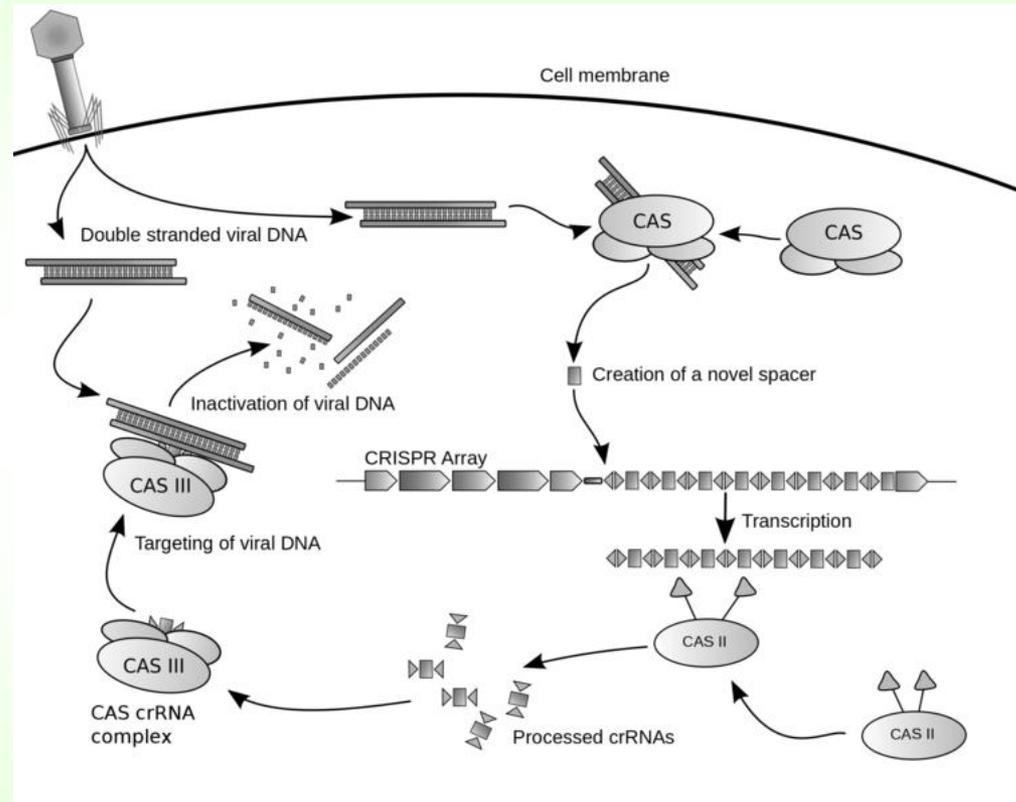
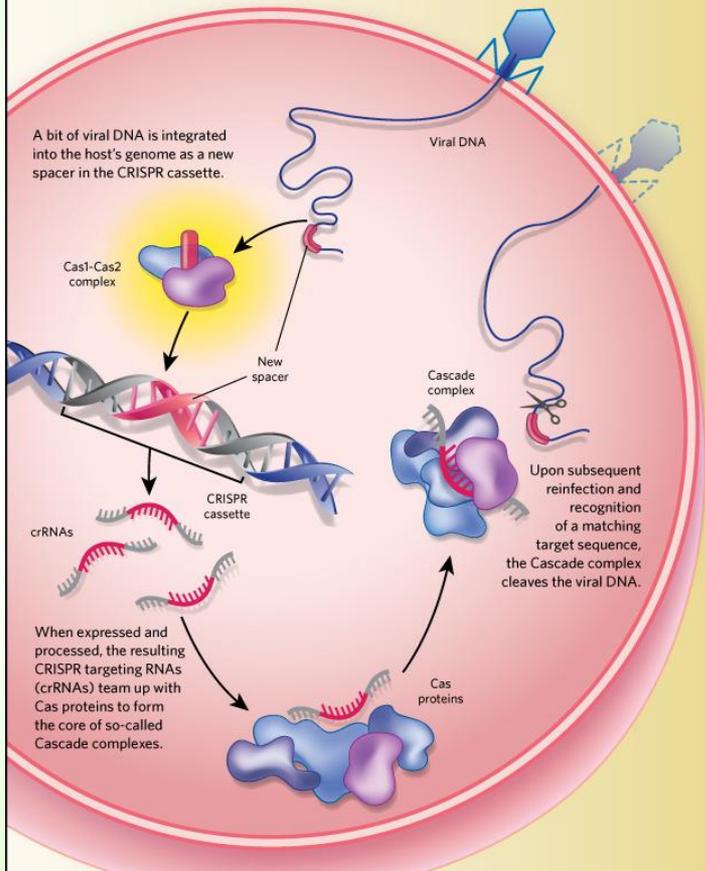


4. CRISPR-Cas Verfahren

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CAS - CRISPR associated proteins

PROKARYOTES

It turns out that prokaryotes can also remember previous pathogens they've encountered in what can be considered an analogous system to vertebrate adaptive immunity. The CRISPR-Cas system allows microbes to insert spacers, short bits of plasmid or virus DNA, into the CRISPR cassettes, clusters of spacers interspersed with short direct repeats. The expression of these sequences can be processed by the cell and used to guide the targeted destruction of plasmid or viral DNA.



TRANSPOSON CONNECTION: The function of Cas1, the key enzyme of CRISPR-Cas that is responsible for the acquisition of foreign DNA as spacers within CRISPR units, resembles the activity of MGE recombinases. In the recently discovered casposons, a distinct group of transposons, a Cas1 homolog is predicted to function as a recombinase.



4. CRISPR-Cas9 Verfahren zur Mutation

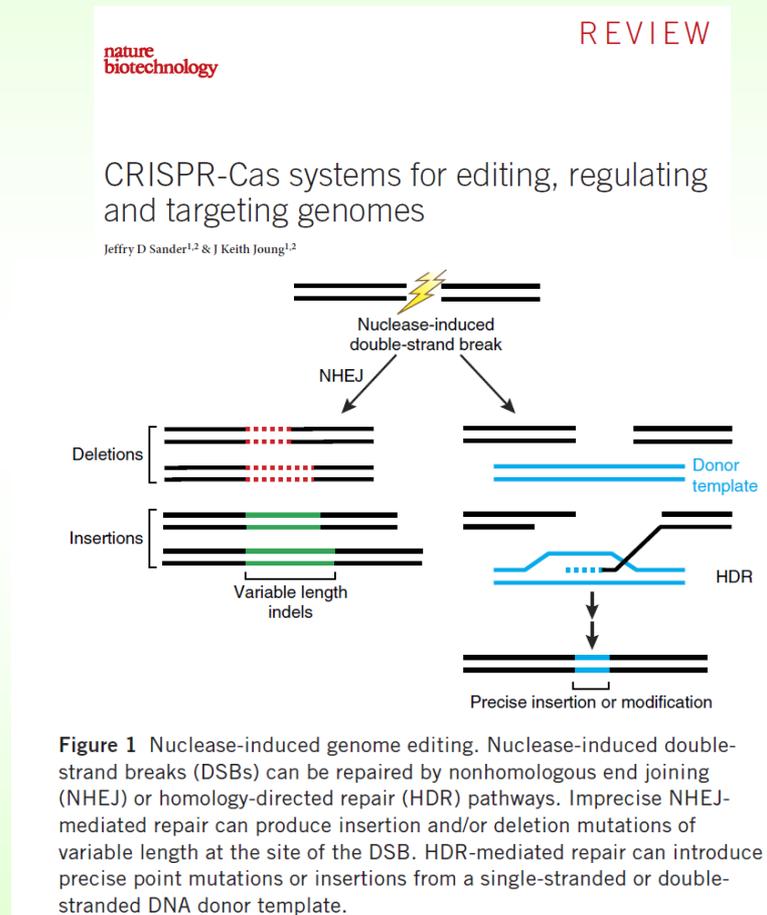
WIKIPEDIA:

Die Endonuklease Cas9 (von *CRISPR-associated*) kann eine bestimmte RNA-Sequenz (*crRNA repeat*, Sequenz GUUUUAGAGCU(A/G)UG(C/U)UGUUUUG) binden. Diese *crRNA repeat*-Sequenz bildet eine RNA-Sekundärstruktur und wird dann von Cas9 gebunden. Als zweiten Teil besitzt die *crRNA* eine Sequenz, welche komplementär zur Ziel-DNA ist und an die Ziel-DNA bindet (*crRNA spacer*).

Wird an eine *crRNA repeat*-Sequenz anstatt der natürlich vorkommenden *crRNA spacer*-Sequenz eine andere, zu einer DNA-Zielsequenz komplementäre RNA-Sequenz angefügt und diese *crRNA* zu einer zur DNA-Sequenz analogen RNA (*tracrRNA*, von engl. *trans-acting CRISPR RNA*) hinzugegeben, schneidet Cas9 die DNA nahe der Zielsequenz. Die beiden RNA-Stränge der *crRNA* und der



