Aufgabenblatt zur „Genschere CRISPR/Cas“

Dieses Aufgabenblatt ist für den (vertiefenden) Biologie-Unterricht in der Sekundarstufe II gedacht.

* Nach dem Erarbeiten der Inhalte des Wissens-Artikels „Die Genschere CRISPR/Cas: Wohin führt der Weg?“ auf der Website von Open Science unter www.openscience.or.at/link/CRISPR-Cas-Wissen sollten die SchülerInnen in der Lage sein, die nachstehenden Fragen beantworten zu können.
* Die Fragen behandeln das Thema CRISPR/Cas sehr detailliert und eignen sich dafür, den SchülerInnen im Rahmen des vertiefenden Unterrichts bestimmte Aspekte des Themas näherzubringen bzw. sie diese eigenständig ausarbeiten zu lassen und so deren Recherche- und Quellenkompetenz zu festigen.

Für die Recherche können noch weitere Unterrichtsmaterialien von Open Science unterstützend herangezogen werden:

* Foliensatz „Die Genschere CRISPR/Cas9“ mit Begleittext und Literatursammlung

https://www.openscience.or.at/link/CRISPR-Cas-Materialien

* Webinar-Mitschnitt, RNA-Expertin Renée Schroeder „Genom-Editierung & die Genschere CRISPR/Cas“

<https://youtu.be/6mrfzx5m8EQ>

Foliensatz:

https://www.openscience.or.at/link/CRISPR-Cas-Webinar

* Interview mit RNA-Forscher Stefan Ameres

https://youtu.be/.....

# Fragen zu CRISPR/Cas, Antworten auf Seite 3ff

**Frage 1**: Wofür stehen die Abkürzungen CRISPR bzw. Cas9? Was wird damit bezeichnet?

**Frage 2:** Was versteht man unter Genomeditierung? Welche Möglichkeiten der Genomeditierung gab es, bevor CRISPR/Cas entdeckt wurde? Geben Sie einen kurzen Überblick.

**Frage 3**: Was sind die Nachteile der einzelnen Genomeditierungs-Werkzeuge der „Vor-CRISPR-Ära“?

**Frage 4**: Was macht CRISPR/Cas so viel besser als alle vorher dagewesenen Genomeditierungs-Verfahren?

**Frage 5**: CRISPR/Cas9 wurde bereits im Jahr 1987 erstmals erwähnt. Wer legte jedoch mit detaillierten *in vitro* Studien die entscheidenden Grundlagen für das CRISPR/Cas-System, und wann war das?

**Frage 6**: In welchen Organismen wurde CRISPR/Cas ursprünglich entdeckt? Welche Aufgabe hat dieses System?

**Frage 7**: Wie funktioniert das CRISPR/Cas-System im Detail?

**Frage 8**: Welche großen Anwendungsgebiete von CRISPR/Cas gibt es heute? Beschreiben Sie für jedes Anwendungsgebiet ein konkretes Beispiel, wie CRISPR/Cas bereits zum Einsatz kommt.

**Frage 9:** Wie ist die Handhabung von CRISPR/Cas in der EU gesetzlich geregelt? Zählen mit CRISPR/Cas editierte Organismen zu den GMOs (genetically modified organisms)? Warum gab es vor dem endgültigen Bescheid des EuGH im Jahr 2018 längere Diskussionen zur Gesetzgebung?

**Frage 10**: Nennen Sie die Unterschiede zwischen somatischer Gentherapie und Keimbahntherapie.

**Frage 11**: Erklären Sie, wie „Prime Editing“ und „CRISPR-Switch“ funktionieren.

# Antworten

**Frage 1**: **Wofür stehen die Abkürzungen CRISPR bzw. Cas9? Was wird damit bezeichnet?**

CRISPR steht für „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ und bezeichnet Regionen im Genom, in denen sich DNA-Sequenzen wiederholen.

Cas9 steht für „CRISPR associated protein 9“ und bezeichnet eine Nuklease – also ein Enzym, das doppelsträngige DNA schneidet.

