

# CRISPR RNAs Guide Defense in Prokaryotes

Multiplex Genome Engineering  
Using CRISPR/Cas Systems

Li (and<sup>1,2</sup>) John Ruu,<sup>3,4</sup> David Doi,<sup>3,4</sup> Sanchita Ito,<sup>3,4</sup> Robert Burns,<sup>5</sup> Daniel Rubin,<sup>6</sup>  
Ranjan P. Rao,<sup>3,4</sup> Junting Wu,<sup>3,4</sup> Weiyao Jiang,<sup>7</sup> Eugene A. Marullo,<sup>8</sup> Jing Zhang,<sup>9</sup>

Martijn M. Juez,<sup>1</sup> Camilo Lamijani,<sup>1</sup> Elie R. Weyman,<sup>1</sup>  
Ambravasi, P. L. Snijders,<sup>2</sup> Mark J. Dickman,<sup>2</sup> Kira S. Makarova,<sup>2</sup>  
John van der Oost,<sup>1</sup>

2012

Encoded Resistance in  
*Corynebacterium diphtheriae*

Jessica Libonis,<sup>1</sup> Chantelle Ejimina,<sup>1</sup>  
Seth, and Sylvain Ménard,<sup>1</sup>

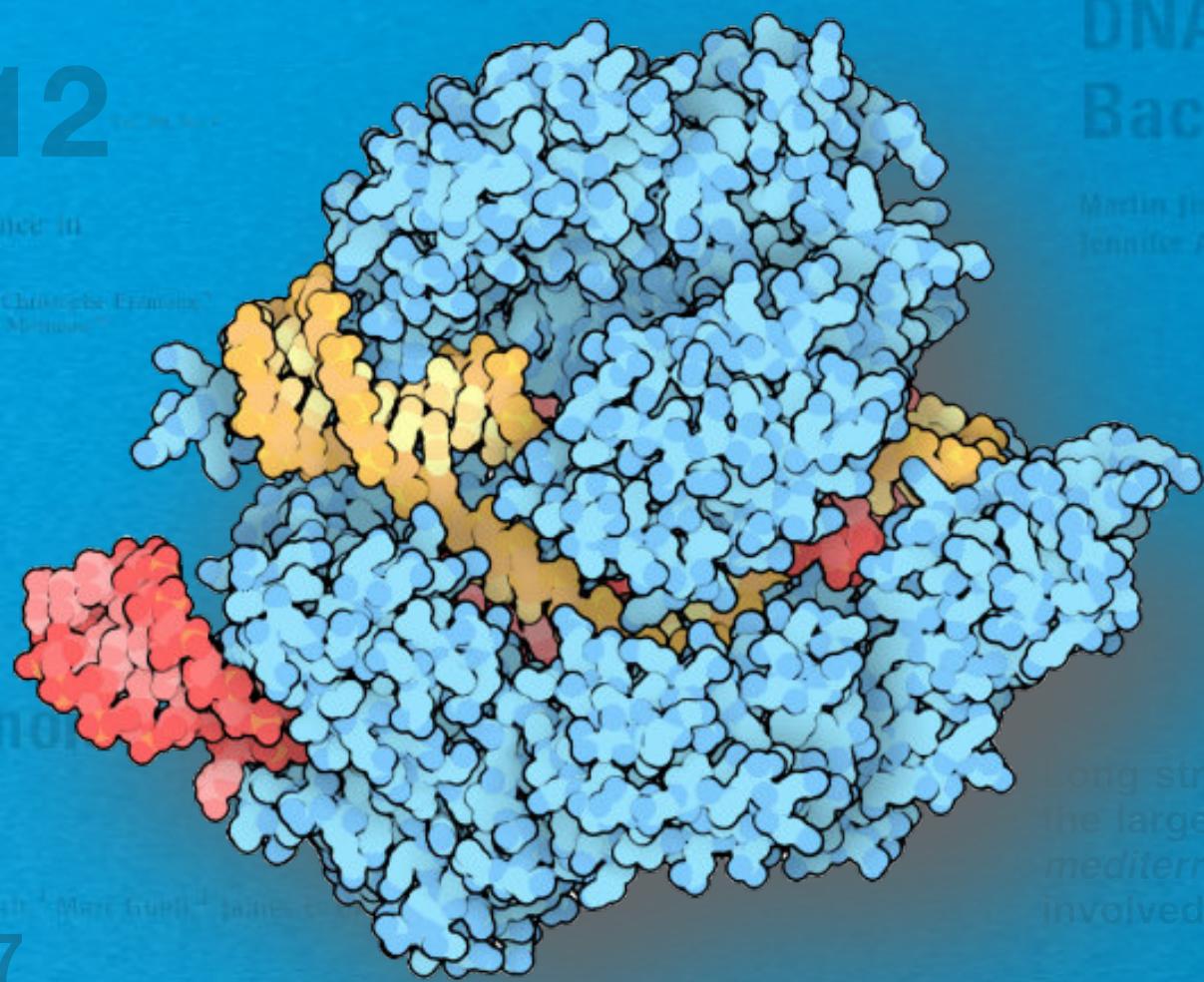
atic

and

an Geno-  
Cas9

Welt,<sup>1</sup> John Aach,<sup>1</sup> Marc Funke,<sup>1</sup> James C.

2007



2005

Long stretches of  
the largest replicon  
*mediterranei* and *H.*  
involved in replica-

F. J. M. Mojica, C. Ferrer, G. Juez and  
F. Rodriguez-Valera<sup>\*</sup>  
Departamento de Genética y Microbiología  
de Alicante - Campus de San Juan, Apa-  
Alacante - Spain

# #CRISPRhistory

erzählt von Marcus Anhäuser

# **CRISPR, Tuberkulose und die Suche des Jan van Embden**

Auch heute noch ist die Gen-Schere CRISPR/Cas9 vor allem ein Versprechen. Sie ist ein Versprechen auf eine bessere Zukunft, trotz all der Schlagzeilen, die sie jetzt schon täglich macht. Bis die großen Ziele erreicht sind – die Heilung schwerer Krankheiten, der alltägliche Einsatz in der Pflanzenzüchtung, das auferstandene Mammut – braucht es Zeit, wenn es denn überhaupt jemals gelingt. Rückschläge sind vorprogrammiert.

Doch es gibt eine Erfolgsgeschichte, die bereits begann, als CRISPR nicht mal seinen Namen hatte oder auch nur jemand ahnte, was dieses eigenartige DNA-Muster aus gleichlangen Wiederholungssequenzen (den *repeats*) und ähnlich langen Zwischenstücken (den *spacers*) für eine Funktion hat.

„Das ist eine tolle Geschichte, nicht wahr!“ Jan van Embdens Begeisterung für die CRISPR-Historie ist sogar

durch die E-Mail hindurch zu spüren, die mir der 75-Jährige schickt. Ich habe den niederländischen Forscher kontaktiert, um mehr über seinen Anteil an dieser Geschichte zu erfahren, seinen Teil, der dieses ganze Kapitel füllt, aber bisher nie erzählt wurde.

Van Embden und sein Team haben CRISPR benutzt, um eine der bedrohlichsten Erkrankungen der Menschheit besser zu verstehen und weniger bedrohlich zu machen: Tuberkulose (TB). Doch die Forscher haben das nicht mit der CRISPR/Cas-Gen-Schere und genome editing erreicht, von denen heute meist die Rede ist. Die Schere war zu den Zeiten, als van Embdens Arbeitsgruppe in den 1990er Jahren auf das eigenartige Muster im Genom eines Bakteriums stieß, nicht mal am Horizont zu erkennen. Damals, ganz am Anfang, gibt es überhaupt nur jene einzige, japanische Arbeitsgruppe die Jahre zuvor ein eigenartiges DNA-Muster in Escherichia coli-Bakterien entdeckt und dann aus den Augen verliert (siehe das vorherige Kapitel: „[CRISPR-Beginn: Herr Ishino und die wunderbare Ahnungslosigkeit](#)“). Die Niederländer sind sozusagen die zweite Chance der Menschheit, CRISPR zu entdecken.

