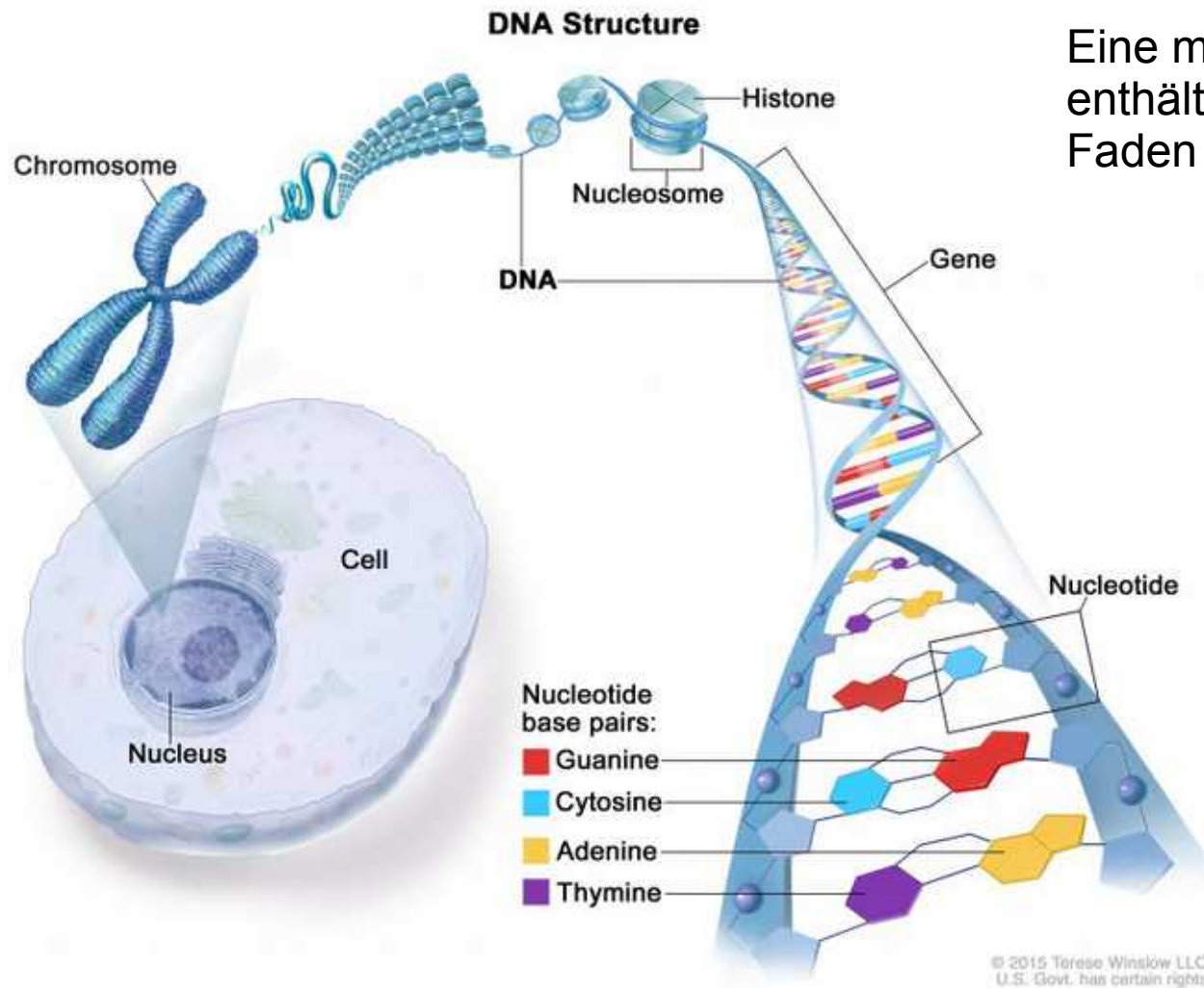


# Chromosomen unter dem Mikroskop

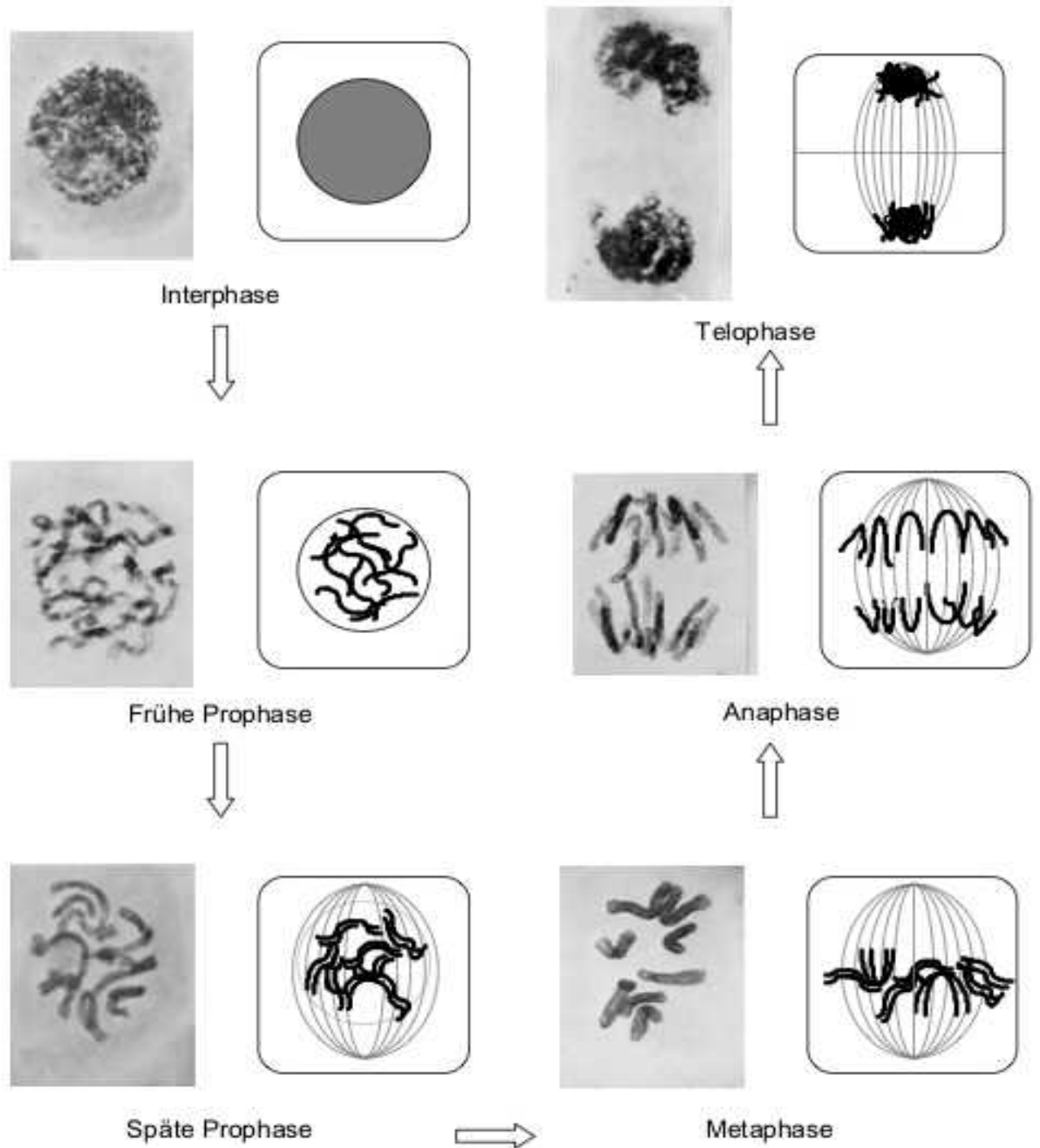
20.Mai 2017

# Vorab zur Einführung

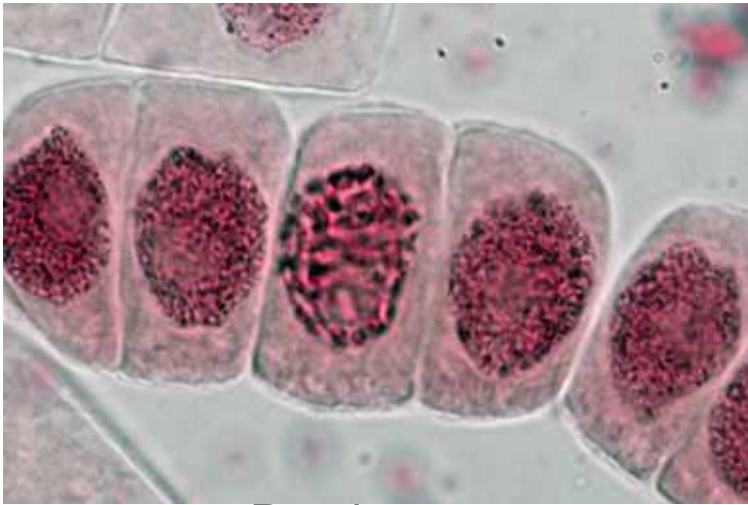


Eine menschliche Zelle enthält ca. 2 Meter DNA Faden im Zellkern!

# Phasen der Zellteilung (Mitose)



# Mitose Rote Zwiebel



Prophase



Metaphase



Anaphase



Telophase

# Wurzelspitzen wachsen lassen



- Spitzen abschneiden
- In Fixierlösung bringen  
3 Teile Ethanol (96%) / 1 Teil Essigsäure (99%)
- Mit Karmin Essigsäure mazerieren und färben
- Quetschpräparat herstellen



