

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

Überlegungen zur Etablierung des CRISPR-Cas9-Systems in *Neurospora crassa*

CRISPR-Cas9: Das will ich auch!

STEFANIE GRÜTTNER

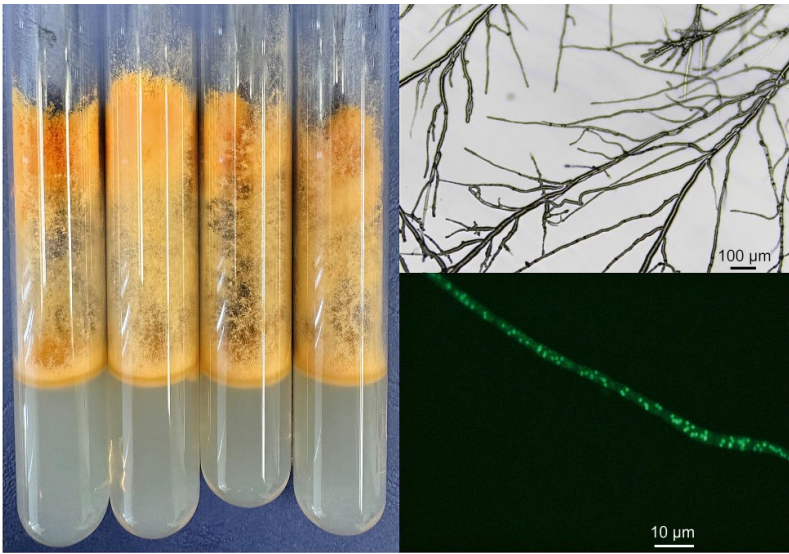


ABB. 1 *Neurospora crassa* im Labor: als Anzucht in Reagenzgläsern (links), Hyphen unter dem Mikroskop (rechts oben) und eine Hyphe mit grün fluoreszierenden Zellkernen (rechts unten). Fotos: S. Grüttner.

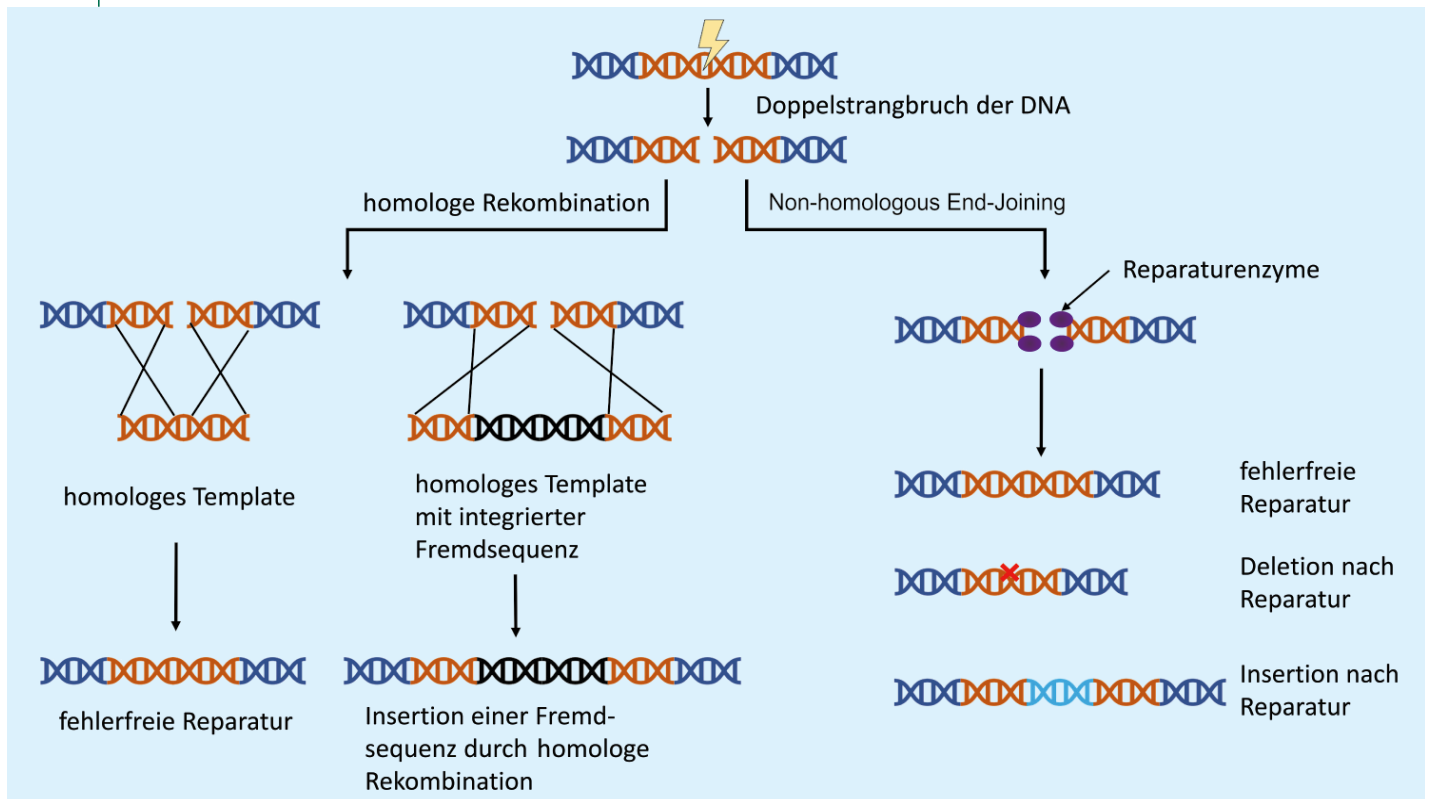
CRISPR-Cas9 ist ein System zur gezielten Veränderung von Genen, dessen Entdeckung Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna 2020 den Chemie-Nobelpreis einbrachte und die Funktionsanalyse von Genen revolutionierte. Seit der Entdeckung wurde CRISPR-Cas9 bereits vielfach auch in Modellorganismen eingesetzt. Die einfache Handhabung und die Effizienz der Methode sorgen dabei für ihre Beliebtheit. Da wäre es doch super, wenn man dieses System auch für Untersuchungen am eigenen Forschungsobjekt verwenden könnte! Wie man herausfindet, ob CRISPR-Cas9 in einem „Organismus von Interesse“ genutzt werden kann und welche Strategien dazu zum Einsatz kommen, soll hier am Beispiel des Modellorganismus *Neurospora crassa* näher erörtert werden.

