

Gentechnik/ Genom-Editierung

Assoc. Prof. Mag. Dr. Helmut Dolznig



ZENTRUM FÜR PATHOBIOCHEMIE
UND GENETIK
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN
Institut für Medizinische Genetik

Dezember 2018 ÖAK Kurs

Chinese researcher claims first gene-edited babies

By MARILYNN MARCHIONE November 26, 2018



He Jiankui is reflected in a glass panel as he works at a computer at a laboratory in Shenzhen in China. (AP Photo/Mark Schiefelbein)

Warum Gentechnik?

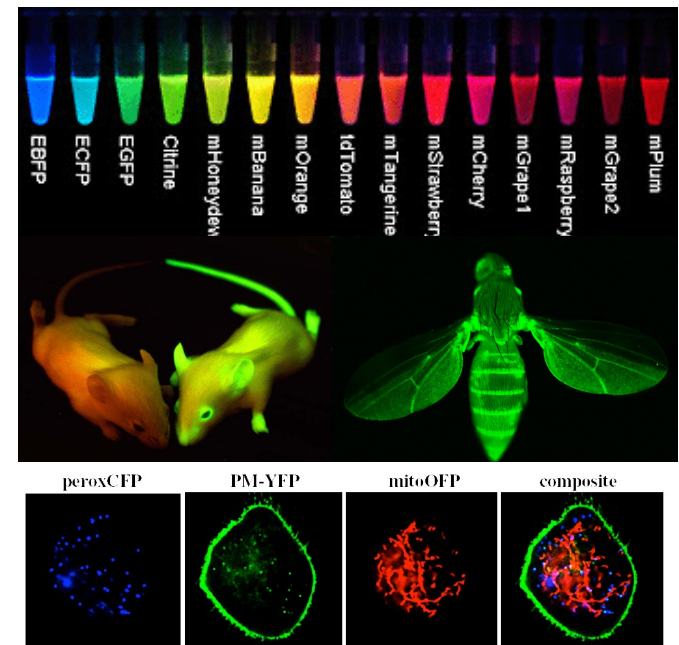
- Als molekularbiologisches Hilfsmittel (*Klonierung*)
- Produktion von rekombinanten Proteinen (*Biotechnologie*)
- Untersuchung der Funktion von bestimmten Genen (*Forschung*)
 - in Zellen oder in ganzen Organismen
- Behebung von Mutationen (*Therapie*)

Biotechnologie

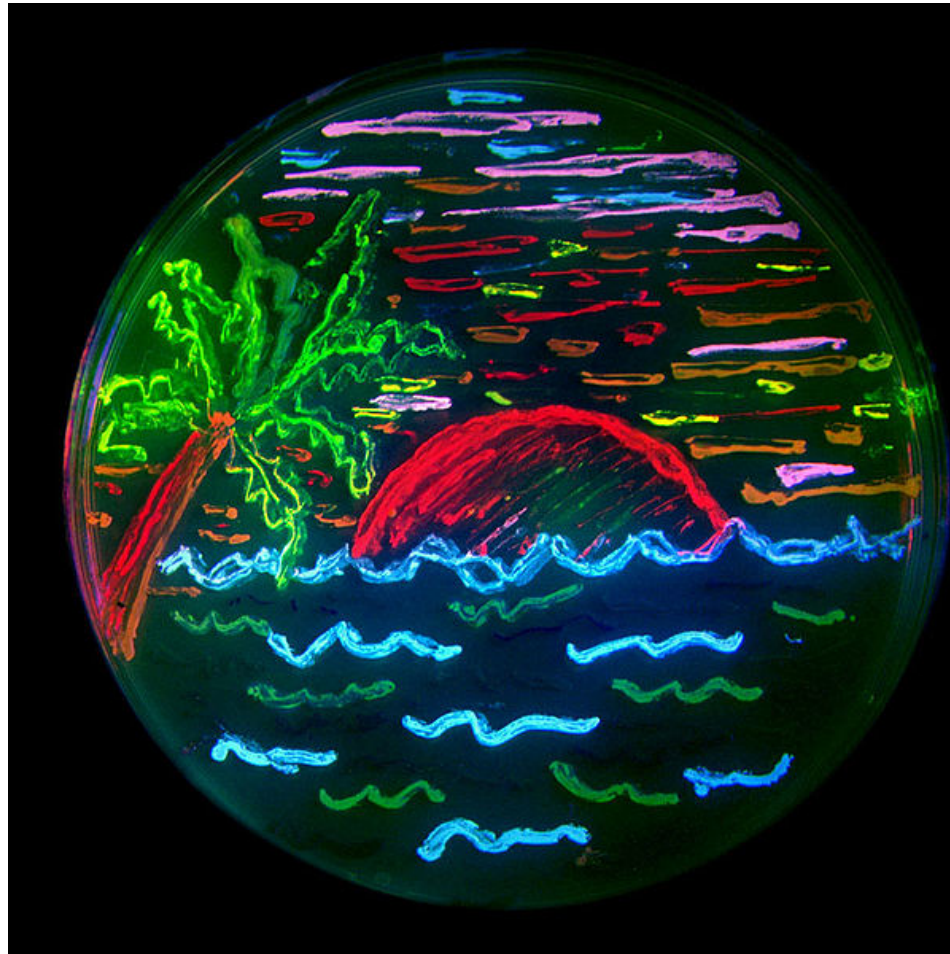
Rekombinante Proteine

Verwendung rekombinanter Proteine

- (Forschung): Biochemische Assays, Kristallografie (Strukturforschung)
- Fusionsproteine (zur leichteren Aufreinigung [TAGs]), Sichtbarmachung (FluoreszenzTAGs zB. GFP)
- Enzymproduktion
- Produktion von medizinisch relevanten Peptiden bzw Proteinen
 - Insulin, EPO



Fluoreszenzmarkierung (Bakterien)

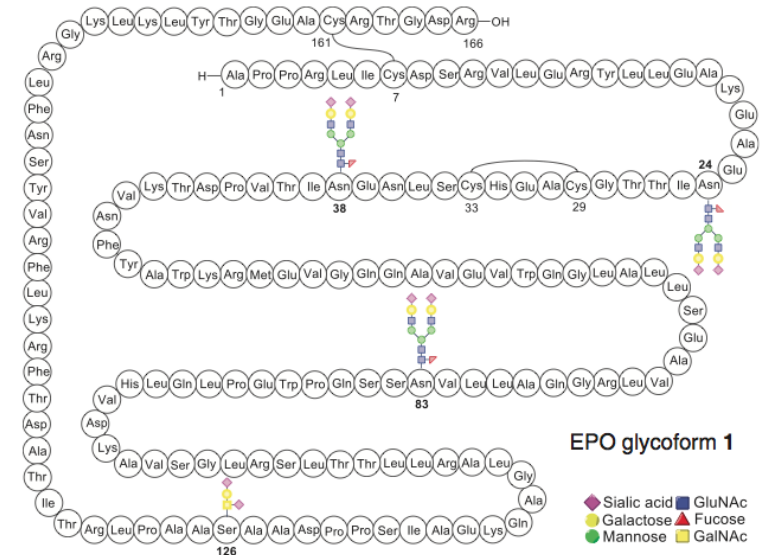


Vorteile rekombinanter Proteine

- Schnelles Wachstum der exprimierenden Zellen
- große Mengen herstellbar (Bioreaktoren)
- gleiches Ausgangsmaterial, Reproduzierbarkeit
- Leichte Aufreinigung (über Protein TAGs, Säulenchromatographie)
- Wenig (Protein) Verunreinigungen

Zellsysteme zur Produktion rekombinanter Proteine

- Bakterien: keine PTMs
- Hefen (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*): PTMs
- Insektenzellen (Baculovirus): PTMs sehr ähnlich zum Menschen
- Säugerzellen (HEK293, COS): humane PTMs

