

CRISPR-Cas: von einem bakteriellen adaptiven Immunsystem zu einem vielseitigen Werkzeug für die Gentechnik

Marion Kirchner und Sabine Schneider*

Cas9 · CRISPR · Gentechnik · Hochtechnologiemedizin

Der Forschungsbereich der Biologie erfährt zurzeit eine Revolution durch die Weiterentwicklung eines bakteriellen adaptiven Immunsystems zu einem universellen Werkzeug für die Gentechnik. Bakterien und Archaeen benutzen repetitive Teile des Genoms, sogenannte „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ (CRISPR), in Kombination mit einer RNA-abhängigen Nuklease (CRISPR-associated nuclease = Cas), um in Zellen eindringende DNA zu erkennen und zu zerstören. Indem man die Sequenz der Leit-RNA (guide-RNA) passend wählt, kann dieses Zweikomponentensystem verwendet werden, um auf effiziente Weise Genloci in Pflanzen, Insekten, Pilzen, Säugetierzellen und ganzen Organismen zu erreichen oder zu modifizieren. Dies eröffnet ungeahnte Möglichkeiten in der Gentechnik bis hin zur Behandlung oder Heilung von menschlichen Erbkrankheiten. Jetzt rücken die potentiellen Risiken und ethische, soziale und juristische Fragestellungen im Zusammenhang mit dieser mächtigen neuen Technik ins Rampenlicht.

1. Entdeckung und Funktion eines RNA-vermittelten immunologischen Gedächtnisses

Nach der Identifizierung und Beschreibung der „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ (CRISPR) in *Escherichia coli* im Jahr 1987^[1] wurden CRISPR-Sequenzen in vielen Bakterien und Archaeen gefunden.^[2] Ihre Funktion hingegen blieb unklar, bis in der ersten Dekade dieses Jahrhunderts herausgefunden wurde, dass diese Zwischenstücke (Spacer) von bakterieller und viraler Herkunft sind. Das war der erste Hinweis auf die Existenz eines bakteriellen adaptiven Immunsystems.^[3] Tatsächlich wurde gezeigt, dass diese Sequenzen in antisense-RNAs (CRISPR-RNAs = crRNAs) transkribiert werden, die die CRISPR-zugehörige Nuklease (CRISPR-associated nuclease = Cas) an die Ziel-DNA bringen, woraufhin die Fremd-DNA zerstört wird.^[4]

Es wurden bislang drei Arten von CRISPR-Cas-Systemen identifiziert, die anhand ihrer molekularen Mechanismen unterschieden werden können. Während die Systeme I und III einen Cas-Protein-Komplex zur Ziel-DNA-Erkennung und -Zerstörung verwenden, werden diese Funktionen im System II nur durch ein einziges Protein erfüllt. Voraussetzung für die Zerstörung von eindringender DNA durch die Systeme I und II ist eine zusätzliche Sequenz 3' neben der Sequenz, die von der crRNA erkannt wird; das sogenannte PAM-Motiv (protospacer adjacent motif). Das minimale Typ II CRISPR-Cas-System aus *Streptococcus pyogenes* benötigt nur eine Endonuklease (Cas9), eine guide-RNA und ein PAM in der Ziel-DNA. Dieses System wurde zu einem RNA-programmierbaren Werkzeug für die Gentechnik weiterentwickelt. Deshalb wird im Folgenden auf die molekularen Mechanismen und die Weiterentwicklung des *S. pyogenes* Typ II CRISPR-Cas-Systems eingegangen und dargestellt, wie es in eine mächtige Technologie verwandelt wurde, die das therapeutische Genomeditieren ermöglicht.^[5]

Abbildung 1 zeigt schematisch die Bestandteile des bakteriellen Typ-II-Immunsystems und wie die adaptive Immunität erreicht wird. Zuerst werden kleine Fragmente der Fremd-DNA, sogenannte Spacer, in den CRISPR-Locus eingefügt (= Erwerb). Dann wird der tracr-Locus (trans-activating crRNA) und der CRISPR-Spacer-Bereich in tracrRNA und Vorläufer-crRNA (prä-crRNA) transkribiert (= Expression). Über eine repetitive Sequenz (repeat-Sequenz in der prä-crRNA) und ihre komplementäre Sequenz

[*] M. Sc. M. Kirchner, Dr. S. Schneider
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie,
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: sabine.schneider@mytum.de

