



Genome Editing: Naturwissenschaftlicher Sachstand

Jörg Vogel

Institute for Molecular Infection Biology, University of Würzburg, Germany

www.imib-wuerzburg.de



Anlass für die Stellungnahme

Prinzipien des genome editing

Anwendung des genome editing

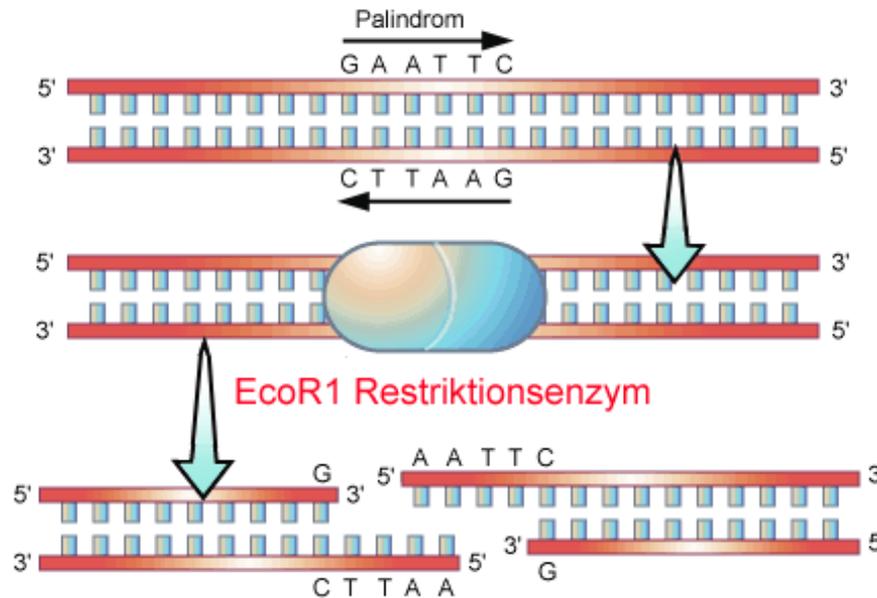
- **Grundlagenforschung**
- **Biotechnologie und Pflanzenzüchtung**
- **Die Gene-drive-Methode**
- **Medizinische Anwendung**
- **Eingriffe in die menschliche Keimbahn**

