

Gentechnische Methoden

Genomveränderungen – CRISPR/Cas9 als Methode der Wahl oder Qual?

ELITSA Y. DIMOVA, THOMAS KIETZMANN
FACULTY OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE, BIOCENTER OULU,
UNIVERSITY OF OULU, OULU, FINNLAND

The last years showed the rise of CRISPR/Cas9 to stardom. Several features such as programmability, specificity, and efficiency, make it to be a technique of choice for genome editing even in processes where basic aspects are not understood. However, scientific, technical and society driven challenges remain. To cope with these challenges, further research, technological improvements, translational studies as well as an open exchange between laboratories and the society are required.

DOI: 10.1007/s12268-018-0977-7
© Die Autoren

■ Mehr als 6.000 Erkrankungen, die ihre Ursache in einem Gendefekt haben, sind bekannt. Dank der großen Menge verfügbarer Genomsequenzierungsdaten vermehrt sich unser Wissen über krankheitsrelevante genetische Mutationen täglich. Man könnte meinen, dass das Wissen über diese Mutationen ausreichend ist, um großangelegte Reparaturverfahren zu starten. Das ist jedoch nicht einfach. Genaue korrigierende Genomveränderungen sind eine sehr anspruchsvolle Aufgabe, und die Suche nach effizienten und zuverlässigen Methoden zur präzisen Genombearbeitung steht schon seit Langem ganz oben auf der Agenda biomedizinischer Forschung. Prinzipielle Möglichkeiten gibt es schon länger, jedoch waren die bisher verfügbaren Methoden sehr teuer und vor allem arbeits- und damit zeitintensiv. Dies scheint sich aber nun auf einen Schlag geändert zu haben. Seit einigen Jahren macht ein neues Werkzeug namens CRISPR/Cas9 Schlagzeilen. Auf einmal sprechen alle darüber, wie wir nicht nur die genetischen Defekte korrigieren, sondern auch Viruserkrankungen oder Krebs heilen könnten. Darüber hinaus erschließt diese methodische Innovation auch neue Optionen in der Pflanzenzüchtung und Biotechnologie. Jedoch gibt es neben diesen Begeisterungstürmen auch Wellen der Kritik,

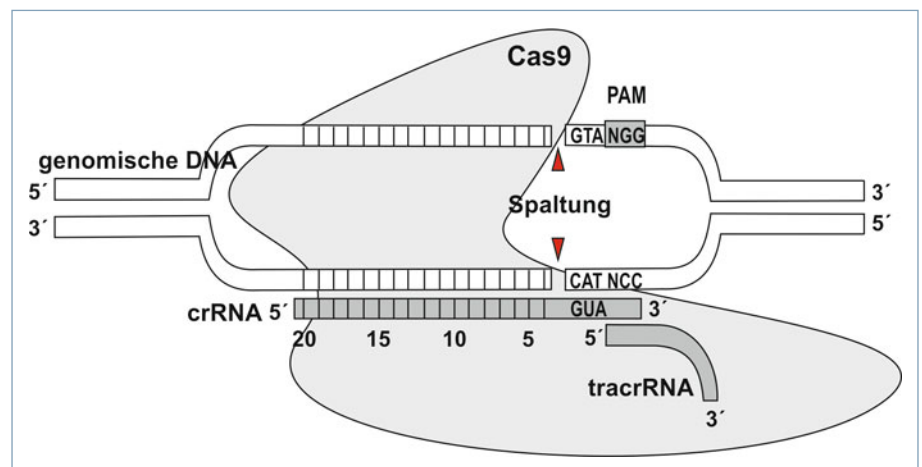
nicht nur aus der biomedizinischen Forschungslandschaft.

Wofür steht CRISPR/Cas9?

CRISPR steht für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* und beschreibt Loci, die schon 1987 im *Escheri-*

chia coli-Genom und später dann im Genom vieler weiterer Prokaryoten und Archaeen beschrieben wurden [1]. Die CRISPR-Loci lassen sich durch eine kurze, konservierte palindromische „repeat-spacer-repeat“-Array-Architektur beschreiben. Weiterhin wurden Gene beschrieben, die in unmittelbarer Nachbarschaft oder zumindest sehr nahe an den CRISPR-Loci lagen und daher *CRISPR-associated* (oder abgekürzt *cas*)-Gene genannt wurden [2].

