

Wissenschaftliche Grundlagen der neuen Gentechnik Verfahren

Übersicht über die neuen Gentechnikverfahren

Genome Editing: Sammelbegriff für neue Gentechnikverfahren, mit denen gezielt Veränderungen in ganz bestimmten Abschnitten des Erbguts herbeigeführt werden.

1. Zielgerichtete Genscheren

CRISPR/Cas9

TALEN

ZNF

2. Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (ODM)

CRISPR: Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats

Cas: CRISPR associated

TALEN: Transcription Activator Like Effector Nuclease

ZNF: Zinc Finger Nuclease

Übersicht über die neuen Gentechnikverfahren

Genome Editing: Sammelbegriff für neue Gentechnikverfahren, mit denen gezielt Veränderungen in ganz bestimmten Abschnitten des Erbguts herbeigeführt werden.

1. Zielgerichtete Genscheren

CRISPR/Cas9

TALEN

ZNF

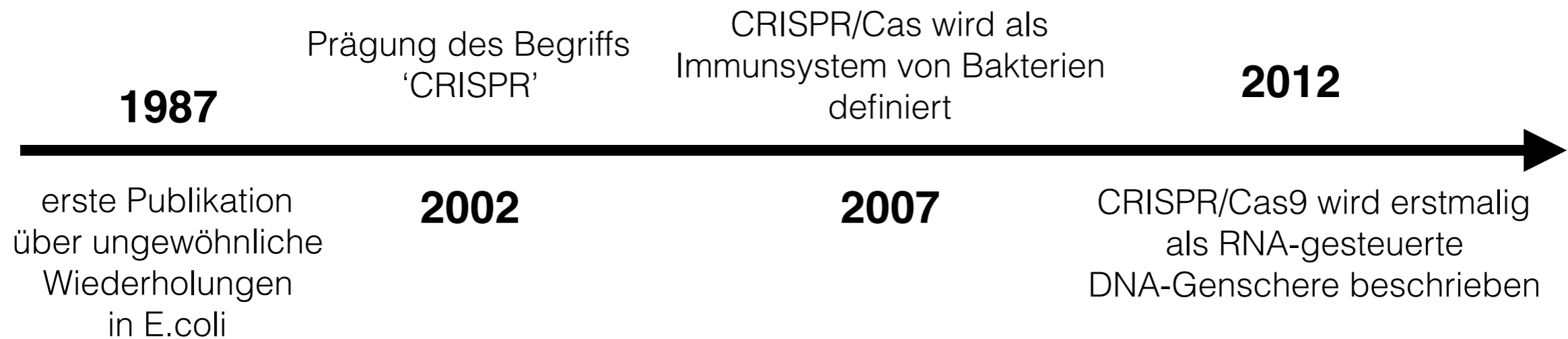
2. Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (ODM)

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Cas: CRISPR associated

TALEN: Transcription Activator Like Effector Nuclease

ZNF: Zinc Finger Nuclease



'CRISPR Explosion'

