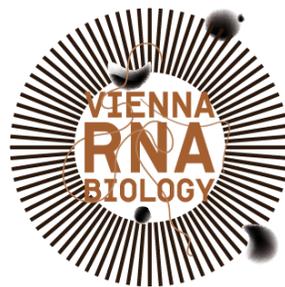


GENOM-EDITIERUNG & DIE GENSCHERE CRISPR/CAS

Webinar mit Univ.-Prof. i.R. Mag. Dr. Renée Schroeder
am 23.10.2019



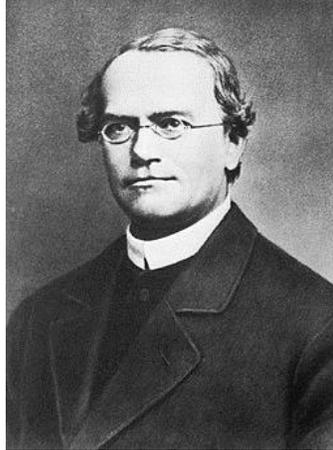
OPEN
SCIENCE
Lebenswissenschaften im Dialog

Inhalt

1. Mendel und die Entdeckung der Genetik
2. Die DNA als Trägerin der genetischen Information
3. Genetische Transformation
4. Gentechnik und rekombinante Proteine
5. Mutationen und Variationen
6. Genetische Krankheiten
7. Klassische Gentherapie
8. Restriktionsenzyme schneiden DNA
9. Artifizielle Nukleasen in der Genom-Editierung
10. Entdeckung und Grundlagen von CRISPR/Cas9
11. Konkrete Anwendungen von CRISPR/Cas9
12. Genom-Editierung: Somatischen Zellen vs. Keimbahn
13. Ethische Aspekte

MENDEL UND DIE ENTDECKUNG DER GENETIK

Gregor Mendel: Begründer der experimentellen Genetik



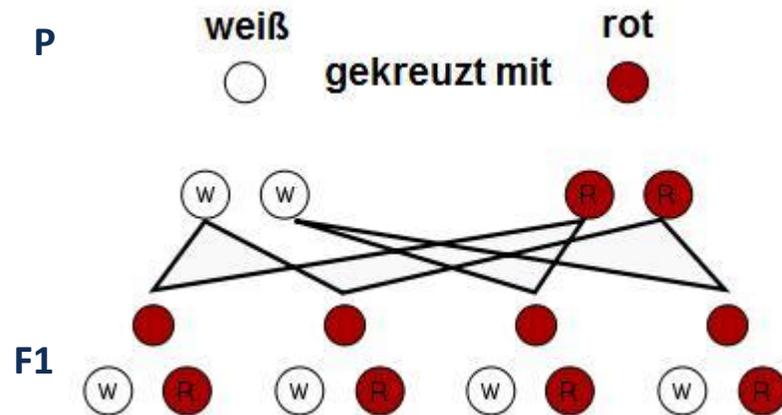
Gregor Mendel
(1822-1884)

Bild: Pixabay, CCO

- Gregor Mendel führte als erster Experimente zur Vererbung durch.
- Biologie wurde eine experimentelle Wissenschaft (im Gegensatz zur beschreibenden Wissenschaft).
- Mendel'sche Gesetze: Beschreiben Erbverhalten mancher Eigenschaften.

Jedes Merkmal wird von einem **unteilbaren Faktor = Gen** kontrolliert

Mendel'sche Regeln am Beispiel der Gartenerbse



Aus reinerbiger **P-Generation** gehen W und R im Spaltungsverhältnis 1:1 in **F1** hervor

Kreuzt man die Individuen der **F1 -Generation** miteinander, so spalten sich die Nachkommen in der **F2 -Generation** in Bezug auf die Merkmale der Eltern nach festen Zahlenverhältnissen auf (Spaltungsgesetz):

Dominant-rezessiver Erbgang:

Aufspaltung im Genotyp im Verhältnis 1 : 2 : 1, sowie im Phänotyp im Verhältnis 3 : 1.

Genetische Merkmale verteilen sich immer in einem Verhältnis nach GANZEN ZAHLEN!
Erkenntnis: Der Mendel'sche Faktor ist nicht teilbar und kommt in verschiedenen Ausprägungen vor!

DIE DNA ALS TRÄGERIN DER GENETISCHEN INFORMATION

Die GRIFFITH-Versuche

Frederick GRIFFITH beschäftigte sich 1928 mit Ursachen der Lungenentzündung, die durch das kugelförmige Bakterium *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufen wird.

Zwei unterschiedlich virulente (gefährliche) Typen bekannt:

- S-Typ Bakterien, haben Kapsel, sind pathogen (infektiös)
- R-Typ Bakterien, haben keine Kapsel, sind nicht pathogen



Die GRIFFITH-Versuche

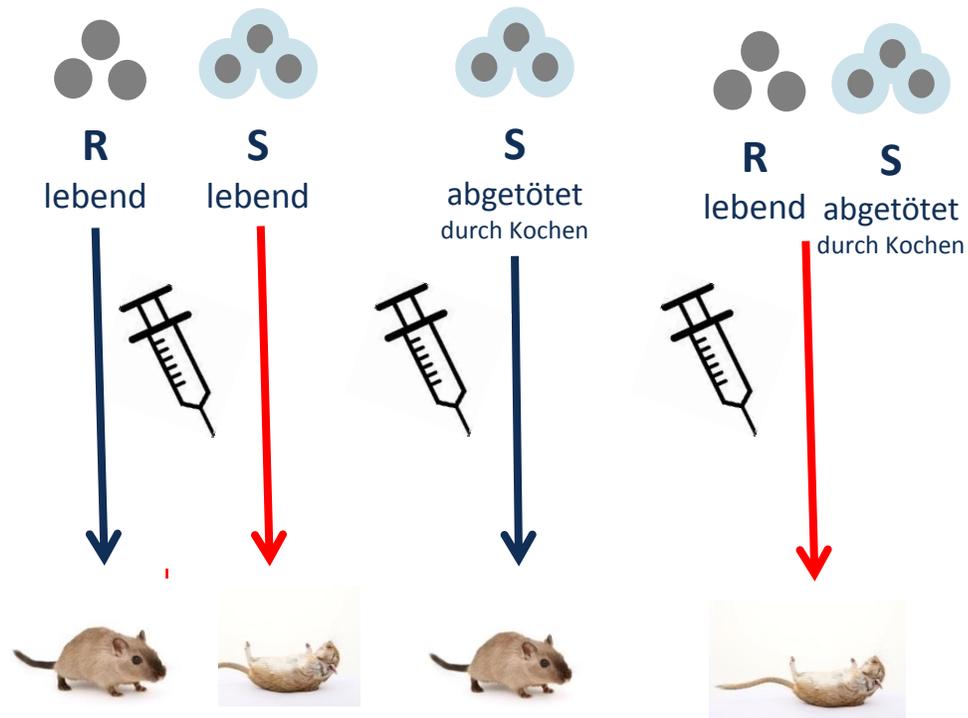


Bild: Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog (CC BY-SA 3.0 AT)

Versuche mit Mäusen:

1. Infektion mit R-Typ Bakterien: alle Mäuse überlebten.
2. Infektion mit S-Typ-Bakterien: die meisten Mäuse starben.
3. Infektion mit S-Typ-Bakterien, abgetötet durch Abkochen: Mäuse überlebten; keine Bakterien im Blut der Mäuse.
4. Infektion mit Mischung aus lebenden R-Typ-Bakterien und abgetöteten S-Typ-Bakterien: alle Mäuse starben, lebende S-Typ-Bakterien aus Blut der toten Mäuse isoliert.

Die GRIFFITH-Versuche

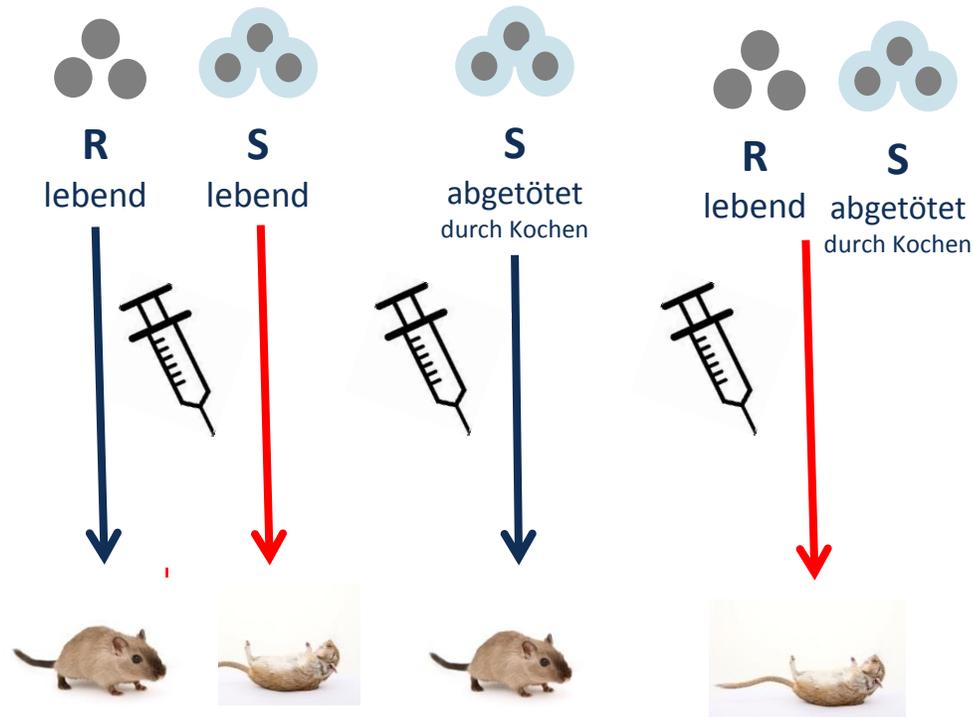


Bild: Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog (CC BY-SA 3.0 AT)

Schlussfolgerungen aus Versuchen:

- S-Bakterien enthalten einen tödlichen Faktor, R-Bakterien nicht (Versuche 1 und 2).
- Tote S-Bakterien können Faktor nicht auf Mäuse übertragen (Versuch 3), wohl aber auf lebende R-Bakterien (Versuch 4).
- Durch die Aufnahme dieses Faktors werden R-Bakterien zu S-Bakterien **transformiert** = umgewandelt (Versuch 4).

Abgetöte Zellen enthielten „Stoff“, der harmlose zu letalen Bakterien transformieren konnte
→ **Genetische Transformation!**

Der AVERY-Versuch

Oswald AVERY und seine Kollegen bauten auf die Ergebnisse von Griffith auf und konnten 1944 nachweisen, dass die DNA Trägerin der Erbinformation ist:

- Sie zerstörten S-Zellen komplett durch Homogenisieren
- Durch anschließendes Zentrifugieren trennten sie diese in Protein-Fraktion und Nukleinsäure (DNA)-Fraktion auf

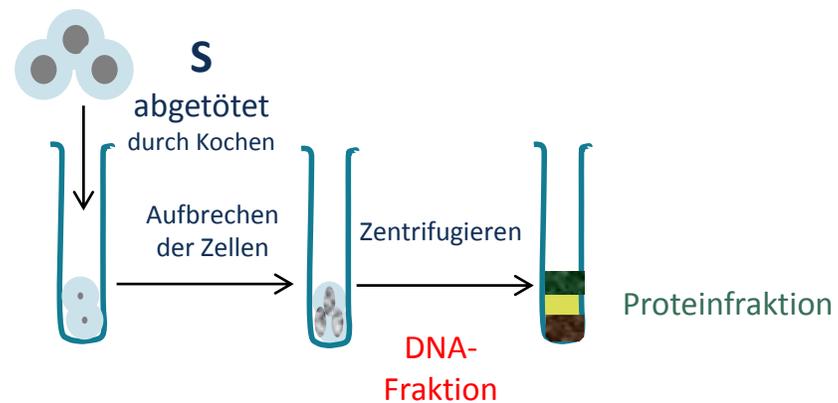


Bild: Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog (CC BY-SA 3.0 AT)

Der AVERY-Versuch

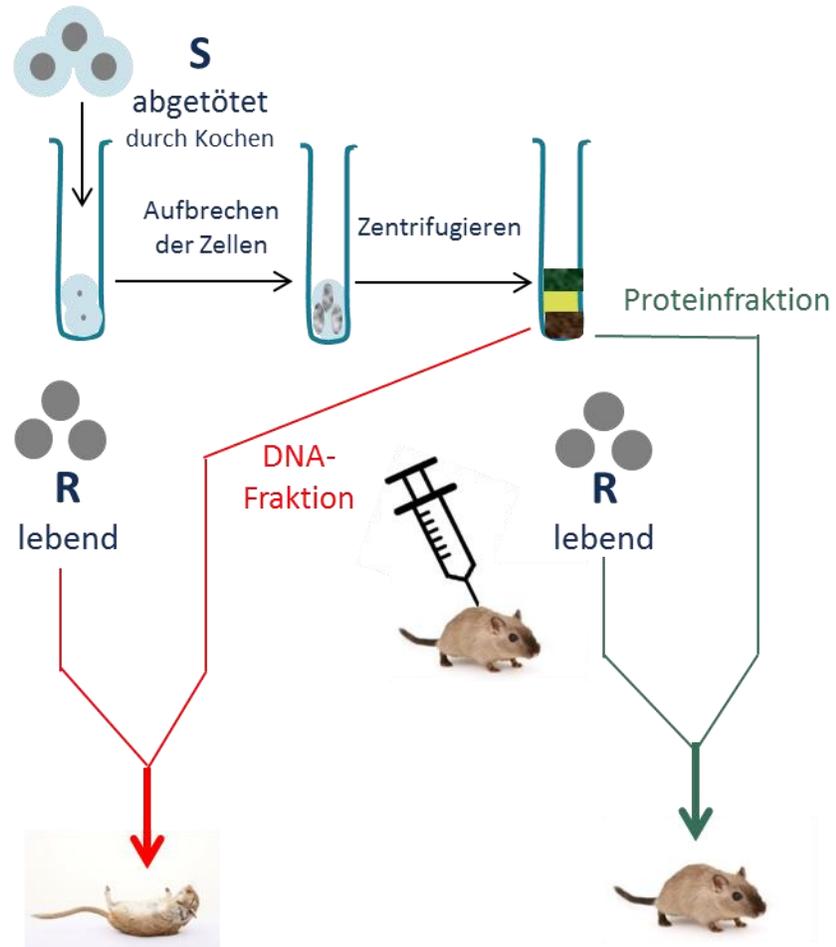


Bild: Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog (CC BY-SA 3.0 AT)

Ergebnisse:

- Injektion von Protein-Fraktion + lebenden R-Zellen: Mäuse lebten weiter.
- Injektion von Nukleinsäure-Fraktion + lebenden R-Zellen: Mäuse starben.

