

DIE GENSCHERE

CRISPR/Cas9

BEGLEITTEXT ZUM FOLIENSATZ

Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog

Stand: Dezember 2017

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



**OPEN
SCIENCE**
Lebenswissenschaften im Dialog

Inhalt

Einführung.....	3
Folie 4: Einführung und Begrifflichkeiten.....	3
Folie 5: Die Genschere CRISPR/Cas9.....	3
Entdeckung einer revolutionären methode.....	4
Folie 7: Die Entdeckung von CRISPR/Cas9.....	4
Folie 8: Die Entdeckung von CRISPR/Cas9	5
Folie 9: Das bakterielle Immunsystem CRISPR/Cas im Überblick	6
Folie 10: Das bakterielle CRISPR/Cas9-System	6
Folie 11: Das bakterielle Immunsystem CRISPR/Cas.....	7
Folie 12: Das bakterielle Immunsystem CRISPR/Cas.....	7
Folie 13: CRISPR/Cas-Systeme	7
Molekularbiologische Methodik	8
Folie 15: Was ist Genom-Editierung?.....	8
Folie 16: Werkzeuge der Genom-Editierung	9
Folie 17: Werkzeuge der Genom-Editierung.....	10
Folie 18: CRISPR Leit-RNA Design.....	10
Folie 19: CRISPR/Cas9-System.....	11
Folie 20 und 21: CRISPR/Cas9-Doppelstrangsnchnitt.....	11
Folie 22: DNA-Reparatur und -Modifikation	11
Folie 23: DNA-Reparatur und -Modifikation	12
Folie 24: CRISPR/Cas9 Modifikationen.....	12
Bestehende und zukünftige Einsatzbereiche.....	13
Folie 26: Grüne Gentechnik.....	13
Folie 27: Methoden der Pflanzenzucht.....	13
Folie 28 und Folie 29: Gene-Drive.....	14
Folie 30: Modellorganismen – Rekonstruktion von Krankheiten im Labor	15
Folie 31: Somatische Gentherapie.....	15
Folie 32: Keimbahntherapie (Gentherapie in Keimzellen)	16
Folie 33: Epigenetik.....	17
Rechtliche, ethische und gesellschaftliche Aspekte.....	18

Folie 34: Rechtliche, ethische und gesellschaftliche Aspekte	18
Folie 35: Rechtliche und regulatorische Aspekte.....	18
Folie 36: Ethische und gesellschaftliche Aspekte	19
Literatur	22
Bücher/Magazine.....	22
Onlineliteratur/Publikationen	22
Videos und Filme.....	23

EINFÜHRUNG

Folie 4: Einführung und Begrifflichkeiten

Was ist CRISPR/Cas9?

CRISPR/Cas9 ist eine molekularbiologische Methode zur Veränderung des Genoms, die in verschiedenen Bereichen der lebenswissenschaftlichen Forschung angewandt wird. Im weitesten Sinne fällt diese Technologie unter den Begriff der Gentechnik, da man damit Gene verändern kann. Sie wird als besonders präzise beschrieben, was bedeutet, dass Forscher sehr genau planen können, wo im Genom sie etwas verändern möchten. Gefunden wurde der Mechanismus in Bakterien. Sie wehren sich damit gegen Viren.

CRISPR steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*. Ausgesprochen als „krisper“.

Es handelt sich dabei um Abschnitte sich wiederholender DNA (Repeats) – dazwischen liegt Spacer-DNA oder Trenn-DNA. Diese Spacer-DNA ist Fremd-DNA die aus Bakteriophagen (Viren) oder Plasmiden herausgeschnitten wurde. Das CRISPR Gen ist also ein DNA-Bauplan für kurze RNA-Moleküle, die die Genschere zur Ziel-DNA bringen.

Cas-Proteine sind „CRISPR-associated proteins“ und werden als „kas“ ausgesprochen. Sie sind der Teil der Genschere, der die DNA entwindet und schneidet. Das Cas9-Enzym wird in der Forschung am meisten verwendet, es kann im CRISPR/Cas9-Komplex DNA-Doppelstränge schneiden.

Leit-RNA oder guide-RNA (gRNA) ist der Teil von CRISPR/Cas9, der im Labor designt wird und der das System zur Ziel-DNA führt. Sie besteht aus crRNA und tracrRNA, ausgesprochen als „krisper-RNA“ und „tracer-RNA“.

Folie 5: Die Genschere CRISPR/Cas9

Die schematische Darstellung zeigt die grundlegende Struktur von CRISPR/Cas9: Eine Leit-RNA wird von ForscherInnen designt. Der Spacer ist jener Bereich, der dann die Ziel-DNA binden soll. Hier werden etwa 20 Nukleotide genau auf die Zielsequenz hin designt. Das Cas9-Protein, das die Schneidefunktion ausübt, wird dann mit der Leit-RNA zum CRISPR/Cas9-Komplex verbunden. In weiterer Folge wird erklärt, warum das CRISPR/Cas9 System für die Forschung eingesetzt wird und welchen Nutzen die einzelnen Bestandteile des Systems, die man nun im Labor verwendet, ursprünglich hatten.

ENTDECKUNG EINER REVOLUTIONÄREN METHODE

CRISPR/Cas9 wird als Revolution in der Gentechnik bezeichnet und bekommt medial zurzeit großes Interesse zugesprochen, da es sich um eine schnelle, präzise und kostengünstige Methode handelt. Sie erlaubt es, die DNA jeder beliebigen pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Zelle zu verändern. Auch wenn CRISPR als etwas ganz Neues gilt, die Entdeckung startete bereits vor etwa 25 Jahren.

Folie 7: Die Entdeckung von CRISPR/Cas9

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

Francisco Mojica untersuchte ein Salz-tolerantes Bakterium und fand eine ungewöhnliche DNA Struktur: Multiple Kopien eines sich wiederholenden, palindromischen¹, 30-Basen-Sequenzabschnittes, welcher durch Spacer mit ca. 36 Basen getrennt wurde. Er nannte diesen Genabschnitt CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*.

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

Mojica forschte weiter an dieser ungewöhnlichen bakteriellen DNA Struktur und fand heraus, dass es sich dabei um einen Genort handelt, der Bakterien gegen Viren (Bakteriophagen) schützen müsse, denn: Die CRISPR-Spacer entsprachen genau Sequenzen unterschiedlicher Bakteriophagen DNA. Es war die Idee geboren, dass CRISPR eine DNA Bibliothek enthält, welche dem Bakterium hilft, Feinde sofort wiederzuerkennen und auszuschalten.

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

Noch war dies aber nur eine Vermutung, denn allein die Sequenzen von Phagen-DNA in einem Bakterium waren nicht Beweis genug, dass es sich um ein adaptives Immunsystem handelt. Forscher der Universität Quebec isolierten Bakterien mit Phagen-Resistenz und untersuchten die CRISPR-Sequenzen. Sie setzten Bakterien auch neue Spacer mit Sequenzen von Phagen-DNA in den CRISPR-Genort ein, was in einer erhöhten Resistenz dieser Bakterien gegen Phagen resultierte. So konnten sie das adaptive Immunsystem in Aktion beobachten.

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

An der Universität Wageningen (Niederlande) wurde das CRISPR-System von *E.coli* in ein modifiziertes *E.coli*-Bakterium eingesetzt, in dem dieses System ausgeknockt war. Dabei konnte nicht nur die Funktion von CRISPR analysiert werden, sondern auch einzeln untersucht werden, wie die Cas-Proteinkaskade in *E.coli* funktioniert.

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

Mit welchem Teil der Phagen nun CRISPR/Cas genau interagiert, wurde an der Universität Chicago erforscht. Es wurde bewiesen das CRISPR/Cas, ähnlich wie ein Restriktionsenzym, die DNA und nicht etwa RNA schneiden kann. Sie fanden heraus, dass *Staphylococcus epidermidis*, ein Bakterium, eine Spacer-Region aufweist, die mit einer Sequenz im

¹ vor- und rückwärtslaufend gleich aufgebaut

Plasmid eines antibiotikaresistenten *Staphylococcus* ident ist. Sie zeigten, dass diese Plasmide lediglich in *Staphylococcus epidermidis* transferiert werden können, wenn man die Antibiotikaresistenz am Plasmid– oder die CRISPR Sequenz im Bakteriengenom, ausschaltet. CRISPR muss also direkt mit DNA (in dem Fall Plasmid DNA) interagieren.

