

Die genetische Schere CRISPR/Cas9

Wolfgang Czieslik, Einhard Schierenberg

Der Nobelpreis für Chemie wurde 2020 an Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna für die Entdeckung verliehen, dass das natürliche bakterielle Viren-Abwehrsystem CRISPR/Cas9 als universelle Genschere verwendet werden kann. Diese Entdeckung ist in Bezug auf seine anwendungstechnischen Möglichkeiten vielleicht der bedeutendste wissenschaftliche Durchbruch des 21. Jahrhunderts. Der CRISPR/Cas9-Mechanismus erlaubt es nämlich, das Erbgut (s. auch „Desoxyribonucleinsäure (DNA) – Träger der Erbinformation“ und „Genom-Editierung“ <https://www.mpg.de/genom-editierung>) eines beliebigen Organismus gezielt an ausgewählten Stellen in gewünschter Weise zu verändern. [1], [2], [3]



Abb. 1: Emmanuelle Marie Charpentier (* 11. Dezember 1968 in Juvisy-sur-Orge, Frankreich) Charpentier studierte ab 1986 Biologie, Mikrobiologie und Genetik an der Universität Pierre und Marie Curie in Paris, wo sie 1995 für ihre Forschungsarbeiten am Institut Pasteur einen Ph.D. in Mikrobiologie erwarb. 2002 wechselte sie an die Max F. Perutz Laboratorien der Universität Wien und ging 2009 an die Universität Umeå in Schweden. Von 2013 bis 2015 war Charpentier Professorin an der Medizinischen Hochschule Hannover und leitete die Abteilung „Regulation in Infection Biology“ am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig. 2015 folgte Charpentier dem Ruf zur Direktorin der Abteilung „Regulation in der Infektionsbiologie“ am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin und ist seit 2018 Gründungsdirektorin der Max-Planck-Forschungsstelle für die Wissenschaft der Pathogene. [4]



Abb. 2: Jennifer A. Doudna Cate (* 19. Februar 1964 in Washington, D.C.). -Sie erwarb 1985 einen Bachelor am Pomona College, Claremont, CA, in Chemie und 1989 einen PhD an der Harvard University. 1994 erhielt sie eine erste Professur an der Yale University. 2000/2001 war sie Gastprofessorin an der Harvard University, bevor sie 2003 an die University of California, Berkeley wechselte. [5]

Was ist CRISPR/Cas und wie funktioniert es?

Viele Bakterien besitzen ein sehr effektives System, mit dem sie eindringende Viren unschädlich machen können. Ein Virus selbst ist zu keinen Stoffwechselvorgängen fähig und benötigt daher zur Fortpflanzung Wirtszellen. Bakteriophagen, das sind Viren, die Bakterien als Wirtszellen verwenden, heften sich an die die Außenwand des Bakteriums und schleusen ihre DNA bzw. Ihre RNA in die Bakterienzelle ein. Viele Bakterien besitzen andererseits in ihrem Erbgut sich wiederholende Sequenzen (repeats, 22-47 Basenpaare), die als „clustered regularly interspaced palindromic repeats“ (gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom-Wiederholungen), kurz CRISPR, bezeichnet werden. (Abb. 3)

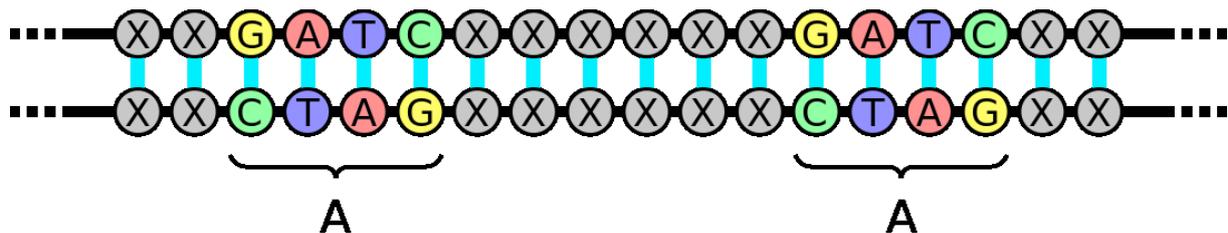


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung einer repeat-Sequenz mit Palindrom-Sequenzen: Die mit A bezeichnete Sequenz des oberen DNA-Strangs entspricht der Sequenz des unteren Strangs allerdings in-gegenläufiger Abfolge. Zwischen den Palindrom-Sequenzen befinden sich in der Regel nicht palindromische Sequenzen, hier mit X gekennzeichnet. Verändert nach [6]

Zwischen den repeats befinden sich variable Abschnitte (spacer, 17–20 Basenpaare), die beispielsweise aus dem Erbgut von Viren stammen, die früher in die Bakterienzellen eingedrungen sind. Mit Hilfe dieser spacer kann das Bakterium das Virus erkennen, wenn dieses erneut an das Bakterium andockt und seine DNA einschleust. In der Nähe der CRISPR-Blöcke befindet sich eine DNA-Sequenz, die den Bauplan für eine Nuclease, in diesem Fall Cas9, enthält. Cas9 ist ein Enzym, das in dem Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA (siehe „Desoxyribonucleinsäure (DNA) – Träger der Erbinformation“) die Auftrennung der Bindung zwischen dem Phosphat-Rest und dem Zucker (Desoxyribose) katalysiert. Somit kann Cas9 als DNA Schere bezeichnet werden.

Bei einem Virenangriff auf das Bakterium wird zunächst die Information der doppelsträngigen CRISPR-DNA auf in eine einzelsträngige crRNA (CRISPR-RNA) übertragen und so die zur CRISPR-DNA passende crRNA aus den entsprechenden Bausteinen synthetisiert wird (Transkription). Die einzelsträngige crRNA besteht also aus -sich wiederholenden konstanten palindromischen Sequenzen (repeats), zwischen denen sich variable Sequenzen aus Viren-Erbgut befinden. Die crRNA wird nun in kürzere RNA-Abschnitte zerlegt, die aus einem virenspezifischen spacer und den repeats bestehen.

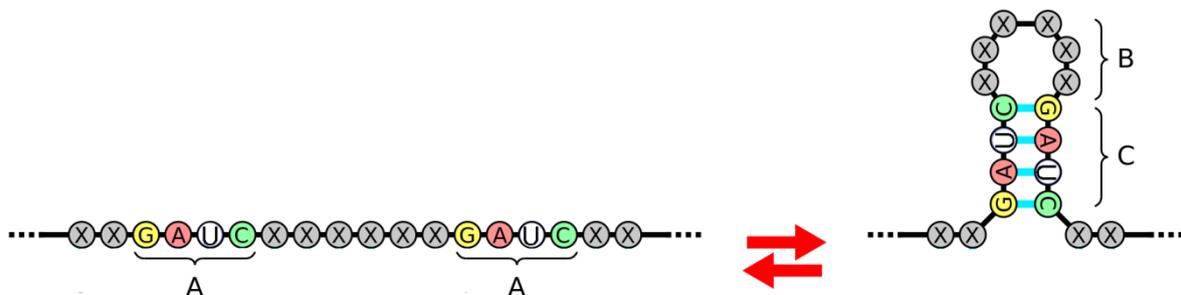


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der Bildung einer stabilen Haarnadelstruktur(C) aufgrund von zwei palindromischen Sequenzen (A) in einem RNA-Strang. Verändert nach [6]

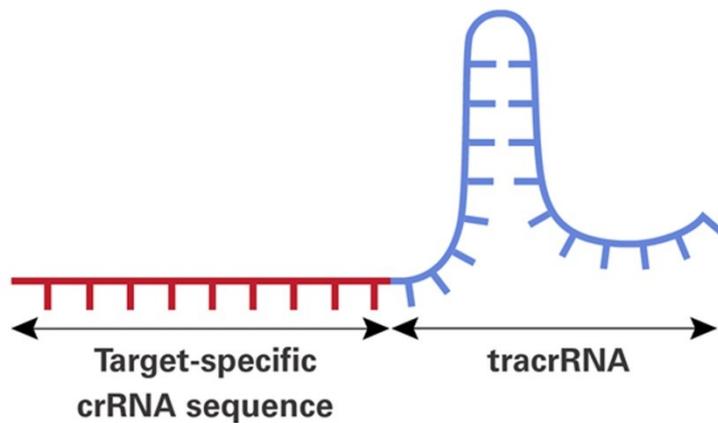


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der crRNA mit der virenspezifischen RNA-Sequenz und der palindromischen Sequenz (tracrRNA; „transacting Crispr RNA“) [7]

Die palindromischen Sequenzen (A) in der einsträngigen RNA können entsprechend den Regeln der Basenpaarung den Stamm (C) einer stabilen Haarnadelstruktur bilden. (Abb. 4 und 5) Diese Struktur wird für die tracrRNA („transacting Crispr RNA“) verwendet, die crRNA an die Nuclease (Cas9) andocken und diese dann mit Hilfe der virenspezifischen RNA-Sequenz (target specific crRNA sequence) zu der passenden DNA-Sequenz des eingedrungenen Virus führen kann. An dieser Stelle ist Cas9 nun in der Lage die Viren-DNA zu schneiden und damit unschädlich zu machen.

