

DNA-freie CRISPRa-RNPs

Gene anschalten statt umbauen: CRISPR aktiviert Zellprogramme ohne DNA-Eingriff

TOBIAS SCHMIDT, CHANDNI NATALIA KUMAR, STEFAN STRICKER
HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN, DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR
GESUNDHEIT UND UMWELT GMBH, NEUHERBERG

Activating genes in their endogenous genomic context is essential for studying gene regulation and cell identity, but was long technically limited. CRISPR-based gene activation (CRISPRa) enables programmable transcriptional control at native loci. DNA-free CRISPRa ribonucleoproteins (dRNPs) allow transient, multiplexed gene activation without genomic modification and enable controlled modulation of cellular states, with potential relevance for future translational applications.

DOI: 10.1007/s12268-026-2659-1
© The Author(s) 2026

■ Heute wissen wir, dass einzelne Gene entscheidend beeinflussen können, ob Krankheiten entstehen und wie schnell unser Körper altert [1]. Manche Gene haben sogar das Potenzial, Zellen in einen anderen Zelltyp umzuprogrammieren [2]. Kein Wunder also, dass die gezielte Aktivierung von Genen seit Langem als vielversprechender Ansatz gilt – sowohl für neue Therapien bei bislang schwer behandelbaren Erkrankungen als auch für den Ersatz geschädigter Zellen [3]. Doch noch bis vor wenigen Jahren fehlten uns die Werkzeuge, um Gene direkt in ihrem natürlichen chromosomalen Umfeld präzise, effizient und in größerem Maßstab zu aktivieren [4, 5].

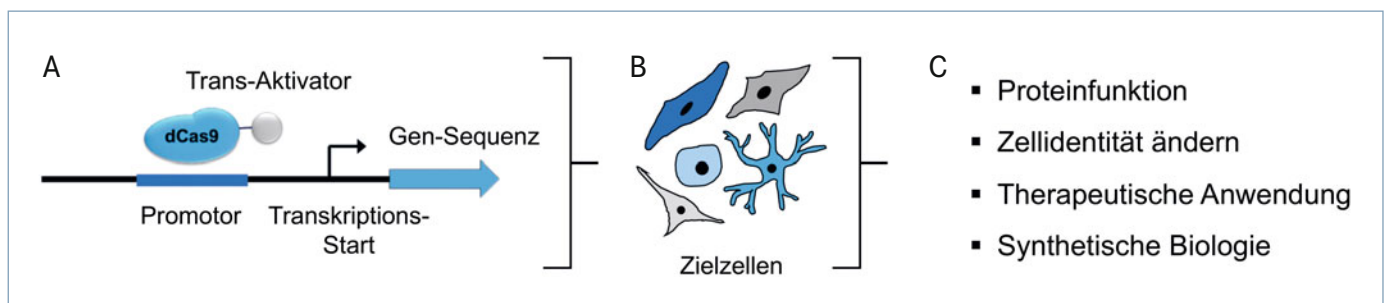
Mit dem Aufkommen CRISPR-basierter Genaktivierungssysteme (CRISPRa) änderte sich dies grundlegend. Erstmals wurde es möglich, regulatorische Schaltelemente im Genom anzusteuern und Gene dort zu aktivieren, wo sie natürlicherweise vorkommen (**Abb. 1A**, [6–8]).

Das heute weit verbreitete CRISPR-System stammt ursprünglich aus einem natürlichen Abwehrmechanismus von Bakterien. Dabei wird das Protein Cas9 mithilfe einer kurzen guide-RNA (gRNA) gezielt an eine bestimmte DNA-Sequenz geführt [9]. Cas9 wirkt normalerweise als Schere: Es schneidet die DNA und kann dadurch Mutationen verursachen. Entfernt man jedoch die Schneide-

funktion, entsteht eine inaktive Variante namens dCas9. Diese bindet weiterhin sehr präzise an die DNA, verändert sie aber nicht mehr. Dadurch lässt sich dCas9 als Plattform nutzen, um Gene gezielt zu regulieren – zum Beispiel, indem man es mit Aktivator-Proteinen koppelt, die die Genexpression steigern.