Folie 8: Die Entdeckung von CRISPR/Cas9

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

An der Universität von Quebec wurde gezeigt, dass die Nuklease Cas9 DNA dort schneidet, wo die crRNA die Ziel-DNA bindet. Sequenzierungen zeigten, dass Cas9 beide Stränge gerade abschneidet (blunt-end), und zwar genau 3 Nukleotide upstream (vorgelagert) der Cas9 Erkennungssequenz PAM (CRISPR/Cas9 Doppelstrangsschnitt – Folie 21).

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

Ein Teil der Erforschung der tracrRNA wurde durch Emanuelle Charpentier an der Universität Wien durchgeführt. Sie erforschte das Bakterium *Streptococcus pyogenes* durch Next Generation Sequencing, einer Methode die es erlaubt, viele Bakteriengenome parallel zu sequenzieren. Sie und ihr Team fanden dabei heraus, dass neben ribosomaler und transfer RNA die dritthäufigste RNA, eine unbekannte Art von RNA war. Das Team konnte zeigen, dass diese tracr-RNA zu den CRISPR-Repeats komplementär war und somit gemeinsam mit der crRNA zum CRISPR/Cas9 System gehörten. Später konnte man auch zeigen, dass die tracrRNA nicht nur crRNA modifizieren kann, sondern auch wichtig für die Cas9 Bindung doppelsträngiger DNA ist.

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

Um zu verstehen, ob das CRISPR/Cas9-System noch weitere Komponenten braucht, um zu funktionieren, wurde der CRISPR-Genlocus von einem Bakterium in ein anderes transfert. Auch so war es funktionell. Man konnte zeigen, dass alleine Cas9 und nicht der gesamte Cas Proteinkomplex, wie er als Variante in *E.coli* vorkommt, ausreicht, um mit cr- und tracer RNA DNA-Doppelstränge zu schneiden. Dies war ein wichtiger Meilenstein, denn nun wusste man, dass man das CRISPR/Cas-System wahrscheinlich in vielen verschiedenen Zellen bzw. Organismen einsetzen konnte.

2011 CRISPR Studien *in vitro* (Charpentier und Doudna et.al., Universität Wien, Universität Berkeley, Universität Umea, Universität Vilnius)

Die ersten Versuche in Zellkultur, die ebenfalls mit Beteiligung der Universität Wien durchgeführt wurden, zeigten, dass man das Cas9-Protein reprogrammieren kann, indem man die Spacer der CRISPR-Sequenz künstlich genauso designt, dass sie die komplementäre Sequenz der Zielsequenz im Genom einer bestimmten Zelle aufweisen und Cas9 damit dort schneiden kann. Außerdem zeigten die Wissenschaftler, dass die crRNA verkürzt und mit der tracrDNA zu einer guideRNA zusammengebaut werden kann, um die Komponenten weiter zu reduzieren. Dies war die Grundlage für einen Einsatz des CRISPR/Cas9 Systems *in vivo*.

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

In den 1980er Jahren wurde die Modifikation von Genen in Säugerzellen durch die Homologe Rekombination, einem zelleigenen DNA-Reparaturmechanismus, erzielt. Dieser Einbau von Fremd-DNA ist schwer zu steuern und ineffizient. Etwas verbessert wurde die Genom-Editierung durch synthetische Endo- und Meganukleasen, die durch Einführung von Doppelstrangsnitten die Häufigkeit der Homologen Rekombinationen und damit des Einbaus von Fremd-DNA ins Genom erhöhten (Werkzeuge der Genom-Editierung – Folie 16). Für kleine Deletionen konnte auch das sogenannte Non-Homologe Endjoining (NHEJ) verwendet werden, das einen häufigeren zellulären Mechanismus der DNA-Reparatur darstellt (DNA-Reparatur und -Modifikation – Folie 23). Später folgten Zinkfinger-nukleasen und TALENs, die auch heute noch eingesetzt werden, da sie sehr spezifisch, jedoch auch sehr aufwändig herzustellen sind (Werkzeuge der Genom-Editierung – Folie 17).

Bei CRISPR stellte sich die Frage, ob ein bakterielles System auch bei einem Säugergenom, das tausend Mal größer ist, und in einem anderen zellulären Umfeld arbeiten würde. Feng Zhang vom Broad Institut des MIT (Massachusetts Institute of Technology) schaffte es, das Genom von humanen embryonalen Nierenzellen mit CRISPR/Cas9 zu verändern. Er untersuchte verschiedene Cas-Proteine aus unterschiedlichen Bakterien und welche davon am besten für Säugerzellen geeignet sind. Sein Team fand heraus, dass Säugerzellen die crRNA anders verändern als Bakterien, weil ihnen die mikrobielle RNaseIII fehlt. Das mit diesem Wissen optimierte CRISPR/Cas9-System konnte nun in humanen und tierischen Zellen arbeiten und dort Insertionen oder Deletionen einführen, um ein Gen zu verändern oder auszuschalten (Non-Homologes Endjoining), als auch DNA-Stücke einzufügen (Homologe Rekombination). Dies kann es auch simultan an mehreren Genorten.

Folie 9: 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.

Die CRISPR-Repeats sind Abschnitte sich wiederholender palindromischer bakterieneigener DNA und zwischen 23 und 47 Basenpaare lang. Spacer sind Teile der Virus-DNA, die nach dem Schnitt des Cas-Komplexes zwischen die Repeats eingebaut werden. Sie sind zwischen 21 bis 72 Basenpaare lang und codieren für, also erzeugen, kurze crRNAs.

Die Cas-Gene sind Gene der Bakterien-DNA und codieren für Cas-Enzyme die Schneidefunktion (Endonukleasefunktion) haben.

Der CRISPR/Cas-Komplex bildet sich aus crRNA-Molekülen und Cas-Enzym. Die crRNA bringt das Enzym an die richtige Stelle, dort kann die Genschere schneiden und die Fremd-DNA zerstören.

Folie 10: Das bakterielle CRISPR/Cas9-System

Das CRISPR/Cas9-System ist das am intensivsten untersuchte Cas-System. Da das Cas9-Enzym DNA-Doppelstränge schneiden kann, wurde es bald für Forschungszwecke adaptiert. So kann man Veränderungen immer auf beiden Strängen der DNA herbeiführen. In *Streptococcus thermophilus* fungiert CRISPR/Cas9 als adaptives Immunsystem:

Bei der Erstinfektion durch einen Virus (Bakteriophagen), wird ein Teil der Virus-DNA durch den Cas-Komplex (Cas1 & 2) ausgeschnitten. Diese DNA (Spacer) wird dann in die bakterieneigenen CRISPR-DNA eingebaut, die aus Wiederholungen ähnlicher DNA-Sequenz (Repeats) besteht. CRISPR-Repeats (23-47 Basenpaare) sind *palindromisch*, also vor- und rückwärtslaufend gleich aufgebaut. Die Bakterienzelle hat nun eine DNA-Bibliothek kurzer RNA-Moleküle, die das Cas-9-Protein zu wiedereindringender Fremd-DNA bringen können.

Folie 11: Das bakterielle Immunsystem CRISPR/Cas

Dringt wiederum Fremd-DNA in das Bakterium ein, kann die DNA-Bibliothek (sogn. CRISPR-Array) zu pre-crRNA transkribiert werden. Die sogenannte tracrRNA spielt eine wichtige Rolle in der Reifung der pre-crRNA zu crRNA. Sie ist komplementär zur pre-crRNA, dadurch können diese einen Duplex formen, der dann von RNAase III gespalten wird. Es resultiert ein Hybrid aus tracrRNA und crRNA. Bildet dieser Hybrid schlussendlich einen Komplex mit dem Cas9-Protein, verändert sich Cas9 strukturell so, dass es DNA aufnehmen kann.

Folie 12: Das bakterielle Immunsystem CRISPR/Cas

An der Zielsequenz sucht die crRNA die Ziel-DNA nach komplementären Sequenzen ab, um sie über die Spacer-Sequenzen zu binden. Zur Bindung muss Cas9 außerdem die sogenannte PAM (Protospacer Adjacent Motif) Erkennungssequenz (NGG, wobei N beliebige Base) finden und binden. Die crRNA bindet an die Zielsequenz und die Cas9-DNA-Endonuklease schneidet die DNA.

Folie 13: CRISPR/Cas-Systeme

CRISPR/Cas9 ist nur eines von vielen Systemen, die man in Bakterien erforscht hat. Insgesamt gibt es 6 Arten von CRISPR-Systemen. Man unterscheidet prinzipiell Klasse 1 und Klasse 2 CRISPR/Cas-Systeme nach Art der Nuklease Cas. Die Klasse-1-Systeme enthalten einen Multi-Protein-Komplex als Nuklease, die Klasse-2-Systeme eine einzelne Nuklease, beispielsweise zählt hierzu Cas9. Cas 1 und Cas2 Proteine sind in fast allen Systemen enthalten und sind für die Integration der Spacer-DNA in den CRISPR-Genlocus verantwortlich.

