

Hintergrund: CRISPR/Cas (Technik)

Das CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas (*CRISPR-associated*)-System wurde in Bakterien entdeckt und dient dort der Immunabwehr gegen eindringende Viren. Die Forschung dazu hat gezeigt, dass das System auch als molekularbiologische Methode genutzt und in verschiedenen Organismen angewandt werden kann. Im Labor wird das CRISPR/Cas-System dazu verwendet, um zielgerichtet Veränderungen am Erbgut eines Organismus vorzunehmen (Genom Editierung/Genome Editing). Die Methode wird derzeit intensiv weiterentwickelt und findet vor allem Anwendung in der Pflanzen- und Tierzucht, der medizinischen Forschung und der Grundlagenforschung.

Dieses Hintergrundpapier erklärt, wie CRISPR/Cas als molekularbiologische Technik funktioniert und fasst den aktuell vorliegenden Wissenstand zum Verfahren zusammen. Es wird darauf eingegangen, wie CRISPR/Cas im Zielorganismus Veränderungen am Erbgut vornimmt, welche Veränderungen möglich sind und was sie bewirken können. Es wird erläutert, wie (mit dem Fokus auf pflanzliche Zellen) und in welcher Form das CRISPR/Cas-System in den Organismus eingeführt werden kann. Abschließend wird auf die technischen Grenzen des Systems eingegangen.

Ursprung von CRISPR/Cas in Bakterien

In Bakterien dienen CRISPR/Cas-Systeme der Immunabwehr gegen eindringende Viren (Mojica, Diez-Villasenor, Garcia-Martinez, & Soria, 2005). CRISPR/Cas hilft Bakterien bei der „Erinnerung“ an zurückliegende Virusinfektionen und als Verteidigungsstrategie bei einer erneuten viralen Infektion. Vereinfacht gesagt werden Stücke aus dem Erbgut der Viren in das Erbgut der Bakterien integriert, was die Bakterien bei einer wiederholten Infektion mit den Viren befähigt, das Genom der Viren zu erkennen und zu zerschneiden (Barrangou et al., 2007). Dieses bakterielle System wurde eingehend untersucht und für molekularbiologische Anwendungen im Labor angepasst (Doudna & Charpentier, 2014). Dabei wird das CRISPR/Cas-System aus der ursprünglichen Funktion in Einzellern herausgelöst und für die Anwendung in Zellkulturen und mehrzelligen Organismen genutzt.

CRISPR/Cas-Systeme kommen natürlicherweise in vielen verschiedenen Bakterien-Gattungen vor, jeweils mit ihren eigenen strukturellen und enzymatischen Eigenschaften. Wissenschaftler nutzen dies, um CRISPR/Cas als molekularbiologische Technik so weiterzuentwickeln, dass immer mehr Bereiche des

Erbguts gezielt erreicht und verändert werden können (Zetsche et al., 2015). Das am meisten genutzte CRISPR/Cas-System im Bereich Genome Editing ist CRISPR/Cas9 aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes*. Es werden aber auch andere CRISPR/Cas-Varianten wie CRISPR/Cpf1 als Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten des Genome Editing (Zetsche et al., 2015) oder CRISPR/Cas13 zur Veränderung von RNA verwendet (Abudayyeh et al., 2017).

CRISPR/Cas als molekularbiologische Technik

Die Arbeitsweise von CRISPR/Cas

Das CRISPR/Cas-System besteht aus einer Erkennungs- und Schneidekomponente. Es gelangt zielgerichtet an eine bestimmte Stelle der DNA, schneidet sie dort und bewirkt am Ende eine Veränderung der Zielsequenz (siehe Abbildung 1).