Die ersten CRISPR-basierten Systeme zur Genaktivierung (CRISPRa) basierten fast ausschließlich auf DNA-Plasmiden oder viralen Vektoren. Diese Arbeiten konnten eindrucksvoll zeigen, dass sich endogene Gene grundsätzlich gezielt aktivieren lassen [10]. Gleichzeitig machten sie jedoch auch deutlich, welche praktischen und methodischen Grenzen mit viralen und vektorbasierten Ansätzen verbunden sind.

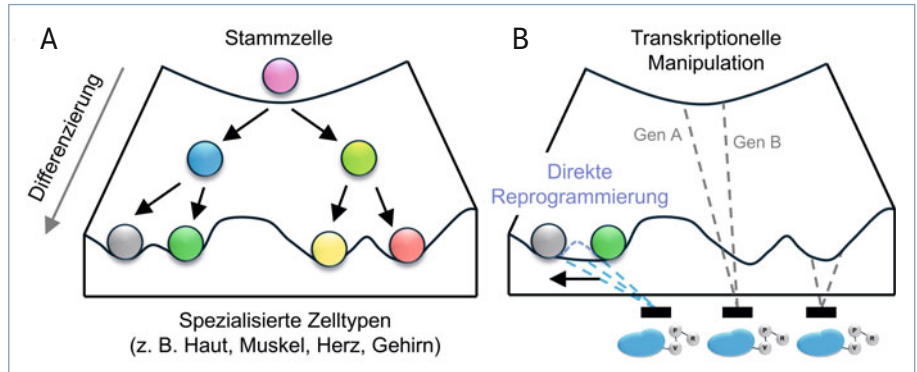
Um diese Einschränkungen zu überwinden, haben wir ein DNA-freies CRISPRa-System entwickelt, das auf aufgereinigten dCas9-Proteinen basiert, die gemeinsam mit guide-RNAs als Ribonucleoproteine (dRNPs) eingesetzt werden [11]. Diese dRNPs ermöglichen eine präzise, zeitlich begrenzte und gleichzeitig sehr effiziente Aktivierung von Genen. Dadurch lässt sich erstmals eine kontrollierte Aktivierung vieler endogener Gene gleichzeitig erreichen – und das, ohne das Genom dauerhaft zu verändern.



▲ **Abb. 1:** Endogene Genaktivierung durch CRISPRa als universelles Werkzeug zur Steuerung von Zellzuständen. **A**, Schematische Darstellung der CRISPR-basierten Transkriptionsaktivierung (CRISPRa). Ein dCas9-Transaktivator-Fusionsprotein wird über eine guide-RNA gezielt an regulatorische Sequenzen in der Nähe des endogenen Promotors rekrutiert und aktiviert die Transkription der Zielgen-Sequenz am nativen Chromatin. **B**, Die endogene Aktivierung spezifischer Gene kann in unterschiedlichen Zielzellen eingesetzt werden, darunter verschiedene somatische Zelltypen. **C**, Die gezielte transkriptionelle Aktivierung endogener Gene eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, etwa zur Untersuchung von Proteinfunktionen, zur gezielten Modulation von Zellidentität, für therapeutische Ansätze sowie in der synthetischen Biologie.