Jan van Embden klingt wie der Name eines niederländischen Renaissancemalers. Ein alter Meister ist er indes in einer ganz anderen Profession: in der Molekularbiologie von Krankheitserregern (neben einigen anderen Themen, denen er sich in seinem Forscherleben

widmete). Ab 1970 arbeitet der junge van Embden, der zum Biochemiker ausgebildet worden war, am Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM, Netherland National Institute for Public Health) in Bilthoven, wenige Kilometer nordöstlich von Utrecht und der dortigen Universität. Er wird dort bis zu seiner Pensionierung im Jahr 2004 bleiben.



In den 1970er Jahren nimmt die biotechnologische Revolution so richtig an Fahrt auf. Grundlegende molekularbiologische Techniken werden entwickelt. Erstmals können Forscher DNA gezielt schneiden und Gene in Bakterien wie *E. coli* einbauen; sie entwickeln die ersten Methoden zur Sequenzierung und präsentieren im Jahr 1976 das erste vollständig sequenzierte Genom über-

haupt – das eines Virus’, das Bakterien befällt. Biologen bestücken nach und nach ihren Werkzeugkasten, um die basale Ebene des Lebens zu verstehen und zu verändern.

Jan van Embden erforscht zunächst die Antibiotika-Resistenz von Salmonellen und sattelt dann auf den Syphilis-Erreger um. Für dessen Diagnose braucht man Antigene, die zu dieser Zeit noch aus Bakterien aus den Hoden von Kaninchen extrahiert werden. Mit den neuen molekularbiologischen Werkzeugen schafft es van Embden, die Antigene in *E. coli*-Bakterien zu produzieren – was nicht nur den Kaninchen recht ist.

Dann sucht die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Anfang der 1980er Jahre Projekte, die mit genau dieser Technik die Diagnose von Tuberkulose verbessern sollen. Van Embdens Team bewirbt sich um die Gelder – und bekommt den Zuschlag. So beginnt seine Liaison mit dem Erreger der Tuberkulose *Mycobacterium tuberculosis*, die ihn bis ans Ende seiner Karriere 2004 begleiten wird.

Tuberkulose – früher auch als Schwindsucht bezeichnet – war immer eine der Geißeln der Menschheit und ist heute noch die Infektionskrankheit, die weltweit die meisten Menschen tötet. Auch wenn die wenigsten tatsächlich erkranken, die sich das Bakterium einfangen, sterben heute jeden Tag vier- bis fünftausend Menschen, vor allem in Südostasien und Afrika. Die

Zahlen in den industrialisierten Ländern sind zwar seit dem Zweiten Weltkrieg stetig gefallen – 1953 registrierten die US-amerikanischen Zentren für Seuchenkontrolle und -prävention (CDC) rund 84.000 TB-Fälle im Land, 1985 sind es nur noch 22.000. Doch mit der Aids-Epidemie und zunehmenden Resistenzen der Bakterien gegen Antibiotika schlägt der Erreger in den 1980er Jahren zurück. In den USA schnellt die Zahl bis 1992 auf mehr als 26.000 Erkrankte hoch.

Die Mediziner erwischt die „Schwindsucht“ auf dem falschen Fuß, denn Forschungsgelder sind mit der Zeit wegen der sinkenden Erkrankungszahlen zusammengekürzt worden. Eigentlich dachten die Verantwortlichen, sie hätten die Krankheit im Griff, doch die Werkzeuge im Kampf gegen Tuberkulose sind seit über hundert Jahren fast dieselben geblieben. Wie eh und je färbt man Bakterien in Abstrichen unter dem Mikroskop an, um sie einigermaßen sicher zu identifizieren und setzt ein paar Jahrzehnte alte Antibiotika oder einen wenig wirksamen Impfstoff ein, um der Krankheit Herr zu werden. Das Wissen über den Erreger, seine Art sich zu verbreiten, ist begrenzt. Neue Mittel und neue Methoden zur Diagnose sind von Nöten, um die neue Erkrankungswelle in den Griff zu bekommen.

## Zwei entscheidende Entwicklungen

Bevor van Embden und sein Team wirkungsvoll in diesen Kampf einsteigen und damit ihren Beitrag zur Geschichte von CRISPR/Cas leisten, braucht es indes zwei weitere entscheidende Entwicklungen.

Die eine ist die Erfindung einer der wichtigsten Labortechniken überhaupt: die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR, polymerase chain reaction*). Der Biochemiker Karry Mullis hat den Heureka-Moment dazu in einer Frühlingsnacht 1983, als er mit seiner Freundin im Wagen auf dem Weg zu seiner Hütte in Nordkalifornien ist. Zehn Jahre später erhält er dafür den Nobelpreis. Mit dieser Methode ist es möglich, winzigste Mengen an Genmaterial beliebig oft zu vervielfältigen und damit so stark anzureichern, dass man eine individuelle Sequenz überhaupt erst eindeutig nachweisen und genauer untersuchen kann. Ohne PCR wären die moderne Molekularbiologie und die Biotechnologie sowie viele bahnbrechende Entwicklungen vom genetischen Fingerabdruck bis zum Vaterschaftsnachweis kaum denkbar. Die Rolle der PCR ist in der Geschichte der Biowissenschaften kaum zu überschätzen. Sie dürfte die am häufigsten verwendete Labormethode überhaupt sein. Man könne die Biologie in eine Epoche vor und eine nach der PCR einteilen, schreibt die *New York Times* im Jahr 1998.

Das zweite Ereignis ist nicht so spektakulär, aber dennoch bedeutend. Es ist eine Entdeckung französischer Forscher, die es erstmals ermöglicht, die Erreger der Tuberkulose mit gentechnischen Mitteln zu erkennen, zu unterscheiden und somit genauer zu erforschen. Bis Ende der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts war all das noch ein hoffnungsloses Unterfangen gewesen.

Denn auch wenn man immer von dem Erreger der Tuberkulose *Mycobacterium tuberculosis* spricht, handelt es sich eigentlich um eine Gruppe von mehreren Bakterienunterarten, die alle Tuberkulose bei Menschen und Tieren auslösen. Dazu zählt der Hauptverursacher *M. tuberculosis*, aber auch die Rindervariante *M. bovis*, die Rinder, aber eben auch Menschen infiziert, und die beide unter dem Mikroskop leicht zu verwechseln sind. Forscher fassen all diese Unterarten unter dem Begriff *Mycobakterium tuberculosis*-Komplex zusammen (engl. *Mycobacterium tuberculosis complex*, MTC oder MTBC).

Obwohl es also verschiedene Unterarten des stäbchenförmigen TB-Erregers gibt, gilt Ende der 1980er Jahre der gesamte Komplex als genetisch so gleichförmig, dass man die verschiedenen Einheiten mit den damals möglichen Methoden auf der Ebene der DNA kaum zu fassen bekommt. Die genetischen Unterschiede zwischen den Unterarten erscheinen einfach zu klein. Aber nur wenn man die Erreger genau identifizieren

kann, kann man ihre Ausbreitung nachzeichnen oder überprüfen, wer sich bei wem angesteckt hat. Auch Kontaminationen im Labor oder im Krankenhaus lassen sich nur so sicher nachzeichnen.

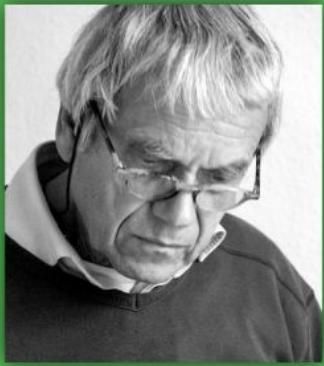
All das ändert sich, als im Januar 1990 eine aufsehenerregende, einseitige Mitteilung im Fachblatt *Nucleic Acids Research* ([PDF](#)) erscheint, die ausführlich durch eine Arbeit in der Dezemberausgabe des *Journal of Clinical Microbiology* ([PDF](#)) ergänzt wird. Der französische Molekularbiologe Dominique Thierry und seine Kollegen am Institut Pasteur in Paris haben eine DNA-Sequenz entdeckt, die 1361 Basenpaare lang ist, und sich mehrfach im Chromosom der Tuberkelbakterien wiederholt. Die Forscher nennen sie Insertions-Element 6110, kurz IS6110, ein Vertreter der „mobilen genetischen Elemente“, die es – wie man heute weiß – in den Genomen der Organismen dieser Welt in Hülle und Fülle gibt. Es ist ein klassisches „egoistisches Gen“, fast so etwas wie ein Virus, wenn auch nicht so zerstörerisch. Die Sequenz vervielfältigt sich selbstständig und fügt sich immer wieder ins Genom ein, einfach weil sie es kann. Ein blinder Passagier im Chromosom der Bakterien.

