

Genome Editing

Gesucht, gefunden: CRISPR-Nukleasen mit neuartigem Schneidemechanismus

PAUL SCHOLZ
BRAIN BIOTECH AG, ZWINGENBERG

CRISPR-Cas-based genome editing has revolutionized a wide range of biotechnological applications due to its speed, precision and simplicity for optimizing the genome of almost all living organisms. To date, however, only a small number of CRISPR nucleases suitable for genome editing have been identified. Here, we report the identification and characterization of a novel family of CRISPR nucleases with an alternative mechanism to target nucleic acid sequences and its use in various application areas.

VAAM-Innovationspreis 2023

DOI: 10.1007/s12268-023-1979-7
© Springer-Verlag GmbH 2023

■ CRISPR-Cas-Nukleasen bilden das natürliche adaptive Immunsystem vieler Prokaryoten und Archaeen: Sie wehren dabei mithilfe der Nukleasen die angreifenden Phagen durch spezifisches Zerschneiden des Phagen-Genoms ab [1]. Basierend auf dieser Erkennt-

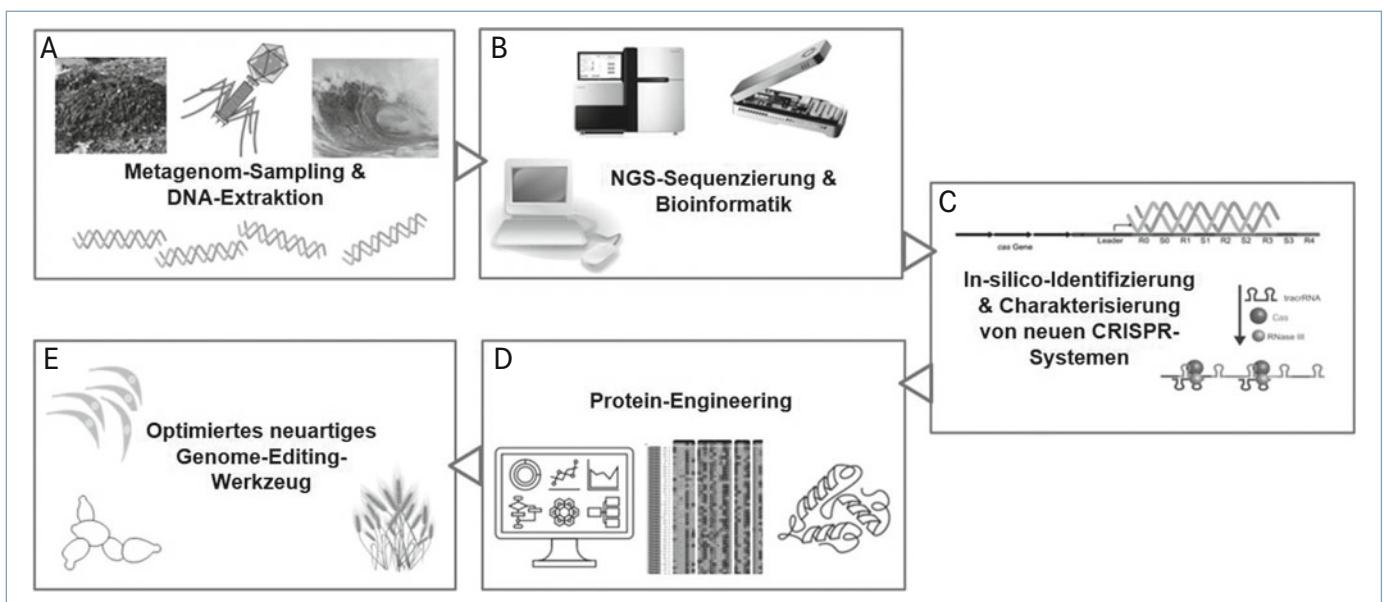
nis entwickelten Forschende in den letzten zehn Jahren Werkzeuge und Strategien, um diese Cas-Nukleasen zu programmieren: Individuell anpassbare guide-RNAs (gRNAs) lenken dabei die Nukleasen gezielt auf fast jede beliebige genomische Region von Interesse,

um dort einen Doppelstrangbruch in der DNA zu induzieren [2]. Diese CRISPR-induzierten Doppelstrangbrüche können anschließend genutzt werden, um das Genom auf vielfältige Weise zu verändern: um Gene aus- oder einzuschalten, die Transkription zu unterbrechen oder zu verstärken, Gene zu reparieren oder neu anzuordnen oder sogar, um komplette Genome zu entwerfen. Vor allem die Präzision und Geschwindigkeit, mit der sich solche Genom-Modifikationen durchführen lassen, machen die CRISPR-Technologie revolutionär im Vergleich zu älteren Methoden.