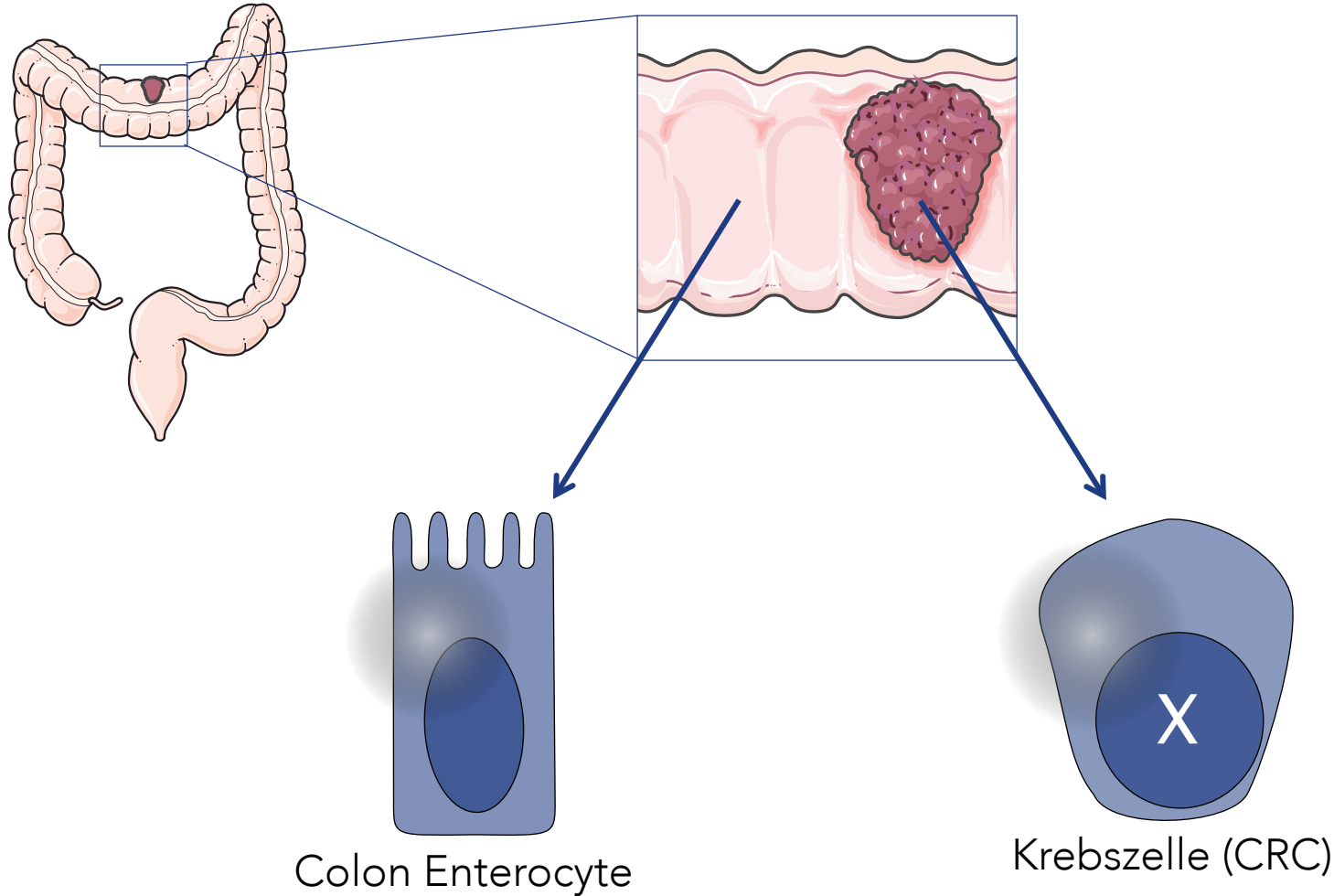


Forschung

Funktion eines oder mehrerer Gene

Was ist die Funktion eines bestimmten Gens?