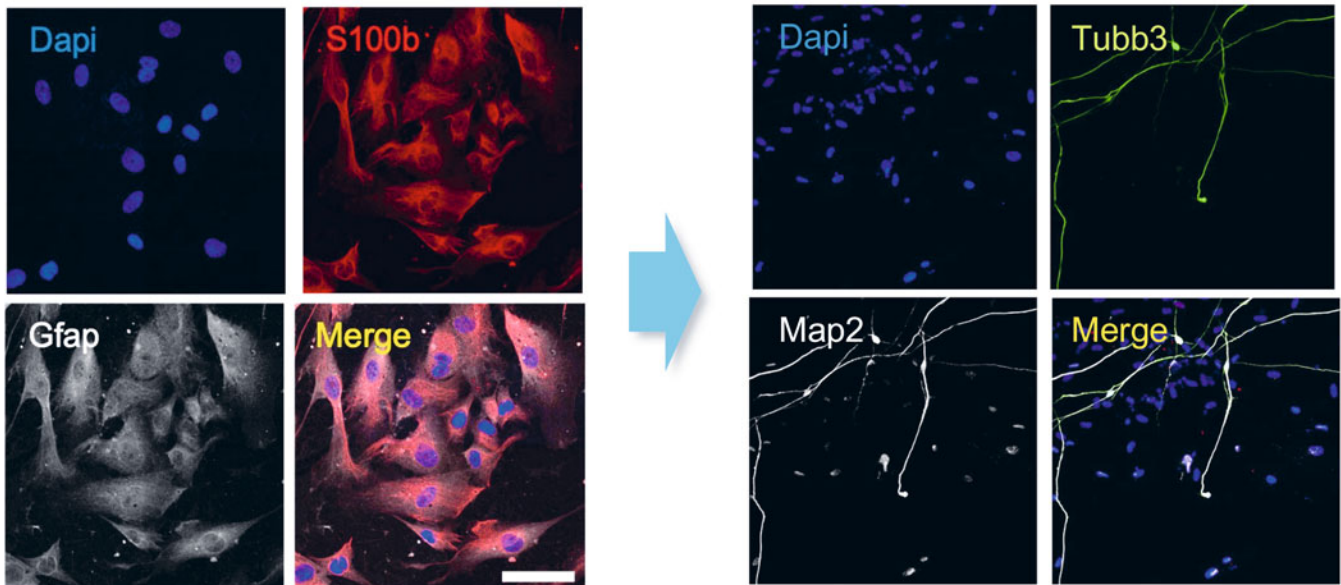
Warum endogene Genaktivierung wichtig ist

Während das gezielte Ausschalten von Genen mithilfe der RNA-Interferenz – einer Methode, die 2006 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde – bereits seit vielen Jahren möglich ist, fehlte bis vor Kurzem eine vergleichbar allgemeine Methode, Gene gezielt anzuschalten [12]. Die einzige praktikable Lösung bestand darin, zusätzliche Kopien der gewünschten Gene über virale Vektoren in die Zellen einzubringen. Diese künstlich eingeführten Gene wurden jedoch unkontrolliert exprimiert und entsprachen nicht der natürlichen Regulation im Genom. Nicht überraschend birgt diese unphysiologische Methode verschiedene Risiken, die ihren Einsatz für therapeutische Anwendungen deutlich einschränken.



▲ **Abb. 2:** Zellidentität als Landschaft: Differenzierung und gezielte transkriptionelle Manipulation. **A**, Klassische Darstellung der Waddington-Landschaft. Eine Stammzelle bewegt sich entlang stabiler Differenzierungspfade in Richtung spezialisierter Zelltypen. Die entstehenden „Täler“ repräsentieren robuste Zellidentitäten (z. B. Haut, Muskel, Herz oder Gehirn), die durch regulatorische Netzwerke und epigenetische Barrieren stabilisiert werden. Pfeile verdeutlichen die hierarchische Verzweigung während der Differenzierung. **B**, Gezielte transkriptionelle Manipulation bestehender Zellzustände durch DNA-freie CRISPRa-RNPs (dRNPs). Die transient eingebrachten Ribonukleoproteinkomplexe aktivieren ausgewählte endogene Gene (z. B. Gen A, Gen B) und können lokale Verschiebungen innerhalb der Landschaft auslösen, etwa im Sinne einer direkten Reprogrammierung (blaue Linien), ohne die Landschaft dauerhaft umzustrukturieren. Adaptiert aus [4]. © 2021 the American Physiological Society.

