

SONDERHEFT
2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**MATERIAL-
FORSCHUNG**
Gesteinsbesiedelnde
Pilze

PFLANZENGENETIK
Genomsequenzen
sichtbar machen

EXPERIMENT
Pauline und die
Ausreißer

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

CRISPR-Cas

... mehr als nur
Verteidigung

Die evolutionäre Wurzel der CRISPR-Cas-Systeme

Casposons

FINN OLE GEHLERT | LISA HELLWIG | RUTH ANNE SCHMITZ

Casposons tragen alle Strukturen mobiler genetischer Elemente außer Transposasen oder Integrasen. Sie kodieren Enzyme ähnlich der Cas1-Enzyme des CRISPR-Cas-Systems und werden daher als evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme betrachtet. Diese Enzyme werden als Cas1-solo oder Casposase bezeichnet und sind separat vom CRISPR-Cas-System lokalisiert. Die Funktion von Casposons wurde nun abschließend in vitro und in vivo untersucht und nachgewiesen.



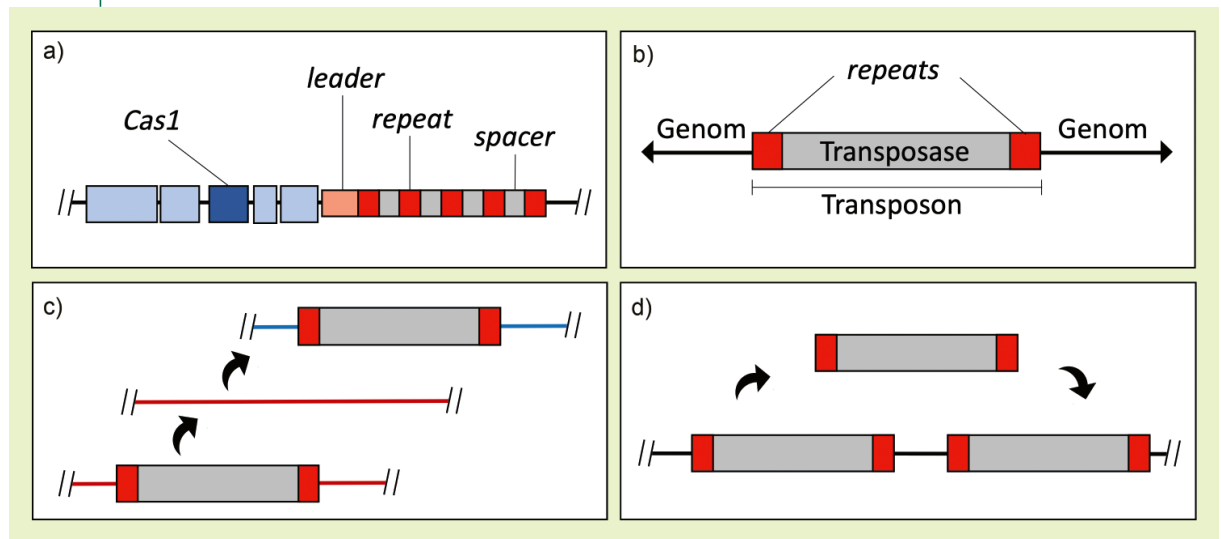
CRISPR-Cas-Systeme sind eine sehr gut untersuchte Klasse von Verteidigungsmechanismen der Prokaryoten gegen verschiedene mobile genetische Elemente. Basierend auf ihrer Fähigkeit, Fragmente der genetischen Information eines Angreifers z. B. eines Bakteriophagen im Erbgut der angegriffenen Zelle und damit in der Population zu speichern, werden sie auch als adaptive Immunsysteme der Bakterien und Archaeen bezeichnet. Als ein Schlüsselenzym, welches zentral für die Integration neuer DNA-Fragmente in die sogenannten CRISPR-Arrays ist, wurde Cas1 identifiziert. Es ist daher in nahezu allen heute bekannten CRISPR-Cas-Systemen vorhanden. Unerwarteterweise zeigten neueste bioinformatische Analysen jedoch auch das Vorkommen von Cas1 verwandten Genen, die alleinstehend außerhalb von CRISPR-Cas-Systemen in Transposon-ähnlichen Strukturen vorliegen. Die entsprechenden Genprodukte wurden daher als Cas1-solo-Proteine bezeichnet. Basierend auf der Tatsache, dass keine weiteren Transposase kodierenden Gene innerhalb der Elemente identifiziert werden konnten, wurden die Cas1-solo-Proteine als Schlüsselenzyme für die Aktivität dieser Transposon-ähnlichen Elemente angesehen, die man in Folge auch als Casposons bezeichnet. Auf dieser Grundlage werden Casposons als evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme diskutiert. Die CRISPR-Cas-Evolution könnte also Parallelen zur Entwicklung der Immunsysteme höherer Organismen haben, da auch hier eine ehemalige Transposase (RAG1) aus Transib-Transposons eine entscheidende Rolle bei der Neukombination variabler Regionen von Antikörpern spielt [1]. Um diese Paral-