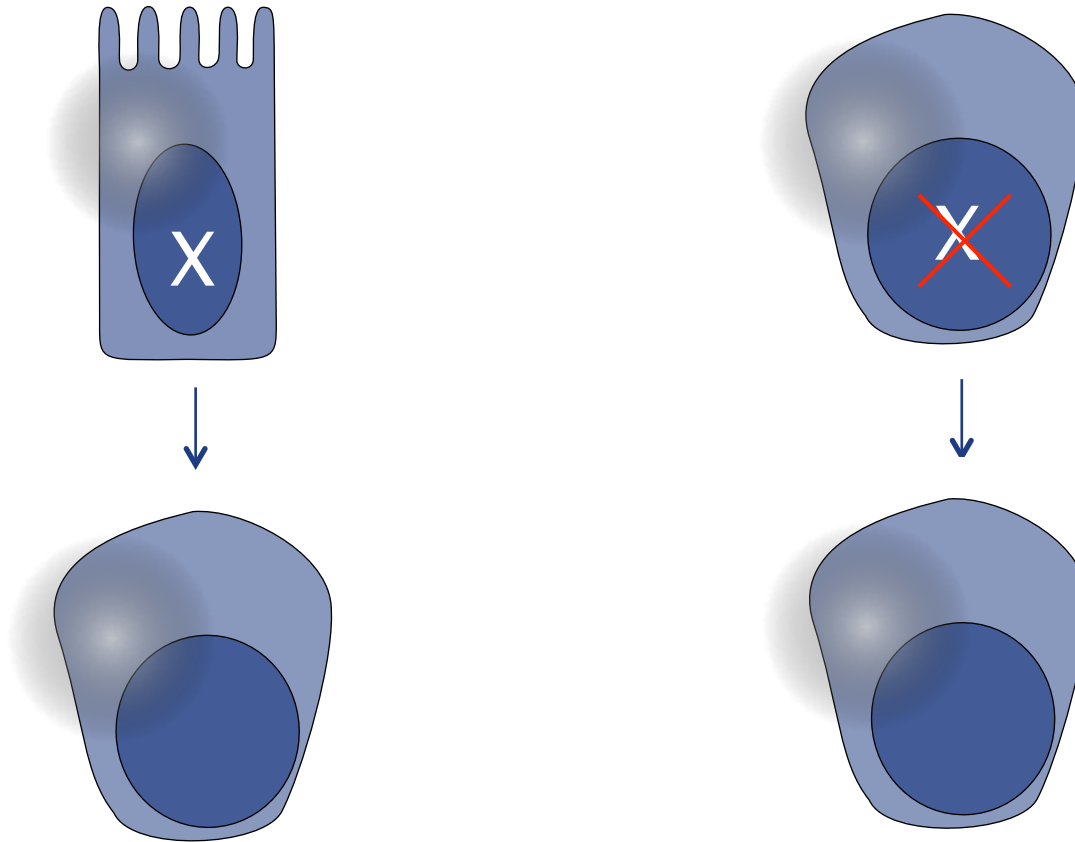
Gesund vs krank



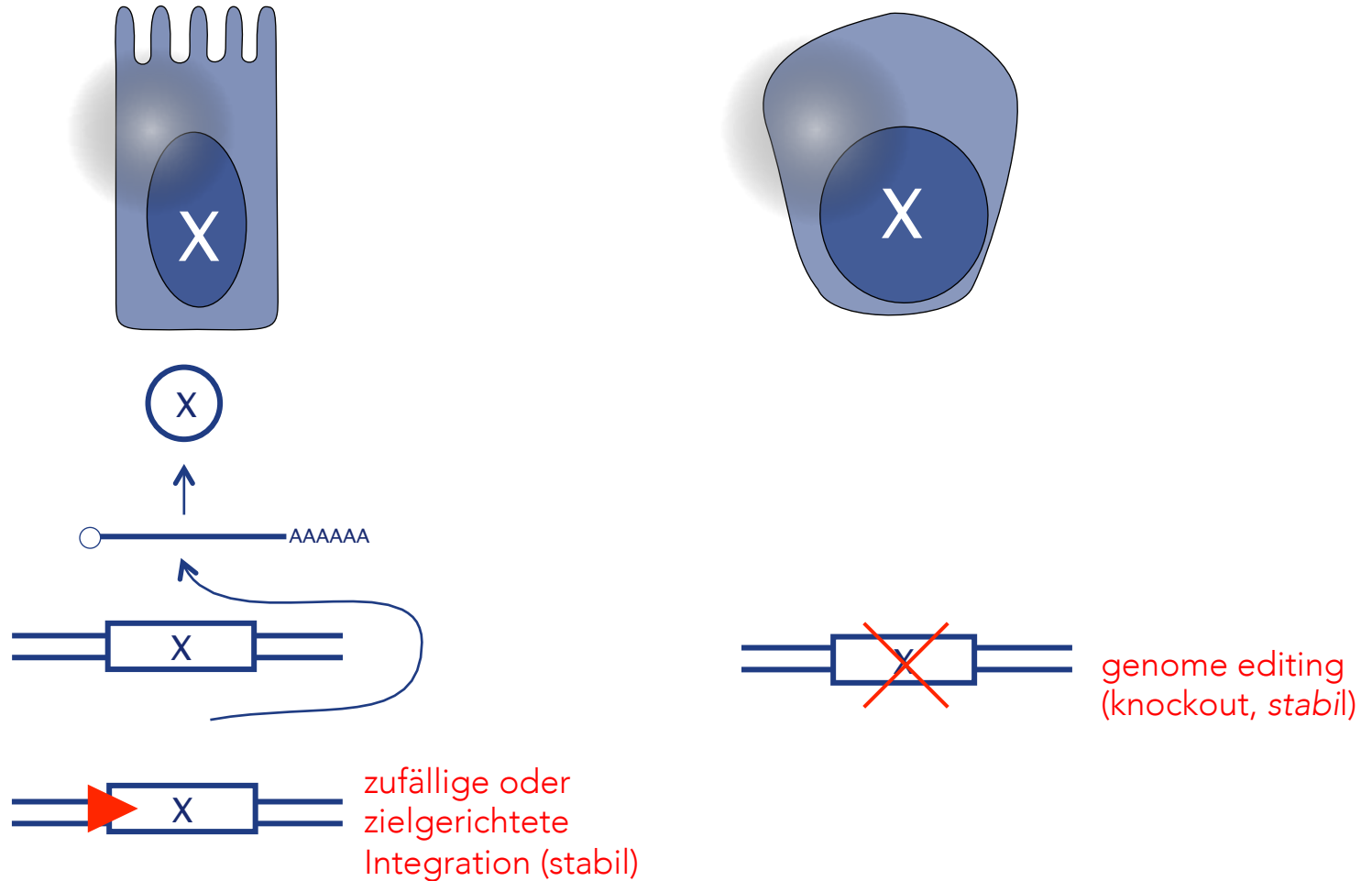
Was ist die Funktion eines bestimmten Gens?



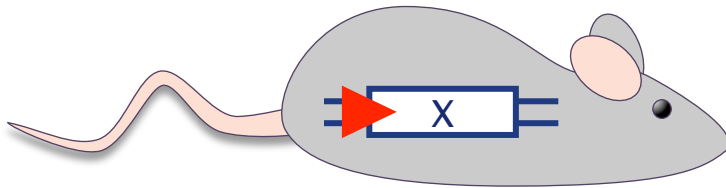
Was ist die Funktion eines bestimmten Gens?



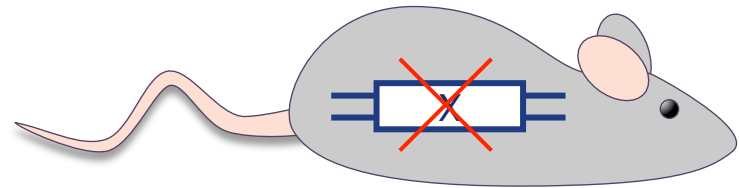
Wie schaltet man ein Gen aus oder an?



An und Ausschalten von Genen in ganzen Organismen

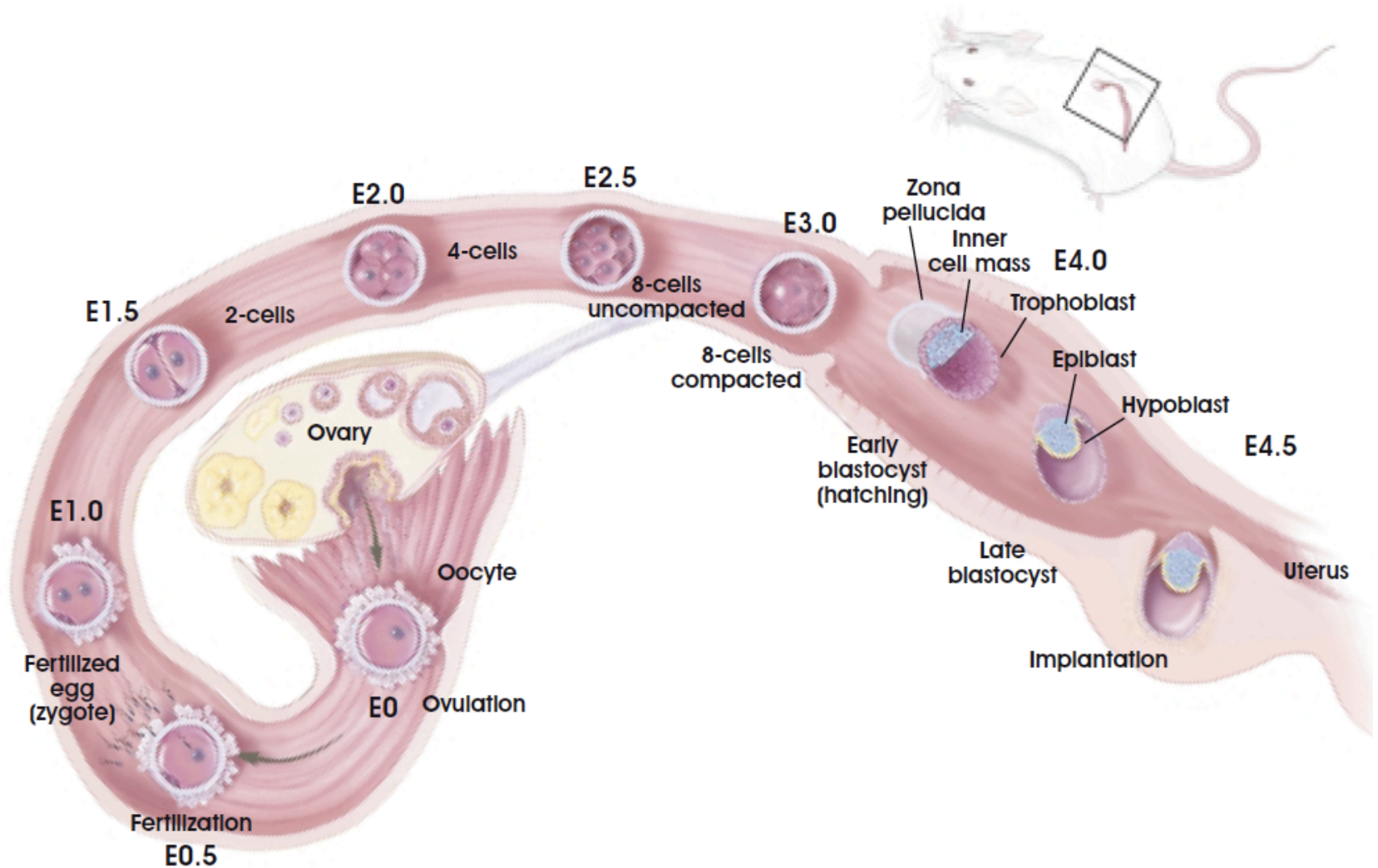


transgene Maus

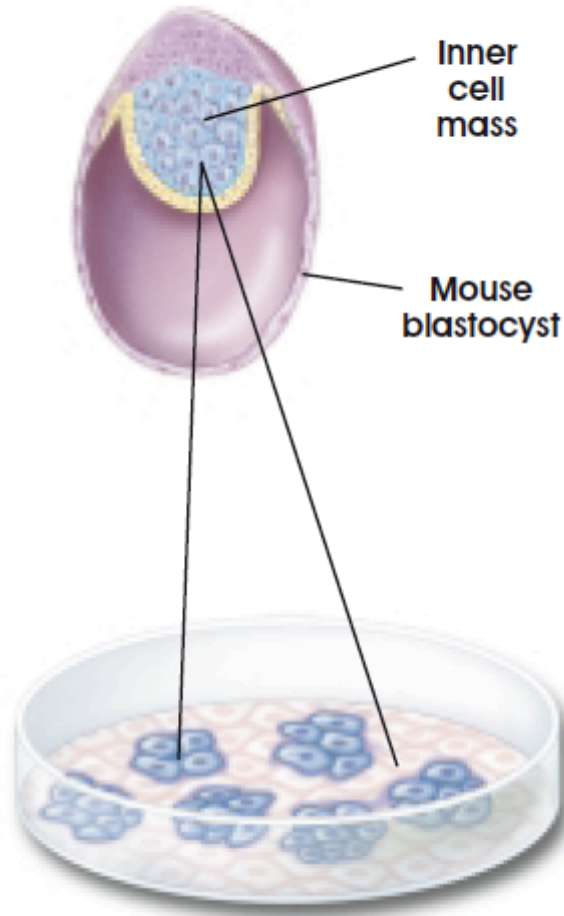


knockout (KO) Maus

Knockout Maus Basics 1



Knockout Mouse Basics 2



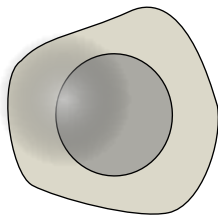
Embryonale
Stammzellen (ES)

