

EINSATZ VON GENSCHERE

Offenbar erstmals genetisch veränderte Babys in China geboren

AKTUALISIERT AM 26.11.2018 - 09:56



In China sollen Zwillingsmädchen zur Welt gekommen sein, deren Erbgut-Anlage offenbar mithilfe des Genom-Editier-Werkzeugs CRISPR bearbeitet worden ist. Der Vorsitzende des Deutschen Ethikrats spricht von einem „Super-Gau“.

WS 2018/19 BSc Modul 8
Grundvorlesung „Allgemeine und Molekulare Genetik“

Gentechnologie



Thomas Hankeln
AG Molekulargenetik und Genomanalyse
Institut für Organismische und Molekulare Evolutionsbiologie

hankeln@uni-mainz.de

Gentechnik in der Öffentlichkeit

Es stimmen der Aussage zu:

von der Gentechnik
gehen unkalkulierbare
Auswirkungen auf
die Kreisläufe der
Natur aus

%

81

Genfood
sollte man
grundsätzlich
ablehnen

%

67

von der
Gentechnik
gehen
gesundheitliche
Gefahren aus

%

66

jeder Eingriff
in die natürliche
Schöpfung sollte
aus ethischen
Gründen abgelehnt
werden

%

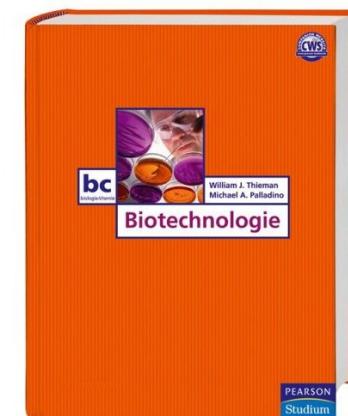
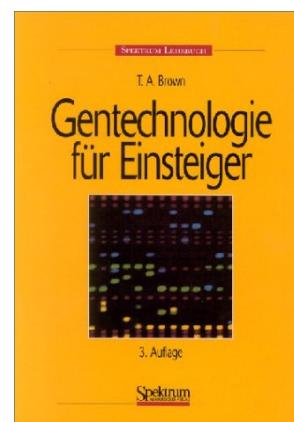
52



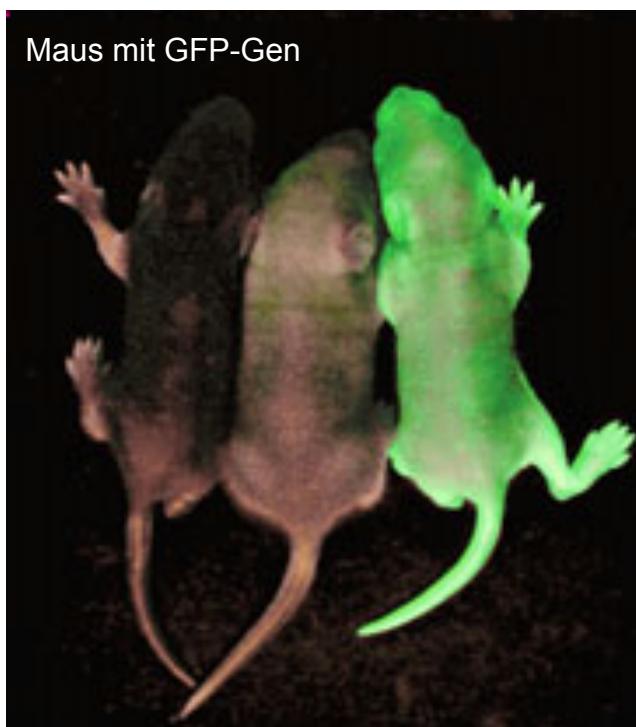
Teufelswerk? Retter der Menschheit?

...zunächst einmal:

- der „ingenieurwissenschaftliche Teil“ der Molekulargenetik
- Schlüsseltechnologie in der Forschung
- unverzichtbar in Lebenswissenschaften & Pharma-Industrie
- potenziell sehr wertvoll für Landwirtschaft



Gentechnik („recombinant DNA technology“)



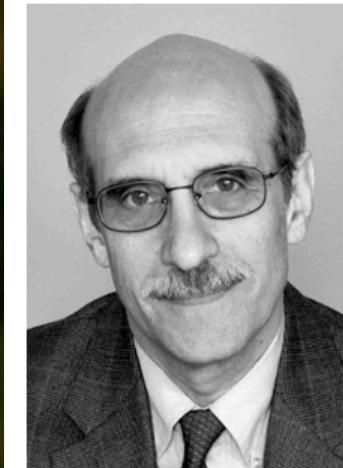


The Nobel Prize in Chemistry 2008

Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien

Share this: [f](#) [G+](#) [Twitter](#) [+1](#) [Email](#) 4

Martin Chalfie - Facts



Martin Chalfie

Born: 15 January 1947, Chicago, IL, USA

Affiliation at the time of the award: Columbia University, New York, NY, USA

Prize motivation: "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"

Field: biochemistry

Prize share: 1/3

Green Fluorescent Protein,
ursprünglich aus der
Qualle Aequorea



NATURAL LIGHTING
WITHOUT ELECTRICITY
glowing plant

PRE-ORDER NOW



POWERED BY TAXA

Was ist Gentechnik?

- Herstellung **neu zusammengesetzter** (rekombinanter) DNA-Moleküle
- aus derselben Art oder unterschiedlichen Arten
- **Transfer** der rekombinanten DNA in Organismen (Transgenese)



Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG)

§ 3 Begriffsbestimmungen

Im Sinne dieses Gesetzes sind

1. Organismus
jede biologische Einheit, die fähig ist, sich zu vermehren oder genetisches Material zu übertragen, einschließlich Mikroorganismen,
- 1a. Mikroorganismen
Viren, Viroide, Bakterien, Pilze, mikroskopisch-kleine ein- oder mehrzellige Algen, Flechten, andere eukaryotische Einzeller oder mikroskopisch-kleine tierische Mehrzeller sowie tierische und pflanzliche Zellkulturen,
2. gentechnische Arbeiten
 - a) die Erzeugung gentechnisch veränderter Organismen,
 - b) die Vermehrung, Lagerung, Zerstörung oder Entsorgung sowie der innerbetriebliche Transport gentechnisch veränderter Organismen sowie deren Verwendung in anderer Weise, soweit noch keine Genehmigung für die Freisetzung oder das Inverkehrbringen zum Zweck des späteren Ausbringens in die Umwelt erteilt wurde,
3. gentechnisch veränderter Organismus
ein Organismus, mit Ausnahme des Menschen, dessen genetisches Material in einer Weise verändert worden ist, wie sie unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt; ein gentechnisch veränderter Organismus ist auch ein Organismus, der durch Kreuzung oder natürliche Rekombination zwischen gentechnisch veränderten Organismen oder mit einem oder mehreren gentechnisch veränderten Organismen oder durch andere Arten der Vermehrung eines gentechnisch veränderten Organismus entstanden ist, sofern das genetische Material des Organismus Eigenschaften aufweist, die auf gentechnische Arbeiten zurückzuführen sind,
- 3a. Verfahren der Veränderung genetischen Materials in diesem Sinne sind insbesondere
 - a) Nukleinsäure-Rekombinationstechniken, bei denen durch die Einbringung von Nukleinsäuremolekülen, die außerhalb eines Organismus erzeugt wurden, in Viren, Viroide, bakterielle Plasmide oder andere Vektorsysteme neue Kombinationen von genetischem Material gebildet werden und diese in einen Wirtsorganismus eingebracht werden, in dem sie unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen,
 - b) Verfahren, bei denen in einen Organismus direkt Erbgut eingebracht wird, welches außerhalb des Organismus hergestellt wurde und natürlicherweise nicht darin vorkommt, einschließlich Mikroinjektion, Makroinjektion und Mikroverkapselung,
 - c) Zellfusionen oder Hybridisierungsverfahren, bei denen lebende Zellen mit neuen Kombinationen von genetischem Material, das unter natürlichen Bedingungen nicht darin vorkommt, durch die Verschmelzung zweier oder mehrerer Zellen mit Hilfe von Methoden gebildet werden, die unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen,
- 3b. nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials gelten
 - a) In-vitro-Befruchtung,
 - b) natürliche Prozesse wie Konjugation, Transduktion, Transformation,
 - c) Polyploidie-Induktion,

es sei denn, es werden gentechnisch veränderte Organismen verwendet oder rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die im Sinne von den Nummern 3 und 3a hergestellt wurden, eingesetzt.

Weiterhin gelten nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials

- a) Mutagenese und
- b) Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) von Pflanzenzellen von Organismen, die mittels herkömmlicher Züchtungstechniken genetisches Material austauschen können,

es sei denn, es werden gentechnisch veränderte Organismen als Spender oder Empfänger verwendet,

- 3c. sofern es sich nicht um ein Vorhaben der Freisetzung oder des Inverkehrbringens handelt und sofern keine gentechnisch veränderten Organismen als Spender oder Empfänger verwendet werden, gelten darüber hinaus nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials

- a) Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) prokaryotischer Arten, die genetisches Material über bekannte physiologische Prozesse austauschen,
- b) Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) von Zellen eukaryotischer Arten, einschließlich der Erzeugung von Hybridomen und der Fusion von Pflanzenzellen,
- c) Selbstdklonierung nicht pathogener, natürlich vorkommender Organismen, bestehend aus
 - aa) der Entnahme von Nukleinsäuresequenzen aus Zellen eines Organismus,
 - bb) der Wiedereinführung der gesamten oder eines Teils der Nukleinsäuresequenz (oder eines synthetischen Äquivalents) in Zellen derselben Art oder in Zellen phylogenetisch eng verwandter Arten, die genetisches Material durch natürliche physiologische Prozesse austauschen können, und
 - cc) einer eventuell vorausgehenden enzymatischen oder mechanischen Behandlung.

Zur Selbstdklonierung kann auch die Anwendung von rekombinanten Vektoren zählen, wenn sie über lange Zeit sicher in diesem Organismus angewandt wurden,

**Reine Mutagenese ist keine Gentechnik
Im Sinne des Gesetzes!**

Warum ist Gentechnik möglich?

- Alle Organismen haben DNA als Speicher der Erbinformation.
- Der genetische Code ist bei (fast) allen Organismen identisch.
- **Per DNA-Transfer lassen sich Gene zwischen verschiedenen Organismen (sogar Spezies) übertragen**

Francis Bacon 1627

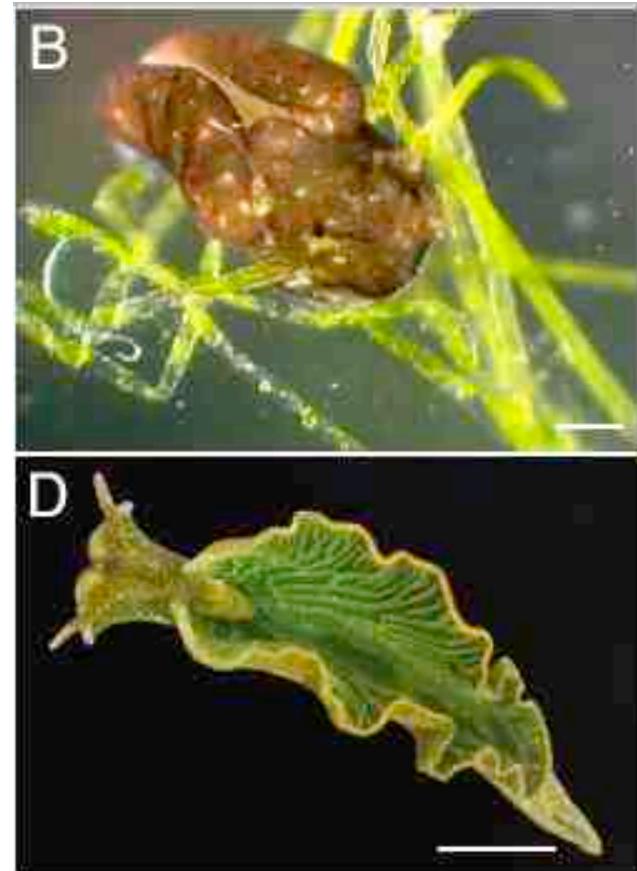
"And we make (by Art) in the same Orchards, and Gardens, Trees and Flowers, to come earlier, or later, then their Seasons; And to come up and beare more speedily then by their Naturall Course they doe. **We make them also by Art greater much then their Nature; And their Fruit greater, and sweeter, and of differing Taste, Smell, Colour, and Figure, from their Nature.** And many of them we so Order as they become of Medicinall Use. Wee have also Meanes to make diverse Plants rise by Mixtures of Earths without Seedes; And likewise to make diverse New Plants, differing from the Vulgar; and to make one Tree or Plant turne into another... By Art likewise, we make them [Beasts and Birds] Greater, or Taller, then their Kinde is; And contrary-wise Dwarfe them and stay their Growth: Wee make them more Fruitfull and Bearing then their Kind is; and contrary-wise Barren and not Generative. Also we make them differ in Colour, Shape, Activity many wayes. We finde Meanes to make Commixtures and Copulations of diverse Kindes; which have produced many New Kindes, and them not Barren, as the generall Opinion is... **Neither doe we this by Chance, but wee know before hand, of what Matter and Commixture, what Kinde of those Creatures will arise."**

Taken from 'New Atlantis' by Francis Bacon, Lord Verulam, Viscount St Alban. (pp37-38. G. C. Moore Smith Edition, Cambridge University Press, 1929). [According to Moore Smith, 'New Atlantis' was first published in 1627, a year after Bacon's death, and was probably written between 1622 and 1624. The spelling is exactly transcribed.]



Wer hat's erfunden?

Ein Beispiel...



Tiere mit „Sonnenkraftwerk“:

adulte Schnecken nehmen
Plastiden und deren cpDNA
aus Algen in ihre Zellen auf

➤ Photosynthese!

Gentransfer über Artgrenzen

<http://www.youtube.com/watch?v=alyaxgBkToU>

Wer hat's erfunden?

Vor ca. 3000 Jahren...

Mutter Pferd ($2n=64$) x Vater Esel ($2n=62$) = **Maultier**



„Das Maultier scheint mir ein sehr erstaunliches Tier zu sein; es macht den Anschein, dass hier die Kunst die Natur übertroffen hat.“

Charles Darwin

Gen-Neukombination über Artgrenzen

DNA-Transfer über Artgrenzen hinweg sowie die Neu/Re-Kombination von Genen finden bereits in der Natur statt!



- Transduktion • Konjugation • Transformation (VL *Mikrobiologie*)

Bei der **Kreuzung** von Tieren und Pflanzen haben Menschen ungezielt Tausende unterschiedlicher Gene neu kombiniert.

In der konventionellen **Züchtung** werden Gen-Mutanten ungezielt durch chemische oder physikalische Mutagenese (Radioaktivität!) hergestellt!

The screenshot shows a website for "BIO ILIOS" which imports bio-fruits and vegetables from Greece. The main navigation menu includes: HOME - START, WIR ÜBER UNS, UNSER TEAM, UNSERE PRODUZENTEN, QUALITÄT / ZERTIFIZIERUNG, OBST UND GEMÜSE, OBST (with sub-options for Zitronen, Orangen, and Grapefruit), and Beschreibung. A sidebar on the right provides details about "Rote Grapefruit - Star Ruby (sunrise) Citrus paradisi MACF.", including a photo of a hand holding a slice of the fruit. It also links back to the "Grapefruit" page and provides a link to the overview page for grapefruits.

Aber es geht auch gezielter...



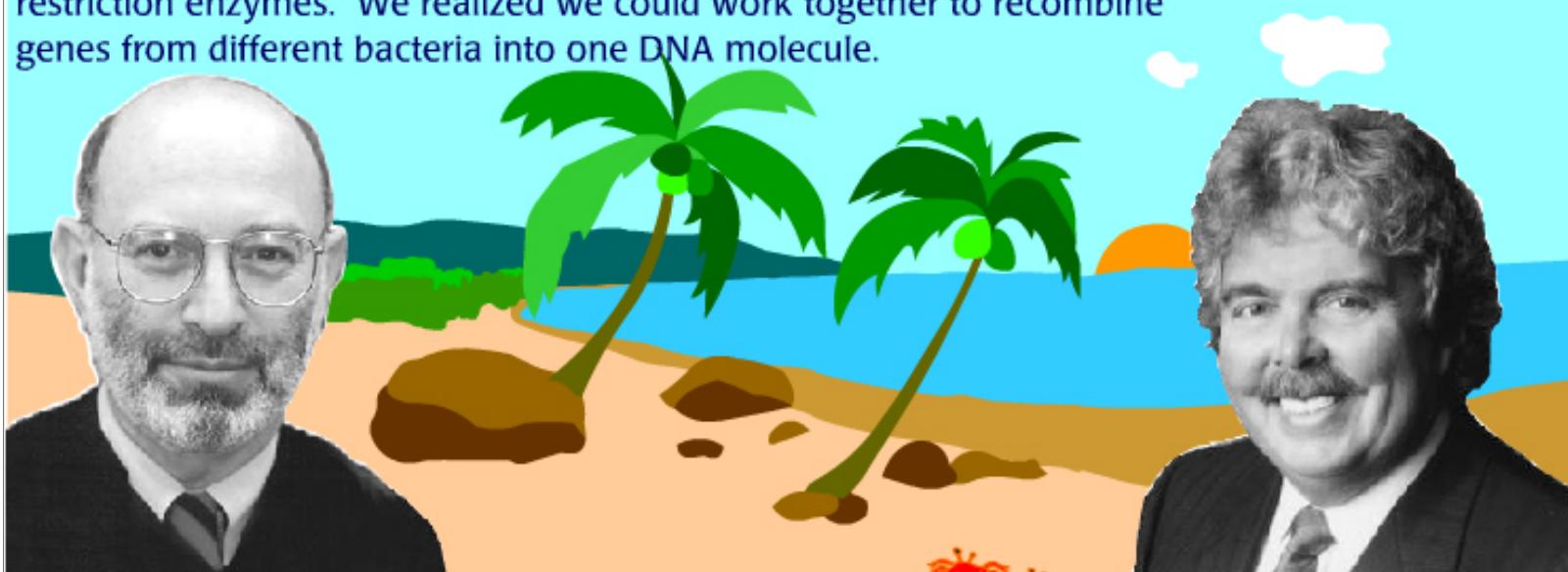
Paul Berg,
Nobelpreis 1980

Gentechnik im engeren Sinne bezeichnet die Neukombination und den gezielten Transfer definierter DNA-Abschnitte.

- 1972 Paul Berg: die erste *in vitro* neu-kombinierte DNA
- 1973 S. Cohen, A. Chang, H. Boyer: der erste bakterielle „GVO“
- 1977 Genentech: gentechnologische Produktion von Somatostatin
- 1981 University of Ohio: das erste transgene Tier (Maus)
- 1985 erste Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen in den USA
- 1990 erste somatische Gentherapie am Menschen
- 1995 genveränderte Tomate auf dem US-Markt
- 1998 RNA-Interferenz für Gen-Knockdown
- 2012 CRISPR-Cas9 Anwendung in Bakterien
- 2014 erste Freisetzung transgener Tiere (Mücken)

serendipity

In 1972, we were at a biology conference in Hawaii. At the time, I was studying bacterial resistance to antibiotics, and Herbert was studying restriction enzymes. We realized we could work together to recombine genes from different bacteria into one DNA molecule.