CRISPR/Cas9 wird erstmalig zum GE von menschl. Zellen verwendet

März. 2013

CRISPR/Cas9 in Pflanzen: Reis, Weizen, Tabak, Hirse

Sep. 2013

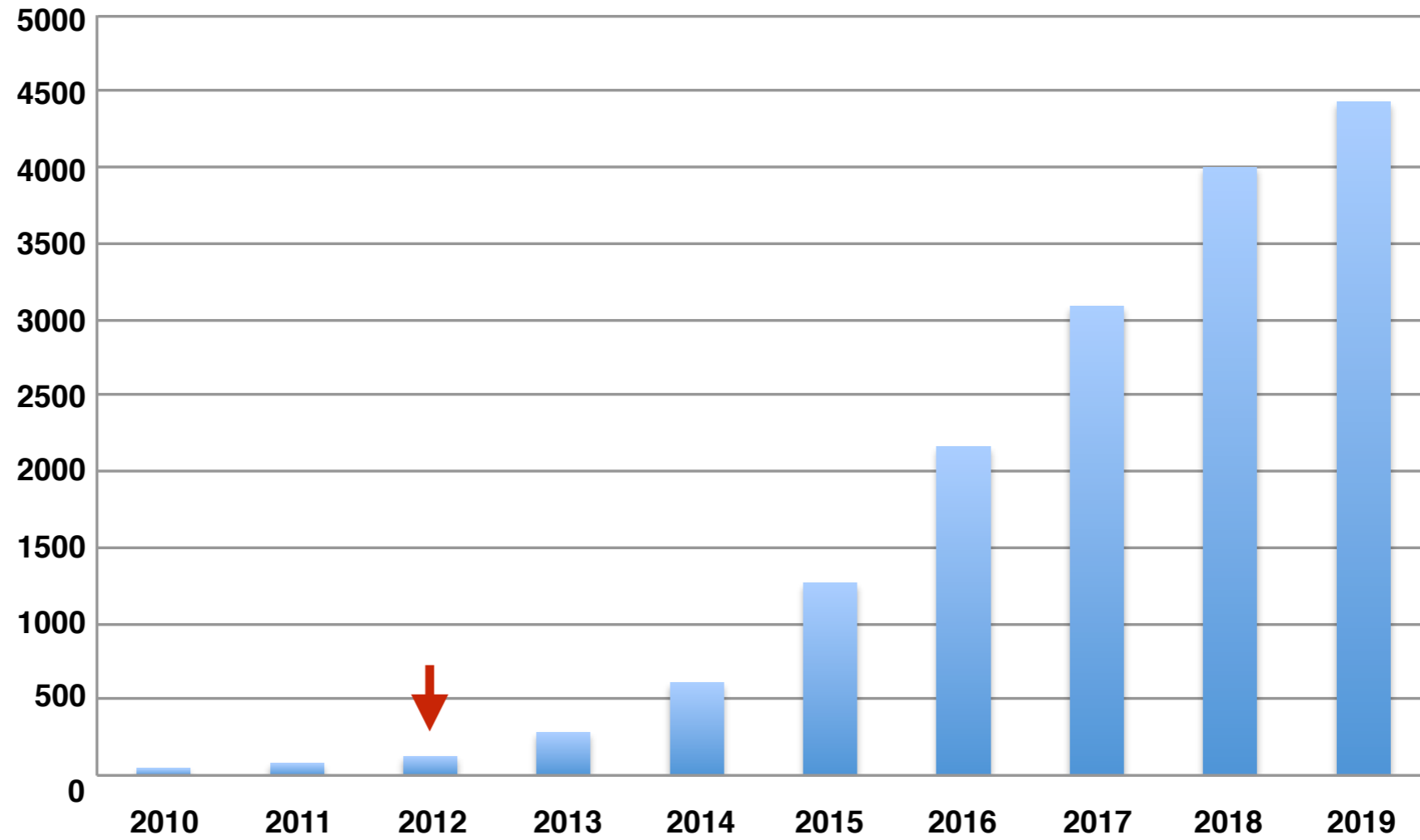
Jan. 2013

CRISPR/Cas9 in Bäckerhefe

Aug. 2013

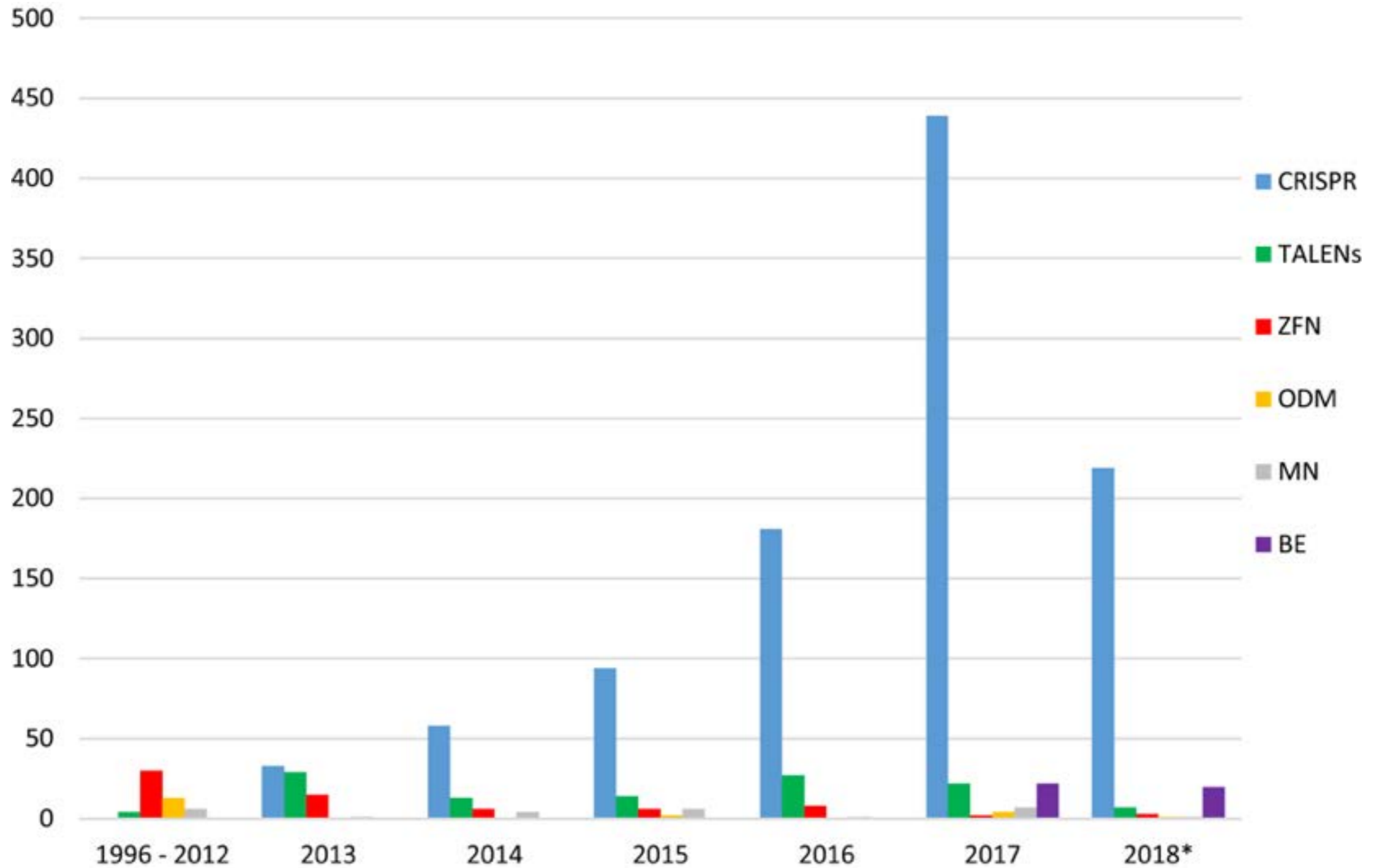
CRISPR/Cas9 in Nutztieren

Veröffentlichungen 'CRISPR' pro Jahr



