



St. Ursula Gymnasium Aachen

Stufe 11

Facharbeit im Leistungskurs Biologie

zum Thema:

CRISPR/Cas9:  
Eine gentechnische Innovation mit  
Zukunftsperspektiven?

Anwendungsbeispiele aus  
Lebensmittelproduktion und Krebsforschung

von

Juliane Ebner

Fachlehrerin:

Frau Ochel

Abgabetermin:  
15. April 2016

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Was ist CRISPR/Cas9? .....	1
2.1 Entdeckung von CRISPR/Cas9 .....	1
2.2 Der natürliche CRISPR/Cas9-Mechanismus .....	2
3. CRISPR/Cas9 als Revolution in der Gentechnik.....	3
3.1 Einführung von CRISPR/Cas9 in die Gentechnik .....	3
3.2 Verwendungsbeispiele von Restriktionsenzymen vor Cas9 .....	4
3.3 Vorteile von Cas9 gegenüber anderen Restriktionsenzymen .....	4
4. Anwendungsmöglichkeiten von CRISPR/Cas9.....	5
4.1 CRISPR/Cas9 eröffnet viele Chancen .....	5
4.2 CRISPR/Cas9 in der Lebensmittelproduktion .....	6
4.3 CRISPR/Cas9 in der Krebsforschung.....	6
5. Probleme und Risiken von CRISPR/Cas9 in unterschiedlichen Anwendungsbereichen ..	7
5.1 Technische Probleme .....	7
5.1.1 Transport der CRISPR/Cas9-Komponenten .....	7
5.1.2 <i>Off-target cuts</i> von Cas9 .....	9
5.2 Ethische Probleme .....	10
5.2.1 Kennzeichnung von Gentechnik in Lebensmitteln.....	10
5.2.2 Sind Eingriffe in die menschliche Keimbahn verantwortbar?.....	11
6. Fazit .....	13
7. Anhänge .....	15
7.1 Alina Huth Experteninterview .....	15
7.2 Abbildungen.....	22
8. Literaturverzeichnis .....	24
9. Selbstständigkeitserklärung .....	28

## 1. Einleitung

Für meine Facharbeit wollte ich mich am liebsten mit einem Thema beschäftigen, das mit Genetik zu tun hat. Das kommt daher, dass ich das Thema Genetik im Unterricht sehr interessant fand. Ich habe also nach neuen Entwicklungen und Innovationen in der Forschung gesucht und bin auf CRISPR/Cas9 gestoßen.

In dieser Facharbeit im Leistungskursfach Biologie erkläre ich zunächst den CRISPR/Cas9-Mechanismus. Die Leitfrage, ob CRISPR/Cas9 eine gentechnische Innovation mit Zukunftsperspektiven ist, soll durch diese Facharbeit erarbeitet werden.

Es sollen verschiedene Sichtweisen auf die Nutzungsmöglichkeiten und die potentiellen Gefahren und Probleme, die CRISPR/Cas9 mit sich bringt, beleuchtet werden. Dazu dienen unter anderem konkrete Anwendungsbeispiele aus der Lebensmittelproduktion und der Krebsforschung.

Die Forschung mit CRISPR/Cas9 hat außerdem eine hohe Aktualität und ist ein sehr kontroverses Thema, da es viele Chancen, aber auch Gefahren mit sich bringt. Dementsprechend gibt es viele verschiedene Meinungen.

## 2. Was ist CRISPR/Cas9?

### 2.1 Entdeckung von CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 ist eine moderne Methode in der Gentechnik, die auf einem natürlichen Mechanismus beruht. Zuerst wurde sie in *E.coli* Bakterien gefunden. Man vermutete, dass er als bakterielle Immunabwehr fungiert (Redaktion Pflanzenforschung.de b).

Die Abkürzung „CRISPR“ steht für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* und ist die Bezeichnung für sich wiederholende DNA-Sequenzen, die im Genom der Bakterien zu finden sind. Vereinfacht gesagt, basiert CRISPR auf einem Restriktionsenzym namens Cas9 (*CRISPR-associated protein*), welches DNA zielorientiert zerschneiden kann und somit einen Virusbefall abwehrt (Ledford 2015, Kreiner u. Schumann 2016, S. 51-52).

Erste Ansätze wurden bereits im Jahre 1987 gemacht. Damals fanden Forscher in einem *E. coli* Bakterium die CRISPR-DNA, konnten ihr aber noch nicht die richtige Bedeutung zuschreiben (Ishino Y u.a., 1987). Erst 2005 wurde die Hypothese aufgestellt, dass CRISPR ein bakterielles Verteidigungssystem gegen Virenbefall sei. Diese Hypothese wurde bis hin zu den Jahren 2012/2013 so genau ausdifferenziert und präzisiert, dass CRISPR/Cas9 erstmals in der Gentechnik verwendet werden konnte (Abb.1). Allerdings ist das Immunabwehrsystem der Bakterien bis heute immer noch nicht vollkommen entschlüsselt (Kreiner u. Schumann 2016, S.51).

## 2.2 Der natürliche CRISPR/Cas9-Mechanismus

Der CRISPR/Cas9 Abwehrmechanismus ist so aufgebaut, dass es in der CRISPR-DNA, auch CRISPR-Locus genannt (Kreiner u. Schumann 2016, S.51), abwechselnd *Spacers* und *Repeats* gibt (Abb.1). *Repeats* sind die Wiederholungen einer identischen DNA-Sequenz innerhalb des CRISPR-Locus. *Spacers* tragen für den Abwehrmechanismus der Bakterien eine ähnliche Aufgabe wie die Gedächtniszellen im menschlichen Immunsystem. Sie bestehen aus DNA-Fragmenten von Viren, die das Bakterium in früheren Zeiten bereits befallen hatten. So ist das Bakterium fähig, bereits bekannte Phagen-DNA schneller zu zerschneiden, sodass das Virus abgewehrt wird und das Bakterium immun gegen dieses Virus ist (Doudna u. Charpentier 2012, Abb.1).

Um neue und somit unbekannte Phagen-DNA zu zerstören, durchläuft das Bakterium drei Phasen. Die erste Phase, auch **Adaptionsphase** oder **Akquisitionsphase** genannt, findet nach Befall durch ein neues Virus statt. Hier suchen Cas9-Proteine die Fremd-DNA nach der PAM-Sequenz (*Protospacer Adjacent Motif*) ab, um den *Protospacer* des Virus aus der Phagen-DNA herauszuschneiden. Diese Sequenz wird anschließend als neuer *Spacer* in die CRISPR-DNA eingefügt (Abb.1; Kreiner u. Schumann 2016, S.52; Sachdeva 2015, S.511; Al-Attar u.a. 2011, S.282-284).

Während der zweiten Phase, der **Transkriptions-** oder auch **Bearbeitungsphase**, wird die vollständige CRISPR-DNA zusammen mit dem neuen *Spacer* transkribiert, sodass die pre-crRNA (*precursor crRNA*) entsteht, welche durch Prozessierung zu crRNA wird (Abb.1; Kreiner u. Schumann 2016, S.52; Sachdeva 2015, S.511; Al-Attar u.a. 2011, S.284f.).

Im Verlauf der sogenannten **Interferenzphase** wird in Verbindung mit Cas9-Enzymen die Phagen-DNA nach Sequenzen, die komplementär zu einem Spacer sind, abgesucht. Bei einem Fund wird durch Cas9 ein Doppelstrangbruch durchgeführt. Somit wird das Virus letztendlich unschädlich gemacht und das Bakterium verfügt bei einem neuen Befall über eine Immunabwehr (Abb.1; Kreiner u. Schumann 2016, S.52; Sachdeva 2015, S.511; Al-Attar u.a. 2011, S.285f.).

### 3. CRISPR/Cas9 als Revolution in der Gentechnik

#### 3.1 Einführung von CRISPR/Cas9 in die Gentechnik

„*We propose an alternative methodology based on RNA-programmed Cas9 that could offer considerable potential for gene-targeting and genome-editing applications.*“ (Doudna u. Charpentier 2012, S.820). Dies war der Schlusssatz der Publikation von Emmanuelle Charpentier und Jennifer A. Doudna aus dem Jahr 2012.

Die beiden Forscherinnen und ihr Team, das auch an dieser Publikation beteiligt war, lieferten die ausschlaggebenden Fakten, die für eine Etablierung von CRISPR/Cas9 in der Gentechnik sorgten. Mithilfe von zahlreichen Experimenten versuchten sie, CRISPR/Cas9 noch detaillierter nachvollziehen zu können und somit die Effizienz zu optimieren (Doudna u. Charpentier 2012).

