

DIE GENSCHERE CRISPR/Cas9

Molekularbiologische Grundlagen und Anwendungen
Rechtliche, ethische und gesellschaftliche Aspekte

Nutzungsbedingungen: [cc/by-nc-sa](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



**OPEN
SCIENCE**
Lebenswissenschaften im Dialog



Inhalt

- Einführung
- Entdeckung einer revolutionären Methode
- Molekularbiologische Methodik
- Bestehende und zukünftige Einsatzbereiche in Forschung und Entwicklung
- Rechtliche, ethische und gesellschaftliche Aspekte

CRISPR/Cas9

Einführung



Begriffe

CRISPR/Cas9

ist eine RNA basierte Methode zur gezielten Veränderung des Genoms

CRISPR steht für Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

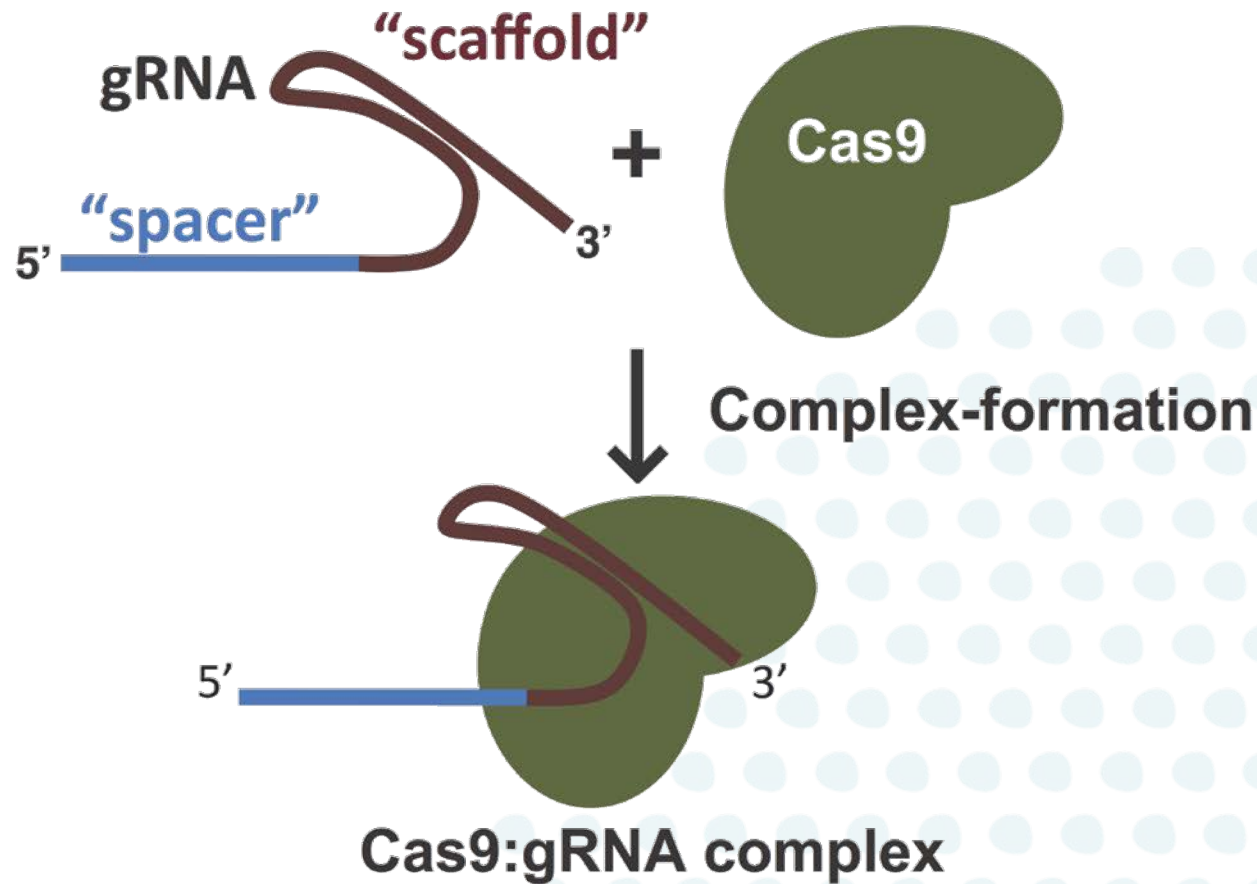
Ausgesprochen als „krisper“

Cas-Proteine sind „CRISPR-associated-proteins“

Ausgesprochen als „kas“, Cas9 am häufigsten verwendet

Leit-RNA oder guide-RNA (gRNA) ist der Teil von CRISPR/Cas9, der zur Ziel-DNA führt

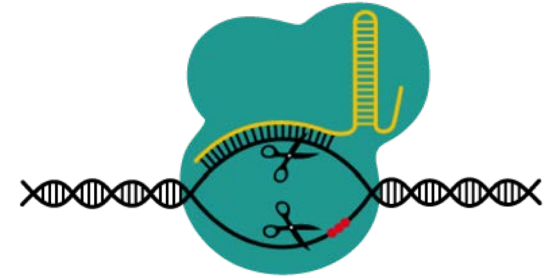
Die Genscherer CRISPR/Cas9



CRISPR/Cas9

Entdeckung einer revolutionären Methode





Die Entdeckung von CRISPR/Cas9

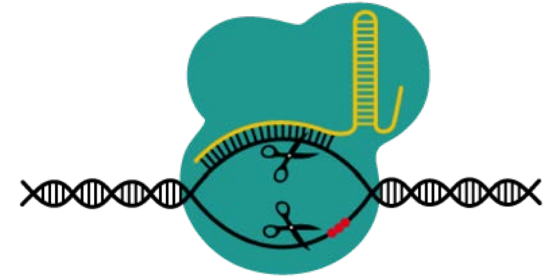
1993 Entdeckung von CRISPR (Mojica et.al. , Universität Alicante)

2003 CRISPR ist adaptives Immunsystem (Mojica et.al., Universität Alicante)

2006 Experimenteller Beweis, dass CRISPR adaptive Immunität überträgt (Barrangou et.al., Universität Laval Quebec)

2008 CRISPR programmiert (Brouns et.al., Universität Wageningen)

2008 CRISPR/Cas schneidet DNA (Sontheimer und Marraffini et.al., Universität Chicago)



Die Entdeckung von CRISPR/Cas9

2010 Cas9 schneidet DNA-Doppelstränge (Garneau et.al., Universität Laval Quebec)

2010 Entdeckung der tracrRNA (Deltcheva, Charpentier et.al., Universität Wien, Universität Umea, Universität Würzburg)

2011 Einbau von CRISPR in anderen Organismus (Sapranauskas et.al., Universität Vilnius)

2012 CRISPR Studien in vitro (Charpentier und Doudna et.al. , Universität Wien, Universität Berkley, Universität Umea, Universität Vilnius)

2012 CRISPR-Genom Editierung in Säugetier-Zellen(Cong, Zhang et.al., Broad Institut MIT; sowie Church et.al., Harvard)

Das bakterielle Immunsystem CRISPR/Cas im Überblick

CRISPR/Cas ist ein adaptives Immunsystem in Bakterien, das Fremd-DNA schneidet und im eigenen Erbgut einfügt. Damit entsteht eine DNA-Bibliothek, das Bakterium immunisiert sich damit gegen Viren-DNA oder Plasmide.

