

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

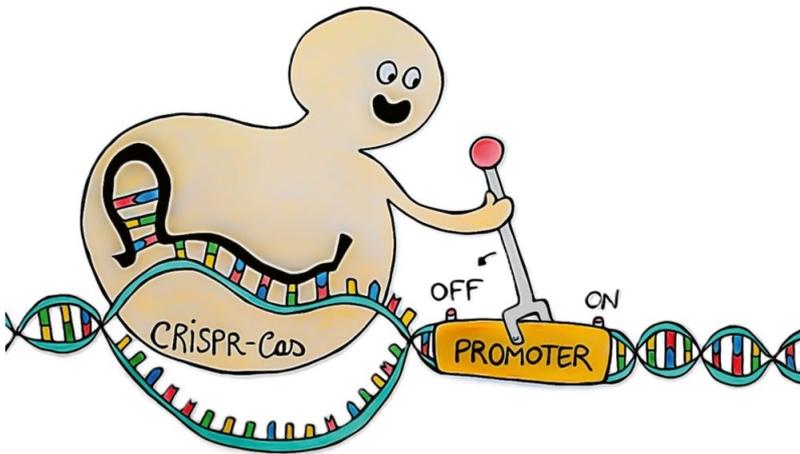
CRISPR-Cas

... mehr als nur
Verteidigung

CRISPR-Cas-Werkzeuge für Haloarchaea

CRISPRi mit einer Prise Salz

LISA-KATHARINA MAIER | NADIA DI CIANNI | ANITA MARCHFELDER



CRISPRi erlaubt es, den Cascade-Komplex als „Schalter“ zur Regulation der Genexpression einzusetzen.

Alle Abbildungen erstellt mit Bio-Render.com.

Auch extremophile Archaea können sich im Werkzeugkasten der CRISPR-Cas-Systeme bedienen, denn gene silencing geht auch mit Multiproteinkomplexen. Cas-Proteine der endogenen CRISPR-Cas-Systeme sorgen für starke Bindung und CRISPR-RNAs (crRNAs) für die Sequenzspezifität, um mit dem Multiproteinkomplex Cascade die RNA-Polymerase und damit die Transkription zu blockieren.

CRISPR-Cas-Systeme und von ihnen abgeleitete molekularbiologische Werkzeuge sind in aller Munde und mittlerweile in nahezu jedem Forschungslabor zu finden. Die im Jahr 2020 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnete Technologie revolutioniert die moderne biologische und medizinische Forschung. Das vererbte Immunsystem der Archaeen und Bakterien dient in seiner natürlichen Form der Abwehr von Fremdnukleinsäuren – seien es Viren oder Plasmide. Obwohl der Großteil aller Prokaryoten ein solches System besitzt, ist ihre Funktion erst 2007 beschrieben worden. Da immer wieder neue Varianten der CRISPR-Cas-Systeme entdeckt werden, ist noch nicht abschließend klar, wie groß die CRISPR-Cas-Familie ist, was zu einer kontinuierlichen Erweiterung und Verfeinerung der Klassifikation führt [1].

Alle CRISPR-Cas-Systeme – egal wie verschieden sie voneinander sind – funktionieren nach demselben Grundprinzip: Eine eingedrungene, fremde Nukleinsäure (z. B.

ein Phage oder Plasmid) wird durch eine kurze RNA (crRNA), die an einen Komplex aus Cas-Protein(en) gebunden ist, sequenzspezifisch erkannt (Abbildung 1a). Anschließend wird der Angreifer durch eine Endonuklease abgebaut (Abbildung 1b). Derzeit werden zwei Hauptklassen, sechs Typen und über 30 Subtypen unterschieden, die sich in Art, Anzahl und Zusammensetzung der Cas-Proteine unterscheiden [1]. In Klasse-1-Systemen wird die crRNA von einem Multiproteinkomplex gebunden (wie Cascade bei Typ-I-Systemen), wohingegen in Klasse-2-Systemen ein einziges Cas-Protein die crRNA bindet (wie Cas9 bei Typ-II-Systemen).

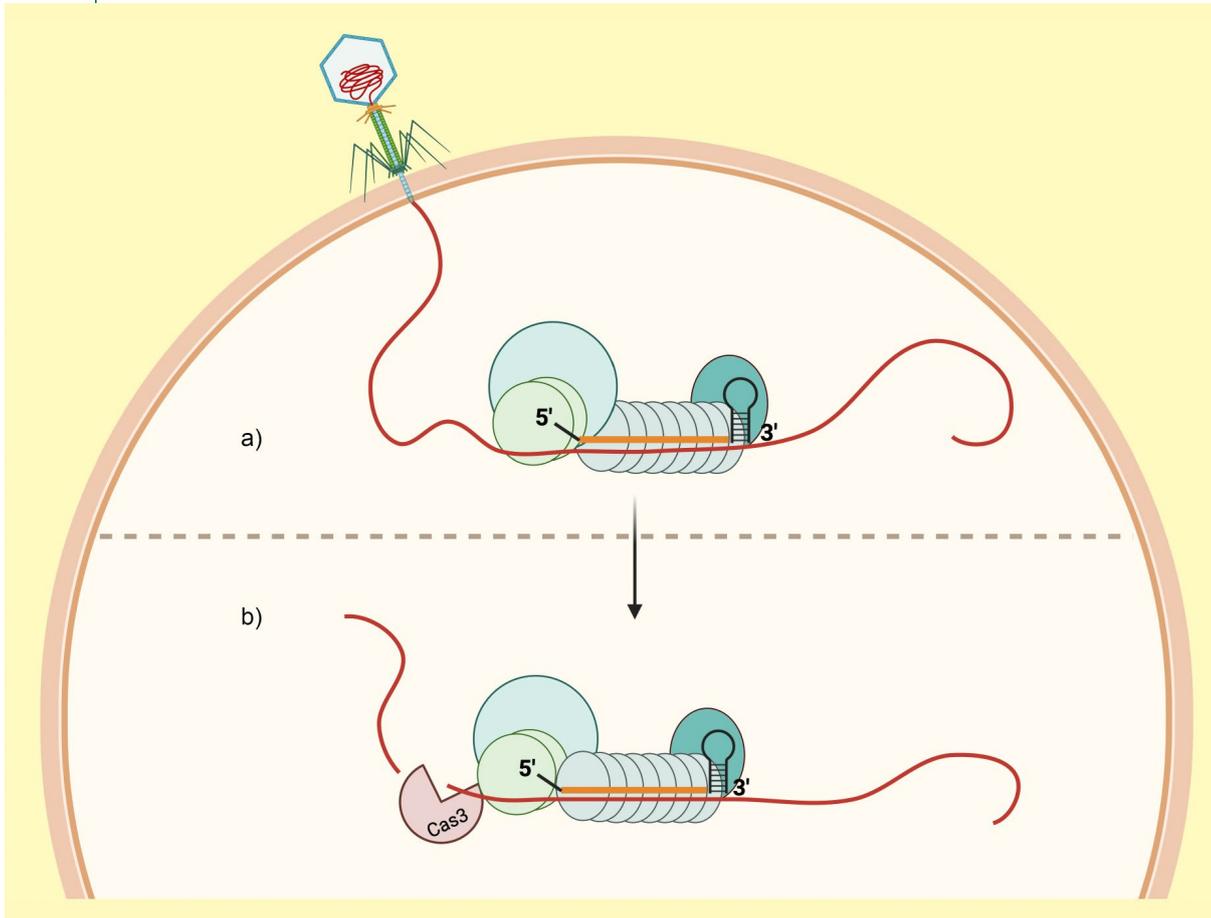
Der CRISPR-Lokus kodiert die crRNA, die die Fremdnukleinsäure als Ziel erkennt. Das System kann sich gegen neue Angreifer immunisieren, indem kleine Stücke der Fremdnukleinsäuren in die CRISPR-Loci integriert werden. Der Effektor-Komplex kann also immer wieder neu programmiert werden, um andere Sequenzen zu erkennen und abzubauen. Die Analogie dieses Prinzips zum RNA-Interferenz-Mechanismus der Eukaryoten (RNAi) hat früh die Entwicklung von CRISPR-Cas-basierten *gene silencing*-Techniken befeuert, die folglich CRISPRi (CRISPR-Interferenz) genannt wurden [2–3].