Ein *in vitro*-Experiment, bei dem das Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* verwendet wurde, sollte zunächst klären, ob sich das Restriktionsenzym Cas9 unter alleinigem Einfluss der crRNA an die targetDNA bindet, oder ob noch eine weitere kurze und nicht codierende RNA-Sequenz, die sogenannte tracrRNA (*trans-activating crRNA*), dazu notwendig ist. Die Ergebnisse belegten, dass die tracrRNA essentiell ist, da sie vermutlich die crRNA an den komplementären Strang der targetDNA leitet und Cas9 aktiviert (Doudna u. Charpentier 2012, S.818; Chylinsky, Le Rhun u. Carpentier, 2013; Kreiner u. Schumann 2016, S.53f.).

Weitere Experimente zeigten, dass nur crRNA, tracrRNA und Cas9 notwendige Elemente für das *Genome-Editing* mit CRISPR sind und dass man crRNA und tracrRNA zu einem Molekül zusammenführen kann, welches man auch sgRNA (*single-guideRNA*) nennt (Doudna u. Carpentier, 2012; Kreiner u. Schumann, 2016).

CRISPR/Cas9 als Gene-Editing-Tool macht es also möglich, mit dem Restriktionsenzym Cas9 gezielt Sequenzen aus tierischer und pflanzlicher DNA zu entfernen und mithilfe von Rekombinationssystemen gegebenenfalls neue Sequenzen einzufügen. Durch die individuell veränderbare guideRNA kann CRISPR/Cas9 passend an neue Gensequenzen adaptiert werden (Kreiner u. Schumann, 2016).

### 3.2 Verwendungsbeispiele von Restriktionsenzymen vor Cas9

Schon vor CRISPR/Cas9 hat man Restriktionsenzyme in der Gentechnik verwendet. Sie spielten ebenfalls in der Biotechnologie und der Medizin bereits eine wichtige Rolle, weil sie die Bildung von rekombinanten Plasmiden ermöglichen.

Mit ihnen kann man unter anderem Pflanzengenome so kreuzen, dass die Pflanze bestimmte gewünschte Erbmerkmale aufweist. Ein Beispiel, bei dem Pflanzen genetisch verändert wurden, ist der sogenannte Golden Rice. In dem gentechnisch modifizierten Reis soll eine erhöhte Anreicherung von Provitamin A den häufigen Vitamin-A Mangel von Menschen in Entwicklungsländern verringern (Kreiner u. Schumann 2016, S.53).

Ein weiterer Verwendungszweck der rekombinanten Plasmide ist die Herstellung von therapeutischen Mitteln. Hier soll die angepasste Vektor-DNA für die gewünschten Genprodukte (therapeutischen Proteine) codiert werden, sodass diese vom Bakterium synthetisiert werden können. Ein Beispiel dafür ist das gentechnisch produzierte Insulin, welches seit 1979 mithilfe von *E. coli* hergestellt wird (Kreiner u. Schumann, 2016, S.52-53).

### 3.3 Vorteile von Cas9 gegenüber anderen Restriktionsenzymen

CRISPR/Cas9 bietet eine vorteilhafte Alternative zu anderen Restriktionsenzymen. Es werden beispielsweise auch sogenannte Zinkfinger-nukleasen und TALEN-Nukleasen als Restriktionsenzyme in der Gentechnik verwendet. Sie sind in der Herstellung verglichen mit CRISPR/Cas9 deutlich komplizierter und zeitaufwändiger, weil sie komplexe Herstellungsmethoden erfordern. Um die individuelle guideRNA (crRNA/tracrRNA/sgRNA) von CRISPR herzustellen, benötigt man jedoch nur Standardreagenzien (Ledford 2015).

Wegen der einfachen Herstellungsmethoden hat CRISPR/Cas9 auch ein vorteilhafteres Preis-Leistungs-Verhältnis als die anderen Nukleasen. Zinkfingernukleasen beispielsweise kosten in der Herstellung etwa 5000\$, während CRISPR/Cas9 bei einem Kostenaufwand von circa 30\$ liegt (Ledford 2015).

CRISPR ist also insgesamt einfacher und kostengünstiger in der Produktion und Nutzung als andere Gene-Editing-Tools, wie zum Beispiel Zinkfingernukleasen oder TALEN-Nukleasen. Deshalb ist CRISPR/Cas9 aktuell die beliebteste Methode für die Gentechnik und ist ein häufiges Forschungsthema geworden (Ledford 2015).

## 4. Anwendungsmöglichkeiten von CRISPR/Cas9

### 4.1 CRISPR/Cas9 eröffnet viele Chancen

Die Forschung mit CRISPR/Cas9 ist bereits in vielfältigen Bereichen aufzufinden. Sie deckt Grundlagenforschung, Biotechnologie, Pflanzenforschung (s. 4.2), Beeinflussung von Ökosystemen, Medizin (s. 4.3) und sogar Eingriffe in die menschliche Keimbahn (s. 5.2.2) ab (DFG 2015, S.7-11).

Zum einen brachten es Wissenschaftler in ihren Laborexperimenten fertig, problematischen multiresistenten Bakterien mittels CRISPR/Cas9 die Resistenz zu nehmen, indem die CRISPR-Komponenten so konstruiert wurden, dass sie Doppelstrangbrüche bei den Resistenz-Plasmiden der Bakterien auslösten. Des Weiteren konnte man humanpathogene Viren, nämlich die zu Gebärmutterhalskrebs führenden Viren HPV-16 und HPV-18, den Hepatitis B Virus und den HI-Virus, durch verschiedene Vorgehensweisen unwirksam machen (Kreiner u. Schumann 2016, S.54-55).

Es wurden jedoch auch schon Experimente mit letalen, menschlichen Zygoten, die künstlich befruchtet wurden, durchgeführt (s. 5.1.2). Das Ziel war es, eine mutierte Gen-Sequenz gegen die voll funktionsfähige Sequenz auszutauschen, um somit Erbkrankheiten zu bekämpfen. Allerdings kam es nicht ganz zu dem erhofften Erfolg, da CRISPR/Cas9 die unerwünschte Sequenz nicht immer austauschen konnte (Kreiner u. Schumann 2016, S.55; Zhou u. Huang 2015).

## 4.2 CRISPR/Cas9 in der Lebensmittelproduktion

Bereits vor der Einführung von CRISPR/Cas9 in die Gentechnik hat man sich gentechnische Verfahren für die Optimierung der Lebensmittelproduktion zunutze gemacht. Mittels älterer gentechnischer Methoden wurde zum Beispiel für höhere Erträge und Widerstandsfähigkeit bei Pflanzen gesorgt (s. 3.2).

Ein großer Vorteil von CRISPR/Cas9 ist, dass das Verfahren deutlich schneller ist als die Kreuzung. Bei Pflanzen, die mit CRISPR gentechnisch manipuliert wurden, ist im Endergebnis allerdings kein Unterschied zu denen zu erkennen, die durch Kreuzung entstanden sind, weil keine nachweisbare Fremd-DNA eingeschleust wurde. (Huth 2016; DFG 2015, S. 7-8).

CRISPR/Cas9 wird in der Nahrungsmittelindustrie auch bei der Erzeugung von Milchprodukten eingesetzt. Bei dieser Produktion können enorme Schäden durch einen Virusbefall der häufig genutzten Bakterien *S. thermophilus* aufkommen, da häufig ganze Produktionslinien durch den Befall zerstört werden. Mithilfe von CRISPR kann gegen einen solchen Befall vorgesorgt werden, indem man das Genom der Bakterien so verändert, dass sie immun gegen diese Viren sind. Sie können die Viren somit eigenständig abwehren (DFG 2014, S.31-32; Al-Attar u.a. 2011, S.286).

## 4.3 CRISPR/Cas9 in der Krebsforschung

Neben älteren Behandlungsarten gegen Krebs, wie zu Beispiel der Operation oder der Chemotherapie, bietet CRISPR/Cas9 ganz neue Therapiemöglichkeiten. Zum einen können durch Tierversuche mit CRISPR/Cas9 Krebsmedikamente gefunden werden. Dazu werden mittels Cas9 und der passenden sgRNA Leserastermutationen in verschiedenen Genen, die bekannterweise vermehrt in Krebszellen exprimiert werden, ausgelöst. Auf diese Weise kann bei einer Genexpression kein funktionierendes Protein ausgebildet werden, sodass das Gen praktisch ausgeschaltet wurde. Anschließend untersucht man, was das Fehlen dieses Gens bewirkt. Im idealen Fall sollten dadurch ausschließlich die Krebszellen abgetötet werden und die anderen Zellen unverändert bleiben. Wenn dies der Fall wäre, könnte man dann eine Substanz gegen das Protein des ursprünglichen Gens entwickeln und somit ein mögliches Krebsheilmittel herstellen (Huth 2016; Sachdeva 2015, S.515).