4. CRISPR-Cas9 Verfahren zur Mutation nutzt einen natürlichen DNA-Reparaturprozess



Problem: sogenannte off target

CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes

Jeffrey D Sander^{1,2} & J Keith Joung^{1,2}

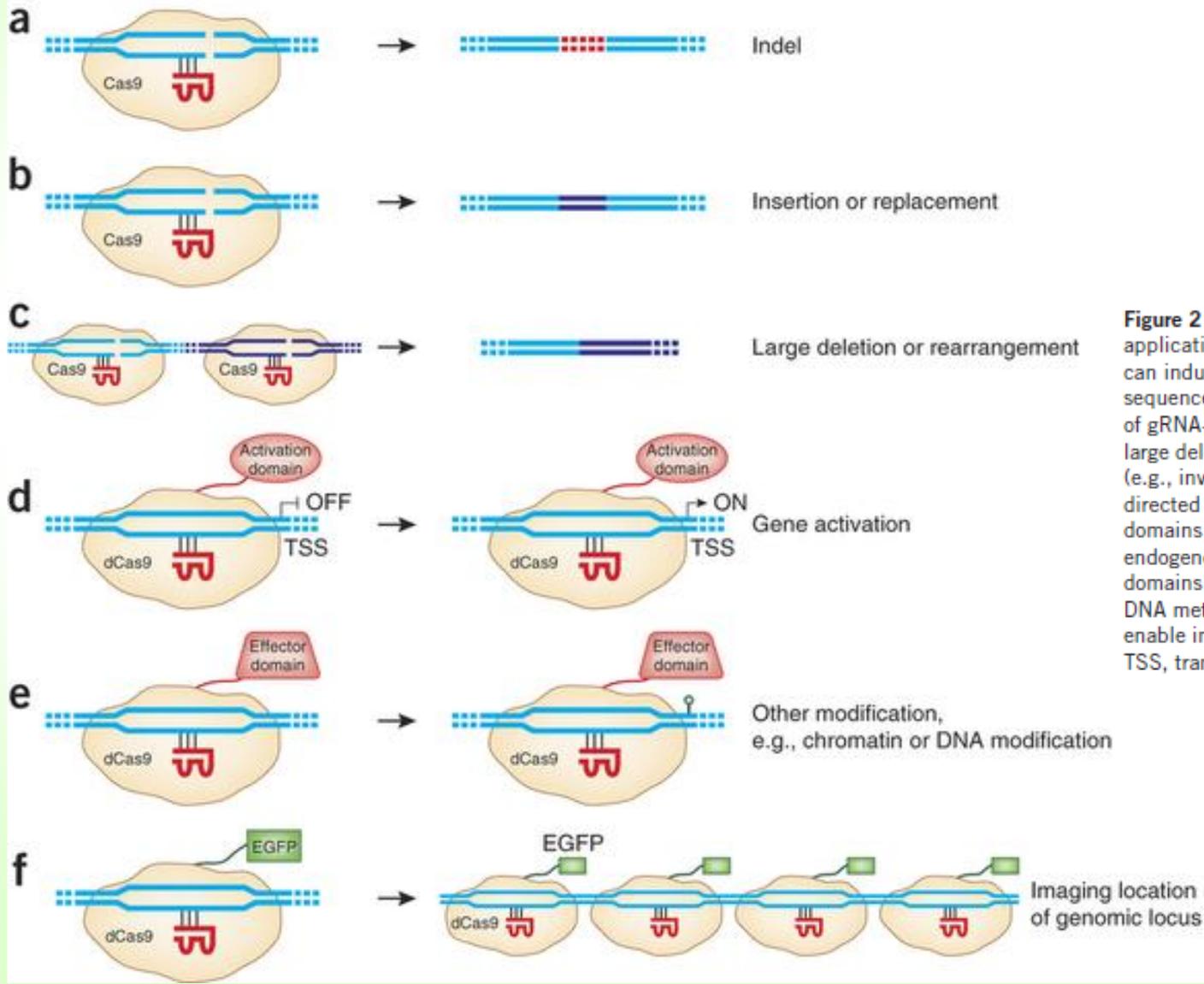


Figure 2 Overview of various Cas9-based applications. (a,b) gRNA-directed Cas9 nuclease can induce indel mutations (a) or specific sequence replacement or insertion (b). (c) Pairs of gRNA-directed Cas9 nucleases can stimulate large deletions or genomic rearrangements (e.g., inversions or translocations). (d-f) gRNA-directed dCas9 can be fused to activation domains (d) to mediate upregulation of specific endogenous genes, heterologous effector domains (e) to alter histone modifications or DNA methylation, or fluorescent proteins (f) to enable imaging of specific genomic loci. TSS, transcription start site.

Katie Vicari



Untersuchung und Verifikation der Mutationen durch Komplementation

1. **Komplementation mit nativem Gen, essentielle Kontrolle**
2. Komplementation mit deletiertem/mutiertem Gen
3. Komplementation mit homologem (orthologem) Gen aus anderen Arten
4. Komplementation mit Gen, dessen Domänen (domain swapping) bzw. AS-Reste (site-directed) ausgetauscht worden sind
5. Untersuchungen mehrerer unabhängiger Mutanten im gleichen Gen



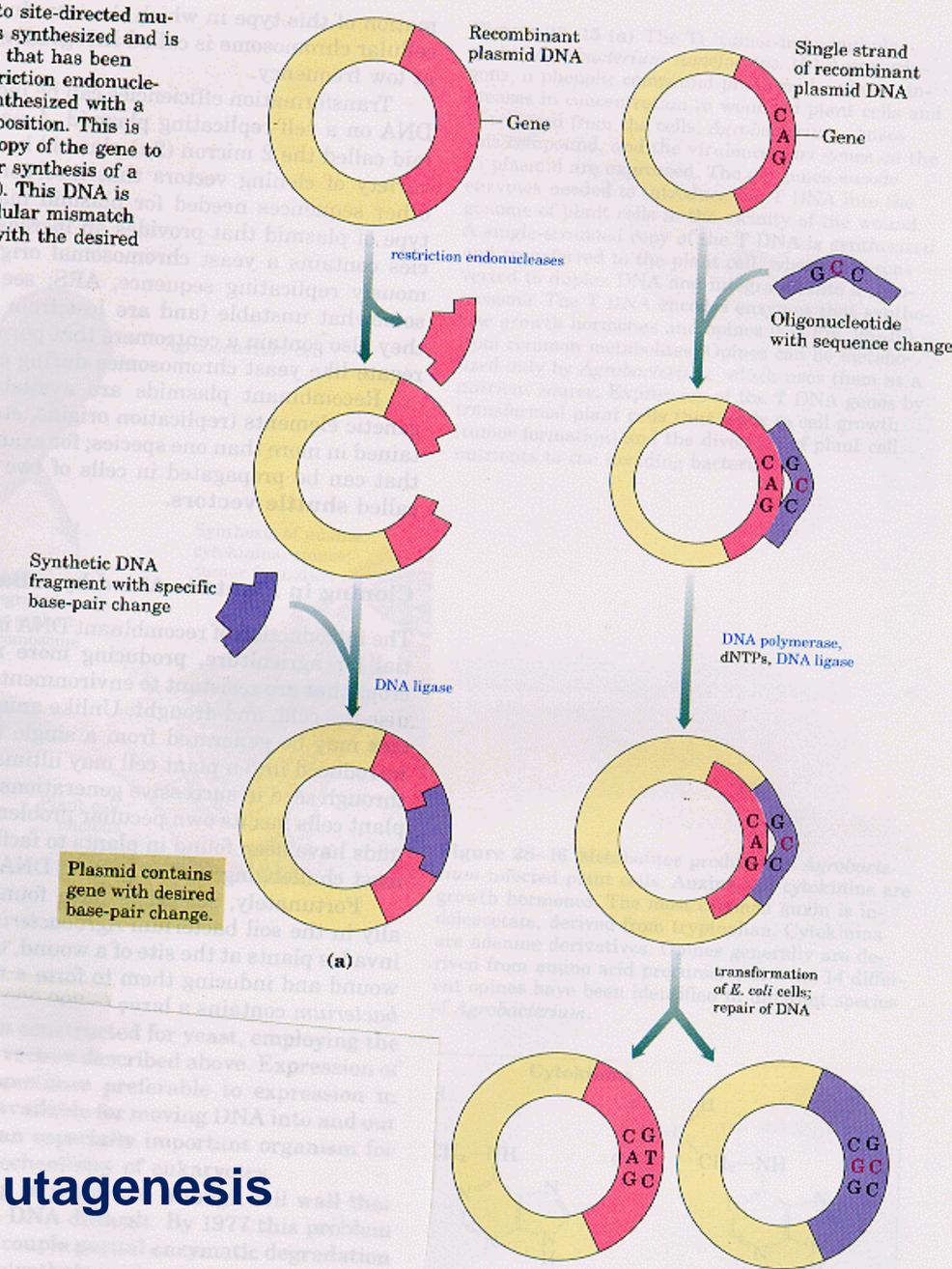
2. Site directed mutagenesis

- Gezielter Austausch einer Aminosäure gegen eine andere, auch größere Umbauten möglich
- Herstellung der codierenden Sequenz des Zielgens (PCR, Klon)
- Herstellung von Primern mit Punktmutationen
- Nutzung der Primer zur PCR
- Klonierung der geänderten DNA
- Proteinexpression – Enzymaktivität
- Transformation – Phänotyp

- Heute bei genügend Geld – komplette Gensynthese



Figure 28-14 Two approaches to site-directed mutagenesis. (a) A DNA segment is synthesized and is used to replace a DNA fragment that has been removed by cleavage with a restriction endonuclease. (b) An oligonucleotide is synthesized with a desired sequence change at one position. This is hybridized to a single-stranded copy of the gene to be altered, and acts as primer for synthesis of a duplex DNA (with one mismatch). This DNA is then used to transform cells. Cellular mismatch repair will produce some clones with the desired sequence change.



In *E. coli* cells, about half of plasmids will have gene with desired base-pair change.

Kits für random Mutagenesis



Methoden und Anwendungen der Gentechnik

1. Einführung, Enzyme als Werkzeuge der Gentechnik
2. Plasmide, Phagen und andere Vektoren
3. Herstellung von Genbanken
4. Screening von Genbanken
5. Promotoranalyse und Reportergene
6. Sequenzierungsverfahren
7. Arbeiten mit RNS (Reinigung, reverse transcription ...)
8. „omics“ Methoden
9. Mutagenese-Verfahren
10. Funktionelle Genomanalyse
- 11. Expressionssysteme für Proteine**
- 12. (Praktikum, 13.2.-24.2.2017, 9.00 bis max. 17.00 Uhr)**



Warum brauchen wir so etwas?

1. Untersuchung der Struktur, Funktion und Expression
→ Wurde die richtige DNA-Sequenz isoliert?
→ Welche Funktion besitzt das Genprodukt?
2. Untersuchung der Struktur, Funktion und Biosynthese von Proteinen
→ Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen
→ Einführung stabiler Isotope (^{15}N , ^2H , ^{13}C , vor allem für NMR)
→ Enzymatische Analyse
→ Herstellung und Analyse von Mutantenproteinen
3. Medizinische und biotechnologische Anwendungen
→ Kostengünstige Herstellung von nieder- und hochmolekularen Substanzen unterschiedlichster Art (Medizin, Industrie)
→ Insulin, Proteasen, Laccasen



Beispielsweise für Impfstoffe

Hepatitis B ist weltweit verbreitete Krankheit

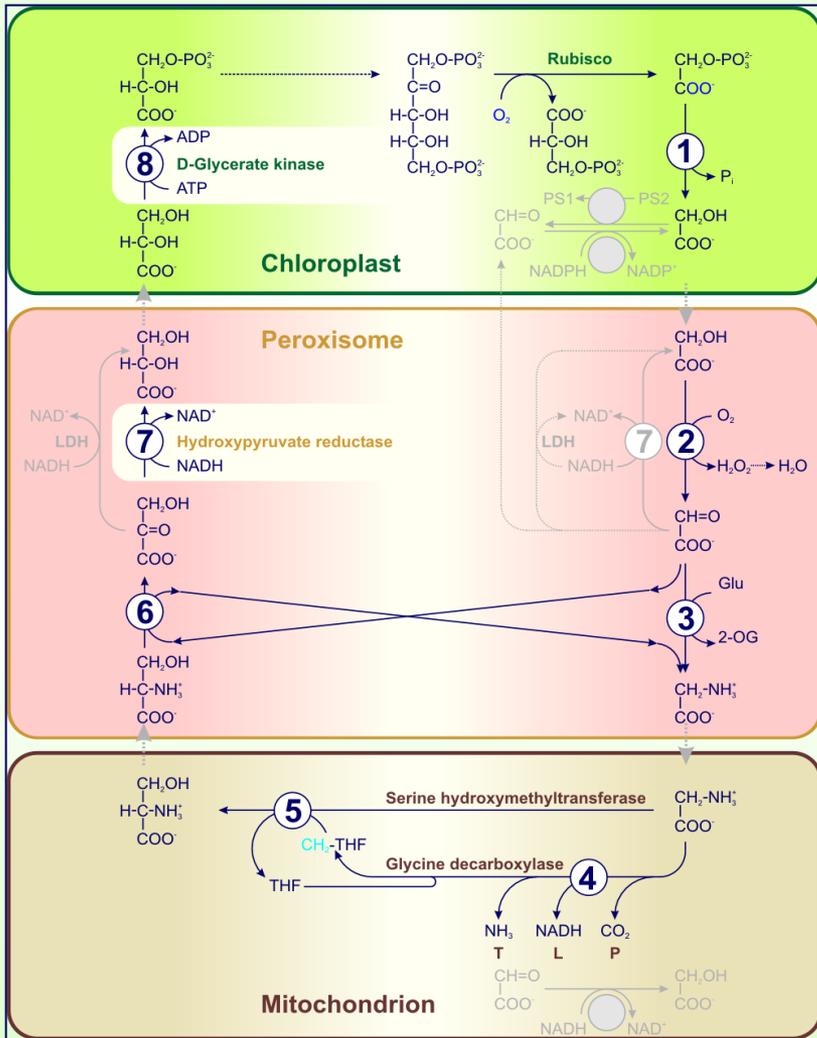
- Hervorgerufen durch Hepatitis B-Virus (HBV).
- Bewirkt zellzerstörende Entzündungen mit schwerer Beeinträchtigung der Leberfunktion

