

Glossar

(Stand: 2.7. 2024)

Dieses Glossar bezieht sich auf das Biuz-Sonderheft zu CRISPR-Cas (Link einfügen). Dafür sind zum Verständnis auch Begriffe aus anderen Gebieten der Biologie erforderlich und sie sind hier teilweise erklärt. Mit Einschränkungen ist das Glossar deshalb auch für andere Themen der Biologie nutzbar. Einige Schlagwörter beziehen sich speziell auf die CRISPR-Thematik und können in anderen Zusammenhängen eine andere/weitere Bedeutung haben.

Das Glossar erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Erklärungen sind meistens vereinfacht, um sie für Nicht-Experten verständlich zu machen. Fehler können wir, trotz aller Bemühungen, nicht ausschließen. Wir nehmen aber gerne Hinweise an (info@biowisskomm.de) und werden die in einem späteren Update ggf. berücksichtigen.

Das Glossar wird gleichzeitig auf der Webseite www.biowisskomm.de veröffentlicht (genauer Link folgt). Dort werden wir uns, im Rahmen unserer Kapazitäten, bemühen, es zu erweitern und zu aktualisieren. Aus technischen Gründen ist eine Aktualisierung auf www.biuz.de leider nicht möglich.

Adaptation: Der Vorgang, aus einer Virus-DNA kurze Stücke auszuschneiden und in den -> CRISPR-Array einzubauen. Dafür sind -> Cas-Proteine erforderlich, die ein eindringendes Virus erkennen und passende Stücke neben einer -> PAM-Sequenz ausschneiden. Häufige Adaptations-Proteine sind Cas 1 und Cas 2.

Akquisition: ähnlich der Adaptation, dabei bezeichnet der Ausdruck genauer, dass der CRISPR-Array einen neuen Spacer hinzugewinnt.

Aptamer: Meist eine synthetische RNA, die durch ihre Sekundärstruktur (Faltung) spezifisch an Proteine oder andere Moleküle (Liganden) binden kann. In Kombination mit anderen RNA-Sequenzen (z.B. crRNAs) können

z.B. Aptamere, die an GFP binden, genutzt werden, um spezifische RNAs in vivo zu markieren. Natürliche Aptamere dienen u.a. als molekulare Schalter: nach der Bindung an den Liganden verändern sie ihre Sekundärstruktur und blockieren oder erleichtern die Translation einer mRNA, der sie vorgeschaltet sind.

Archaea / Archaeen: Eine Domäne des Lebens, die viele Mikroorganismen beinhaltet, die sich häufig durch sehr spezielle Lebensweisen und ausgefallene Habitate auszeichnen wie zum Beispiel die Methanogenen oder die Extremophilen. Neben verschiedenen Alleinstellungsmerkmalen wie beispielsweise eines speziellen Zellwandaufbaus, vereinen Archaeen häufig verschiedene Eigenschaften von Bakterien und Eukaryoten miteinander und gelten daher als evolutionär ursprüngliche

Gruppe.

Bisher wurden die Archaea als eine von drei Domänen betrachtet, in die alle zellulären Lebewesen eingeteilt werden (Bakterien, Archaea, Eukaryota). Heute geht man von zwei Domänen aus, wobei die Eukaryoten als Abkömmlinge der Archaea gesehen werden. Archaea und Bakterien sind Prokaryoten, das heißt, sie verfügen über keinen Zellkern, ihre Erbinformation liegt ohne eine Kernmembran im Cytoplasma vor.

Früher wurden Archaea auch „Archaeobakterien“ genannt, weil sie zunächst, wie Bakterien aussehen. Erst die Sequenzierung ihrer ribosomalen DNA und später dann ganzer Genome zeigte, dass sie einem völlig neuen Reich der Organismen angehören und viele Ähnlichkeiten mit den Eukaryoten, den weiterentwickelten Lebewesen mit einem Zellkern haben. Nach den neuesten Erkenntnissen haben sich die Eukaryoten aus einer archaealen Zelle entwickelt. Unter den Archaea befinden sich viele Organismen, die unter extremen Umweltbedingungen leben: in Salz-, Alkali und Säureseen und bei Temperaturen über 80°C. Aber auch in normalen Habitaten stellen sie einen großen Anteil der Biomasse dar, d.h. es gibt auch viele „mesophile“ Archaeen. Sie sind auch Teil des menschlichen Mikrobioms, pathogene Archaeen sind jedoch bisher nicht gefunden worden, es ist also die freundlichste Domäne! Viele Archaea sind nicht nur für die Grundlagenforschung interessant. Sie produzieren auch Enzyme, die z. B. in Waschmitteln angewendet werden, um bei niedrigen Temperaturen Fett- und Eiweißflecken aufzulösen oder bei anderen technischen Prozessen bei hohen Temperaturen zu arbeiten.

Bakteriophagen: -> Phagen

Base-Editors: Bei der Genom-Editierung mit CRISPR-Cas9, wird ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB = double strand break) induziert. Ein solcher DSB wird von der zelleigenen Machinerie entweder durch den fehleranfälligen Prozess der nichthomologen Endverbindung (NHEJ = non-homologous end joining) oder aber homologer Rekombination (HDR = homology directed repair) repariert. Dennoch sind DSB gefährlich für eine Zelle: die offenen Enden der DNA an der Bruchstelle können zu großen Deletionen führen oder sogar falsch zusammengebaut werden, wenn beispielsweise gleichzeitig ein Bruch an einer anderen Stelle passiert ist. 2016 hat die US-amerikanische Forschergruppe um David Liu (Video) an der Harvard Universität eine CRISPR-Cas-basierte Methode entwickelt, die ohne Doppelstrangbrüche auskommt und darüber hinaus in der Lage ist, punktuell einzelne Basen an beliebiger Position im Genom einer lebenden Zelle auszutauschen. Das heißt, dass man eine Punktmutation gezielt reparieren kann, ohne die DNA zu schneiden. Diese Methode ist seitdem unter dem Begriff „Base Editing“ bekannt und wurde bereits erfolgreich angewendet.

Die vielen verschiedenen Varianten dieser Technik lassen sich einer von zwei Klassen zuordnen: den Cytosin Base Editors (CBEs), die die Umwandlung eines C•G Basenpaars zu einem T•A Basenpaar katalysieren, und den Adenin Base Editors (ABEs), die ein A•T Basenpaar zu G•C Basenpaar konvertieren.

Das grundlegende Prinzip besteht darin, dass eine katalytisch inaktive Cas9-Nuklease (nCAs9 oder dCas9) mit einer Deaminase fusioniert wird. Die Entfernung einer NH₃ Gruppe (Deaminierung) macht aus einem Cytidin ein Uracil, das von der Zelle wie ein Thyminid erkannt wird. Das C•G Basenpaar wird

letztlich zu einem T•A Basenpaar umgeschrieben. Während die Cytidin-Deaminase natürlicherweise vorkommt, musste im Fall der ABEs die Adenosin-Deaminase (z.B. TadA) erst künstlich hergestellt werden. Mit guten Kenntnissen zur Struktur und Funktion ähnlicher Enzyme kann man deren katalytische Aktivität tatsächlich gezielt verändern. Die Adenosin-Deaminase macht aus einem Adenosin ein Inosin, das von der Zelle wie ein Guanosin erkannt wird. Das A•T Basenpaar wird letztlich in ein G•C Basenpaar umgeschrieben.

dCas9 in den Base Editors verursacht keinen DSB, weil die Schneideaktivität ausgeschaltet wurde. Mithilfe der Leit-RNA wird aber die gewünschte Stelle im Genom gefunden. Die per „Huckepack“ mitgeführte Deaminase wandelt das entsprechende Adenosin in ein Guanosin um bzw. das Cytosin in ein Thymin. Der gegenüberliegende, nicht editierte Strang wird von der Zelle als fehlgepaart erkannt und entsprechend verändert., sodass wieder ein korrektes Basenpaar entsteht.

Bei genetischen Erkrankungen des Menschen ist die Entwicklung der Base Editors ein weiterer Durchbruch. Sehr viele solcher Mutationen sind Punktmutationen einzelner Nukleotide. Base-Editors können nicht bei allen dieser Mutationen eingesetzt werden, theoretisch könnte man aber ca. 60% erfassen.

Biofilm: Populationen von verschiedenen Mikroorganismen bilden auf Oberflächen bei der Besiedelung oft einen Biofilm. Aus Wasser und von den Organismen abgesonderten Substanzen bildet sich ein schleimiges Gel, das mehrere Funktionen hat: Die Bakterien bleiben an einem Ort und werden nicht fortgespült. Der Film schützt vor Einflüssen

der Umgebung und dient zudem als Kommunikationsmedium für Signale innerhalb der Population.

Wir betrachten Prokaryoten meist als einzelne Zellen, die unabhängig voneinander im Wasser oder im Boden leben. Unter bestimmten Umständen entwickeln Bakterien jedoch ein „soziales Leben“. Sie können sich mit Hilfe von Pili an Oberflächen festsetzen und bilden dann z. B. den Zahnbelag, ein Biofilm auf den Zähnen oder auch auf Steinen und Mauerwerk. Biofilme bestehen oft aus verschiedenen Bakterienarten, die gemeinsam eine Population bilden und die ganz anderen Eigenschaften als die frei lebenden Einzelorganismen zeigen. Gemeinsam produzieren sie eine „extrazelluläre Matrix“ aus Zuckermolekülen (Polysaccharide), in die auch noch Mineralien und andere organische Materialien eingebaut werden können. Daraus entsteht eine Schutzschicht, die es sehr schwer macht, Biofilme (z. B. an chirurgischen Instrumenten) zu beseitigen. Auch für Antibiotika ist der Biofilm kaum durchdringbar und die Zellen sind dadurch weitgehend resistent.

Eine große Rolle bei der Biofilm-Bildung spielt das „Quorum sensing“. Bakterien kommunizieren miteinander über chemische Signale, sie können damit die Dichte ihrer Population messen, induzieren die Produktion der extrazellulären Matrix und können freischwimmende Bakterien anlocken, sich der Gemeinschaft im Biofilm anzuschließen.

Cascade -Komplex: Im Gegensatz zu Klasse 2 CRISPR-Cas Systemen besteht der Effektor-Komplex der Typ I Systeme aus mehreren verschiedenen Cas Proteinen, in die die crRNA eingebettet wird. Die Art und Anzahl der im Komplex enthaltenen Cas Proteine ist

Subtyp-spezifisch. Cascade-Komplexe können sowohl mit einer Nuklease-Aktivität die Ziel-DNA zerschneiden, in manchen Fällen blockieren sie aber nur den Zugang für andere Enzyme und verhindern z.B. die Transkription. Dies wird als CRISPR-Interferenz (-> CRISPRi) bezeichnet. Funktionen wie die Erkennung der Zielsequenz und das Zerschneiden der Zielsequenz liegen i.d.R. auf verschiedenen Proteinen des Cascade-Komplexes, während sie in Klasse 2 Systemen in einem Protein (wie z.B. Cas9) vereinigt sind.

