
Bernburg
Dessau
Köthen



Hochschule Anhalt
Anhalt University of Applied Sciences

FB Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik (BWP)

***„DAS CRISPR/CAS9-SYSTEM-EIN WERKZEUG
ZUR GENOM-EDITIERUNG UND
GENREGULATION“***

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Engineering

(B.Eng.)

Von: Juanjuan Kang

Mat.-Nr: 4055940

Studiengang: Biotechnologie

1. Gutachter: Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert
2. Gutachter: Herrn Prof. Dr. Heun Georg

Köthen, 15.02.2017

Abstract

Based on the acquired immune system of bacteria, a new artificial endonuclease CRISPR-Cas9 (clusters regularly interspaced short palindromic repeat) was engineered in 2013 has recently been developed. Genregulation, Targetiing and Genome-Editing are main branches applications of biogenetics and genetic engineering. By changing the genome of organsims plants can be made more resistant against plant disease or animals can produce more flesh meat. For some of these mutations only a few changes in the nucleotid sequence of the genome is necessary. The CRISPR-Cas9-system has some advantages over other artificial endonucleases targets in the genome or a more cost-effective production. Nevertheless, Many many studies describe so called the off-target-effects which lead to an unwanted undesired mutation at a false an unspecific target. Diverse influencing factors are described. Amongst others, I go into detail about the length and specificity of the PAM-sequence, the concentration of Cas9-sgRNA-complex and the chromatin-function. Different approaches like a mutant of CRISPR-Cas9 which has different cutting-activities are pursued developed to minimize these off-target-effects. The CRISPR-Cas9-system has some promising characteristics, nevertheless However ,it is important to conduct perform more experiments and studies to establish this system in genetic research and to apply it in clinical research as well. In this thesis I describe the different aspects of the origin, the principle, the application and the problems of the CRISPR-Cas9-system.

In den letzten Jahren konnte eine weitere künstliche Endonuklease CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) entwickelt werden, die basierend auf dem erworbenen Immunsystem von Bakterien modifiziert wurde. Genregulation, Targeting und Genome-Editing spielen in der heutigen Gentechnik eine wichtige Rolle. Mithilfe genetischer Veränderungen konnten resistenterere Pflanzen und Tiere mit verstärktem Muskelfleischaufbau gezüchtet werden. Zum Teil benötigen derartige Veränderungen nur eine kleine Änderung der Nukleotid-Sequenz des Erbguts. Das CRISPR-Cas9-System bietet mehrere Vorteile gegenüber anderer künstlicher Endonukleasen, wie zum Beispiel eine sehr hohe Zielverteilung im Genom oder eine kostengünstigere Herstellung. Aber Studien beschreiben auch die sogenannten Off-Target-Effekte welche eine Mutation an ungewollter Stelle hervorruft. Eine Untersuchung dieses Effektes zeigte, dass mehrere Einflussfaktoren eine Rolle spielen. Hier gehe ich unter anderem auf die Länge und Spezifität der PAM-Sequenz, die Konzentration des Cas9-sgRNA-Komplexes und die Chromatin-Funktion ein. Es werden diverse Strategien verfolgt, wie der Off-Target-Effekt minimiert werden kann. Dafür wurden zum Beispiel Mutanten hergestellt, welche veränderte Schnitt-Aktivität aufweist. Das CRISPR-Cas9-System hat einige vielversprechende Eigenschaften, allerdings müssen noch weitere Studien und Experimente folgen, um das CRISPR-Cas9-System in der Genforschung zu etablieren und auch in klinischer Forschung anwenden zu können. In dieser Arbeit beschreibe ich detailliert die einzelnen Aspekte der Herkunft, des Prinzips, der Anwendung und der Probleme des CRISPR-Cas9-Systems.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung in fachlichen Fragen sowie bei der Gestaltung dieser Bachelorarbeit herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungen und Formelzeichen	6
Abbildungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Genome-Editing	9
1.2 Genregulation und Targeting	9
1.3 Die Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen	10
1.4 Künstliche Endonukleasen	12
2 Aufgabenstellung und Zielsetzung	14
3 Die drei Typen der CRISPR/Cas-Systemen	15
3.1 Die drei Phasen jeder CRISPR/Cas – Systeme	15
3.1.1 Phase 1: Akquisitionsphase	16
3.1.2 Phase 2: Bearbeitungsphase	18
3.1.3 Phase 3: Interferenzphase	20
3.2 Das CRISPR-Cas9-Typ II System.....	21
3.2.1 Die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systemes.....	21
3.2.2 Die Struktur des CRISPR/Cas9-Systemes.....	23
3.2.3 Die Funktionsweise des CRISPR-Cas9- Systemes	24
3.2.4 Die Reparatur Mechanismen des CRISPR/Cas9 -Systemes	25
4 Anwendungen des CRISPR/Cas9-System.....	27
4.1 Anwendung in Gentherapieforschung	28
4.2 Anwendung bei Pflanzen	29
4.3 Anwendung bei Tieren.....	30
4.3.1 Forschungsprojekten.....	30
4.3.2 Kontrolle und Effizienz transgener Arten.....	32
5 Technische Probleme und Lösungsansätze	33

5.1	Off-Target-Effekte und deren Einflussfaktoren	33
5.1.1	Länge und Spezifität der PAM-Sequenz	33
5.1.2	Konzentration des Cas9-sgRNA Komplexes.....	34
5.1.3	Länge der sgRNA-Sequenz	35
5.1.4	Seed-Sequenz	35
5.1.5	Chromatin-Funktionen	36
5.2	Strategien zur Minimierung von Off-Target Effekten	38
5.2.1	Verbesserung der Gestaltung von sequenzspezifischer sgRNA	38
5.2.2	Steuerung der Konzentration des Cas9-sgRNA Komplexes	38
5.2.3	Anwendung der einzelnen Schnittaktivitäten des mutanten dCas9	39
5.2.4	Neue Cas9-Proteine	40
6	Zusammenfassung und Ausblick	41
7	Literaturverzeichnis	42
	Eidesstattliche Erklärung	1

Abkürzungen und Formelzeichen

CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
Cas9	CRISPR associated Protein 9
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
HR	Homologe Rekombination
NHEJ	Nicht-homologes End Joining
ZFN	Zink Finger Endonuclease
TALENs	Transcription activator-like effector nuclease
SSR	short sequence repeats
PAM	protospacer adjacent motif
gRNA	guided-RNA
crRNA	CRISPR-RNA
tracrRNA	trans-aktivierende crRNA
nt	Nucleotide
DSB	DNA doublestranded Break
SpCas9	Streptococcus pyogenes Cas9
DNMT	DNA Methyltransferase
Sam	s-adenosyl-methionin
CpG	Desoxycytidin – Phosphat – Desoxyguanosin

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 REPARATURMECHANISMEN VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN	11
ABBILDUNG 2 ÄHNLICHKEITEN VON ZINKFINGERNUKLEASE (ZFN) UND TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASE (TALEN)	13
ABBILDUNG 3 DIE DREI TYP CRISPR/CAS-SYSTEMEN.....	23
ABBILDUNG 4 FUNKTIONSWEISE DER VERSCHIEDENEN CRISPR-CAS9 SYSTEM TYPEN	17
ABBILDUNG 5 STRUKTUR DES CRISPR/CAS-LOCUS	19
ABBILDUNG 6 FUNKTIONSWEISE DES CRISPR-CAS9-TYP II SYSTEMS.....	24
ABBILDUNG 7 VERBINDUNG DER SGRNA MIT ZIELSEQUENZ	26
ABBILDUNG 8 SEED-SEQUENZ.....	36
ABBILDUNG 9 DNA METHYLATION	37
ABBILDUNG 10 SCHNITTAKTIVITÄTEN DES MUTANTEN DCAS9	39
ABBILDUNG 11 DCAS9-FOK I-FUSIONSPROTEIN.....	40

1 Einleitung

Vor wenigen Jahren hat sich im Bereich der Biologie ein neuer Zweig herausgebildet, der sich mit dem Erbgut, der DNA, des Menschen, von Tieren und Pflanzen beschäftigt. Eine Genmutation ist eine Form der Mutation, die durch eine Änderung der Nukleotidsequenz der Gene entsteht. Um Genprobleme zu lösen, spielt die Forschung der Gentechnik und damit die zielgerichtete Modifikation von Genen eine wichtige Rolle, von der man sich ebenfalls erhofft, genetische Krankheiten des Menschen behandeln zu können. Inzwischen arbeiten viele Wissenschaftler daran, die Erbinformation zu entschlüsseln und zu verstehen, sowie dieses neu gewonnene Wissen in Bereichen der Medizin, Nahrungsmittelherstellung und auf einigen anderen Gebieten einzubringen. Gentechnologie ermöglicht die gezielte Veränderung des Erbgutes von Organismen durch die Addition synthetischer oder artfremder Gene. Ein Gen ist der Träger von Erbinformationen, welche in verschiedenen Sequenzen, also der Abfolge von Nucleotiden, der DNA codiert sind. Die gesamte Erbinformation und damit alle Informationen die zur Entwicklung eines Lebewesens notwendig sind, wird auch als Genom bezeichnet.

Die DNA eines jeden Lebewesens besteht aus vier Bausteinen, den sogenannten Nucleotiden Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin (A, C, G, T). Letzteres wird in der RNA durch Uracil (U) ersetzt. Die Nucleotide sind in der DNA zu zwei langen Ketten verknüpft und bilden mit einer zweiten, entgegengesetzten DNA-Sequenz über Wasserstoffbrückenbindungen die typische Doppelhelix. In der DNA sind unter anderem die Informationen zur Herstellung von Proteinen codiert. Proteine bestehen aus einer bestimmten Abfolge und Anzahl von verschiedenen Aminosäuren. Es gibt verschiedene Methoden, um bestimmte Gene zu modifizieren.

1.1 Genome-Editing

Das Genome-Editing ermöglicht die zielgerichtete Veränderung der DNA. Für diese Methode muss zunächst die DNA an bestimmten Sequenzen geschnitten werden. Um eine doppelsträngige DNA an einer bestimmten Zielsequenz zu schneiden und damit Doppelstrangbrüche zu erhalten, werden in der Forschung verschiedene künstliche Endonukleasen verwendet. Nachdem Schneiden erfolgt grundsätzlich die Aktivierung von Reparaturmechanismen. Hierfür stehen zwei Hauptwege zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen zur Verfügung. Zum einen die homologe Rekombination (HR), welche eine fehlerfreie Reparatur durch den Sequenzabgleich mit einer homologen DNA-Region ermöglicht. Zum anderen das Nicht-homologe End-Joining (NHEJ) welches auf der einfachen Verknüpfung freier DNA-Enden beruht. Das NHEJ läuft sehr schnell ab, birgt allerdings auch das Risiko von Mikrodeletionen und verläuft daher nicht immer fehlerfrei. (Dorothee Deckbar, 2007.)

Der Prozess des Genom-Editings wird eingesetzt, um veränderte DNA in die Ziel-DNA einzusetzen, um Gene auszuschalten oder zu entfernen. In den letzten Jahren haben sich die Methoden der Genveränderungen verbessert und die Möglichkeiten haben besonders in der Grundlagenforschung einen hohen Stellenwert eingenommen.

1.2 Genregulation und Targeting

Als Genregulation bezeichnet man auch die Steuerung der Genexpression. Die Expression eines Gens erfolgt über mehrere Schritte. Ob und wann ein Gen abgelesen und das dort codierte Protein exprimiert wird, wird über verschiedene regulatorische Faktoren gesteuert. Mit Hilfe der Gen-Regulation kann die Expression eines bestimmten Gens zu einer bestimmten Zeit unterbunden werden. Gen-Targeting beschreibt somit die gezielte Genmodifikation in der Gentechnik.