Damit der Komplex aus tracrRNA, crRNA und Cas9 die zu zu schneidende Virus-DNA erkennen kann, muss er diese erst einmal finden. Dazu dient die Sequenz XGG, wobei X jedes beliebige Nukleotid sein kann und G ist das Nukleotid mit der Base Guanin. Erst wenn Cas9 auf eine Sequenz dieser Art, die als PAM-Motiv (proto-spacer adjacent motif) bezeichnet wird, in der Virus-DNA trifft dockt es an diese an und entspiralisiert die Doppelhelix der Viren-DNA. Mit der crRNA wird nun überprüft, ob sich die Ziel-DNA in der Nähe befindet. Ist dies nicht der Fall, wandert der CRISPR/Cas9-Komplex weiter bis der passende Abschnitt gefunden ist und die Viren-DNA dann an dieser Stelle geschnitten wird. (Abb. 6) Da die PAM-Sequenz sehr kurz ist, ist die Wahrscheinlichkeit, dass es auch in der Nähe der zu schneidenden Zielsequenz die PAM-Sequenz gibt, sehr groß. Der hier dargestellte Mechanismus funktioniert auch bei Viren deren Erbgut aus RNA besteht.

CRISPR-CAS9-Komplex mit gRNA

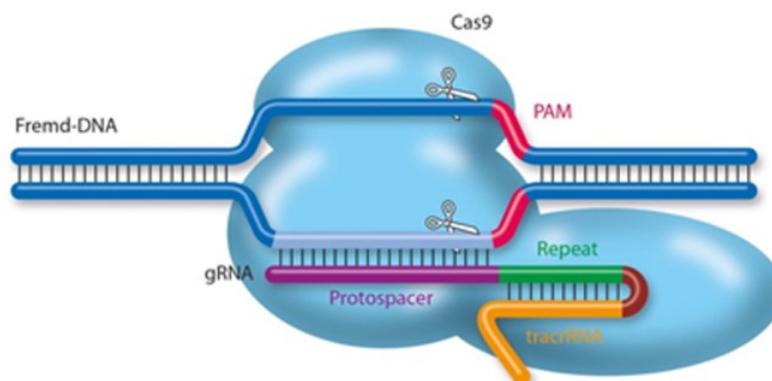


Abb.6: Der CRISPR-Cas9-Komplex besteht aus drei Komponenten: Die CRISPR-RNA (crRNA, hier als gRNA guideRNA bezeichnet) erkennt mit ihrem von einer früheren Virusattacke stammenden spacer-Bereich (hier als „Protospacer“ bezeichnet) einen passenden Abschnitt auf einer Fremd-DNA. Zusammen mit der tracr-RNA bildet sie eine besonders stabile Haarnadel-förmige Struktur aus. Das Cas9-Enzym kann dann die beiden DNA-Stränge durchtrennen, allerdings muss in unmittelbarer Nähe ein weiterer kurzer Erkennungsabschnitt liegen (PAM). [8] © MPG/ Art for Science

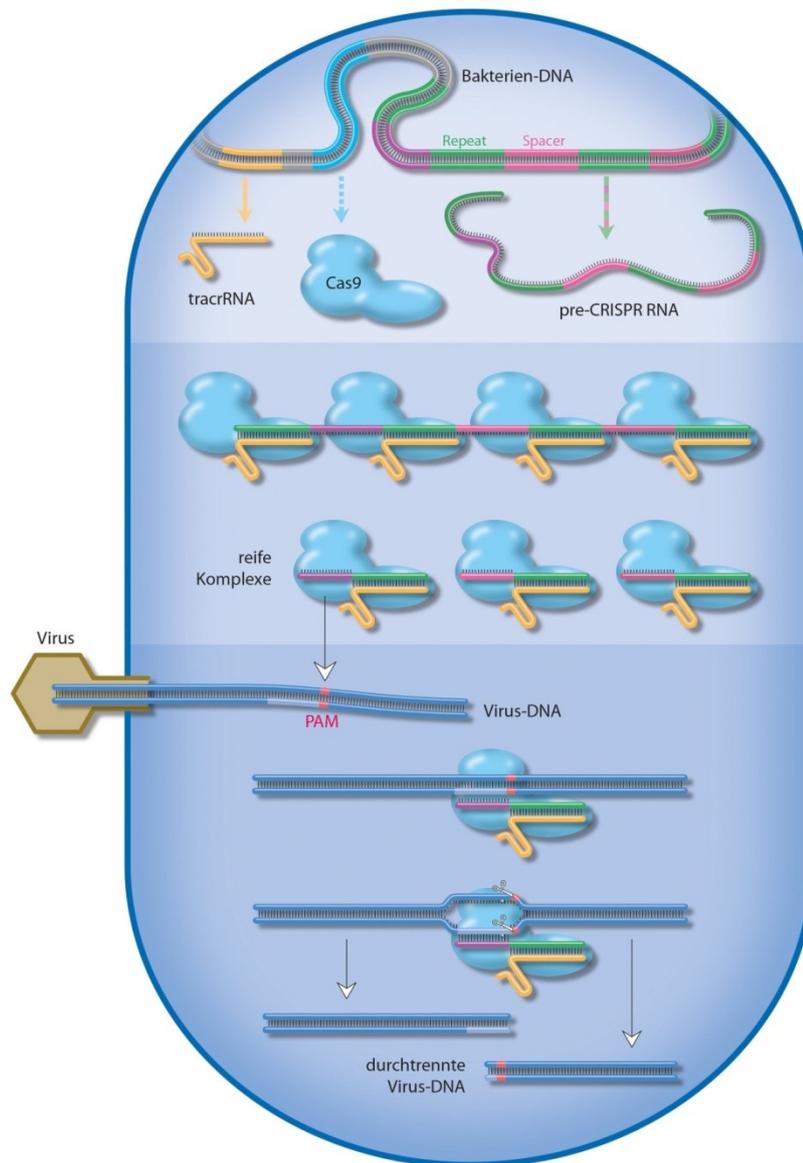


Abb. 7: Immunsystem eines Bakteriums: Befällt ein Virus eine Bakterienzelle werden Teile seines Erbguts in die CRISPR-Region (repeats) des Bakteriengenoms als sogenannte spacer eingebaut. Das davon abgelesene RNA-Molekül (pre-CRISPR-RNA) durchläuft mehrere Veränderungen, bevor es zusammen mit der tracr-RNA und dem Cas-Enzym aktiv werden kann. Bei einer erneuten Infektion mit dem Virus erkennt die CRISPR-RNA das Erbgut des Erregers wieder und führt das Enzym zu einer passenden Schnittstelle. Der Virus wird dadurch unschädlich gemacht. [9]
© MPG/ Art for Science

Nachweis von SARS-CoV-2 mit einem CRISPR-Cas-System [10]

Der Goldstandard für den Nachweis von Corona-Viren wie SARS-CoV-2 ist der PCR-Test (polymerase chain reaction; s. auch „Der PCR-Test“). Hierbei reicht eine winzige Menge des viralen Erbmaterials aus, das um das 100.000-fache oder mehr vervielfältigt und dann nachgewiesen wird. Dies ist auch die Methode, mit der in der Kriminaltechnik auch kleinste Spuren von DNA potenzieller Täter identifiziert werden.

Dieser Nachweis kann nur in einem gut ausgestatteten Labor, das über die notwendigen Automaten verfügt, durchgeführt werden.

Bei einem im Januar 2021 neu beschriebenen Verfahren [10] wird ein CRISPR/Cas-Komplex für den Nachweis von Viren-RNA, z.B. von SARS-CoV-2, verwendet. Allerdings wird hierbei nicht das Enzym Cas9 sondern das verwandte Cas13 verwendet.