Die Funktion der CRISPR-Arrays war jedoch bis 2005 ein Mysterium, als dank der akkumulierenden Genomsequenzdaten herausgefunden wurde, dass CRISPR-Sequenzen Homologien zu DNA-Sequenzen aus Bakteriophagen aufweisen [3]. Zeitgleich berichteten Forschungen aus dem französischen Verteidigungsministerium, dass *Yersinia pestis* vorzugsweise Bakteriophagen-DNA in die CRISPR-Loci integriert [4]. Ausgehend von diesen Befunden wurde dann vorgeschlagen, dass CRISPRs Bereiche sind, die in der Lage sind, Fremd-DNA als Teil eines Verteidigungsmechanismus aufzunehmen, und da-



▲ **Abb. 1:** DNA-Spaltung durch CRISPR/Cas9. Kommt der crRNA/tracrRNA/Cas9-Komplex (crRNA: CRISPR-RNA; tracrRNA: *trans*-aktivierende CRISPR-RNA) mit genomischer DNA in Kontakt, so können die ca. 20 Nukleotide langen Spacersequenzen der crRNA an komplementäre Bereiche der genomischen DNA binden. Die Anwesenheit eines *protospacer adjacent motif* (PAM) in der Nähe der genomischen DNA führt dann dazu, dass Cas9 (grau) die genomische DNA durch Einführung eines Doppelstrangbruchs etwa drei Basenpaare stromaufwärts des PAMs spaltet.

mit auch eine Erinnerung an vergangene „genetische Aggressionen“ repräsentiert. Zwei Jahre später haben dann Untersuchungen des Lebensmittelunternehmens Danisco gezeigt, dass „Joghurt-herstellende Bakterien“ sich gegen eine Neuinfektion durch dieselben Bakteriophagen „immunisieren“, indem sie Phagen-DNA als neue Spacer in den vorbestehenden CRISPR-Locus integrieren. Weiterhin zeigten diese Arbeiten, dass auch die *cas*-Gene eine entscheidende Rolle beim Erwerb dieser Immunität spielen. Damit wurde der erste experimentelle Beweis geliefert, dass das CRISPR/Cas-System tatsächlich als bakterieller antiviraler Abwehrmechanismus fungiert [5]. Kurz gesagt, das CRISPR/Cas ist eine Art „bakterielles Immunsystem“.

Wie funktioniert CRISPR/Cas9, und was macht es so einfach?

CRISPR-Systeme sind extrem vielfältig, und trotz des erheblichen Erkenntnisgewinns in den letzten Jahren sind die Mechanismen und die Wirkungsweise des CRISPR/Cas-Systems in Prokaryoten noch nicht genau verstanden. Zurzeit werden sechs Haupttypen mit vielen Subtypen unterschieden. Sie differieren in ihrer Generhaltung, Locusorganisation und mechanistischen Details während der Verteilung.

Am besten ist das Typ-II-System von *Streptococcus pyogenes* untersucht [6]. Dieses CRISPR/Cas-System enthält den eigentlichen CRISPR-Locus mit der typischen *repeat-spacer-repeat*-Array-Architektur, vier Protein-codierende Gene, nämlich *cas9*, *cas1*, *cas2* und *cns2*, sowie eine nicht-Protein-codierende, *trans*-aktivierende CRISPR-RNA (*tracrRNA*) [7].

Die CRISPR/Cas9-vermittelte Immunität hat drei Hauptphasen: Akquisition, Expression und Interferenz.

Man geht davon aus, dass nach der Infektion des Bakteriums in der Akquisitionsphase neue fremde Phagen-DNA-Sequenzen (Protospacer) in den CRISPR-Locus des Bakteriums integriert werden [6]. Obwohl die genauen mechanistischen Details weitestgehend unbekannt sind, werden die in den CRISPR-Locus zu integrierenden Spacer jedoch nicht zufällig ausgewählt, sondern bestehen aus DNA-Abschnitten, die immer nahe an spezifischen, im Phagen-Genom enthaltenen, drei bis sechs Basenpaare langen DNA-Bereichen mit der Sequenz NGG liegen [8]. Diese als Protospacer-benachbarte (*adjacent*) Motive (PAM) bezeichneten DNA-Abschnitte sind spä-

ter kritisch, sind sie doch in der Phagen-DNA enthalten, aber nicht in den Spacersequenzen, die in den CRISPR-Locus eingebaut werden [6].

In der Expressionsphase werden zunächst das CRISPR-Array als auch die *tracrRNA* transkribiert, wodurch eine lange Vorläufer-*crRNA* (Prä-*crRNA*) und eine *tracrRNA* erzeugt werden. Diese zwei RNAs hybridisieren und werden durch Cas9 und RNase III zu kürzeren Formen verarbeitet [7]. Cas9 bindet dabei an die *repeat*-Sequenz der *crRNA* [9].