Das CRISPR/Cas9 System (Klasse-2, Typ II) ist das einzige System, das Doppelstrangbrüche erzeugt. Andere Systeme werden für speziellere Anwendungen angewandt. Klasse-1, Typ I Systeme beispielsweise werden dazu verwendet, antimikrobiell gegen das Bakterium selbst zu wirken. Dafür werden Phagen genetisch so verändert, dass sie Strangbrüche an für das Bakterium wichtigen Stellen, initiieren. Da Bakterien keine guten DNA-Reparaturmechanismen haben, werden die Schäden nicht repariert, das Bakterium stirbt. Dies wird im Bereich von Infektionskrankheiten erforscht.

MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODIK

Folie 15: Was ist Genom-Editierung?

Unter Genom-Editierung versteht man verschiedene Techniken, die es ermöglichen, gezielt Erbgut zu verändern. Bei Mikroorganismen spricht man von weißer Gentechnik, bei Pflanzen von grüner Gentechnik, bei menschlichen Zellen von roter Gentechnik und bei Tieren spricht man von transgenen Tieren bzw. von gentechnisch veränderten Tierlinien (Knockouts). Oft werden gentechnisch veränderte Organismen als GMO`s (genetically modified organisms) und gentechnisch veränderte Pflanzen als GPO`s (genetically modified plants) bezeichnet. In deutscher Sprache spricht man oft auch allgemein von GVO, gentechnisch veränderten Organismen.

Synonyme für Genom-Editierung sind Genome Engineering, Gene Editing, Genom-Modifikation und Genom-Editing.

Ziel einer Genom-Editierung kann ein Knockout, also das Zerstören von einem Gen im Genom, oder ein Knockin, das Einfügen eines Gens ins Genom sein. Bei letzterem unterscheidet man zwischen cisgen, was bedeutet, dass das Gen von der gleichen Art ist, und transgen, wenn das Gen von einer anderen Art kommt. Außerdem können gezielt eine oder mehrere Basen im Genom verändert werden, die Auswirkung auf das Genprodukt haben.

Auch wenn CRISPR/Cas9 zu den neuesten Entdeckungen im Bereich der gezielten Genom-Modifikationsverfahren zählt, gibt es auch andere Verfahren, die im Laufe der vergangenen Jahren für die Veränderung von Mikroorganismen-, Tier-, oder Pflanzengenomen verwendet wurden: Meganukleasen, Zinkfinger-nukleasen und TALENs (Transkription Aktivator-like effector nucleases). RNAi, RNA Interferenz, eine Methode für den gezielten Gen-Knockdown, ist keine Genom-Editierung im klassischen Sinne, da sie Gene nur „ausschalten“ kann.

Das Prinzip der Genschere findet also nicht nur mit CRISPR/Cas9 Anwendung, sondern wurde bereits bei älteren Methoden eingesetzt: ein Enzym, das natürlich vorkommt, wird künstlich nachgebaut und kann eine bestimmte Stelle im Erbgut ansteuern, wo es schneidet. Man nennt diese Enzyme auch „Sequenz-spezifische Restriktionsnukleasen“. Es gibt einen Bereich („Domäne“) des Proteins, der die Erkennungssequenz enthält, was das zu suchende „Wort“ im Text des Erbguts darstellt. Ein anderer Bereich schneidet das DNA-Molekül an der Stelle mit dem „Suchwort“. Bei CRISPR/Cas9 führt kein Protein, sondern ein RNA-Leit-Molekül, die Nuklease zum Ziel.

Auf den folgenden Folien werden diese Verfahren näher beschrieben und der CRISPR-Mechanismus im Detail erklärt. Außerdem werden zwei DNA-Reparaturmechanismen näher erläutert, die essentiell sind, um den veränderten DNA-Doppelstrang wieder zu reparieren.

Folie 16: Werkzeuge der Genom-Editierung

Meganukleasen

Diese Endonukleasen können eine DNA-Sequenz von 14–40 Basenpaaren durch Protein–DNA Interaktionen erkennen, binden und die inneren („endo“) Phosphodiesterbindungen spalten. Ihre Spezifität der Ziel-DNA Bindung ist nicht besonders hoch und die Herstellung ist sehr zeitintensiv, da Erkennung und Bindung der DNA sowie die Nuklease-Aktivität in einer einzelnen Domäne verflochten sind. Es gibt Fusionsproteine von Meganukleasen mit TALE-Arrays (megaTALs), die ebenfalls für die Genom-Editierung bzw. zur Herstellung von Doppelstrangbrüchen eingesetzt werden können.

Zinkfingernukleasen und TALENs

ZFNs (Zinkfingernukleasen) und TALENs (Transcription Activator-like Effector Nucleases) sind beides Fusionsproteine mit DNA-Bindedomäne und unspezifisch schneidender Nukleasedomäne – dem Restriktionsenzym FokI. Nach dem Schnitt reparieren DNA-Reparaturmechanismen die DNA (DNA Reparatur und Modifikation – Folie 22, 23). Sie wurden bereits eingesetzt, um Gene in verschiedenen Organismen wie Viren, Bakterien, Nematoden, Fröschen, Pflanzen, Insekten und Säugetieren wie Mäusen, Ratten, Schweinen sowie kultivierten Vögeln und Säugerzellen zu verändern.

Zinkfingerdomänen sind eine der häufigsten DNA-Bindemotive in Säugerproteinen, sie können so modifiziert werden, dass sie eine große Bandbreite an DNA-Sequenzen erkennen. Zinkfinger sind schleifenförmige, von Zinkatomen im Zentrum zusammengehaltene Eiweißstrukturen. Das Ende passt in die Rille des DNA-Doppelstranges, dort bindet es Basenpaaren. Ein einzelner Zinkfinger bindet je drei Basen, bei etwa 3-6 Fingern, werden also etwa 9-18 Basenpaare gebunden. Das hybridisierte FokI-Restriktionsenzym kann dann an Ort und Stelle Doppelstrangbrüche einführen. ZNFs sind die kleinsten aller Genschere. Normalerweise aktivieren zwei ZNF-Monomere die FokI-Nuklease, wenn aber nur ein Monomer die Ziel-DNA bindet, kann FokI oft auch binden und unspezifisch schneiden. Dadurch kommt es bei ZNFs des Öfferns zu Off-target Effekten, was bedeutet, dass die DNA an einer ungewünschten Stelle geschnitten wird. ZNFs weisen eine schlechte Dichte der Zielsequenzen auf, was dazu führt, dass die Methode wenig effizient ist. Durch künstliche Modifikation der FokI-Nuklease kann jedoch die Spezifität der ZNFs erhöht werden.

Die TALE-Domäne wurde in einem gramnegativen Bakterium entdeckt. Auch bei TALENs ist die DNA-Bindedomäne mit der FokI-Nuklease fusioniert. Die TALE-Domäne besteht aus Wiederholungen (Repeats) von etwa 33-35 Aminosäuren, von denen jede ein spezifisches Basenpaar in der großen Furche der Ziel-DNA erkennt. Die Spezifität der Bindung jeder dieser Repeats ist durch zwei Aminosäuren an Position 12 und 13 bestimmt. Im Gegensatz zu anderen Methoden kann man TALENs so designen, dass fast jede Zielsequenz anvisiert werden kann, beispielsweise auch small-DNAs wie miRNA-codierende Sequenzen.

Diese Klassen von Genom-Editierungs-Nukleasen basieren auf einer Protein-DNA-Interaktion. Die Fusionsproteine sollen eine hohe Aktivität und eine niedrige Zelltoxizität aufweisen. Dies ist (vor allem bei ZNFs) oft schwer zu erzielen, dadurch sind sehr aufwändig herzustellen, was den großen Nachteil dieser Methoden darstellt.

Folie 17: Werkzeuge der Genom-Editierung

CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 fällt unter die Methode der „RNA-guided engineered nucleases“. Eine guide- RNA besteht aus einer tracrRNA und einer crRNA und bringt die Nuklease zur Zielsequenz, wo sie Doppelstrangbrüche einführen kann. Im Gegensatz zu ZFNs und TALENs entwindet Cas9 die Ziel-DNA vor dem Schneiden.