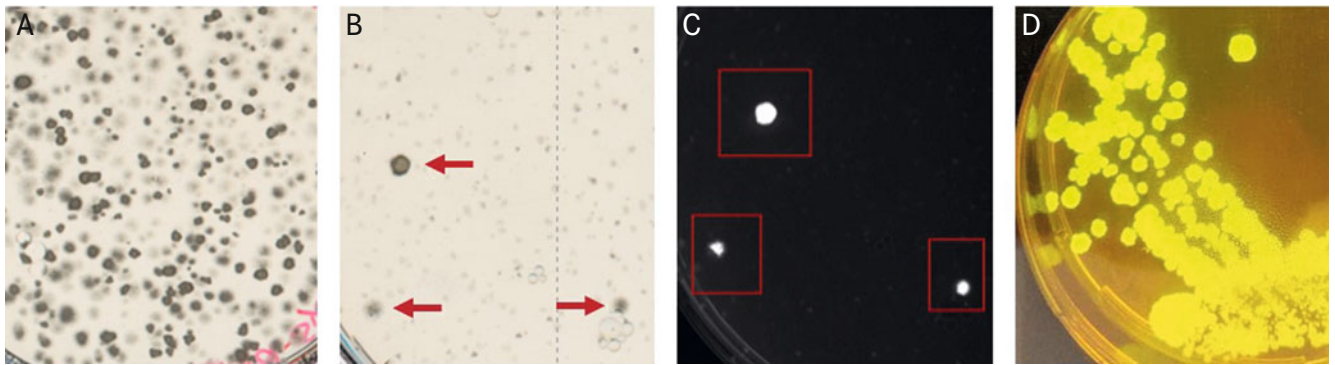
Trotz dieses riesigen Potenzials der CRISPR-Technologie sind die bisher verfügbaren Werkzeuge nur eingeschränkt nutzbar, da ungelöste Patentstreitigkeiten und komplizierte Lizenzbedingungen eine breite Anwendung vor allem im industriellen Umfeld erschweren [3].

Metagenomik: Schlüssel zur Schatztruhe der Natur

Um den Anwendungsbereich der CRISPR-Technologie zu erweitern sowie den beste-



▲ **Abb. 1:** Workflow zur Identifizierung neuartiger Genome-Editing-Nukleasen. **A,** Auswahl von geeigneten Metagenom-Proben und Präparation der DNA. **B,** NGS-Sequenzierung und bioinformatische Auswertung der metagenomischen DNA. **C,** computergestützte Analyse der Sequenzdatenbanken zur Identifizierung neuer CRISPR-Nukleasen. **D,** Optimierung der identifizierten Sequenzen durch Protein Engineering. **E,** Entwicklung der neuen Nukleasen zu Genome-Editing-Werkzeugen mit einem breiten Anwendungsspektrum in verschiedenen Organismen.



▲ Abb. 2: Locus-spezifischer Knock-in von grün fluoreszierendem Protein (GFP) in das Genom von *Aspergillus niger*. **A**, Die Negativkontrolle zeigt eine Platte voller Kolonien, da eine G-dase-E-Nuklease in Kombination mit einem nicht zielgerichteten Spacer eingesetzt wurde. **B**, Die Spacer-spezifische Aktivierung der G-dase-E-Nuklease führt zu einer starken Zellreduktion mit nur drei gewachsenen Kolonien. **C**, visuelle Auswertung (UV-Licht) der gewachsenen Kolonien, die die Integration des GFP-Gens in das *Aspergillus*-Genom bestätigt. **D**, Die stabile GFP-Integration wird durch die Kultivierung und Expansion einer der Kolonien bestätigt.