1.3 Die Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen

Wie bereits erwähnt, können DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe zweier Reparaturwege beseitigt werden (Abb. 1). Der erste Weg ist die homologe Rekombination (HR). Für die HR wird ein DNA-Template benötigt welches homolog, also übereinstimmend, mit der zu reparierenden DNA-Sequenz ist. Natürlicherweise kommt die HR während der Synthesephase des Zellzyklus zum Einsatz (Capecchi 2005, Cui, Ji et al. 2011). Über diesen Weg können, neben der Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche, gezielt Mutationen in das Genom eingeführt oder auch Gene entfernt werden (Knock-out). Daher spielt dieser Prozess eine wichtige Rolle in der Gentechnik.

Der zweite Reparaturweg ist das sogenannte Non-homologous End-Joining. Dieser Reparaturmechanismus, welcher in Eukaryotischen Zellen betrieben wird und nicht zellzyklusabhängig ist, schließt sehr schnell den DNA-Doppelstrangbruch, gilt allerdings auch als ungenau und fehleranfällig. Häufig wird beobachtet, dass bei diesem Prozess sogenannte InDels, kleine Insertionen oder Deletionen einzelner Basen, gebildet werden (Lieber 2008).

Mithilfe eines Vektors, bestehend aus Genen für tracrRNA, cr-RNA und SpCas9 (transfiziert aus *Streptococcus pyogenes*), konnten mit dem CRISPR/Cas9-System gezielt mehrere DBS mit glatten Enden erzeugt werden (Cong, Ran et al. 2013). Diese Brüche werden in der Regel durch HR repariert.

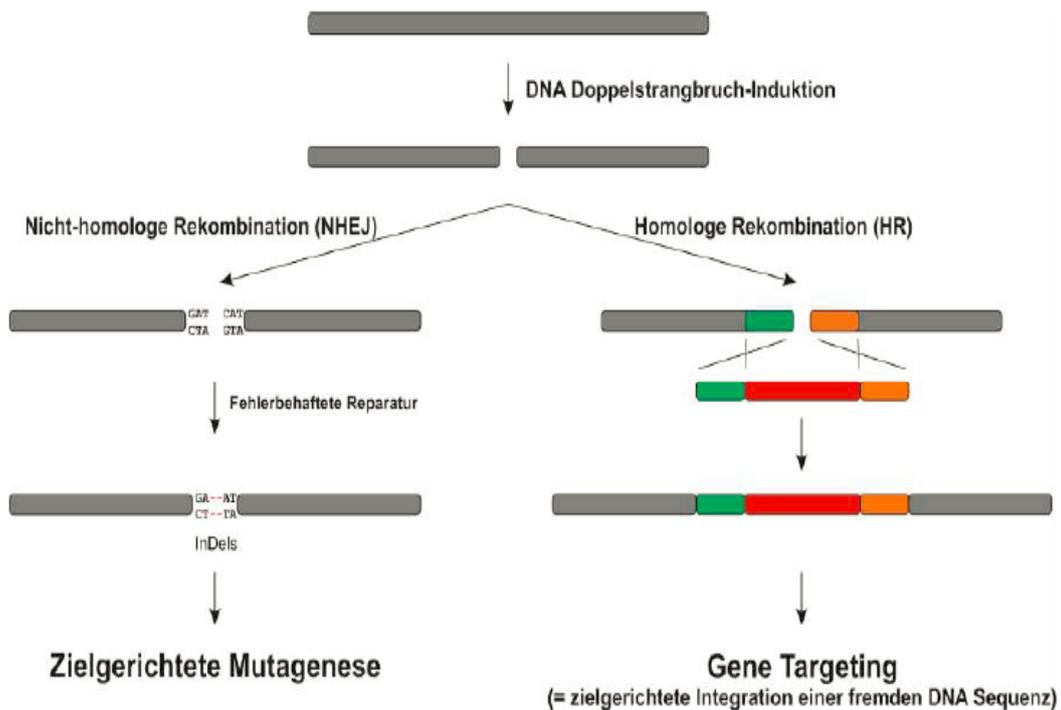


Abbildung 1 Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen

(Abbildung modifiziert nach Sander & Joung, Nature Biotechnology 2014). Ein DNA-Doppelstrang wird durch eine Nuklease gebrochen. Um den Bruch zu reparieren kommen zwei Reparaturmechanismen in Frage. Zum einen die Nicht-homologe Rekombination (NHEJ), welcher sehr schnell abläuft, jedoch als fehleranfällig gilt da es zu kleineren Deletionen oder Insertionen (InDels) kommen kann. Ein langsamerer Weg, aber dafür präziser ist die Homologe Rekombination (HR). Hierfür wird ein Template benötigt dessen Enden homolog zu den Enden der DNA-Bruchstelle sind (orange und grün). Zwischen diesen homologen Sequenzen kann eine beliebige Sequenz und damit ein beliebiges Gen (rot) in die DNA eingebaut werden.

Es kann eine Vielzahl chromosomaler Modifikationen mit dem CRISPR/Cas9-System erzeugt werden. Indels als Folge der NHEJ-Reparatur können zu Punktmutationen oder Leserasterverschiebungen führen. Indels und Leserasterverschiebungen führen aber nicht zwingend zu einem Gen-Knockout, da es sich um stille Mutationen handeln kann. Werden jedoch mehrere CRISPR-Konstrukte gleichzeitig verwendet, so kann es zu intra- sowie interchromosomalen Translokationen kommen. Bei der Generierung zweier DSB in einem Chromosom kann es neben Indel-Formationen zu genomischen Deletionen oder Inversionen kommen. Diese Mutationen können heterozygot oder homozygot sein; homozygote Modifikationen haben jedoch eine geringere Effizienz. Die Effizienz der Erzeugung chromosomaler Deletionen ist umgekehrt proportional zu ihrer Größe. (Xiao, Wang et al. 2013)

1.4 Künstliche Endonukleasen

Zinkfingernukleasen (ZFN) sind die erste Generation der künstlichen Endonukleasen. ZFN ist die Fusion eines Zinkfingerproteins mit einer DNA-bindenden Domäne und FOK I Endonuklease mit einer DNA-schneidenden Domäne (Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. 1996). Mit Hilfe der ZFN können an vorbestimmten Positionen bei verschiedenen komplexen Genomen doppelsträngige DNA hydrolysiert werden. Die Zinkfingerdomäne ist eine schleifenförmige Struktur innerhalb des Zinkfingerproteins, ein Zink-Ion hält sie zusammen. Allerdings ist die Herstellung der ZFN kompliziert und auch teuer und ihre Patente werden von einigen wenigen Unternehmen kontrolliert. Vor einigen Jahren wurde eine zweite Generation künstlicher Nukleasen entwickelt, welche die ZFN weitgehend ersetzt haben. Die Transcription Activator-like Effector Nucleasen (TALEN) können relativ einfach so designed werden, dass sie jede gewünschte Zielsequenz des Genoms erkennen.

TALENs sind künstlich hergestellte Restriktionsenzyme, welche an einer definierten Sequenz DNA schneiden können. Sie werden ähnlich wie die Zinkfingernukleasen zum gezielten Verändern von DNA eingesetzt, indem sie die jeweilige Zielsequenz im Genom erkennen und die DNA dort schneiden. An dieser Stelle können dann Gene ausgeschaltet, entfernt oder neue Gene eingebaut werden. Die Herstellung von TALENs ist recht aufwändig, da für jede neue DNA Bindungsstelle entsprechende TALENs konstruiert und hergestellt werden müssen. Sowohl ZFN als auch TALENs sind künstliche Nukleasen und nach dem gleichen Prinzip entstanden: die Verschmelzung eines DNA-bindenden Proteins mit der Endonuklease Fok I (Abb. 2).

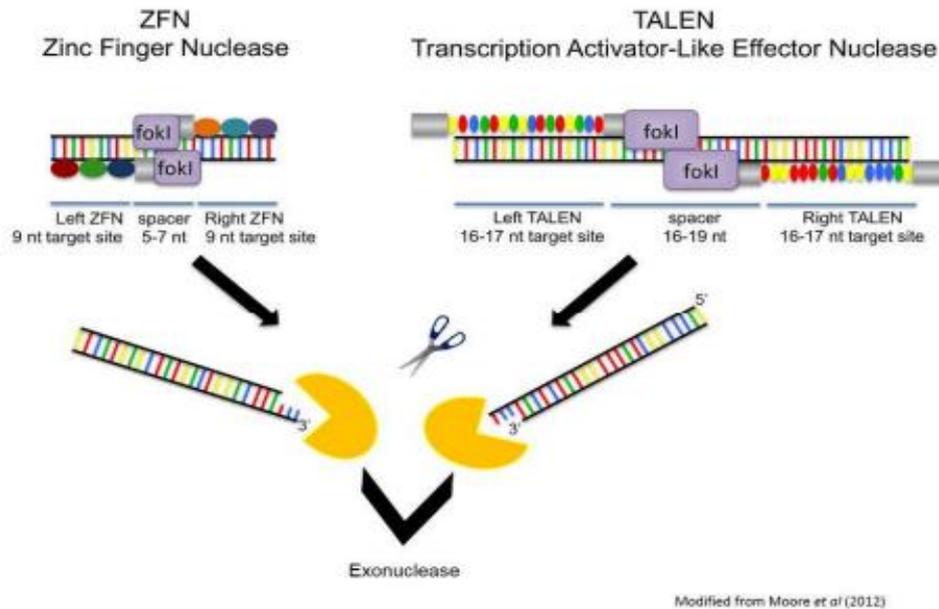


Abbildung 2 Ähnlichkeiten von Zinkfingernuklease (ZFN) und Transcription Activator-like Effector Nuclease (TALEN)

Sowohl ZFN als auch TALEN sind DNA-bindende Proteine welche mit der Endonuklease Fok I fusioniert sind. Die Endonuklease Fok I, welche sowohl bei TALEN als auch bei ZFN zum Einsatz kommt, schneidet die Ziel DNA an einer spezifischen Stelle. Dadurch entsteht ein DNA-Doppelstrangbruch und die geschnittene DNA wird durch eine Exonuklease abgebaut. ZFN haben insgesamt eine kürzere DNA-Ziel Sequenz. Sie binden an der zu schneidenden Stelle an 5-7 Nukleotiden, rechts und links dieser Stelle mit 9 Nukleotiden. TALENs haben hingegen bindet an deutlich mehr Nukleotiden. Die Spacer Sequenz umfasst 16 – 19 Nukleotide, rechts und links der Spacer-Sequenz bindet TALEN an 16 – 17 Nukleotiden.

Quelle: [http://2014.igem.org/wiki/images/2/2e/Captura_de_pantalla_2014-10-17_a_la\(s\)_20.55.52.png](http://2014.igem.org/wiki/images/2/2e/Captura_de_pantalla_2014-10-17_a_la(s)_20.55.52.png)

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Jahr 2013 konnte eine weitere Endonuklease CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) entwickelt werden, die basierend auf dem erworbenen Immunsystem von Bakterien modifiziert wurde. Ihre Besonderheit ist ihre einfache und kostengünstige Herstellung und ihre effiziente Wirkung.

Die Aufgaben sind :

- 1) Was ist die Prinzip des CRISPR/Cas9-System?
- 2) Welche Anwendungsbereiche kann man die CRISPR/Cas9-System anwenden?
- 3) Gibt es welche technische Problem und welche Lösungsansätze?

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Herkunft, das Prinzip und die Anwendungen des CRISPR-Cas9 Systems ausführlich vorzustellen.

3 Die drei Typen der CRISPR/Cas-Systemen

Die CRISPR/Cas-Systeme können in drei Arten, Typ I, Typ II und Typ III unterteilt werden, die je nach enthaltener Cas-Art unterschiedliche Gene in mehrere Untergruppen unterteilt werden (Makarova K S, Aravind L, Wolf Y I). Alle drei CRISPR/Cas-Systeme Typen haben die gleiche Aufgabe: Die Zelle zu verteidigen. Das heißt, sie machen das Erbmateriale des Virus unwirksam. Allerdings sind die Abläufe bei allen drei Typen unterschiedlich.