CRISPR-DNA:

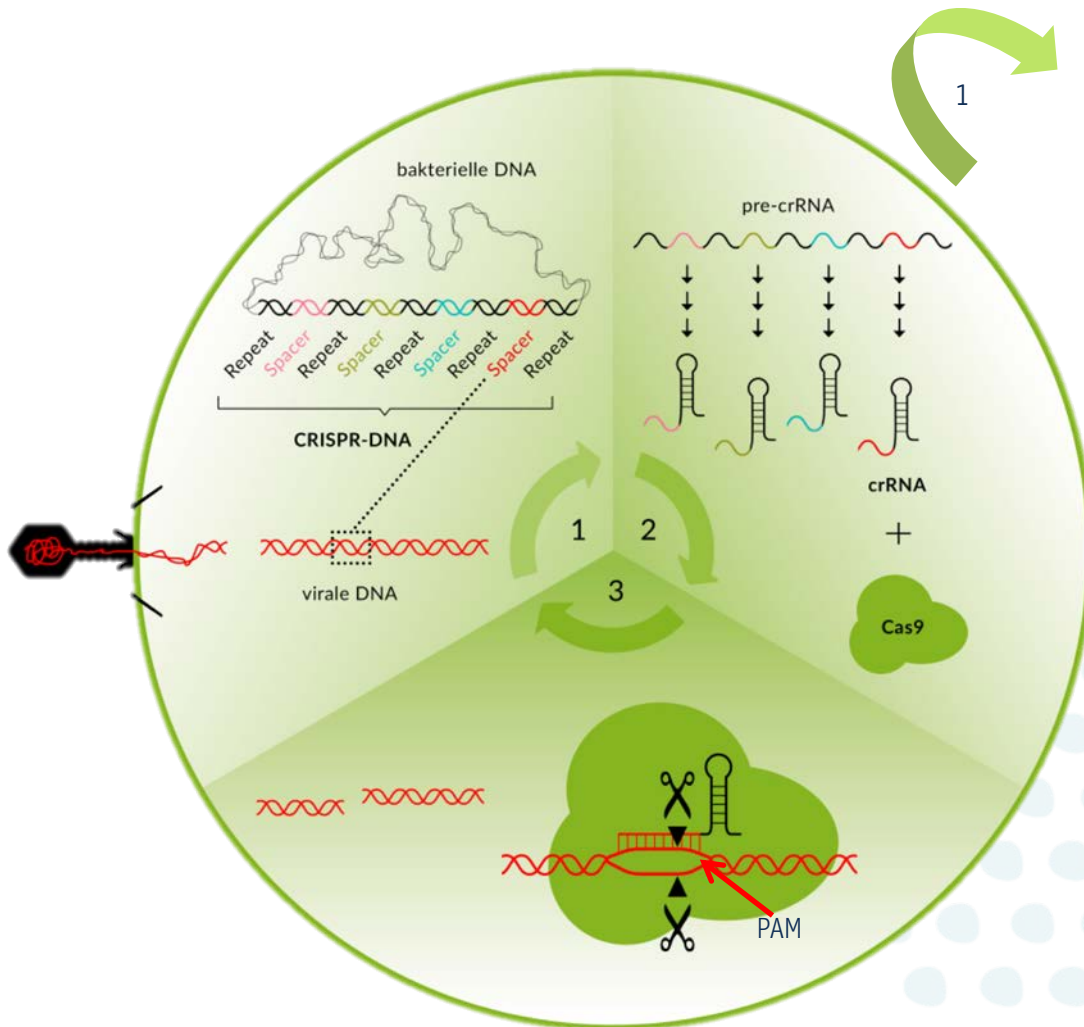
- Abschnitte sich wiederholender palindromischer bakterieneigener DNA -Repeats – zwischen 23 und 47 Basenpaare lang
- Repeats wechseln sich mit Spacern ab
- Spacer sind Teile der Virus DNA – zwischen 21 bis 72 Basenpaare lang
-> codieren für kurze crRNAs

Cas-Gene:

Gene der Bakterien-DNA, codieren für Cas-Enzyme, die Schneidefunktion haben

CRISPR/Cas Komplex: crRNA Moleküle bringen das Cas-Enzym an die richtige Stelle, dort kann die Genschere schneiden und die Fremd-DNA zerstören

Das bakterielle CRISPR/Cas9-System

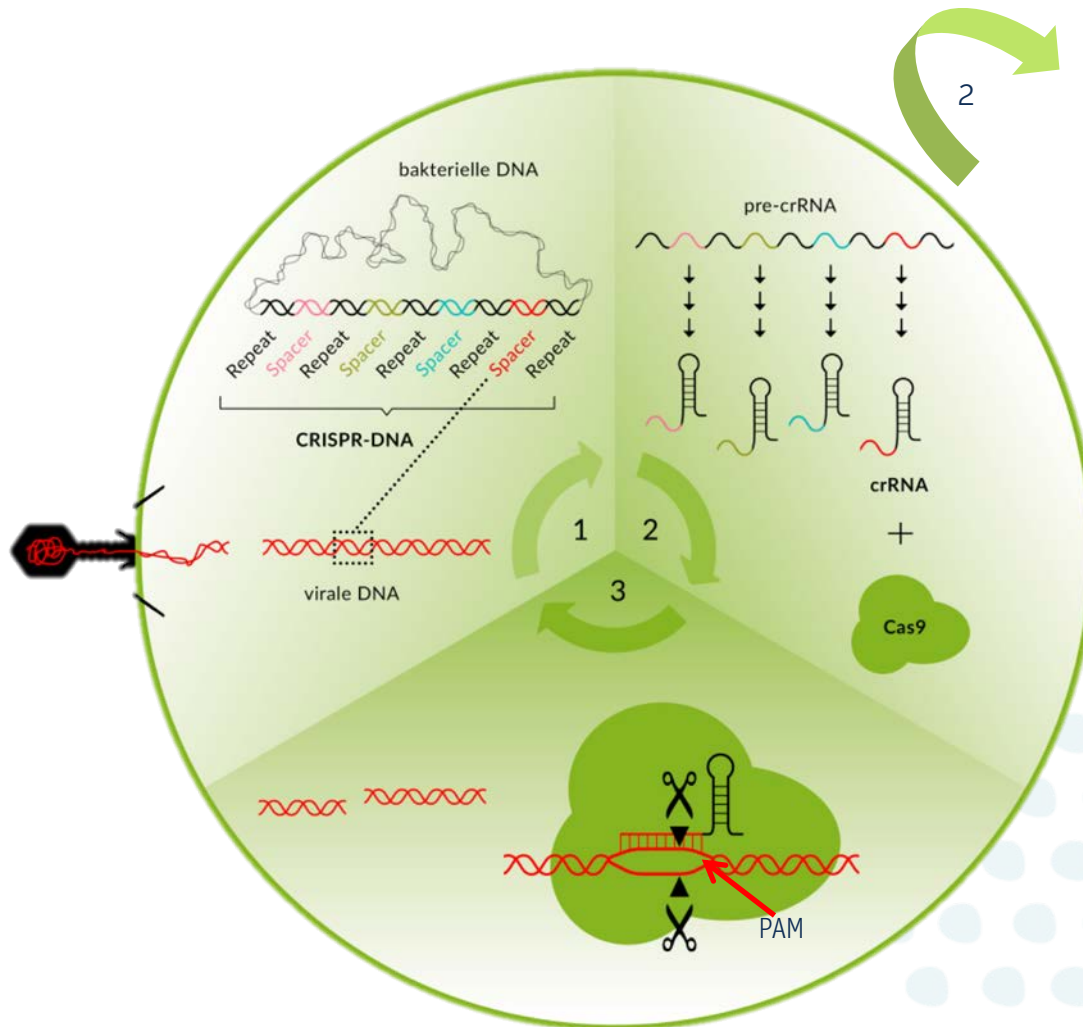


Bei der Erstinfektion durch einen Virus (Bakteriophagen) -> Teil der Virus-DNA durch den Cas-Komplex (Cas1 & 2) ausgeschnitten

DNA (Spacer) wird in bakterieneigenen CRISPR-DNA eingebaut, die aus DNA-Sequenz-Repeats besteht

Bakterienzelle hat nun DNA-Bibliothek kurzer RNA-Moleküle -> können Cas-9-Protein zu wiedereindringender Fremd DNA bringen