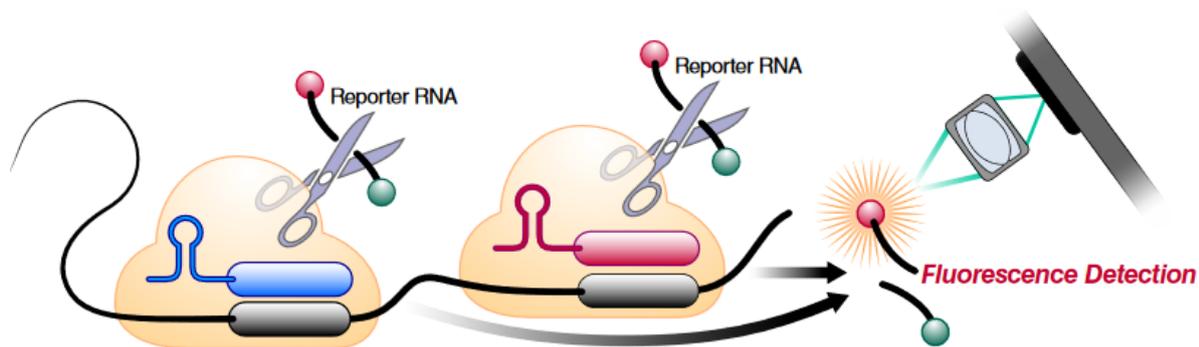


Abb. 8: Nachweis von SARS-CoV-2 mit einem CRISPR-Cas-System [10]

Zwei CRISPR/Cas13-Komplexe mit jeweils einer kleinen crRNA-Sequenz aus der nachzuweisenden Viren-RNA (blau und violett: crRNA; blau-rosa: Cas13) binden an den passenden Stellen der Viren-RNA (schwarz), falls diese in der Untersuchungsprobe enthalten ist. Zusätzlich bindet Cas13 eine Reporter-RNA (schwarz), falls diese in der Untersuchungsprobe enthalten ist. Wenn der CRISPR/Cas-Komplex allerdings an die Viren-RNA bindet, dann schneidet Cas13 auch die Reporter-RNA und die Probe fluoresziert. Die Fluoreszenz wird stärker wenn mehr als ein CRISPR/Cas-Komplex verwendet wird. Aus der Intensität der Fluoreszenz lässt sich im Gegensatz zur empfindlicheren PCR-Methode die Viruslast des Patienten abschätzen. Weitere Vorteile dieses neuartigen Ansatzes für zukünftige Massentests sind zum einen seine Schnelligkeit - es dauert nur wenige Minuten bis zum Ergebnis - und die Einfachheit der Anwendung ohne teure Spezialgeräte.

Literaturhinweise und Bildnachweise

1. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/popular-information/>
2. <https://www.nobelprize.org/uploads/2020/10/advanced-chemistryprize2020.pdf>
3. Jennifer A. Doudna, Emmanuelle Charpentier, The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, SCIENCE sciencemag.org 28 November 2014 • VOL 346 ISSUE 6213
4. <https://www.mpg.de/9343753/science-of-pathogens-charpentier>
5. <https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/people/summary/Doudna>
6. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_palindrome.svg
7. <https://medium.com/@ahmedmoselhi7/beyond-cas9-expanding-our-genetic-editing-toolkit-e76b230b632c>
8. <https://www.mpg.de/11032932/crispr-cas9-mechanismus>
9. <https://www.mpg.de/11032886/crispr-cas9-aufgaben>
10. Fozouni et al., Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy, 2021, Cell 184, 323–333 January 21, 2021 © 2020 Elsevier Inc. <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2820%2931623-8>

Weiterführende Literatur

Beyer / Walter, Organische Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig, 2015

B. Alberts, Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2021

Ein sich wiederholendes Mysterium

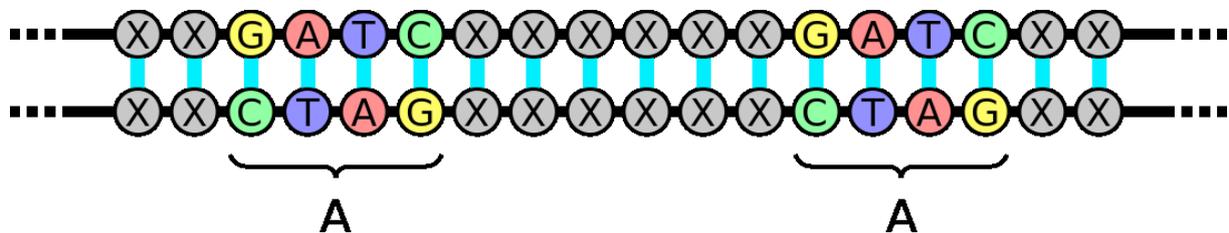
Eine kurze Geschichte der Entdeckung des CRISPR/Cas9 -Systems

Bakterien wie beispielsweise *Escherchia coli*, ein Darmbakterium, besitzen ein uraltes System, mit dem sie eindringende Viren bekämpfen. Wir nennen es heute CRISPR/Cas9.

1987 veröffentlichten der japanische Molekularbiologe Yoshizumi Ishino und seine Kollegen der Universität Osaka in Japan die Sequenz eines Gens namens *iap*, das zu der Darmmikrobe *E. coli* gehört. Um besser zu verstehen, wie das Gen funktionierte, sequenzierten die Wissenschaftler auch einen Teil der es umgebenden DNA. Sie hofften, Stellen zu finden, an denen *iap* an- und ausgeschaltet wird. Doch statt eines Schalters fanden die Wissenschaftler etwas Unverständliches.

In der Nähe des *iap*-Gens lagen fünf identische DNA-Abschnitte, die jeweils aus den gleichen 29 Basen zusammengesetzt waren. Diese Wiederholungssequenzen (Repeat-Sequenzen) wurden durch DNA-Blöcke (Spacer) aus jeweils 32 Basenpaare voneinander getrennt. Im Gegensatz zu den Repeat-Sequenzen hatte jeder der Spacer eine einzigartige Sequenz.

Vereinfacht lassen sich die DNA-Blöcke wie folgt darstellen:



Die mit A bezeichnete Sequenz des oberen Strangs entspricht der Sequenz des unteren Strangs allerdings in umgekehrter Reihenfolge. Zwischen den Palindrom-Sequenzen befinden sich in der Regel nicht palindromische Sequenzen, hier mit X gekennzeichnet. Die A-Blöcke bezeichnet man auch als Palindrome. In der deutschen Sprache sind Palindrome Buchstabenketten. Die vorwärts und rückwärts gelesen werden können. Beispiele hierfür sind die Wörter **ANNA**; **REITTIER**; **REGALLAGER** oder auch **RELIEFPFEILER**. Diese Wörter bestehen jeweils aus zwei Teilen: Der erste Teil (rot) von vorne nach rechts gelesen ergibt das gleiche Wort wie der zweite Teil (grün) von hinten nach links gelesen. In dem Wort RELIEFPFEILER sind die Palindrome durch den Buchstaben P voneinander getrennt.

Dieses eigentümliche genetische Sandwich sah nicht aus wie etwas, das Biologen zuvor gefunden hatten. Als die japanischen Forscher ihre Ergebnisse veröffentlichten, konnten sie nur mit den Achseln zucken. "Die biologische Bedeutung dieser Sequenzen ist nicht bekannt", schrieben sie.

Im Verlauf der 1990er Jahre fand man die beschriebenen genetischen Sandwiches in einer großen Anzahl von Bakterien ohne zu wissen wofür diese Sequenzen bestimmt waren. Im Jahr 2002 bezeichneten der Molekularbiologe Ruud Jansen von der Universität Utrecht und Kollegen diese Sandwiches als "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" kurz CRISPR.

Jansens Team fand außerdem, dass sich in der Nähe von CRISPR immer eine Ansammlung von Genen befand, die für Enzyme, also Proteine, codierten, die DNA schneiden konnten. Diese Gene wurden Cas-Gene, CRISPR-associated, genannt. Die Bedeutung dieses CRISPR/Cas Systems war aber weiterhin rätselhaft.

Drei Jahre später bemerkten drei Teams von Wissenschaftlern unabhängig voneinander, dass die CRISPR-Spacer der DNA von Viren sehr ähnlich sahen.

Als Eugen Koonin, ein Evolutionsbiologe am National Center for Biotechnology Information in Bethesda, Md., davon erfuhr, dass CRISPR-Spacer Teile der Virus-DNA seien, entwickelte er eine Hypothese wie Mikroben CRISPR als Waffe gegen Viren benutzen: Bakterien verwenden Cas-Enzyme, um sich Fragmente der Virus-DNA zu schnappen, die sie dann in ihre eigenen CRISPR-Sequenzen einfü-

gen. Später, wenn ein anderes Virus auftaucht, können die Bakterien die CRISPR-Sequenz als „Spickzettel“ verwenden, um den Eindringling zu erkennen.