Pubmed Literatur-Suche 'CRISPR' vom 4.11.2019

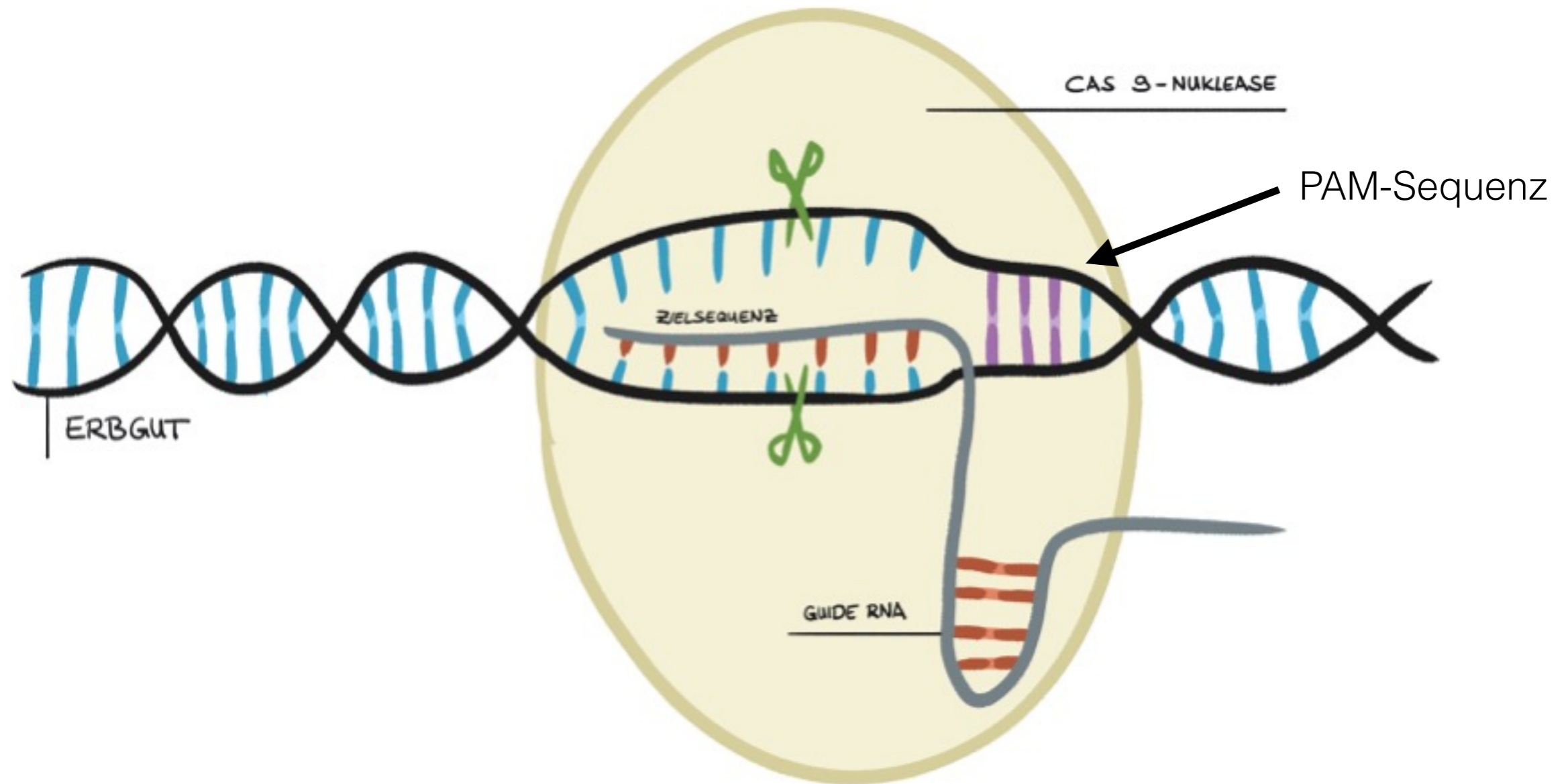
Anzahl der Genome Editing Anwendungen in Pflanzen



Wie wirkt die Genschere CRISPR/Cas9?

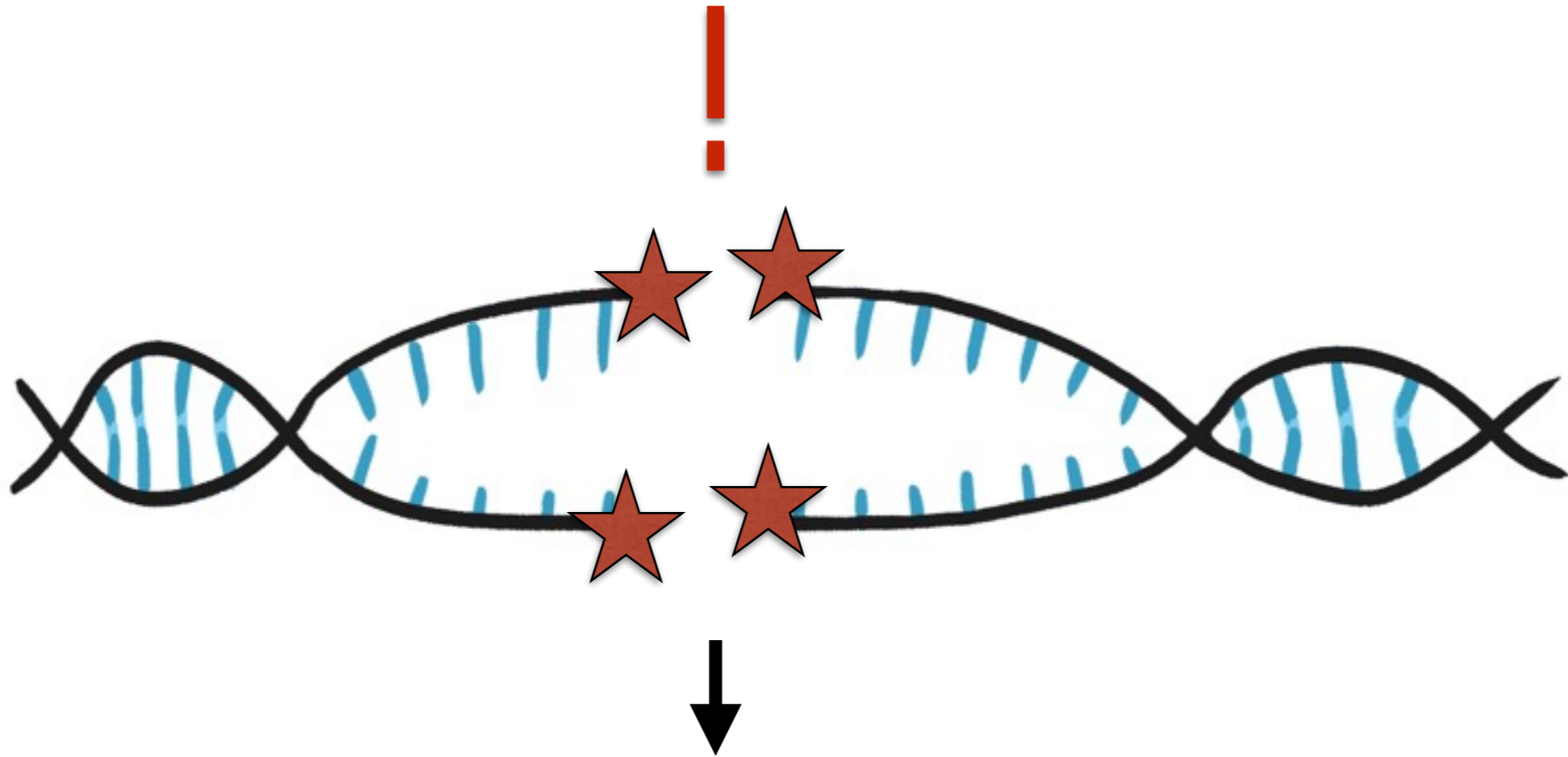
Was bewirkt sie?

Die Arbeitsweise der Genscherer CRISPR/Cas



Zielgerichtete Genscheren führen DNA-Doppelstrangbrüche an spezifischen Stellen des Erbguts ein.

