

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

Typ-IV-A-CRISPR-Interferenz

Schritt für Schritt ohne Schnitt

MERAL KARA | SELINA RUST | LENNART RANDAU

*CRISPR-Cas-Systeme der Klasse 1 sind bei Prokaryoten weit verbreitet und durch Effektor Komplexe gekennzeichnet, die aus mehreren Cas-Protein-Untereinheiten bestehen. Hierbei zeigen Typ-IV-A-CRISPR-Cas-Systeme Interferenz gegen Plasmid-Ziele, ohne diese DNA zu degradieren. Noch viel ungewöhnlicher: Das Typ-IV-A1-System aus *Pseudomonas oleovorans* ist dabei auch gegen das eigene Bakteriengenom gerichtet und reguliert gezielt die Genexpression des Wirts. Der Mechanismus dieses ungewöhnlichen CRISPR-Cas-Systems bietet vielseitige Ansätze für gene silencing.*

Im Jahr 2011 wurde ein CRISPR-Cas-System aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* erstmals als neuartiger CRISPR-Typ (Typ-U) klassifiziert [1]. Es gab keine Kenntnisse über Mechanismen, die Struktur oder eine mögliche Verwendung. Doch welche Merkmale zeichnen diese inzwischen als Typ-IV benannten Systeme aus? Ähnlich wie bei einigen Typ-III-Systemen werden keine Adaptationsproteine wie Cas1 und Cas2 kodiert. Diese Enzyme schneiden DNA-Fragmente fremder DNA und integrieren sie in die CRISPR-Arrays, welche bei Typ-IV-Systemen oftmals nicht direkt neben den *cas*-Genen liegen oder vollständig fehlen. Typ-IV-Systeme sind in der Regel auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden und nicht auf dem Bakterienchromosom kodiert. Sie besitzen keine Endonuklease (wie z. B. Cas3 oder Cas9), die die Ziel-DNA oder -RNA

schneidet, wehren aber fremde DNA durch einen Interferenz-Mechanismus ab. Anders als bei Cas9 besteht der CRISPR-Ribonukleoprotein-Effektor Komplex (crRNP) dabei aus mehreren Proteinen.

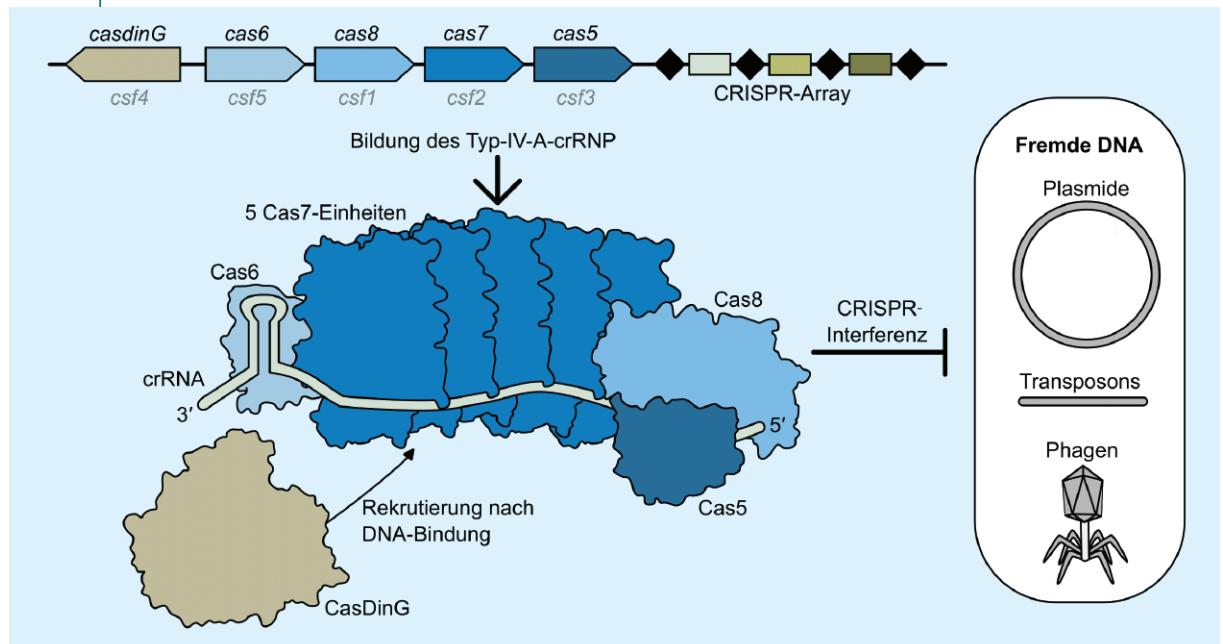
Durch Unterschiede in Sequenz, Struktur und Vorkommen der Effektorproteine konnten innerhalb weniger Jahre mehrere Untergruppen des Typ IV unterschieden werden [2, 3]. Anschließend wurden viele weitere Typ-IV-CRISPR-Cas-Systeme entdeckt, die unterschiedliche genomische Strukturen aufweisen. Daraufhin wurde vorgeschlagen, das Typ-IV-System in fünf Subtypen einzuteilen [4]. Der Fokus dieses Beitrags liegt dabei auf dem verbreiteten Typ-IV-A-CRISPR-Cas-System.

