



CRISPR und Gene-Drive

Bernd Wille, 2020

CRISPR/CAS-9

(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

“**Gen-Schere**”

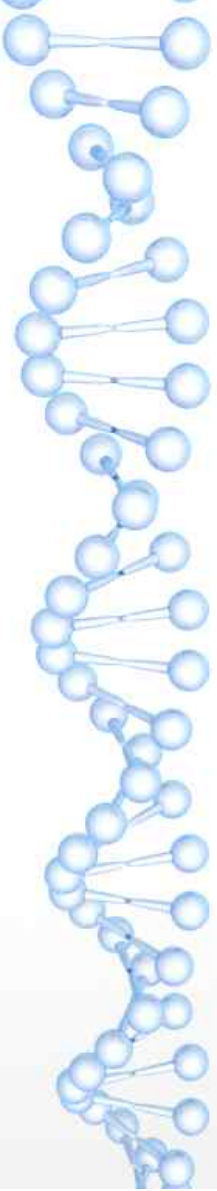
Damit lassen sich erstmals Gene an einer **genau vorbestimmten Stelle** und **mit hoher Ausbeute** ins Erbgut einfügen.

Gene-Drive

Normalerweise wird eine genetische Veränderung an 50% der Nachkommen weitergegeben.

Gene-Drives erhöhen diese Wahrscheinlichkeit massiv.

In wenigen Generationen tragen **praktisch alle Nachkommen** das neue Gen.



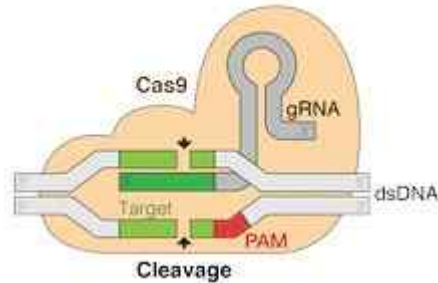
Gene Drives Überblick

- CRISPR: Mechanismus, Unterschiede zu klassischer Technik
- Gene-Drives: Schema
- Mechanismen
- Anwendungen: Absehbare Probleme -Schutzmechanismen
- Kritik an der Entwicklung von Anwendungen
- (Exkurs) Was man mit einer Definition alles anrichten kann
- Anwendungen Beispiele: Malaria in Burkina Faso, Moskitos in Brasilien
- EFSA und GMO
- Gene Drives Bewertung durch die EFSA
- Drives Bewertung Quellen

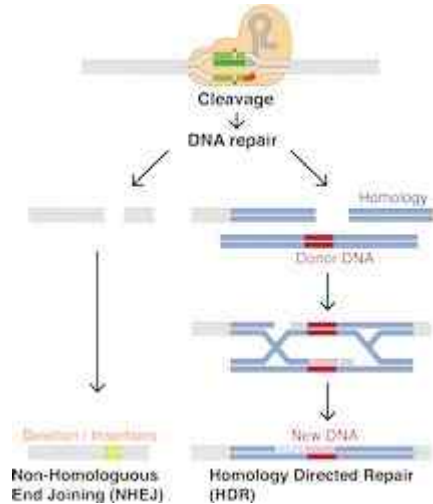
CRISPR und Gene Drives Literatur zum Einstieg
Quellen

Entschuldigung vorab:
Quellen stehen in den
Folien daher sieht es
gelegentlich etwas nach
Bleiwüste aus.