"Boyer and I didn't set out to invent genetic engineering. Our invention came from efforts to understand basic biological phenomena and the realization that our findings had important practical applications."

www.dnaftb.org

Kap 34



Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

(R factor/restriction enzyme/transformation/endonuclease/antibiotic resistance)

STANLEY N. COHEN*, ANNIE C. Y. CHANG*, HERBERT W. BOYER†, AND ROBERT B. HELLING†

* Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and † Department of Microbiology, University of California at San Francisco, San Francisco, Calif. 94122

Communicated by Norman Davidson, July 18, 1973

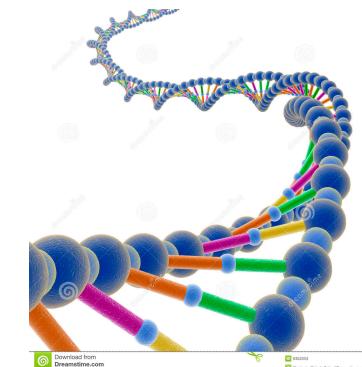
ABSTRACT The construction of new plasmid DNA species by *in vitro* joining of restriction endonuclease-generated fragments of separate plasmids is described. Newly constructed plasmids that are inserted into *Escherichia coli* by transformation are shown to be biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences from both of the parent DNA molecules. Functional plasmids can be obtained by reassociation of endonuclease-generated fragments of larger replicons, as well as by joining of plasmid DNA molecules of entirely different origins.

The general procedure described here is potentially useful for insertion of specific sequences from prokaryotic or eukaryotic chromosomes or extrachromosomal DNA into independently replicating bacterial plasmids. The antibiotic resistance plasmid pSC101 constitutes a replicon of considerable potential usefulness for the selection of such constructed molecules, since its replication machinery and its tetracycline resistance gene are left intact after cleavage by the *EcoRI* endonuclease.

Das klassische gentechnische Experiment

Problem:

Wie kann man gezielt einen bestimmten Abschnitt (z. B. nur ein Gen) aus dem Genom untersuchen?



Wie erhält man diesen DNA-Abschnitt in ausreichender Menge?

Lösung:

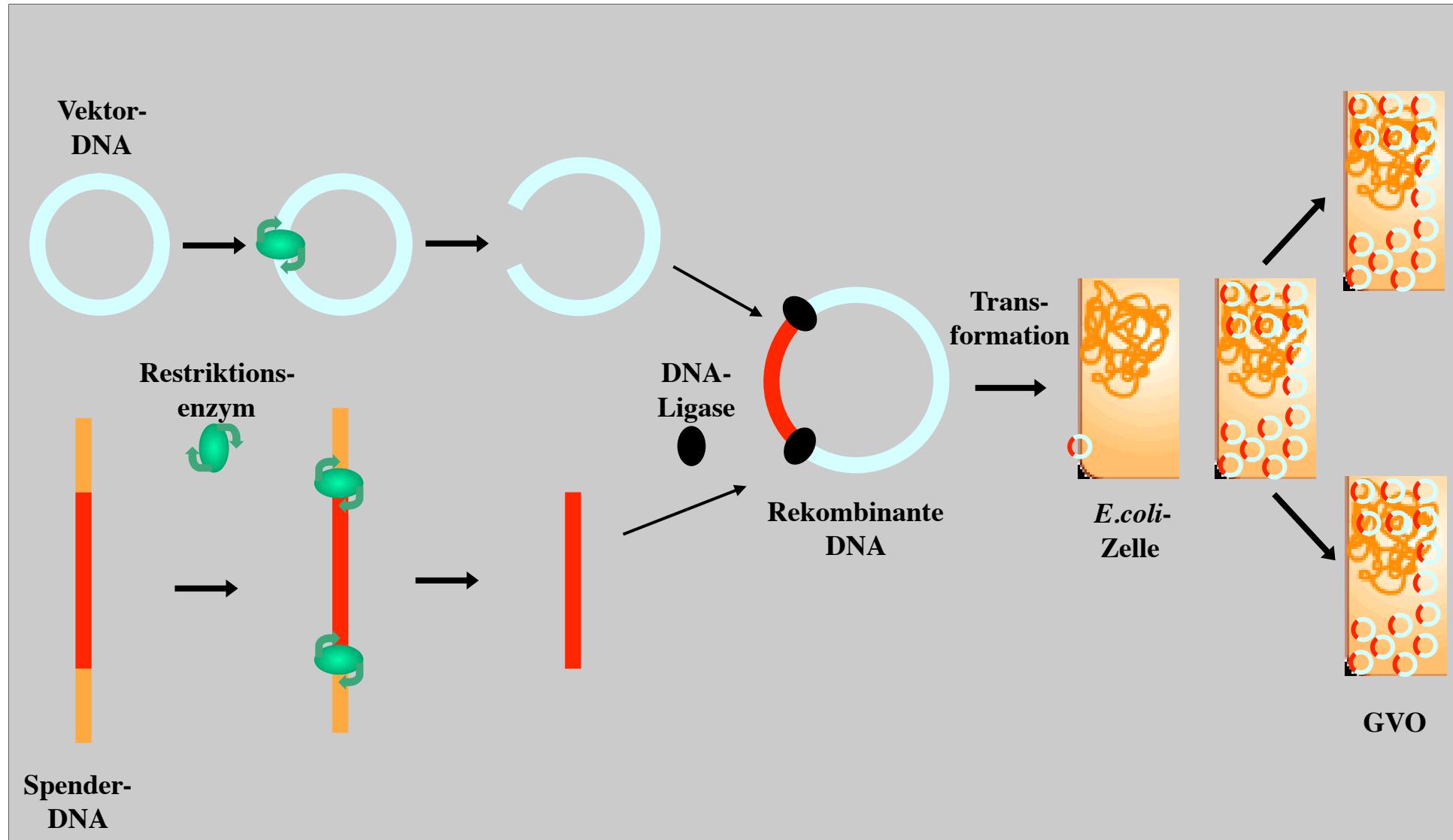
Man schneide sich den DNA-Abschnitt heraus und vermehre ihn selektiv viele Millionen mal,
z. B. dadurch, dass man ihn in ein Bakterien-Replikon einfügt
und so in Bakterien replizieren lässt.

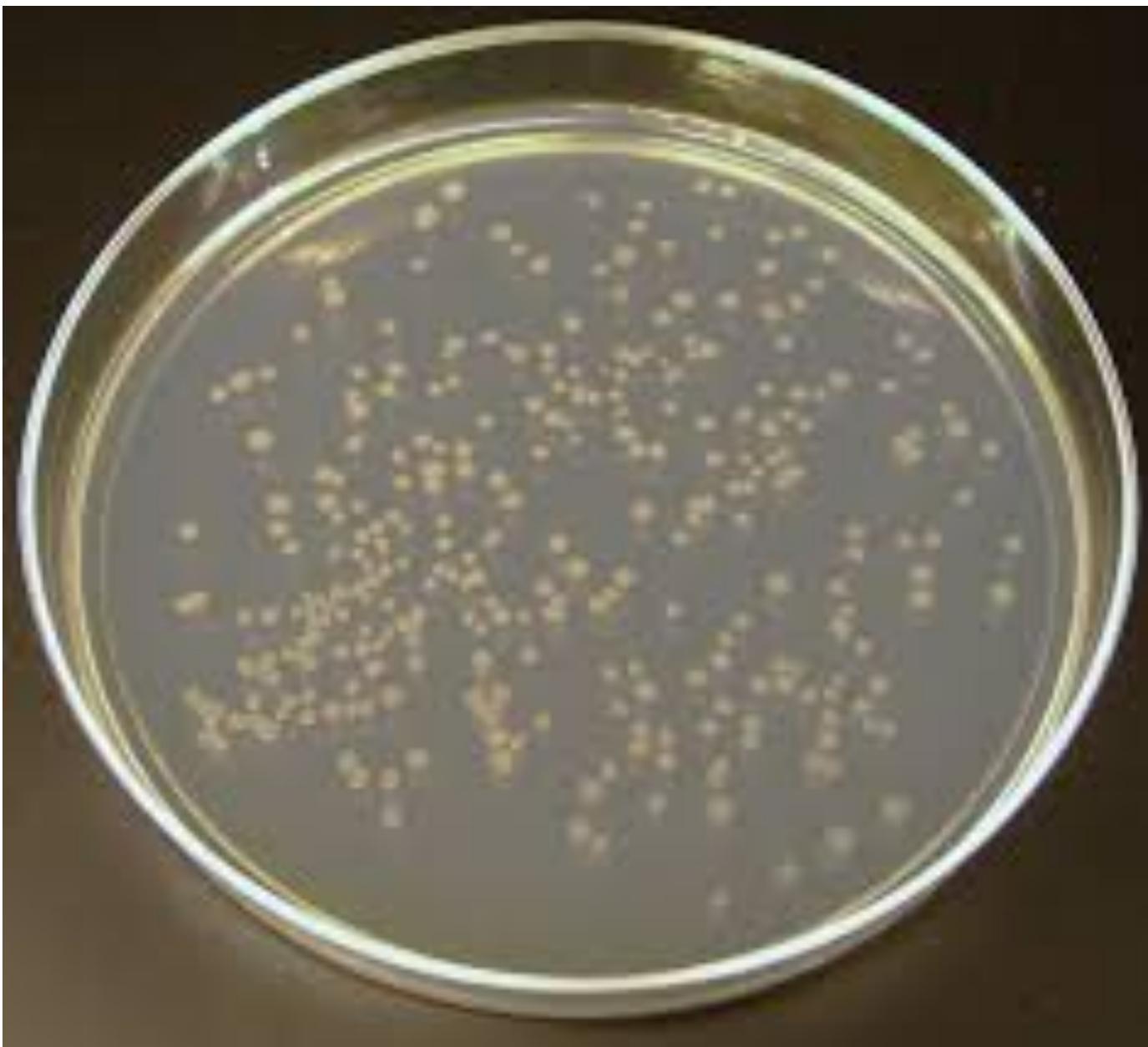
Das klassische gentechnische Experiment

- Erforderliche Komponenten-

- „Spender“-DNA (z.B. ein ganzes Genom o. Teile daraus)
- Vektor-DNA (z. B. Plasmide)
- Molekulare Scheren: Restriktionsenzyme
- Molekularen Klebstoff: DNA-Ligase
- DNA-Transfermethoden
- Wirtsorganismen

Das klassische gentechnische Experiment





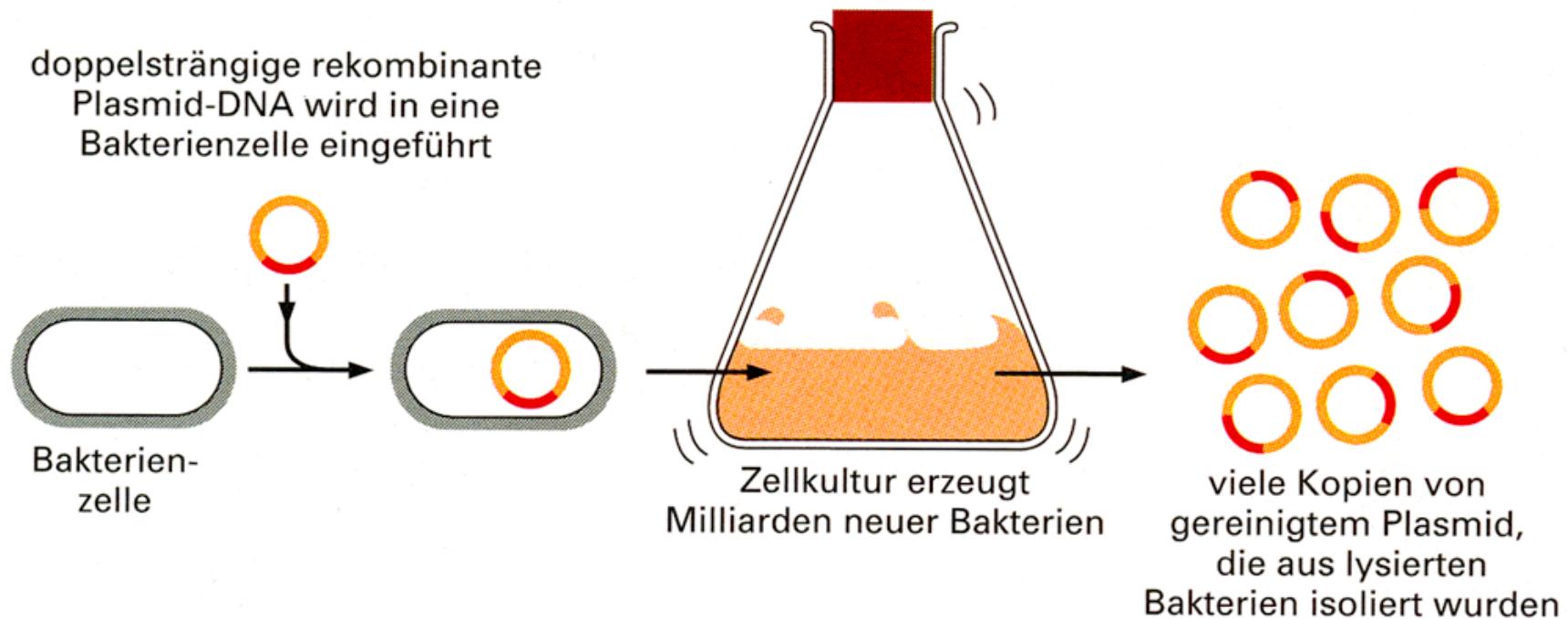
Das klassische gentechnische Experiment

Ziel:

Vermehrung eines definierten DNA-Abschnitts

Methode:

Klonanzucht und Plasmid-DNA-Präparation



Begriffsdefinitionen

- „**Klon**“ in der Gentechnologie:

Mio. von genetisch identischen Bakterien, die alle ein bestimmtes Fremd-DNA-Fragment beinhalten

- „**Klonieren**“: Herstellung eines solchen Bakterien-Klons

- „**in vitro-neukombinierte DNA**“ (*engl.“recombinant DNA”*):

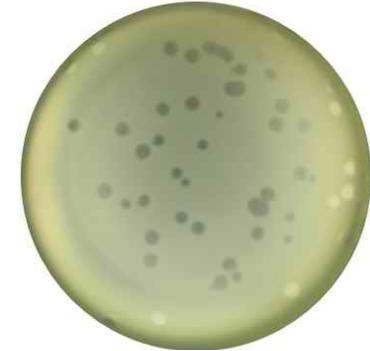
vom Gentechnologen konstruiertes Hybrid-Konstrukt aus „Fremd“-DNA und replikationsfähiger Träger-DNA (Vektor)

- „**GVO**“: gentechnisch veränderter Organismus



Die „Zutaten“ der Reihe nach....

Restriktionsenzyme

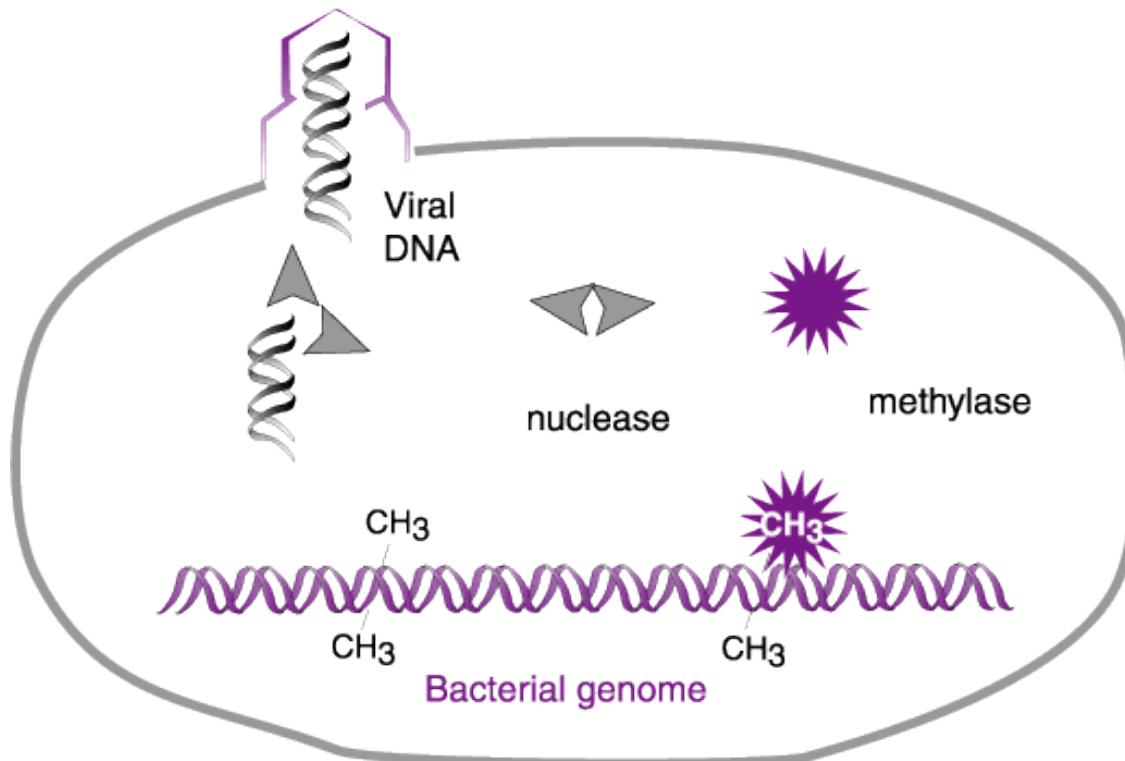


λ -Phage vermehrt auf E. coli K	+ pfu*
➤ „Ernten“ der erfolgreichen Phagen	
➤ Beimpfen von E. coli K	+++++ pfu
➤ Beimpfen von E. coli B	+ pfu

d.h. **Wachstum auf E. coli B „restringiert“**, während Phagen auf E. coli K angepasst sind und sich dort sehr gut vermehren können

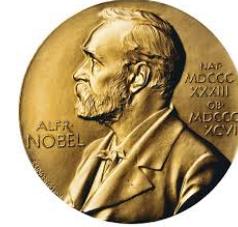
* plaque forming units

Restriktions/Modifikationsenzyme schützen Bakterien vor eindringender fremder DNA



Modifikation durch Methylierung am Cytosin oder Adenin
> N6-Methyl-Adenin bzw. 5-Methyl-Cytosin

