

Genom-Editing

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201512002
 Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201512002

Modifizierte RNAs in CRISPR/Cas9: ein bewährter Trick, der immer noch funktioniert

Alfonso Latorre, Ana Latorre und Álvaro Somoza*

CRISPR/Cas · DNA · Genom-Editing · Nukleotide · RNA

In den letzten Jahren hat sich eine neue Technik des gezielten Genom-Editing basierend auf dem adaptiven Immunsystem von Prokaryoten, bezeichnet als CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), zur bevorzugten Methode für die Erzeugung gentechnisch veränderter Organismen etabliert. Die einfache und flexible Anwendung von CRISPR im Vergleich zu früheren Verfahren (Zinkfinger-nukleasen, TAL-Effektornukleasen)^[2] ermöglicht die selektive Veränderung fast jedes beliebigen Gens, sogar in Säugtieren. Das System umfasst die Bildung eines Komplexes zwischen der Cas9-Endonuklease und einem RNA-Strang, der den Komplex aktiviert und an die Zielregion der DNA dirigiert, um dort Doppelstrangbrüche auszulösen (Abbildung 1 A).^[3]

Das CRISPR/Cas9-System hat eine gewisse Ähnlichkeit zu einem der Abwehrmechanismen in eukaryotischen Zellen, nämlich der RNA-Interferenz (RNAi).^[4] Bei der RNAi spaltet ein als RISC bezeichneter Proteinkomplex vermittelt durch einen RNA-Führungsstrang mRNA-Sequenzen, um die Expression der Zielgene zu hemmen (Abbildung 1 B). Allerdings ist das CRISPR/Cas9-System vielseitiger und kann genutzt werden, um die Expression von Genen zu reduzieren^[5] oder zu steigern^[6] sowie, wichtiger noch, um Gene zu editieren, was durch zwei Mechanismen geschehen kann. Der häufigste Mechanismus ist die nicht-homologe Rekombination (non-homologous end joining, NHEJ), die zu Insertionen oder Deletionen („Indels“) an der Bruchstelle führt. Im Gegensatz dazu kann die homologe Rekombination (HR) in Gegenwart einer exogenen DNA-Matrize neue Sequenzen (z.B. funktionelle Gene) an der Zielregion einführen.

Eine andere Parallele zwischen RNAi und CRISPR/Cas9 besteht darin, dass beide Systeme RNAs benötigen, um den enzymatischen Komplex zu aktivieren und die Zielregion anzusteuern. RNAi benötigt kurze RNA-Doppelstränge von 19–21 Nukleotiden (nt) – bezeichnet als kleine interferierende RNAs (siRNA) –, um den Prozess auszulösen. Die Führungs-RNAs (guide RNAs, gRNAs), die den Cas9-Kom-

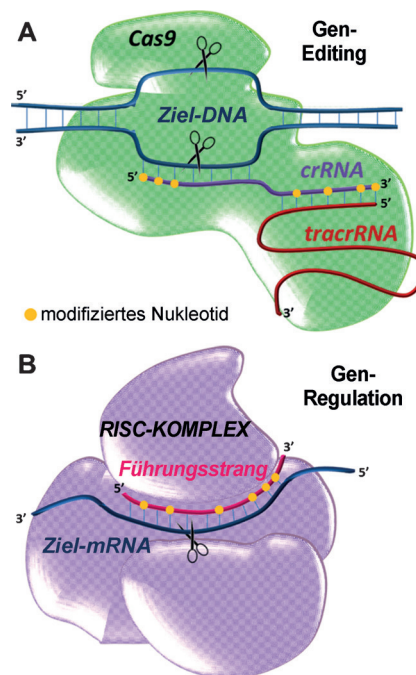


Abbildung 1. Schematische Darstellung der bei CRISPR/Cas9 (A) und RNAi (B) beteiligten Ribonukleoproteinkomplexe. In beiden Systemen können modifizierte Nukleotide die Aktivität und Selektivität des Komplexes erhöhen. Bei CRISPR/Cas9 wird die doppelsträngige Ziel-DNA geschnitten und editiert, während bei RNAi die Boten-RNA geschnitten und zerstört wird.

plex aktivieren und zur Zielregion der DNA dirigieren, sind hingegen deutlich länger, einsträngig und aus zwei RNAs zusammengesetzt, nämlich der CRISPR-RNA (crRNA, 42 nt) und der trans-aktivierenden RNA (tracrRNA, 80 nt). Die beiden Sequenzen hybridisieren partiell und bilden die gRNA, die über die tracrRNA-Region an Cas9 bindet (Abbildung 1 A). Die crRNA-Domäne hybridisiert dann an die komplementäre Ziel-DNA, die direkt neben einer als PAM (protospacer adjacent motif) bezeichneten Sequenz liegen sollte. Interessanterweise kann die Effizienz des Prozesses durch die Verwendung einer chimären Struktur bestehend aus crRNA und tracrRNA, bezeichnet als single-guide-RNAs (sgRNAs), gesteigert werden, die üblicherweise 100 nt lang sind.