CRISPR



NHEJ

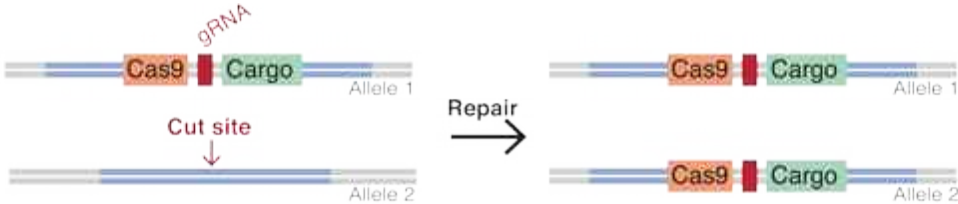


HDR

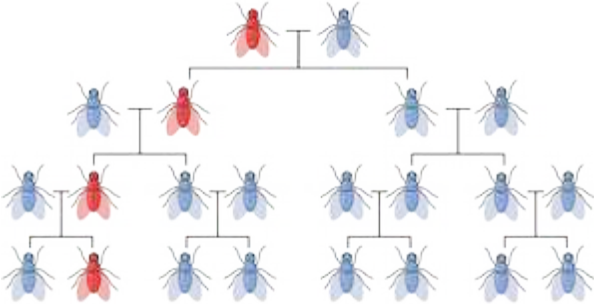
- „Immunsystem“ in Bakterien und Hefen: zerschneidet bestimmte Fremd-Sequenzen
- CRISPR-Cas9-Nuclease + guide-RNA erzeugt Doppelstrangbruch in DNA an der von der RNA gegebenen Zielsequenz
- Homologiegeleitete Reparatur mit Einbau von Fremd-DNA

Gene Drive

- Gen wird bei Reproduktion **immer** weitergegeben, verschiedene Mechanismen

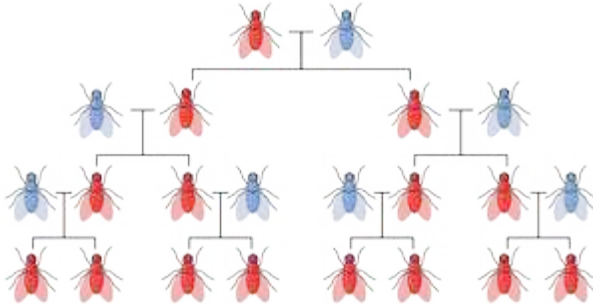


Normal inheritance



Altered gene does not spread

Gene drive inheritance



Altered gene is always inherited

Gene Drive

Mechanismus mit CRISPR (vereinfacht):

- Durch thermische Strangbrüche wird ein Reparaturmechanismus angestoßen, der zum Einbau des Cas9-Fremdgen-Konstrukts in beide Chromatiden führt.
- Damit wird die Weitergabe des neuen Gens in der Population stark beschleunigt, der Wildtyp kann schließlich praktisch verdrängt werden.

Andere Verfahren:

- Auch andere Mechanismen möglich („Selfish Genes“: Transposomen, Transmission distorters: X-Shredder, T-complex, Infektion mit Wolbachia), das Gebiet ist in rascher Entwicklung wobei gerade hier oft betont wird, es handele sich nicht um „genetic engineering“ da **natürlich vorhandene** Transfermechanismen genutzt werden. Modifizierte

Gene Drive – andere Mechanismen

Wolbachia

Infektion mit “unvollständigen” Bakterien, in Insekten weit verbreitet. Wolbachien können nur in Wirtszellen leben.

Wolbachien infizieren besonders weibliche Individuen und verhindern durch eine Reihe von Mechanismen die Vererbung von männlichen Merkmalen in der Population. Damit setzen sich die Wolbachien-infizierten Genome durch.

Auch hier zieht das Argument, es handele sich um einen natürlichen Prozess: Wolbachia-Stämme gelten in der EU als Biozid, die infizierten Mücken wären nicht reguliert (EU 2018/1623)

Transposomen

Kurze Genabschnitte, die sich mit einem in ihnen kodierten Enzym (Transposase) an andere Stellen im Genom kopieren oder versetzen können. Auch beim Menschen vorhanden. Offensichtlich wichtig für die Dynamik der Vererbung. Können zu einer vermehrten Vererbung in ihnen enthaltener Sequenzen führen. Entdeckt bei Mais 1958, Nobelpreis B. McClintok 1983.

Gene Drive -Anwendungen

- Ausrotten von Populationen: Ae. Albopictus, Drosophila suzukii, invasive Arten
- Verdrängen oder Ausbringen von z.B. Resistenzen

Probleme in der Anwendung:

- Selektion gegen neuen Phänotyp, neuer Phänotyp evtl. nicht so fit wie Wildtyp
- Resistenzbildung durch lokale Mutationen (deshalb möglichst hochkonservierte Bereiche benutzt) und NHEJ (s.u.) - in Studien oft sehr ausgeprägt
- „falscher“ Reparaturmechanismus (non-homologous end joining) überwiegt in Pflanzen
- p53-“cell guardian“ in Säugetieren: modifizierte Zellen werden evtl. im Zellzyklus gehemmt oder (bei p53-Hemmung) ein Krebsrisiko

Ökologische Effekte:

- Übernahme z.B. der Vektorfunktion für Krankheitserreger durch andere Art
- Übernahme der Nische durch anderen Organismus – Vektor für andere Krankheiten
- Beim Ausrotten: Schaffung einer neuen invasiven Art evtl. z.B. durch “Entkommen” von Genen in andere Arten
- Beim Ausrotten: Entkommen des Drives (oder des entscheidenden Gens) in den ursprünglichen Lebensraum der betreffenden Art
→ Ausrottung der Art.