Pilze begegnen uns in vielen Lebenslagen – sei es in der Natur als Destruent, Symbiont oder Pathogen, in der Biotechnologie in der Herstellung von u. a. Enzymen, Antibiotika und Arzneimitteln oder auf unserem Teller als Speisepilz. Auch in der Wissenschaft spielen sie eine große Rolle, da sie sich hervorragend als Modellorganismen für verschiedenste Untersuchungen eukaryotischer Zellen eignen. Auch *Neurospora crassa*, der rote Brotschimmel, ist solch ein Modellorganismus (Abbildung 1). Er gehört zu den Schlauchpilzen (Ascomycota) und wurde zum ersten Mal 1843 als Verursacher eines orangenen Schimmelbefalls in französischen Bäckereien beschrieben. In den späten 1920er Jahren wurde er von Bernard O. Dodge und Carl C. Lindgren im Labor etabliert und entwickelte sich dann über die Zeit zu einem wichtigen Modellorganismus der biochemischen Genetik [1]. So verhalf er beispielsweise George W. Beadle und Edward L. Tatum 1941 zum Nobelpreis für die Aufstellung der revolutionären „Ein-Gen-ein-Enzym“-Hypothese [2].

Zudem erfreut sich *N. crassa* in zahlreichen weiteren Forschungsfeldern großer Beliebtheit wie z. B. in der Physiologie, Molekularen Zellbiologie, Entwicklungsbiologie, Epigenetik sowie in der Erforschung der circadianen Rhythmik. Der Grund für diese zahlreichen Anwendungen liegt darin, dass *N. crassa* sehr einfach im Labor kultiviert werden kann. Er wächst sehr schnell und hat nur geringe Ansprüche an das Wachstumsmedium. Zum anderen werden genetische Analysen dadurch vereinfacht, dass das Genom von *N. crassa* vollständig sequenziert ist. Da der Pilz ein haploides Genom aufweist, sind auch genetische Modifikationen vergleichsweise einfach durchzuführen. Weitere Vorteile liegen in der großen bereits etablierten Methodenvielfalt sowie dem Vorhandensein einer Sammlung von Stämmen, bei denen einzelne Gene des Pilzes ausgeschaltet sind, und die fast alle bekannten Gene abdeckt [1–2].

Obwohl bereits sehr viele zelluläre Prozesse bei *N. crassa* erforscht sind, bietet der Pilz diverse Möglichkeiten, um weitere Forschungsfragen zu untersuchen, deren Ergebnisse potenziell auf andere Organismen wie Säugetiere oder auch den Menschen übertragbar sind. So konnten z. B. wichtige Erkenntnisse zur epigenetischen Regulierung durch DNA-Methylierung mithilfe von *N. crassa* gewonnen werden [3]. Derartige Untersuchungen sind mit Mäusen und anderen Modellorganismen, bei denen die Funktion

ABB. 2 | ZELLEIGENE DNA-REPARATURMECHANISMEN



Wenn sich ein DNA-Doppelstrangbruch ereignet, greift entweder die homologe Rekombination (HR, links) oder das *non-homologous end-joining* (NHEJ, rechts). Bei der HR wird eine homologe DNA-Sequenz als Vorlage für die Reparatur genutzt. Beinhaltet diese zusätzliche DNA-Bereiche, werden diese bei der Reparatur miteingefügt. Beim NHEJ werden die Stränge ohne Vorlage zusammengefügt; dabei können Fehler entstehen: Deletionen (Basen fehlen) oder Insertionen (Einfügen zusätzlicher Basen).

der DNA-Methylierung eine lebenswichtige Rolle spielt, nicht möglich, da Tiere mit manipulierter DNA-Methylierung nicht überlebensfähig sind. Zudem stellen Pilze wichtige Organismen in der Biotechnologie dar. Auch wenn *N. crassa* selbst dort eher selten verwendet wird, lassen sich Erkenntnisse, die an dem Modellorganismus gewonnen werden, auf Produktionsstämme übertragen.

Never change a running system?