Allerdings wurden zunächst nur die wesentlich weniger komplexen Klasse-2-Systeme mit nur einem Effektorprotein als Werkzeug eingesetzt. Das Typ-II-Signaturprotein Cas9 kann für CRISPRi genutzt werden, indem es durch Mutation inaktiviert wird (das inaktivierte Cas9 wird dCas9 genannt), um so den Abbau der Fremd-DNA zu verhindern [3]. dCas9 (d = dead) kann in eukaryotischen, aber auch bakteriellen Systemen leicht zur Expression gebracht und als Schalter zur Regulation der Genexpression in vielen medizinisch, industriell oder wissenschaftlich interessanten Spezies eingesetzt werden.

Problematisch wird die Expression von dCas9-Varianten und anderen Klasse-2-Effektoren in der Domäne der Archaea [4]. Bisher sind nur in Metagenomsequenzen unkultivierbarer Nanoarchaeota Typ-II-Systeme gefunden worden, deren Cas9 homolog ist, die aber nicht ohne weiteres heterolog genutzt werden konnten [4]. Für die Geneditierung von Archaea müssten also bakterielle Systeme verwendet werden. Allerdings sind aber viele Archaea und insbesondere archaale Modellorganismen Extremophile, in denen mesophile bakterielle Proteine nicht aktiv sind.

Somit können in extremophilen Archaea herkömmliche Ansätze zur Genommanipulation und enzymatische Techniken und Werkzeuge, die für mesophile Bakterien

ABB. 1 | NATÜRLICHE FUNKTION DES CRISPR-CAS-SYSTEMS



a) Fremd-DNA wird durch die crRNA-Komponente des Cascade-Multiproteinkomplexes sequenzspezifisch erkannt.
b) Anschließend wird die Endonuklease Cas3 rekrutiert und die Fremd-DNA abgebaut.

entwickelt wurden, nicht benutzt werden. Nur in mesophilen Archaeen wie *Methanosarcina acetivorans* gelang bisher die heterologe Anwendung eines Cas9-Systems [4]. Für andere Archaea wie *Haloferax volcanii*, das an hohe Salzkonzentrationen angepasst ist, oder dem hyperthermophilen *Sulfolobus solfataricus* müssen alternative CRISPR-Cas-Werkzeuge entwickelt werden [5–7]. Zumeist wird dann ein bereits in dem Organismus vorhandenes CRISPR-Cas-System so verändert, dass es eine neue Funktion als Werkzeug ausüben kann.

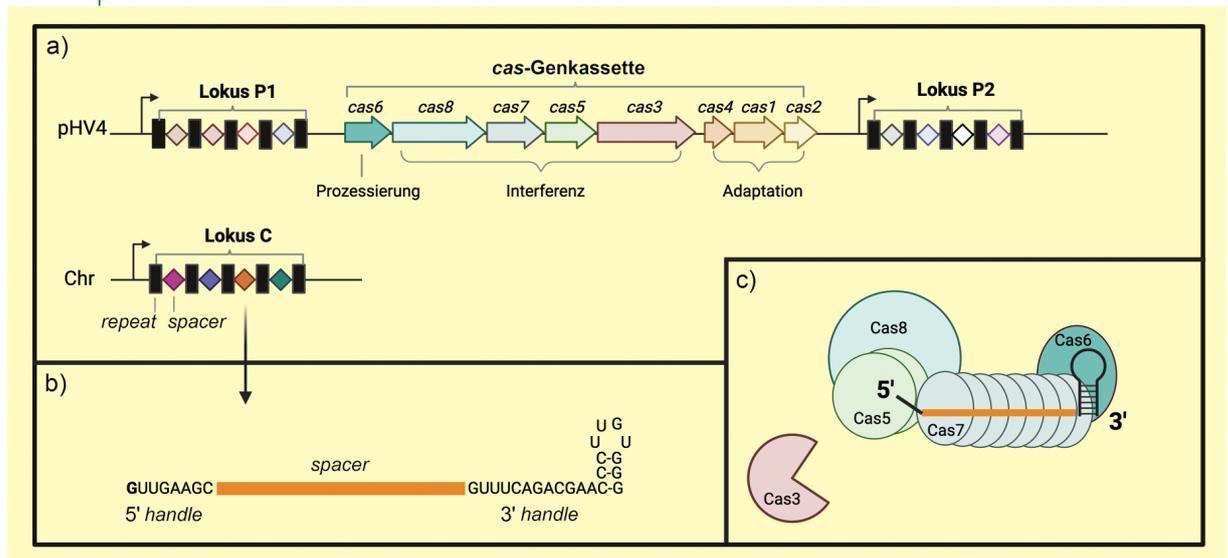
Das Prinzip, den Interferenzschritt nach der Bindung des Effektors an die Ziel-DNA einzufrieren, lässt sich bei Multiproteinsystemen der Klasse 1 noch einfacher realisieren, da die Effektor-nuklease ein eigenständiges Protein ist, wie das Beispiel des Typ-IE-Systems bei *Escherichia coli* zeigt [2, 8]. Die Entwicklung von CRISPRi-Werkzeugen in Archaea erweitert die Forschungsmöglichkeiten immens, da es oft die einzige Möglichkeit zur schnellen und gezielten Regulation der Genexpression ist. Die Umwidmung eines endogenen CRISPR-Cas-Systems vom Abwehrsystem (durch Zerschneiden der DNA) zum CRISPRi-Genregulationswerkzeug wurde von unserem Labor

erstmals für ein Archaeon – das Haloarchaeon *H. volcanii* – etabliert und bereits in ähnlicher Weise für andere Typ-I-Systeme in Archaeen übernommen [7–9].