Gene Drive – Absehbare Probleme

Weitere absehbare Probleme und „Nebenwirkungen“

- Überschreitung von **Artgrenzen**
- „mitreisende“ Gene durch Ungenauigkeit im Design, CRISPR-Fehler, Mutationen
- besonders effektiv in hochkonservierten Genomabschnitten – sonst ist beschränkte Wirksamkeit wegen Variation in der Population zu befürchten. Gerade das aber macht die entstehenden Spezies ökologisch und in Bezug auf verwandte Organismen sehr gefährlich
- die erzeugten Organismen sind „**invasive species by design**“ und wenn erfolgreich praktisch nicht zu kontrollieren: sehr wenige „entkommene“ Organismen können einen neuen Drive in einer Population auslösen. **Daher wird vorgeschlagen, Schutzmechanismen und Containment obligatorisch zu machen.**
- Überwachung ist sehr schwierig: sowohl die Detektion der Organismen ohne Marker als auch die Abschätzung komplexer ökologischer Folgen
- **Erprobung ist gleich Freisetzung**: das ist mit dem Vorsorgeprinzip (Rio-Konvention, Cartagena-Protokoll) nicht vereinbar
- man muss immer im Auge behalten, dass viele in diesen Forschungen entwickelte Strategien potentielle militärische Anwendungen haben.

Gene Drive - Schutzmechanismen

Vorgeschlagene Schutzmechanismen, teilweise im Labor erprobt:

hierbei ist zu beachten, dass in der Regel der Urzustand der Population nicht wiederhergestellt wird

- Restricted drives – sterben nach einigen Generationen wieder aus – analog zur Oxytec -Technik, unabhängige Bewertung steht noch aus, Literaturlage widersprüchlich

Praktisch realisiert, aber nicht in Drive: herausverdünnen von nur in Männchen vererbten Merkmalen klappt in der Praxis, die eingeschleusten Gene wurden aber trotzdem nach „Aussterben“ der veränderten Mücken in der Wildtyp-Population nachgewiesen, waren also **nicht „contained“!** (Oxytec-Mücken)

- Daisy chain: drei Elemente, die im Ablauf zu einer „Verdünnung“ des Drives führen, der quasi ausstirbt – praktisch noch nicht demonstriert
- synthetic target drive: Abhängigkeit des Drives von Fremdgen, - nicht in Wildtyp – vorerst theoretisch
- split drive: eine Komponente, z.B. Endonuclease nach Mendel vererbt – praktisch nicht dargest.
- „überschreiben“ mit weiterem drive, „Immunisieren“: praktisch nicht dargestellt

Gene-Drive – Kritik an der Entwicklung von Anwendungen

- **Grundsätzlich falsche Reihenfolge:** wir haben ein Instrument -> laßt uns sehen welche Probleme wir damit lösen können → evaluieren wir die Anwendung
- **Richtig wäre:** wir haben ein Problem → finden wir mögliche Lösungen → evaluieren wir **alle** möglichen Verfahren

"Gene Drives Webinar Series: «Gene drives in a social context: promises, precaution & public engagement» by Tamara Lebrecht, GeneWatch UK". 10.6.20, 15h

- Enthusiasmus für neue Entwicklung verhindert Nutzung bewährter Konzepte und sorgfältige Analyse von Problemen (wenn Sie einen Hammer haben sieht jedes Problem wie ein Nagel aus).
- Grundlagen für Evaluierung fehlen: oft sind die Kenntnisse über die betroffenen Ökosysteme nicht ausreichend

Gene-Drive: tatsächliche Umsetzung

- Die Umsetzungsversuche finden stets in Staaten ohne ausreichende Rechtssysteme und ohne einflußreiche Zivilgesellschaft statt.
- Staaten mit permissiver Gesetzgebung werden bevorzugt: Brasilien erlaubt jetzt Freisetzung ohne wissenschaftliche Bewertung nach Gentechnikrecht: <https://www.keine-gentechnik.de/nachricht/33065>, Umweltprobleme dort würden aber auch Nachbarstaaten betreffen
- Warum wohl kommt ein großer Teil der Finanzmittel vom US-Militär?