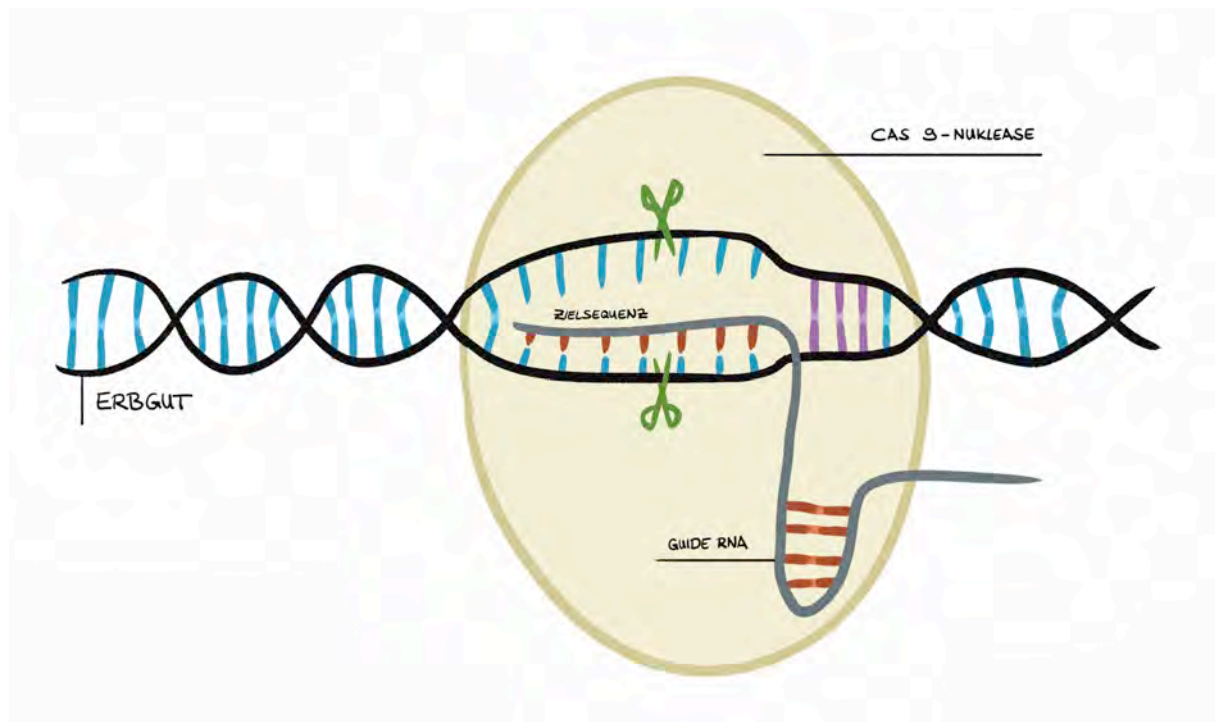


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von CRISPR/Cas9.

Cas9 wird durch eine spezifische guide RNA an die Zielsequenz im Erbgut des Zielorganismus geleitet und führt dort einen Doppelstrangbruch ein. In lila ist die PAM (Protospacer Adjacent Motif)-Sequenz dargestellt. Sie fungiert als anfängliche Erkennungssequenz für das CRISPR/Cas9 System. Passt die davor liegende Sequenz zur guide RNA, wird Cas9 aktiv und schneidet dort.

Die Erkennungskomponente ist ein kleines Molekül, genannt guide RNA. Die guide RNA erkennt zum einen den Zielbereich auf der DNA und bindet zum anderen die Schneidekomponente, das Cas-Protein, und bringt es in Position. Dem Zielbereich voran gestellt ist immer eine sogenannte PAM-Sequenz. Sie ist charakteristisch für jedes Cas-Enzym und notwendig für die anfängliche Erkennung und das

Aufschmelzen des Zielbereichs. Das Cas-Protein spaltet die DNA im Zielbereich auf und führt einen Doppelstrangbruch ein. Proteine, die DNA-Stränge zerschneiden, werden auch Nukleasen genannt. Die Zelle erkennt den entstandenen Doppelstrangbruch als Schaden und aktiviert zelleigene DNA-Reparaturmechanismen (siehe unten). Durch ihre Arbeit wird letztlich die DNA-Sequenz verändert.

Einige dieser Reparaturmechanismen arbeiten mitunter ungenau. Dabei können falsche Basen (die Bausteine der DNA) an dem Zielbereich eingebaut werden, kleinere Bereiche der DNA herausgenommen oder kleine DNA-Stücke eingeführt werden (Sander & Joung, 2014). So können eine bis wenige Basenpaare der DNA verändert und Gene (die funktionellen Einheiten der DNA) ausgeschaltet beziehungsweise manipuliert werden. Diese Technik wird häufig als SDN-1 (site directed nuclease-1) bezeichnet (siehe Abbildung 2) und meint also eine ortsspezifische, aber zufällige Veränderung weniger Basenpaare.