# Mitose per Hand



# Drei „revolutionäre“ Techniken in der Genforschung

★ 1980er Jahre: PCR, Polymerase Chain Reaction

➡ Methode zur Vervielfältigung von DNA

1990er Jahre: Deep Sequencing von DNA

➡ Methode zur schnellen und kostengünstigen Bestimmung der DNA Zusammensetzung

★ 2010er Jahre: CRISPR-Cas, Gene Editierungng

➡ Methode zur gezielten Veränderung der DNA

**Genscheren, Minischweine, AIDS  
Bekämpfung: was steckt hinter der  
CRISPR/Cas Revolution in den Genlaboren?**

Vortrag Mikro Hamburg 20. Mai 2017

Klaus Spiekermann



**Eine Frau, ihre**

**Entdeckung und wie sie**

**die Welt verändert**

*(Zeit 27.06.16)*

**Chinesen erschaffen mit  
Genchirurgie Mini-Schweine**  
*(Welt 13.11.15)*

**Unheimlich einfach – Aber auch erwünscht?** *(FAZ 12.12.15)*

**CRISPR the disruptor**  
*(nature 12.06.15)*

**Lenkwaffe im Zellkern**  
*(Spiegel 18/2015)*

**CRISPR: gene editing is just the beginning**  
*(Nature 07.03.16)*

**Don't edit the  
human germ line**

*(nature 15.07.15)*

**CRISPR: the good, the bad and the unknown**  
*(nature 19.07.15)*

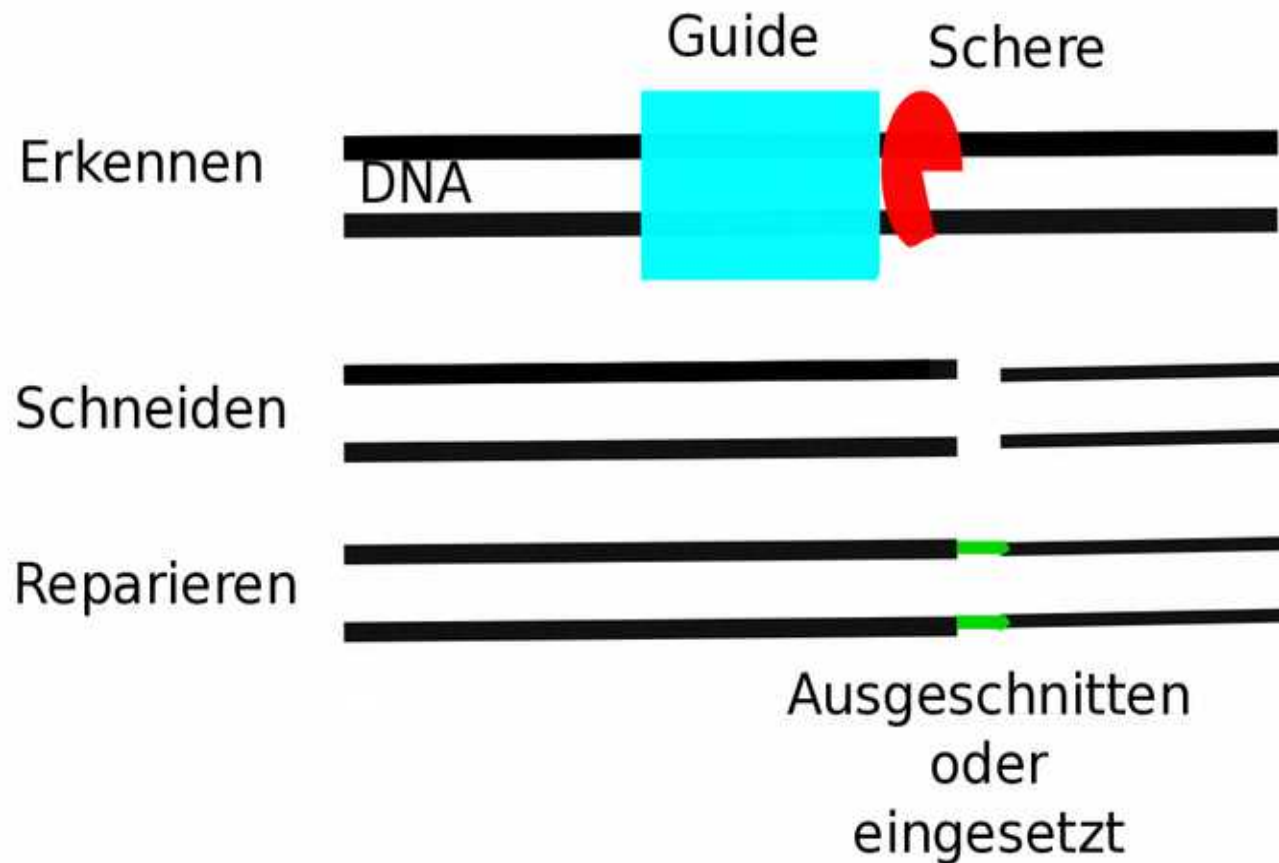
**Crispr gehört nicht länger mir**  
*(SZ 15.05.17)*



# Storyline (1)

Um Gene gezielt zu verändern, benötigt man

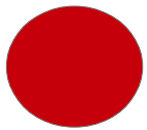
1. einen **Guide**, der die zu verändernde Sequenz der DNA erkennt,
2. eine **Schere**, die den DNA Strang schneidet und
3. **Reparaturmechanismen** um den Bruch zu heilen.



# Storyline (2)



Als Guide dienten früher Proteine, die spezifische Sequenzen auf der DNA erkennen können. Heute nutzt man RNA Sequenzen um die gewünschte Stelle auf der DNA erkennen.



Es gibt viele verschiedenen Genscheren, die Endonukleasen genannt werden.

Die in den letzten Jahren erzielten Fortschritte basieren auf der Erforschung des Immunsystems der Bakterien.

Bakterien nutzen RNA und eine Genschere um die DNA angreifender Viren zu erkennen und zu zerstören. Diese Mechanismen macht man sich nutzbar, um DNA gezielt zu verändern.

# Begriffsklärung: DNA / RNA Basenpaarung



2 Aspekte, die für unsere Diskussion wichtig sind:

- In Zellen wird aus DNA--> RNA gebildet. RNA liefert den Bauplan für Proteine, die in Ribosomen synthetisiert werden. Drei RNA Basen kodieren dabei für eine Aminosäure.
- RNA kann sich an DNA anlagern, wenn die Basen komplementär sind (s.o.)

# Wie alles begann



Emmanuelle Charpentier

Jennifer Doudna

- Ende der 1980er Jahre wurde das Immunsystem der Bakterien entdeckt.
- 2012 beschreiben Charpentier und Doudna (Berkeley) wie Gene mit Hilfe der Immunwerkzeuge der Bakterien gezielt aus der DNA von Bakterien geschnitten werden kann.
- Kurz darauf gelang es Feng Zhang (Broad Institute) die Methode für Eukaryoten zu optimieren.
- Seitdem tobt ein Patentstreit.
- Charpentier/Doudna erhalten 2014 den „Breakthrough Prize in Life Sciences“ und zahlreiche weitere Ehrungen.
- Charpentier ist seit 2015 Direktorin am Max Planck Institut für Infektionsbiologie in Berlin.