Das bakterielle CRISPR/Cas9-System



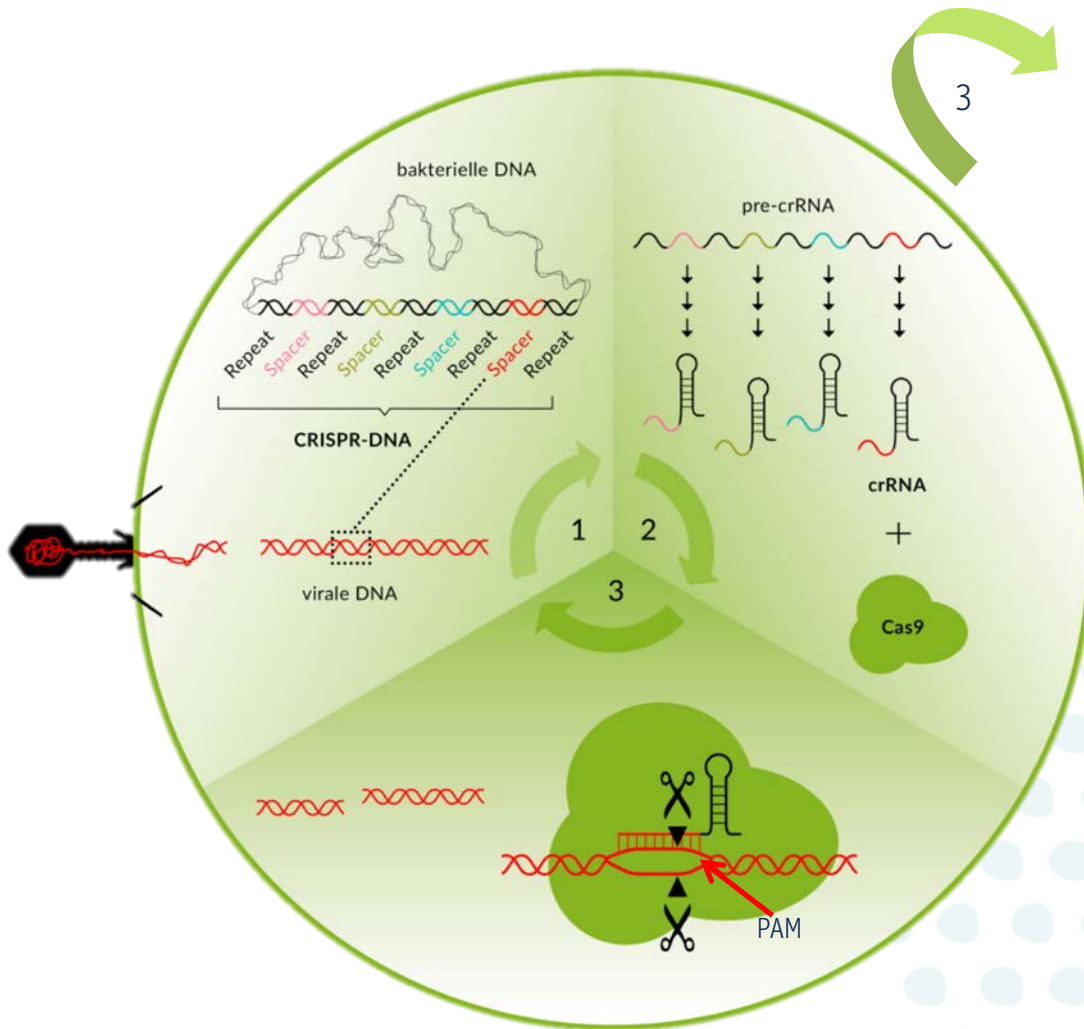
Dringt wiederum Fremd DNA in Bakterium ein, wird pre-crRNA anhand DNA-Bibliothek transkribiert

pre-crRNA und tracrRNA hybridisieren im Bakterium über komplementäre Sequenzbereiche und werden durch Cas9 und Enzym RNaseIII in kurze Stücke prozessiert

Es resultiert ein Komplex aus Cas9-Protein, tracrRNA und crRNA

Bindung verändert Cas9 strukturell, sodass es DNA aufnehmen kann

Das bakterielle CRISPR/Cas9-System



crRNA sucht Ziel-DNA nach komplementären Sequenzen ab und bindet über Spacer-Sequenzen

Zur Bindung muss Cas9 PAM (Protospacer Adjacent Motif) Erkennungssequenz finden und binden

crRNA des Komplexes bindet an die Zielsequenz und Cas9-DNA-Endonuklease schneidet DNA

CRISPR/Cas-Systeme

6 verschiedene CRISPR/Cas-Systeme

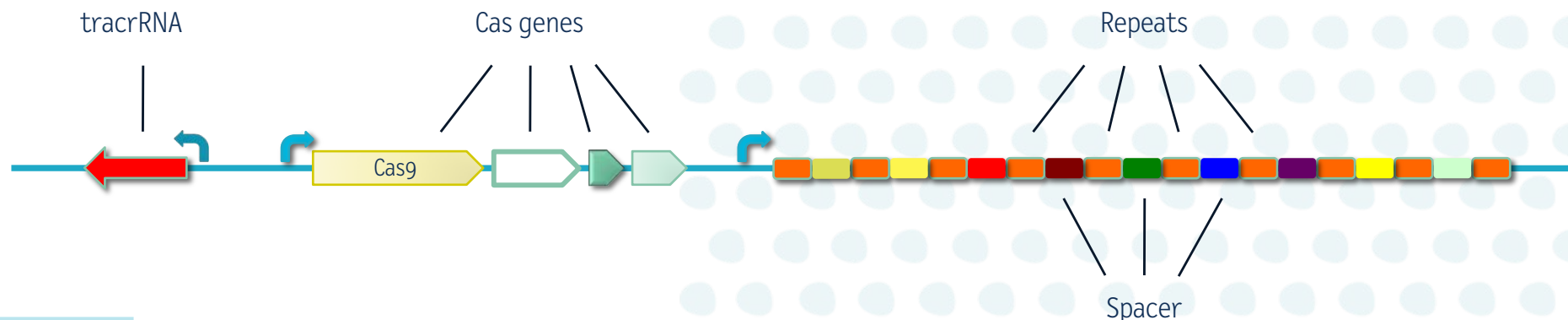
Unterscheiden sich nach Art der Nuklease

Klasse-1-Systeme: Multi-Protein-Komplex als Nuklease

Klasse-2-Systeme: einzelne Nuklease

Klasse-2, Typ II: z.B. CRISPR/Cas9

Klasse-1, Typ I : z.B. für antimikrobielle Wirkung
(gegen Bakterium selbst gerichtet)



GENOM-EDITIERUNG

Molekularbiologische Methodik



Was ist Genom-Editierung?

Verschiedene Techniken, die es ermöglichen, gezielt Erbgut zu verändern:

Bei Mikroorganismen „Weiße Gentechnik“

Bei Pflanzen „Grüne Gentechnik“

Bei menschlichen Zellen „Rote Gentechnik“

Bei Tieren „Transgene Tiere“ bzw. gentechnisch veränderte Tierlinien

Synonyme sind:

Genome Engineering

Gene-Editing

Genom-Modifikation

Genom-Editierung

Ziele sind:

Knockout – Gen in Genom zerstören

Knockin – Gen in Genom einfügen (cisgen von gleicher Art; transgen von anderer Art)

Punktmutation(en) - gezielt Base(n) in Genom verändern

Werkzeuge der Genom-Editierung

Meganukleasen

- sind Endonukleasen und erkennen DNA-Sequenz von 14–40 Basenpaare durch Protein–DNA Interaktion
- sind wenig spezifisch, die Ziel-DNA-Bindung ist nicht besonders hoch

ZNFs-Zinkfingernukleasen und TALENs (Transcription Activator-like Effector Nucleases)

- haben DNA-Bindungsdomäne und eine unspezifische FokI-Nukleasedomäne
- haben FokI-Protein, das doppelsträngige DNA spaltet
- ZNFs binden DNA-Sequenz von 9–18 Basenpaaren-> Off-target Effekte durch künstliche Veränderung von Fok-I reduziert
- TALE-Domänen bestehen aus Repeats von etwa 33-35 Aminosäuren, jede erkennt ein spezifisches Basenpaar in der großen Furche der Ziel-DNA

Fusionsproteine mit einer hohen Aktivität und niedriger Zelltoxizität sind schwer herzustellen, was den großen Nachteil dieser Methoden darstellt.