Cas9: Das bekannteste Cas Protein, das vielfach für gentechnische Anwendungen verwendet wird. Cas9 gehört zu einem Typ II CRISPR-Cas System, bei denen der Effektor-Komplex nur ein Protein enthält. Cas9 ist eine DNase, die mit zwei Nukleaseaktivitäten in einem Molekül (RuvC und HNH) einen Doppelstrangbruch in der DNA setzt. Cas9 bindet eine crRNA und eine -> tracrRNA, die das Protein an eine spezifische Sequenz leiten. Bei vielen Anwendungen und auch in der Grundlagenforschung werden crRNA und tracrRNA synthetisch zu einem Molekül, der sgRNA (single guide RNA) verbunden – das vereinfacht die Sache. Struktur und Funktion von Cas9 sind sehr genau bekannt und können gentechnisch verändert werden. Daraus entstanden (und entstehen) neue Werkzeuge für die Gentechnik wie z.B. die „Nickase“ die nur einen DNA-Strang schneidet und das inaktive -> dCas9, mit dem verschiedenste angekoppelte Proteine an spezifische Sequenzen gebracht werden können.

Cas-Gene: „CRISPR-associated genes“, Gene, die für Proteine codieren, die der Funktion des Systems dienen. Sie liegen i.d.R. in der Nachbarschaft der CRISPR-Arrays. Zu den Cas-Genen gehört z.B. das bekannte Cas9, das mit

Hilfe einer crRNA eine Ziel-DNA erkennt und schneidet. Weiterhin sind es Gene, die für das Ausschneiden eines -> Protospacers aus der DNA eines Angreifers zuständig sind und Gene, die dieses DNA-Stück in den CRISPR-Array einbauen. Verschiedene CRISPR-Systeme können weitere Gene mit speziellen Funktionen enthalten.

Casposon: Vergleichsweise seltenes DNA-Transposon, das in einigen Bakterien und Archaeen gefunden wurde und als Besonderheit anstelle von Integrasen oder -> Transposasen Cas1-Proteine kodiert.

Centromer: „Mittelstück“ eines eukaryotischen Chromosoms (das aber nicht unbedingt in der Mitte liegen muss!). Centromere sind kompakte DNA-Strukturen, die in speziellen Centromer-Proteinen verpackt sind. An den Centromeren setzen die Spindelfasern an, die bei der Zellteilung die Chromosomen korrekt auf die beiden Tochterzellen verteilen.

Chromatin: In -> Eukaryoten liegt die DNA eng in Proteine verpackt im Zellkern vor. Die wesentlichen Chromatinproteine sind die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 von denen es wiederum verschiedene Varianten gibt. H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen scheibenförmigen Komplex, um den die DNA aufgewickelt ist (Nukleosom). H1 sitzt als Linker-Histon zwischen den Nukleosomen. Die DNA ist durch die Verpackung vor äußeren Einflüssen geschützt. Das Chromatin hat jedoch noch weitere Aufgaben und ist an der Regulation der Gene beteiligt. Enzyme, die Teil des Chromatins bilden, können Nukleosomen verschieben oder auflösen (Chromatin-Remodeller), andere Proteine dienen als Transkriptionsfaktoren mit denen Gene aktiviert oder inhibiert werden. Weiterhin wird die DNA ständig von Reparaturenzymen

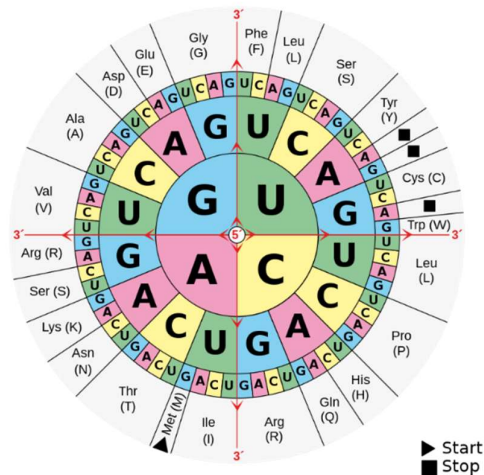
„patrouilliert“, die Brüche oder Mutationen reparieren.

In -> **Prokaryoten** ist die DNA ebenfalls verpackt, jedoch nicht mit den komplexen Nukleosomen.

CID: chromogene in-situ Detektion. Eine Methode, bei der ein Enzym (z.B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase) an eine Sonde gekoppelt wird. Die Sonde kann u.a. Cas9 oder eine sgRNA sein. Nach der Bindung der Sonde wird ein Substrat zugegeben, das von dem Enzym in eine farbige Substanz umgesetzt wird. Diese Umsetzung passiert an Stellen, an denen die Sonde gebunden hat. In mikroskopischen Präparaten kann so gezeigt werden, wo im Zellkern die Telomere lokalisiert sind. Für CID muss ein Präparat fixiert werden, d.h. die Zellen sind tot und zeigen keine Dynamik mehr an.

Codon: In einem Gen (nach der Transcription in einer mRNA) bilden jeweils drei Nukleotide ein Codon, das von einer spezifische -> **tRNA** erkannt und bei der -> **Translation** in eine spezifische Aminosäure übersetzt wird. Aus den vier verschiedenen Nukleotiden sind 64 verschiedene 3er-Codons möglich. Davon codieren 61 für eine Aminosäure und drei signalisieren den Abbruch der Translation (Stopp Codons). Mit einer „Codon-Sonne“ oder Codon-Tabelle kann eine DNA oder RNA manuell in eine Aminosäuresequenz „übersetzt“ werden.

Beachte: wird die Zahl der Nukleotide in einem Gen durch eine Mutation (Deletion oder Insertion) um eins oder zwei verändert, ändert sich der Leserahmen. Hinter der Mutation sind alle Codons „falsch“! Eine solche „Leserahmen-Mutation“ (frameshift mutation) führt meistens dazu, dass das codierte Protein vollständig ausfällt.



Quelle: Wikipedia

CRISPR: „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“, eine Ansammlung von kurzen, palindromischen Sequenzen, die regelmäßig durch andere, „unique“ (d.h. einmalige, nicht wiederholte Sequenzen) unterbrochen werden. Diese „unique Sequenzen“ werden als Spacer bezeichnet. Die Spacer stammen aus der DNA früherer Angreifer (z.B. -> **Phagen**) und stellen das „Adress-Label“ für die Abwehr dar. CRISPR oder auch -> **CRISPR-Array** ist eine der zwei Hauptkomponenten der CRISPR-Cas Systeme, der CRISPR Locus ist das genetische Element, das den Promotor und die Sequenzinformation für die Transkription der (prä)crRNAs enthält.

CRISPR-Array: Abschnitt im Genom (oder auch auf Plasmiden) von Bakterien und Archaea der aus Spacern und Repeats besteht. Spacer sind Sequenzstücke, die aus Viren stammen und als molekulares Gedächtnis dienen. Repeats sind immer gleiche Sequenzen zwischen den Spacern. Sie dienen u.a. der Bindung der RNA an Cas-Proteine. CRISPR-Arrays werden von einem Promotor meist als lange RNA transkribiert und dann zu kleinen Stücken

(bestehend aus einem Spacer und Teilen des davor und danach liegenden Repeats) prozessiert.

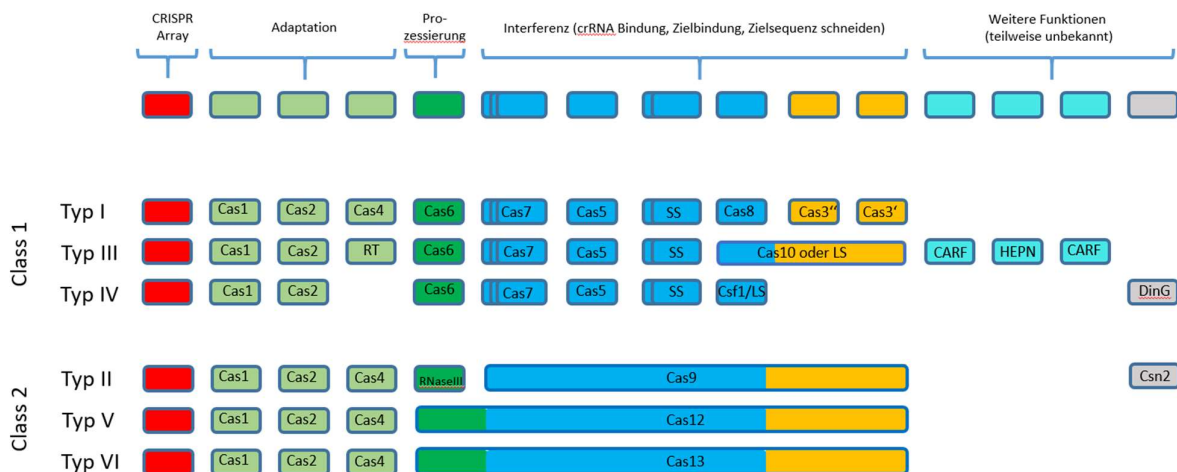
CRISPR-Cas-Systeme: Die Immunsysteme aus Bakterien und Archaeen sind sehr vielfältig. Obwohl ähnlich, unterscheiden sie sich in ihren Funktionen und ihrem Aufbau. Sie werden in zwei Klassen mit jeweils mehreren Typen und Subtypen eingeteilt. Klasse 1 enthält Systeme, in denen vor allem die Bindung der crRNA, die Zielerkennung und das Schneiden der DNA von verschiedenen Proteinen in einem großen Komplex bewerkstelligt wird. In der Klasse 2 sind hingegen viele Funktionen in einem relativ kleinen Protein (wie z.B. Cas9) vereinigt. Innerhalb der Klasse 2 gibt es auch Enzyme wie Cas13, die statt DNA RNA schneiden können (Abb. S. unten).

CRISPRi: = CRISPR Interferenz bezeichnet einen Mechanismus, bei dem ein Cas Protein nicht an der Zielsequenz schneidet, sondern alleine durch seine Bindung an die DNA den Zugang anderer Proteine verhindert. So kann z.B. die Transcription einer RNA blockiert werden, weil die RNA-Polymerase nicht an die DNA binden

kann. CRISPRi verändert nicht die DNA-Sequenz und ist reversibel. Wenn die Bindung an die DNA aufgehoben wird, funktioniert ein Gen wieder wie zuvor.

CRISPRi kommt natürlich in CRISPR-Cas Systemen vor, die keine Nukleaseaktivität haben, es kann aber auch konstruiert werden, indem die Nukleaseaktivität eines Cas-Proteins gezielt mutiert wird. Das bekannteste Beispiel dafür ist -> dCas9 bei dem beide Nukleaseaktivitäten im Cas9 Protein ausgeschaltet wurden.