# Die Zeit vor dem Jahr 2000

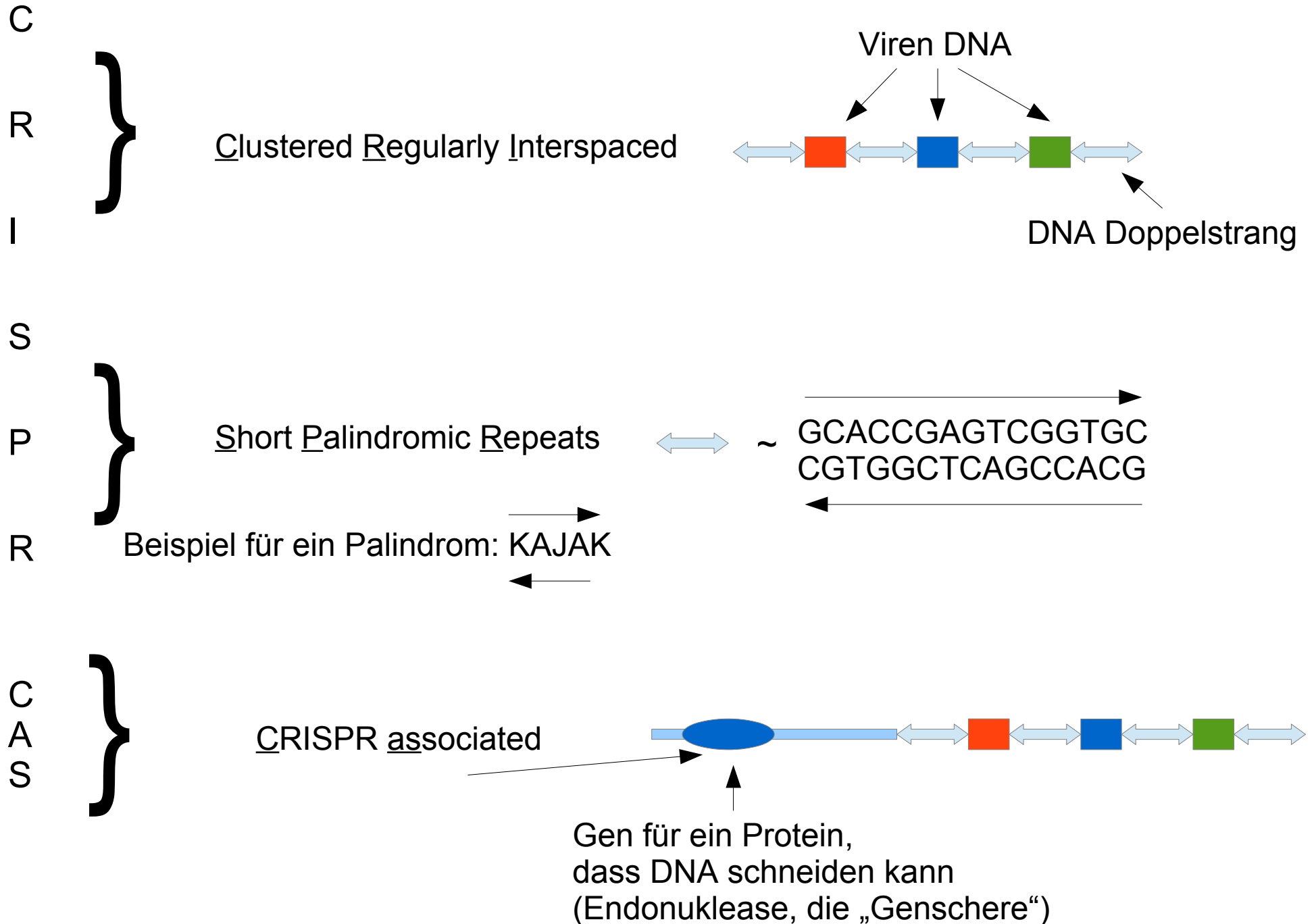
- Gezielte Veränderungen der DNA sind möglich, jedoch mühsam und teuer;
- Die DNA Sequenz, die geschnitten werden soll, wird durch **Proteine** erkannt, die mit einer Genschere verbunden sind (wechselnde Genauigkeit komplizierte Herstellung). Es gibt unterschiedliche Methoden mit Vor- und Nachteilen;
- Protein und Gene für die Genschere werden in die Zielzelle gebracht;
- Die Methoden wurden nur auf wenige Organismen angewandt.

## Heute

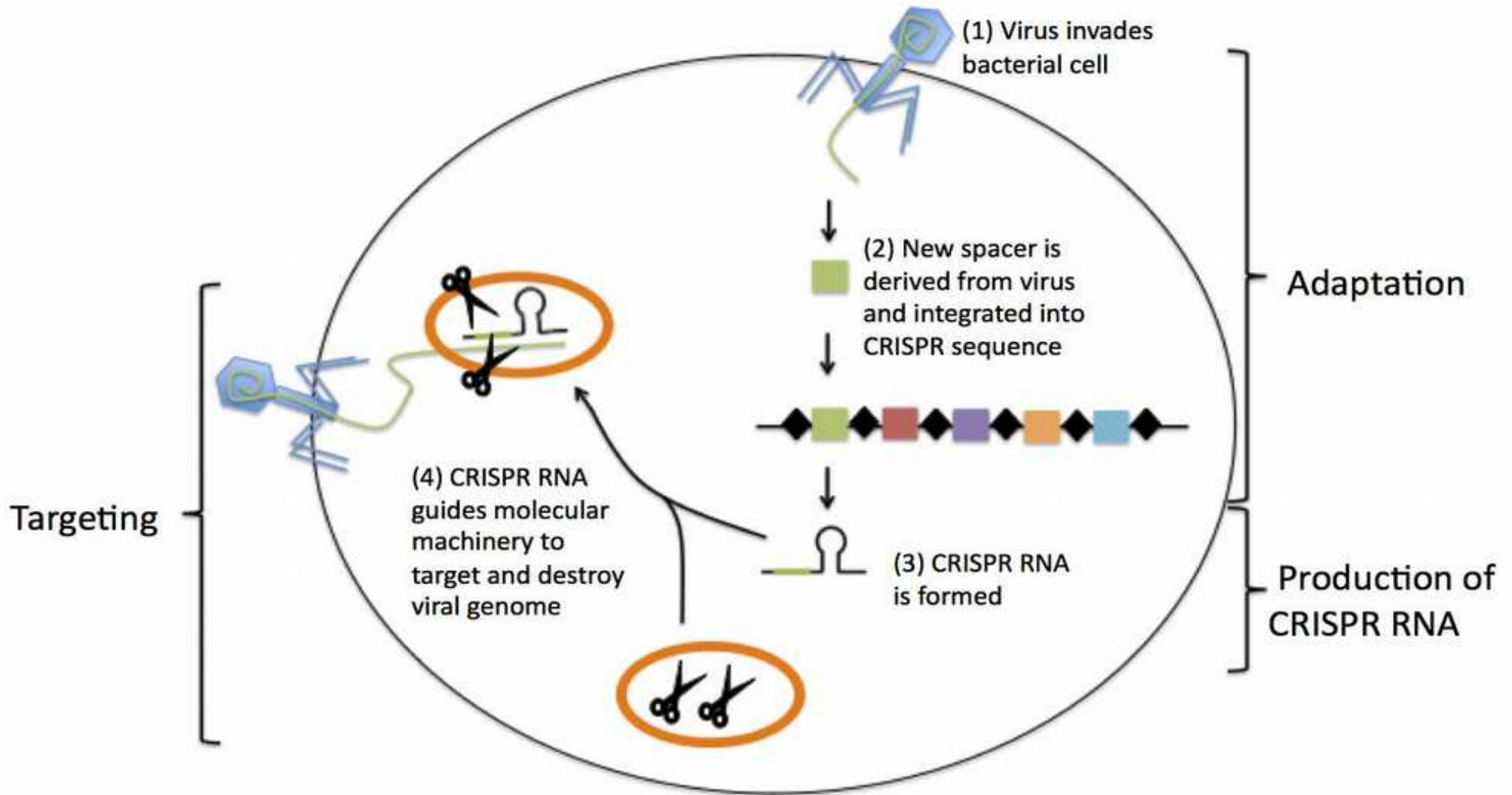
- Gezielte Veränderungen der DNA sind leicht möglich und billig;
- Die DNA Sequenz, die geschnitten werden soll wird durch **RNA** erkannt, die mit einer Genschere verbunden sind (hohe Genauigkeit, billig herzustellen);
- RNA und Gene für die Genschere werden in die Zielzelle gebracht;
- Die Methode wird auf (sehr) viele Organismen angewandt. Die Zahl der Veröffentlichungen explodiert.