Zwei Arten von Hepatitis B-Vakzinen sind verfügbar:

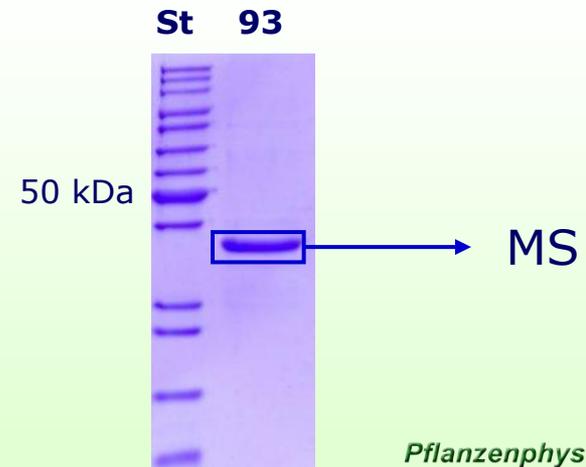
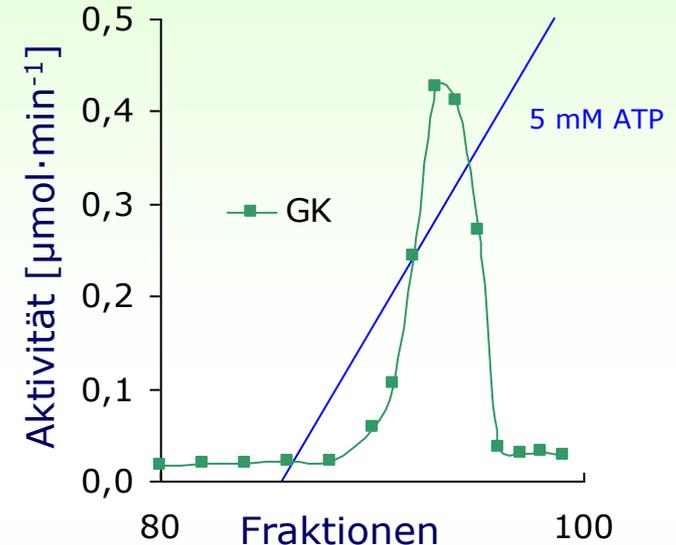
1. Aus Blutplasma
 - Kontaminationsrisiko (z.B. HIV)
 - Komplexe Produktionsverfahren und aufwändige Testung
 - Hohe Kosten
2. Gentechnisch hergestellt
 - Hohe Qualität bei geringen Kosten



Beispielsweise in der Grundlagenforschung Funktionelle Beschreibung der Photorespiration

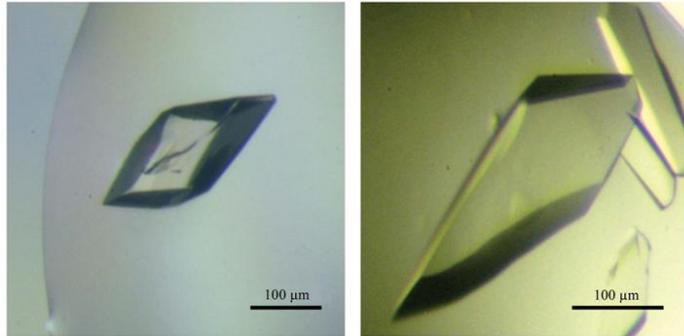


Matrex®GreenA



Beispielsweise in der Grundlagenforschung Kristallisierung des P-Proteins

P-Apoproteinkristalle

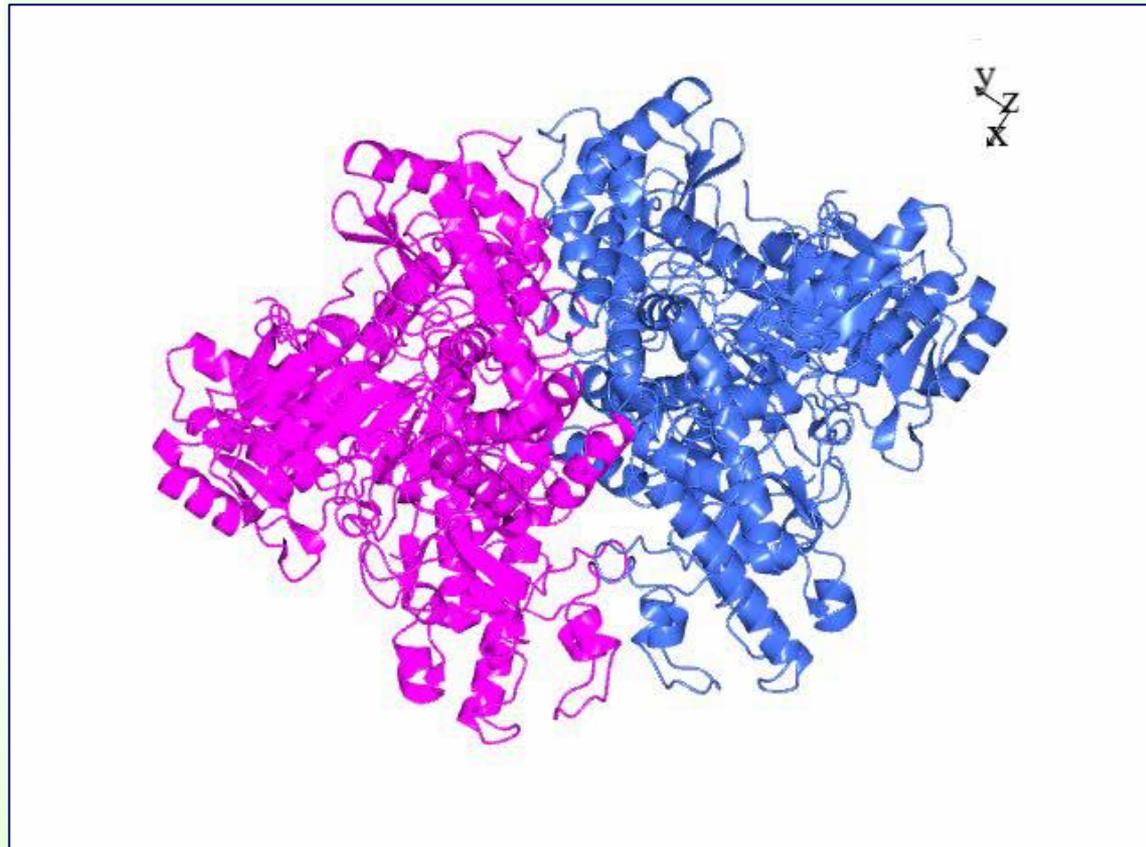
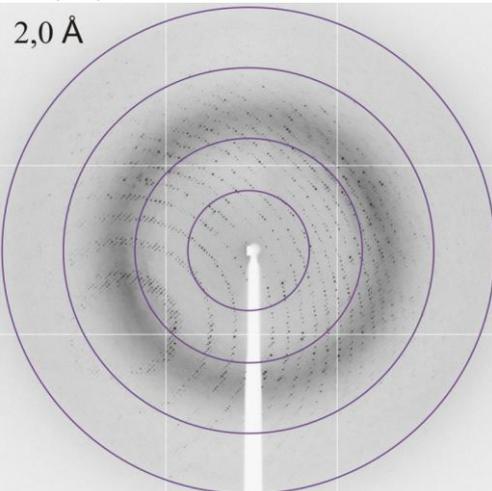


Hasse et al., 2010, Acta Cryst. F66, 187-191

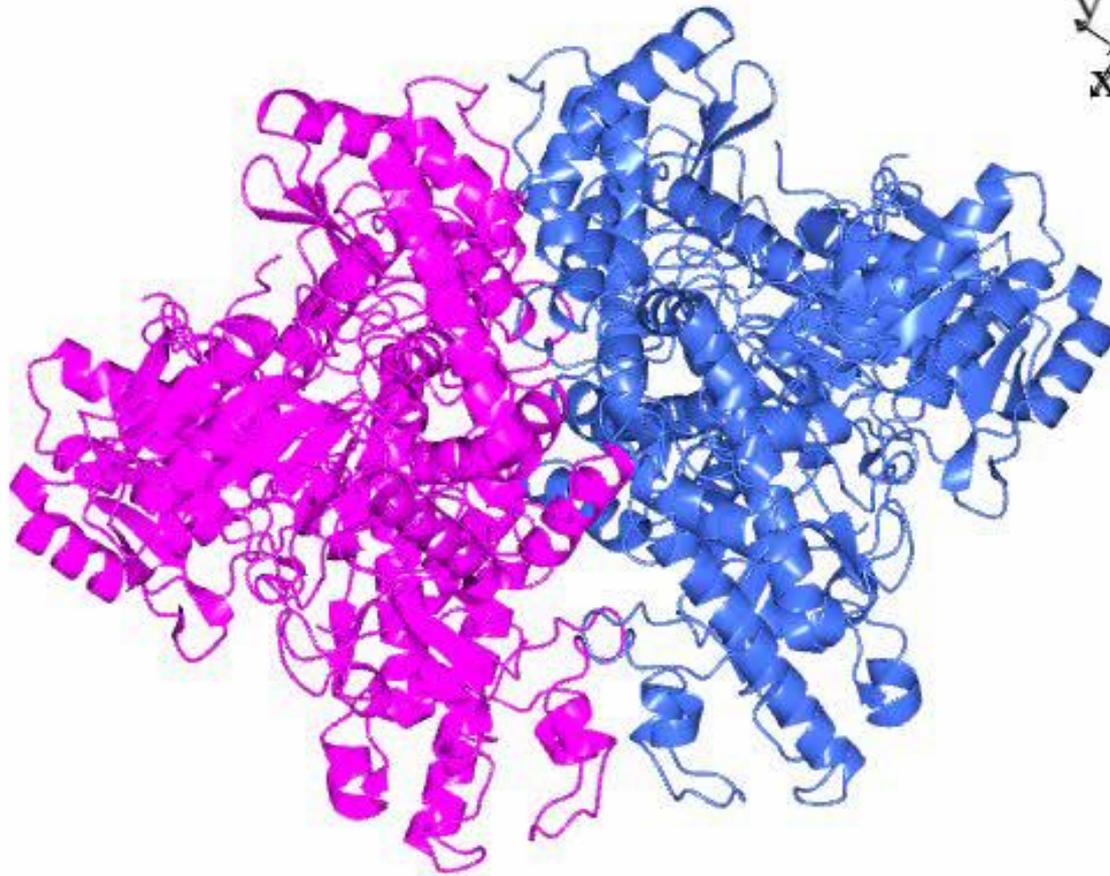


ESRF Grenoble

Beugungsmuster



P-Proteinstruktur



Gemeinsame Eigenschaften von Expressionssystemen

1. Gen-Klonierung in einen Expressionsvektor
2. Transformation des Wirtsorganismus
3. Selektion der Transformanden
4. Anzucht des Wirtsorganismus und Expression
5. Reinigung des Proteins