In der folgenden Interferenzphase löst der Komplex aus *crRNA*, *tracrRNA* und Cas9 den Abbau der eindringenden Phagen-DNA aus. Kommt der *crRNA/tracrRNA/Cas9*-Komplex mit Phagen-DNA in Kontakt, können nun die ca. 20 Nukleotide langen Spacersequenzen der jeweiligen *crRNA* an die komplementären Bereiche der Phagen-DNA binden [10]. Die Anwesenheit eines PAMs in der Nähe der Phagen-Ziel-DNA führt dann dazu, dass Cas9 als Endonuklease das Phagen genom durch Einführung eines DNA-Doppelstrangbruchs etwa drei Basenpaare stromaufwärts des PAMs spaltet [10].

Cas9 enthält zwei Nukleasedomänen, die als HNH (benannt nach charakteristischen Histidin- und Asparaginresten) und RuvC (benannt nach einem *E. coli*-Protein, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist) bekannt sind. Jede Domäne spaltet einen DNA-Strang, wobei die HNH-Domäne den an die *crRNA* hybridisierten Ziel-DNA-Strang und die RuvC-Domäne den komplementären DNA-Strang spaltet. Wie bereits erwähnt, ist die Präsenz eines PAMs in der Ziel-DNA und dessen Interaktion mit der PI-Domäne (*PAM-interacting domain*) im C-Terminus von Cas9 dafür Voraussetzung (**Abb. 1**).

Wie man sieht, ist Cas9 nichts Exotisches, sondern nur eine Endonuklease, ein Enzym, das die Phosphodiesterbindung innerhalb eines Polynukleotids spaltet. Im Gegensatz zu einer weiteren großen Klasse von bakteriellen Endonukleasen, den Restriktionsenzymen, die ihre spezifischen DNA-Sequenzen für die Spaltung selbst erkennen, ist Cas9 eine geführte Nuklease. Es erfordert einen dualen RNA-*guide*, der aus *crRNA* und *tracrRNA* gebildet wird. Dies war für eine ganze Weile für niemanden von großem Interesse, außer für den Mikrobiologen. Dies änderte sich jedoch ab 2012, als entdeckt wurde, dass Cas9 auch „künstlich programmiert“ werden kann. Der Trick bestand lediglich darin, das duale *crRNA:tracrRNA*-Hybridsystem in ein

single-guide-RNA(*sgRNA*)-System zu überführen, das die zwei entscheidenden Merkmale beibehält: die 20 Nukleotide lange Spacersequenz am 5'-Ende der *sgRNA*, die die DNA-Zielstelle durch Watson-Crick-Basenpaarung bestimmt, und die RNA-Doppelstrang-Struktur, an die Cas9 bindet [9]. Dadurch entsteht ein sehr einfaches Zweikomponentensystem aus einer *sgRNA* und Cas9, in dem Änderungen in der Spacersequenz (20 Nukleotide in der nativen RNA) der *sgRNA* dazu verwendet werden können, um Cas9-vermittelte Doppelstrangbrüche (DSB) an jeder DNA-Sequenz von Interesse zu erzeugen, solange diese an eine PAM angrenzt [8]. Einfach ausgedrückt, Veränderungen im DNA-Erkennungsmotiv der *sgRNA* machen Cas9 zur programmierbaren Nuklease. Darüber hinaus besitzt Cas9 Multiplexpotenzial, das heißt, simultanes Targeting von mehr als einem Gen ist möglich.

Um die bakterielle Cas9-Endonuklease für die gezielte Genomeditierung in Säugerzellen zu verwenden, wurde eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) mit einer human-Codon-optimierten Version des Cas9-Gens fusioniert und in ein Säugetier-Expressionssystem kloniert [11]. Um Cas9 an ein Target von Interesse zu lenken, wurde dieses Plasmid mit Plasmiden ko-exprimiert, die *sgRNA* exprimierten. Kurz darauf wurde gezeigt, dass die RNA-gesteuerte Cas9-Nuklease dazu verwendet werden kann, Gene in Maus- und menschlichen Zelllinien zu verändern [12].