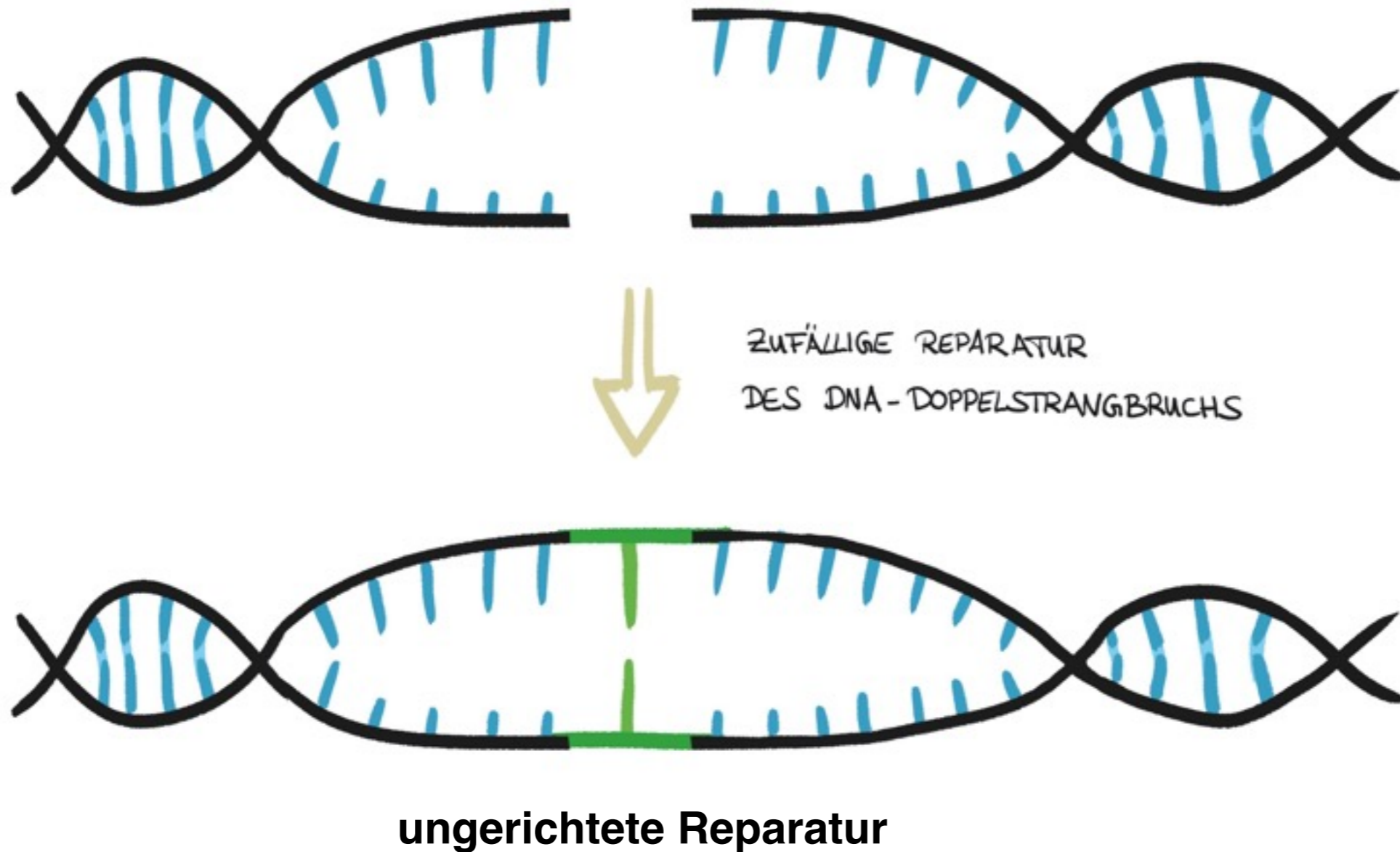




Aktivierung von Reparaturmechanismen der Zelle

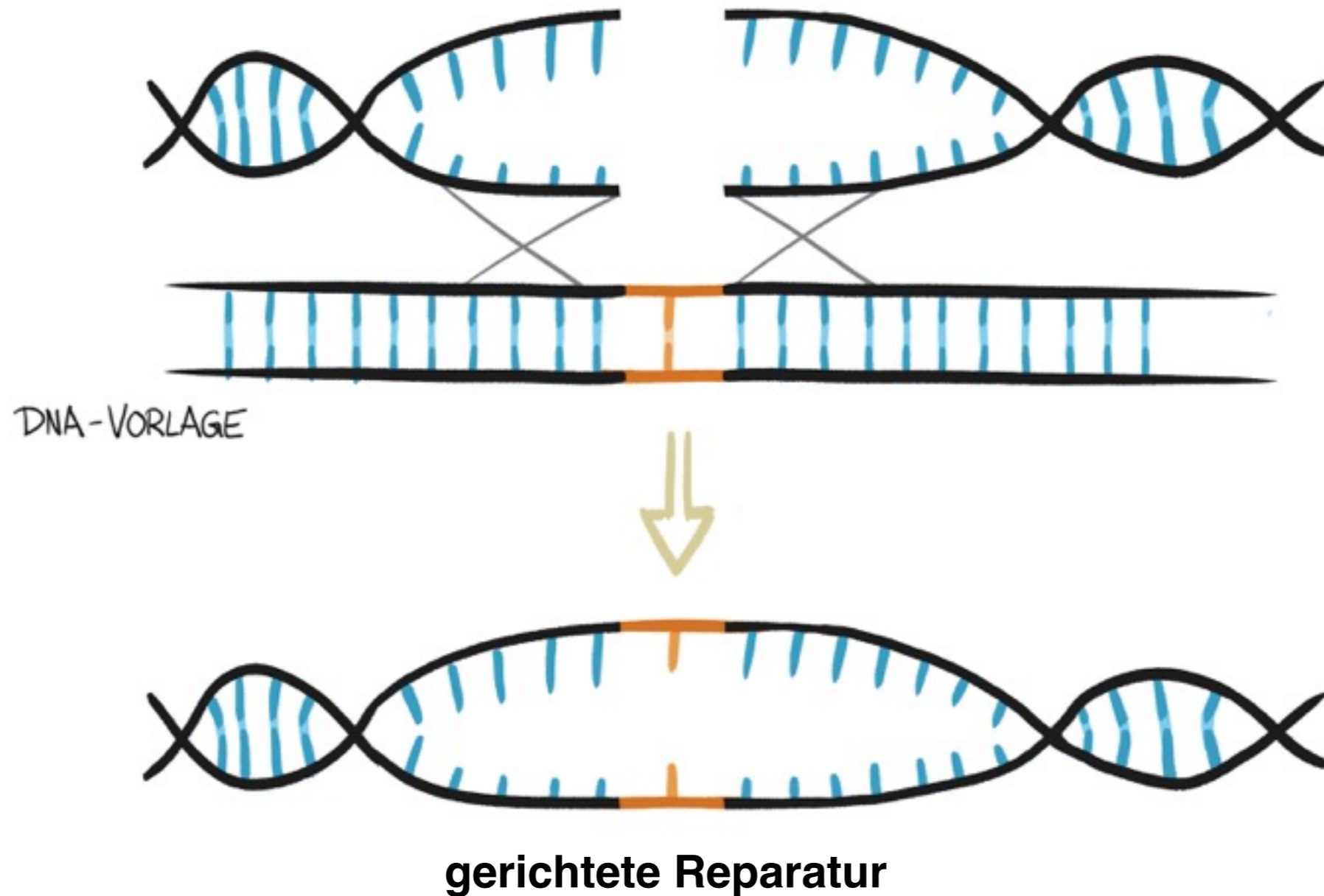
Die DNA-Doppelstrangbrüche werden von der Zellen als Schaden wahrgenommen und aktivieren Reparaturprozesse in der Zelle, die zu Veränderungen des Erbguts führen können.