Ein CRISPR-Cas-System, welches (nicht) adaptieren kann

Das gramnegative, aerobe Gamma-Proteobakterium *Pseudomonas oleovorans* kodiert – neben einem Typ-IE- und Typ-IF-System auf dem Wirtsgenom – ein CRISPR-Cas-System des Typ-IV-A1 auf einem Megaplasmid (Abbildung 1). Obwohl den Typ-IV-CRISPR-Cas-Systemen Proteine zur Adaptation fehlen, besitzen die meisten dennoch einen eigenen CRISPR-Array. Dieser deutet darauf hin, dass das System einst in der Lage war oder noch ist, sich an fremde DNA anzupassen. Doch wie ist dies ohne ein Adaptationsmodul möglich? Eine Erklärung zur *spacer*-Akquisition ist die Kommunikation des Typ-IV-Systems mit den anderen CRISPR-Cas-Systemen der Zelle. So sind zum Beispiel Typ-IE-CRISPR-Cas-Systeme bekannt dafür, eine identische PAM-Sequenz wie das Typ-IV-A1-System zu verwenden und werden mit hoher Wahrscheinlichkeit auch zur Adaptation des Typ-IV-A genutzt. Die PAM – ein dem *protospacer* angrenzendes Motiv – ist normalerweise für jeden CRISPR-Cas-Typ spezifisch und umfasst dabei zwei bis fünf Basen. Die Verwendung einer identischen PAM gibt somit Hinweise auf eine Verbindung des Typ-IV-A-Systems zum Typ-IE [5].

***Escherichia coli*-Kolonien zeigen eine räumlich begrenzte *lacZ*-Reportergenaktivität nach DNA-Interferenz durch ein Typ-IV-CRISPR-Cas-System.**

ABB. 1 | AUFBAU DES TYP-IV-A1-CRISPR-CAS-SYSTEMS AUS *P. OLEOVORANS*



Nachdem die *cas*-Gene exprimiert wurden, assoziieren die Proteine mit einer durch Cas6 gereiften CRISPR-RNA (crRNA) zum crRNP-Effektorkomplex. Dieser besitzt fünf Untereinheiten des Cas7-Proteins, welche das Rückgrat des Komplexes bilden und die crRNA halten. Nach Bindung des Komplexes mit komplementärer DNA, neben welcher sich eine PAM-Sequenz befindet, wird CRISPR-Interferenz vermittelt.