Einige Problembereiche

Herstellung rekombinanter Proteine in angemessener Ausbeute ist oft schwierig

- Instabilität
 - der Stämme & Plasmide
 - des Antibiotikums (z.B. Ampicillin wird hydrolysiert)
- Geringe Ausbeute
 - Proteolyse
 - Arg-Codons AGA und AGG werden in Eukaryoten oft, in *E. coli* jedoch selten benutzt (→ tRNA-Überexpression)
- Keine biologische Aktivität
 - Post-translationale Prozessierung (Disulfid-Brücken ...)
 - Faltung



Wie wird ein einfacher Klonierungsvektor zum Expressionsvektor?

1. Elemente für Transkription

- Promotor,
- Terminator,
- Regulationssequenzen (z.B. lac-Operator, lac-Repressor, Introns)

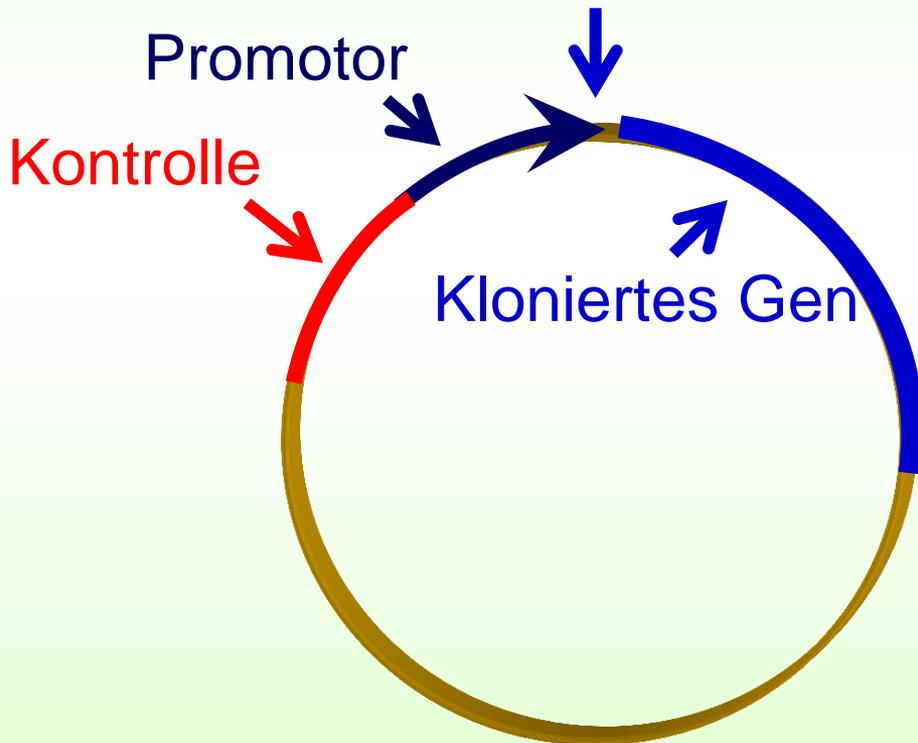
2. Elemente für Translation

- Ribosomenbindungsstelle (in Bakterien Shine-Dalgarno)
- Translationsinitiation (ATG, oder, selten GTG oder TTG)
- Translationstermination (TAA, TGA, TAG)

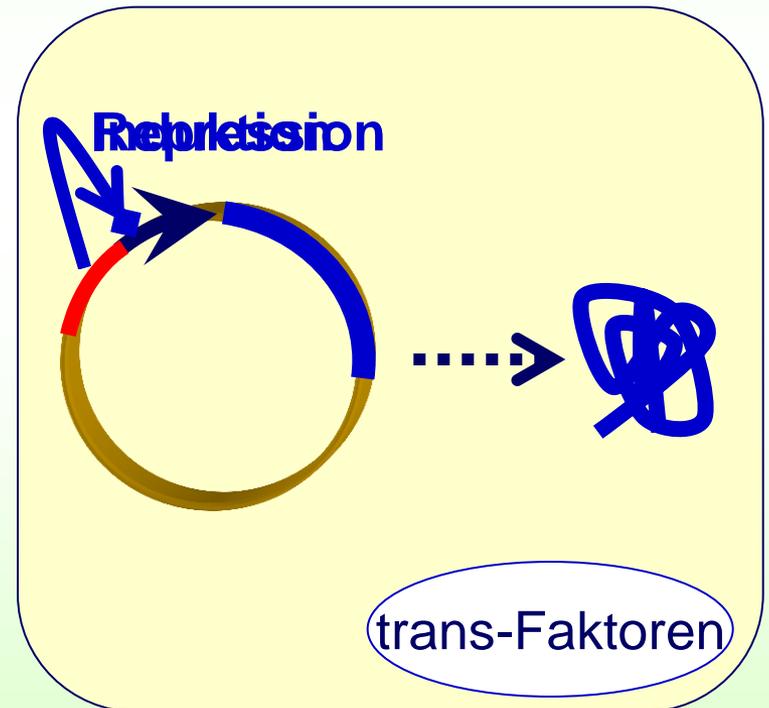


Wie funktioniert das? Was brauchen wir?

REKOMBINANTER EXPRESSIONSVEKTOR



TRANSGENE WIRTSZELLE



Systeme zur heterologen Genexpression

Hauptgruppen

- Escherichia coli
 - Bacillus subtilis
 - Hefe
 - Baculovirus & Insektenzellen
 - Säuger-Zellen
 - Pflanzen
- Jedes System besitzt spezifische Vor- und Nachteile
- Erfolgreiche Synthese von Fremdproteinen ist in jedem System im wesentlichen empirisch



Es gibt kein ideales Expressionssystem: Vorüberlegungen

- Hohe Ausbeute erforderlich?
- (Korrekte) biologische Aktivität erforderlich?
- (Korrekte) posttranslation. Modifikationen erforderlich?
- Einfache Reinigung erwünscht?
 - Intrazelluläre Akkumulation
 - Exkretion ins Medium
- Hohe Reinheit erforderlich?
- Aufwand und Kosten, spezifische Geräte
- Haben wir (oder Kollegen) schon Erfahrungen?



Systeme zur heterologen Genexpression

1. *Escherichia coli*

Vorteile:

- Einfache gentechnische Manipulation
- Viele und gut kontrollierbare Vektoren
- Kurze Generationszeit
- Anzucht einfach & billig

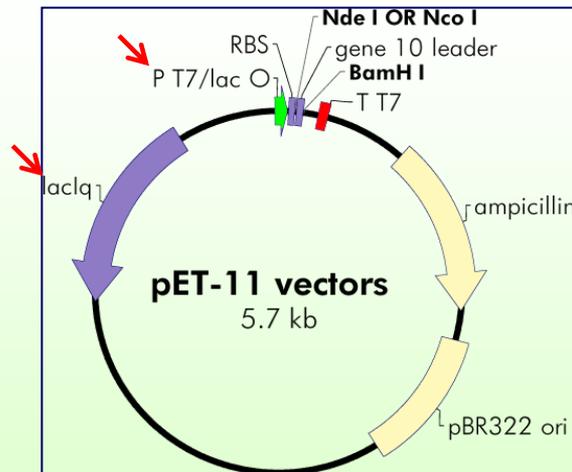
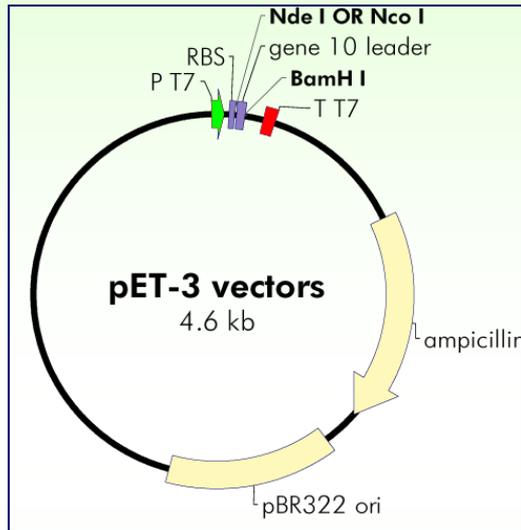
Nachteile:

- Oft geringe Ausbeute
- Viele toxische Proteine
- Renaturierungsprobleme (Inclusion bodies)
- Bei eukaryotischen Proteinen
 - Keine (falsche) post-translationale Prozessierung
 - Codon usage / tRNA
- ...