Konsequenzen und Empfehlungen

Molekulare Werkzeuge

Natürliche Genscheren

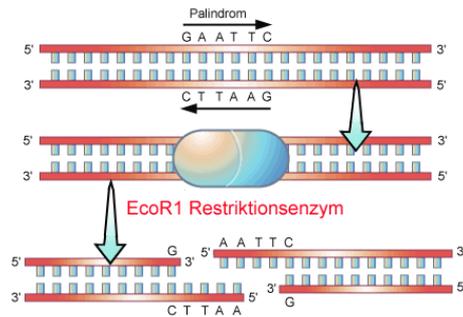
Restriktionsendonukleasen



Molekulare Werkzeuge

Natürliche Genscheren

Restriktionsendonukleasen

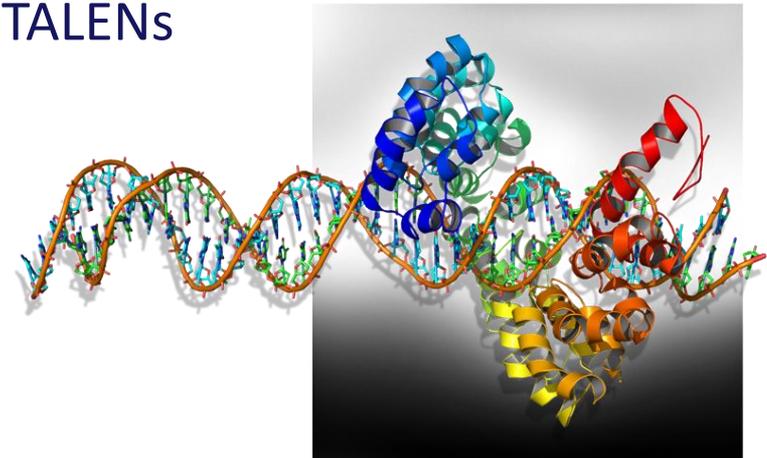


Künstliche Genscheren

Zinkfinger nukleasen



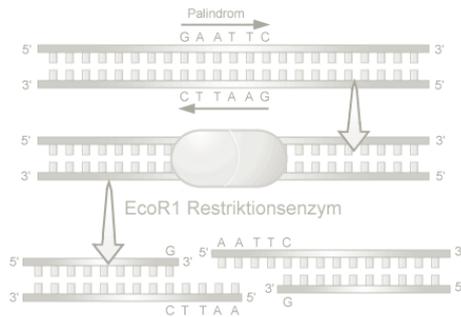
TALENs



Molekulare Werkzeuge

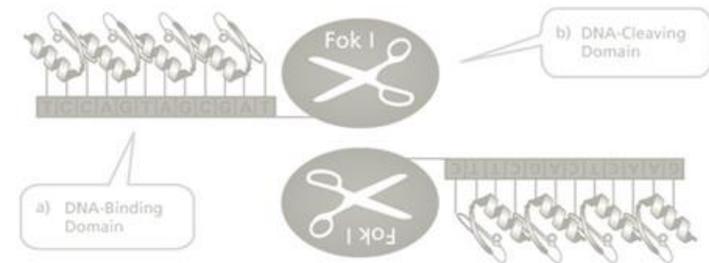