Der Clou ist: Thierry und seine Kollegen weisen nach, dass IS6110 exklusiv in den Vertretern des Tuberkulose-Komplexes vorkommt, sich aber durch Position und Häufigkeit von Unterart zu Unterart unterscheidet.

Damit ist es als Marker für das Auseinanderhalten der verschiedenen Typen von Tuberkulose-Erregern prädestiniert. Das macht den Fund so aufregend. Er öffnet eine neue Tür.

Der einzige Nachteil der Methode, die Thierry und Kollegen in der Folge entwickeln: Weil für die Analyse sehr viel DNA nötig ist, müssen die Bakterien erst kultiviert werden, was viele Wochen dauert, da Tuberkulose-Bakterien echte Wachstumsschnecken sind. *E. coli* braucht im Labor unter günstigen Bedingungen zwanzig bis dreißig Minuten, um sich zu verdoppeln, bei *M. tuberculosis* kann das bis zu einem Tag dauern.

Für Jan van Embdens Team ist die Entdeckung von IS6110 der Startschuss, solche Wiederholungssequenzen im *M. tuberculosis*-Komplex zu suchen und zu erforschen. Die Niederländer erkennen das Potenzial für die Diagnostik, denn, so van Embden: „Es war lange bekannt, dass solche repetitiven Sequenzen in Bakterien ziemlich variabel sind.“ Und eben wegen dieser Variabilität könne man sie nutzen, um Bakterienstämme und Unterarten voneinander zu unterscheiden. Genau das brauchte es, um den Tuberkulose-Komplex endlich genetisch zu erschließen und ein weiteres potentes Diagnostiktool im Kampf gegen die Erreger in die Hände zu bekommen.



INFECTION AND IMMUNITY, Aug. 1991, p. 2695-2705  
0019-9567/91/082695-11\$00.50/0  
Copyright © 1991, American Society for Microbiology

**Insertion Element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG Is Located in a Hot-Spot Integration Region for Insertion Elements in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains**

PETER W. M. HERMANS,<sup>1</sup> JEREMY W. DILKE,<sup>2</sup> AND JAN A. D. E. VRIES<sup>1</sup> ELIZABETH M. BIK,<sup>1</sup> PETRA E. W. DE HAAS,<sup>1</sup> JEREMY W. DILKE,<sup>2</sup> AND JAN A. D. E. VRIES<sup>1</sup> National Institute of Public Health and Environmental Protection, P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven, The Netherlands,<sup>1</sup> and Department of Microbiology, University of Surrey, Guilford, Surrey GU2 5XH, United Kingdom<sup>2</sup>

Received 18 February 1991/Accepted 20 May 1991

Most strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex carry multiple copies of an IS1311-like element, and these strains are highly polymorphic with regard to the site of integration in the chromosome. In contrast, *Mycobacterium bovis* BCG contains a single copy of the insertion element, and in all strains this copy is integrated at the same site in the genome. In this study, we determined the sequence of the homologous insertion element found in BCG, IS987, and its location in the genome. The sequence of IS987 and the insertion element was virtually identical to the sequence of IS989 from *M. tuberculosis*. IS987 is located in a region containing inverted repeats (IR). The insertion element contains two inverted DNA repeats of 14 bp, each separated by 35 bp (41 bp of spacer DNA). Analysis of other insertion elements in the *M. tuberculosis* complex revealed the presence of a cluster of 49 IRs, and IS987 is inserted in the 38th IR. Furthermore, the IR sequences were found to occur only in species of the *M. tuberculosis* complex and not in some other mycobacteria species studied. Analysis of *M. tuberculosis* strains revealed that in one strain two insertion sequence elements were located in the IR-containing region of eight strains, two insertion sequence elements were located in the DR region of five strains, and one strain contained an insertion sequence element in this region. Additionally, the presence of a cluster of 14 IRs in BCG strains was predicted to be in 98% of the genome composition. We conclude that the DR cluster is a specific, hot-spot region for integration of insertion elements in the chromosome of *M. tuberculosis* complex strains.

Insertion sequences (ISs) and transposons are mobile genetic elements encoding genes which are essential for transposition. Insertion of these elements into structural genes can lead to mutations. Insertions of IS elements were first detected as a result of their strong polar effects due to insertions near the lacZ (3) and gal (11) operons of *Escherichia coli*. Insertions have also been observed in gram-positive bacteria such as *Bacillus* (12) and *Staphylococcus* (13) spp., gram-negative bacteria such as *Agrobacterium* (10), and *Shigella* (15) spp., and archaeabacteria (3).

*Mycobacteria* have recently been added to the list of insertion element hosts. An IS element, IS10, was isolated the transposable element Tn10 from *Mycobacterium fortuitum* PC1, encoding sulfonamide resistance. Tn10 contains an IS10 element and a kanamycin resistance gene. An insertion element, IS6110, which shares similarity with the enterobacterial IS6 family, Four copies of IS610 are present in the *M. tuberculosis* complex. IS610 has been found in *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* complex, or other *M. fortuitum* strains. IS610 has been shown to occur in *Mycobacterium smegmatis* (14).

The analysis of repetitive DNA in mycobacteria has led to the discovery of several insertion elements. McEvily et al. have isolated a repetitive DNA element, IS990, from *Mycobacterium paratuberculosis* (17). IS990 is present in 10 to 15 copies in the chromosome of *M. paratuberculosis* and some *Mycobacterium avium* strains (6, 18). IS990 consists of a single copy of the IS5 element, and the chromosomal site of integration was identical in these strains (8). The absence of any IS element in the BCG genome of *M. bovis* BCG strains indicates that no transposition of the IS5 element has taken place during culture of these strains. This suggests that either the BCG genome does not have the capacity to transpose or that the transposition frequency is extremely low. One may speculate that the IS5 element is involved in the attenuation of virulence of *M. bovis* BCG.

\* Corresponding author.

2695



Peter Hermans (re.) und Jan van Embden (li.) und die erste Seite ihres Fachartikels aus dem Jahr 1991 im Fachmagazin 'Infection and Immunity', in dem sie erstmals CRISPR im Genom des Rinder-Tuberkulosebakteriums *Mycobacterium bovis* BCG beschreiben, das die Grundlage des Tuberkulose-Impfstoffs ist.

Anhäuser/privat/Infection and Immunity/privat

Inzwischen nutzt die niederländische Arbeitsgruppe auch die neue PCR-Technik, womit sie für eine Analyse mit winzigen Mengen an DNA auskommt. Jan van Embdens Mitarbeiter Peter Hermans, Mitte Zwanzig, macht sich im Rahmen seiner Doktorarbeit als erster auf die Suche nach weiteren Wiederholungssequenzen. Und

er schaut sich IS6110 bei einem ganz speziellen Fall genauer an: beim Tuberkulose-Bakterium *M. bovis* BCG.

Die Rindervariante mit dem Zusatz BCG spielt in der Tuberkulose-Geschichte eine besondere Rolle. BCG steht für Bacillus Calmette-Guérin. Die Franzosen Albert Calmette (1863–1933) und Camille Guérin (1872–1961) hatten Anfang des 20. Jahrhunderts aus dem Wildtyp von *Mycobacterium bovis* durch wiederholte Fortzüchtung ein abgeschwächtes Bakterium entwickelt. Diese Form war dann die Grundlage für den bisher einzigen Impfstoff, der vor allem nach dem Zweiten Weltkrieg gegen die Tuberkulose eingesetzt wurde. Inzwischen wird er nur noch in einzelnen Ländern verwendet, weil er nicht sehr wirksam und auch nicht besonders sicher ist. Welche Veränderungen auf der Gen-Ebene das Bakterium einst abgeschwächt hatten, war indes nie klar geworden.

Hermans möchte genau das herausfinden und geht einem Verdacht nach. In dem abgeschwächten Bakterienstamm findet sich nur ein einziges Exemplar von IS6110. Solche mobilen genetischen Elemente sind nicht besonders gefährlich für Bakterien, es sind eben keine Viren. Trotzdem kann es passieren, dass sie sich beim Einnisten ins Chromosom mitten in die Sequenz eines funktionierenden Gens quetschen. Damit machen sie den genetischen Code an dieser Stelle für die Zelle

unlesbar, und das Bakterium verliert eine wichtige Funktion.