Restriktionsenzyme



Nobelpreis 1978



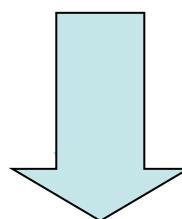
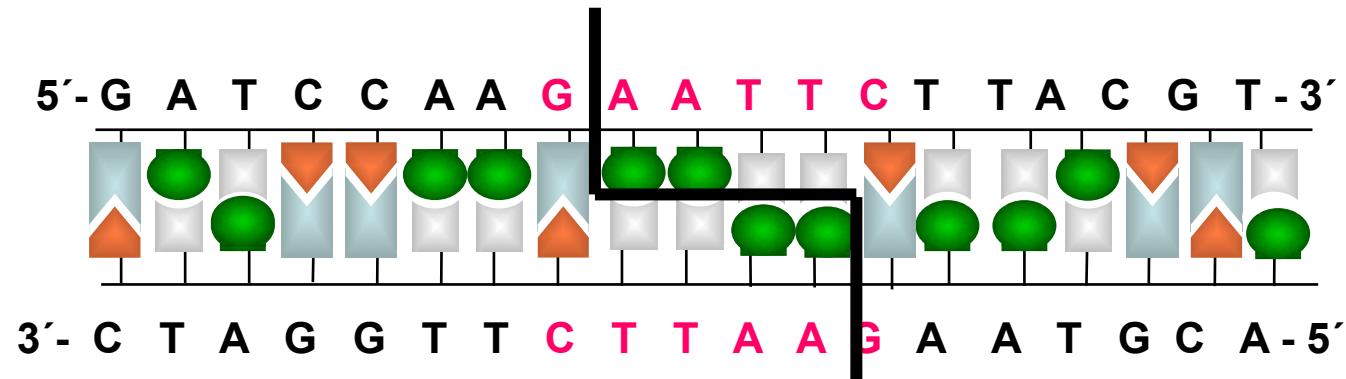
H.O. Smith



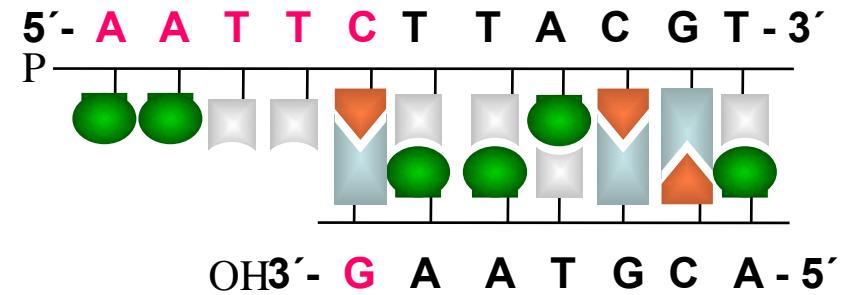
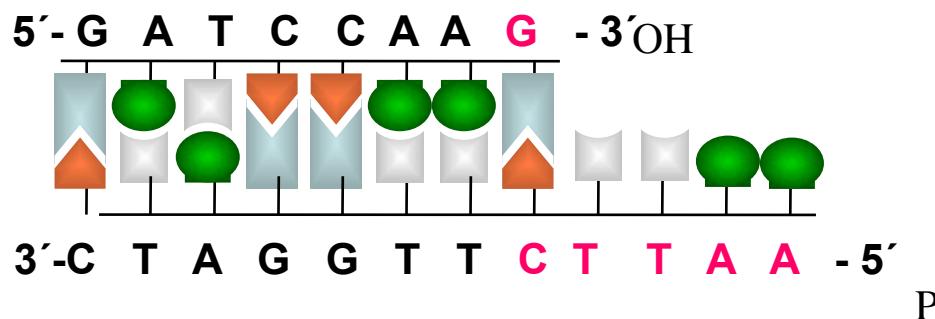
D. Nathans

- Restriktionsendonukleasen schneiden „eindringende“, fremde DNA in Bakterien!
- Zelleigene DNA wird durch „Modifikation“ (d.h. Methylierung) vor dem Schneiden geschützt.
- Reinigung des ersten Restriktionsenzyms aus *Haemophilus influenzae* (*Hinf I*)
- Anwendung von Restriktionsenzym-Schnittstellen auf der DNA als „Landmarken“: Kartierung der SV40-Virus-DNA

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA sequenzspezifisch



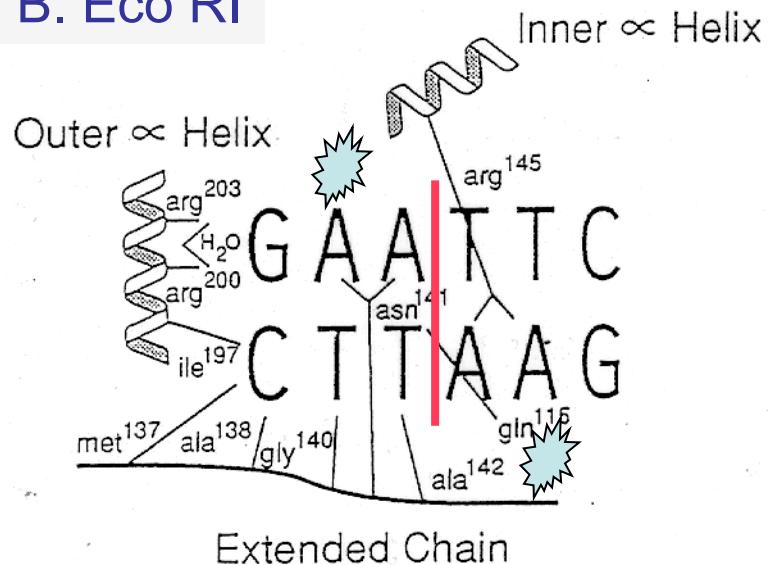
x Eco RI



DNA-Restriktionsenzyme (Typ II)

- erkennen und schneiden meist innerhalb einer 4 bis 6 Bp langen Sequenz
- Erkennungssequenzen sind **palindromisch!**
- entstehende Enden besitzen 3'OH bzw. 5'P-Gruppen
- schneiden entweder „**versetzt**“ (macht überhängende Enden) oder auch „**glatt**“
- mehrere hundert Enzyme mit unterschiedlichen Erkennungs-Sequenzen sind bekannt und kommerziell erhältlich

z. B. Eco RI



Roter Strich = Symmetrieachse des Palindroms
= Methylierungsstelle

Beispiele

Restriktions-enzym	Erkennungssequenz	Enden der Restriktionsfragmente
ECORI	5'—pGpApApTpTpC — 3' 3' — CpTpTpApApGp — 5'	5'—pG _{OH} 3' — 3' 3' — CpTpTpApAp 5' <i>keZessiv</i>
HindIII	5'—pApApGpCpTpT — 3' 3' — TpTpCpGpApAp — 5'	5'—pA _{OH} 3' 3' — TpTpCpGpAp 5'
PstI	5'—pCpTpGpCpApG — 3' 3' — GpApCpGpTpCp — 5'	5'—pCpTpGpCpA _{OH} 3' 3' — Gp 5' <i>lückig</i>
KacIII	5'—pGpGpCpC — 3' 3' — CpCpGpGp — 5'	5'—pGpG _{OH} 3' blunt 3' — CpCp 5' ends

Erkennungssequenz und jeweilige Schnittweise einiger gebräuchlicher Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind Typ-II-Restriktionsendonukleasen, die hydrolytisch das Phosphat-Rückgrat der DNA angreifen und beide Stränge der DNA spalten. Es in jedem Strang ein 3'-OH- und ein 5'-P-Ende.

3'-zurück-hängendes Ende

3'-zurück-hängendes Ende

5'-zurück-hängendes Ende

glattes Ende





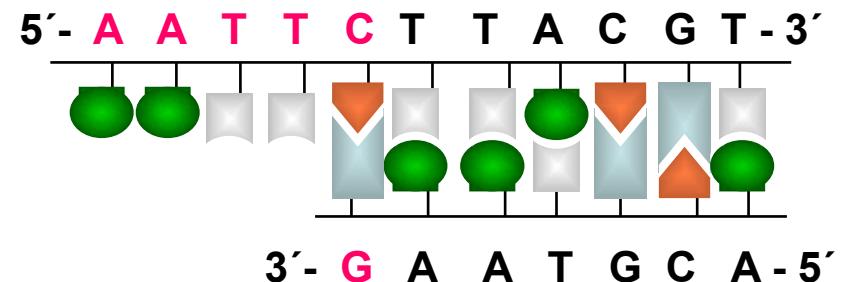
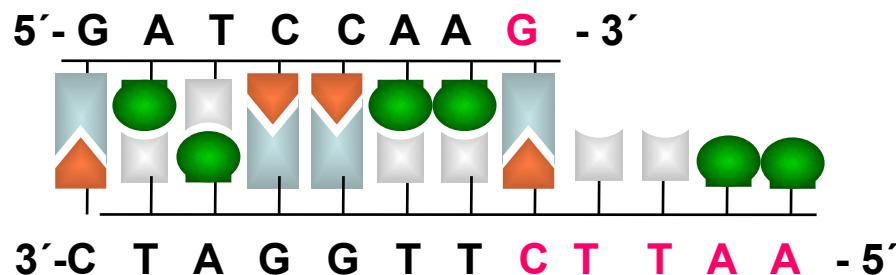
rebase.neb.com

A T						C G					
Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo- nuclease	Number of recogni- tion sites on pBR λ	322		Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo- nuclease	Number of recogni- tion sites on pBR λ	322	
1	A A T T	<i>Tsp EI</i>	188	8		68	A↓C G T	<i>Mae II</i>	143	10	
2	A A A T T T	—	16	0		69	A A C G T T	—	7	4	
3	G↓A A T T C	<i>Eco RI</i>	5	1		70	G A C G T↓C	<i>Aat II</i>	10	1	
4	(G)↓A A T T (C)	<i>Fse I</i>	58	1		71	G A C G T↓C	<i>Ssp 5230 I</i>	10	1	
5	C↓A A T T G	<i>Mun I</i>	8	0		72	C A C↓G T G	<i>Bbr P I</i>	3	0	
6	T A A T T A	—				73	(C) A C↓G T (G) (T)	<i>Bsa AI</i>	14	1	
7	T T A A T↓T A A	<i>Pac I</i>	0	0		74	T A C↓G T A	<i>Sna B I</i>	1	0	
8	G A T C	<i>Dpn I</i>	116	22		75	G C G G C	<i>Cfo I</i>	215	31	

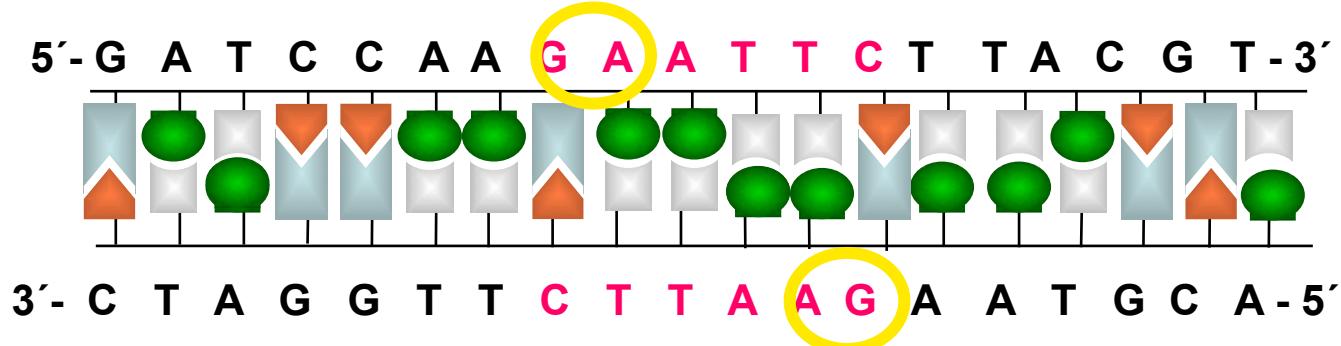
- + Schneiden inhibiert bei Methylierung
- 0 Schneiden unbeeinflusst von Methylierung
- M Schneiden erfordert Methylierung

DNA-Ligasen

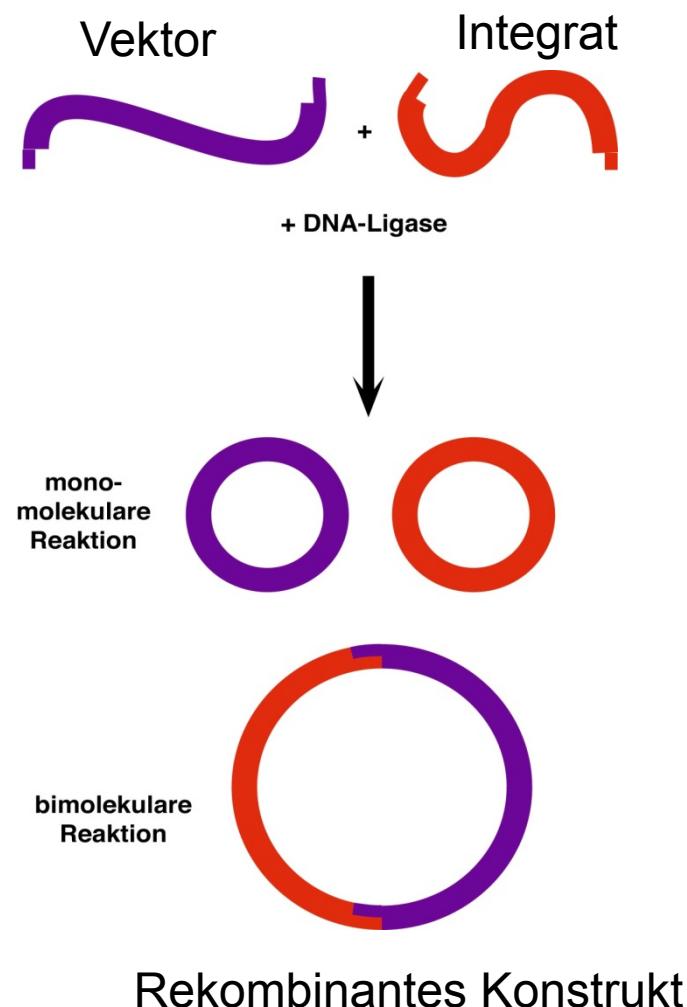
Katalyse der Bindung zwischen 3'-OH und 5'-P



DNA-Ligase



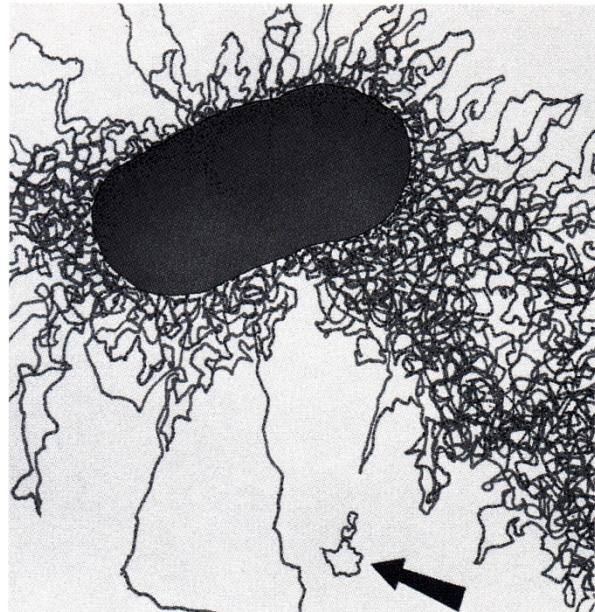
Ligation: mehrere Möglichkeiten



Es entstehen (ohne Anwendung spezieller Tricks) alle möglichen Ligationsprodukte.

Q:
Wie findet man die Bakterien, die rekombinante Moleküle aufgenommen haben?

Vektoren



- z. B. **Plasmide** -
ringförmige, extrachromosomalen
DNA-Moleküle in Bakterien
- Plasmide sind „**Replikons**“
 - Plasmide sind nicht essentiell,
aber ihre Gene sind nützlich

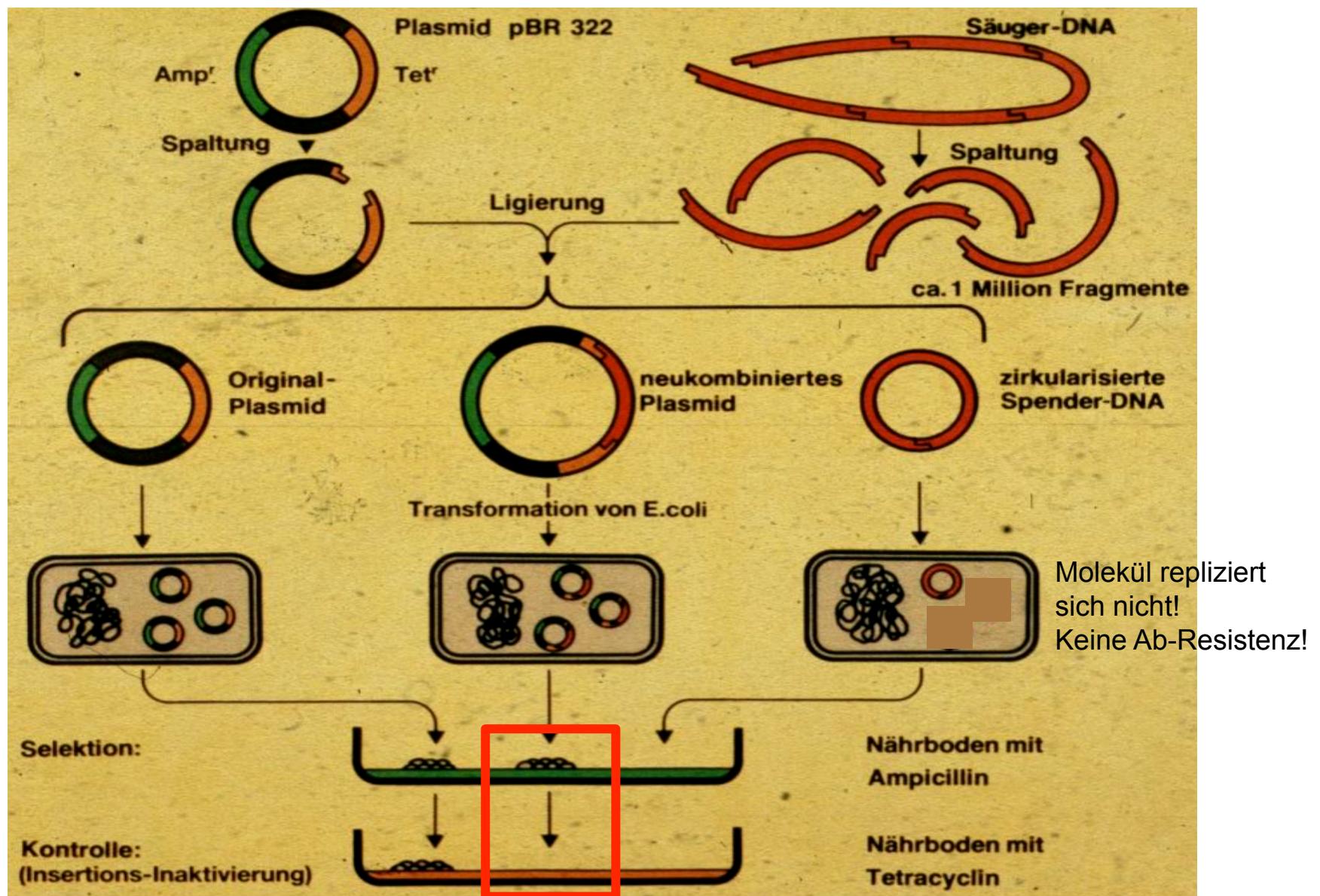
- z. B.
- Resistenz-Genen gegen Antibiotika
 - Gene für Colicine (töten andere Bakterien)
 - Schwermetallresistenz-Gene
 - Nif-Gene (Nitrogenase für N_2 -Fixierung)

Plasmid-Vektoren brauchen...

