

CRISPR/Cas in „freier Wildbahn“

Start

In diesem Kapitel betrachten wir den Abwehrmechanismus, der das CRISPR/Cas-System in Bakterien „in freier Wildbahn“ ist. Als Gegenstück wird danach die Funktionsweise der CRISPR/Cas-Methode im Labor erklärt.

Voraussetzung für diesen Abschnitt ist die Kenntnis des Aufbaus von DNA, der Proteinbiosynthese und Grundlagen zu Bakterien und Viren.

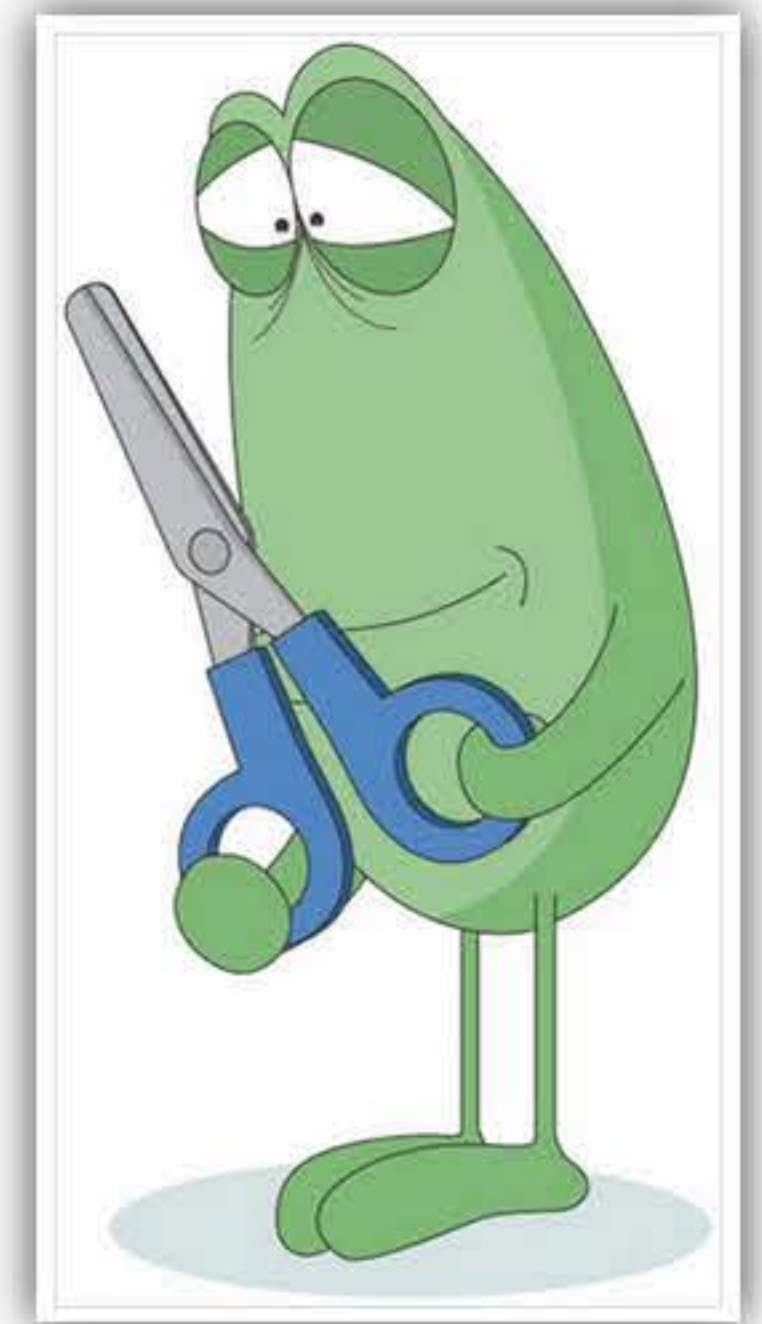


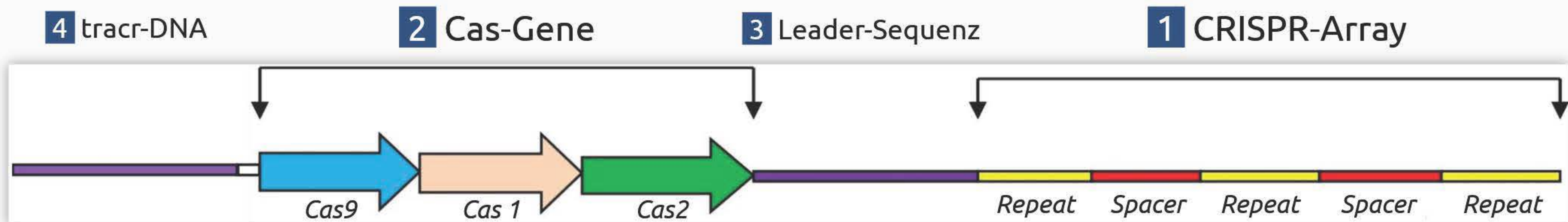
Abb. 1 Darstellung eines Cas9-Proteins

weiter

CRISPR/Cas in „freier Wildbahn“

Der CRISPR/Cas-DNA-Abschnitt

Zu Beginn schauen wir uns den DNA-Abschnitt genauer an, auf dem das bakterielle Abwehrsystem CRISPR/Cas beruht:



tracrRNA:

dient der Verknüpfung von CRISPR-RNA (crRNA) und dem Cas9-Protein

Cas-Gene:

codieren für die Cas-Proteine:
Cas1 und 2 = erkennen Fremd-DNA und bauen sie in das CRISPR-Array ein
Cas9 = schneidet Fremd-DNA auf Grundlage der DNA des CRISPR-Arrays

Leader-Sequenz:

ist der Promotor für das CRISPR-Array.

Repeats:

sich palindromisch wiederholende DNA. Namensgebend für das gesamte System.

Spacer:

DNA von Viren aus zurückliegenden Attacken

weiter

Die drei Phasen des Abwehrmechanismus

Die Funktion des adaptiven „Immunsystems“ von Bakterien

Einleitung: Das Wirkprinzip des bakteriellen CRISPR/Cas-Systems beruht auf der schnellen Wiedererkennung und Zerstörung von Virus-DNA. Obwohl noch nicht alle Schritte dieses „Immunsystems“ bekannt und auch die Funktionen seiner Elemente noch nicht vollständig verstanden sind, hat man die wesentlichen Etappen grundlegend erforscht: Wird ein Bakterium von einem Virus angegriffen, unterteilt sich die Immunreaktion in drei Schritte.

Aufgabe: Lese zuerst den Text und versuche, die drei Phasen des bakteriellen Abwehrmechanismus zu verstehen. Markiere Stellen, die noch unklar sind. Schaue dir danach das Erklärvideo zu den drei Phasen an und entferne die Markierungen im Text, die sich dadurch geklärt haben.