CRISPR-Locus: Ein oder mehrere Orte im Genom oder auf Plasmiden, an denen sich CRISPR-Arrays und Cas-Gene befinden. Meist liegen die Cas-Gene vor dem CRISPR-Array, aber es gibt viele Variationen. Manche CRISPR-Loci enthalten keine Cas-Gene, andere keine CRISPR-Arrays, manchmal sind Cas-Gene an anderen Stellen des Genoms zu finden und manchmal ist die Reihe der Cas-Gene durch andere Gene unterbrochen, die anscheinend keine Funktion im CRISPR-Mechanismus haben (oder man hat diese Funktion noch nicht entdeckt). Einige CRISPR-Loci können miteinander interagieren. So können, unter



CRISPR-Cas-Systeme: Abb. verändert und vereinfacht nach <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>, von BioWissKomm

bestimmten Bedingungen, Cas-Gene eines Locus die crRNAs eines anderen Locus verwenden oder Cas-Gene eines Locus können die Adaptation (das Einfügen neuer Spacer) an einem anderen Locus übernehmen.

Chromatin: Die DNA in einer Zelle liegt nicht nackt vor, sondern ist als Chromatin stark kondensiert und verpackt. In Eukaryoten besteht das Chromatin (neben der DNA) hauptsächlich aus Histon-Proteinen, aber auch aus vielen weiteren Proteinen, die zur Regulation der Transcription beitragen. Durch Modifikation der Histon-Proteine (z.B. das Anhängen von Phosphat-, Methyl-, Acetyl- und anderen chemischen Gruppen) wird die Zugänglichkeit der DNA für die Transcriptionsmaschinerie reguliert. Diese Regulationsmechanismen zählen zur Epigenetik, weil sie Einfluss auf die Genetik nehmen, aber nicht in der DNA-Sequenz manifestiert sind. Mit Hilfe von CRISPR-Cas (-> **dCas9**) können Histon-modifizierende Enzyme an definierte Stellen des Chromatins gebracht werden und so die Genexpression verändern, ohne den genetischen Code zu verändern.

crRNA: eine kleine RNA die aus dem langen Transcript des -> CRISPR-Array herausgeschnitten wird und als „Adressaufkleber“ für eine Cas-Nuklease dient. Die crRNA besteht aus einem Spacer und einem Teil eines Repeats, der für die Bindung an das Cas-Protein erforderlich ist. Der Begriff -> **gRNA** (guide RNA) hat eine ähnliche Bedeutung. Die -> **sgRNA** (single guide RNA) hat die gleiche Funktion, sie ist nur synthetisch aus zwei verschiedenen RNA-Molekülen zusammengesetzt, weil in Klasse 2 Systemen Sequenzerkennung und Bindung an eine Cas-Nuclease auf separaten RNAs vorliegen.

dCas9: Das Cas9-Protein besteht aus mehreren Domänen, also Abschnitten in der Aminosäure-Kette, die einzelne Funktionen ausführen.

RuvC und HNH sind die zwei Domänen in Cas9, die unabhängig voneinander die beiden Stränge der Ziel-DNA schneiden, sie werden daher als Nuklease-Domänen bezeichnet. Man kennt den Mechanismus der Schneideaktivität sehr gut und kann deshalb sagen, dass in der RuvC-Domäne die Aminosäure D10 (Asparaginsäure in Position 10) essentiell für das Schneiden ist. Tauscht man sie gegen die Aminosäure Alanin aus, kann RuvC nicht mehr schneiden. Der Austausch wird als D10A bezeichnet. Die Funktion aller anderen Domänen bleibt erhalten. Das modifizierte Cas9-Protein kann deshalb nach wie vor eine Zielsequenz erkennen, dort aber nur einen der beiden DNA-Stränge schneiden, also „einen Nick“ setzen. Man bezeichnet diese Mutante deshalb als „nCas9“ oder „Nickase“. Die Nickase wird für verschiedene Anwendungen eingesetzt, z.B. beim „Base-Editing“ oder „Prime-Editing“ und wird verwendet, um versetzte DNA-Schnitte zu erzeugen, die eine präzisere Editierung erlauben.

Ahnlich wie bei der RuvC-Domäne, kann in der HNH-Domäne die Aminosäure H810 (Histidin in Position 810) gegen ein Alanin ausgetauscht werden (H810A), um die Schneideaktivität von HNH zu zerstören. Damit wäre eine andere Nickase erzeugt.

Werden beide Nuklease-Domänen (RuvC und HNH) mutiert, so entsteht ein Cas9-Protein, das keine Schneideaktivität mehr hat und als „dCas9“ oder „dead Cas9“ bezeichnet wird. Weil alle anderen Funktionen erhalten bleiben, kann dCas9 nach wie vor an spezifische Stellen der DNA geleitet werden. Durch die bloße Bindung an die DNA kann für andere Proteine (z.B. Aktivatoren der Genexpression) der Zugang blockiert werden.

Außerdem können andere Proteine an dCas9 gekoppelt werden und z.B. epigenetischer Veränderungen im Genom bewirken, ohne die Basensequenz der DNA zu verändern.

<https://www.youtube.com/watch?v=AZn3Nj1vq1c>

DNA-Sequenzierung: Die DNA-Sequenzierung, d.h. das Lesen der genetischen Information, ist seit 1977 möglich. Anfangs war die Technologie aufwändig, teuer und langwierig: Ein Wissenschaftler brauchte etwa 1 Jahr, um 1.000 Basen eines DNA-Moleküls zu lesen. Die Technologie entwickelte sich aber sehr schnell: Heute ist es kein Problem mehr, ein menschliches Genom mit rund 3 Milliarden Basen an einem Tag zu sequenzieren. Das aktuelle Problem ist eher, diese Datenflut zu verarbeiten, auszuwerten und in für jeden zugänglich in öffentlichen Datenbanken zu hinterlegen.

Die Kosten für die Sequenzierung sind gewaltig gesunken: kostete die erste Sequenzierung des menschlichen Genoms noch ca. 3,5 Mrd. Euro, so ist das heute für unter 1.000€ machbar. Damit sind aber auch die Ansprüche an die Forschung gestiegen. Heute werden hunderte von menschlichen Genomen sequenziert um seltene Krankheiten zu diagnostizieren und Medikamente zu entwickeln. Die Kenntnis von Pflanzengenomen ist vor allem für die Landwirtschaft von Bedeutung. Die Genome fast aller relevanten Nutzpflanzen sind heute sequenziert, teilweise mit verschiedenen Unterarten. Tiere, Pflanzen, Pilze und -> **Prokaryoten** werden auch sequenziert, um Biodiversität und ihre Veränderungen zu erforschen, aber auch um technische Anwendungen zu erkunden.

In der Sequenziertechnik gab es große Durchbrüche: die ersten manuellen

Sequenzierungen beruhten auf chemischen Reaktionen der verschiedenen Nukleotide, dann gab es enzymatische Reaktionen, bei denen eine DNA-Kette Nukleotid um Nukleotid verlängert und so lesbar wurde. Diese Methode wurde automatisiert und führte zur „Hochdurchsatz-Sequenzierung“ bei der viele Proben parallel und maschinell analysiert wurden. Manche der heutigen Sequenziergeräte haben die Größe eines USB-Sticks und sequenzieren, indem ein einzelner DNA-Strang mechanisch durch eine Nanopore gezogen wird. Die Daten werden in Echtzeit auf die Speicherplatte eines Computers übertragen (<https://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierung>). Viele Hersteller von Sequenziergeräten bieten anschauliche Grafiken und Filme im Netz an (z.B. <https://nanoporetech.com/how-it-works>).

Doppelstrangbruch: DNA besteht aus einem Doppelstrang (Doppelhelix). Durch Strahlung, Chemikalien und andere Umwelteinflüsse passieren ständig „Unfälle“, bei denen einer oder beide Stränge zerbrechen. Wenn nur ein Strang gebrochen wird (Einzelstrangbruch), kann das leicht durch eine -> **Ligase** repariert werden. Brechen jedoch beide Stränge an ungefähr derselben Stelle, gibt es ungeschützte offenen Enden an denen DNA abbauende Enzyme ansetzen. Eine ganze Gruppe von Reparaturenzymen patrolliert ständig die DNA nach solchen Brüchen und repariert sie. Die Reparatur ist jedoch nicht perfekt. Es entstehen Fehler, die als Mutationen starke Auswirkungen auf den Organismus haben können (aber nicht müssen!). Siehe auch Reparaturmechanismen -> **NHEJ** und -> **HDR**.

DPANN Archaeen: Akronym für die ersten benannten Archaeen dieses Superphylums: Diapherotrites, Parvarchaea, Aenigmarchaea,

Nanoarchaea und Nanohaloarchaea. Sie gehören zu den am wenigsten untersuchten Organismen und leben meist unter extremen Bedingungen, manche in der Tiefe der Erde unter hohem Druck, ohne Sauerstoff und vor allem mit CO₂ als Kohlenstoffquelle. Die meisten DPANN Archaeen sind bisher -> **unkultivierbar**, d.h. sie können im Labor nicht in einer Reinkultur vermehrt werden. Oft kennt man nur ihre DNA Sequenz aus -> **Metagenomen**.

Effektorkomplex: Darunter versteht man den Komplex aus einem (Klasse 2 Systeme) oder mehreren (Klasse 1 Systeme) Proteinen und einer crRNA (in einigen Fällen zusätzlich einer tracrRNA). Dieser Komplex scannt die DNA (in manchen Fällen auch die RNA) einer Zelle und zerschneidet/zerstört die Nukleinsäure, wenn eine Homologie zur crRNA gefunden wird. Einige Effektorkomplexe haben die Fähigkeit zum Schneiden verloren, binden aber noch an die DNA. Sie können so z.B. die Transkription viraler Gene verhindern, ohne die Nukleinsäure direkt zu zerstören. Bei Klasse 1 Systemen wird der Effektorkomplex als -> **Cascade-Komplex** bezeichnet. Wie in Klasse 1 Systemen das Nukleaseprotein entfernt oder in Klasse 2 Systemen die Nukleaseaktivität mutiert, bleibt vom Effektorkomplex nur noch das -> **Targeting Module**, das die spezifische Sequenz erkennt und bindet.

Endogene Gene: „von innen kommend“. In diesem Zusammenhang Gene, die im eigenen Genom bzw. der eigenen Spezies codiert sind. Weil Gene innerhalb einer Art verschiedene Varianten haben können, versteht man darunter auch Genvarianten, die aus einem anderen Individuum derselben Art stammen können. Bei Pflanzen und Tieren können z.B. in einer Wildform einzelne Gene aktiv sein, die in

einer Zuchtform nicht mehr aktiv oder verändert vorliegen. Beide Varianten werden als endogene Gene bezeichnet.