Von Hoffnung und Risiken

Trotz der immensen Hoffnungen und des Potenzials insbesondere in Medizin und Biotechnologie war die CRISPR/Cas9-Methode in den vergangenen 18 Monaten Topthema einer Reihe von Berichten, die Sicherheitsbedenken hinsichtlich der Spezifität, Immunogenität und Tumorigenität aufwerfen. Bereits im Mai 2017 erschütterte ein inzwischen zurückgenommenes Paper die CRISPR-Welt. Diesem Drama folgten weitere Schrecken: Zum einen ein Vorabdruck eines Papers, das darauf hindeutet, dass es bereits vorhandene Immunantworten (sowohl humorale als auch zellvermittelte) auf Cas9 beim Menschen gibt, was praktisch bedeutet, dass einige Individuen immun gegenüber CRISPR/Cas9-basierten Therapien wären. Zum anderen zwei in jüngerer Zeit erschienene Artikel, die zeigen, dass das CRISPR/Cas9-System immer dann besonders gut funktioniert, wenn die Funktion des Tumorsuppressorproteins p53 eingeschränkt ist [13, 14]. Das könnte bedeu-

ten, dass CRISPR/Cas9-editierte Zellen anfällig für die Entstehung von Tumoren sind, da sie eventuell kein voll funktionelles p53 besitzen. Weiterhin scheint CRISPR/Cas9 nicht so spezifisch zu sein, wie ursprünglich angenommen. Dies wurde kürzlich in einer Studie angerissen, in der gezeigt wurde, dass nach einem Schnitt mit CRISPR/Cas9 mitunter bis zu 9.500 Basenpaare lange DNA-Abschnitte verloren gehen, Teile der DNA invertiert oder Stücke eingefügt werden, die von einem anderen Chromosomenabschnitt stammen [15].

Obwohl andere CRISPR-basierte Plattformen wie Baseneditierung, Transkriptionsstörung oder RNA-Targeting von diesen Ergebnissen nicht betroffen waren und die oben genannten Berichte die wissenschaftliche Community auch nicht wirklich überraschten, zeigen sie doch deutlich, dass trotz des allgemeinen Hypes diese neue Technologie immer noch vor vielen Herausforderungen und Fallstricken steht, die es zu überwinden gilt. Und diese sind nicht nur technischer, sondern nach der Anwendung an menschlichen Embryonen [16, 17] auch ethischer Natur. Um sich den Herausforderungen zu stellen, ist weiterhin eine zielstrebige Grundlagenforschung in ihrer gesamten Breite notwendig. Dabei müssen offene Fragen im Hinblick auf den Nutzen und potenzielle Risiken sowie die sichere und verantwortungsbewusste Anwendung mit Blick auf den Menschen und die Umwelt transparent und kritisch diskutiert werden. Des Weiteren müssen Empfehlungen für zukünftige Regelungen, z. B. entsprechend konzipierte präklinische Sicherheitstests für jedes Gentherapie-Therapeutikum, erarbeitet werden. ■

Literatur

[1] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K et al. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169:5429–5433

[2] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF et al. (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1:e60

[3] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J et al. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60:174–182

[4] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151:653–663

[5] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712

[6] Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096

[7] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM et al. (2011) CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471:602–607

[8] Sternberg SH, Redding S, Jinek M et al. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507:62–67

[9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821

[10] Wright AV, Nunez JK, Doudna JA (2016) Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell* 164:29–44

[11] Mali P, Yang L, Esvelt KM et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339:823–826

[12] Yang H, Wang H, Shivalila CS et al. (2013) One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 154:1370–1379

[13] Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR et al. (2018) p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med* 24:939–946

[14] Haapaniemi E, Botla S, Persson J et al. (2018) CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med* 24:927–930

[15] Kosicki M, Tomberg K, Bradley A (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 36:765–771

[16] Liang P, Xu Y, Zhang X et al. (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell* 6:363–372

[17] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW et al. (2017) Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548:413–419

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Open access funding provided by University of Oulu, Finland.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Thomas Kietzmann
Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine
Biocenter Oulu
University of Oulu
Aapistie 7
FI-90220 Oulu
Tel.: +358-294-294487713
Thomas.Kietzmann@oulu.fi

AUTOREN



Elitsa Dimova

Biologie- und Ökologiestudium in Sofia, Bulgarien. 1997 Master of Science. 2005 Promotion an der Universität Göttingen. 2005–2009 Postdoc an der Fakultät für Chemie, TU Kaiserslautern. Seit 2017 Dozentin an der Fakultät für Biochemie und Molekulare Medizin, Universität Oulu, Finnland.



Thomas Kietzmann

Medizinstudium in Greifswald, 1989 Diplom in Biochemie. 1989–1991 UNESCO-Stipendium. 1992 Promotion in Medizinischer Genetik. 1996 Facharzt für Biochemie. 2001 Habilitation am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen. 2004–2009 Professor für Biochemie, Fakultät für Chemie, TU Kaiserslautern. Seit 2009 Professor für zelluläre Biochemie an der Fakultät für Biochemie und Molekulare Medizin, Universität Oulu, Finnland.