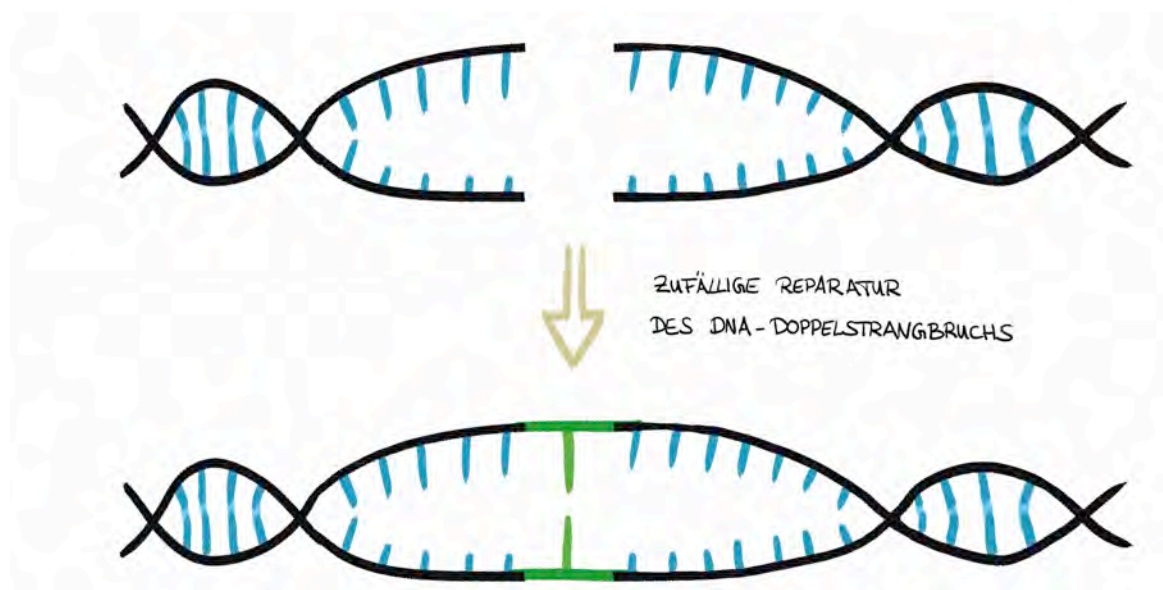


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Veränderung durch SDN-1 (Site-Directed Nuclease-1).

Die durch das CRISPR/Cas-System (und anderen Nukleasen des Genome Editing) eingeführten Doppelstrangbrüche der DNA an einer Zielsequenz führen zur Aktivierung von zelleigenen Reparaturmechanismen. Bei der SDN-1 Technik können durch die Aktivierung der NHEJ-Reparatur (Non-Homologous End Joining) kleine Veränderungen an der Basensequenz der DNA eingeführt werden. Die NHEJ-Reparatur arbeitet häufig fehlerhaft und kann dazu führen falsche Basen an der Zielsequenz einzubauen oder kleinere DNA-Bereiche einzuführen oder herauszunehmen.

CRISPR/Cas kann auch dazu verwendet werden, gezielte und größere Veränderungen an der DNA vorzunehmen. Hierfür werden im Labor kurze DNA-Stücke hergestellt, die als Reparatur-Vorlagen für den Bereich rund um den eingeführten DNA-Bruch dienen. Die DNA-Stücke werden zusammen mit dem CRISPR/Cas-System in die Zelle eingeschleust und sind mit dem Zielbereich der DNA bis auf die erwünschte Veränderung der Basen identisch. Die zelleigenen Reparaturmechanismen erkennen die Reparatur-Vorlage und bauen diese in das Erbgut ein (Wang, La Russa, & Qi, 2016). Das Einführen von kleinen gerichteten Veränderungen wird als SDN-2 Technik bezeichnet (Site Directed Nuclease-2) (vergleiche Abbildung 3).

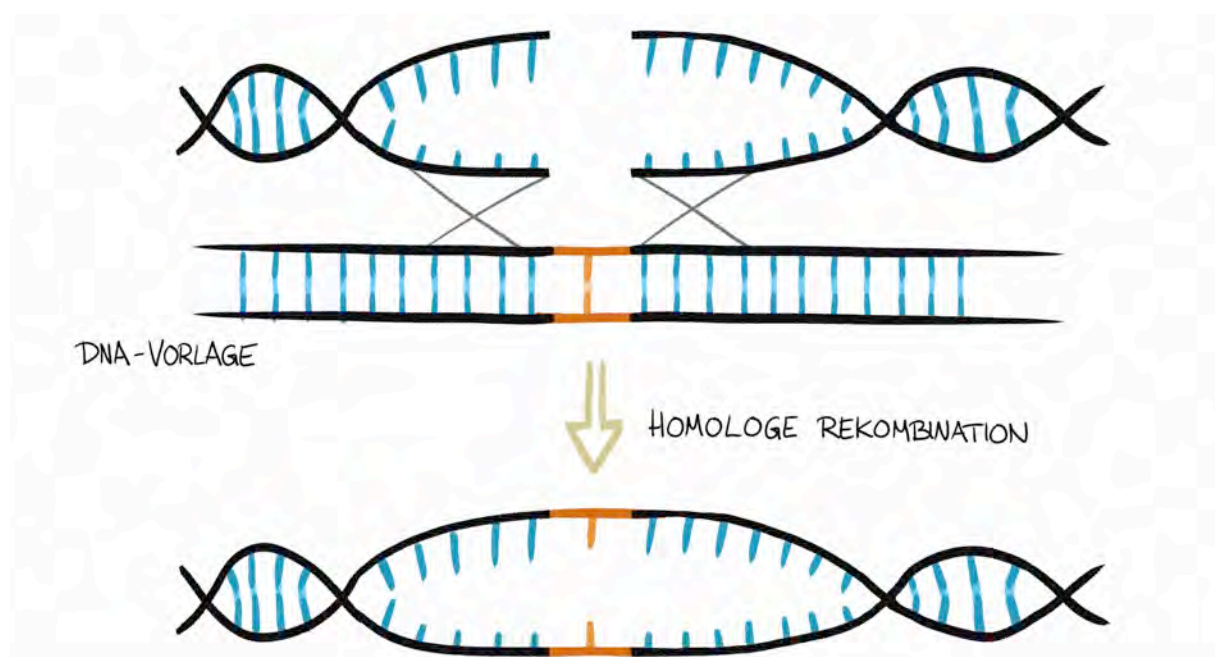


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Veränderung durch SDN-2 (Site-Directed Nuclease-2).