Typ-IV-A und Plasmide

Typ-IV-A bildet eine Reihe von Effektorproteinen, darunter Cas8 (Csf1), Cas7 (Csf2), Cas5 (Csf3) und Cas6 (Csf5)¹. Darüber hinaus kodieren Typ-IV-A-Loci für eine assoziierte Helikase der DinG-Familie (Csf4), welche in diesem Zusammenhang auch als CasDinG bezeichnet wird. Gene für Adaptationsproteine fehlen dabei völlig. Erste Einblicke in die Funktionsweise und den Aufbau von Cas6 gab es durch Untersuchungen des Bakteriums *Aromatoleum aromaticum* EbN1 [6]. Dabei ist Cas6 unverzichtbar für die Reifung (Prozessierung) von crRNAs, welche spezifisch in crRNPs (CRISPR ribonucleoprotein) des Typ-IV-A eingebaut werden.

In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Plasmide durch das Typ-IV-A1-System aus *P. aeruginosa* effektiv abgewehrt werden können [7]. Plasmide scheinen bei Typ-IV-Systemen eine große Rolle zu spielen, da insbe-

sondere Typ-IV-A-Systeme auf sehr großen Plasmiden – sogenannten Megaplasmiden (>200 kb) – zu finden sind. Es wird angenommen, dass die Systeme hierbei Plasmide mit Antibiotikaresistenzen stabilisieren, während invasive Plasmide attackiert werden [8].

CRISPR-Interferenz ohne DNA-Degradation?

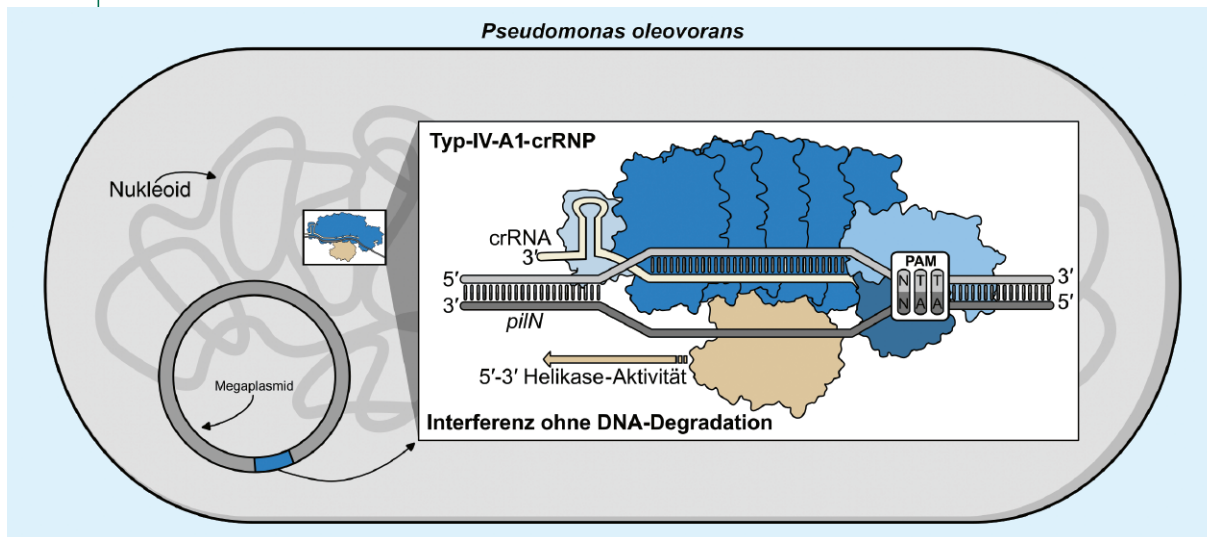
Der CRISPR-Interferenz geht die Prozessierung von prä-crRNAs durch Cas6 voraus. Reife crRNAs, welche sich in ihren *spacer*-Sequenzen unterscheiden, geleiten den crRNP anschließend zur Ziel-DNA, welche sich auf Plasmiden, Transposons oder viralen Genomen findet. Analysiert man die *spacer*-Motive der fremden DNA, findet sich immer ein AAG-Motiv am 5'-Ende des *protospacer*-Abschnitts. Dieses Motiv wurde als PAM-Sequenz identifiziert und wird gebraucht, um die fremde DNA von der DNA des Wirtsorganismus zu unterscheiden. Es wurde nachgewiesen, dass die PAM-Sequenz zwingend erforderlich ist, damit das Typ-IV-A-System Interferenz vermittelt [9].