Werkzeuge der Genom-Editierung

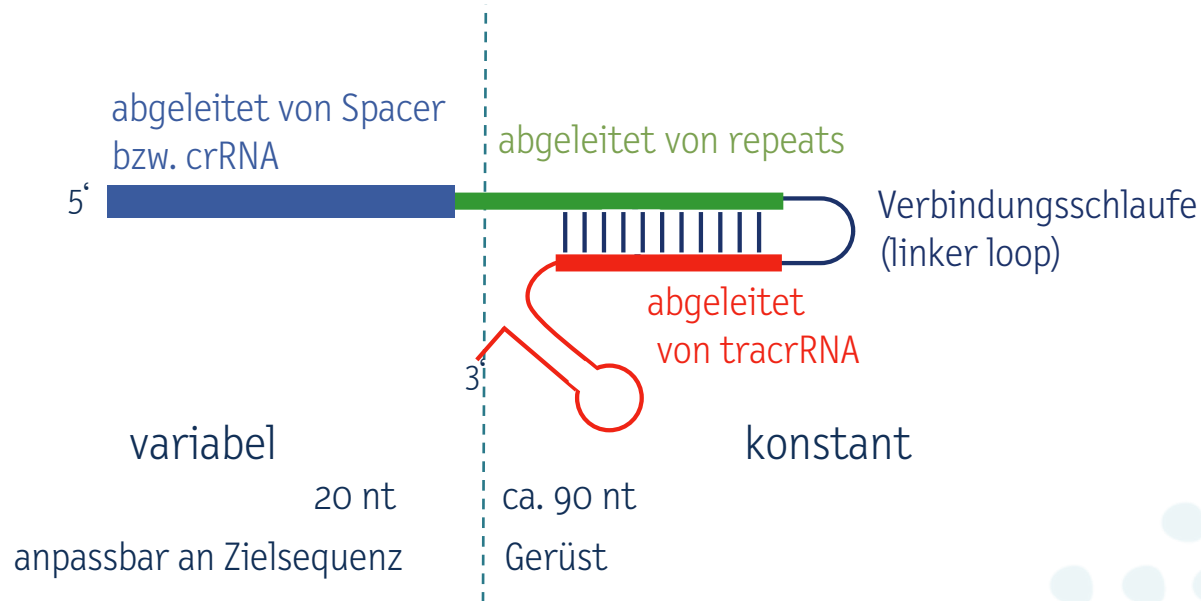
CRISPR /Cas9

- CRISPR/Cas9 ist ein adaptives Immunsystem von Bakterien, das Forscher zur gezielten Modifikation von DNA verwenden
- Methode der „RNA-guided engineered nucleases“, guide RNA bestehend aus tracrRNA & crRNA bringen die Nuklease zur Zielsequenz -> Doppelstrangbruch -> Insertion oder Deletion bzw. Einführung einer Gensequenz möglich

Wie unterscheiden sich die Methoden?

Methode	Effizienz	Spezifität	Design	Lieferung	Kosten
ZNF	niedrig	niedrig	schwierig	mittel	hoch
TALEN	mittel	hoch	schwierig	mittel	gering
CRISPR/Cas9	hoch	hoch	einfach	schnell	gering

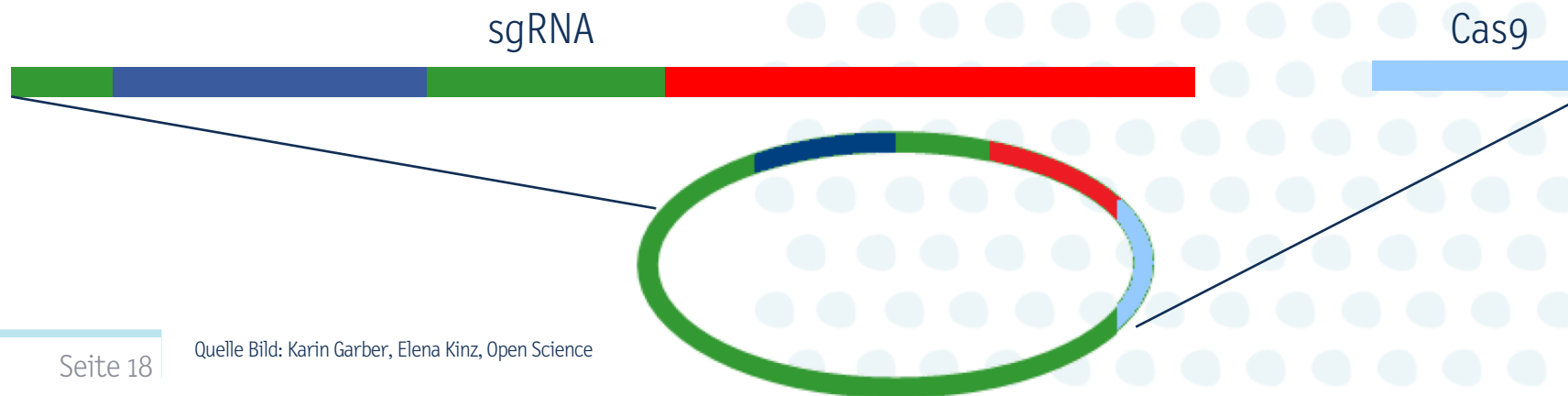
CRISPR Leit-RNA Design



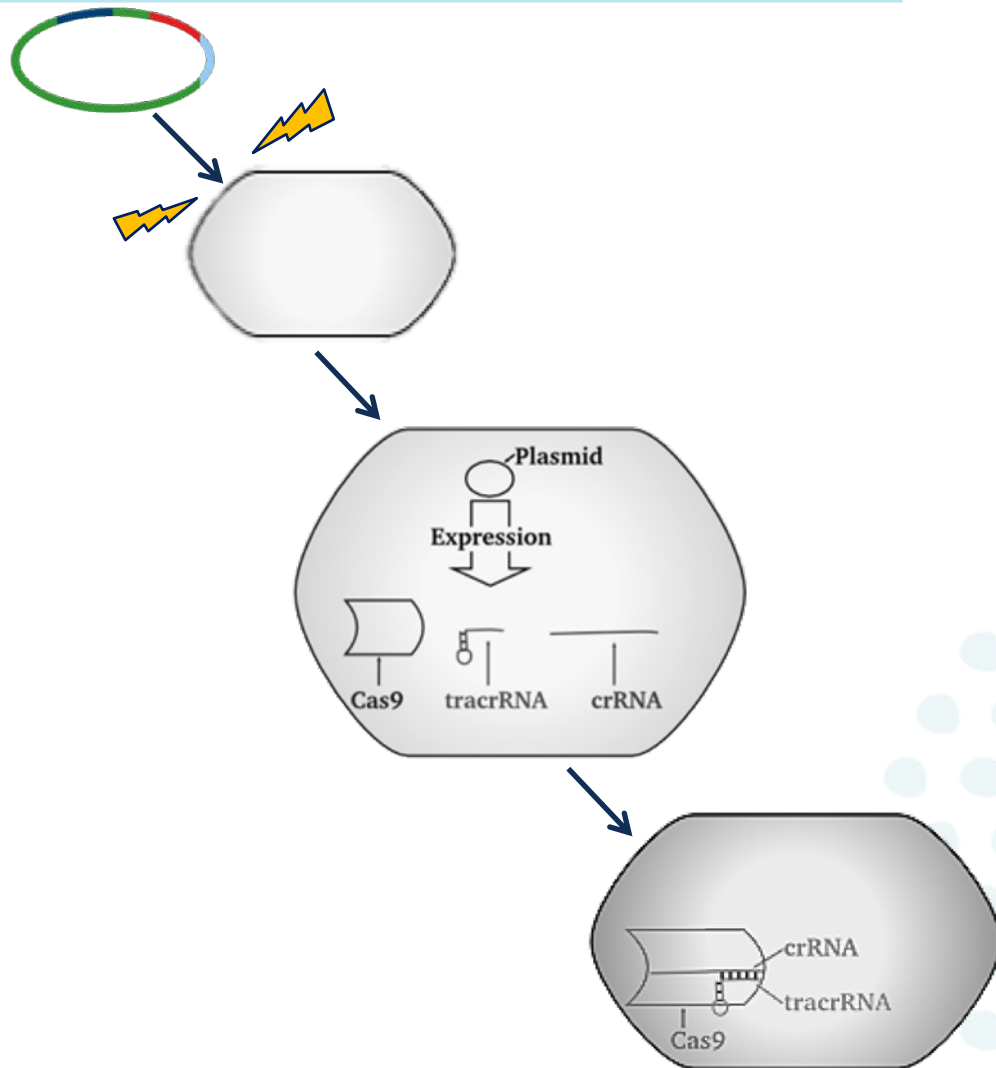
crRNA: variabler Teil der Leit-RNA, wird auf die Zielsequenz hin designt; besteht aus circa 20 Nukleotiden