Transfer of
stem cells
to mouse
blastocyst

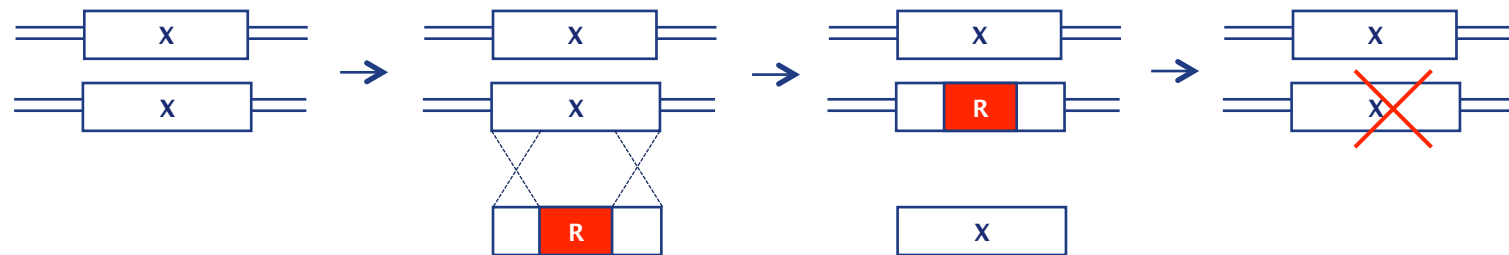
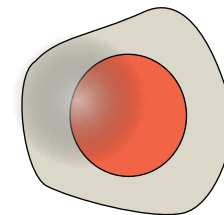
Normal
blastocyst



Knockout Mouse Basics 2

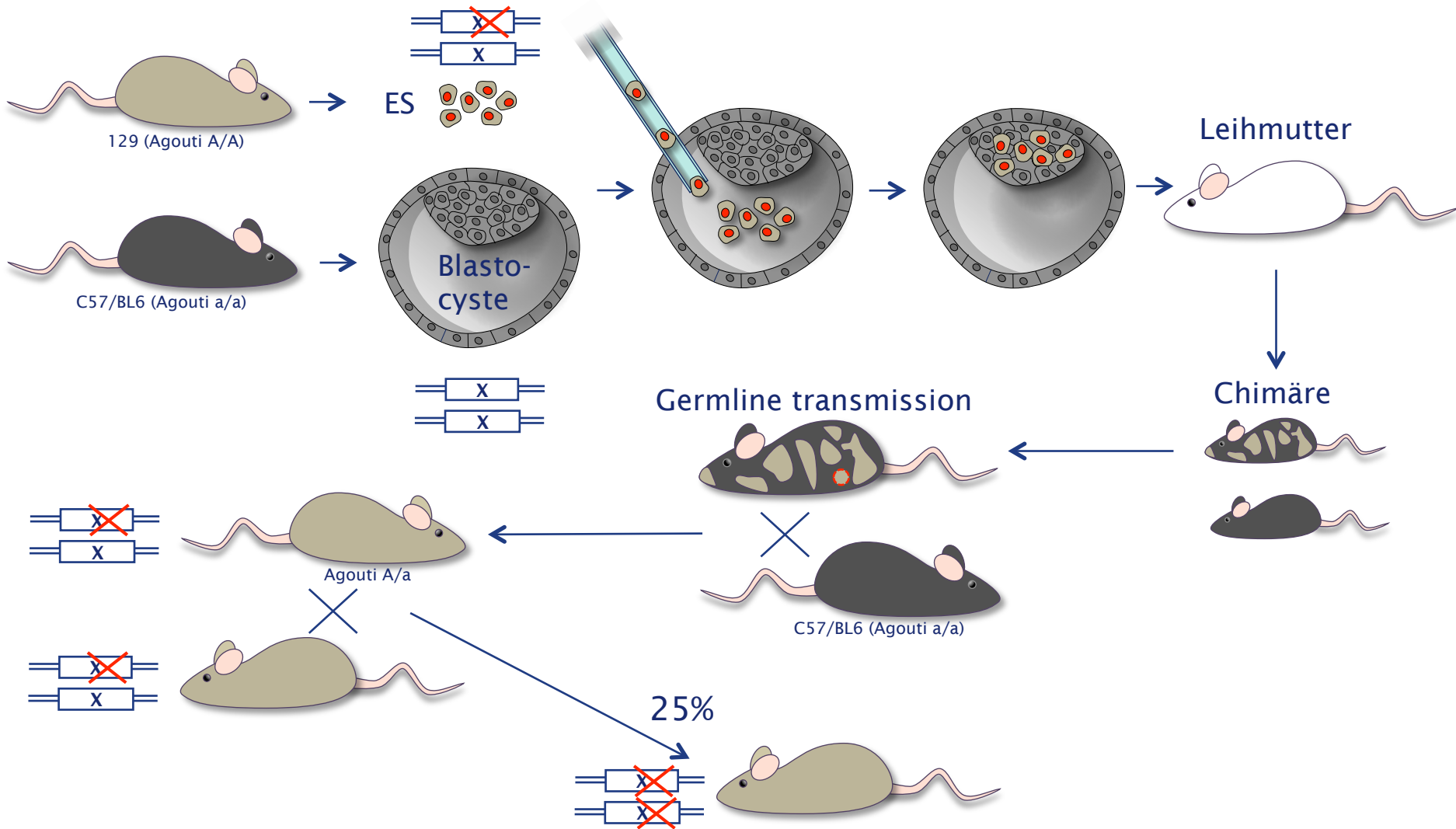


Embryonale Stammzellen (ES)



Homologe Rekombination (HR)