henden Hürden bei der Lizenzierung zu begegnen, beschäftigen wir uns bei der BRAIN Biotech AG seit einigen Jahren mit der Identifizierung und Entwicklung neuartiger Genom-Editierungswerkzeuge. Auf Basis der sequenzbasierten Metagenomik, bei der mittels NGS-Technologien (*next generation sequencing*) sämtliche Organismen und die darin enthaltenen Erbinformationen einer Umweltprobe analysiert werden, suchen wir nach Alternativen zu bereits bekannten CRISPR-Systemen. Dazu haben wir ganz gezielt mehr als 30 Metagenom-Proben anhand verschiedener Parameter ausgewählt und mithilfe von gestaffelten Filtrierungsschritten spezifische Gruppen von Mikroorganismen angereichert, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit neuartige CRISPR-Systeme enthalten. Die DNA dieser angereicherten Organismen isolierten wir anschließend und sequenzierten sie mithilfe eines hybriden NGS-Ansatzes (Illumina und Nanopore). Dies generierte mehr als drei Tera-Basenpaare an Sequenzdaten. Diese Daten assemblierten und annotierten wir, sodass wir eine sequenzbasierte Metagenomdatenbank mit mehr als 100 Millionen *open reading frames* (ORFs) erhielten.

Basierend auf dieser Datenbank und einer eigens für diesen Zweck entwickelten Bioinformatik-Pipeline analysierten wir die Sequenzdaten zunächst *in silico*, um neue CRISPR-Nukleasen zu identifizieren. In einer ersten Screening-Runde identifizierten wir dabei mehr als 2.000 neue Sequenzen potenzieller CRISPR-Nukleasen, von denen die meisten eine gewisse Verwandtschaft mit bereits beschriebenen Nuklease-Familien aufweisen (z. B. 158 neue Cas9-Varianten). Mehr als 99 Prozent dieser Sequenzen wurden bisher noch nicht näher charakterisiert, bieten aber ein enormes Potenzial für zukünftige Arbeiten in verschiedenen

Anwendungsbereichen (z. B. kleinere Cas-Nukleasen, spezifische Wirkungsweisen, RNA-Editierung, Anwendung in der Diagnostik). Neben dieser Schatztruhe ungenutzter Sequenzen wählten wir 18 Nuklease-Sequenzen aus, die keine oder nur eine sehr geringe Sequenzidentität mit bereits bekannten Nukleasen aufweisen, und charakterisierten ihre Fähigkeiten.

Die 18 Nukleasen verteilen sich dabei auf zwei verschiedene Familien, die wir G-dase E (3 Nukleasen) und G-dase M (15 Nukleasen) taufte.

G-dase E: Genome Editing einmal anders

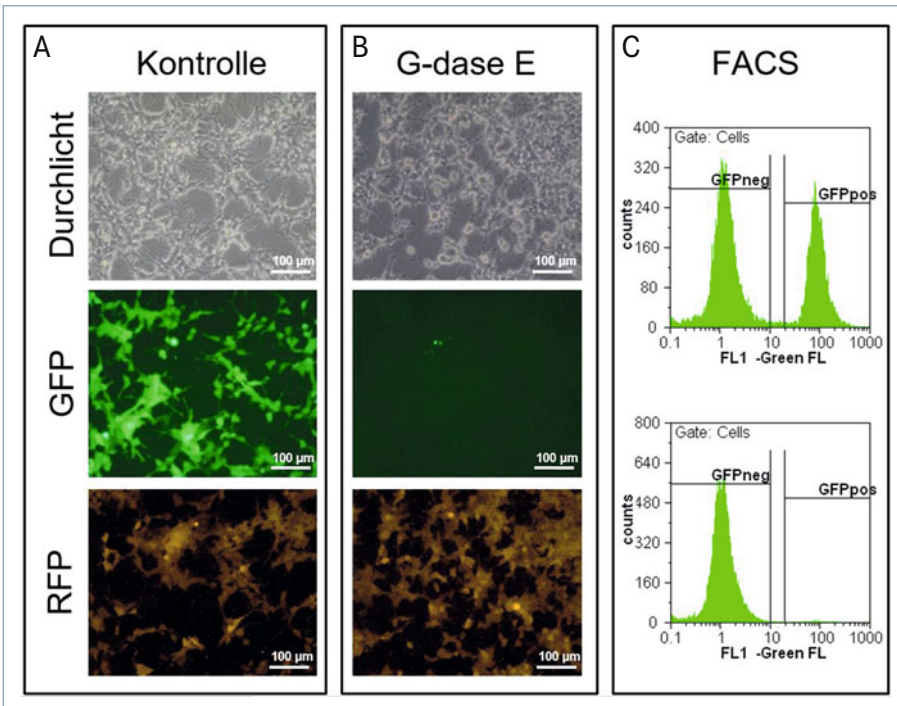
Eine der Technologien, die wir innerhalb der letzten Jahre entwickelt haben, betrifft die Familie der G-dase-E-Nukleasen (E für *engineered*). Diese neuartige Familie von CRISPR-Nukleasen der Klasse 2 unterscheidet sich in ihrer Wirkungsweise deutlich von klassischen CRISPR-Nukleasen und trägt dadurch zur Erweiterung des Anwendungsspektrums der CRISPR-Technologie bei. Im Gegensatz zu den klassischen CRISPR-Nukleasen, bei denen die Aktivierung zu einem geführten Doppelstrangbruch an einer vordefinierten Position in der DNA führt [2], induzieren die G-dase-E-Nukleasen nach einer initialen, RNA-sequenzspezifischen Aktivierung einen kollateralen DNA- und RNA-Abbau, der zum Zelltod führt (geführte Toxizität). Obwohl sich der Mechanismus der gezielten Toxizität stark vom DNA-Targeting-Mechanismus klassischer CRISPR-Nukleasen unterscheidet, haben wir in verschiedenen Experimenten bereits hocheffizientes Genome Editing in verschiedenen Organismen (Prokaryoten-, Hefe-, Pilz- und Säugetierzellen) etabliert. Neben den klassischen Genome-Editing-Anwendungen erforschen wir derzeit alternative Anwendungsbereiche, in denen klas-