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

Die „älteren“ Verfahren sind wesentlich aufwändiger herzustellen und dadurch zeit- und kostenintensiver. Die Leit-RNA von CRISPR enthält nur 20 Nukleotide, was in der Herstellung mittlerweile nur noch etwa einen Tag dauert. Das Cas9-Protein muss nicht spezifisch designiert werden. TALENs sind ähnlich spezifisch wie CRISPR-Systeme, jedoch weniger effizient. Die Herstellung von TALENs dauert etwa 3-5 Tage, die von Zinkfingernukleasen einige Wochen. Die Herstellung eines CRISPR Systems kostet etwa 20 Euro, TALENs 40-80 Euro und Zinkfingernukleasen 200 Euro. CRISPR/Cas9 kann im Gegensatz zu den älteren Verfahren mehrere Stellen im Erbgut gleichzeitig schneiden („Multiplexing“). Außerdem sinken die Herstellungskosten, dadurch, dass CRISPR/Cas-Systeme immer häufiger eingesetzt werden, laufend.

Folie 18: CRISPR Leit-RNA Design

Das CRISPR/Cas9-System besteht aus einer Leit-RNA (single guide-RNA) und dem Cas9-Protein. Die Leit-DNA besteht neben der Spacer-Region bzw. crRNA aus der tracrRNA (trans activating crRNA). Die crRNA ist der variable Teil der Leit-RNA, er wird auf die Zielsequenz hin designiert und besteht aus circa 20 Nukleotiden. Des Weiteren beinhaltet die Leit-RNA einen Teil, der aus den zwischen CRISPR-Sequenzen lokalisierten Repeats besteht. Die tracrRNA ist wie im Bakterium für die Prozessierung der pre-crRNA zuständig und bewirkt im Komplex mit crRNA, dass das Cas9 DNA aufnehmen kann. Die genetische Information zur Expression der Leit-RNA und des Cas9 Proteins werden mittels Plasmid in die Zielzelle eingebracht.

Folie 19: CRISPR/Cas9-System

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Einbringung eines Plasmids in die Zielzelle (Transfektion). Die häufigste ist die Elektroporation, bei der die Zellmembranen durch elektrische Impulse durchlässig gemacht werden. Wichtig bei der Einbringung des CRISPR/Cas9-Systems in die Zielzellen ist das Verhältnis von DNA bzw. Protein und RNA zu den Zellen. Nach der Expression wird Leit-RNA (crRNA und tracrRNA) zum CRISPR/Cas9-Komplex verbunden.

Folie 20 und 21: CRISPR/Cas9-Doppelstrangsschnitt

Die Leit-RNA führt den CRISPR/Cas9-Komplex zur Ziel-DNA. Zur Bindung wird die Ziel-DNA in das strukturell durch die crRNA/tracrRNA Hybrid-Bindung veränderte Cas9 aufgenommen und die DNA solange abgesucht, bis die Zielsequenz gefunden wurde. Zur Bindung muss Cas9 außerdem die sogenannte PAM (Protospacer Adjacent Motif) Erkennungssequenz (NGG, wobei N beliebige Base) finden und binden. Die crRNA bindet dann an die Zielsequenz und die Cas9-DNA-Endonuklease entwindet und schneidet den DNA-Doppelstrang. Der Schnitt wird drei Basenpaare vor (upstream) dem PAM-Erkennungsmotiv durchgeführt.

Anschließend versucht die Zelle, die entstandenen DNA-Schäden durch zelleigene DNA-Reparaturmechanismen zu korrigieren.

Folie 22: DNA-Reparatur und -Modifikation

Es gibt zwei Formen von DNA-Doppelstrang Reparatur, die für CRISPR-basierte Genom-Editierung vornehmlich ausgenutzt werden.

Die Homologe Rekombination (HR, oder engl. HDR „homology directed repair“) kommt vor allem in post-mitotischen Zellen, also Zellen die sich nicht mehr teilen, wie Muskel-, Nerven-, oder Skelettzellen, vor. Es ist eine Form der genetischen Rekombination, bei der Teile zwischen homologen DNA-Sequenzen ausgetauscht werden. Bei Eukaryoten findet sie in der ersten Prophase der Meiose statt, im Falle höherer Organismen bei männlichen Individuen während der Spermatogenese und bei weiblichen Individuen während der Oogenese. Nach einem Doppelstrangbruch nähern sich zwei homologe Chromosomen, die nach vorangegangener Replikation aus je zwei Schwester-Chromatiden (aus einem DNA-Doppelstrang) bestehen, an, und tauschen DNA-Material aus. Wird nun von CRISPR-Cas9 ein Doppelstrangbruch initiiert und zusätzlich eine DNA-Sequenz für eine einzubauendes Gen mitgeliefert, kann dieses anstatt der Chromatide als Vorlage für die Rekombination dienen und damit einen neuen DNA-Abschnitt einführen. Die neue DNA-Sequenz oder Donor-DNA, kann mit dem CRISPR/Cas9-Plasmid mitgeliefert werden. Homologe Rekombination wird also bei der Genom-Editierung vor allem dafür ausgenutzt, neue Geninsertionen einzuführen.

Folie 23: DNA-Reparatur und -Modifikation

Das Non-homologe Endjoining (NHEJ) ist eine wesentlich ungenauere Methode der DNA-Rekombination, die aber in allen Zellen vorkommt. Dadurch, dass das NHEJ so ungenau arbeitet, werden oft Basen deletiert (gelöscht) oder kleine Insertionen eingeführt. Das kann bewusst für die Genom-Editierung ausgenutzt werden. Möchte man beispielsweise ein schädliches Protein verändern, kann man durch NHEJ, durch sogenanntes Exon-Skipping, den Leseraster auf der DNA ändern, sodass ein unvollständiges oder falsches Protein entsteht, das dann seine Wirkung nicht mehr entfalten kann.

Folie 24: CRISPR/Cas9 Modifikationen

CRISPR/Cas9 wird in der Forschung eingesetzt, um folgende DNA-Modifikationen zu generieren:

Ein Knockout durch NHEJ bewirkt ein gezieltes ausschalten eines Gen- oder Genabschnittes (Exon) mit bestimmter Funktion. Einen Knockin, also Neueinbau eines Gens, wird durch Homologe Rekombination (engl. HDR) erreicht, wenn man zusätzlich zum CRISPR/Cas9-System eine Donor-DNA mit dem gewünschten Gen als Reparaturvorlage mitliefert.

CRISPR/Cas9 kann aber auch eingesetzt werden, ohne dass Cas9 schneidet. Die Endonuklease von Cas9 kann inaktiviert werden („death-Cas9 oder dCas9“) und das CRISPR/Cas9 System damit die Transkription bestimmter Gene erhöhen oder unterdrücken. Dafür muss man Cas9 mit einem Transkriptionsaktivator oder -repressor („Unterdrücker“) verbinden und CRISPR/Cas9 nutzen, damit Aktivator/Repressor zur richtigen Zielsequenz (Promotorregion) geleitet wird.

Ebenso ermöglicht CRISPR/Cas9 die Visualisierung und damit Lokalisierung von DNA-Abschnitten durch Fluoreszenzmarkierungen. Dafür wird die Leit-RNA so designt, dass die Zielsequenz jenem DNA-Abschnitt entspricht, dessen raum-zeitliche Organisation analysiert werden soll. CRISPR/Cas9 kann dort dann Gene, die für Fluoreszenzfarbstoffe wie GFP (Green Fluorescent Protein) codieren, einbauen. Wichtig dabei ist, dass die Funktion des zu analysierenden Gens durch die CRISPR/Cas9-Modifikation nicht beeinträchtigt wird.

BESTEHENDE UND ZUKÜNFTIGE EINSATZBEREICHE

CRISPR/Cas9 wird bereits in vielen Bereichen der lebenswissenschaftlichen Forschung eingesetzt, weil es kostengünstiger als herkömmliche Methoden und einfach herzustellen ist, außerdem ist es sehr präzise im Vergleich zu anderen Methoden der Genom-Editierung (vgl. Werkzeuge der Genom-Editierung – Folie 17). Nachfolgend werden einige Forschungs- und Anwendungsbereiche vorgestellt.

Folie 26: Grüne Gentechnik

Grüne Gentechnik bezeichnet die Veränderung des Erbgutes von Pflanzen, damit sie widerstandsfähiger gegen Schädlinge oder Klimabedingungen werden. Man verwendet dafür nun CRISPR/Cas9, da die Methode Gene in Pflanzen einbringen kann und dies so exakt passiert, dass die Organismen weiter „naturidentisch“ sind. Es werden dabei also keine neuen längeren Gensequenzen oder artfremdes DNA-Material eingebracht.

Bereits geforscht wurde an: weißem Zucht-Champignon, der langsamer braun wird; ertragreicherem Wachsmais; allergenfreien Erdnüsse oder Mais für Biosprit.