Gene Drive, “Definition” – man beachte das Argumentationsmuster Genauso wird die grüne “nicht-Gentechnik” in Europa gerade verkauft

Opinion: Standardizing the definition of gene drive

View ORCID Profile Luke S. Alpey, Andrea Crisanti, Filippo (Fil) Randazzo, and View ORCID Profile Omar S. Akbari

PNAS first published November 18, 2020; <https://doi.org/10.1073/pnas.2020417117>

“Additional concepts can help further improve the understanding of gene drives. Again, **gene drives are a natural phenomenon**. They have arisen through entirely natural processes of mutation and selection; indeed many types exist (transposons, toxin-antidote systems, homing nuclease, and sex distorters), and gene drives and relics of old gene drives are widespread in nature. Naturally occurring gene drives can induce the development of potent suppression systems in response to the selection pressures they impose on the population. Modern molecular biology now **allows researchers to mimic various types of natural gene drives** in the laboratory. A gene drive system that is created through recombinant DNA techniques is called an “engineered” or “synthetic” gene drive.”

Achtung: wenn es die Natur macht, dann kann es ja nicht so schlimm sein.

Wichtig ist nicht, dass ein “natürlicher” Prozess nur “nachgeahmt” wird sondern was genau getan werden soll und was dabei schief gehen kann.

Gene-Drive Beispiele

Malaria-Experiment in Burkina Faso (Target Malaria, u.a. Gates-Stiftung, US-Militär):

The Guardian (2019): Wiping out the daughters: Burkina Faso's controversial mosquito experiment. https://www.theguardian.com/global-development/2019/nov/18/wiping-out-the-daughters-burkina-faso-controversial-mosquito-experiment?CMP=share_btn_tw

Zitat:

“Bart Knols, mosquito expert at the Radbouduniversiteit in Nijmegen, says **bed nets are far more cost effective.**

“The development of gene-drive mosquitoes is expensive, while a mosquito net costs next to nothing. I think that it's more effective to invest more money in distributing those.”

Hintergrund: Rückgang der Malaria um 75% (2000-2015), es geht also auch trotz Resistenzbildung bei Pestiziden. 2017 wurde in Science die erste Ankündigung eines wirksamen Impfstoffes publiziert: Mordmüller, B., Surat, G., Lagler, H. et al. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. Nature 542, 445–449 (2017).

<https://doi.org/10.1038/nature21060>, jetzt in klinischer Phase II; **vielleicht mehr Forschungsgelder in diesen Ansatz?**

Hauptargument heute: Reduzierung des Pestizideinsatzes.

Das Projekt “**End Malaria**” der Firma “**Target Malaria**” hat mehrere Phasen:

1. Ausbringung von sterilen Männchen, kein genetic Engineering, kein Drive!
 2. Selbstlimitierender Drive mit Defekten an Männchen
 3. Selbsterhaltender Bestand modifizierter Männchen
- falsches Geschlechterverhältnis, reduzierte Fruchtbarkeit der Weibchen
- wir sind noch bei Phase 1.

Grundsätzlich gefordert wäre: “Prior informed consent” also Zustimmung der Betroffenen nach ausführlicher Information

für medizinische Anwendungen von Helsinki-Convention gefordert, für nicht-medizinische Anwendungen durch die Biodiversitäts-Konvention von 2018

Praktisch alle Versuche sind in dieser Hinsicht zumindest in sehr kritischer Diskussion (siehe Guardian-Artikel)

Freisetzung - Beispiele

Moskito-Freisetzung in Brasilien durch Oxytec

(keine Gene-Drives)

Brasilien weil dort keine wissenschaftliche Verfolgung solcher Studien verpflichtend ist

<https://www.sciencemag.org/news/2019/09/study-dna-spread-genetically-modified-mosquitoes-prompts-backlash>

Caiman Islands

<https://www.sciencemag.org/news/2010/11/gm-mosquito-trial-strains-ties-gates-funded-project>

Malaysia

<https://www.sciencemag.org/news/2010/11/gm-mosquito-trial-strains-ties-gates-funded-project>

Jeweils blieb der Eindruck einer überhasteten Freisetzung wobei lokale Gruppen und teils auch die Administration ausgetrickst wurden.

