



Lisa-Katharina Maier
Jahrgang 1985. 2004–2010
Studium der Biologie, Universität
Ulm, gefördert durch die
Studienstiftung des deutschen
Volkes. 2010–2014 Promotion
bei Prof. Dr. A. Marchfelder zu
RNA-Metabolismus und Immun-
abwehr in Haloarchaeen.

Elisabeth-Gateff-Preis der GfG

CRISPR-Cas mit einer Prise Salz – Immunabwehr der Prokaryoten

LISA-KATHARINA MAIER
BIOLOGIE II, UNIVERSITÄT ULM

DOI: 10.1007/s12268-015-0646-z
© Springer-Verlag 2015

■ Prokaryotische Organismen dominieren alle erdenklichen Habitate und können selbst unwirtlichste Bedingungen tolerieren. Ihr Überleben ist aber stetig durch eine mindestens zehnfache Übermacht mobiler, zumeist parasitärer, genetischer Elemente bedroht. Zur Abwehr haben Mikroorganismen eine Vielzahl von Abwehrstrategien entwickelt. Die angreifenden Viren überwinden diese Verteidigungslinien jedoch immer wieder und es resultiert ein endloses Wettrüsten. Erst vor kurzem wurde eine neue Form der Abwehr bei Prokaryoten entdeckt, die adaptiv, vererbbar und hochspezifisch ist. Es ist eine Art Immunantwort der Prokaryoten, wie sie bisher nur für Eukaryoten angenommen wurde. Das CRISPR-Cas-System verleiht Immunität indem die eindringende Nukleinsäure sequenzspezifisch erkannt und schließlich eliminiert wird (**Abb. 1**). Hierzu generieren die Zellen durch Integration von Abschnitten der Angreifer-DNA ein in ihrem Genom verankertes Immungedächtnis (CRISPR-Loci). Die gespeicherte Information wird durch

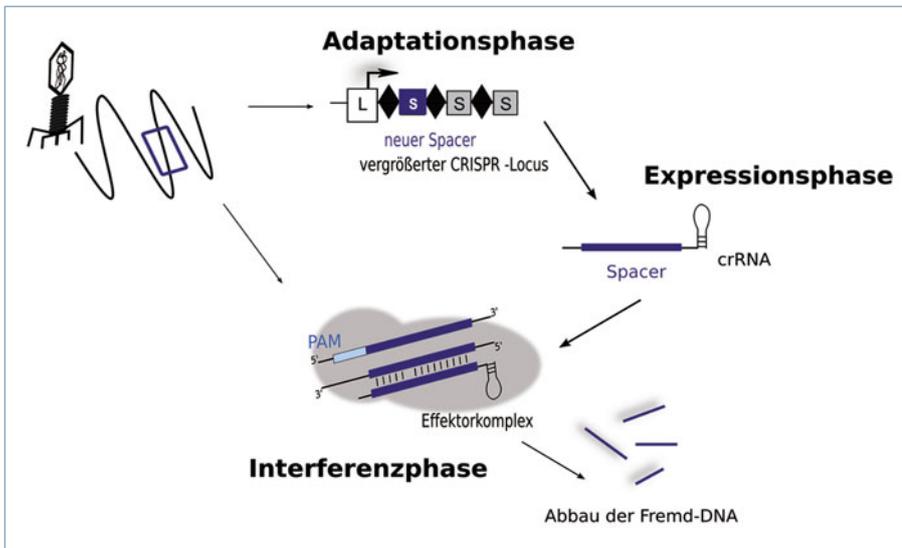
Transkription in kleine RNA-Moleküle (crRNA) für die Zelle nutzbar gemacht. Sie werden Teil eines Effektorkomplexes (Cascade) und dirigieren diesen bei erneutem Kontakt mit dem Angreifer zu dessen Erbgut, das dann eliminiert wird (zusammengefasst u. a. in [1]).

Die Anwendung dieser durch kleine RNA-Moleküle zu programmierenden Effektorkomplexe ist die größte biotechnologische Entdeckung der letzten Jahre. Die Nutzung als gentechnologisches Werkzeug revolutioniert momentan die Molekularbiologie und verspricht ein breites Anwendungsspektrum bis hin zur gezielten Anwendung in der Medizin [2].

Über viele mechanistische Details und speziesspezifische Charakteristika ist noch sehr wenig bekannt zumal sich CRISPR-Cas-Systeme in fünf Typen und zahlreiche Subtypen gliedern. Eines der wenigen eingehend untersuchten archaealen Systeme ist das Typ I-B-System des salzliebenden Haloarchaeons *Haloferax volcanii* [3].