Knockout Maus



Genom-Editierung in einzelnen Zellen

Programmierbare Nukleasen

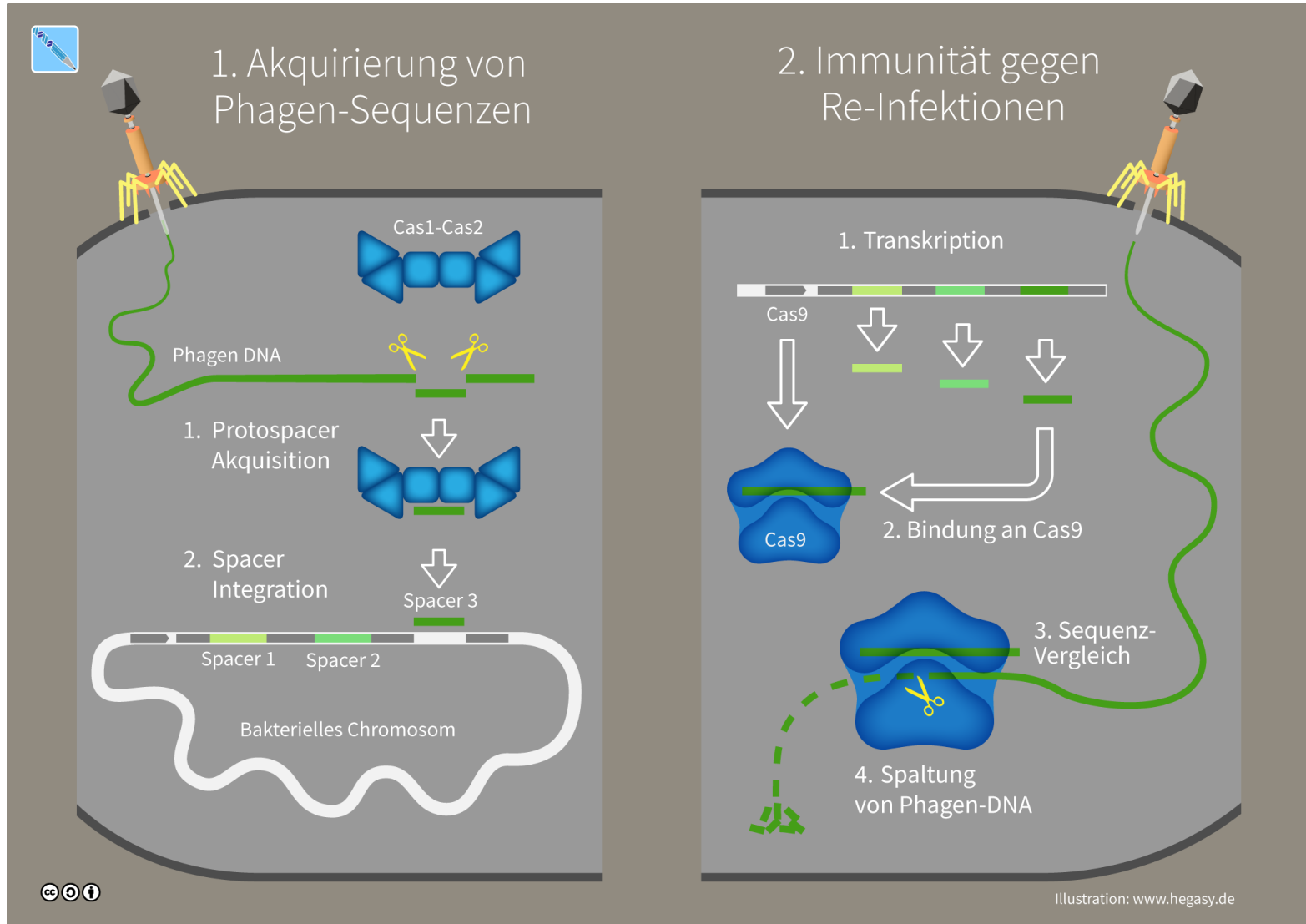
- Zinc-finger Nukleasen (ZFN)
- Transcription-activator-like effector Nukleasen (TALEN)
- clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-Cas Nukleasen

CRISPR-Cas9

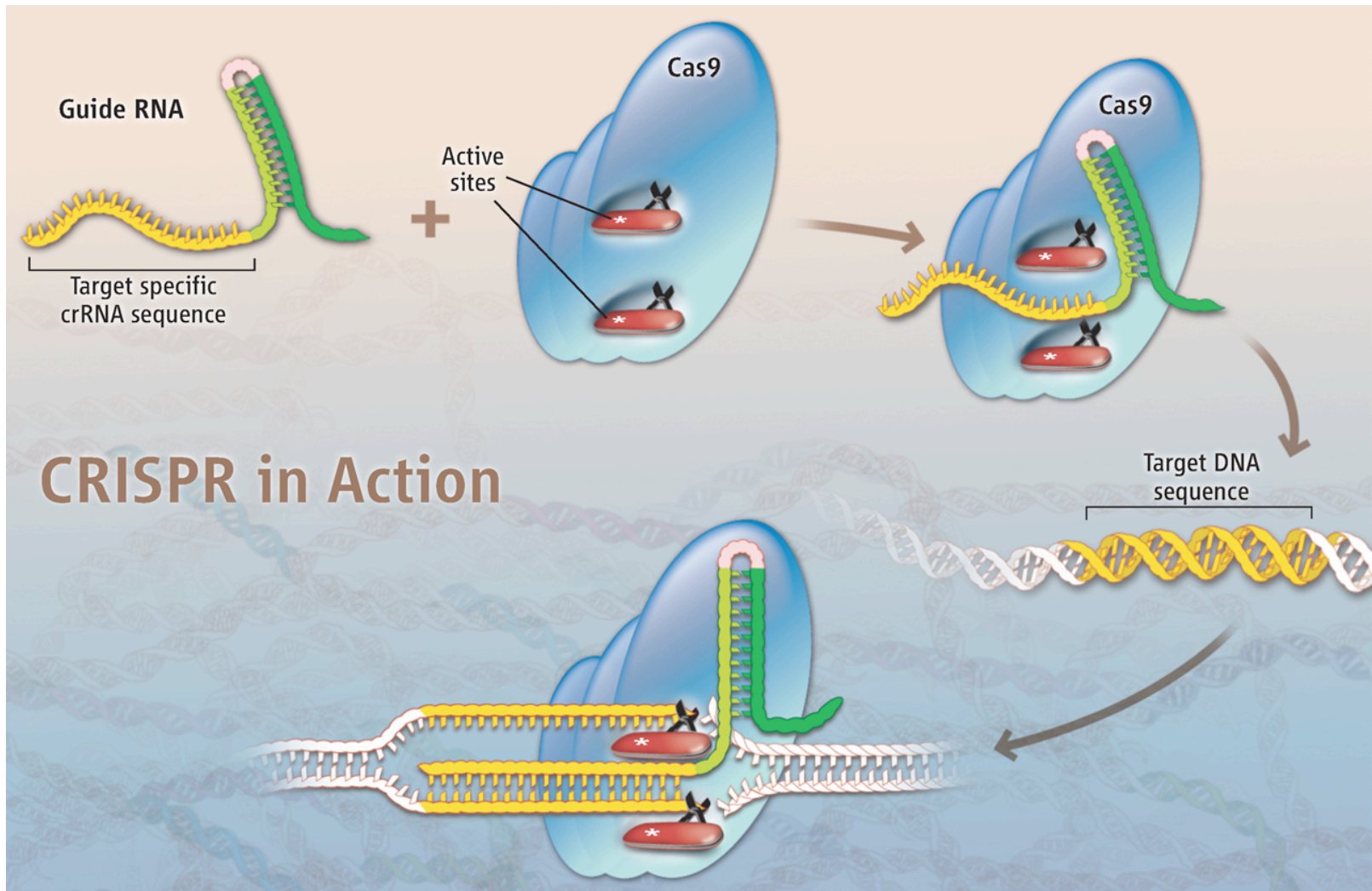
aus Bakterien (z.B. *Streptococcus pyogenes*)

- vermittelt „Immunität“ von Bakterien gegenüber Bakteriophagen oder Plasmiden
- ist eine Nuklease die als ribonukleotid Partikel (RNP) doppelstrang DANN schneiden kann
- damit kann sie die eindringende DNA von Bakteriophagen zerstückeln und hat das Bakterium gewinnt dadurch eine Form von Immunität gegenüber dieses Bakterien-Virus