Unverstandene Mechanismen:

Studie, nach der offenbar Gene von freigesetzten genetisch veränderten Moskitos in Brasilien nicht „aussterben“ wie geplant sondern in Zielpopulation übergehen wobei die neu entstehende Generation eventuell schädlicher und robuster ist als der Wildtyp. In der Studie wurde kein Gene-Drive eingesetzt.

EFSA (European Food Safety Organisation) und Gene Drives

SCIENTIFIC OPINION ADOPTED: 14 October 2020

doi: 10.2903/j.efsa.2020.6297

Über die **Brauchbarkeit der vorhandenen Risikoabschätzungsmechanismen** für Gene-Drives:

“In diesem wissenschaftlichen Gutachten kommt das Gremium ...zu dem Schluss, dass die Leitlinien der EFSA für die molekulare Charakterisierung (MC), die Umweltrisikobewertung (ERA) und die Umweltüberwachung nach dem Inverkehrbringen (PMEM) von GDmIs angemessen, aber unzureichend sind. ... gibt es spezifische Bereiche, in denen weitere Leitlinien für GDmIs erforderlich sind.”

“Dazu gehören bereichsübergreifende Überlegungen der EFSA (2013) [d. h. **Empfangsumgebungen, Komparatoren, Nicht-GV-Surrogate, Versuchsplanung und Statistik, Langzeiteffekte und Modellierung**], spezifische Risikobereiche der EFSA (2013) [d. h. **Persistenz und Invasivität, einschließlich vertikaler Gentransfer, horizontaler Gentransfer, Pathogene, Infektionen und Krankheiten sowie Wechselwirkungen mit Zielorganismen**], PMEM der EFSA (2013) und MC-bezogene Aspekte der EFSA (2012). “ Übersetzt mit www.DeepL.com/Translator (kostenlose Version)

Stellungnahme von Save our Seeds dazu:

https://www.saveourseeds.org/fileadmin/files/SOS/gene_drive/Pressemitteilung_von_Save_Our_Seeds_EFSA_bestehende_Leitlinien_f%C3%BCr_die_Risikobewertung_von_GVO_ungen%C3%BCgned_f%C3%BCr_Gene_Drive_Organismen.pdf

Die EFSA stelle zwar richtig fest, dass GeneDrives extrem schwer zu überwachen und evaluieren seien, ignoriere aber speziell Mehrgenerationeneffekte und natürlich spiele die vorgängige Frage nach dem politischen Willen der europäischen Bevölkerung keine Rolle.

Gene-Drives und Bewertung durch EFSA

Der Bewertungsprozess befindet sich im Fadenkreuz mächtiger Interessen wie der Gates-Stiftung und des US-Militärs

In der EFSA-Bewertungsgruppe gibt es kein Mitglied ohne Bindung an kommerziell interessierte Organisationen

<https://corporateeurope.org/en/2019/06/efsa-gene-drive-working-group-fails-independence-test>

Und es gibt Hinweise auf eine Kampagne durch die Gates-Stiftung – Bericht der Heinrich Böll Stiftung

https://www.boell.de/de/2017/11/20/milliardaere-bestimmen-globale-agenda?utm_source=website&fbclid=IwAR3S1NExWPBBINFRV4htRuQajZeLuE-IYPdxDWSclF9lbcf-RSniv_Vlxmc

Gene Drives – Bewertung – Quellen

Übersichtsartikel NYT J. Kahn

<https://www.nytimes.com/2020/01/08/magazine/gene-drive-mosquitoes.html>

Bewertung durch Amerikanische Natl. Acad. Of Sciences:

<https://doi.org/10.17226/23405>.

Fordert differenzierte Bewertung, Risikoabschätzung nach schrittweisem Verfahren und Einbindung lokaler Bevölkerung.

“Recommendation 8-9: decision makers **should consider a large toolbox of policies, including regulatory and non-regulatory mechanisms**, for the rapidly developing field of gene drive research.”