Natürliche Genscheren

Restriktionsendonukleasen

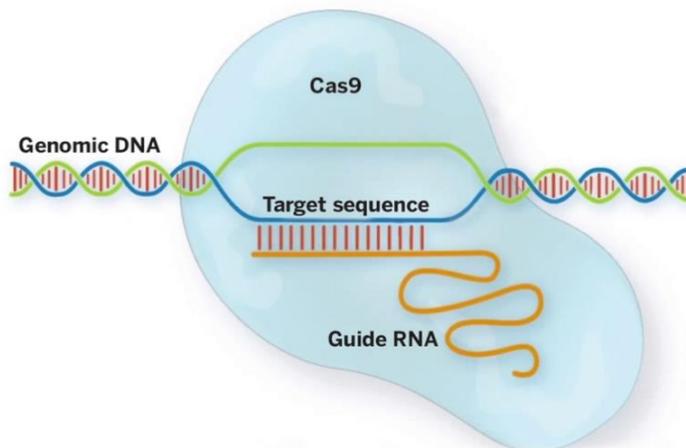


Künstliche Genscheren

Zinkfinger nukleasen



CRISPR-Cas9



TALENs



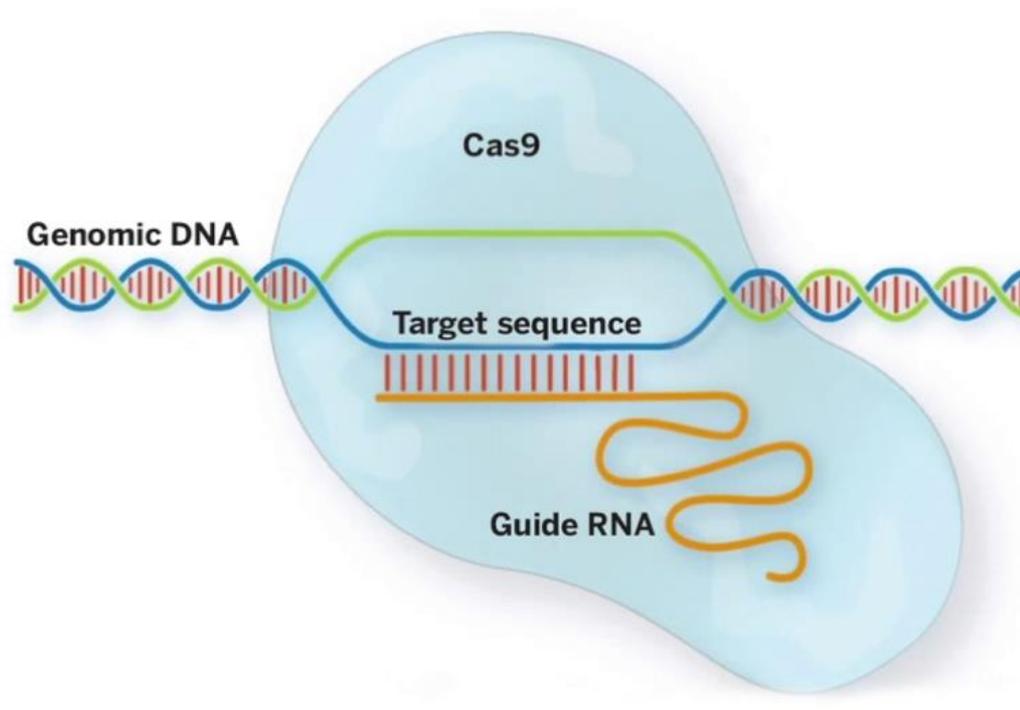
CRISPR-Cas9

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

Cas: *CRISPR-associated proteins*

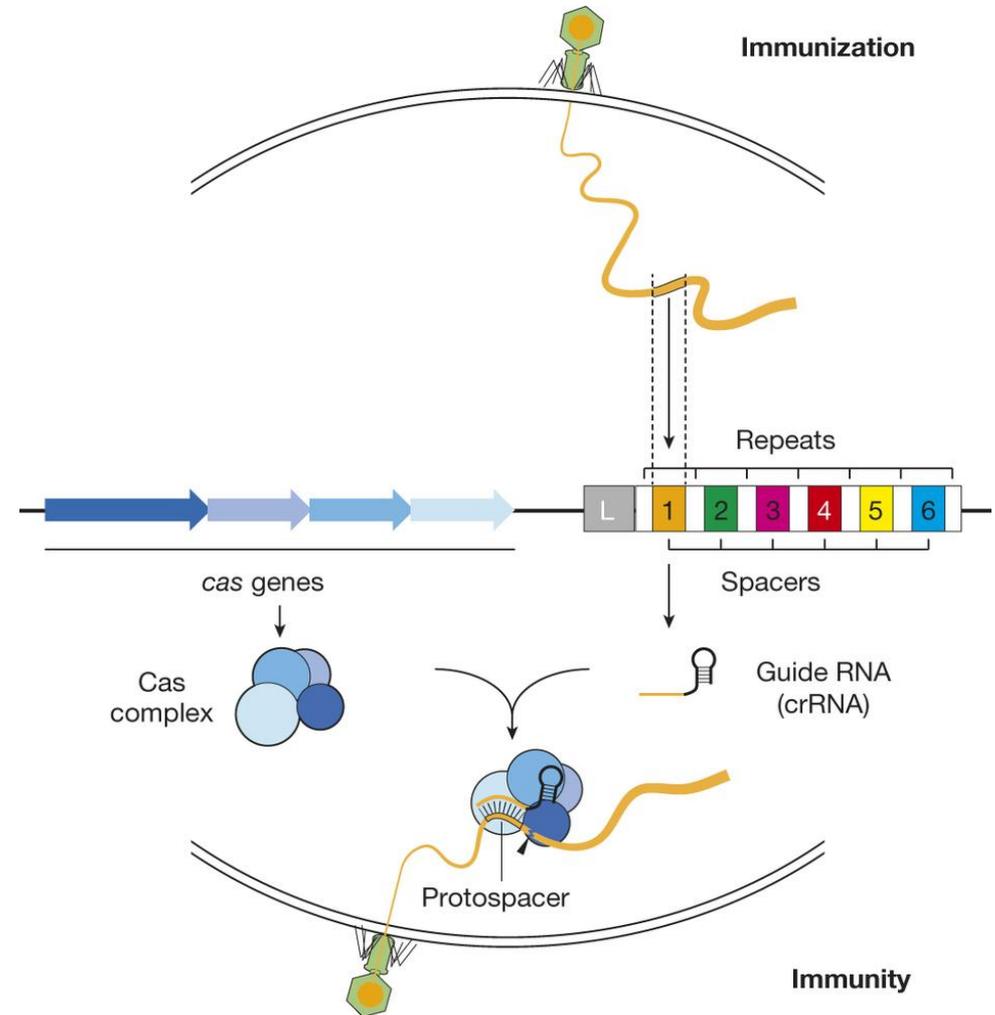
Natürliche Genscherer, mit Leit-RNA programmierbar (20 Basen-Sequenz)