Epigenetik: Ein komplexes Gebiet der Genetik, das eine Regulation von Genen beschreibt, die nicht auf einer Veränderung der DNA Sequenz beruht. Man unterscheidet verschiedene Aktionsebenen der Epigenetik, die jedoch auch voneinander abhängig sind. Bei der DNA-Methylierung werden vor allem Cytosinbasen mit einem Methylrest versehen. Das hat Auswirkungen auf die Verpackung der DNA und die Zugänglichkeit für Enzyme wie z.B. RNA-Polymerasen. Histone sind das Verpackungsmaterial der DNA in Eukaryoten und bilden die Nukleosomen. Das sind globuläre Proteinkomplexe, um die die DNA aufgewickelt ist. Nukleosomen bestimmen die Dichte der Verpackung und damit die Zugänglichkeit der DNA für die Genaktivierung. Histone können enzymatisch vielfältig modifiziert werden (z.B. durch Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung und andere Seitengruppen) und damit sehr spezifische funktionelle Veränderungen im Chromatin bewirken.

Eine weitere Gruppe epigenetischer Akteure sind Chromatin-Modifizierer, die Nukleosomen verschieben, ablösen oder einfügen können. Kleine regulatorische RNAs spielen ebenfalls eine Rolle in der Epigenetik. Small interfering RNAs (siRNAs), Micro-RNAs (miRNAs) und andere können Gene auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene regulieren.

Eukaryot: Organismus der aus einer oder vielen Zellen mit einem Zellkern besteht. Im Gegensatz zu -> Prokaryoten ist die Erbinformation zusätzlich durch die Membran des Zellkerns geschützt. Zellkern und Cytoplasma sind zwei getrennte Kompartimente, die durch einen regulierten

Transport durch die Kernmembran verbunden sind. So müssen z.B. mRNAs, die im Zellkern transkribiert werden, aktiv in das Cytoplasma transportiert werden, um sie dort in Protein zu übersetzen (-> Translation). Andererseits müssen Proteine, die im Zellkern benötigt werden, aktiv aus dem Cytoplasma dorthin transportiert werden.

Exogene Gene: „von außen kommend“. In diesem Zusammenhang sind das Gene, die aus einem anderen Organismus stammen. Wegen des universellen genetischen Codes können solche „Fremd“-Gene in der Regel problemlos exprimiert werden. Ein bekanntes Beispiel ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus einer Qualle, das in Bakterien, Tieren und Pflanzen eingesetzt werden kann und diese grün fluoreszieren lässt.

Extremophil: Unter extremophilen Organismen versteht man solche, die unter Lebensbedingungen existieren, unter denen „normale“ (mesophile) Organismen nicht lebensfähig sind. Zu Extrembedingungen zählen u.a. hohe Temperaturen (80°C und mehr), niedrige Temperaturen (-10°C und weniger), hoher Salzgehalt, sehr saure und sehr alkalische Biotope und mehr. Extremophile findet man hauptsächlich unter Prokaryoten und dort besonders unter Archaeen. In den meisten Fällen sind Extremophile unter mesophilen Bedingungen nicht lebens- und vermehrungsfähig, das macht ihre Haltung unter Laborbedingungen schwierig und aufwändig. Extremophile Organismen haben ihren Metabolismus und ihre Enzyme an extreme Umweltbedingungen angepasst und sind deshalb auch von Interesse, weil sie z.B. industriell nützliche Enzyme produzieren, die bei besonders hohen oder besonders niedrigen Temperaturen optimal arbeiten oder

auch unter sehr sauren oder alkalischen Bedingungen noch funktionsfähig sind. Andererseits sind Enzyme oder andere Proteine aus Extremophilen in Mesophilen meist nicht funktionsfähig – und umgekehrt.

FISH: Fluorescence in situ hybridization. Eine Methode mit der in mikroskopischen Zell-Präparaten DNA Sequenzen durch fluoreszierende Farbstoffe sichtbar gemacht werden. In den meisten Fällen beruht die Methode darauf, dass ein DNA-Strang mit Fluoreszenz-Markierung mit einer komplementären Sequenz in dem Präparat hybridisiert (Basenpaarung eingeht). Dazu ist es erforderlich, dass die DNA im Präparat chemisch denaturiert (einzelsträngig gemacht) wird. Diese Präparate sind folglich tot. Der CRISPR-Cas Komplex erkennt DNA-Sequenzen jedoch auch in intakten Zellen, d.h. in doppelsträngiger DNA und sogar in -> Chromatin. Die Fluoreszenzmarkierung kann dabei auf unterschiedliche Art sowohl am Cas-Protein als auch an der sgRNA angebracht werden. Damit ist es möglich, in lebenden Zellen die Dynamik des Chromatins zu beobachten.

Genomics: Analyse und Vergleich von Genomen. Mit den Fortschritten der Sequenziermethoden werden immer mehr Genome vollständig sequenziert. Vergleiche innerhalb einer Art ermöglichen detaillierte Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse (nicht nur innerhalb einer Familie, sondern auch zwischen verschiedenen Ethnien), über die Verbreitung von Spezies, über genetische Ursachen von Krankheiten und Resistenten gegen Krankheiten. Vergleiche zwischen Arten geben Aufschluss über Evolution und Biodiversität.

Genotyp: Der Genotyp umfasst die genetische Information eines Organismus. Er unterscheidet sich vom **-> Phänotyp** darin, dass Veränderungen in der genetischen Information meistens nicht offensichtlich in einem Organismus zu erkennen sind.

Genregulation: Alle Zellen in einem Organismus tragen das gleiche Erbgut in sich. Trotzdem erfüllen sie verschiedene Funktionen und sind unterschiedlich aufgebaut. In jeder Zelle wird nur eine Teilmenge der Erbinformation transkribiert. Die „Auswahl“ erfolgt über verschiedene Mechanismen wie spezifische Transkriptionsfaktoren (Proteine), die Organisation des **-> Chromatins** sowie regulatorische RNAs, die mRNAs abbauen oder ihre Translation verhindern können.

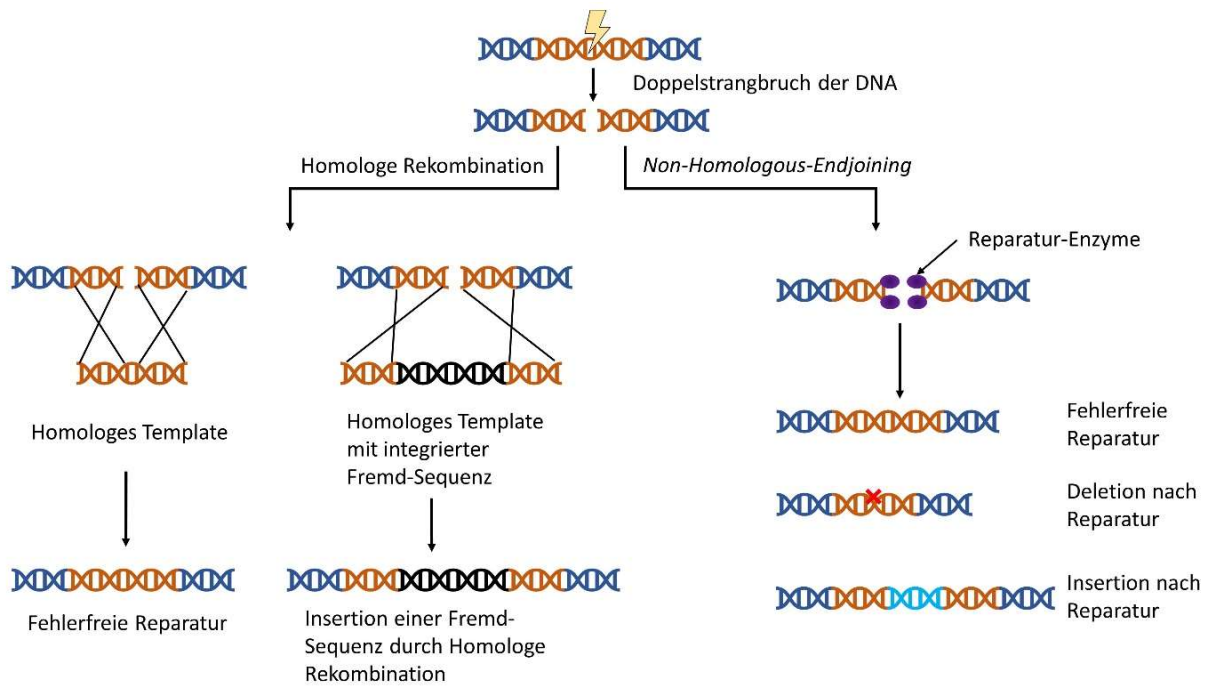
Gentherapie: Medizinischer Eingriff, bei dem die genetische Ursache einer Erkrankung behandelt wird. Bei der somatischen Gentherapie wird in erwachsenen Menschen die Erbinformation in einem betroffenen Zelltyp (z.B. Blutzellen) repariert oder umprogrammiert. Große Erfolge wurden bei der Behandlung von **-> Sichelzellanämie** erzielt. Eine Schwierigkeit besteht noch im „Targeting“, d.h. ein entsprechendes CRISPR-Cas Konstrukt gezielt in ein betroffenes Organ bzw. einen bestimmten Zelltyp zu leiten. Bei der somatischen Gentherapie wird die genetische Veränderung nicht auf die Nachkommen übertragen. Bei der Keimbahntherapie wird die genetische Information in Keimzellen oder in der befruchteten Eizelle durchgeführt. Die Veränderung ist erblich. Ein spezielles Targeting ist nicht erforderlich. Alle Zellen des Embryos (und damit des wachsenden Menschen) werden genetisch verändert. Die Keimbahntherapie zur Korrektur erblicher Krankheiten ist ethisch äußerst fragwürdig

und in den allermeisten Fällen medizinisch nicht angemessen (pränatale Diagnostik und ggf. eine Abtreibung wären weniger belastend). Für einen sehr geringen Teil der Fälle hat der Deutsche Ethikrat eine Keimbahntherapie nicht absolut ausgeschlossen.

gRNA: guide-RNA (s. **crRNA**)

Homology directed repair (HDR)

Durch Strahlung oder andere äußere Einwirkungen kann die DNA-Schaden nehmen bis hin zu einem kompletten Bruch des DNA-Doppelstrangs. In der Zelle gibt es Reparaturmechanismen für solche Fälle, einer davon heißt „homology directed repair“, kurz „HDR“. Im Gegensatz zu „non-homologous end joining“, kurz: „NHEJ“, wird bei HDR der DNA-Strang so repariert, dass er dem ursprünglichen DNA-Strang gleicht. Dazu dient ein weiterer DNA-Strang als Matrize für die Reparatur. Die Wirkungsweise von CRISPR-Cas9 beruht darauf, dass zielgenau ein Doppelstrangbruch erzeugt wird, der dann entweder über HDR oder NHEJ repariert wird.



Homology directed repair (HDR) - Quelle: Stefanie Grüttner, BiuZ-Sonderheft „CRISPR-Cas“ (2024)

Horizontaler Gentransfer: Genetische Information wird üblicherweise von einer Generation zur nächsten übertragen, d.h. wenn sich ein einzelliger Organismus teilt oder wenn Gene bei sexueller Fortpflanzung durch Spermium und Eizelle auf die nächste Generation übertragen werden (vertikaler Gentransfer). In Ausnahmefällen (die gar nicht so selten sind), können Teile der genetischen Information auch von einem Individuum auf ein anderes übertragen werden. Dies ist vor allem bei Prokaryoten bekannt, die z.B. -> Plasmide über -> Konjugation austauschen können. Dabei können auch Artgrenzen überschritten und genetische Informationen von einer Spezies auf eine andere übertragen werden. Plasmide sind von besonderem medizinischen Interesse, weil sie oft Resistenzen gegen ein oder mehrere Antibiotika tragen und so die Behandlung bakterieller Infektionen sehr erschweren.