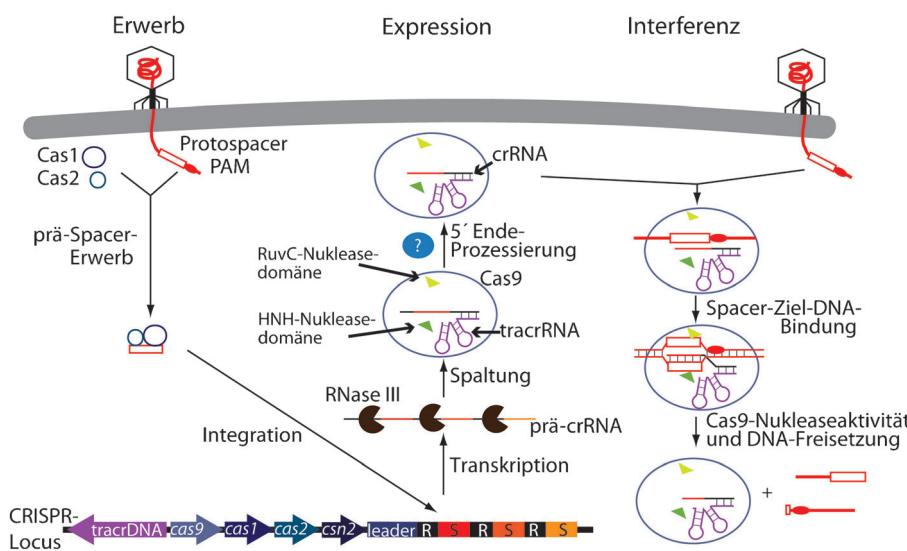


Abbildung 1. Schematische Darstellung der drei Phasen des Typ-II-CRISPR-Cas-Systems. Beim Erwerb des immunologischen Gedächtnisses dringt Fremd-DNA (rot) in die Bakterienzelle ein (Zellwand gekennzeichnet durch eine graue Linie) und wird durch Endonukleasen prozessiert (Cas1, Cas2; blaue Kreise). Die Fragmente (Protospacer) werden in den CRISPR-Locus im bakteriellen Chromosom integriert (S = Spacer, R = Repeat). Nach der Expression des CRISPR-Locus und der Prozessierung der prä-crRNA durch RNase III wird der crRNA:tracrRNA-Komplex gebunden. Der Cas9:tracr:crRNA-Komplex ist nun bereit, eindringende DNA mit einem PAM-Motiv und einer Sequenz komplementär zur crRNA zu schneiden.

(tracrRNA) bilden beide einen Duplex. Durch RNase III werden sie weiter prozessiert, bevor die so entstandene reife tracrRNA:crRNA (guide-RNA) einen Ribonukleoproteinkomplex mit der Endonuklease Cas9 bildet. Wenn eine DNA mit einem zur crRNA komplementären Sequenzabschnitt auf diesen Komplex trifft, wird sie von Cas9 geschnitten (=Interferenz).^[6]

2. Mechanismus der DNA-Erkennung bei CRISPR-Cas9

Durch Kristallstrukturen und KryoEM-Studien der Typ-II-Cas9-Orthologen aus *S. pyogenes* und *Actinomyces naeslundii* konnten detaillierte Einblicke in den molekularen Aufbau und den Mechanismus von CRISPR-Cas9 gewonnen werden. Alle Cas9-Proteine haben einen konservierten strukturellen Kern und bestehen aus zwei Untereinheiten. Die Nukleaseuntereinheit (NUC) beinhaltet eine HNH- und

eine RuvC-ähnliche Endonuklease-domäne.^[7] Beide sind durch eine Brückenhelix verbunden. Sie sind für das Schneiden von Ziel-DNAs verantwortlich, die komplementär zur 20 Basen langen Leitsequenz in den crRNAs (= komplementärer Strang) sind und ein benachbartes PAM-Motiv im Gegenstrang (= nichtkomplementärer Strang) enthalten. Die zweite Untereinheit, die Erkennungsuntereinheit (REC), besteht aus einer alphahelikalen und einer topoisomerase-homologen Domäne. Sie ist essentiell für die Bindung des Duplexes aus repetitiver und komplementärer (repeat-antirepeat) RNA der Leit-RNA sowie der Stammschleife 1 der tracrRNA.^[8] Es wurde gezeigt, dass die cr:tracrRNA zu einer einzigen guide-RNA (single guide-RNA = sgRNA) zusammengefasst werden kann, indem man beide Teile durch eine künstliche Tetraschleife verbindet.^[6b] Dabei wird die guide-RNA und die zwölf Basen

lange repetitive Sequenz der crRNA sowie die 14 Basen lange komplementäre Sequenz und die drei Stammschleifen der tracrRNA verwendet (Abbildung 2). Während die Stamm-

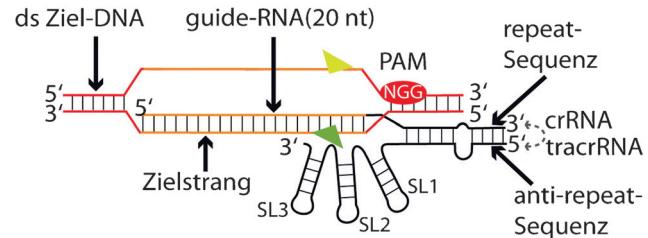


Abbildung 2. Schematische Darstellung der guide-RNA und der Ziel-DNA. Zusätzlich zu einer entsprechenden PAM-Sequenz am 3'-Ende des Protospacers (hier die *S. pyogenes* PAM-Sequenz NGG) ist Komplementarität zwischen Protospacer- und Spacersequenz zum Schneiden der DNA nötig (SL = Stammschleife (stem loop); grüne Dreiecke markieren Schnittstellen). Der graue Pfeil deutet die Position der Tetraschleife in der artifiziell hergestellten sgRNA an.



Sabine Schneider (geb. 1976) studierte an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (Dipl.) und promovierte an der University of Nottingham bei M. Paoli. Nach einem Postdoktorat an der LMU München (T. Carell) erhielt sie ein Liebig-Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie (2010) und wurde unabhängige Nachwuchsgruppenleiterin an der Technischen Universität München.



Marion Kirchner (geb. 1988) studierte an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (M. Sc.). Seit 2014 promoviert sie bei Sabine Schneider an der Technischen Universität München.

schleifen 2 und 3 den Komplex durch Interaktion mit der NUC-Untereinheit stabilisieren, ist Stammschleife 1 essentiell für die Funktion von Cas9.^[8] Erkennung und Bindung des PAM-Motivs in der Ziel-DNA findet im positiv geladenen Spalt zwischen den beiden Untereinheiten (PAM-interaction (PI) domain) statt.