Um die Funktion bestimmter Gene zu analysieren, bedient man sich in der Regel des Ausschaltens von Genen. Anschließend wird untersucht, welche Prozesse sich im Organismus von Interesse verändern, wenn das entsprechende Gen nicht mehr funktionsfähig ist. Daraus können Rückschlüsse auf die Funktion des einzelnen Gens gezogen werden. Man spricht hier auch von reverser Genetik. Diese ist allerdings nicht immer ganz trivial, da oft nicht nur ein einziges Genprodukt für einen Prozess verantwortlich ist, sondern es eines Zusammenspiels verschiedener Genprodukte bedarf. Anstatt Gene auszuschalten, können auch Gene in den Organismus eingebracht werden, um ihre Funktion zu untersuchen. Das können sowohl eigene (endogene) Gene des Organismus als auch auch fremde (exogene) Gene sein.

Das Ausschalten der Gene kann auf verschiedenen Wegen geschehen. In Pilzen wird häufig die Methode der homologen Rekombination verwendet. Dabei macht man sich – ähnlich wie bei dem CRISPR-Cas9-System – einen zelleigenen Reparaturmechanismus zunutze, der Doppelstrangbrüche in der DNA erkennt und diese durch die Verwendung einer homologen DNA-Sequenz (identische Sequenz) als Vorlage repariert (Abbildung 2). Liefert man der Zelle eine alternative DNA-Sequenz, bei der sich

IN KÜRZE

- *Neurospora crassa* ist ein wichtiger Modellorganismus in der Genetik, Molekularbiologie und vielen weiteren Forschungsgebieten.
- Das CRISPR-Cas9-System für *N. crassa* bietet einige Vorteile für die Forschungsgemeinschaft, wie die Möglichkeit, mehrere Gene gleichzeitig zu modifizieren und den **Arbeitsaufwand zu minimieren**.
- Die Etablierung des Systems erfordert viel Vorbereitung und Abwägungen. Besonders wichtig ist die Überlegung, wie die einzelnen **CRISPR-Cas9-Komponenten in die Zelle gelangen** bzw. von ihr synthetisiert werden können.
- Wenn die **generelle Funktionalität** des entwickelten Systems durch Tests und entsprechende Kontrollen nachgewiesen wurde, kann es für spezifische Analysen bei *N. crassa* angewendet werden.

inmitten der homologen Sequenzen eine andere DNA-Sequenz befindet, wird auch die fremde DNA mit kopiert und so in das Genom eingebaut. Dadurch wird dann das ursprüngliche Gen an dieser Position entweder zerstört oder komplett ersetzt und ist somit ausgeschaltet.

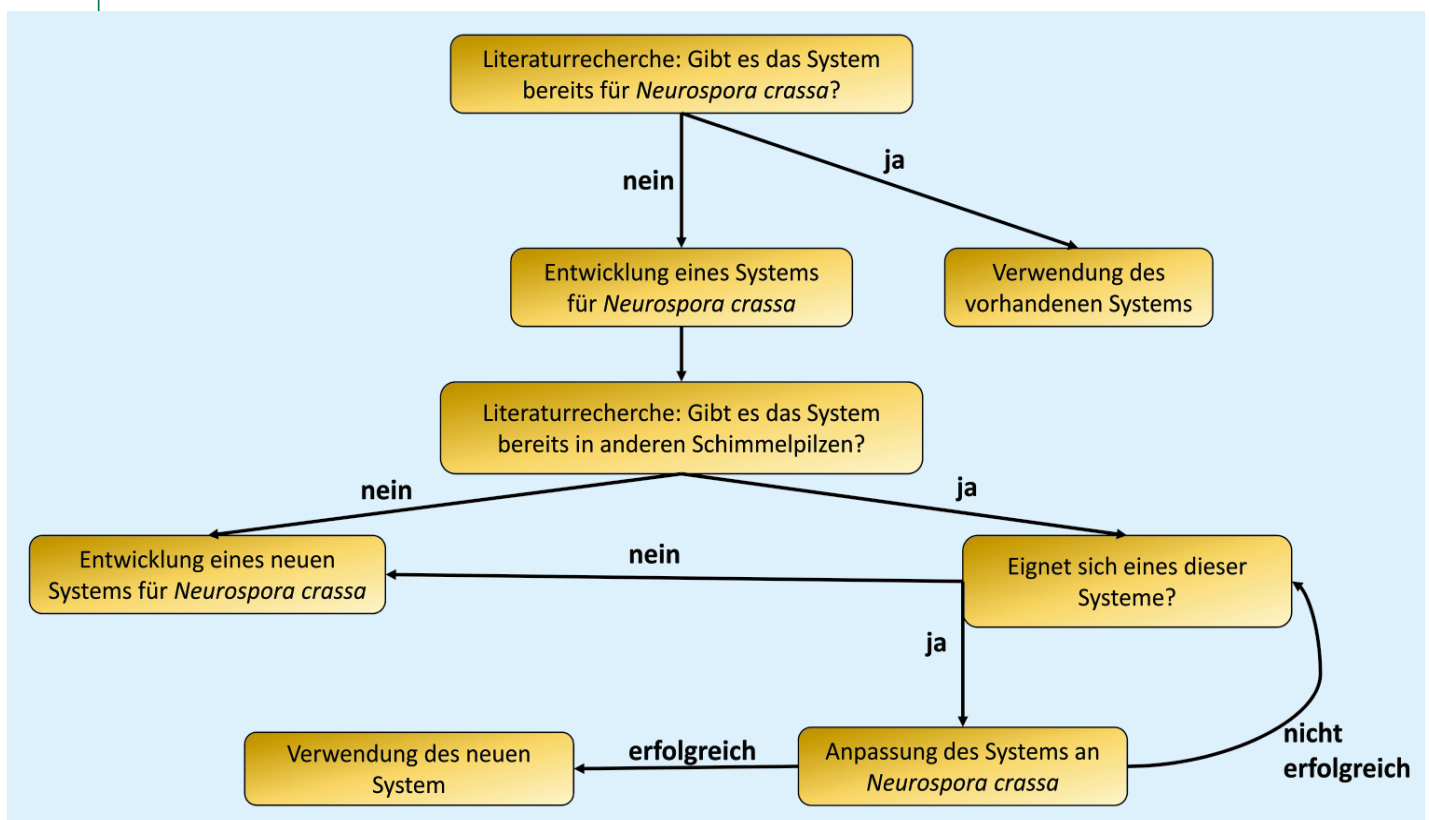
Die homologe Rekombination ist allerdings ein sehr aufwendiger Prozess und erfolgt zudem in *N. crassa* nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit, da in der Regel ein zweiter Reparaturmechanismus von der Zelle genutzt wird: das sogenannte *non-homologous end-joining* (kurz NHEJ), das ebenfalls bei CRISPR-Cas9 eine Rolle spielt [4-5] (Abbildung 2). Bei diesem Mechanismus werden die zwei auseinandergebrochenen DNA-Stränge ohne Vorlage einfach wieder zusammengefügt. Dieser Reparaturweg erlaubt es allerdings nicht, fremde DNA in das Genom einzubringen. Will man also mit hoher Effizienz neue DNA-Sequenzen in das Genom von *N. crassa* einbringen – sei es, um Gene auszuschalten oder neue einzubringen –, muss man eine Mutante verwenden, bei der das NHEJ ausgeschaltet ist. Der Nachteil hierbei ist, dass man am Ende zwar einen Stamm erhält, der die gewünschte DNA-Sequenz trägt, bei diesem allerdings auch ein wichtiger Reparaturmechanismus nicht mehr funktionsfähig ist. Dies kann unter Umständen dazu führen, dass nachfolgende Analysen beeinflusst werden und falsche Schlüsse bezüglich des untersuchten Gens gezogen werden. Um das zu umgehen, muss man den neu erzeugten Stamm mit