IN KÜRZE

- Ein flexibler Genexpressionsschalter für Archaea: Auch endogene CRISPR-Cas-Systeme können so umgestaltet werden, dass sie sich als **Werkzeug zur Genrepression** eignen.
- Voraussetzung für CRISPRi-Anwendungen ist die **Deletion der Endonuklease (Cas3)**. Dadurch bindet der Cascade-Komplex zwar an die Ziel-DNA, ihr Abbau bleibt aber aus.
- Die Technik CRISPRi beruht darauf, eine künstliche crRNA einzubringen, die gegen die Promotorregion des Zielgens gerichtet ist. Cascade bindet dann dort und blockiert den Zugang für die DNA-Polymerase – **die Transkription unterbleibt**.
- CRISPRi ist **effizient und flexibel**, da nur die künstliche crRNA ausgetauscht werden muss.
- CRISPRi im Haloarchaeon *Haloferax volcanii* kann die Transkription auf nur 1,1 Prozent reduzieren und **Gene im Hauptchromosom, aber auch auf Plasmiden oder in Operons** ansteuern.
- Repression statt Deletion erlaubt es Forschenden, auch **essenzielle Gene zu studieren**, die nicht aus dem Genom entfernt werden können.

ABB. 2 | DAS TYP-I-B-CRISPR-CAS-SYSTEM VON *H. VOLCANII*



a) Die Komponenten des CRISPR-Cas-Systems werden im Genom in den CRISPR-Loci und der cas-Genkassette kodiert. *H. volcanii* besitzt drei CRISPR-Loci: Einer liegt auf dem Hauptchromosom (Chr) und zwei flankieren die cas-Genkassette auf dem Minichromosom pHV4. In einem Locus wechseln sich die repeat-Einheiten gleicher Sequenz mit spezifischen Abschnitten (spacer) ab. Im Adaptationsschritt passt sich das System einem neuen Angreifer an, indem ein Abschnitt der Fremd-DNA als neuer spacer in den Locus integriert wird. Da es sich um ein Typ-I-B-System handelt, kodiert die cas-Genkassette für acht Cas-Proteine; diese stellen die Proteinaktivität für die einzelnen Phasen der Immunantwort zur Verfügung (Adaptation-Prozessierung-Interferenz). Die CRISPR-Loci werden ausgehend von einem Promotor (Pfeil) als Ganzes transkribiert. Diese prä-crRNA wird dann durch Cas6 in der repeat-Sequenz geschnitten, um die reifen crRNAs freizusetzen. b) Die reife crRNA besteht aus dem spacer, der die Sequenzinformation der zuvor integrierten Fremd-DNA trägt, und den Resten der repeat-Sequenzen, die ihn als 5' und 3' handle flankieren. c) Die crRNA wird dann in den Multiproteinkomplex Cascade integriert, der aus den Cas-Proteinen (grün) des Interferenzmoduls aufgebaut ist. Wird die zum spacer der crRNA komplementäre Fremd-DNA erkannt, so wird Cas3 (rot) rekrutiert und damit der Abbau der Fremd-DNA eingeleitet.

Cascade: Vom DNA-Abbau- zum DNA-Binde-Komplex

Die endogene Immunantwort im Modellarchaeon *H. volcanii* wird von einem Typ-I-B-System vermittelt (zusammengefasst in [10]). Dieses umfasst neben drei CRISPR-Loci eine cas-Genkassette, die für die acht Cas-Proteine Cas1-8b kodiert (Abbildung 2). Die Reifung der von den CRISPR-Loci transkribierten prä-crRNAs erfolgt durch Cas6-vermittelte Prozessierung der repeat-Abschnitte, und die reifen crRNAs werden dann in einen Cascade genannten Multiproteinkomplex aus den Proteinen Cas5, 6, 7 und 8b integriert. Dieser Komplex erkennt und bindet Fremd-DNA spezifisch und rekrutiert dann die Effektor nuklease Cas3, die den Abbau einleitet, wobei Cascade wieder freigesetzt wird (Abbildungen 1 und 2).

In den Multiprotein-Effektor-Systemen Typ I und III kann die DNA prozessierende Aktivität entweder durch Inaktivieren des cas3-Gens oder durch Deletion des Gens entfernt werden [2-8]. Der in einer $\Delta cas3$ -Mutante verbliebene Cascade-Komplex kann also weiterhin die Ziel-DNA erkennen und binden; der Abbau erfolgt allerdings nicht, da keine Cas3-Endonuklease rekrutiert werden kann. Damit stellt der Cascade-Komplex ein an den Matrizenstrang gebundenes Hindernis dar, das diesen DNA-

Abschnitt blockiert. Wird nun Cascade an der besonders zentralen Stelle der Transkriptionsinitiation platziert, so versperrt er der RNA-Polymerase und den Transkriptionsfaktoren den Zugang zum Promotor (Abbildung 3).