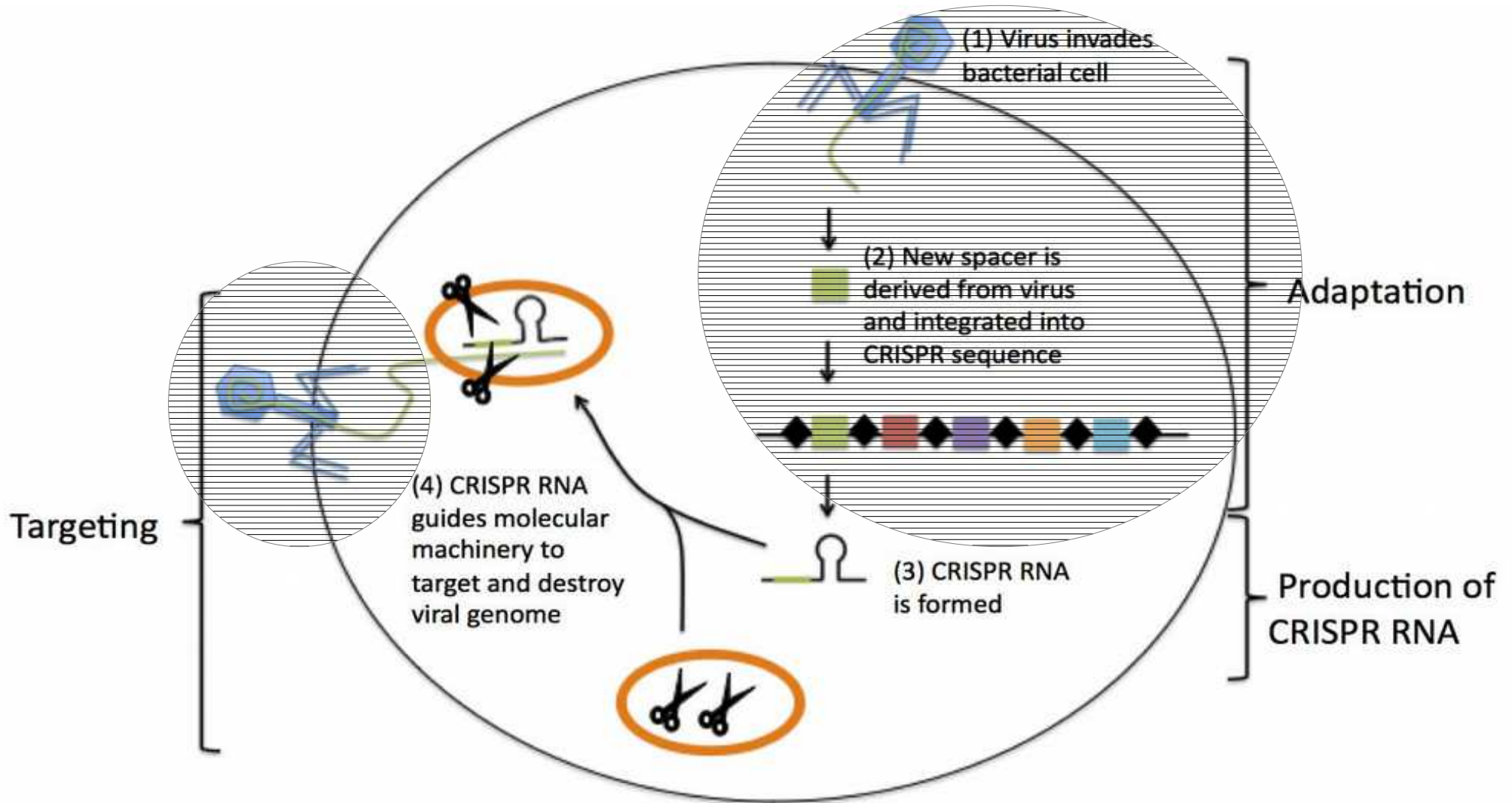
# CRISPR-Cas: Die Entdeckung des Immunsystems von Bakterien



# Das Immunsystem von Bakterien

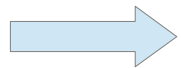


# Was wird vom Immunsystem der Bakterien für CRISPR-Cas genutzt?



# Was ist so besonders an dieser Methode?

- Schnell zu erlernen und durchzuführen;
- Zutaten können preiswert auf dem Postweg erworben werden;
- Ist die DNA Sequenz eines Organismus bekannt, kann sein Erbmateriale an jeder beliebigen Stelle manipuliert werden;
- Die Methode ist recht zielgenau und wird ständig verbessert;
- Veränderungen sind jetzt nicht nur in somatischen Zellen einfach zu erstellen, sondern auch in der Keimbahn aller Organismen möglich und können damit weiter vererbt werden.



