



Prime Time

von Timothy Riley, PhD, am 30. November 2019

„Go big or go home“ ist oft mein Statement zur Forschungsphilosophie des RSRT. Wie Sie wahrscheinlich wissen, ist es unser Ziel, das Rett-Syndrom in seiner Wurzel anzugreifen: MECP2-Mutationen. Es gibt viele Möglichkeiten, dies zu erreichen. Die traditionelle Gentherapie oder „Gene Replacement“, wie sie oft genannt wird, ist eine Möglichkeit. Gesunde Kopien von MECP2 werden über einen viralen Vektor in die Zellen transportiert. Mit dieser Strategie, welche der Klinik schon am nächsten ist, können wir jedoch nicht kontrollieren, wie viele Kopien des Gens in eine bestimmte Zelle gelangen. Es ist möglich, dass zu viele Kopien des Gens problematisch sein können.

Ein eleganterer Ansatz zur Behebung des Problems der Überexpression wäre die Bearbeitung von Mutationen innerhalb des MECP2-Gens. Sie können sich DNA-Editing als eine molekulare Pinzette vorstellen, welche die mutierte DNA buchstäblich gegen korrigierte DNA austauscht. Zu den Forschungsgruppen, die wir in diesem Bereich finanzieren, gehört Beam Therapeutics. David Liu ist einer der Mitbegründer der Strahlentherapie, sein Labor ist am Broad Institute in Cambridge, MA, zu finden. Vielleicht haben Sie bereits von einem Durchbruch des DNA-Editings namens Prime Editing gehört. Im Folgenden wird erläutert, wie Prime Editing funktioniert. Es ist nämlich wahrscheinlich dazu in der Lage, bis zu 89% der krankheitsverursachenden Mutationen zu reparieren.

Zunächst wollen wir einige Grundlagen klären. CRISPR ist ein Protein, das so programmiert werden kann, dass es eine bestimmte DNA-Sequenz erkennt. Ein kleines Stück RNA, das als Leitsequenz bezeichnet wird, führt das CRISPR-Protein zur richtigen Stelle der DNA und erkennt die entsprechende Sequenz. Damit CRISPR an die DNA bindet, muss eine bestimmte Sequenz von DNA-Basen in unmittelbarer Nähe der zu korrigierenden Mutation vorliegen. Diese Sequenz wird wiederum als PAM-Sequenz bezeichnet. Ihr Erfordernis begrenzt die Anzahl der Mutationen, die von den aktuellen Basen-Editoren repariert werden können.

Sobald das CRISPR-Protein die richtige Stelle gefunden hat, hilft es dabei, die DNA abzuwickeln, damit die Leitsequenz binden kann. Ursprünglich schnitt das CRISPR-Protein namens CAS9 die DNA in zwei Hälften. Es wurde jedoch bereits optimiert, sodass es die DNA lediglich einkerbt. Diese Fortschritte ermöglichen eine höhere Zuverlässigkeit im Editing.

An jene verbesserte Version von CRISPR/CAS9 sind auch andere Proteine gebunden, die DNA modifizieren können. Diese sogenannten „CRISPR-Fusionsproteine“ werden als Basen-Editoren bezeichnet und können Editing sehr spezifisch durchführen. Es gibt jedoch Einschränkungen hinsichtlich der Anzahl und Art der Mutationen, die bearbeitet werden können. Ideal eignen sie sich für bestimmte Punktmutationen (C>T, T>C, A>G, G>A), die eine PAM-Sequenz in unmittelbarer Nähe aufweisen.

In Situationen, in denen die PAM-Sequenz nicht ideal positioniert ist, sind Prime-Editoren die bessere Option. Wichtig ist, dass Prime-Editoren andere Mutationsklassen als die genannten Punktmutationen wie zum Beispiel Insertion, Deletion und sogar die weiteren acht Arten der Punktmutation editieren können.

Bisher konnte Prime-Editing nur in Zellen durchgeführt werden. Der nächste Schritt ist, die Technologie bei Tieren einzusetzen. Fortschritt in diesem Bereich ist sehr schnell. David Liu hat eine Erfolgsgeschichte von seriellen Forschungsdurchbrüchen vorzuweisen. Ich bin also davon überzeugt, dass große Fortschritte erzielt werden.