einem Wildtyp – also einem unveränderten Stamm – kreuzen, um so die mutierten NHEJ-Gene zu entfernen („auszukreuzen“), während die neu eingebrachte Sequenz erhalten bleibt. Das klingt nicht nur mühselig, das ist es auch! Daher wäre ein einfacheres System zur Veränderung des *N. crassa*-Genoms eine wirklich sinnvolle Ergänzung des vorhandenen Methodenkastens. Hier kommt nun also das CRISPR-Cas9-System ins Spiel. Es verspricht einen viel geringeren Arbeitsaufwand und könnte dem Experimentator einiges an Zeit einsparen. Nur leider gibt es bisher noch kein gut funktionierendes CRISPR-Cas9-System für *N. crassa* und das, obwohl dieser doch ein beliebter Modellorganismus ist.

Abgucken erlaubt!

Somit wären wir also bei der Frage angekommen, wie man das CRISPR-Cas9-System für *N. crassa* etablieren kann. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte, die hier näher erläutert werden sollen. Zunächst muss man sich mit der Frage auseinandersetzen, ob es wirklich sinnvoll ist, das System zu etablieren, da es ja bereits Methoden gibt, um *N. crassa* genetisch zu modifizieren. Schließlich ist es mit viel Schweiß und Arbeit verbunden, ein neues System in einem Organismus zum Laufen zu bringen. Im Fall von *N. crassa* lohnt sich der Aufwand aber definitiv. Die Community wartet bereits sehnsüchtig darauf, dass es endlich jemand schafft, das System prak-

ABB. 3 | ENTWICKLUNG DES CRISPR-CAS9-SYSTEMS IN *N. CRASSA*



tikabel im Modellorganismus zu etablieren. Nicht nur würde ein funktionierendes CRISPR-Cas9-System dem Experimentator eine Menge Zeit und Aufwand im Vergleich zur klassischen Methode der homologen Rekombination sparen. Ein weiterer Vorteil wäre die Möglichkeit, mit diesem System mehr als ein Gen zur selben Zeit zu verändern. Dies ist mit der homologen Rekombination nicht so einfach durchzuführen, da hier jedes Gen einzeln und nacheinander ausgeschaltet oder eingekreuzt werden muss. Zudem muss man mit der CRISPR-Cas9-Methode nicht den *N. crassa*-Stamm mit dem defekten NHEJ-System benutzen. Die Verwendung der Cas9-Nuklease in Verbindung mit der entsprechenden guideRNA (gRNA) und Donor-DNA erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es zur homologen Rekombination kommt, nämlich bereits ausreichend.