Horizontaler Gentransfer wird zunehmend auch in höheren Organismen gefunden: so gibt es auch horizontalen Gentransfer zwischen Parasiten und ihren Wirten und bei der Pflanzung von Pflanzen werde Gene zwischen Unterlage und Edelreis ausgetauscht. Ein weiteres bekanntes Beispiel ist die Übertragung von Genen des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* in das Genom eines pflanzlichen Wirts, um dort Tumore auszulösen.

Integrase: Schlüsselenzym von einigen genetischen Elementen u. a. Retroviren, welches essenziell ist, um das virale Erbgut in das Wirtsgenom zu integrieren.

In-vivo: „im lebenden Organismus“. Experimente wie z.B. Arzneimitteltests aber auch Experimente der Grundlagenforschung können in-vitro (im Reagenzglas) oder in-vivo durchgeführt werden. In-vitro Experimente können jedoch nicht die gesamten komplexen

Interaktionen in einem höheren Organismus wie Tier oder Mensch abbilden.

In-vitro: „im Reagenzglas“. Experimente bei denen mehr oder weniger komplett die Situation im lebenden Organismus nachgestellt wird. Im einfachsten Fall ist das eine enzymatische Reaktion, bei der die Umsetzung eines Substrats zu einem Produkt beobachtet wird. Komplexer werden Experimente, bei den z.B. Zellextrakte eingesetzt werden, um bestimmte Effekte zu erreichen. Zellextrakte werden zwar standardisiert, sie sind aber nicht vollständig definiert, weil man nicht alle Bestandteile bis ins Detail kennt. Ein weiterer Schritt sind Organoide, das sind kultivierte Zellen, die dazu induziert werden „Mini-Organ“ zu bilden, die bis zu einem gewissen Grad ein Organ nachbilden und die Effekte einer Behandlung (z.B. mit einem Medikament) besser abbilden als eine Kultur von Einzelzellen. Organoide können jedoch auch nicht die Interaktionen mit anderen Organen in einem ganzen Organismus nachstellen.

Kernlokalisierungssignal: Englisch NLS (nuclear localisation signal). Eine kurze Aminosäuresequenz, die sich oft am Anfang eines Proteins befindet und dieses in den Zellkern leitet. Weil in Eukaryoten Proteine im Cytoplasma synthetisiert werden, müssen einige von ihnen aktiv in den Zellkern transportiert werden (z.B. DNA-Polymerasen). NLS sind gut untersucht und können gentechnisch zuverlässig eingesetzt werden, indem man z.B. die DNA-Sequenz, die für ein NLS codiert, vor ein gewünschtes Gen setzt. Bei der Anwendung von CRISPR-Cas in Eukaryoten muss das Cas9 Protein in den Zellkern, um dort die DNA an der gewünschten Stelle zu schneiden. Für solche Anwendungen wird Cas9 mit einem NLS versehen.

Ko-Evolution: bezeichnet die evolutionäre Entwicklung von verschiedenen Arten, die stark miteinander interagieren. Die Selektion innerhalb einer Art hängt davon ab, wie erfolgreich die Individuen mit der anderen Art interagieren.

Oft ist Ko-Evolution wie ein unendliches Wettrüsten: Ein Organismus A infiziert Organismus B. Daraufhin entwickelt sich in B ein Abwehrmechanismus. A findet einen Weg, den Abwehrmechanismus zu umgehen. Nachkommen von B, die es schaffen, den neuen Infektionsweg von A zu blockieren, haben eine bessere Überlebenschance und dann ist wieder A gefordert, einen neuen Weg zu finden, B zu infizieren. Dies ist jedoch keine gezielte Entwicklung, sondern beruht auf zufälligen Mutationen, die ein besseres Überleben – oder auch ein schnelleres Wachstum – ermöglichen. Ein Beispiel sind Anti-CRISPR Proteine, die von manchen Phagen produziert werden. Sie können u.a. das Schneideenzym blockieren und so der bakteriellen Abwehr entgehen.

Konjugation: Austausch genetischer Information unter Prokaryoten. Voraussetzung ist ein F-Faktor auf einem Plasmid oder im Chromosom des Prokaryoten. Der F-Faktor codiert für F-Pili (-> Pilus), die eine Brücke zwischen zwei Zellen bilden können (einer F⁺ und einer F⁻-Zelle). Über diese Brücke können dann Teile des Chromosoms oder Plasmide auf die F⁻-Zelle übertragen werden. Die Konjugation ist nicht auf Prokaryoten einer Spezies beschränkt, sie kann auch zwischen verschiedenen Arten stattfinden. Weil Plasmide oft Resistenzgene gegen Antibiotika enthalten, ist dieser horizontale Gentransfer wesentlich für die Entstehung multiresistenter Keime verantwortlich.

F-Pili sind oft auch das Ziel verschiedener ->

Phagen, die durch Injektion ihres Erbmateri- als in den Pilus einen Prokaryoten infizieren.

Ligase: Ein Enzym, das zwei DNA-Stränge (z.B. nach einem Einzel- oder -> **Doppelstrangbruch**) verbindet („ligiert“). Zwischen dem letzten Nukleotid des einen und dem ersten Nukleotid des zweiten Strangs entsteht dabei eine Phosphodiesterbindung.

Mesophile: Organismen, die unter „normalen“, moderaten Bedingungen leben. Dazu gehören, mit wenigen Ausnahmen, alle Eukaryoten. Im Gegensatz dazu stehen die -> **Extremophilen**, die nur oder vorzugsweise unter extremen, üblicherweise lebensfeindlichen Bedingungen existieren.

Metagenomics: Mit den rasanten Fortschritten der DNA-Sequenzierung können heute Unmengen an DNA in kürzester Zeit sequenziert werden. Bei Metagenomics wird die gesamte DNA z.B. aus einer Umweltprobe präpariert und sequenziert. D.h. es werden keine einzelnen Organismen isoliert, sondern man sequenziert alles, was in der Probe enthalten ist. Damit werden auch Mikroorganismen erfasst, die im Labor nicht kultivierbar sind und die man nie gesehen hat. Mit Hilfe der Bioinformatik können die DNA-Sequenzen zum größten Teil funktionalen Genen und/oder bekannten Organismen zugeordnet werden. Besonders interessant: Metagenome geben Aufschluss über mikrobielle Ökosysteme und ihre Veränderung in einem Boden, in See-, Meer- oder Flusswasser. Von medizinischer Bedeutung ist das mikrobielle Metagenom (Mikrobiom) des Menschen das deutliche Unterschiede zwischen Individuen und verschiedenen Körperstellen (Haut, Mundhöhle, Darm usw.) aufweist.

Mikrobiom: Die Gesamtheit der Mikroorganismen in einem bestimmten Habitat. Dazu wird **das -> Metagenom** durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Mikrobiome haben einen großen Einfluss auf andere Lebewesen. Beim Menschen sind sie wichtige Indikatoren für Gesundheit, im Boden sorgen sie für Stoffkreisläufe und damit auch für die Fruchtbarkeit auf landwirtschaftlichen Flächen. Wir stehen erst am Anfang, die Diversität von Mikrobiomen, ihre Bedeutung und ihre Veränderungen zu verstehen.

Mini-Casposon: Synthetisches Casposon, das neben den begrenzenden Elementen - Wiederholungssequenzen und Zielsequenz-Duplikation *E. coli* Gene enthält.

Mismatch: fehlerhafte Basenpaarung, die z.B. bei der Replikation der DNA oder durch Mutation einzelner Basen entsteht. In den meisten, aber nicht in allen Fällen werden Mismatches von zellulären Reparatursystemen repariert. Wird ein Mismatch vom Reparatursystem „übersehen“ (oder auch falsch repariert), entsteht eine Mutation. Als Mismatch werden auch Fehlpaarungen zwischen RNA und DNA bezeichnet. Bei CRISPR-Cas Systemen kann es dadurch zu -> **off-target Effekten** kommen.

Modellorganismus: Laien mögen sich manchmal wundern, wieviel Zeit und Geld in aufwändige Untersuchungen an scheinbar irrelevanten Organismen gesteckt wird. Modellorganismen sind Stellvertreter für andere Organismen. Sie haben auch ihren eigenen Wert, sind aber in erster Linie einfacher, schneller, ethisch vertretbarer und weniger aufwändig zu untersuchen als die Organismen, über die man wirklich etwas lernen will. In der Medizin spielt z.B. das „Mausmodell“ eine große Rolle, um

physiologische Prozesse und menschliche Krankheiten zu verstehen. Selbst die Taufliege *Drosophila* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben wesentliche Beiträge zum Verständnis menschlicher Krankheiten geleistet. In der Botanik und der grünen Gentechnik werden vielfach das „Unkraut“ *Arabidopsis thaliana* und der Tabak eingesetzt. Für verschiedene Fragestellungen werden verschiedene Modellorganismen eingesetzt, die spezielle Vorteile haben. Wichtig sind z.B. eine schnelle Reproduktionszeit um mehrere Generationen genetisch verfolgen zu können, eine einfache und kostengünstige Haltung im Labor und leichte Zugänglichkeit z.B. für gentechnische Methoden. Auch andere Merkmale können bei der Auswahl von Modellorganismen eine Rolle spielen: die Embryonen des Zebrafisches *Danio rerio* sind z.B. durchsichtig und erlauben eine einfache mikroskopische Beobachtung der Embryonalentwicklung. Ergebnisse aus Modellorganismen sind natürlich nicht zu 100% auf andere Organismen übertragbar. Aus den detaillierten Untersuchungen weiss man jedoch, wo man mit wesentlich schwierigeren Versuchen in der Medizin und bei Nutzpflanzen ansetzen muss.

Nanoarchaeota: sehr kleine Archaeen mit reduziertem Genom, die meist parasitisch oder symbiotisch mit anderen Archaeen leben. Sie gehören zur Gruppe der **-> DPANN Archaeen** (Akronym für die ersten benannten Archaeen dieses Superphylums: Diapherotrites, Parvarchaea, Aenigmarchaea, Nanoarchaea und Nanohaloarchaea).

nCas9: s. -> dCas9

nested-PCR: PCR-Technik, bei der eine zweite PCR innerhalb einer PCR durchgeführt wird. Dadurch wird die Empfindlichkeit und

Spezifität der Amplifikation deutlich gesteigert.