3.1 Die drei Phasen jeder CRISPR/Cas – Systeme

Grundsätzlich läuft der Prozess jedoch in drei Phasen, Akquisitionsphase, Bearbeitungsphase und Interferenzphase. Die Akquisitionsphase beinhaltet das Erkennen der PAM-Sequenz und das Einbauen des Protospacers in den CRISPR-Cas-Locus. In der Bearbeitungsphase wird eine pre-crRNA gebildet, welche den neu eingebauten Spacer bereits enthält. In der Interferenzphase wird die pre-crRNA in kürzere crRNA geschnitten. Diese fusioniert mit einem Cas-Protein und führt schließlich zu einer Bindung mit der Fremd-DNA und dessen Abbau (Abb. 4).

3.1.1 Phase 1: Akquisitionsphase

Die Nukleinsäure des eindringenden Elements (Phagen- oder Plasmid-DNA) tritt in die Zelle ein. Anhand des „Protospacer-adjacent-Motif“ (PAM), welches Bestandteil des eindringenden Virus oder Plasmids ist, wird sie sofort als fremde Nukleinsäure (Invader DNA) erkannt. PAM ist eine spezifische DNA-Sequenz von 2-6 Basenpaaren welche durch die Cas9-Nuklease im CRISPR-Bakterien-adaptiven Immunsystem bestimmt wird. Ein Stück der Invader DNA (der Protospacer) wird als neuer Spacer ausgewählt und in den CRISPR-Locus integriert. Das PAM gilt daher als Erkennungssequenz für das CRISPR-Cas9 System. Das Cas9 kann nicht erfolgreich an die Invader DNA binden und sie schneiden, wenn keine PAM Sequenz vorhanden ist (Shah SA, Erdmann S, Mojica FJ, Garrett RA (2013)). Die Auswahl eines neuen Spacer hängt von der Anwesenheit einer spezifischen Nachbarsequenz, dem protospacer-adjacent-Motiv (PAM) ab. Während des CRISPR-Cas Prozesses wird eine crRNA gebildet, welche komplementär zum Protospacer ist. Die Basenpaarung wird von den Cas-Proteinen erkannt und spezifisch geschnitten. Durch diesen Prozess wird die Invader DNA ausgeschaltet. Der Protospacer ist somit der DNA-Abschnitt der Fremd-DNA der sowohl in die prokaryotische CRISPR-DNA eingebaut (Akquisitionsphase), als auch von dem Cas-RNA-Komplex erkannt und abgebaut (Interferenzphase) wird. Die PAM, die sich nur in der Target-DNA befindet, ist eine wichtige Erkennungssequenz für das CRISPR-Cas9 System damit die Cas-Proteine nicht das eigene Erbgut angreifen. Dies bedeutet dass, falls sich ein Cas/crRNA-Komplex an einen DNA Abschnitt ohne PAM-Sequenz bindet, dieser nicht hydrolysiert wird. Die PAMs spielen eine essentielle Rolle bei den CRISPR-Cas9 Systemen Typ I und Typ II. Es wird angenommen, dass während des ersten Schrittes Cas1 und Cas2 Proteine die Protospacer im CRISPR-Locus durch Bildung von Spacern einbinden.

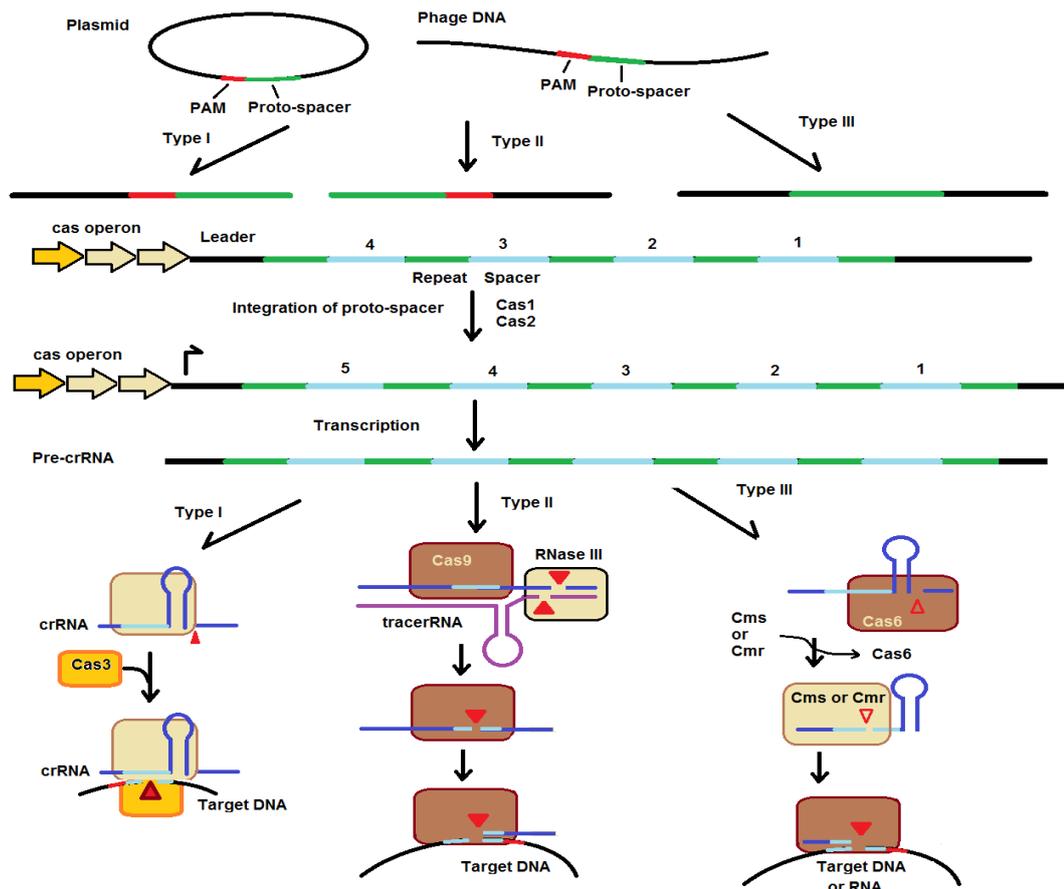


Abbildung 3 Die drei CRISPR/Cas-Systemen

CRISPR-Cas-Systeme wirken in drei Stufen: Akquisitionsphase, Bearbeitungsphase und Interferenzphase. Während Typ II und Typ III CRISPR-Cas-Systeme als Abwehrmechanismus für Phagen-DNA eingesetzt wird, greift Typ I bei eindringender Plasmid-DNA. Funktionsweise: Typ I und Typ II - Die Auswahl von Proto-Spacern, in eindringenden Nukleinsäuren, hängt von einem Protospacer-benachbarten Motiv (PAM) ab. Es wird angenommen, dass Cas1- und Cas2-Proteine während des ersten Schrittes die Proto-Spacer in den CRISPR-Locus einbinden und sie als Spacer in den Spacer-Repeat-Bereich einbauen. Während der Expression wird der CRISPR-Locus mit den Spacern (inklusive den neu eingebauten Spacern) abgelesen und es wird ein langes primäres CRISPR-Transkript (pre-crRNA) erzeugt. Im nächsten Schritt bindet der CRISPR-assoziierte Komplex für den antiviralen Verteidigungskomplex (Cascade) die pre-crRNA. Cas6- und Cas6f-Untereinheiten spalten die Pre-crRNA, um crRNAs mit einem typischen 8-Nukleotid-Repeat-Fragment am 5'-Ende und dem Rest des Repeat-Fragments zu erzeugen. Im Allgemeinen bildet das Repeat-Fragment eine Haarnadelstruktur auf der 3'-Flanke aus. Typ-II-Systeme verwenden eine trans-codierte kleine RNA (tracrRNA), die mit dem Repeat-Fragment der Pre-crRNA paart. Nach der Bindung spaltet der Cas9 RNase III-Komplex die RNA innerhalb der Repeats. Während der Reifung werden die Spacer in einem festen Abstand innerhalb der Spacersequenz gespalten.

Bei Typ III-Systemen startet Cas6 die Verarbeitung von crRNA. In einem nächsten Schritt scheint crRNA auf einen anderen Cas-Komplex namens Cms in Subtyp III A und Cmr in Subtyp III B übertragen zu werden. In Subtyp III B wird das 3'-Ende von crRNA weiter getrimmt. Die eindringende Nukleinsäure wird während des Interferenzschrittes gespalten.

Quelle: <http://www.biosyn.com/tew/Chemically-Modified-Nucleic-Acids-for-CRISPR-Cas.aspx>

3.1.2 Phase 2: Bearbeitungsphase

In der Bearbeitungsphase wird bei allen Typen ein langes primäres CRISPR-RNA (pre-crRNA) aus dem gesamten CRISPR-Lokus mit den Spacern hergestellt. Die Repeat-Sequenzen bilden dabei Haarnadelstrukturen aus. Die lange pre-crRNA wird zu kurzen crRNAs verarbeitet, welche jeweils spezifisch für eine einzelne Invadersequenz sind. Im nächsten Schritt bindet die pre-crRNA mit Cas Protein zum CRISPR-assoziierte Komplex welcher dann die Target DNA schneidet (Abb. 5).

Typ I: Beim Typ I CRISPR-Cas System wird die pre-crRNA an der Basis der Haarnadelstrukturen mit Hilfe eines Cas-Protein-Komplexes (Cascade) geschnitten. Dadurch entsteht eine crRNA welche mit Cas3 fusioniert, hinter der PAM-Sequenz an die Fremd-DNA bindet und diese an der Zielstelle schneidet.

Typ II: Neben der crRNA wird beim Typ II auch eine weitere RNA, die tracrRNA (transcodierte sRNA) gebildet. Diese ist komplementär zu den Repeatsequenzen der pre-crRNA und lagert an diesen an. Die pre-crRNA wird an der Basis der Haarnadelstrukturen mit Hilfe der RNase III geschnitten und bindet an das Cas9. Dieser Cas9/crRNA/tracrRNA Komplex bindet im nächsten Schritt an die Fremd-DNA und schneidet diese (Abb. 6).

Typ III: Das Cas6 Protein, eine spezifische Endoribonuklease, schneidet die pre-crRNA an der Basis der Haarnadelstrukturen. Die daraus entstehende crRNA fusioniert mit dem Cas10-Komplex und wird am 3' Ende weiter verkürzt. Eine Transkription der Zielsequenz ist notwendig, damit der Cas10-Komplex die Fremd-DNA schneiden kann.