- einen „high copy number“-**Replikations-Origin**
- nur einmal pro Vektor vorhandene **Restriktionsschnittstellen** zum gezielten Einfügen der Fremd-DNA
- **Markergene** zum Erkennen,
 - (1) ob der Vektor in die Bakterienzelle aufgenommen ist.
 - (2) ob der Vektor eine Fremd-DNA trägt.



Vektor mit zwei Ab-Resistenzgenen



Prinzip: „Insertions-Inaktivierung“

- das **Integrat** „unterbricht“ das **Marker-Gen** und zerstört dessen genetische Funktion!

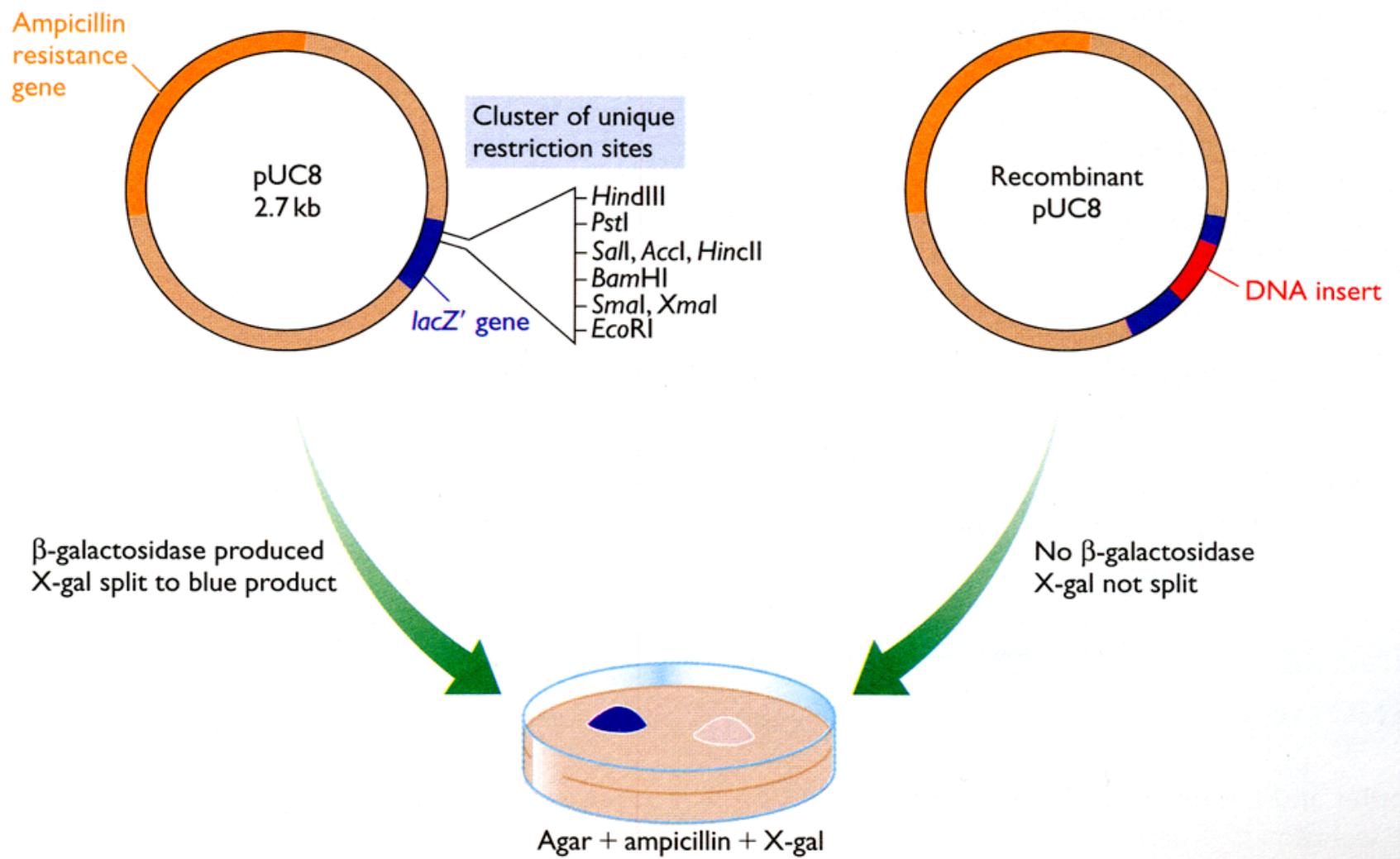
Verschiedene Möglichkeiten...

- > Stop der Transkription
- > Stop der Translation (durch eingefügte Stop-Kodons)
- > Veränderung des „Leserahmens“ und dadurch Produktion eines nicht-funktionellen Proteins

- das inaktivierte Marker-Gen zeigt die **Anwesenheit des Integrats** an!



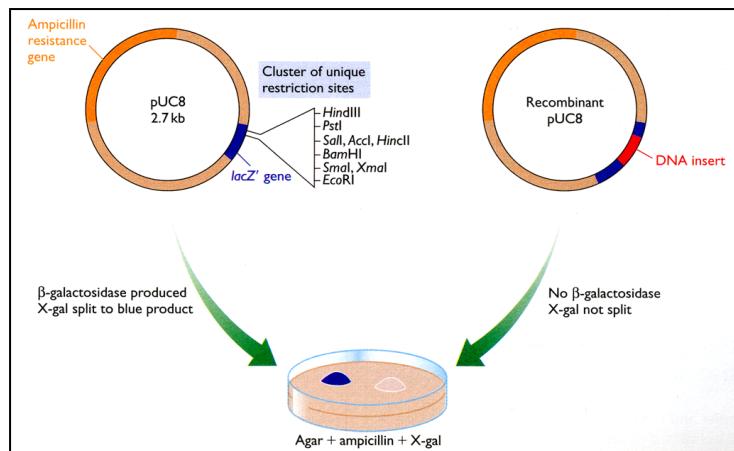
pUC: der meist verwendete Vektor



BLAU-WEISS-Selektion: nur weiße Kolonien enthalten das Fremdgen!!!

pUC: der meist verwendete Vektor

Zwei Marker-Gene sind erforderlich...



Markergen 1:

Das Ampicillin-Resistenzgen selektiert Zellen, die zumindest ein Plasmid aufgenommen haben. (Amp ist im Agar-Nährboden enthalten)

Markergen 2:

Das lacZ-Gen zeigt an, ob Integrat im Plasmid vorhanden ist!

Intaktes LacZ > funktionsfähige β -Gal > Substratumsatz > BLAU

Durch Integrat zerstörtes LacZ > β -Gal defekt > WEISS



Gentechnik im Modul 8



...es werde LICHT!



Warnschild: Biohazard - biologische Gefährdung.

Sicherheit in der Gentechnik

§ 7

Sicherheitsstufen, Sicherheitsmaßnahmen

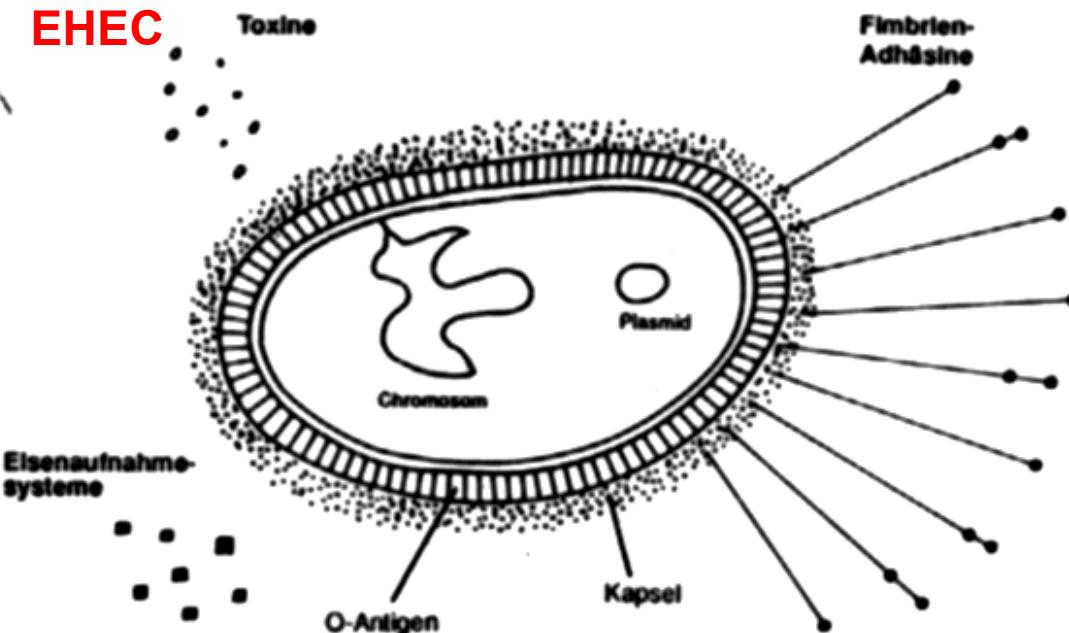
(1) Gentechnische Arbeiten werden in vier Sicherheitsstufen eingeteilt:

1. Der Sicherheitsstufe 1 sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszugehen ist.
2. Der Sicherheitsstufe 2 sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem geringen Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.
3. Der Sicherheitsstufe 3 sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem mäßigen Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.
4. Der Sicherheitsstufe 4 sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem hohen Risiko oder dem begründeten Verdacht eines solchen Risikos für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.



Warnschild: Biohazard -biologische Gefährdung.

Sicherheit von E. coli als Wirt



E. coli K12

- keine Toxine
- keine Fimbrien-Adhäsine
- keine Eisenaufnahmesysteme
- keine Kapsel
- reduziertes O-Antigen
- keine Plasmide
- kleineres Genom

E. coli K12 fehlen mehr als 1000 Gene gegenüber pathogenem E. coli-Stamm (z.B. EHEC).

K12 kann menschlichen Darm nicht besiedeln ! > **Containment**

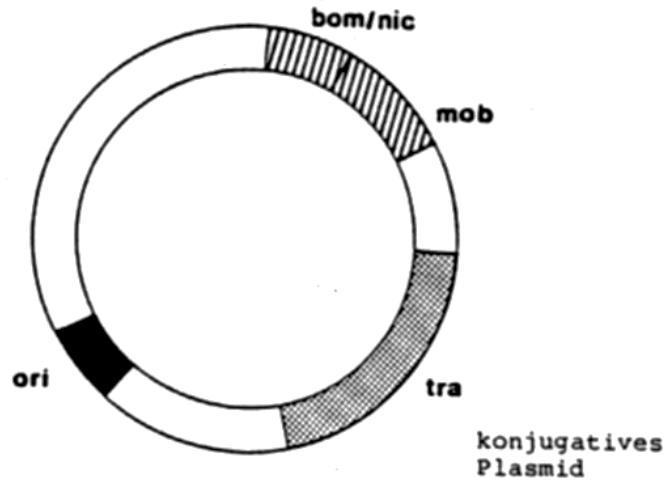


Warnschild: Biohazard - biologische Gefährdung.

Sicherheit moderner Plasmidvektoren

F-Plasmid

- breitet sich über Konjugation von Zelle zu Zelle aus!



bom/nic: Origin of Transfer
mob: mobility genes
tra: transfer-Gene (Pili)

Das **Vektorplasmid pUC18** und Nachfolger haben **KEINE** dieser genetischen Eigenschaften mehr!

Keine Konjugation = kein unerwünschter Gentransfer = **containment !!!**



Warnschild: Biohazard - biologische Gefährdung.

Trotzdem gilt im Praktikum:



~~Essen~~

~~Trinken~~

~~Rauchen~~

Kittel !!!



Gentechnik XXXL („synthetic biology“)

Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome

Daniel G. Gibson, Gwynedd A. Benders, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Evgeniya A. Denisova, Holly Baden-Tillson, Jayshree Zaveri, Timothy B. Stockwell, Anushka Brownley, David W. Thomas, Mikkel A. Algire, Chuck Merryman, Lei Young, Vladimir N. Noskov, John I. Glass, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith*

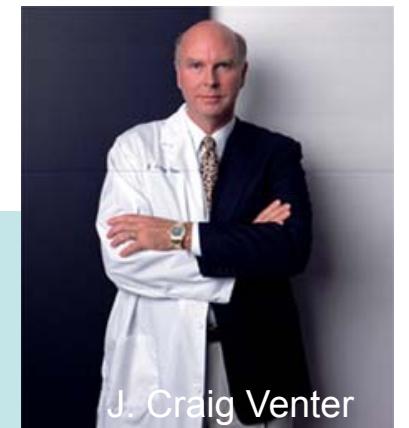
We have synthesized a 582,970-base pair *Mycoplasma genitalium* genome. This synthetic genome, named *M. genitalium* JCVI-1.0, contains all the genes of wild-type *M. genitalium* G37 except MG408, which was disrupted by an antibiotic marker to block pathogenicity and to allow for selection. To identify the genome as synthetic, we inserted “watermarks” at intergenic sites known to tolerate transposon insertions. Overlapping “cassettes” of 5 to 7 kilobases (kb), assembled from chemically synthesized oligonucleotides, were joined by in vitro recombination to produce intermediate assemblies of approximately 24 kb, 72 kb (“1/8 genome”), and 144 kb (“1/4 genome”), which were all cloned as bacterial artificial chromosomes in *Escherichia coli*. Most of these intermediate clones were sequenced, and clones of all four 1/4 genomes with the correct sequence were identified. The complete synthetic genome was assembled by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, then isolated and sequenced. A clone with the correct sequence was identified. The methods described here will be generally useful for constructing large DNA molecules from chemically synthesized pieces and also from combinations of natural and synthetic DNA segments.

http://www.ted.com/talks/craig_venter_on_dna_and_the_sea.html

<http://www.biology.iupui.edu/biocourses/Biol540/15genomefullCSS.html>

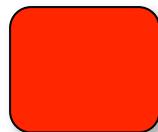
JBS Haldane once said that God had a fondness for beetles. Until Craig Venter creates a few, I don't think God 1.0 needs to worry.

(Prof. Steven Rose, London)

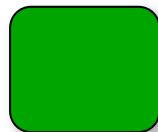


J. Craig Venter

Anwendungsgebiete der Gentechnik



Rote Gentechnik: Medizin (Diagnostik, Therapie, Forschung)



Grüne Gentechnik: Pflanzenzucht & Landwirtschaft



Weiße Gentechnik: Wirkstoffproduktion (Medikamente, Enzyme, Energieträger etc.)



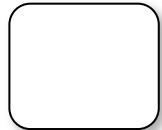
Graue Gentechnik: Umwelt (Bioremediation)



Weiße Gentechnik

Produkte der weißen Biotechnologie, die bereits heute im Tonnenmaßstab hergestellt werden (* enzymatisch hergestellt) nach DECHEMA, 2004.

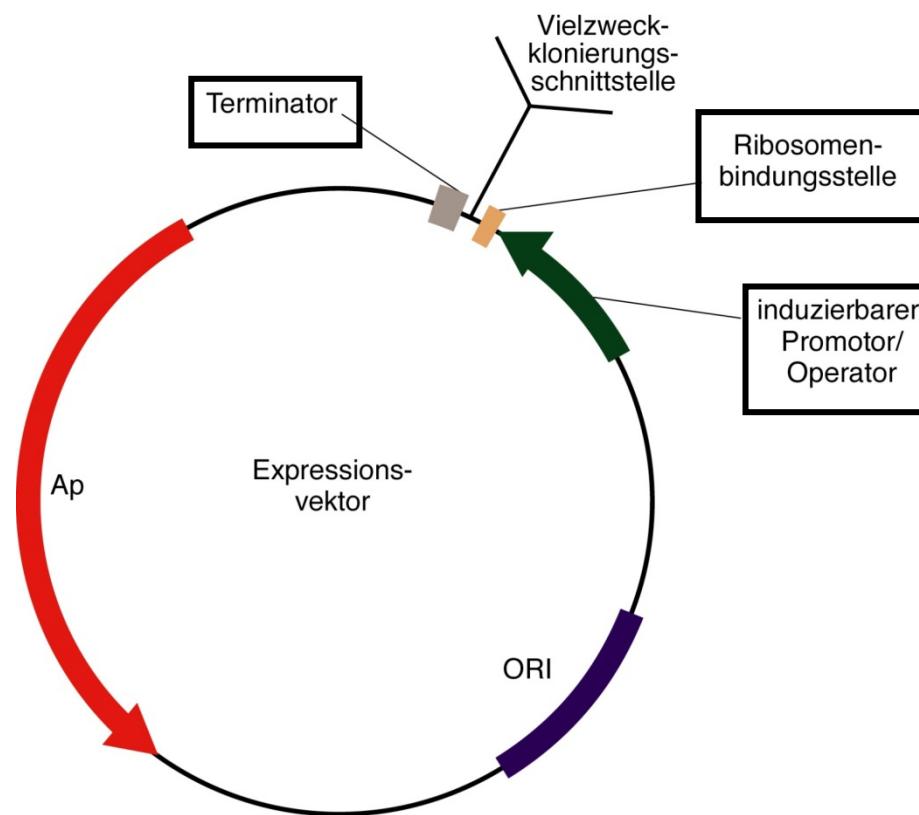
Produkt	Weltjahresproduktion (t/a)	Anwendung	Produkt	Weltjahresproduktion (t/a)	Anwendung
Säuren					
Zitronensäure	1.000.000	Lebensmittel, Waschmittel	Penicilline	45.000	Medizin, Futtermittelzusatz
Essigsäure	190.000	Lebensmittel	Cephalosporine	30.000	Medizin, Futtermittelzusatz
Gluconsäure	100.000	Lebensmittel, Textil, Metall	Tetracycline	5.000	Medizin
Itaconsäure	15.000	Kunststoff, Papier, Klebstoff	Biopolymere		
L-Apfelsäure*	100	Säuerungsmittel	Polylactid	140.000	Verpackung
Aminosäuren					
L-Glutamat	1500.000	Geschmacksverstärker	Xanthan	40.000	Erdölförderung, Lebensmittel
L-Lysin	700.000	Futtermittel	Dextran (-derivate)	2.600	Blutersatzstoff
L-Threonin	30.000	Futtermittel	Vitamine		
L-Asparaginsäure*	13.000	Aspartam-Herstellung	Ascorbinsäure (Vit. C)	80.000	Pharma, Lebensmittel
L-Phenylalanin	10.000	Aspartam, Medizin	L-Sorbose	50.000	Pharma, Lebensmittel
L-Tryptophan	1.200	Ernährung, Futtermittel	(Vit. C Vorstufe)	30.000	Wirkstoff, Futterzusatz
L-Arginin	1.000	Medizin, Kosmetik	Riboflavin (B ₂)		
L-Cystein	500	Pharma, Lebensmittel	Kohlenhydrate		
L-Alanin*	500	Infusionslösungen	Glucose*	20.000.000	Flüssigzucker
L-Methionin	400	Infusionslösungen	High Fructose Syrup*	8.000.000	Getränke, Ernährung
Lösungsmittel					
Bioethanol	18.500.000	Lösungsmittel, Energieträger	Fructooligosaccharide*	10.500	Präbiotikum
			Cyclodextrine*	5.000	Kosmetik, Pharma, Lebensmittel