Bei der SDN-2 (Site Directed Nuclease-2)-Technik werden zusammen mit den CRISPR/Cas-Komponenten auch DNA-Vorlagen mit in die Zelle eingebracht, die der Zielsequenz zu großen Teilen identisch sind. Durch den DNA-Doppelstrangbruch können die Komponenten der zelleigenen HDR (Homology Directed Repair)-Reparatur aktiviert werden und zum Einbau der DNA-Vorlage in die Zielsequenz führen. Hierdurch wird es möglich in der DNA-Vorlage kleine gezielte Veränderungen an der Zielsequenz einzuführen.

Es können auch große DNA-Stücke (z.B. ganze Genabschnitte) eingeschleust werden und gezielt im Bereich des Bruches der Zielsequenz eingebaut werden. Diese Art der Veränderung wird unter SDN-3 zusammengefasst (Site Directed Nuclease-3) (siehe Abbildung 4). SDN-2 und SDN-3 sind also ortsspezifische Techniken und können Veränderungen nach DNA-Vorlagen einführen, bei SDN-2 sind das kleine Veränderungen der Basensequenz, bei SDN-3 werden lange DNA-Stücke eingeführt.

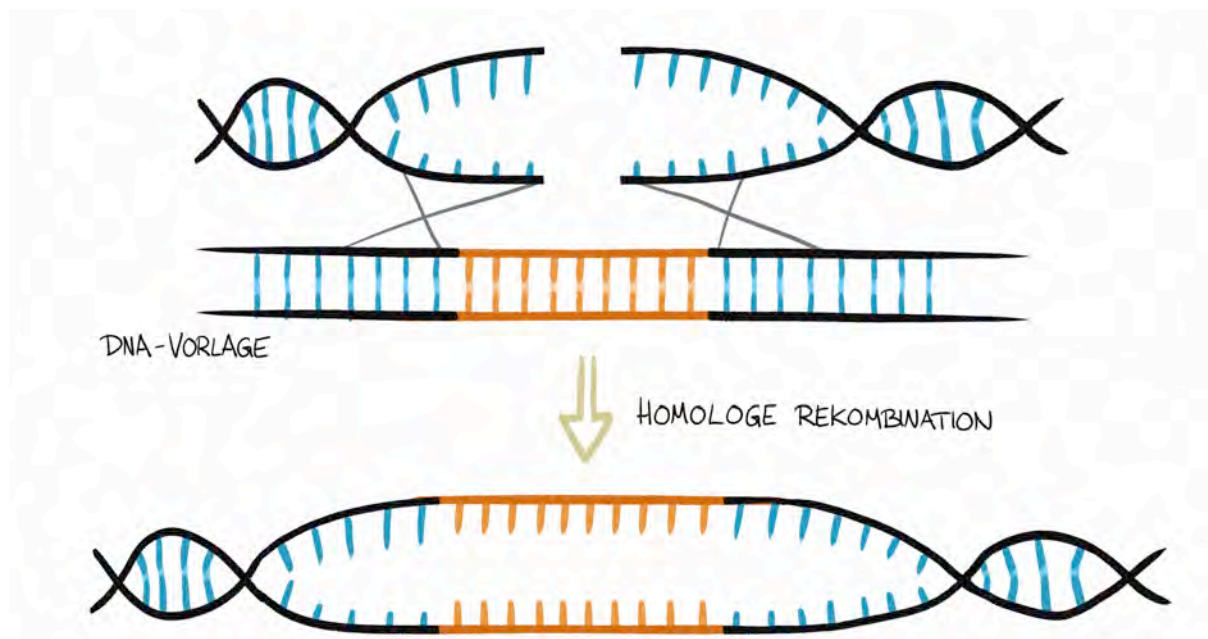


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Veränderung durch SDN-3 (Site-Directed Nuclease-3).

Bei der SDN-3 Technik wird, wie bei der SDN-2 Technik, die HDR-Reparatur aktiviert und eine synthetisch hergestellte DNA-Vorlage mit in die Zelle eingebracht. Die DNA-Vorlage trägt bei SDN-3 jedoch viel längere DNA-Bereiche (z.B. ganze Genabschnitte).

Doppelstrangbrüche der DNA aktivieren Reparaturmechanismen in der Zelle

Wie erwähnt aktivieren Doppelstrangbrüche zwei zelleigene Reparaturmechanismen, die die Schäden unterschiedlich reparieren. Im Ergebnis kann so eine CRISPR/Cas Anwendung zu unterschiedlichen Veränderungen führen. Für eine schnelle Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA ist das sogenannte NHEJ (Non-Homologous End Joining)-System zuständig. Hierbei werden zwei geschnittene DNA-Enden wieder zusammengefügt, um möglichst schnell Strangbrüche zu reparieren. Dabei treten häufig Fehler auf, was zum Einbau von falschen Buchstaben der DNA (Basen), kleineren DNA-Abschnitten oder zum Löschen kleinerer Bereiche führen kann. Eben dies wird bei der SDN-1-Technik von CRISPR/Cas genutzt (Abb. 2).