weiter

Die drei Phasen des Abwehrmechanismus

Die Funktion des adaptiven „Immunsystems“ von Bakterien

1) Adaption 2) Expression 3) Interferenz

Injiziert ein Virus einem Bakterium seine DNA, werden die Enzyme **Cas1 und Cas2** aktiv. Cas1 und Cas2 erkennen Virus-DNA und schneiden DNA-Fragmente aus dieser heraus („Protospacer“). Dabei schneiden die Enzyme lediglich an ganz bestimmten Stellen, den so genannten PAM-Sequenzen.

PAM-Sequenzen bestehen aus der Basenabfolge NGG, wobei N eine der vier möglich Basen Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin sein kann. Eine derartige Basenfolge kommt häufig vor. Dort binden Cas1 und Cas2 und schneiden das DNA-Fragment vor dem PAM-Motiv aus. Auf diese Weise wird eine Selbstzerstörung des CRISPR/Cas-Systems vermieden, denn: Das Resultat der Aktivität von Cas1 und Cas2 sind Virus-DNA-Fragmente, die keine PAM-Sequenz mehr enthalten.

Im nächsten Schritt bauen Cas1 und Cas2 die Protospacer in das **CRISPR-Array** des eigenen Genoms ein. Die Abschnitte werden ohne das PAM-Motiv in das CRISPR-Array eingebaut. Dadurch können die Cas-Proteine die im CRISPR-Array eingebaute Virus-DNA nicht zerschneiden. Das CRISPR-Array besteht nun aus den CRISPR, also den „Repeats“, zwischen denen die ursprüngliche Virus-DNA, nun „Spacer“ genannt, eingebaut wurde.

Die drei Phasen des Abwehrmechanismus

Die Funktion des adaptiven „Immunsystems“ von Bakterien

1) Adaption 2) Expression 3) Interferenz

Die Expressions-Phase ist der zweite Schritt des Abwehrmechanismus. Sie hat ein funktionales **Cas9**-Protein als Endprodukt. Cas9 ist in der Lage, aus früheren Attacken bekannte Virus-DNA in kurzer Zeit wiederzuerkennen und zu zerstören.