Des Weiteren werden durch CRISPR/Cas9 Verbesserungsmöglichkeiten der Immunabwehr des Krebspatienten erzielt. Mithilfe von CRISPR/Cas9 kann man nämlich die Immunevasion der Krebszellen, also das gezielte Umgehen des körpereigenen Immunsystems, abschwächen. Dazu entnimmt man dem Patienten oder einem Spender Blut, um anschließend die T-Zellen so zu verändern, dass sie über einen Rezeptor verfügen. Dieser Rezeptor erkennt die tumorspezifischen Antigene der Krebszellen und bindet sich an sie, wodurch die Krebszellen absterben. Außerdem kann die Lebensdauer und die Toxizität der Immunzellen erhöht werden, sodass die Krebszellen noch effizienter bekämpft werden können (Huth 2016; Kreiner u. Schumann 2016, S.55).

Diese Therapie wurde in London bereits bei einem einjährigen Mädchen, das an Leukämie erkrankt war, erfolgreich durchgeführt. Vor dem Einsatz der gentechnisch veränderten T-Zellen hatte bei ihr keine Behandlung angeschlagen. Damals wurden zwar noch TALEN-Nukleasen verwendet (GOSH-ICH Press Office 2015), jedoch könnte diese Behandlungsform mit CRISPR noch kostengünstiger und präziser gemacht werden (s.3.3).

## 5. Probleme und Risiken von CRISPR/Cas9 in unterschiedlichen Anwendungsbereichen

### 5.1 Technische Probleme

#### 5.1.1 Transport der CRISPR/Cas9-Komponenten

Neben den bereits genannten Möglichkeiten und Vorteilen, weist CRISPR/Cas9 allerdings auch noch einige technischen Probleme auf, welche die Arbeit damit einschränken.

Ein komplizierter Schritt ist zunächst der Transport von CRISPR/Cas9 in das Zielorgan im Körper, was ein Versuch von Daniel Anderson zeigt. Er versuchte, mithilfe von CRISPR/Cas9 Tyrosinämie bei Mäusen zu heilen. Dazu wollte er das Gen mit der Punktmutation, die die Krankheit ausgelöst hatte, durch ein intaktes Gen auswechseln. Um Cas9 und sgRNA in das Zielorgan der Maus zu bringen, nutzte Anderson die sogenannte **hydrodynamische Injektion**. Hierbei muss viel Flüssigkeit, welche die

CRISPR-Komponenten transportieren soll, in den Blutkreislauf der Maus injiziert werden. Der große Nachteil bei diesem Verfahren ist, dass sich das Blutvolumen durch die Flüssigkeit verdoppelt. Das kann bei der Maus zu Leberschäden führen und ist beim Menschen gar nicht durchführbar (Huth 2016; Ledford 2015; Sachdeva 2015, S.514).

Eine mögliche Option, die Komponenten in das Zielorgan zu befördern, ist die Nutzung von sogenannten **Lipid-Nanopartikeln**. Die Cas9 mRNA wird dazu in Lipidvesikel eingebettet, welche in den Nanopartikeln anschließend zu den entsprechenden Zellen gebracht werden, wo die beladenen Lipidvesikel durch Endozytose in die Zellen übernommen werden können (Huth 2016).

Des Weiteren werden für den Transport der der sgRNA häufig **Adeno-assoziierte Viren** oder **Lentiviren** verwendet. Diese Viren werden dafür gentechnisch so manipuliert, dass sie sich weder durch Befall eines Bakteriums vermehren, noch Krankheiten auslösen können (Huth 2016, Livingstone 2015).

Man kann das Genom der Viren als Speicherort für die Cas9 RNA, die sgRNA und falls nötig eine weitere DNA-Sequenz nutzen. So dienen die unschädlich gemachten Viren als Transporthülle für die CRISPR-Komponenten (Huth 2016).

Die Schwierigkeit bei diesem Verfahren ist die limitierte Transportkapazität der Viren. Adeno-assoziierte Viren verfügen über eine Maximalkapazität von 4,7 Kilobasen und Lentiviren können 10 Kilobasen transportieren. Hinzu kommt, dass das Cas9-Gen allein bereits 4 Kilobasen beansprucht und somit ein relativ komplexes und großes Protein ist. Häufig werden auch sogenannte Reportergene mittransportiert, um herausfinden zu können, ob das Einbringen von Cas9 gelungen ist. Für alle Komponenten zusammen könnte möglicherweise zu wenig Platz vorhanden sein (Huth 2016).

Außerdem konnte Alina Huth im Zusammenhang mit ihrer Masterarbeit ein weiteres Problem dieser Viren beobachten. Nach der ersten Infektion durch Lentiviren fanden nur bei etwa 2% der infizierten Zellen eine Genexpression der CRISPR-Gene statt. Zur Lösung dieses Problems sucht man momentan nach weiteren Transportmitteln und nach Möglichkeiten, wie man das Cas9-Enzym kleiner gestalten kann (Huth 2016).

### 5.1.2 *Off-target cuts* von Cas9

Wie schon in 4.1 kurz erwähnt wurde, gab es bereits Experimente von chinesischen Forschern, bei denen menschliche Zygoten mittels CRISPR/Cas9 verändert werden sollten. Das Forschungsziel war es, die Genauigkeit von CRISPR/Cas9 als Gene-Editing-Tool zu analysieren. Bei dem Experiment stand das Gen, das für das  $\beta$ -Globin-Protein codiert, im Mittelpunkt. Bei einer Mutation dieses Gens löst es die Blutkrankheit  $\beta$ -Thalassämie aus, welche tödlich enden kann. Alle Zygoten in diesem Experiment hatten die mutierte Gensequenz in ihrem Genom. Um sie zu heilen, wollten die chinesischen Forscher die mutierte Gensequenz, auf der sich das krankheitsauslösende Gen befindet, durch die passende nicht mutierte Gensequenz austauschen (Cyranoski u. Reardon 2015; Zhou u. Huang 2015, S.363-366).

Durch dieses Experiment versuchte man also zu zeigen, dass genetisch bedingte Krankheiten möglicherweise schon vor der Geburt heilbar sind. Dies schien ein großes Potential zu bieten, jedoch waren die Ergebnisse des Experiments nicht erfolversprechend. Nach 48 Stunden Versuchslaufzeit waren von den insgesamt 86 verwendeten Zygoten nur noch 71 am Leben. Es wurde das Genom von 54 Zygoten geprüft und man fand heraus, dass CRISPR/Cas9 nur bei 28 Zellen die Veränderung im Genom vollbracht hatte (Cyranoski u. Reardon 2015; Zhou u. Huang 2015, S.366-370).

Die geringe Effizienz von Cas9 ist zum Teil mit dem sogenannten *off-target* Effekt zu begründen. Das bedeutet, dass Cas9 trotz einer minimal falschen Basenpaarung der sgRNA an die DNA einen Doppelstrangbruch durchführen kann. Diese fehlerhaften Doppelstrangbrüche in der DNA nennt man *off-target cuts* (Huth 2016, Zhou u. Huang 2015, S.366-370).

Hinzukommende erschwerende Faktoren bei dem Experiment waren einerseits Komplikationen beim Transport und andererseits, dass man das Gen auf beiden homologen Chromosomen ausschalten müsste, um es gänzlich zu entfernen (Huth 2016, Zhou u. Huang 2015, S.366-370).

Mittlerweile gibt es allerdings Fortschritte zur Effizienzverbesserung von Cas9. Zum einen werden sogenannte **Cas9 Nickasen** anstatt des ursprünglichen Cas9-Enzyms ge-

nutzt. Sie verursachen keine Doppelstrang- sondern Einzelstrangbrüche. Demnach benötigt man zwei Cas9 Nickasen, die sich unabhängig voneinander an derselben Stelle im Genom anlagern müssen, um gemeinsam einen Doppelstrangbruch zu bewirken (Huth 2016).

Des Weiteren werden sogenannte **deadCas9** (dCas9) an Stelle von Cas9 verwendet. Diese Cas9-Enzyme wurden inaktiviert, das heißt sie können die DNA zwar nicht selbstständig zerschneiden, aber das richtige Gen lokalisieren. Um die DNA nach dem Fund zu zertrennen, haben die dCas9-Enzyme eine zusätzliche Endonuklease gebunden. Diese schneidet die DNA allerdings nur, wenn sich noch eine weitere Endonuklease direkt in ihrer Nähe befindet (Huth 2016; Sachdeva 2015, S.513).