Proteine können lebende R-Zellen nicht in S-Zellen transformieren.

Die Nukleinsäuren sind transformierender Faktor des Griffith-Versuchs.

→ **Die DNA ist Träger der Erbinformation!**

Welche molekularen Mechanismen stecken dahinter?

GENETISCHE TRANSFORMATION

Genetische Transformation

Definition:

Einbringen „fremder“ DNA in eine Empfängerzelle. Diese erhält die „neue Information“ und kann sie auch umsetzen.

- Beispiel Versuche von Griffith und Avery: Die DNA der letalen S-Typ-Bakterien wurde an R-Typ-Bakterien weitergegeben und in deren DNA eingebaut, Information zur Bildung der Kapsel abgelesen
- Beispiel Insulinproduktion: Führt man die DNA für menschliches Insulin in E. Coli Bakterienzellen ein, so können diese menschliches Insulin (Eiweiß) herstellen → auch **rekombinantes Protein** genannt.

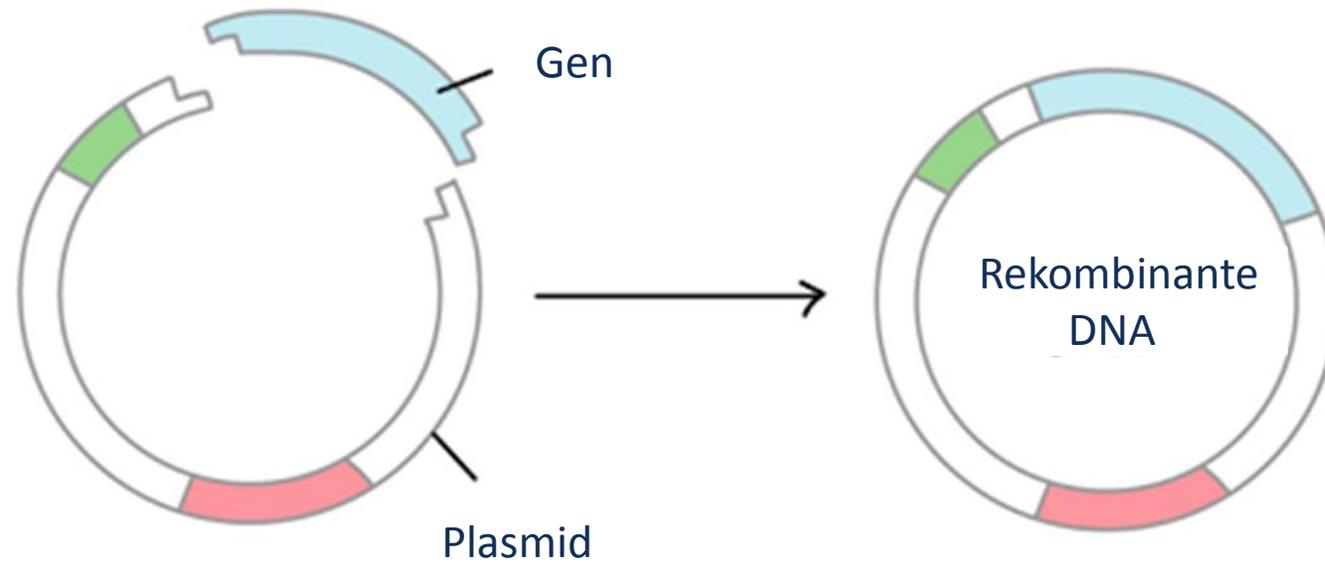
Warum ist das möglich?

Weil der genetische Code universell ist!

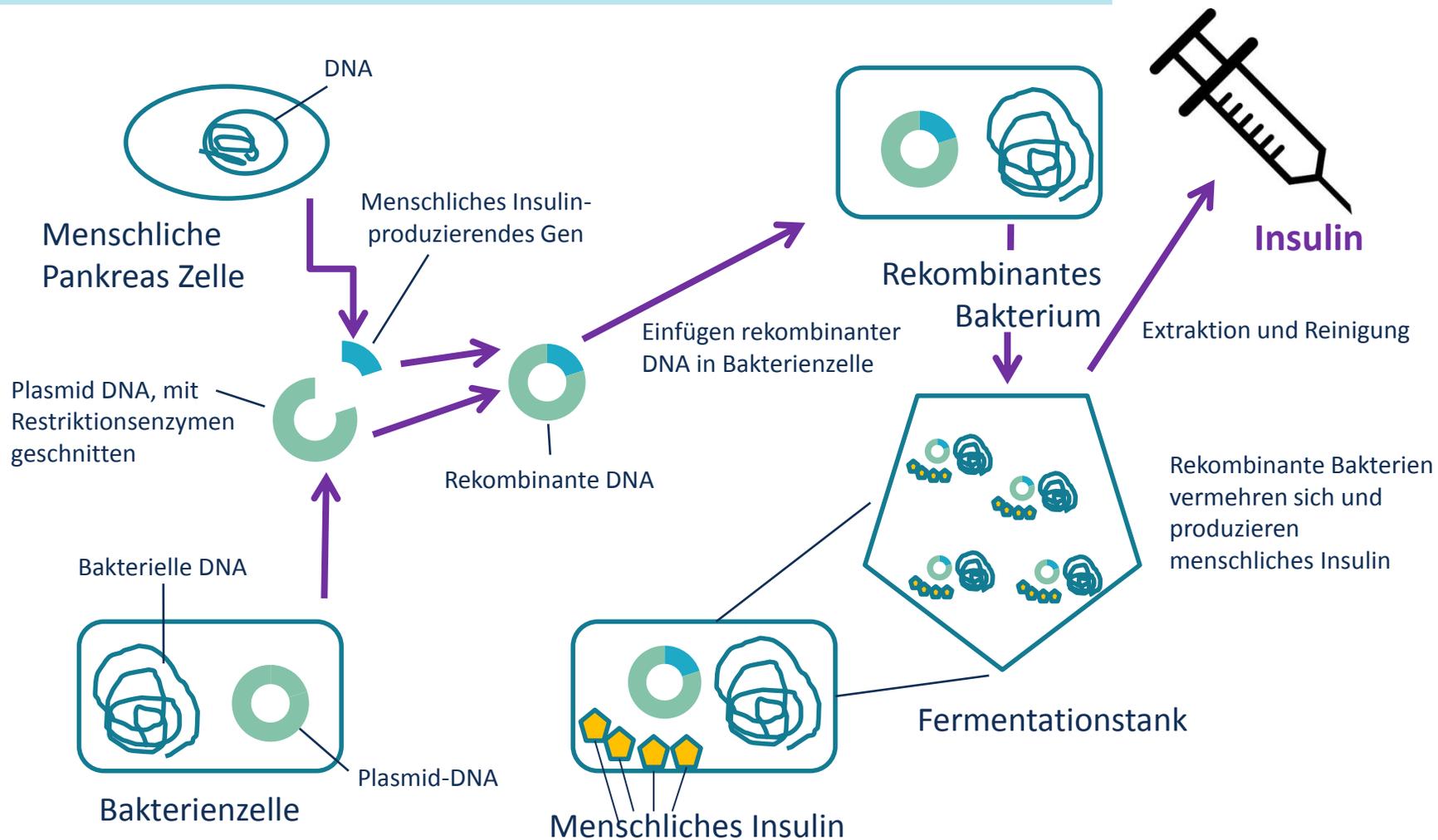
E. coli Bakterium verwendet gleichen genetischen Code wie der Mensch.

GENTECHNIK UND REKOMBINANTE PROTEINE

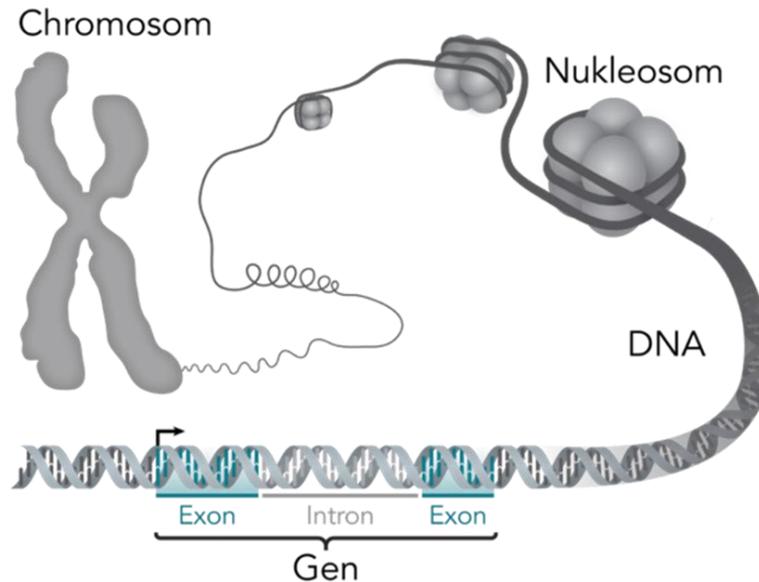
Rekombination von DNA



Produktion von menschlichem Insulin



DNA und genetische Information



Als **Gen** wird meist ein Abschnitt auf der DNA bezeichnet, der Grundinformationen für die Entwicklung von Eigenschaften eines Individuums und zur Herstellung eines Proteins oder einer biologisch aktiven RNA enthält. (Wikipedia; modifiziert)

Bild: Schematische Darstellung eines Gens (bestehend aus Introns und Exons) einer eukaryotischen DNA;
By Thomas Splettstoesser (www.scistyle.com), <https://de.wikipedia.org/wiki/Gen#/media/Datei:Chromosom-DNA-Gen.png>; (CC BY-SA 4.0)

Das zentrale Dogma

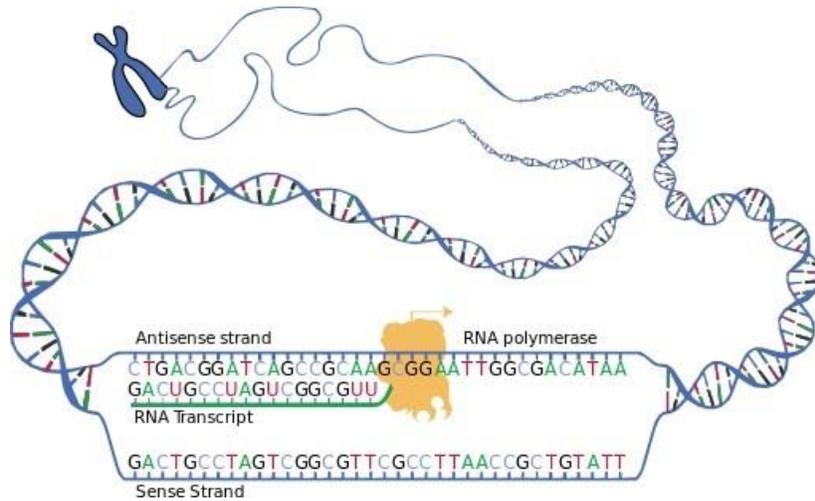


Bild: DNA transcription, by National Human Genome Research Institute/ reworked and vectorized by Sulai
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_transcription.svg

Zentrales Dogma:
DNA → mRNA → Protein

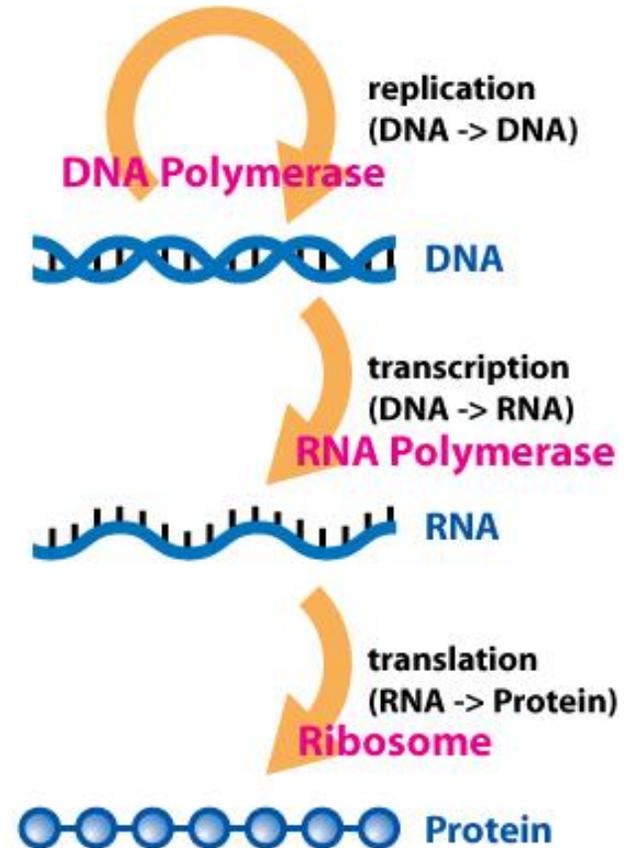


Bild: Central dogma of molecular biochemistry with enzymes; by Dhorspool at en.wikipedia (CC BY-SA 3.0)
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Central_Dogma_of_Molecular_Biochemistry_with_Enzymes.jpg

MUTATIONEN UND VARIATIONEN

Mutationen

Definition: Als **Mutation** wird eine dauerhafte Veränderung des Erbgutes bezeichnet. Betrifft zunächst das Erbgut nur einer Zelle, wird aber an deren Tochterzellen weitergegeben.