Veränderungen der strukturellen Organisation dieser Domänen zwischen verschiedenen Cas-Orthologen sind verantwortlich für die Unterschiede in guide-RNA und PAM-Sequenzspezifität, wobei die REC-Domäne am wenigsten konserviert ist. Zum Beispiel erkennt SpCas9 seine typische PAM-Sequenz 5'-NGG-3' durch ein basenspezifisches Erkennen des GG-Motivs in der großen Furche des DNA-Duplexes mithilfe zweier konservierter Arginine in der PI-Domäne.^[9] Im Gegensatz dazu verwendet das Cas9-Ortholog aus *Lactobacillus buchnerie* zwei Glutamine an der strukturell gleichen Position, um eine PAM-Sequenz bestehend aus vier aufeinander folgenden Adeninen nach einer beliebigen Base zu erkennen (5'-NAAAAA-3').^[10] Vor kurzem wurde gezeigt, dass das Vorhandensein der PAM essentiell für die Zielsequenzerkennung ist: DNA-Sequenzen, die komplett komplementär zur guide-RNA waren, wurden in Abwesenheit einer PAM nicht von Cas9 erkannt (Abbildung 2).^[11] Die Bindung von Cas9 an DNA-Sequenzen, die eine PAM besitzen, aber nur partiell komplementär zu der sgRNA-Sequenz sind, ist prinzipiell ein großes Problem beim Genomeditieren und ebenfalls ein limitierender Faktor bei der siRNA-Technologie. Tatsächlich wurde die Bindung von CRISPR-Cas9 an Nicht-Ziel-DNA durch Hochdurchsatz-Sequenzierung mittels Chromatinimmunopräzipitation mit genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen aus der Maus (mESC)^[12] und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) beobachtet.^[13] Trotzdem wurde festgestellt, dass das Schneiden von DNA mit einer PAM und einer Sequenz, die partiell komplementär zur guide-RNA ist, selten vorkommt. Das zeigt, dass das Prüfen, die Bindung und das Schneiden der DNA getrennte Vorgänge sind.^[11]

Wie also ist die Aktivität von Cas9 reguliert? Eine Anzahl von Strukturuntersuchungen von *S. pyogenes* Cas9 (PDB-Code 4CMP) und Cas9-sgRNA:Ziel-DNA (PDB-Code 4OO8, 4UN3) zeigten, dass die Aktivität von Cas9 durch Konformationsänderungen gesteuert wird.^[8–10] Im Apo-Zustand ist das Enzym katalytisch inaktiv. Durch Wechselwirkung mit der guide-RNA findet eine große Rotation der NUC-Untereinheit statt, durch die ein zentraler Tunnel geschaffen wird, der für die Bindung der DNA essentiell ist. Es folgen die DNA-Bindung und die PAM-Sequenzerkennung durch Wasserstoffbrückenbindungen der konservierten Arginine mit den Hoogsteen-Seiten der Guanine. Anschließend wird der DNA-Duplex neben dem PAM-Motiv durch die Wechselwirkung eines Serin- und eines Lysinrestes (Phosphat-Schloss-Schleife) mit dem +1-Phosphat destabilisiert, was der Beginn der Strangtrennung ist. Die Bildung des Heteroduplexes durch Watson-Crick-Paarung mit der guide-RNA wird begleitet durch eine verstärkte Bindung des Komplexes und das Schneiden der DNA. Die HNH-Domäne schneidet den komplementären Ziel-DNA-Strang drei Basen oberhalb der PAM-Sequenz. Die RuvC-Domäne schneidet den nichtkomplementären Gegenstrang (Abbildung 3).^[6b]

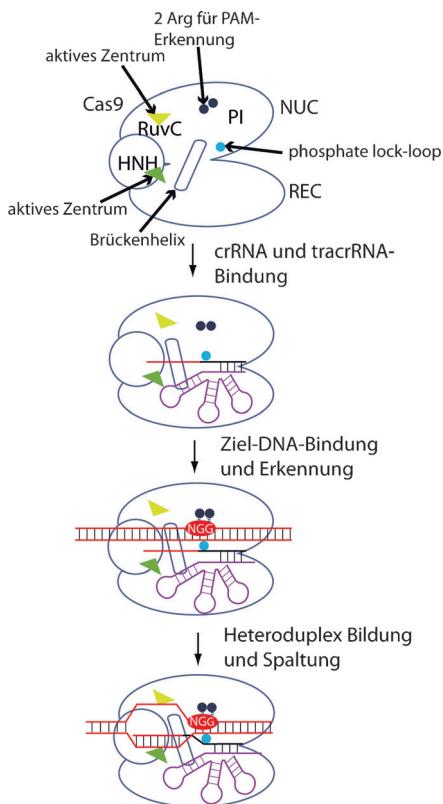


Abbildung 3. Überblick über den Bindungs- und Spaltungsmechanismus von Typ-II-A-SpCas9. Cas9 (hellblau) besteht aus einer Erkennungsuntereinheit (REC) mit der sogenannten Brückenhelix (hellblaues Oval) sowie einer Nukleaseuntereinheit (NUC) mit PAM-interagierender (PI) Domäne und den RuvC- und HNH-Nuklease-domänen (HNH-Domäne als blauer Kreis abgebildet). Die aktiven Zentren sind grün dargestellt. Nach Bindung von crRNA (schwarz-rote Linie) und tracrRNA (lila) kommt es im Protein zu strukturellen Veränderungen, die zur Ausbildung eines positiv geladenen Tunnels zwischen den beiden Untereinheiten führen. Dorthin binden der guide-Zielkomplex sowie der repeat-antirepeat-Duplex. Nach der DNA-Bindung wird das PAM-Motiv (rotes Oval) auf dem nichtkomplementären Strang durch zwei Argininreste der PI-Domäne (dunkelblau) erkannt. Die DNA-Strangtrennung wird durch die Interaktion der Phosphat-Schloss-Schleife (phosphate lock-loop; hellblau) mit dem Zielstrang induziert. Danach wird der DNA-RNA-Hybrid gebildet und die DNA-Stränge werden geschnitten.