Außerdem ist es möglich die noch zu hohe Toleranz von Fehlpaarungen der sgRNA zu senken, indem man die Nukleotidanzahl der sgRNA von 20 auf 17-18 Nukleotide verringert. So soll die Präzision erneut verbessert werden (Huth 2016).

Durch jede Veränderung von Cas9 wird jedoch auch seine Effizienz beeinträchtigt. Daher ist die Forschung mit Cas9 noch nicht beendet und man sucht nach weiteren Optimierungsmöglichkeiten (Huth 2016).

## 5.2 Ethische Probleme

### 5.2.1 Kennzeichnung von Gentechnik in Lebensmitteln

Es gibt einige Bereiche, wie zum Beispiel die Heilung von Krebs (s. 4.3) oder HIV, in denen die Anwendung von CRISPR/Cas9 in der Forschung ausschließlich befürwortet wird. Allerdings bewerten Kritiker vor allem die Verwendung von CRISPR in der Nahrungsmittelindustrie und die Beeinflussung der menschlichen Keimbahn negativ (Deutschlandfunk 2016).

In der Lebensmittelindustrie gilt CRISPR nach Definition des Gentechnikgesetzes nicht als gentechnischer Eingriff, da er nicht von herkömmlichen Züchtungsmethoden unterscheidbar ist. Dort wird der Begriff des **gentechnisch veränderten Organismus** als „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 [...]“ (BMJV a, §3) definiert. Ein weiteres Kriterium ist, dass „[...] das genetische Material des Organismus Eigenschaften aufweist, die auf gentechnische Arbeiten zurückzuführen sind“ (BMJV a, §3). Es wird keine nachweisbare Fremd-DNA eingefügt, wodurch beide Kriterien nicht zutreffen. Somit sind die Konzerne gesetzlich nicht verpflichtet, die mit CRISPR bearbeiteten Produkte als gentechnisch veränderte Organismen zu kennzeichnen (BMVJ a, §3 Begriffsbestimmungen).

Gentechnische Veränderungen an Nutzpflanzen werden auch als Grüne Gentechnik bezeichnet und sind, allgemein betrachtet, europaweit ziemlich unbeliebt, besonders in Deutschland. Es gibt jedoch auch Befürworter. Alina Huth beispielsweise denkt, es sei eine bessere Aufklärung über verschiedene Arten von Gentechnik notwendig, da sie ein unberechtigt schlechtes Image habe. CRISPR zum Beispiel beschleunige den Kreuzungsvorgang nur und sei je nach Art der Genmanipulation gesundheitlich unbedenklich. Dies müsse allerdings für jede gentechnisch manipulierte Pflanze bewiesen werden (Huth 2016).

Des Weiteren kann die übermäßige Nutzung von Pflanzenschutzmitteln in der Landwirtschaft durch die gentechnische Optimierung von Pflanzen eingedämmt werden, was für den Verbraucher, aber auch für die Bauern vorteilhaft sei (Deutschlandfunk 2016, 21:30-21:54).

### 5.2.2 Sind Eingriffe in die menschliche Keimbahn verantwortbar?

Die Möglichkeit, mit CRISPR in die menschliche Keimbahn einzugreifen, wird von Kritikern noch deutlich skeptischer als die Grüne Gentechnik aufgefasst. Ein Ziel dieser Eingriffe ist es, Erbkrankheiten zu heilen. Dies will man erreichen, indem man mit CRISPR entweder die DNA der Gameten oder der Zygoten verändert. Diese Veränderung in der DNA wird an die zukünftigen Generationen weitergegeben. Daher wird befürchtet, dass man die langfristigen Auswirkungen dieser Veränderung nicht vorhersehen kann (Gómez Tatay 2016).

Des Weiteren ist ein solches Verfahren bei dem aktuellen Stand der Technik überhaupt

nicht gefahrenlos durchführbar. Der Grund für diese Befürchtung ist das Experiment der chinesischen Forscher (s. 5.1.2), bei dem insbesondere die geringe Erfolgsquote viele Kritiker beunruhigt. Bei dieser hohen Wahrscheinlichkeit für *off-target cuts* ist CRISPR/Cas9 keinesfalls am Menschen anwendbar. Die kurze sgRNA kann sich durch die Toleranz von wenigen Fehlpaarungen mit Sicherheit an mehreren Stellen im großen menschlichen Genom anbinden, was gefährliche Folgen haben kann (Gómez Tatay 2016; Lanphier, Urnoy u.a. 2015, S.410; Huth 2016).

In England hat man die Definition, ab wann eine Zygote als menschliches Individuum gilt, auf den zwölften Tag nach der Befruchtung ausgedehnt. So ist die Grundlagenforschung an Embryonen bis zum zwölften Tag erlaubt. In Deutschland ist das nicht der Fall, da das Individuum laut Definition des Embryonenschutzgesetzes (§8), welches 2011 zuletzt geändert wurde, bereits durch die Befruchtung entsteht (Deutschlandfunk 2016, 29:22-29:51; BMJV b, §8).

Diese Entwicklung wird überwiegend negativ aufgefasst, weshalb über ein freiwilliges Forschungsmoratorium in diesem Bereich diskutiert wurde. Es soll international gelten und Zeit bieten, um „die wissenschaftlichen, medizinischen, ethischen, juristischen und regulatorischen Implikationen der neuen Möglichkeiten des genome editing an menschlichen Keimbahnzellen zu diskutieren.“ (DFG 2015).

Der problematischste Aspekt ist, dass diese Eingriffe letztendlich zur Optimierung von Menschen führen könnten, was dramatische Folgen für die Gesellschaft mit sich bringen würde (Arens 2016). Eine Bewegung, die dies fördert, ist der **Transhumanismus**. Eine Hauptvertreterin dieser Richtung ist Elizabeth Parrish, Geschäftsleiterin des Biotech-Start-ups namens BioViva. Sie hält den Alterungsprozess und die häufigen Begleiterscheinungen wie beispielsweise Arterienverkalkungen, Alzheimer und Muskelschwund für eine Krankheit, die man mittels CRISPR heilen könne. Sie will mit Adeno-assoziierten Viren und CRISPR bestimmte DNA einschleusen, die das Altern der betroffenen Zellen rückgängig machen soll. Das Verfahren wurde angeblich erfolgreich an Tieren getestet und soll nun an der Geschäftsleiterin persönlich getestet werden. So eine Therapie kann bis zu 80.000 US-Dollar kosten (Kewitz 2015).

## 6. Fazit

Ich denke, CRISPR/Cas9 bietet generell großes Potential in sehr vielen verschiedenen Anwendungsbereichen. Es hängt jetzt davon ab, wie man diese gentechnische Revolution einsetzt. In Anwendungsbereichen wie der Medizin und der Biotechnologie wird CRISPR meiner Meinung nach bisher besonders sinnvoll eingesetzt. Vor allem finde ich die neue Möglichkeit, Krankheiten wie beispielsweise Krebs schneller heilen zu können, sehr nützlich.

Allerdings muss meines Erachtens das Gentechnikgesetz mit der veralteten Definition eines genetisch veränderten Organismus dem aktuellen Forschungsstand so angepasst werden, dass alle gentechnisch veränderten Lebensmittel als solche gekennzeichnet werden müssen. Die fehlende Nachweisbarkeit darf kein Kriterium sein, sondern nur die in der Produktion angewandten Methoden. Außerdem könnte zwischen verschiedenen Arten von Gentechnik unterschieden werden.

Ebenfalls relevant ist, was genau an der Pflanze verändert wurde. Einerseits sehen viele Verbraucher das Einfügen von Antibiotikaresistenzgenen als problematisch an, da so beim Menschen Antibiotikaresistenzen und Allergien entstehen können. Andererseits führt sonst notwendiger übermäßiger Einsatz von Pestiziden in der Landwirtschaft zu ökologischen und gesundheitlichen Problemen (BUND o.J.).

Eine deutliche Grenze muss meiner Meinung nach bei der Beeinflussung der menschlichen Keimbahn gezogen werden. Die langfristigen Auswirkungen sind unkalkulierbar und ethische Probleme vorprogrammiert (Präimplantationsdiagnostik). Daher halte ich das Moratorium für diese Forschungsrichtung für wichtig. Es sind international gleich geltende Gesetzesstandards notwendig, weil meines Erachtens keine künstlich vorgenommene Veränderung im Genom an die nächsten Generationen weitergegeben werden darf, ohne die Langzeitfolgen zu kennen. Außerdem halte ich die Möglichkeit, Menschen genetisch zu optimieren für ethisch nicht verantwortbar.