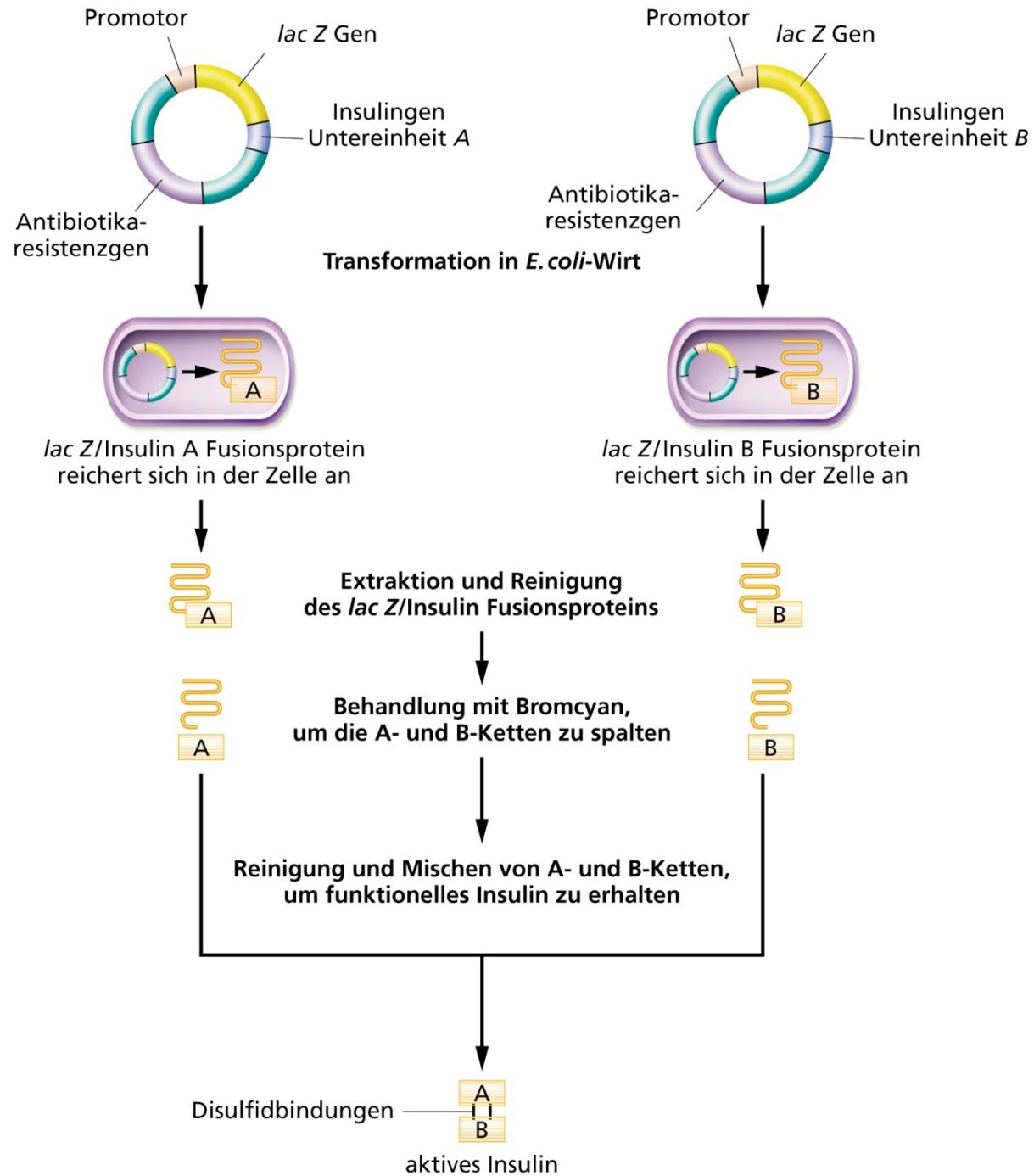
Weisse Gentechnik

Expressions-Vektor:

ermöglicht Transkription und Translation eines Fremd-Gens in der Wirtszelle (z.B. E. coli)



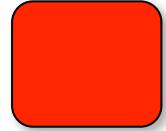
Insulin aus E. coli



Rekombinante Medikamente

- Insulin Diabetes
 - Faktor VIII Blutgerinnung
 - Erythropoietin Anämie
 - Wachstumshormon Zwergwuchs
 - Gewebe-Plasminogen Aktivator (tPA) Infarkt
 - G-Interferon Krebs
 - Epidermaler Wachstums-Faktor Hauttransplantation
- etc etc





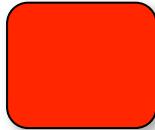
Rote Gentechnik

Transgene Tiere (zusätzl. Gen > Phänotyp? > Genfunktion?)

Knock-Out Tiere (Null-Mutation > Phänotyp? > Genfunktion?)

Gentherapie am Menschen (Korrektur von Mutationen)

(Klonen) (ist eigentlich Reproduktionstechnik!)



Gentransfer bei Tieren



Die fremde DNA muss in die Chromosomen der Zygote gelangen, wenn der ganze Organismus (Soma- und Keimzellen) transgen sein soll!

Eine gängige Methode ist die Mikroinjektion der DNA in den Zellkern einer befruchteten Eizelle.

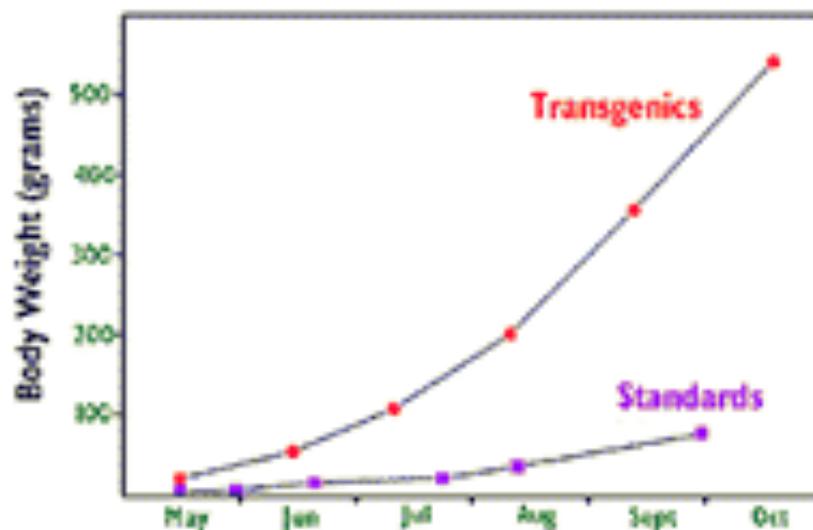
Der Integrationsort ist nicht voraus bestimmbar!

Microinjection of a One-celled Mouse Embryo

(Courtesy of Mark Steinhelper, Cold Spring Harbor Laboratory.)



Transgene Tiere und Nahrung



Nach 20 Jahre dauerndem Genehmigungsprozess seit 2015 in USA zugelassen.

- Kein Umweltrisiko durch Entweichen: nur sterile Weibchen in Inland-Zuchtfarmen
- Stabilität der Transgenexpression und Toxikologie geprüft

Achtung: rekombinant in Bakterien hergestelltes Wachstumshormon schon seit 1997 in EU für Lachsfütterung zugelassen!



Transgene Tiere und Medizin: „Gene Pharming“

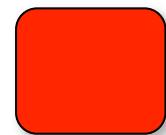
- Ziel: **Überexpression** pharmazeutischer Wirkstoffe



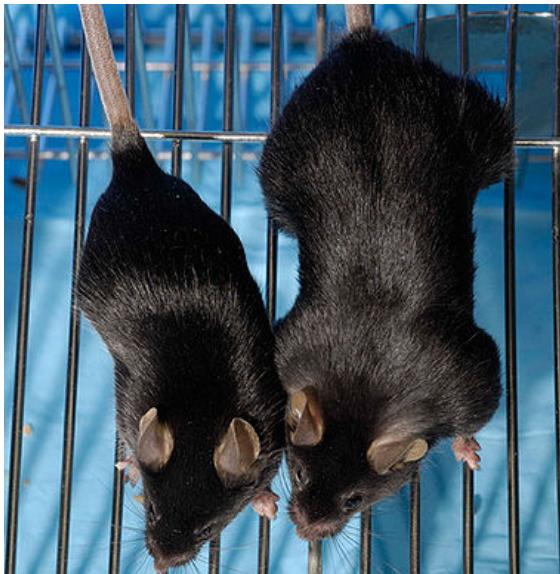
GTC Biotherapeutics:

- Antithrombin III in Milchdrüse von Ziegen
- FDA approval im Februar 2009

- Probleme: Transgenese-Technik teuer,
Aufbau stabiler Herden langwierig,
> „Klonen“ transgener Produzententiere attraktiv



Knock Out-Tiermodelle für die biomedizinische Forschung

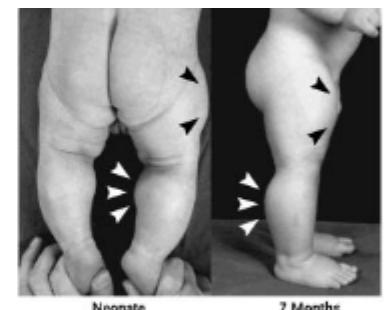


Wildtyp-Maus

Myostatin Knock-Out
Maus

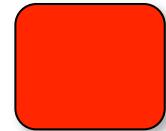
- Myostatin, ein Wachstumsfaktor der TGFbeta-Familie, kontrolliert das Muskelwachstum

Natürliche Mutation
Im Menschen...

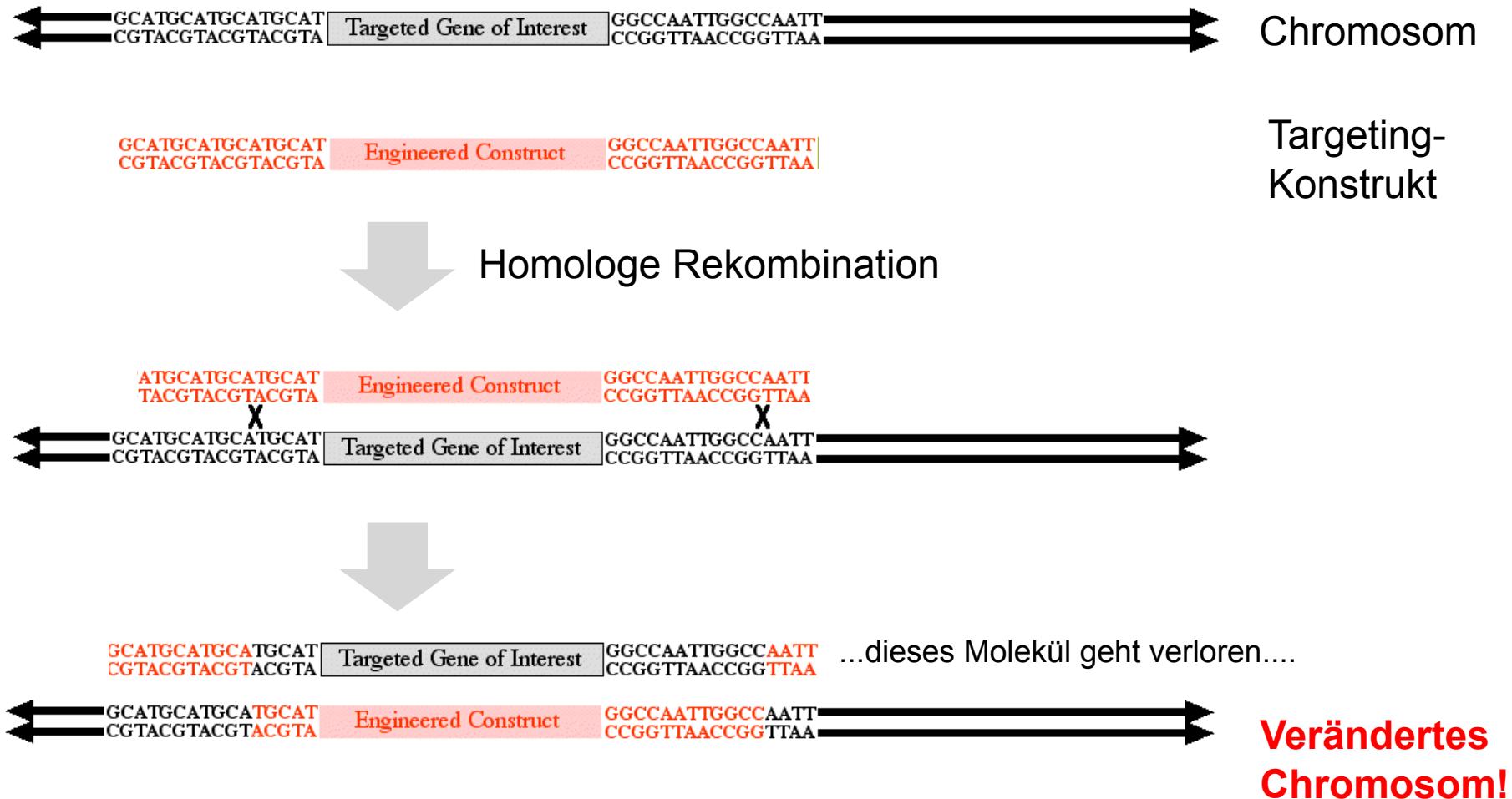


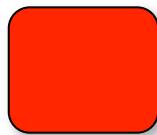
Neonate

7 Months

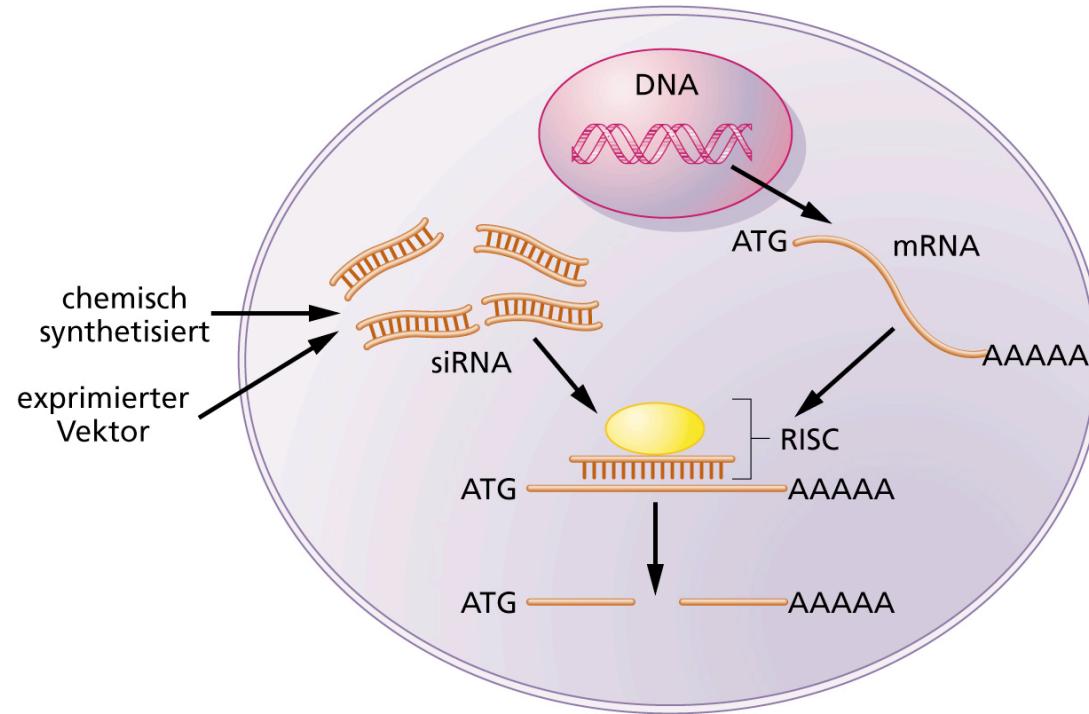


Gen-Knockout oder Genkorrektur durch Homologe Rekombination





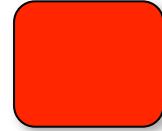
Alternative KO-Methode: RNA-Interferenz



Achtung:
Hier wird nicht das Gen,
sondern die mRNA
ausgeschaltet

RNA-Interferenz (RNAi). Kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle, so genannte kurze, interferierende RNAs (siRNAs) werden in eine Zelle eingeführt. In der Zelle werden sie Bestandteil des RNA-induzierten Silencingkomplexes (RISC, engl. *RNA-introduced silencing complex*). Der Antisense-Strang der siRNA bindet innerhalb der Zelle an die komplementäre mRNA. Er zielt auf zelluläre mRNAs ab, die innerhalb des RISCs durch Enzyme gespalten wird. Die gespaltene mRNA wird anschließend abgebaut und nicht translatiert.

Wir werden noch sehen (VL Genregulation): Das Ganze gibt es auch als natürlichen Prozess der post-transkriptionellen Genregulation (microRNAs)!

