

# Ungewollte Nebeneffekte von CRISPR/Cas

## Welche Nebeneffekte sind bisher bekannt?

### **Off-target Effekte:**

CRISPR/Cas kann an der falschen Stelle des Erbguts schneiden.

- Veränderungen an ungewollten Bereichen des Genoms zusätzlich zur Zielsequenz
- gewisse Toleranz von Cas-Enzymen gegenüber Fehlpaarungen zwischen DNA und der gRNA
- abhängig von mehreren Faktoren: Design der gRNA, Konzentration der Nuklease
- Genetische Varianz in Individuen kann zu unvorhergesehen Off-Target Bereichen führen (SNPs)
- Problem: Unterscheidung von Off-Target Effekten - Genetische Varianten?

# Off-target Effekte von CRISPR/Cas9

Modrzejewski et al. *Environ Evid* (2019) 8:27  
<https://doi.org/10.1186/s13750-019-0171-5>


Environmental Evidence

**SYSTEMATIC MAP**

**Open Access**

What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map



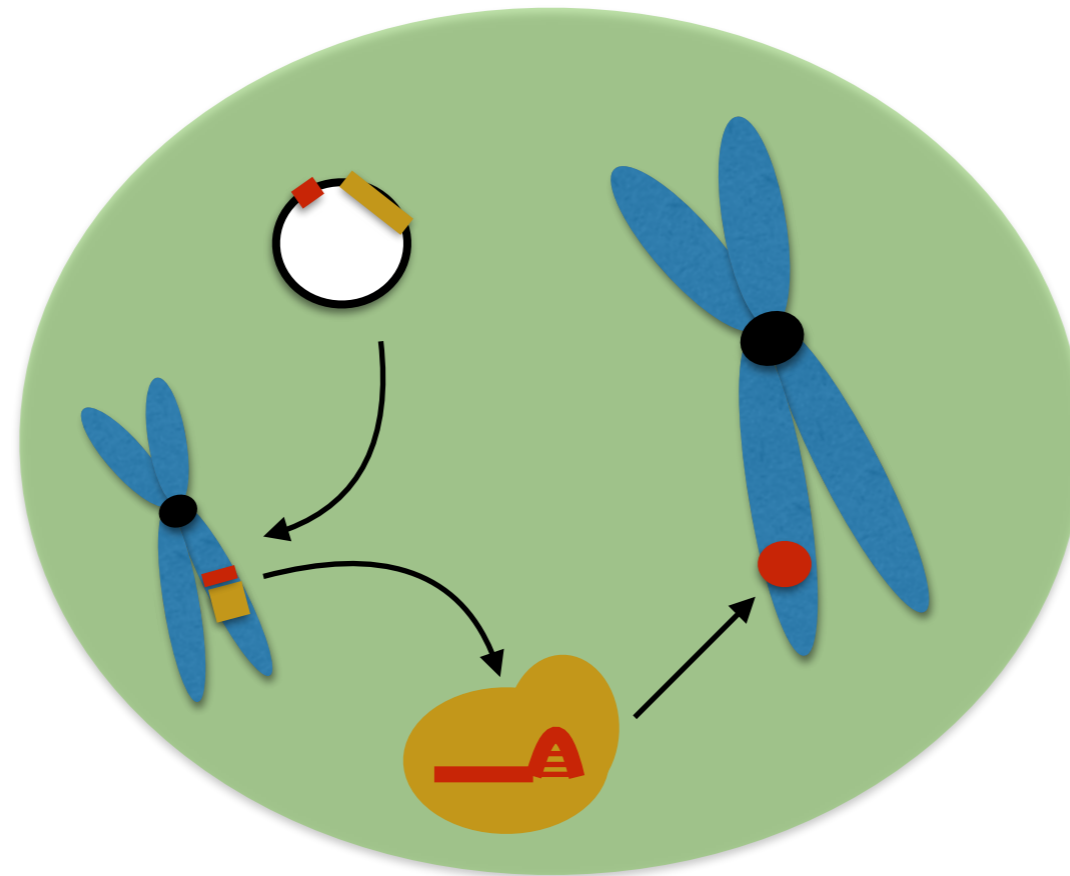
Dominik Modrzejewski<sup>\*</sup> , Frank Hartung, Thorben Sprink, Dörthe Krause, Christian Kohl and Ralf Wilhelm