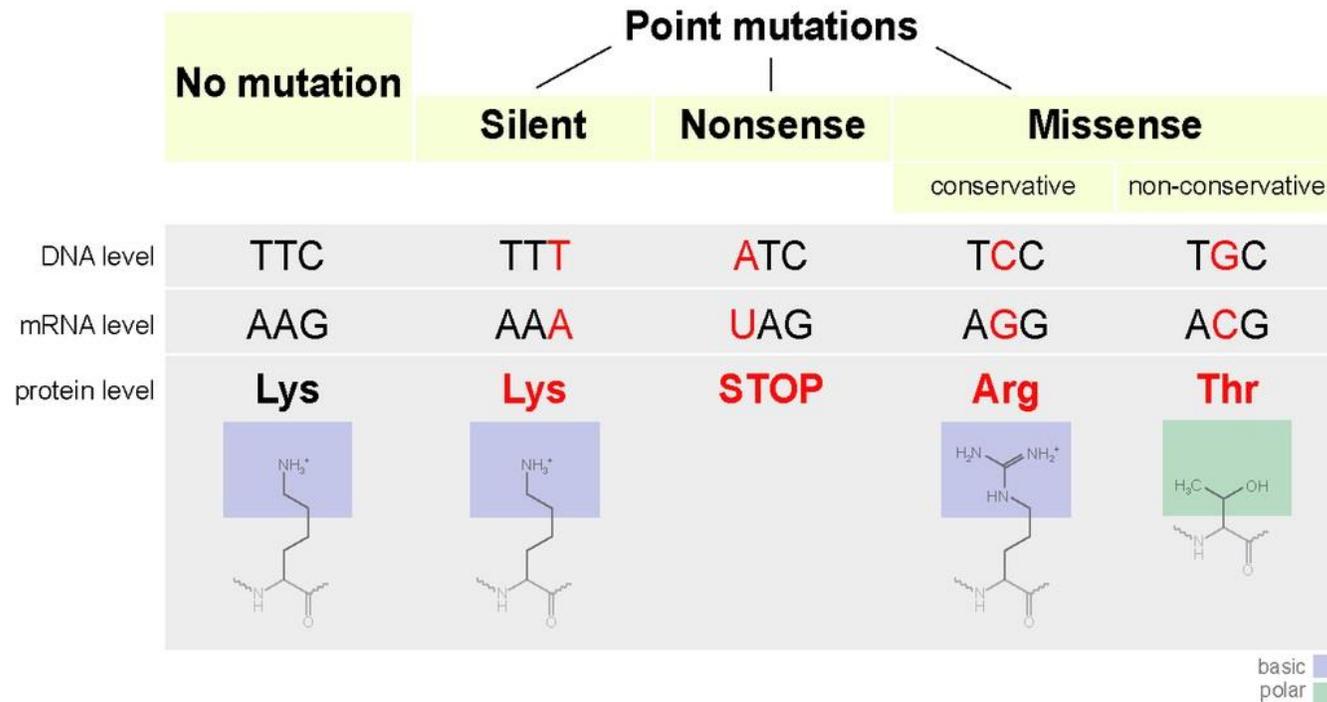


Bild: Darstellung der drei verschiedenen Arten von Punktmutationen eines Codons; by Jonsta247 (CC BY-SA 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Point_mutations-en.png

Mutationen

Bei mehrzelligen Tieren unterscheidet man

- **Keimbahn-Mutationen**, die durch Vererbung an die Nachkommen weitergegeben werden können, von
- **Mutationen in somatischen Zellen**, die nur in den übrigen Geweben des Körpers vorliegen.

Eine Mutation kann Auswirkungen auf die Merkmale eines Organismus haben oder auch nicht (stille Mutation).

Abweichende Merkmalsausprägungen (Variationen) können negative, positive oder auch gar keine Folgen hinsichtlich der Lebensfähigkeit und/oder des Fortpflanzungsvermögens haben.

GENETISCHE KRANKHEITEN

Beispiele für genetische Krankheiten

- Chorea Huntington, autosomal-dominant
- Hämophilie A und B, X-chromosomal-rezessiv
- Galaktosämie, autosomal-rezessiv
- Mukoviszidose, autosomal-rezessiv
- Sichelzellkrankheit, autosomal-kodominant
- Phenylketonurie, autosomal-rezessiv
- Mukopolysaccharidose, autosomal-polygenetisch

KLASSISCHE GENTHERAPIE

Was ist Gentherapie?

Vorteilhafte Veränderung eines Phänotyps durch Änderung bzw. Normalisierung von defektem genetischem Material.

Dazu werden Verfahren eingesetzt, mit deren Hilfe Gene (oder Teile davon, DNA oder RNA) in Zellen eines Gewebes eingeschleust werden, um

- dort exprimiert zu werden oder
- die fehlerhafte oder unkontrollierte Expression eines Gens zu verhindern (antisense Technik)

Warum ist Gentherapie möglich?

Folgende Eigenschaften der DNA ermöglichen überhaupt erst eine Gentherapie:

- Struktur der DNA
- Zugänglichkeit der DNA für Proteine

DNA: Doppelhelix mit fixen Basenpaarungen

Regeln von Watson und Crick:

- Anzahl der Basen Adenin (A) und Thymin (T) stets im Verhältnis 1 : 1 vor
- Verhältnis der Basen Guanin (G) und Cytosin (C) beträgt immer 1 : 1

→ A-T und G-C bilden jeweils komplementäre Basenpaare

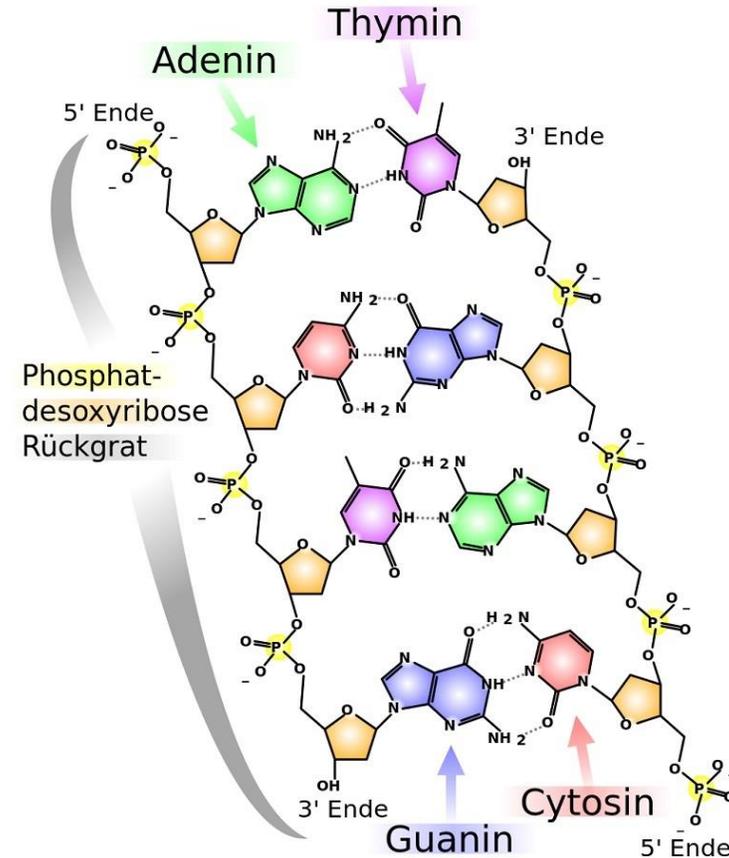


Bild: Chemische Struktur der DNA mit farbigen Beschriftungen um die 4 Basen, die Phosphate und die Desoxyribose zu kennzeichnen.

By Madeleine Price Ball, User: Madprime derivative work: Matt [CC BY-SA 2.5 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/>)]

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Chemische_Struktur_der_DNA.svg

Struktur der DNA

Kann man die DNA-Sequenz „lesen“, ohne die Helix aufzuwinden?

- Ja, die Information ist von den Furchen (große und kleine Furche) zugänglich.
- Proteine können sequenz-spezifisch an die DNA binden.

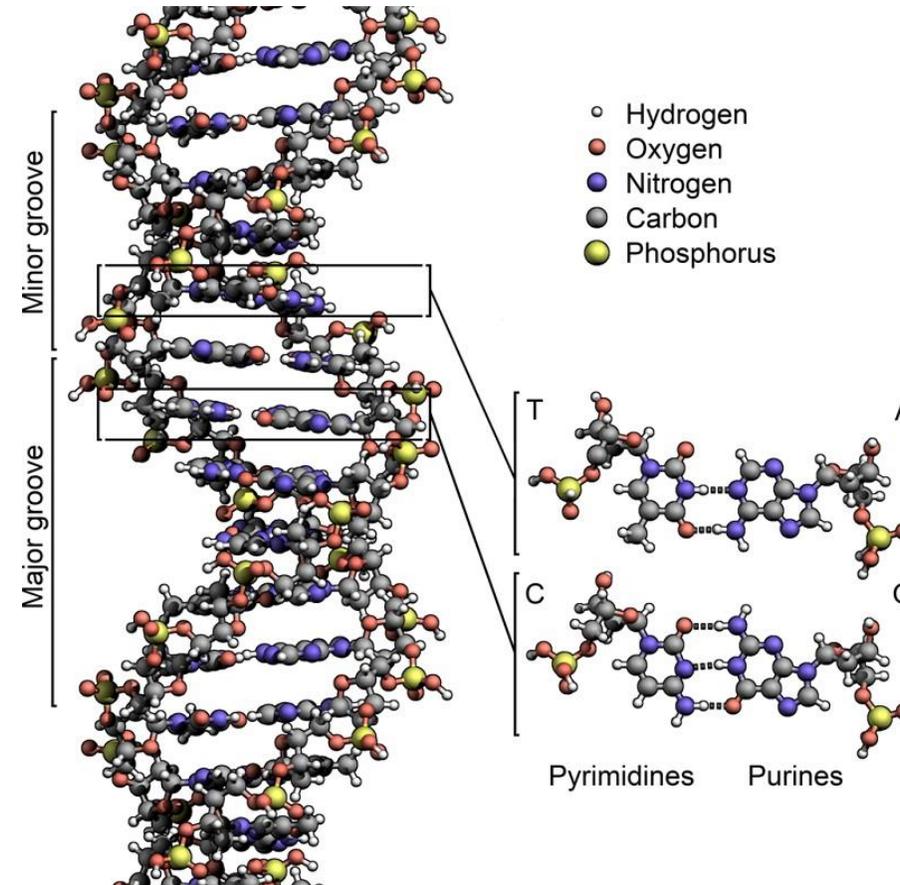


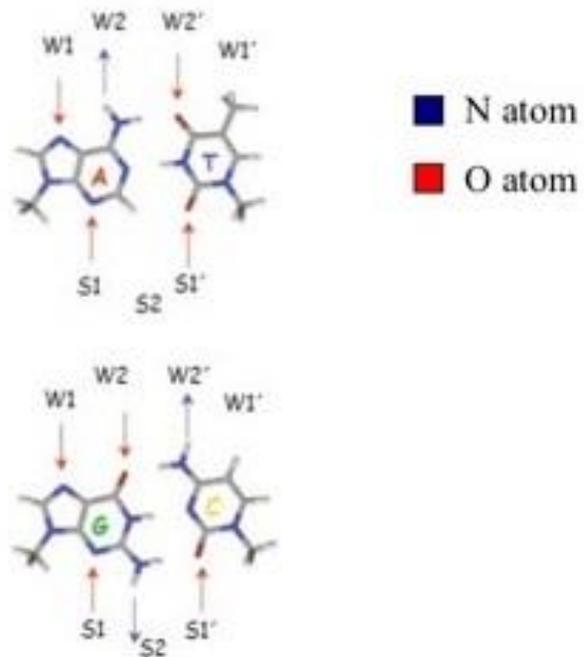
Bild: Struktur der DNA, by Zephyris [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4c/DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.pn_NoBB.png

Proteine können sequenz-spezifisch an DNA binden

Prinzipien der DNA-Erkennung

W...Stelle der großen Furche der DNA

S... Stelle der kleinen Furche der DNA



Ein Protein (grün)
bindet an die DNA
(rot-blau)

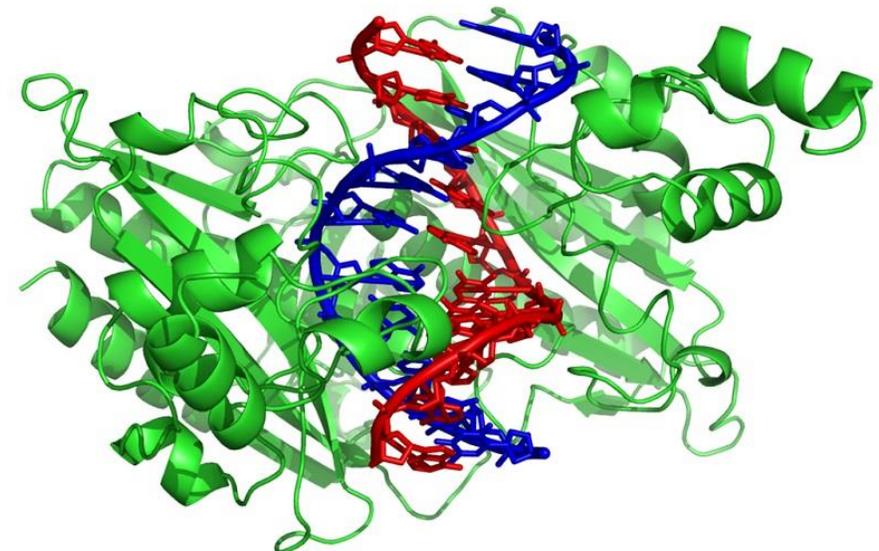


Bild: Image of EcoRV homodimer in complex with a DNA substrate.
The original uploader was Richard Wheeler (Zephyris) at English Wikipedia.
[CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/dc/EcoRV_1RVA.png

RESTRIKTIONSENZYME SCHNEIDEN DNA

Restriktionsenzyme schneiden DNA sequenz-spezifisch

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) sind „**molekulare Scheren**“



Bild: Abgewandelt von Pixabay, CCO

Das Restriktionsenzym EcoRV (grün)
schneidet DNA (blau-rot)

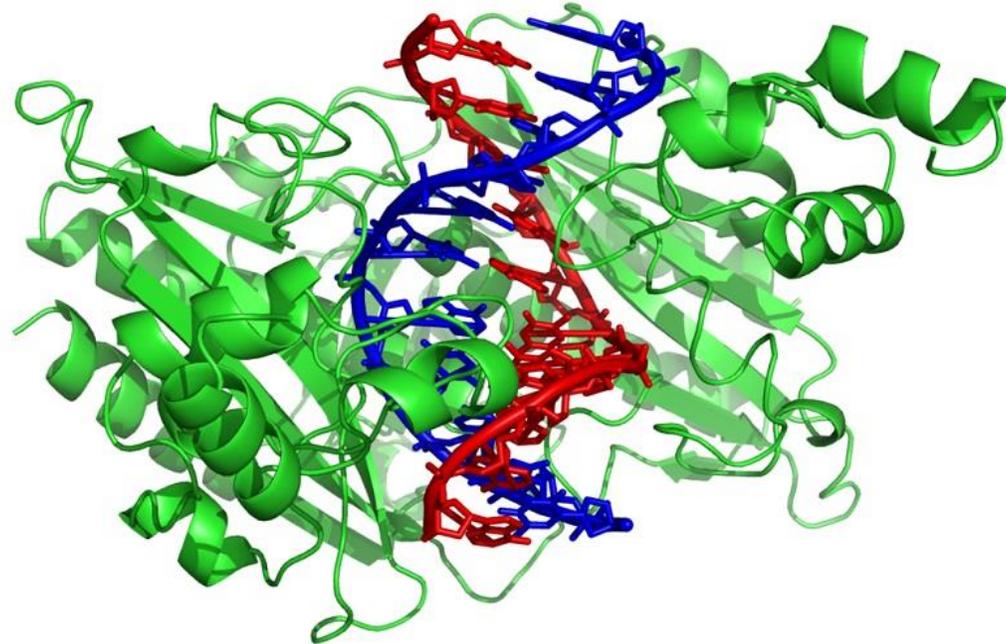
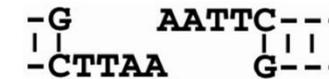
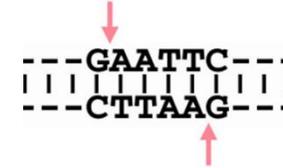