Strukturell handelt es sich bei einem funktionalen Cas9-Protein um ein Assemblierungsprodukt aus zwei RNA-Sequenzen, der CRISPR-RNA (crRNA), der trans-activating-RNA (tracrRNA) und dem Cas9-Protein. Während die crRNA einen Teil der CRISPR-Array-Informationen, nämlich die eines Spacers, trägt, besteht die Funktion der tracrRNA darin, crRNA und Cas9 miteinander zu verbinden. Dazu ist die tracrRNA in der Lage, mit ihrem 5'-Ende über komplementäre Basenpaarungen mit einem Teil der crRNA zu hybridisieren und sich mit ihrem 3'-Ende an Cas9 anzulagern.

Die drei Phasen des Abwehrmechanismus

Die Funktion des adaptiven „Immunsystems“ von Bakterien

1) Adaption 2) Expression 3) Interferenz

Im dritten Schritt der Abwehrreaktion, der Interferenz-Phase, wird bekannte parasitische DNA identifiziert und gezielt zerschnitten. Dabei erfolgt die Zerstörung dieser DNA durch Cas9 nicht an zufälligen Stellen. Die PAM-Sequenz ist die Erkennungsstelle für die molekulare Schere. Wenn die Virus-DNA vor dem PAM-Motiv mit der gespeicherten DNA-Vorlage, dem Spacer, übereinstimmt, dann zerschneidet Cas9 den viralen DNA-Strang. Durch die PAM-Sequenz wird sichergestellt, dass nur fremde DNA geschnitten wird.

Im folgenden Erklärvideo wird der Mechanismus noch einmal vereinfacht dargestellt.

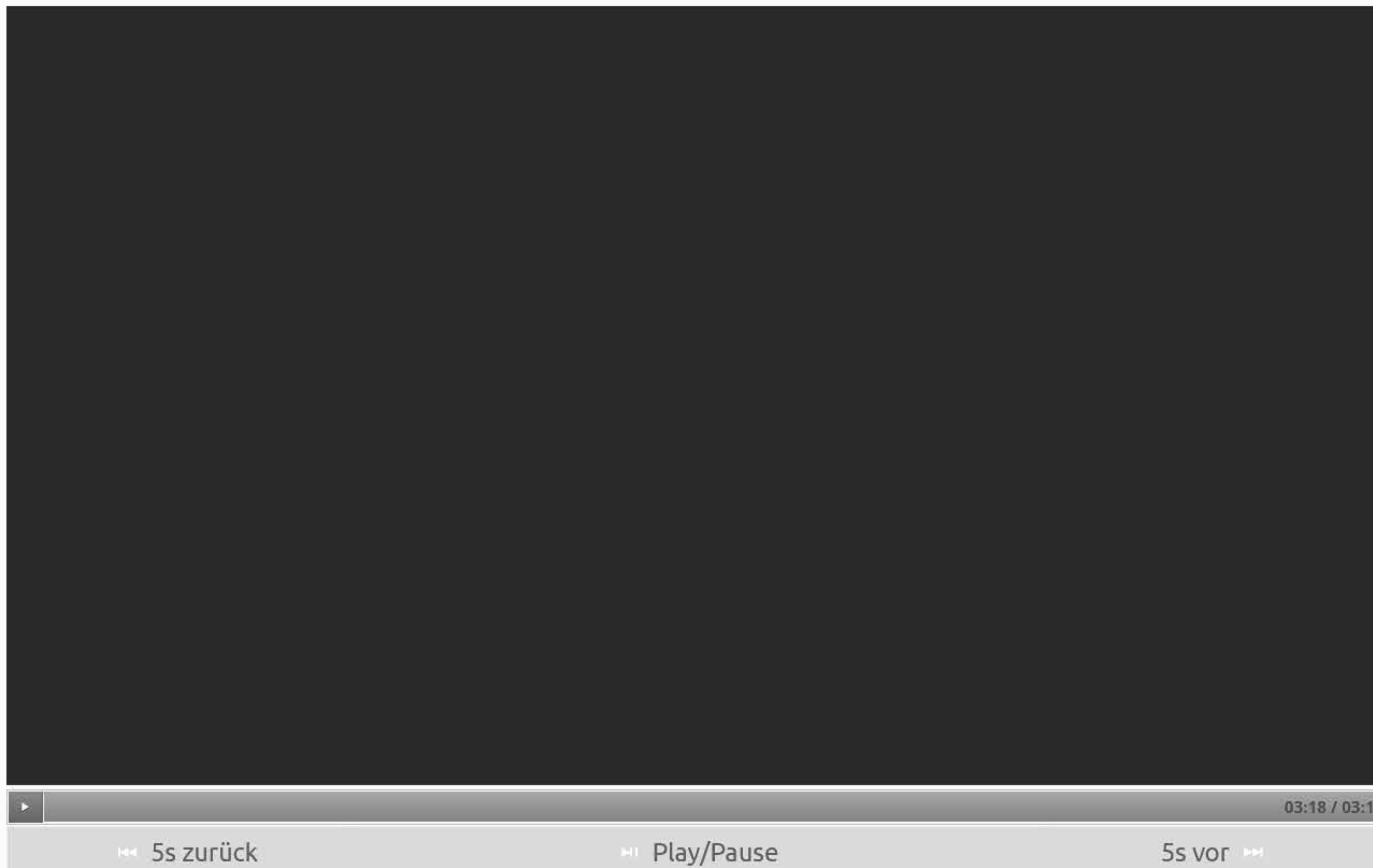
[Video jetzt anschauen](#)

