

Das CRISPR/Cas-System

Im Jahr 2012 beschrieb eine Arbeitsgruppe um Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna eine neue Methode zur künstlichen Veränderung der genetischen Information mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems, für die sie 2020 den Nobelpreis für Chemie erhielten. Für dieses System sind vor allem drei Komponenten wesentlich:

Schneide-Komponente: Im Zentrum steht eine Endonuklease mit der Bezeichnung Cas9. Endonukleasen zerschneiden beide Einzelstränge der DNA an bestimmten Stellen und werden deshalb auch „Genschere“ genannt. In der klassischen Gentechnik werden Endonukleasen (Restriktionsenzyme) eingesetzt, die ihre Zielstelle auf der DNA (meist kurze Palindrome) selbst finden und meist durch versetzte Schnitte „Sticky Ends“ erzeugen. Cas9 durchschneidet die in ihre Einzelstränge aufgetrennte DNA glatt („Blunt Ends“), findet ihre Zielstelle auf der DNA aber nicht selbst.

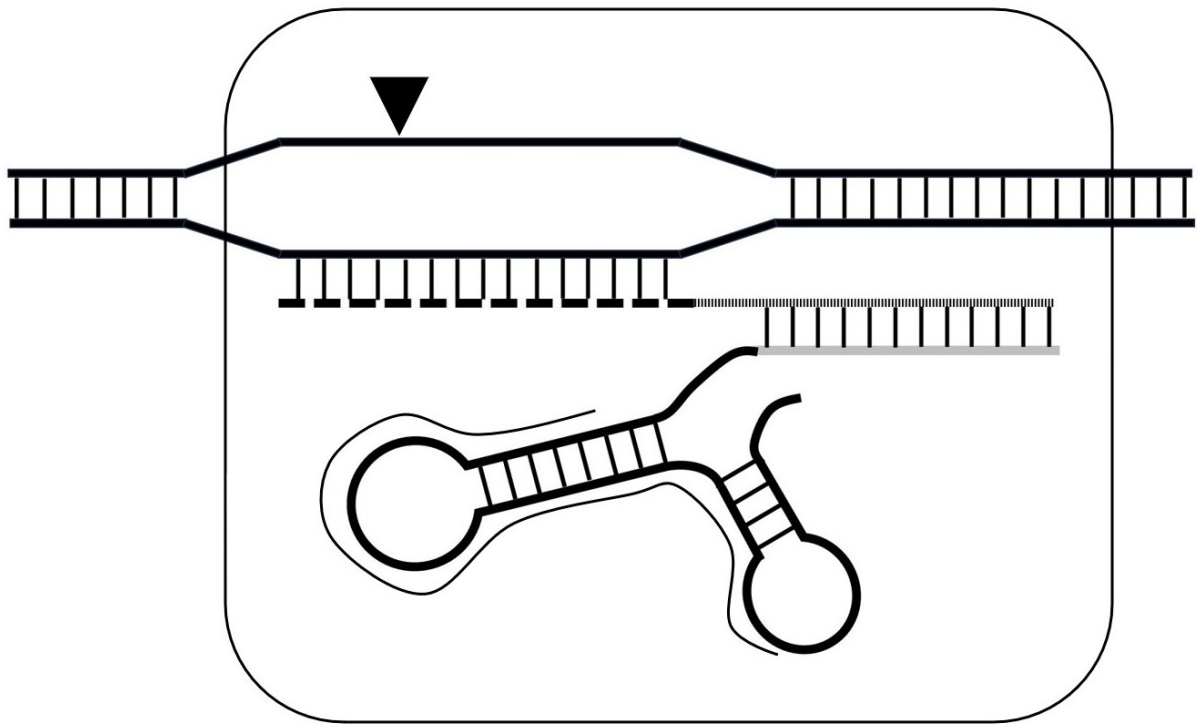
Erkennungs-Komponente: Ein weiteres Werkzeug im CRISPR/Cas-System, die sogenannte crRNA (Crispr-RNA) besteht aus zwei Abschnitten. Der eine Abschnitt, die bis zu 20 Nukleotide lange Guide-Sequenz, ist komplementär zur Zielstelle auf der DNA und dockt dort mit etwa 12 Nukleotiden punktgenau an. Wenn diese Nukleotid-Sequenz geschickt gewählt wird, ist es wenig wahrscheinlich, dass die crRNA auch an einer anderen Stelle auf der Ziel-DNA andockt. Dadurch wird vermieden, dass die DNA an einer falschen Stelle ungewollt verändert wird. Der andere Abschnitt der crRNA enthält Wiederholungen kurzer Nukleotid-Sequenzen und heißt deshalb Repeat-Sequenz.