Die Wissenschaftler wussten nicht genug über die Funktion der CRISPR- und Cas-Enzyme, um eine detaillierte Hypothese aufstellen zu können. Aber für den Mikrobiologen Rodolphe Barrangou war Koonins Hypothese interessant genug, um sie zu testen.

Barrangou und seine Kollegen infizierten das milchgärende Bakterium *Streptococcus thermophilus* mit zwei Virusstämmen. Die Viren töteten viele der Bakterien, aber einige überlebten. Als sich diese resistenten Bakterien vermehrten, erwiesen sich auch ihre Nachkommen als resistent. Es waren einige genetische Veränderungen eingetreten. Barrangou und seine Kollegen fanden heraus, dass die Bakterien DNA-Fragmente der beiden Viren in ihre Abstandshalter („spacer“) gestopft hatten. Als die Wissenschaftler diese herauschnitten, verloren die Bakterien ihre Resistenz.

Im Jahr 2007, also 20 Jahre nach der Entdeckung der seltsamen Sequenzen, gelang erstmals der Nachweis, dass das CRISPR/Cas9 System eine Art Immunsystem der Bakterien ist.

Zu diesem Zeitpunkt kamen die Wissenschaftlerinnen Jennifer Doudna und Emanuelle Charpentier auf eine bahnbrechende Idee: Warum nicht dieses System der Genschere für eigene Zwecke nutzen? Das Prinzip der Gen-Scheren war zwar bereits verwirklicht, und die ersten beiden [ZFN und TALEN](#) fanden schon rege Anwendung. Gegenüber diesen Genschere hatte das System aus CRISPR und Cas9 aber einen großen Vorteil: Es besteht aus zwei Komponenten. Das Protein Cas9 ist als Schneideinstrument universell einsetzbar und RNA-Moleküle, die an Stelle von CRISPR ein gewünschtes Ziel definieren, können schon für wenig Geld bei spezialisierten Firmen bestellt werden. Eine wichtige Frage blieb noch offen: Funktioniert das bakterielle CRISPR/Cas9 auch in menschlichen Zellen? Anfang 2013 erschienen drei Studien, die dies eindeutig zeigten - mit dabei waren erneut Doudna und Charpentier. Damit war der Damm gebrochen - CRISPR/Cas9 trat seinen Siegeszug durch Labore in aller Welt an.

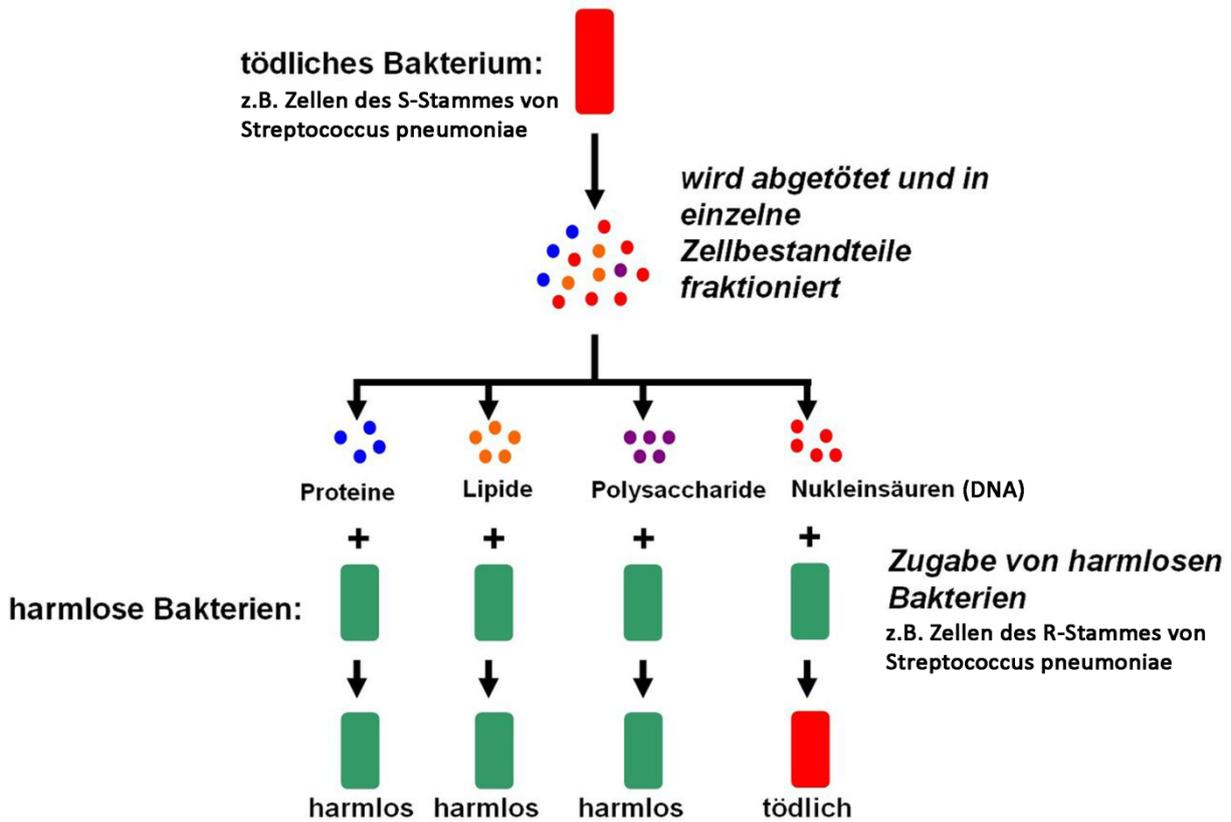
Quellen

Dieser Text wurde unter Verwendung folgender Artikel erstellt:

- Carl Zimmer, Breakthrough DNA Editor Born of Bacteria
<https://www.quantamagazine.org/crispr-natural-history-in-bacteria-20150206/>
- CRISPR/Cas9 - Bakterien und die Manipulation des Erbguts
https://www.wissensschau.de/genom/crispr_forschung_medizin.php

Desoxyribonucleinsäure (DNA) – Träger der Erbinformation

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist die Trägerin der Erbinformation. Diese Erkenntnis ist das Ergebnis von Experimenten, die im Jahr 1944 von dem kanadischen Mediziner Oswald Avery (* 21. Oktober 1877, † 2. Februar 1955) mit verwandten Stämmen des Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* durchgeführt wurden.

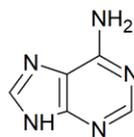


Schematische Darstellung des Versuchs von Avery (modifiziert nach[2])
Harmlose Bakterien können zu tödlichen Bakterien werden, wenn Ihnen die Erbinformation der tödlichen Bakterien zugeführt wird. Das Fazit der Versuche ist, dass die DNA und nicht die Proteine, wie viele Biologen vor den Experimenten von Avery annahmen, die Trägerin der Erbinformation ist.

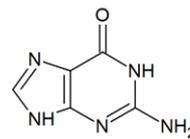
Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) besteht aus der Phosphat-Gruppe, einem Zucker, der Desoxyribose und vier Basen, dem Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin(T).

Das Molekül der DNA besteht aus zwei langen Ketten, in der sich jeweils die Desoxyribose mit einem Phosphatrest abwechseln. Mit jeder Desoxyribose in dieser Kette ist jeweils eine der vier genannten Basen verbunden.

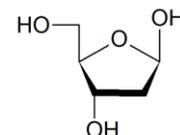
Beide Ketten sind über Wasserstoffbindungen zwischen zwei Basen miteinander verbunden - in der Abbildung „Strukturformel eines DNA-Ausschnittes“ durch Punkte dargestellt.