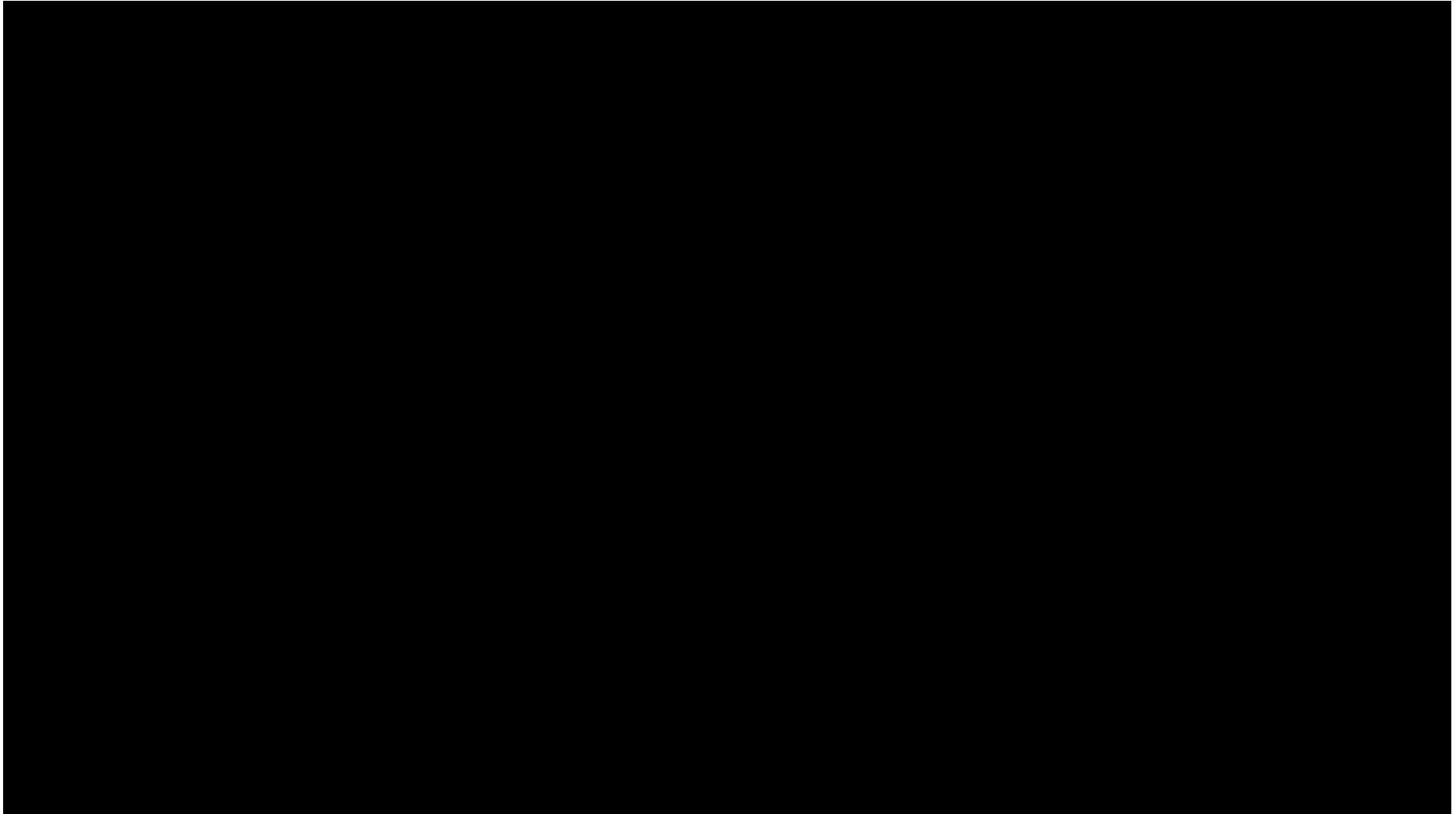
CRISPR-Cas9



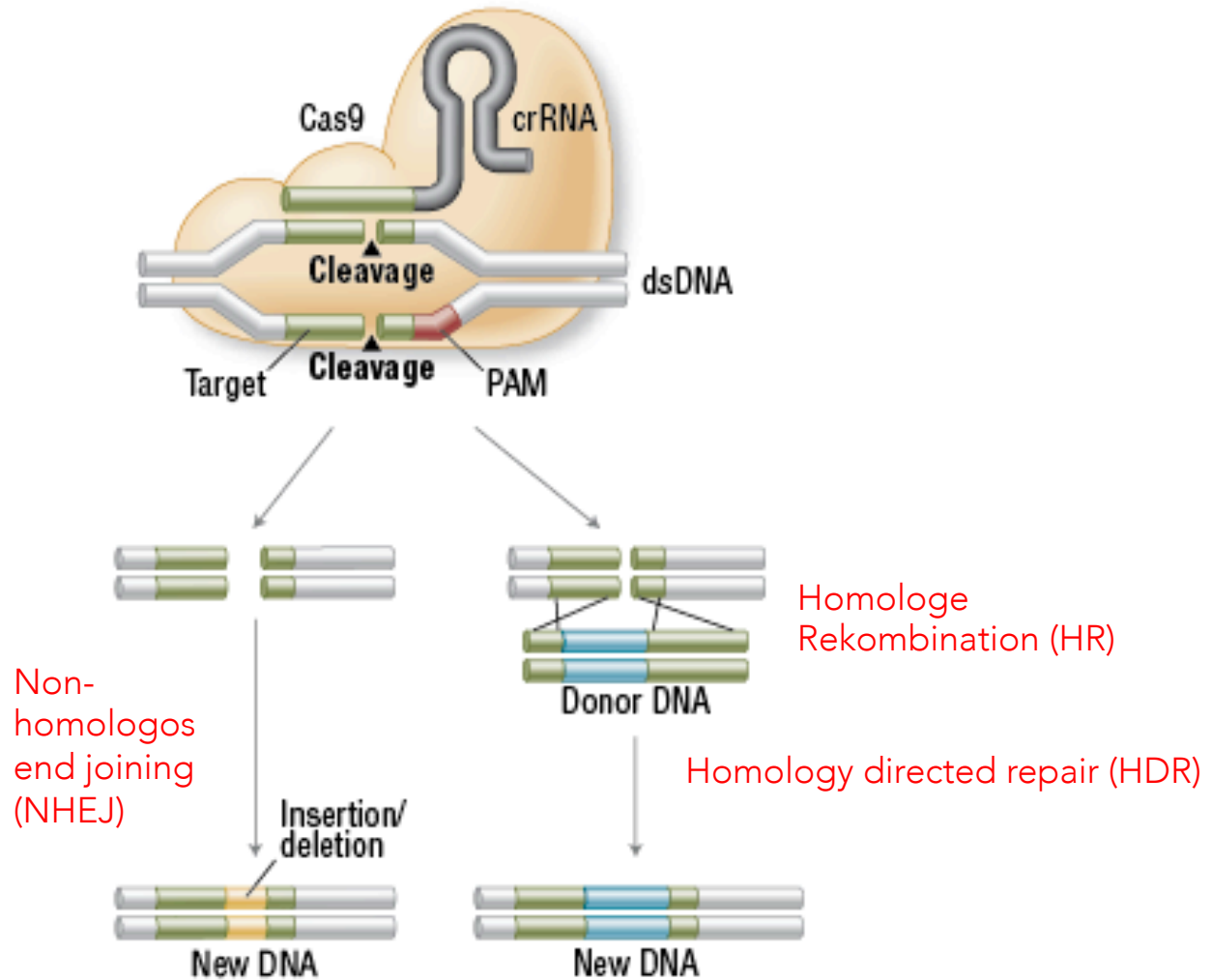
CRISPR-Cas9



CRISPR-Cas9

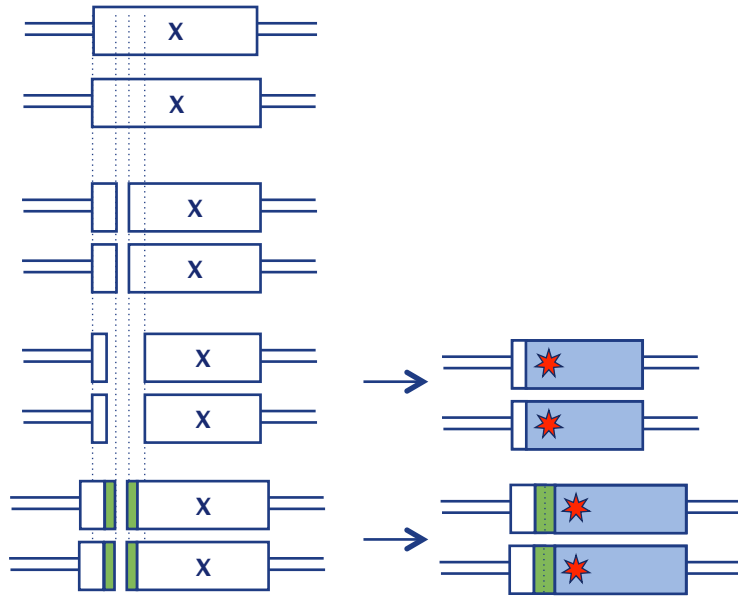


CRISPR-Cas9

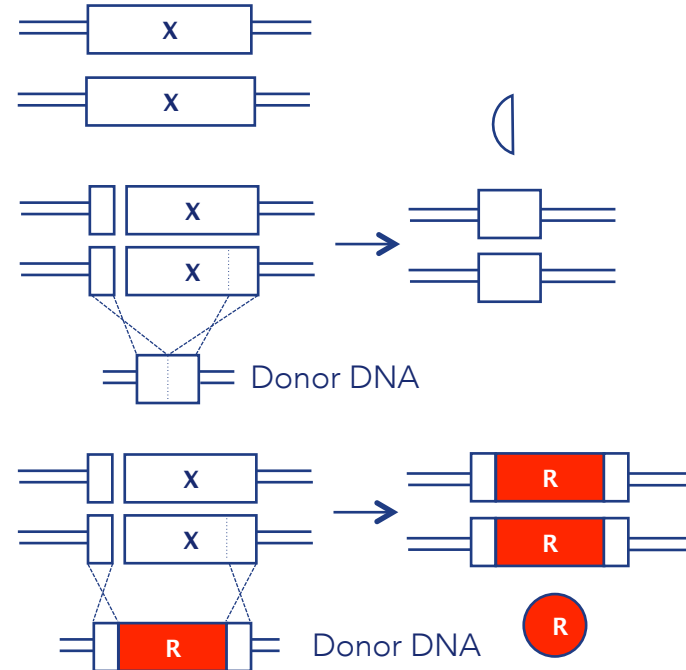


NHEJ versus HDR

NHEJ: InDel Mutationen



HDR