## Off-target Effekte (OTEs) von CRISPR/Cas9

Es werden vor allem **voreingenommene** Verfahren (PCR-Sequenzierung) verwendet, die an ausgewählten Stellen des Erbguts nach OTEs suchen.

Wenige Studien verwenden **unvoreingenommenen** Methoden (Whole genome sequencing, WGS) um das Erbgut uneingeschränkt nach dem Auftreten von OTEs zu untersuchen.

Kontinuierliche Bildung der Genscheren erhöhen das Auftreten von OTEs



1. Die CRISPR/Cas DNA wird in das Erbgut eingebaut
2. dauerhafte Bildung der Genschere

Wichtig für die Effizienz ist die Menge an eingebrachter Genschere: Optimales Gleichgewicht zwischen den gewünschten Veränderungen an der Zielsequenz und dem Auftreten von Off-target Effekten

## Welche Nebeneffekte sind bisher bekannt?

### **Off-target Effekte:**

CRISPR/Cas kann an der falschen Stelle des Erbguts schneiden.

### **On-target Effekte:**

Es können ungewollte DNA-Fragmente sowohl in der Zielsequenz als auch in Nicht-Zielbereichen eingebaut werden. (z.B. Fragmente der DNA der Genschiere)

Liang, Z. et al. (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 8, 14261

Norris, A. L., Lee, S. S., Greenlees, K. J., Tadesse, D. A., Miller, M. F., & Lombardi, H. A. (2020). Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat Biotechnol*, 38(2), 163-164. doi:10.1038/s41587-019-0394-6

### **Bildung veränderter Proteine:**

Durch die gewünschte Veränderung am Erbgut können Proteine entstehen, die in ihrer Struktur ungewollt verändert sind. Das kann nur auf RNA-Ebene nachgewiesen werden.

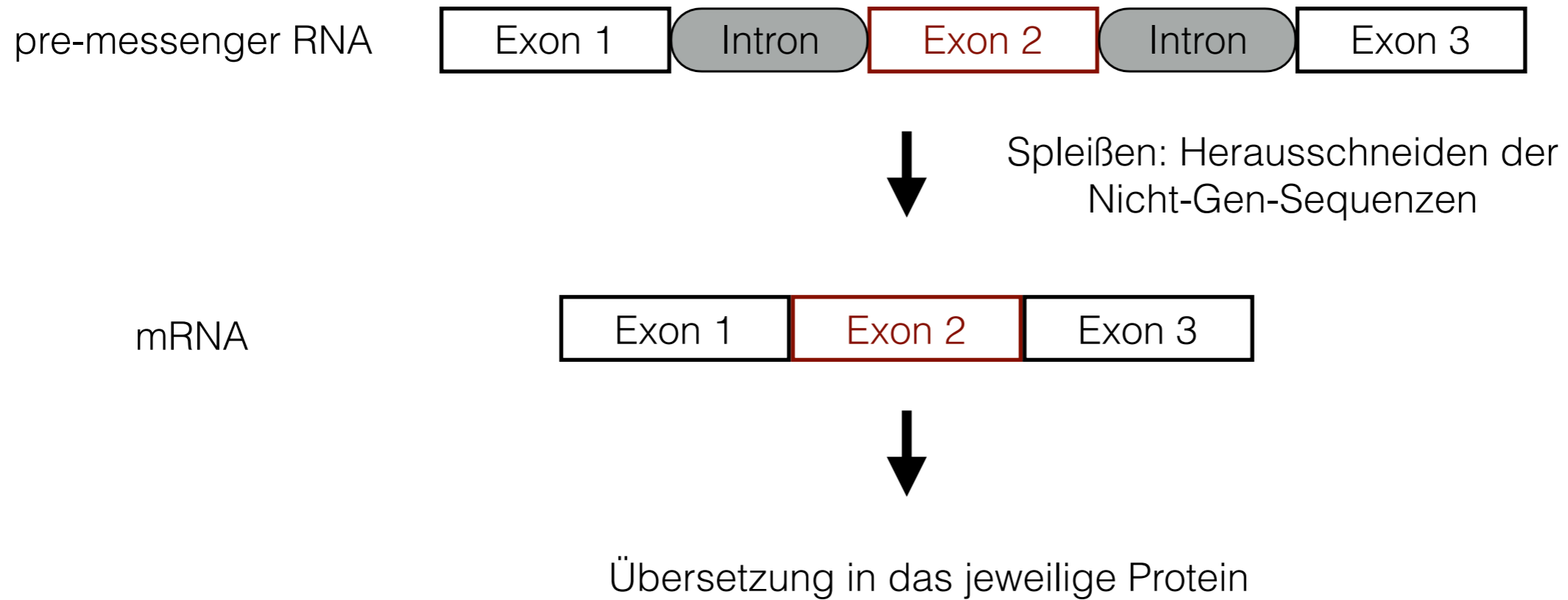
Tuladhar, R., Yeu, Y., Tyler Piazza, J., Tan, Z., Rene Clemenceau, J., Wu, X., . . . Lum, L. (2019). CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat Commun*, 10(1), 4056. doi:10.1038/s41467-019-12028-5