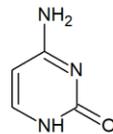
Adenin



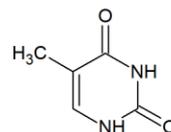
Guanin



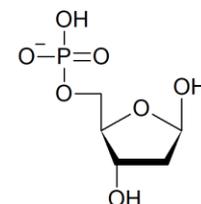
Deoxyribose



Cytosin

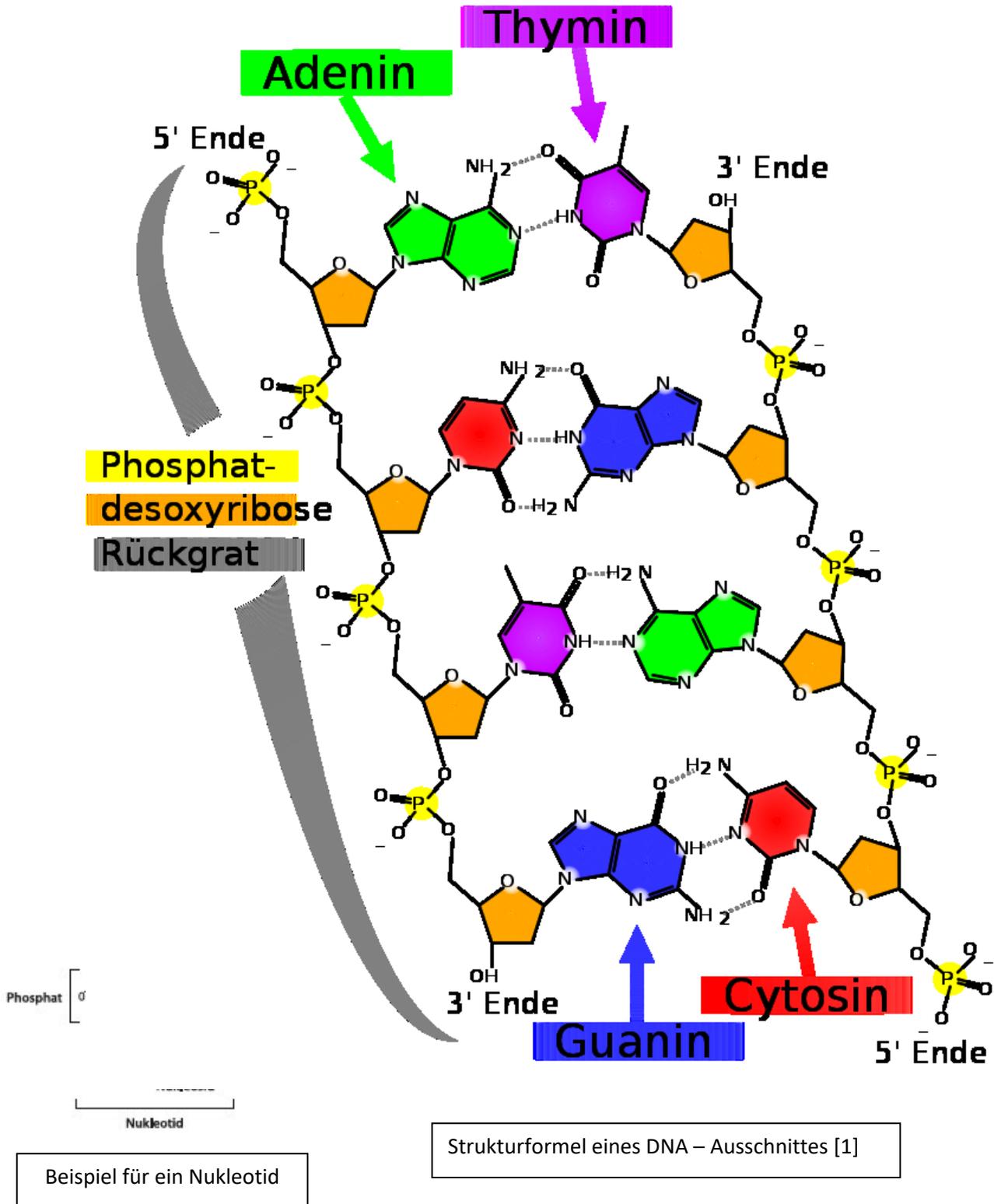


Thymin



2-Desoxyribose-5-phosphat

Dabei sind immer Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin verbunden. Der Verbund aus einer Base, dem zugehörigen Zucker und einem Phosphatrest wird als Nukleotid bezeichnet. Die Kurzbezeichnungen A, G, C, T und U für die Basen werden auch für die Kennzeichnung des Nukleotids verwendet.



Sekundärstruktur der DNA

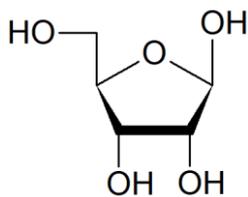
Die beiden DNA-Ketten liegen nun nicht einfach parallel nebeneinander, sondern sie sind zu einer Doppelhelix verdrillt.

Das Doppelhelixmodell für die Molekularstruktur der DNA wurde erstmalig 1953 von dem britischen Physiker Francis H. C. Crick (* 8. Juni 1916, † 28. Juli 2004) und dem amerikanischen Molekularbiologen James D. Watson (*6. April 1928) vorgeschlagen. Zur Veranschaulichung diente ein Modell, das die beiden Wissenschaftler aus Drähten, Blechstücken und Stativmaterial aufbauten.

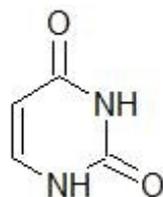


Rekonstruktion des Doppel-Helix Modells der DNA von Crick und Watson von 1953 [4]

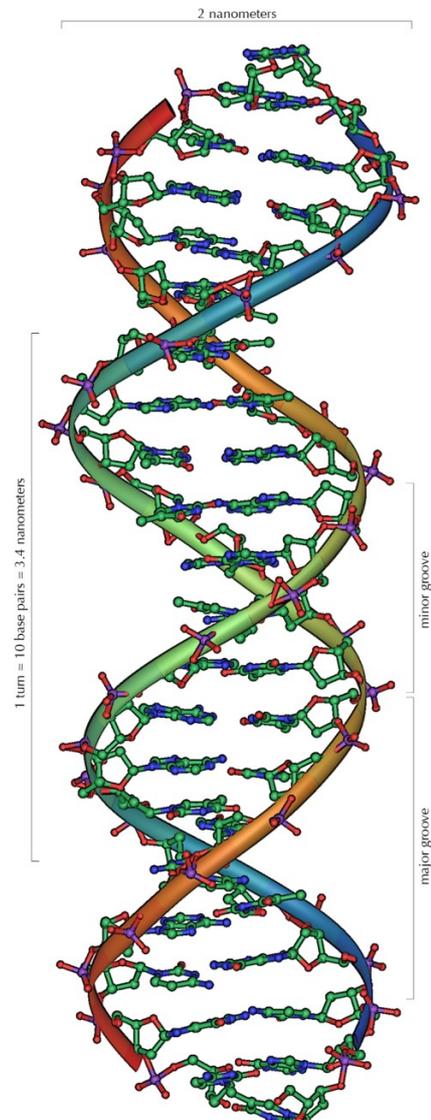
Bei vielen Prozessen in der Zelle, wie beispielsweise der Synthese von Proteinen, wird die Ribonucleinsäure (RNA) verwendet. Im Zucker-Phosphat-Strang der RNA befindet sich Ribose anstelle von Dextroxyribose und die Base Thymin in der DNA wird durch die Base Uracil (U) in der RNA ersetzt.



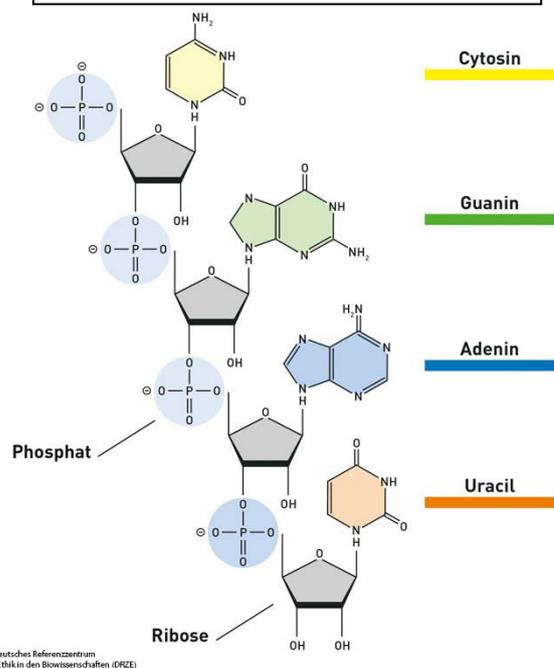
Ribose



Uracil



Ausschnitt von 20 Basenpaaren aus der DNA-Doppelhelix [5]



© Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften (DRZE)

Strukturformel eines RNA – Ausschnittes [3]

Speicherung der genetischen Information in der DNA

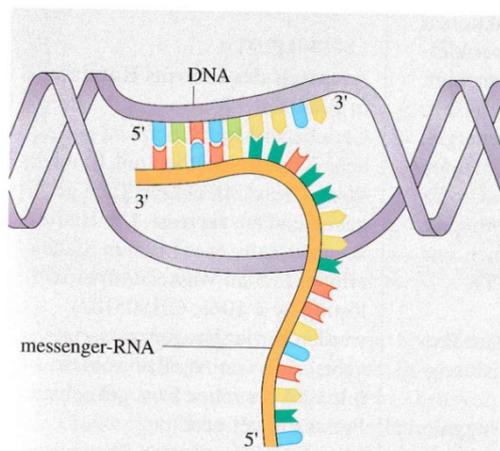
In der Abfolge der Basen in der DNA ist das Erbgut eines Organismus gespeichert. Die DNA des Menschen in einer menschlichen Zelle enthält etwa 3 Milliarden Basenpaare. Jeder Mensch ist ungefähr das Produkt von 100 Billionen Zellen, wovon etwa 25% Blutzellen sind, die keinen eigenen Zellkern besitzen.