1. *Escherichia coli*

1.3. Optimierte Expressionsvektoren



pET3

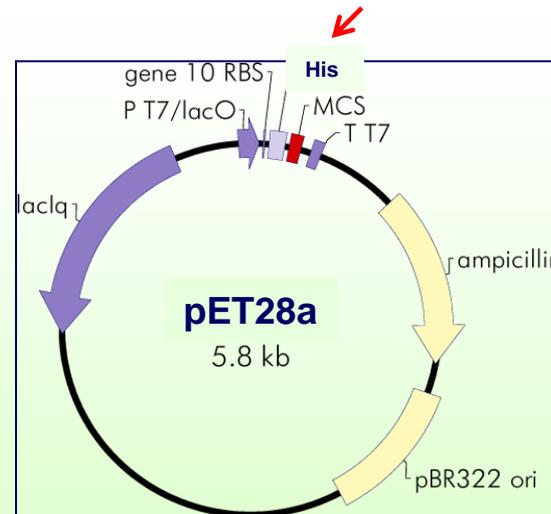
→ nicht reprimierbar (leaky)

pET11

→ lacI^q Repressor (less leaky)

pET28

→ Affinitätstag (less leaky & Affinitäts-Reinigung)



1. *Escherichia coli*

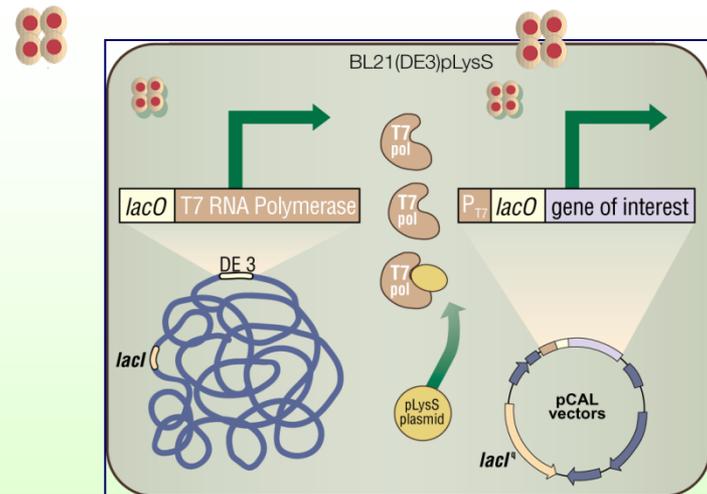
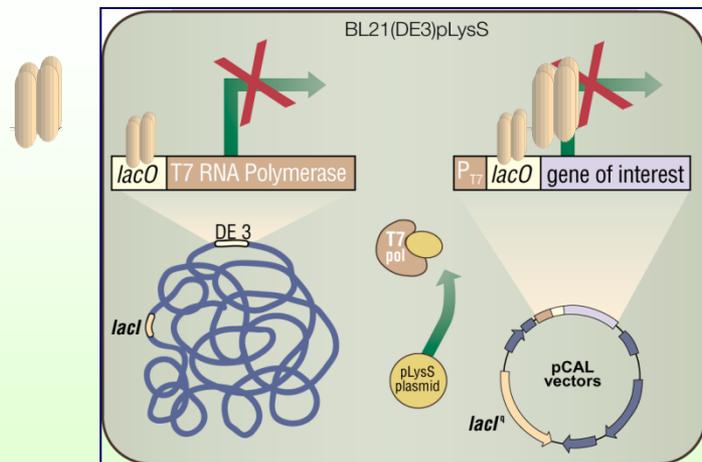
1.4. Expressionskontrolle

Repression:

1. Transkription von T7 RNA-Polymerase und Fremdgen blockiert durch **Lac Repressor**
2. *pLysS* Plasmid produziert **T7-Lysozyme** (Inhibitor der T7 Polymerase)

Induktion:

1. IPTG bindet an Lac-Repressor und deprimiert *lac* Operator.
2. Hohe Expression der T7-Polymerase macht Hemmung durch T7 Lysozyme unwirksam
3. **Hohe Expression des Fremdgens**

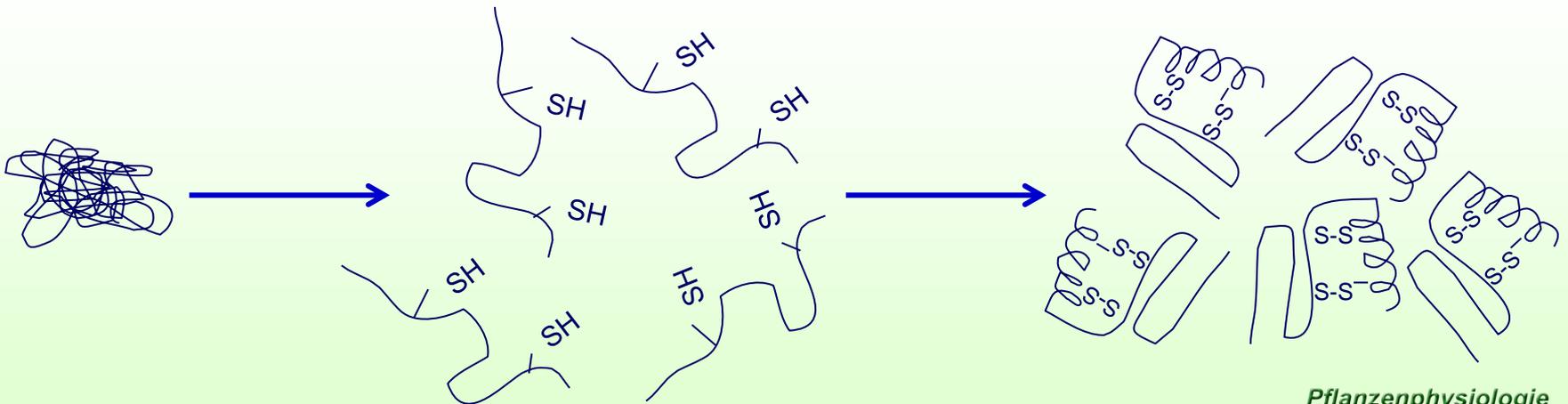


1. *Escherichia coli*

1.5. Inclusion Bodies – Problem und Vorteil

Häufig präzipitieren Proteine als schwer lösliche Aggregate im Cytoplasma.

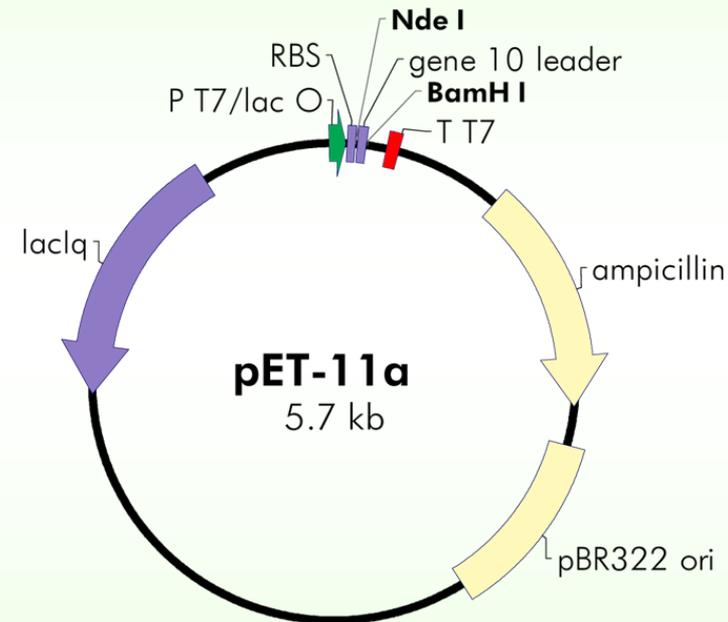
1. Lyse der Bakterien (z.B. Ultraschall)
2. Inclusion bodies abzentrifugieren
3. Vollständig denaturieren (Guanidinium-HCl, DTT)
4. Langsam renaturieren (Dialyse)



1. *Escherichia coli*

1.6 Expressionsvektoren - Zusammenfassung

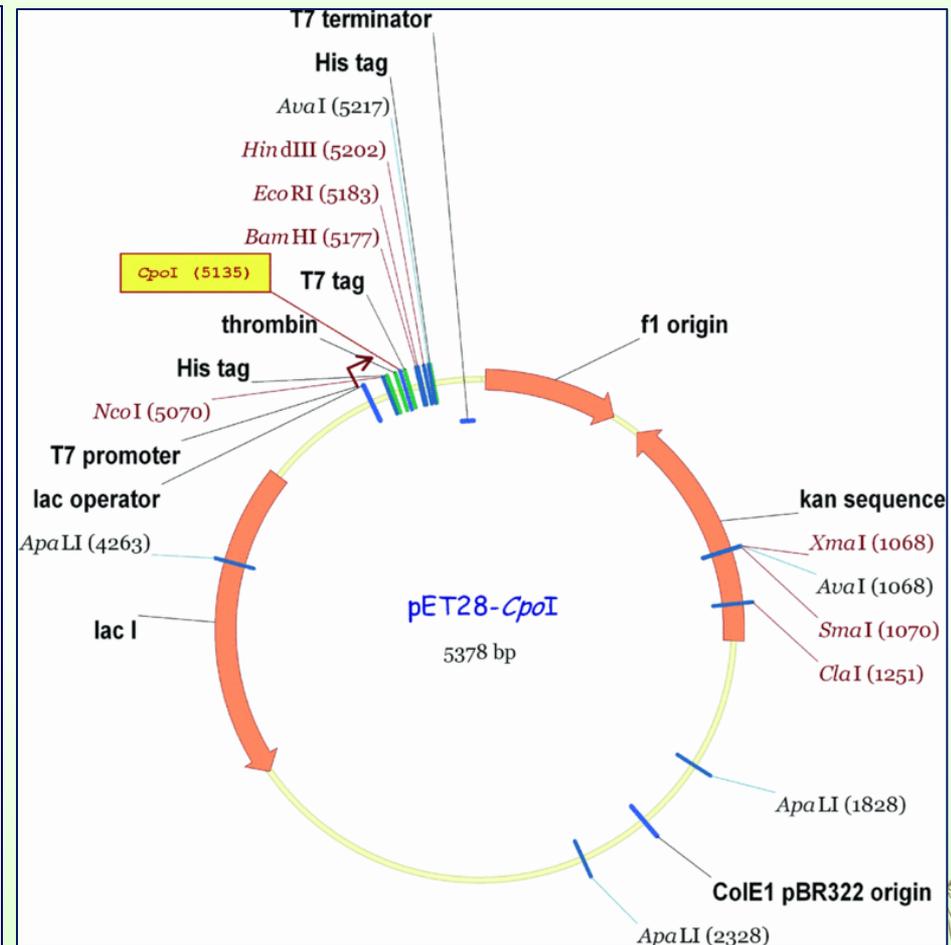
1. Optimiert für Expression (Transkriptions- und Translationsstart) im gegebenen System (hier *E. coli*)
2. Vektorvarianten erlauben Fusion im passenden Leseraster mit bzw. ohne leader
3. Effizientes und gut kontrollierbares Promotorsystem
 - Hier T7-Promotor kombiniert mit *lac*-Repressor, regulierbar mit IPTG (Isopropylthiogalactosid)
4. T7 RNA-Polymerase wird *trans* im geeigneten Wirtstamm bereitgestellt (z.B. auf Lysogen oder extra Plasmid)



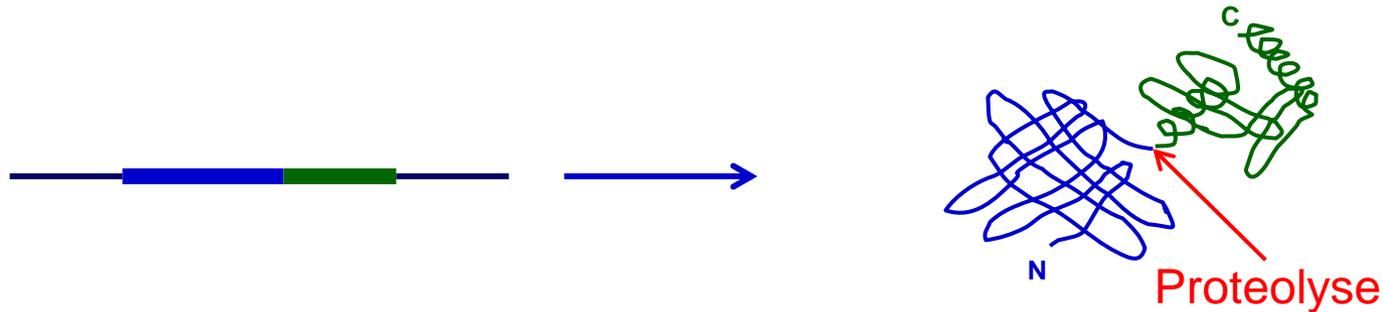
1. *Escherichia coli*

1.6 Expressionsvektoren – Zusammenfassung 2

1. Moderne Vektoren pET28a enthalten Tag-Sequenzen für eine bessere Aufreinigung (hier His-tag)
2. Sollten durch Protease entfernbar sein (hier Thrombin)



Warum sind Fusionsproteine nützlich?