Programmieren von Cascade: So einfach lässt sich die Zielsequenz ändern

Die Bindung des Cascade-Komplexes wird durch die im Cascade gebundene crRNA gesteuert. Eine reife crRNA des *Haloferax*-Typ-I-B-Systems umfasst immer eine 5' und 3' handle-Sequenz, die bei allen crRNAs eines CRISPR-Lokus gleich ist und die spacer-Sequenz umschließt [11] (Abbildung 2b). Die handle-Sequenzen stammen aus der Prozessierung der repeat-Einheiten durch das Cas6-Protein und flankieren den individuellen spacer-Abschnitt, dessen Sequenz invers komplementär zur Zielsequenz der angegriffenen DNA ist (Abbildung 4). Wenn der enzymatisch inaktive Cascade-Komplex des CRISPRi-Stammes gegen eine Wunschsequenz gerichtet werden soll, so muss eine crRNA mit entsprechendem spacer in den Stamm eingebracht werden. Dazu wird ein Plasmid mit einer Kassetten zur Expression einer künstlichen crRNA benutzt, das - wie unten beschrieben - eine Reifung der crRNA unabhängig von der Cas6-Endonuklease erlaubt [7] (Abbil-

dung 5). Es wird ein *Haloferax*-Stamm ohne *cas6*-Gen benutzt, denn es hat sich gezeigt: Steht die „neue“ crRNA in Konkurrenz zu endogenen crRNAs, die von den CRISPR-Loci des Systems kodiert werden und ebenfalls an den Cascade-Komplex binden können (etwa bei *H. volcanii* 51), dann kann experimentell keine signifikante Reduktion des Expressionslevels eines Reportergens erreicht werden [7]. Es muss also sichergestellt sein, dass die Wunsch-crRNA nicht nur eine von vielen ist und dass sich möglichst viele – für eine ideale Repression alle – Cascade-Komplexe gegen das Zielgen richten. Dieses System wird bei uns im Labor standardmäßig erfolgreich benutzt und soll hier näher beschrieben werden.

crRNA-Reifung mit tRNA prozessierenden Enzymen

In diesem CRISPRi-System verbleiben die endogenen CRISPR-Loci unverändert im Genom, aber das *cas6*-Gen wird deletiert. Dies hebt die natürliche Reifung der

Vorläufer-crRNAs aus, und es werden keine zelleigenen crRNAs mehr gebildet [7]. Jeder verfügbare Cascade-Komplex kann so die mit dem Plasmid eingebrachte Wunsch-crRNA aufnehmen – es gibt keine Konkurrenz mehr und alle endogenen CRISPR-Immunreaktionen sind ausgeschaltet. Die künstliche crRNA muss nun aber auf anderem Wege bereitgestellt werden.

Die Reifung der crRNA muss präzise erfolgen, da insbesondere die 5' *handle*-Sequenz essentiell für das Funktionieren der crRNA ist [13]. Hierzu enthält die CRISPRi-Kassette sogenannte t-Elemente (Abbildung 5). Diese Sequenzabschnitte falten sich nach der Transkription zu tRNA-ähnlichen Strukturen, die die Erkennungsstelle für die endogenen Enzyme der tRNA-Reifungsmaschinerie nachahmen (Abbildung 6). Das 5'-Ende der crRNA wird durch die tRNase Z, die stromabwärts des ersten t-Elements schneidet, erzeugt, und das 3'-Ende der crRNA entsteht durch die Aktivität der RNase P, die das zweite t-Element am 5'-Ende prozessiert (Abbildung 6) [13]. Die

ABB. 3 | PRINZIP VON CRISPR-INTERFERENZ

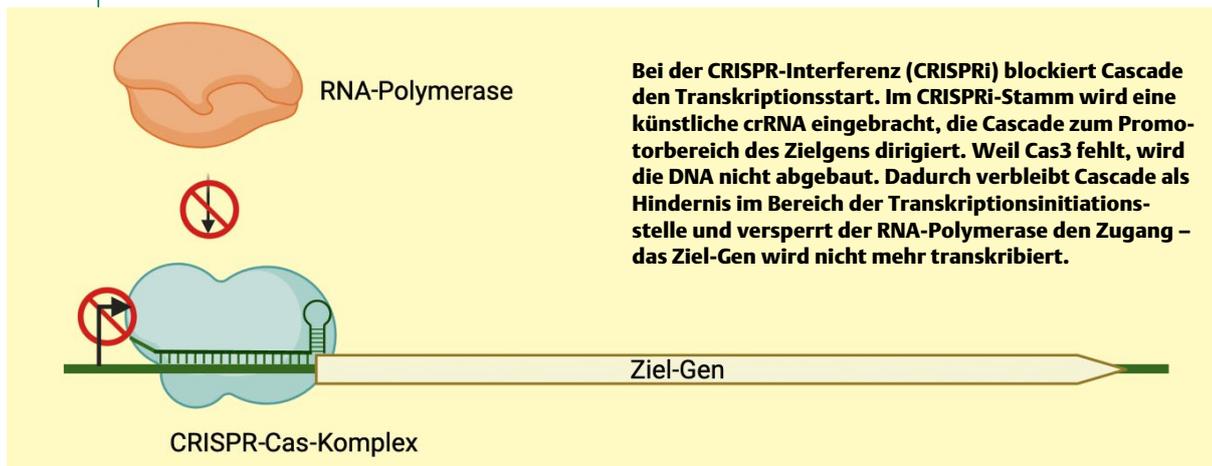
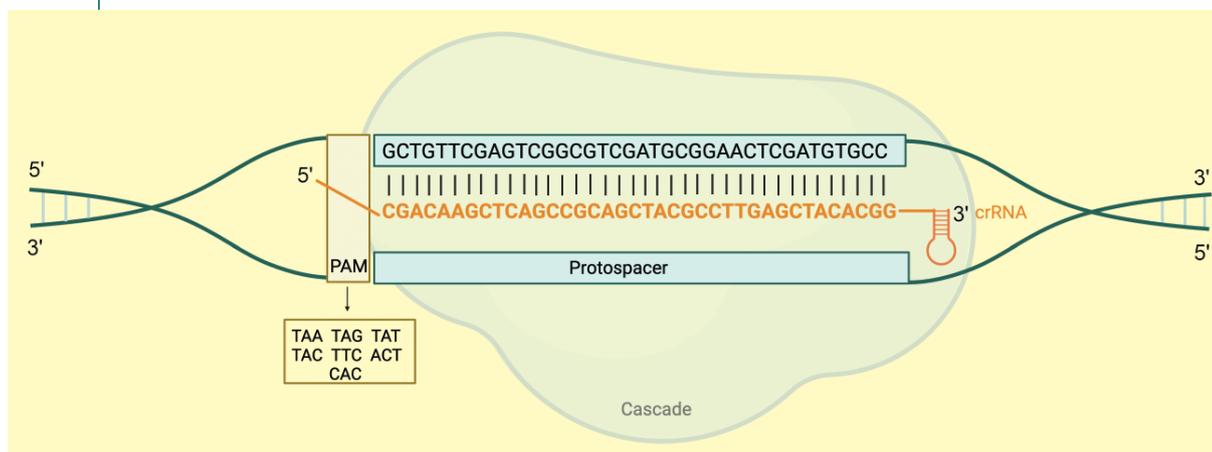