Bild: Image of EcoRV homodimer in complex with a DNA substrate.
The original uploader was Richard Wheeler (Zephyris) at English Wikipedia.
[CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/dc/EcoRV_1RVA.png

Verschiedene Klassen von Restriktions-Enzymen

Zwei Klassen von Restriktionsenzymen:

- **Typ I:** Schneiden die DNA-Erkennungssequenz und erzeugen glatte „blunt ends“
- **Typ II:** Schneiden DNA-Erkennungssequenz und erzeugen klebrige „sticky ends“ (Einzelstrang-Überhänge)



Beispiele:

Enzymname	Erkennungssequenz	Schnitt	Enden	
Eco RI	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	5'-G AATTC -3' 3'- CTTAA G-5'	Sticky	Überhang mit 4 Basen
Hind III	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	5'-A AGCTT -3' 3'- TTCGA A-5'	Sticky	Überhang mit 4 Basen
Bam HI	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	5'-G GATCC -3' 3'- CCTAG G-5'	Sticky	Überhang mit 4 Basen
Hae III	5'-GGCC-3' 3'-CCGG-5'	5'-GG CC -3' 3'- CC GG-5'	Blunt	Glattes Ende, kein Überhang
Sma I	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5'	5'- CCC GGG-3' 3'-GGG CCC -5'	Blunt	Glattes Ende, kein Überhang

Figur: Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog (CC BY-SA 3.0 AT)

DNA schneiden und wieder verbinden (ligieren)

Molekül A

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

Molekül B

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'



Verdau mit gleichem
Restriktionsenzym (Eco RI)

5'-G
3'-CTTAA

Klebrige Enden

AATTC-3'
G-5'



Mischen
Verbinden durch **DNA-Ligase**

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

Rekombinante DNA

ARTIFIZIELLE NUKLEASEN IN DER GENOM-EDITIERUNG

Artifizielle DNA-Endonukleasen: Ein Überblick

„Designer-Nukleasen“:

1. Zinkfinger-Nukleasen
2. TALENS
3. CRISPR/Cas9

Prinzip:

- Finden spezifische Stelle in der DNA
- Schneiden Zielsequenz
- Reparieren DNA-Doppelstrangbruch

Zinkfinger-Nukleasen (ZNF)

- Künstlich im Labor hergestellt
- Zinkfingerdomäne bindet DNA
- Nukleasedomäne (meist FokI) schneidet DNA

Schwieriges Design, hohe Kosten



Bild: Genome editing, snippet, by Farzad Jamshidi, GNU Free Documentation License, Version 1.2 (CC BY-SA 3.0)
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/c/cd/Engineered_Nucleases.jpg

TALEN

(Transcription activator-like effector nuclease)

- Künstlich im Labor hergestellt
- TAL-Effektor dient DNA-Erkennung kombiniert plus
- DNA-schneidende Untereinheit eines Restriktionsenzym

Schwieriges Design, geringe Kosten

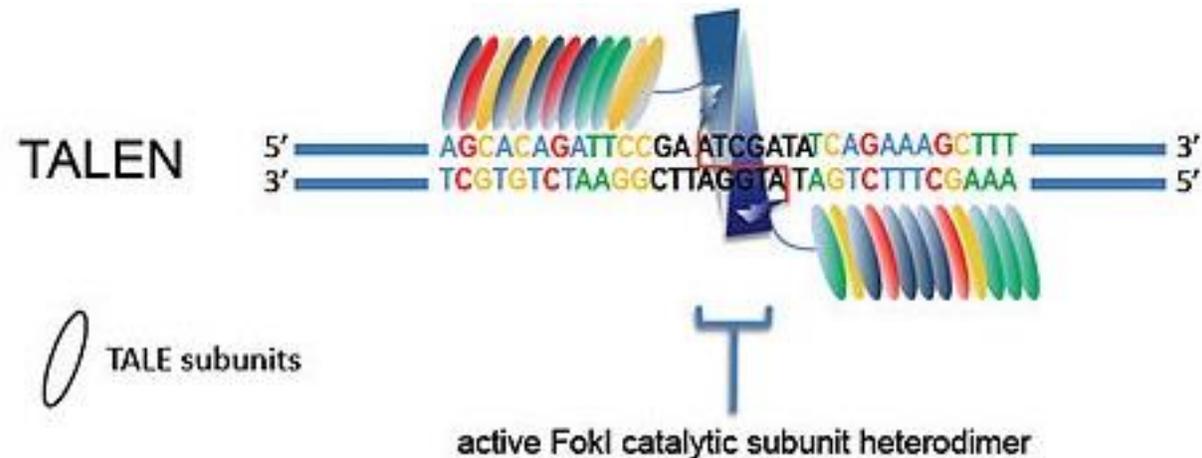


Bild: Genome editing, snippet, by Farzad Jamshidi, GNU Free Documentation License, Version 1.2 (CC BY-SA 3.0)
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/c/cd/Engineered_Nucleases.jpg

Herkömmliche Gentherapie

- Bei der klassischen Gentherapie kann nicht vorhergesagt werden, wo genau im Erbgut die Viren das neue Gen einfügen werden.
- Es kann passieren, dass der Einbau ein ansonsten stillgelegtes Krebs-Gen aktiviert oder ein Tumor-Supressor-Gen zerstört.
- Bei Immunschwäche-Patienten, die mittels Gentherapie behandelt worden waren, stieg aus diesem Grund das Leukämie-Risiko.

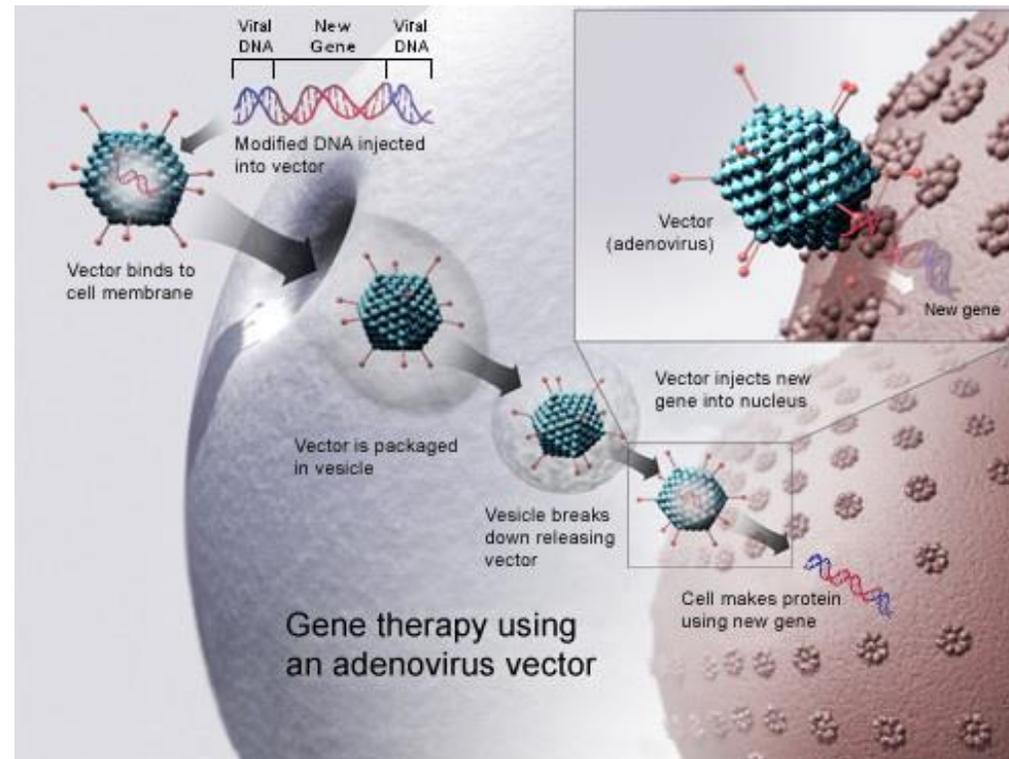


Bild: Gene therapy using an adenovirus vector; by the National Institutes of Health, public domain
https://de.wikipedia.org/wiki/Viraler_Vektor#/media/Datei:Gene_therapy.jpg

Vergleich Cas9 zu herkömmlicher Gentherapie

Vorteil von Cas9 im Vergleich zur herkömmlichen Gentherapie:

- Die guide RNA ermöglicht das präzise Einfügen von DNA an einem gewünschten Ort
- Die mutierten Gene werden repariert (bei der herkömmlichen Gentherapie bleiben die nicht-funktionellen Allele im Genom)

Probleme

- 1. Die Reparatur von Genen klappt nur in vergleichsweise wenigen Zellen.** Es reicht nicht, nur einen fehlerhaften Genabschnitt auszuschneiden. Die Zelle muss anschließend die beiden Enden des DNA-Strangs wieder korrekt ergänzen und zusammenfügen. Dieser Reparaturmechanismus läuft nur in sich teilenden Zellen ab. Die meisten Körperzellen wie Nerven-, Muskel-, Leber- oder Blutstammzellen teilen sich jedoch nicht mehr.
- 2. CRISPR/Cas9 findet zwar sein Ziel mit hoher Präzision, greift aber trotzdem in seltenen Fällen auch daneben.** Die Folge könnten DNA-Brüche an unerwünschter Stelle im Erbgut des PatientInnen mit unvorhersehbaren Folgen sein („**Off-target-Effekte**“).
- 3. CRISPR/Cas9 bleibt nach einer Gentherapie jahre- oder jahrzehntelang in den Zellen aktiv.** Dies erhöht die Gefahr, dass die Genschere außerplanmäßig aktiv wird. Auch wenn Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass dies selbst nach 20 Generationen keine offensichtlichen Auswirkungen hatte, wäre es sicherer, wenn CRISPR/Cas9 nur temporär aktiv wäre.

ENTDECKUNG UND GRUNDLAGEN VON CRISPR/CAS9

Emmanuelle Charpentier & Jennifer Doudna



Bild: Emmanuelle Charpentier, by Bianca Fioretti, Hallbauer & Fioretti
[CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/66/Emmanuelle_Charpentier.jpg

CRISPR /Cas9: An adaptive immune system in bacteria



Bild: Jennifer Doudna, by The Royal Society
[CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5d/Professor_Jennifer_Doudna_ForMemRS.jpg

A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.

Jinek M¹, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E.

Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/

CRISPR/Cas9:

Ein adaptives Immunsystem in Bakterien

CRISPR-DNA:

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

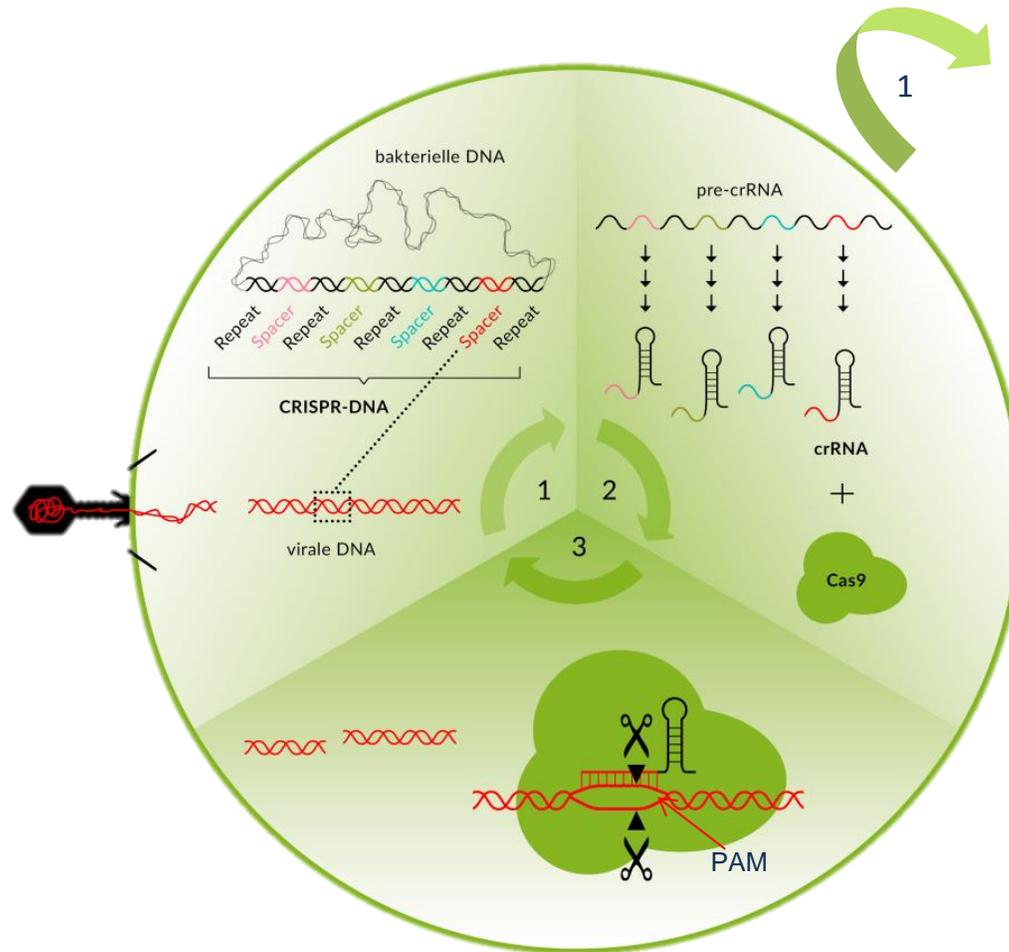
Cas-Gene:

- Gene von Bakterien, codieren für Cas-Enzyme, haben Schneidefunktion

CRISPR/Cas Komplex:

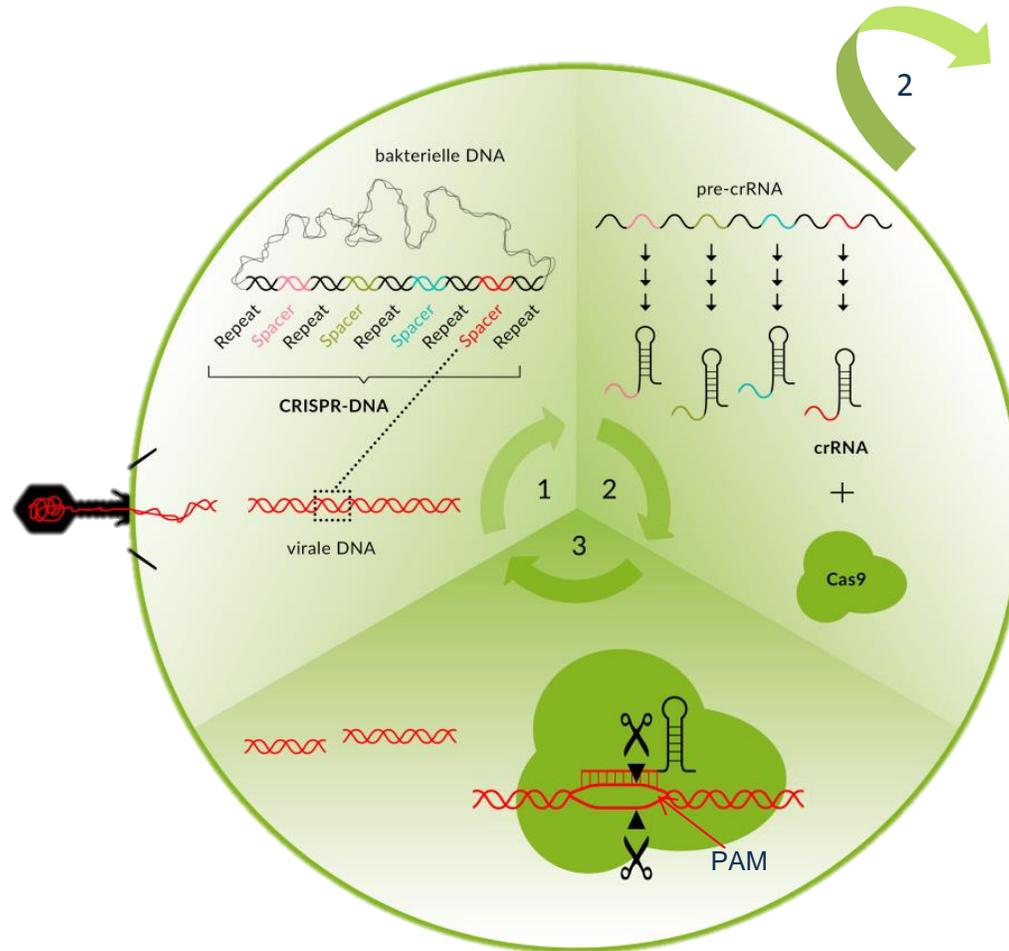
- crRNA Moleküle bringen das Cas-Enzym an die richtige Stelle, dort kann die Genscheere schneiden und die Fremd-DNA zerstören

Das bakterielle CRISPR/Cas9-System



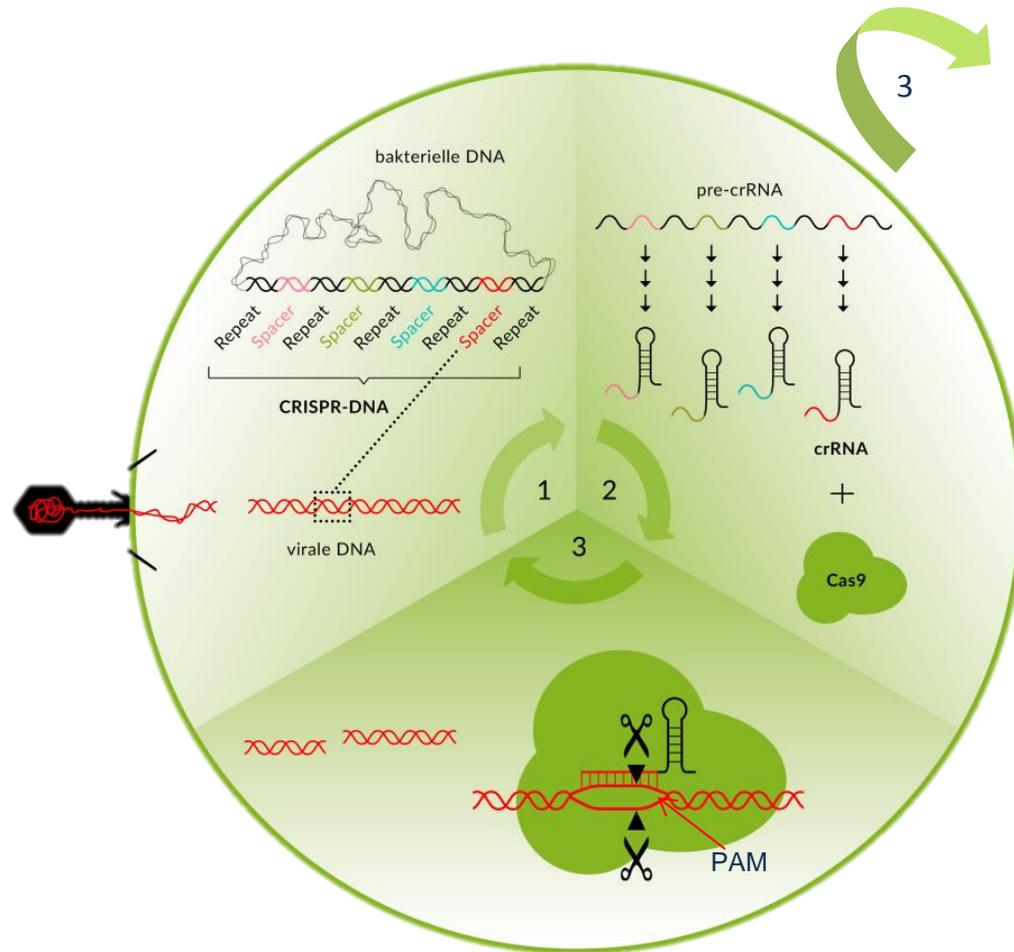
- Bei der Erstinfektion durch einen Virus (Bakteriophagen) -> Teil der Virus-DNA wird durch Cas-Komplex (Cas1 & 2) ausgeschnitten
- DNA (Spacer) wird in bakterieneigene CRISPR-DNA eingebaut, die aus DNA-Sequenz-Repeats besteht
- Bakterienzelle hat nun DNA-Bibliothek kurzer RNA-Moleküle -> können Cas9-Protein zu wiedereindringender Fremd DNA bringen

Das bakterielle CRISPR/Cas9-System



- Dringt wieder ein Virus (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/Cas9 Doppelstrangenschnitt

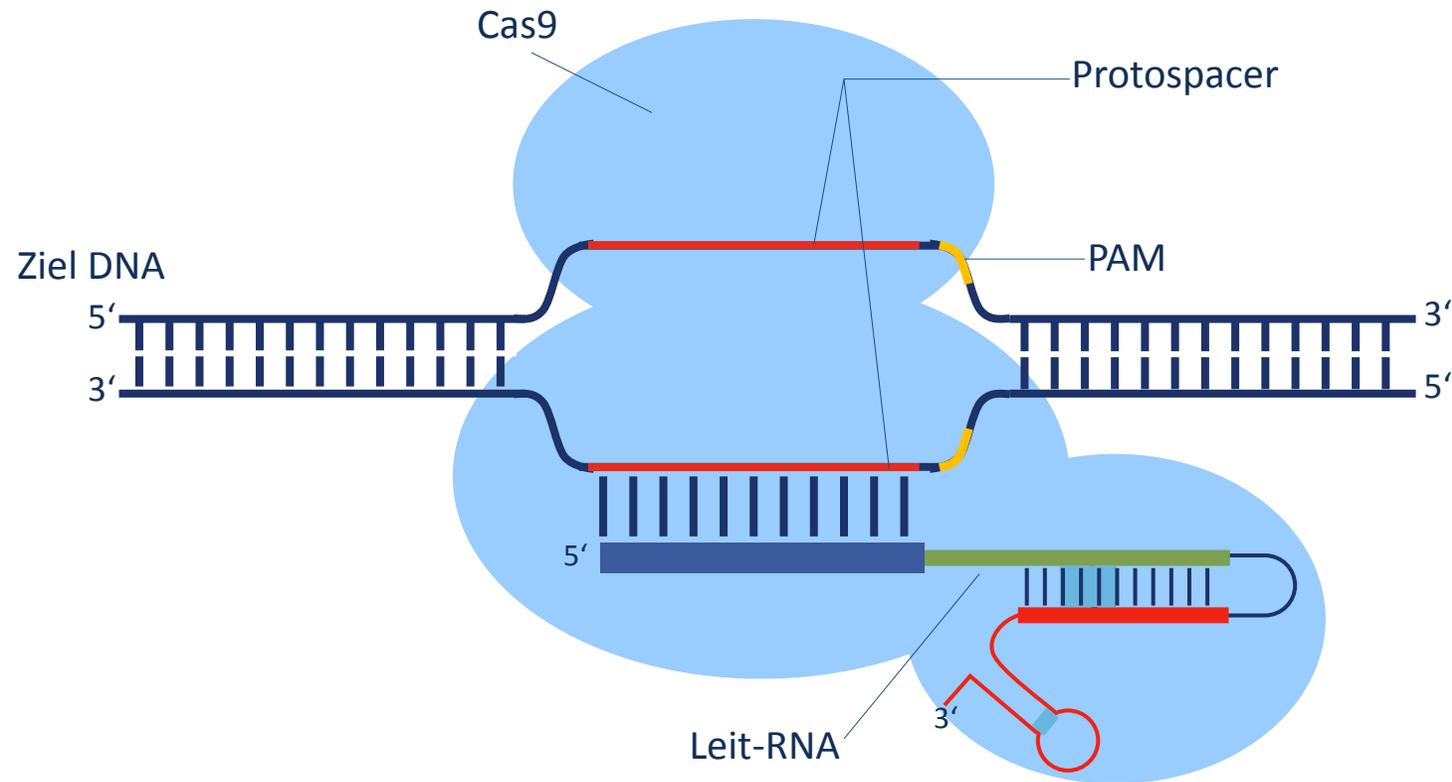
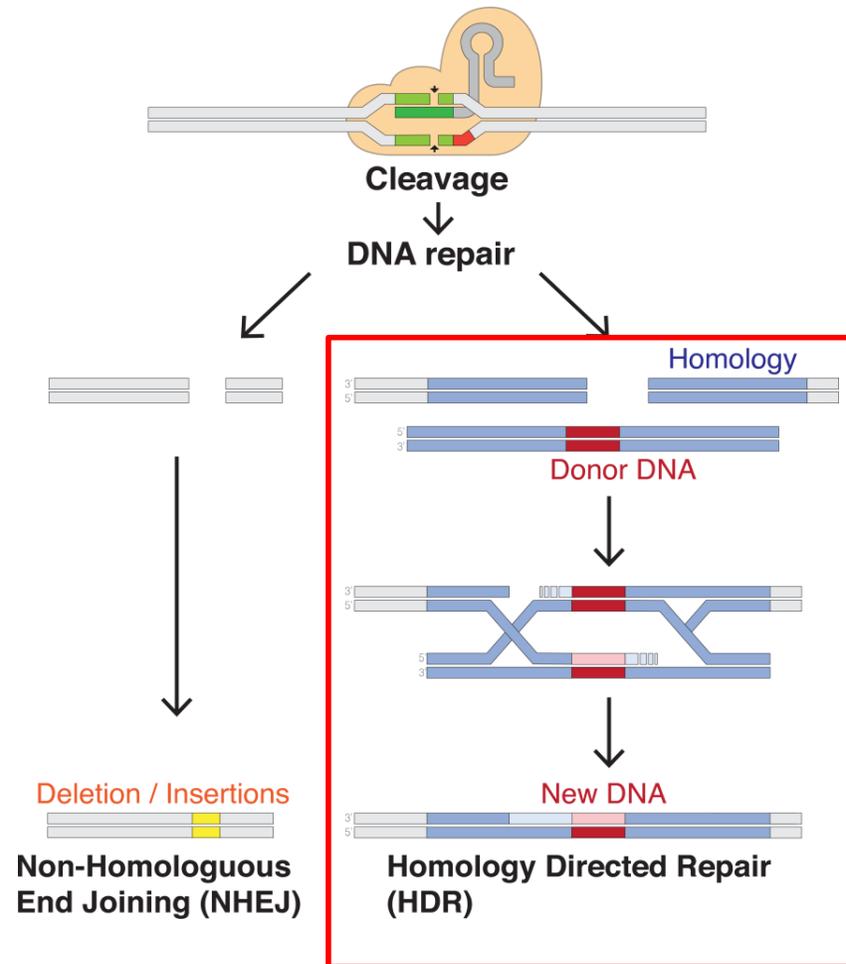


Bild: Vienna Open Lab (CC BY-SA 3.0 AT)

