

Arbeitsblatt 4 (Fallbeispiel)

Design eines CRISPR/Cas9-Systems am Beispiel des Zebrafisches (*Danio rerio*)

Aufgabenstellung

Designen Sie ein CRISPR/Cas9-System im Zebrafisch.

Zeitaufwand

ca. 45 min

Vorkenntnisse

Vorhergehende Arbeitsblätter und deren Inhalte

Sehen verstehen mit dem Zebrafisch

Haben Sie sich schon mal gefragt wie Wissenschaftler*innen vorgehen, um komplexe Fragestellungen wie zum Beispiel „wie funktioniert unser Sehsinn“ experimentell zu beantworten? Viele Untersuchungen sind am Menschen nicht möglich. Forschende setzen daher möglichst einfache Modellorganismen ein, um erst einmal die grundlegenden Fragen zu klären. Solche Modellorganismen sind meist recht einfach in der Haltung und Zucht. Der große Vorteil ist jedoch, dass es für sie verschiedene genetische Werkzeuge gibt, mit denen sich einzelne Eigenschaften verändern und dadurch untersuchen lassen.



Abb. 1: Larve des Zebrafisches *Danio rerio*

Im folgenden realen Forschungsbeispiel des Max-Planck-Instituts für biologische Intelligenz* wurden Larven des Zebrafisches *Danio rerio* als Modellorganismus¹ eingesetzt, um die Aufgaben bestimmter Zellen im visuellen System zu untersuchen. Da fast 70% der Zebrafisch-Gene menschliche Homologe haben, lassen sich die im Fisch erworbenen Erkenntnisse häufig auch auf den Menschen übertragen. Das Besondere an den Zebrafischlarven ist, dass sie fast ganz durchsichtig sind. So können Nervenzellen mit ihrer Lage und Funktion im Gehirn durch das Mikroskop beobachtet werden, während der Fisch zum Beispiel ein bestimmtes Verhalten zeigt.

Die Neurobiolog*innen interessieren sich besonders dafür, wie Nervenbahnen im Gehirn visuelle Eindrücke in Verhaltensantworten umwandeln. Also zum Beispiel wie Nervenbahnen steuern, dass der Zebrafisch auf Licht zuschwimmt oder vor einem Fressfeind flieht. Dabei spielen Retinal-Ganglion-Zellen (RGC) eine große Rolle. Diese Zellen sitzen in der Netzhaut des Auges, senden ihre Axone aber in verschiedene Bereiche des Gehirns. Die RGCs sind somit für das Weiterleiten der Informationen von der Netzhaut ans Gehirn verantwortlich.

Bislang konnten die Forschenden die RGCs etwa 30 verschiedenen Typen zuordnen. Sie vermuten, dass die unterschiedlichen RGC-Typen unterschiedliche Funktionen bei der Informationsübertragung übernehmen. Um dies aber experimentell zu beweisen, müssen die einzelnen RGC-Typen zunächst voneinander unterschieden werden. Dazu werden die Zellen einzelner RGC-Typen farblich markiert.

* in Gründung; bis zu seiner offiziellen Gründung wird das Institut rechtlich durch seine Vorläuferinstitute, dem MPI für Neurobiologie in Martinsried und dem MPI für Ornithologie in Seewiesen, vertreten

Dies geschieht mit sogenannten Markergenen: Das sind Gene, die nur in einem bestimmten RGC-Typ aktiv sind. In diese Gene wird mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems das Gen, also die "Bauanleitung", für das grün leuchtende Protein (GFP)² eingebracht. So wird gewährleistet, dass in diesem RGC-Typ nicht nur das Markergen, sondern auch die GFP-Bauanleitung in ein Protein übersetzt wird. Das Ergebnis: im dichten Nervenzellgeflecht leuchten nur die Zellen des einen RGC-Typs grün auf.

Das hinter der Methode liegende Prinzip ist recht einfach: Das Gen für GFP wird durch Gentransfer in die Zebrafischlarven eingebracht. Dafür werden zunächst entsprechende Plasmide hergestellt, welche die Informationen für die Komponenten des CRISPR/Cas9-Systems (Cas9-Enzym, gRNA, GFP) beinhalten. Diese werden dann in eine befruchtete Zebrafisch-Eizelle injiziert.

¹ Der Zebrafisch als Modellorganismus: <https://www.mpg.de/10886445/zebrafisch>

² Leuchtproteine als Kundschafter in der Zelle: https://www.mpg.de/6825064/mpin_ib_20121

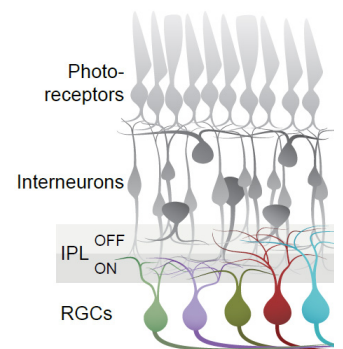


Abb. 2: Ausschnitt aus der Netzhaut mit verschiedenen Retinal-Ganglion-Zellen © MPI für Neurobiologie / Stemmer, Baier

Übung

Bevor Sie beginnen, das CRISPR/Cas9-System zu designen, einige Übungen zum besseren Verständnis.