Die CRISPR/Cas9 Methode wird die Pflanzenzucht revolutionieren. Veränderungen im Pflanzensaatgut sind der Methode schneller umsetzbar und günstiger. Noch ist die rechtliche Regelung in der EU fraglich – bewertet man den Herstellungsprozess (genveränderter Organismus) oder das Produkt (naturidentischer, nicht genveränderter Organismus)? (Rechtliche Aspekte und regulatorische Aspekte– Folie 35)

Folie 27: Methoden der Pflanzenzucht

Die Folie zeigt am fiktiven Beispiel der Tomate verschiedene Möglichkeiten der Pflanzenzucht.

Konventionelle Züchtung funktioniert über geschlechtliche Kreuzung, Mutagenese und Zellkulturtechniken.

Die Kreuzungszucht basiert auf einer Hybridisierung zwischen Empfänger- und Spenderlinie. Die Nachfahren müssen dann auf die gewünschte Eigenschaft hin selektiert werden. Um ungewünschte Eigenschaften der Spenderlinie (Stern-Symbol) zu entfernen, bedient man sich dem sehr aufwändigen Verfahren der Rückkreuzung mit der Empfängerlinie.

Durch Chemikalien oder Strahlung behandelte Pflanzensamen werden einer zunächst zufälligen Mutagenese ausgesetzt, d.h. man weiß nach Behandlung nicht gleich, welche DNA-Sequenzen verändert wurde. Es folgt eine ebenfalls sehr aufwändige Auslese der gewünschten Eigenschaften. Nur ein sehr kleiner Teil der Mutanten ist für die Weiterzucht geeignet, die meisten Mutationen führen zu Defekten und machen den Pflanzensamen unbrauchbar. Die mutierten Pflanzen müssen ebenfalls zurückgekreuzt werden, um die positive Eigenschaft zu überführen.

Bei der Protoplastenfusion werden Zellen von der gleichen Spezies fusioniert, um neue Hybride zu formen. So werden Eigenschaften beider Spezies vereint. Genetische Modifikationen können mit artfremdem oder artgleichem genetischen Material durchgeführt werden. Transgene Pflanzen haben mittels Plasmiden artfremde DNA erhalten und eingebaut. Cisgene Pflanzen wurden mit einem natürlichen Gen transformiert, welches auch durch Kreuzung erhalten

hätte werden können. Bei der Genom-Editierung wird DNA mittels CRISPR/Cas9 oder anderer Genscheren direkt inseriert, entfernt oder ersetzt, hier ist keine Selbstbestäubung mehr möglich (Kreuz-Symbol).

Folie 28 und Folie 29: Gene-Drive

Neben dem Einsatz in der Agrarwirtschaft wird daran geforscht, CRISPR/Cas9 an Lebewesen in der freien Wildbahn einzusetzen, die beispielsweise gefährliche Krankheiten übertragen. Gene-Drive ist eine Technik, bei der man ein manipuliertes Gen rasch in einer ganzen Population durchsetzen kann. Normalerweise brauchen Genveränderungen im Organismus sehr lange, bis sie sich in einer Population ausgebreitet haben, da die Mutation meist nur auf einem Chromosom lokalisiert ist. Auch hängt die Vererbungsgeschwindigkeit von der sogenannten Generationszeit ab, also jener Zeitdauer, in der sich die Zahl der Individuen einer Population von Lebewesen verdoppelt. Bei Menschen sind das etwa 25 Jahre, bei einem Bakterium zwischen 15 und 60 Minuten. Bei Gene-Drive verwendet man einen „Turbo“ für die Vererbung eines veränderten Gens. Die auf einem Gen eingeführte Mutation kopiert sich selbstständig auf das Schwesterchromosom, sodass von Generation zu Generation alle Nachkommen diese Mutation erben. Die neuen Gene werden also mit größerer Wahrscheinlichkeit an Nachkommen weitergegeben als üblich. Damit können genetische Veränderungen innerhalb weniger Generationen in einer Population oder einer ganzen Art vorhanden sein.

Im Detail funktioniert dies folgendermaßen: Die genetischen Informationen für Cas9 und guide-RNA werden stabil ins Erbgut integriert. Dies geschieht, indem man die genetischen Informationen mit DNA-Sequenzen flankiert, die homolog zum Gen sind, das man ausschalten will. Die homologen DNA-Sequenzen dienen als Vorlage für den DNA-Reparaturmechanismus, um den induzierten DNA-Bruch zu reparieren (Homologe Rekombination – vgl. DNA-Reparatur und Modifikation – Folie 22). Ein stabil ins Erbgut integriertes Endonuklease-Gen kann immer wieder schneiden. Es entsteht eine Art Kettenreaktion, da alle Kopien eines Gens verändert werden. Dies führt dazu, dass ein heterozygotes Merkmal homozygot wird, was gemäß den Mendel'schen Regeln nicht vorkommt. Dies passiert in der Natur unkontrolliert und selten – im Labor wird es ausgenutzt, um schnell neue Eigenschaften in einen Organismus einzuführen. Rekombinante Gene-Drive Systeme können des Weiteren sogenannte Cargo-Gene enthalten, die den Gene-Drive unterstützen oder davon unabhängige Eigenschaften besitzen.

Bei folgenden Tieren oder Pflanzen werden bereits Genveränderungen mittels Gene-Drive eingeführt:

- Drosophila, Hefe oder Rundwürmer als wichtige Modellorganismen: mittels Gene-Drive kann man schnell Mutationen (auch unbekannte) erforschen bzw. Krankheitsmodelle erstellen; wird lediglich im Bereich der Grundlagenforschung eingesetzt
- Stechmücken zur potentiellen Bekämpfung von Malaria, Dengue oder Zika, werden vor allem in Amerika erforscht – bekannter Forscher George Church; mögliche Anwendung gegen Infektionskrankheiten

Es ist fraglich, wie sich das Ökosystem verändern würde, wenn Gene-Drive veränderte Tiere tatsächlich aus dem Labor entlassen werden würden. Medien sprechen von einer künstlichen „Steuerung der Evolution“. Befürworter meinen, die Natur sei per se in keinem Gleichgewicht, sodass auch eine vom Menschen veränderte Tierart keine großen Auswirkungen haben würde. Gene-Drive ist nur an Tieren durchführbar, Keimbahnveränderungen mit Gene-Drive am Menschen sind nicht möglich, da die Generationszeiten zu lang sind (Ethische und gesellschaftliche Fragen-Folie 36).

Folie 30: Modellorganismen – Rekonstruktion von Krankheiten im Labor

In Modellorganismen wird im Labor nachgestellt, wie Krankheiten entstehen, verlaufen, behandelt bzw. vorgebeugt werden können:

In der Grundlagenforschung werden bakterielle, pflanzliche und tierische Modellorganismen dazu verwendet, Pathologien des menschlichen Organismus (bei dem eine genauere Erforschung zellulärer Mechanismen nicht möglich ist) nachzustellen. Wichtige Organismen sind hierbei die Ackerschmalwand (*Arabidopsis*), diverse Bakterienstämme, Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Zebrafische (*Danio rerio*), Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) und Mäuse. Diese Modellorganismen zeichnen sich in der Regel durch eine kurze Generationszeit sowie eine kostengünstige und unkomplizierte Haltung aus. Sie sind in vielfältiger Hinsicht sehr gut dokumentiert (genetische Informationen, Proteine, Wechselwirkungen, zelluläre Pathways, ...) und weisen andere Besonderheiten auf, die sich für die genetische Forschung eignen (wie beispielweise wenige Chromosomen, wie es bei *Drosophila* der Fall ist).

Das Einfügen von genetischen Veränderungen, beispielweise um eine Krebsmauslinie zu erhalten, ist oft eine langwierige Aufgabe, da die Veränderung in die Keimbahn eingebracht und stabil weitervererbt werden muss. Bis dato wurden dafür Vektoren („Genfähren“) mit Fremd-DNA verwendet, die dann ins Genom des Organismus integriert wurden – und dies mehr oder weniger zufällig. Mit CRISPR/Cas-Systemen werden neue Gene in die Zelle eingebracht oder ausgeschaltet. Die Herstellung von RNA ist einfach und günstig, CRISPR/Cas Systeme arbeiten spezifisch und effizient und damit sind die Modellorganismus-Linien in der Grundlagenforschung mittlerweile wesentlich rascher und günstiger herzustellen. Außerdem kann man mittels CRISPR/Cas9 auch mehrere Stellen im Genom, beispielweise einer Maus, verändern und so komplexe Gen-Kombinationen effizienter erzeugen – denn oft hat eine Erkrankung mehrere genetische Ursachen. Modellorganismen werden auch erzeugt, um auf genetischer Ebene zu simulieren, wie ein Wirkstoff, der beispielweise ein Gen/Genprodukt blockiert, wirkt.