Diese PAM-abhängige CRISPR-Interferenz konnte durch Experimente mit synthetischen crRNAs, welche auf Plasmide abzielten, im nativen System bestätigt werden. Das Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System aus *P. oleovorans* wurde anschließend in *Escherichia coli* BL21-AI rekonstruiert und rekombinante crRNPs wurden produziert. Den Zellen wurden Plasmide mit einem passenden *protospacer* und unterschiedlichen PAM-Sequenzen zugeführt,

IN KÜRZE

- Typ-IV-CRISPR-Cas-Systeme erkennen meistens Zielsequenzen in Plasmiden und besitzen keine DNA-Schneideaktivität.
- Die Effektor Komplexe dieser Systeme können auch eingesetzt werden, um gezielt die Expression von bakteriellen Wirtsgenen zu unterbinden.
- *Pseudomonas oleovorans* nutzt diese Aktivität, um die Produktion von Typ-IV-Pili zu inhibieren.
- Diese natürliche Zielerkennung von Plasmiden und genomischer DNA zeigt evolutionäre Anpassungen des antiviralen Immunsystems CRISPR-Cas.

¹ Die Bezeichnungen in Klammern geben eine alternative Nomenklatur an.

ABB. 2 | AKTIVITÄT DES TYP-IV-A1-CRISPR-CAS-SYSTEMS AUS *P. OLEOVORANS*


Das Typ-IV-A-CRISPR-Cas-System von *Pseudomonas oleovorans* richtet sich gegen das eigene Genom. Der CRISPR-Locus befindet sich auf einem Megaplasmid, wobei eine der nativen *spacer*-Sequenzen identisch zu einer DNA-Sequenz des Wirtsgens *pilN* ist. Da sich neben dieser Sequenz auch ein passendes PAM-Motiv befindet, wird der *protospacer* vom Typ-IV-A1-crRNP erkannt. Die spezifische Bindung des Effektor-Komplexes führt zu einer CRISPR-Interferenz im eigenen Genom, ohne dass die DNA abgebaut wird.

wobei erkannt wurde, dass das Motiv 5'-AAN-3' (N = jedes beliebige Nukleotid) als geeignete PAM-Sequenz gilt und Plasmide eliminiert werden können.

In weiteren Untersuchungen wurden crRNAs eingesetzt, die das *lacZ*-Gen im *E. coli*-Genom binden können. Bei Aktivität des Typ-IV-A1-Systems sollte damit eine Veränderung der β -Galaktosidase-Expression erkennbar sein. Da das Protein für die Spaltung von X-Gal zuständig ist, kann Blau-Weiß-Screening zur Analyse genutzt werden. Wird die β -Galaktosidase nicht blockiert, entstehen hier blaue Kolonien auf den Agarplatten. Bei einer Inhibierung der β -Galaktosidase entstehen hingegen weiße Kolonien. Bei den Untersuchungen wurde ersichtlich, dass es keine Rolle spielte, ob die crRNA den kodierenden oder nicht-kodierenden DNA-Strang angriff: Bei funktionellen crRNAs waren in allen Fällen weiße Kolonien zu sehen, die durch die Reduzierung der β -Galaktosidase-Aktivität entstanden. Die genomische DNA der weißen Kolonien wurde anschließend untersucht und es war hier kein Abbau der DNA zu sehen [9]. Anders als Systeme mit Cas3 oder Cas9 agiert das Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System somit womöglich durch Blockade der Transkription und nicht durch DNA-Degradation.