Bevor man mit der Etablierung des Systems beginnt, sollte man sich mit seinem Wirkprinzip auseinandersetzen: Welche Komponenten benötige ich und wie funktioniert das System? Im Fall des CRISPR-Cas9-Systems werden zwei Hauptkomponenten benötigt: die Nuklease Cas9 zur Erzeugung des Doppelstrangbruchs der DNA und die gRNA, um die Nuklease an die entsprechende Stelle im Genom, an der die Veränderung stattfinden soll, zu rekrutieren. Die Frage dabei ist, wie diese beiden Komponenten in die Zelle hineingelangen können. Und nicht nur das: Damit eine Genomedition stattfinden kann, müssen die Komponenten des CRISPR-Cas9-Systems auch in den Zellkern gelangen und dort funktionsfähig sein. Dabei gibt es einiges zu beachten:

- 1) In welcher Form werden die Komponenten in die Zelle eingebracht?
- 2) Mit welcher Methode werden die Komponenten eingebracht?
- 3) Welche Eigenschaften müssen die Komponenten aufweisen, damit sie auch in der pilzlichen Zelle funktionsfähig sind und an den richtigen Ort gelangen?

Da das CRISPR-Cas9-System bereits in anderen Organismen angewandt wird, muss das Rad zum Glück nicht komplett neu erfunden werden. Man muss lediglich herausfinden, welche der bereits verwendeten Varianten sich auch für *N. crassa* eignen könnten. Hierzu beginnt man mit einer Literaturrecherche. Für den Anfang eignen sich Übersichtsartikel (*Reviews*) sehr gut, da sie einen groben Überblick über den aktuellen Stand der Dinge liefern können. Mit ein bisschen Glück stößt man dabei auf einen Artikel, der beschreibt, welche verschiedenen Methoden bereits bei Schlauchpilzen (Ascomyceten), zu denen ja auch *N. crassa* gehört, angewendet werden. Je näher verwandt die Organismen sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass die beschriebene Methode auch im Versuchsorganismus funktioniert. Da bereits 2015 die ersten CRISPR-Cas9-Anwendungen bei *Trichoderma reesei* und einigen *Aspergillus*-Arten (beide gehören zu den Schlauchpilzen) verwendet wurden [6–7] und viele

weitere folgten, findet man einige Übersichtsartikel zu den verschiedenen Methoden. Aber welche davon passt am besten zu *N. crassa*?