NGT: „Neue genomische Techniken“. Darunter werden Methoden wie CRISPR-Cas, TALENS und Zinkfinger-Nukleasen zusammengefasst, die zielgenau Doppelstrangbrüche in der DNA setzen und damit zielgenaue Mutationen auslösen können. Juristisch werden drei Kategorien unterschieden: bei NGT-1 wird (meistens) nur ein Schnitt gesetzt, der durch endogene Mechanismen repariert wird. Dabei kommt es zu kleinen Deletionen oder Insertionen, mit denen ein Gen z.B. inaktiviert wird. Wenn bis zu 20 Nukleotide verändert werden, zählt der Eingriff zur Kategorie NGT-1. NGT-1 Organismen sind nicht von Organismen zu unterscheiden, die durch natürliche Mutationen entstanden sind. Organismen der Kategorien NGT-1 enthalten keine DNA von anderen Organismen und werden als cis-gen bezeichnet. Der derzeitige Vorschlag der EU sieht vor, dass für NGT-1 Organismen (hier Pflanzen) die strenge Regulierung nach dem alten Gentechnikgesetz entfällt, u.a. weil ein Nachweis des gentechnischen Eingriffs nicht eindeutig möglich ist.

NGT-2 und NGT-3 Organismen enthalten zusätzliche, größere Abschnitte fremder DNA, auch Gene oder Genabschnitte aus anderen Arten. Sie werden deshalb als trans-gen bezeichnet. Nach dem gegenwärtigen EU-Vorschlag sollen solche Organismen weiterhin der bisherigen Regulierung für gentechnisch veränderte Organismen (GVO) unterliegen.

NLS: nuclear localisation signal **->**
Kernlokalisierungssignal

Non-homologous end joining (NHEJ): Durch Strahlung oder andere äußere Einwirkungen kann die DNA-Schaden nehmen bis hin zu

einem kompletten Bruch des DNA-Doppelstrangs. In der Zelle gibt es Reparaturmechanismen für solche Fälle, einer davon heißt „non-homologous end joining“, kurz: „NHEJ“. Dabei setzen Reparatur-Enzyme an den Enden an, entfernen Nucleotide oder fügen neue hinzu. Auch wenn die losen Enden der DNA wieder zusammengefügt werden, können dabei Mutationen (sogenannte Indels = Insertionen oder Deletionen) entstehen. Die genetische Information wird verändert und es entsteht eine Mutation. (s. auch -> HDR = homology directed repair)

Nucleotid: Die Bausteine der DNA und RNA werden als Nucleotide bezeichnet. Sie bestehen aus einem Zucker (der Ribose bei RNA und der Desoxyribose bei DNA), einer Base (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, in der RNA ist Thymin durch Uracil ersetzt) und einem Phosphorsäure-Rest. Freie Nucleotide liegen (meist) als energiereiche Triphosphate vor. Bei der Synthese von DNA oder RNA wird die Energie für den Einbau durch die Abspaltung von zwei Phosphatgruppen gewonnen.

off-target Effekt: crRNAs steuern eine Zielsequenz sehr genau an. Aber nichts ist zu 100% perfekt! Manchmal werden einzelne -> **Mismatches** zwischen crRNA und der Zielsequenz auf der DNA toleriert und es kommt zu einem Doppelstrangbruch an einer ähnlichen, aber nicht beabsichtigten Sequenz. Off-target Effekte können durch verschiedene Optimierungen reduziert aber niemals ausgeschlossen werden. Wenn man ganz sicher sein will (z.B. bei medizinischen Anwendungen und in der grünen Gentechnik) wird inzwischen oft das komplette Genom der gentechnisch veränderten Zellen oder Organismen sequenziert (-> **DNA Sequenzierung**), um eventuelle off-target Effekte auszuschließen.

Omics: steht für verschiedene Methoden der Biologie, bei den sehr großen Datenmengen erfasst und mit der Bioinformatik verarbeitet werden. Damit können u.a. Verwandtschaftsverhältnisse in großem Rahmen, Interaktionen in Ökosystem oder Zusammenhänge bei komplexen Erkrankungen untersucht werden. Siehe -> **Genomics**, -> **Transcriptomics**, -> **Metagenomics**. (Metabolomics, Proteomics und andere sind noch nicht im Glossar aufgenommen).

PAM: (Protospacer Adjacent Motif) ist eine kurze Sequenz von meist 2-6 Nucleotiden, die auf dem gegenüberliegenden Strang der Ziel-DNA an die die crRNA binden kann. Die PAM-Sequenz ist nicht Teil der crRNA! Sie gibt dem Komplex aus Schneideenzym (Nuclease, z.B. Cas9) und crRNA eine Vorauswahl, um seine Zielsequenz zu finden. Damit der Komplex mit hoher Geschwindigkeit über die DNA laufen kann, wird nicht an jeder Stelle ein Abgleich mit der crRNA gemacht. Nur wenn er über eine PAM-Sequenz läuft hält der Komplex kurz an und die crRNA versucht mit der danebenliegenden Sequenz eine Basenpaarung. Wenn die Sequenz passt, „rastet“ das Enzym ein und der Schneidevorgang findet statt. Passt die Sequenz nicht, läuft der Komplex weiter und stoppt erst wieder am nächsten PAM (<https://www.youtube.com/watch?v=b4c2sqltlbs>).

In der Anwendung bedeutet das, dass man zwar jede beliebige crRNA synthetisch herstellen kann, aber nicht jede Sequenz ist als Ziel geeignet: es muss immer ein PAM daneben liegen.

Wenn Bakterien einen neuen -> **Spacer** aus einem angreifenden Virus ausschneiden, dann ist das keine ganz zufällige Sequenz. Es werden nur Stücke ausgeschnitten, die neben einem PAM liegen. Die ausgeschnittenen

Stücke heißen Protospacer und stellen die zukünftigen Zielsequenzen auf dem Virusgenom dar. Das Ausschneiden erfolgt durch die Proteine Cas1 und Cas2, die in der viralen DNA die PAM-Sequenz erkennen. Ebenso erkennt das Schneideenzym (Nuklease, z.B. Cas9) die PAM-Sequenz. Dabei erfolgt die Erkennung nicht über Basenpaarung, sondern über wenige Aminosäuren im Cas-Protein, die eine bestimmte Basensequenz erkennen und binden können.

Die Cas-Proteine aus unterschiedlichen Organismen erkennen unterschiedliche PAM-Sequenzen.

Um den Anwendungsbereich zu vergrößern, wurden Cas-Proteine molekulargenetisch so verändert, dass sie verschiedene PAM-Sequenzen erkennen können.

Parasitismus, Parasiten: Als Parasitismus bezeichnet man das Zusammenleben verschiedener Organismen, bei denen einer mehr oder ausschließlich von dieser Interaktion profitiert. Obligate Parasiten können ohne ihren Wirt nicht leben, fakultative Parasiten können das schon. Parasiten können ihren Wirt bis zu dessen Tod ausnutzen, andere schwächen den Wirt mehr oder weniger, töten ihn aber nicht. Parasitismus kann sich im Laufe der Evolution zu einer **-> Symbiose** wandeln, dabei profitieren beide Partner von dem Zusammenleben und sind mitunter alleine nicht mehr lebensfähig.

PCR: Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*). Standardverfahren der Molekularbiologie zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann RNA in DNA umgeschrieben und so auch in einer PCR eingesetzt werden. Unter qPCR (quantitative PCR) versteht man eine Abwandlung des

Verfahrens, mit der die Kopienzahl eines DNA-Abschnitts, meistens aber die Menge einer DNA bestimmt werden kann.

Phagen: Ursprünglich Bakteriophagen (= Bakterienfresser) sind im engeren Sinne keine Lebewesen, weil sie keinen eigenen Stoffwechsel und auch nicht die genetischen Anlagen dafür haben. Sie sind Viren, die auf -> Prokaryoten als Wirt angewiesen sind. Sie sind sehr spezifisch und befallen meist nur eine bestimmte Bakterienart. Mit Hilfe des Wirtes können sie sich (parasitisch) vermehren, dabei wird der Wirt getötet (lysiert). Phagen mit DNA als Erbmateriale können in das Genom des Wirts eingebaut werden und dort lange Zeit als „selbstsüchtige DNA“ (-> selfish DNA) ruhen. Phagen mit RNA als Erbmateriale können diese in DNA umschreiben (Retroviren) und dann in die Wirts-DNA einbauen. Die Evolution hat viele Abwehrmechanismen gegen Phageninfektion hervorgebracht, dazu zählen auch -> CRISPR-Cas Systeme. Manche Phagen haben Teile von CRISPR-Cas Systemen von ihren Wirten gestohlen und nutzen sie u.a., um ihren Wirt zu schädigen oder um konkurrierende Phagen abzuwehren.

Weil es Phagen sowohl für Archaea als auch für Bakterien gibt, beschreibt der Begriff „Bakteriophage“ nur eine Familie von Phagen.

Phänotyp: Der Phänotyp umfasst zunächst sämtliche äußeren Merkmale eines Organismus inklusive seines Verhaltens. Der Begriff ist etwas diffus geworden, denn dazu zählen auch Eigenschaften des Stoffwechsels, die man mit geeigneten Methoden messen kann. Grundsätzlich kann man sagen „der Phänotyp ist das, wonach man schaut“. Ein Verhalten muss am lebenden Organismus beobachtet werden, um eine Enzymaktivität messen zu können, braucht man entsprechende Messmethoden. Im Prinzip kann man auch eine

Punktmutation als Phänotyp bezeichnen, wenn man die DNA-Sequenz durch eine Sequenzierung sichtbar macht. In den meisten Fällen wird aber noch zwischen -> Genotyp und Phänotyp unterschieden.

Pilus: (Mehrzahl: Pili) sind haarförmige Anhängsel an Prokaryoten, die, je nach Zusammensetzung, verschiedene Funktionen haben. Bekannt sind die F-Pili, die Kontakte zwischen Zellen herstellen und den Austausch genetischer Information ermöglichen. Pili dienen aber auch dem Kontakt mit Oberflächen, an denen sie sich festsetzen können. Dadurch können Biofilme aus mehreren verschiedenen Arten von Prokaryoten entstehen. Beim Kontakt mit eukaryotischen Zellen spielen Pili oft eine wichtige Rolle bei der Pathogenität. Manche Viren (Bakteriophagen) heften sich an Pili an und nutzen sie als Eingangspforte, um einen Prokaryoten zu infizieren.

Plasmide: meist zirkuläre DNA-Sequenzen, die in Bakterien, Archaeen, aber auch in einigen einzelligen Eukaryoten vorkommen. Bakterien und Archaeen können Plasmide auf andere übertragen und dabei sogar Artgrenzen überschreiten. Plasmide können auch als mobile, parasitäre DNA-Elemente bezeichnet werden. Sie nutzen für ihre Vermehrung die zelluläre Maschinerie ihres Wirts. Plasmide haben komplexe Mechanismen entwickelt, die ihren Wirt daran hindern, sie zu eliminieren. Plasmide können Gene enthalten, die dem Wirt dienlich sind. Dazu gehören Resistenzgene gegen Antibiotika aber auch Gene für Stoffwechsellzyme, die ein Überleben des Wirts unter besonderen Umweltbedingungen erlauben. Dabei schwimmt die Grenze zwischen -> Symbiose und Parasitismus. Manche Plasmide enthalten auch eigene CRISPR-Cas Systeme.

