

09. März 2020

Genom-Editierung: Neue Cas9-Variante für höhere Präzision

CRISPR-Cas9 hat das Gebiet der Genetik durch seine Fähigkeit DNA spezifisch an definierten Stellen zu schneiden revolutioniert. Forscher benutzen die Genschere unter anderem dazu Gene gezielt auszuschalten oder neue DNA Fragmente in das Genom einzufügen. Aber egal wie spezifisch das Cas9 Enzym ist – manchmal schneidet es dort, wo es nicht schneiden soll. Wissenschaftler der Max-Planck-Forschungsstelle für die Wissenschaft der Pathogene in Berlin und der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelten nun eine Cas9-Variante, welche die Editierung von Genen noch spezifischer macht.

Ungenauigkeiten durch Off-Targets

Damit Cas9 sein DNA Ziel schneiden kann, muss es zunächst durch eine guide-RNA an die Stelle im Genom geführt werden, an der es schneiden soll. Die guide-RNA enthält die zur Zielstelle komplementäre Sequenz und funktioniert wie eine Postleitzahl, um Cas9 an sein Ziel zu bringen. „Manchmal kann Cas9 jedoch auch DNA-Sequenzen schneiden, die dem eigentlichen Ziel sehr ähnlich sind, so genannte Off-Targets“, erklärt Emmanuelle Charpentier, Direktorin der Max-Planck-Forschungsstelle für die Wissenschaft der Pathogene. Diese unerwünschte Aktivität von CRISPR-Cas9 kann zu Ungenauigkeiten bei der Bearbeitung des Genoms führen. „Ein unbeabsichtigter Schnitt an der falschen Stelle im menschlichen Genom kann tiefgreifende Folgen haben. Deshalb brauchen wir ein spezifischeres System“, sagt Michael Böttcher, Juniorprofessor an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität.

Präzision durch Brückenhelix

Wissenschaftler versuchen daher, die Spezifität von Cas9 mit verschiedensten Ansätzen zu optimieren. In der aktuellen Studie konzentrierte sich das Forscherteam aus Berlin und Halle auf eine evolutionär konservierte Domäne von Cas9, die Brückenhelix. Die Forscher fanden heraus, dass die Brückenhelix eine entscheidende Rolle bei dem Mechanismus spielt, durch den Cas9 mit seiner guide-RNA und der DNA Zielstelle interagiert. Sie identifizierten eine Gruppe von Aminosäuren, die mit dem Phosphat-Rückgrat der guide-RNA in Kontakt kommen und dadurch die Bildung einer stabilen Schleife ermöglichen, welche für die Aktivität von Cas9 essentiell ist. In dieser Schleife paaren sich die Basen der von Cas9-gebundenen guide-RNA mit dem komplementären Strang der DNA-Zielsequenz und verdrängen dabei den zweiten DNA-Strang, wodurch es Cas9 möglich wird beide DNA Stränge zu schneiden.

Neue Cas9-Varianten

Die Forscher generierten neue Cas9-Varianten, indem sie die identifizierten Aminosäuren veränderten, und stellten fest, dass mehrere dieser Varianten viel seltener als das ursprüngliche Cas9-Enzym an Stellen schneiden, die nicht dem eigentlichen DNA Ziel entsprechen. Sie konnten weiterhin zeigen, dass eine der getesteten Varianten, genannt R63A/Q768A, die Spezifität von Cas9 auch in menschlichen Zellen erhöhte. „Unsere Ergebnisse bieten eine neue Grundlage für die weitere Optimierung des CRISPR-Cas9 Systems und zeigen die Notwendigkeit, mehr Wissen über die Biochemie der CRISPR-Cas Systeme zu gewinnen, um sie weiter zu verbessern“, sagt Charpentier.

Quelle: Universitätsklinikum Halle