- A** Die folgende Teilsequenz der DNA enthält mehrere PAM-Sequenzen. Markieren Sie fünf PAM-Sequenzen (NGG) im oberen Strang (5'- 3' Strang). N = beliebige Base.

5'-ATCGGCGGACCGTTAAGGTTCTAACGGTATATCGTACGGTAT-3'
3'-TAGCCGCCTGGCAATTCCAAGATTGCCATATAGCATGCCATA-5'

5'-ATCGGCGGACCGTTAAGGTTCTAACGGTATATCGTACGGTAT-3'
3'-TAGCCGCCTGGCAATTCCAAGATTGCCATATAGCATGCCATA-5'

- B** Unten ist eine Teilsequenz einer Single Guide RNA abgebildet. Der unterstrichene Abschnitt der RNA ist so gestaltet, dass er mit einer bestimmten DNA-Sequenz übereinstimmt.

5'-GGCGGAGCGGUUCUJGGCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC-3'

Im nächsten Abschnitt finden Sie die DNA-Sequenz, die mit der obigen Guide-RNA übereinstimmt. Markieren Sie die eine PAM-Sequenz im oberen Strang (5' bis 3'), die am nächsten zu dieser Target-DNA-Sequenz lokalisiert ist. (Beachten Sie den Austausch von T zu U in der RNA).

5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCCGG-3'
3'-CGTGCCGCCTCGCCAAGAACCGTCGCCGGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'

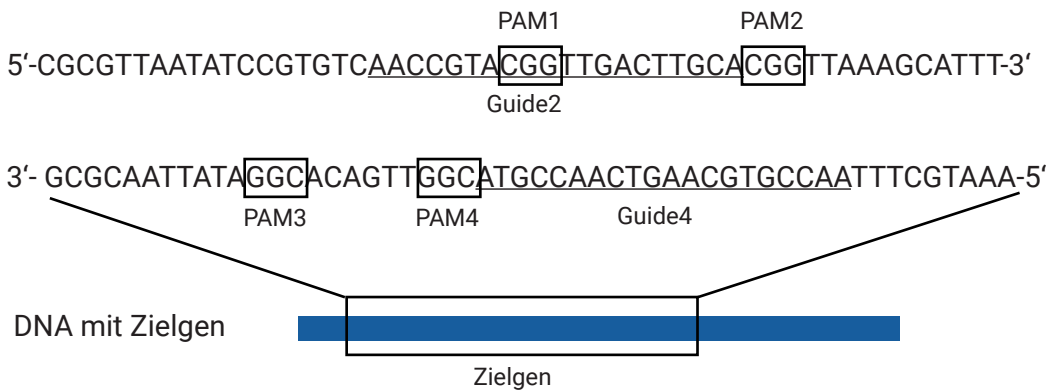
5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCCGG-3'
3'-CGTGCCGCCTCGCCAAGAACCGTCGCCGGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'

C Im Folgenden finden Sie die Teil-Sequenz einer beispielhaften DNA. Beispielhaft wird erklärt, wie zwei Guide-Sequenzen für die gRNAs definiert werden. Dazu geht man folgendermaßen vor:

1. Markieren Sie alle PAM-Sequenzen (NGG) in den DNA-Sequenzbereichen. Ein PAM kann dabei auf beiden Strängen liegen.
2. Markieren Sie nun die möglichen Guide-Sequenzen für gRNA1 und gRNA2. Bedenken Sie, dass die Guide-Sequenz dabei 20 Basen lang sein muss und direkt vor einer PAM-Sequenz liegt. Zur besseren Orientierung ist weiter unten ein Beispiel angegeben.
3. Schreiben Sie die Guide 1-Sequenz in der gRNA1 und Guide 2-Sequenz in der gRNA2 auf. Beachten Sie, dass die Guide-Sequenz immer in 5'-3' Richtung hergestellt wird, egal welcher Guide genommen wird.

Übungsbeispiel:

Es gibt 4 PAM-Sequenzen. Eingezeichnet wurden die Guide-Sequenzen vor PAM 2 und PAM 4.



Guide 2-Sequenz in der gRNA: 5'-AACCGUACGGUUGACUUGCA-3'

Guide 4-Sequenz in der gRNA: 5'-AACCGUGCAAGUCAACCGUA-3'

Fallbeispiel

Im Folgenden finden Sie jetzt eine reale Teilsequenz der DNA des Zebrafisches, die wie oben beschrieben für die Untersuchung verwendet wurde. Diese Sequenz unterscheidet sich bei den verschiedenen Zelltypen und ist deshalb für die Fragestellung geeignet. Bestimmen Sie eine Guide-Sequenz für die gRNA. Gehen Sie dazu wie bereits oben beschrieben vor.

- 1 Markieren Sie alle PAM-Sequenzen (NGG) in den DNA-Sequenzbereichen. Ein PAM kann dabei auf beiden Strängen liegen. Theoretisch eignen sich alle Bereiche, die eine PAM-Sequenz haben für die Untersuchung. Es wird aber nur eine geeignete Sequenz ausgewählt.
- 2 Markieren Sie nun die Guide-Sequenz, die auf dem oberen Strang möglichst weit rechts liegt. Bedenken Sie, dass die Guide-Sequenz dabei 20 Basen lang sein muss und direkt vor einer PAM-Sequenz liegt.