Abwehrmechanismen von Bakterien gegen fremde DNA



CRISPR-Cas9

Bakterielles Immunsystem zur Abwehr von Phagen



CRISPR-Cas9

Cell

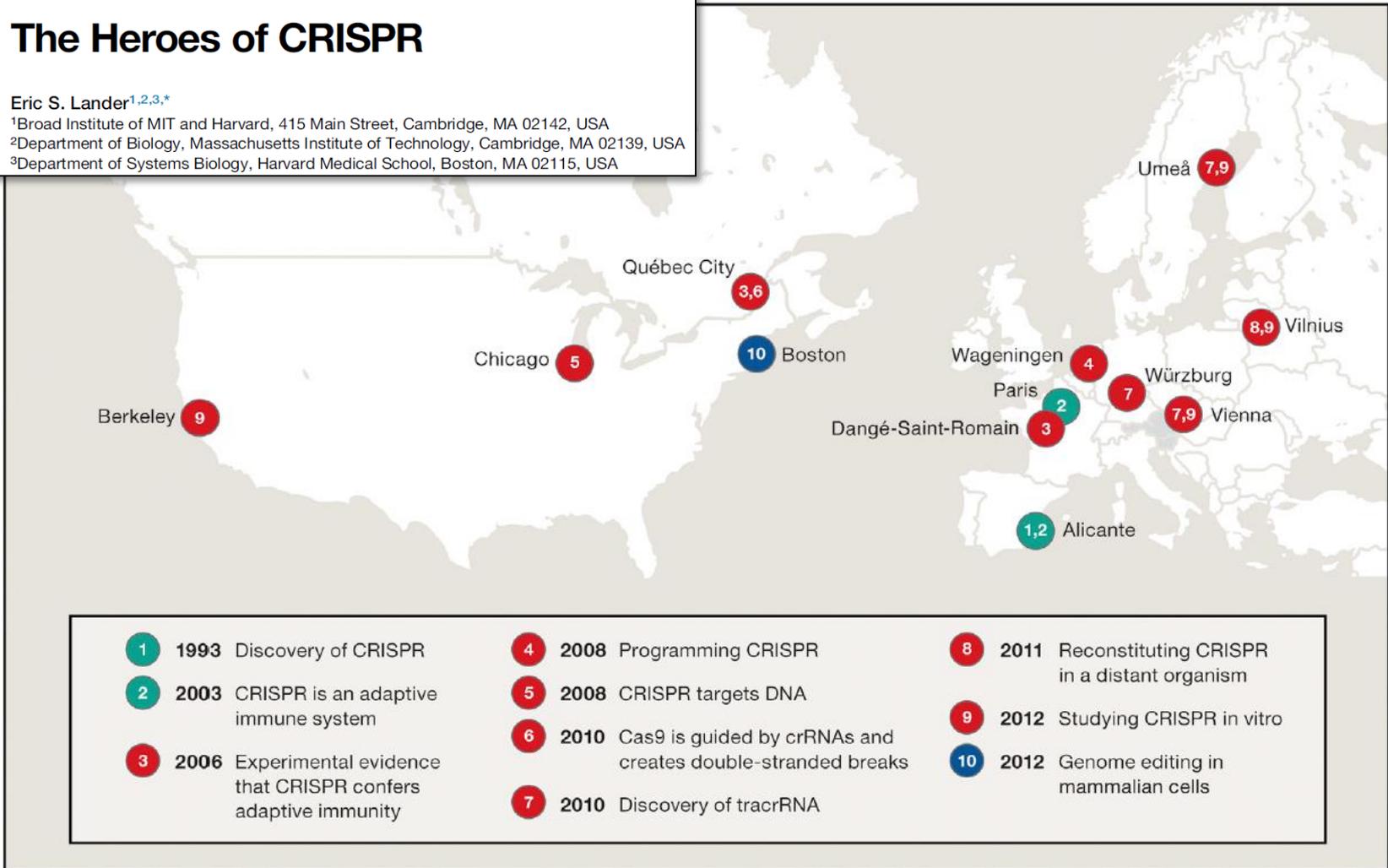
The Heroes of CRISPR

Eric S. Lander^{1,2,3,*}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, 415 Main Street, Cambridge, MA 02142, USA

²Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

³Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA



CRISPR-Cas9: Einsatz in der Grundlagenforschung

Bis vor kurzem wenige Modellorganismen

z.B. Bäckerhefe, Fruchtfliege, Fadenwürmer, Maus

CRISPR-Cas9 generisch anwendbar

Von diversen Mikroorganismen bis zu Affen (2014)

Schwer zugängliche Parasiten wie etwa *Cryptosporidium* (2015)

Schnelle genetische Manipulation, weniger Versuchstiere

Multiple Mutationen z.B. in der Maus innerhalb weniger Wochen

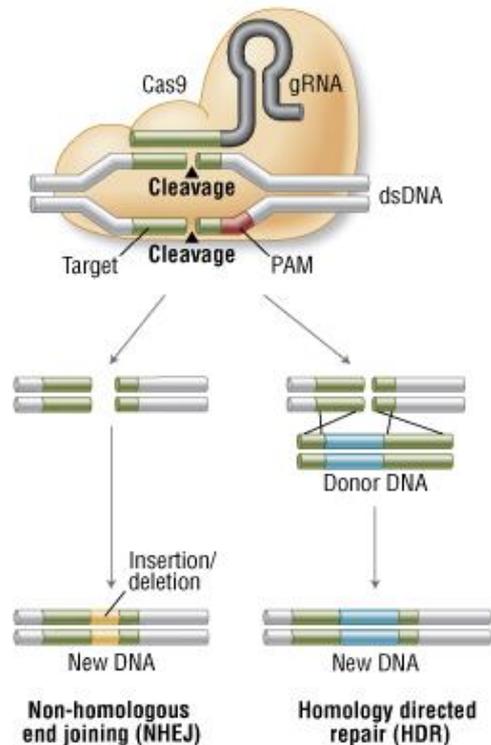
Multifaktorielle menschliche Erkrankungen (Morbus Alzheimer, etc.)

CRISPR-Cas9: Einsatz in der Grundlagenforschung

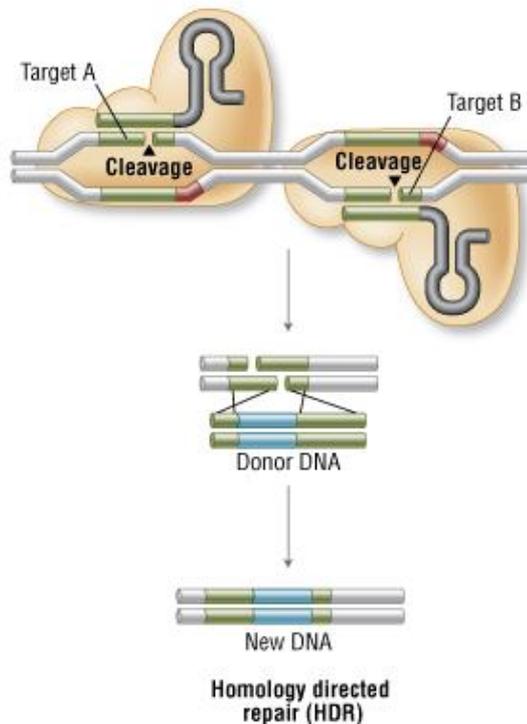
Diverse Typen von Veränderungen in der DNA