### **Weitreichende Umgestaltung des Erbguts:**

Große Deletionen und Umkehrungen (Inversionen) im Bereich der Zielsequenz wurden in humanen Zellen nachgewiesen.

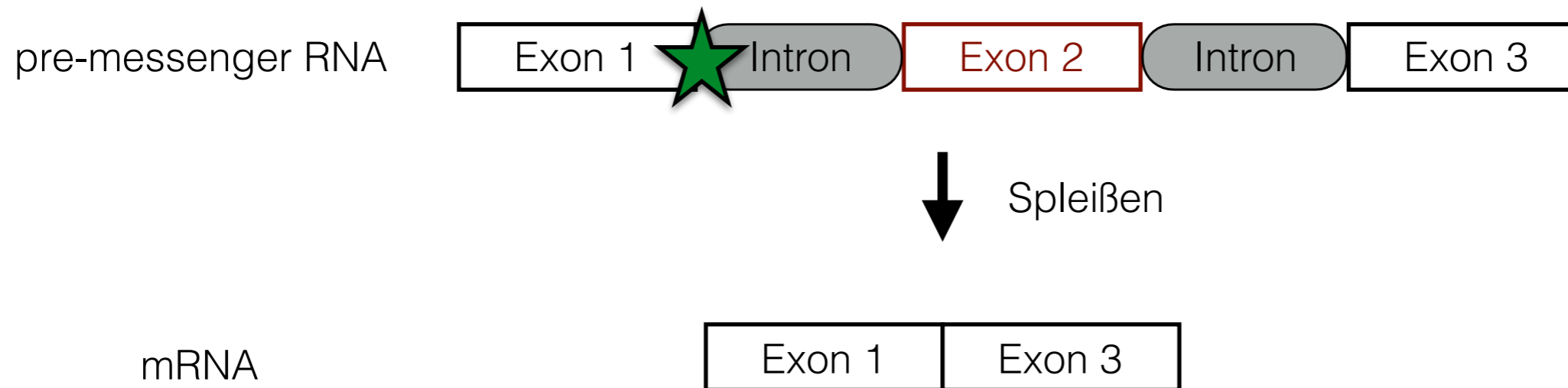
Kosicki, M. et al. (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 36 (8), 765-771.

