweder durch Insertion exogener Motive (d.h. eines Inteins oder einer photoaktivierbaren Aminosäure) oder durch Spaltung des Cas9-Proteins an sorgfältig ermittelten Positionen und anschließende Wiederherstellung der Cas9-Struktur und -Funktion induziert durch kleine Moleküle oder Licht. Die Regulation der Cas9-Funktion ist schnell und orthogonal zum Wirtssystem, und sie profitiert von der Entwicklung modularisierter induzierbarer und/oder funktioneller Domänen (z. B. Heterodimerisierungsdomänen und Aktivator-/Repressordomänen). Zusätzliche Möglichkeiten ergeben sich durch die Kopplung posttranslationaler Regulation mit anderen Methoden, wie z. B. dem transienten Zelltransport des Cas9:gRNA-Komplexes<sup>[29]</sup> oder einer durch gewebespezifische Promotoren gesteuerten Expression.<sup>[30]</sup> Induktion durch kleine Moleküle bietet Vorteile bezüglich der Gewebedurchlässigkeit im Vergleich zur Bestrahlung mit Licht, während die optische Regulation eine hohe räumliche Spezifität und schnelle Reversibilität erlaubt. Allerdings besteht bei den konditional gesteuerten Split-Cas9-Systemen noch Verbesserungsbedarf, etwa bezüglich der durch unvollständige Umbildung der Cas9-Struktur verursachten Hintergrundaktivität (z. B. durch Selbstorganisation der Split-Cas9-Fragmente oder der Heterodimerisierungsdomänen) sowie der reduzierten Aktivität aufgrund ungenügender Wiederherstellung (z. B. durch unvollständiges Selbstspießen von Inteinen).<sup>[31]</sup>

Mögliche neue Anwendungen der effektorinduzierten CRISPR/Cas9-Funktion liegen unter anderem beim Design und der Regulation komplexer genetischer Kreisläufe, der Untersuchung der Genregulationsdynamiken während zeitlich und räumlich orchestrierter Prozesse (z. B. Zelldifferenzierung und -entwicklung) sowie der Gewebzüchtung und gezielten Abstimmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen durch räumlich-zeitliche Regulation der Genexpression. Ein hoch präzises, fein abstimmbares Gen-Editing könnte auch durch das Kombinieren von programmierbaren DNA-Bindedomänen,<sup>[32]</sup> Nicking-Strategien mit Cas9-D10A-Nickase<sup>[6c]</sup> oder dCas9-Endonukleasefusionen<sup>[33]</sup> mit konditionaler Regulation erzielt werden.

#### Danksagung

Wir danken der National Science Foundation (MCB-1330746 und CHE-1404836) für Unterstützung.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 5394–5399  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 5482–5487

- [1] a) H. Deveau, J. E. Garneau, S. Moineau, *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, 64, 475; b) P. Horvath, R. Barrangou, *Science* **2010**, 327, 167; c) L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, *Nature* **2010**, 463, 568; d) M. P. Terns, R. M. Terns, *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, 14, 321.