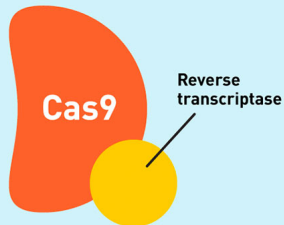
Die Forschungsergebnisse des Prime-Editings hat Dr. Liu kürzlich in Boston präsentiert. Dort hatte ich auch die Gelegenheit, mit ihm über die Geschäftsbeziehung zwischen Prime Medicine und Beam Therapeutics zu sprechen. Aufgrund einer Unterlizenz für Beam Therapeutics von Prime Medicine werden wir durch unsere bestehende Beziehung zu Beam Therapeutics Zugang zu der Technologie erhalten.

Ich freue mich darauf, Ihnen weitere Updates über die Entwicklungen zu geben.

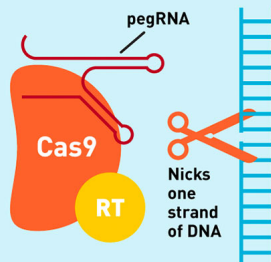
Für Wissenschaft-Nerds wie mich folgen unten weitere Informationen zur Funktionsweise von Prime-Editing.

Search-and-replace genome editing

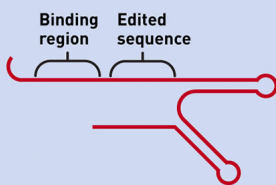
The prime editor complex includes a **Cas9 enzyme**, modified to only nick one strand of DNA, and a **reverse transcriptase enzyme**, which can generate new DNA by copying an RNA template.



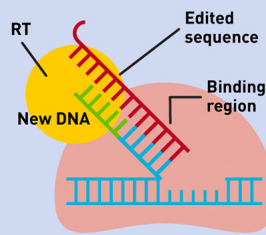
An **engineered "pegRNA"** (prime editing guide RNA) sends the editor to its target, where **Cas9 nicks the DNA**.



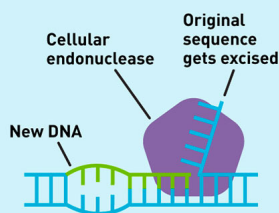
The **pegRNA** has two special components: a **section that binds to the nicked DNA**, preparing the nicked strand to have new DNA letters added, and a **section of RNA letters** that encode the desired edit.



To transfer the edited sequence from the pegRNA to the target DNA, the **reverse transcriptase** reads the **RNA** and attaches the corresponding DNA letters to the end of the **nicked DNA**.



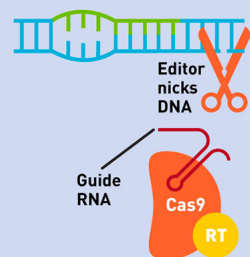
An **endonuclease** in the cell naturally excises the **old segment** of DNA and seals the **new letters** into the genome.



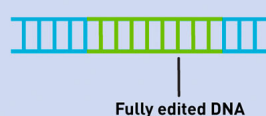
Now, the target site is left with **one edited strand and one unedited strand**.



To resolve the mismatch, favoring the permanent installation of the edited DNA, a **different guide RNA** directs the **prime editor** to nick the unedited strand.



This nick prompts the cell to remake that nicked strand, using the **edited strand** as a template, thus completing the edit.



Im Fall von Prime-Editing werden dem CRISPR/CAS9-Molekül zwei zusätzliche Teile beigefügt. Ein Teil davon ist ein weiteres Protein namens Reverse Transcriptase oder kurz RT (Block 1 in der Abbildung).

RT ist ein Enzym, das einzelsträngige RNA liest und in doppelsträngige DNA umwandelt. Normalerweise halbiert CRISPR die DNA. Diese neue Art von CRISPR-Proteinen schneidet jedoch nur einen der beiden DNA-Stränge (Block 2).

Das zweite Teil, welches hinzugefügt wird, ist ein weiterer Abschnitt der Leitsequenz, der die konkrete Information zur Reparatur der Mutation im MECP2-Protein enthält (Block 3).

Die Information wird nun vom RT-Protein gelesen und in den richtigen DNA-Abschnitt umgewandelt, der die Mutation im MECP2 repariert (Block 4).

Nun greift der natürliche Reparaturmechanismus in all unseren Zellen ein und schneidet die fehlerhafte Sequenz aus dem MECP2-DNA-Code heraus, bevor er den gekerbten DNA-Strang wieder verbindet (Block 5).

Die dadurch entstandene Ausbuchtung in der DNA (Block 6) wird daraufhin durch einen weiteren Einschnitt im gegenüberliegenden Strang geglättet, sodass die reparierte DNA zurückbleibt (Block 8).

Quelle:
The Harvard Gazette, Karen Zusi,
21. Oktober 2019