tracrRNA: trans activating crRNA, für Prozessierung der pre-crRNA

Gemeinsam mit genetischer Information von Cas9 wird sgRNA (single guide RNA) in ein Plasmidkonstrukt eingebracht



CRISPR/Cas9 System

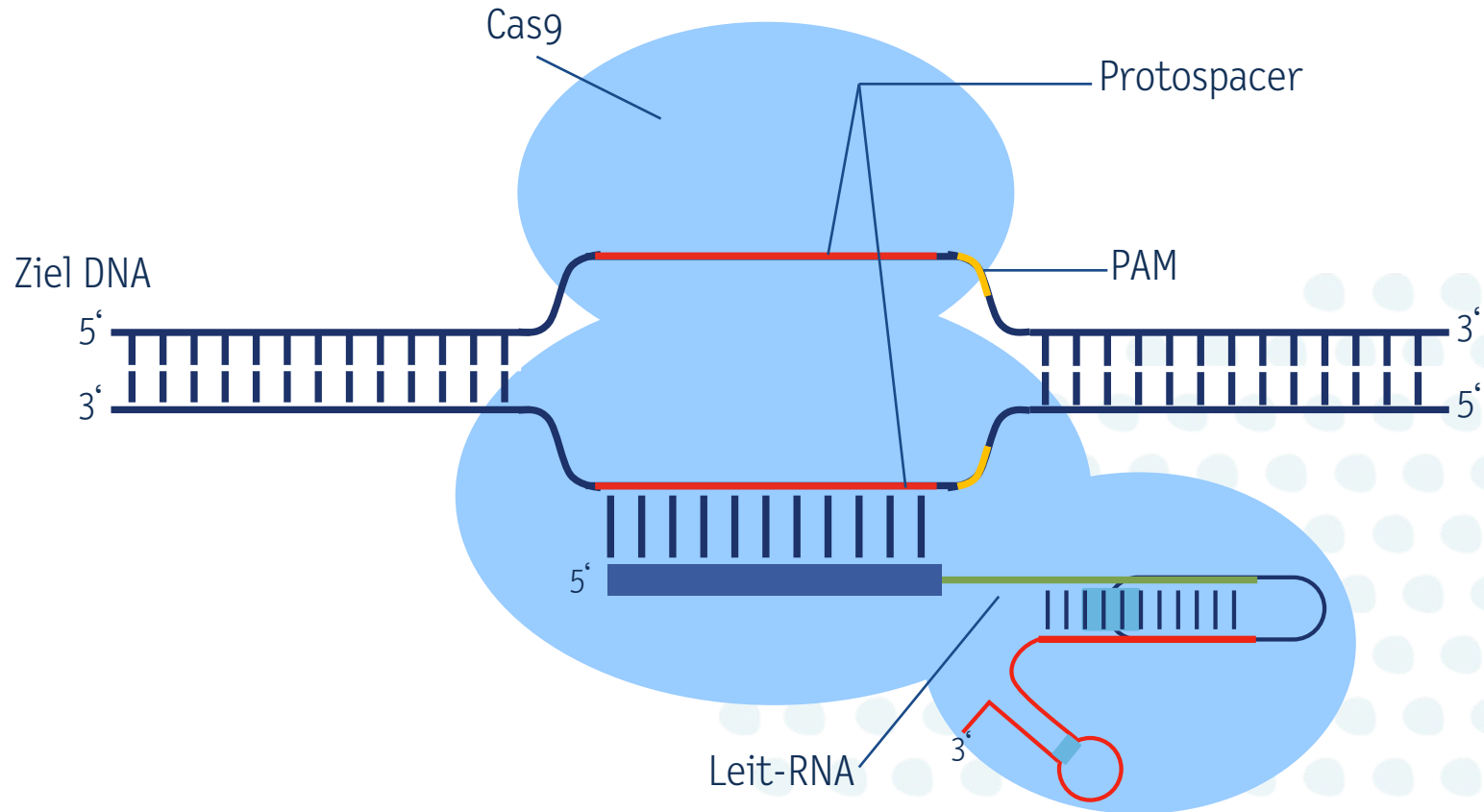


Genetische Information der Leit-RNA und des Cas9-Proteins mittels Plasmid in Zielzelle eingebracht

Geschieht meist mittels Elektroporation
->Plasmid kann Zellmembran passieren

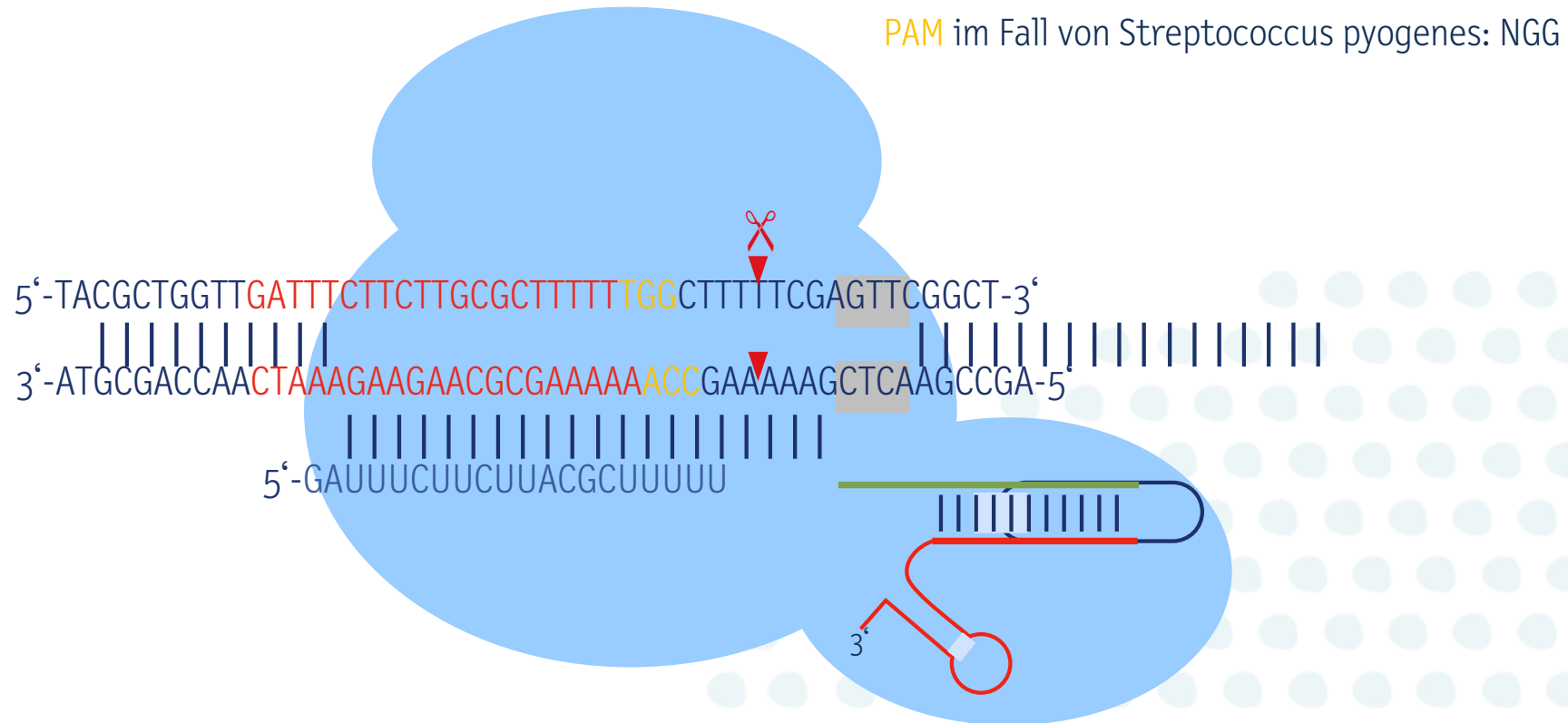
Nach Expression wird Leit-RNA (crRNA und tracrRNA) und Cas9 zum CRISPR/Cas9-Komplex verbunden