[*] Dr. A. Latorre, A. Latorre, Dr. Á. Somoza
 IMDEA Nanociencia & Nanobiotecnología (IMDEA-Nanociencia)
 Unidad Asociada al Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
 Faraday 9, 28049 Madrid (Spanien)
 E-Mail: alvaro.somoza@imdea.org

Die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201512002> zu finden.

Ein entscheidender Unterschied zwischen CRISPR/Cas9 und RNAi ist, dass das Genom-Editing mit CRISPR/Cas9 dauerhaft und vererbbar ist. Hingegen ist die durch RNAi vermittelte Genregulation nur vorübergehender Natur und auf die Gegenwart von siRNAs angewiesen. Darüber hinaus legt die Cas9-Spezies die tracrRNA- und PAM-Sequenzen fest, während bei RNAi die siRNA-Sequenzen unabhängig vom RISC-Komplex sind. Die am häufigsten verwendete Cas9-Nuklease wird aus *Streptococcus pyogenes* erhalten und kann dank der Einfachheit ihrer PAM-Sequenz (NGG) zur Modifikation nahezu jedes Gens eingesetzt werden.

Das Implementieren dieses Systems in eukaryotische Zellen geschieht nicht so einfach wie bei RNAi, weil die Cas9-Endonuklease in diesem Zelltyp nicht exprimiert wird. Aus diesem Grund müssen das gesamte Protein oder die kodierenden Nukleinsäuren (z.B. Plasmide oder mRNA) in die Zelle internalisiert werden, was mit unterschiedlichen Strategien bewerkstelligt werden kann.^[7]

Eine Reihe von Nachteilen und Limitierungen sind CRISPR/Cas9 und RNAi gemeinsam. Dazu gehören die geringe Stabilität von RNA in Serum und eine gewisse Aktivität für Regionen außerhalb der Zielstrukturen („off-target“-Effekte). Um diese Limitierungen zu umgehen, haben zwei Arbeitsgruppen kürzlich die Verwendung von modifizierten RNAs in CRISPR/Cas9 systematisch untersucht, wobei die Studien von früheren Arbeiten über RNAi inspiriert waren.^[8]

Porteus und Mitarbeiter^[9] synthetisierten drei sgRNAs, die in den letzten drei Nukleotiden an beiden Enden eine der folgenden Modifikationen trugen: 2'-O-Methyl (M), 2'-O-Methyl-3'-phosphorthioat (MS) oder 2'-O-Methyl-3'-thioPACE (MSP) (Abbildung 2). Diese Modifikationen werden häufig in Antisense- und RNAi-Techniken genutzt, um die Stabilität gegen RNAsen zu verbessern und die Bindung an die komplementären Zielsequenzen zu verstärken.

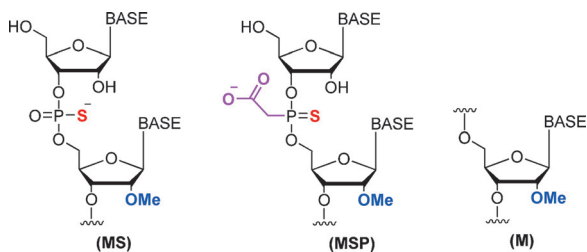


Abbildung 2. Strukturen der modifizierten Nukleotide, die in sgRNA inkorporiert wurden, einschließlich der 2'-OMe-Modifikation (M) am Ribosezucker sowie der Phosphorthioat- (MS) und 2'-OMe-3'-thioPACE-Modifikationen (MSP) an der Phosphatbindung.^[9] BASE = Nukleobase.

Zunächst untersuchten sie die Aktivität des Cas9-sgRNA-Komplexes mithilfe eines DNA-Spaltungsassays *in vitro*, der bestätigte, dass die Modifikationen nicht die Endonukleaseaktivität verminderten. Aktivität und Selektivität wurden dann in verschiedenen etablierten humanen Zelllinien und humanen primären T-Zellen bestimmt. Im letzteren Fall sind die Ergebnisse bemerkenswert, weil das Editieren von humanen primären T-Zellen (insbesondere nicht-stimulierten) problematisch sein kann.