ABB. 4 | BINDUNG DER ZIEL-DNA DURCH DEN CASCADE-KOMPLEX

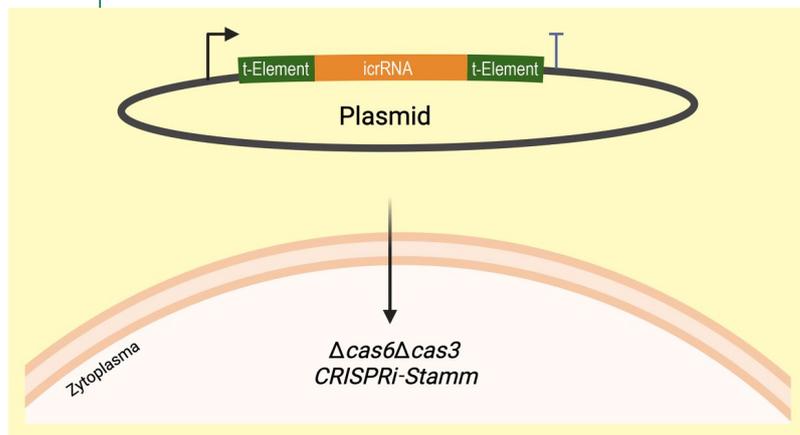


Die im Cascade gebundene crRNA (orange) sorgt mit dem spacer für die sequenzspezifische Erkennung der Ziel-DNA (grün). Der zum spacer invers komplementäre Abschnitt der DNA heißt protospacer. Er liegt auf dem nicht gebundenen Strang und muss neben einem PAM liegen. *H. volcanii* besitzt sieben PAMs.

Reifung der crRNA ist also ein Nebenprodukt der natürlichen Aktivität des tRNA-Metabolismus von *H. volcanii*. Die so erzeugte crRNA kann dann in den Cascade von

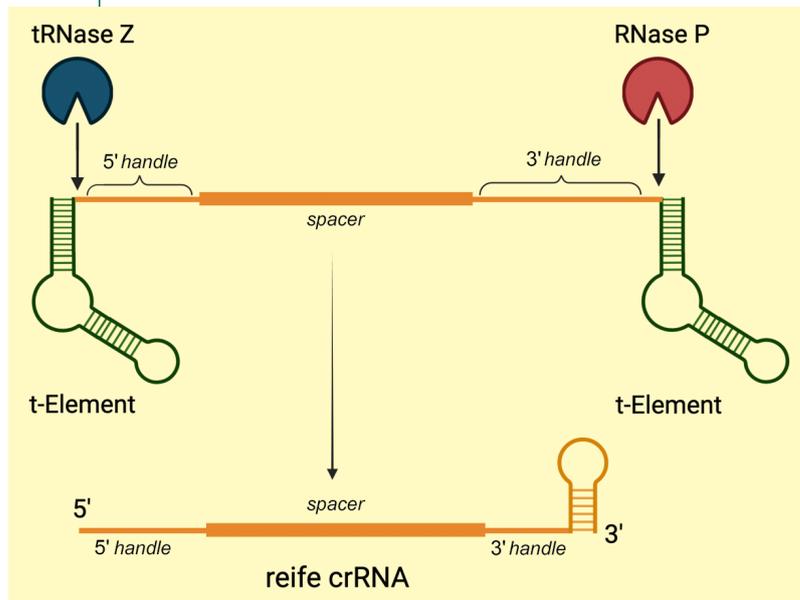
H. volcanii aufgenommen werden und eine Immunreaktion des Systems auslösen, die nicht von der endogenen zu unterscheiden ist [13].

ABB. 5 | DAS CRISPRi-PLASMID



Das Gen für die Wunsch-crRNA wird mittels eines Plasmids in den CRISPRi-Stamm ($\Delta cas3\Delta cas6$) eingebracht. Die Kasette zur Expression der crRNA setzt sich zusammen aus einem synthetischen, konstitutiv aktiven Promotor (Pfeil) gefolgt von einem t-Element (grün), der kodierenden Sequenz der crRNA bestehend aus 5' handle – spacer – 3' handle (orange), einem weiteren t-Element und einem Terminator (blau). Die spacer-Sequenz dieser Kasette kann leicht durch eine neue Sequenz ausgetauscht werden, was eine schnelle und effiziente Klonierung eines neuen CRISPRi-Konstruktes erlaubt.

ABB. 6 | REIFUNG DER crRNA



Die crRNA wird durch die tRNA-Prozessierungsenzyme gereift. Die crRNA wird als längerer Vorläufer ausgehend von einem konstitutiven Promotor transkribiert. Alle Elemente einer reifen crRNA (5' handle, spacer, 3' handle, orange) sind in der Vorläufer-RNA stromauf und -abwärts von t-Elementen (grün) flankiert. Diese t-Elemente falten sich in eine 3D-Struktur, die von den Enzymen der tRNA-Reifungsmaschinerie für eine tRNA gehalten wird. Dementsprechend wird das 3'-Ende der t-Elemente von der tRNase Z und das 5'-Ende der t-Elemente von der RNase P prozessiert. Durch das „Abschneiden“ der t-Elemente werden die Enden der crRNA freigesetzt.

Wie wähle ich die Zielregion für CRISPRi aus?

Die vom CRISPR-Cas-System erkannte Region der Ziel-DNA wird *protospacer* genannt; sie wird von einem *protospacer adjacent motif* (PAM) flankiert (Abbildung 4). Für das Typ-I-B-System von *H. volcanii* wurden sieben verschiedene solcher Motive beschrieben (zusammengefasst in [10]). Eines von ihnen muss stromaufwärts des *protospacer*-Abschnitts liegen und bei Erkennung der Zielsequenz von Cascade identifiziert werden, um sie als *bonafide*-Ziel auszuweisen. Als Wunsch-*protospacer* kommen also nur Sequenzen in Frage, die stromabwärts von einer der sieben PAM-Sequenzen liegen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass CRISPRi in *H. volcanii* relevante Effekte zeigt, wenn die Zielsequenz im Bereich der Transkriptionsstartstelle liegt (-70 → +20) [14]. Die besten Ergebnisse wurden mit crRNAs erzielt, deren *spacer* im Promotorbereich binden [14]. Dies führt zur Annahme, dass der Cascade-Komplex in *Haloflex* den Elongationsprozess nur unzureichend aufhalten kann [12], wohl aber die Initiation durch die RNA-Polymerase. Die Erfahrung mit den bisher in unserem Labor durchgeführten CRISPRi-Experimenten zeigt weiter, dass der Matrizenstrang als Ziel zu bevorzugen ist [14]. Ist also ein zu reprimierendes Gen ausgewählt, so müssen:

- (1) der Transkriptionsstart identifiziert werden,
- (2) PAMs in diesem Bereich auf dem kodierenden Strang ausgewählt und
- (3) 36 Nukleotide stromabwärts als potenzielle *spacer*-Sequenz aufgenommen werden.