CRISPR/Cas9 Doppelstrangenschnitt

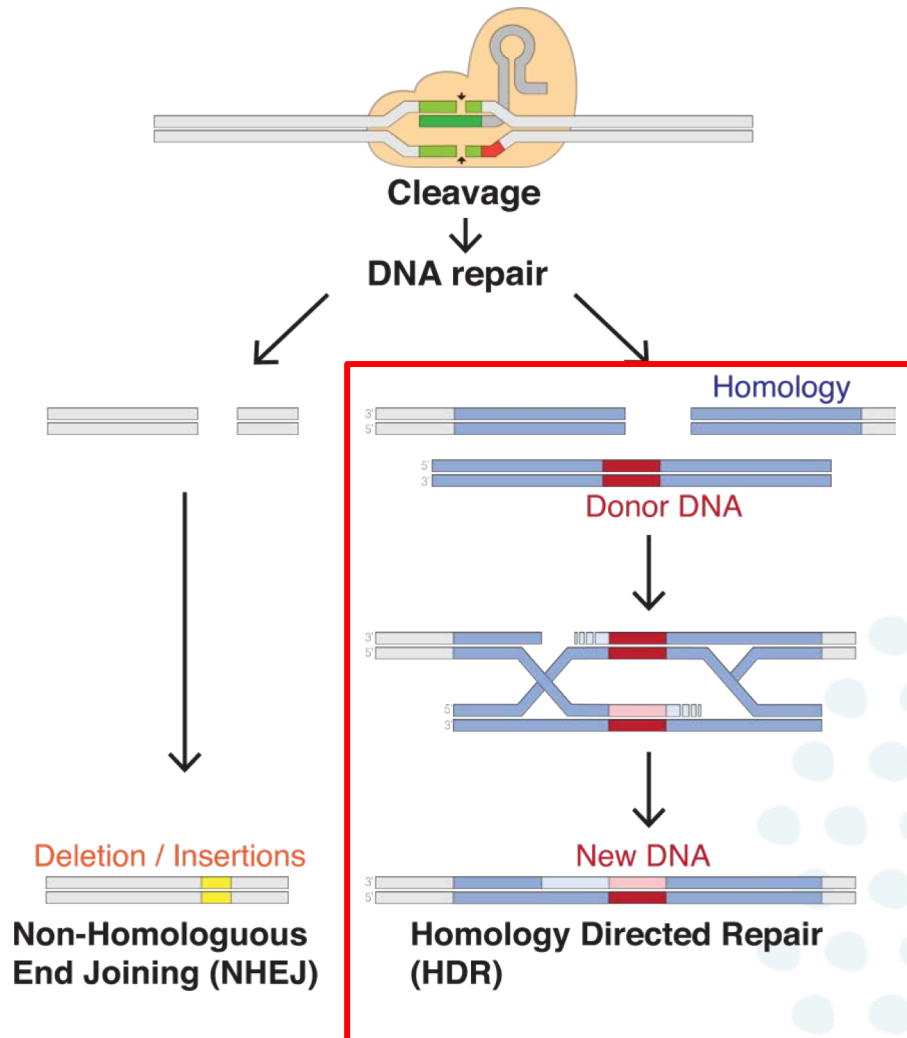


CRISPR/Cas9-Doppelstrangschnitt

PAM im Fall von *Streptococcus pyogenes*: NGG



DNA-Reparatur und -Modifikation



Homologe Rekombination (HR)

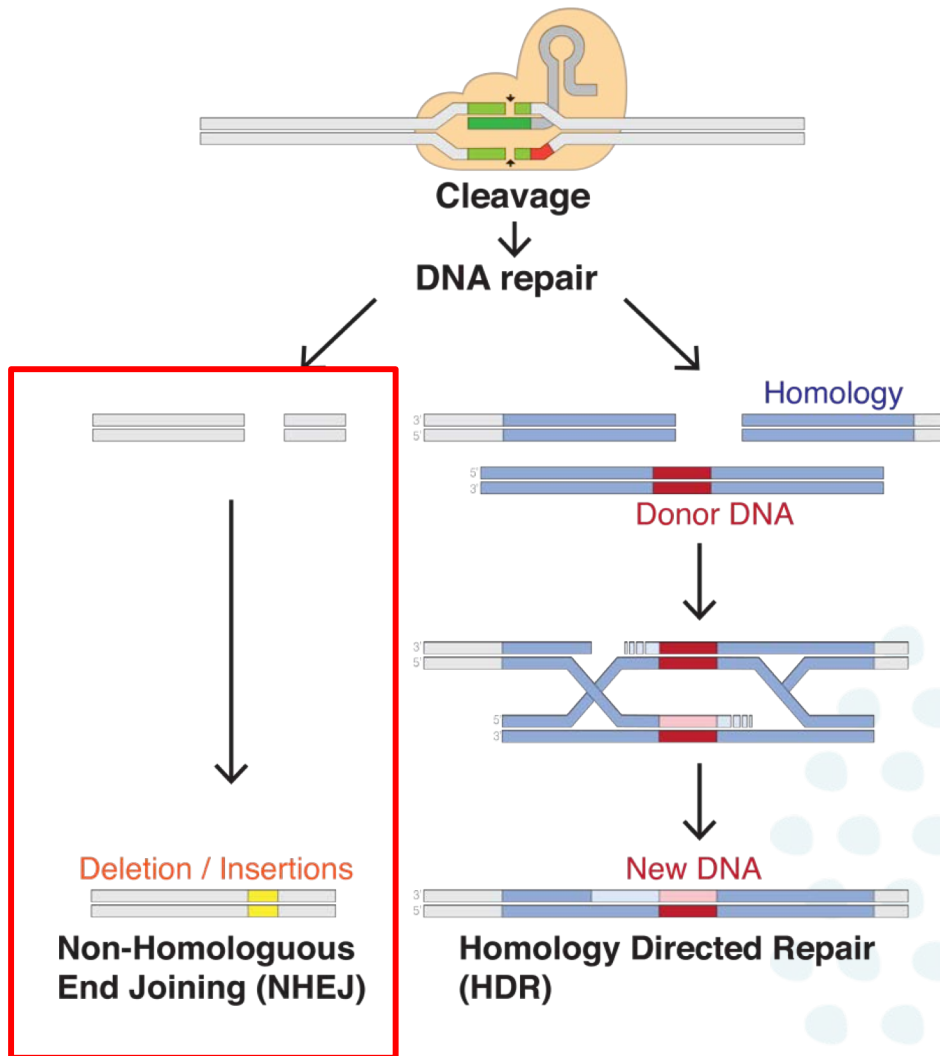
Kommt in post-mitotischen Zellen vor (Muskel-,Nerven-, Skelettzellen)