Insgesamt ist CRISPR/Cas9 also eine nützliche gentechnische Innovation, die in vielen Bereichen großes Zukunftspotential bietet. Zu den vielversprechendsten Richtungen

gehören vor allem die medizinische und biotechnische Anwendung. Die Möglichkeiten werden allerdings auch noch durch berechtigte ethische Bedenken eingegrenzt. Des Weiteren treten noch einige technische Probleme auf, die nur durch detailliertere Erforschung der noch recht jungen gentechnischen Methode CRISPR gelöst werden können. Daher denke ich, dass die Lösung dieser Probleme noch etwas mehr Zeit benötigt und dass sich Politik und Gesellschaft intensiver mit diesem Thema auseinandersetzen müssen.

## 7. Anhänge

### 7.1 Alina Huth Experteninterview

#### Antworten Fragenkatalog CRISPR

##### **Technische Fragen:**

1. Was konnten Sie genau durch Ihr Masterprojekt herausfinden und was werden diese Ergebnisse in der Krebsforschung verändern können?

Die Zielsetzung meiner Masterarbeit war es, die CRISPR/Cas Methode zu etablieren, um damit später *knockout*-Studien *in vitro* und *in vivo* durchzuführen zu können. Bei *knockout*-Studien wird ein Gen ausgeschaltet, hier mittels CRISPR/Cas9, und anschließend wird analysiert, welchen Effekt das Fehlen dieses Gens auf die Zelle hat. So kann man zum Beispiel ein Gen, das in Krebszellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen besonders stark exprimiert wird, ausschalten. Führt das Ausschalten dieses Gens in Krebszellen zum Zelltod, so könnte das Gen ein potenzieller Angriffspunkt für Medikamente gegen Krebserkrankungen sein. Nun kann nach einem Wirkstoff gegen das Protein, das von besagtem Gen codiert wird, gesucht werden, um daraus ein Medikament zu entwickeln. Das CRISPR/Cas System wird hier also indirekt zur Validierung von *targets* eingesetzt und nicht direkt zur Therapie im Menschen.

2. Es gab Tierversuche von Daniel Anderson, bei denen große Mengen an Flüssigkeit in die Blutgefäße injiziert werden mussten, um Cas9 und seine guideRNA in das Zielorgan des Tieres zu bringen, was beim Menschen unmöglich wäre.

Wie kann man beispielsweise zur Krebsbehandlung das Cas9-Enzym und die guideRNA an die richtige Stelle im menschlichen Körper bringen?

Daniel Anderson und sein Team benutzten CRISPR/Cas9, um Tyrosinämie zu heilen, eine genetisch bedingte Krankheit, die durch eine einzige Punktmutation verursacht wird. Im Gen das für das Enzym Fumarylacetoacetase codiert ist das letzte Nukleotid von Exon 8 G→A (Guanin zu Adenin) mutiert, was zur Produktion von defekten Enzymen führt. Dies wiederum führt zur Ansammlung giftiger Stoffe in den Leberzellen und somit zu gefährlichen Leberschäden. Im Kontext einer solchen Erkrankung, die durch die Mutation eines einzigen oder weniger Gene verursacht wird, kann man durch das Einbringen des Cas9 Enzyms, der *single guide* RNA (sgRNA) und einer DNA Vorlage die krankhafte Mutation präzise ausschneiden und korrigieren. Das funktioniert so, dass Cas9 von der sgRNA zum Zielgen, in Daniel Anderson Fall zu besagter G→A Mutation, geführt wird, und dort einen Doppelstrangbruch herbeiführt. Dieser wird anschließend mithilfe der

(hier einzelsträngigen) DNA Vorlage, die die Informationen für die gesunde Variante des Gens enthält, repariert. Bei der so genannten „*homology-directed repair*“, die einen der beiden DNA Notfallreparaturmechanismen der Zelle darstellt, baut die Polymerase den Doppelstrangbruch wieder zusammen, und orientiert sich dabei an der DNA Vorlage, die an den Enden mit dem geschnittenen Gen überlappt. Durch das Wiederherstellen der „gesunden“ Version des Gens konnten Daniel Anderson und seine Kollegen die Krankheit Tyrosinämie nachweislich lindern.

Bei Krebserkrankungen ist das leider nicht so einfach. Krebs ist ein Begriff, der viele verschiedene Krankheiten zusammenfasst, die gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen. Zum Beispiel sind Krebszellen per Definition in der Lage, Metastasen zu bilden, und besitzen im Vergleich zu gesunden Körperzellen eine erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit und einen veränderten Stoffwechsel. Auf molekularer Ebene unterscheiden sich die Zellen allerdings erheblich zwischen verschiedenen Indikationen (z.B. Brustkrebs und Lungenkrebs), aber auch zwischen Patienten, die an der gleichen Art von Krebs erkrankt sind. Und sogar innerhalb eines Tumors eines Patienten können sich die Zellen unterscheiden, weshalb es oft so schwierig ist, Krebspatienten vollständig zu heilen. Im Laufe der Zeit häufen sich in Krebszellen immer mehr verschiedene Mutationen an, sodass die direkte Therapie des Krebses mittels CRISPR/Cas9 nicht vielversprechend ist und technisch sehr anspruchsvoll wäre.

Deshalb macht man sich die CRISPR-Technologie in der Krebsforschung auf andere Weise zunutze. Eine beliebte Anwendung ist es, mithilfe von Cas9 und sgRNAs gezielt Gene auszuschalten, die in Krebszellen besonders stark exprimiert werden, um anschließend den Effekt des Fehles dieses Gens auf die Zellen in Zellkultur oder in der Maus zu untersuchen. Hierbei macht man sich den zweiten DNA Notfallreparaturmechanismus der Zelle zunutze, das „*non-homologous end joining*“. Hier werden die Enden des Doppelstrangbruches von Notfallreparaturenzymen wieder zusammengefügt, wobei oft Nukleotide aus der ursprünglichen DNA-Sequenz verloren gehen oder zusätzliche Nukleotide eingefügt werden. Dadurch verschiebt sich in vielen Fällen die Codonabfolge nach dem Bruch und es kommt zu Leserastermutationen. Beim Ablesen des Gens entstehen stark verkürzte, nicht funktionstüchtige Varianten des Enzyms, man sagt das Gen ist ausgeknockt. Hat der knockout eines Gens eine tödliche Wirkung auf Krebszellen, nicht aber auf gesunde Körperzellen, ist es möglicherweise ein guter Angriffspunkt für ein Krebsmedikament. Man kann nun einen Wirkstoff gegen das Protein entwickeln und auf sein Potenzial zur Krebsheilung testen.

CRISPR/Cas wird des Weiteren benutzt, um die Zellen des Immunsystems genetisch zu manipulieren, sodass diese die Krebszellen besser erkennen und abtöten können. Krebszellen sind durch verschiedene Mechanismen in der Lage, die körpereigene Immunabwehr zu umgehen (Immunevasion). Zahlreiche Forschergruppen haben bereits gezeigt, dass man Immunzellen mittels CRISPR/Cas so verändern kann, dass diese beispielsweise länger leben oder toxischer sind und die Erkrankung so besser angreifen können. Hierzu wird dem Patienten oder einem Spender (z.B. bei Leukämie) Blut entnommen und daraus die Immunzellen isoliert. Diese werden mit CRISPR/Cas9 verändert und dann in den Patienten injiziert, wo sie den Krebs eindämmen oder sogar vollständig

beseitigen. Generell geht der Trend in der Krebsforschung aktuell Richtung personalisierter Krebstherapie, sprich Patienten sollen in Zukunft mit einer auf sie persönlich angepassten Therapie geheilt werden.

Es ist also nur sinnvoll, CRISPR/Cas9 direkt zur Behandlung von Krankheiten einzusetzen, wenn die Krankheit durch die Mutation eines oder sehr weniger Gene hervorgerufen wird und diese Mutationen präzise korrigiert werden können.

Ein Hauptproblem bei der Verwendung von CRISPR/Cas9 in komplexeren Organismen ist der Transport von Cas9 Enzym und sgRNA zum Zielorgan. Daniel Anderson benutzt die hydrodynamische Injektion um beide Komponenten in die Leberzellen zu bringen, was nicht besonders effizient ist. Durch die Injektion verdoppelt sich das Blutvolumen der Mäuse und es können zudem Leberschäden auftreten. Dennoch werden die Symptome der Tyrosinämie in Mäusen deutlich gelindert, was bedeutet, dass Daniel Andersons Herangehensweise prinzipiell funktioniert.