**Frage 2: Was versteht man unter Genomeditierung? Welche Möglichkeiten der Genomeditierung gab es, bevor CRISPR/Cas entdeckt wurde? Geben Sie einen kurzen Überblick.**

Als Genomeditierung werden die zielgerichtete Veränderung von DNA und damit verbundene Techniken bezeichnet. Auch schon vor der Entdeckung von CRISPR/Cas war es möglich, gezielte Veränderungen von DNA vorzunehmen. Vor der Entdeckung von CRISPR/Cas wurden bereits folgende Methoden der Genomeditierung standardmäßig angewandt:

* Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen)
* Artifizielle Nukleasen: Meganukleasen, Zink-Finger-Nukleasen (ZFN), Transcription Activator-like Effektor Nucleases (TALENS)

**Frage 3**: **Was sind die Nachteile der einzelnen Genomeditierungs-Werkzeuge der „Vor-CRISPR-Ära?“?**

* Die Erkennungssequenzen von **Restriktionsenzymen** sind nur wenige Basenpaare lang und kommen mehrfach im Genom vor. Restriktionsendonukleasen würden das Genom somit in viele kleine Teile zerstückeln und sind daher für die Manipulation einer einzigen Region im Genom nicht geeignet.
* **Meganukleasen** sind relativ unspezifisch, und ihr Design ist sehr anspruchsvoll und zeitintensiv.

**ZFN** sind schon zielgerichteter als Meganukleasen, Nachteile sind großer Aufwand (mehrere Monate), schwieriges Design, hohe Kosten sowie Off-Target-Effekte (DNA wird auch unspezifisch geschnitten).

**TALENS** sind ebenfalls schon zielgerichteter, der Aufwand fürs Design schon geringer (wenige Wochen), insgesamt auch niedrigere Kosten. Design ist jedoch noch immer schwierig.

**Frage 4: Was macht CRISPR/Cas so viel besser als alle vorher dagewesenen Genomeditierungs-Verfahren?**

Die „molekulare Genschere“ erlaubt den präzisen, punktgenauen Eingriff in das Erbgut von praktisch jedem Organismus. Diese neue molekularbiologische Methode ist noch dazu leicht anwendbar, schnell und preiswert. Das erklärt, warum sie oft auch als größte Revolution der Molekularbiologie seit der Erfindung der PCR bezeichnet wird und allen vorangegangenen Genomeditierungs-Verfahren überlegen ist.

**Frage 5: CRISPR/Cas9 wurde bereits im Jahr 1987 erstmals erwähnt. Wer legte jedoch mit detaillierten *in vitro* Studien die entscheidenden Grundlagen für das CRISPR/Cas-System, und wann war das?**

Im Jahr 2012 legten die französische Forscherin Emmanuelle Charpentier und ihre amerikanische Kollegin Jennifer Doudna mit ihren detaillierten *in vitro* Studien die Grundlagen für das sogenannte CRISPR/Cas-System.

**Frage 6: In welchen Organismen wurde CRISPR/Cas ursprünglich entdeckt? Welche Aufgabe hat dieses System?**

CRISPR/Cas9 wurde ursprünglich als Teil des adaptiven Immunsystems von Bakterien entdeckt. Das CRISPR/Cas-System hat in Bakterien die Aufgabe, Viren abzuwehren.

**Frage 7: Wie funktioniert das CRISPR/Cas-System im Detail?**

Werden Bakterien von Viren (Bakteriophagen) befallen, so injizieren diese ihre Nukleinsäure ins Bakterium. Die Bakterien reagieren mit der Produktion von Cas9, das Stücke aus der viralen Nukleinsäure herausschneidet und an den CRISPR-Loci ins eigene (Bakterien-)Genom integriert. Bei erneuter Attacke der gleichen Viren werden die CRISPR-Loci, die nun auch die viralen DNA-Sequenzen enthalten, in kurze RNA-Moleküle (crRNA und trRNA) kopiert. Diese binden gemeinsam dann an Cas9. Die RNA-Enzym-Komplexe (crRNA-trRNA-Cas9) erkennen invasive virale Nukleinsäuren über ihre RNA-Bestandteile, die passende homologe Sequenzen in der Virus-DNA finden und das Cas9-Protein quasi dorthin lotsen. Cas9 bindet so an den entsprechenden DNA-Bereich und schneidet die Zielsequenz. Dies geschieht aber nur dann, wenn diese in Kombination mit einem sogenannten PAM-Motiv (Protospacer Adjacent Motif), einer 2-6 bp langen DNA-Sequenz, die unmittelbar der Cas9-Zielsequenz folgt, vorliegt. Das Virus wird so daran gehindert, sich im Wirtsbakterium zu vermehren. Da die CRISPR-Sequenzen des Bakteriums keine PAM-Motive enthalten, wird die bakterielle DNA nicht von Cas9 geschnitten.