Die Aktivität des CRISPR/Cas9-Systems bei Verwendung unmodifizierter sgRNA wurde anhand von Insertionen und Deletionen gemessen, und ein Wert von 2.4% Indels in der Ziel-DNA wurde ermittelt. Wurde der RNA-Strang mit M, MS oder MSP modifiziert, stieg die Gendisruption auf 13.5%, 68.0% bzw. 75.7%. Interessanterweise stiegen die Werte für die letzten beiden Proben auf 75.3% und 83.3%, wenn die Menge an sgRNA von 1 auf 20 µg (pro Million Zellen) erhöht wurde. Diese Werte sind vergleichbar mit den Indel-Häufigkeiten, die erzielt wurden, wenn Cas9 und sgRNA in einem Plasmid codiert waren.

Die Autoren untersuchten außerdem die Effizienz der Insertion eines exogenen fluoreszierenden Gens durch HR, und auch hier waren die modifizierten sgRNAs besser als unmodifizierte sgRNA. Die MSP-modifizierte RNA führte zum aktivsten System, und wenn eine größere Menge (20 µg) eingesetzt wurde, war die Aktivität ähnlich oder sogar höher als wenn das CRISPR/Cas9-System aus einem Plasmid exprimiert wurde.

Die Spezifität dieser chemisch modifizierten sgRNAs wurde durch die Analyse unspezifischer Mutationen ermittelt. Die Ergebnisse zeigten variable unspezifische Aktivitäten in Abhängigkeit der untersuchten Indelstelle, des Gens und der sgRNA. Weitere Studien mit anderen Modifikationen müssen ausgeführt werden, um sicherzustellen, dass chemisch modifizierte sgRNAs in der Lage sind, diese unspezifischen „off-target“-Effekte zu reduzieren.

In einem anderen Bericht von Cleveland und Mitarbeitern^[10] wurden crRNA- und tracrRNA-Strukturen anstelle der langen chimären sgRNA eingesetzt. Modifikationen wurden in die crRNA eingeführt, da dies aufgrund deren kürzerer Länge einfacher zu bewerkstelligen ist. Die Modifikationen waren Phosphorthioatgruppen (PS) im RNA-Rückgrat sowie 2'-O-Methyl- (M), 2'-Fluor- (F) und S-konfigurierte Ethylgruppen (cEt) im Ribosezucker (Abbildung 3). Auch diese Modifikationen waren vormals bereits zur Modifikation von siRNAs genutzt worden, um deren Stabilität und Bindung an die Ziel-mRNA zu verbessern.

Als erstes untersuchten die Autoren die Aktivität des Systems, wenn das gesamte crRNA-Rückgrat zu Phosphorthioaten modifiziert wurde. Bemerkenswerterweise war die Aktivität viertel höher als mit unmodifizierter crRNA.

Die Einführung zusätzlicher Modifikationen am Ribosezucker wurde in der Folge systematisch untersucht. In diesem Fall lieferte die Anwesenheit von M- oder F-Gruppen in den

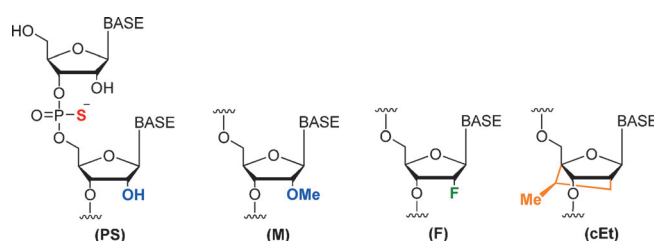


Abbildung 3. Strukturen der modifizierten Nukleotide, die in crRNA inkorporiert wurden, einschließlich der 2'-OMe- (M), 2'-Fluor- (F) und S-konfigurierten Ethylmodifikationen (cEt) am Ribosezucker und der Phosphorthioat-Modifikation (PS) an der Phosphatbindung.^[10] BASE = Nukleobase.

letzten fünf Nukleotiden an beiden Enden eine siebenfach höhere Aktivität als mit der unmodifizierten crRNA, was aber immer noch nur der Hälfte der mit der chimären sgRNA erzeugten Aktivität entspricht.

Nach Tests verschiedener Kombinationen fanden Cleveland und Mitarbeiter, dass der Ersatz der zehn Nukleotide am 5'-Ende mit F-modifizierten Nukleotiden und die Einführung von fünf cET-Modifikationen in den letzten fünfzehn Nukleotiden des 3'-Endes in crRNA das aktivste CRISPR/Cas9-System ergibt. Das System erreichte 75 % der mit der langen sgRNA erhaltenen Aktivität. Schließlich verkürzten die Autoren modifizierte crRNAs, um die erforderliche Mindestlänge für ein effizientes Genom-Editing herauszufinden. Sie fanden, dass die Aktivität mit einem 29-nt-Derivat leicht besser war als mit unmodifizierten sgRNAs. Wenn modifizierte crRNAs in CRISPR/Cas9 eingesetzt wurden, war das Genom-Editing interessanterweise viermal selektiver als mit sgRNA, entsprechend einer erheblichen Reduktion unspezifischer Strangbrüche.

