

Dr. R. Shamsadin

WS 2016/2017

**CRISPR/Cas9-System
&
Immunsystem**

CRISPR/Cas9-System

Funktion des CRISPR/Cas9-Systems

CRISPR/Cas9-System

CRISPR/Cas: Ein mikrobielles Immunsystem ?

CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) sind wiederholende DNA-Abschnitte (sog. *Repeats*), die im Erbgut von vielen Bakterien (ca. 40%) und Archaeen (ca. 90%) auftreten.

Das System bewirkt, ähnlich wie das Immunsystem der Prokaryoten, Resistenz gegen das Eindringen von fremdem Erbgut (**Viren** o. **Plasmide**).

Cas (**CRISPR-associated**).

Das System bildet die Grundlage für ein neues Verfahren, um DNA-Bausteine im Erbgut einfach und präzise zu verändern.

CRISPR/Cas9-System

CRISPR /Cas: Ein ein neues Verfahren

Das CRISPR/Cas-System ist eine gentechnische Methode, mit der gezielt eine DNA-Sequenz im Genom eines Zielorganismus modifiziert wird, dabei wird das bakterielle Abwehrsystem als präzise **DNA-Schere** genutzt, die exakt an einer gewünschten Stelle im Erbgut schneidet.

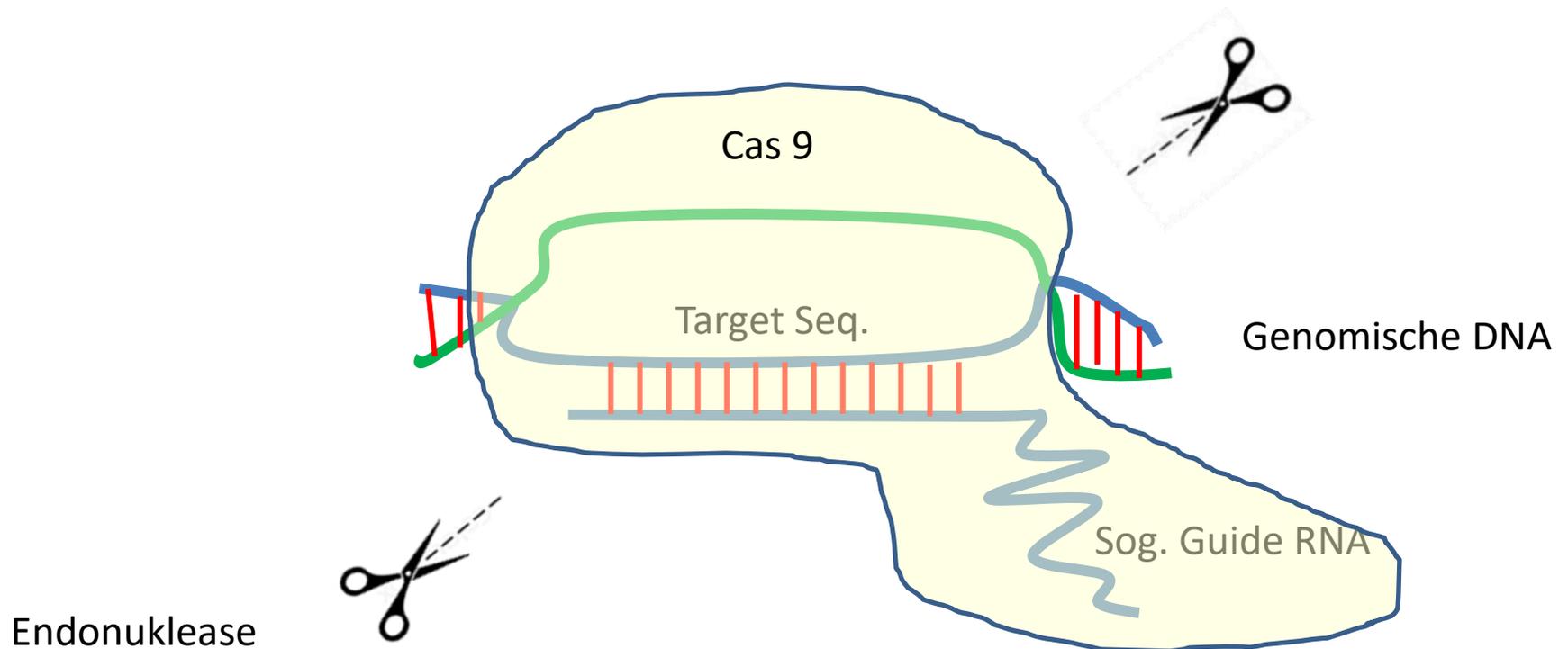
Obwohl das System schon lange in Bakterien bekannt war, wird die Idee, das System als Werkzeug einzusetzen, erst später von **Charpentier & Doudna** beschrieben.