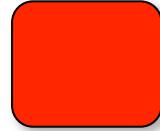


Gentherapie am Menschen

Ziel : Korrektur eines Gendefekts

- besonders geeignet für **MONOGENE** Erkrankungen
- nur **somatische** !! Gentherapie erlaubt
- **Keimbahn**-Gentherapie in D gesetzlich **verboten** !! (§ 5 Embyonenschutzgesetz, 1990)
- häufig genetisch abgeschwächte **Viren als Vektoren**
- **Risiken**: ungezielte Integration von Fremd-Genen (Tumorentstehung) und Immun-Reaktion auf virale Vektoren
- Weltweit mehr als 2200 klinische Studien, aber noch keine allgemeine Zulassung

<http://www.genetherapy.net.com/clinical-trials.html>



Gentherapie am Menschen

14. Sept. 1990: Erste **somatische** Gentherapie am Menschen



Ashanthe de Silva, damals 4 Jahre alt

SCID, severe combined immunodeficiency (1:100 000)

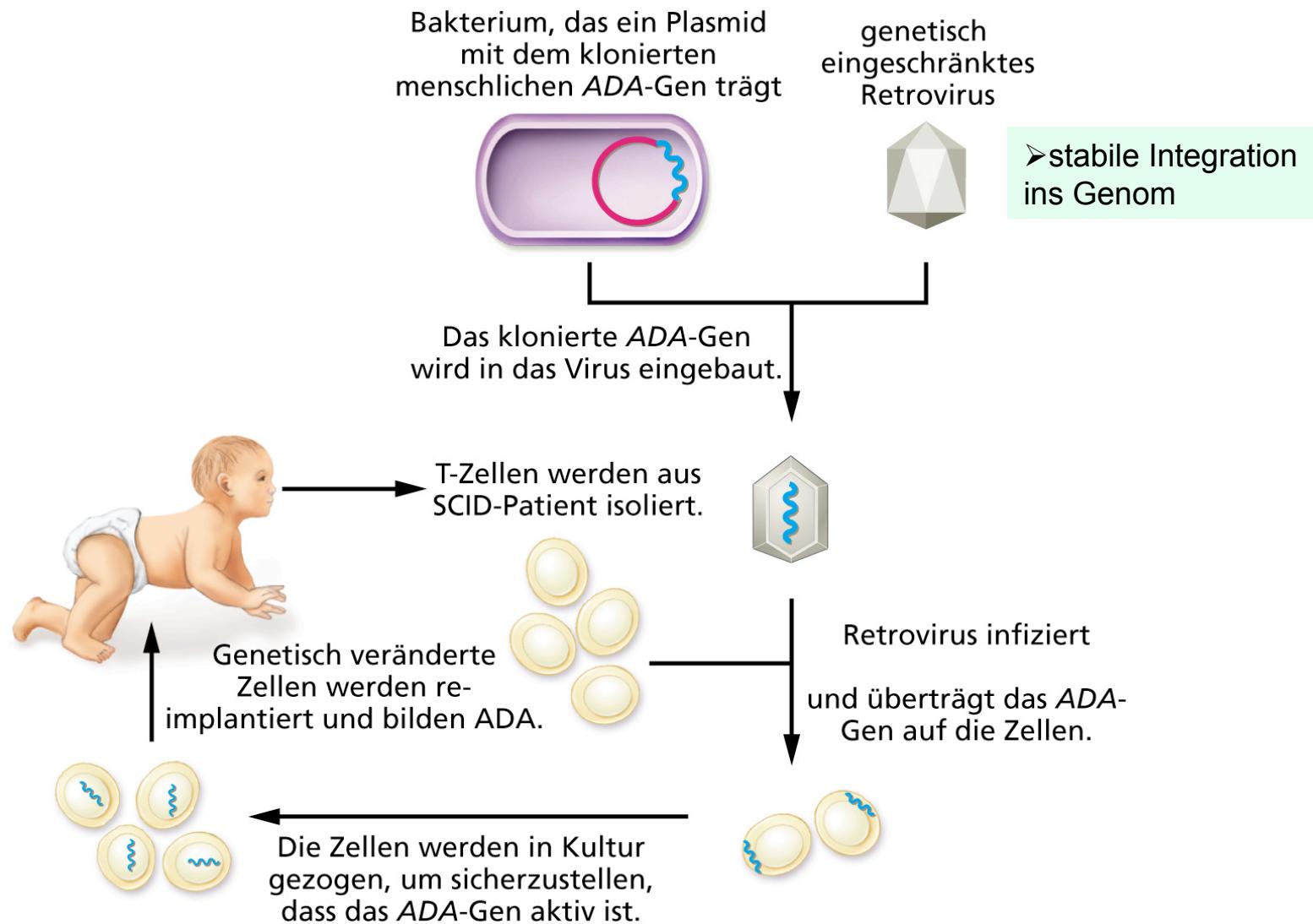
Adenosin-Desaminase (ADA) - Mutation
> Keine T- und B-Lymphozyten!!

<https://www.youtube.com/watch?v=IgES04-cSr8>



Ashanthe de Silva – Very First Gene Therapy Patient

Gentherapie am Menschen



Gentherapie der Haut rettet todkranken Jungen

AKTUALISIERT AM 08.11.2017 - 19:01

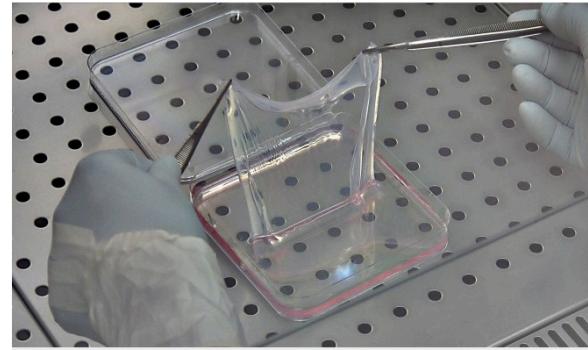


Ein Siebenjähriger liegt in einer Bochumer Klinik, der Tod fast unausweichlich, seine Haut wegen eines Gendefektes zerstört. Stammzellforscher sehen eine Chance: Sie retten ihn, indem sie dem Jungen eine runderneuerte Ersatzhaut züchten.

Laminin332-Defekt



Figure 1 | Regeneration of the transgenic epidermis. a, Clinical picture of the patient showing massive epidermal loss. b, Schematic representation of the clinical picture. The denuded skin is indicated in red; blistering areas are indicated in green. Flesh-coloured areas indicate currently non-blistering skin. Transgenic grafts were applied on both red and green areas. c, Restoration of patient's entire epidermis, with the exception of very few areas on the right thigh, buttocks, upper shoulders/neck and left axilla (white circles, altogether $\leq 2\%$ of TBSA). d, Normal skin functionality and elasticity. e, Absence of blister formation at sites where post-graft biopsies were taken (arrow).



Die aus Stammzellen angezüchteten Hauttransplantate. Bild: dpa

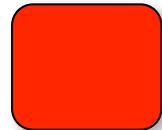
ARTICLE 16.11.2017

doi:10.1038/nature24487

Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells

Tobias Hirsch^{1*}, Tobias Rothoeft^{2*}, Norbert Teig^{2*}, Johann W. Bauer^{3*}, Graziella Pellegrini^{4,5*}, Laura De Rosa^{5*}, Davide Scaglione⁶, Julia Reichelt³, Alfred Klausegger³, Daniela Kneisz³, Oriana Romano⁷, Alessia Secone Seconetti⁵, Roberta Contin⁵, Elena Enzo⁸, Irena Jurman⁸, Sonia Carulli⁹, Frank Jacobsen¹, Thomas Luecke¹⁰, Marcus Lehnhardt¹, Meike Fischer², Maximilian Kueckelhaus¹, Daniela Quaglino⁷, Michele Morganante⁸, Silvio Bicciato⁷, Sergio Bondanza⁹ & Michele De Luca⁵

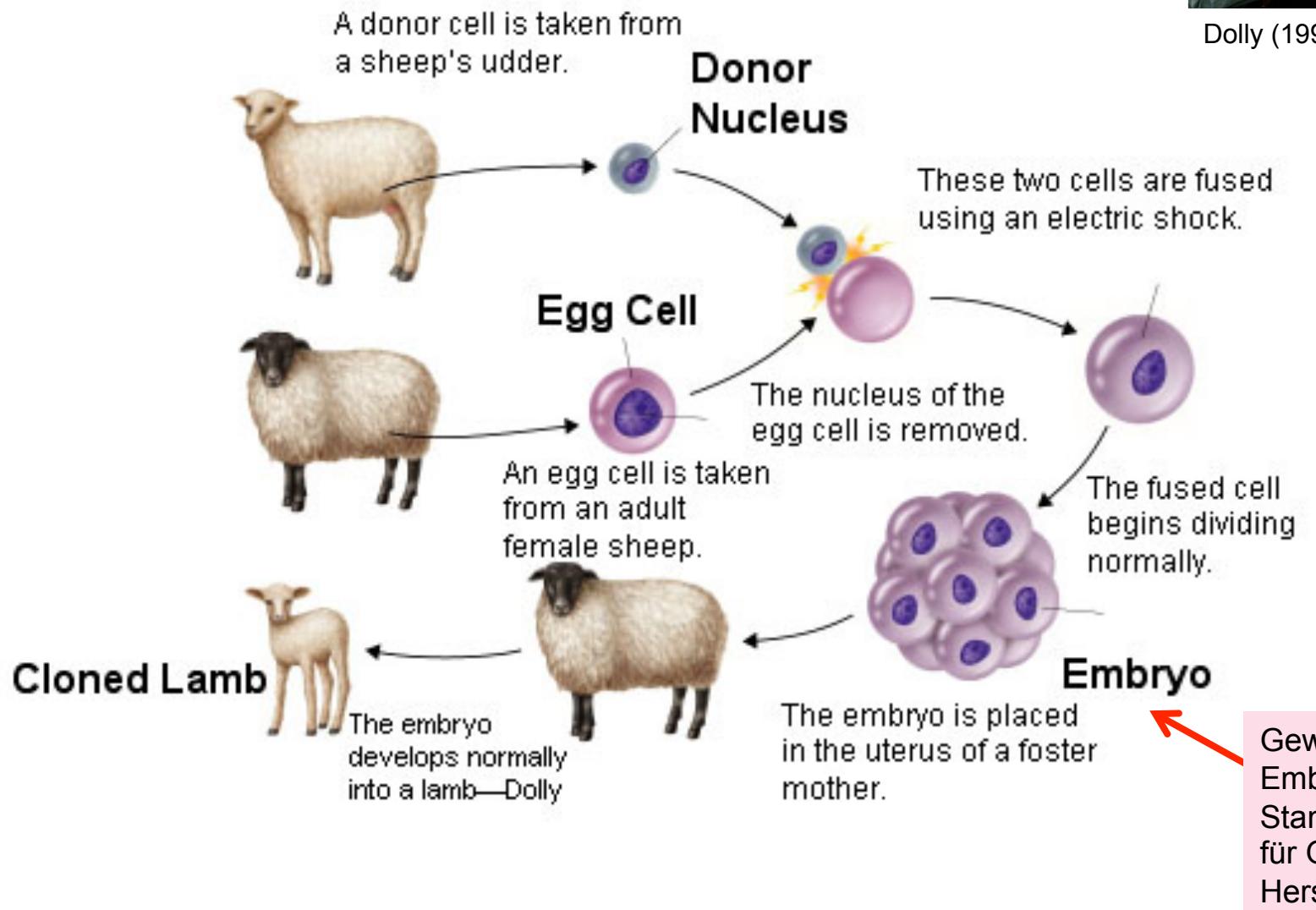
Junctional epidermolysis bullosa (JEB) is a severe and often lethal genetic disease caused by mutations in genes encoding the basement membrane component laminin-332. Surviving patients with JEB develop chronic wounds to the skin and mucosa, which impair their quality of life and lead to skin cancer. Here we show that autologous transgenic keratinocyte cultures regenerated an entire, fully functional epidermis on a seven-year-old child suffering from a devastating, life-threatening form of JEB. The proviral integration pattern was maintained *in vivo* and epidermal renewal did not cause any clonal selection. Clonal tracing showed that the human epidermis is sustained not by equipotent progenitors, but by a limited number of long-lived stem cells, detected as holoclones, that can extensively self-renew *in vitro* and *in vivo* and produce progenitors that replenish terminally differentiated keratinocytes. This study provides a blueprint that can be applied to other stem cell-mediated combined *ex vivo* cell and gene therapies.

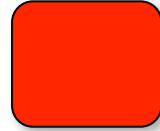


Klonen von Tieren



Dolly (1996-2003)





Klonen von Tieren

- ist nicht notwendigerweise auch „Gentechnik“ im engeren Sinne.
- ist interessant für kommerziell wichtige transgene Tiere.
- „Reproduktives Klonen“ beim Menschen per Gesetz verboten.
- Berichte über Klonen von Menschen (2005) waren Fälschungen.

https://en.wikipedia.org/wiki/Hwang_Woo-suk

- Neue Verfahren ermöglichen Herstellung von Stammzellen ohne Klonen durch Transfektion weniger Master-Transkriptionsfaktoren (*induced pluripotent stem cells, iPS*)!!



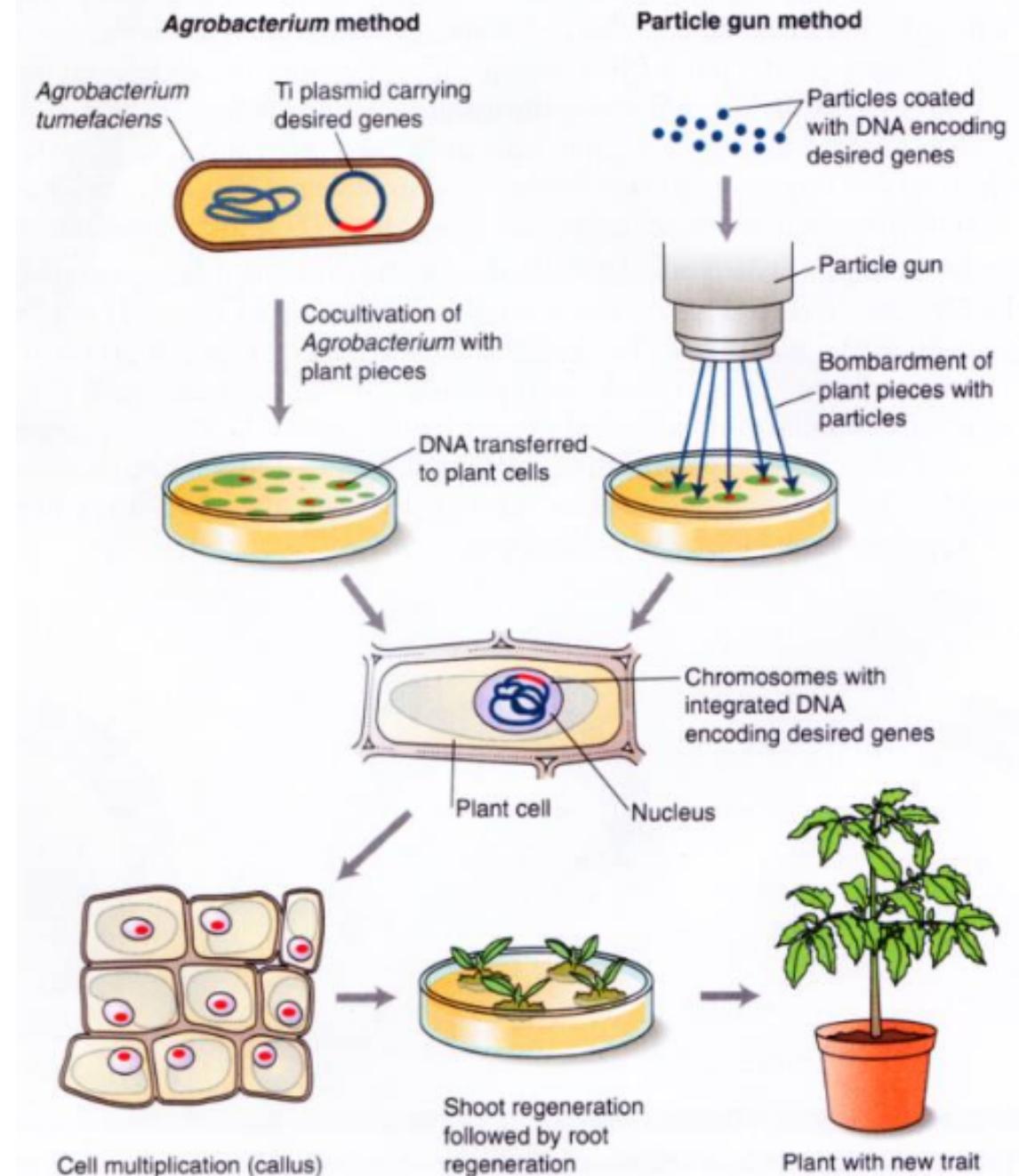


Grüne Gentechnik

1. Verbesserung agronomischer Eigenschaften :
Schädlingsresistenz, Unkrautbekämpfung,
Trockentoleranz, Salztoleranz etc.
2. Neue Produkteigenschaften :
z. B. glutenfreier Weizen, nikotinfreier Tabak,
verändertes Fettsäurespektrum
3. Wirkstoff-Produktion
z. B. *Plantibodies*

Gentransfer bei Pflanzen

Agrobakterien:
„natürliches“ Gentransfer-
System!



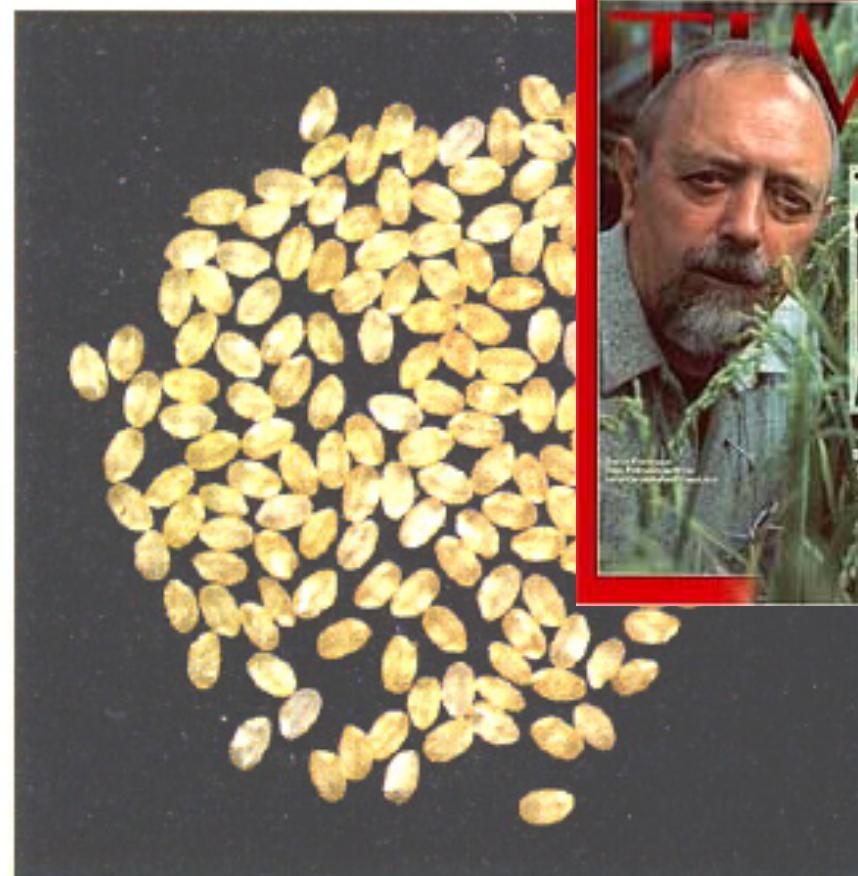
Produktverbesserung

Gelber Reis als Lieferant für Eisen und Vitamin A

Transgenen Reis, der beträchtliche Mengen Beta-Karotin und Eisen produziert, haben Schweizer und deutsche Wissenschaftler hergestellt. Die Pflanzen enthalten insgesamt sieben fremde Erbanlagen. Vier Gene, die von der Gruppe um Peter Beyer von der Universität Freiburg aus Narzissen gewonnen und kloniert wurden, bilden die für die Herstellung des Beta-Karotins notwendigen Enzyme. Die drei weiteren Gene stammen aus Pilzen, Bohnenpflanzen und Basmati-Reis. Sie verstärken die Bildung von leicht verwertbarem Eisen in den Körnern. Der transgene Reis enthält etwa doppelt so viel Eisen wie herkömmliche Sorten. Beta-Karotin wird nach Aussage von Ingo Potrykus vom Schweizer Bundesinstitut für Technologie in Zürich so stark angereichert, dass bereits 300 Gramm ausreichen, den Tagesbedarf an Vitamin A zu decken. Der gelbe Reis soll den Forschern zufolge helfen, zwei in vielen Ländern verbreitete Mangelkrankheiten zu lindern. Aus Beta-Karotin kann der menschliche Körper Vitamin A herstellen. Schätzungsweise 400 Millionen Menschen leiden weltweit an einem zu Infektionen und Augenkrankheiten führenden Mangel an diesem Vitamin. An ausreichend Eisen fehlt es häufig schwangeren Frauen. Noch lässt sich der transgene Reis allerdings nicht vermarkten, da man die weniger stark genutzte Japonica-Sorte verändert hat. Das internationale Reisforschungsinstitut „IRRI“ auf den Philippinen will nun die nützlichen Gene in den häufigeren Indica-Reis einkreuzen. F.A.Z.