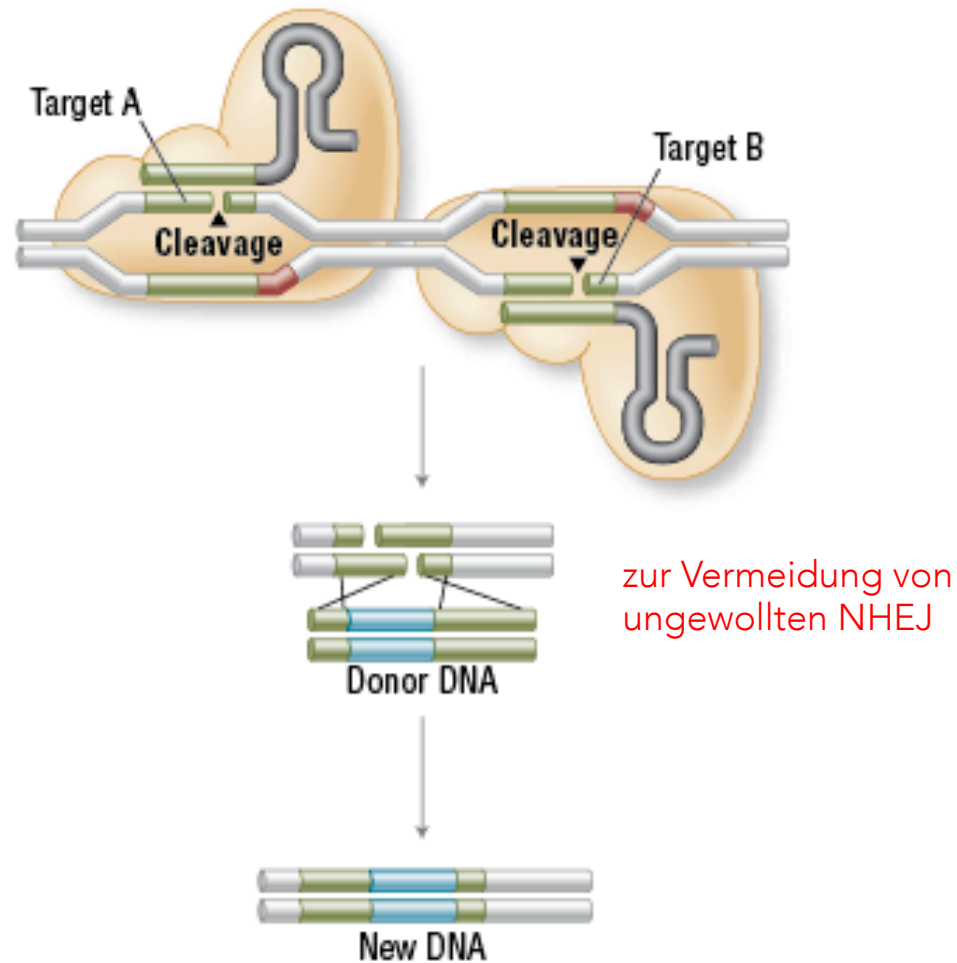
★ Stop-Codon

■ Insertion

■ geänderter Leserahmen

■ R Resistenzgen

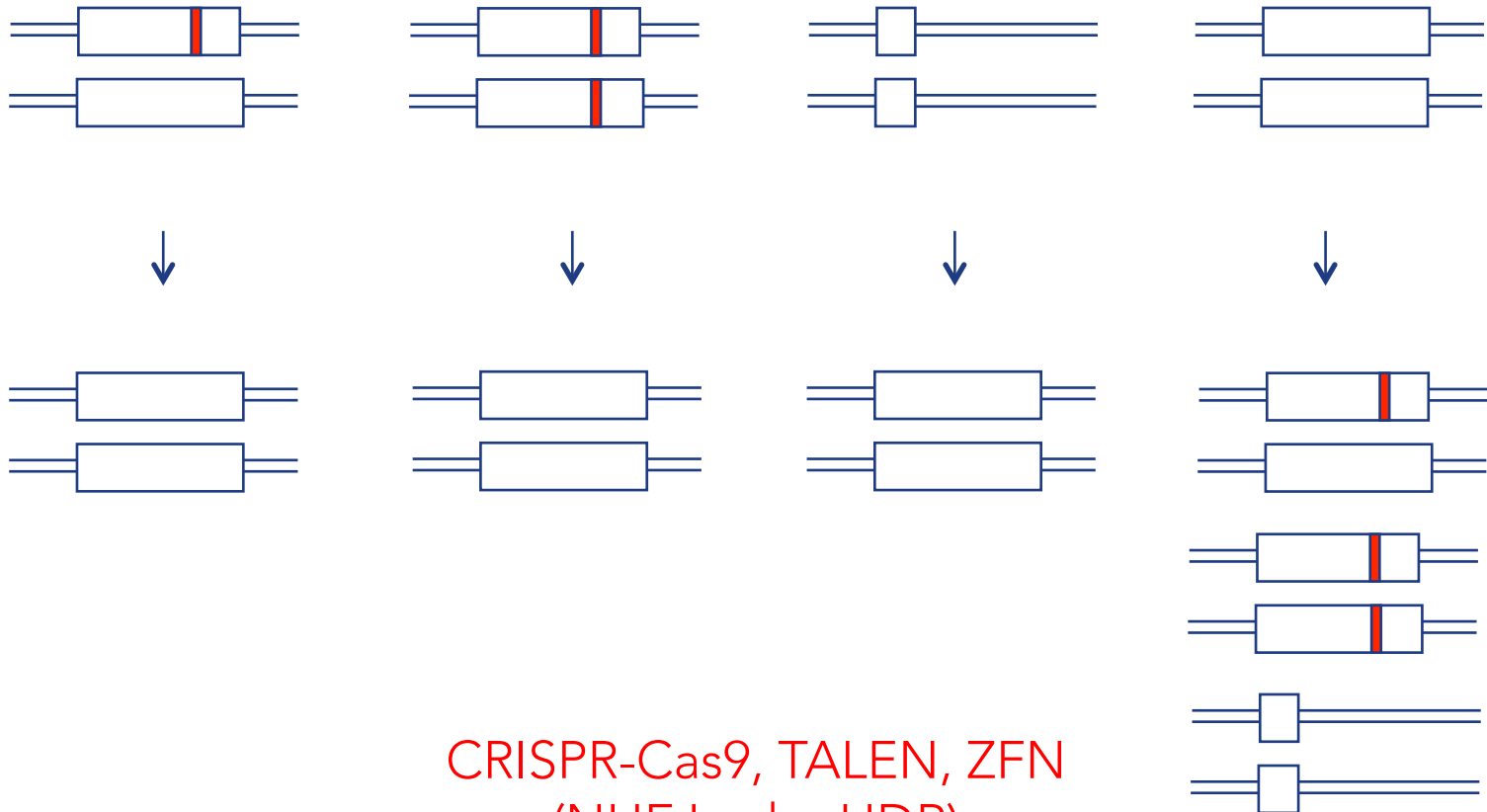
modifizierte CRISPR-Cas 9: nicking



Klinik

Behebung von Mutationen, Gentherapie

Veränderung von Genen im Menschen



CRISPR-Cas9, TALEN, ZFN
(NHEJ oder HDR)