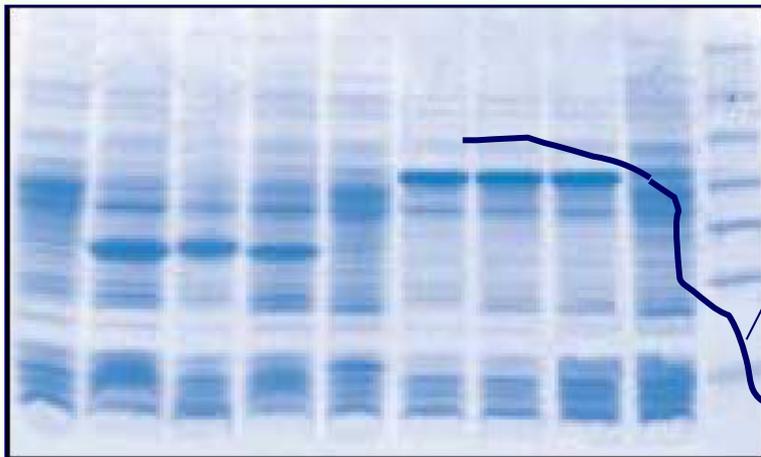
1. Nutzung der Eigenschaften des Fusionsproteins für biologische Studien
2. Expression toxischer/problematischer Proteine (Intein-System)
3. Reinigung durch Affinitätschromatografie
4. Fusions-Proteine begünstigen korrekte Faltung
 - Maltose binding protein (*pMal-c* und *p*),
 - Glutathion-S-transferase



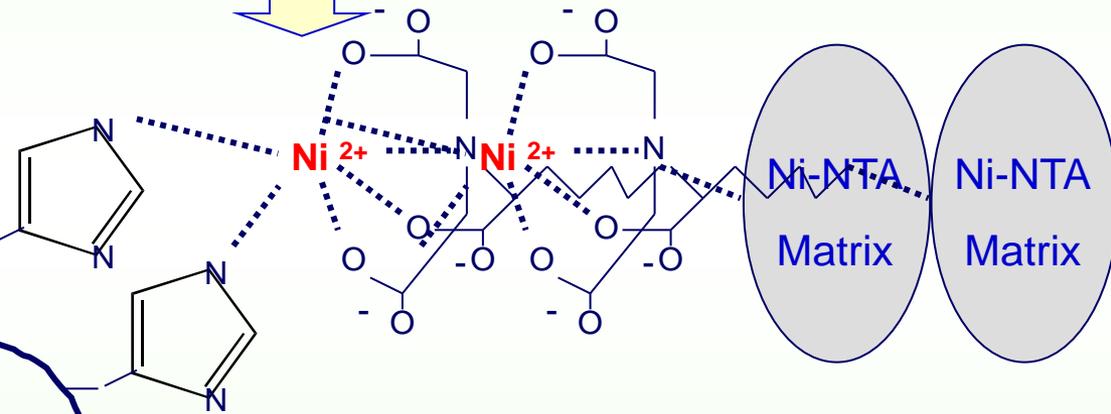
Protein-Affinitäts-Reinigung

His-, GST-, CBP-Tags

1. Wachstum bei 37°C bis OD600 von etwa 0,8
2. Induktion mit 1 mM IPTG/ 2 h



Imidazol

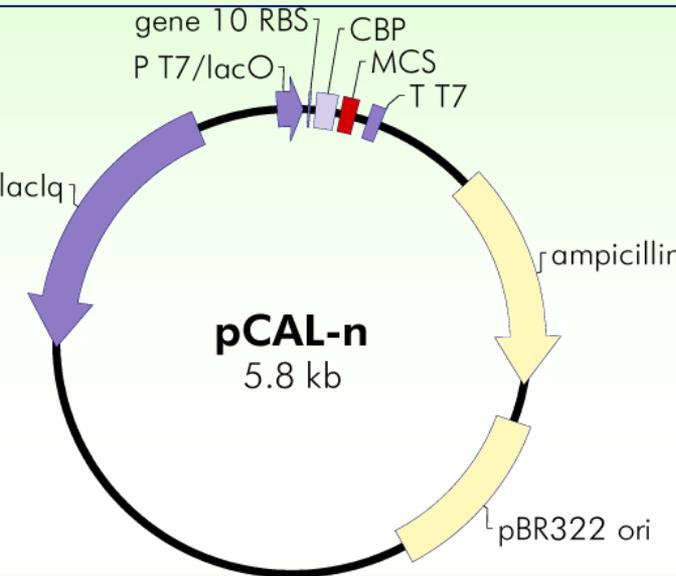


5' -CAT CAT CAT CAT CAT CAT- 3'
 3' -GTA GTA GTA GTA GTA GTA- 5'

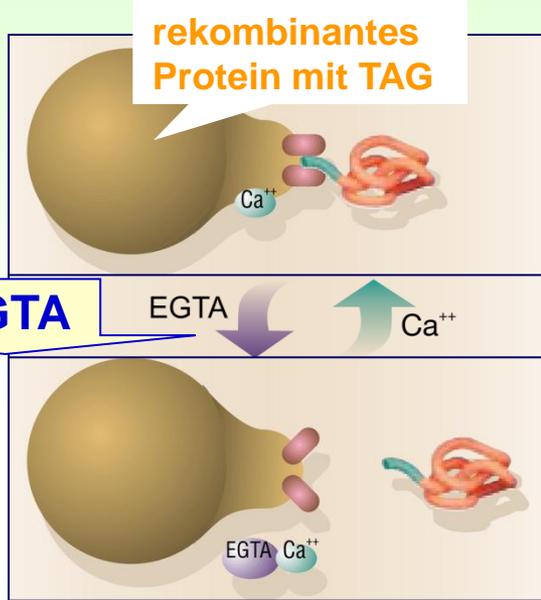
-His-His-His-His-His-His-



Calmodulin Binding Peptide-Tags



Calmodulin-Matrix



pCAL-n

M K R R W K K N F I A V S A A N R F K K I S S S G

CATATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGCTTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGG

Nde I

A L L V P R G S P G I L D S M G R L E L K L R S A

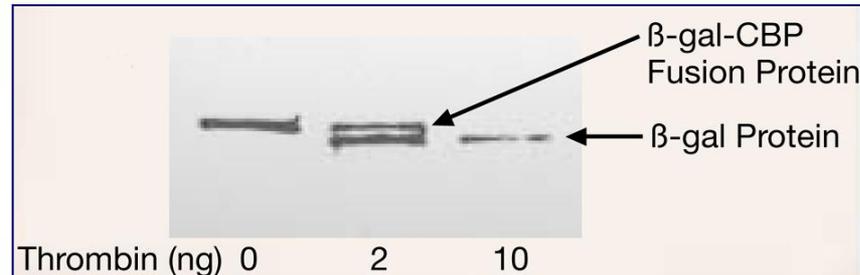
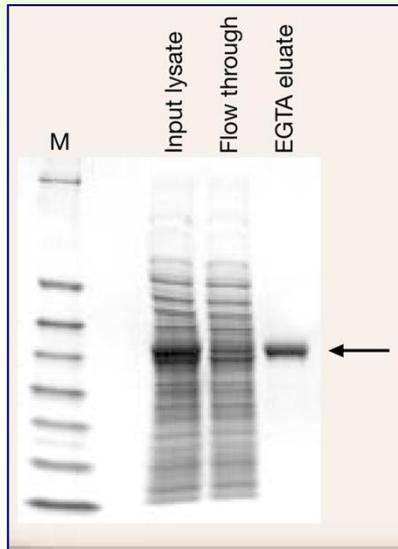
GCACCTTCTGGTTCCGCGTGGATCCCGGGGAATTCTAGACTCCATGGGTCGACTCGAGCTCAAGCTTAGATCCGGC

BamHI SmaI EcoRI XbaI NcoI SalI XhoI SacI Hind III

Calmodulin-binding unit Thrombin target



Abspaltung des CBP-Tags durch Thrombin



pCAL-n

M K R R W K K N F I A V S A A N R F K K I S S S G
 CATATGAAGCGACGATGGAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGCTTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGG
Nde I
 A L L V P R G S P G I L D S M G R L E L K L R S A
 GCACCTCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGGAATTCTAGACTCCATGGGTCGACTCGAGCTCAAGCTTAGATCCGGC
BamHI SmaI EcoRI XbaI NcoI SalI XhoI SacI Hind III

Calmodulin-binding unit

Thrombin target



Systeme zur heterologen Genexpression

2. Baculovirus & Insektenzellen

Vorteile:

- Oft hohe Ausbeuten
- Prozessierung und Transport ähnlich wie in anderen Eukaryoten
- Posttranslat. Modifikationen (Glycosylierung, Phosphorylierung, Acylierung)
- dsDNA-Viren (etwa 130 kb), für große Proteine geeignet
- Spezifisch für Insekten (nicht humanpathogen)

Nachteile:

- Gentechnische Manipulationen schwieriger
- Prozessierung (z.B. Glycosylierung) oft anders als bei anderen Eukaryoten
- Teuer (Kulturmedien)
- Aufwand (CO₂-Inkubatoren)