Aktivierung eines einzelnen neuronalen Master-Transkriptionsfaktors



▲ **Abb. 3:** Direkte neuronale Reprogrammierung humaner Astrozyten durch einen transienten dRNP-Impuls. Zwei kurze, DNA-freie Aktivierungsimpulse eines einzelnen neuronalen Master-Transkriptionsfaktors mittels CRISPRa-Ribonukleoproteinkomplexen (dRNPs) reichen aus, um humane Astrozyten direkt in neuronale Zellen umzuprogrammieren. Links sind Astrozyten mit Expression glialer Marker (GFAP, S100β) dargestellt, rechts einige Tage nach dRNP-Einbringung, Zellen mit neuronaler Morphologie und Expression neuronaler Marker (TUBB3, MAP2). Die Aktivierung erfolgt transient über den endogenen Promotor am Genlocus, ohne dauerhafte genetische Modifikation. Abbildung adaptiert aus [11], CC BY-NC 4.0.

Bei der endogenen Genaktivierung dagegen wird kein künstliches Gen eingebracht. Stattdessen wird das vorhandene Gen in seinem natürlichen regulatorischen Umfeld aktiviert. Promotoren, Enhancer und Chromatinstruktur bleiben erhalten und bestimmen, wie stark und wie lange ein Gen reagiert (**Abb. 1A**).

Dies ist besonders relevant für sogenannte Master-Transkriptionsfaktoren, die Zellidentität und Entwicklungsprogramme steuern. Viele dieser Faktoren sind in differenzierten Zellen epigenetisch abgeschirmt und lassen sich durch klassische cDNA-Überexpression nur unphysiologisch beeinflussen. CRISPRa-Systeme respektieren diese Barrieren.

In unseren Arbeiten zeigte sich beispielsweise, dass selbst stark regulierte Gene wie *Neurog2* oder *Ascl1* auf einen ausreichend starken, aber zeitlich begrenzten Aktivierungsimpuls reagieren können. Dies eröffnet einerseits die Möglichkeit, zu untersuchen, wie Genaktivitäten durch Chromatinprozesse gesteuert werden, und erlaubt andererseits, Zelltypen gezielt zu verändern (siehe unten).

CRISPRa wird damit nicht nur zu einem Werkzeug zur Genaktivierung, sondern auch zu einer experimentellen Plattform, um die regulatorischen Prinzipien der Genaktivität systematisch zu untersuchen und zu manipulieren (**Abb. 1B, C**). CRISPR-basierte Systeme zur endogenen Genaktivierung adressieren damit einen lange formulierten Bedarf der Epigenomforschung, epigenetische Profile in funktionelle Eingriffe zu überführen [13, 14].

Grenzen bisheriger CRISPRa-Systeme

CRISPRa-Systeme verwenden Transkriptionsfaktordomänen wie VP64, p65 und Rta (zusammen als VPR bezeichnet), die ein besonders starkes Aktivierungspotenzial besitzen [10]. Wenn diese Domänen mit dCas9 verbunden werden, lassen sich gezielt Gene aktivieren, die über die entsprechenden gRNAs angesteuert werden [6–8]. Dennoch wiesen viele dieser Systeme grundlegende Nachteile auf. Da sie auf Plasmid- oder Virus-basiertem Einbringen in die Zellen beruhten, ließen sich Dauer und Stärke der Genaktivierung nur begrenzt kontrollieren. Zudem bestand bei viralen Vektoren das Risiko einer Integration ins Genom, und eine dauerhafte Überexpression der Aktivator-Proteine

konnte toxische Effekte auf die Zellen haben.

Diese Einschränkungen zeigten deutlich, dass neue Ansätze notwendig sind, um endogene Gene transient und kontrolliert zu aktivieren – und zwar ohne zusätzliches DNA-Material einzubringen.

DNA-freie CRISPRa-RNPs: präzise, transient, reproduzierbar

Unser Ansatz ersetzt DNA vollständig durch Ribonukleoproteinkomplexe, bestehend aus gereinigtem dCas9-Aktivatorprotein (dCas9-VPR) und synthetischen gRNAs. Diese Komplexe (dRNPs) werden direkt in die Zelle eingebracht und wirken dort als zeitlich begrenzter transkriptioneller Impuls (**Abb. 1B**, [11]).

Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in seiner effizienten Kontrolle: dRNPs wirken sofort und werden nach kurzer Zeit abgebaut, sodass keine dauerhafte Aktivierung entsteht. Gleichzeitig erlaubt die direkte Proteindosierung eine skalierbare Einstellung der Aktivator-Menge pro Zelle – ein klarer Vorteil gegenüber plasmidbasierter Expression mit variabler Kopienzahl.

Bemerkenswert ist zudem, dass das System auch sehr gut dafür eingesetzt werden kann, viele Gene gleichzeitig zu aktivieren. Dieses „Multiplexing“ könnte es künftig ermöglichen, nicht nur einzelne Gene, sondern ganze regulatorische Netzwerke zu aktivieren. Damit entsteht eine neue Klasse (epi-)genetischer Werkzeuge, die präzise, nicht integrierend und flexibel einsetzbar ist (**Abb. 1C**, [4]).

Zellzustände gezielt verändern

Ein entscheidender Wendepunkt für das Verständnis von Zellidentität war die Arbeit von Takahashi und Yamanaka im Jahr 2006. Sie zeigten erstmals, dass die gezielte Expression weniger definierter Transkriptionsfaktoren ausreicht, um differenzierte Körperzellen in einen pluripotenten Zustand zurückzuführen (induzierte pluripotente Stammzellen) [15]. Damit wurde deutlich, dass Zellidentität kein irreversibler Endzustand ist, sondern durch gezielte Eingriffe in transkriptionelle Programme grundlegend verändert werden kann. Diese als „Reprogrammierung“ bezeichnete Technologie wurde 2012 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet und ist heute ein Grundpfeiler der modernen Grundlagenforschung sowie eine

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

vielversprechende Basis für zukünftige Anwendungen in der regenerativen und perspektivisch auch personalisierten Medizin.

dRNPs eröffnen hier einen völlig neuen Ansatz (**Abb. 2**). Wir konnten zeigen, dass bereits ein kurzer Aktivierungsimpuls eines einzelnen Master-Transkriptionsfaktors ausreicht, um die neuronale Identität zu initiieren – sowohl aus humanen iPS-Zellen als auch durch die direkte Umprogrammierung von Astrozyten (**Abb. 3**). Besonders bemerkenswert war dabei, dass das Signal zeitlich begrenzt war und die Aktivierung über die endogenen Genloci erfolgte.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass mit dem dRNP-System bis zu 15 Gene in menschlichen Zellen gleichzeitig aktiviert werden können. Dies legt nahe, dass sich künftig nicht nur einzelne Faktoren, sondern ganze regulatorische Module gezielt steuern lassen – ein Ansatz, der insbesondere für komplexe Zelltypen von Bedeutung sein könnte.

Ausblick

DNA-freie CRISPRa-RNPs ermöglichen eine bislang unerreichte Kontrolle über die Aktivierung endogener Gene. Sie machen es möglich, Transkriptionsprogramme gezielt, reversibel und in genau definierten Kombinationen zu steuern. Über Anwendungen in der Zellreprogrammierung hinaus eröffnet dieser Ansatz die Möglichkeit, grundlegende Fragen der Genregulation zu untersuchen – zum Beispiel, warum erhöhte mRNA-Spiegel nicht automatisch zu mehr Protein führen. In Kombination mit modernen Proteomanalysen lassen sich so erstmals systematisch die Zusammenhänge zwischen Transkription und Translation erfassen [16]. Damit markieren CRISPRa-RNPs einen entscheidenden Übergang: weg von dauerhaften genetischen Eingriffen, wie sie klassische Gentherapien darstellen, hin zu einer dynamischen, programmierbaren Steuerung von Zellzuständen.

Danksagung

Wir danken für die Förderung durch das EU/EIC-Projekt „REGENERAR“ sowie durch den Frontiers in Research Fund (NRFR) – Transformation Grant „iNeuron“.