Mittlerweile sind Daniel Anderson und sein Team auf andere Transportmöglichkeiten umgestiegen. Sie benutzen Lipid-Nanopartikel, um die Cas9 mRNA in die Zellen zu transportieren. Die Cas9 mRNA wird hierbei in Lipidvesikel (Hüllen aus z.B. Fettsäuren) eingeschlossen und über Endozytose von den Zellen aufgenommen. Mit Adeno-assoziierten Viren bringen sie zudem die sgRNA und die einzelsträngige DNA-Vorlage in die Zellen.

Viren sind ein beliebtes Transportmittel für das CRISPR/Cas9 System. Oftmals werden Adeno-assoziierte Viren oder Lentiviren verwendet. Diese sind gentechnisch verändert, sodass sie sich nicht mehr selbstständig vermehren können und keine Krankheiten mehr auslösen können. In ihr Genom können Cas9 Gen, sgRNA und gegebenenfalls eine DNA Vorlage integriert werden. Die Viren können anschließend Zellen infizieren und so Cas9 und sgRNA in die Zellen bringen. Ein Nachteil der Viren ist die begrenzte Transportkapazität, sprich es kann nur ein kurzes Stück DNA integriert und transportiert werden. Für Adeno-assoziierte Viren liegt die Obergrenze bei 4.7 Kilobasen, bei Lentiviren immerhin bei 10 Kilobasen. Cas9 ist ein recht großes Protein und das zugehörige Gen misst über 4 Kilobasen. Zudem ist gängige Praxis, zusätzliche Gene, die zusammen mit Cas9 abgelesen werden und zur Überprüfung des erfolgreichen Einbringens von Cas9 dienen, in das Virus einzufügen. Diese Reportergene verringern zusätzlich die Transportkapazität, sodass der Platz auf dem Virus schnell knapp wird. Oft ist Effizienz von Viren als Transportmittel eher gering. Auch ich habe in meiner Masterarbeit beobachtet, dass nach der ersten Infektion meiner Zellen mit Cas9-Lentiviren nur ca. 2% der Zellen das Enzym tatsächlich exprimiert haben. Deshalb wird vermehrt nach kleineren Varianten des Cas Enzyms und nach effizienteren und sichereren Transportmöglichkeiten für das Cas9 Enzym und die sgRNAs gesucht.

3. Ich habe gelesen, dass es öfters zu off-target cuts des Cas9-Enzyms kommt. Gibt es mittlerweile Fortschritte, um das Cas9-Enzym zu präzisieren?

Off-target Effekte sind tatsächlich ein großes Problem der CRISPR/Cas Technologie. Es wurde gezeigt, dass fehlerhafte Basenpaarungen von sgRNA und genomischer DNA 8-12 Nukleotide hinter dem *protospacer adjacent motif* (PAM) toleriert werden und es somit auch zu von Cas9 herbeigeführten Doppelstrangbrüchen kommen kann, wenn die 20 Nukleotide lange sgRNA nicht perfekt mit einem Gen übereinstimmt. Wenn man sich jetzt vor Augen ruft, wie groß das menschliche Genom ist, kann man sich leicht vorstellen, dass solch eine kurze sgRNA an mehreren Stellen binden kann und so gefährliche Mutationen in anderen Stellen als dem Zielgen verursachen kann. Um Off-target Effekte zu vermeiden, werden vermehrt veränderte Versionen von Cas9 eingesetzt, nämlich die Cas9 Nickasen. Diese Enzyme können keinen Doppelstrangbruch mehr herbeiführen. Stattdessen schneiden sie nur einen DNA Strang. Es müssen also zwei Cas9 Nickasen gleichzeitig von zwei verschiedenen sgRNAs zum Gen geführt werden und dort jeweils einen Einzelstrangbruch induzieren, um insgesamt einen Doppelstrangbruch zu erzeugen. Dadurch wird die Genauigkeit des Systems deutlich verbessert.

Alternativ werden auch Cas9 Enzyme verwendet, die so verändert wurden, dass sie komplett inaktiv sind, sogenannte „dead“ Cas9 (dCas9). An das dCas9 Enzym wird eine andere Endonuklease gebunden, die nur dann schneidet, wenn sich eine zweite Endonuklease in unmittelbarer Nähe befindet. Auch hier wird also ein kooperatives System aus zwei Endonukleasen benutzt, um die Genauigkeit zu erhöhen.

Es wurde zudem gezeigt, dass das Verkürzen der sgRNA von 20 auf 17 oder 18 Nukleotide die Zielgenauigkeit des Systems verbessert, vermutlich, weil so Fehlpaarungen von sgRNA und genomischer DNA schlechter toleriert werden.

Veränderungen des Cas9 Enzyms reduzieren unglücklicherweise auch die Effizienz der Spaltung des Ziel-Gens. Deshalb wird verstärkt nach neuen Versionen von Cas9 gesucht, die von Natur aus präziser sind. Auch chemische Modifikationen der sgRNA könnten in Zukunft die Genauigkeit des CRISPR/Cas Systems verbessern.

### **Ethische/ rechtliche Fragen:**

1. Die DFG hat sich in einer Stellungnahme für „ein freiwilliges internationales Moratorium für sämtliche Formen der künstlichen Keimbahnintervention beim Menschen, bei der Veränderungen des Genoms an Nachkommen weitergegeben werden können.“ ausgesprochen. Außerdem wird es eine Tagung des Deutschen Ethikrates bezüglich *genome editing* in diesem Jahr geben.

Was denken Sie über diese Maßnahmen? Sind sie notwendig, um verantwortungsbewusst zu forschen?

Der tschechische Forscher Martin Jinek, der zuerst das Potenzial von CRISPR/Cas für die Gentechnik erkannte und die ersten sgRNAs entwickelte, hat kürzlich ein Interview in der Zeitschrift

Neon gegeben, in dem er sich auch mit der ethischen Vertretbarkeit von Veränderungen menschlicher Keimzellen auseinandersetzte. Er sagte darin, dass es von äußerster Wichtigkeit sei, sich mit solchen ethischen Fragen intensiv auseinanderzusetzen. Der Mensch ist die erste und einzige Spezies auf der Erde, die sein eigenes Erbgut modifizieren kann – mit unabsehbaren Folgen für alle nachfolgenden Generationen.

Eine Gruppe aus China hat vergangenes Jahr eine Studie veröffentlicht, in der sie mittels CRISPR die tödliche Erbkrankheit  $\beta$ -Thalassämie in einem menschlichen Embryo heilen wollten. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Technologie noch nicht ausgereift genug ist, um sie an menschlichen Keimzellen einzusetzen. In Europa sind die Gesetze zur Forschung an menschlichen Embryonen zum Glück wesentlich strenger als in China und den USA. Dennoch dürfen, wie ich gelesen habe, seit Februar 2016 englische Wissenschaftler mit CRISPR/Cas menschliche Embryonen modifizieren, sofern diese 7 Tage später zerstört werden. Ich finde das ist eine sehr besorgniserregende Entwicklung, da die Langzeitfolgen der dauerhaften Veränderung des menschlichen Erbguts überhaupt nicht abschätzbar sind und off-target Mutationen dramatische Effekte haben könnten. Deshalb ist es sehr wichtig, ethische Fragen intensiv zu diskutieren und Grenzen für solche Studien zu definieren, die nicht überschritten werden dürfen.

2. Ein weiteres Problem ist, dass man nicht nachweisen kann, ob ein Organismus genetisch verändert wurde. So passiert es beispielsweise, dass gentechnisch veränderte Lebensmittel verkauft werden, ohne dass sie gekennzeichnet sind. Es ist auch unklar, ob der Einsatz von CRISPR in der Nahrungsmittelindustrie als Gentechnik zu betiteln ist, da CRISPR ursprünglich ein natürlicher Vorgang war.

Was denken Sie über Gentechnik bei Nahrungsmitteln und die unklare Definition von gentechnischer Veränderung in Nahrungsmittelindustrie?