Der zweite Reparaturmechanismus namens HDR (Homology Directed Repair) wird bei der SDN-2 (Abb.3) und SDN-3 (Abb.4) Technik aktiv. Hierbei erkennt HDR

miteingebrachte homologe DNA-Stücke und nutzt diese als Vorlage, um basierend auf ihrer Basensequenz die Doppelstrangbrüche an der Zielsequenz zu schließen. Natürlicherweise, also ohne extern eingebrachte DNA-Stücke, werden Doppelstrangbrüche der DNA anhand des unversehrten Schwesterchromatids repariert (Symington & Gautier, 2011). HDR-Reparaturen, und damit der Einbau der DNA-Vorlagen, erfolgen nur in einer von mehreren Phasen des Zellzyklus (S-Phase). Die meisten DNA-Schäden werden daher ungewollt durch NHEJ bearbeitet. Die SDN-2 wie die SDN-3 Technik sind deswegen weniger effizient als SDN-1.

Das CRISPR/Cas-System kann in unterschiedlichen Formen in der Zelle eingebracht werden

Grundsätzlich kann das CRISPR/Cas-System in unterschiedlichen Formen in die Zelle eingebracht werden: 1.) in Form von DNA, die für die Nuklease Cas und die guide RNA kodiert, oder 2.) als bereits im Labor hergestellter Ribonukleoprotein-Komplex (fertiger Komplex aus dem Cas-Protein und der guide RNA) (DeWitt, Corn, & Carroll, 2017; Ran et al., 2013). Das Verhalten der beiden Formen ist unterschiedlich: 1.) Wird die DNA von Cas eingeführt, kann diese entweder in das Erbgut der Zelle integriert und an nachfolgende Zellen weitergegeben werden oder sie liegt als vorübergehendes, zusätzliches Stück DNA im Zellkern vor. Erst in der Zelle wird mit der eingebrachten DNA das Cas-Protein gebildet, welches dann mit Hilfe der guide RNA die Zielsequenz erkennt und schneidet.

2.) Im Fall, dass CRISPR/Cas als Proteinkomplex in die Zelle eingeschleust wird, kann dieser direkt in der Zelle aktiv werden (DeWitt et al., 2017; Kouranova et al., 2016). Der Proteinkomplex wird jedoch relativ schnell von der Zelle abgebaut und wird nicht an nachfolgende Zellen weitergegeben (Kim, Kim, Cho, Kim, & Kim, 2014).

Verfahren, um das CRISPR/Cas-System in pflanzliche Zelle einzubringen

Es gibt verschiedene Techniken, wie das CRISPR/Cas-System in die Zellen des Ziel-Organismus eingeschleust werden kann. Die Wahl dieser Technik hängt sowohl vom jeweiligen Zielorganismus als auch von der Form (DNA/Protein) ab. Häufig wird das natürlicherweise im Boden vorkommende Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* genutzt, um die DNA des CRISPR/Cas-Systems in pflanzliche Zellen einzuführen. Das Bakterium infiziert die Zielpflanze und überträgt die DNA des CRISPR/Cas-Systems in die Zellen.

Pflanzliche Zellen besitzen eine undurchlässige Zellwand, die bei einigen Techniken zunächst entfernt werden muss, damit die darunterliegende Zell-Membran zugänglich wird. Eine pflanzliche Zelle ohne Zellwand wird auch als Protoplast bezeichnet. Bei vielen Pflanzenarten können diese Verfahren allerdings nicht angewendet werden, da von ihren Zellen gegenwärtig noch keine Protoplasten hergestellt werden können.

Eine weitere Möglichkeit zum Einbringen von DNA stellt der Partikelbeschuss der Zellen mit sehr kleinen Metallpartikeln (Gold, Wolfram) dar. Die Partikel sind mit der DNA des CRISPR/Cas-Systems beschichtet und werden mit hohem Druck in die pflanzlichen Zellen hineingeschossen. Dabei wird die DNA im Zellkern abgeladen, wenn dieser durch die Partikel getroffen wurde. Beide Verfahren (Agrobakterium Transformation und Partikelbeschuss) werden auch in der bisherigen Gentechnik verwendet. Der Einbau der Gene erfolgt bei diesem Verfahren nicht gezielt, wodurch es oft viele ungewollte Veränderungen im Erbgut geben kann (Li et al., 2015).

Wird das CRISPR/Cas-System als Protein-Komplex in die Zelle eingeschleust, werden auf Fetten (Lipiden) basierende molekulare Methoden verwendet, welche die Proteine in die Zellen einbringen. Alternativ können sogenannte Elektroporations-Verfahren genutzt werden. Man erzeugt dabei ein elektrisches Feld, das die Zellmembran kurzzeitig für Moleküle durchlässig macht.