Literatur

- [1] Melzer D, Pilling LC, Ferrucci L (2020) The genetics of human ageing. *Nat Rev Genet* 21: 88–101
- [2] Bocchi R, Masserdotti G, Götz M (2022) Direct neuronal reprogramming: Fast forward from new concepts toward therapeutic approaches. *Neuron* 110: 366–393
- [3] Villiger L, Joung J, Koblan L et al. (2024) CRISPR technologies for genome, epigenome and transcriptome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 25: 464–487
- [4] Breunig CT, Köferle A, Neuner AM et al. (2021) CRISPR Tools for Physiology and Cell State Changes: Potential of Transcriptional Engineering and Epigenome Editing. *Physiol Rev* 101: 177–211
- [5] Doudna JA (2020) The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 578: 229–236
- [6] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L et al. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154: 442–451
- [7] Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM et al. (2013) RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* 10: 973–976
- [8] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM et al. (2013) CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods* 10: 977–979
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821
- [10] Chavez A, Scheiman J, Vora S et al. (2015) Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods* 12: 326–328
- [11] Schmidt T, Wiesbeck M, Egert L et al. (2025) Efficient DNA- and virus-free engineering of cellular transcriptomic states using dCas9 ribonucleoprotein (dRNP) complexes. *Nucleic Acids Res* 53: gkaf235
- [12] Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811
- [13] Stricker SH, Köferle A, Beck S (2017) From profiles to function in epigenomics. *Nat Rev Genet* 18: 51–66
- [14] Baumann V, Wiesbeck M, Breunig CT et al. (2019) Targeted removal of epigenetic barriers during transcriptional reprogramming. *Nat Commun* 10: 2119
- [15] Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676
- [16] Prabaha A, Zamora R, Barclay D et al. (2024) Unraveling the complex relationship between mRNA and protein abundances: a machine learning-based approach for imputing protein levels from RNA-seq data. *NAR Genom Bioinform* 6: lqae019

Funding: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Korrespondenzadresse:

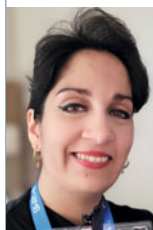
Prof. Dr. Stefan H. Stricker
 Epigenetic Engineering
 Institute of Stem Cell Research
 Helmholtz Zentrum München
 Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH
 Ingolstädter Landstraße 1
 D-85764 Neuherberg
 stefan.stricker@helmholtz-muenchen.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Tobias Schmidt

2017–2020 Bachelorstudium in Chemie und Biochemie, LMU München. 2020–2022 Masterstudium in Biochemie, LMU München. Seit 2022 Doktorand in der Arbeitsgruppe „Epigenetic Engineering“ am Helmholtz Zentrum München und der LMU München unter Leitung von Prof. Dr. S. Stricker. Unterstützt durch EpiCrossBorders, International Helmholtz-Edinburgh Research School for Epigenetics.



Chandni Natalia Kumar

2013–2017 Bachelor in Bioscience – Applied Biology in Medicine and Pharmacy. 2017–2018 Master in Bio- and Pharmaceutical Analysis. 2018–2022 Doktorandin in der Arbeitsgruppe „Mass Spectrometry“ am Zentrum, Department Biochemie, LMU München. Seit 2023 Postdoctoral Researcher am Biomedical Center Munich LMU München, Schwerpunkt: Humane Zentromerforschung, Drug Discovery, Post-Translationale Modifikationen, Chromatin-Proteomics.



Stefan Stricker

Diplomstudium Biologie und Promotion (PhD). 2008–2014 PostDoc, Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, University of Cambridge und UCL Cancer Institute, London, UK. 2017–2020 Gruppenleiter, Munich Center for Neuroscience, LMU München. 2020–2021 Gruppenleiter für Epigenetisches Engineering, Institut für Stammzellforschung, Deutsches Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg. Seit 2021 W2-Professor für Regeneration und Reprogrammierung, LMU München.