# Exon Skipping



Spleißen entfernt Gen-Bereiche, die nicht mit in das jeweilige Protein übersetzt werden.

# CRISPR/Cas kann Exon Skipping verursachen



Das Protein kann seine Funktion zum Teil oder ggf auch gar nicht mehr ausführen.

Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. Kapahnke, et al, Cells (2016).

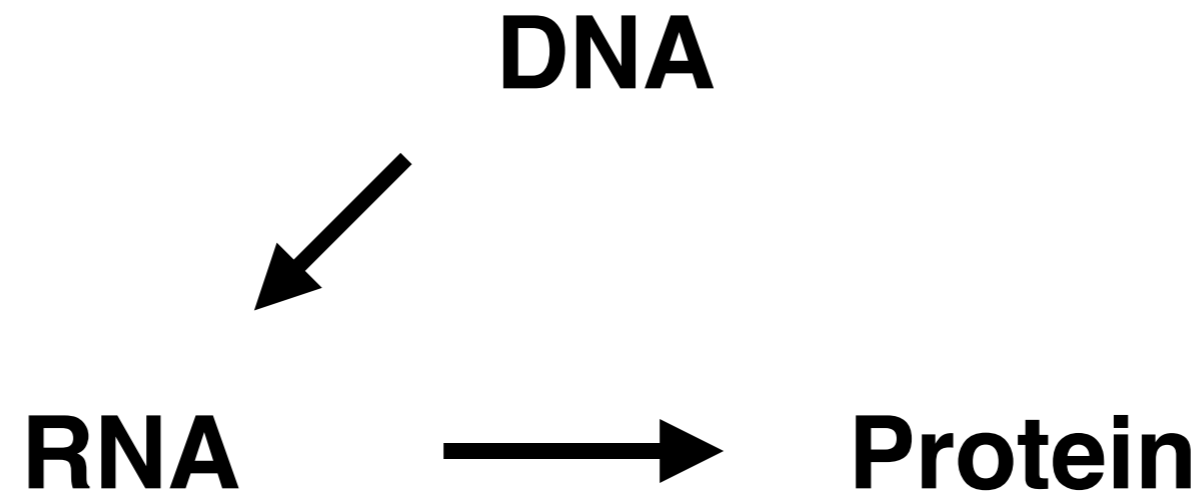
Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. Lalonde, et al. PLoS One (2017).

CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. Mou, et al. Genome Biol (2017).



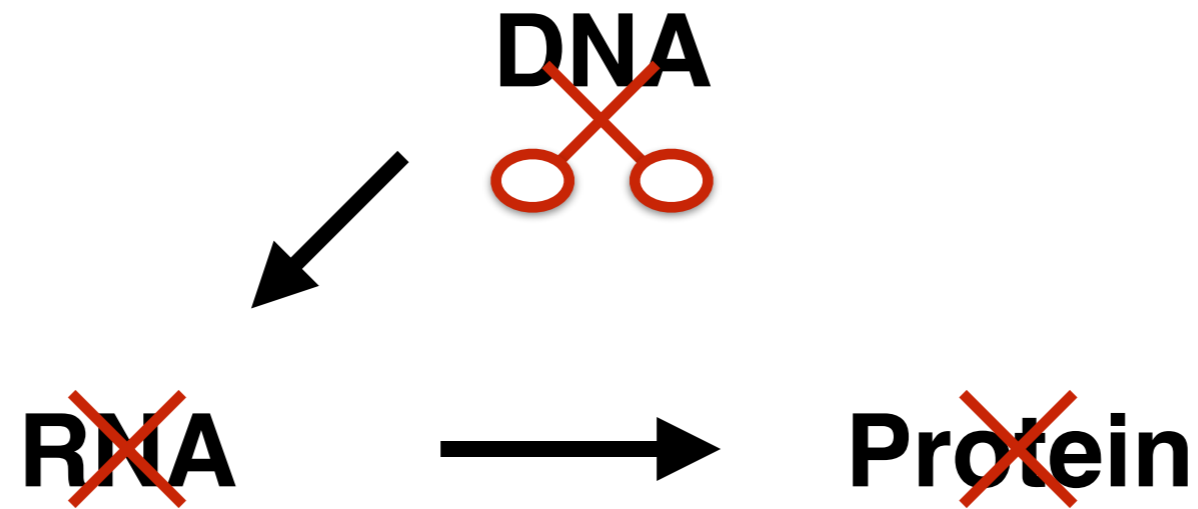
Auch gewollte Veränderungen können ungewollte Nebeneffekte haben