Wird die Transkription – beispielsweise durch Proteine, die sich an die DNA anlagern – behindert, kann das Gen nicht oder nicht vollständig abgelesen werden. Das Gen selbst bleibt dabei jedoch intakt. Wird die Transkription unterbunden, findet auch keine Produktion der Proteine (Translation) statt. Durch Inhibition der Transkription kann somit die Bildung von Proteinen beeinflusst werden. Im Falle vom Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System wird CasDinG dabei eine bedeutende Rolle zugeschrieben.

CasDinG – Ein wichtiger Faktor

CasDinG ist ein Signaturprotein des Typs IV-A und maßgeblich daran beteiligt, die Aufnahme von Plasmiden zu verhindern [5, 9, 10]. Diese ATP-abhängige 5'-3'-DNA-Helikase entwindet *in vitro* sowohl dsDNA (doppelsträngige DNA) mit einem 5'-Überhang als auch DNA-RNA-Hybride. CasDinG wird – wie Cas3 in Typ-I-Systemen – nach Zielerkennung durch den Typ-IV-A-Komplex rekrutiert (Abbildung 2) und ermöglicht eine gezielte Entwindung der Regionen um die Ziel-DNA [11, 12]. Erst kürzlich wurde bekannt, dass CasDinG nicht immer für eine erfolgreiche CRISPR-Interferenz benötigt wird [5]. Befindet sich die Zielsequenz der crRNA in einer Promoterregion, kann ein Typ-IV-A-crRNP die Transkriptionsinitiation auch in Abwesenheit von CasDinG unterbinden. Dabei wird vermutet, dass der crRNP-Komplex den Zugang des Promoters für die RNA-Polymerase blockiert. CasDinG wird jedoch zwingend benötigt, wenn eine crRNA eine Zielsequenz innerhalb eines Gens angreift. Der genaue Mechanismus ist hierbei noch nicht ganz verstanden, aber es scheint plausibel, dass die Helikase-Aktivität von CasDinG benötigt wird, um das Signal der erfolgten Zielerkennung über eine größere Distanz zu verbreiten. In zukünftigen Arbeiten soll hierbei die Interaktion der Helikase mit transkribierenden RNA-Polymerasen genauer untersucht werden.

Interferenz im eigenen Genom

Eine Besonderheit des nativen Typ-IV-A1-CRISPR-Arrays in *P. oleovorans* ist die Übereinstimmung des ersten *spacer* zu einem *protospacer* im Wirtsgen *pilN*, welches für ein Protein des Typ-IV-Pilus kodiert. Die Existenz einer 5'-AAG-3'-PAM-Sequenz neben dem *pilN*-*protospacer* deu-

tet darauf hin, dass das Typ-IV-A1-System in *P. oleovorans* sich selbst angreifen kann. In einem Stamm mit einer CRISPR-Array-Deletion (Δ CRISPR) wurde eine signifikant erhöhte Transkriptmenge von *pilN* festgestellt, die das sogenannte *self-targeting* bestätigte [8]. Die Regulierung der Genexpression ist hierbei nur möglich, weil das Typ-IV-A1-System nicht in der Lage ist, DNA zu schneiden (Abbildung 2). Typ-IV-Pili sind in den Prozess der Aufnahme von Nucleinsäuren involviert. Die Reduktion der Expression von Piluskomponenten kann damit die Aufnahme fremder DNA verringern und den Abwehrmechanismus des CRISPR-Cas-Systems verstärken [10, 13].

Zusammenfassung

Das Typ-IV-A-CRISPR-Cas-System aus *P. oleovorans* vermittelt PAM-abhängige DNA-Erkennung und kann zur Inhibition der Genexpression in Abwesenheit von DNA-Nuklease-Aktivität verwendet werden. Dieser Mechanismus ähnelt der CRISPRi-Methode, bei der CRISPR-Cas-Proteine mit inaktivierten katalytischen Zentren oder fehlenden Nucleasen verwendet werden, um Ziele stabil zu binden und die Transkriptionsmaschinerie zu blockieren. Synthetische crRNAs wurden verwendet, um CRISPR-Interferenz durch das native *P. oleovorans* Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System zu induzieren. Diese speziellen CRISPR-Cas-Systeme können damit zur Regulierung der Expression von Wirtsgenen genutzt werden und bieten neue Möglichkeiten, gegen pathogene Organismen vorzugehen.