len in der Evolution weiter zu erforschen, wurden die Casposons in ihrer Funktionsweise näher charakterisiert. Erst kürzlich gelang es, ihre Aktivität in lebenden Zellen nachzuweisen. Alle vorangegangenen Analysen konzentrierten sich zunächst ausschließlich auf bioinformatische Ansätze und auf die *in vitro*-Charakterisierung der Enzymaktivitäten. Der folgende Artikel umfasst einen Überblick über die *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung von Casposons.

CRISPR-Cas als prokaryotische Verteidigungssysteme

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) und mit CRISPR assoziierte Proteine (Cas) sind vielfältige Verteidigungssysteme von Prokaryoten, die gegen alle möglichen Arten von mobilen genetischen Elementen gerichtet sein können. Die Systeme werden nach ihrer Enzymausstattung und ihren Zielmolekülen in verschiedene Klassen, Typen und Subtypen unterteilt. So sind einzelne Systeme optimiert, um fremde RNA oder DNA zu erkennen und effizient zu zerstören. Dabei wird unterschieden, ob die Hauptaktivität der Systeme von Proteinkomplexen (Klasse I) oder einzelnen großen Proteinen ausgeht (Klasse II) [2, 3]. Die Targets können bei allen Systemen sehr divers sein wie z. B. Bakteriophagen/Viren oder auch Plasmide [2, 3]. Dabei unterteilt sich die CRISPR-Cas-Aktivität in drei funktionale Phasen [2, 3]. In der ersten Phase der Adaptation werden beispielsweise die Fremd-DNA eines Bakteriophagen erkannt und Fragmente seines Genoms vom Adaptationsmodul – zumeist

ABB. 1 | CRISPR-CAS-SYSTEME UND TRANSPOSONS



a) Darstellung der genetischen Struktur der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) mit assoziierten Protein-(Cas)-Systemen mit Fokus auf Cas1 als Teil des Adaptationsmoduls und dem Aufbau des CRISPR-Arrays bestehend aus der *leader*-Sequenz, den *spacer*-Einheiten und den *repeats*. **b)** Aufbau einfacher DNA-Transposons bestehend aus den terminalen invertierten *repeats* (TIRs) und des Transposase-Gens. **c)** Exzision und Translokation von Transposons von einer Genomposition zu einer neuen Position. Die Kopienanzahl der Transposons bleibt gleich. **d)** Kopieren eines Transposons von einer bekannten Position zu einer weiteren Position. Die Kopienanzahl der Transposons steigt mit ihrer Aktivität.

bestehend aus Cas1 und Cas2 in Verbindung mit weiteren Cas-Proteinen wie zum Beispiel Cas4 – an bestimmten Erkennungsmotiven (*protospacer adjacent motif*, PAM) des jeweiligen CRISPR-Cas-Systems identifiziert, geschnitten und in das CRISPR-Array integriert (Abbildung 1a). In der Expressionsphase werden der CRISPR-Array und seine Cas-Proteine exprimiert. Es entsteht die prä-crRNA (crRNA = CRISPR-RNA), das Transkript des CRISPR-Arrays, das nur die kurzen *spacer*-Sequenzen, die das Erbgut vergangener Angreifer repräsentieren, und die dazwischenliegenden Wiederholungssequenzen (*repeats*) enthält. Diese RNA des Arrays wird durch verschiedene Cas-Proteine prozessiert, bis reife crRNAs vorliegen, die jeweils einen einzelnen *spacer* repräsentieren. Insgesamt stellen alle verschiedenen, reifen crRNAs, die so in der Expressionsphase entstehen, also einen Pool von Sequenzen dar, der auf alle jemals erfassten ehemaligen Angreifer zurückgeht. In der Interfe-

renzphase kommt es dann zur spezifischen Basenpaarung der entsprechenden crRNA mit dem jeweiligen Genom des Angreifers in den sogenannten Cascade-/Interferenz-Komplexen [2, 3]. Innerhalb dieser Komplexe erfolgt dann der gezielte enzymatische Abbau des fremden Erbguts.

Neben den Cas1-Proteinen, deren Gene elementarer Teil der CRISPR-Cas-Systeme sind, wurden weitere Gene der Cas1-Familie identifiziert, deren genomische Position jedoch weit außerhalb von CRISPR-Cas-Systemen liegt und deren genomische Umgebung Charakteristika von transponierbaren Elementen aufweist [4].