User müssen lediglich dem Enzym **Cas9** und eine **g-RNA** (*guide RNA*; Wegweiser RNA) vorlegen, die dann die Rolle von viralen Vorlagen übernimmt und vom Cas9 geschnitten wird.

Dieser DNA-Bruch kann anschließend wieder repariert werden.

CRISPR/Cas9-System

What's behind all this ?



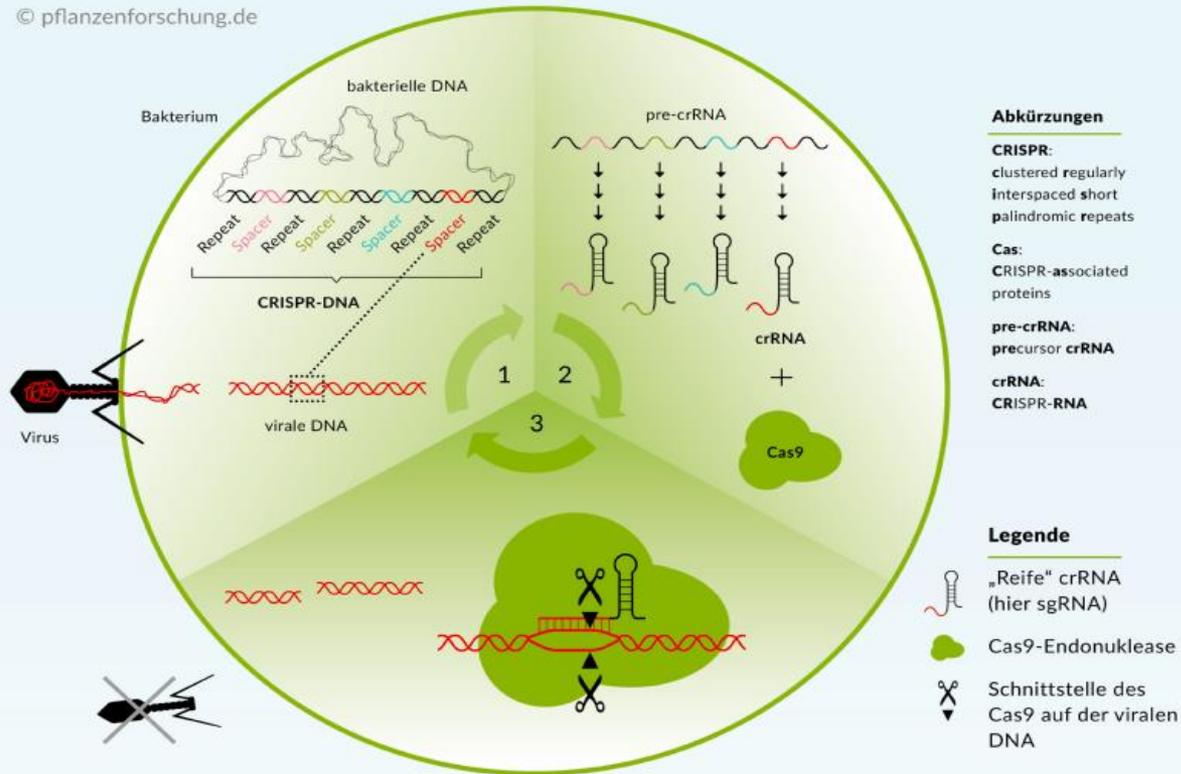
Bei einer Phageninfektion werden neue Spacer-Sequenzen in das Bakteriengenom eingefügt
→ Bakt. immun gegenüber Phagen, die die **Protospacern** tragen.

Die Cas-Gene müssen aktiv sein. Keine Aktivität → Keine Immunität !

CRISPR/Cas9-System

Die drei Phasen des CRISPR/Cas9-Prozesses

© pflanzenforschung.de



Phase 1: AKQUISITIONSPHASE

Nach Virusinfektion wird in der CRISPR-DNA ein neuer Spacer eingefügt

Phase 2: BEARBEITUNGSPHASE

Die pre-crRNA wird in „reife“ crRNA bearbeitet

Phase 3: INTERFERENZPHASE

Das Bakterium tötet das Virus, indem sein genetisches Material mithilfe von der

Barrangou R. et al. *Science* 2007, „passenden“ crRNA und Cas9 schneidet
www.Pflanzenforschung.de

Bei einer weiteren Infektion wird die Vorläufer-crRNA (CRISPR-RNA) transkribiert und bildet einen Komplex mit der tracrRNA (trans-activating crRNA) und dem Cas9-Protein.