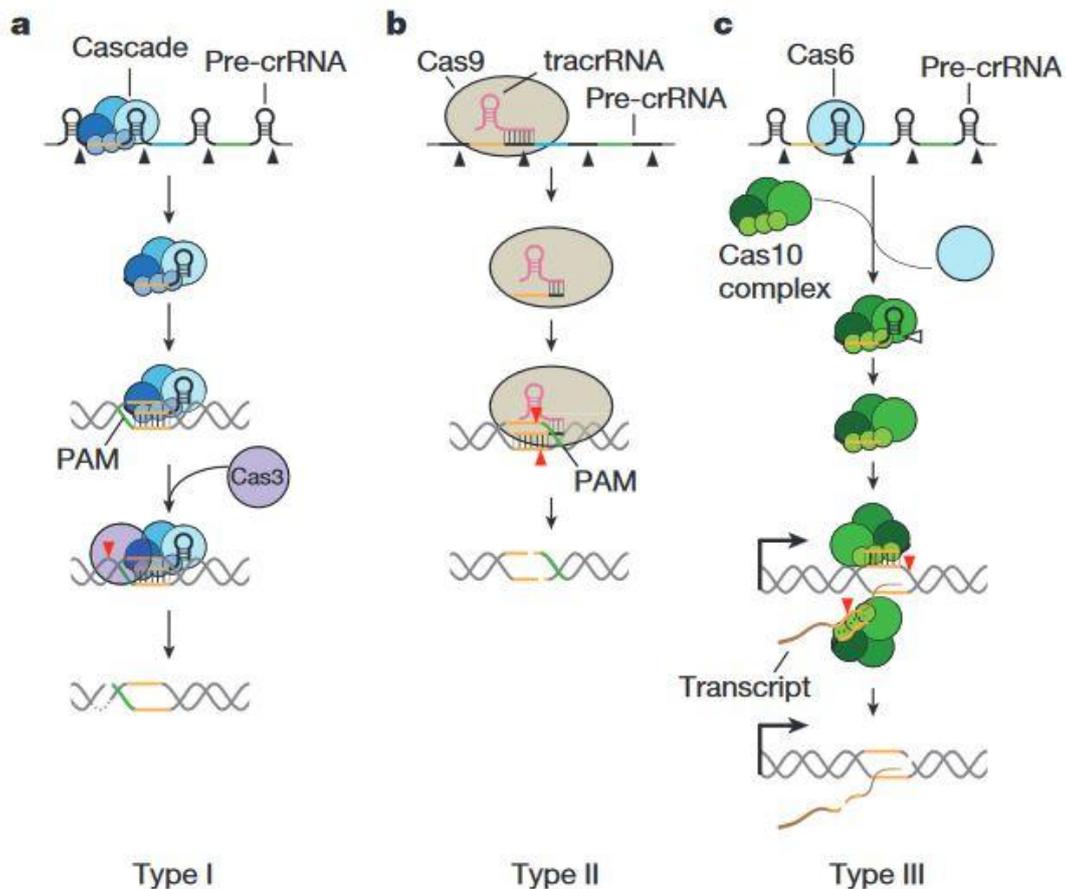


Abbildung 4 Funktionsweise der drei CRISPR-CasSystem Typen

Die pre-crRNA wird mit Hilfe eines Cas-Protein-Komplexes (Cascade) an der Basis der Haarnadelstrukturen des Spacer-Repeat-Bereichs geschnitten. Dieser Schritt generiert eine kurze führungs-crRNA welche anhand der PAM-Sequenz die eindringende Fremd-DNA erkennt und an dieser bindet. Das Cas3-Protein fusioniert mit diesem Komplex und schneidet die DNA hinter der PAM Sequenz und baut ebenfalls den gegenüberliegenden DNA-Strang ab. **B – Typ II Systeme)** Die tracrRNA, welche von Cas9 gebunden wird, beinhaltet einen Sequenzbereich welcher komplementär zu den Repeatsequenzen der pre-crRNA ist und lagert sich an diese an. Die pre-crRNA wird von RNase III geschnitten um eine crRNA zu generieren, welche die Cas9 Nuklease zu der Invader DNA führen kann. Der daraus entstehende Komplex aus crRNA, Cas9 und tracrRNA kann dann an die Ziel-Sequenz der eindringenden DNA binden und diese schneiden. **C – Typ III Systeme)** Die pre-crRNA wird mit Hilfe des Cas6 Proteins (eine spezifische Endoribonuklease) an der Basis der Haarnadelstrukturen des Spacer-Repeat-Bereichs geschnitten. Die so entstehende crRNA fusioniert mit dem Cas10-Komplex und wird am 3' Ende weiter verkürzt. Die Ziel Sequenz der Fremd-DNA muss transkribiert werden damit der Cas10-Komplex die DNA schneiden kann (Maraffini, L.A., et. al. 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes)

3.1.3 Phase 3: Interferenzphase

Cas-Proteine zusammen mit crRNA erkennen die Invader DNA während der Abwehrreaktion. Die Spacersequenz der crRNA bildet Basenpaare mit der Invadersequenz, von der sie sich ableitet, und hybridisiert mit ihr. Dies macht die Abwehrsequenz spezifisch. Die eindringende Nukleinsäure wird während des Interferenzschritts gespalten.

Typ I: Bei Typ I-Systemen leitet die crRNA den Kaskade-Komplex zu Targets, die komplementäre DNA enthalten. Das Cas3-Protein soll die eindringende DNA spalten. Darüber hinaus wird angenommen, dass PAMs für die Zielerkennung eine wichtige Rolle spielen.

Typ II: Bei Typ II Systemen bleibt Cas9 mit dem tracrRNA/crRNA Duplex verbunden bis die Invader-DNA gebunden und degradiert ist. Dieser Vorgang erfordert PAMs.

Typ III: Es wird angenommen, dass bei Typ III-A Systemen ein Cmr-Komplex gebildet wird, der zusammen mit der crRNA Invader-DNA erkennt und abbaut. Typ III-B Systeme stellen eine Ausnahme dar, da bei ihnen der Cmr-Komplex Invader RNA erkennt und abbaut. (Yingjun Li, Saifu Pan, Yan Zhang, Min Ren, Mingxia Feng, Nan Peng, Lanming Chen, Yun Xiang Liang, and Qunxin She; Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing)

Zitat: www.biosyn.com Chemically Modified Nucleic Acids for Crisper-Cas

3.2 Das CRISPR-Cas9-Typ II System

Das bakterielle CRISPR-Cas9-System ist typische System von Typ II CRISPR/Cas-System. In meine Arbeit wird dieses System genau vorgestellt .

3.2.1 Die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systemes

Um das CRISPR/Cas9-System und dessen Funktionsweise zu verstehen, ist es wichtig zu wissen, wo das CRISPR/Cas9-System entdeckt wurde und wie es funktioniert. Bakterien und Archaeen existieren schon ungefähr tausende Jahre. Die Lebens- und Überlebensfähigkeit aller Organismen hängt von ihrer Fähigkeit zur ständigen Anpassung an die Veränderungen ihrer dynamischen Umgebung ab. Bakterien werden nicht nur durch Umweltfaktoren wie beispielsweise Temperaturschwankungen oder wechselnde Nährstoffangebote, sondern auch durch horizontalen Gentransfer beeinflusst. Durch Konjugation (Übertragung von Plasmid) oder Transduktion (Infektion mit Bakteriophagen) kann die interzelluläre Übertragung von DNA stattfinden (Thomas, C.M., Nielsen, K.M., 2005).

Mancher horizontaler Gentransfer kann für das Überleben und die Anpassung der Zelle vorteilhaft sein. So werden beispielsweise Antibiotikaresistenzen oder die Fähigkeit zum Abbau toxischer Substanzen erworben und ausgetauscht, um die Zerstörung der Zelle durch eine Infektion zu verhindern (Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005).

Virus ähnliche Partikel besitzen eine hohe Mutationsrate und haben damit eine große genetische Variabilität (Brüssow, H., Hendrix, R.W., 2002). Als Folge des Selektionsdrucks durch diese vielfältige und übermächtige Bedrohung haben Bakterien und Archaeen eine Vielzahl verschiedener Abwehrmechanismen entwickelt, die teilweise einen beträchtlichen Teil des Genoms einnehmen und an vielen Punkten des viralen Lebenszyklus angreifen (Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Snir, S., Koonin, E.V., 2011). Erfolgreiche Abwehrmechanismen müssen mehrschichtig sein und die Fähigkeit haben, mit variablen und sich schnell entwickelnden Räubern fertig zu werden. 1987 wurden im Genom von *Escherichia coli* Bakterien ungewöhnliche repetitive Sequenzen (Repeats) entdeckt, welche sich mit nicht repetitiven Sequenzen (Spacer) abwechseln (Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata 1987). Die durch einzigartige Sequenzen unterbrochenen repetitiven Einheiten wurden

am Anfang als short sequence repeats (SSR) bezeichnet (Van Belkum, A., S. Scherer, L. van Alphen and H. Verbrugh 1998). Einige Jahre später wurde die genauere Bezeichnung CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) eingeführt (Jansen, R., J. Embden, W. Gaastra and L. Schouls 2002b). Neben den CRISPR Regionen wurden CRISPR assoziierte Gene entdeckt, die nur in Organismen mit CRISPR repeats vorkommen (Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin and S. Ehrlich 2005). Das CRISPR/Cas9-System basiert auf der Unterscheidung von eigener und fremder Nukleinsäure. Die Spacersequenzen sind ein wichtiger Bestandteil des mikrobiellen adaptierten Immunsystems, da sie homolog zu den genomischen DNA-Sequenzen von Viren und Phagen sind. Nach einem Virusbefall wird ein Teil der viralen DNA in das mikrobielle Genom integriert und verbleibt dort als Spacer. Der experimentelle Nachweis für CRISPR als adaptierter Abwehrmechanismus wurde 2007 erbracht. Es konnte gezeigt werden, dass nach einem Phagenbefall neue Spacer-Sequenzen in das Bakteriengenom eingefügt werden und die Bakterien danach immun gegenüber Phagen mit den entsprechenden Protospacern sind (Barrangou, Fremaux et al. 2007). Neben den Spacern sind die Cas-Gene entscheidend, da nach ihrer Inaktivierung die Immunität nicht mehr vorhanden ist (Barrangou, Fremaux et al. 2007).

3.2.2 Die Struktur des CRISPR/Cas9-Systemes

Jedes CRISPR/Cas-Locus besteht aus zwei wichtigen Teilen, die CRISPR assoziierten Gene (CRISPR-Cas Gene) und das Repeat-spacer Array. Das typische Repeat-spacer Array besteht aus einem Leader-Bereich und palindromischen Repeat Sequenzen, die durch unterschiedliche Spacersequenzen unterbrochen sind (Abb. 2). Die Spacersequenzen stammen aus der Fremd-DNA der Viren. Je nach CRISPR/Cas-System und Organismus kann dabei die Anzahl der einzelnen Repeat Spacer-Einheiten von einigen wenigen bis hin zu mehreren variieren. Auch die Länge der CRISPR Repeats kann zwischen 23 bis 55 Nukleotiden differieren (Mojica, F. M. and R. Garrett 2013). Der Leader-Bereich fungiert als Promotor und bewirkt die Transkription in eine lange Vorläufer-RNA (Pre-RNA), die dann mit Hilfe der Cas-Proteine prozessiert wird.

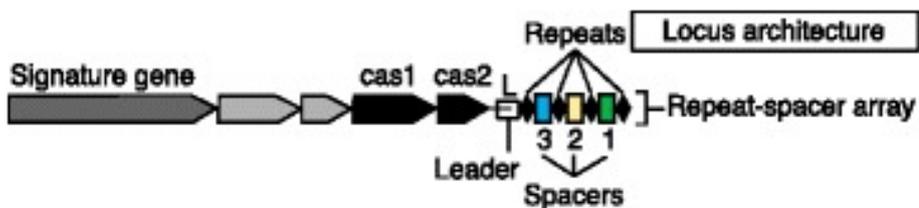


Abbildung 5 Struktur des CRISPR-Cas Locus

Ein CRISPR/Cas-Locus besteht aus mehreren palindromischen Repeats welche sich mit Spacem abwechseln. Die Spacer sind Teile fremder DNA (aus Plasmiden oder Viren) welche in den CRISPR-Cas Locus eingebaut werden. Daher kann die Größe des Repeat-Spacer-Bereichs stark variieren. Flankiert wird dieser Repeat-Spacer-Bereich durch cas-Protein-codierende Gen.

Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4638107/figure/Fig1/>

3.2.3 Die Funktionsweise des CRISPR-Cas9- Systemes

Nach der Virusinfektion wird in der CRISPR-DNA ein neuer Spacer eingefügt. Die tracrRNA, welche von Cas9 gebunden wird, beinhaltet einen Sequenzbereich welcher komplementär zu den Repeatsequenzen der pre-crRNA ist und lagert sich an diese an. Die pre-crRNA wird von RNase III geschnitten um eine crRNA zu generieren, welche die Cas9 Nuklease zu der Invader DNA führen kann. Die pre-crRNA wird in „reife“crRNA umgewandelt. Der daraus entstehende Komplex aus crRNA, Cas9 und tracrRNA kann dann an die Ziel-Sequenz der eindringenden DNA binden und diese schneiden. (Deltche va E, Chylinski K, Sharma CM,et al.)Das Bakterium zerstört das eingedrungene Virus, indem mithilfe der „passenden“crRNA und Cas9 das genetische Material des Virus zerschnitten wird.

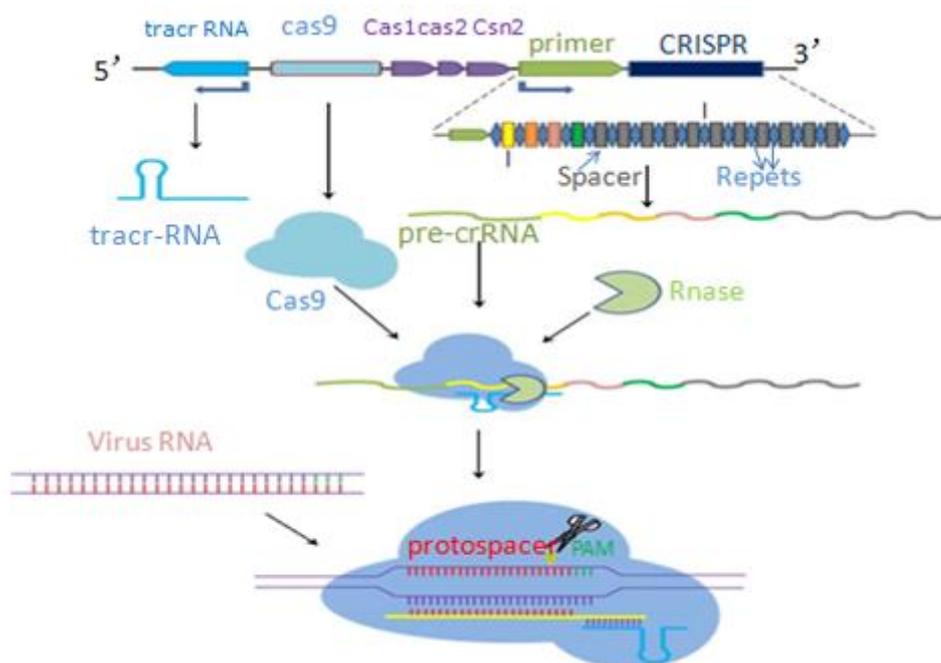


Abbildung 3 Funktionsweise des CRISPR-Cas9-Typ II Systems

Die tracrRNA, welche von Cas9 gebunden wird, beinhaltet einen Sequenzbereich welcher komplementär zu den Repeatsequenzen der pre-crRNA ist und lagert sich an diese an. Die pre-crRNA wird von RNase III geschnitten um eine crRNA zu generieren, welche die Cas9 Nuklease zu der Invader DNA führen kann. Der daraus entstehende Komplex aus crRNA, Cas9 und tracrRNA kann dann an die Ziel-Sequenz der eindringenden DNA binden und diese schneiden. (Deltche va E, Chylinski K, Sharma CM,et al.)

3.2.4 Die Reparatur Mechanismen des CRISPR/Cas9-Systemes

Das bakterielle CRISPR/Cas9-System vom Typ II besteht aus einer RNA-geführten Nuklease (Cas9) und einer kurzen guided-RNA (gRNA). Das bakterielle CRISPR/Cas9-System vom Typ II erzeugt ortsspezifische DNA-Brüche.

Diese werden durch endogene zelluläre Mechanismen repariert. Ein solcher Mechanismus kann mehrere Ergebnisse erzielen:

1. Mutagene nicht-homologische Endverbindungen (NHEJ),
2. Erzeugung von Insertionen oder Deletionen (Indels) am Bruchort
3. Genaue Änderung einer genomischen Sequenz durch Homologe Rekombination (HR).

Die Leit-RNA besteht aus zwei RNAs, CRISPR-RNA (crRNA) und trans-aktivierender crRNA. Die trans-aktivierende crRNA (tracrRNA) kann mit einer chimären, single guide RNA (sgRNA) kombiniert werden. Die sgRNAs sind typischerweise 100 Nukleotide (nt) lang. Zwanzig Nukleotide am 5'-Ende hybridisieren mit einer Ziel-DNA-Sequenz durch Watson-Crick-Basenpaarung. Diese Hybridisierungsreaktion leitet die Cas-Endonuklease, um die genomische Ziel-DNA zu spalten. Die verbleibende doppelsträngige Struktur an der 3'-Seite ist entscheidend für die Cas9-Erkennung.

Das CRISPR-System ist ein von vielen Bakterien verwendeter Immunmechanismus, um sich vor fremden Nukleinsäuren wie Viren oder Plasmiden zu schützen. (Horvath P, Barrangou R. CRISPR-Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science. 2010) Das CRISPR-Cas9 System enthält Sequenzen eingedrungener DNA als Spacer-Sequenz zwischen den Repeat-Sequenzen. Die CRISPR Repeat-Spacer-Sequenz wird zu CRISPR-RNA (crRNA) transkribiert, die jeweils eine variable Sequenz enthält. Jede crRNA hybridisiert mit einer transaktivierenden RNA (tracrRNA) und diese zwei RNAs bilden einen Komplex mit den Cas9-Nukleasen. Der protospacer-codierte Teil der crRNA leitet Cas9 dazu an, komplementäre DNA-Sequenzen zu spalten, wenn sie an PAM Sequenzen angrenzen. Allerdings werden die Protospacer-Sequenzen, die in den CRISPR-Locus eingebaut sind, nicht gespalten, da sie nicht neben einer PAM-Sequenz liegen. Als ersten Schritt zum Genome Editing wird ein DNA doublestranded Break (DSB) hergestellt. Die einfachste und am weitesten verbreitete Form der

Genombearbeitung ist die Einführung der zwei Komponenten Cas9 Nuklease und gRNA. Die gRNA besteht aus der Fusion einer crRNA mit einer konstanten tracrRNA (Abb. 7).

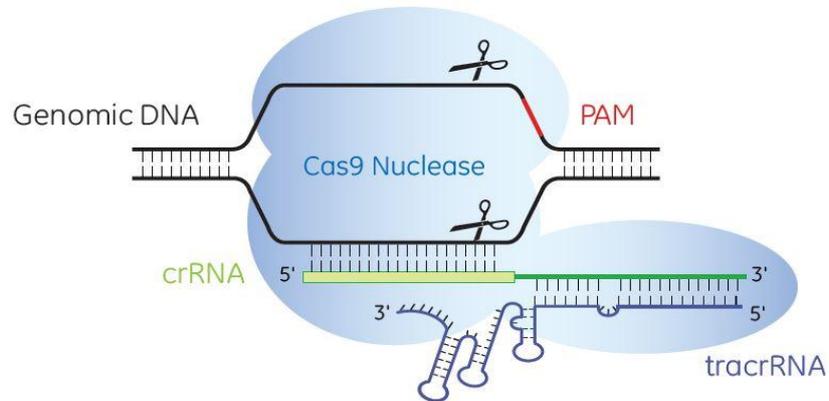


Abbildung 4 Verbindung der sgRNA mit Zielsequenz

Der crRNA/Cas9 Komplex bindet mit Hilfe der sgRNA an die Fremd-DNA direkt hinter der PAM Sequenz. Die Cas9 Nuklease schneidet daraufhin die Fremd-DNA.

Quelle: <http://dharmacon.gelifesciences.com/gene-editing/crispr-cas9/crispr-guide-ma/lentiviral-sgrna/>

4 Anwendungen des CRISPR/Cas9-System

Die CRISPR-Cas9-Technologie kann prinzipiell in allen Bereichen der Biologie angewendet werden, weil der genetische Code in allen Lebewesen –inklusive Prokaryoten, Viren und Pflanzen– derselbe ist. Die Funktion des CRISPR-Cas9-Systems ist ähnlich wie die der Restriktionsendonuklease. Sein sequenzspezifisches Schneiden ist abhängig von der Erkennung der Protospacer in der Zielsequenz durch den Ribonukleo-Komplex, welcher zusammengesetzt ist aus der spezifischen crRNA und dem Cas-Protein. Die Eigenschaften des CRISPR-Cas Systems werden genutzt und CRISPR-Cas9 als künstliche Endonuklease hergestellt. Die künstliche Endonuklease kann so entworfen und programmiert werden, dass sie an den zu bearbeitenden interessanten Genen bindet. Somit kann sie nahezu jeden beliebigen Ort eines Genoms punktgenau ansteuern und dort einen Schnitt setzen. Dies ermöglicht in einem weiteren Schritt den zielgerichteten Austausch, Veränderung oder die Entfernung einzelner DNA-Bausteine bis hin zu ganzen Nukleotid-Abfolgen. Aufgrund der Effizienz und der praktischen Vorteile des CRISPR-Cas9 Systems, wurde es in kürzester Zeit in den verschiedensten Bereichen angewendet. Obwohl die Forschung des CRISPR-Cas9 System noch in der Anfangsphase steckt, findet es bereits in Landwirtschaft und industriellen Bereichen Anwendung. In der Gentherapieforschung und an zahlreichen Schnittstellen von Biologie und Medizin wird das CRISPR-Cas9-System auch genutzt.

4.1 Anwendung in Gentherapieforschung

Gentherapie bezeichnet die gezielte Einführung von Genen mit Hilfe geeigneter Übertragungsmethoden in Zellen von kranken Organismen mit dem Ziel der Heilung oder therapeutischen Besserung.

Die CRISPR-Cas9 Technologie konnte bereits bei vielen Modellorganismen erfolgreich angewendet werden, von Drosophila bis Menschenaffe über Maus und Zebrafisch. Mit dem Ziel der Gentherapie wurde mittels CRISPR/Cas9-System die Korrektur von Mutationen in kultivierten Zellen bereits erfolgreich durchgeführt (Mali, P. et al.). Der Biotechnologe Daniel Andersen und seine Mitarbeiter vom Massachusetts Institute of Technology in Cambridge zeigten letztes Jahr, wie sie mit Hilfe des CRISPR-Cas9-Systems eine Mutation bei einer Maus korrigieren konnten, die mit der beim Menschen bekannten Stoffwechselerkrankung Tyrosinaemie assoziiert ist (Yin, H, et al.). Dies war die erste Korrektur einer krankheitsverursachenden Mutation in erwachsenen Tieren mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems und ein wichtiger Schritt in Richtung des Einsatzes dieser Technologie in der Gentherapie beim Menschen. Für große Aufregung unter den Wissenschaftlern und Biotechnologen sorgte zuletzt die Vorstellung CRISPR könne die Entwicklung in der Gentherapie beschleunigen. Aber der große Aufwand dieser potenziellen Methode ist nicht zu unterschätzen. Um das Cas9-Enzym und seine gRNA in die Leber als Zielorgan des Versuchstieres einzubringen zu können, mussten die Forscher große Mengen Flüssigkeit in die Blutgefäße injizieren. Außerdem wurde die Mutation nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz korrigiert, was prospektiv bei vielen Krankheiten nicht ausreichen wird.

Im April 2015 haben chinesische Wissenschaftler Arbeiten zum Genome-Editing an menschlichen Embryonen publiziert (Liang P et al. (2015)). Die Forscher hatten bei diesem Vorhaben bewusst Embryonen ausgewählt, die nicht entwicklungsfähig und zuvor bei künstlicher Befruchtung aussortiert wurden. Um das Potential der CRISPR/Cas9 Methode zu untersuchen, sollte an den nicht entwicklungsfähigen Embryonen eine Mutation in das Beta-Globin-Gen eingeführt werden. Mutationen in diesem Gen führen zu der autosomal rezessiv erblichen Blutbildungsstörung Thalassämie, welche in China häufig vorkommt.