Koppelungs-Komponente: Ein drittes Werkzeug im CRISPR/Cas-System, die tracrRNA, stellt die Verbindung zwischen Cas9 und der crRNA her. Ein Abschnitt der tracrRNA ist komplementär zur Repeat-Sequenz der crRNA und kann als Anti-Repeat-Sequenz bezeichnet werden. Durch komplementäre Basenpaarung dockt sie punktgenau an die crRNA an. Der andere Abschnitt der tracrRNA bildet – ähnlich wie eine tRNA – eine Haarnadel-Struktur. Sie dockt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip punktgenau an eine Bindungstasche von Cas9 an. Damit sind alle drei Komponenten unverrückbar und präzise miteinander verbunden.

(In der Abbildung sind nur die gepaarten Kernbasen eingezeichnet.)

Aufgaben:

- 1 Beschriften Sie in der Abbildung die Bestandteile mit den Begriffen, die im oben stehenden Text unterstrichen sind.
- 2 Markieren Sie die crRNA, die tracrRNA und die DNA mit jeweils unterschiedlichen Farben.
- 3 Die Pfeilspitze in der Abbildung zeigt die Stelle an, wo der DNA-Einzelstrang von Cas9 durchtrennt wird. Ergänzen Sie eine zweite Pfeilspitze, die anzeigt, wo der andere DNA-Einzelstrang durchtrennt wird.



4 Gentechnische Verfahren im Vergleich

Legen Sie in Ihren Unterlagen eine Tabelle nach dem folgenden Muster an und füllen Sie die beiden leeren Spalten aus. Verwenden Sie dazu Informationen aus dem Unterricht, dem Lehrbuch bzw. aus dem Internet.

	klassische Gentechnik	Genom-Editierung mit CRISPR/Cas
Ort des Eingriffs auf der Ziel-DNA		
erwünschte Veränderung in der DNA		
unerwünschte Effekte („off-target-Effekte“)		
Erfolgsquote		
Marker		
Nachweis des gentechnischen Eingriffs		
Aufwand		

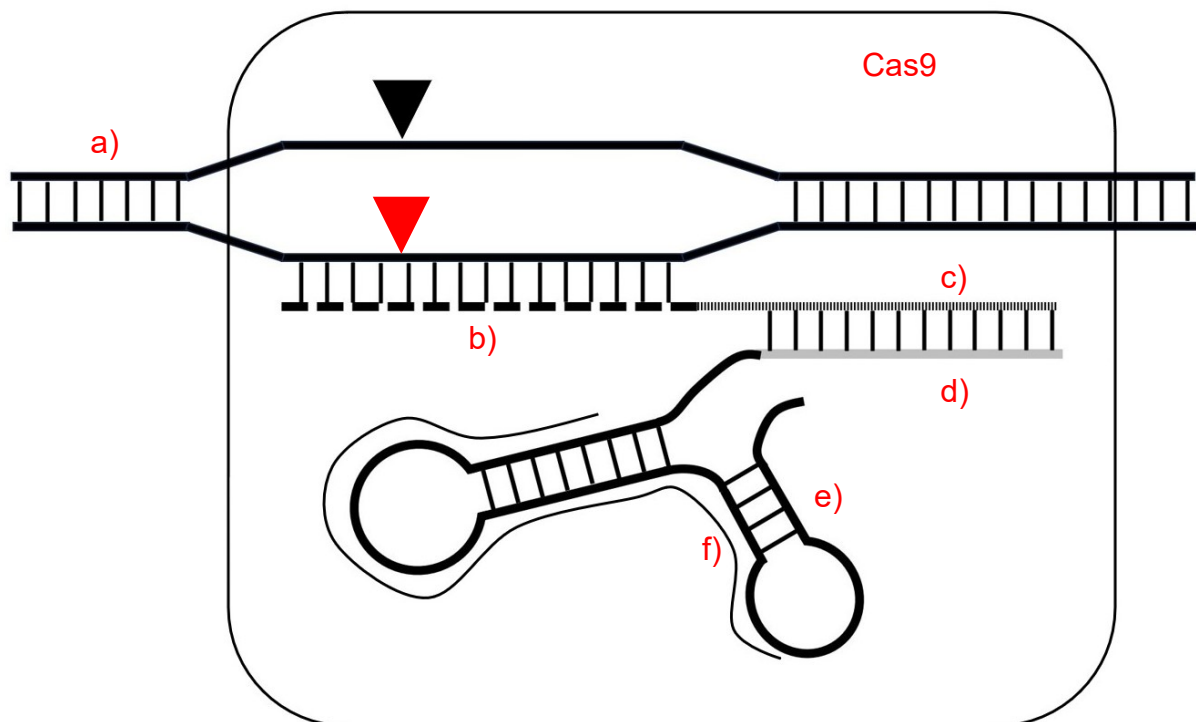
Hinweise für die Lehrkraft:

Die Wahl der Bezeichnungen ist teilweise etwas willkürlich, aber wenn die Dinge Namen haben, lässt sich leichter darüber sprechen. So wird der von mir „Guide“ genannte Bereich auch als Spacer bezeichnet (v. a. bei der Funktion von CRISPR/Cas als Immunabwehr); die Formulierungen „Anti-Repeat-Sequenz“ sowie „Haarnadel-Bereich“ stammen von mir (dafür habe ich in den Quellen keine verbindlichen Bezeichnungen gefunden).