sische CRISPR-Nukleasen nicht eingesetzt werden können, z. B. die spezifische Zelldepletion für therapeutische Anwendungen, die Zellanreicherung, die Anwendung als Kill-Switch oder die allgemeine Nutzbarkeit als DNase.

Anwendung in der weißen Biotechnologie

Die Genome-Editing-Fähigkeit der klassischen CRISPR-Nuklease basiert auf einem geführten DNA-Doppelstrangbruch in Kombination mit den nativen Reparaturmechanismen der Zielzelle (NHEJ: *non-homologous end joining* oder HDR: *homology directed repair*). Im Gegensatz dazu basiert die Genom-Editierung mittels der G-dase-E-Technologie auf der Anreicherung von Zellen, die mittels des nativen HDR-Reparaturmechanismus editiert wurden und mit deren Hilfe man ein Homologie-Template zielgerichtet in das Genom der Zielzelle einbringen kann. Das Editing findet dabei in zwei Schritten statt: Im ersten Schritt wird das HDR-Template, das die gewünschte Modifikation des Genoms trägt, in die Zielzellen eingebracht. Über den nativen HDR-Reparaturmechanismus der Zellen wird dieses HDR-Template dann in einigen Zellen über die Homologie-Flanken ortsspezifisch ins Genom eingebaut, was in diesen Zellen zur gewünschten Veränderung führt. Dieser natürliche Mechanismus findet allerdings nur in sehr wenigen Zellen statt, sodass in den meisten Fällen mehr als 99 Prozent der Zellen das HDR-Template nicht oder an einer falschen Stelle ins Genom einbauen, was die Identifizierung der korrekt editierten Zellen sehr aufwändig macht.

Hier kommt die G-dase-E-Technologie zum Einsatz, die nachgeschaltet zum HDR-Template in den Zellen aktiviert wird. Ist die G-dase-E-Nuklease mit einer Zielsequenz für



▲ **Abb. 3:** Zielspezifische Zelldepletion. **A**, negative Kontrolle: 50/50-Mischung von HEK-GFP- und HEK-RFP-Zellen, die mit G-dase E in Kombination mit einem nicht zielgerichteten Spacer transfiziert wurden. **B**, Depletion der GFP-positiven Zellen unter Verwendung einer GFP-spezifischen Spacer-Sequenz zur Aktivierung der G-dase-E-Nuklease, ohne die Lebensfähigkeit der GFP-negativen (RFP-positiven) Zellen zu beeinträchtigen. **C**, FACS-Analyse zeigt eine Verteilung von etwa 55 % GFP-negativen (linker Peak) und etwa 45 % EGFP-positiven Zellen (rechter Peak) in der Negativkontrolle (oberes Diagramm) und von mehr als 98,5 % GFP-negativen (linker Peak) und weniger als 1,5 % GFP-positiven Zellen (rechter Peak) unter Verwendung eines zur GFP-Sequenz passenden Spacers (unteres Diagramm).