Experimentelle Erfahrung des Marchfelder-Labors zeigt, dass es in der Regel ausreicht, drei so konzipierte crRNAs zu testen, um eine signifikante Reduktion des Transkriptlevels des Wunschlokus zu erzielen.

Anwendungsbeispiele aus dem Labor

Nach Klonierung der Wunsch-*spacer*-Einheit in die CRISPRi-Kasette wird das Expressionsplasmid mittels Transformation in den CRISPRi-Stamm ($\Delta cas3\Delta cas6$) eingebracht. Anschließend können die erhaltenen Zellen analysiert werden. Mittels einer *Northern-Blot*-Analyse oder mit RT-qPCR (Reverse Transkriptase-quantitative Polymerasekettenreaktion) kann das Transkriptlevel des Zielgens direkt überprüft und quantifiziert werden (Abbildung 7). Ist das mRNA-Level reduziert, so kann dann mit der Charakterisierung bzw. Untersuchung der CRISPRi-Mutante fortgefahren werden. Eine detaillierte Methodenbeschreibung ist zusammengefasst in [14]. Auf diese Weise konnte die Plasmid-basierte Expression des für die β -Galaktosidase kodierenden Reportergens *bgaHa* um 47 Prozent reduziert werden [7]. Liegt das Zielgen im Genom von *H. volcanii*, so ergibt sich in der Regel eine noch stärkere Reduktion der mRNA-Menge.

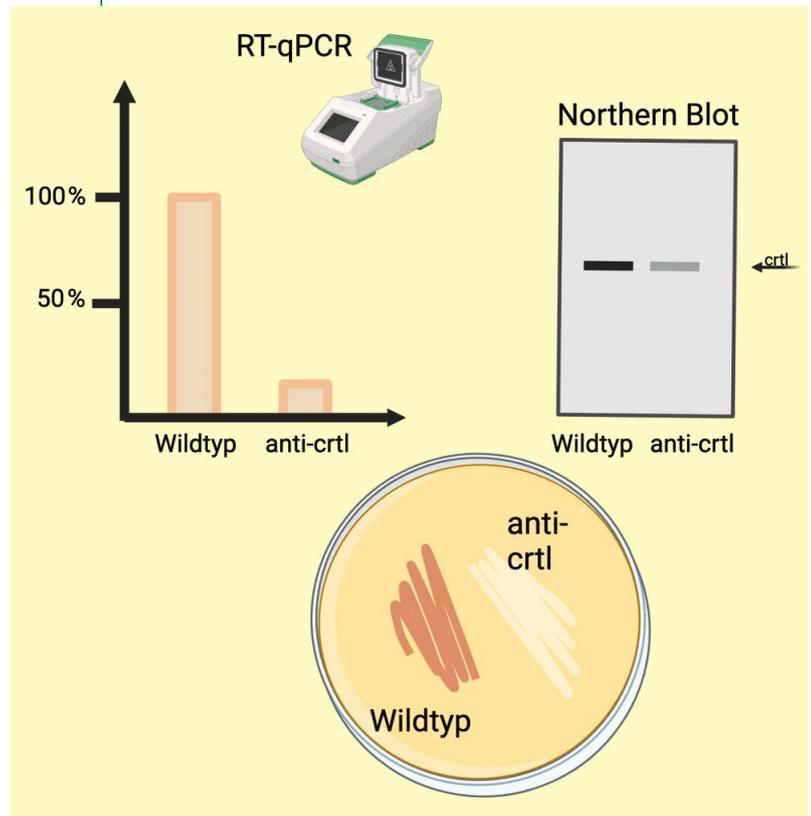
Im Beispiel des mRNA-Prozessierungsfaktors *epf1* reduziert CRISPRi die RNA-Menge auf weniger als 20 Prozent [7]. Im Fall des für die Karotinoid-Biosynthese essenziellen *crtI*-Operons konnte durch CRISPRi gegen den Promotorbereich des *crtI*-Gens auch der Phänotyp der Zellen verändert werden. Wildtyp-*Haloferax*-Zellen sind rot, die Reduktion der Menge an *crtI*-mRNA mit CRISPRi auf nur acht Prozent führt dazu, dass die Zellen weiß bleiben (Abbildung 7) [7]. Der Promotor stromaufwärts des *crtI*-Gens steuert alle drei Gene des Operons, und die RNA-Mengen der anderen beiden Gene sind ebenfalls deutlich einschränkt (35% oder weniger). Das zeigt, dass der Transkriptionsblock auch für polycistronische Transkripte effektiv ist. Dass die Transkriptlevel des zweiten und drittens Gens weniger stark reduziert wurden, lässt sich dadurch erklären, dass innerhalb des Operons weitere Transkriptionsstartstellen nachgewiesen werden konnten, die nicht durch den am *crtI*-Promotor platzierten Cascade blockiert werden [7]. CRISPRi ist also ein mächtiges Instrument um die Expression genomischer, aber auch Plasmid-kodierter Gene herunterzuregulieren – seien sie einzeln oder in Operons organisiert.

Die Untersuchung essenzieller Gene ist im wissenschaftlichen Alltag eine Herausforderung. Hier ist die Anwendung von CRISPRi optimal. Wenn ein Gen essenziell ist, wäre ein Knock-out letal; durch CRISPRi aber kann die Transkription so weit eingeschränkt werden, dass ein basales mRNA-Level erhalten bleibt, die Zellen also noch überleben. Anschließend kann der resultierende Phänotyp analysiert und so die Funktion des Genprodukts entschlüsselt werden.

Ein Beispiel aus unserem Labor ist die Repression des für das kleine Protein CdrS kodierenden Gens. Wird die Transkription hier um bis zu 60 Prozent reduziert, treten ein schwerer Wachstumsdefekt und eine Dysregulation der Zellteilung auf, was sich in einer stark veränderten Zellmorphologie zeigt [15]. Mit Hilfe von Transkriptom- und Proteomanalysen des CRISPRi-Repressionsstammes konnte letztlich CdrS als Transkriptionsfaktor in einem regulatorischen Netzwerk identifiziert werden, das Stoffwechsel und Zellteilung koordiniert [15]. Die bisher stärkste Repression konnte für die ebenfalls essenzielle *splicing*-Endonuklease *endA* erreicht werden. Ihr Genprodukt konnte auf eine Restmenge von 1,1 Prozent gesenkt werden [16]. Der betroffene Stamm zeigte starke Wachstumseinbußen, und es kam unter anderem durch die Anreicherung von unprozessierten Vorläufern ribosomaler RNAs sowie von tRNAs zu vielfältigen Effekten auf eine große Anzahl von mRNAs.