Jeweils drei nebeneinander liegende Basen stellen den Code für eine Aminosäure dar, mit denen die Proteine aufgebaut werden. Mit vier verschiedenen Basen gibt es $4^3 = 64$ unterschiedliche Dreier-Kombinationen (Codons) der Basen. Beispielsweise wird die einfachste Aminosäure Glycin durch die Basen-Kombinationen GGA, GGC, GGG und GGU codiert. Da die Proteine aller Lebewesen aus insgesamt 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut werden, werden die meisten Aminosäuren durch mehr als ein Codon repräsentiert.

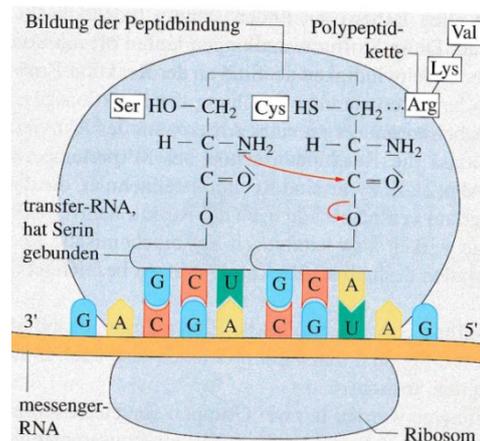
Proteinbiosynthese

„Zunächst wird die Basensequenz eines Gens der DNA in die Basensequenz eines der DNA ähnlichen Moleküls, der messenger-RNA (mRNA), umgeschrieben. Dieser Vorgang heißt Transkription. Das messenger-RNA-Molekül transportiert die Information aus dem Zellkern heraus zu den Ribosomen im Zellplasma, wo die Synthese der Proteine erfolgt.

Die Übersetzung (Translation) der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz des Proteins erfolgt wieder unter Mitwirkung von RNA-Molekülen. Die benötigten Aminosäuren werden durch transfer-RNA (tRNA) zum Ribosom transportiert. Für diesen Vorgang wird ein zum tRNA-Molekül passendes Aminosäuremolekül kurzzeitig gebunden. Im Ribosom erfolgt schließlich mit Hilfe des Enzyms Peptidyltransferase die Verknüpfung der Aminosäuren in der durch das Gen festgelegten Reihenfolge“ [6]



Transkription: Die Basensequenz der DNA wird in die messenger-RNA umgeschrieben [6]



Prinzip der Translation: Bildung der Peptidbindung zwischen Serin und Cystein [6]. Diese Abb. finde ich für einen Uneingeweihten schwer zu verstehen. Ist Peptid/ Polypeptid/Peptidbindung erklärt?

Bild-und Textnachweise

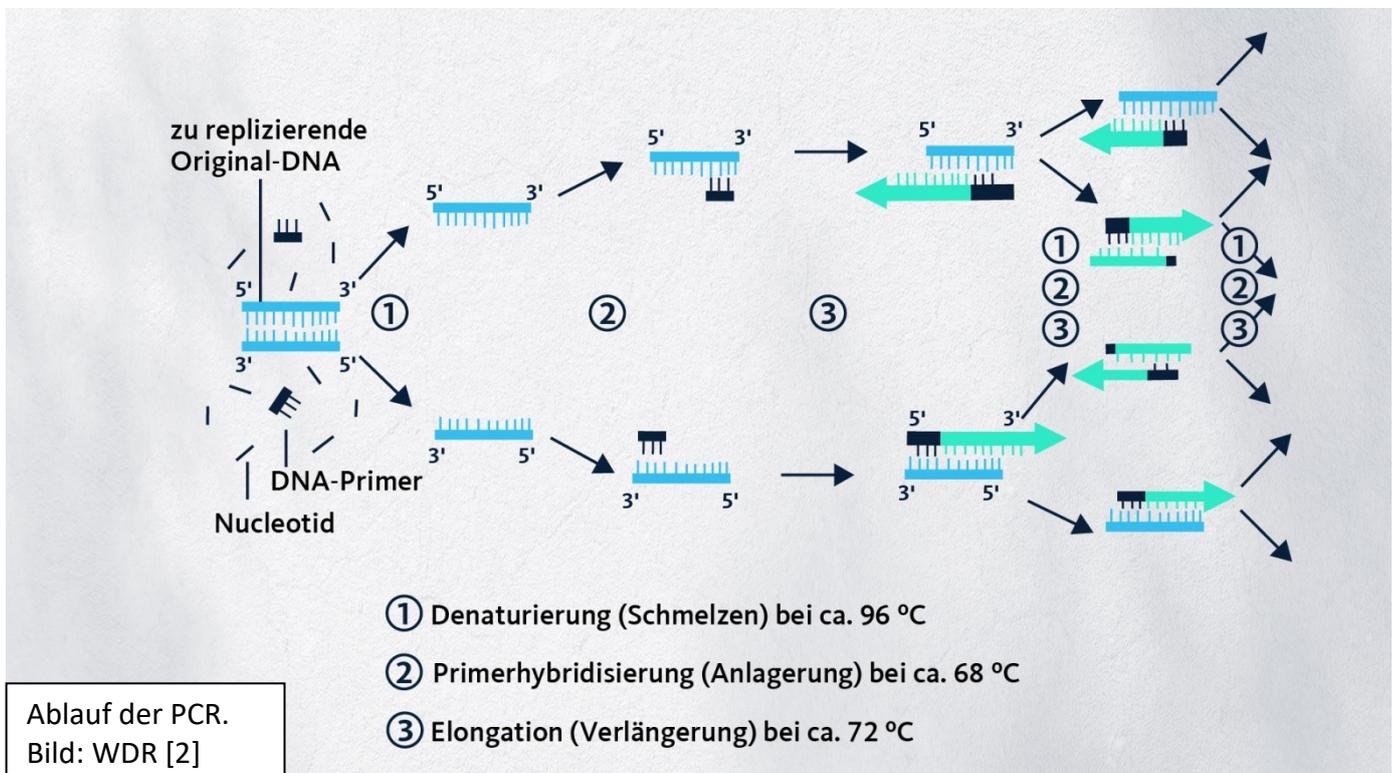
1. <https://www.lecturio.de/magazin/dna/>
2. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c0/Averyversuch.jpg>
3. <https://www.drze.de/jm-blickpunkt/somatische-gentherapie/module/rna-und-dna>
4. Science Museum London:
<https://collection.sciencemuseumgroup.org.uk/objects/co146411/crick-and-watsons-dna-molecular-model-molecular>
5. https://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleins%C3%A4ure#/media/Datei:DNA_Overview.png
6. Leicht modifiziert nach Chemie Oberstufe, Cornelsen Verlag, Berlin 2010, S.421

Der PCR-Test [1], [2]

Die PCR - Polymerase Chain Reaktion, auf Deutsch Polymerasekettenreaktion - ist ein System, mit dem man spezifische DNA-Sequenzen außerhalb des lebenden Organismus, *in vitro*, vervielfältigen kann. Entwickelt wurde sie 1983 von dem amerikanischen Biochemiker Kary Mullis. (28.12.1944 – 7.10.2019), der hierfür 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt.

Komponenten für die PCR:

- DNA , die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält.
- Zwei Primer: kurze Nukleotid-Sequenzen, die sich an die Einzelstränge der DNA anlagern können und den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen
- DNA-Polymerase: Enzym, das bei hohen Temperaturen stabil ist und die Synthese der festgelegten DNA katalysiert.
- Vier Nukleotide: Die Bausteine mit den Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, aus denen die DNA aufgebaut wird.
- Magnesium-Ionen, die für die Funktion der Polymerase notwendig sind und Pufferlösungen mit denen der richtige pH-Wert der Lösungen eingestellt wird.



Die zu untersuchende DNA , befindet sich zusammen mit dem Primer, den Nukleotiden und zusätzlichen Reagenzien in dem Reaktionsgefäß.