Hermans will nun in seiner Studie überprüfen, ob das Tuberkulose-Bakterium des Impfstoffs seine Gefährlichkeit – seine Virulenz – schlicht dadurch verlor, dass IS6110 sich ausgerechnet in die Sequenz eines Gens verpflanzte, das für die Virulenz des Keims maßgeblich ist. Der junge Forscher sequenziert also die Umgebung um das IS-Element herum. Er möchte herausfinden, in welcher genetischen Landschaft IS6110 – das in diesem Bakterium IS987 heißt – gelandet ist. Und er wird ziemlich überrascht: Statt eines einzelnen Gens findet Hermans etwas völlig anderes.

mycobacterial DNA inserts of pPH1001 and pPH1002 disclosed the sequence of a segment 486 bp left of, and 999 bp right of, IS987. A striking feature of these flanking sequences is the presence of multiple DRs of 36 bp, each separated by spacer DNA, 35 to 41 bp in length. These spacers are nonrepetitive, except for two, each of which was found twice in the sequence (Fig. 2). Seventeen of 20 DRs were completely identical, whereas one nucleotide substitution was observed in two DRs. One DR was split by the insertion of IS987. This DR contained a 3-bp duplication (5'CCC), supposedly due to the integration of IS987. Such a 3-bp duplication has also been found in the target DNA of IS6110 (27). No significant homology of the DR with DNA sequences present in the GenBank data library was found.

**Determination of the number of DRs flanking IS987 in *M. bovis* BCG.** To investigate the number of DRs flanking IS987, we synthesized oligonucleotides that allowed the amplification of DR-containing sequences to the left and right of the

Der Niederländer ist genauso entzückt von dem, was er fand, wie ein paar Jahre vor ihm schon der Japaner Yozishumi Ishino, der CRISPR an der Universität Osaka als erster zu Gesicht bekommen hatte (siehe: „CRISPR-Beginn: Herr Ishino und die wunderbare Ahnungslosigkeit“).

„Ich war beeindruckt von diesen angrenzenden Bereichen, weil sie aus vielen direkten Wiederholungen (*direct repeats*, DR) und dazwischen liegenden einzigartigen Distanzstücken (*unique spacer*) zusammengesetzt sind“, sagt Hermans heute, inzwischen selbst Professor am Radboud Institute for Molecular Life Sciences der Universität Nijmegen.

## DNA-Sequenzen im Vergleich

## Repeat von *Escherichia coli*

## 29 Basen lang

# Repeat von *Mycobacterium tuberculosis*

## **36 Basen lang**

## Palindromische Sequenzen

**A**denin **T**hymin **G**uanin **C**ytosin

Check!

Besonders frappierend: Alle sich nahezu perfekt wiederholenden DNA-Stückchen sind exakt 36 Basen lang, alle Abstandshalter zwischen 35 und 41 Buchstaben. Zum Vergleich: Bei Ishinos und Nakatas E. coli-Bakterien sind die *repeats* 29, die *spacer* 32 Basen lang.

Escherichia coli

● ● beliebige Base

### Repeat Spacer

29 Basen lang 32 Basen lang



36 Basen lang 35 bis 41 Basen lang

### Repeat Spacer

Mycobacterium tuberculosis complex

[zurück](#)

Das Team findet einen Weg, mittels PCR die *repeats* zu zählen und kommt auf 49. Im dreißigsten Wiederholungsstück hat sich IS6110 eingenistet und zerteilt es in zwei Abschnitte. Hermans checkt zwei weitere BCG-

Linien und findet die identische Situation vor: 49 *repeats*, jedes 36 Basenpaare lang, dazwischen die *spacer*, und das dreißigste repeat wird von IS6110 zer-teilt. Das stachelt seine Neugier weiter an. Er untersucht andere Tuberkulose-Unterarten und wird auch dort fündig, aber – und dieser Punkt ist entscheidend – nur bei den Vertretern des *M. tuberculosis*-Komplexes. Bei anderen Mycobacterien-Arten, die Menschen nicht krank machen, erscheint an der entscheidenden Stelle kein Band auf dem Agarose-Gel.

Hermans testet auch *E. coli* – einfach, weil es das Standardbakterium der Laborbiologen ist – genau die K12-Linie, bei der wenige Jahre zuvor die Japaner Ishino und sein Chef Atsuo Nakata zum allerersten Mal dieses außergewöhnliche Muster entdeckt hatten. Doch das Gel des Niederländers zeigt keine Reaktion. Was er nicht weiß: Zwar besitzt *E. coli* *repeats*, doch sind die Sequenzen des Tuberkulose-Erregers und des Magen-Darm-Bakteriums völlig unterschiedlich. Sie haben nur dieselbe Struktur.

Deshalb bleibt auch sein nächster Versuch erfolglos, die Tuberkulose-*repeats* an anderer Stelle zu finden. Peter Hermans gibt die 36 Basen lange Buchstabenfolge bei GenBank ein, einer der drei großen internationalen DNA-Sequenzdatenbanken der Forschungswelt, die sich Anfang der neunziger Jahre zunehmend schneller mit DNA-Sequenzen aus allen nur erdenklichen Organismen

füllen. Und er findet nichts. Jede Bakterien-Art, die ein CRISPR-System trägt, besitzt ihre eigene Repeat-Sequenz, wie wir heute wissen.

Was er damals auch nicht weiß: Es sind die *spacer*-Sequenzen von CRISPR, die auf DNA von anderen biologischen Einheiten zurückzuführen sind. Doch die gibt er nicht ein. Was wäre passiert, hätte er damals auch einige *spacer*-Sequenzen gegengecheckt? Wäre er fündig geworden? Hätte er das Rätsel des Ursprungs und der Funktion des von ihm untersuchten einzigartigen DNA-Abschnitts schon damals lösen können?

Sein Chef Jan van Embden wird genau das neun Jahre später versuchen.

Peter Hermans kann zumindest seine Ausgangsfrage mit ziemlicher Sicherheit beantworten: Offensichtlich hatte sich IS6110 nicht in einem Gen breit gemacht, das der Virulenz diente, und hatte somit *M. bovis* BCG auch nicht handzahm machen können. Dort war gar kein Gen, sondern eine Region aus *repeats* und *spacers*. Hermans war auf CRISPR gestoßen, genau wie vor ihm die Japaner. Er schreibt in seinem Artikel, der in Band 59, Ausgabe 8 (August) des Jahres 1991 auf den Seiten 2695 bis 2705 der Zeitschrift *Infection and Immunity* erscheint:

„Da die [IS-]Elemente in der DR-Region sowohl auf dem Chromosom von *M. tuberculosis*-Stämmen als auch

*von M. bovis BCG-Stämmen eingefügt werden, ist es unwahrscheinlich, dass der Mangel an Virulenz von M. bovis BCG auf die Inaktivierung eines Gens, das an der Virulenz beteiligt ist, durch das Einfügen von IS987 zurückzuführen ist.“*

*„Because elements are inserted in the DR region on the chromosome of both M. tuberculosis strains and M. bovis BCG strains, it is unlikely that the lack of virulence of M. bovis BCG is due to IS987 insertional inactivation of a gene which is involved in virulence.“*

*(Anmerkung: Im Artikel wird das IS-Element als IS987 bezeichnet, entspricht aber IS6110 der anderen Unterarten.)*

Das ist ein durchaus eindeutiges Ergebnis, wenn auch kein weltbewegendes, eher von der Sorte: „Gut das wir mal darüber gesprochen haben.“ Für die Geschichte von CRISPR ist der Fund dennoch wichtig, denn er zählt meist als erster Nachweis von CRISPR in der zweiten der beiden großen Bakterien-Gruppen. *Escherichia coli* – das Bakterium, das Ishino und Nakata untersuchten – gehört zur großen Gruppe der gramnegativen Bakterien. Tuberkulosebakterien werden häufig zur Gruppe der grampositiven gezählt. Es gibt aber auch viele Wissenschaftler, die sagen, dass die Tuberkulose-Erreger in keine der beiden Gruppen gehören.