Viele Wissenschaftler geben aber auch zu bedenken, dass sehr viel Forschung, Arbeit und Aufwand betrieben werden muss, bevor das CRISPR/Cas9-System sicher und wirksam eingesetzt werden kann. So muss zunächst noch die Effizienz des Genome-Editings gesteigert

werden, dabei sollte jedoch gewährleistet werden, dass keine gleichzeitigen Änderungen an anderer Stelle des Genoms herbeigeführt, welche die Gesundheit des Patienten gefährden könnten. "Die Enzyme schneiden nicht nur an der vorgesehenen Stelle, was eine Menge Folgen haben kann", weiß Haber. "Wenn man das Sichelzellgen in einer Stammzelle ersetzen möchte, müsste man sich erst einmal fragen, welchen Schaden man damit an anderer Stelle im Genom anrichten könnte."

4.2 Anwendung bei Pflanzen

Forscher haben einen neuen Weg gefunden, Pflanzen gegen Viren resistent zu machen. Dafür nutzen sie Genome-Editing mit der CRISPR/Cas9-Methode. Die Forscher haben im Labor gezeigt, dass der Abwehrmechanismus auf Pflanzen übertragen werden kann, um die gezielt vor bestimmten Viren zu schützen. Forscher haben das Gen für die DNA-Schere und spezifische DNA-Sequenzen von Viren, die Pflanzenkrankheiten verursachen, in das Pflanzengenom eingeführt. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass die Pflanzen nach diesem Prozess gegen diese Viren resistent waren. Ein bekanntes Problem bei Viren ist, dass sie häufig mutieren. Durch Mutationen in der Erkennungssequenz können die Viren die Resistenz überwinden, da das Immunsystem der Pflanze die veränderte DNA nicht mehr erkennt. Aber auch dieses Problem lässt sich mit der neuen Methode effizient lösen. Ein großer Vorteil dabei ist es, dass mehrere verschiedene DNA-Vorlagen gleichzeitig in die Pflanze eingebracht werden können. Ein Virus müsste dann gleichzeitig an allen diesen Stellen mutieren um vom Immunsystem nicht mehr erkannt zu werden. Eine solche Mutation ist sehr unwahrscheinlich. Zudem lassen sich die Erkennungssequenzen nachträglich verändern oder ergänzen. Es können so auch Resistenzen gegen mehrere Viren gleichzeitig erzeugt werden. Die Methode wurde bisher aber nur an Modellpflanzen unter Laborbedingungen getestet. Ob dieser Mechanismus auch unter Feldbedingungen genügend Schutz bietet, wird sich noch zeigen müssen (<http://www.naturwissenschaften.ch/service/news/52762-mit-crispr-lassen-sich-pflanzen-gegen-viren-impfen>).

4.3 Anwendung bei Tieren

Bereits 1980 gelang es zum ersten Mal, einen neuen DNA-Abschnitt in das Genom einer Maus zu integrieren. Nach zwei Jahren gaben die Forscher bekannt, dass die Mäuse schneller wuchsen und größer wurden. (Transparenz Gentechnik) Trotz dieser frühen Erfolgsmeldungen gibt es bis heute keine gentechnisch veränderten Nutztiere, die Milch, Fleisch oder Eier für die menschliche Ernährung liefern. Das liegt vor allem daran, dass die seit damals üblichen Verfahren, um transgene Individuen zu erzeugen, bei großen Säugetieren zu wenig effizient sind. Mit wenigen Ausnahmen hat sich die Gentechnik in der praktischen Tierzucht nicht etablieren können. Doch das könnte sich schon bald ändern. In den letzten Jahren haben Molekularbiologen in lebenden Zellen natürliche Mechanismen entdeckt und dann zu neuen Verfahren weiterentwickelt, mit denen gezielt einzelne DNA-Bausteine im Erbgut umgeschrieben werden können. Sie sind nicht nur viel genauer und kontrollierter als die klassische Gentechnik, sondern sie erfordern auch deutlich weniger Zeit und Kosten. Diese Verfahren – oft als Genome Editing bezeichnet – funktionieren im Prinzip in allen Organismen – bei Tieren genau wie bei Pflanzen, Mikroorganismen oder menschlichen Zellen. Genome Editing – und vor allem das CRISPR/Cas9-System – hat auch der Tierzucht einen neuen Schub versetzt. In zahlreichen Projekten überall auf der Welt wird damit an Nutztieren geforscht. Oft sind es Pilotprojekte, um auszuloten, ob die Verfahren tatsächlich funktionieren und was sie leisten könnten.

4.3.1 Forschungsprojekten

Dabei zeigt sich, dass mit nur wenigen Modifikationen einzelner DNA-Bausteine Eigenschaften von Tieren verändert werden könnten.

- 1) So haben chinesische Genetiker durch punktuellen DNA-Editieren Mini-Schweine erzeugt, die nur ein Sechstel des Gewichts normaler Schweine aufweisen. Bei Hunden wurde das Muskelwachstum extrem gesteigert. (CRISPR/Cas9: Chinesen erschaffen mit Genchirurgie Mini-Schwein)

- 2) Wissenschaftler arbeiten an Hausschweinen, die gegen die Afrikanische Schweinepest resistent sind. Nach dem Vorbild eines entsprechenden Resistenz-Gens aus dem Warzenschwein, dem die Krankheit nicht anhaben kann, wurde ein ähnliches Gen im Hausschwein umgeschrieben. Auch gegen die Vogelgrippe und andere Infektionskrankheiten zeichnen sich neue Möglichkeiten für resistente Tieren ab. (<http://www.wir-sind-tierarzt.de>)
- 3) In den USA ist es gelungen, in Ferkeln eine Resistenz gegen das PRRS-Virus zu erzeugen, Auslöser für die weltweit bedeutendste Schweinekrankheit. Die Forscher haben dazu ein bestimmtes Protein, das als „Einstiegspforte“ für das Virus dient, mit dem CRISPR-Cas-System ausgeschaltet. (<http://www.tieren-stand.html>)
- 4) Mit Genome Editing könnte es auch gelingen, bestimmte Allergene aus der Kuhmilch oder aus Hühnereiern zu entfernen. (<http://www.transgen.de>)
- 5) Auch an Rindern, die keine Hörner haben, oder Schafen, die mehr Wolle tragen, wird im Rahmen von Forschungsprojekten gearbeitet. (<http://www.transgen.de>)

Noch gibt es solche mit den neuen Verfahren geänderten Tiere außerhalb von Forschungsprojekten nicht. Und es wird auch noch einige Jahre dauern, bis sich das ändern könnte. Einige Ziele könnten damit so schnell und effektiv erreicht werden, wie es vor einigen Jahren kaum vorstellbar schien. Bei Fischen funktionierten die klassischen gentechnischen Verfahren wesentlich erfolgreicher als bei Säugetieren, da die Befruchtung und Entwicklung außerhalb des Mutterleibes stattfindet und in jedem Gelege eine große Anzahl von Eiern zur Verfügung steht. Schon in den 1990er Jahren wurden den USA schnell wachsende gentechnisch veränderte Lachse entwickelt. Zwanzig Jahre nach dem ersten Zulassungsantrag genehmigten die US-Behörden die Vermarktung von Produkten aus diesem gv-Lachs. Zierfische mit Fluoreszenzgenen sind in den USA und Taiwan schon länger erhältlich. Gentechnisch veränderte Insekten wurden erstmals im April 2014 in Brasilien zugelassen. Dabei handelt es sich um Tigermücken, die das Dengue-Fieber übertragen. Den gv-Mücken wurde ein Gen übertragen, das dafür sorgt, dass ihr Nachwuchs bereits im Larvenstadium stirbt. Durch die Paarung mit diesen Insekten sollen freilebende Populationen ausgerottet werden. Andere Insektenarten, die in ähnlicher Weise gentechnisch verändert wurden, befinden sich noch in der Entwicklung. Erste Freilandversuche haben bereits stattgefunden. Neben Krankheitsüberträger wie Malaria oder das Zika-Virus sollen so auch Pflanzenschädlinge bekämpft werden.

Auch Tiere so zu verändern, dass sie medizinische Wirkstoffe produzieren, ist schon länger möglich. In Europa sind zwei Wirkstoffe – ein Blutgerinnungsfaktor und ein Plasmaprotein – auf

dem Markt, die in der Milch transgener Ziegen bzw. Kaninchen gebildet werden. Noch im Forschungsstadium befindet sich dagegen die Transplantation innerer Organe von Schweinen, bei denen bestimmte Proteine moduliert werden, damit die Organe nicht vom Immunsystems des Empfängers abgestoßen werden (Xenotransplantation). Aber auch hier könnte Genome Editing die weitere Entwicklung beschleunigen. (<http://www.transgen.de/tiere/670.gentechnik-tieren-stand.html>)

4.3.2 Kontrolle und Effizienz transgener Arten

Die bisherigen transgenen Arten sind meist zufällig durch die Integration eines fremden Gens entstanden und die Kontrolle der transgenen Expression ist nicht gewährleistet. Dadurch ist die Beurteilung der Biosicherheit der transgenen Tiere erschwert was wiederum die Akzeptanz der Verbraucher negativ beeinflusst. So wurde die feine Bearbeitungstechnik der Gene großer Tiere das dringendste Problem der Forscher. Aber die traditionelle homologe Rekombination Gen-Targeting Technik hat eine sehr geringe Effizienz und ihre Anwendung ist bei der tatsächlichen Produktion schwierig umzusetzen. Die in den letzten Jahren entwickelte Genome-Editing Technologie des CRISPR-Cas9-Systems ermöglicht es diese Situation zu ändern.

5 Technische Probleme und Lösungsansätze

5.1 Off-Target-Effekte und deren Einflussfaktoren

Das in verschiedenen Bakterien und Archaeen vorkommende CRISPR/Cas9-System wurde erfolgreich eingesetzt um eukaryotische Genome zu bearbeiten. CRISPR/Cas9 -Technologie ist in den Forschungsbereichen Studium der Funktionalität von genetischen Elementen, Schaffung genetisch veränderter Organismen und der präklinischen Erforschung genetischer Erkrankungen weit verbreitet. Allerdings birgt die induzierte Mutation an anderen als an den beabsichtigten Stellen, vor allem wegen der hohen Häufigkeit, Risiken, insbesondere für therapeutische und klinische Anwendungen. Ein großes Problem dabei sind die sogenannten Off-Target Mutationen die bei der Anwendung von CRISPR/Cas9 Systemen in der Biomedizin und der klinischen Anwendung vorkommen. Eine Mutation an nicht beabsichtigter Stelle kann zu genomischer Instabilität und Störung der normalen Funktion anderer Gene führen. Frühere Studien haben gezeigt, dass unterschiedliche gRNA Strukturen die Spaltung von Targetstellen in On-Target und Off-Target beeinflussen können.

Im Folgenden werden die grundlegenden Mechanismen des Off-Target Schneidens im CRISPR-Cas9 System, die Methoden zum Nachweis der Off-Target Mutationen und die Strategien zur Minimierung der Off-Target-Spaltung beschrieben.

5.1.1 Länge und Spezifität der PAM-Sequenz

Unterschiedliche Arten von Bakterien haben unterschiedliche PAM Sequenzen in der Erkennungs-DNA Sequenz, (Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. ;Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, et al) aber alle PAM Sequenzen befinden sich am 3'-Ende der Ziel-Sequenz und werden vom Cas9 erkannt (Zhang Y, Ge X, Yang F, et al ; Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al.). Das am häufigsten angewandte Cas9 ist das aus dem Stamm *Streptococcus pyogenes*

(SpCas9). Eine PAM typische Sequenz ist NGG, wobei N für ein beliebiges Nukleotid stehen kann.