Produkt
verbess

542
8.9.99



PETER BEYER, UNIVERSITÄT FREIBURG

Beta-Carotin verleiht dem „Golden Reis“ seine Farbe und macht ihn wertvoller für die Ernährung.

<http://www.goldenrice.org>



Agronomische Verbesserung: Schädlingsresistente Pflanzen mit *Bacillus thuringiensis*-Toxin (BT)



Mais-Zünsler:
12 Mio € Schaden in D pro Jahr

**Mais-Wurzelbohrer auf dem
Vormarsch**



Bt-Toxin: Eigenschaften

BT ist kristallines Protein. Es wird **NUR im Insektdarm in ein Endotoxin umgewandelt**, das den Ionenhaushalt stört und zum Tod der Insekten führt.

BT ist **hoch artspezifisch (400 Varianten)**

- > kein negativer Effekt auf den Menschen sowie die meisten Nicht-Ziel-Organismen!

BT wird im Boden **schnell abgebaut**

- > nach $\frac{1}{2}$ Jahr weg
- > sehr geringe Konzentrationen in Rhizosphäre

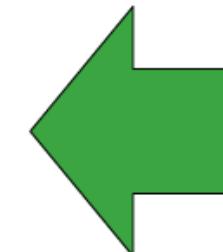
Zertifiziertes Mittel im ökologischen Landbau!



Anteil von GVO-Pflanzen

2014	Fläche GVO (Mio ha)	Anteil GVO (in %)
Soja	90,5	82
Baum- wolle	25,3	68
Mais	54,3	25
Raps	9,1	25

Daten: ISAAA-Report 2014





Risiken bei der Freisetzung von GVOs

- Auskreuzung des GVO
- Horizontaler Gentransfer von Markergenen
- Resistenzbildung bei Schädlingen
- “non target“-Effekte
- Produktsicherheit (Allergien)

... müssen Fall für Fall neu diskutiert und bewertet werden!!



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

ZENTRUM FÜR WISSENSCHAFTLICHE WEITERBILDUNG

[HOME](#) [ENGLISH](#) [SUCHE](#) [INDEX](#) [SITEMAP](#) [KONTAKT](#)

[AKTUELLES](#) [PROJEKTE](#) [WEITERBILDUNGSANGEBOTE](#) [TAGUNGEN](#) [SERVICE & BERATUNG](#) [FINANZIELLE FÖRDERUNG](#) [ONLINE-ANMELDUNG](#) [NEWSLETTER](#) [FAQ](#) [WIR ÜBER UNS](#)

Aktuelles

Projekte

► Weiterbildungsangebote

Master- und weiterbildende Studiengänge der JGU Mainz

Kontaktstudien

Lehrkräftefortbildungen

► Seminare

Bildungsprämie

► Gentechnik

Musik

ProfilPASS

Rutschungen

Strahlenschutz

Studieren 50 Plus

Gasthörerstudium

Sicherheit in der Gentechnik

Adressaten/ Adressatinnen

Personen, die als Projektleiter oder Beauftragte für die Biologische Sicherheit gentechnischer Anlagen bestellt werden sollen; Biologen, Mediziner sowie Sicherheitsfachkräfte mit molekularbiologischen oder biotechnologischen Kenntnissen.

Ziele

Die Teilnehmenden sollen Kenntnisse in Fragen der biologischen Sicherheit erlangen, insbesondere wird die Vermittlung der Lehrinhalte gemäß § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 der Gentechnik-Sicherheits-Verordnung erfolgen.

Veranstalter

Dr. Michael Rammelsberg, Beauftragter für Biologische Sicherheit an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anmeldung

Wichtiger Hinweis für Angestellte der Johannes Gutenberg-Universität und der Universitätsmedizin Mainz:
Bitte nutzen Sie die internen Anmeldeformulare in der rechten Spalte, eine Online-Anmeldung ist für Sie nicht möglich

Kontakt

Dr. Michael Rammelsberg,
Beauftragter für die biologische Sicherheit
gentechnischer Anlagen
Tel 06131/ 39-24808
Fax 06131/ 39-23475
Email: rammelsb@uni-mainz.de

Download

[Programm 2015 \(pdf\)](#)

[Programm 2016 \(pdf\)](#)

[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 24./25. November 2015 \(pdf\)](#)

[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 08./09. März 2016 \(pdf\)](#)

[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 22./23. September 2016 \(pdf\)](#)

[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 22./23. November 2016 \(pdf\)](#)

Technologische Probleme der klassischen Gentechnik bislang...

- **Transgenese:**

Insertionsort unbekannt; epigenetische Instabilität; Positionseffekte; diffizile Transformationstechniken; unerwünschte Markergene; aufwändig und langwierig

- **Gen-Knockout:**

ineffizient in Säugerzellen; oft unspezifisch

- **RNA-Interferenz:**

nur RNA-Ebene verändert; oft unspezifisch oder ineffizient

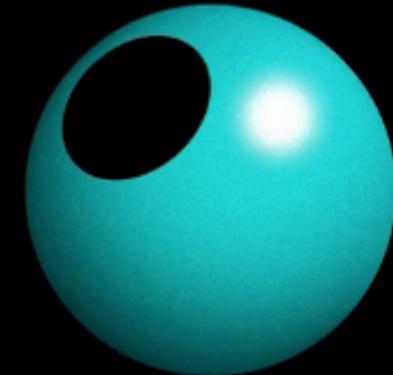
- **Gentherapie:**

Punktmutationen kaum zu korrigieren; unsichere (virale)Verfahren

The Genesis Engine.

We now have the power to quickly and easily alter DNA. It could eliminate disease. It could solve world hunger. It could provide unlimited clean energy.

It could really get out of hand.
by Amy Maxmen



SCIENTIFIC METHOD / SCIENCE & EXPLORATION

Gene editing tech named *Science* magazine's Breakthrough of the Year

The technique lets us edit just about any piece of DNA in a living cell or organism.

by Roheeni Saxena - Dec 31, 2015 5:00pm CET

[Share](#) [Tweet](#) [Email](#) 61



MPI Infektionsbio, B'schweig UC Berkeley
EMMANUELLE CHARPENTIER AND JENNIFER DOUDNA
PRINCESS OF ASTURIAS AWARD FOR TECHNICAL & SCIENTIFIC RESEARCH 2015



©Helmholtz / Haltbauer & Fioretti

©Roy Kalschmidt, Berkeley Lab Public Affairs

Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna have gained international recognition for their joint work on a genome-editing technique based on what are known as CRISPR sequences (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). The CRISPR-Cas system is an antiviral defence mechanism in archaea and bacteria based on DNA repeat arrays (CRISPR elements) that function in conjunction with Cas nucleases. The teams headed by Charpentier –in Sweden– and Doudna –in the United States– had been independently researching these Cas proteins, associated with CRISPR sequences. In 2012, they published a joint article in Science –2007 Prince of Asturias Award for Communication and Humanities–, in which they showed that the Cas 9 enzyme in *Streptococcus pyogenes* is able to carry out *in vitro* genetic alterations of double-stranded DNA with precision, associating using an RNA sequence that contains a combination of repeats and spacers.



Virginijus Siksnys,
Univ Vilnius



Feng Zhang, MIT



-  Gentechnik Wird Alles Für Immer
Verändern - CRISPR
Kurzgesagt – In a Nutshell
- 2  Sind GMOs schlecht? Gentechnik &
unser Essen
Kurzgesagt – In a Nutshell
- 3  Wie wir einen unserer tödlichsten Feinde
vernichten können - Gene Drive &
Kurzgesagt – In a Nutshell

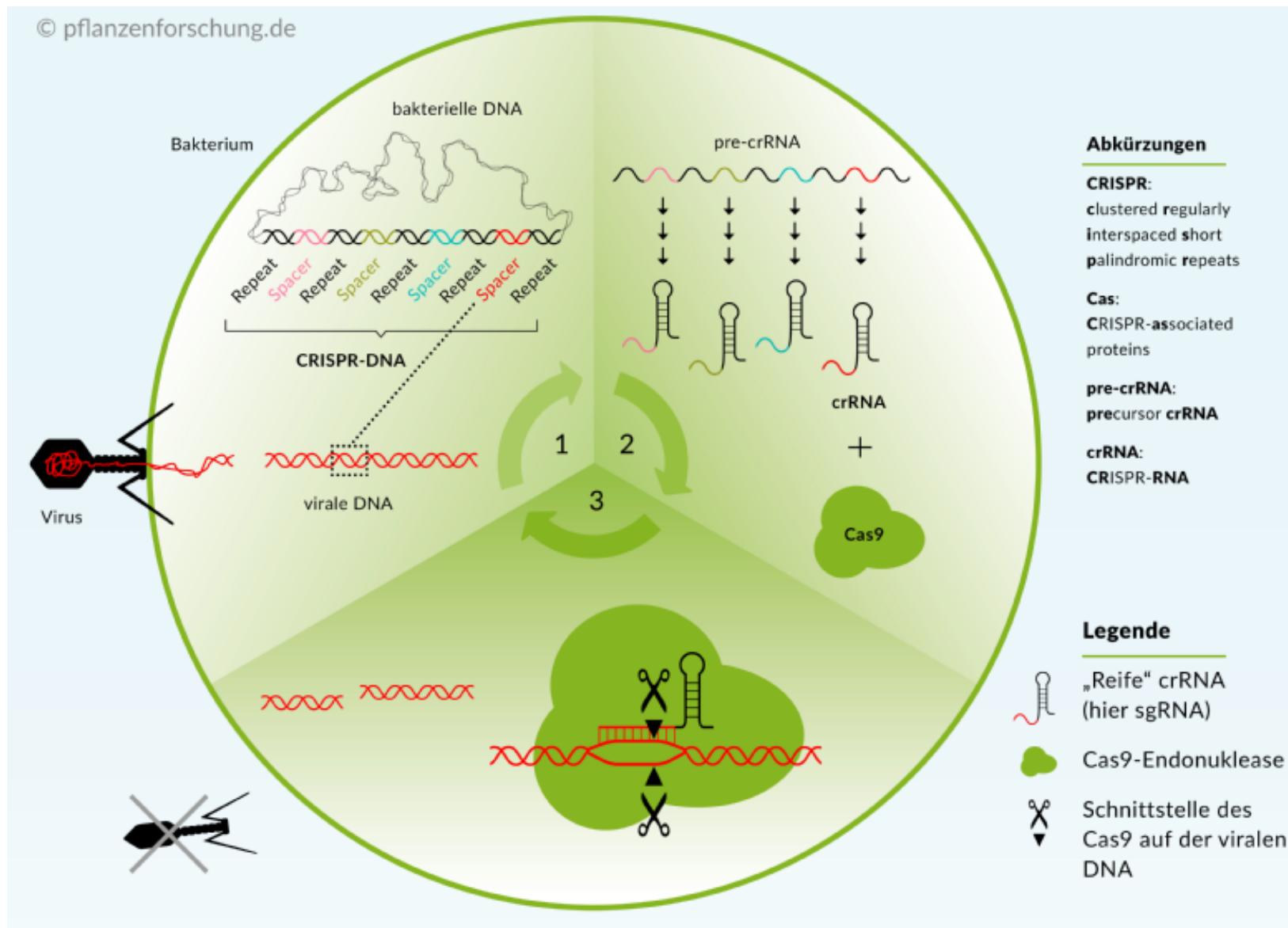
Genome Editing macht alles möglich

- gezieltes Einbringen von Transgenen (Insertion)
 - Herausschneiden von Genen (Deletion > Gen-Knockout)
 - Veränderung einzelner Basen (Punktmutagenese > Gentherapie)
 - Editieren des Chromatinzustands (d.h. der Genaktivität)
 - Editieren der RNA
-



Präziser, einfacher, flexibler, kostengünstiger

Ein adaptives „Immunsystem“ in Bakterien!



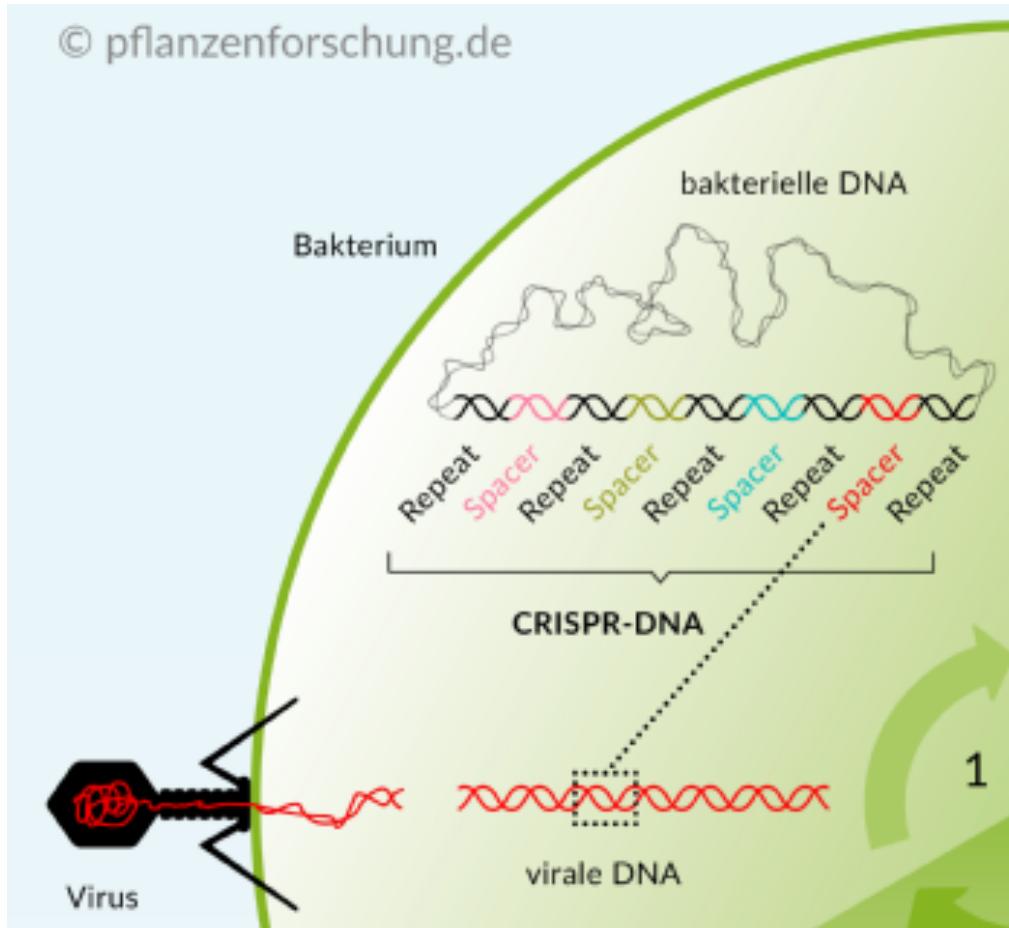
Barrangou R et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315, 1709 - 1712 (2007)



Ein adaptives „Immunsystem“ in Bakterien!

- Phagen attackieren Bakterien.
Manche überleben...
- Wie kann sich das Bakterium vor
erneutem Angriff schützen?
- Bakterium braucht molekulares
„Gedächtnis“ und Abwehrmechanismus.

Ein adaptives „Immunsystem“ in Bakterien!



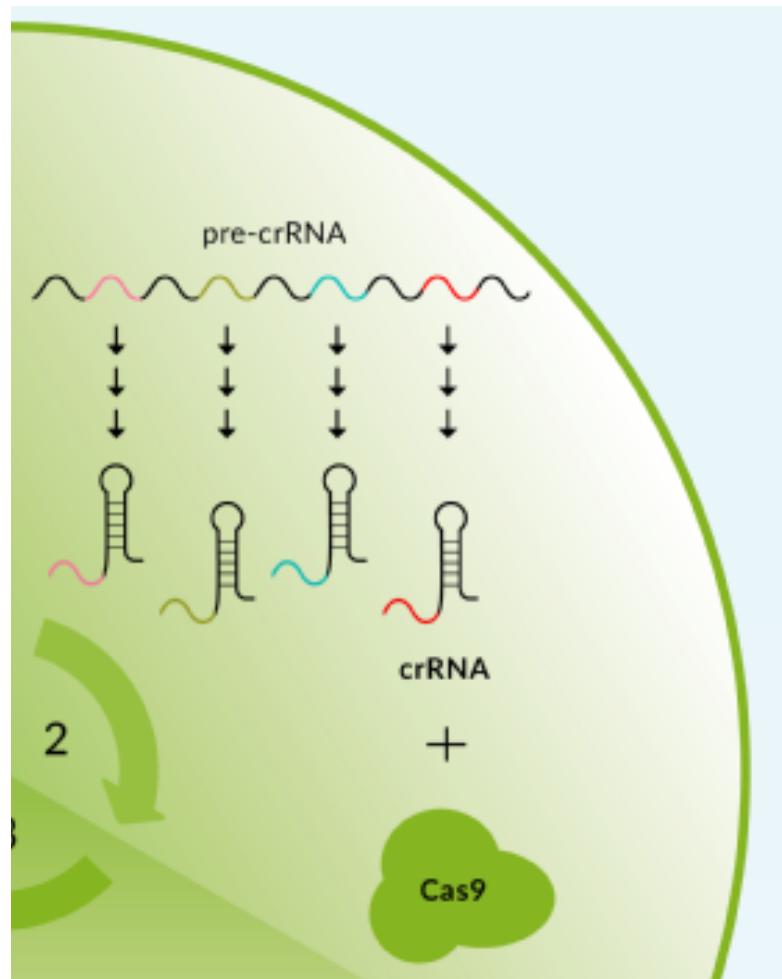
Clustered
Regular
Interspaced
Palindromic
Repeats

Spacer-Sequenzen
passen zu Bakteriophagen-
Sequenzen!

> Erinnerung an überlebte
Attacken

> ABWEHRFUNKTION

Ein adaptives „Immunsystem“ in Bakterien!



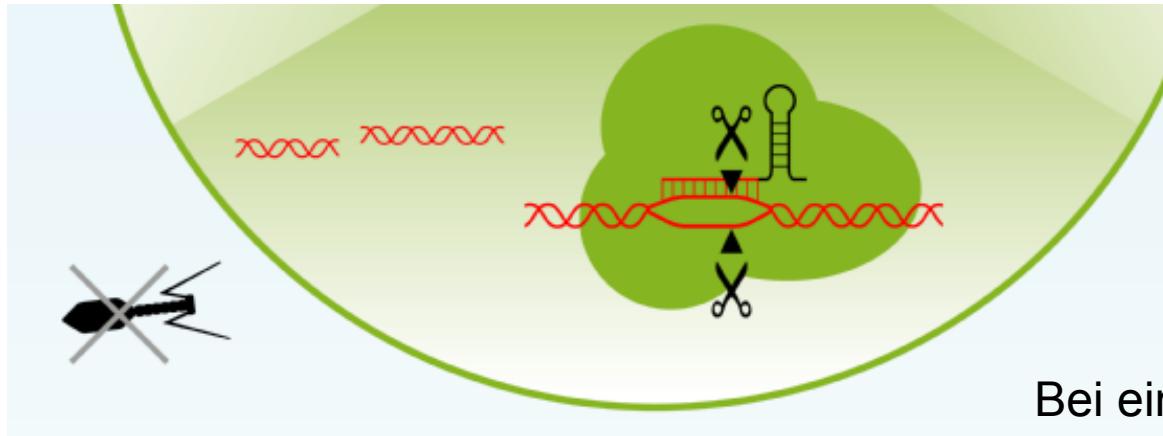
CRISPR-Regionen werden transkribiert

Nach Prozessierung entstehen crisprRNAs (crRNA).