Das Potential von CRISPR/Cas

Genome Editing

Das Forschungsfeld um CRISPR/Cas entwickelt sich derzeit rasant weiter. Seit der Entwicklung der CRISPR/Cas Technik bis heute ist die Zahl der Veröffentlichungen zu dem Thema enorm stark angestiegen und täglich kommen neue hinzu. Am häufigsten wird CRISPR/Cas bisher genutzt, um am Erbgut von Zielorganismen gezielt kleine Veränderungen einzelner Basenpaare vorzunehmen, kleine DNA-Bereiche zu entfernen oder neue einzuführen (z.B. ganze Gensequenzen). Damit können Gene stillgelegt werden, zusätzliche Gene eingebaut und die Genexpression, also das An- beziehungsweise Abschalten von Genen, verändert werden.

Mit dem CRISPR/Cas-System ist es zudem möglich, mehrere Zielsequenzen der DNA durch das Einführen unterschiedlicher guide RNAs gleichzeitig zu verändern (vorwiegend durch SDN-1), was als Multiplexing bezeichnet wird (Cong et al., 2013). Durch Multiplexing können mit dem Einsatz von mehreren guide RNAs mehrere Gene gleichzeitig ausgeschaltet werden (Wang et al., 2013). Auch können durch Multiplexing große Bereiche des Genoms gelöscht werden, indem die Sequenz, die zwischen zwei Zielsequenzen liegt, entfernt wird (Zhou, Liu, Weeks, Spalding, & Yang, 2014).

Mit CRISPR/Cas ist es außerdem auch möglich, alle DNA-Bereiche zu verändern, die sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind. Speziell Pflanzen haben oft ein redundantes Genom, das heißt Gene liegen oft mehrfach und als Varianten (Allele) vor. Alle Gen-Sequenzen/Gen-Cluster mit den gleichen Gen-Informationen können auf einmal verändert werden, so dass keine Sicherheitskopie mehr verbleibt (Sanchez-Leon et al., 2018).

CRISPRa/CRISPRi

Es wurden CRISPR/Cas-Systeme mit einer inaktiven Schneidekomponente (dCas9, dead Cas9) entwickelt. Wenn eine dCas9, von der guide RNA geleitet, an die regulatorischen DNA-Bereiche eines Zielgens bindet, behindert es dort den Zugang und damit die Genexpression; d.h., das entsprechende Protein wird nicht mehr gebildet (Qi et al., 2013). Dabei wird die DNA-Sequenz nicht verändert und der Einsatz von dead Cas9 ist auf der Ebene der DNA nicht nachweisbar.

Alternativ können an das Cas9 Enzyme gekoppelt werden, die durch Änderung der Zielsequenz die Genexpression aktivieren oder inaktivieren (CRISPRa/CRISPRi) (Mali et al., 2013; Qi et al., 2013).

Base Editing

Durch die Entwicklung einer Methode namens Base Editing wurde die Möglichkeit geschaffen, ohne Strangbruch und damit unabhängig von der HDR-Reparatur, gezielt einzelne Basen der Zielsequenz zu verändern. So kann ein Basenpaar gezielt in ein anderes Basenpaar enzymatisch umgewandelt werden. Hierfür wurde wiederum dCas9 an Enzyme gekoppelt, welche bestimmte Basen (z.B. Adenine) biochemisch über weitere enzymatische Schritte in eine andere Base (z.B. Guanin) umwandeln (Gaudelli et al., 2017; Komor, Kim, Packer, Zuris, & Liu, 2016). So wird aus dem ursprünglichen Basenpaar A-T ein G-C¹.

Die Base Editing-Systeme sind jedoch noch nicht weit genug entwickelt, um die Zielsequenz punktgenau zu verändern. Es kann passieren, dass alle Basen derselben Art (z.B. alle Cytosine) in einem Umkreis von bis zu 5 Basen an der Zielsequenz verändert werden. Derzeit werden Base Editing-Systeme entwickelt, die diese Limitierung aufheben sollen (J. M. Gerhke, 2018).

RNA Editing

Mittlerweile kann auch RNA mit Hilfe von CRISPR/Cas gezielt manipuliert werden. In einer Zelle fungiert RNA (unter anderem) bei der Übersetzung von DNA-Sequenzen (Genen) in die entsprechenden Proteine als Zwischenprodukt. Die DNA-Sequenz wird von zellulären Komponenten als Vorlage verwendet, um RNA-Stücke zu bilden, die dann genutzt werden, um Proteine herzustellen. Proteine sind aus einer Kette von Aminosäuren aufgebaut. Jede Aminosäure wird von bestimmten Kombinationen aus 3 Basen kodiert, was heißt, dass die Abfolge der Basensequenz der DNA die genaue Reihenfolge der Aminosäuren in einem Protein festlegt. Die Basenkodierung aller natürlichen Aminosäuren bildet zusammen den genetischen Code; er ist – von Ausnahmen abgesehen – in allen Organismen gleich, er ist universell.

¹ A steht für Adenin, T für Thymin, C für Cytosin, G für Guanin

Die Cas-Variante Cas13a funktioniert ähnlich wie die Cas9, nur dass Cas13a RNA statt DNA schneidet (Abudayyeh et al., 2017). Die zugehörige guide RNA heißt hier crRNA (crRNA steht für CRISPR RNA). Damit kann die Bildung bestimmter Proteine auf Ebene der RNA reguliert bzw. die Menge an Protein vermindert werden.