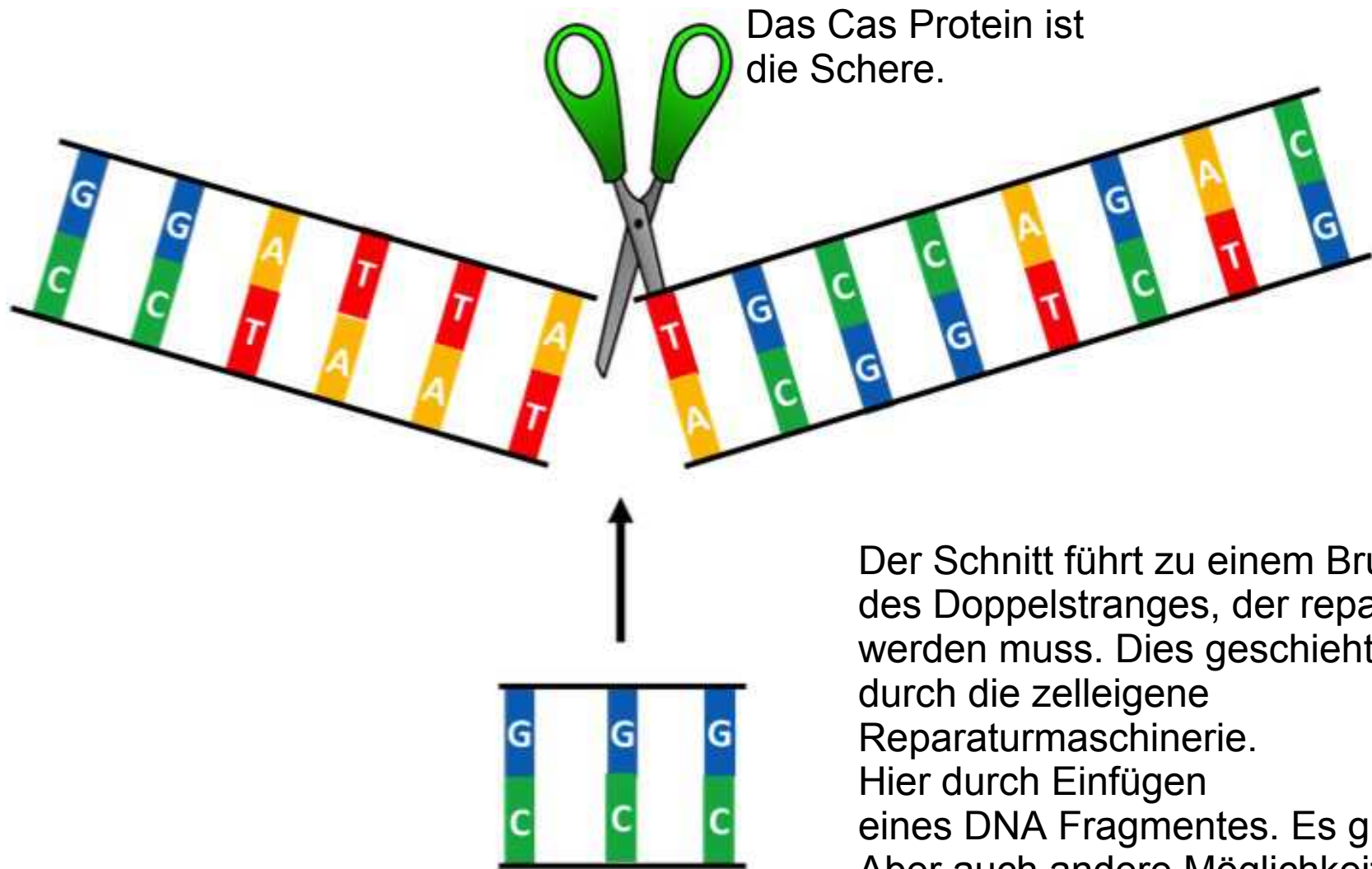
Es ist besonders einfach, ein Gen „Auszuschalten“, etwas komplizierter neue Sequenzen einzufügen.