Erkrankungen die bereits mit CRISPR/Cas9 generierten Modellorganismen erforscht werden sind beispielweise Akute Myeloische Leukämie, Alzheimer, oder Herz-Kreislauferkrankungen. Meist handelt es sich hierbei um Erkrankungen, von denen man bereits ein sehr gutes genetisches Profil hat und sehr genau weiß, wie DNA Veränderungen zur Erkrankung führen.

Folie 31: Somatische Gentherapie

Im Gegensatz zu Keimbahnmutationen werden somatische Mutationen im Laufe des Lebens durch diverse Umwelteinflüsse (Chemikalien/ Mutagene der Umwelt, energiereiche Strahlungsarten) erzeugt. Sie treten in Zellen außerhalb der Keimbahn (Somazellen) auf und werden nach Zellteilung auf die Tochterzellen derselben Zelllinie übertragen. Oft handelt es sich bei einer somatischen Mutation um eine Punktmutation.

Bei der somatischen Gentherapie wird ein Gen, das zu einer Krankheit führt, repariert oder ausgetauscht. Am besten eignen sich dafür Stammzellen, wie beispielweise Blutstammzellen oder andere Zellen wie Immunzellen, die sich noch häufiger teilen können. Je nach Erkrankung kann die Therapie *ex vivo* oder *in vivo* erfolgen. *Ex vivo* bedeutet, dass dem eigenen Körper Zellen entnommen und im Labor „repariert“ und vermehrt werden. Dann werden die gesunden

Zellen wieder in den Körper eingebracht. Bei *in vivo* Therapien versucht man CRISPR/Cas9-Systeme direkt in die Körperzellen einzuschleusen.

Bei *ex vivo* Therapien konnte man bereits Erfolge erzielen. Beispielsweise kann man hierbei auch Zellen eines Spenders verwenden. Dennoch müssen die reparierten Zellen wieder an den Zielort zurück und dort präsenter sein als die mutierten Zellen. Daher ist die Herausforderung neben der genauen Reparatur auch, genug Zellen wieder ins Gewebe einzubringen. Gut funktioniert dies bei Blutkrebserkrankungen (Hämophilie A, Sichelzellenanämie), da hier Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entnommen und wieder eingesetzt werden können. Bei Kindern, die weniger Zellen und meist auch eine geringere Anzahl mutierter Zellen haben, und bei denen die zelleigenen Reparaturmechanismen noch besser funktionieren, sind solche Therapien erfolgreicher als bei Erwachsenen. Bei einer Krankheit wie beispielsweise Duchenne Muskeldystrophie, stellen die vielen beteiligten Muskeltypen die Herausforderung dar. Im Gegensatz zu Blutkrebserkrankungen müsste man hier die reparierten Zellen an vielen verschiedenen Stellen im Körper (mit unterschiedlichen Funktionen) wieder einbringen.

Bei einer Therapie *in vivo* ist die Herausforderung, das CRISPR/Cas9-System genau zum Zielgewebe zu bringen, denn es soll nur dort wirksam sein und keine anderen Effekte im Körper auslösen. Bei *ex vivo* Therapien können die reparierten Zellen genau untersucht werden (Sequenzierung), bevor sie wieder in den Körper gebracht werden. Bei *in vivo* Therapien sind Off-target Effekte problematisch, da CRISPR/Cas9 potentiell an anderen Stellen im Genom schneiden könnte und man die Auswirkungen nicht kontrollieren kann.

CRISPR/Cas9 wird in der somatischen Gentherapie für die Erforschung von Blutgerinnungsstörungen wie Hämophilie A, Leukämie, HIV und anderen Immundefekten, Muskelschwund-Erkrankungen und Sichelzellenanämie eingesetzt, da diese Erkrankungen genetisch bereits gut charakterisiert und teilweise so schwerwiegend sind, dass auch eine wenig ausgereifte Therapie eventuell durchgeführt werden kann (vgl. Folie 35 und 36 zu Rechtlichen und Ethischen Aspekten). Mögliche Targets sind auch Krebserkrankungen, die durch Punktmutationen hervorgerufen werden und somit einfach zu modifizieren wären (Beispiel: BRAF V600E).

Folie 32: Keimbahntherapie (Gentherapie in Keimzellen)

Das Genom menschlicher Keimbahnzellen (Eizelle, Samenzelle und deren Vorläuferzellen) wird an die Nachkommen weitergegeben. Das bedeutet, dass Gendefekte, die in der Keimbahn des Menschen vorkommen, vererbbar sind. Mit CRISPR/Cas9 erforscht man nun Möglichkeiten der Eingriffe in die menschliche Keimbahn. Dies wird als sehr kritisch erachtet, da CRISPR/Cas9 in komplexen Säugermodellen (wie z.B. im Mausmodell) viele sogenannte Off-Target Effekte gezeigt hat. Das bedeutet, CRISPR/Cas9 repariert nicht nur das kranke Gen, sondern schneidet potentiell auch an vielen anderen Stellen im Genom, die eine ähnliche Basensequenz aufweisen, wie die Ziel-DNA. Die Auswirkungen sind unbekannt. In der Keimbahn können dadurch irreversible Veränderungen durchgeführt werden, die an Nachkommen weitergegeben werden. In einfacheren Organismen wie Pflanzen, sind auch aufgrund des kleineren Genoms die Off-target Effekte geringer, außerdem wird durch die gezielte Zucht die Vermehrung kontrolliert. Bei Tier und Mensch ist das anders und daher problematisch.

Man unterscheidet auch hier verschiedene Stufen der Veränderung. Entnimmt man eine Keimzelle und verändert die Erbinformation, ist dies gesetzlich anders zu bewerten, als wenn man eine Stammzelle entnimmt und diese verändert

und in eine Keimzelle umwandelt, die man dann für die Fortpflanzung einsetzt. In China beispielsweise sind die Gesetze wenig restriktiv, hier wurde bereits eine Keimbahnveränderungen mit CRISPR/Cas9 an einem überzähligen Embryo (aus IVF²) mit genetischer Bluterkrankung getestet.

Erbkrankheiten im kranken Menschen (*in vivo*) zu reparieren, gilt derzeit und in naher Zukunft als eher unwahrscheinlich, da in einem entwickelten Organismus noch weitaus mehr unvorhergesehen Effekte zu erwarten sind.

Keimbahntherapien mit CRISPR/Cas9 sind hoch umstritten, es ist eine Moratorium zu erwarten, durch das WissenschaftlerInnen weltweit die Verwendung von CRISPR für Keimbahnveränderungen als unethisch bewerten und damit einschränken werden (vgl. Folie 35 und 36 zu Rechtlichen und Ethischen Aspekten).

Abzugrenzen ist die Keimbahntherapie von der Erforschung von Erbkrankheiten in mit CRISPR veränderten Zelllinien. Beispielsweise werden Keimbahnmutationen im BRCA1-Gen, die bei Trägerinnen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu familiären Brustkrebs führen, in mit CRISPR veränderten Krebszelllinien untersucht.

Folie 33: Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt Veränderungen an Chromosomen, die die Aktivität einzelner Gene beeinflussen. Enzyme markieren Abschnitte der DNA, was zu einem stärkeren oder schwächeren Ablesen von Genen führt.

Epi stammt aus dem Griechischen und bedeutet „über“, d.h. Epigenetik spielt sich „oberhalb“ der Nukleotidsequenz des DNA-Strangs ab.

Mittlerweile ist bekannt, dass die Expressionsprofile von genetischen Erkrankungen nicht ausschließlich auf Mutationen einzelner Gene, sondern ebenso auf epigenetischen Veränderungen beruhen. Deswegen wird das Epigenom, also Faktoren die die Aktivität eines Gens bestimmen, als zusätzliche Kontrolle in der Erforschung der Entstehung von Erkrankungen eingesetzt.

DNA-Methylierung ist eine der wichtigsten epigenetischen Veränderungen in der Zelle, die Einfluss auf die Genexpression nimmt. Histonmodifikationen sind ebenfalls epigenetische Veränderungen die neben der Methylierung auch auf anderen chemischen Veränderungen (Acetylierung, Phosphorylierung) beruhen.

Mit CRISPR-Cas9 lassen sich eine oder mehrere Regionen im Erbgut ansteuern und dort das epigenetische Muster verändern, ohne am Erbgut selbst einzugreifen. Dafür wird Cas9 deaktiviert und mit epigenetischen Modifikatoren verbunden (dCas9). Beispielsweise kann man somit DNA mit Methylgruppen oder Histonproteine mit Acetylgruppen markieren. Damit können Forscher analysieren, welchen Einfluss diese Modifikationen auf die Genexpression haben. Oft wird dies auch in Hoch-Durchsatz Ansätzen durchgeführt, bei denen tausende von mit CRISPR Systemen willkürlich eingefügten Modifikationen, analysiert werden.