Deletionen, Insertionen von Fremd-Sequenzen, Korrektur einzelner Basen

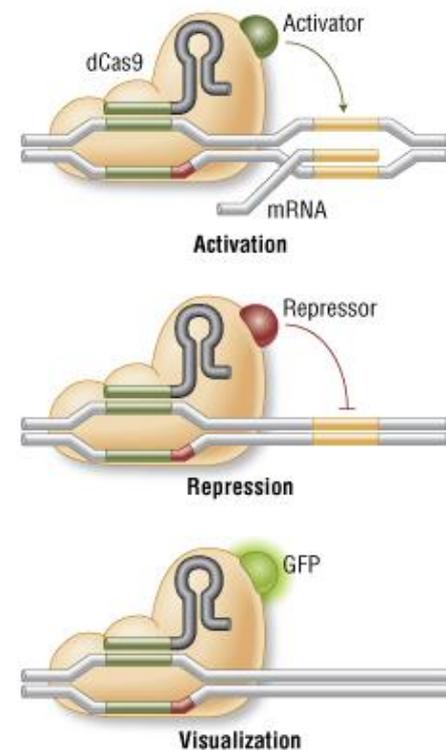
A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



B. Genome Engineering By Double Nicking With Paired Cas9 Nickases



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease



CRISPR-Cas9: Einsatz in der Grundlagenforschung

Diverse Typen von Veränderungen in der DNA

Deletionen, Insertionen von Fremd-Sequenzen, Korrektur einzelner Basen

Hohe Effizienz (Allele), kann “Infrastruktur” der Gentherapie nutzen

RNA-Interferenz, Formulierung, AAV-Vektoren

Cas9-Protein robust, toleriert Fusionsproteine

“Molekulare Fähre” in andere Labormethoden

CRISPR-Cas9: Anwendung in der Biotechnologie

Vielfältiger Einsatz in Biotechnologie und Pflanzenzüchtung

Hohe Zeit- und Kostenersparnis

Beispiele

- Hefe mit viel Mevalonat (Synthese von Krebsmedikamenten, Nahrungsergänzungstoffen und Antimalariamitteln)
- Hefe die Holzzucker (Xylose) abbaut -> Biotreibstoffproduktion
- Bakterienresistenter Reis, mehlttauresistenter Weizen
- Modellversuche in Mais, Tabak, Kartoffel, Soja, Tomate, Orange, ...

Attraktive Alternative zu konventioneller Gentechnik: **no GMO!**

- *Keine Fremdsequenzen von Bakterien oder Viren*
- *Entfernt Fremdsequenzen*

- Ergebnis *nicht unterscheidbar*
von Chemikalien/Strahlung

- *ZKBS-Beschlüsse zu*
Zinkfingernukleasen

Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation

A fungus engineered using CRISPR-Cas9 can be cultivated and sold without oversight.

BY EMILY WALTZ

The US Department of Agriculture (USDA) will not regulate a mushroom that has been genetically modified with the gene-editing tool CRISPR-Cas9, the agency has confirmed. The long-awaited decision means that the mushroom can be cultivated and sold without passing through the agency's regulatory process — making it the first CRISPR-edited organism to receive a green light from the US government.

“The research community will be very happy with the news,” says Caixia Gao, a plant biologist at the Chinese Academy of Sciences Institute of Genetics and Developmental Biology in Beijing, who was not involved in developing the mushroom. “I am confident we'll see more gene-edited crops falling outside of regulatory authority.”

Yinong Yang, a plant pathologist at Pennsylvania State University (Penn State) in University Park, engineered the fungus — the common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) — to resist browning. The effect is achieved by targeting the family of genes that encodes polyphenol oxidase (PPO), an enzyme that causes browning. By deleting just a hand-



The common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) has been modified to resist browning.

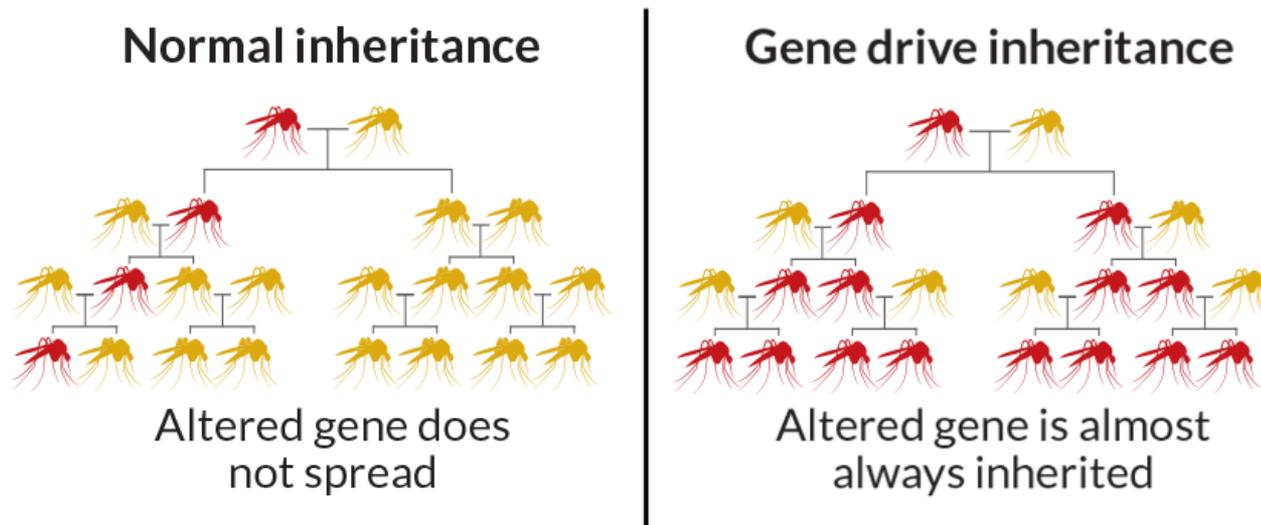
CRISPR-Cas9 und die *Gene drive*-Methode