Eine enzymatisch inaktive Version von Cas13 (dCas13, dead Cas13) kann, in Anlehnung an dCas9, eine Ziel-RNA spezifisch binden, ohne diese aber zu spalten. dCas13 kann dazu genutzt werden, um gekoppelte Enzyme an die Zielsequenz zu transportieren und bestimmte Arten von Basen in eine andere Base zu verändern (z.B. Adenosin in Inosin) (Cox et al., 2017). Damit können Veränderungen an der RNA und Proteinen vorgenommen werden, ohne das Erbgut dauerhaft in seiner Basensequenz zu verändern. Die durch CRISPR/Cas 13 veränderte RNA wird dann natürlicherweise im Organismus abgebaut.

Epigenetische Veränderung durch CRISPR/Cas (Epigenome Editing)

Der Begriff Epigenetik beschreibt Veränderungen am Erbgut, die nicht direkt an der DNA-Sequenz erfolgen. Epigenetik reguliert die Expression von Genen und bestimmt damit das Schicksal jeder individuellen Zelle eines Organismus. Die genomische DNA ist eng assoziiert mit regulatorischen Proteinen (Histone), welche einen Einfluss auf die räumliche Struktur der DNA und damit auf die Regulation der Genexpression haben können. Histone können unterschiedliche kleine Anhänge tragen (Histonmodifikationen) und damit die Expression von Genen an- oder abschalten. Beim sogenannten Epigenome Editing wird CRISPR/Cas genutzt, um mit Hilfe von guide RNA und an dead Cas9 gekoppelte Enzyme die Histone bestimmter DNA-Zielsequenzen zu verändern (Huang et al., 2017; McDonald et al., 2016). Solche Veränderungen können die Eigenschaften der DNA-Histon-Komplexe und damit auch die Genregulation beeinflussen (Braun et al., 2017; Hilton et al., 2015). Ein weiterer „epigenetischer Faktor“ neben den Histonen sind bestimmte Markierungen an den Basen der DNA (z.B. Methylgruppen an der Base Cytosin): ob bestimmte Basen markiert sind oder nicht, hat Einfluss auf die Genexpression. Auch hier wurde das dCas9-System bereits genutzt, um Markierungen herbeizuführen oder zu entfernen (Vojta et al., 2016).

Nicht alle Bereiche des Erbguts können durch CRISPR/Cas verändert werden

Die guide RNA ist der Wegweiser des CRISPR/Cas Systems und leitet die Nuklease an die gewünschte Zielsequenz. Eine Voraussetzung für das Erkennen der Zielsequenz ist eine 3 Basenpaar lange Sequenz (die sogenannte PAM-Sequenz), die vor der eigentlichen Zielsequenz liegt. Ohne diese kurze Erkennungssequenz ist es nicht möglich, dass die DNA-Doppelhelix geöffnet wird und die guide RNA vollständig binden kann. Beim Design einer geeigneten guide RNA anhand von Referenzgenomen tritt daher die Limitierung auf, dass vor der eigentlichen

Zielsequenz eine PAM-Sequenz vorhanden sein muss. Das heißt, dass nicht alle Bereiche des Erbguts frei durch das CRISPR/Cas-System verändert werden können. Um die Auswahl an möglichen Zielsequenzen zu erhöhen, werden neue Cas-Nukleasen isoliert und weiterentwickelt, die unterschiedliche Erkennungssequenzen benötigen (Zetsche et al., 2015). Diese Cas-Nukleasen werden aus verschiedenen Bakterienstämmen isoliert und für den molekularen Einsatz im Labor genutzt.

Zugänglichkeit der DNA für CRISPR/Cas

Die DNA liegt in strukturell unterschiedlich zugänglichen Zuständen vor, was einen Einfluss auf die Effizienz des CRISPR/Cas-Systems haben kann. Natürlicherweise befindet sich die DNA nie „nackt“ im Zellkern, sondern ist um Histon-Proteine gewickelt. Dabei kann die DNA eng aufgewickelt, aber auch wieder gelockert werden. Die engste Aufwicklung erfährt die DNA während der Zellteilung, wenn sie in Chromosomen sichtbar wird. In der Zeit zwischen zwei Zellteilungen werden die Chromosomen wieder aufgelockert. Bereiche, in denen aktiv Gene abgelesen werden, liegen „offener“, sprich weniger stark gewickelt vor als Genabschnitte, an denen Gene gerade nicht abgelesen werden. Diese Bereiche sind stärker um die Histone gewickelt und somit weniger zugänglich (Allis, 2007). Diese weniger gut erreichbaren Bereiche der DNA sind für das CRISPR/Cas-System schlecht zugänglich und mindern die Effizienz der Technik (Daer, Cutts, Brafman, & Haynes, 2017; Horlbeck et al., 2016). Grundsätzlich sind aber auch solche Bereiche des Erbguts durch CRISPR/Cas veränderbar. Die Möglichkeiten von CRISPR/Cas Bereiche im Erbgut zu verändern, in denen natürlicherweise weniger häufig Mutationen auftreten, werden im Hintergrundpapier zu Mutationen/Mutagenese beschrieben.