SDN-1 (Site Directed Nuclease-1)



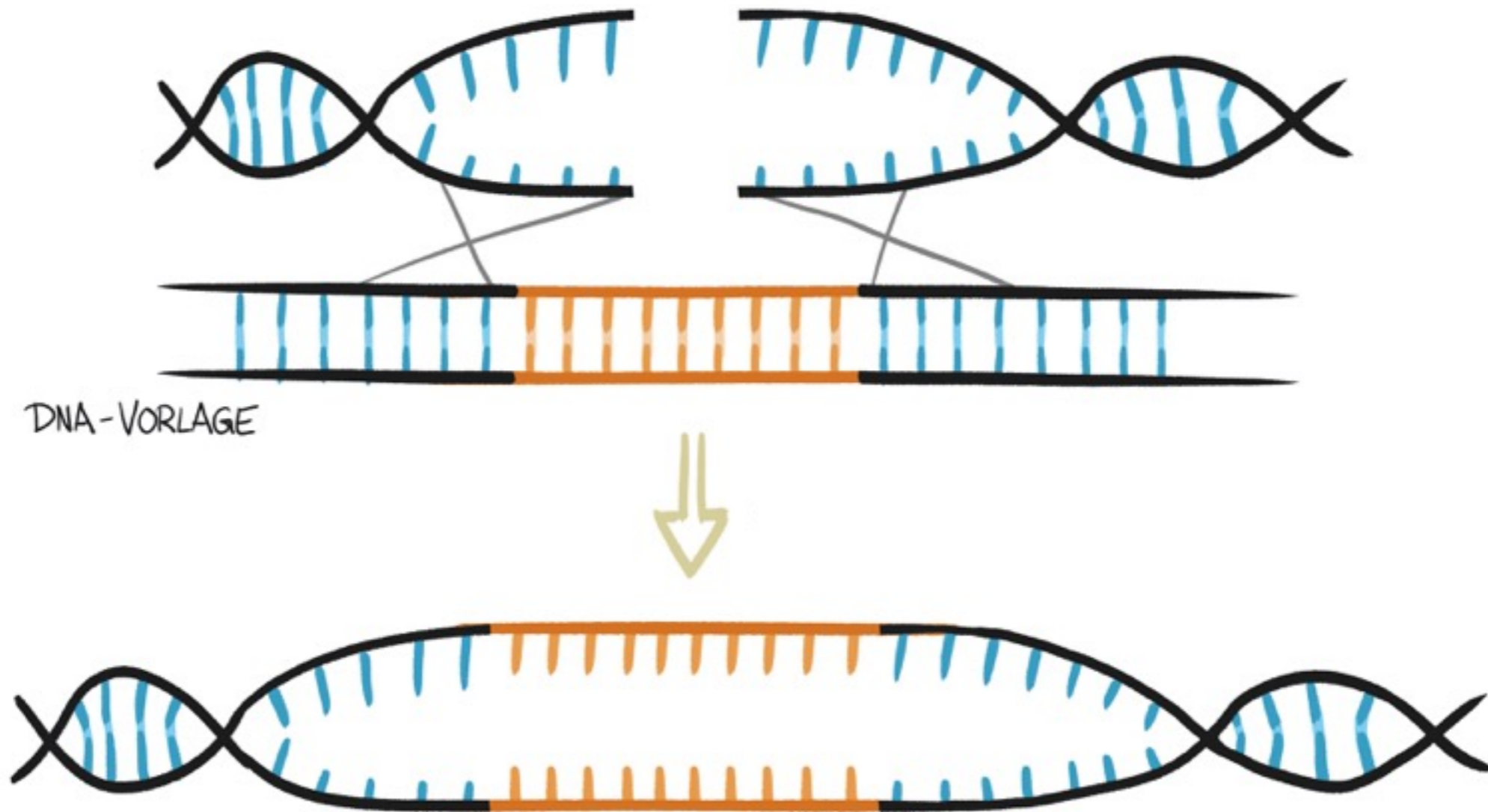
Herstellung des ursprünglichen Zustands oder fehlerhafte Reparatur des DNA-Doppelstrangbruchs durch NHEJ-Reparatur.

SDN-2 (Site Directed Nuclease-2)



DNA-Vorlagen werden mit in die Zelle eingebracht, die bis auf die gewünschten Veränderungen (orange) dem Bereich der Zielsequenz identisch sind. Durch die HDR-Reparatur werden diese ins Erbgut eingebaut.

SDN-3 (Site Directed Nuclease-3)



gerichtete Reparatur, Einbringen ganzer Gene

DNA-Vorlagen werden mit in die Zelle eingebracht, die bis auf die gewünschten Veränderungen (orange) dem Bereich der Zielsequenz identisch sind. Durch die HDR-Reparatur werden diese ins Erbgut eingebaut.

Mögliche Veränderungen des Erbgutes durch CRISPR/Cas9

Zielsequenz vor dem Eingriff

CAGGTTACTAGG

Austausch einzelner DNA-Bausteine

CAGGTCACTAGG

Insertionen

CAGGTTGAACACTAGG

SDN-1 & SDN-2

Deletionen

CA—————ACTAGG

Einführung von großen DNA-Abschnitten

CAGGTTATGCCTATCGTAATCAGTAGCCCACTAGG

SDN-3

Mögliche Veränderungen durch CRISPR/Cas9

Gene können...