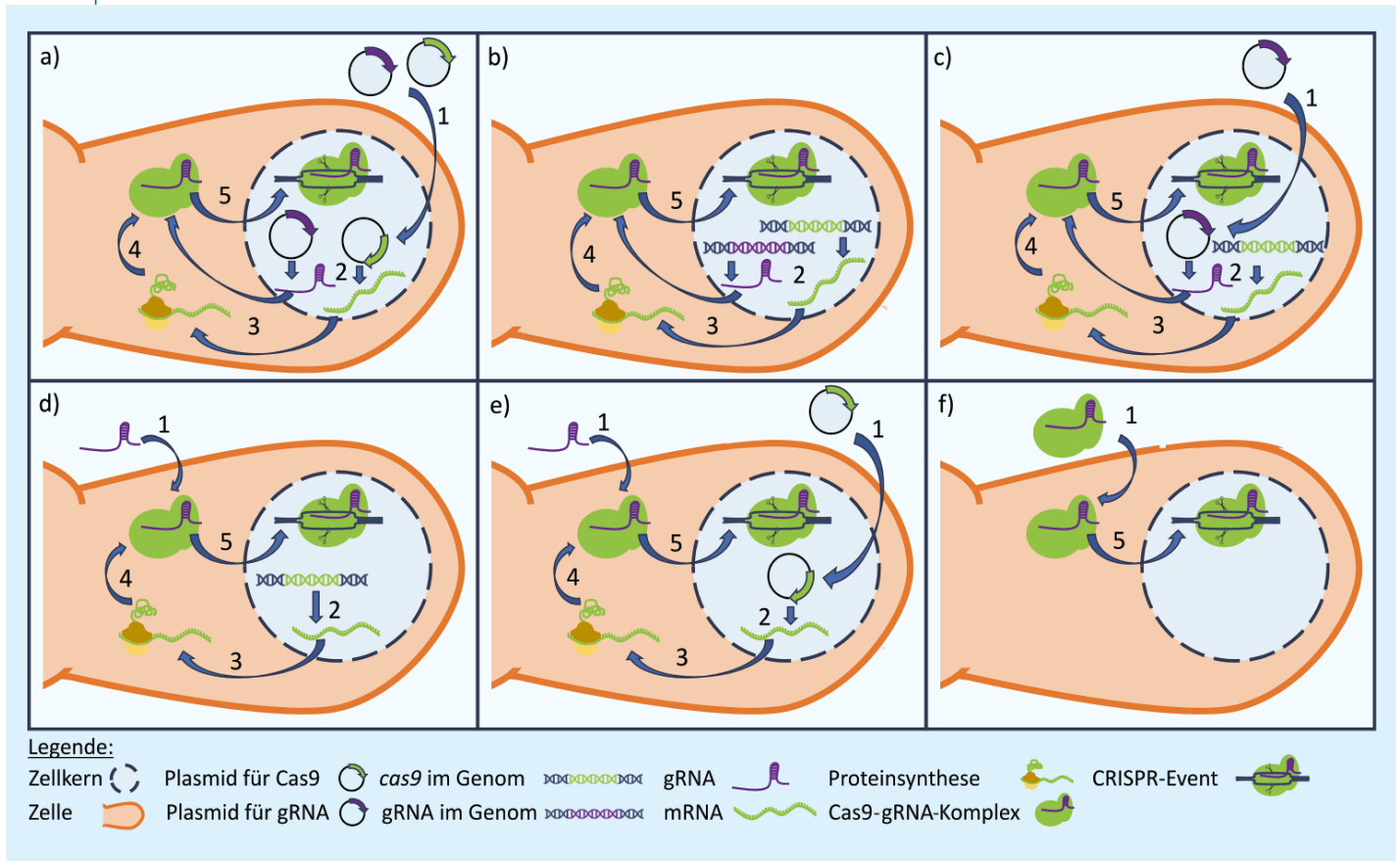
Wer die Wahl hat, hat die Qual

Wie die einzelnen Komponenten – Cas9 und die gRNA – in die Zelle gelangen bzw. von der Zelle synthetisiert werden können, ist in Abbildung 4 zusammengefasst und im Folgenden näher beschrieben: Bei Möglichkeit a) werden sowohl die *cas9*- als auch die gRNA-Sequenz in Form eines Plasmids in die Zellen eingebracht. Das Plasmid dient hier quasi als ein Transportmittel, über das die DNA-Sequenzen in die Zelle gelangen. Innerhalb der Zelle können dann die jeweiligen DNA-Sequenzen abgelesen werden. Auf diese Weise werden die gRNA bzw. das Cas9-Protein von der Zelle selbst gebildet. Die Möglichkeit b) sieht es vor, dass die für Cas9 und für die gRNA kodierenden Sequenzen zunächst direkt in das Genom des Pilzes integriert werden. Danach folgen die gleichen Schritte wie in Fall a): Die Sequenzen werden abgelesen und Cas9 bzw. die gRNA direkt von der Zelle synthetisiert. Im Fall c) handelt es sich um eine Kombination aus a) und b), bei der die Sequenz einer Komponente (entweder Cas9 oder die gRNA) im Genom integriert und die entsprechend andere als Plasmid in die Zelle eingebracht wird. Bei der Variante d) liegt die *cas9*-Sequenz bereits im Genom integriert vor. Die gRNA gelangt hier nicht in Form von DNA, sondern als RNA in die Zelle. Man umgeht damit also die RNA-Synthese durch die Zelle und verwendet stattdessen eine im Labor synthetisierte RNA. Variante e) ist eine leichte Abwandlung von d), bei der die *cas9*-Sequenz nicht ins Genom integriert wird, sondern als Plasmid in die Zelle eingebracht wird. Die gRNA gelangt parallel als RNA in die Zelle. Im Fall f) werden Cas9 und die gRNA als sogenannter Ribonukleoprotein-Komplex (RNP-Komplex) aus synthetisierten Komponenten im Reagenzglas zusammengesetzt und in die Zelle eingebracht. Damit wird bereits der vollständige Cas9-gRNA-Komplex in die Zelle transferiert, so dass die Zelle keine der Komponenten selbst synthetisieren muss.

Alle aufgezählten Varianten haben ihre Vor- und Nachteile, die man nun abwägen muss. Im Falle der Integration der Sequenzen ins Genom – Varianten b–d) – verbleiben diese im Genom und sind somit immer vorhanden. Dies kann zu sogenannten *off-target*-Effekten führen, bei denen es zu unerwünschten Veränderungen im Genom durch die Cas9-Nuklease kommt. Verwendet man hingegen Plasmide – hier die Varianten a), c) und e) – dann gehen diese im Laufe der Zeit verloren. Man spricht deshalb von einer transienten Transformation, mit der man das Risiko der *off-target*-Effekte minimieren kann. Voraussetzung hierfür ist, dass passende Plasmide verwendet werden, die im jeweiligen Organismus abgelesen und repliziert werden.

Bei der Synthese der Komponenten kann es verschiedene Probleme geben. Vor allem die Lokalisierung im

ABB. 4 | EINBRINGEN VON CRISPR-CAS9-KOMPONENTEN IN DIE ZELLE



Das Schema zeigt verschiedene Methoden, um die einzelnen Komponenten, Cas9 und die gRNA, in die Zelle zu bringen bzw. von der Zelle synthetisieren zu lassen. a) Die cas9- und gRNA-Sequenz werden als Plasmide in die Zelle eingebracht. b) Die cas9- und gRNA-Sequenz werden in das Genom des Pilzes integriert. c) Eine Sequenz wird als Plasmid eingebracht, die entsprechend andere ist im Genom integriert. d) Die cas9-Sequenz ist im Genom integriert, die gRNA wird als RNA in die Zelle transferiert. e) Die cas9-Sequenz wird als Plasmid und die gRNA als RNA in die Zelle transferiert. f) Der fertige Cas9-gRNA-Komplex wird direkt in die Zelle eingebracht. 1: Die Komponenten werden in der angegebenen Form in die Zelle transformiert; 2: gRNA und/oder cas9-mRNA werden im Zellkern synthetisiert; 3: Transport der RNAs in das Cytoplasma; 4: Proteinbiosynthese von Cas9 und Komplexbildung mit gRNA; 5: Transfer des Komplexes in den Zellkern.