Summary

Type-IV-A CRISPR interference

P. oleovorans type IV-A CRISPR-Cas system targets DNA in a PAM-dependent manner and can be applied to inhibit gene expression in the absence of DNA nuclease activity. This mechanism resembles the CRISPRi method that utilizes CRISPR-Cas proteins with inactivated catalytic sites or missing nucleases to stably bind targets and block the transcription machinery. Synthetic crRNAs were used to induce CRISPR interference of the native *P. oleovorans* Type IV-A1 CRISPR-Cas system. Thus, these special CRISPR-Cas systems can be applied to regulate the expression of host genes and they offer possibilities to take action against pathogenic organisms.

Schlagworte

CRISPR-Cas, *Pseudomonas*, *self-targeting*, Typ-IV-A

Danksagung

Wir danken dem CRISPR-Team unserer Arbeitsgruppe (Nathalie Klein, Steffi Nguyen, Lisa Pavel, Mariana Sanchez-Londono, Hannah Wege) und Kooperationspartnern. Die CRISPR-Forschung unserer Arbeitsgruppe wurde durch die DFG (SPP 2141 und Heisenberg-Programm) finanziert.

Literatur

- [1] K. S. Makarova et al. (2011). *Nat Rev Microbiol* 6, 467–477, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- [2] K. S. Makarova et al. (2015). *Nat Rev Microbiol* 13, 722–736, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- [3] K. S. Makarova et al. (2020). *Nat Rev Microbiol* 2020, 18, 67–83, <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.
- [4] R. Pinilla-Redondo et al. (2020). *Nucl Acids Res* 48, 2000–2012, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1197>.
- [5] F. Benz et al. (2023). *bioRxiv* 2023, 2023.06.23.546257, <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546257>.
- [6] A. Özcan et al. (2019). *Nat Microbiol* 4, 89–96, <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0274-8>.
- [7] V. M. Crowley et al. (2019). *CRISPR J* 2, 434–440, <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0048>.
- [8] W. M. Li et al. (2010). *FEBS J* 2010, 277, 627–641, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07488.x>.
- [9] X. Guo et al. (2022). *Nat Microbiol* 2022, 7, 1870–1878, <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01229-2>.
- [10] H. Harvey et al. (2018). *Nat Microbiol* 3, 47–52, <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0061-y>.
- [11] N. Cui et al. (2023). *Mol Cell* 83, 2493–2508.e5, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.05.036>.
- [12] H. Domgaard et al. (2023). *Nucl Acids Res* 2023, 51, 8115–8132, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad546>.
- [13] E. J. van Schaik et al. (2005). *J Bacteriol*, 187, 1455–1464, <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005>.

Verfasst von:



Meral Magdalena Kara, Jahrgang 2000, studiert im Master Molekularbiologie an der Philipps-Universität Marburg und fertigt eine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lennart Randau an. Fokus der Arbeit ist die CRISPR-Cas-Aktivität der Klasse I, insbesondere des Typs I-Fv und des Typs IV-A1.



Selina Rust, Jahrgang 1997, studierte Molekularbiologie an der Philipps-Universität Marburg und promovierte im Fachbereich der Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lennart Randau. Der Forschungsschwerpunkt liegt hier auf dem Typ-IV-A1-CRISPR-Cas-System in *P. oleovorans*.



Lennart Randau, Jahrgang 1978, studierte Biologie und promovierte 2006 am Institut für Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig. Nach einer Postdoc-Zeit an der Yale Universität war er ab 2010 Leiter einer Forschungsgruppe am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg. Seit 2019 ist er Heisenberg-Professor für Genetik an der Philipps-Universität Marburg.

Korrespondenz

Prof. Dr. Lennart Randau
Hans-Meerwein-Straße 6
35032 Marburg
Email: lennart.randau@staff.uni-marburg.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!