Ich sehe die genetische Veränderung von Nutzpflanzen nicht sehr kritisch, da es Gentechnik in seiner ursprünglichen Form als Kreuzung von besonders ertragsreichen oder widerstandsfähigen Pflanzen schon seit sehr langer Zeit gibt. Die Gentechnik, und insbesondere CRISPR/Cas, ist nur ein molekulares Werkzeug, das es ermöglicht, diesen Kreuzungsvorgang stark zu beschleunigen und präzisieren. Oft werden die Nutzpflanzen so verändert, dass Gene, die in anderen Pflanzenarten schon natürlicherweise vorkommen, mittels Gentechnik eingefügt werden. Das finde ich prinzipiell wenig bedenklich, auch wenn solche Pflanzen für die Verbraucher als gentechnisch verändert gekennzeichnet werden sollte. Allerdings bin ich der Meinung, dass die Verbraucher in Deutschland unbedingt besser über grüne Gentechnik aufgeklärt werden sollte. Die Gentechnik hat, besonders in Deutschland, ein sehr schlechtes Image, was meiner Meinung nach absolut nicht gerechtfertigt ist. So wird es ohne zusätzliche Aufklärung schwer werden, gentechnisch veränderte Produkte hier zu verkaufen. Firmen, die gentechnisch veränderte Nutzpflanzen entwickeln, haben es zurzeit sehr schwer in Deutschland, auch wenn ihre Produkte gesundheitlich unbedenklich sind.

Ich wünsche mir eine bessere Aufklärung der Allgemeinheit zum Thema Gentechnik in der Nahrungsmittelindustrie, damit Deutschland in der grünen Biotechnologie eine Zukunft hat und international wettbewerbsfähig wird.

### **Zukunft:**

1. Wie relevant wird die CRISPR/Cas9-Technologie in Zukunft sein? Wird sie evtl. so wie Zinkfingernukleasen oder TALEN-Nukleasen an Bedeutung verlieren?

Die CRISPR/Cas9-Technologie wird meiner Einschätzung nach auch in Zukunft von großer Bedeutung für viele Bereiche der Biologie sein, sofern keine neue einfachere oder sicherere Technologie entwickelt wird. Schon heute kann man sich CRISPR/Cas kaum noch entziehen und die meisten Forschergruppen in meinem Umfeld nutzen die Technologie intensiv. Auch Zinkfingernukleasen (ZFNs) und Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) sind nützliche Werkzeuge für die Gentechnik und sehr effektiv. Der große Nachteil beider Technologien ist es, dass man für jedes neue Target die ZFNs oder TALENs auf Proteinebene modifizieren muss, während man bei CRISPR/Cas nur eine neue sgRNA entwerfen muss, während das gleiche Enzym (Cas9) verwendet werden kann. Das ist zeitlich und finanziell wesentlich weniger aufwändig. Der Grund, warum ZFNs und TALENs sich letztendlich nicht durchsetzen konnte, war lediglich, dass nur kurze Zeit später CRISPR/Cas entdeckt wurde. Dennoch funktionieren ZFNs und TALENs ähnlich zuverlässig wie CRISPR/Cas.

2. In welchen Bereichen (z.B.: Lebensmittelindustrie, Krebsbehandlung) sind die größten Erfolge zu erwarten?

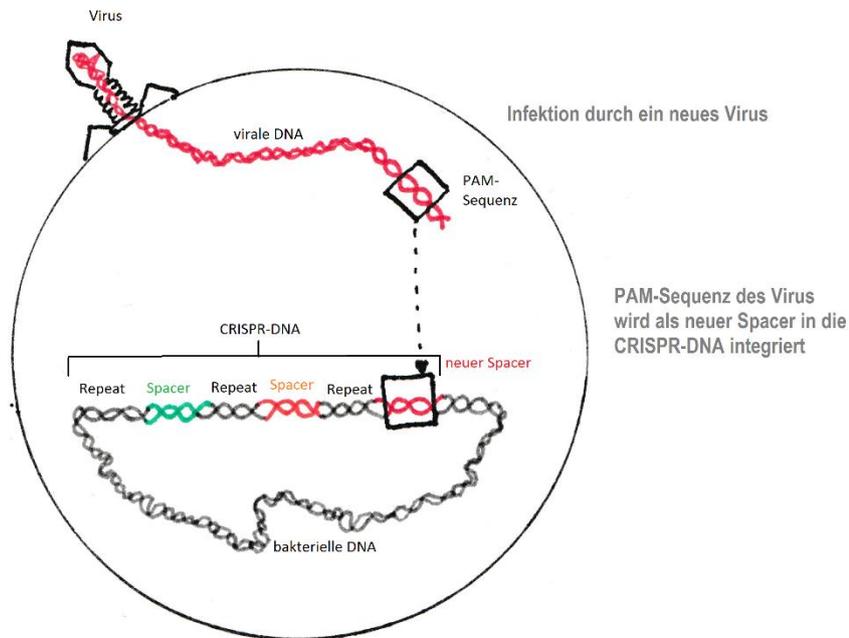
Ich denke, dass CRISPR/Cas viele Bereiche der Biologie revolutionieren wird. In der Krankheitsforschung wird die Technologie, wie bereits weiter oben erklärt, schon auf die verschiedensten Arten eingesetzt. Eine Anwendungsmöglichkeit, auf die ich bisher noch nicht näher eingegangen bin, ist die Erschaffung von Mausmodellen mittels CRISPR/Cas. Mithilfe von CRISPR/Cas kann das Mausgenom so modifiziert werden, dass menschliche Krankheitsbilder nachgeahmt werden. Solche Krankheitsmodelle sind extrem wichtig, um diese Krankheiten auf molekularer Ebene untersuchen und verstehen zu können. Des Weiteren können potenzielle Wirkstoffe im Tier in vivo getestet werden, bevor klinische Studien im Menschen gestartet werden können. Bislang war die Erschaffung solcher Tiermodelle sehr zeitintensiv und nur wenige der Nachkommen besaßen die gewünschten Mutationen. CRISPR/Cas kann diesen Prozess wesentlich verkürzen, wodurch Zeit und Geld gespart werden und weniger Mäuse geopfert werden müssen.

In der Industrie kann CRISPR/Cas, das ursprünglich als einzig bisher bekanntes adaptives Immunsystem der Bakterien entdeckt wurde, eingesetzt werden, um industriell eingesetzte Bakterien vor Infektionen durch Bakteriophagen zu schützen und so die Herstellungsprozesse zu verbessern. In gleicher Weise kann CRISPR/Cas auch eingesetzt werden, um Nutzpflanzen zu verbessern und Erträge zu steigern. Im Zeitalter der Gentechnikgegner wird es allerdings, vor Allem in Deutschland, schwierig werden, CRISPR/Cas in der Nahrungsmittelindustrie effektiv einzusetzen.