...an- oder ausgeschaltet...

...in ihrer Wirkung verändert...

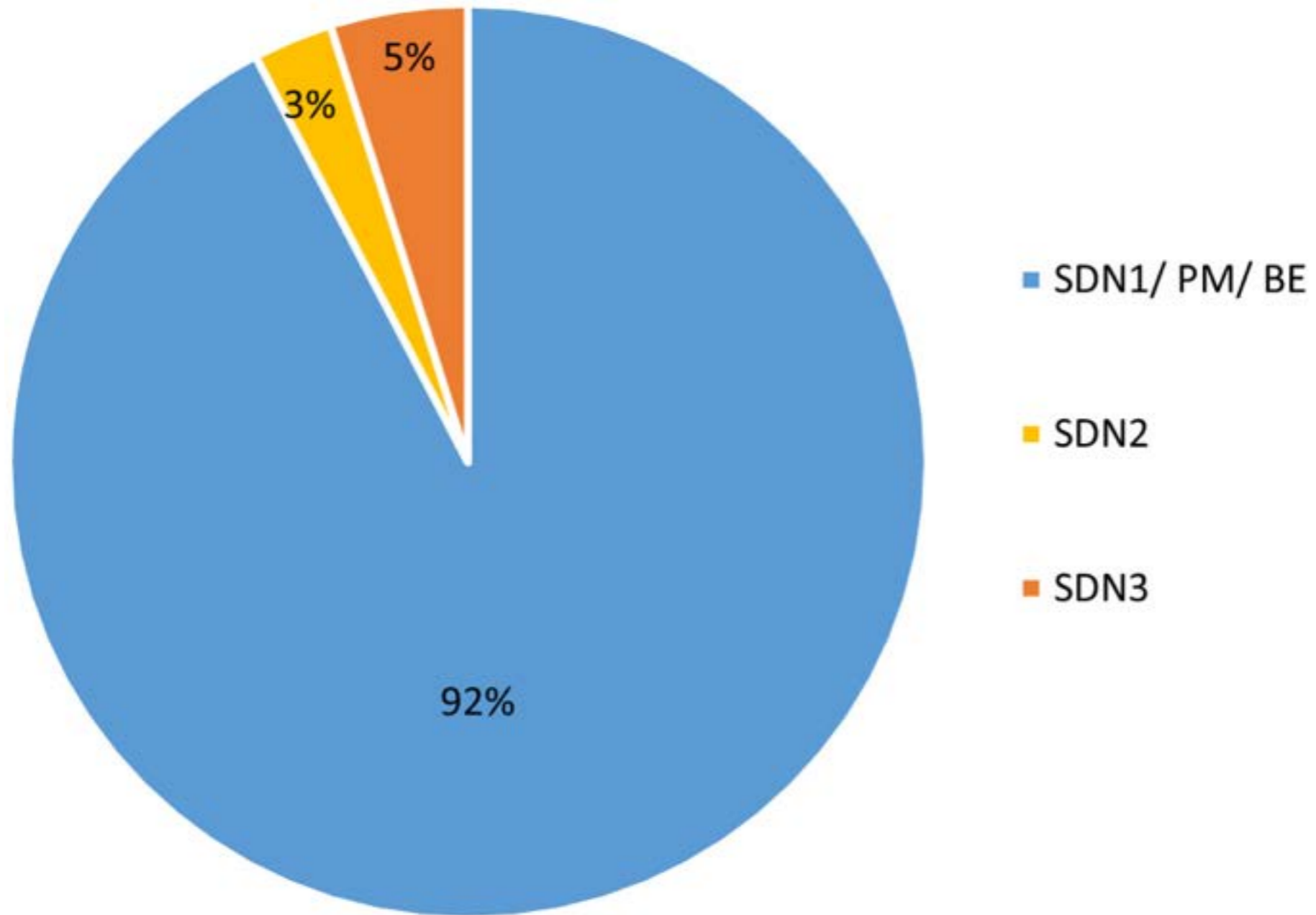
...entfernt...

...anders abgelesen...

...neu ins Erbgut eingefügt...

...werden.

Verteilung der Art der Genome Editing Anwendungen



SDN: Site-directed nuclease
PM: Point Mutation
BE: Base Editors

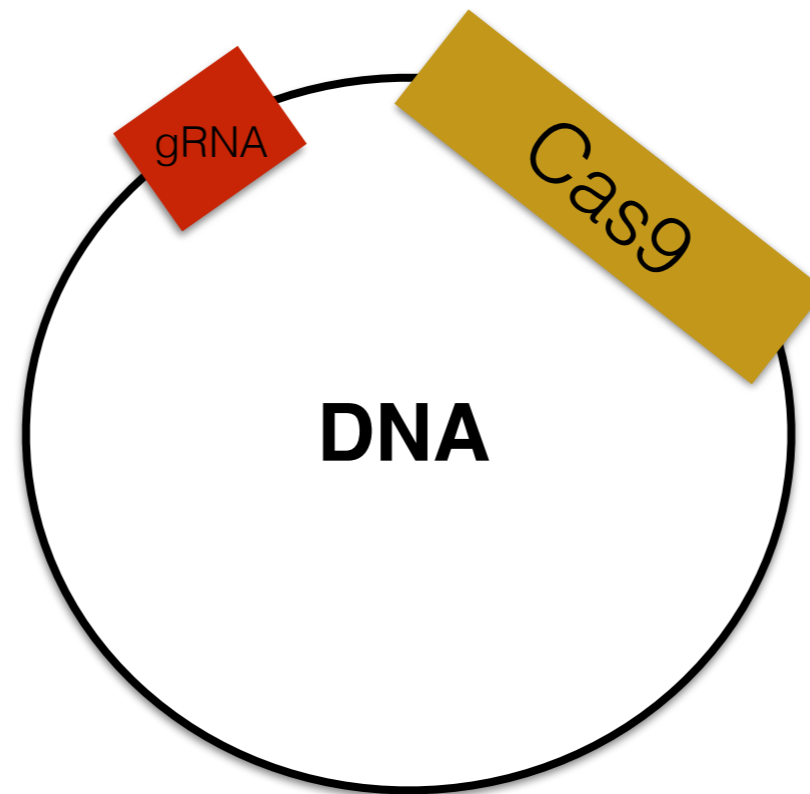
Weitere Anwendungen von CRISPR/Cas

dead Cas9-Verfahren (“stumpfe Genschere”)

- Basieren auf einer Gen-Schere, die DNA nicht mehr schneiden, aber noch binden kann.
- Kopplung an andere Enzyme
- **Base Editing**: Enzymatische Umwandlung einer Base in eine andere (C-T, G-A, A-G and T-C)
bisher nicht möglich: C-A, C-G, G-C, G-T, A-C, A-T, T-A and T-G

Wie kommt CRISPR/Cas in die Zellen/Pflanzen?