Wenn es zu Fehlpaarungen zwischen DNA und guide-RNA kommt, vor allem nahe des PAM, kann sich der Heteroduplex nicht ausbilden. Das stoppt sehr wahrscheinlich die weitere Strangtrennung und die festere Bindung des Enzyms an seine Ziel-DNA, wodurch verhindert wird, dass Nicht-Ziel-DNA geschnitten wird. Die zwei Nuklease-domänen verwenden unterschiedliche Katalysemechanismen, um den DNA-Strang zu schneiden: Die HNH-Endonuklease-domäne hat strukturelle Ähnlichkeit mit der Familie der HNH-Endonukleasen, die durch eine $\beta\beta\alpha$ -Metallfaltung charakterisiert sind. Die T4-Endonuklease IV (PDB-Code 1EN7) verwendet eine katalytische Triade (His-Asp-Asn) in einem Ein-Metallionen-Katalysemechanismus. Hierbei bindet ein hydratisiertes Mg^{2+} -Ion, welches durch Histidin und Asparagin koordiniert wird, das zu spaltende Phosphat im Zielstrang der DNA, wobei das Histidin als Base fungiert und das angre-

fende Wassernukleophil deprotoniert.^[14] Die entsprechenden Aminosäurereste in der HNH-Domäne von Cas9 sind Asp839, His840 und Asn863. RuvC-ähnliche Nukleasen besitzen eine RNase-H-Faltung. Sie koordinieren zwei Mn²⁺-Ionen durch ein konserviertes Asp-Asp-Glu-His-Motiv und funktionieren mit großer Wahrscheinlichkeit durch einen Zwei-Metallionen-Mechanismus. In der Cas9-RuvC-Domäne koordinieren Asp10, Glu762, His983 und Asp986 zwei Mg²⁺-Ionen und befinden sich an vergleichbarer Position wie die katalytischen Aminosäurereste von RuvC von *Thermus thermophilus* (PDB-Code 4LD0).^[9] Asp10 und His840, sowie die Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen, sind essentiell für die Funktion von Cas9, und die Mutation beider Reste zu Ala führt zu einem katalytisch inaktiven Enzym (dCas9).^[6b,8-11,15]

3. Entwicklung des CRISPR-Cas9-Systems zu einem Werkzeug für Genommodifikationen

Vor der Entwicklung des CRISPR-Cas9-Systems zu einem zielgerichteten Werkzeug für die Gentechnik^[16] wurden andere programmierbare Nukleasen wie Zinkfingernukleasen (ZFN)^[17] oder TALENs (transcription activator-like effector nucleases)^[18] zur Genommodifikation in vielen verschiedenen Organismen verwendet. In ZFNs und TALENs ist die DNA-Bindedomäne eines Proteins an eine FokI-Nukleasen domäne fusioniert. Jedoch muss, um eine bestimmte DNA-Sequenz zu erreichen, die jeweilige DNA-Bindedomäne verändert werden, damit diese die Nukleasen domäne an die gewünschte Stelle bringt (Übersichtsartikel: Lit. [19]). Im Vergleich dazu benötigt das CRISPR-Cas9-System keine Proteinmodifikationen, damit es an das Ziel binden kann, sondern braucht lediglich eine Anpassung der 20 bp langen guide-RNA-Sequenz an die Zielsequenz.^[6b,15]

Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems zur Genommodifikation in Eukaryoten ist eine optimierte Expression und die korrekte Lokalisierung der Komponenten in der Zelle. Dies wurde durch Expression von kodonoptimiertem Cas9 mit einem zusätzlichen Kernlokalisierungssignal (NLS) und der dazugehörigen guide-RNA möglich.^[16b,f,m] Mit so optimierten Proteinen konnten zielgerichtet Deletionen und Insertionen im Genom von einigen menschlichen und Mauszelllinien sowie in pluripotenten Stammzellen eingeführt werden. Obwohl die Genomveränderung mit TALENs und ZFNs bereits möglich war, ist das optimierte CRISPR-Cas9-System schneller.^[16j,20] Essentiell für die Aktivität von Cas9 ist die Gegenwart eines PAM und einer zur Ziel-DNA streng komplementären 8–12 Basen langen „Keimregion“.^[16a,b,f] Cas9 toleriert Fehlpaa rungen bis zu einem gewissen Grad, was der Grund für die oben erwähnten Nebeneffekte ist.^[21] Durch die geordnete Anordnung der Spacer im CRISPR-Locus ist es möglich, mehrere Loci in einem Genom gleichzeitig zu verändern (multiplexe Genommodifikation), indem man mehrere sgRNAs zur gleichen Zeit exprimiert.^[16b,j] Wenn eine der Endonukleasen domänen von Cas9 durch Mutation inaktiviert wird, kann das Enzym in eine „Nickase“ (nCas9) umgewandelt werden, die nur noch einen Strang der Ziel-DNA schneidet. Dadurch wird die Rate der homologen Rekombination im

Vergleich zur nicht-homologen Endverknüpfung erhöht.^[15,22] Weil die Zielerkennung durch Cas9 auf dem Vorhandensein eines PAM neben der Zielsequenz auf dem Gegenstrang basiert, ist das natürliche Substrat von Cas9 doppelsträngige DNA. Trotzdem wurde vor kurzem gezeigt, dass die sequenzspezifische Aktivität von Cas9 auf RNA und einzelsträngige DNA erweitert werden kann. Dafür ist ein zusätzliches kleines einzelsträngiges Oligonukleotid, das „PAM-mer“, nötig. Dieses könnte den Weg zu einem allgemeinen Ansatz für die sequenzspezifische RNA-Manipulation weisen.^[23]