[weiter](#)

CRISPR/Cas in „freier Wildbahn“

Die drei Phasen des Abwehrmechanismus

Die Funktion des adaptiven „Immunsystems“ von Bakterien



Das PAM-Motiv habe ich nicht verstanden:
<https://youtu.be/b4c2sqLtlbs?t=10>

Mir sind die drei Phasen unklar:

Verständnishilfe anzeigen

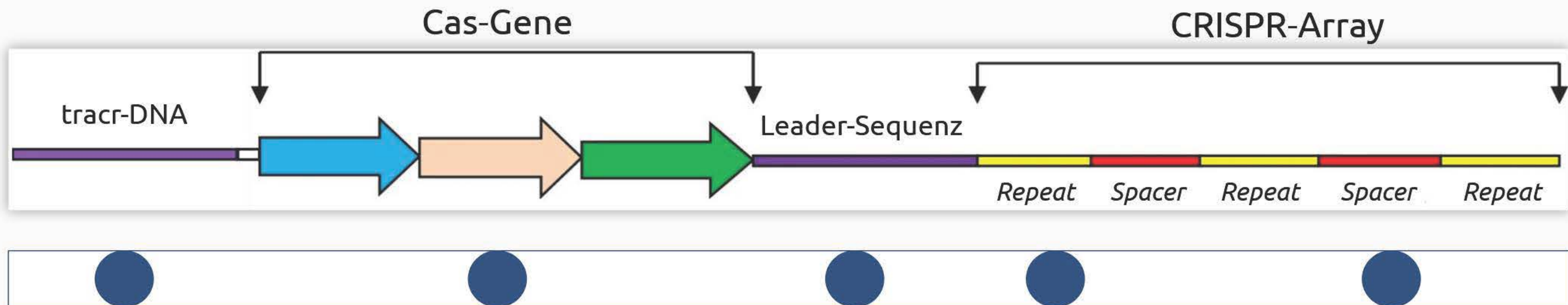
weiter

Video neu starten

CRISPR/Cas in „freier Wildbahn“

Test

1. Ordne den Bestandteilen des CRISPR/Cas DNA-Abschnitts ihre richtige Funktion zu. Ziehe die Beschriftungen dafür auf die blauen Punkte im Kasten unter der Abbildung (Abb. 3).



sich wiederholende
DNA-Stücke, dienen als
Speicherort für das
Bakterium

DNA-Fragmente von
Viren

codieren für die CRISPR-
assoziierten (Cas) -
Proteine

Promotorfunktion

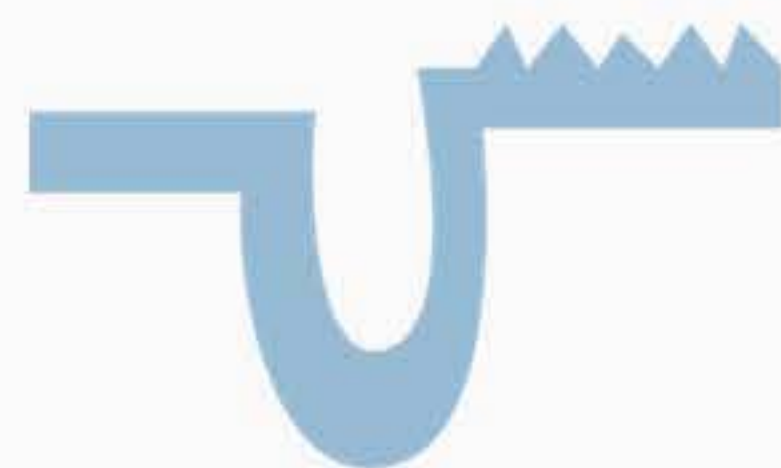
stellt Verbindung
zwischen crRNA und
Cas9 her

überprüfen

CRISPR/Cas in „freier Wildbahn“

Test

2. Baue das vollständig funktionale Cas9-Protein („Cas9-Endonuklease“) nach.
Ziehe die Bestandteile an die richtige Stelle im Protein.