Die Bakterien beider Gruppen unterscheiden sich im Aufbau ihrer Zellhülle. Das führt dazu, dass man die gramnegativen Bakterien anfärben und entfärben kann (um sie mit einem anderen Farbstoff zu färben), während man die grampositiven Bakterien nicht mehr entfärben kann. Damit lassen sie sich im Mikroskop leicht unterscheiden. Die Methode ist seit über 130 Jahren ein wichtiges Nachweiserfahren, um zum Beispiel schnell einen möglichen Krankheitserreger auszuschließen oder herauszufinden, welches Antibiotikum wirksam wäre. Benannt ist sie nach dem dänischen Bakteriologen Hans Christian Gram, der den ersten Schritt dieser Gramfärbung um 1884 erfunden hat.

Es gibt auch einige Fälle, die in keine der beiden Gruppen so richtig passen, weil zum Beispiel ihre Hülle anders aufgebaut ist, so wie bei Tuberkulose-Bakterien. Zählt man *M. tuberculosis* aufgrund anderer Eigenschaften trotzdem zu den grampositiven Bakterien, dann ist der Fund auf jeden Fall ein wichtiger Meilenstein in der CRISPR-Geschichte. Zählt man es nicht dazu, wäre der Fall aber immer noch bedeutend. Denn es ist der erste Nachweis von CRISPR jenseits von gramnegativen Bakterien. Wichtig macht die Entdeckung zudem, dass Tuberkulose-Erreger auf dem Stammbaum der Bakterien auf einem Ast sitzen, der weit entfernt vom *E. coli*-Ast ist. Und schließlich: Die Niederländer sind in den 1980er und 90er Jahren weltweit erst die zweite

Arbeitsgruppe überhaupt, die CRISPR-Strukturen nachweist. Wenn man Ishino und Nakatas Team mit der Crew von Apollo 11 vergleicht, dann sind die Niederländer um Hermans und van Embden Apollo 12.

Die Arbeiten der Japaner übersieht der junge Niederländer damals. Es ist viel schwieriger als heute, relevante Artikel zu einem Thema aufzuspüren, da man dafür noch Stunden und Tage in der Bibliothek verbringen muss, um Stichwortverzeichnisse und Microfiche-Kataloge zu durchstöbern, und auf Tipps von Kollegen oder Hinweise aus Übersichtsarbeiten angewiesen ist. Van Embdens Team wird den *E. coli*-Fund der Japaner erst Ende der 1990er Jahre registrieren.

Vielleicht auch deshalb entgeht den Forschern ein typisches Kennzeichen vieler CRISPR-repeats, auf das Ishino in seiner 1987er Arbeit bereits hingewiesen hatte: ein Abschnitt mit einer palindromischen Sequenz. Das P in CRISPR steht für diese besondere Sequenzstruktur. Damit kann sich ein einsträngiges Stück DNA an diesen Stellen zu einer zweisträngigen Strickleiter zusammenlegen. Aus der eindimensionalen Perlenkette wird eine zweidimensionale Haarnadelstruktur mit einer Öse am Ende, mit dem sich ein Stück DNA in ein Protein einpassen kann (siehe auch das Kapitel „[CRISPR-Beginn: Herr Ishino und die wunderbare Ahnungslosigkeit](#)“).

Jan van Embden hat heute eine einfache Erklärung dafür, dass ihnen das damals nicht aufgefallen ist: „Peter Hermans hat nach vielen verschiedenen Wiederholungssequenzen gesucht. Die Struktur der Sequenzen spielte dabei keine Rolle.“ Was man nicht sucht, wird man meist nicht finden.

Eines aber haben beide Arbeitsgruppen aus den so weit entfernten Teilen der Welt gemein: Sie wissen nicht, was dieses erstaunliche Sequenzmuster biologisch gesehen überhaupt ist oder welche Funktion es im Bakterium hat. Die Niederländer vermuten, dass es eine Bedeutung haben sollte: „Das Vorhandensein und die Konservierung der DRs in allen Arten des *M. tuberculosis*-Komplexes deuten auf eine biologische Rolle für diese Sequenzen hin; ihre Funktion ist derzeit jedoch noch unbekannt“, schreiben sie. Und am Ende des Textes versuchen sie es doch noch mit einem educated guess:

*„(...) könnte man über die Möglichkeit spekulieren, dass die DR-Sequenzen Bindungsstellen für ein Protein sind, das an der Regulation von DR-Grenzgenen beteiligt ist (...).“*

Zumindest was das Vorhandensein angrenzender Gene betrifft, liegt das Team gar nicht so verkehrt. Das Cas in CRISPR/Cas9 steht genau für diese angrenzenden Gene. Es wird ein junger Niederländer von der

benachbarten Universität Utrecht sein , der später genau diese benachbarten Gene findet. Auch dass die *repeats* Bindungsstellen für Proteinmoleküle sein könnten, wird sich noch als hellsichtig erweisen – wenn auch auf ganz andere Art und Weise als damals gedacht.

Die historische Bedeutung ihrer Arbeit spielt für Hermans und van Embden damals ohnehin keine Rolle. Sie wissen ja überhaupt nicht, was sie da letztlich entdeckt haben. Etwas anderes ist für das Team viel aufregender. Das Muster aus *repeats* und *spacers* – CRISPR also – prädestiniert die Sequenzen für ein neues Diagnostik- und Typisierungsverfahren. Denn in dieser Form und mit diesen Buchstabenfolgen gibt es die repetitiven Sequenzstücke nur bei den Vertretern des *Mycobakterium tuberculosis*-Komplexes – eine Parallele zu IS6110.

Das niederländische Team weiß zwar nicht, wozu Bakterien CRISPR nutzen, aber es weiß, wozu sie als Molekularbiologen die *repeat-spacer*-Paare benutzen können: als weiteren Marker für Tuberkulose.

## **CRISPR benutzen, ohne zu wissen, was es ist**

Zuerst sieht sich Peter Groenen, ein weiterer Mitarbeiter aus van Embdens Team, die Wiederholungssequenzen genauer an und entwickelt auf Basis der PCR-Methode ein erstes Verfahren, um Tuberkelbakterien zu erkennen und zu unterscheiden. Die Ergebnisse veröf-

fentlicht er 1993 auf neun Seiten in der Dezemberausgabe des Fachmagazins *Molecular Microbiology*. Groenen untersucht die Unterschiede in der Kette der repeat-spacer-Paare zwischen einzelnen Tuberkulose-Stämmen und identifiziert systematische Variationen im Muster (Genetiker sprechen von *Polymorphismen*). Die braucht es, um einzelne Bakterien-Linien voneinander zu unterscheiden.

Er und seine Kollegen vergeben einen ersten Namen für die Kombination aus *repeats* und *spacern*. Sie nennen ein einzelnes solches Paar jeweils ‚*Direct Variable Repeat*‘ (DVR), und nummerieren die Paare anschließend durch. Da die Reihenfolge der einzelnen DVR bei den verschiedenen Linien und Unterarten der Bakterien gleich bleibt, können die Forscher diese dank der Nummerierung ganz einfach miteinander vergleichen. Und dieser Vergleich ergibt, dass die Unterschiede zwischen den Unterarten und Linien schlicht dadurch zustande kommen, dass an bestimmten Stellen einzelne DVR fehlen oder vorhanden sind.

So unterscheidet sich die Linie 42 von *M. bovis* von der Linie P3 von *M. bovis* BCG, weil bei Linie 42 das repeat-spacer-Paar 26 fehlt. Der *M. tuberculosis* Linie H37Ra fehlen im Vergleich zu *M. bovis* BCG P3 die DVR-Paare 25 und 26 und so fort.

Um das neue System in einer Anwendung einzusetzen, nutzen Groenen und Kollegen eine Methode des

Erfinders des genetischen Fingerabdrucks. Der Genetiker Alec Jeffreys hatte schon 1984 ein erstes Verfahren für den genetischen Fingerabdruck beim Menschen entwickelt. 1991 stellt er dann eine andere Fingerprinting-Methode im Fachmagazin *Nature* vor, die er MVR-PCR nennt. Daran angelehnt benennen die Niederländer ihr Verfahren DVR-PCR.