Transposons

Transponierbare Elemente oder kurz Transposons wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Barbara McClintock zuerst bei verschiedenen Pflanzen entdeckt und näher untersucht [5]. Transposons sind mobile genetische Elemente, die ihre Position in ihrem jeweiligen Genom verändern können; häufig verändert sich dabei ebenfalls ihre Kopienanzahl (Abbildung 1b–d). Es gibt eine große Bandbreite von transponierbaren Elementen, die in der Regel alle für ihre Funktion benötigten Gene tragen [6]. Transposons werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt, deren Nomenklatur mit der weiteren Untersuchung und der weiteren Entdeckung neuer mobiler Elemente ständigen Veränderungen unterworfen ist. Allgemein gilt jedoch, dass Transposons danach unterteilt werden, ob sie ein RNA-Intermediat aufweisen, wie dies bei Klasse-I-Transposons (Retrotransposons) der Fall ist, oder ob sie kein RNA-Intermediat aufweisen und somit zu den

IN KÜRZE

- Casposons tragen alle Strukturen **mobiler genetischer Elemente** außer Transposasen oder Integrasen.
- Sie kodieren Enzyme ähnlich der Cas1-Enzyme des CRISPR-Cas-Systems und werden daher als **evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme** betrachtet.
- Diese Enzyme werden als **Cas1-solo oder Casposase** bezeichnet und sind separat vom CRISPR-Cas-System lokalisiert.
- Die **Funktion von Casposons** wurde nun abschließend in vitro und in vivo untersucht und nachgewiesen.

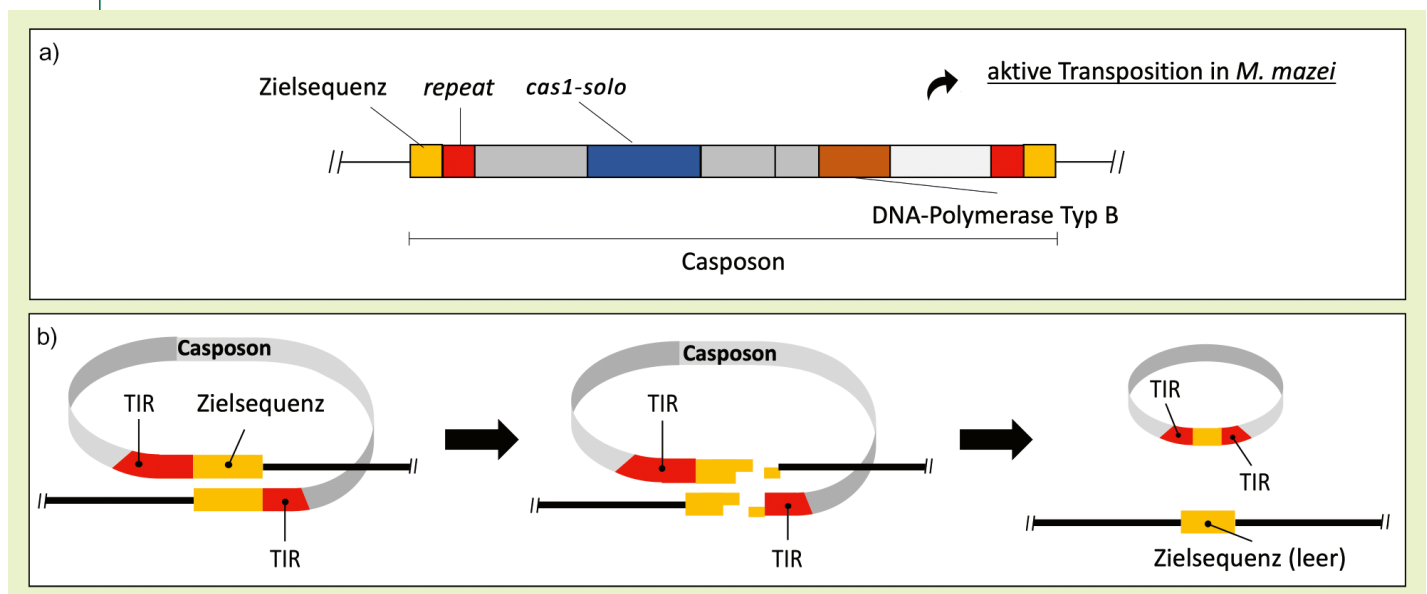
Klasse-II-Transposons gehören (DNA-Transposons) [6]. Die Minimalausstattung der DNA-Transposons, die sogenannten IS-Elemente (Insertionselemente), beinhaltet die kodierende Sequenz der Transposase sowie direkt flankierende Bereiche, die invertierte Sequenzen aufweisen (*terminal inverted repeats*; TIRs) [6] (Abbildung 1b). Die Transposase erkennt die TIRs an den Transposonenden und kann das transponierbare Element aus seiner aktuellen Position herauschneiden oder es durch weitere Mechanismen replizieren und es an anderer Stelle wieder in das Genom einfügen (Abbildung 1c, d). Die Transposasen werden je nach Funktion unterteilt. Typische Transposasen sind Serin- oder Tyrosin-Transposasen. Hier ist die jeweilige Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms namensgebend, die entscheidend für den nukleophilen Angriff auf das DNA-Molekül ist und abschließend eine vorübergehende kovalente Bindung mit dem freiwerdenden DNA-Ende eingeht [6]. Ein Beispiel für DNA-Transposons aus Eukaryoten sind die sogenannten *Mavericks*. Diese Elemente umfassen mehrere Kilobasen an Nukleotiden und werden ebenfalls durch TIRs begrenzt. Sie kodieren mehrere Gene, unter anderem eine Integrase und eine eigene DNA-Polymerase vom Typ B, weshalb davon ausgegangen wird, dass diese Transposons sich selbst unabhängig vom Wirtsgenom replizieren können [7].