- [2] J. E. Garneau, M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadan, S. Moineau, *Nature* **2010**, *468*, 67.
- [3] E. Deltcheva, K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, E. Charpentier, *Nature* **2011**, *471*, 602.
- [4] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, *337*, 816.
- [5] Y. Kamiya, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2273.
- [6] a) P. D. Hsu, D. A. Scott, J. A. Weinstein, F. A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E. J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T. J. Cradick, L. A. Marraffini, G. Bao, F. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 827; b) P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, G. M. Church, *Science* **2013**, *339*, 823; c) F. A. Ran, P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, D. A. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang, F. Zhang, *Cell* **2013**, *154*, 1380.
- [7] a) L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G. A. Brar, S. E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E. H. Whitehead, J. A. Doudna, W. A. Lim, J. S. Weissman, L. S. Qi, *Cell* **2013**, *154*, 442; b) M. H. Larson, L. A. Gilbert, X. Wang, W. A. Lim, J. S. Weissman, L. S. Qi, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2180; c) L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin, W. A. Lim, *Cell* **2013**, *152*, 1173.
- [8] a) M. Agne, I. Blank, A. J. Emhardt, C. G. Gabelein, F. Gawlas, N. Gillich, P. Gonschorek, T. J. Juretschke, S. D. Kramer, N. Louis, A. Muller, A. Rudorf, L. M. Schafer, M. C. Scheidmann, L. J. Schmunk, P. M. Schwenk, M. R. Stammnitz, P. M. Warmer, W. Weber, A. Fischer, B. Kaufmann, H. J. Wagner, G. Radziwill, *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3*, 986; b) F. J. Sánchez-Rivera, T. Jacks, *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 387.
- [9] D. B. Cox, R. J. Platt, F. Zhang, *Nat. Med.* **2015**, *21*, 121.
- [10] A. Strauß, T. Lahaye, *Mol. Plant.* **2013**, *6*, 1384.
- [11] a) A. R. Buskirk, D. R. Liu, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 151; b) R. Rakhit, R. Navarro, T. J. Wandless, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1238.
- [12] a) A. R. Buskirk, Y. C. Ong, Z. J. Gartner, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10505; b) S. H. Peck, I. Chen, D. R. Liu, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 619; c) C. M. Yuen, S. J. Rodda, S. A. Vokes, A. P. McMahon, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8939.
- [13] K. M. Davis, V. Pattanayak, D. B. Thompson, J. A. Zuris, D. R. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 316.
- [14] B. Zetsche, S. E. Volz, F. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 139.
- [15] L. A. Banaszynski, C. W. Liu, T. J. Wandless, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4715.
- [16] G. P. Pathak, J. D. Vrana, C. L. Tucker, *Biol. Cell* **2013**, *105*, 59.
- [17] Y. Nihongaki, S. Yamamoto, F. Kawano, H. Suzuki, M. Sato, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 169.
- [18] L. R. Polstein, C. A. Gersbach, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 198.
- [19] a) C. Chou, D. D. Young, A. Deiters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5950; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6064; b) J. Hemphill, C. Chou, J. W. Chin, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13433; c) J. Y. Kang, D. Kawaguchi, I. Coin, Z. Xiang, D. D. O'Leary, P. A. Slesinger, L. Wang, *Neuron* **2013**, *80*, 358; d) J. Luo, R. Uprety, Y. Naro, C. Chou, D. P. Nguyen, J. W. Chin, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15551; e) W. Ren, A. Ji, H. W. Ai, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2155.
- [20] J. Hemphill, E. K. Borchardt, K. Brown, A. Asokan, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5642.
- [21] Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima, M. Sato, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 755.
- [22] F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya, M. Sato, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6256.
- [23] M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, C. L. Tucker, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 973.
- [24] L. E. Dow, J. Fisher, K. P. O'Rourke, A. Muley, E. R. Kastenhuber, G. Livshits, D. F. Tschaharganeh, N. D. Socci, S. W. Lowe, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 390.
- [25] J. Ablain, E. M. Durand, S. Yang, Y. Zhou, L. I. Zon, *Dev. Cell* **2015**, *32*, 756.
- [26] a) A. S. Khalil, T. K. Lu, C. J. Bashor, C. L. Ramirez, N. C. Pyenson, J. K. Joung, J. J. Collins, *Cell* **2012**, *150*, 647; b) T. Wenink, S. Vasylychko, T. Ellis, *PLoS One* **2012**, *7*, e33279.
- [27] S. Waaijers, V. Portegijs, J. Kerver, B. B. Lemmens, M. Tijsterman, S. van den Heuvel, M. Boxem, *Genetics* **2013**, *195*, 1187.
- [28] L. Yin, L. A. Maddison, M. Li, N. Kara, M. C. LaFave, G. K. Varshney, S. M. Burgess, J. G. Patton, W. Chen, *Genetics* **2015**, *200*, 431.
- [29] J. A. Zuris, D. B. Thompson, Y. Shu, J. P. Guiling, J. L. Bessen, J. H. Hu, M. L. Maeder, J. K. Joung, Z. Y. Chen, D. R. Liu, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 73.
- [30] Z. Shen, X. Zhang, Y. Chai, Z. Zhu, P. Yi, G. Feng, W. Li, G. Ou, *Dev. Cell* **2014**, *30*, 625.
- [31] A. V. Wright, S. H. Sternberg, D. W. Taylor, B. T. Staahl, J. A. Bardales, J. E. Kornfeld, J. A. Doudna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 2984.
- [32] M. F. Bolukbasi, A. Gupta, S. Oikemus, A. G. Derr, M. Garber, M. H. Brodsky, L. J. Zhu, S. A. Wolfe, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 1150.
- [33] N. Wyvekens, V. V. Topkar, C. Khayter, J. K. Joung, S. Q. Tsai, *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, 425.

Eingegangen am 9. Dezember 2015,  
veränderte Fassung am 21. Januar 2016  
Online veröffentlicht am 21. März 2016