Nach einer Prozessierung durch die RNase III entsteht der reife crRNA/tracrRNA-Cas9-Komplex. Dieser bindet spezifisch Virus-DNA mit der Erkennungssequenz PAM (Protospacer Adjacent Motif, NGG), indem die crRNA (Spacer) Basenpaarungen mit der Ziel-DNA (Protospacer) eingeht und ein Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA erzeugt

Phagen DNA wird innerhalb der CRISPR-Sequenz des Bakteriengenoms, die aus Spacern und repetitiven Sequenzen bestehen (sog. Repeats), eingebaut.

CRISPR/Cas9-System

Das CRISPR/Cas9-System ist zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies übertragbar und kann *in vitro* Ziel-DNA schneiden (2012).

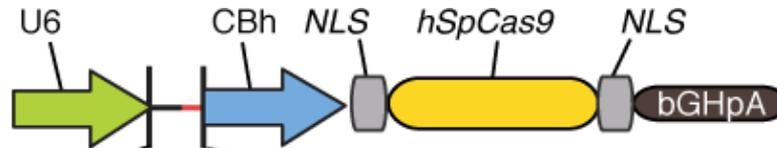
Das System wurde 2013 erstmals gezielt für genomische Modifikationen in Mauszellen sowie humanen Zellen eingesetzt.

Eukaryotische Zellen wurden mit einem Vektorkonstrukt aus Genen für die tracrRNA, crRNA und Cas9 aus dem Bakterium **Streptococcus pyogenes** (SpCas9) transfiziert.

Es konnten gezielt multiple Doppelstrangbrüche mit glattem Enden mithilfe des Systems erzeugt werden, die vom zelleigenen Reparaturmechanismus beseitigt wurden.

CRISPR/Cas9-System

pX330 (or pX335):
hSpCas9 (or hSpCas9n nickase)
+ chimeric guide RNA



Target Sequence Cloning Protocol Zhang Lab

PX330-based plasmids, including PX458-462 -SpCas9 (or SpCas9n D10A nickase)+ single guide RNA:

To clone the guide sequence into the sgRNA scaffold, synthesize two oligos of the form:

5' -CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

3' - CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAA -5'

PX260 and PX334 -SpCas9(or SpCas9n D10A nickase)+ CRISPR array + tracrRNA:

To clone the guide sequence into the sgRNA scaffold, synthesize two oligos of the form:

5' -AAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGT -3'

3' - NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAAT -5'

CRISPR/Cas9-System

Das System ist ein präzises Instrument, um DNA gezielt zu schneiden und zu verändern.

Einzelne DNA-Bausteine können **eingefügt**, **entfernt** oder **ausgeschaltet** werden.

Das Verfahren besteht theoretisch aus **drei Schritten**:

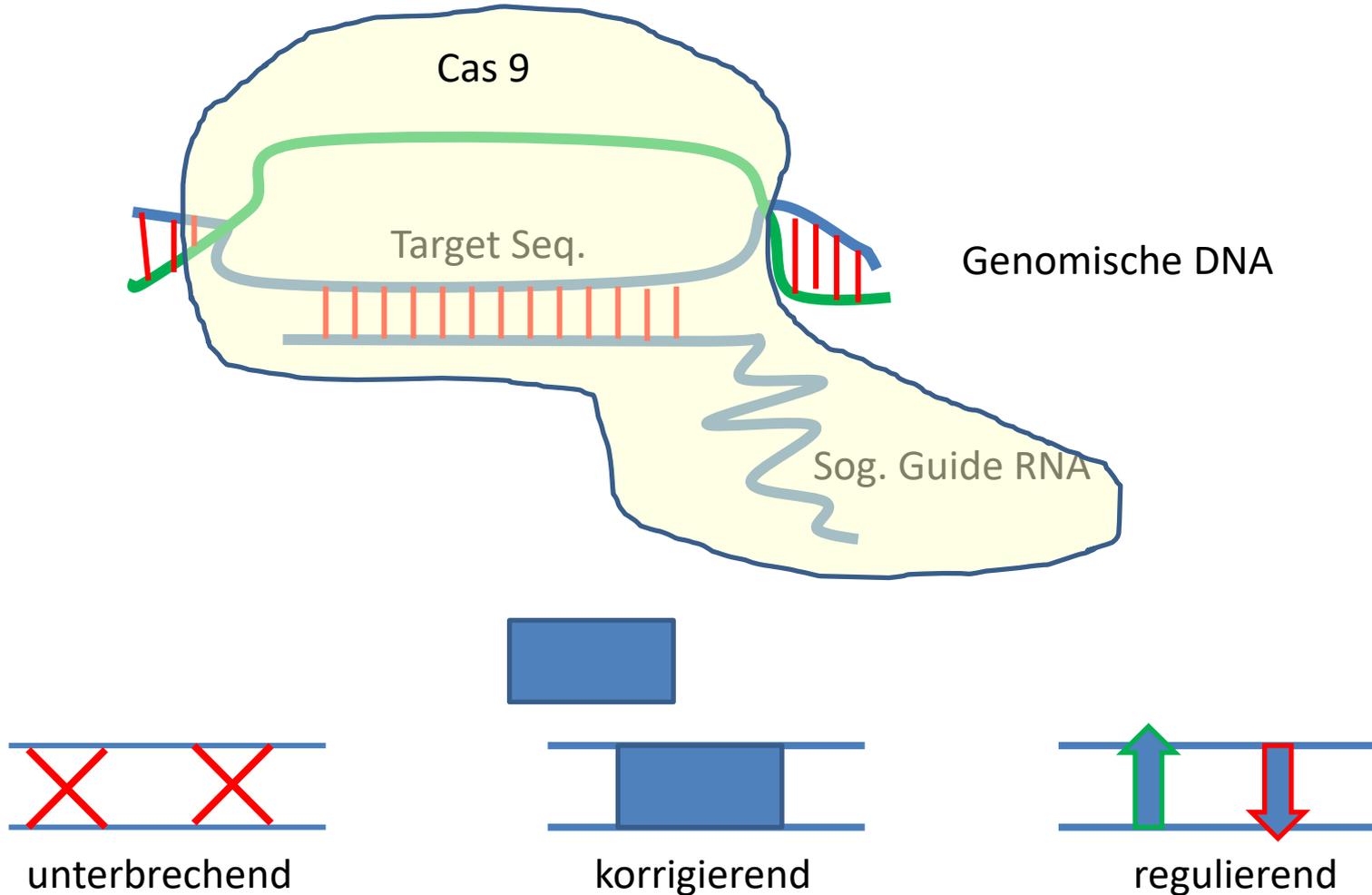
Ziel-Sequenz finden, Schneiden und Reparieren