Unterschiedliche Strategien

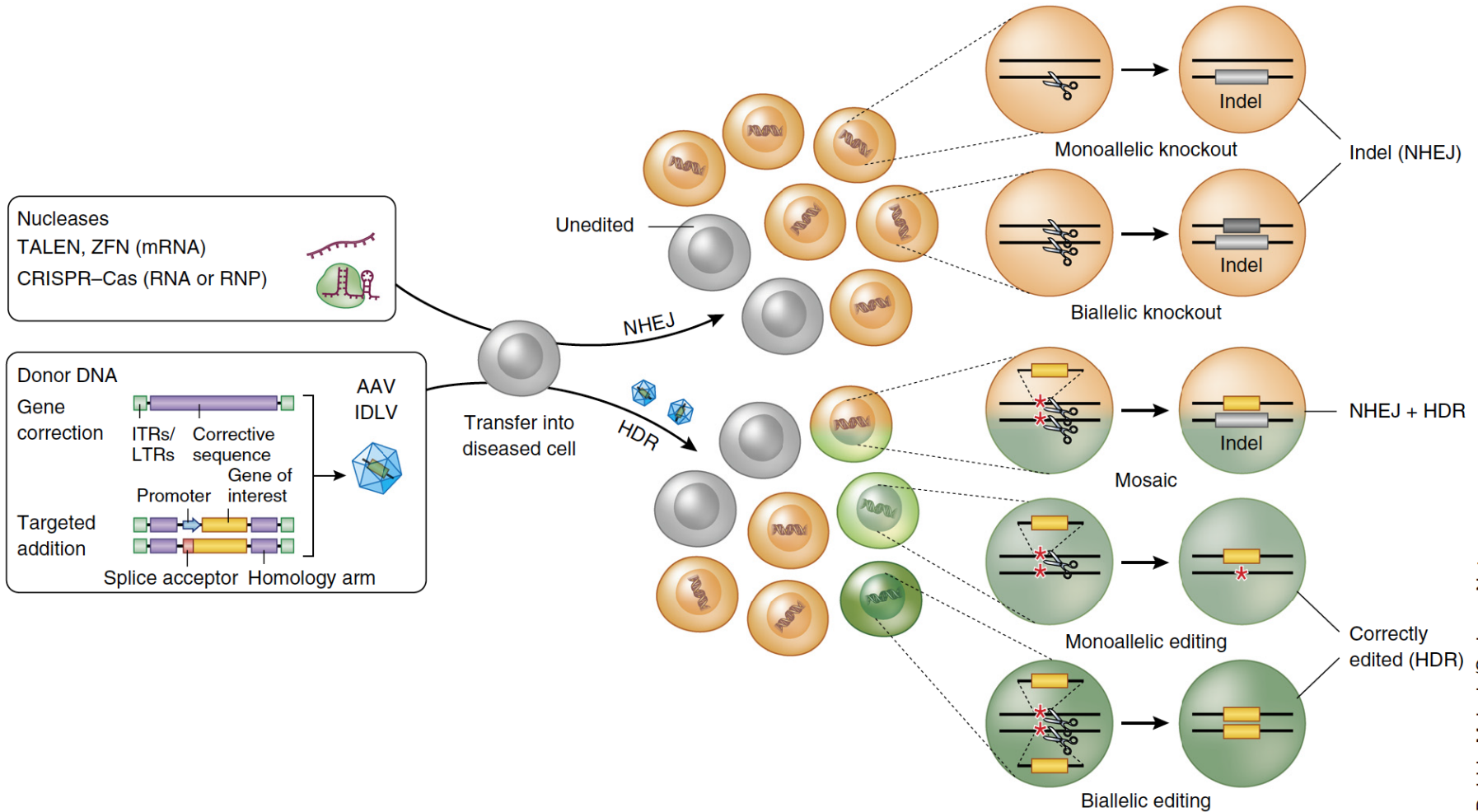
ex vivo:

die Zielzellen werden entnommen, genetisch verändert, kultiviert und wieder zurückgegeben

in vivo:

die CRISPR Komponenten werden direkt ins Gewebe, das verändert werden soll, eingebracht; erfordert DNA Transfer in vivo (Adenovirus Vektoren etc)

Möglichkeiten der Therapie



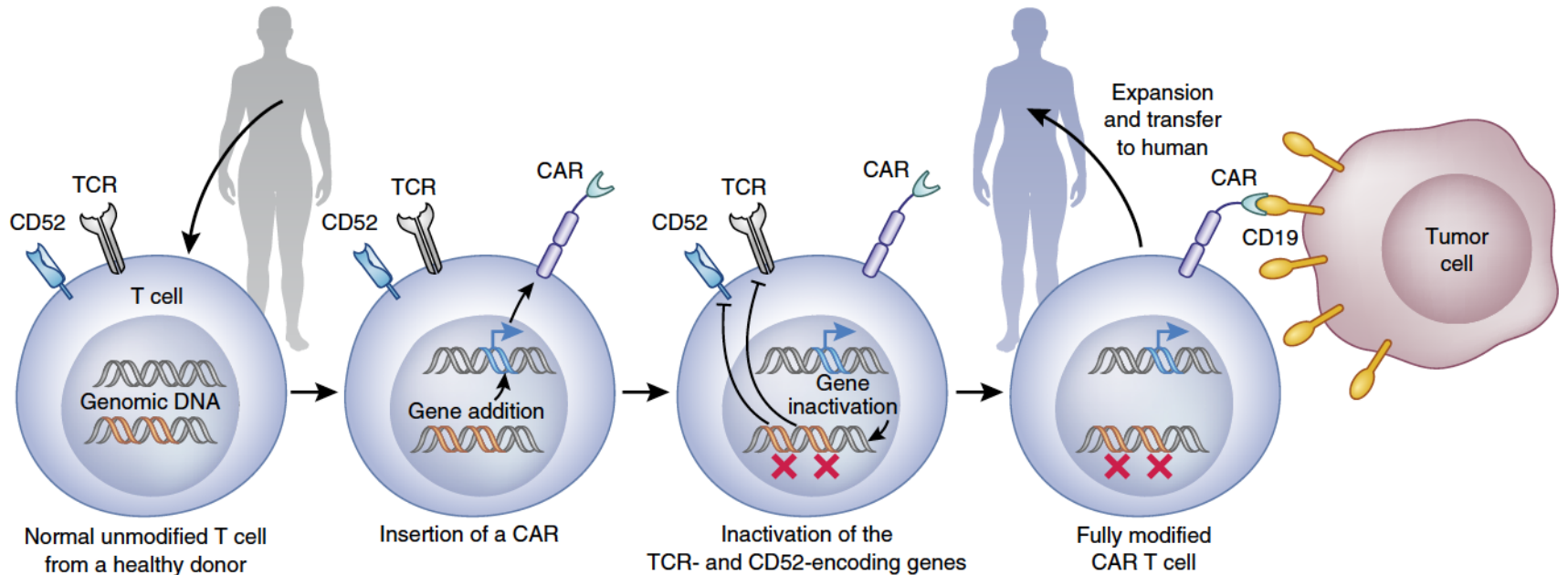
Debbie Maizels/Springer Nature

Klinische Studien Stand 2017

Table 2 Clinical gene-editing trials.

	Platform	Disease applications	Target	Strategy	Edited cells	Delivery	Trial number						
<i>Ex vivo</i>	ZFN	HIV	<i>CCR5</i>	NHEJ	CD4 ⁺ T cells	AdV or mRNA	NCT00842634						
							NCT01044654						
							NCT01252641						
							NCT01543152						
							NCT02225665						
							NCT02388594						
TALEN	HIV	Leukemia (B-ALL)	<i>CCR5</i>	NHEJ	CD34 ⁺ cells	mRNA	NCT02500849						
							CRISPR-Cas	Solid tumors	<i>CD52, TRAC</i>	NHEJ	CAR T cells	mRNA	NCT02808442
													<i>PDCD1</i>
							NCT02867345						
							NCT02863913						
							NCT02867332						
<i>In vivo</i>	ZFN	Hemophilia B	<i>ALB, F9</i>	HDR	Hepatocytes	AAV	NCT02695160						
		Mucopolysaccharidosis I (MPSI)	<i>ALB, IDUA</i>	HDR	Hepatocytes	AAV	NCT02702115						
		HPV-induced cervical precancerous lesions	HPV E7	NHEJ	Epithelial cells	DNA	NCT02800369						

T-Zell Modifikation- CAR (chimärer Antigen receptor)



Debbie Maizels/Springer Nature

Literatur

nature
medicine 2017

Refining strategies to translate genome editing to the clinic

Tatjana I Cornu^{1,2}, Claudio Mussolino^{1,2} & Toni Cathomen¹⁻³