Casposons

Die Entdeckung von *cas1-solo*-Genen in genetischen Elementen, die von TIRs begrenzt werden und keine weiteren Gene für Transposasen oder Integrasen aufwiesen,

führte zur Hypothese, dass diese Cas-Proteine eine Schlüsselrolle für die Aktivität der als Casposons bezeichneten Elemente spielen (Abbildung 2a) [4, 8]. Casposons wurden in verschiedenen Organismen gefunden und vor allem in Archaeen der Gattung *Metbanosarcina* untersucht [8, 9]. Die Elemente werden anhand ihrer Enzymarchitektur und der Taxonomie ihrer Wirtsorganismen in vier verschiedene Familien eingeteilt [4, 8]. Casposons der ersten Familie sind charakteristisch für Thaumarchaeota und kodieren typischerweise eine *protein-primed* Typ B DNA-Polymerase (PolB), die in hohem Maße Ähnlichkeiten zu den Polymerasen von archaeellen Viren aufweist, wie dies beispielsweise für die Viren His1 und His2 gezeigt werden konnte [10]. Casposons der zweiten und dritten Familie hingegen nutzen *RNA-primed* PolBs und werden zudem nach ihren jeweiligen Wirtsorganismen unterschieden [4, 8]. So wurden Familie-2-Casposons in einer großen Bandbreite von Euryarchaeota wie zum Beispiel *Aciduliprofundum boonei* T469 identifiziert [11]. Im Gegensatz dazu kommen Familie-3-Casposons nur bei Actinobacteria und Proteobacteria vor [4, 8]. Die letzte Gruppe von Casposons, zugehörig zur Familie 4, wurde bisher nur in *M. mazel*-Stämmen gefunden [4, 8]. Erste hypothetische Modelle für die Casposon-Aktivität gingen davon aus, dass die Transposition ähnlich zum Mechanismus der *Mavericks* ablaufen könnte, da beide Elemente ähnlich groß sind, eine ähnliche Komplexität mit mehreren Genen aufweisen und ebenfalls eigene DNA-Polymerasen vom selben Typ kodieren (Abbildung 2a). Ausgehend von dieser Ähnlichkeit postulierten Krupovic und

ABB. 2 | STRUKTUR VON CASPOSONS



a) Darstellung der Struktur von Casposons anhand des MetMAZ-C1-Casposons aus *M. mazel*. MetMAZ-C1 besitzt terminale invertierte repeats (TIRs) und eine Duplikation der Zielsequenz. Seine Sequenz kodiert acht verschiedene Proteine, zu denen neben Cas1-solo ebenfalls eine DNA-Polymerase vom Typ B gehört. b) Hypothetisches Modell der Casposon-Translokation über ein zirkuläres Intermediat, basierend auf der Beobachtung von einer einzelnen übrigbleibenden Zielsequenz nach der Exzision und dem Übertragen einer Zielsequenz zu einer neuen Genomposition bei der Casposon-Reintegration.

Kollegen, dass Casposons nur während der Replikation des Wirts aktiv sein könnten. Sie gingen davon aus, dass nach dem Entwinden der *supercoiled* doppelsträngigen DNA in der Replikation eine Basenpaarung der Casposon-Enden (TIRs) stattfinden könnte, die notwendig wäre, um von Cas1-solo erkannt und aus dem entsprechenden Einzelstrang ausgeschnitten zu werden [4]. Die anschließende Replikation des Genoms würde zu einer Genomkopie ohne Casposon mit direkt verknüpfter verdoppelter Zielsequenz führen. Gleichzeitig könnte sich das ausgeschnittene Casposon mit der eigenen DNA-Polymerase replizieren und somit wieder den eigenen Doppelstrang herstellen [4]. Das Team um Krupovic postulierte eine hohe Ähnlichkeit innerhalb der Funktion von Cas1-solo und CRISPR-Cas1 und somit ebenfalls eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Casposon-Integration ähnlich abläuft wie die Integration neuer *spacer*-Sequenzen in die CRISPR-Arrays [4].