² In Vitro Fertilisation

RECHTLICHE, ETHISCHE UND GESELLSCHAFTLICHE ASPEKTE

Folie 34: Rechtliche, ethische und gesellschaftliche Aspekte

Bei der Diskussion um die rechtlichen, ethischen und gesellschaftlichen Aspekte ist es wichtig, die Anwendung von CRISPR/Cas9 genauer zu differenzieren. Zunächst muss man zwischen dem Prozess der Herstellung, der Gentechnik (Gentechnisch Veränderter Organismus) und der Bewertung des Produktes bzw. Organismus als transgen unterscheiden. Ersteres betrifft primär die Forschung, letzteres die Anwendung. Diese Aspekte sind vor allem bei der Diskussion um die Verwendung von CRISPR/Cas9 in der Pflanzenzüchtung bzw. Agrarwirtschaft und im Bereich der Grundlagenforschung (Herstellung von GMOs) wichtig. Im medizinischen Bereich ist bei der Anwendung von CRISPR/Cas9, der Eingriff in die menschliche Keimbahn durch das Gentechnikgesetz untersagt, für die somatische Gentherapie *ex vivo* wird CRISPR/Cas9 bereits vielerorts in klinischen Studien eingesetzt.

Folie 35: Rechtliche und regulatorische Aspekte

Methoden wie CRISPR/Cas9 erzeugen nach österreichischer Rechtslage gentechnisch veränderte Organismen (GVOs). Experimente mit CRISPR/Cas-Systemen fallen daher unter den Schirm des Gentechnikgesetzes, ihre Anwendung in der Forschung ist damit geregelt. Ein anderes Bild ergibt sich für die Anwendung außerhalb des Labors. Die Technologie wird es zum Beispiel ermöglichen, gentechnisch veränderte Pflanzen ohne „Markergene“ herzustellen. Diese Markergene waren bisher das Haupt-Charakteristikum transgener Pflanzen. In naher Zukunft wird es also Pflanzen geben, bei denen die Methode der Veränderung nicht als Gentechnik nachweisbar ist. Alle gezielten Manipulationen an Pflanzen und Tier fallen unter das österreichische Gentechnikgesetz und sind daher Kennzeichnungspflichtig.

Eingriffe in die Keimbahn des Menschen, beispielweise bei embryonalen Stammzellen, sind hoch umstritten. Eingriffe an entwicklungsfähigen embryonalen Zellen sind in Österreich durch das Fortpflanzungsmedizingesetz verboten. Der Import und die Forschung an den importieren, nicht entwicklungsfähigen Embryonen ist erlaubt. Im Gegensatz zu Deutschland hat Österreich kein Embryonenschutzgesetz, das die Forschung an embryonalen Stammzellen genauer regelt.

In Europa wird darüber diskutiert, wie man CRISPR/Cas9 veränderte Organismen kennzeichnen könnte. Beispielsweise könnte man bei der Herstellung von Gentechnischen Veränderten Organismen, das Produkt und den Herstellungsprozess separat bewerten und unterschiedlich kennzeichnen.

In Schweden wurde bereits im Falle einer mit CRISPR veränderten Ackerschmalwand entschieden, dass es sich dabei um keinen gentechnisch veränderten Organismus (kein GMO -Prozess) handelt. Genom-Editierung an Embryonen ist in Schweden, wie in Österreich, per Gesetz verboten.

In den USA werden durch CRISPR veränderte Pflanzen unter gewissen Voraussetzungen nicht als transgen eingestuft (nicht transgenes Produkt). Dort gelten editierte Pflanzen nicht als GMO, sofern sie vollständig frei von „fremder“ DNA

sind. Es gibt bereits Test-Felder mit CRISPR veränderten nicht-GMO Pflanzen. Öffentliche Förderungen erlauben es in den USA des Weiteren nicht, menschliche Embryonen zu modifizieren, die Genom-Editierung ist allerdings erlaubt. Klinische Studien am Menschen (Somatische Gentherapie) werden bereits durchgeführt. Privat finanzierte Förderung sind in den USA wesentlich weniger restriktiv.

Folie 36: Ethische und gesellschaftliche Aspekte

Aus den vorangegangenen Informationen ergeben sich folgende Fragestellungen für die gesellschaftliche Debatte:

Sind Pflanzen, die durch Genom-Editierung entstanden sind, deren Genom jedoch „naturidentisch“ ist als GVOs anzusehen?

Es ist bis dato nicht klar, welche Auswirkungen CRISPR/Cas9 auf Mensch und Ökosystem haben wird. Die Off-target Effekte in der Pflanze sind beispielweise sehr gering, in Tieren als komplexere Organismen bereits höher. Noch werden keine veränderten Organismen in das Ökosystem entlassen, wenn aber doch, sind die Auswirkungen auf das Gleichgewicht der Umwelt (Mensch, Tier, Pflanzen, andere Organismen ...) schwer abzuschätzen.

Des Weiteren wird es durch die EU-Kommission bald eine Entscheidung über die Kennzeichnungspflicht von CRISPR editierten GVOs geben, die dann gegebenenfalls in nationale Gesetzgebung umgesetzt werden müsste. Diskussionsgrundlage für die Beurteilung der Technik werden unter anderem sein, ob neue Genkombinationen geschaffen wurden, ob neue Nukleotide eingefügt worden sind, ob es sich dabei um kombinierte Nukleotide handelt, ob diese dauerhaft oder nur vorübergehend exprimiert werden, ob die Veränderungen vererbt werden, ob diese Veränderungen auch in der Natur vorkommen oder mit herkömmlichen Methoden erreicht werden können und ob sich die Sorten von herkömmlich gezüchteten Sorten unterscheiden lassen.

Wer bekommt die Patente für CRISPR/Cas 9 Technologie?

Viele Forscher und wissenschaftliche Einrichtungen waren an der Entwicklung von CRISPR/Cas9 in den vergangenen 25 Jahren beteiligt. Patente wurden von Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier sowie Feng Zhang und Georg Church eingereicht. Letztere hatten mit einem Patent Eilverfahren in der USA einen Teil der Technologie, nämlich die Anwendung von CRISPR/Cas9 in tierischen und menschlichen Zellen zugesprochen bekommen, während erstere in einem umfangreicheren US-Patentantrag noch auf ein Ergebnis warteten. Die darauf folgende Klage von Doudna/Charpentier gegen das Patent wurde vom US Patentgericht abgewiesen.

Sollten auch Charpentier und Doudna nun ihr EU-Patent zugesprochen bekommen – was wahrscheinlich ist, könnte es darauf hinauslaufen, dass künftig alle Einrichtungen, die CRISPR/Cas9 an eukaryotische Zellen anwenden wollen, gleich zwei Lizenzen benötigen: eine von den Erfinderinnen des Verfahrens und eine vom Broad Institut (Feng Zhang). In China wurde das Patent für CRISPR/Cas9 erst kürzlich Charpentier und Doudna zugesprochen.

Soll die Genom-Editierung für die Veränderung der Keimbahn eingesetzt werden?

Keimbahnmutationen und Designer Babies:

CRISPR/Cas9 könnte eingesetzt werden, um familiäre Erbkrankheiten zu heilen. Die Keimbahn könnte man nur im Embryo nachhaltig verändern, dies wird aber aus ethischen Gründen abgelehnt. Im Bereich der In Vitro Fertilisation (IVF), wenn Kindern künstlich gezeugt werden, wird in vielen Ländern eine Prä-Implantationsdiagnostik gemacht, d.h. die zu implantierenden Embryos auf ihre Gesundheit hin untersucht und nur gesunde Embryonen implantiert. Die Angst vor der Weiterführung dieser Selektion (mit CRISPR) auf Haarfarbe oder Augenfarbe, wie es durch den Ausdruck „Designer Baby“ oft medial diskutiert wird, ist unberechtigt, da solche Eigenschaften über viele verschiedenen Gene sehr komplex vererbt werden und zusätzlich unsere ethischen Grundregeln und Gesetze solche Maßnahmen untersagen würden. Bei schweren Erbkrankheiten wie Cystischer Fibrose oder Chorea Huntington erzielten Grundlagenforschungsexperimente bereits erste Erfolge, ob es aber tatsächlich in den nächsten Jahren klinische Studien geben wird, hängt davon ab, wie gut man die Genscheren und ihre Genauigkeit verbessern kann und wie die rechtlichen Rahmenbedingungen gestaltet werden.