2. Baculovirus & Insektenzellen

2.1. Konstruktion des Expressionsvektors

Bacmid = Baculovirus Shuttle Vector

lytisches ds-DNA-Virus

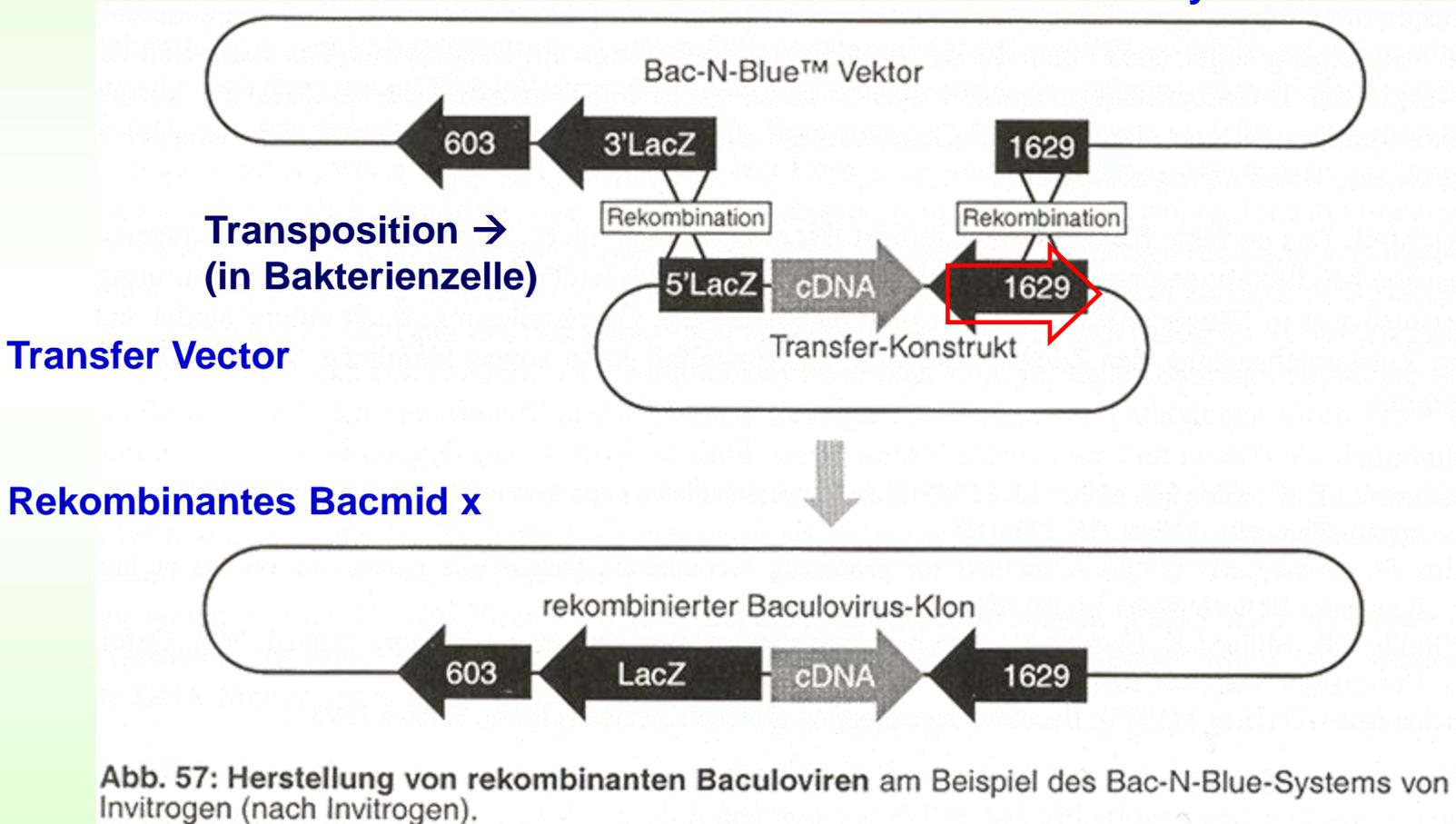


Abb. 57: Herstellung von rekombinanten Baculoviren am Beispiel des Bac-N-Blue-Systems von Invitrogen (nach Invitrogen).

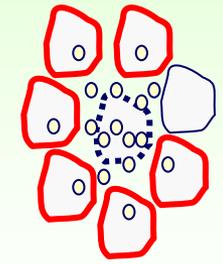


2. Baculovirus & Insektenzellen

2.2. Transfektion (oder Ko-Transfektion)



2. Zelle lysiert, setzt Virionen frei

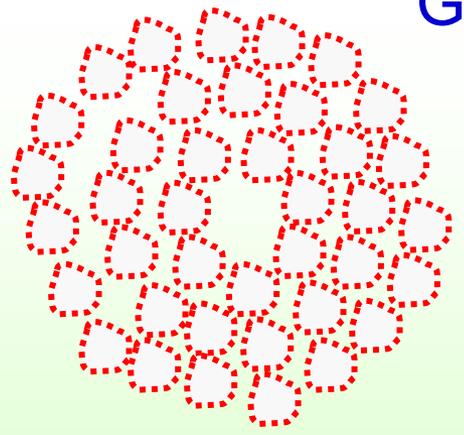


1. Virion infiziert Zelle

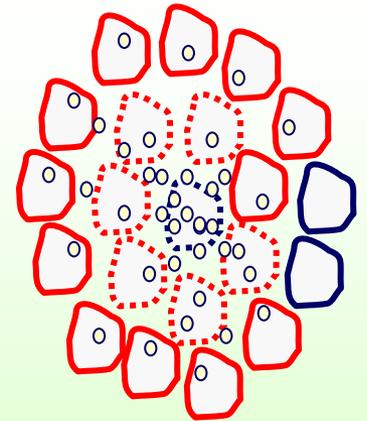
Baculovirus kann bis zu 50% des GESAMT-Zellproteins produzieren



3. usw



4. Vollständige Lyse bewirkt Auflösung/Klärung des Monolayers



5. Produktion von β -gal bewirkt Blaufärbung



Hilfe! Mein Expressionssystem funktioniert nicht!

Die Ausbeute ist sooo gering:

- Überprüfe
 - Gesamtlisat auf inclusion bodies
 - *E. coli*-Stamm, reading Frame (v. a. bei Fusionsproteinen)
 - Codon Usage, Transkriptions-Terminator
- Nimm einen *pLysS*- oder *pLysE*-Stamm
- Maximiere AT-Gehalt am 5' Ende des ORF

Das Protein lööst sich nicht:

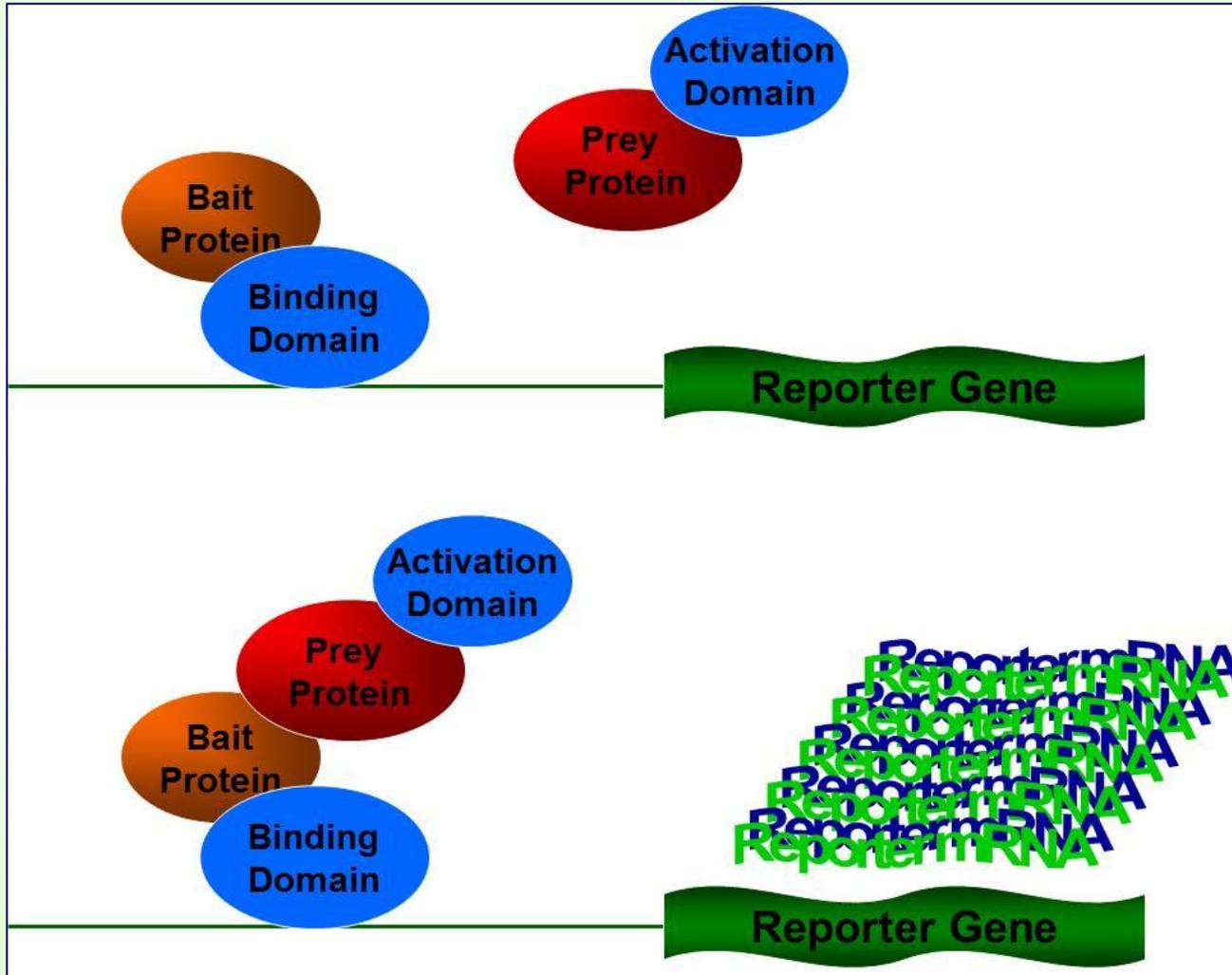
- Isoliere inclusion bodies, denaturieren und renaturieren
- Reduziere die Anzuchttemperatur
- Nimm einen low/moderate copy number Plasmid-Vector
- Fusioniere periplasmatische targeting Sequenz an N-terminus
- Versuche Fusionierung z.B. mit Glutathion-S-Transferase
- Untersuche ein besser lösliches Protein
- Coexpression von Chaperonen



3.3 Das Prinzip des 2-Hybridsystems

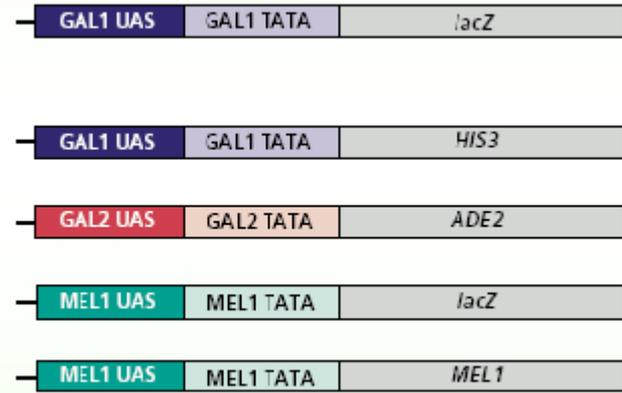
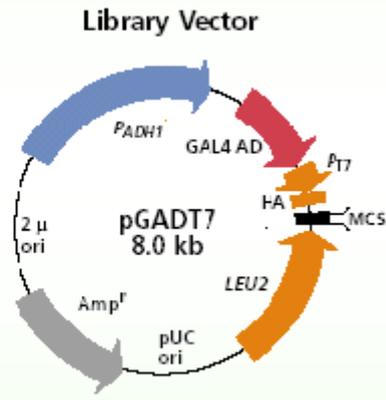
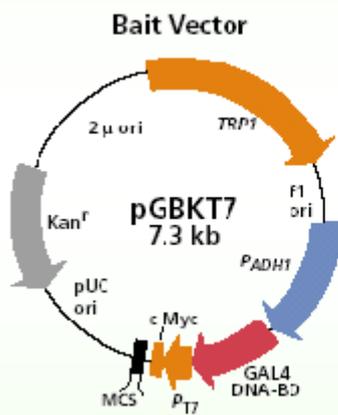
Nachweis von Proteininteraktionen