Die Abwehrreaktion beruht nicht nur auf Faktoren der Wirtszelle allein, sondern auch

auf Motiven innerhalb des Genoms des Angreifers. Um eine Interferenzreaktion zu lizenzieren, muss der mit der crRNA übereinstimmende Abschnitt der Fremdnukleinsäure von kurzen Sequenzmotiven, den PAMs (*protospacer adjacent motifs*) flankiert werden. Eine umfassende *in vivo*-Analyse zeigte, dass sechs Trinukleotid-Sequenzen eine Interferenzreaktion in *H. volcanii* auslösen können [4]. Dies ist die höchste bisher bekannte Anzahl von PAM-Sequenzen und ermöglicht es der Zelle, klonaler Divergenz und individuellen Mutationen innerhalb der Angreiferpopulation durch ein breiteres Erkennungspotenzial zu begegnen. Die Erkennung des Angreifers ist nicht nur von der Präsenz einer PAM-Sequenz abhängig sondern wird v. a. durch die Basenpaarung zwischen dem angreiferspezifischen Spacer-Abschnitt der crRNA und dem entsprechenden Bereich der Fremd-DNA bestimmt. Wie eine Mutationsanalyse zeigt, umfasst diese Seed-Sequenz für *Haloferax* im PAM-proximalen Bereich 13 Nukleotide. Lücken innerhalb der Seed-Sequenz werden toleriert und, wie für das *Escherichia coli*-System verfügbare Struktur-



▲ **Abb. 1:** Übersicht über die dreiphasige Immunantwort des CRISPR-Cas-Systems. Nach Infektion der Zelle wird ein Abschnitt der Fremd-DNA in den CRISPR-Locus der Zelle integriert (Adaptationsphase). Die gespeicherte Information über den Angreifer wird in eine kleine RNA (crRNA) übersetzt (Expressionsphase). Die crRNA ermöglicht bei einer Reinfektion der Zelle die sequenzspezifische Erkennung des Angreifers und den Abbau der Fremd-DNA (Interferenzphase).

daten zeigen, durch die Anordnung bzw. Struktur der Komponenten des Effektor-Komplexes bedingt [5–8].

Neben den Voraussetzungen für eine funktionelle Interferenzreaktion ist eine Vereinfachung und Reduktion des Systems essenziell für eine mögliche Anwendung als Werkzeug zur gezielten Genregulation in archaealen Systemen. Für *Haloferax* konnte ein System etabliert werden, das die CRISPR-Cas-

unabhängige Produktion einer crRNA erlaubt. Durch diese Entkopplung der Biogenese- und Interferenzphase der Immunantwort konnte eine minimale crRNA, sowie ein minimaler Effektor-Komplex definiert werden [9]. Diese Erkenntnisse werden es ermöglichen, in naher Zukunft auch weitere CRISPR-Cas-Systeme als Werkzeuge einzusetzen und so die Vielfalt molekularbiologischer Techniken zu erweitern. ■

Literatur

- [1] Sorek R, Lawrence M, Wiedenheft B (2013) CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem* 82:237–266
- [2] Charpentier E (2015) CRISPR-Cas9: how research on a bacterial RNA-guided mechanism opened new perspectives in biotechnology and biomedicine. *EMBO Mol Med* 7:363–365
- [3] Maier LK, Dyal-Smith M, Marchfelder A (2015) The Adaptive Immune System of *Haloferax volcanii*. *Life* 5:521–537
- [4] Fischer S, Maier LK, Stoll B et al. (2012) An Archaeal Immune System Can Detect Multiple Protospacer Adjacent Motifs (PAMs) to Target Invader DNA. *J Biol Chem* 287:33351–33363
- [5] Maier LK, Lange SJ, Stoll B et al. (2013) Essential requirements for the detection and degradation of invaders by the *Haloferax volcanii* CRISPR/Cas system I-B. *RNA Biol* 10:865–874
- [6] Jackson RN, Golden SM, van Erp PB et al. (2014) Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science* 345:1473–1479
- [7] Mulepati S, Héroux A, Bailey S (2014) Crystal structure of a CRISPR RNA-guided surveillance complex bound to a ssDNA target. *Science* 345:1479–1484
- [8] Zhao H, Sheng G, Wang J et al. (2014) Crystal structure of the RNA-guided immune surveillance Cascade complex in *Escherichia coli*. *Nature* 515:147–150
- [9] Maier LK, Stachler AE, Saunders SJ et al. (2015) An Active Immune Defense with a Minimal CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) RNA and without the Cas6 Protein. *J Biol Chem* 290:4192–4201

Korrespondenzadresse:

Dr. Lisa-Katharina Maier
Biologie II
Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11
D-89069 Ulm
Tel.: 07315022620
lisa-katharina.maier@uni-ulm.de