**Frage 8**: **Welche großen Anwendungsgebiete von CRISPR/Cas gibt es heute? Beschreiben Sie für jedes Anwendungsgebiet ein konkretes Beispiel, wie CRISP/Cas bereits zum Einsatz kommt.**

Im Prinzip wird CRISPR/Cas heute für folgende große Bereiche eingesetzt: Medizin, Landwirtschaft & Biotechnologie und Grundlagenforschung.

* Beispiele Medizin: CRISPR-Therapie bei Erkrankungen des Blutes (Sichelzellenkrankheit, Beta-Thalassämie), CRISPR-Therapie bei Muskeldystrophie
* Beispiele Landwirtschaft & Biotechnologie: Krankheitsresistente Kakaopflanzen durch CRISPR/Cas, CRISPR/Cas gegen braunes Obst und Gemüse, Virenresistente Joghurtkulturen mit CRISPR/Cas
* Beispiel Grundlagenforschung: CRISPR/Cas-Fluoreszenzmarkierungen

**Frage 9: Wie ist die Handhabung von CRISPR/Cas in der EU gesetzlich geregelt? Zählen mit CRISPR editierte Organismen zu den GMOs (genetically modified organisms)? Warum gab es vor dem endgültigen Bescheid des EuGH im Jahr 2018 längere Diskussionen zur Gesetzgebung?**

Neue Methoden der Gentechnik, die keine transgenen Organismen erzeugen – und dazu zählt CRISPR/Cas – fallen in Europa unter die bestehenden Gentechnik-Richtlinien und gelten rechtlich als gentechnisch veränderte Organismen (GMO, genetically modified organisms). Sie unterliegen strengsten Auflagen, müssen langwierige und teure Zulassungsverfahren durchlaufen und gekennzeichnet werden. Vor dem endgültigen Bescheid gab es aus folgendem Grund zahlreiche Diskussionen: Veränderungen durch CRISPR/Cas, bei denen keine Fremd-DNA eingefügt wird (kein Transgen erzeugt wird), könnten auch auf natürliche Weise entstehen und sind nicht nachweisbar.

**Frage 10: Nennen Sie die Unterschiede zwischen somatischer Gentherapie und Keimbahntherapie.**

Bei der somatischen Gentherapie wird ins Genom von Körperzellen eingegriffen, um genetisch bedingte Erkrankungen zu lindern oder zu heilen. Die in der DNA eingefügten Veränderungen werden nicht an die Nachkommen vererbt und betreffen nur das behandelte Individuum selbst.

Bei der Keimbahn-Therapie werden Veränderungen an Keimbahnzellen, Keimzellen oder frühen Embryonen durchgeführt und auch an die Nachkommen weitergegeben.

**Frage 11: Erklären Sie, wie „Prime Editing“ und „CRISPR-Switch“ funktionieren.**

Prime Editing ermöglicht einen noch präziseren und flexibleren Eingriff ins Erbgut. Auch hier kommt eine RNA zum Auffinden der Ziel-DNA zum Einsatz, es wird dabei allerdings auch gleich die Vorlage für die gewünschte Veränderung mitgeschickt. Der DNA-Doppelstrang wird beim Prime Editing nicht durchtrennt. Stattdessen dient die RNA-Vorlage dazu, den bisherigen Abschnitt im Genom mittels Reverser Transkriptase – einem Enzym, das die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert – gegen die gewünschte Sequenz auszutauschen.

CRISPR-Switch hat der CRISPR/Cas-Technologie einen weiteren Feinschliff verpasst: Diese Methode erlaubt das gezielte An- und Ausschalten der Genschere. Dies wird dadurch erreicht, dass die Aktivität der guideRNAs unter die Kontrolle von Cre-Rekombinasen gebracht wird. Dadurch wird unter anderem ein Ausschalten von Genen in definierter zeitlicher Reihenfolge möglich, was gerade für die Untersuchung komplexer Krankheiten wichtig ist.

# Diskussionsfrage zum Thema „CRISPR/Cas“

**Die SchülerInnen sollen anhand folgender Fragestellung über das Thema „CRISPR/Cas“ diskutieren:**

„Stellen Sie sich vor, Sie hätten 1 Millionen Euro zur Verfügung, mit denen Sie Forschungsprojekte fördern könnten, in denen von der CRISPR/Cas-Technologie Gebrauch gemacht wird. Welche Projekte würden Sie mit diesem Geld finanzieren – Projekte im Bereich von Medizin, Landwirtschaft oder Grundlagenforschung – und warum? Was würden Sie nicht fördern und warum?“