Verwendet Schwesterchromatide als Vorlage für Reparatur

Bei CRISPR/Cas9 kann DNA-Vorlage „mitgeliefert“ werden, um neues Gen einzubauen

Genauer Einbau neuen genetischen Materials in die Zielzelle

DNA-Reparatur und -Modifikation



Non-Homologes Endjoining (NHEJ)

Kommt in allen Zellen vor

Ungenauer Mechanismus

Oft werden Basen deletiert (gelöscht) oder kleine Insertionen eingeführt

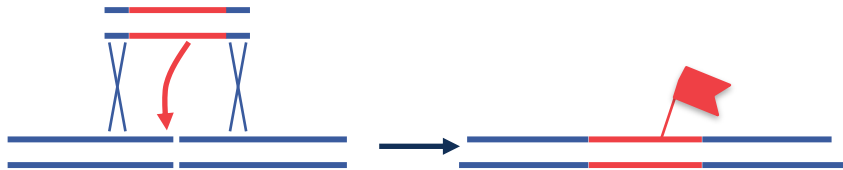
Kann man ausnutzen, um Leseraster eines Gen so zu verschieben, dass nicht-funktionelles Protein entsteht

CRISPR/Cas9-Modifikationen



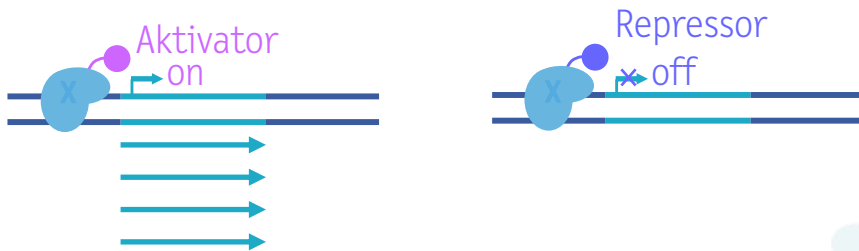
Gen gezielt ausschalten (Knockout)

Zielsequenz = Exon



Gen gezielt verändern, neue Sequenz einbringen
(Knockin)

Zielsequenz = Region in der Veränderung vorgenommen werden soll



Genaktivität erhöhen oder herabsetzen

Zielsequenz = Promotor
(Verwendung von CRISPR ohne Sequenzänderungen der Ziel-DNA)



Visualisierung / Lokalisierung von DNA-Abschnitten
durch Fluoreszenzmarkierung

Zielsequenz = DNA Abschnitt dessen raum-zeitliche Organisation analysiert werden soll

CRISPR/CAS9

Bestehende und zukünftige Einsatzbereiche



Grüne Gentechnik

- Veränderung des Erbgutes von Pflanzen-> widerstandsfähiger gegen Schädlinge oder Klimabedingungen
- CRISPR/Cas9 kann Gene naturidentisch* in Pflanzen einbringen
- Bereits erforscht wurde : weißer Zucht-Champignon, der langsamer braun wird, ertragreicherer Mais oder allergenfreie Erdnüsse
- Beforschte Anwendungen:

Optimierte Pflanzen mit CRISPR schneller herstellbar und günstiger als klassische Pflanzenzucht

Rechtliche Regelung fraglich – Bewertung des Herstellungsprozesses (genveränderter Organismus) oder des Produkts (naturidentischer, nicht genveränderter Organismus) ?