Zellkern ist hier kritisch. Damit ein Protein in den Zellkern gelangt, benötigt es ein sogenanntes Lokalisierungssignal. Das Cas9-Protein stammt aber aus Bakterien, die keinen Zellkern besitzen. Das entsprechende Gen enthält folglich keine Information für eine Kernlokalisierung. Diese Information muss also nachträglich hinzugefügt werden. Auch hier gibt es wieder verschiedenste Möglichkeiten, die sich von Organismus zu Organismus unterscheiden. So muss man bestimmte Signalsequenzen auswählen und entscheiden, ob man diese am Anfang oder am Ende des Proteins anfügen möchte. Diese Entscheidung kann später einen großen Einfluss auf die Funktionalität von Cas9 innerhalb der Zelle haben.

Neben dem Lokalisationssignal des Proteins muss auch sichergestellt werden, dass der Organismus das Protein problemlos synthetisieren kann. Proteine bestehen aus einer durch die DNA-Sequenz festgelegten Aneinanderreihung von Aminosäuren. Die DNA-Sequenz bestimmt diese Abfolge durch die einzelnen Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Jede Aminosäure wird durch drei Basen kodiert – die Aminosäure Glutaminsäure beispielsweise durch die Abfolge GAG. Allerdings können diese Triplets variieren, d. h. mehrere Triplets kodieren für ein und dieselbe Aminosäure (Redundanz beim genetischen Code). Im Fall der Glutaminsäure wären das GAG und GAA. Die Schwierigkeit hierbei ist, dass jeder Organismus seine „Favoriten“ hat, die bevorzugt verwendet werden. Eventuell muss man also die kodierende Proteinsequenz dahingehend verändern, dass diese Favoriten bevorzugt vorliegen.

Probleme bei der Synthese kleiner RNAs – wozu gRNAs zählen – lassen sich umgehen, wenn man die gRNA als RNA und nicht in Form von DNA in die Zelle einbringt wie bei den Varianten d) und e). Allerdings ist es auch nicht ganz trivial, intakte RNA in die Zelle einzubringen und diese über einen gewissen Zeitraum stabil in der Zelle zu behalten. Die optimalste Version stellt die Verwendung von RNP-Komplexen dar (Variante f), weil

hier nichts mehr von der Zelle selbst synthetisiert werden muss und die Verweildauer des Komplexes begrenzt ist. Dies ist aber auch die komplexeste und komplizierteste Methode, da sich der große Komplex nur schwer ohne Funktionsverlust in die Zelle transferieren lässt. Es gibt also viel zu beachten, bevor man sich für eine Methode entscheiden kann.

Die Entscheidung ist gefallen

Hat man sich nach einiger Vorarbeit für eine Methode entschieden, folgt endlich der praktische Teil, in dem getestet wird, ob die ausgewählte Methode funktioniert. Vorsichtshalber sollte man immer einen Back-up-Plan parat haben, sich also im Vorfeld Gedanken über Alternativen gemacht haben, falls ein Schritt nicht funktioniert, damit man nicht komplett von vorne anfangen zu muss. Anschließend muss man überlegen, wie sich am besten nachweisen lässt, dass die Methode prinzipiell funktioniert. Hier geht es um den sogenannten *proof of principle* und noch nicht um eine spezifische Anwendung der Methode, bei der ein Gen ausgeschaltet wird, dessen Funktion man näher charakterisieren möchte. Für den *proof of principle* würde sich z. B. anbieten, bei der Auswahl des Zielgens eines zu wählen, auf das man selektieren oder screenen kann. Das bedeutet, man erhält bereits über den Phänotypen einen Anhaltspunkt dafür, ob die Methode erfolgreich war oder nicht, ohne zunächst weitere komplexe Analysen durchzuführen. Dafür eignet sich beispielsweise ein Gen in einem bestimmten Stoffwechselweg, dessen Verlust zu einer Auxotrophie (lebenswichtige Stoffe wie bestimmte Aminosäuren können nicht mehr selbst synthetisiert werden und müssen von außen aufgenommen werden) führt. Eine weitere Möglichkeit wäre es, ein Gen zu verändern, bei dem die Veränderung dazu führt, dass der Pilz unter Bedingungen wachsen kann, unter denen er sonst nicht überlebt. So lässt sich bereits ohne eine Sequenzierung des betroffenen Bereichs die Vermutung aufstellen, dass die Veränderung des Genoms mittels Cas9 erfolgreich war.

Es ist auch sehr wichtig, dass man entsprechende Kontrollen durchführt, mit denen man sicherstellen kann, dass dieser Phänotyp nicht auf andere zufällige Ereignisse zurückzuführen ist. Dafür kann man z. B. einen Pilz verwenden, der ganz genauso behandelt wird wie der, mit dem die CRISPR-Cas9-Technik getestet wird, der aber keine der CRISPR-Komponenten enthält. Je nach gewählter Methode könnten die Kontrollen zusätzlich aus Pilzen bestehen, die jeweils nur eine Komponente des CRISPR-Cas9-Systems enthalten. Sollte man dann die gleichen Effekte wie bei dem Pilz mit vollständigem CRISPR-Cas9-System beobachten, kann ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen im Genom des Pilzes tatsächlich auf die CRISPR-Anwendung zurückzuführen sind. Stellt sich aber heraus, dass die Kontrollen keine Veränderungen aufweisen, der Pilz mit CRISPR-Cas9

allerdings schon, dann kann man davon ausgehen, dass das System funktionsfähig ist. In diesem Fall kann die Methode dann endlich dafür eingesetzt werden, Gene von Interesse zu untersuchen, um neue Forschungsfragen zu beantworten.