Repeat-Anteile der RNA (schwarz) binden **Cas9-Protein** (Cas = Crispr-associated).

Farbige RNA-Anteile (**guide RNA**) können Viren-DNA erkennen und binden.

Ein adaptives „Immunsystem“ in Bakterien!



Bei einer Phagen-Attacke:

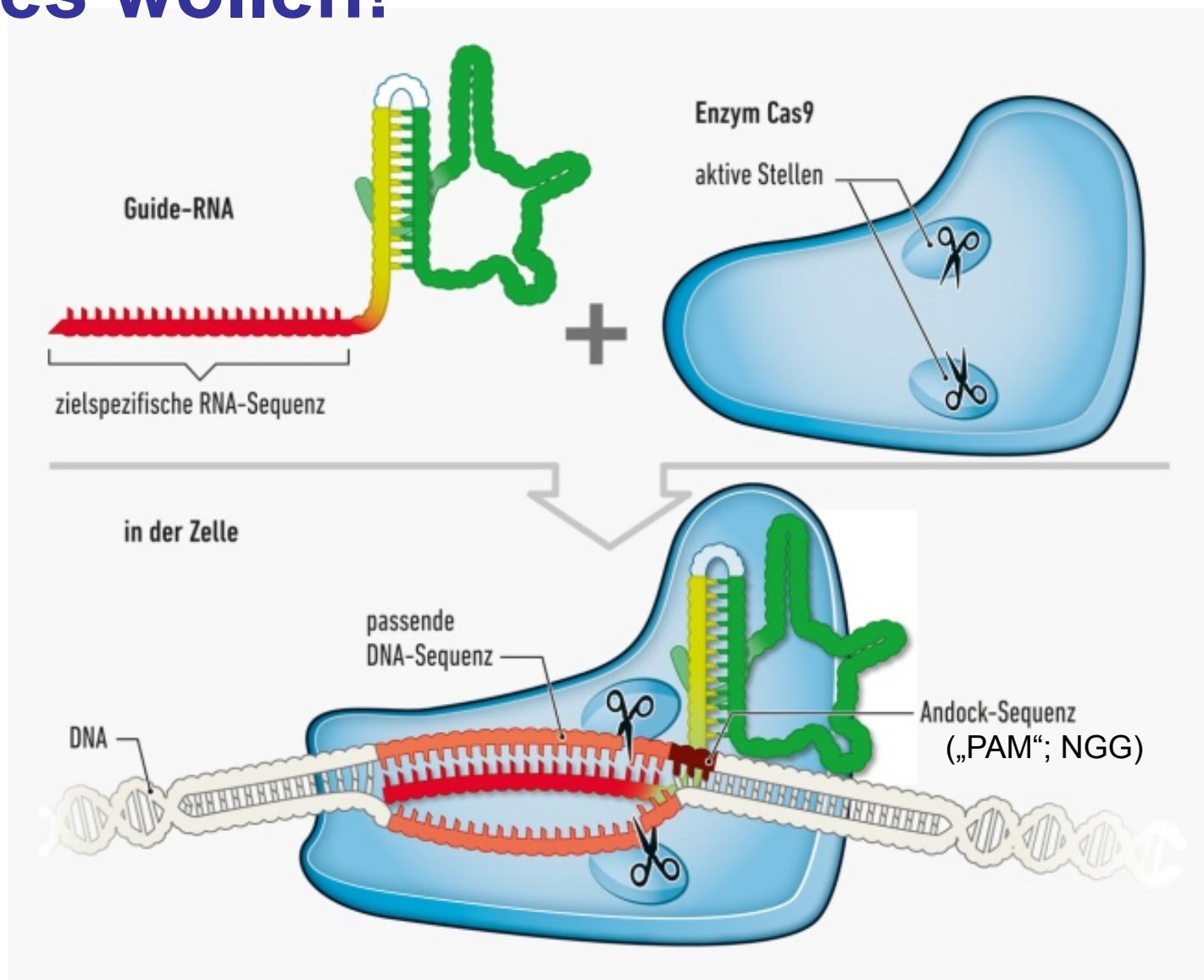
guideRNA lenkt CRISPR/Cas9-Komplex zur Virus-DNA.

Die Endonuklease **Cas9** macht glatten (blunt) *ds* Schnitt.

Virusvermehrung wird unterbunden!

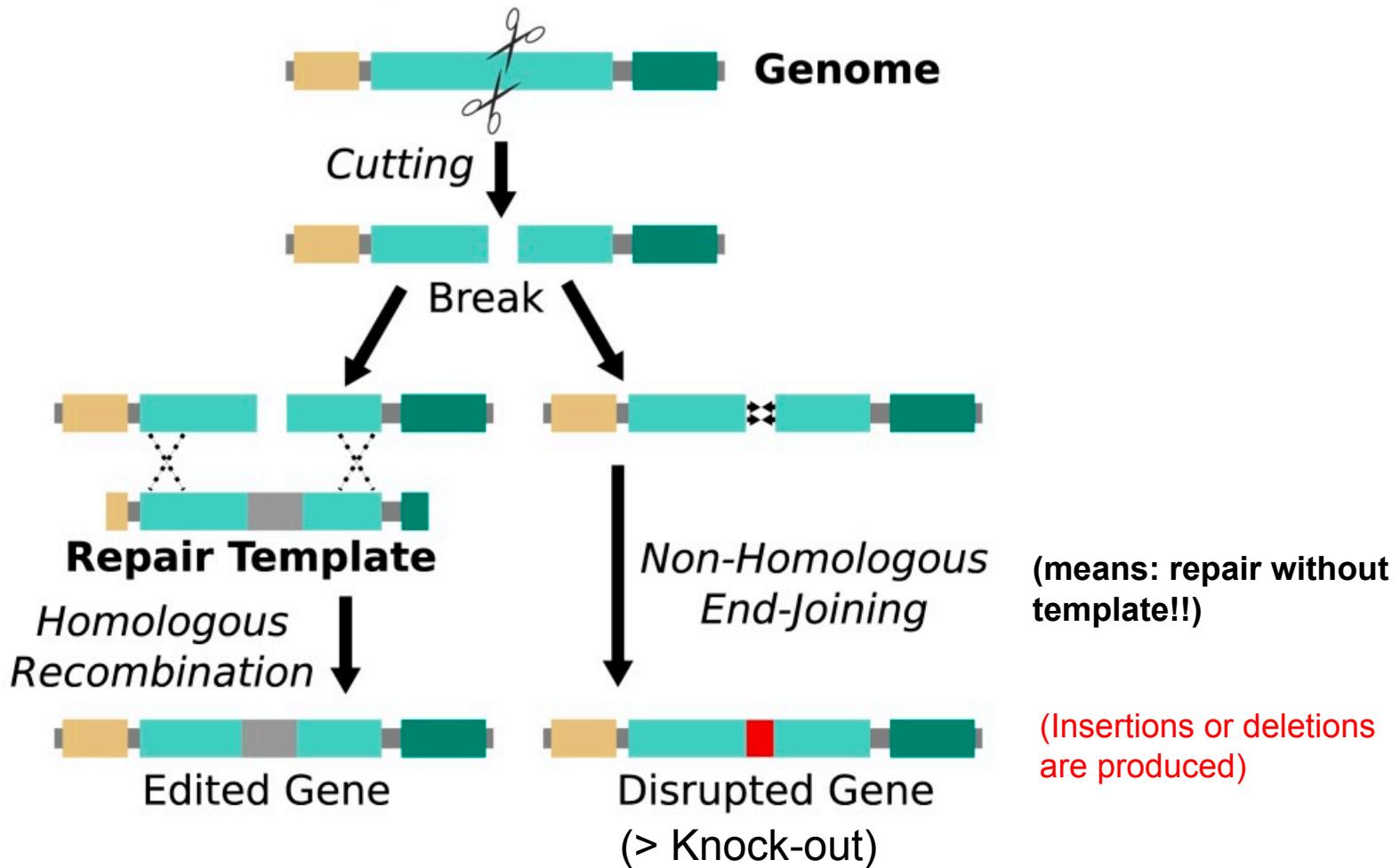
Erster Schritt zum Gene editing:

CRISPR/Cas9 erzeugt dsBrüche, wo wir es wollen!



Quelle und Grafikvorlagen:
Science, 28.11.2014, S. 1077
und 23.8.2013, S. 83
F.A.Z.-Grafik Röttele

Ein dsBruch ermöglicht nun das **Editieren** der Ziel-DNA





- heile Gen-Defekte! Aber auch...
- erzeuge humanisierte Schweine-Organe für abstoßungsfreie Xeno-Transplantation
- erzeuge trocken/hitzeresistente Pflanzen
- lasse editierte Gene sich in der Population automatisch durch *gene drive* vermehren
(Elimination Malaria-verbreitender Mosquitos)
- verwandle Elefanten zurück in Mammuts (oder editiere Neanderthaler-Gene in den modernen Menschen)



Patient erstmals mit Gene Editing direkt im Körper behandelt



Brian Madeux im UCSF Benioff Children's Hospital in Oakland (USA) neben seiner Freundin Marcie Humphrey. (Foto: dpa)

Iduronate-2-sulfatase (X-chrom.)
lysosomal storage defect
1/130 000

- Der 44-jährige Amerikaner Brian Madeaux hat vor wenigen Tagen als erster Mensch sogenannte Genscheren ins Blut verabreicht bekommen.
- Der Mann leidet unter dem Hunter-Syndrom, einer extrem seltenen Erbkrankheit, die in Deutschland nur vier bis fünf Mal im Jahr diagnostiziert wird.
- Die Ärzte haben für Madeaux' Therapie eine Genschere mit dem Namen Zinkfingernuklease verwendet. (älteres Konkurrenzsystem zu CRISPR-Cas)
- Es wird Monate dauern, bis sich Wirkungen und Nebenwirkungen in vollem Umfang zeigen.



Entferne HIV aus dem Genom!

RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection

Wenhui Hu^{a,1,2}, Rafal Kaminski^{a,1}, Fan Yang^a, Yonggang Zhang^a, Laura Cosentino^a, Fang Li^a, Biao Luo^b, David Alvarez-Carbonell^c, Yoelvis Garcia-Mesa^c, Jonathan Karn^c, Xianming Mo^d, and Kamel Khalili^{a,2}

^aDepartment of Neuroscience, Center for Neurovirology and The Comprehensive NeuroAIDS Center, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA 19140; ^bCancer Genome Institute, Fox Chase Cancer Center, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA 19111; ^cDepartment of Molecular Biology and Microbiology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106; and ^dLaboratory of Stem Cell Biology, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, West China Medical School, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Edited by Anthony S. Fauci, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, and approved June 19, 2014 (received for review March 19, 2014)

AIDS remains incurable due to the permanent integration of HIV-1 into the host genome, imparting risk of viral reactivation even after antiretroviral therapy. New strategies are needed to ablate the viral genome from latently infected cells, because current methods are too inefficient and prone to adverse off-target effects. To eliminate the integrated HIV-1 genome, we used the Cas9/guide RNA (gRNA) system, in single and multiplex configurations. We identified highly specific targets within the HIV-1 LTR U3 region that were efficiently edited by Cas9/gRNA, inactivating viral gene expression and replication in latently infected microglial, promonocytic, and T cells. Cas9/gRNAs caused neither genotoxicity nor off-target editing to the host cells, and completely excised a 9,709-bp fragment of integrated proviral DNA that spanned from its 5' to 3' LTRs. Furthermore, the presence of multiplex gRNAs within Cas9-expressing cells prevented HIV-1 infection. Our results suggest that Cas9/gRNA can be engineered to provide a specific, efficacious prophylactic and therapeutic approach against AIDS.

receptor 4 (CXCR4) and proviral DNA-encoding viral proteins (8, 9). CCR5 gene-targeting ZFNs are in phase II clinical trials for HIV-1/AIDS treatment (11). Also, various gene editing technologies have recently been shown to remove the proviral HIV-1 DNA from the host cell genome by targeting its highly conserved 5' and 3' long terminal repeats (LTRs) (12, 13). However, introduction of nucleases into cells via these nuclease-based genomic editing approaches remains inefficient and partially selective to remove the entire HIV-1 genome. Thus, the key barrier to their clinical translation is insufficient gene specificity to prevent potential off-target effects (toxicities). To achieve highly specific HIV-1 genome editing, we combined approaches to identify HIV-1 targets while circumventing host off-target effects. The resulting highly specific Cas9-based method proved capable of eradicating integrated HIV-1 DNA with high efficiency from latently infected human “reservoir” cell types, and prevented their infection by HIV-1.



Verhindere HIV-Eintritt!

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection

Received: 16 May 2015

Accepted: 29 September 2015

Published: 20 October 2015

Panpan Hou^{1,2,*}, Shuliang Chen^{1,*}, Shilei Wang², Xiao Yu², Yu Chen², Meng Jiang³, Ke Zhuang⁴, Wenzhe Ho⁴, Wei Hou¹, Jian Huang⁵ & Deyin Guo¹

Genome editing via CRISPR/Cas9 has become an efficient and reliable way to make precise, targeted changes to the genome of living cells. CXCR4 is a co-receptor for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and has been considered as an important therapeutic target for AIDS. CXCR4 mediates viral entry into human CD4⁺ cells by binding to envelope protein, gp120. Here, we show that human CXCR4 gene is efficiently disrupted by CRISPR/Cas9-mediated genome editing, leading to HIV-1 resistance of human primary CD4⁺ T cells. We also show that the Cas9-mediated ablation of CXCR4 demonstrated high specificity and negligible off-target effects without affecting cell division and propagation. The precise and efficient genome editing of CXCR4 will provide a new strategy for therapeutic application against HIV-1 infection.

See slides of the talk at

https://drive.google.com/drive/folders/1T1zLTtHS2z_cgl29fN_7qJg7fLA4qlrd



Dr. Jiankui He

Der Tabu-Bruch: Genome Editing in menschlichen Embryonen!

1. Mercy for families in need (悲悯之心)

A broken gene, infertility, or a preventable disease should not extinguish life or undermine a loving couple's union.

For a few families, early gene surgery may be the only viable way to heal a heritable disease and save a child from a lifetime of suffering.

2. Only for serious disease, never vanity (有所为更有所不为)

Gene surgery is a serious medical procedure that should never be used for aesthetics, enhancement, or sex selection purposes — or in any way that would compromise a child's welfare, joy, or free will. No one has a right to determine a child's genetics except to prevent disease.

Gene surgery exposes a child to potential safety risks that can be permanent. Performing gene surgery is only permissible when the risks of the procedure are outweighed by a serious medical need.

3. Respect a child's autonomy (探索你自由)

A life is more than our physical body and its DNA. After gene surgery, a child has equal rights to live life freely, to choose his or her occupation, to citizenship, and to privacy. No obligations exist to his or her parents or any organization, including paying for the procedure.

4. Genes do not define you (生活需要奋斗)

Our DNA does not predetermine our purpose or what we could achieve. We flourish from our own hard work, nutrition, and support from society and our loved ones. Whatever our genes may be, we are equal in dignity and potential.

5. Everyone deserves freedom from genetic disease (促进普惠的健康权)

Wealth should not determine health. Organizations developing genetic cures have a deep moral obligation to serve families of every background.

5 Regeln für
Genome Editing,

von Dr. J. He
am Vorabend
seines Vortrags
auf dem
GeneEditSummit
im Crispr Journal
publiziert...



Sean Ryder
@RyderLab

Folger

1

Here's my take on the protein sequences encoded by the alleles reported at [#geneeditsummit](#) for [#CRISPRbabies](#). Lulu's mutation (delta15) leads to a five amino acid deletion, but the protein largely resembles wild type. The consequence of this mutation is unknown... (1) Thread

Protein sequence comparison of CCR5 alleles in CRISPR babies compared to unmodified and Delta32 variants

CCR5 MDYQVSSPYIDNYNTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVLVIFPGVGNMLVILILINCKRLKSMTDIYLNLALASDLPF
 CCR5 Lale Delta15 MDYQVSSPYIDNYNTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVLVIFPGVGNMLVILILINCKRLKSMTDIYLNLALASDLPF
 CCR5 Delta 32 MDYQVSSPYIDNYNTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVLVIFPGVGNMLVILILINCKRLKSMTDIYLNLALASDLPF
 CCR5 Nana Insl MDYQVSSPYIDNYNTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVLVIFPGVGNMLVILILINCKRLKSMTDIYLNLALASDLPF
 CCR5 Nana Beta4 MDYQVSSPYIDNYNTSEPCQKINVKQIAASLLPPLYSLVLVIFPGVGNMLVILILINCKRLKSMTDIYLNLALASDLPF

CCR5	LTVPFWAHYAAQNDFGNTMCQLLTLGLYFIGGFSGIFFFILLLTIDRYLAVVNAVFALKARTVTFGVTVSTIIVWVAVF
CCR5 Lala Delta15	LTVPFWAHYAAQNDFGNTMCQLLTLGLYFIGGFSGIFFFILLLTIDRYLAVVNAVFALKARTVTFGVTVSTIIVWVAVF
CCR5 Delta 32	LTVPFWAHYAAQNDFGNTMCQLLTLGLYFIGGFSGIFFFILLLTIDRYLAVVNAVFALKARTVTFGVTVSTIIVWVAVF
CCR5Delta15	LTVPFWAHYAAQNDFGNTMCQLLTLGLYFIGGFSGIFFFILLLTIDRYLAVVNAVFALKARTVTFGVTVSTIIVWVAVF
CCR5Delta15L	LTVPFWAHYAAQNDFGNTMCQLLTLGLYFIGGFSGIFFFILLLTIDRYLAVVNAVFALKARTVTFGVTVSTIIVWVAVF

CCR5	LPGIIIFTRSQKEGLIYTCSHPEPY
CCR5 Lala Delta15	LPGIIIFTRSQKEGLIYTCSHPEPY
CCR5 Delta32	LPGIIIFTRSQKEGLIYTCSHPEPY
CCR5 Nana Insl	LPGIIIFTRSQKEGLIYTCSHPEPY
CCR5 Nana Delta4	LPGIIIFTRSQKEGLIYTCSHPEPY

CCR5 MIVYFLFWAPYNIVLLNNTQEEFGLNNCSSNRLDQAMQVTTETLGMTHCCINPIIYAFVGKFRNYLLVFQKHHIAK
CCR5 Lala Delta15 MIVYFLFWAPYNIVLLNNTQEEFGLNNCSSNRLDQAMQVTTETLGMTHCCINPIIYAFVGKFRNYLLVFQKHHIAK
CCR5 Delta32
CCR5 Nana Insl
CCR5 Nana Delta4

CCR5	CKRCCSIQQEAKERASSVYTRSTGEQEISVGL	Transmembrane Span
CCR5 Lulu Delta15	CKRCCSIQQEAKERASSVYTRSTGEQEISVGL	Disulfide Bond
CCR5 Delta32		Amino Acid changes unique to Lulu and Nana
CCR5 Nana Insl		Amino Acid common between Delta 32 and Nana
CCR5 Nana Delta44		