# Zentrales Dogma der Molekularbiologie



Informationsfluss zwischen Biomolekülen

# Zentrales Dogma der Molekularbiologie



Informationsfluss zwischen Biomolekülen

**Aber ist das in einem biologischen System wirklich so einfach?**

Pflanze

⋮

## Kommunikation

### Pflanzen (über Luft/Boden: VOCs, Phytohormone)

- Warnung anderer Pflanzen vor Schädlingen
- Schutz vor Insektenbefall
- zw benachbarten Pflanzen

(z.B. Aufnahme von Stress-Signalen: Einfluß auf das Wurzelwachstum, “Konkurrenz um Ressourcen”)

### Tiere (optisch, chemisch)

- Bestäubung
- Anlocken bei Schädlingsbefall

### Pilze (Mykorrhiza)

- Austausch von Nährstoffen  
(Stickstoff, Phosphor - Kohlenstoffverbindungen)
- unterirdische Vernetzung

### Bakterien (Mikrobiom)

- in der Rhizosphäre: Nährstoffaustausch  
(Stickstoff)
- “externes Immunsystem”

# Folgen für die pflanzliche Kommunikation durch Eingriffe in Stoffwechselwege durch Genome Editing

Für die Pflanze selber:

- Einfluss auf die Entwicklung
- Veränderung der Inhaltsstoffe
- veränderte Reaktion auf Stress (Herbivorie, Pathogene, Trockenheit, hohe/niedrige Salzkonzentration, Temperatur)
- verringerte/erhöhte Fitness
- Einfluss auf die circadiane Rhythmik

Für das assoziierte Ökosystem:

- veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms
- Abwehrmechanismen
- Bestäuber
- Eingriff in die Nahrungskette
- toxische Effekte

# Referenzen

Modrzejewski, D., Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., Wilhelm R. . (2019). What is the available evidence for the range of applications of genome editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. . *Environ Evid.* doi:<https://doi.org/10.1186/s13750-019-0171-5>

Liang, Z. et al. (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 8, 14261

Norris, A. L., Lee, S. S., Greenlees, K. J., Tadesse, D. A., Miller, M. F., & Lombardi, H. A. (2020). Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat Biotechnol*, 38(2), 163-164. doi:[10.1038/s41587-019-0394-6](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0394-6)

Tuladhar, R., Yeu, Y., Tyler Piazza, J., Tan, Z., Rene Clemenceau, J., Wu, X., . . . Lum, L. (2019). CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat Commun*, 10(1), 4056. doi:[10.1038/s41467-019-12028-5](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12028-5)

Kosicki, M. et al. (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 36 (8), 765-771.

Kapahnke, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016). Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. *Cells*, 5(4). doi:[10.3390/cells5040045](https://doi.org/10.3390/cells5040045)

Lalonde, S., Stone, O. A., Lessard, S., Lavertu, A., Desjardins, J., Beaudoin, M., . . . Lettre, G. (2017). Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PLoS One*, 12(6), e0178700. doi:[10.1371/journal.pone.0178700](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178700)

Mou, H., Smith, J. L., Peng, L., Yin, H., Moore, J., Zhang, X. O., . . . Xue, W. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol*, 18(1), 108. doi:[10.1186/s13059-017-1237-8](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1237-8)