Der durch CRISPRi erzielte Repressionseffekt ist abhängig von der jeweiligen crRNA und kann stark variieren (vgl. *bgaHa*) [12]. In Bezug auf essenzielle Gene ist das sogar von Vorteil, denn es kann diejenige crRNA ermittelt werden, die einen (maximalen) phänotypischen Effekt erzielt, das Überleben der Zelle aber zulässt und so überhaupt die Untersuchung essenzieller Gene ermöglicht.

ABB. 7 | TYPISCHE ERGEBNISSE EINES CRISPRi-EXPERIMENTS



Am Beispiel der Repression des für die Karotinoidbiosynthese essenziellen *crtI*-Gens lassen sich die Auswirkungen der Genrepression illustrieren. In CRISPRi-Zellen (*anti-crtI*) wird durch die verringerte Transkription des *crtI*-Gens weniger Protein synthetisiert und damit weniger Karotinoid. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen, die die für *H. volcanii* charakteristische Rotfärbung zeigen, ist die Zellfarbe der CRISPRi-Zellen deshalb weiß. Die Reduktion der Transkriptmenge kann mittels Northern Blot oder RT-qPCR nachgewiesen werden; hier erscheint das Signal des CRISPRi-Stammes (*anti-crtI*) deutlich schwächer als im Wildtyp.

Wenn die Repression plötzlich stoppt – „Escaper“-Klone

Die Genexpression kann in *H. volcanii* durch CRISPRi effektiv reguliert werden; aber es gibt gelegentlich Zellen, die dieser Repression entkommen. Diese „Escaper“ können sich schnell in der Kultur ausbreiten, insbesondere wenn die Repression des Zielgens das Zellwachstum beeinträchtigt. Sie weisen Mutationen in Komponenten des CRISPRi-Weges auf, die dazu führen, dass die Ziel-DNA nicht erkannt wird, die crRNA nicht gebildet wird oder Cascade nicht mehr an die DNA binden kann. Diese Mutationen können durch Punktmutationen in den *cas*-Genen, dem crRNA-Expressionsplasmid oder den umgebenden Bereichen verursacht werden [7]. Am häufigsten kommt es aber wegen der hohen Rate homologer Rekombination in *H. volcanii* zum Verlust von relevanten Genabschnitten. Besonders gefährdet ist hier die *cas*-Genkassette, die im Genom von den beiden CRISPR-Loci mit ihren *repeat*-Sequenzen flankiert wird. Aber auch die crRNA kodierende Sequenz, die von zwei identischen t-Elementen einge-

rahmt ist, kann deletiert werden (Abbildungen 2a und 5). Um die „Escape“-Ereignisse zu überwachen, ist während eines CRISPRi-Experiments ein PCR-Monitoring erforderlich [14].

Ausblick

Typ-I-Systeme – wie der hier für *H. volcanii* beschriebene Typ I-B – sind neben Typ I-A und I-D die in Archaea vorherrschenden CRISPR-Cas-Systeme. Für viele archaeale Spezies sollte es also möglich sein – wie hier beschrieben – CRISPRi zur Genregulation einzusetzen. Für *Haloferax mediterranei* konnte z. B. ein analoges CRISPRi-Werkzeug umgesetzt werden, um so als Wegbereiter einer biotechnologischen Anwendung den Kohlenstofffluss gezielt zu modifizieren [9].

Neben dem Einsatz als „Sperre“ für die Transkription kann ein nur bindender, aber nicht schneidender Cascade auch genutzt werden, um z. B. an ihn gebundene Proteine zu bestimmten Genomabschnitten zu bringen. Diese Art von Werkzeugen wird basierend auf Klasse-2-Effektoren bereits weit verbreitet eingesetzt. Darüber hinaus wurde speziell für die Anwendung in Archaea auch das RNA-abbauende Typ-III-CRISPR-Cas-System zum Genregulationswerkzeug umgestaltet [4], [5]. In *Sulfolobus*-Spezies wird ein mit einer künstlichen crRNA versehener Typ-III-Cascade eingesetzt, um gezielt bestimmte RNAs abzubauen: ein Weg, um Genexpression posttranskriptional zu reprimieren (zusammengefasst in [4, 14]). Die archaeale CRISPR-Cas-Werkzeugkiste füllt sich also zunehmend und macht so diese faszinierende prokaryotische Domäne molekular-genetisch zugänglicher. Diese erweiterte Toolbox wird es zukünftig ermöglichen, archaeale Regulations- und Stoffwechselleistungen zu verstehen und ihr volles Potenzial auszuschöpfen.

Zusammenfassung

Aufgrund ihrer komplexen und ungewöhnlichen Biologie ist die Entwicklung von Werkzeugen für Archaea nicht einfach, und bisher stand kein Werkzeug zur Genrepression zur Verfügung. Fast alle Archaea besitzen jedoch CRISPR-Cas-Systeme, die eine exzellente Quelle für die Entwicklung von Methoden sind. Wie wir am Beispiel des Haloarchaeons Haloferax volcanii zeigen, können diese CRISPR-Cas-Systeme in Werkzeuge zur Genrepression verwandelt werden: Entfällt nach Deletion der Effektornuklease Cas3 der Abbau der Ziel-DNA, bleibt der Cascade-Komplex gebunden und blockiert den Zugang für die RNA-Polymerase (CRISPRi). Genrepression mittels Cascade ist ein effizientes und wertvolles Werkzeug, um auch in Archaea essentielle Gene studieren zu können. CRISPRi ist modular und kann schnell und einfach durch den Austausch der crRNA gegen ein anderes Zielgen gerichtet werden. Hier fassen wir die Schritte zur Umnutzung des CRISPR-Cas-Systems von H. volcanii zusammen und berichten von Anwendungen aus unserem Labor.

Summary

CRISPR-Cas tools for Haloarchaea

Due to their complex and unusual biology, the development of tools for archaea is not simple and so far, no tool for the regulation of gene repression has been available. However, all of archaea have CRISPR-Cas systems, which are an excellent source for the development of new methods. Using haloarchaeon Haloferax volcanii as an example, we show that these CRISPR-Cas systems can be transformed into tools for gene repression: If the degradation of the target DNA does not take place upon deletion of the effector nuclease Cas3, the Cascade complex remains bound and blocks the access for RNA polymerase (CRISPRi). Cascade-based gene repression is an efficient and valuable tool to study essential genes in archaea. CRISPRi is highly modular and can quickly and easily be directed towards a different target gene by the exchange of the crRNA. Here we summarize the steps to repurpose the CRISPR-Cas system of H. volcanii and report on applications in our laboratory.