- Denaturierung: Die Temperatur wird auf 94 bis 96°C erhöht, wobei sich die beiden DNA-Stränge voneinander lösen, so dass zwei Einzelstränge vorliegen.
- Anlagerung: Die Temperatur wird für ca. 30 s auf einen Wert zwischen 55 und 65°C gesenkt, so dass sich der Primer an einen Einzelstrang der DNA anlagern kann.
- Verlängerung: Bei einer Temperatur von 72°C wird ausgehend von den Primern mit Hilfe der Polymerase aus den Nukleotiden ein neuer Einzelstrang an die freiliegenden Einzelstränge der Ausgangs DNA angebaut. Aus einem Doppelstrang sind zwei geworden.

Danach beginnt ein neuer Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung, in dem aus den beiden DNA-Strängen vier DNA-Stränge werden. In den meisten Fällen werden etwa 30 Zyklen durchlaufen, wodurch aus einem DNA-Strang mehr als eine Milliarde, genau $2^{30} = 1.073.740.000$ Stränge werden.

Der PCR-Test beim Corona-Virus

Das Corona-Virus besitzt keine DNA, sondern eine RNA. Vor dem Beginn des oben beschriebenen Test- Zyklus muss die Viren-RNA in eine entsprechende DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in dem gleichen Reaktionsgefäß, in dem auch die PCR stattfindet. Auch bei diesem Prozess wird zunächst ein Primer, eine kurze Sequenz der Viren RNA, an die zu untersuchende RNA angelagert und dann mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase verlängert. Damit entsteht ein DNA-Strang, der die gleichen genetischen Informationen wie das Virus Genom enthält. Hier beginnt dann die PCR wie sie für die DNA beschrieben wurde.

Identifizierung des PCR-Produktes

Für die Identifizierung des PCR-Produktes wird die Gelelektrophorese verwendet. Dazu wird DNA in ein Agarose-Gel (Agarose ist ein Polysaccharid <https://de.wikipedia.org/wiki/Agarose>) eingebracht und anschließend wird eine Gleichspannung angelegt. Da die DNA eine negative Ladung an der Phosphatgruppe aufweist, wandert sie zum Pluspol. Dabei bewegen sich die kürzeren DNA-Stränge schneller als die längeren. Die Länge des PCR-Produktes kann dann durch den Vergleich mit einer Probe, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden.

Für einen quantitativen Nachweis wird die Real Time PCR verwendet. Bei diesem Verfahren befinden sich zusätzlich noch DNA-Sonden im Reaktionsgefäß, die während der Anlagerungsphase wie die Primer spezifisch an den gesuchten DNA-Abschnitt binden. Die Sonden besitzen eine Fluoreszenzmarkierung, die allerdings inaktiv ist solange die Sonde intakt ist. Wenn die Polymerase mit der Verlängerung beginnt stört die Sonde und wird zerstört. Damit wird die Fluoreszenzmarkierung frei gesetzt und die Probe beginnt leuchten.

Quellen und Bildnachweis

1. <https://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>
2. <https://www.quarks.de/gesundheit/medizin/corona-test-wie-funktioniert-der-test/>

Genome Editing – Die DNA wird gezielt verändert

Das natürliche Abwehrsystem von Bakterien gegen Fremd-DNA kann dazu verwendet werden, um gezielt kurze Sequenzen aus einem DNA-Strang heraus zu schneiden.

Hierzu muss eine CRISPR-RNA konstruiert werden, die der gewünschten Zielsequenz in der t DNA, die man verändern möchte, entspricht. Diese so entstandene zielspezifische crRNA wird mit tracrRNA zu einem Strang, der single guide RNA (sgRNA) genannt wird, verbunden. Die sgRNA bindet an die Nuclease Cas9 und der CRISPR/Cas-Komplex sucht -wie in „Was ist CRISPR/Cas und wie funktioniert es?“ beschrieben- die DNA nach der Zielsequenz ab, dockt dort-an und zerschneidet die DNA.

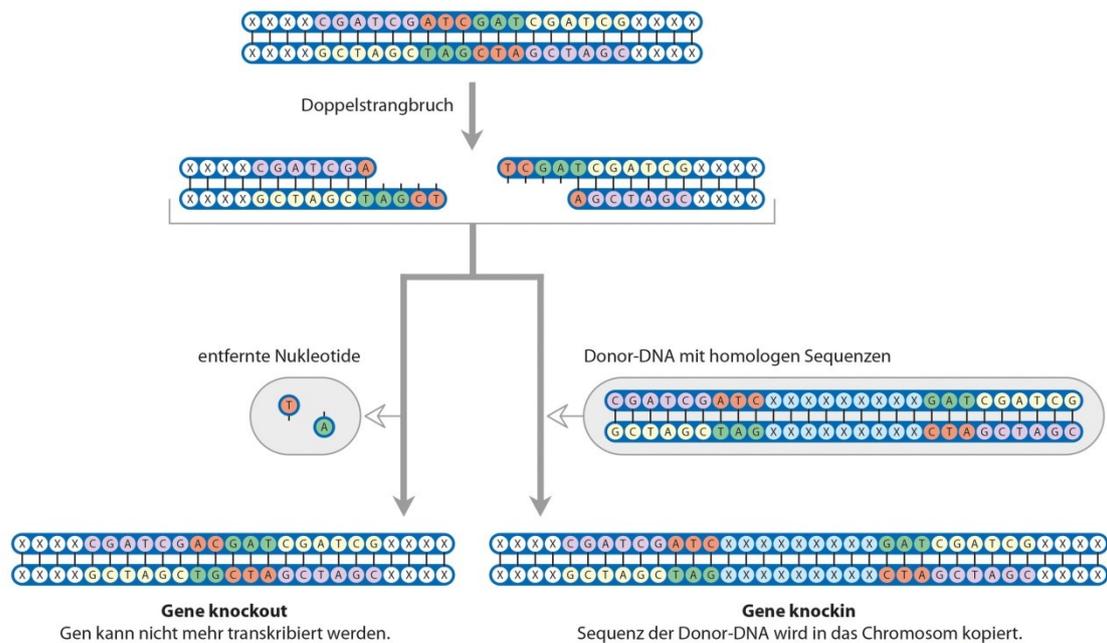


Abb 1: „CRISPR-Cas9 ist beim Editieren des Genoms nur für den ersten Schritt zuständig: das Schneiden der DNA. Geht beim anschließenden Zusammenfügen der beiden Stränge eine Base (Buchstabe) verloren, kann das Gen nicht mehr korrekt abgelesen werden und ist somit funktionslos („gene knockout“, linker Ast). Wird dagegen ein Stück Fremd-DNA mit zu den Schnittstellen passenden Enden hinzugegeben, kann dieses eingebaut werden („gene knockin“, rechter Ast). Auf diese Weise kann ein neues Gen in ein Erbgut integriert werden.“ [1]

© MPG/ Art for Science

Vorteile und Schwierigkeiten der Genom –Editierung [2]

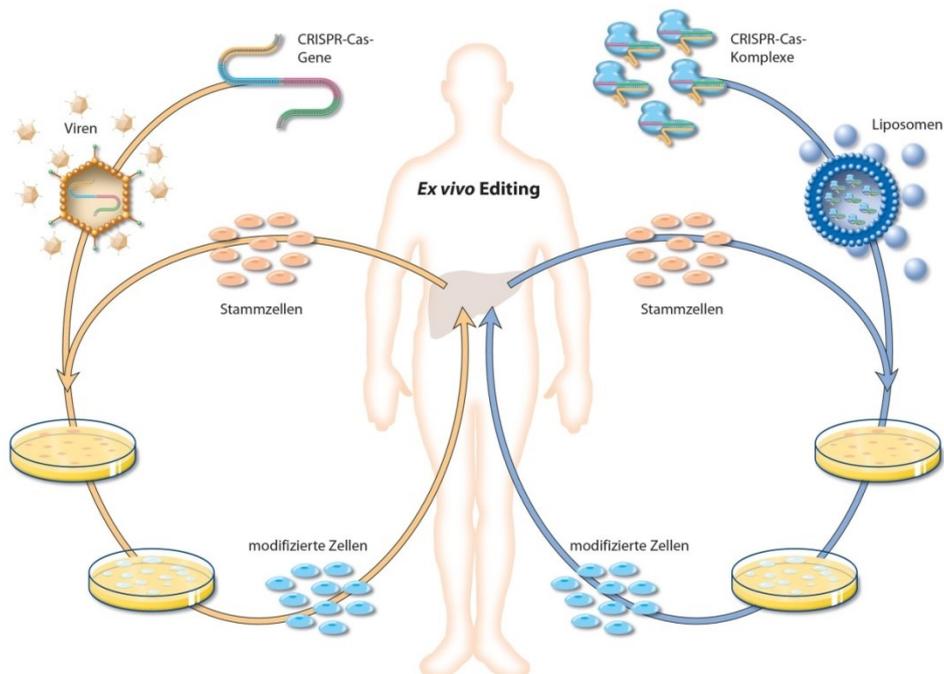


Abb 2: „Bei der sogenannten "ex vivo" Genom Editierung werden dem Körper zunächst Stammzellen entnommen und deren Erbgut verändert. Dies geschieht entweder über genetisch veränderte Viren, die in ihrem Genom die Gene für CRISPR-Cas9 besitzen und die diese Gene ins Erbgut der Stammzellen einbauen. Die modifizierten Zellen können sich dann im Körper vermehren (in der Abb. links). Alternativ werden die fertigen Moleküle des CRISPR-Cas-Systems in kleine Fetttröpfchen (Liposomen) verpackt, die von den Stammzellen aufgenommen werden. (in der Abb rechts)“ [2]
 © MPG/ Art for Science

