**Das CRISPR/Cas-System** (gA)

**M1**

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, die ursprünglich aus Bakterien stammen:

**Schneide-Komponente**: Im Zentrum steht ein Restriktions-Enzym mit der Bezeich­nung Cas9. Es zerschneidet beide Einzelstränge der DNA an be­stimmten Stellen und wird deshalb auch „Genschere“ genannt. In der klassi­schen Gentechnik werden andere Restriktionsenzyme eingesetzt, die besondere Stellen auf der DNA selbst finden und dort versetzte Schnitte anbringen („Sticky Ends“). Cas9 besitzt dage­gen eine Schneide-Komponente, welche die DNA glatt durchschneidet („Blunt Ends“). Cas9 findet seine Zielstelle auf der DNA nicht selbst.

**Erkennungs-Komponente**: Um die Zielstelle auf der DNA zu finden, wird eine dirigierende RNA eingesetzt, die komplementär zu einer bestimmten Stelle auf einem der DNA-Einzelstränge ist. Dadurch wird vermieden, dass Cas9 an einer falschen Stel­le andockt und dort unge­wollt die DNA zerschneidet.

**Koppelungs-Komponente**: Eine Koppelungs-Komponente aus RNA sorgt dafür, dass die dirigierende RNA in genau definierter Weise mit Cas9 verbunden wird. Dadurch sind alle drei Kompo­nenten unver­rück­bar und präzise miteinander verbunden, so dass die DNA exakt an der vorbestimmten Stelle zerschnitten wird.





a

 b

 d

 c

 e



**M2**

**CRISPR/Cas als Multifunktionswerkzeug:** Nachdem die DNA durchschnitten ist, können unterschiedliche Manipulationen an der DNA durchgeführt werden, wie in den folgenden Beispielen am codogenen Strang gezeigt ist:

1) 5‘-CCGATTACGC-3‘ (Originalzustand des codogenen Strangs der Ziel-DNA)

2) 5‘-CCGATTAGC-3‘ 3) 5‘-CCGATTACGGC-3‘

4) 5‘-CCGATTAGGC-3‘ 5) 5‘-CCGGC-3‘

5) 5‘-CCGATTACTTAGAGC-3‘

**Aufgaben zum CRISPR/Cas-System** (gA)

1 M1 beschreibt die Komponenten des CRISPR/Cas-Systems.

 Ordnen Sie die im Text unterstrichenen Begriffe den in der Abbildung darge­stell­ ten Strukturen zu.

2 Mit dem CRISPR/Cas-System können unterschiedliche Veränderungen an der DNA vorgenommen werden.

 Markieren Sie die Veränderungen in den Nukleotid-Sequenzen 2) bis 6) (M2) und beschreiben Sie diese in Worten.

3 Die besonderen Stellen, an denen sich Restriktionsenzyme der klassischen Gen­technik an die DNA anlagern, kommen im Genom eines Organismus meist mehrfach vor, zum Teil sogar mitten in einem Strukturgen. Diese Erkennungs­ stellen umfassen erheb­lich weniger Nukleotide als die Erkennungs-Sequenz für die dirigierende RNA im CRISPR/Cas-System.

 Begründen Sie, warum bei der Anwendung des CRISPR/Cas-Systems erheb­ lich weniger Fehler zu erwarten sind als bei der klassischen Gentechnik

**Hinweise für die Lehrkraft:**

*Dieses Arbeitsblatt ist für gA-Kurse konzipiert, in denen nur die allerwesentlichsten Aspekte des CRISPR/Cas-Systems thematisiert werden sollen. Wenn Sie den Begriff Restriktionsenzym im Rahmen der klassischen Gentechnik nicht eingeführt haben, verändern Sie bitte den Text auf der Materialseite entsprechend.*

*Die Abbildung eignet sich aber auch bei einer vertieften Behandlung des CRISPR/Cas-Systems, wobei die Kursteilnehmer die konkreten Komponenten wie crRNA oder tracrRNA den graphi­schen Elementen der vereinfachten Abbildung zuordnen.*

1 Zuordnung der Komponenten

 a: DNA

 b: Erkennungskomponente (dirigierende RNA)

 c: Koppelungskomponente, verbindet b und e miteinander

 d: Schneidekomponente (Bestandteil des Enzyms Cas9)

 e: Enzym Cas9

2 Veränderungen an der DNA

 2) Ein Nukleotid (C; 3. von rechts) wurde herausgeschnitten.

 3) Ein Nukleotid (G) wurde eingefügt.

 4) Ein Nukleotid (C; 3. von rechts) wurde durch ein anderes (G) ersetzt = Basenaus­ tausch.

 5) Eine Nukleotid-Sequenz (ATTAC) wurde herausgeschnitten.

 6) Eine Nukleotid-Sequenz (TTAGA) wurde eingefügt.

3 Vergleich

 Die Veränderung der DNA soll nur an einer einzigen bestimmten Stelle erfolgen. Die kurze Erkennungs-Nukleotidsequenz bei der klassischen Gentechnik kommt aber mehr­ fach vor, nicht nur an der erwünschten Stelle der DNA. Erfolgt der Schnitt des Restrik­ tions­enzyms an einer der anderen Stelle, ist dies ein fehlerhafter Eingriff.

 Beim CRISPR/Cas-System sorgt dagegen eine dirigierende RNA dafür, dass (in der Regel) das Restriktionsenzym Cas9 nur an einer einzigen Stelle auf der DNA, denn es ist unwahrscheinlich, dass eine längere Nukleotid-Sequenz zwei Mal vorkommt.

Thomas Nickl, Januar 2024