Schlagworte:

CRISPRi, crRNA, gene silencing, gene repression, Archaea, CRISPR-Cas, Cascade, *Haloferax volcanii*

Literatur

- [1] E. V. Koonin, K. S. Makarova (2022). Evolutionary plasticity and functional versatility of CRISPR systems. *PLOS Biology* 20 (1), e3001481, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001481>.
- [2] D. Rath et al. (2015). Efficient programmable gene silencing by Cascade. *Nucleic Acids Research* 43 (1), 237–246, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1257>.
- [3] L. S. Qi et al. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152 (5), 1173–1183, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>.
- [4] U. Gophna et al. (2017). Finally, Archaea Get Their CRISPR-Cas Toolbox. *Trends in Microbiology* 25(6), 430–432, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.03.009>.
- [5] Z. Zebec et al. (2016). Efficient CRISPR-Mediated Post-Transcriptional Gene Silencing in Hyperthermophilic Archaeon Using Multiplexed crRNA Expression. *G3 Genes | Genomes | Genetics*. 6 (10), 3161–3168, <https://doi.org/10.1534/g3.116.032482>.
- [6] J. Bost et al. (2023). Application of the endogenous CRISPR-Cas type I-D system for genetic engineering in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Frontiers in Microbiology* 14, Zugriff: 18. März 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1254891>
- [7] A.-E. Stachler, A. Marchfelder (2016). Gene Repression in Haloarchaea Using the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas I-B System“. *Journal of Biological Chemistry* 291(29), 15226–15242, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.724062>.
- [8] M. L. Luo et al. (2015). Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression. *Nucleic Acids Research* 43 (1), 674–681, <https://doi.org/10.1093/nar/gku971>.
- [9] L. Lin et al. (2021). Optimising PHBV biopolymer production in haloarchaea via CRISPRi-mediated redirection of carbon flux. *Commun Biol* 4, 1007, <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02541-z>.
- [10] L.-K. Maier et al. (2019). The nuts and bolts of the *Haloferax* CRISPR-Cas system I-B“. *RNA Biology* 16 (4), <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1460994>.

- [11] L.-K. Maier et al. (2013). Essential requirements for the detection and degradation of invaders by the *Haloferax volcanii* CRISPR-Cas system I-B*, *RNA Biology* 10 (5), <https://doi.org/10.4161/rna.24282>.
- [12] A.-E. Stachler et al. (2020). CRISPRi as an efficient tool for gene repression in archaea. *Methods* 172, 76–85, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.023>.
- [13] L.-K. Maier et al. (2015). An Active Immune Defense with a Minimal CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) RNA and without the Cas6 Protein*, *Journal of Biological Chemistry* 290 (7), 4192–4201, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617506>.
- [14] T. S. Schwarz et al. (2022). CRISPR Interference as a Tool to Repress Gene Expression in *Haloferax volcanii*. In: *Archaea* 2522, S. Ferreira-Cerca, Hrsg. in *Methods in Molecular Biology* 2522, New York, NY, Springer US, 57–85. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2445-6_4.
- [15] Y. Liao et al. (2021). CdrS Is a Global Transcriptional Regulator Influencing Cell Division in *Haloferax volcanii*, *mBio* 12 (4), e01416–21, <https://doi.org/10.1128/mBio.01416-21>.
- [16] T. S. Schwarz et al. (2020). Splicing Endonuclease Is an Important Player in rRNA and tRNA Maturation in Archaea, *Front Microbiol.* 11, 594838, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.594838>.



Nadia Di Cianni, Masterabschluss in Functional Genomics an der Universität Triest, Italien, 2018. Danach Research Assistant am Danish Archaea Centre, Kopenhagen, Dänemark und seit 2019 Doktorandin in der AG Marchfelder an der Universität Ulm.



Anita Marchfelder, Diplomarbeit 1988 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin, Promotion 1992 am Institut für Genbiologische Forschung Berlin, 1993–1994 Postdoktorandin in Stanford bei D. A. Clayton, 2001–2007 Leitung einer Nachwuchsgruppe gefördert von der VolkswagenStiftung, 2007 Heisenberg-Stipendium, 2008 Heisenberg-Professur, seit 2011 Professorin an der Universität Ulm, seit 2024 Leiterin des Instituts für Molekularbiologie und Biotechnologie der Prokaryoten der Universität Ulm. Anita Marchfelder ist Mitglied der GBM (www.gbmonline.de), der VAAM, des VBIO und der GfG (www.gfgenetik.de) und unterstützt die Studiengruppen RNA-Biochemie (www.rnabiochemistry.de) und GEN-AG Regulatorische RNAs. Die CRISPR-Cas-Forschung der AG Marchfelder wird gefördert durch die DFG im Rahmen des SPP 2141 – CRISPR-Cas functions beyond defence.



Verfasst von:



Lisa-Katharina Maier, Biologiestudium an der Universität Ulm, 2010 Diplom mit Schwerpunkt Molekularbiologie. 2015 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marchfelder. Seit 2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Marchfelder mit Forschungsschwerpunkt zum RNA-Metabolismus und zur Immunabwehr bei Haloarchaeaen.

Korrespondenz

Dr. Lisa-Katharina Maier
Molekularbiologie und Biotechnologie der Prokaryoten
Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11
89081 Ulm
Email: lisa-katharina-1.maier@uni-ulm.de



Berufsfelder Biologie – hier gibt es den Überblick

Der VBIO hat achtzig spannende Porträts von Biowissenschaftlerinnen und Biowissenschaftlern im Beruf zusammengestellt. Berufsfeldübersichten, Kontaktadressen, Tipps und Internet-Links ergänzen die „Perspektiven“.

Perspektiven – Berufsbilder von und für Biologen und Biowissenschaftler

- Herausgegeben vom VBIO
- 11. überarbeitete Auflage, DIN A5, 312 Seiten, ISBN 978-3-9810923-3-2
- 16,80 Euro (inkl. Versand) 15,00 Euro (VBIO-Mitglieder)
- Direktbestellung über info@vbio.de



Weitere Infos:

www.vbio.de/perspektiven

PERSPEKTIVEN BERUFSFELD BIOLOGIE





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!