Gene-Drive:

Wie verändert sich das Ökosystem, wenn Gene-Drive Tiere tatsächlich aus dem Labor entlassen werden würden? Eine „Steuerung der Evolution“ wird befürchtet. Versuche gibt es zu modifizierten Stechmücken die keine Malaria mehr übertragen können. Würde man solche modifizierten Tiere entlassen, würden sie eventuell sehr rasch die bestehende Art verdrängen. Was das für Auswirkungen auf das Ökosystem hat, kann man nicht abschätzen. Trotzdem wäre der Nutzen für den Menschen groß. In den USA forscht beispielweise Wissenschaftler George Church mit Gene-Drive veränderten Tieren. In diesem Fall wäre auch die jeweilige gesetzliche Regelung der einzelnen Länder obsolet, denn einmal entlassene Tiere könnten das Ökosystem der ganzen Welt verändern. Daher darf zwar unter strengen Sicherheitsvorkehrungen daran geforscht werden, es wird aber in der wissenschaftlichen Gemeinschaft sehr scharf darauf geachtet, die Anwendungen stark zu regulieren.

CRISPR/Cas9

Literaturliste

Open Science – Lebenswissenschaften im Dialog
Stand: Dezember 2017
Nutzungsbedingungen: cc/by-nc-sa

LITERATUR

Bücher/Magazine

STANDARD MAGAZIN FORSCHUNG: „DAS OPTIMIERTE LEBEN: WIE DIE „GENSCHERE DIE WELT VERÄNDERT“ (2017)

SPEKTRUM DER WISSENSCHAFT KOMPAKT - CRISPR/Cas9 - ERBGUT AUF DEM SCHNEIDETISCH (2017)

JENNIFER DOUDNA, SAMUEL H. STERNBERG: “A CRACK IN CREATION: GENE EDITING AND THE UNTHINKABLE POWER TO CONTROL EVOLUTION” (2017) Houghton Mifflin Harcourt

JOHN PARRINGTON: “REDESIGNING LIFE: HOW GENOME EDITING WILL TRANSFORM THE WORLD” (2016) Oxford University Press

TAKASHI YAMAMOTO: “TARGETED GENOME EDITING USING SITE-SPECIFIC NUCLEASES” (2015) Springer

NATURE COLLECTIONS: “CRISPR-CAS9 GENOME EDITING” (2016) E-Book Nature Pub. Group

RODOLPHE BARRANGOU, JOHN VAN DER OOST: “CRISPR-CAS SYSTEMS: RNA-MEDIATED ADAPTIVE IMMUNITY IN BACTERIA AND ARCHAEA” (2012) Springer

Onlineliteratur/Publikationen

Übersichtsartikel

SCIENCE MEDIA CENTER GERMANY, CRISPR - Cas9 ALS REVOLUTIONÄRE METHODE DES GENOME EDITING, Fact sheet (2016)
https://www.sciencemediacenter.de/fileadmin/user_upload/Fact_Sheets_PDF/CRISPR-Cas9-Genome-Editing_Factsheet_SMC_2016-04-26-2.pdf

NEW ENGLAND BIOLABS “CRISPR/Cas9 AND TARGETED GENOME EDITING: A NEW ERA IN MOLECULAR BIOLOGY” (2014) NEB expressions I. <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>

NATURE NEWS FEATURE “WELCOME TO CRISPR ZOO” (2016) <http://www.nature.com/news/welcome-to-the-crispr-zoo-1.19537>

BUNDESMINISTERIUM FÜR FRAUEN UND GESUNDHEIT, GRUNDLAGEN ZUR BEWERTUNG NEUER TECHNIKEN IN DER PFLANZENZÜCHTUNG: RNA-ABHÄNGIGE TECHNIKEN, ACCELERATED BREEDING UND CRISPR-CAS (2017)
https://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/2/5/0/CH1052/CMS1493814297724/techniken_pflanzenzuechtung_zusammenfassung_20170323.pdf

WADDINGTON S.N., PRIVOLIZZI R., KARDA R., O’NEILL H.C., “A BROAD OVERVIEW AND REVIEW OF CRISPR-CAS TECHNOLOGY AND STEM CELLS” (2016) Curr Stem Cell Rep., 2(1): 9–20.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4913977/pdf/40778_2016_Article_37.pdf

SANDER J.F., JOUNG K., “CRISPR-CAS SYSTEMS FOR EDITING, REGULATING AND TARGETING GENOMES” (2014) Nature Biotechnology, 32: 347–355. <https://www.nature.com/nbt/journal/v32/n4/full/nbt.2842.html>

PATRICK D. HSU, ERIC S. LANDER, FENG ZHANG: “DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF CRISPR-Cas9 FOR GENOME ENGINEERING” (2014) Cell, 157, 6:1262–1278. [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(14\)00604-7.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(14)00604-7.pdf)

LANDER E., “THE HEROES OF CRISPR” (2016) Cell, 164:18–28. <http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674%2815%2901705-5.pdf>

BARRANGOU R., HORVATH P., „A DECADE OF DISCOVERY: CRISPR FUNCTIONS AND APPLICATIONS“ (2017) Nature Microbiology, 2: 17092. <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol201792>

Übersichtsseite: **NATURE GENOME EDITING**-mit laufend neuen News und Artikeln
<https://www.nature.com/collections/rpdbdzpccx>

Detailartikel

ADDGENE (NON PROFIT ORGANISATION) WEBSITE: „CRISPR/Cas9 GUIDE“. <https://www.addgene.org/crispr/guide/>

JINEK M., CHYLINSKI K., FONFARA I. ET AL.: A PROGRAMMABLE DUAL-RNA-GUIDED DNA ENDONUCLEASE IN ADAPTIVE BACTERIAL IMMUNITY (2012) Science, 17:337(6096):816-21. <http://www.ask-force.org/web/Genomics/Jinek-Programmable-Dual-RNA-Guided-DNA-Endonuclease-Adaptive-Bacterial-Immunity-2012.pdf>

CHYLINSKI K., LE RHUN A. AND CHARPENTIER E.: THE TRACR RNA AND Cas9 FAMILIES OF TYPE II CRISPR-Cas IMMUNITY SYSTEMS. (2013) RNA Biol., 10(5):726-37. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/rna.24321>

RODRIGUEZ E.: ETHICAL ISSUES IN GENOME EDITING USING CRISPR/Cas9 SYSTEM (2016) Clin. Res. Bioeth. 7:2. <https://www.omicsonline.org/open-access/ethical-issues-in-genome-editing-using-crisprcas9-system-2155-9627-1000266.php?aid=70914>

HUANG S., WEIGEL D., BEACHY R.N., LI J.: A PROPOSED REGULATORY FRAMEWORK FOR GENOME-EDITED CROPS (2016), Nature Genetics, 48(2): 109-111, <https://pdfs.semanticscholar.org/24be/8d67bfd9b3dfa2e3e3798f2f87e9e98228c1.pdf>

Videos und Filme

Dokumentation

3Sat, Scobel: „Die neue grüne Genetik“
<http://www.3sat.de/mediathek/?mode=play&obj=58185>

Erklärvideos

Open Science-Lebenswissenschaften im Dialog
<http://www.openscience.or.at/projekte/projektnews/crispr-cas9-erkl%C3%A4rvideo-zur-genschere>

DieZeit: „Crispr: So funktioniert das neue Universalwerkzeug der Gentechnik“
<http://www.zeit.de/video/2016-06/4948764858001/crispr-so-funktioniert-das-neue-universalwerkzeug-der-gentechnik>

Alila Medical Media: “What is CRISPR? Animation.”
https://www.youtube.com/watch?v=O3e2_CtTy_M

Bozeman Science: “What is CRISPR?”
<https://www.youtube.com/watch?v=MnYppmstxIs>

TED: “How CRISPR lets us edit our DNA | Jennifer Doudna”
<https://www.youtube.com/watch?v=TdBAHexVYzc>

Microbiology Society: “What is CRISPR-Cas?”
<https://www.youtube.com/watch?v=52j0EPzhpzc>

Sonstiges

Spektrum (2017): „Die 5 wichtigsten Fragen zu CRISPR/Cas9“

<http://www.spektrum.de/wissen/wie-funktioniert-crispr-cas9/1441060#>

Helmholtz Blogs: „Klar Soweit? No.32 – CRIPSR, CRISPR, Knäuschen...“

<https://blogs.helmholtz.de/augenspiegel/2016/09/klar-soweit-no-32/>

Scienceblogs: „Genetik zwischen Allmacht und Albtraum – CRISPR und die Zukunft des menschlichen Genoms“

<http://scienceblogs.de/astrodicticum-simplex/2016/10/11/genetik-zwischen-allmacht-und-albtraum-crispr-und-die-zukunft-des-menschlichen-genoms/>