4. Aktuelle Anwendungen

Eine konkrete biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems ist die Immunisierung von kultivierten Bakterien in der Milchindustrie. Zum einen kann die Widerstandskraft der Bakterien gegenüber Phagen verbessert und zum anderen die Aufnahme von Plasmiden mit unerwünschten Genen verhindert werden.^[24] Die Anwendungsmöglichkeiten der CRISPR-Cas9-Technologie ist aber nicht auf die Immunisierung von Bakterien für industrielle Zwecke beschränkt: In den letzten drei Jahren wurden mehr als 500 Artikel veröffentlicht, die unterschiedlichste Anwendungen der CRISPR-Cas9-Technologie beschreiben. Das System wurde erfolgreich in verschiedenen Zelltypen und Organismen wie Hefe,^[16c,25] Aktinomyzeten,^[26] Drosophila,^[27] Zebrafisch,^[16e,28] *C. elegans*,^[16d] Säugetieren^[29] und Pflanzen^[16h,k,30] als Genomeditierungswerkzeug angewandt (Übersichtsartikel: Lit. [5a,c,31]). Zum Beispiel kann nukleaseaktivierte Cas9 (dCas9) die Genexpression verhindern, indem sie die Transkription eines Zielgens blockiert.^[32] Außerdem können Transkriptionsregulatoren durch dCas9-Fusionsproteine und mithilfe der guide-RNA zielgerichtet an bestimmte Stellen im Genom gebracht werden (Abbildung 4).^[16j,33] Dies erlaubt es, sowohl die Rolle der Transkriptionsregulatoren als auch die Funktion der Gene durch ihre selektive Hochregulation oder Repression zu studieren. Oftmals ist ein Transkriptionsregulator alleine fusioniert an dCas9 nicht ausreichend für eine Steigerung der Genexpression, und die Amplitude des erzielten regulatorischen Effekts ist abhängig vom Locus des Zielgens. Um die Genexpression genweit zu erhöhen, müssen zusätzliche Transkriptionsaktivatordomänen durch weitere kleine Aptamerdomänen an der sgRNA an die Zielgene gebracht werden. Dies wurde beispielsweise verwendet, um Gene, die Resistzenzen gegenüber einem Chemotherapeutikum vermitteln, zu identifizieren. Mithilfe einer sgRNA-Bibliothek, die 23430 Gene einer Krebszelllinie erkennt, in Kombination mit einem Selektionsverfahren zur Identifikation von hochregulierten Genen konnten bisher unbekannte Resistanzmechanismen gefunden werden.^[33d] Des Weiteren wurden durch CRISPR-Cas9 epigenetische Marker wie DNA-Methylierungen untersucht, die eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielen. Durch die Zerstörung von unterschiedlichen DNA-Methyltransferasen in ES-Zellen und mithilfe von Bisulfitsequenzierung wurden Ziele für diese DNA-Methyltransferasen auf Einzelbasenebene identifiziert.^[34] Eine andere Anwendung ist

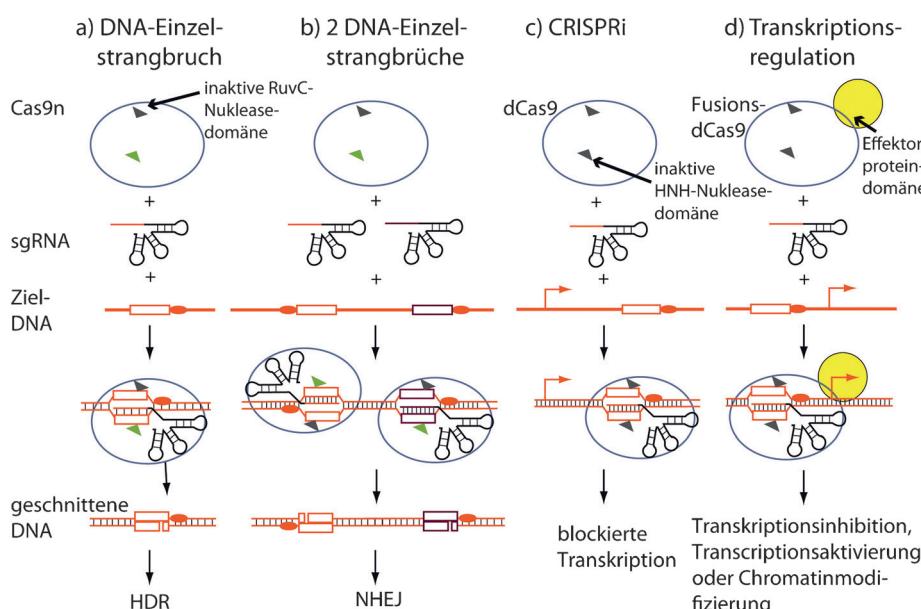


Abbildung 4. Anwendungen des Typ-II-CRISPR-Cas-Systems. Die sgRNA (schwarz) beinhaltet einen Spacer-ähnlichen Teil, der homolog zur Zielsequenz ist (lila und orange). a) Um den Anteil der homologen Rekombination (HDR) im Vergleich zur nicht-homologen End-Verknüpfung (NHEJ) zu erhöhen, wird Cas9n, eine Cas9 mit einer inaktivierten RuvC-Nuklease-domäne (graues Dreieck), verwendet. Dadurch wird nur ein Strang der Ziel-DNA von der HNH-Nuklease-domäne geschnitten.^[22] b) Indem man zwei verschiedene sgRNAs benutzt, kann die DNA an zwei Stellen geschnitten werden, die dann durch NHEJ repariert werden können. Dadurch wird die Genomeditierung spezifischer.^[16b] c) Durch die Bindung von endonukleaseinaktivem Cas9 (dCas9) an einen Zielpromoter kann die Transkription gehemmt werden (CRISPRi).^[32b] d) Aktivierung oder Inhibition von Genen wird durch die Fusion von Proteineffektor-domänen (gelb) an dCas9 und deren Bindung an die Promotorregionen erreicht. Zusätzlich kann dadurch auch die Funktion der Effektor-domänen studiert werden.^[33a,c,d]