Gene drive: >50% Übertragung einzelner Gene auf Nachkommen

Selten in der Natur (Transposons, endogene Viren in der Keimbahn)

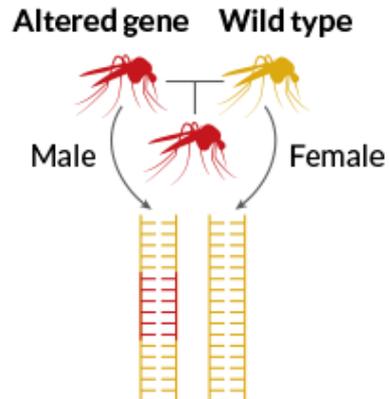
Möglicher Ansatz zur gezielten Veränderung von Schädlingpopulation

Malaria, Dengue-Fieber; invasive Arten wie Aga-Kröte, Ratten

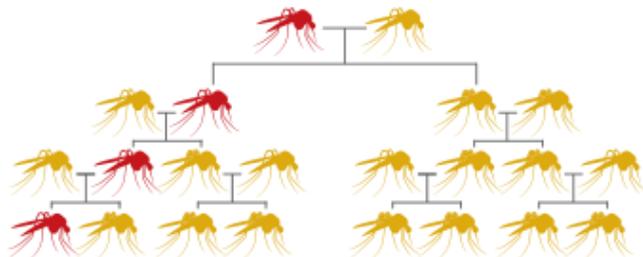


CRISPR-Cas9 und die *Gene drive*-Methode

Normal inheritance

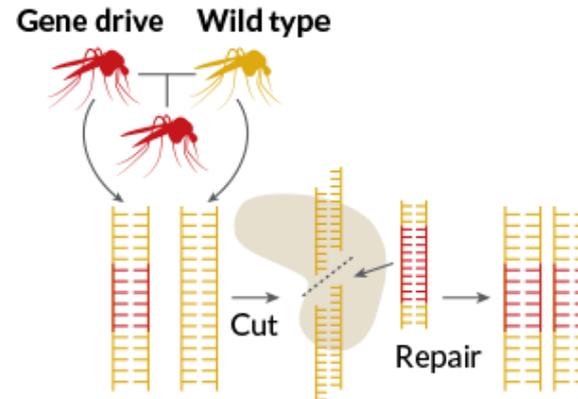


Altered gene without gene drive: One copy inherited from one parent. 50 percent chance of passing it on.

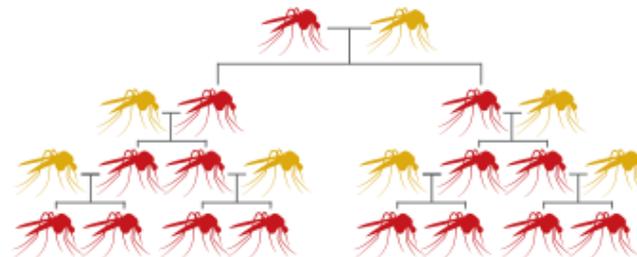


Altered gene does not spread

Gene drive inheritance



Altered gene as gene drive: One copy converts gene inherited from other parent. More than 50 percent chance of passing it on.



Altered gene is almost always inherited

CRISPR-Cas9 und die *Gene drive*-Methode

Ziel: *Anopheles*-Mücken die Malaria-Erreger nicht übertragen können

- “Mutagene Kettenreaktion” im Fruchtfliegenmodell erfolgreich
- Genetisches Element auf Basis von CRISPR-Cas9
- Durchdringung einer Mückenpopulation in 10-20 Generationen
- Feldversuch?
- Risiko für Ökosysteme?