Plasmide sind ein Routine-Werkzeug in der Molekularbiologie. Sie können -> in-vitro zusammengesetzt werden und Kombinationen verschiedener genetischer Elemente (codierende Regionen, Promotoren, funktionale RNA-Gene wie CRISPR-Arrays) enthalten.

Primer: Kurze DNA- oder RNA-Sequenzen, die an spezifische DNA-Regionen binden und von hieraus die DNA-Synthese innerhalb der PCR (künstlich) oder Replikation (natürlich) initiieren.

Prokaryot: Zu den Prokaryoten gehören die Bakterien und die Archaea. Beide haben gemeinsam, dass sie keinen Zellkern besitzen. Dadurch entfallen u.a. Transportvorgänge zwischen Cytoplasma und Zellkern, die bei -> Eukaryoten erforderlich sind. In Prokaryoten kann z.B. die -> Translation schon während der mRNA Synthese (-> Transkription) beginnen.

Protospacer: Als Protospacer bezeichnet man einen DNA-Abschnitt in einem Virus, der von den Proteinen Cas1 und Cas2 ausgeschnitten und dann in den CRISPR-Locus als neuer Spacer eingebaut werden kann. Voraussetzung ist, dass im viralen Genom daneben eine -> PAM-Sequenz liegt.

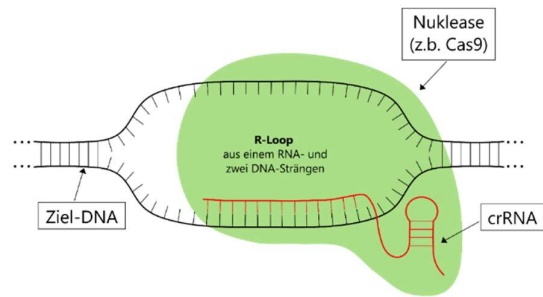
Prozessierung: die meisten RNAs werden nach der Transkription weiterverarbeitet, indem Stücke abgeschnitten oder herausgeschnitten werden oder auch Nukleotide angehängt werden. In CRISPR-Cas Systemen wird i.d.R. ein langes Transkript des CRISPR-Arrays in Einheiten zerlegt, die sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende einen Teil des vorhergehenden als auch des nachfolgenden Repeats enthalten. Dazwischen liegt der Spacer, der die Zielsequenz definiert. Die Repeatsequenzen werden auch als 5'- und 3'-

Handle bezeichnet. Sie sind für die Bindung der crRNA an den **-> Effektor-komplex** erforderlich.

Replikation: Der Vorgang, bei dem eine DNA-Doppelhelix (meist vor einer Zellteilung) verdoppelt wird. Dabei werden die beiden DNA-Stränge getrennt und jeder Strang dient als Vorlage (Template) für eine DNA-Polymerase, die den komplementären Strang synthetisiert.

Ribonukleoprotein-Komplex: (RNP) Eine spezifische Zusammenlagerung von einem oder mehreren Proteinen mit einem oder mehreren RNA-Molekülen zu einer funktionalen Einheit. RNPs sind wesentliche, evolutionär sehr alte Funktionseinheiten des Lebens. Essenzielle biologische Vorgänge wie die **-> Translation** finden an RNPs (hier: Ribosomen) statt. Cas-Nukleasen bilden zusammen mit der crRNA ein RNP.

R-Loop: Eine doppelsträngige DNA ist ziemlich stabil. Um die beiden Stränge lokal zu trennen (durch entwenden oder aufschmelzen), ist ein Enzym und Energie notwendig. Enzyme, die doppelsträngige Nucleinsäuren entwenden bezeichnet man als Helikasen. Eine solche Helikaseaktivität ist auch in Cas9 und anderen CRISPR-Cas-Nucleasen enthalten. Wird die Ziel-DNA aufgeschmolzen, so fädelt sich die crRNA ein und bildet Basenpaare mit einem der beiden DNA-Stränge. Der zweite DNA-Strang bleibt einzelsträngig. Weil eine Basenpaarung zwischen DNA und RNA fester ist, bleibt dieser Komplex, den man als R-Loop bezeichnet (Abb. 1), ziemlich stabil. Erst wenn der Schnitt erfolgt ist, zerfällt er wieder.



R-Loop aus Ziel-DNA, crRNA und Nuklease (Cas9)
(Abb.: Science Bridge)

RNA-Interferenz, RNAi: Die RNA-Interferenz ist ein molekularer Regulationsmechanismus, der auf kleinen (etwa 20 Nucleotide langen) nicht-codierenden RNAs beruht (siRNAs = small interfering RNAs). Diese RNAs sind komplementär zu Abschnitten auf mRNAs und können diese mit Hilfe entsprechender Enzyme zerstören. Es handelt sich dabei um einen posttranscriptionellen Regulationsmechanismus: es gibt keinerlei Veränderung der DNA-Sequenz, nur die Menge an mRNA wird reduziert. siRNAs haben ihren Ursprung in längeren Antisense-Transcripten, die durch das Enzym DICER in die kleinen siRNAs zerlegt werden.

RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus, man findet in fast allen Organismen eine große und vielfältige Zahl an siRNAs, die oft an der Regulation von Transposons beteiligt sind. RNAi wird aber auch gentechnisch als Medikament eingesetzt und ist für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft geplant.

Die Ähnlichkeit mit CRISPR-Cas Systemen ist offensichtlich und zeigt sich auch in ähnlichen, verwandten Enzymen, die an beiden Reaktionen beteiligt sind. Ein etwas ausführlicher Artikel zu RNAi ist hier zu finden:

<https://www.biowisskomm.de/2024/04/wie-man-gene-zum-schweigen-bringt/>

RNA Polymerase: ein Enzym, das von der Vorlage eines DNA Strangs eine RNA synthetisiert (transkribiert). RNA-Polymerasen sind aus mehreren Proteinen (Untereinheiten) aufgebaut. In Eukaryoten unterscheidet man grob zwischen RNA Polymerase I, II und III, die (hauptsächlich) rRNA (ribosomale RNA), mRNA (messenger RNA) und tRNA transkribieren. RNA-Polymerasen werden durch spezifische Promotoren und zusätzliche Proteinfaktoren zum Startpunkt der Transcription geleitet. Dabei spielt auch die Chromatinstruktur (Zugänglichkeit eines Promotors) eine Rolle (-> **Epigenetik**). Bakterien haben nur eine RNA-Polymerase die jedoch durch zusätzliche Proteinuntereinheiten für bestimmte Promotoren spezifiziert werden kann. Archaeen haben hingegen RNA-Polymerasen, die ähnlich aufgebaut sind wie die der Eukaryoten.

RNase: eine Vielzahl von Enzymen, die RNA abbauen oder an bestimmten Stellen schneiden. Sie sind wichtig für die Prozessierung von Transkripten wie z.B. den langen RNAs, die vom -> **CRISPR-Array**, der präzise in Einheiten zerlegt wird, die aus -> **Spacer** und einem Teil der Repeats besteht. Eine andere Aufgabe der RNasen besteht im Recycling von RNAs, die sie in einer Zelle mehr oder weniger schnell abbauen. Die dabei freigesetzten Nukleotide werden danach mit energiereichen Phosphatgruppen beladen und wiederverwendet.

RNA-Sequenzierung: RNA wird aus technischen Gründen nicht direkt sequenziert. Sie wird im Reagenzglas zunächst mit dem Enzym Reverse Transcriptase in DNA umgeschrieben und dann wie bei der -> **DNA-Sequenzierung** verarbeitet. RNA-Sequenzierung erlaubt die Erstellung und den quantitativen Vergleich von -> **Transcriptomen**

z.B. unter verschiedenen Umweltbedingungen oder bei Erkrankungen.

Screening: Aus den Nachkommen einer Kreuzung oder aus einer Population werden die Individuen ausgesucht, die im Phänotyp eine gewünschte Eigenschaft haben. Das kann sehr mühsam sein, weil z.B. eine gewünschte Mutation sehr selten auftritt. Wenn möglich, wird man eine -> **Selektion** vornehmen, bei der nur die Organismen lebensfähig sind, die die gewünschte Eigenschaft haben.

Selektion: Das „Aussortieren“ von Organismen, die eine bestimmte Eigenschaft haben. Bei Bakterien werden Plasmide eingebracht, um bestimmte DNA-Sequenzen zu vermehren oder gewünschte Gene zu exprimieren. Nur wenige Bakterien nehmen im Experiment ein -> **Plasmid** auf. Deshalb enthalten Plasmide zusätzlich meist ein Gen, das Resistenz gegen ein Antibiotikum vermittelt. Auf einem Medium, das dieses Antibiotikum enthält, können nur Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben.

Als Selektion wird auch die Auswahl von Tieren oder Pflanzen mit gewünschten Eigenschaften aus einer Population bezeichnet: man wählt die dicksten Tomaten oder die größten Fische für die weitere Vermehrung aus. Eigentlich handelt es sich dabei um ein -> **Screening**. Bei Selektion wären die unerwünschten Tiere oder Pflanzen nicht lebensfähig.

Selfish DNA: als „selbstsüchtige DNA“ bezeichnet man DNA-Sequenzen, die ihrem Wirt (zunächst) keine Vorteile bieten und ihn ausschließlich zur eigenen Vermehrung nutzen. Dazu zählen mobile DNA-Elemente wie -> **Transposons**, -> **Plasmide**, Viren und -> **Phagen**. Sekundär können diese Elemente jedoch Funktionen annehmen und damit

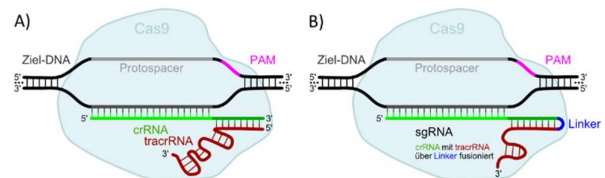
symbiotisch werden. Transposons haben oft strukturelle Aufgaben als **->Centromere** und **>Telomere** in eukaryotischen Chromosomen übernommen. Plasmide tragen häufig Resistenzgene gegen Antibiotika und schützen damit ihren Wirt.

Self-targeting: Die überraschende Beobachtung, dass es **-> Spacer** gibt, die gegen Gensequenzen aus dem eigenen Bakteriengenom gerichtet sind. Wenn es sich dabei um essenzielle Gene handelt, käme das einem „Selbstmord“ gleich. Die Funktion von Self-targeting ist noch nicht vollständig geklärt. In manchen CRISPR-Cas Systemen wird das eigene Gen nicht zerstört, sondern nur runterreguliert – das Self-targeting hat damit eine Funktion bei der Genregulation. In anderen Fällen werden nicht-essenzielle Gene abgeschaltet, was unter bestimmten Umständen einen Vorteil bedeuten kann. Es besteht noch viel Forschungsbedarf, um die Bedeutung von Self-Targeting zu klären.