5'-AGGGACCGATAGACATTTGAATGGGTTCTGGAAGATGTTGGACAGGAGT-3'
3'-TCCCTGGCTATCTGTAAACTTACCCAAGACCTTCTACAACCTGTCCTCA-5'

5'-AGGGACCGATAGACATTTGAATGGGTTCTGGAAGATGTTGGACAGGAGT-3'
3'-TCCCTGGCTATCTGTAAACTTACCCAAGACCTTCTACAACCTGTCCTCA-5'

- 3 Schreiben Sie die Guide-Sequenz in der gRNA auf. Beachten Sie, dass die Guide-Sequenz immer in 5'-3' Richtung hergestellt wird, egal welcher Guide genommen wird.

Guide-Sequenz in der gRNA: 5'-GGUUCUGGAAGAUGUUGGAC-3'

Wenn Sie alles richtig gemacht haben, so haben Sie jetzt Zebrafischlarven designed, die unter Fluoreszenzlicht aufleuchten!

Das Ergebnis der Forschenden

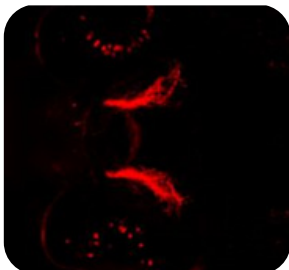


Abb. 3: Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs angefärbte RGCs (Retinal-Ganglion-Zellen) in einer Zebrafischlarve. © MPI für Neurobiologie / Stemmer, Baier

Fünf bis sieben Tage nach Befruchtung werden die Zebrafischlarven unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Bei denjenigen Larven, bei denen das CRISPR/Cas9-System erfolgreich gearbeitet hat, stellen die Zellen eines RGC-Typs das GFP-Protein her und leuchten somit auf.

Sobald den Forschenden dies geglückt ist, können sie nun verschiedenste Versuche durchführen. Zum einen kann das Aussehen und die Struktur der Zellen eines RGC-Typs genau untersucht werden. Die Forschenden können so feststellen, in welche Bereiche des Gehirns die Zellen ihre Axone senden. Auch können diese Zellen inaktiviert und dann analysiert werden, bei welchem Verhalten der RGC-Typ eine Rolle spielt. Ganz konkret konnten die Neurobiolog*innen bereits zeigen, dass bei Inaktivierung eines bestimmten RGC-Typs der Zebrafisch nicht mehr auf Licht zuschwimmt. Ein deutlicher Hinweis darauf, dass dieser RGC-Typ eine Rolle bei der Phototaxis spielt; also dem Verhalten, sich einer Lichtquelle zu nähern.

Beantworten Sie folgende Fragen

- 1** Die Guide-Sequenz ist 17-24 Nukleotide lang. Erklären Sie, warum dies eine für das Experiment gut geeignete Länge ist.

Damit wird sichergestellt, dass die Sequenz möglichst nur einmal im Genom vorkommt und es keine bzw. wenige Schnitte außerhalb der gewünschten Region (sog. off-Targets) gibt.

- 2** Warum ist es günstig für die Gentechnik, dass PAM-Sequenzen nur wenige Nukleotide lang sind?

So können meist mehrere PAMS innerhalb eines Gens gefunden werden.

- 3** Stellen Sie eine Hypothese auf was passiert, wenn Cas9 ein PAM-Motiv auf der DNA entdeckt und dort die DNA-Doppelhelix öffnet, die angelagerte gRNA aber nicht vollständig komplementär zur zugänglichen DNA-Sequenz ist.

Die gRNA kann sich nicht anlagern und der Komplex wandert weiter bis zur nächsten PAM-Sequenz.

- 4** Durch das Schneiden des Cas9-Proteins entsteht ein Doppelstrangbruch in der DNA. Diesen Bruch versucht die Zelle möglichst schnell wieder zu reparieren (sog. nicht-homologe Endverknüpfung). Dabei passieren aber manchmal Fehler, die häufig zu einer abgeänderten DNA führen. Welche Veränderungen (Mutationen) sind denkbar und welche Konsequenzen hätte das für das Gen, bzw. das daraus folgende Protein.

Deletion, Insertion, damit eine Rastermutation. Dies kann aufgrund des kommafreen Triplettcodes zum kompletten Abschalten des Gens und damit zu einem funktionsuntüchtigen Protein führen. Es kann auch zu einem kompletten Abbruch der Translation führen.

- 5** Das CRISPR/Cas9-System kann ebenfalls eingesetzt werden, um gezielt ein Gen aus der Ziel-DNA auszuschneiden. Wie müsste solch ein System aussehen?

Man müsste zwei Cas9-gRNA-Komplexe einsetzen, die komplementär zu Sequenzen vor und hinter dem Zielgen sind und dort zeitgleich schneiden. Dadurch könnte das Zielgen vollständig entfernt werden.