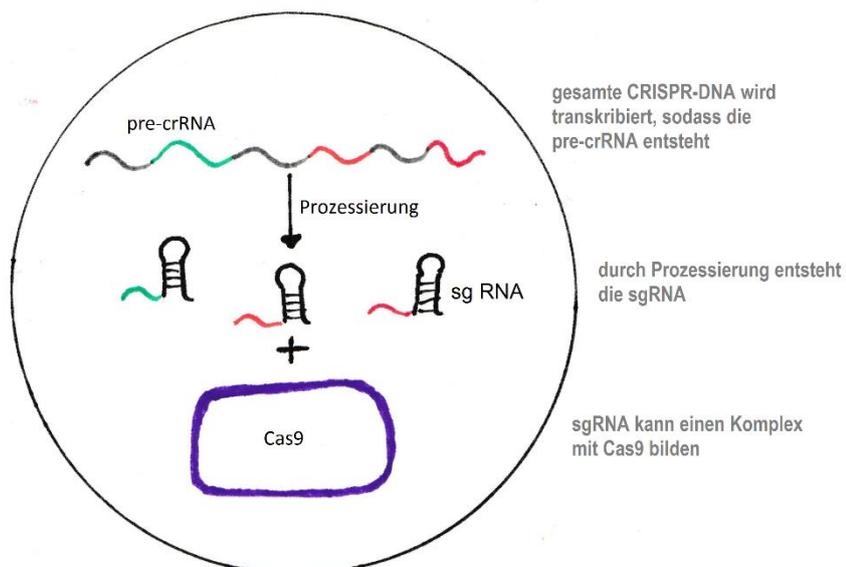
## 7.2 Abbildungen

Abb.1

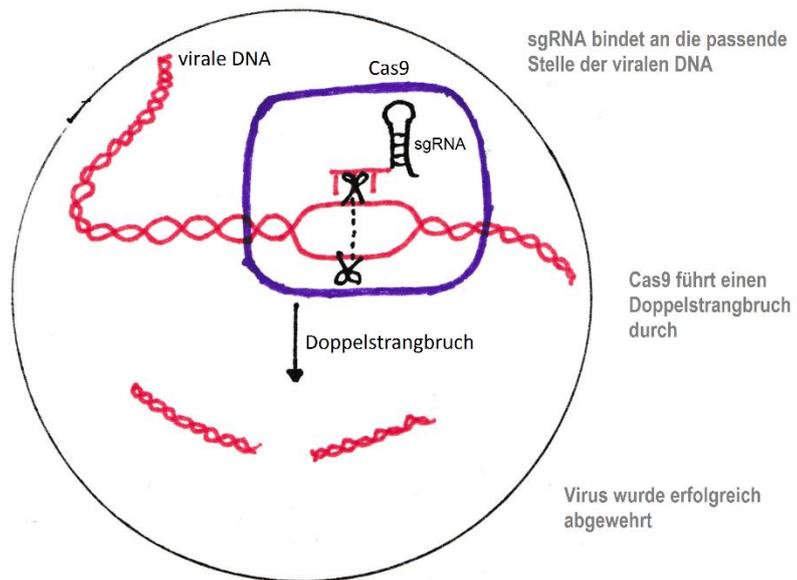
### Adaptions-/ Akquisitionsphase



### Bearbeitungs-/Transkriptionsphase



## Interferenzphase



Eigene Darstellung (in Anlehnung an Pflanzenforschung.de a)

## 8. Literaturverzeichnis

- ♦ AL-ATTAR, Sinan, WESTRA, Edze R.; VAN DER OOST, John u. BROUNS, Stan J.J.: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Ausgabe Nr. 392, April 2011, S.277–289
- ♦ ARENS, Christoph: Ein Tabu gerät ins Wanken. Am 02.02.2016 in Bonn veröffentlicht, <http://www.katholisch.de/aktuelles/aktuelle-artikel/ein-tabu-gerat-ins-wanken>, Aufruf am 31.03.2016
- ♦ BMJV a (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz): Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG). Ausgefertigt am 20.06.1990, Bekanntmachung am 16.12.1993, letzte Überarbeitung am 31.08.2015, <http://www.gesetze-im-internet.de/gentg/BJNR110800990.html#BJNR110800990BJNG000201314>, Aufruf am 01.04.2016
- ♦ BMJV b (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz): Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG). Ausgefertigt am 13.12.1990, zuletzt geändert 21.11.2011, <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/eschg/gesamt.pdf>, Aufruf am 10.04.2016
- ♦ BUND (Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland e.V.): Gentechnisch veränderte Lebensmittel: ungeklärte Risiken für die Gesundheit. O.J., [http://www.bund.net/themen\\_und\\_projekte/gentechnik/risiken/gesundheit/](http://www.bund.net/themen_und_projekte/gentechnik/risiken/gesundheit/), Aufruf am 10.04.2016
- ♦ CHYLINSKI, Krzysztof, LE RHUN, Anaïs u. CHARPENTIER, Emmanuelle: tracrRNA: a unique family of trans-activating RNAs associated to type II CRISPR-Cas systems. *CRISPR: Evolution, Mechanisms and Infection* (P039). 17.06.2013, Download am 19.03.2016, <https://www.biochemis->

try.org/Events/tabid/379/ModuleID/2545/ItemID/2427/Default.aspx?view=Posters#26787

- ◆ CYRANOSKY, David u. REARDON, Sara: Chinese scientists genetically modify human embryos - Rumours of germline modification prove true — and look set to reignite an ethical debate. Nature News, 22.04.2015
- ◆ DEUTSCHLANDFUNK (Gesprächsleitung: Ulrich Blumenthal und Andreas Sentker): Das Kulturgespräch – Die Neugeburt der Gentechnik, Sendung vom 11.03.2016, [http://www.deutschlandfunk.de/61-zeit-forum-wissenschaft-die-neugeburt-der-gentechnik.1301.de.html?dram:article\\_id=348064](http://www.deutschlandfunk.de/61-zeit-forum-wissenschaft-die-neugeburt-der-gentechnik.1301.de.html?dram:article_id=348064)
- ◆ DFG: Chancen und Grenzen des *genome editing*. Stellungnahme vom September 2015, [http://www.dfg.de/download/pdf/dfg\\_im\\_profil/reden\\_stellungnahmen/2015/stellungnahme\\_genome\\_editing\\_2015.pdf](http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2015/stellungnahme_genome_editing_2015.pdf), Download am 05.03.2016, S.7-14
- ◆ DFG: Jahresbericht 2014 - Aufgaben und Ergebnisse. Vorgestellt am 02.07.2015, [http://www.dfg.de/dfg\\_profil/jahresbericht/index.jsp](http://www.dfg.de/dfg_profil/jahresbericht/index.jsp), Download am 26.02.2016
- ◆ DOUDNA, Jennifer u. CHARPENTIER, Emmanuelle u.a.: a programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, Ausgabe Nr.337, 17.08.2012, S.816-821
- ◆ GALONSKA, Anja: Genome Editing: Revolution in der Pflanzenzüchtung? 21.10.2015, <http://www.daserste.de/information/wissen-kultur/w-wie-wissen/querbeet-166.html>, Aufruf am 31.03.2016
- ◆ GÓMEZ TATAY, Lucía: Genome editing CRISPR-Cas9 technique. Biomedical, ecological and ethical considerations. 03.02.2016, <http://www.observatoriobioetica.org/2016/02/crispr-cas9-genome-editing-biomedical-and-ethical-considerations/12026>, Aufruf am 02.04.2016

- ◆ GOSH-ICH PRESS OFFICE: World first use of gene-edited immune cells to treat ‘incurable’ leukaemia. 05.11.2015, <http://www.gosh.nhs.uk/news/press-releases/2015-press-release-archive/world-first-use-gene-edited-immune-cells-treat-incurable-leukaemia>, Aufruf am 01.04.2016
- ◆ HUTH, Alina: Experteninterview, 21.03.2016 (s. Anhang)
- ◆ ISHINO, Y u.a.: Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J. Bacteriol, Ausgabe Nr.169, Dezember 1987
- ◆ KEWITZ, Christine: Diese Transhumanistin will ihren Alterungsprozess durch Genmanipulation stoppen. 15.10.2015, <http://motherboard.vice.com/de/read/transhumanistin-will-ihren-alterungsprozess-per-gentherapie-aufhalten-332>, Aufruf am 02.04.2016
- ◆ KREINER, Marina u. SCHUMANN, Wolfgang: Anwendungen in Biotechnologie und Medizin - Die Immunsysteme der Bakterien. Biologen unserer Zeit, Ausgabe Nr.46, Wiley-VCH Verlag, 2016, S.50-56
- ◆ LANPHIER, Edward; URNOY, Fyodor u.a.: Don’t edit the human germ line. Nature, Ausgabe 519, 26.03.2015, S.410-411
- ◆ LEDFORD, Heidi: CRISPR, the disruptor. Nature, Ausgabe Nr.522, 2015, S.20-24
- ◆ LIVINGSTONE, Mark: CRISPR genome editing: which cell line to choose? 30.06.15, <http://being-bioreactive.com/2015/06/30/crispr-genome-editing-which-cell-line-to-choose/>, Aufruf am 28.03.2016
- ◆ REDAKTION PFLANZENFORSCHUNG.DE a: Factsheet: Das CRISPR/Cas-System. [http://www.pflanzenforschung.de/files/9714/5631/1043/160223\\_Fachsheet\\_CRISPR-Cas9-Prozess.pdf](http://www.pflanzenforschung.de/files/9714/5631/1043/160223_Fachsheet_CRISPR-Cas9-Prozess.pdf), Download am 09.03.2016

- ◆ REDAKTION PFLANZENFORSCHUNG.DE b: Zinkfinger-Nukleasen - Molekulare Werkzeuge für die Pflanzenzucht. 06.09.2011, <http://www.pflanzenforschung.de/de/journal/journalbeitrage/zinkfinger-nukleasen-molekulare-werkzeuge-fuer-die-pfla-1486/>, Aufruf am 04.03.2016
  
- ◆ SACHDEVA, M. u.a.: CRISPR/Cas9: molecular tool for gene therapy to target genome and epigenome in the treatment of lung cancer. *Nature, Cancer Gene Therapy*, Nr.22, online veröffentlicht am 23.10.2015, S.509-517
  
- ◆ ZHOU, Canquan u. HUANG, Junjiu: CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein&Cell*, 2015, S.363–372

## 9. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Facharbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Schriften oder Medien entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Aachen, den 10.04.2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Schmidt', written on a light-colored rectangular background.