Sequencing reads (of auch nur “reads”): Bei der **-> DNA-Sequenzierung** wird im Prinzip die Basenabfolge eines spezifischen DNA Abschnitts bestimmt („gelesen“). Mit dem Fortschritt der Sequenzierungsmethodik werden heute mehrere tausend oder Millionen Abschnitte parallel gelesen. Damit werden u.a. Lesefehler korrigiert, indem viele Reads ein und derselben Sequenz verglichen werden. Bei der **-> RNA-Sequenzierung** kann aus der Anzahl der Reads die relative Menge eines bestimmten Transcripts (z.B. einer mRNA oder einer crRNA) bestimmt werden.

sgRNA: Die Klasse II CRISPR-Cas-Systeme brauchen neben der crRNA noch eine tracrRNA, um an das Schneideenzym (z.B. Cas9 im Bakterium *Streptococcus pyogenes*) zu binden und es zur Ziel-DNA zu leiten (Abb. A).

Das ist für die Anwendung umständlich. Deshalb hat man aus zwei RNAs eine gemacht und crRNA und tracrRNA mit einem kurzen Zwischenstück (Linker) verbunden. Diese RNA nennt man „*single guide*“ oder sgRNA (Abb. B).



(Abb.: Science Bridge)

Sichelzellanämie: Eine Blutkrankheit, die durch eine Mutation im β -Globin verursacht wird. Das veränderte Protein verklumpt und die Sauerstoffaufnahme der roten Blutkörperchen ist stark beeinträchtigt. Die Krankheit ist autosomal-rezessiv, nur homozygote Patienten sind betroffen. Heterozygote sind weitgehend symptomfrei. Die Sichelzellanämie ist inzwischen mit einer CRISPR-Cas Therapie heilbar. Dabei wird das fetale Hämoglobin F, das normalerweise nach der Geburt abgeschaltet wird, reaktiviert. Der Gesundheitszustand aller behandelten Patienten hat sich nach der Therapie wesentlich verbessert, einige sind inzwischen völlig symptomfrei.

Spacer: Spacer (Abstandhalter) sind DNA-Trennsequenzen zwischen Funktionsabschnitten auf der DNA. CRISPR-Systeme enthalten im „CRISPR-Array“ kurze, sich wiederholende identische DNA-Sequenzen (Repeats), die von den variablen Spacern getrennt werden. Spacer sind kurze DNA-Stücke, die (meistens) aus Viren herausgeschnitten und in den CRISPR-Array eingebaut wurden. Zusammen mit einer Repeat-Sequenz werden sie zu crRNAs transkribiert und dienen als „Adress-Label“ um

ein Cas-Enzym an eine bestimmte DNA zu leiten.

Symbiose: eigentlich „Zusammenleben“, der Begriff wird aber meist als ein Zusammenleben verwendet, bei dem Wirt und Symbiont davon profitieren. Das unterscheidet Symbiose vom > Parasitismus. In vielen, aber nicht in allen Fällen sind die Partner voneinander abhängig und nicht mehr alleine lebensfähig.

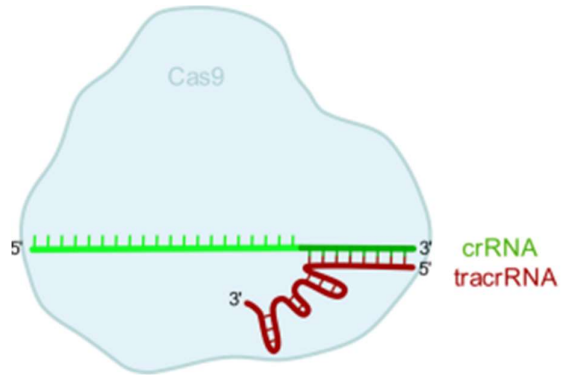
Telomer: Ende eines (eukaryotischen) Chromosoms. Telomere sind eigentlich „offene DNA-Enden“ die ein Ziel für Nukleasen (DNA abbauende Enzyme) darstellen. Telomere bestehen aus vielfach wiederholten DNA-Sequenzen, die durch komplizierte „Knotenstrukturen“ vor diesem Abbau geschützt sind. Bei jeder Verdopplung der DNA (Replikation) werden die Telomere jedoch jedes Mal etwas kürzer, weil die Replikationsmaschinerie nie ganz bis zum Ende die DNA verdoppeln kann. Das wird durch die Telomerase kompensiert, ein Enzym, das die wiederholten Sequenzen an den Enden verlängern kann.

Weil Telomerasen im Alter an Aktivität verlieren, ist die Verkürzung der Telomere eine Alterserscheinung.

Targeting Module: siehe -> Effektorkomplex.

TracrRNA: Die tracrRNA (trans-activating crRNA) ist eine kurze RNA, die mit ihrem 5' Ende über Basenpaarung an die Repeat Sequenzen von crRNAs bindet. Erinnerung wir uns: die crRNA besteht aus einem Stück, das spezifisch auf eine Virus-DNA passt und einem Stück „Repeat“, dass bei allen crRNAs gleich ist. Das andere Ende der tracrRNA weist eine starke Faltung (Sekundärstruktur) auf und ist notwendig, damit der Komplex aus crRNA und tracrRNA an das Schneideenzym (Cas9)

binden kann. Für eine einfachere Anwendung können tracrRNA und crRNA künstlich zu einer „single guide“ oder sgRNA verbunden werden.



(Abb.: Science Bridge)

tRNA-Synthase: tRNAs (Transfer RNAs) sind für die Übersetzung von mRNAs (Messenger RNAs) in ein Protein essentiell. Sie tragen an der einen Seite ein Basen-Triplett (Anti-Codon), das ein spezifisches Codon auf der mRNA erkennt. An der anderen Seite tragen sie die entsprechende Aminosäure, in die dieses Codon übersetzt werden soll. Im Ribosom, der zellulären „Protein-Synthese-Maschine“ wird die Aminosäure auf die wachsende Aminosäurekette (Protein) übertragen. tRNAs werden recycelt. Nach der Abgabe der Aminosäure im Ribosom wird die tRNA neu beladen. Dafür sind die tRNA-Synthasen zuständig. Diese Enzyme müssen die Struktur der tRNA erkennen und sehr genau das Anti-Codon „lesen“ können. Die falsche Beladung einer tRNA wäre fatal! Der genetische Code besteht aus 61 Codons, die für Aminosäuren codieren (plus drei Stopp-Codons, für die es keine tRNAs gibt). Es muss also 61 verschiedene tRNA-Synthasen geben, die 61 verschiedene tRNAs spezifisch beladen können. Der Verlust einer tRNA-Synthase kann für einen Organismus tödlich sein.

Transkription: Das Ablesen einer RNA-Kopie von der DNA. Die Synthese der RNA erfolgt durch eine RNA-Polymerase. Sie erkennt und bindet an eine DNA-Sequenz, die vor einem Gen liegt und als -> Promotor bezeichnet wird. Während oder nach der Transkription werden RNAs i.d.R. noch prozessiert, d.h. es werden Stücke herausgeschnitten, Stücke angehängt oder einzelne Basen modifiziert. Es werden nicht nur RNAs Protein-codierender Gene transkribiert, sondern auch viele weitere regulatorische RNAs und RNAs mit anderen Funktionen (z.B. ribosomale RNA, tRNA).

Transkriptom: -> Transcriptomics

Transcriptomics: Bezeichnet die Sequenzierung und bioinformatische Analyse aller RNAs, die unter definierten Bedingungen in einem Organ synthetisiert (transkribiert) wurden. Die Gesamtheit aller RNAs wird als Transkriptom bezeichnet. Im Gegensatz zu Genomics werden dabei nur die aktiven Gene erfasst. Mit Hochdurchsatz-Sequenzierung kann auch die relative Menge an RNA bestimmt werden, die von jedem Gen abgelesen wird. So kann z.B. die Entwicklung eines Tumors frühzeitig erkannt werden, weil sich die Genexpression von normalem Gewebe unterscheidet.

Translation: „Übersetzung“ der genetischen Information in ein Protein. Die „Translationsmaschinen“ sind die Ribosomen, in denen mit Hilfe von tRNAs der genetische Triplettcode in Aminosäuren umgesetzt wird. In -> Eukaryoten müssen mRNAs nach der Transkription aus dem Zellkern in das Cytoplasma, dem Ort der Translation transportiert werden. In -> Prokaryoten beginnt die Translation meist bereits schon während der Transkription.

Transposase: Schlüsselenzym von DNA-Transposons, essentiell für das Ausschneiden und Wiedereinsetzen von Transposonsequenzen aus, bzw. in ein Genom.

Transposon: Mobiles genetisches Element (-> selfish DNA), welches sowohl seine Position als auch oft seine Kopienanzahl innerhalb des Genoms verändern kann. Besteht meist aus der kodierenden Sequenz verschiedener Enzyme z. B. Transposase und flankierenden Bereichen (repeats). DNA-Transposons werden in der Regel aus dem Genom ausgeschnitten und an anderer Stelle (bei bestimmten Zielsequenzen) wieder eingesetzt („springende Gene“. Ihre Kopienzahl im Genom bleibt relativ konstant, sie können aber bei einer Transposition andere Gene zerstören oder beeinflussen. Bei RNA-Transposons (Retrotransposons) wird die transkribierte RNA in DNA umgeschrieben und dann in das Genom eingebaut. Die Kopienzahl von Transposons in einer Zelle kann ansteigen. Transposons sind zumindest teilweise Abkömmlinge von Viren oder Phagen.

Unkultivierbare Mikroorganismen,
unkultivierte Mikroorganismen: der größte Teil der Mikroorganismen kann nicht in einer Reinkultur im Labor gezüchtet werden. Das liegt z.B. daran, dass diese Organismen unter extremen Bedingungen leben, die im Labor schwer nachzustellen sind (z.B. Organismen, die sich nur bei hohen Temperaturen, unter Sauerstoffausschluss oder unter hohem Druck vermehren). Andere können möglicherweise nur in -> Symbiose mit anderen Organismen leben. Bei vielen kennt man die erforderlichen Nährstoffe und Spurenelemente nicht. Durch Versuch und Irrtum versucht man ständig, „unkultivierbare“ Mikroorganismen doch noch kultivierbar zu machen – Manchmal gelingt das.

Aber woher kennt man dann unkultivierbare Mikroorganismen überhaupt? In den meisten Fällen aus der -> Metagenomik, bei der die gesamte DNA eines bestimmten Biotops sequenziert wird. Beim Abgleich mit riesigen Datenbanken kann man meistens Verwandtschaften zu bekannten Organismen finden, nicht aber genau diese DNA-Sequenz. Das heißt, man hat einen neuen Organismus entdeckt, den man aber nie direkt gesehen hat.

Impressum:

BioWissKomm – Wolfgang Nellen
Geschw. Scholl Platz 5,
34225 Baunatal
info@biowisskomm.de
+49 1523 2705202

Das Projekt „CRISPR-Whisper“ wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP2141 gefördert.