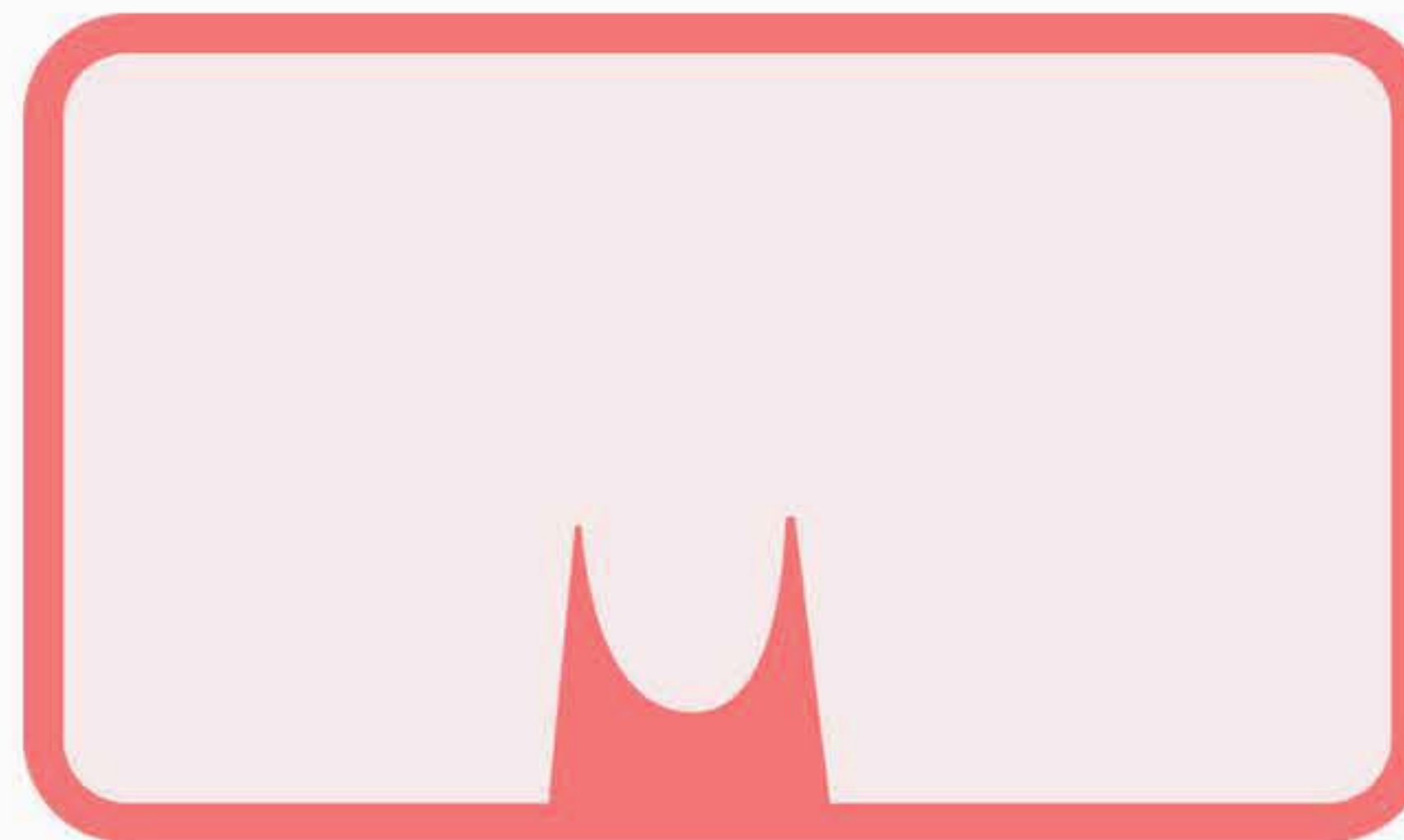


tracrRNA



Spacer Repeat

crRNA



prüfen

DU BIST FERTIG MIT

KAPITEL 2

[WEITER ZU KAPITEL 3](#)

[PDF](#)