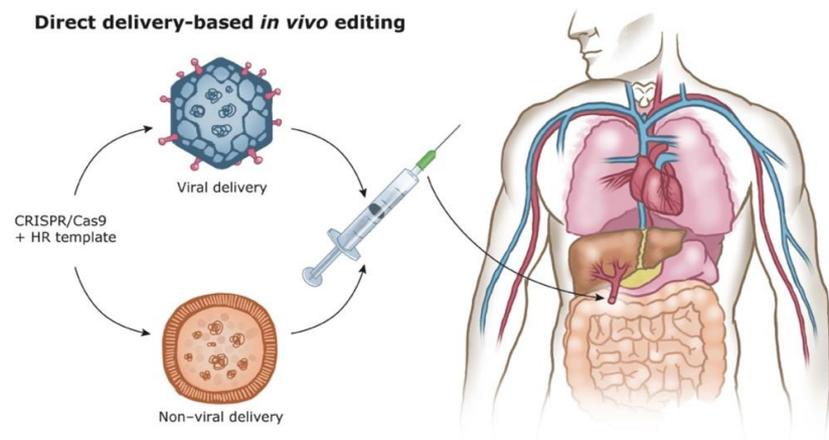
Jill George, NIH

CRISPR-Cas9: Anwendung in der Medizin

Erste Erfolge in der Medizin, nicht-übertragbare Krankheiten

Tyrosinämie: Korrektur erblicher Stoffwechsel-Mutation in adulten Mäusen (2014)

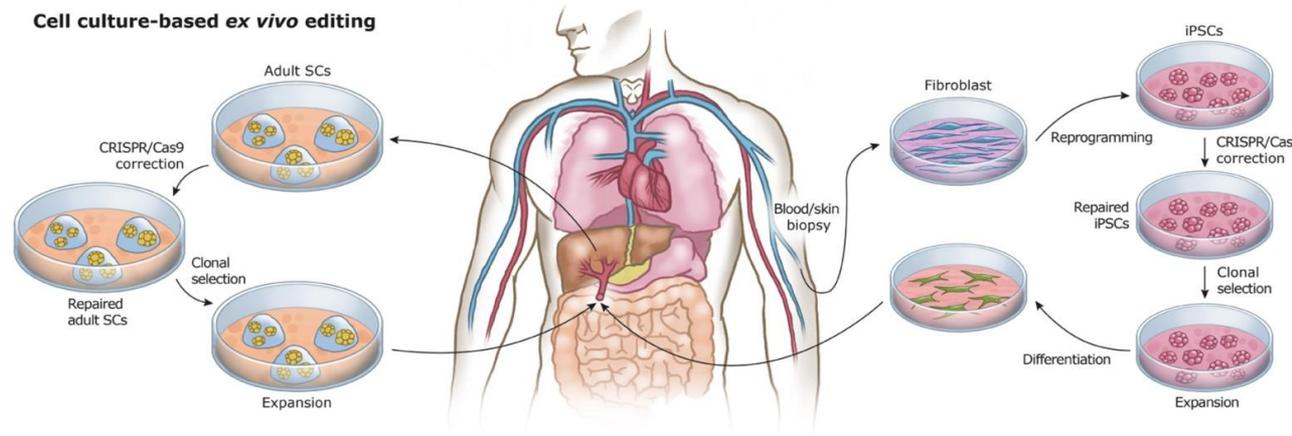
Direct delivery-based *in vivo* editing



DMD (Duchenne) in der Maus:

Keimbahn (2014), postnatal (2016)