die Lebendzellabbildung durch Cas9-GFP-Fusionsproteine, mit denen die sequenzspezifische Untersuchung der Dynamik und der räumlich-zeitlichen Aufteilung von Genomelementen wie Telomeren während der Mitose möglich ist.^[35] Außerdem erlaubt es die CRISPR-Cas9-Technologie sehr effizient, Organismen mit spezifischen Mutationen zu generieren. Diese können dann als wertvolles Modell zum Studieren von Genfunktionen, Krankheiten und Krankheitsentwicklung eingesetzt werden. Vor der CRISPR-Cas9-Technologie war dagegen die Modell-Generierung komplex und zeitaufwändig. Durch einfache Injektion von Cas9-mRNA und sgRNA in die Zygoten von Mäusen und Affen können mehrere Gene jetzt in einem einzigen Schritt mutiert werden.^[16,29] Zusätzlich kann Cas9 benutzt werden, um virale DNA zu erkennen und zu zerstören, wie beispielsweise die des humanen Immundefizienzvirus (HIV) oder des humanen Papillomavirus (HPV), was zum Schutz der Zellen vor HIV-Infektion^[36] oder zur induzierten Apoptose von HPV-transformierten Zellen führt.^[37] Vor kurzem wurde gezeigt, dass das System auf ganze Organismen angewendet werden kann, um die Entwicklung von Krebs zu studieren. Dabei wurden Mäusen Lungenkrebszellen implantiert, die Cas9 exprimieren. Mithilfe einer sgRNA-Bibliothek, die proteinkodierende und mikroRNA-kodierende Gene erkennt, konnten Gene identifiziert werden, deren Inaktivierung den Verlauf der Tumorentwicklung und die Metastasenbildung fördert.^[38]

Außerdem können chromosomale Translokationen und Punktmutationen in erwachsenen Mäusen durch das Einbringen eines Expressionsplasmids mit CRISPR-Cas9 und sgRNA in die Zielzellen generiert werden, womit schnell Tumormodelle entwickelt werden können und funktionelle genetische Untersuchungen möglich sind.^[39]

5. Zukünftige Entwicklungen und neue Horizonte

Der Fortschritt in den DNA-Sequenzierungs-technologien in Kombination mit genomweiten Assoziierungsstudien haben Einblicke in die Krankheiten zugrundeliegende Genetik bis auf das Einzellenniveau ermöglicht. Dank seiner Fähigkeiten und offensichtlich einfachen Anwendbarkeit hat das CRISPR-Cas9-System das Potential dazu, die Brücke von der genetischen Information zur Behandlung von Krankheiten zu schlagen und verspricht personalisierte Medizin mit noch nie dagewesener Präzision. In einem

Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass die Mutation eines Gens, das zu einer leberbasierten Stoffwechselstörung führt, im ganzen Tier korrigiert werden kann.^[40] Ebenso konnte in Stammzellen der erbliche Einzelgendifekt im CFTR-Gen für zystische Fibrose repariert werden.^[41] Der potentielle zukünftige Nutzen von Cas9 als Therapeutikum liegt nicht nur in der Reparatur von erblichen Einzelgendifekten wie zystischer Fibrose, vielmehr könnte es auch zur Vorbeugung gegen Infektionen eingesetzt werden, indem Cas9 gegen die Genome von pathogenen Bakterien oder Viren gerichtet wird. Auch könnten Entzündungen oder Autoimmunität kontrolliert oder die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressoren reprimiert bzw. aktiviert werden. Außerdem würden Sequenzänderungen in pluripotenten Stammzellen die Manipulation von Gewebe ermöglichen. Obwohl CRISPR-Cas9 ein bisher nie dagewesenes Potential für biotechnologische und medizinische Anwendungen besitzt, werden gleichzeitig Fragen über die damit verbundenen Risiken und ethischen Auswirkungen aufgeworfen.^[42] Sicherheitsaspekte wie sogenannte Off-target- und On-target-Effekte mit unvorhersehbaren Konsequenzen, sowie mögliche Toxizität und Immunogenität müssen untersucht werden, bevor Cas9 als Therapeutikum im Menschen angewandt wird. Die Wechselbeziehung zwischen dem individuellen genetischen Hintergrund eines Patienten, Umweltfaktoren und Krankheitsentwicklung ist in weiten Teilen immer noch nicht klar. Eine Vorhersage der Folgen von Genomveränderungen zu thera-

apeutischen Zwecken ist deshalb nicht möglich. Genommodifikationen in befruchteten Eiern oder Embryos werden an jede Zelle des Organismus weitergegeben und könnten unerwünschte Auswirkungen haben. Eine Gruppe von Forschern und Interessensvertretern haben bereits dazu aufgerufen, die Verwendung der Technologie für Veränderungen in der menschlichen Keimbahn einzuschränken. Sie fordern eine offene Debatte in einem Forum aus Forschern, Ärzten, Sozialwissenschaftlern und der Öffentlichkeit.^[42,43] Einer ihrer Kernvorschläge zum Umgang mit dieser mächtigen Technologie vor der klinischen Anwendung ist die Bildung einer weltweiten repräsentativen Gruppe aus Entwicklern und Nutzern von Genommodifizierungstechnologien, Genetikern, Juristen, Bioethikern, der wissenschaftlichen Gemeinschaft, der Öffentlichkeit und wichtiger Regierungen. Transparente Forschung ist nun nötig, um das volle Potential und die Risiken dieser Technologie bewerten zu können.