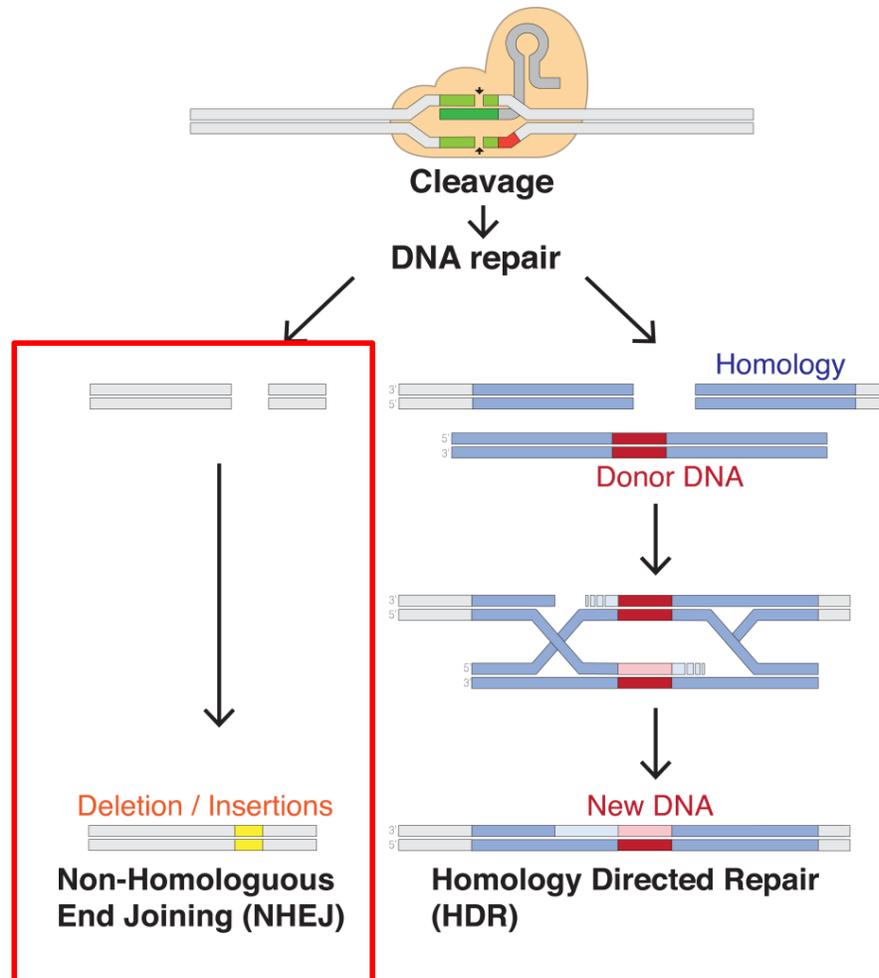
DNA-Reparatur und -Modifikation



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 Gens so zu verschieben, dass nicht-funktionelles Protein entsteht

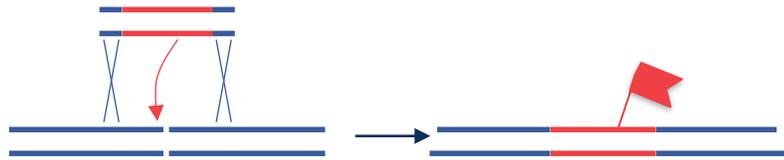
Bild: DNA Repair after CRISPR-Cas9 double strand break , by Mariuswalter (Own work) [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)], via Wikimedia Commons https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0c/DNA_Repair.png

Anwendungen von CRISPR/Cas9



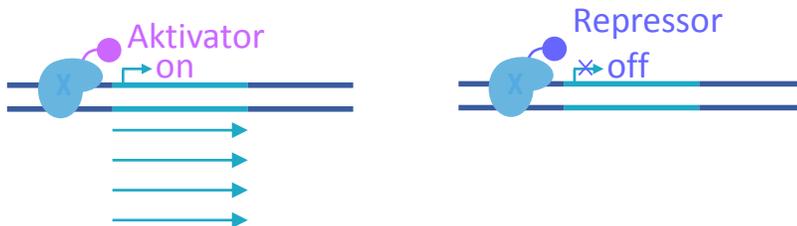
- **Gen gezielt ausschalten (Knock-out)**

Zielsequenz = Exon



- **Gen gezielt verändern, neue Sequenz einbringen (Knock-in)**

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 raumzeitliche Organisation analysiert werden soll

KONKRETE ANWENDUNGEN VON CRISPR/CAS9

Medizin/ Gentherapie

Sichelzellkrankheit

- Erbkrankheit, die rote Blutkörperchen betrifft.
- Hämoglobin (Proteinkomplex für Sauerstofftransport im Blut) ist defekt.
- Rote Blutzellen verformen sich von scheibenförmig zu sichelförmig.
- Blutzellen verklumpen und verstopfen Blutgefäße, Sauerstoffzufuhr zu Gewebe unterbrochen.
- Chronische Blutarmut (Anämie), Thrombose, Schlaganfall, Organversagen sind die Folge.
- PatientInnen haben große Schmerzen, geringe Lebenserwartung.

„CRISPR-Therapie bei Erkrankung des Blutes“

Es gibt bereits mehrere Ansätze, um die Sichelzellkrankheit mithilfe der CRISPR/Cas-Technologie zu heilen. Bei einer der Methoden werden Blutstammzellen von PatientInnen aus deren Knochenmark gewonnen. Mithilfe von CRISPR/Cas9 und einer korrekten DNA-Vorlage wird der fehlerhafte Baustein in der DNA korrigiert. Die defekten Stammzellen im Körper der Patientin/des Patienten werden durch Chemotherapie zerstört, und die korrigierten Stammzellen werden mittels Transfusion in den Blutkreislauf gebracht. Diese Methode konnte am Menschen bereits erfolgreich angewandt werden.

Medizin/ Genterapie

Muskeldystrophien

- Überbegriff für eine Gruppe chronischer Erkrankungen der Skelettmuskulatur.
- Es sind mehr als 30 verschiedene Formen mit unterschiedlichsten Schweregraden bekannt.
- Können schon bei der Geburt, in der Kindheit/Jugend oder erst im Erwachsenenalter auftreten.
- Bei PatientInnen kommt es zum Funktionsverlust der Muskulatur.
- Duchenne-Muskeldystrophie: Erbkrankheit, bei der das Muskelstrukturprotein Dystrophin betroffen ist.

“Muskelkraft dank CRISPR?“

Sowohl bei Mäusen als auch bei Hunden konnte der Defekt im Dystrophin-Gen bereits mit Hilfe von CRISPR/Cas9, das mithilfe eines Virus in die Tiere eingebracht wurde, korrigiert werden. Die Herausforderungen bestehen noch darin, die Immunantwort des Organismus gegen Cas9 zu unterdrücken und unspezifische und nicht gewollte Veränderungen (Off-Target-Effekte) des CRISPR/Cas9-Systems zu verringern. Derzeit gibt es noch keine Anwendung am Menschen.

Nutzpflanzen/ Biotechnologie

Kakaopflanze (*Theobroma cacao*)

- Wird oft von Pilzen, Viren oder Schädlingen befallen.
- Dadurch geht häufig mehr als ein Fünftel der Jahresernte verloren.
- Beispiel einer Pilzkrankheit: Black pod (Schwarzfäule).
- Die Kakaopflanze wird bei Befall unbrauchbar, Folge sind Existenzschwierigkeiten für Landwirte v.a. in Entwicklungsländern.
- Das Gen *TcNPR3* unterdrückt die Abwehrreaktion der Kakao-Pflanze.

CRISPR: “Schokolade auch in Zukunft“

In Blättern der Kakaopflanze konnte mithilfe von CRISPR/Cas das Gen *TcNPR3* ausgeschaltet werden. Die so veränderten Blätter waren deutlich resistenter gegen Krankheitserreger. CRISPR/Cas soll auch dabei helfen, den Kakaopflanzen Insektenresistenz zu verschaffen und ihnen die Anpassung an den Klimawandel zu erleichtern. Zurzeit wird die Modifikation von Kakaopflanzen erforscht und ist noch nicht in der Anwendung.

Nutzpflanzen/ Biotechnologie

Bräunungsreaktion von Obst und Gemüse

- Äpfel, Kartoffeln oder Pilze werden nach dem Aufschneiden durch Reaktion mit Luftsauerstoff braun.
- Dafür sind Polyphenole und das Enzym Polyphenoloxidase (PPO) verantwortlich.
- Diese sind normalerweise voneinander isoliert, kommen aber durch das Aufschneiden (Zerstören der Zellmembranen) in Kontakt.
- Reagieren mit Luftsauerstoff zu Chinon (gelb) und Melanin (braun).
- Es gibt bereits nicht-bräunende Apfelsorten wie Arctic® Apples, die mit anderen biotechnologischen Methoden (kleine RNA-Moleküle) hergestellt wurden. Sie bilden weniger PPO.

CRISPR: “Champignons, die nicht braun werden“

Beim Zuchtchampignon *Agaricus bisporus* wird CRISPR/Cas dafür eingesetzt, um die PPO-Gene dauerhaft zu zerstören. Dadurch werden Enzym- und damit die Bräunungsaktivität um 30 % reduziert. Im Gegensatz zu den Arctic® Apples ist der Anbau und Verkauf dieser Champignons in den USA nicht zulassungspflichtig. Nach der europäischen Gentechnik-Richtlinie wären sowohl die Arctic® Apples als auch diese Champignonart zulassungspflichtig.

Nutzpflanzen/ Biotechnologie

Bakterien für die Joghurtproduktion

- Die industrielle Produktion von Joghurt fällt unter den Begriff „Weiße Biotechnologie“. Kenntnisse aus der Biochemie werden also für industrielle Verfahren genutzt.
- Milch wird dabei durch Milchsäurebakterien eingedickt.
- Das Bakterium *Streptococcus thermophilus* fermentiert Laktose (Milchzucker) zu Milchsäure.
- Dies führt zur gallertartigen Textur und zum charakteristischen Geschmack von Joghurt.
- Joghurtbakterien können von sogenannten Bakteriophagen (bestimmte Viren) befallen werden; bringt Probleme für Joghurtindustrie

CRISPR: “Virenresistente Joghurtkulturen“

CRISPR/Cas ist selbst Teil eines bakteriellen Immunsystems, das die DNA von Bakteriophagen (kurz auch: Phagen) erkennen und zerschneiden kann. Doch nicht jeder Phage wird von allen Bakterien erkannt. ForscherInnen haben mithilfe des CRISPR-Systems phagenresistente Joghurt-Bakterien der Art *Streptococcus thermophilus* hergestellt, die eindringende Phagen effizient erkennen und ihre DNA zerstören.

Grundlagenforschung

Leuchtende Zellen

Um die Funktion bestimmter Zellen besser zu verstehen, werden in der Grundlagenforschung häufig Bestandteile lebender Zellen sichtbar gemacht.

ForscherInnen verwenden dafür unter anderem Fluoreszenzfarbstoffe, die unter speziellen Mikroskopen in einer definierten Farbe leuchten.

CRISPR: “CRISPR/Cas9-Fluoreszenzmarkierungen“

Mithilfe von CRISPR/Cas9 können relativ rasch fluoreszierende Proteine generiert werden: Die gRNA bringt Cas9 zum DNA-Abschnitt, der verändert werden soll. Cas9 schneidet den DNA-Doppelstrang, und durch homologe Rekombination (Reparaturmechanismus der Zelle) wird ein mitgeliefertes Fluoreszenzgen in die DNA eingebaut. In der Zelle wird ein fluoreszierendes (Fusions-)Protein gebildet. Für andere Anwendungen wird eine inaktivierte Form von Cas9 verwendet („death“ Cas9, dCas9), die mit GFP verbunden ist. Mithilfe des fluoreszierenden dCas9-GFP-Fusionsproteins und der gRNA kann so die Position eines Gens auf dem Chromosom (Genlokus) in der lebenden Zelle markiert werden.
zerstören.

Grundlagenforschung

Gene Drive

- Jeder Elternteil vererbt jeweils nur ein Chromosom eines Chromosomenpaares an seine Nachkommen (Mendel'sche Regeln).
- Ein bestimmtes Merkmal wird daher mit 50%iger Wahrscheinlichkeit an die Folgegeneration weitergegeben, und es dauert sehr lange, bis sich Genveränderungen in einer Population ausbreiten.
- Die Gene Drive-Technik ist ein „Turbo für die Vererbung“: Sie beschleunigt die Ausbreitung eines (manipulierten) Gens, indem sich dieses selbstständig auf das Schwesternchromosom kopiert.
- Eine bestimmte Genvariante wird so nahezu an 100 % aller Nachkommen weitergegeben, auch bei Selektionsnachteil, ermöglicht schnelle Verbreitung von Genen in gesamter Population oder Art.

CRISPR: “Gene Drive gegen Malaria“

CRISPR/Cas-Systeme werden für den Gene Drive veränderter Gene eingesetzt: Mit CRISPR/Cas werden Mutationen gemeinsam mit einem speziellen Kopiermechanismus in einen Organismus eingebracht und dadurch von Generation zu Generation an alle Nachkommen weitervererbt. So gibt es beispielsweise bereits Ansätze, Malariamücken so verändern, dass sie keine Malaria mehr übertragen. Das würde jedoch die ursprüngliche Art in kürzester Zeit verändern und könnte unvorhersehbare Auswirkungen auf das Ökosystem haben. Es ist daher wichtig, Gene Drive nur in gut gesicherten Laboren und Probeumgebungen zu untersuchen, um die Auswirkungen dieser Methode besser verstehen zu können.

Jedes Kind hat 60 bis 100
Mutationen,
welche die Eltern nicht haben.
(Fehlerrate bei der DNA
Replikation)

Chinesische Wissenschaftler verwenden CRISPR, um “Minipigs” herzustellen

https://padlet.com/desm61225/modified_micropigs

Editierung in der menschlichen Keimbahn

Designer Babys



Bild: Modifiziert von Pixabay, CCO



Bild: He Jiankui, by The He Lab [CC BY 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9a/He_Jiankui_%28cropped%29.jpg

Erster bekannter Fall von Genomeditierung in der menschlichen Keimbahn (Zwillinge Nana and Lulu) in China im November 2018, um HIV Resistenz zu bewirken (CCR5 Gen zerstört)

GENOM-EDITIERUNG: SOMATISCHEN ZELLEN VS. KEIMBAHN

Editierung des Erbguts in der Keimbahn?

- Manche ForscherInnen wollen fehlerhafte Gene in der Keimbahn – also in Ei-, Spermazellen, und Embryo – editieren und dadurch Erbkrankheiten bei Embryonen aus künstlicher Befruchtung verhindern.
- Solche Eingriffe sind jedoch aus ethischen Gründen umstritten.
- Viele Wissenschaftler lehnen sie ab, da sie das Erbgut künftiger Generationen dauerhaft verändern.

Keimbahnzellen versus somatische Zellen

Somatische Zellen

- Eine somatische Zelle ist eine Körperzelle, aus der keine Geschlechtszellen (Gameten) hervorgehen können.

Keimbahnzellen

- Aus Zellen der Keimbahn entstehen - beginnend mit der befruchteten Eizelle (Zygote) - im Laufe der Individualentwicklung eines Lebewesens seine Keimdrüsen und darin gebildete Keimzellen (Geschlechtszellen = Eizellen und Spermien).

Diese Unterscheidung von **Keimbahn** und **Soma** ist für Tiere und Menschen charakteristisch.

Was sind Stammzellen?