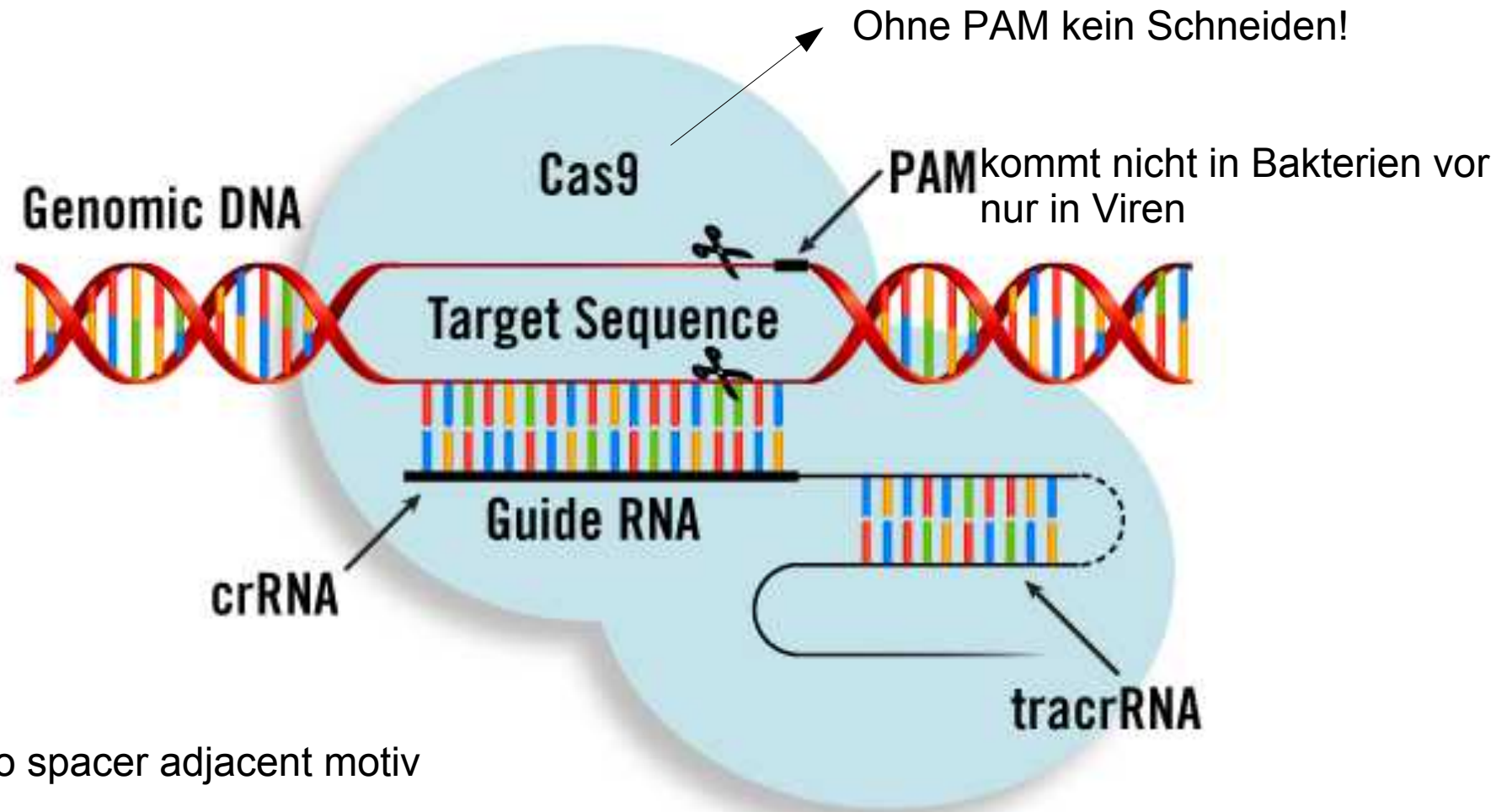
Eine Revolution in der Gentechnologie

Die Bezeichnung CRISPR-Cas hat historische Gründe, „Gen- Editierung“ ist eher angebracht.

# Die Genschere



# Prinzip CRISPR-Cas (Gene Editing)



PAM: Proto spacer adjacent motiv

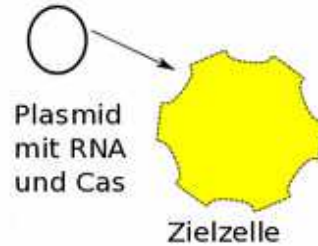
crRNA: CRISPR RNA

tracrRNA: transactivating CRISPR RNA

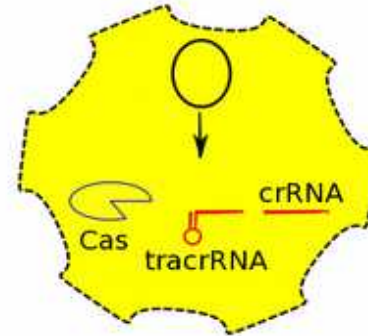


# CRISPR Cas Arbeitsschritte

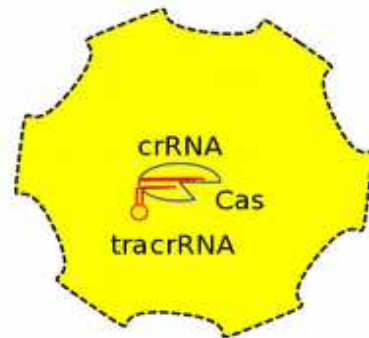
1. Transfektion



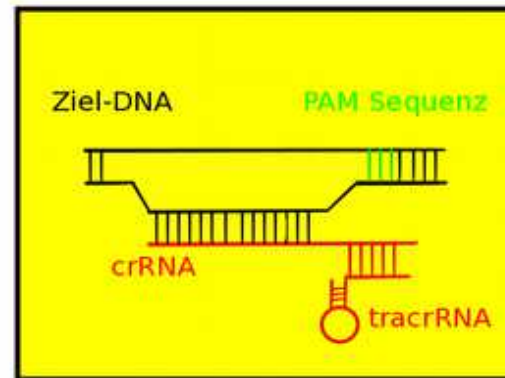
2. Expression des Plasmiden



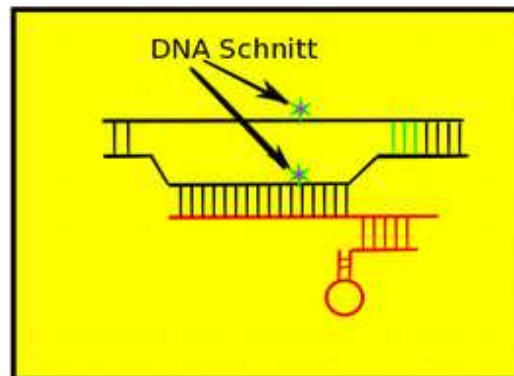
3. Aktivierung von Cas



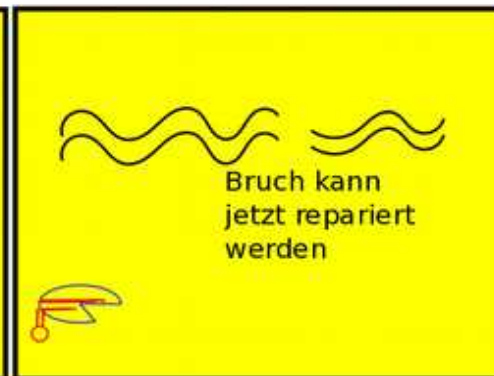
4. RNA bindet sich an Zielsequenz



5. Spaltung der DNA



6. DNA kann repariert werden



# Mögliche Anwendungen

- Pflanzen und Tiere genetisch verändern
- Gen Therapie beim Menschen
- Eingriff in die Keimbahn beim Menschen
- Designer Organismen
- Gene Drive

# Beispiele für die Anwendung von CRISPR-Cas

## Problem: Fehleranfälligkeit der „Schere“

### **Zwergschwein (Designer Organismus)**

Das chinesische Forschungsinstitut BGI hat durch Genome Editing das Gen für den Rezeptor des Wachstumshormons in einer Minischwein-Rasse inaktiviert. Diese genveränderten Schweine werden nur 15 kg anstelle von 60 kg schwer und waren zunächst als Versuchstiere geplant, die eine kostengünstige Infrastruktur erlauben. Sie werden nun auch als Haustiere angeboten.