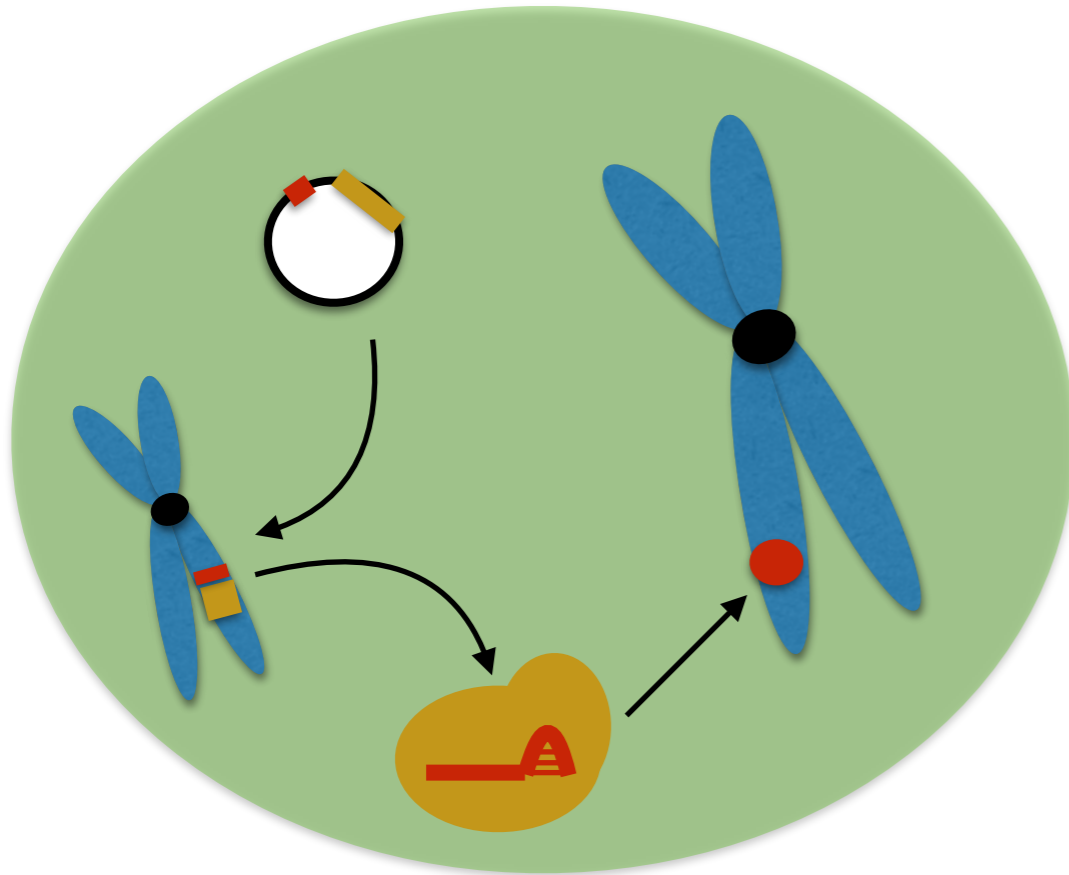
CRISPR/Cas wird überwiegend in Form von DNA eingebracht



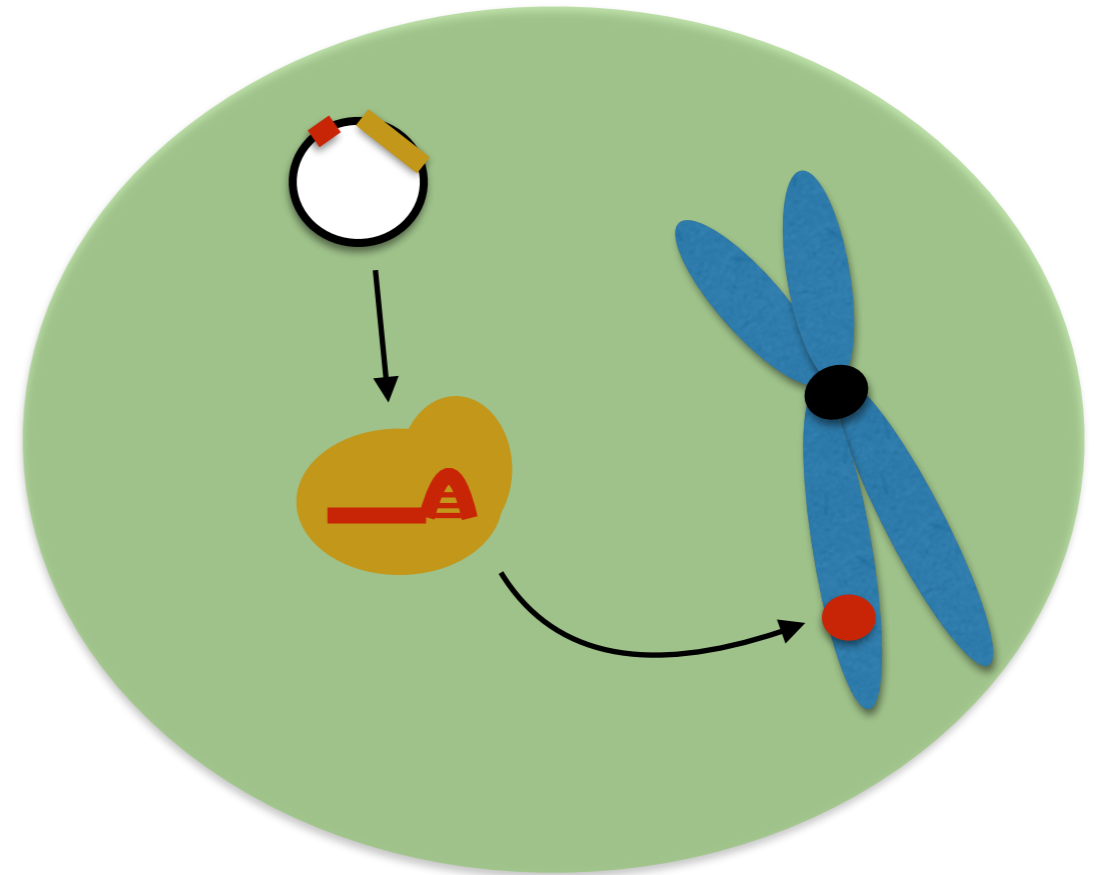
Die alten Gentechnik-Verfahren werden verwendet, um die DNA in die Zellen zu bringen:

- *Agrobacterium tumefaciens*
- Partikel Beschuss (physisch)
- PEG (chemisch)

Unterschiedliche Wirkungsweisen der Genscheren



Die CRISPR/Cas DNA wird in das Erbgut eingebaut
dann erst wird die Genschere gebildet
Genschere wird immer wieder gebildet

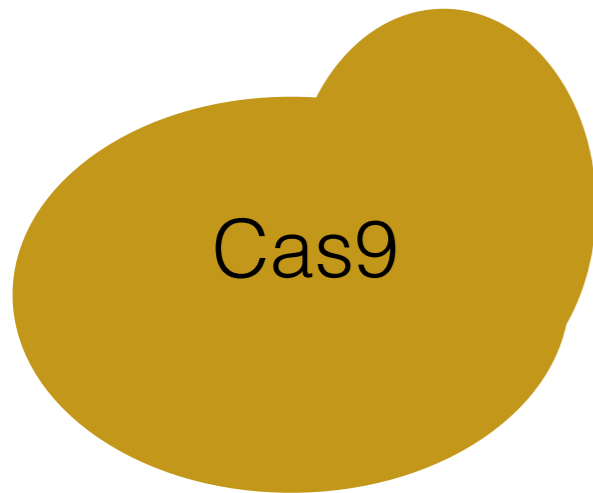


- Die Genschere wird nur vorübergehend gebildet
- DNA der Genschere wird nach gewisser Zeit abgebaut

Wird im Moment am häufigsten gemacht. Anfälliger für Off-Target Effekte!

Alternative CRISPR/Cas in die pflanz. Zellen einzubringen

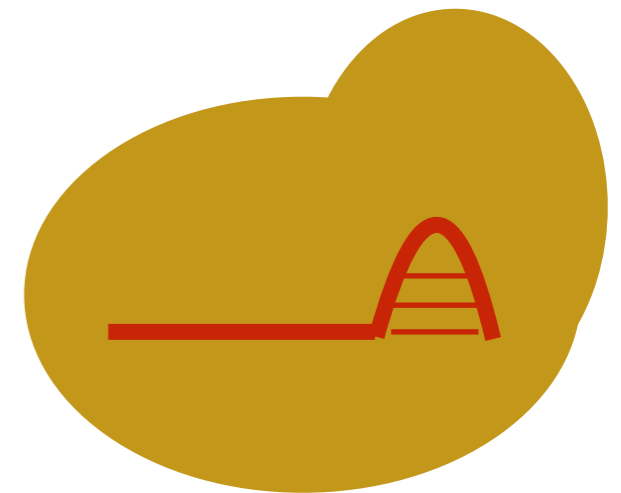
Protein



+

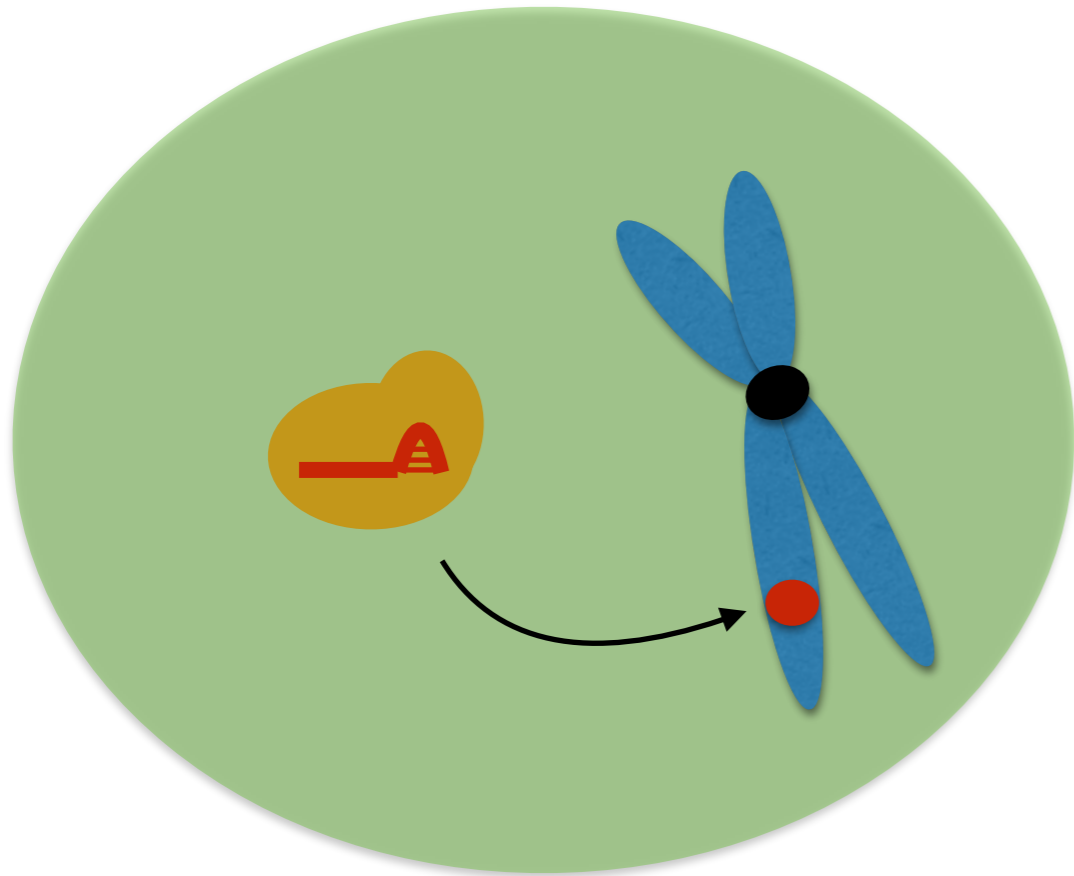


RNPs



- Partikel Beschuss (physisch)
- PEG (chemisch)

Unterschiedliche Wirkungsweisen der Genscheren



- Die fertige Genschere wird in die Zelle eingebracht
- Genscheren wirken direkt nach dem Einbringen
- Genscheren werden nach gewisser Zeit abgebaut