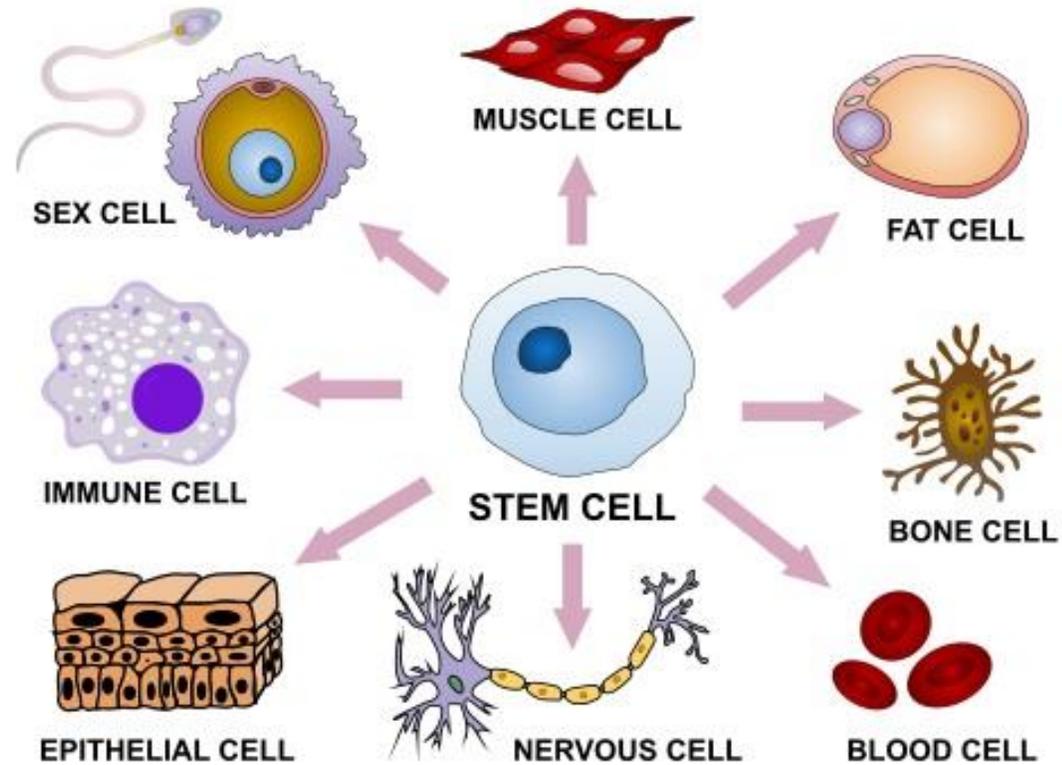


Bild: Stem cell differentiation into various tissue types, by Haileyfournier [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Final_stem_cell_differentiation_%281%29.svg

Stammzellen können sich vermehren und/oder differenzieren

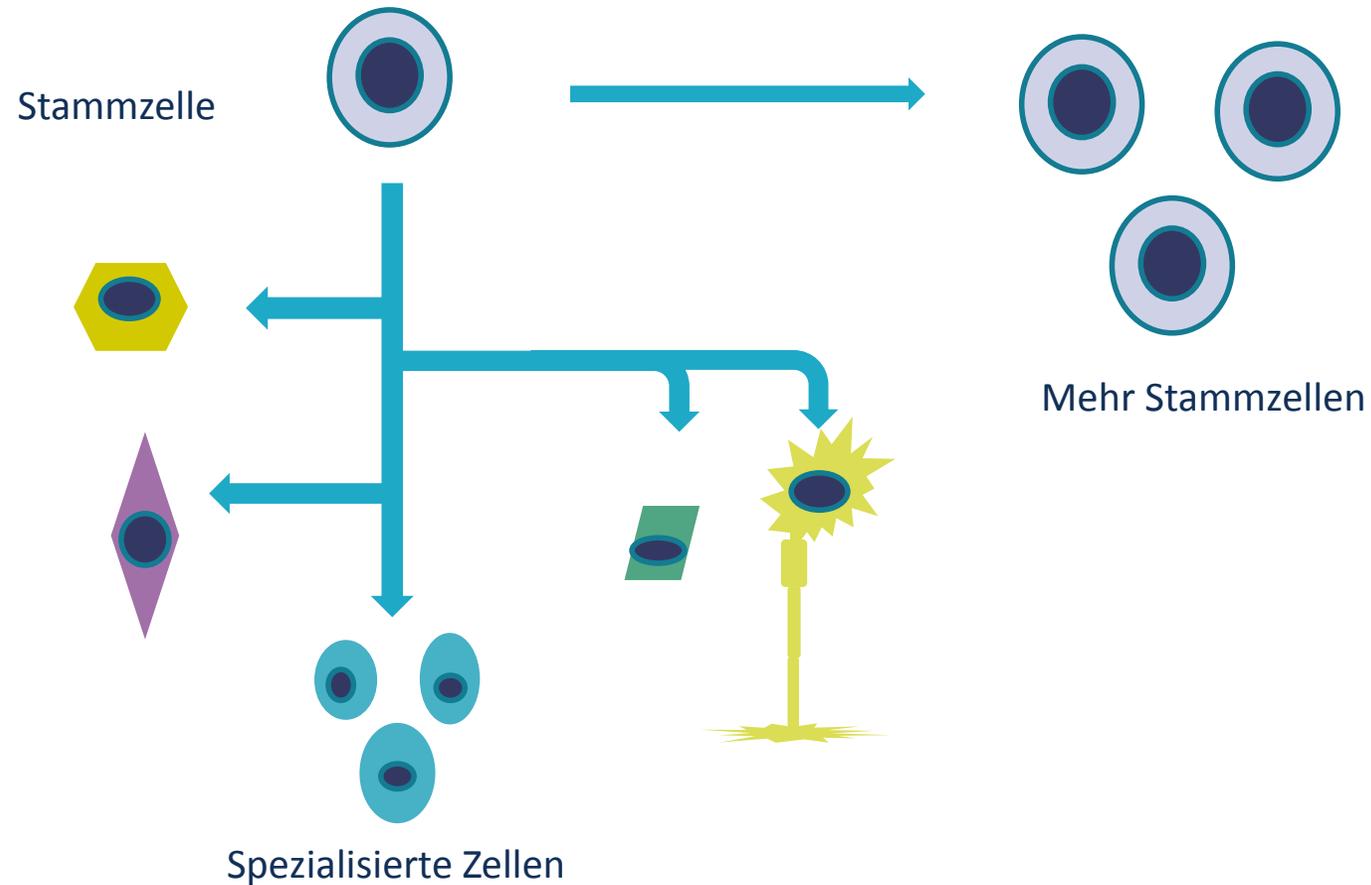


Bild: Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog (CC BY-SA 3.0 AT)

Was sind totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen?

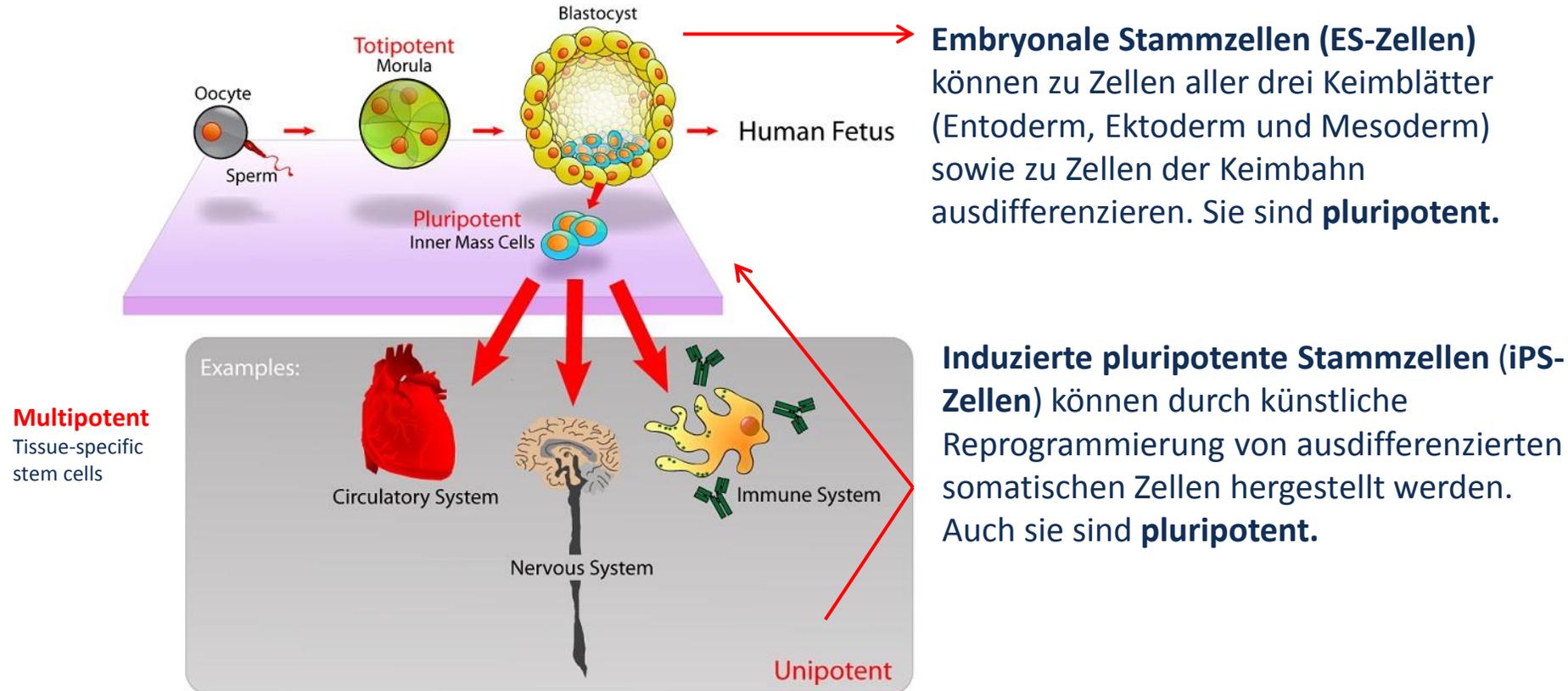


Bild: The source of pluripotent stems cells from developing embryos, by Mike Jones [CC BY-SA 2.5 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Stem_cells_diagram.png

Entwicklung des frühen Embryos

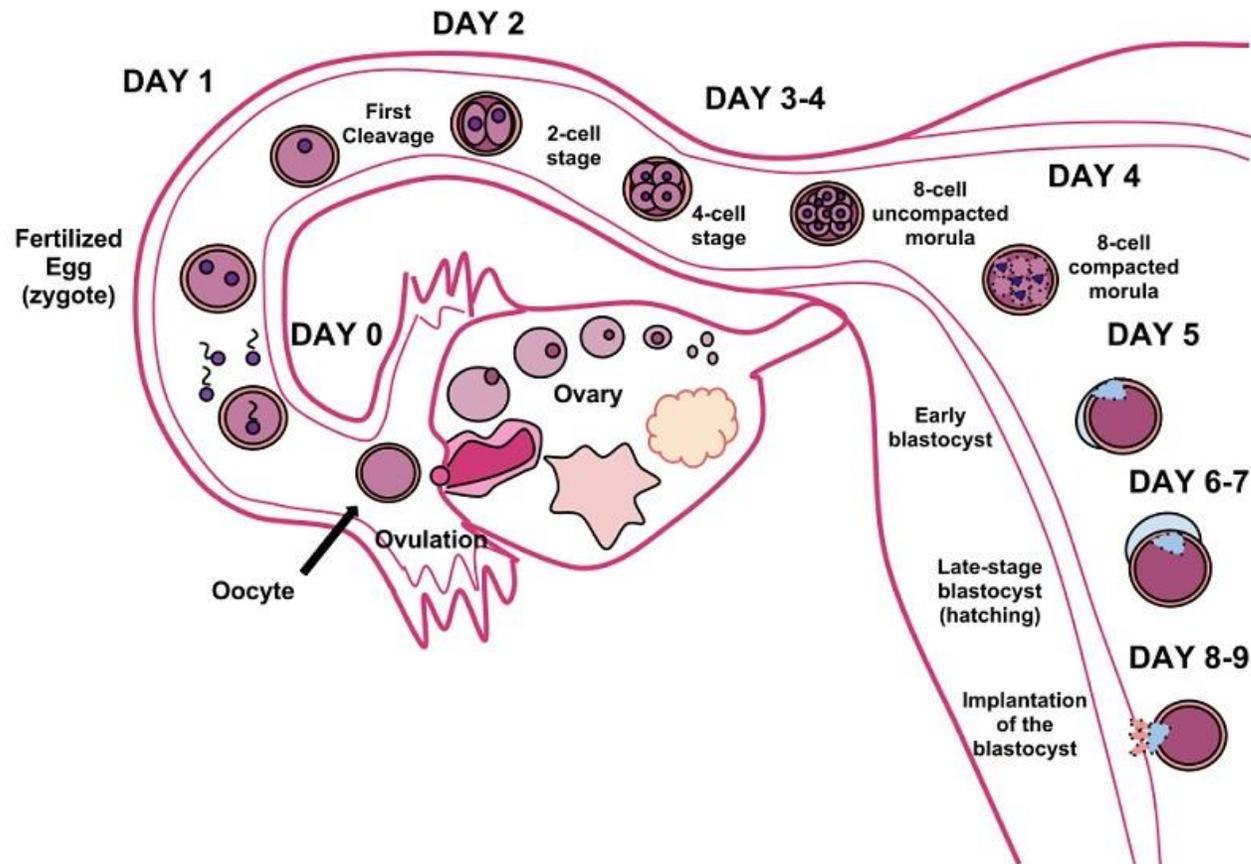


Bild: Human fertilization, by Ttrue12 [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5b/Human_Fertilization.png