- Der *g-RNA* erkennt das Ziel (Sequenz in dem umzuschreibenden Gen).
- Das Cas9-Protein schneidet den DNA-Doppelstrang genau an der Zielsequenz.
- Die eigenen Reparatursysteme fügen nun den durchtrennten DNA-Strang wieder zusammen.

CRISPR und Cas9 - werden synthetisch hergestellt und anschließend in eine Zelle eingeführt

DNA-Bausteine können entfernt oder modifiziert werden, je nachdem, wie das geschieht.
Kurze DNA-Sequenzen neu einzubauen ist auch möglich.

CRISPR/Cas9-System



Ohne Spuren zu hinterlassen

CRISPR/Cas9-System

Technisches Knowhow & Meilensteine :

- Primerdesign & Annealing
- Klonierung, molekularbiologische Tests und Sequenzierung
- Transfektion von Zellen o. ES-Zellen
- Genotypisierung
- Injektion in Embryos bei Maus
- Genotypisierung
- Weitere molekularbiologische, biochemische Untersuchungen

CRISPR/Cas9-System

Das System hat einen großen Vorteil, weil es aus **zwei Komponenten** besteht, aus CRISPR und aus Cas9 und funktioniert wie ein Laser, der spezifische Gene entfernt und ersetzen kann.

Das Cas9 ist ein Protein, das **universell** einsetzbar ist.

RNA-Moleküle - die an Stelle von CRISPR das Ziel definieren - können sehr **preiswert** (15-20 Euro) bei vielen Firmen einfach geordert werden.

Das System funktioniert in **Bakterien, Pflanzen, Tieren** und beim **Menschen**.

Zielzellen, **somatisch** o. **Keimbahn** ?

Eingriffe in die menschliche Keimbahn: In Deutschland (**noch**) gesetzlich verboten.

CRISPR/Cas9-System

Gene Editing-Technologie mit dem System:

Seit 2015 Realität !

Direkte Gentherapie & Prävention z.B. bei HIV-Therapie über T-Zell-Rezeptoren.

Therapie in menschlichen Embryonen (**China**): β -globin gene HBB, β -thalassemia.

CRISPR/Cas9-System

Anwendungsgebiete: Medizin, Landwirtschaft, Pharma und Umwelt

-  Rote Gentechnik → Diagnostik, Therapie & Forschung
-  Grüne Gentechnik → Pflanzenzucht & Tierzucht
-  Weiße Gentechnik → Medikamente, Enzyme & Wirkstoffe
-  Graue Gentechnik → Bioremediation
-  Sicherheit & Risiken → Nützlichkeit & Nebenwirkungen ?
-  Ethische Fragen → Der unbedingte Wille zur Wahrheit & Missbrauch ?