Es kann davon ausgegangen werden, dass es für die Erkennung und besonders für die Spezifität der künstlichen Endonuklease gibt: Wenn das erste Nukleotid der PAM-Sequenz auf eine bestimmte Base beschränkt ist beispielsweise Adenin, dann wird die ursprüngliche Zielsequenz des Cas9 um $\frac{1}{4}$ reduziert. Dies hat zur Folge, dass zwar die Anzahl der möglichen Ziele sehr hoch ist, die Spezifität allerdings vermindert ist. Wenn die PAM-Sequenz 4 oder 5 Nukleotide umfasst, dann reduzieren sich die möglichen Bindungsstellen, allerdings kann die Spezifität dadurch wesentlich erhöht werden. Es ist bemerkenswert, dass diese längere PAM-Sequenz die Spezifität der Ziele erhöht und die Off-Target-Effekte dadurch reduziert werden können, aber gleichzeitig auch die Anzahl der Zielsequenzen reduziert wird.

5.1.2 Konzentration des Cas9-sgRNA Komplexes

Im CRISPR/Cas9-System leitet die sgRNA, eine kurze RNA welche mit dem Ziel-DNA-Fragment übereinstimmt, das CRISPR/Cas9 zur Zielsequenz. Eine Studie fand heraus, dass sgRNA mit nicht –Ziel-DNA-Sequenz bindet. Dadurch entstehen Fehlpaarungen und diese können unbeabsichtigte Mutationen hervorrufen. Diese Fehlpaarungen sind der Schlüssel der Off-Target-Effekte und die Grenze dieser Technologie. In-vitro-Experimente zeigten, dass ein übermäßiges Vorhandensein an Cas9-sgRNA-Komplex zu einem erhöhten Auftreten dieser Fehlpaarungen führt (Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al). Wenn die Nuklease-Konzentration in-vitro zu hoch ist, wird das Plasmid falsch geschnitten. Ebenso kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die Cas9 Schneide-Spezifität verringert, wenn die effektive Konzentration an Cas9-sgRNA-Komplex erhöht wird. Dieses Prinzip ist das Gleiche wie in einem in-vivo-Zell Test: Wenn man die Konzentration an Cas9-sgRNA-Komplex reduziert, wird die Spezifität der Ziele erhöht (Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al). Wenn die Cas9-Proteinkonzentration um den Faktor 2,6 in den Zellen erhöht wurde, erhöhte sich die Anzahl der Fehlpaarungen ebenfalls um diesen Faktor (Wu X, Kriz AJ, Sharp PA.). Anhand dieses Experimentes konnte belegt werden, dass die relative Häufigkeit des Cas9-sgRNA-Komplexes die Zielspezifität bestimmt und alle Änderungen der Cas9-sgRNA-Komplex Konzentration zu einer Änderung des Expressionsniveaus führt bzw. direkten Einfluss auf die Anzahl der Off-Targets hat.

5.1.3 Länge der sgRNA-Sequenz

Normalerweise bindet die sgRNA an der Ziel-Nukleotidsequenz in den ersten 20 Nukleotiden nach der PAM-Sequenz. Daher verbessert eine Verlängerung der sgRNA-Sequenz nicht die Zielspezifität. In einem Experiment stellte man mit Hilfe des Northern Blots fest, dass eine am 5'-Ende auf 30 Nukleotide verlängerte sgRNA am 5'-Ende zu früh hydrolysiert wird (Ran Fa, Hsu Pd, Lin Cy, et al.). Dies deutet darauf hin, dass eine verlängerte sgRNA nicht stabil ist und dass das Cas9 Protein nur an etwa 20 Nukleotiden spezifisch binden kann. Wenn die sgRNA verkürzt wird, auf beispielsweise 17-18 Nukleotide, wurde eine erhöhte Zielspezifität beobachtet. Vermutlich spielt dabei jedoch die veränderte Länge der sgRNA keine Rolle, sondern die spezifische PAM-Sequenz (Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al).

5.1.4 Seed-Sequenz

In Bakterien und Säugetieren kann das Auftreten von Fehlpaarungen in den 1-12 Basenpaaren, welche an die PAM-Sequenz angrenzen, dazu führen, dass sich die Zielspezifität verringert oder gar verschwindet. Diese 1-12 Basenpaare werden als die Seed-Sequenz bezeichnet (Abb. 8) (Jiang W, Bikard D, Cox D, et al Cong L, Ran FA, Cox D, et al.). Inzwischen haben Untersuchungen gezeigt, dass die Seed-Sequenz 1-5 Basenpaare der Ziel-Sequenz umfasst (Wu X, Scott DA, Kriz AJ, et al; O'Geen H, Henry IM, Bhakta MS, et al.). Die Seed-Sequenz bestimmt die Spezifität des Cas9 und ist wichtiger als die PAM-Sequenz (Cong,L,Ran,FA, Cox,D, Lin, S, Barretto, R, Habib,N,et,al.2013)(Jinek, M, Chylinski, K, Fonfara, I, Hauer, M, Doudna, JA and Charpentier, E (2012)).

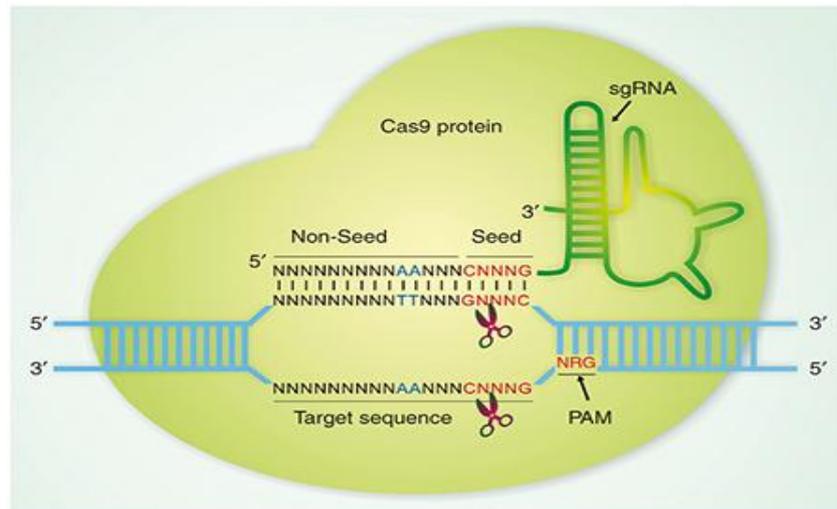


Abbildung 5 Seed-Sequenz

Die ersten 1-5 Basenpaare nach der PAM-Sequenz werden als Seed-Sequenz bezeichnet. Dieser Bereich bestimmt, noch mehr als die PAM-Sequenz, die Spezifität des Cas9. Der komplementäre Teil der sgRNA bindet an die Seed-Sequenz und bestimmt damit die Schnittstelle der Cas9-Endonuklease.

Quelle: <http://www.nature.com/mtna/journal/v4/n11/full/mtna201537a.html>

Mit Hilfe der Seed-Sequenz kann die Zielspezifität ermittelt werden. Im Säugetiergenom hat jede sgRNA Millionen potentielle Zielsequenzen bestimmt durch die PAM-Sequenz (NGG). Durch die Seed-Sequenz können diese potentiellen Zielsequenzen verringert werden. Im Mausgenom beispielsweise befinden sich etwa eine Millionen AAGGA (Seed-Sequenz) + NGG (PAM) Nukleotidabfolgen, die Abfolge CGTCG (Seed-Sequenz) + NGG (PAM) kommt nur etwa zehntausendmal vor. Eine sgRNA die speziell für die Abfolge CGTCG entworfen wurde, kann also an weitaus weniger Zielen binden als eine sgRNA mit der Abfolge AAGGA. Bei letzterem steigt die Wahrscheinlichkeit von Off-Target-Effekten deutlich, bei ersterem kann man eine höhere Zielspezifität gewährleisten (Wu X, Scott DA, Kriz AJ, et al).

5.1.5 Chromatin-Funktionen

Die genomische DNA ist keine einfache, lineare doppelsträngige DNA mit offener Raumstruktur. In verschiedenen Zellzyklus-Phasen wird genomische DNA zusammengebaut, Chromosome enthalten die genomische DNA. Die Seed-Region + PAM-Sequenz werden darin so eingebettet, dass die Zugänglichkeit von Cas9-Proteinen und Seed-

Regionen berücksichtigt werden können. Wenn ein Chromatin eine stärkere Affinität besitzt, dann kann sich das Cas9 mit der Seed-Sequenz einfacher verbinden.

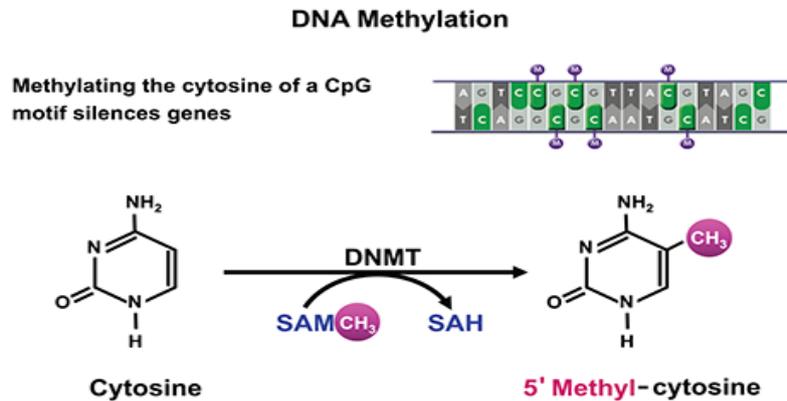


Abbildung 6 DNA Methylation

Einige der Cytosine innerhalb der Cytosin-Guanin Dinukleotide (CpG) können am 5. Kohlenstoffatom methyliert werden und ein 5'Methylcytosin entsteht. Die Methylgruppe wird dabei von S-adenosylmethionine abgespalten. Ein erhöhtes Auftreten von 5'Methylcytosin in einem bestimmten Bereich wird auch als CpG-Insel-Methylierung bezeichnet und hat in Promotoren oder nahe der Promotoren eine Stilllegung des Gens (Gene-Silencing) zur Folge.

Quelle: <http://images.google.de/imgres?imgurl>

Die Zielposition der Sequenzen der CpG-Methylierung hängen auch mit der Zielspezifität zusammen. CpG-Insel-Methylierung kann in Bezug auf der Chromatin Silencing und erhöhtem Methylierungsstatus die Bindungskraft reduzieren, wodurch die Zielspezifität beeinflusst wird (Wu X, Kriz AJ, Sharp PA.). DNA-CpG-Methylation ist eine unter DNA Methyltransferase ablaufende katalytische Phase, bei der die Methyl-Basis von (Sam) in 5'-Cytosine übertragen werden (Abb. 9).

5.2 Strategien zur Minimierung von Off-Target Effekten

Die Problematik der Off-Target-Effekte schränkt den Gebrauch der CRISPR-Cas9 genome-editing Technologie ein. Die Erforschung der Einflussfaktoren der Off-Target-Effekte hat viele Möglichkeiten zur Reduzierung dieser Problematik hervorgebracht. Einige dieser Strategien zur Minimierung von Off-Target-Effekten sind im Folgenden dargestellt.

5.2.1 Verbesserung der Gestaltung von sequenzspezifischer sgRNA

Einige Experimente haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Spezifität von sgRNA Sequenzen eine Reduktion der Off-Target-Effekte zur Folge hat. Daher werden sgRNA Sequenzen derzeit unter folgenden Kriterien entworfen:

- (1) Minimierung der Anzahl der Basenpaarungen der sgRNA Sequenz mit der vorhergesagten Off-Target-Zielsequenz;
- (2) Design sgRNA mit mindestens zwei Basenpaarung mit den vorhergesagten Off-Target-Zielstellen in dem Bereich nahe der PAM.