Das PCR-Verfahren zu verwenden bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Methoden, wie etwa der mit IS6110: „*[Damit] sollte es möglich sein, die Bakterien als Tuberkulose-Erreger zu erkennen und sie im gleichen Schritt zusätzlich zu typisieren*“, schreibt Peter Groenen. Die Niederländer wollen zwei Fliegen mit einer Klappe schlagen. Das war bis dahin so nicht möglich gewesen, und es sollte die Tuberkulose-Diagnostik erheblich beschleunigen. Denn durch das PCR-Verfahren genügen für eine umfassende Analyse nun schon winzigste Mengen an DNA. Das langwierige, wochenlange Kultivieren wie bei der Analyse von IS6110 fällt komplett weg.

Am Ende seines Verfahrens erhält Peter Groenen eine mehr oder minder lange Buchstabensequenz, die sich in einem speziellen Computerprogramm abspeichern und auswerten lässt. Das ist zumindest einfacher als der herkömmliche Vergleich schummriger Banden auf Agarose-Gelen.

## **Mit Spacern gegen Tuberkulose**

Groenens Methode ist noch nicht perfekt, aber sie zeigt in die richtige Richtung. Seine Arbeit bereitet den Boden für eine weitere Kollegin aus Jan van Embdens Team, Judith Kamerbeek. Ihre Arbeit bringt schließlich den Durchbruch: eine zuverlässige und schnelle Methode auf Basis der CRISPR-Sequenzen, die Tuberkulose-Erreger in einem einzigen Schritt erkennt und typisiert, ohne dass die Bakterien zuvor langwierig kultiviert werden müssen. Allerdings dauert es weitere vier Jahre bis Kamerbeek im April 1997 das Ergebnis ihrer Arbeiten im *Journal of Clinical Microbiology* präsentieren kann.

Sie beschreibt in der Einleitung die Probleme, die an Groenens Ansatz noch zu lösen waren:

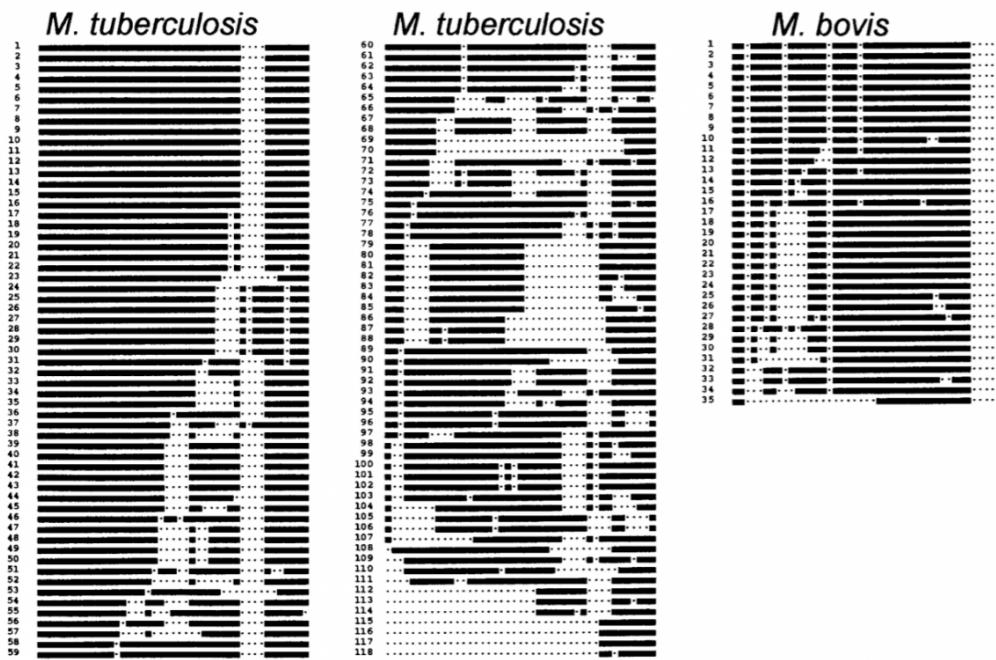
*„Die Methode ist für die Routinenutzung in einem klinischen Labor nicht geeignet, weil sie technisch aufwändig ist und es schwierig ist, einen hohen Durchsatz an Proben zu erreichen.“*

Kamerbeeks Verfahren setzt zwar wie Groenens Ansatz auf eine PCR. Doch ansonsten hat es mit Jeffreys Ursprungs-Ansatz so gut wie nichts mehr gemein. Die Besonderheit von Kemerbeeks Methode sind wiederverwendbare Membranen am Ende des Prozesses. An diesen sind synthetisch hergestellte, kurze DNA-Sequenzen

angeheftet, sogenannte Oligonukleotide, die den ersten 43 *spacer*-Sequenzen der DVR-Region des Tuberkulose-Komplexes entsprechen. Die einzelnen Stämme unterscheiden sich ja nur durch das Fehlen oder Vorhandensein einzelner oder mehrerer DVRs. Und das kann Kamerbeeks Verfahren dank dieses Tricks auf denkbar einfache Weise sichtbar machen.

Ist ein *spacer* in der Probe vorhanden und durch die PCR in ausreichender Menge vervielfältigt worden, lagert sich das Material an die entsprechende Sequenz an der Membran an. Fehlt ein *spacer* hingegen, kann sich auch nichts anlagern. Es ist ein bisschen wie mit den Einsen und Nullen des Computercodes. Am Ende erscheint auf den Membranen eine binäre Signalreihe von 43 Positionen, bei denen das Vorhandensein eines *spacers* durch eine Markierung sichtbar wird oder eben nicht. Das Ergebnis überträgt Kamerbeek auf ein digitales Blatt Papier in ihrem etwas in die Jahre gekommenen Schreibprogramm WordPerfect 5.1. Für jedes Bakterium erhält sie eine Zeile mit einem typischen Hybridisierung-Muster.

Die Reihen der Bakterien-Linien und Unterarten kann sie schließlich mit der Sortierfunktion der Software in eine übersichtliche Ordnung bringen. Was dabei heraus kommt, könnte man ohne weitere Erklärung auch für die Ikonografie Außerirdischer in einem Science Fiction Film halten.



*Schematische Darstellung der Spoligotypen verschiedener Tuberkulose-Bakterien. Jede Zeile steht für eine Bakterien-Linie. Ein Rechteck gibt an, wenn eine spacer-Sequenz vorhanden ist, bei einem Punkt fehlt diese. Insgesamt gibt es 43 Positionen, für die dies ermittelt wird. Die Zeilen sortiert Judith Kamerbeek ganz einfach mit der Sortierfunktion ihres Schreibprogramms Word Perfect 5.1.*

Kamerbeek/Journal of Microbiology

Tatsächlich zeigt sich hier ein weiterer Vorteil der Methode. Es genügt ein einfacher Word-Prozessor für die Auswertung, man braucht keine komplexe Software wie für IS6110. Und das Verfahren gelingt mit Laborproben ebenso wie mit abgehustetem Schleim. Zur Überraschung der Niederländer können sie mit Kamerbeeks

Methode sogar Vertreter von *M. tuberculosis* ganz leicht von *M. bovis* unterscheiden. Gerade das fällt mit klassischen bakteriologischen Methoden meist sehr schwer.

Aber das allerbeste ist: Die Ergebnisse liegen innerhalb von ein bis zwei Tagen vor, nicht erst viele Wochen später. Strike!

Kamerbeek nennt die Methode „Spoligotyping“, abgeleitet von den Begriffen „spacer“ und „oligotyping“, also eine Typisierung mittels Oligonukleotiden, die den spacern des MTB-Komplexes entsprechen. In den Folgejahren zeigt sich, dass Spoligotyping wirklich brauchbar ist. Und es etabliert sich nach der IS6110-Methode als eine der wichtigen Typisierungsmethoden im Kampf gegen die tödliche Krankheit TB. Spoligotyping ist zwar nicht ganz so genau wie das Verfahren mit IS6110, dafür aber erheblich schneller und einfacher zu handhaben. Oft wird es mit anderen Typisierungs-Methoden, von denen es inzwischen eine Vielzahl gibt, kombiniert.

Wozu die Bakterien nun aber tatsächlich ihre *repeats* und *spacer* gebrauchen oder wo sie herkommen, darauf weiß auch Judith Kamerbeek keine Antwort. Diese Fragen spielen in ihrem Artikel auch keine Rolle. Doch Jan van Embden lassen sie keine Ruhe: „Seit der Entdeckung der DRs bei *M. tuberculosis* war mir klar, dass dieses genetische Element eine spezifische biologische Bedeutung haben muss“, schreibt mir van Embden.