Danksagung

Wir entschuldigen uns bei den Forschern, deren Arbeit in diesem Kurzaufsatz aus Platzgründen nicht behandelt werden konnte. Wir danken Angi Kirchner und Thomas Carell für kritisches Lesen des Manuskripts und hilfreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde durch den Fonds der chemischen Industrie, die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; Sachmittelantrag DFG SCHN 1273, SFB 749 und GRK 2062) und das Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM) gefördert.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13508–13514
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13710–13716

- [1] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 5429–5433.
- [2] a) R. Jansen, J. D. Embden, W. Gaastra, L. M. Schouls, *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 1565–1575; b) A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, *Microbiology* **2005**, *151*, 2551–2561; c) F. J. Mojica, C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, E. Soria, *J. Mol. Evol.* **2005**, *60*, 174–182; d) C. Pourcel, G. Salvignol, G. Vergnaud, *Microbiology* **2005**, *151*, 653–663.
- [3] a) K. Makarova, A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15611–15616; b) R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath, *Science* **2007**, *315*, 1709–1712; c) S. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, J. van der Oost, *Science* **2008**, *321*, 960–964; d) H. Deveau, R. Barrangou, J. E. Garneau, J. Labonte, C. Fremaux, P. Boyaval, D. A. Romero, P. Horvath, S. Moineau, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1390–1400; e) L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, *Science* **2008**, *322*, 1843–1845; f) 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.
- [4] a) 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*, 67–71; b) R. Sapranauskas, G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksny, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 9275–9282; c) T. R. Sampson, S. D. Saroj, A. C. Llewellyn, Y. L. Tzeng, D. S. Weiss, *Nature* **2013**, *497*, 254–257.
- [5] a) P. Mali, K. M. Esvelt, G. M. Church, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 957–963; b) R. Barrangou, *Science* **2014**, *344*, 707–708; c) J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2014**, *346*, 1258096.
- [6] a) E. Deltcheva, K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, E. Charpentier, *Nature* **2011**, *471*, 602–607; b) M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, *337*, 816–821.
- [7] K. S. Makarova, D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, et al., *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 467–477.
- [8] H. Nishimasu, F. A. Ran, P. D. Hsu, S. Konermann, S. I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang, O. Nureki, *Cell* **2014**, *156*, 935–949.
- [9] M. Jinek, F. Jiang, D. W. Taylor, S. H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, et al., *Science* **2014**, *343*, 1247997.
- [10] C. Anders, O. Niewoehner, A. Duerst, M. Jinek, *Nature* **2014**, *513*, 569–573.
- [11] S. H. Sternberg, S. Redding, M. Jinek, E. C. Greene, J. A. Doudna, *Nature* **2014**, *507*, 62–67.
- [12] X. Wu, D. A. Scott, A. J. Kriz, A. C. Chiu, P. D. Hsu, D. B. Dandon, A. W. Cheng, A. E. Trevino, S. Konermann, S. Chen, et al., *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 670–676.
- [13] C. Kuscu, S. Arslan, R. Singh, J. Thorpe, M. Adli, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 677–683.
- [14] W. Yang, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1228–1231.
- [15] G. Gasiunas, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E2579–2586.
- [16] a) S. W. Cho, S. Kim, J. M. Kim, J. S. Kim, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 230–232; b) L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, et al., *Science* **2013**, *339*, 819–823; c) J. E. DiCarlo, J. E. Norville, P. Mali, X. Rios, J. Aach, G. M. Church, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 4336–4343; d) A. E. Friedland, Y. B. Tzur, K. M. Esvelt, M. P. Colaiacovo, G. M. Church, J. A. Calarco, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 741–743; e) W. Y. Hwang, Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai, J. D. Sander, R. T. Peterson, J. R. Yeh, J. K. Joung, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 227–229; f) M. Jinek, A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma, J. Doudna, *eLife* **2013**, *2*, e00471; g) D. Li, Z. Qiu, Y. Shao, Y. Chen, Y. Guan, M. Liu, Y. Li, N. Gao, L. Wang, X. Lu, et al., *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 681–683; h) J. F. Li, J. E. Norville, J. Aach, M. McCormack, D. Zhang, J. Bush, G. M. Church, J. Sheen, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 688–691; i) W. Li, F. Teng, T. Li, Q. Zhou, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 684–686; j) P. Mali, J. Aach, P. B. Stranges, K. M. Esvelt, M. Moosburner, S. Kosuri, L. Yang, G. M. Church, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 833–838; k) V. Nekrasov, B. Staskawicz, D. Weigel, J. D. Jones, S. Kamoun, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 691–693; l) H. Wang, H. Yang, C. S. Shivalila, M. M. Dawlatly, A. W. Cheng, F. Zhang, R. Jaenisch, *Cell* **2013**, *153*, 910–918; m) P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, G. M. Church, *Science* **2013**, *339*, 823–826.
- [17] M. L. Maeder, S. Thibodeau-Beganny, J. D. Sander, D. F. Voytas, J. K. Joung, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1471–1501.
- [18] V. M. Bedell, Y. Wang, J. M. Campbell, T. L. Poshusta, C. G. Starker, R. G. Krug 2nd, W. Tan, S. G. Penheter, A. C. Ma, A. Y. Leung, et al., *Nature* **2012**, *491*, 114–118.
- [19] J. A. Doudna, E. J. Sontheimer, *Methods Enzymol.* **2014**, *546*, xix–xx.
- [20] Q. Ding, S. N. Regan, Y. Xia, L. A. Oostrom, C. A. Cowan, K. Musunuru, *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 393–394.
- [21] V. Pattanayak, S. Lin, J. P. Guilinger, E. Ma, J. A. Doudna, D. R. Liu, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 839–843.
- [22] 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, et al., *Cell* **2013**, *154*, 1380–1389.