“Recommendation 8-10: Research institutions, ... should revisit international regulatory frameworks, national laws, non-governmental policy, and professional codes of conduct ... particularly with regard to site selection issues, **capacity building for responsible and inclusive governance systems, scientific and post release surveillance, and stakeholder engagement.**”

Leider gibt es auch Ansätze zur Einbindung der Bevölkerung unter der Ägide der Gene-Drive Firmen wie Target-Malaria wobei die Information im “informed consent” etwas verzerrt ausfallen dürfte.

Hartley S, Thizy D, Ledingham K,

Coulibaly M, Diabaté A, Dicko B, et al. (2019)

Knowledge engagement in gene drive research for malaria control. PLoS Negl Trop Dis 13(4):

e0007233. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007233>

Gene Drives – Bewertung – Quellen

Eine differenzierte Darstellung speziell zur Ausrottung invasiver Arten: Elisabeth Kolbert:

<https://www.newyorker.com/magazine/2021/01/18/crispr-and-the-splice-to-survive>

Eine internationale Initiative von über 200 Repräsentanten und Organisationen aus der Bewegung hat einen Appell unterzeichnet, der auf einer Studie der ETC-Gruppe und der Heinrich Böll Stiftung basiert.

https://www.boell.de/sites/default/files/etc_forcingthefarmreport_8.pdf

Gene Drives und Landwirtschaft: Sechs Beispiele aus dem **“Forcing the Farm”-Report**

- Gene Drives werden in Fliegen, Insekten, Würmer und andere Schädlinge eingepflanzt, um Sterilität als biologische Alternative zu Pestiziden zu verbreiten.
- Forscher schlagen vor, Gene Drives als Züchtungsinstrument einzusetzen, um die Fleischproduktion bei Nutztieren zu steigern.
- "Auto-Extinction"-Gentriebe werden in Ratten und Mäuse sowie in Käfer eingebaut, die die Lagerung von Getreide beeinflussen.
- Es wurden Patente beantragt, um Gene Drives in Honigbienen einzubauen, um die Bestäubungsmuster mit Lichtstrahlen zu kontrollieren.
- Es wird daran geforscht, Gene Drives in gängige Unkrautarten einzubauen, um sie anfälliger für Herbizide wie Roundup zu machen.
- Die Analyse von zwei Schlüsselpatenten zu Gene Drives zeigt, dass sie jeweils etwa 500-600 landwirtschaftliche Anwendungen referenzieren, darunter Markennamen von 186 Herbiziden, 46 Pestiziden, 310 landwirtschaftlichen Schadinsekten, Nematoden, Milben, Motten und anderen

CRISPR-Gene Drive Literatur:

- **Einführung:**

- <https://www.youtube.com/watch?v=ouXrsr7U8WI> Max Planck-Gesellschaft, CRISPR-Einführung Deutsch
- Prof. Röbbbe Wünschiers • Saxony⁶ Einführung CRISPR <https://www.youtube.com/watch?v=3LYFxAALSOdg>
- <https://www.wired.com/story/wired-guide-to-crispr/>

- <https://www.youtube.com/watch?v=ouXrsr7U8WI> Max Planck-Gesellschaft, CRISPR-Einführung Deutsch
- <https://www.youtube.com/watch?v=ezR3CzOi8j8> Schweizer Akademie der Wissenschaften: Gene Drives

- **Europäisches Symposium mit sehr viel aktuellem Material**

- <https://www.efsa.europa.eu/en/events/event/190515>
- Zusammenfassung:
- <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/190515-briefing-notes.pdf>

- **ENSSER-Studie: (European Network of Scientists for social and environmental responsibility)**

- dw-ev.de, ensser.org, criticalscientists.ch
- https://genedrives.ch/wp-content/uploads/2019/05/Press-Release_Gene-Drive-Symposium_CSS_ENSSER_FGS.z

- **Verbrauchervotum BfR:**

- https://www.bfr.bund.de/en/press_information/2019/35/conclusion_of_the_bfr_consumer_conference_on_genome_editing__lots_of_potential__but_clear_rules_required-242324.html
- <https://www.bfr.bund.de/cm/349/consumer-vote-genome-editing.pdf>

- **Umfassend: ENSSER-Serie über Gene-Drives**

- <https://genedrives.ch/webinar-genedrives>