## Eine Ur-CRISPR-Region?

In einem Artikel, der in der 2000er Maiausgabe des *Journal of Bacteriology* erscheint, fasst er all das zusammen, was er und seine Arbeitsgruppe im vergangenen Jahrzehnt gelernt hatten. Er entdeckt 45 weitere DVRs, die das Spoligotyping zur Enttäuschung des Teams indes nur wenig genauer machen. Vor allem aber versucht er ein Szenario des Ursprungs dieses Musters aus *repeat-spacer*-Paaren zu entwickeln.

Van Embden spekuliert über den evolutionären Hintergrund dieser auffälligen Struktur: „*Die Daten deuten darauf hin*“, schreibt er im Artikel, „*dass die DR-Region, die wir heutzutage in den klinischen Proben sehen, der Überrest einer ursprünglichen DR-Region ist, der aus einer großen Zahl, vielleicht aus hunderten verschiedenen DVRs bestand.*“

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterien-Stämmen seien einfach dadurch entstanden, dass einzelne oder mehrere *repeat-spacer*-Paare im Laufe der Zeit verloren gegangen waren, dass sie irgendwie gelöscht wurden. Das würde erklären, warum es in der DR-Region der einen Bakterien-Linie zum Beispiel 56 DVR gibt, bei einer anderen aber nur noch sechs.

Doch wie war diese „archetypische“ Region zu Urzeiten entstanden? Darauf hat er keine Antwort: „*Derzeit sind in der Natur keine Beispiele bekannt, bei denen*

*kurze DNA-Stücke so dupliziert werden, dass die Wiederholungen durch ähnlich große, nicht wiederkehrende Zwischensequenzen getrennt werden*“, beschreibt er die Einzigartigkeit der Struktur.

Dann macht der Niederländer genau das, was auch sein Doktorand Peter Hermans neun Jahre zuvor mit den *repeat*-Sequenzen versucht hatte: Er startet den Abgleich in einer Gen-Datenbank – mit dem entscheidenden Unterschied. Dieses Mal gibt er auch *spacer*-Sequenzen in die Suchmaske von *GenBank* ein, und gleicht sie mit den DNA-Sequenzen aller möglichen Organismen ab: wieder kein Treffer.

Van Embden hat kein Glück bei seiner Suche. Er ist einfach zu früh. Offenbar sind bis zum Jahr 2000 noch nicht die passenden Sequenzen in die Datenbank aufgenommen worden. Denn nur wenige Jahre später werden ein spanischer Forscher und andere Wissenschaftler mehr Glück haben bei dieser Suche nach identischen Sequenzen. Ihnen wird gelingen, was Jan van Embden versagt bleibt: die Frage zu beantworten nach dem Ursprung und der Funktion von CRISPR.

## Zwei neue, junge Forscher

Jan van Embden versucht sich immerhin an einem größeren Bild. Seit 1997 hat ein jüngerer Kollege von der Universität Utrecht namens Ruud Jansen eines sei-

ner Projekte übernommen. Er will besser verstehen, woher die Polymorphismen des *repeat-spacer*-Musters stammen. Dazu beginnt Jansen mit einer speziellen Software gezielt nach dieser Struktur auch in den Genomen anderer Bakterien zu suchen. In den neunziger Jahren entdecken immer mehr Forscher dieses eigenartige Muster, und Jansen trägt sie zusammen. So kann van Embden in seinem Artikel auf zehn Untersuchungen verweisen, die im Laufe des Jahrzehnts CRISPR bei anderen Bakterien entdeckt haben. Dieses Indiz untermauert den Verdacht, etwas Bedeutendes ins Visier genommen zu haben.

Ein fast schon ironisches Schlaglicht auf den damaligen Stand der CRISPR-Forschung wirft, dass van Embden in dieser Liste zwar zum allerersten Mal die Arbeit der Japaner erwähnt. Aber er listet im Literaturteil am Ende seines Fachartikels nur die 1989er Arbeit von Atsuo Nakata auf, auf die er im Artikel selbst aber gar nicht verweist. Und Yozishumi Ishinos Arbeit von 1987 – immerhin die allererste Beschreibung von CRISPR überhaupt – wird nicht gelistet.

Es weiß um die Jahrtausendwende einfach noch niemand, welche historische Bedeutung das alles noch bekommen wird.

Darüber hinaus liegt van Embden mit seinen Thesen zum Ursprung der *repeats* und *spacer* diametral falsch. CRISPR entsteht nicht dadurch, dass repeat-

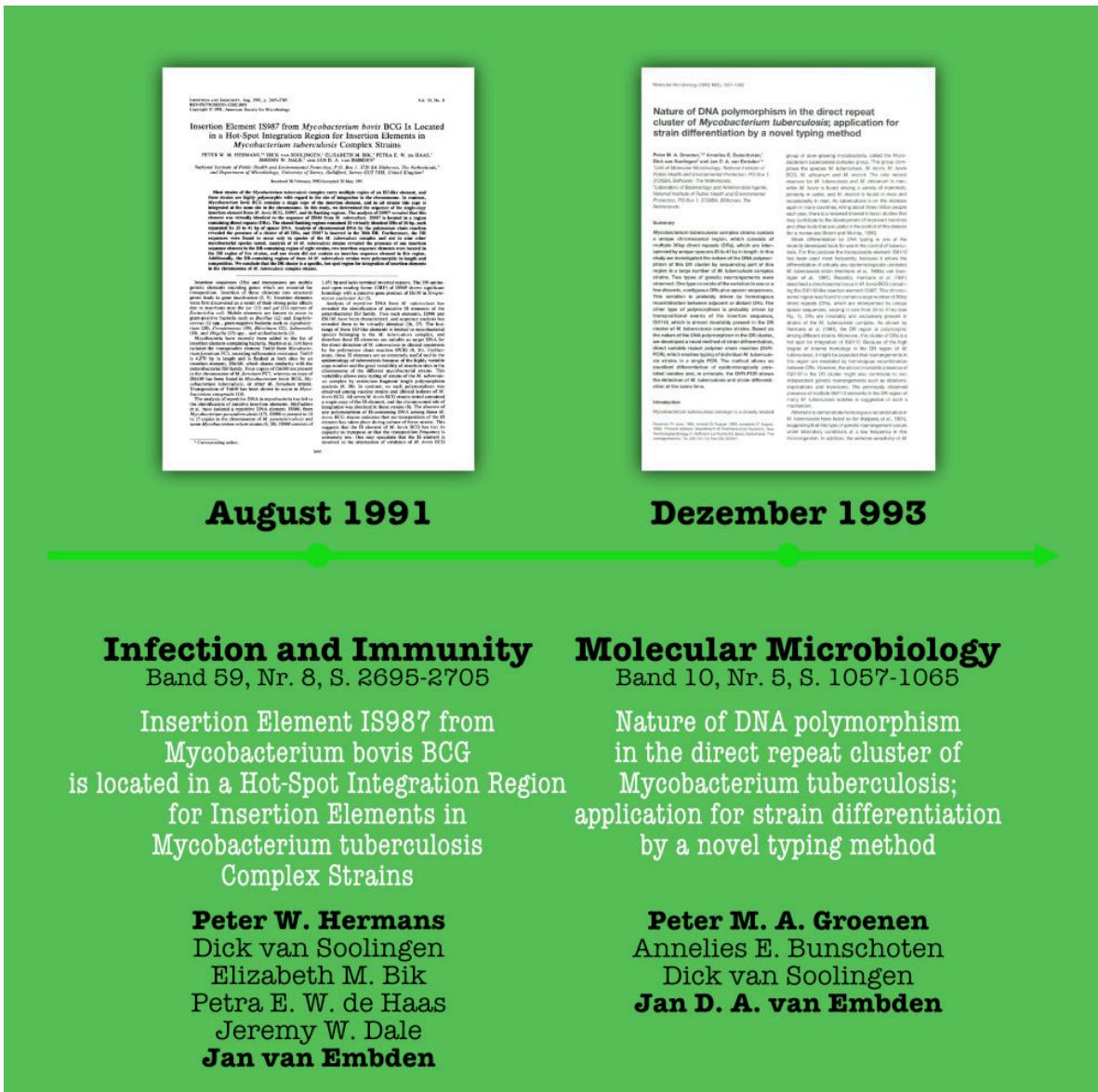
spacer-Paare mit der Zeit verschwinden, sondern im Gegenteil zunächst dadurch, dass neue hinzugefügt werden. Aber an diesem Punkt geht es dem Niederländer nicht anders als allen anderen, die seit 1987 über CRISPR spekulieren.