Läuft in Hefe ab und funktioniert nur mit löslichen Proteinen

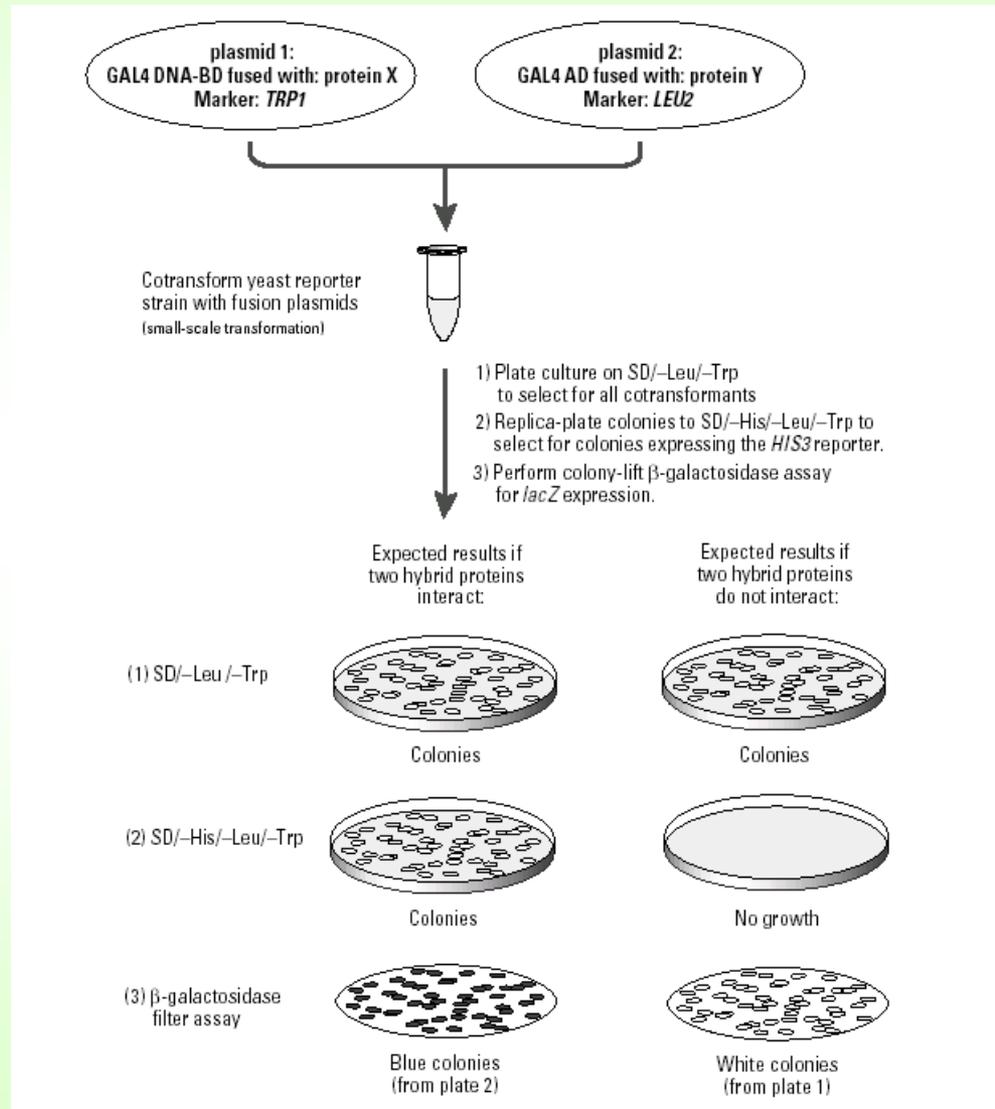


3.3 Das Prinzip des 2-Hybridsystems

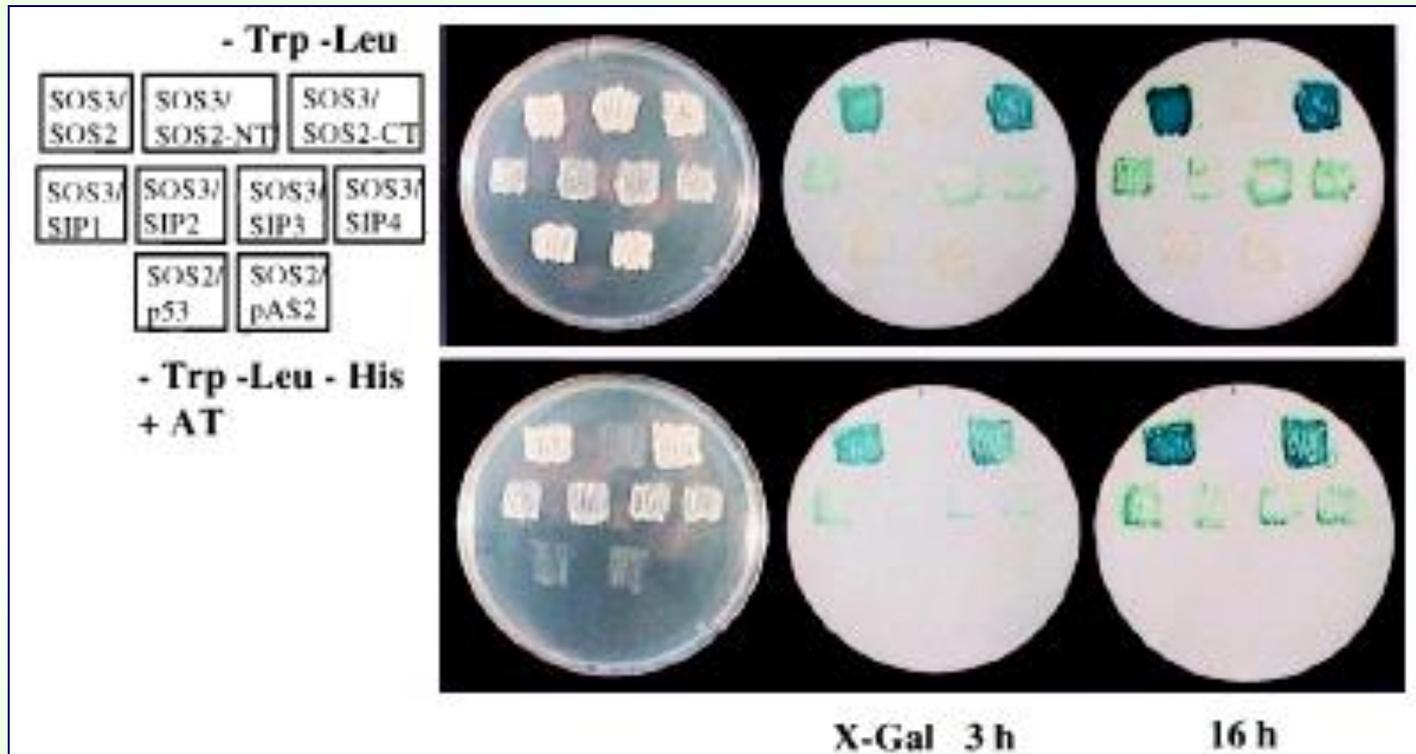
Klonierung der Proteine in zwei getrennte Vektoren
 Fusion der untersuchten Proteine mit Domänen eines TF
 Screening in Hefestämmen mit Reportergenen unter Kontrolle des TF



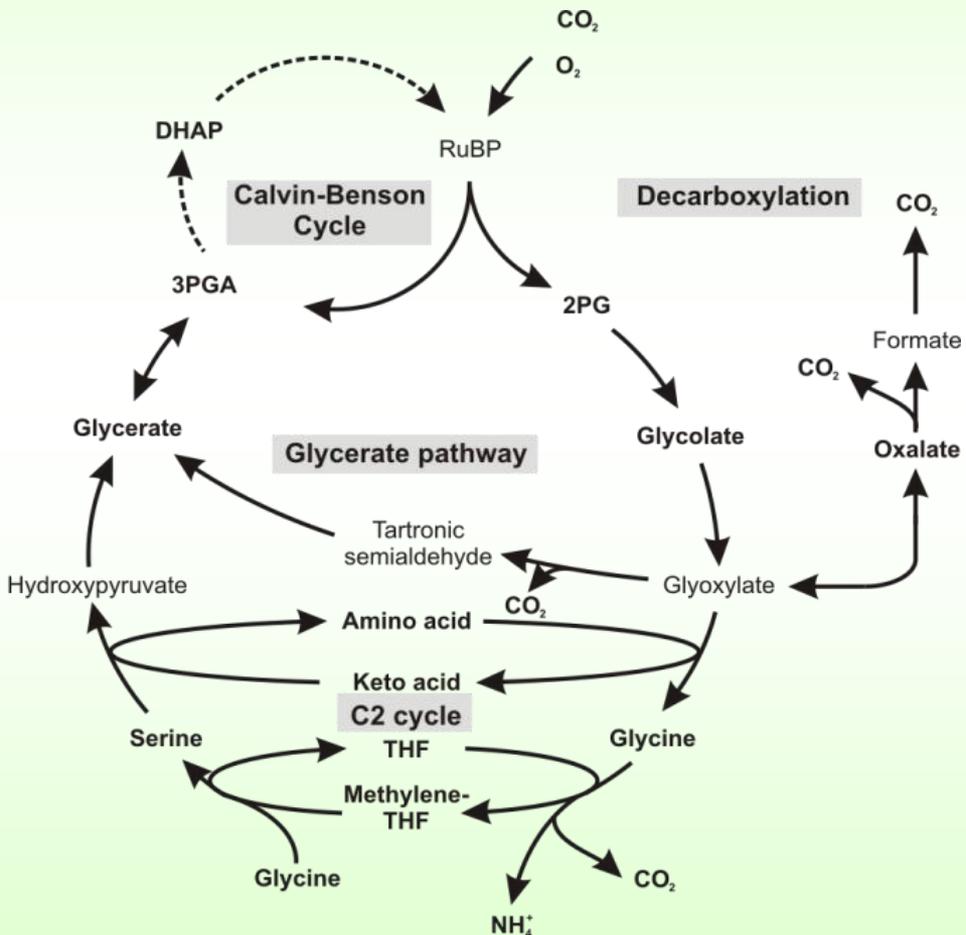
Der Ablauf eines 2-Hybrid-Interaction-Assays



Die Interaktion von SOS2/3 als Beispiel für 2-Hybrid-Interaction-Assays



Ziel des Praktikums: z.B. Expression von Enzymen des Glyceratweges under Formatassimilation aus *Synechocystis*



Tartronsäuresemialdehyde Carboligase (GCL):

→ Eingangsenzym des Glyceratwegs, evtl. multifunktionell

Tartronsäuresemialdehyde Reduktase (TSR):

→ Hilfsenzym für Aktivitätstests

Hydroxypyruvate-Isomerase (TPI):

→ Bisher nicht annotiert, aber mögl. vorhanden