Untersuchungen zur Aktivität der Casposons

Nach diesen Vorhersagen wurde die Funktion der Casposons in mehreren *in vitro*-Studien untersucht, die sich auf einzelne Casposons und ihre Schlüsselenzyme konzentrierten. Ein intensiv untersuchtes Beispiel stammt von *A. boonei* [11]. Das hier identifizierte Cas1-solo-Protein katalysierte eine ortsspezifische Integration von Einzelsträngen (Oligonukleotiden) und synthetischen Mini-Casposons, wenn die native Zielsequenz zur Verfügung stand [12]. Casposons wurden in großen Mengen in Methanoarchaea wie *Methanosarcina*-Arten und -Stämmen gefunden wie z. B. MetMaz1FA1A3-C2 und MetMaz-C1 [4, 8]. Hier zeigte das Cas1-solo (WP_011035139.1) des Casposons MetMaz1FA1A3-C2 ebenfalls, dass sowohl die Casposon-Enden als auch ein breites Spektrum an Substraten, z. B. ssDNA und ssRNA (ss = *single-stranded*, einzelsträngig), aktiv erkannt und ortsspezifisch integriert wurden [9]. Darüber hinaus ergab die Strukturanalyse des Casposase-DNA-Komplexes eine Tetramerbildung sowie einzelne strukturelle Unterschiede zwischen der CRISPR-Cas-Integrase und Cas1-solo [9].

Für den *in vivo*-Aktivitätsnachweis von Casposons wurde das Casposon MetMaz-C1 von *M. mazei* Gö1 mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. So wurde die aktive Translokation mittels *nested*-PCRs (PCR = Polymerasekettenreaktion) und zum anderen mittels eines Mini-Casposons nachgewiesen [13].

Nachweis aktiver Translokation mit *nested*-PCR

Die Aktivität wurde mittels Lokalisierung im Genom durch *nested*-PCR nachgewiesen. *Nested*-PCRs sind PCRs, bei der zwei hintereinander geschaltete PCRs mit demselben Template ablaufen, um eine höhere Produktmenge zu erzeugen. Für den Nachweis der Casposon-Aktivität wurden PCR-Primer abgeleitet, die links und rechts der bekannten Casposon-Position im *M. mazei* Genom binden konn-

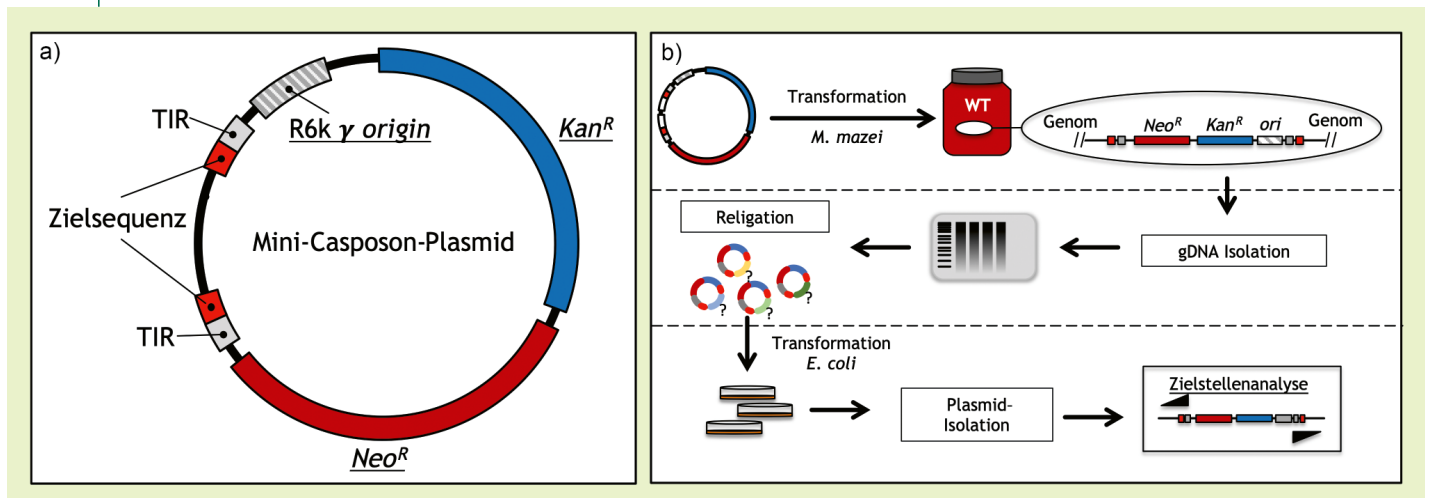
ten [13]. Die Elongationszeit wurde so kurz gewählt, dass nur dann ein PCR-Produkt erzeugt wurde, wenn das Casposon seine ursprüngliche Position durch Transposition verlassen hatte (Exzision). Als PCR-Template wurde genomische DNA von zwei verschiedenen *M. mazei*-Stämmen verwendet [13]. Die *nested*-PCR zeigte, dass in einer normalen *M. mazei*-Population einzelne Zellen Genome mit leeren Zielsequenzen trugen. Dies bedeutete, dass eine geringe basale Casposon-Aktivität vorlag [13]. Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte unerwarteterweise, dass keine Verdoppelung der Zielsequenz vorlag, sobald das Casposon sich aus der bekannten Position ausgeschnitten hatte. Die ursprüngliche Zielsequenz wurde wiederhergestellt, ohne Hinweise auf das vorherige Vorhandensein eines Casposons zurückzulassen (Abbildung 2b; [13]). Dies deutete erstmalig auf einen anderen Mechanismus hin als von Krupovics Team vorhergesagt.