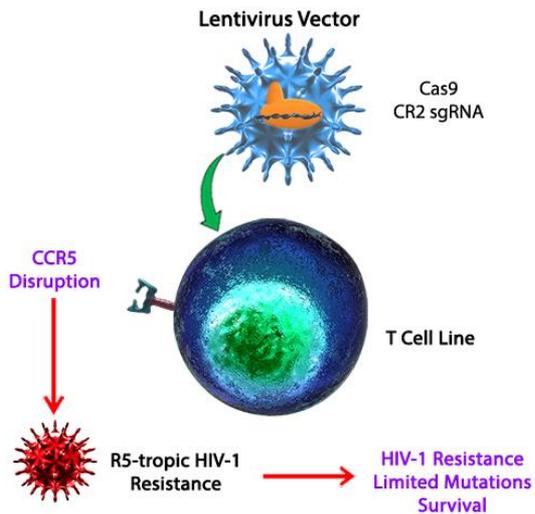
Cell culture-based *ex vivo* editing



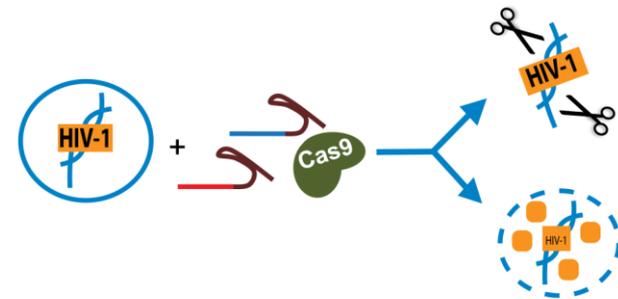
CRISPR-Cas9: Anwendung in der Medizin

Erste Erfolge in der Medizin, Infektionskrankheiten

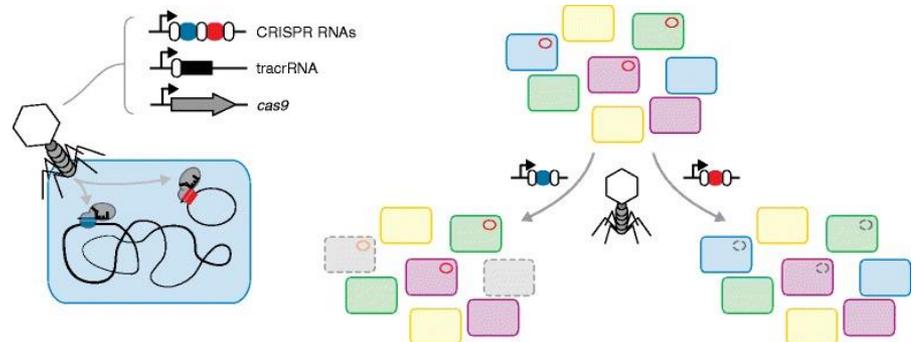
2014: Verändertes CCR5-Gen in
Blutstammzellen, HIV-Resistenz



2016: Aktivierung von HIV im Genom;
HIV-DNA aus Genom geschnitten



2015: Antibiotikaresistenz, Bakterien



CRISPR-Cas9: Eingriffe in die menschliche Keimbahn

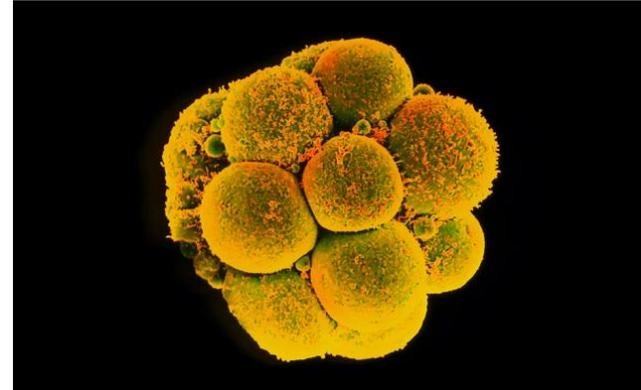
Genome Editing an menschlichen Embryonen

Zwei Arbeiten in China (2015, 2016)

Triprounukleare Embryonen

- *Beta-Globulin-Gen, Thalassämie*

- *CCR5-Mutation, HIV-Resistenz*



Wichtige Erkenntnisse zur momentanen Ineffizienz des Verfahrens

Hohe *off-target*-Rate

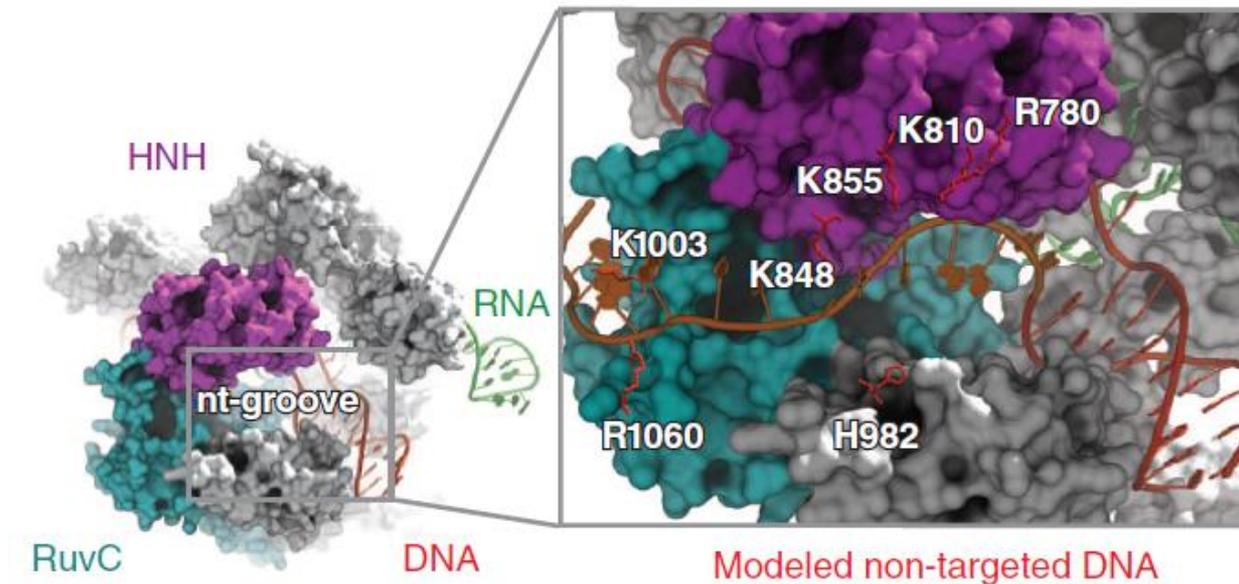
Bessere Chancen in gesunden Embryonen?

Genome Editing für den Menschen

CRISPR-Cas9: Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie denkbar

Einfachheit, Verfügbarkeit, Präzision, Tempo, Infrastruktur

Strukturbiologie, Pharmazeutische Forschung



Genome Editing für den Menschen

Reversibilität?

Humanspezifische Fehler?

Synthetische Biologie

Systembiologische Vergleiche an Embryonen

Alternative Enzyme: CRISPR-Cas9 anderer Bakterien, Cpf1