Erste Schritte der Embryogenese

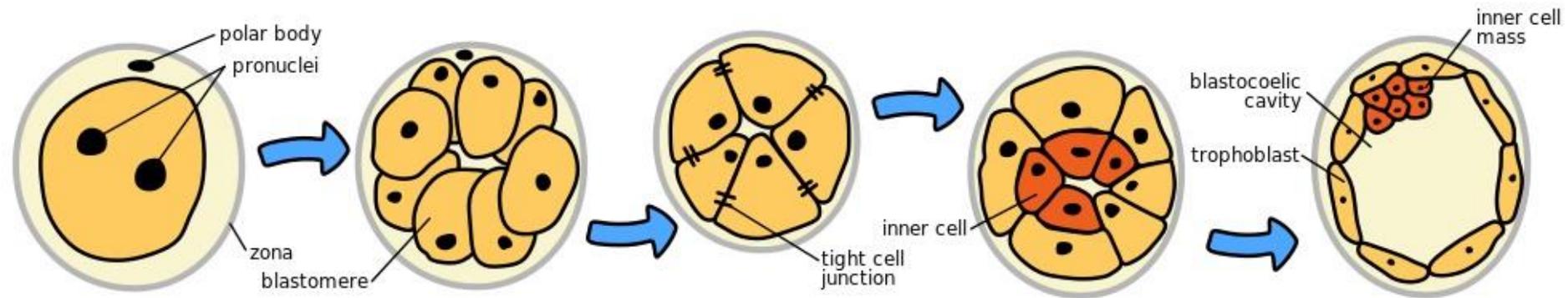
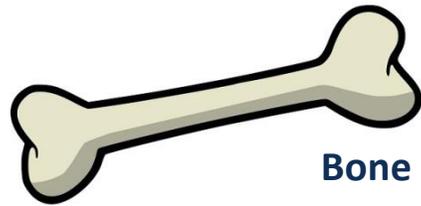


Bild: Adaptiert von The first few weeks of **embryogenesis in humans**, by Zephyris [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)]
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/06/HumanEmbryogenesis.svg>

Hämatopoese



Bone marrow

Bild: Pixabay, CCO

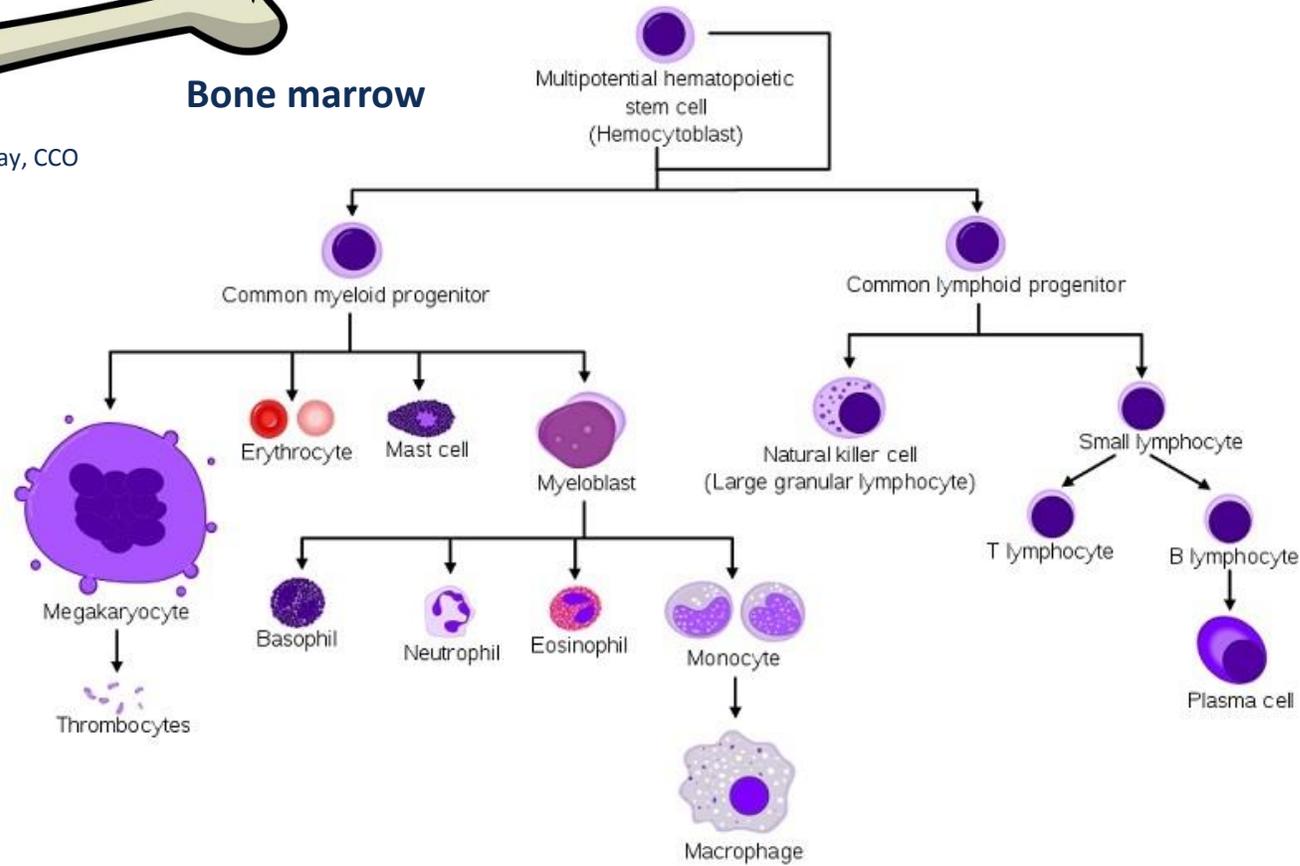
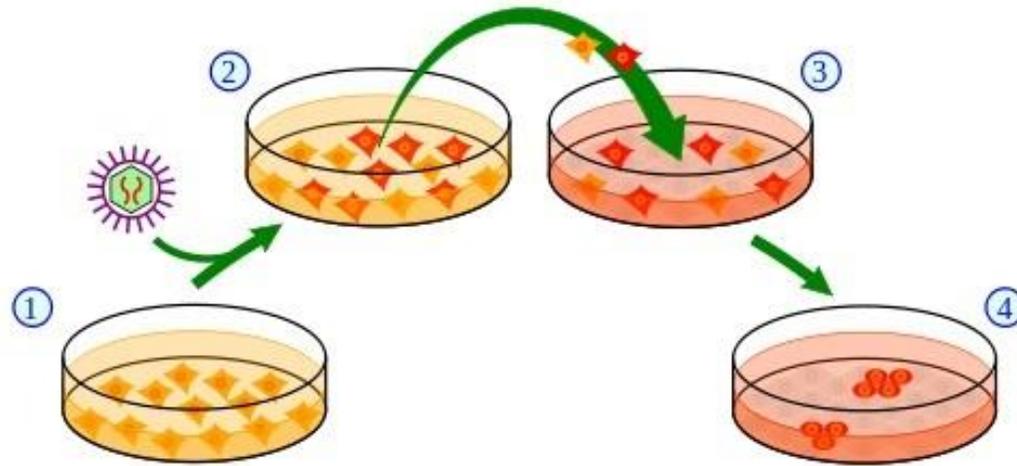


Bild: Simplified hematopoiesis, by Mikael Häggström and A. Rad [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Hematopoiesis_simple.svg

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)



1. Isolate and culture host cells. e.g. mouse embryonic fibroblasts and adult human dermal fibroblasts.
2. Introduce the ES specific genes (iPS factors) into the cells by using retrovirus vector. Red cells indicate the cells expressing the exogenous genes.
3. Harvest and culture the cells according to the method for ES cell culture using feeder cells (gray).
4. A subset of the cells generates ES-like colonies, that is, iPS cells.

Bild: A scheme of the generation of induced pluripotent stem (iPS) cells
by Y tambe [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/09/Induction_of_iPS_cells.svg

Mesoderm, Endoderm, Ektoderm

iPSC – induced pluripotent stem cells

- Induced pluripotent stem cells (iPSs or iPSCs) sind pluripotente Stammzellen, die direkt aus adulten Zellen hergestellt werden können.
- Es gibt vier spezifische Gene, die für Transkriptionsfaktoren codieren und die adulte Zellen in iPSs konvertieren können (“**Yamanaka`s Cocktail**”: Oct4, Sox2, Klf4 und Myc)
- Shinya Yamanaka and Sir John Gurdon bekamen 2006 den Nobelpreis für ihre Entdeckung, dass mature Zellen zu pluripotenten Zellen reprogrammiert werden können.

Therapien mit Stammzellen (iPSC)

Welche Krankheiten können heute schon mit Stammzellen behandelt werden?

Aktuelle Information dazu unter:

<https://www.eurostemcell.org/de/welche-krankheiten-koennen-mit-stammzellen-behandelt-werden>

Ex vivo Editing

- Bei der sogenannten "ex vivo" Genom Editierung werden dem Körper zunächst Stammzellen entnommen, und deren Erbgut wird verändert.
- Dies geschieht entweder über genetisch veränderte Viren, die in ihrem Genom die Gene für CRISPR-Cas9 besitzen und die diese Gene ins Erbgut der Stammzellen einbauen. Die modifizierten Zellen können sich dann im Körper vermehren.
- Alternativ werden die fertigen Moleküle des CRISPR-Cas-Systems in kleine Fetttröpfchen (Liposomen) verpackt, die von den Stammzellen aufgenommen werden.

Anwendungen

- **Tiermodell:** Im Mausmodell ist es bereits gelungen, die Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie (Phenylalanin-Hydroxylase Gen) zu heilen.
- **Im Menschen:** PatientInnen von Duchenne-Muskeldystrophie wiesen nach einer CRISPR-Cas9-Behandlung leicht erhöhte Werte eines Proteins auf, das bei dieser Krankheit wegen eines Gendefekts nicht gebildet werden kann.

ETHISCHE ASPEKTE

Ethische Reflexion

- Ethik ist zunächst einmal reflexive Distanznahme zu moralischen Einstellungen gegenüber Handlungen, Entscheidungen und sozialen Arrangements. Deshalb muss es darum gehen zu prüfen, worauf wir uns als Gesellschaft mit Verfahren der Präzisions-Genom-Editierung **einlassen oder eben nicht einlassen wollen**.
- Beurteilung und Abwägung von **Absichten, Chancen und Risiken**. Bei einer solchen Abwägung orientiert sich die Ethik zunächst an der sog. Technikfolgenabschätzung und fragt:
Wie hoch ist die Wahrscheinlichkeit und das Schadenspotenzial möglicher Fehler, unbeabsichtigter Freisetzung und im Gegenzug schnell und effektiv wirkender Gegenmaßnahmen einzuschätzen (sog. Biosafety-Problematik)?

Ethische Reflexion

- Die Werbebotschaft für CRISPR lautet: Das Verfahren ist proportional zu vergleichbaren Methoden **effektiv, effizient, leicht zu lernen**, einfach zu handhaben und **kostengünstig** – ein Versprechen, das nicht nur zum wohlmeinend-friedlichen Gebrauch einlädt!
- Entsprechende Wege, wie sie u.a. der Deutsche Ethikrat in seiner Biosicherheitsstellung-nahme von 2014 vorgeschlagen hat, sollten verstärkt angegangen werden: Wir müssen für die Wissenschaft an einer (neuen) Sicherheitskultur arbeiten, in deren Rahmen Aufklärung und Selbstverpflichtung der Wissenschaft, die Erarbeitung entsprechender Codes of Conduct und ggf. die Installierung von Kommissionen adressiert werden können.
- Gegenwärtig – und dies bedeutet mindestens für die nächsten fünf Jahre – sind die Risiken einer Keimbahnintervention als so hoch einzustufen, dass kein Kind mit einer solchen Veränderung zur Geburt gebracht werden darf. Die gewonnene Zeit sollte trotz der weltanschaulichen Differenzen genutzt werden, um darüber nachzudenken, ob ein solches **De-facto-Moratorium** zu vererbaren Genmanipulationen bei Menschen nicht noch verlängert werden muss.
- Den Einsatz dieser Technik grundsätzlich scheitern zu lassen, wäre jedenfalls unverantwortlich. Angesichts des enormen Potenzials gibt es eben auch nicht nur eine Schuld, wenn man gefährliche Dinge tut, sondern auch, wenn man angesichts drängender globaler Herausforderungen sinnvolle Lösungsansätze vorschnell unterlässt.

RECHTLICHE GRUNDLAGEN IN DER EU

Richtlinien der EU zu neueren Methoden der Gentechnik

Veränderungen durch CRISPR, bei denen keine fremd-DNA eingefügt wird (kein Transgen erzeugt wird), könnten auch auf natürliche Weise entstehen und sind nicht nachweisbar.

Müssen CRISPR-modifizierte Organismen dann überhaupt gesetzlich reguliert werden?

- **Urteil des Europäischen Gerichtshofs (EuGH) im Juli 2018:** Neuere Methoden der Gentechnik, die keine transgenen Organismen erzeugen, fallen trotzdem unter die bestehenden Gentechnik-Richtlinien, gelten rechtlich als gentechnisch verändert (GMO). Sie unterliegen strengsten Auflagen, müssen langwierige und teure Zulassungsverfahren durchlaufen und gekennzeichnet werden. In Österreich ist der Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen generell verboten. Anwendungen am Menschen (z.B. somatische Gentherapie) sind bewilligungspflichtig.
- **Ähnlich restriktiv wie die EU: Neuseeland.**
- **Weniger streng: Schweiz, Norwegen, USA** (CRISPR-Lebensmittel zum Verkauf zugelassen, geneditierte Pflanzen ohne Fremd-DNA von Gentechnikgesetz ausgenommen). Dilemma: In EU verboten, bei Importen jedoch nicht nachweisbar.

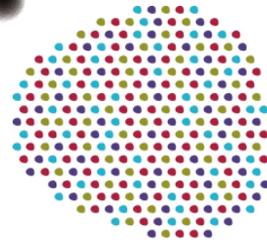
Richtlinien der EU zu neueren Methoden der Gentechnik

- **Kritik vieler ForscherInnen, Stellungnahme im Juli 2019:** Der Einsatz dieser neuen und wesentlich präziseren Zuchtmethoden zur Verbesserung von Kulturpflanzen muss vereinfacht werden, um nachhaltige Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion auch in Zeiten von Klimawandel und Bevölkerungswachstum sicherzustellen.
- **Stellungnahme der Österreichische Akademie der Wissenschaften zur Anwendung am Menschen:** (Stichwort Chinesische CRISPR-Babys, HIV-resistent): CRISPR-Editierung der Keimbahn als Gentherapie aktuell nicht vertretbar, Human Enhancements (Verbesserung des menschlichen Körpers) als Ziel von Genom-Editierung niemals vertretbar.

FRAGEN UND ANTWORTEN

Bitte tippen Sie jetzt Ihre Fragen an Renée Schroeder ein!

Sollten nach Ende des Webinars noch Fragen auftauchen, wenden Sie sich bitte an:
office@openscience.or.at oder an zahra.ayatollahi@univie.ac.at



**OPEN
SCIENCE**
Lebenswissenschaften im Dialog

www.mfpl.ac.at/rna-biology
www.openscience.or.at

WIR DANKEN
UNSEREM FÖRDERGEBER

FWF Der Wissenschaftsfonds.

...und unserer Sprecherin Renée Schroeder!