„Ohne die Genom-Editierung konnten Patienten mit einem defekten Gen bislang nur behandelt werden, indem mit Hilfe von Viren ein neues funktionstüchtiges Gen in die betroffenen Zellen eingeschleust wird. Dadurch soll der Mangel an einem Protein ausgeglichen werden, das dort gar nicht oder nicht ausreichend produziert wird. Allerdings können die Forscher hier nicht vorhersagen, wo genau im Erbgut die Viren das Gen einfügen. Deshalb kann es passieren, dass auf diese Weise ein eigentlich stillgelegtes Krebs-Gen aktiviert wird. Bei Immunschwäche-Patienten, die mittels dieser Gentherapie behandelt worden waren, stieg aus diesem Grund das Leukämie-Risiko.“

Das Editieren bereits vorhandener Gene soll dieses Risiko minimieren. Mit dieser Methode lassen sich auch Erkrankungen behandeln, bei denen ein Gendefekt zu einem fehlerhaften und dadurch krankmachenden Protein führt. In solchen Fällen hilft es nicht, nur neue DNA einzufügen –sondern das Gen für das eigentlich krankmachende Protein muss entfernt werden. Beispiele dafür sind manche Immunerkrankungen oder die Sichelzellanämie.

Allerdings klappt die Reparatur von Genen bisher nur in vergleichsweise wenigen Zellen. Es reicht schließlich nicht, nur einen fehlerhaften Genabschnitt auszuschneiden. Die Zelle muss anschließend die beiden Enden des DNA-Strangs wieder korrekt ergänzen und zusammenfügen. Dieser Reparaturmechanismus läuft aber nur in sich teilenden Zellen ab. Viele Körperzellen eines Erwachsenen teilen sich aber unter natürlichen Bedingungen nicht mehr oder nur noch selten.

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass CRISPR-Cas9 zwar sein Ziel mit hoher Präzision findet, trotzdem in seltenen Fällen aber auch daneben greift. Die Folge könnten DNA-Brüche an unerwünschter Stelle im Erbgut des Patienten mit unvorhersehbaren Folgen sein. Hinzu kommt, dass CRISPR-Cas9 nach einer Gentherapie jahrelang oder gar Jahrzehnte in den Zellen aktiv bleiben kann. Dies erhöht die Gefahr, dass die Genschere außerplanmäßig aktiv wird. Auch wenn Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass dies selbst nach 20 Generationen keine offensichtlichen Auswirkungen hatte, wäre es sicherer, wenn CRISPR-Cas9 nur temporär aktiv wäre.“

Transportvehikel für Genscheren

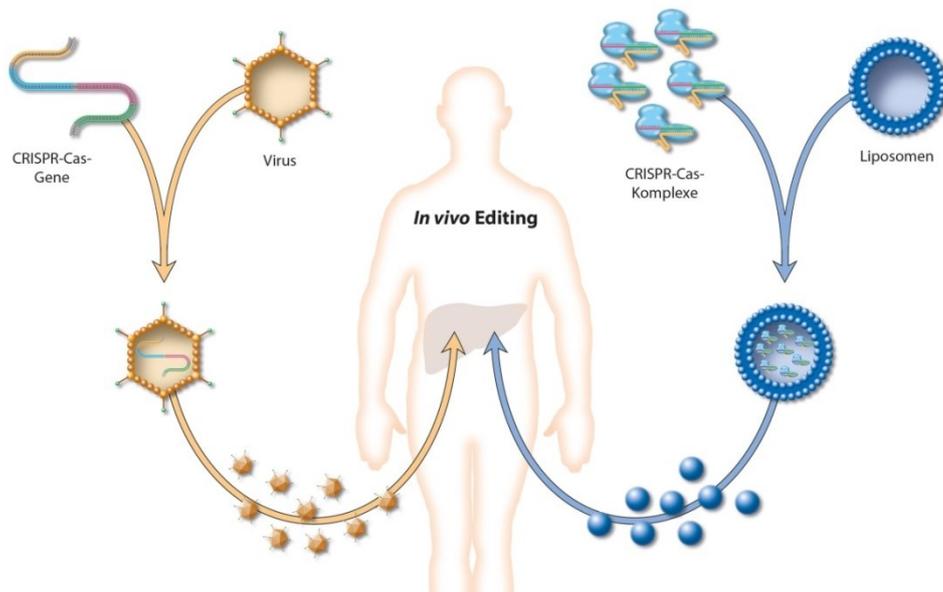


Abb3.: Beim "in vivo" Ansatz transportieren Viren (links) oder Liposomen (rechts) die CRISPR-Cas-Gene bzw. die CRISPR-Cas-Komplexe direkt in die Körperzellen. Die Schwierigkeit besteht hierbei vor allem darin, dass CRISPR-Cas seine Zielzellen erreicht.¹
© MPG/ Art for Science

Bevor CRISPR-Cas9 bei menschlichen Patienten in größerem Umfang eingesetzt werden kann, gibt es aber noch eine weitere Hürde zu überwinden: Wie gelangt die Genschere an ihren Wirkort, kann sie gespritzt oder einfach als Tablette verabreicht werden?

Beide Darreichungsformen scheiden aus, da weder RNA-Moleküle noch Enzyme wie Cas9 durch die Membran einer Körperzelle gelangen würden. Beide würden zudem im Verdauungstrakt zerstört sowie in der Blutbahn von Immunzellen attackiert.

Mediziner brauchen also ein Vehikel, das CRISPR-Cas9 direkt ins Zellinnere schleust. Eine Möglichkeit wäre, dazu Nanopartikel wie zum Beispiel sogenannte Liposomen zu verwenden. Diese winzig kleinen Fetttropfchen (25 – 100 nm) könnten die „guide“-RNA und das Cas9-Enzym in ihrem Innern einschließen und durch die Fettmembran geschützt durch die Blutbahn zu den Zellen mit dem Gendefekt transportieren. Rezeptormoleküle in der Membran würden sicherstellen, dass die Liposomen an die richtigen Zellen andocken und ihren Inhalt ins Zellinnere abgeben können. Noch ist solch ein Verfahren allerdings Zukunftsmusik, denn die Nanopartikel sind für einen medizinischen Einsatz nicht ausgereift.

Im Gegensatz zu den noch in der Entwicklung befindlichen Nanopartikeln werden Viren als Transportvehikel in der Gentherapie bereits eingesetzt. Schließlich sind sie von Natur aus dafür ausgelegt, an Zellen ihrer Wirte anzudocken, ihr Genmaterial einzuschleusen und es manchmal sogar in das Zellgenom einzubauen. Für die Gentherapie setzen Mediziner von Natur aus ungefährliche oder künstlich inaktivierte Viren ein. In den meisten Fällen entnehmen sie dabei dem Patienten vorübergehend Zellen und behandeln diese in einer Zellkultur mit den Viren.

Bild-und Textnachweise

1. <https://www.mpg.de/11033456/crispr-cas9-therapien>
2. Die folgenden Texte zur Genom-Editierung wurden dem Material der Max Planck Gesellschaft zur Genom-Editierung entnommen. <https://www.mpg.de/genom-editierung>
Der nachfolgende Text stammt aus dem Kapitel „CRISPR-Cas9 – eine Schere aus Enzym und RNA - Auf dem Weg zur Therapie“ <https://www.mpg.de/11033456/crispr-cas9-therapien>