- [23] M. R. O'Connell, B. L. Oakes, S. H. Sternberg, A. East-Seletsky, M. Kaplan, J. A. Doudna, *Nature* **2014**, *516*, 263–266.
- [24] R. Barrangou, P. Horvath, *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* **2012**, *3*, 143–162.
- [25] J. Z. Jacobs, K. M. Ciccaglione, V. Tournier, M. Zaratiegui, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5344.
- [26] Y. Tong, P. Charusanti, L. Zhang, T. Weber, S. Y. Lee, *ACS Synth. Biol.* **2015**, DOI: 10.1021/acssynbio.1025b00038.
- [27] F. Port, H. M. Chen, T. Lee, S. L. Bullock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E2967–2976.
- [28] W. Y. Hwang, Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, P. Kaini, J. D. Sander, J. K. Joung, R. T. Peterson, J. R. Yeh, *PLoS One* **2013**, *8*, e68708.
- [29] a) Y. Niu, B. Shen, Y. Cui, Y. Chen, J. Wang, L. Wang, Y. Kang, X. Zhao, W. Si, W. Li, et al., *Cell* **2014**, *156*, 836–843; b) H. Yang, H. Wang, C. S. Shivalila, A. W. Cheng, L. Shi, R. Jaenisch, *Cell* **2013**, *154*, 1370–1379.
- [30] Q. Shan, Y. Wang, J. Li, Y. Zhang, K. Chen, Z. Liang, K. Zhang, J. Liu, J. J. Xi, J. L. Qiu, et al., *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 686–688.
- [31] P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, *Cell* **2014**, *157*, 1262–1278.
- [32] a) M. H. Larson, L. A. Gilbert, X. Wang, W. A. Lim, J. S. Weissman, L. S. Qi, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2180–2196; b) L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin, W. A. Lim, *Cell* **2013**, *152*, 1173–1183.
- [33] 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, et al., *Cell* **2013**, *154*, 442–451; b) M. L. Maeder, S. J. Linder, V. M. Cascio, Y. Fu, Q. H. Ho, J. K. Joung, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 977–979; c) P. Perez-Pinera, D. D. Kocak, C. M. Vockley, A. F. Adler, A. M. Kabadi, L. R. Polstein, P. I. Thakore, K. A. Glass, D. G. Ousterout, K. W. Leong, et al., *Nat. Methods* **2013**, *10*, 973–976; d) S. Konermann, M. D. Brigham, A. E. Trevino, J. Joung, O. O. Abudayyeh, C. Barcena, P. D. Hsu, N. Habib, J. S. Gootenberg, H. Nishimasu, et al., *Nature* **2015**, *517*, 583–588.
- [34] J. Liao, R. Karnik, H. Gu, M. J. Ziller, K. Clement, A. M. Tsankov, V. Akopian, C. A. Gifford, J. Donaghey, C. Galonska, et al., *Nat. Genet.* **2015**, 469–478.
- [35] C. Chen, L. A. Fenk, M. de Bono, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e193.
- [36] W. Zhu, R. Lei, Y. Le Duff, J. Li, F. Guo, M. A. Wainberg, C. Liang, *Retrovirology* **2015**, *12*, 1–7.
- [37] S. Zhen, L. Hua, Y. H. Liu, L. C. Gao, J. Fu, D. Y. Wan, L. H. Dong, H. F. Song, X. Gao, *Gene Ther.* **2015**, *22*, 404–412.
- [38] S. Chen, N. E. Sanjana, K. Zheng, O. Shalem, K. Lee, X. Shi, D. A. Scott, J. Song, J. Q. Pan, R. Weissleder, et al., *Cell* **2015**, *160*, 1246–1260.
- [39] a) D. Maddalo, E. Manchado, C. P. Concepcion, C. Bonetti, J. A. Vidigal, Y. C. Han, P. Ogorowski, A. Crippa, N. Rekhtman, E. de Stanchina, et al., *Nature* **2014**, *516*, 423–427; b) W. Xue, S. Chen, H. Yin, T. Tammela, T. Papagiannakopoulos, N. S. Joshi, W. Cai, G. Yang, R. Bronson, D. G. Crowley, et al., *Nature* **2014**, *514*, 380–384.
- [40] H. Yin, W. Xue, S. Chen, R. L. Bogorad, E. Benedetti, M. Grompe, V. Koteliansky, P. A. Sharp, T. Jacks, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 551–553.
- [41] G. Schwank, B. K. Koo, V. Sasselli, J. F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, N. Sasaki, S. Boymans, E. Cuppen, C. K. van der Ent, et al., *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 653–658.
- [42] D. Baltimore, P. Berg, M. Botchan, D. Carroll, R. A. Charo, G. Church, J. E. Corn, G. Q. Daley, J. A. Doudna, M. Fenner, et al., *Science* **2015**, *348*, 36–38.
- [43] E. Lanphier, F. Urnov, S. E. Haecker, M. Werner, J. Smolenski, *Nature* **2015**, *519*, 410–411.

Eingegangen am 26. Mai 2015,
veränderte Fassung am 8. Juli 2015
Online veröffentlicht am 18. September 2015