Trotzdem ist sein Artikel aus dem Jahr 2000 für die CRISPR-Geschichte bedeutsam. Er ist formal das erste ‚Zusammentreffen‘ zweier junger Forscher, die beide in den kommenden zwei Kapiteln der #CRISPRhistory wichtig werden: Sein Mitarbeiter Ruud Jansen und ein noch jüngerer Spanier namens Francisco Mojica, den van Embden ebenfalls zitiert.

Mojica arbeitet an der Universität von Alicante und schafft es in van Embdens Literaturliste mit einer Arbeit aus dem Jahr 1995. Er hatte das eigenartige repeat-spacer-Muster in der ersten Hälfte der 1990er Jahre bei zwei Arten der salzliebenden Mikroben-Gattung *Haloferax* entdeckt und als einer der wenigen über deren Funktion spekuliert. Völlig unabhängig von den Japanern und den Niederländern hatte auch der Spanier begonnen, das Muster aus *repeats* und *spacers* zu erforschen. Niemand kann zum jetzigen Zeitpunkt ahnen, wie wichtig er (und auch Jansen) für die CRISPR-Forschung noch werden.

Das Spoligotyping bleibt bis heute neben dem Fingerprinting mit IS6110 eine wichtige Methode, um Tuberkulose festzustellen und zu erforschen. Die Nieder-

länder legen schon früh Datenbanken mit Spoligotypen an, in denen Forscher recherchieren, ihre Ergebnisse vergleichen und Daten über die weltweite Verbreitung der Stämme abrufen können. Der technische Ansatz Judith Kamerbeeks wird auf andere Erreger wie etwa



Salmonellen übertragen, und erst kürzlich, 2018, stellt ein chinesisches Forscherteam eine noch schnellere und einfache Variante des Spoligotyping vor: das McSpoligotyping. Damit ist es möglich, die gesamte Prozedur innerhalb weniger Stunden statt in ein bis zwei Tagen durchzuführen.

**April 1997**

**Journal of Clinical Microbiology**  
Band 35, Nr. 4, S. 907-914

**Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology**

**Judith Kamerbeek**  
Leo Schouls, Arend Kolk  
Miranda van Agterveld  
Dick van Soolingen, Sjoukje Kuijper  
Annelies Bunschoten, Henri Molhuizen  
Rory Shaw, Madhu Goyal  
**Jan van Embden**

**Mai 2000**

**Journal of Bacteriology**  
Band 182, Nr. 9, S. 2392-2401

**Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria**

**J. D. A. van Embden**  
T. van Gorkom  
K. Kremer  
**R. Jansen**  
B. A. M. van der Zeijst  
L. M. Schouls

Noch immer werden regelmäßig Arbeiten mit dieser Methode veröffentlicht. Doch allmählich scheint die Bedeutung zu schwinden. Seit 2012 nimmt die Zahl der jährlich veröffentlichten Artikel zum Thema langsam ab. Das komplette Genom eines Bakteriums zu lesen, geht inzwischen extrem schnell und man erhält auf einen Schlag so viele Informationen, dass Forscher immer häufiger gleich alles sequenzieren statt nur die CRISPR-Region zu betrachten.

Obwohl Spoligotyping also die erste große Erfolgs-story von CRISPR ist, scheint dieser Zusammenhang nicht vielen WissenschaftlerInnen bewusst zu sein: In der biomedizinischen Fachartikel-Datenbank Pubmed finden sich unter 1100 möglichen Spoligotyping-Artikeln nur 24, in denen beide Begriffe (Spoligotyping und CRISPR) gemeinsam vorkommen.

## **CRISPR gegen Tuberkulose**

Tuberkulose hat seinen Schrecken nicht verloren. Doch vor allem im Westen sind die Zahlen trotz Aids-Krise wieder zurückgegangen. Das gelang auch, weil WissenschaftlerInnen und MedizinerInnen mit den genetischen Fingerabdruck-Diagnosen die Ausbreitung der Krankheit viel besser verstehen als früher. Dank IS6110 und Spoligotyping wurde zum Beispiel das alte Dogma über den Haufen geworfen, dass Tuberkulose-

Epidemien nur bei denen starten, die das Bakterium schon lange in sich tragen. Tatsächlich spielen Neuinfektionen bei einem Ausbruch eine erhebliche Rolle, womit auch die Eindämmung der Krankheit ganz anders ausfallen muss, als unter dem alten Dogma.

1993 erklärt die WHO die TB zur weltweiten Bedrohung, wodurch sich der finanzielle Aufwand nicht nur in der Forschung massiv erhöht. 2017 zählten die US-Behörden in den USA nur noch 9.100 Fälle, so wenige wie nie zuvor (zur Erinnerung: 1953 waren es 84.000 Fälle, 1992 26.000). Die WHO schätzt, dass durch verbesserte Diagnose- und Therapiemöglichkeiten weltweit zwischen 2000 und 2017 etwa 54 Millionen Menschen gerettet wurden.

Das Ziel ist, Tuberkulose bis 2030 auszurotten. Dazu braucht es wohl auch neue Medikamente und Antibiotika, denn multiresistente Erreger sind weiterhin und zunehmend ein Problem.

Wer weiß, vielleicht kann CRISPR ein zweites Mal im Kampf gegen Tuberkulose helfen, dann aller Wahrscheinlichkeit nach als Gen-Schere, vielleicht um Impfstoffe zu verbessern, neue Antibiotika herzustellen oder den Erreger direkt anzugreifen.

Der letzte Fachartikel, bei dem Jan van Embdens Name in der Autorenliste auftaucht, erscheint 2005, ein Jahr nachdem er sich in den Ruhestand verabschiedet und sieben Jahre bevor CRISPR/Cas9 als Gen-Schere

das Licht der Welt erblickt. Der Titel des Artikels hätte nicht treffender ausfallen können, um den Beitrag des alten Meisters und seines Teams in der CRISPR-Historie auf den Punkt zu bringen: „[Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis](#)“.

... Fortsetzung folgt

Hermans, P., et al. (1991): [Insertion Element IS987 from Mycobacterium bovis BCG Is Located in a Hot-Spot Integration Region for Insertion Elements in Mycobacterium tuberculosis Complex Strains](#), Infection and Immunity, Band 59, Nr. 8, Seite 2695-2705

Groenen, P., et al. (1993): [Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method](#), Molecular Microbiology, Band 10, Nr. 5. Seite 1057-1065

Kamerbeek, J., et al. (1997): [Simultaneous Detection and Strain Differentiation of Mycobacterium tuberculosis for Diagnosis and Epidemiology](#), Journal of Microbiology, Band 35, Nr. 4, Seite 907-914

Van Embden. J., et al. (2000): Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of Mycobacterium tuberculosis Complex Bacteria, Journal of Bacteriology, Band 182, Nr. 9, Seite 2393-2401

Dies ist die PDF-Version der Folge 7 der #CRISPRhistory-Serie. Die Webversion mit interaktiven Animationen findet sich unter dieser URL:

[https://www.riffreporter.de/crisprhistory/  
spoligotyping/](https://www.riffreporter.de/crisprhistory/spoligotyping/)

Dies ist ein Beitrag der Serie [#CRISPRhistory – Die Biografie der revolutionären Gen-Schere CRISPR/Cas9](#) von Marcus Anhäuser. Verpasse keine Folge und abonniere den Newsletter oder verfolge Twitter, Facebook und Instagram. Die Einführungsartikel sind gratis. Die Hauptartikel der Story gibt es für die, die bereit sind, einmalig 3,99 Euro zu zahlen (zum Einführungspreis). #CRISPRhistory ist wie ein Buch: Du zahlst einmal und bekommst die ganze Geschichte.

Fragen, Lob oder Kritik? Einfach eine E-Mail an mich, Marcus Anhäuser: [m.anhaeuser@me.com](mailto:m.anhaeuser@me.com)

# **#CRISPRhistory**

Die Biografie der revolutionären Gen-Schere  
CRISPR/Cas9.

Von Marcus Anhäuser

<https://www.riffreporter.de/crisprhistory>