die Wildtyp(WT)-Sequenz programmiert, wird die Nuklease in diesen Zellen aktiviert und tötet sie mithilfe der kollateralen Aktivität ab. Im Gegensatz dazu ist in den Zellen, in denen das HDR-Template korrekt ins Genom eingebaut wurde, die Zielstelle im Genom sowie die daraus resultierende RNA durch das HDR-Template verändert. Dadurch passt die Zielsequenz der G-dase-E-Nuklease nicht mehr perfekt an die Zielstelle. Die G-dase-E-Nuklease wird in diesen Zellen nicht aktiviert, und die Zellen sind vor der kollateralen Aktivität der G-dase-E-Nuklease geschützt. Dadurch wird ein gezieltes Absterben der nicht korrekt editierten Zellen ausgelöst, und nur die korrekt editierten Zellen überleben die G-dase-E-Behandlung (**Abb. 2**).

Trotz der Abhängigkeit vom nativen HDR-Mechanismus der Zellen haben wir die hoch-effiziente Genom-Editierung mit der G-dase-E-Nuklease bereits in verschiedenen prokaryotischen Zellen sowie Hefe- und Pilzzellen erfolgreich etabliert und wenden die Technologie routinemäßig in verschiedenen Orga-

nismen in internen Projekten und für unsere Partner an.

Spezifische Zelldepletion in der therapeutischen Anwendung

Genom-Editing-Technologien versprechen die Entwicklung innovativer Therapien. Mit aktuell mehr als 70 laufenden klinischen Studien hat der „CRISPR-Goldrausch“ bereits begonnen [4]. Dabei nutzen verschiedene Unternehmen vor allem klassische CRISPR-Nukleasen (DNA-Doppelstrangbrüche) für *ex vivo*- und *in vivo*-Anwendungen, um Krankheiten durch das Verändern des Genoms der Zielzellen zu heilen.

Aufgrund der neuartigen Wirkungsweise der G-dase-E-Nukleasen (kollaterale DNA- und RNA-Aktivität nach einer initialen, sequenzspezifischen Aktivierung) ermöglicht die G-dase-E-Technologie Anwendungen, die für andere Nukleasen bisher unerreichbar waren. Im Gegensatz zu klassischen Nukleasen, mit deren Hilfe das Genom der Zielzellen verändert werden kann, ist die G-dase-E-Technologie in der Lage, Zellen auf

der Grundlage eines spezifischen RNA-Markers selektiv abzutöten. In ersten Experimenten haben wir bereits gezeigt, dass aus einer 50/50-Mischung von humanen Zellen (HEK293), die sich jeweils nur in einem Marker-Gen unterscheiden (GFP bzw. RFP), ein selektives Abtöten eines Zelltyps auf Basis der Markersequenz möglich ist (**Abb. 3**).

Dank dieser einzigartigen Eigenschaften könnte die G-dase-E-Nuklease zur selektiven Entfernung unerwünschter Zellen eingesetzt werden, ohne die Lebensfähigkeit der umliegenden Zellen zu beeinträchtigen. Dies eröffnet neue und einzigartige Möglichkeiten für den therapeutischen Einsatz, etwa bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, bakteriellen Infektionen oder anhaltenden Infektionen mit Viren (z. B. HIV, Hepatitis C, Herpes, Varizella-Zoster- oder Masernvirus). Arbeiten mit dem Fokus auf onkologischen Targets haben wir bei BRAIN gestartet, bündeln sie aktuell in einer Ausgründung (Akribion Genomics) und treiben dies fokussiert voran.

Literatur

- [1] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709–1712
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821
- [3] Ledford H (2022) Major CRISPR patent decision won't end tangled dispute. *Nature* 603: 373–374
- [4] Eshka S, Bahador M, Gordan M et al. (2022) A systematic review of gene editing clinical trials. *medRxiv*, DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.11.24.22282599>

Paul Scholz



Biologiestudium an den Universitäten Köln und Bochum. **2015** Promotion und anschließendem PostDoc am Lehrstuhl für Zellphysiologie der Universität Bochum bei Prof. Dr. H. Hatt. **2016** Wechsel in die Bioactives Unit der BRAIN Biotech AG, Zwingenberg. Seit **2019** Leiter der Technologieplattform für Angewandte Bioinformatik sowie Wissenschaftlicher Leiter der Genome-Editing-Entwicklung. **2023** VAAM-Innovationspreis.

Korrespondenzadresse:

Dr. Paul Scholz
BRAIN Biotech AG
Darmstädter Straße 34–36
D-64673 Zwingenberg
www.brain-biotech.com
ps@brain-biotech.com