Dieses Arbeitsblatt ist sowohl für den gA-Kurs als auch für den eA-Kurs geeignet. Es stellt in Text und Bild die drei wesentlichen Komponenten des CRISPR/Cas-Systems am Beispiel des Typs II dar, wie er im Labor angewendet wird. Die bei Typ II obligate PAM-Stelle ist allerdings weggelassen (didaktische Reduktion). Weitere Einzelheiten bzw. Varianten (wie etwa der Einsatz einer sgRNA) sind dem eA-Kurs vorbehalten.

Als Minimalanforderung im gA-Kurs könnten die wesentlichen Charakteristika des CRISPR/Cas-Systems genügen, ohne seine drei Hauptwerkzeuge. In diesem Fall ist dieses Arbeitsblatt trotzdem sinnvoll, weil es den Schülern Gelegenheit bietet, sich mit diesem System auseinanderzusetzen. Anschließend können dessen Charakteristika herausgearbeitet werden, während die Werkzeuge und ihre Bezeichnungen keinen Lernstoff darstellen. Dies liegt im Ermessen der Lehrkraft.

Die *tracrRNA* als Kopplungskomponente mag überflüssig erscheinen, denn die *crRNA* könnte selbst eine Haarnadel-Struktur ausbilden, mit der sie punktgenau an die Endonuklease binden würden. Dies ist in der Natur bei Typ I verwirklicht, bei dem allerdings einige weitere Komponenten notwendig sind und der deshalb im Labor keine Anwendung findet.



a) Ziel-DNA

b) Guide-Sequenz

c) Repeat-Sequenz } crRNA

f) Bindungstasche

d) Anti-Repeat-Sequenz

e) Haarnadel-Struktur } tracrRNA

Aufgabe 4:

Den Kursteilnehmern sollten zur Bearbeitung dieser Aufgabe weitere Informationen bzw. Hinweise auf geeignete Informationsquellen gegeben werden. Ggf. werden einzelne Aspekte bei der gemeinsamen Besprechung ergänzt.

	klassische Gentechnik	Genom-Editierung mit CRISPR/Cas
Ort des Eingriffs auf der Ziel-DNA	bei einem bestimmten Palindrom, das zufällig im Genom verteilt ist und mehrfach vorkommen kann („Schrotschuss-Technik“); die Art der Endonuklease gibt den Typ des Palindroms vor	bei einer ganz bestimmten Nukleotid-Sequenz, die bei geschickter Wahl nur ein Mal im Genom vorkommt und präzise vorbestimmt ist; die Nukleotid-Sequenz der crRNA (bzw. sgRNA) gibt den Zielort punktgenau vor
erwünschte Veränderung in der DNA	Einfügen eines Fremd-Gens in die DNA der Zielzelle	Punktmutation (Basenaustausch); Entfernung eines Nukleotids oder einer Nukleotid-Sequenz; Einfügen eines Nukleotids oder einer Nukleotid-Sequenz; u. a.
unerwünschte Effekte („off-target-Effekte“)	häufig, da nicht vorbestimmbar ist, wo das Fremdgen eingebaut wird; das kann z. B. mitten in einem wichtigen Strukturgen der Fall sein	treten kaum auf, weil der Eingriff an einer genau vorbestimmten Stelle der DNA erfolgt
Erfolgsquote	sehr gering (weit unter 1 %)	hoch bis sehr hoch (50-90 %)
Marker	wegen der sehr geringen Erfolgsquote sind Marker notwendig, mit denen die Zielzellen selektiert werden können, die das Fremd-Gen aufgenommen haben; Marker sind u. a. Gene zur Antibiotika-Resistenz	wegen der hohen Erfolgsquote sind keine Marker notwendig
Nachweis des gentechnischen Eingriffs	über die Marker bzw. über das eingebrachte Fremdgen leicht möglich, denn beide bleiben in der Ziel-DNA erhalten	bei kleinen Eingriffen nicht möglich, weil es keine Marker gibt und die gentechnischen Werkzeuge (Cas9, RNAs) in kurzer Zeit von der Zielzelle abgebaut werden
Aufwand	hoher Aufwand an technischem Knowhow, an Zeit und Kosten: Großlabor nötig (Konzern)	geringer Aufwand in der Handhabung, an Zeit und Kosten: auch im Kleinbetrieb möglich (Startups)