*kein genetischer Unterschied zur natürlichen Pflanze

Methoden der Pflanzenzucht

Kreuzung
Empfängerlinie Spenderlinie

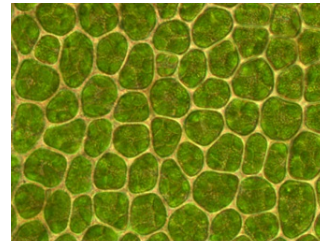


Rückkreuzung



Sorte mit gewünschten Eigenschaften

Mutagenese
Chemikalien/
Strahlung

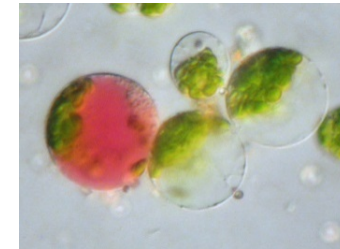


Auslese



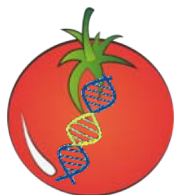
Sorte mit gewünschten Eigenschaften

Protoplastenfusion



artfremde DNA

bakt. DNA DNA-Plasmid



transgene Pflanze

artgleiche DNA

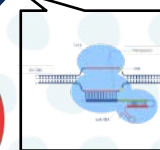


cisgene Pflanze

CRISPR/Cas9



TTGCGCTT
AACGCGAA



GE erzeugte Pflanze

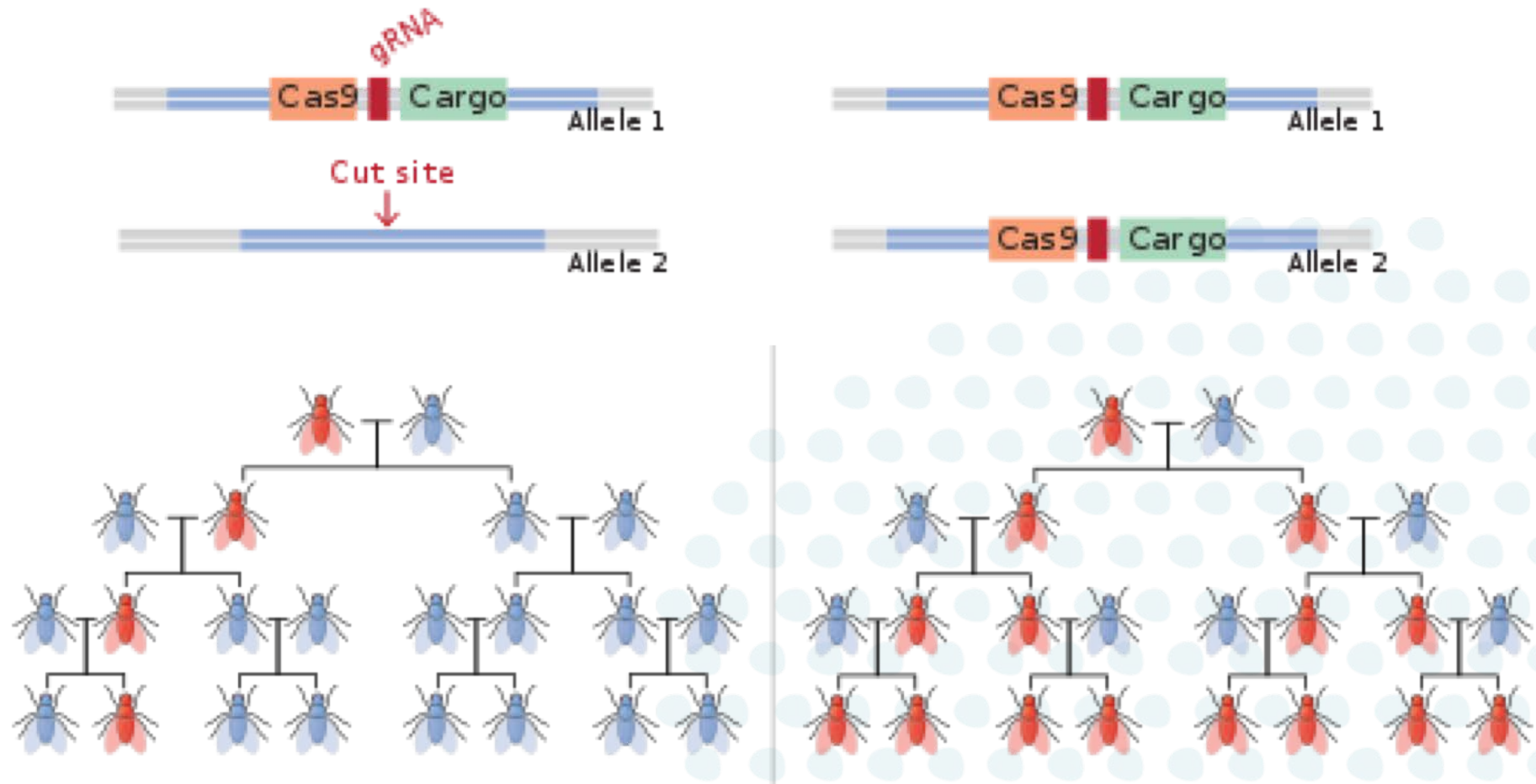
Gene-Drive – „Genetischer Antrieb“

- Genetischen Informationen für Cas9 und guide-RNA mit DNA-Sequenzen flankiert, die homolog zum Gen sind, das man modifizieren will
- Genetischen Informationen für Cas9 und guide-RNA werden stabil ins Erbgut integriert
- Homologe DNA-Sequenzen dienen als Vorlage für den DNA-Reparaturmechanismus, um den „künstlichen“ DNA-Bruch zu reparieren
- Auf einem Gen eingeführte Mutation kopiert sich selbstständig auf das Schwesterchromosom
- „Turbo“ für die Vererbung des veränderten Gens -> von Generation zu Generation erben alle Nachkommen diese Mutation
- Wird im Labor ausgenutzt, um rasch neue Eigenschaften in einen Organismus einzuführen, beispielsweise bei *Drosophila melanogaster* (in der Grundlagenforschung) oder bei Stechmücken zur potentiellen Bekämpfung von Malaria, Dengue oder Zika (zukünftige Anwendung?)

Gene-Drive – „Genetischer Antrieb“

Normale Vererbung

Gene Drive-Vererbung



Modellorganismen (MO) – Rekonstruktion von Krankheiten im Labor

- Mit CRISPR/Cas9 können Linien von genmodifizierten Organismen rascher und günstiger hergestellt werden
- CRISPR/Cas9 kann mehrere Stellen im Genom gleichzeitig verändern und so komplexe Gen-Kombinationen effizienter erzeugen
- MO dienen der Erforschung von zellulären Vorgängen und Krankheiten
- Wichtige Organismen sind: Ackerschmalwand, div. Bakterien, Bäckerhefe, Zebrafische, Taufliegen und Mäuse
- Mit MO kann man beispielweise auf genetischer Ebene simulieren, wie ein Wirkstoff ein Gen/Genprodukt blockieren könnte
- Erforscht werden damit Krankheiten wie Akute Myeloische Leukämie, Alzheimer, oder Herz-Kreislaufkrankungen

Somatische Gentherapie

- Eine Mutation, die zu einer Erkrankung führt, wird repariert bzw. ein Gen ausgetauscht
- Unterscheidung: ex vivo oder in vivo Therapien
- Es eignen sich Stammzellen oder Zellen, die sich häufig teilen
- Wichtig: Art der Mutation, Gewebe/Zelltyp, Zugang/Transport
- Off-target Effekte vor allem in vivo problematisch, ex vivo kann man Zellen vorselektieren
- Forschung im Bereich somatische Gentherapie an:
 - Blutgerinnungsstörungen wie Hämophilie A
 - Leukämie, HIV und anderen Immundefekten
 - Muskelschwund-Erkrankungen
 - Sichelzellenanämie

Keimbahntherapie

- Genom menschlicher Keimbahnzellen wird an die Nachkommen weitergegeben-> Mutationen vererbbar
- CRISPR/Cas9 Eingriffe in die menschliche Keimbahn möglich -> als kritisch erachtet
- CRISPR/Cas9 zeigt in komplexen Säugermodellen viele Off-target Effekte-> irreversible Veränderungen, die dann an Nachkommen vererbt werden und deren Auswirkungen man schwer einschätzen kann
- Forschung mit Embryonen hoch umstritten
- Erbkrankheiten im Menschen mit CRISPR/Cas9 schwierig zu therapieren
- Keimbahnmutationen im BRCA1-Gen, die bei Trägerinnen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu familiären Brustkrebs führen, wird mit CRISPR veränderten Krebszelllinien erforscht

Epigenetik

- Epigenetische Veränderungen an Chromosomen beeinflussen Aktivität einzelner Gene
- Enzyme verändern Abschnitte der DNA, was zu einem stärkeren oder schwächeren Ablesen von Genen führt (Genexpression)
- Mit CRISPR-Cas9 lassen sich Regionen im Erbgut ansteuern und dort das epigenetische Muster verändern, ohne am Erbgut selbst einzugreifen
- Dafür wird Cas9 deaktiviert und mit epigenetischen Modifikatoren verbunden
- Beispielsweise kann man somit DNA mit Methylgruppen oder Histonproteine mit Acetylgruppen markieren und damit den Einfluss epigenetischer Veränderungen auf die Genexpression untersuchen

CRISPR/Cas9

Rechtliche, ethische und gesellschaftliche Aspekte

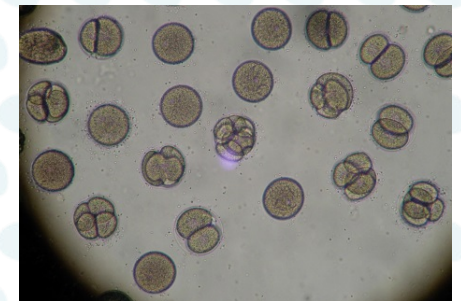


Rechtliche und regulatorische Aspekte

Österreich	Schweden	USA
<p>Experimente mit CRISPR fallen unter das Gentechnikgesetz, Keimbahnveränderungen am Menschen sind untersagt. Forschung an Embryonen ist zusätzlich über das Fortpflanzungsmedizingesetz geregelt.</p>	<p>Genom-Editierung an Embryonen ist in Schweden, wie in Österreich, per Gesetz verboten.</p>	<p>Öffentliche Förderungen erlauben es nicht, menschliche Embryonen zu modifizieren. Die Genom-Editierung ist allerdings erlaubt. Klinische Studien am Menschen, wie im Bereich der Somatische Gentherapie, werden durchgeführt.</p>
<p>In der Pflanzenzucht sind gezielte Manipulationen kennzeichnungspflichtig. CRISPR-GVOs ohne „Markergene“: Methode der Veränderung ist keine Gentechnik.</p>	<p>Im Falle einer mit CRISPR veränderten Ackerschmalwand wurde entschieden, dass es sich um einen nicht gentechnisch veränderter Organismus handelt (kein GMO-Prozess).</p>	<p>Durch CRISPR veränderte Pflanzen unter gewissen Voraussetzungen nicht „transgen“.</p>

Ethische und gesellschaftliche Fragen

- Sind Pflanzen, die mit Genom-Editierung entstanden sind, deren Genom jedoch „naturidentisch“ ist, als GVOs anzusehen?
- Wer bekommt die Patente für CRISPR-Cas9 Methode?
Doudna/Charpentier oder Zhang/Church?
- Soll die Genom-Editierung für die Veränderung der Keimbahn eingesetzt werden?
Designer Babies – wo beginnt Selektion?
Gene Drive – was passiert mit dem Gleichgewicht der Natur?



DANKE FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT!

Wir danken unseren Fördergebern:



Bundesministerium für
Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft



**OPEN
SCIENCE**
Lebenswissenschaften im Dialog

www.openscience.or.at
office@openscience.or.at