5.2.2 Steuerung der Konzentration des Cas9-sgRNA Komplexes

Wie in 5.1.2 beschrieben, beeinflusst jede Änderung der Konzentration des Cas9-sgRNA Komplexes die Off-Target-Effekte. Eine Erhöhung der Konzentration der Plasmide und die Nutzung starker Promotoren erhöht die Konzentration von Cas9-sgRNA-Komplexen und steigert die richtigen Ziel-Kombinationseffekte und gleichzeitig die Off-Target-Effekte deutlich. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Reduktion der Plasmid-Konzentration und die Nutzung von schwachen Promotoren eine Cas9-sgRNA Komplex-Verminderung mit der Folge, dass die richtigen Ziel-Kombinationseffekte und die Off-Target-Effekte reduziert werden. Vor kurzem wurde entdeckt, dass die Verwendung von RNA-Polymerase II Transkriptionssystemen die sgRNA Expressionskontrolle verbessert (Kiani S, Beal J, Ebrahimkhani MR, et al.).

5.2.3 Anwendung der einzelnen Schnittaktivitäten des mutanten dCas9

Wenn an den wichtigsten Stellen an denen das Cas9 die doppelsträngigen DNA schneidet eine Mutation eingebracht wird, so entsteht eine Mutante, das sogenannte dCas9-Protein, welches nur einen Strang schneiden kann oder keine Schneidefähigkeit besitzt. (Cheng AW, Wang H, Yang H, et al.; Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al.). Um einen Doppelstrangbruch zu erhalten werden zwei mutante dCas9-Proteine benötigt mit einer eigenen sgRNA. Während die erste Mutante den ersten Strang schneidet, schneidet die zweite Mutante in den komplementären Strang. Dadurch entsteht ein leicht versetzter Doppelstrangbruch (Abb. 10). Der Vorteil besteht darin, dass eine Fehlpaarung einer sgRNA nur zu einem Einzelschnitt führt, nicht zu einem Doppelstrangbruch. Diese falsch gesetzte Einzelstrangbruch kann durch diverse Reparaturmechanismen schnell und unkompliziert geschlossen werden. Eine Fehlpaarung beider Mutanten und somit ein Entstehen eines falschen Doppelstrangbruches, ist äußerst gering, wodurch die Zielspezifität vergrößert werden kann.

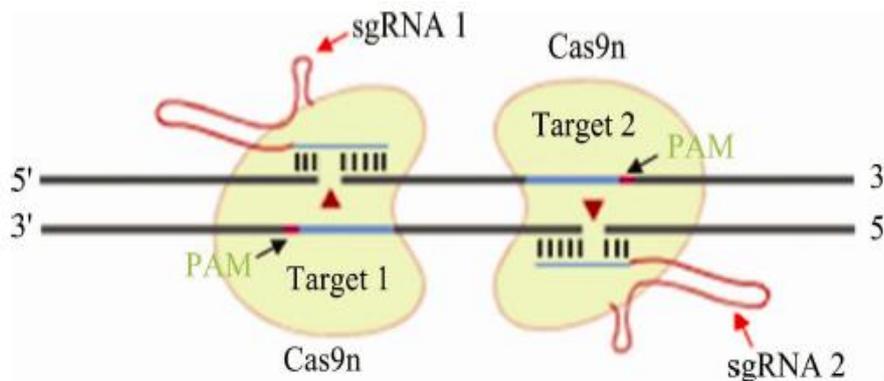


Abbildung 7 Schnittaktivitäten des mutanten dCas9

Da das mutante dCas9-Protein nur jeweils einen Strang der DNA schneiden kann, werden zwei dCas9-Proteine benötigt um einen Doppelstrangbruch herbeizuführen. Zu diesem Zweck werden zwei unterschiedliche sgRNAs designed, welche an spezifischen benachbarten Sequenzen binden können. Während die sgRNA 1 am ersten Strang bindet und das dCas9 die DNA schneidet, lagert die sgRNA 2 am komplementären Strang an und setzt dort einen Schnitt. Nur bei korrekter Basenpaarung entsteht so ein Doppelstrangbruch.

Quelle: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150610.1557.002.html>

Eine ähnliche Strategie ist die Verwendung von mutanter Fok I Nuklease die mit dCas9 ein Dimer bildet. Nur Fok I, welche mit dCas9 ein Dimer bildet, hat Nukleinsäurespaltungsaktivität. Das dCas9-Fok I-Fusionsprotein mit zwei sgRNAs kann einen vollständigen Schnitt der doppelsträngigen DNA generieren (Abb. 11). (Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, et al).

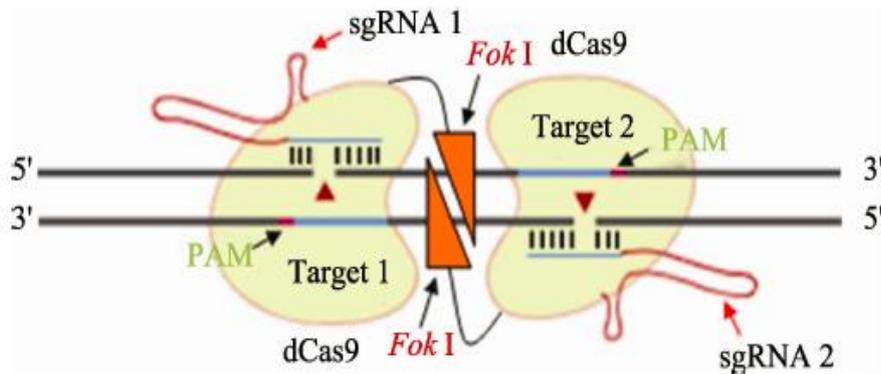


Abbildung 8 dCas9-Fok I-Fusionsprotein

Das dCas9 bildet zusammen mit Fok I ein Dimer (dCas9-Fok I-Fusionsprotein) welches an die Ziel-DNA bindet und einen Doppelstrangbruch generiert.

Quelle: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150610.1557.002.html>

5.2.4 Neue Cas9-Proteine

Am weitesten verbreitet in der Nutzung des CRISPR-Cas9 Systems ist derzeit das *Streptococcus pyogenes* Cas9-Protein. Inzwischen werden aber auch Cas9-Proteine aus anderen Bakterienstämmen untersucht und in der Gentechnik eingesetzt. Die Nutzung neuer Cas9-Protein-Stämme, alternatives SpCas9-Protein oder auch die Änderung der Protein Konformation können die Spezifität verbessern. In den verschiedenen Bakterienstämmen weist das Cas9-Protein unterschiedliche PAM Sequenzen auf und hat damit Auswirkungen auf Spezifität der Ziele. Auch durch die Änderung der Protein-Kristallstruktur in-vitro kann eine neue erhöhte Spezifität des Cas9-Proteins entworfen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung der CRISPR-Cas9 Technologie führt zu der Möglichkeit, eine Gensequenz zu modifizieren. Die Forschungsgruppe von Qi hat die Doppelstrang DNA der Cas9-Proteine hydrolysiert, sodass sie vollständig ihre Endonuklease-Aktivität verloren hat. Aber dennoch kann das Cas9-Protein einen Komplex mit der sgRNA bilden und an spezifischen Sequenzen zielgerichtet binden (Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al.). Auch wenn die Zielsequenz durch die Mutation nicht mehr geschnitten werden kann, wird weiterhin die Bindung von RNA-Polymerase oder anderen Transkriptionsfaktoren inhibiert. Auf Transkriptionsebene wird dadurch die Genexpression herunterreguliert und das mutierte Cas9-Protein spielt eine ähnliche Rolle wie die RNA-Interferenz. Dementsprechend kann man am Ende der Cas-9-Proteinmutationen andere funktionelle Proteine einbinden, beispielsweise DNA-Decacetylase oder VP64 Transkriptionsaktivierungsdomäne, wodurch der Acetylierungsgrad oder die Genexpression reguliert werden kann. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob dieser Einsatz eine so große Rolle wie erwartet einnehmen wird und weitere Experimente werden zeigen, wie man dieses System noch nutzen kann.

Nach wie vor steckt die Entwicklung und Nutzung des CRISPR-Cas9-Systems in den Kinderschuhen und löst nicht alle bestehenden Probleme der Gentechnik. Es muss weiterhin überprüft werden ob beispielsweise die genomische Bearbeitungseffizienz des CRISPR-Cas9-Systems tatsächlich besser ist als die der TALEN oder ZFN Technologie, oder ob Cas9-Proteine eine Immunantwort in anderen Spezies hervorrufen könnte. Des Weiteren muss untersucht werden wie man die Effizienz der Bearbeitung der Gen-vermittelten homologen Rekombination und dergleichen verbessern kann. Wir glauben, dass die CRISPR-Cas9-Technologie eine gute Perspektive bietet und dass eine umfassende Studie die Vorteile aufzeigen würde.

7 Literaturverzeichnis

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *315*:1709-1712.

Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, et al. (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. *95*: 10570-10575.

Cong L, Ran FA, Cox D, et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *8*:819-823.

Cheng AW, Wang H, Yang H, et al. (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *23*: 1163-1171.

Clop A, Marcq F, Takeda H, et al. (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *8*:813-818

Dorothee Deckbar. 2007. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Medizinischen Fakultät ; *2* : 20-12

Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. (2014) Improving CRISPR-Cas nucleases specificity using truncated guide RNAs. *32* (3): 279-284.

Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *468*: 67-71.

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *2*: 442-451.

Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases 31 (9): 827-832.

Heidi Ledford (2015) Gentechnik: CRISPR verändert alles

Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems 31 (3): 233-239.

Jinek, M, Chylinski, K, Fonfara, I, Hauer, M, Doudna, JA and Charpentier, E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. 337: 816–821.

Kiani S, Beal J, Ebrahimkhani MR, et al. (2014) CRISPR transcriptional repression devices and layered circuits in mammalian cells 7: 723-726.

Kim S, Kim D, Cho SW, et al. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins 24: 1012-1019.

Liang P et al. (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trinuclear zygotes. Protein and Cell 6(5): 363–372.

Mojica, F. M. and R. Garrett (2013) Discovery and Seminal Developments in the CRISPR Field. CRISPR-Cas Systems. R. Barrangou and J. van der Oost, Springer Berlin Heidelberg: 1-31.

Makarova K S, Aravind L, Wolf Y I et al. (2011) Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas system. Biol Direct, 6-38.

Mali, P. et al. (2013) RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. Science 339, 823 – 826

Martin J, Fuguo J, David WT, et al. (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 43: 124-127.

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV; (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 9 :467-477.

Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA 156 (5): 935-949.

O'Geen H, Henry IM, Bhakta MS, et al. (2015) A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture 43: 3389-3404.

O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, et al. (2014) Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. 516: 263–266.

Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity 31: 839-843.

Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, et al. (2013) RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors 10: 973-976.

Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. 152(5): 1173–1183.

Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloor J, et al. (2014) Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA 24 (6): 1020-1027.

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity 154 (6): 1380-1389.

Shah SA, Erdmann S, Mojica FJ, Garrett RA (2013).

Van Läre A S, Nguyen M, Braunschweig M, et al. (2003) A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. 425: 832-836

Wu X, Kriz AJ, Sharp PA. (2014) Target specificity of the CRISPR-Cas9 system 2: 59-70.

Wu X, Scott DA, Kriz AJ, et al. (2014) Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells 32 (7): 670-676.

Wu X, Scott DA, Kriz AJ, et al. (2014) Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells 32 (7): 670-676.

Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system 343 (6166): 80-84.

Yin,H, et al. (2014) Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype 32,551-553

Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, et al. (2013) Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*, 50 (4): 488- 503.

Zhang Y, Ge X, Yang F, et al. (2014) Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells 4 : 5405.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Bachelorarbeit selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben.

Köthen, _____

Ort, Datum

Unterschrift