Lohnt sich die Mühe?

Wie das in der Wissenschaft eben ist, dürfen wir noch nicht verraten, welche Methode uns den Erfolg brachte. Denn das Manuskript für unsere Publikation ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ganz fertig. Soviel sei aber verraten: Ja, die Mühe lohnt sich!

Zusammenfassung

Neurospora crassa ist ein bedeutender Modellorganismus für die Genetik, Molekularbiologie und weitere Forschungsgebiete. Um neue Erkenntnisse in diesen Gebieten zu gewinnen, wird oft das Prinzip der reversen Genetik verwendet, wobei z. B. Gene ausgeschaltet werden, um deren Funktion zu analysieren. Für N. crassa nutzt man hierfür die homologe Rekombination als gängige Methode. Diese ist jedoch aufwendig und ineffizient. Das CRISPR-Cas9-System stellt eine effizientere Alternative dar, steht für N. crassa aber noch nicht zur Verfügung. Die Etablierung erfordert viel Vorarbeit, Literaturrecherche und viele Abwägungen. Aspekte, die für eine erfolgreiche Etablierung des Systems in N. crassa berücksichtigt werden müssen, sind die Auswahl der Methode, um die CRISPR-Cas9-Komponenten in die Zelle einzubringen, die Optimierung der Genexpression von cas9 bzw. der gRNA sowie die Minimierung von Nebeneffekten. Nach der Auswahl und Optimierung der Methode muss die Funktionalität des Systems durch Tests und geeignete Kontrollen bestätigt werden, bevor es dann für spezifische Analysen eingesetzt wird.

Summary

Thoughts on establishing the CRISPR-Cas9 system in Neurospora crassa

Neurospora crassa is a significant model organism for genetics, molecular biology, and other research areas. To gain new insights in these fields, the principle of reverse genetics is often used, i. e. switching off genes in order to analyze their function. Regarding N. crassa, homologous recombination is commonly used for this purpose, but it is time-consuming and inefficient. The CRISPR-Cas9 system offers a more efficient alternative, but it is not yet available for N. crassa. Establishing this system requires extensive preparatory work, literature research, and careful considerations. Factors to be considered for a successful implementation of the system in N. crassa include selecting the method to introduce the CRISPR-Cas9 components into the cell, optimizing the expression of cas9 and gRNA, and minimizing side effects. After having selected and optimized the method, the functionality of the system must be confirmed through tests and appropriate controls before it can be used for more specific analyses.

Literatur

- [1] K. A. Borkovich et al. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 1.
- [2] C. M. Roche et al. (2014). *Neurospora crassa*: Looking back and looking forward at a model microbe. *American Journal of Botany* 101, 2022–2035.
- [3] R. Aramayo, E. U. Selker (2013). *Neurospora crassa* a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, 17921–17922.
- [4] S. Wang et al. (2017). Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 8063–8075.
- [5] Y. Ninomiya et al. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 33, 12248–12253.
- [6] R. Liu et al. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR-Cas9 system. *Cell Discov* 1, 15007.
- [7] C.S. Nødvig et al. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* 10, 7.

Verfasst von:



Stefanie Grüttner ist seit 2022 Postdoktorandin in der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel. Sie hat an der CAU Biologie studiert und promoviert. Während der Promotion hat sie sich mit den Regulierungsmechanismen der Genexpression pflanzlicher Mitochondrien beschäftigt – im Genaueren mit der Translationsregulierung durch Pentatricopeptide-Repeat-Proteine (PPR-Proteine). Für die Postdoktorandenzeit hat sich ihr Forschungsinteresse auf die Molekularbiologie des Ascomyceten *Neurospora crassa* verschoben. Sie fokussiert sich auf die Entwicklung und Optimierung eines CRISPR-Cas9-Systems in *N. crassa* und die Anwendung dieses Systems in Bezug auf die Beantwortung neuer Forschungsfragen.

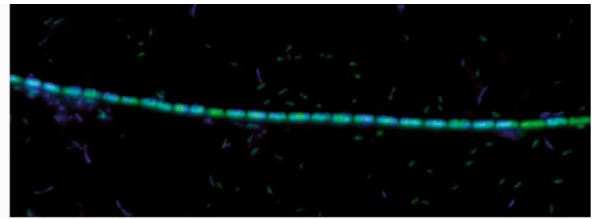


Korrespondenz

Dr. Stefanie Grüttner
Botanisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Abt. Botanische Genetik und Molekularbiologie
Am Botanischen Garten 1–9
24118 Kiel
E-Mail: sgruettner@bot.uni-kiel.de

MIKROBE DES
JAHRES 2024

Kabelbakterium
Electronema



- lebende Stromleiter
- Zellketten mit Arbeitsteilung
- Ökosystem-Ingenieur im Sediment
- Bio-Kabel statt Elektroschrott?



<http://mikrobe-des-jahres.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!