Zusätzlich wurde die potenzielle Casposon-Reintegration in das Wirtsgenom mit weiteren *nested*-PCRs untersucht. Mögliche Zielsequenzen waren bereits durch die bioinformatische Analyse von verschiedenen Casposons in der Literatur beschrieben worden [8]. Hier wurden die Primer so abgeleitet und zusammengestellt, dass die *forward*-Primer *upstream* der potenziellen neuen Zielsequenz binden konnten und die *reverse*-Primer innerhalb der Casposon-Sequenz. Die PCR konnte also nur ein Produkt bilden, wenn das Casposon erfolgreich in die neue Zielsequenz integrierte. Dies konnte in mindestens einem Fall bestätigt werden, in dem das Casposon in das distale Ende eines *tRNA-Leu*-Gens integriert wurde [13]. Ähnliches Verhalten wurde bereits für weitere Transposons gezeigt wie zum Beispiel für das prokaryotische Tn7-Transposon [14]. Die Sequenzierung der hier erzeugten PCR-Produkte deutete eine mögliche Übertragung der ursprünglichen Zielsequenz zur neuen Casposon-Position im Genom an. Auch dies wies auf einen möglicherweise anderen Mechanismus der Translokation hin [13].

Nachweis mittels generiertem Mini-Casposon

Ein weiterer unabhängiger Nachweis der *in vivo*-Casposon-Aktivität wurde mittels eines synthetischen Mini-Casposons erbracht. Hierbei wurde ein Plasmid generiert, auf dem die nativen Zielsequenzen und die TIRs einen *origin of replication* (*ori*) für *E. coli*, eine Kanamycin-Resistenzkassette und eine Neomycin-Resistenzkassette einrahmten (Abbildung 3) [13]. Das Plasmid wurde über eine Liposomen-vermittelte Transformation in *M. mazei* eingebracht und konnte sich hier aufgrund eines fehlenden *M. mazei* *origins* nicht replizieren (*suicide vector*). Nur im Falle einer Casposon-Aktivität konnte das Plasmid-kodierte Mini-Casposon aus dem Plasmid ausgeschnitten und in das *M. mazei*-Chromosom an typischen Integrationsstellen integrieren. In diesem Falle sind die resultierenden Zellen gegen Neomycin resistent und können angereichert und isoliert werden [13]. Die Kanamycin-Resistenz ist für *M. mazei* unbrauchbar, da dieses Antibiotikum – anders als Neomycin – keinen Einfluss auf Archaea hat. Neomycin ist

ABB. 3 | MINI-CASPOSON-ANSATZ



a) Plasmid-Karte des Mini-Casposon-Plasmids. Das Plasmid trägt ein synthetisches Mini-Casposon bestehend aus der Zielsequenzduplikation und den TIRs, die einen R6k γ -origin, eine Kanamycin- und eine Neomycinkassette einschließen. b) Design des Mini-Casposon-Experiments. Das Mini-Casposon-Plasmid wird in *M. mazei* transformiert, so dass das Mini-Casposon von seinem Plasmid in das *M. mazei*-Genom integrieren kann. Das übrige Plasmid geht verloren, da es keinen *M. mazei* origin of replication kodiert (suicide vector). Aus den positiven, gegen Neomycin resistenten Zellen wird genomische DNA (gDNA) isoliert. Diese DNA wird fragmentiert und mit sich selbst religiert, um Plasmid-ähnliche DNA-Fragmente zu erzeugen, die möglicherweise bekannte oder unbekannte Zielsequenzen enthalten. Diese Plasmide werden dann in *E. coli* transformiert. Hier wird dann mit Kanamycin selektiert; Plasmide der Einzelklone werden mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert und analysiert.