### **HIV Bekämpfung (Gen Therapie)**

Menschen, bei denen in Zellen ihres Immunsystems ein Rezeptor (CCR5) fehlt, sind immun gegen HIV. Es erscheint möglich, das Gen für die Bildung des Rezeptors auszuschalten. Dadurch wäre eine Heilung Von der Immunschwächekrankheit möglich.

### **Menschliche Embryonen und Keimzellen (Eingriff in die Keimbahn, Designer Babies)**

Chinesische (und britische) Labore experimentieren erfolgreich mit embryonalen Zellen. Der Eingriff in die Keimbahn ist derzeit geächtet.

### **Gene Drive**

Gene in Malaria Mücken so verändern, dass sie steril werden oder gegen den Malaria Parasiten zu immunisieren

Es wurden bereits > 40 Organismen modifiziert

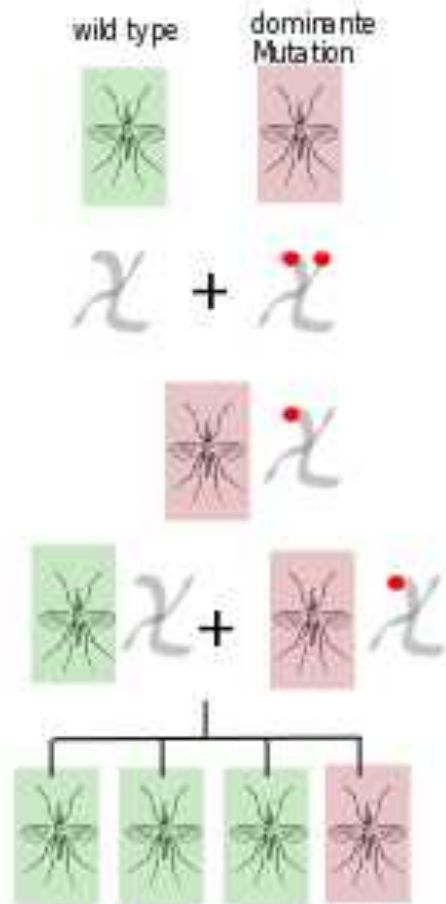
# Minischwein



# Gene Drive

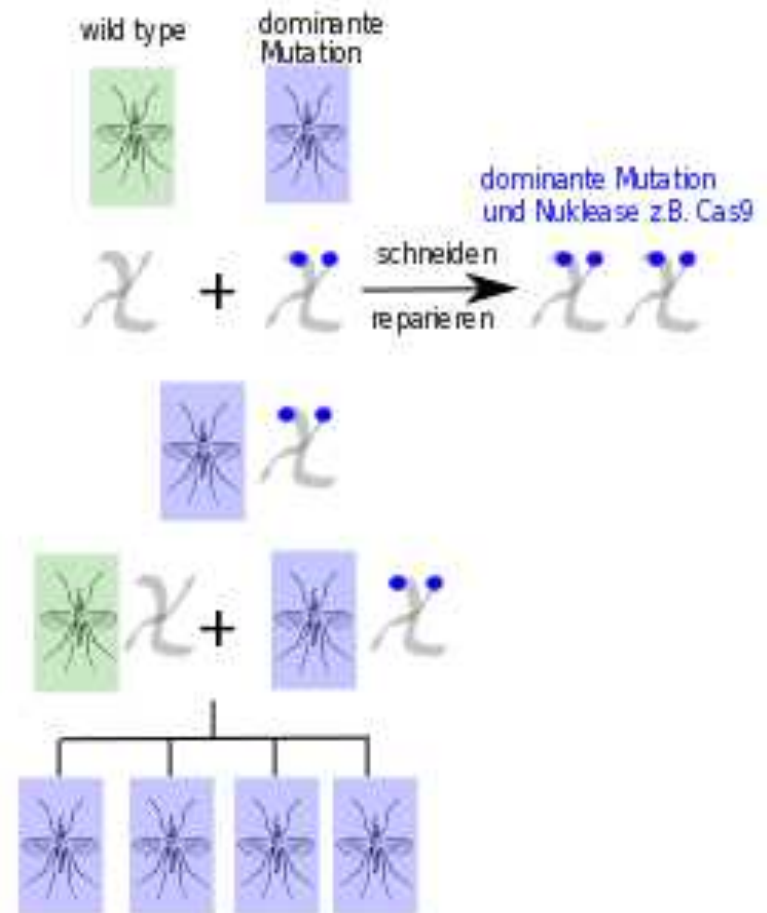
## Gene Drives

### Normale Vererbung



langsame Ausbreitung

### Gene Drive



sehr schnelle Ausbreitung

# Ethische Fragen

Problemfelder (eine Auswahl):

- CRISPR-Cas ist relativ einfach anzuwenden und kostengünstig. Wie kann kontrolliert werden, das damit verantwortungsvoll umgegangen wird?
- Gene Editing ist kaum von natürlichen Mutationen zu unterscheiden. Die Gesetzeslage ist in vielen Ländern unklar. Fallen geditierte Pflanzen und Tiere unter die Gesetzgebung für genmanipulierte Organismen? Eine transparente Diskussion zwischen Wissenschaft und Gesellschaft ist notwendig.
- Darf Gene Editing auf die Keimbahn – insbesondere des Menschen – angewandt werden? Das veränderte Erbgut würde viele Generationen weiter vererbt werden. Ist das zu verantworten?

Im Dezember 2015 beschloss die wissenschaftliche „Community“ ein Moratorium für das Gene Editing in der menschlichen Keimbahn. Experimente an „überzähligen“ Embryonen wurden als vertretbar eingestuft. Dennoch sind eine vertiefte Diskussion in der Gesellschaft sowie klare Regeln erforderlich.