Zielregionen können mehrfach vorhanden sein

Speziell Pflanzen haben oft ein redundantes Genom, das heißt Gen-Informationen können sich wiederholen. Im Laufe der Evolution sind Genfamilien entstanden, die durch Duplikation einer ursprünglich vorhandenen Gensequenz entstanden sind. Diese duplizierten Sequenzen können entweder in Gencluster zusammenbleiben oder über das gesamte Erbgut verteilt sein (auf dem ursprünglichen Chromosom, aber auch auf verschiedenen Chromosomen). Die Gene in diesen Genfamilien können in ihrer DNA-Sequenz komplett identisch sein oder sie können sich in einzelnen Basen unterscheiden, was auf Mutationsereignisse zurückgeführt werden kann. Liegt ein Gen in mehrfacher Ausführung (Allele) vor, können alle beziehungsweise mehrere Gene vom CRISPR/Cas-System erkannt und verändert werden.

Stand Juli 2018

Referenzen

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., . . . Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, *550*(7675), 280-284. doi: 10.1038/nature24049
- Allis. (2007). *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., . . . Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, *315*(5819), 1709-1712. doi: 10.1126/science.1138140
- Braun, S. M. G., Kirkland, J. G., Chory, E. J., Husmann, D., Calarco, J. P., & Crabtree, G. R. (2017). Rapid and reversible epigenome editing by endogenous chromatin regulators. *Nat Commun*, *8*(1), 560. doi: 10.1038/s41467-017-00644-y
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., . . . Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*(6121), 819-823. doi: 10.1126/science.1231143
- Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, *358*(6366), 1019-1027. doi: 10.1126/science.aag0180
- Daer, R. M., Cutts, J. P., Brafman, D. A., & Haynes, K. A. (2017). The Impact of Chromatin Dynamics on Cas9-Mediated Genome Editing in Human Cells. *ACS Synth Biol*, *6*(3), 428-438. doi: 10.1021/acssynbio.5b00299
- DeWitt, M. A., Corn, J. E., & Carroll, D. (2017). Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. *Methods*, *121-122*, 9-15. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.04.003
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. doi: 10.1126/science.1258096
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., & Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, *551*(7681), 464-471. doi: 10.1038/nature24644
- Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, *33*(5), 510-517. doi: 10.1038/nbt.3199
- Horlbeck, M. A., Witkowsky, L. B., Guglielmi, B., Replogle, J. M., Gilbert, L. A., Villalta, J. E., . . . Weissman, J. S. (2016). Nucleosomes impede Cas9 access to DNA in vivo and in vitro. *Elife*, *5*. doi: 10.7554/eLife.12677
- Huang, Y. H., Su, J., Lei, Y., Brunetti, L., Gundry, M. C., Zhang, X., . . . Goodell, M. A. (2017). DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A. *Genome Biol*, *18*(1), 176. doi: 10.1186/s13059-017-1306-z

- J. M. Gerhke, O. C., M. Clement, L. Pinello, J. K. Joung. (2018). High-precision CRISPR-Cas9 base editors with minimized bystander and off-target mutations. *bBioRxiv (Preprint)*.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, *24*(6), 1012-1019. doi: 10.1101/gr.171322.113
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, *533*(7603), 420-424. doi: 10.1038/nature17946
- Kouranova, E., Forbes, K., Zhao, G., Warren, J., Bartels, A., Wu, Y., & Cui, X. (2016). CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos. *Hum Gene Ther*, *27*(6), 464-475. doi: 10.1089/hum.2016.009
- Li, Z., Liu, Z. B., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., . . . Cigan, A. M. (2015). Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. *Plant Physiol*, *169*(2), 960-970. doi: 10.1104/pp.15.00783
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., . . . Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, *31*(9), 833-838. doi: 10.1038/nbt.2675
- McDonald, J. I., Celik, H., Rois, L. E., Fishberger, G., Fowler, T., Rees, R., . . . Challen, G. A. (2016). Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. *Biol Open*, *5*(6), 866-874. doi: 10.1242/bio.019067
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, *60*(2), 174-182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, *152*(5), 1173-1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, *8*(11), 2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
- Sanchez-Leon, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Gimenez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., & Barro, F. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*, *16*(4), 902-910. doi: 10.1111/pbi.12837
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, *32*(4), 347-355. doi: 10.1038/nbt.2842

- Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, *45*, 247-271. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132435
- Vojta, A., Dobrinic, P., Tadic, V., Bockor, L., Korac, P., Julg, B., . . . Zoldos, V. (2016). Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, *44*(12), 5615-5628. doi: 10.1093/nar/gkw159
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem*, *85*, 227-264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, *153*(4), 910-918. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., . . . Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, *163*(3), 759-771. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H., & Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, *42*(17), 10903-10914. doi: 10.1093/nar/gku806