eines der wenigen Antibiotika, die das Wachstum von *M. mazei* beeinflussen können. Die genomische DNA der Neomycin-resistenten Kulturen wurde dann für ein *rescue cloning* verwendet, um die potenziellen Integrationsstellen zu identifizieren. Hierbei wurde die genomische DNA mit dem Enzym AccI behandelt und so in über 1000 verschiedene DNA-Fragmente unterschiedlichster Längen zerlegt, welche dann mit sich selbst ligiert und in *E. coli* transformiert wurden. Jene Zellen, die ein so entstandenes zirkuläres DNA-Fragment aufgenommen hatten, konnten nur dann in Anwesenheit des Antibiotikums wachsen, wenn das zirkuläre DNA-Fragment den R6K γ -origin beinhaltet und gleichzeitig die Kanamycin-Resistenzkassette [13], da sich in diesem Fall das DNA-Fragment wie ein Plasmid stabil repliziert und eine Antibiotika-Resistenz vermittelt. Über Selektion auf Kulturmedium mit Kanamycin wurden so positive Einzelklone identifiziert und ihre Plasmide über Sanger-Sequenzierung mit Primern sequenziert, die aus dem Mini-Casposon heraus gerichtet waren. Es zeigte sich, dass das Mini-Casposon die bereits besetzte Zielsequenz des nativen Casposons MetMaz-C1 erneut als Integrationsstelle nutzte und somit eine Tandemstruktur entstand, bei der beide Casposons durch eine gemeinsame Zielsequenz in der Mitte voneinander getrennt waren [13]. Dies wurde durch bioinformatische Analysen bereits vorhergesagt, da in einzelnen untersuchten *M. mazei*-Stämmen ebenfalls Strukturen beschrieben worden sind, in denen mehrere Casposons hintereinanderlagen [8]. Das Mini-Casposon transponierte somit ebenfalls aktiv und zielgerichtet.

Zusätzlich zu dieser Aktivität zeigte das Experiment außerdem, dass andere von *M. mazei* kodierte transponierbare Elemente ebenfalls aktiv waren.

Fazit

Die hier zusammengefassten Daten ermöglichen einen ersten tieferen Einblick in die Aktivität eines Casposons *in vivo*. Die Daten deuten auf eine geringe Casposon-Aktivität in einzelnen Zellen einer *M. mazei*-Population hin. MetMaz-C1 und das verwendete Mini-Casposon zeigten eine starke ortsspezifische Integration, wie bereits für verschiedene Casposons durch Charakterisierung ihrer Schlüsselenzyme *in vitro* vermutet wurde. Dass die ehemalige leere Zielsequenz von MetMaz-C1 nach der Exzision keine bleibende Duplikation aufwies und dass die Sequenzierung von potenziellen neuen Insertionsstellen die ursprüngliche Zielsequenz zeigte, deutete auf einen Mechanismus hin, bei dem die ursprüngliche Zielsequenz übertragen wird (Abbildung 2b, [13]). In Kombination mit einem erwarteten überhängenden Schnitt innerhalb der Zielsequenz deuten unsere Daten auf ein zirkuläres Casposon-Intermediat hin (Abbildung 2b) [4, 13]. Das Mini-Casposon-Experiment belegte, dass die Integration in dieselbe MetMaz-C1-Zielsequenz zu Tandemstrukturen führte, was möglicherweise als weiteres Argument für die evolutionäre Rolle der Casposons innerhalb der Entstehung der CRISPR-Arrays gelten kann. Solche Tandemstrukturen wurden für eine Vielzahl von transponierbaren Elementen und sogar für einige Casposon-Verwandte in verschiedenen *Methanosarcina*-Arten festgestellt (nachzulesen in [8, 15]). Insgesamt lieferte die aktuel-

le Studie nicht nur erste experimentelle Beweise für die *in vivo*-Aktivität von MetMaz-C1, sondern auch Hinweise auf ein neues Casposon-Translokationsmodell [4] und konnte somit die Rolle von Casposons als evolutionäre Ursprünge der CRISPR-Cas-Systeme weiter hervorheben.

Zusammenfassung

Casposons wurden erst kürzlich *in silico* in vielen Archaea entdeckt. Dabei handelt es sich um transponierbare Elemente, die bisher nur in bioinformatischen Analysen und in *in vitro*-Assays mit Schwerpunkt auf der Aktivität ihrer Schlüsselenzyme, der Cas1-solo-Enzyme, untersucht wurden. Aufgrund dieser Enzyme gelten die Casposons als evolutionärer Ursprung der CRISPR-Cas-Systeme. Jüngste Experimente mit Methanosarcina mazei bestätigten ihre *in vivo*-Aktivität – Exzision und Reintegration – mittels nested-PCRs. Die Ergebnisse legen die Existenz eines zirkulären Casposon-Intermediats nahe. Weiterhin wurde die Integration eines synthetischen, Plasmid-kodierten Mini-Casposons – bestehend aus einem R6k γ -origin und zwei Antibiotika-Resistenzkassetten – in das M. mazei-Chromosom festgestellte und näher analysiert. Das Mini-Casposon bildete nach erfolgreicher Integration eine Tandemstruktur mit dem nativen Casposon MetMaz-C1.