Zusammengefasst unterstreichen diese beiden Berichte den potenziellen Nutzen von chemisch modifizierten RNAs in CRISPR/Cas9. Es sollte erwähnt werden, dass die Einführung chemischer Modifikationen in siRNAs in der Vergangenheit herausragende Ergebnisse erbracht hat. Insbesondere konnten die Aktivität in vivo beibehalten und unspezifische „off-target“-Effekte reduziert werden. Die beiden hier vorgestellten Berichte bestätigen, dass chemische Modifikationen tatsächlich im CRISPR/Cas9-System genutzt werden können, was die Anwendung von CRISPR/Cas9 auf eine größere Auswahl von Zelllinien ausdehnen und die klinische Umsetzung von CRISPR/Cas9 befördern sollte. Porteus und Mitarbeiter demonstrierten, dass modifizierte sgRNA ähnliche Ergebnisse wie plasmidexprimierte RNAs liefern kann. Allerdings kann die Herstellung von langen RNAs (100 nt) in großen Mengen (20 µg für Zellkulturexperimente) kostspielig und technisch schwierig sein, insbesondere wenn nichtnatürliche Modifikationen eingeführt werden. Um diesen Nachteil zu umgehen, verkürzten Cleveland und Mitarbeiter die crRNA von 42 auf 29 Nukleotide und erreichten damit die gleiche Aktivität wie unmodifizierte sgRNA sowie eine vierfach höhere Selektivität.

Dies sind nur die ersten Beispiele, und es besteht natürlich ein Bedarf an mehr Studien mit anderen Modifikationen. Etablierte Methoden aus der Antisense-, siRNA- und microRNA-Forschung werden dabei wichtige Anhaltspunkte liefern, da in diesen Bereichen bereits systematische Studien mit verschiedenen Modifikationen bemerkenswerte und in einigen Fällen unerwartete Ergebnisse erbracht haben.^[11]

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2014-56763-R), die Asociación Española Contra el Cancer und IMDEA Nanociencia gefördert.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3548–3550
Angew. Chem. **2016**, 128, 3608–3610

- [1] a) J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2014**, 346, 1258096; b) P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, *Cell* **2014**, 157, 1262–1278; c) A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 4710–4712; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 4792–4794.
- [2] T. Wijshake, D. J. Baker, B. van de Sluis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2014**, 1842, 1942–1950.
- [3] M. Kirchner, S. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 13508–13514; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 13710–13716.
- [4] R. Barrangou, A. Birmingham, S. Wiemann, R. L. Beijersbergen, V. Hornung, A. V. B. Smith, *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, 3407–3419.
- [5] 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.
- [6] M. L. Maeder, S. J. Linder, V. M. Cascio, Y. Fu, Q. H. Ho, J. K. Joung, *Nat. Methods* **2013**, 10, 977–979.
- [7] a) J. A. Zuris, D. B. Thompson, Y. Shu, J. P. Guilinger, J. L. Bessen, J. H. Hu, M. L. Maeder, J. K. Joung, Z.-Y. Chen, D. R. Liu, *Nat. Biotechnol.* **2015**, 33, 73–80; b) L. Li, Z.-Y. He, X.-W. Wei, G.-P. Gao, Y.-Q. Wei, *Hum. Gene Ther.* **2015**, 26, 452–462; c) J. L. Gori, P. D. Hsu, M. L. Maeder, S. Shen, G. G. Welstead, D. Bumcrot, *Hum. Gene Ther.* **2015**, 26, 443–451.
- [8] J. W. Gaynor, B. J. Campbell, R. Cosstick, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4169–4184.
- [9] A. Hendel, R. O. Bak, J. T. Clark, A. B. Kennedy, D. E. Ryan, S. Roy, I. Steinfeld, B. D. Lunstad, R. J. Kaiser, A. B. Wilkens, R. Bacchetta, A. Tsalenko, D. Dellinger, L. Bruhn, M. H. Porteus, *Nat. Biotechnol.* **2015**, 33, 985–989.
- [10] M. Rahdar, M. A. McMahon, T. P. Prakash, E. E. Swayze, C. F. Bennett, D. W. Cleveland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, E7110–E7117.
- [11] a) G. F. Delevey, M. J. Damha, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 937–954; b) Z. Li, T. M. Rana, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, 13, 622–638; c) S. Martínez-Montero, G. F. Delevey, N. Martín-Pintado, J. F. Fakhoury, C. González, M. J. Damha, *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 2016–2023.

Eingegangen am 29. Dezember 2015
Online veröffentlicht am 16. Februar 2016