Summary

Casposons: The evolutionary root of CRISPR-Cas systems

Only recently, casposons have been discovered *in silico* in many archaea. So far, these transposable elements have only been studied by bioinformatic analyses and *in vitro* assays focusing on the activity of their key enzymes, the Cas1-solo enzymes. Due to these enzymes, casposons are considered to be the evolutionary origin of CRISPR-Cas systems. Recent experiments with Methanosarcina mazei confirmed their *in vivo* activity – excision and reintegration – using nested PCRs. The results suggest the existence of a circular casposon intermediate. Furthermore, the integration of a synthetic, plasmid-encoded mini-casposon – consisting of an R6k γ origin and two antibiotic-resistance cassettes – into the M. mazei chromosome was detected and analyzed in more detail. After successful integration, the mini-casposon was found to form a tandem structure with the native casposon MetMaz-C1.

Schlagworte

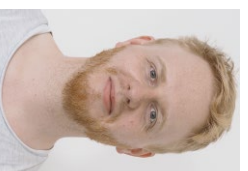
Methanosarcina mazei, CRISPR-Cas, Casposon, Translokation, Transposons, Mini-Casposons, nested-PCR

Literatur

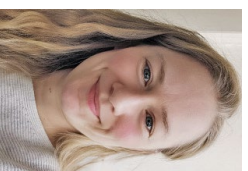
- [1] V. V. Kapitonov et al. (2005). RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol* 3 (6), e181.
- [2] K. S. Makarova et al. (2017). SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell* 168 (1), 328–328, e1.
- [3] K. S. Makarova et al. (2017). SnapShot: class 1 CRISPR-Cas systems. *Cell* 168 (5), 946–946, e1.

- [4] M. Krupovic et al. (2014). Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. *BMC Biology* 12.
- [5] B. McClintock (1984). The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science* 226 (4676), 792–801.
- [6] M. J. Curcio et al. (2003). The cuts and fns of transposition: from mu to kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Bio* 4 (11), 865–877.
- [7] E. J. Pritcham et al. (2007). Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* 390 (1–2), 3–17.
- [8] M. Krupovic et al. (2016). Recent Mobility of Casposons, Self-Synthesizing Transposons at the Origin of the CRISPR-Cas Immunity. *Genome Biol Evol* 8 (2), 375–86.
- [9] A. B. Hickman et al. (2020). Casposase structure and the mechanistic link between DNA transposition and spacer acquisition by CRISPR-Cas. *Elife* 9.
- [10] C. Bath et al. (2006). Hst1 and Hst2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus. *Virology* 350 (1), 228–39.
- [11] A. B. Hickman et al. (2015). The casposon-encoded Cas1 protein from *Acidilobifundum boonei* is a DNA integrase that generates target site duplications. *Nucleic Acids Res* 43 (22), 10576–87.
- [12] P. Beguin et al. (2019). Sequence motifs recognized by the casposon integrase of *Acidilobifundum boonei*. *Nucleic Acids Res* 47 (12), 6386–6395.
- [13] F. O. Gehlert et al. (2023). Active *in vivo* translocation of the *Methanosarcina mazei* Go1 Casposon. *Nucleic Acids Res* 51 (13), 6927–6943.
- [14] J. E. Peters et al. (2001). Trn7: Smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2 (11), 806–814.
- [15] P. Siguier et al. (2015). Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiol Spectr* 3 (2), MDNA3-0030-2014.

Verfasst von:



Finn O. Gehlert, Jahrgang 1992, ist an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel promovierter Mikrobiologe.



Lisa Helwig, Jahrgang 1986, promovierte Mikrobiologin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.



Ruth A. Schmitz, Jahrgang 1965, promoviert an der Philipps-Universität Marburg, habilitiert an der Georg-August-Universität Göttingen, seit 2004 Lehrstuhlinhaberin „Molekulare Mikrobiologie“ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.



Ruth A. Schmitz, Jahrgang 1965, promoviert an der Philipps-Universität Marburg, habilitiert an der Georg-August-Universität Göttingen, seit 2004 Lehrstuhlinhaberin „Molekulare Mikrobiologie“ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Ruth A. Schmitz
Am Botanischen Garten 1–9
24118 Kiel
E-Mail: rschmitz@fam.uni-kiel.de



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

