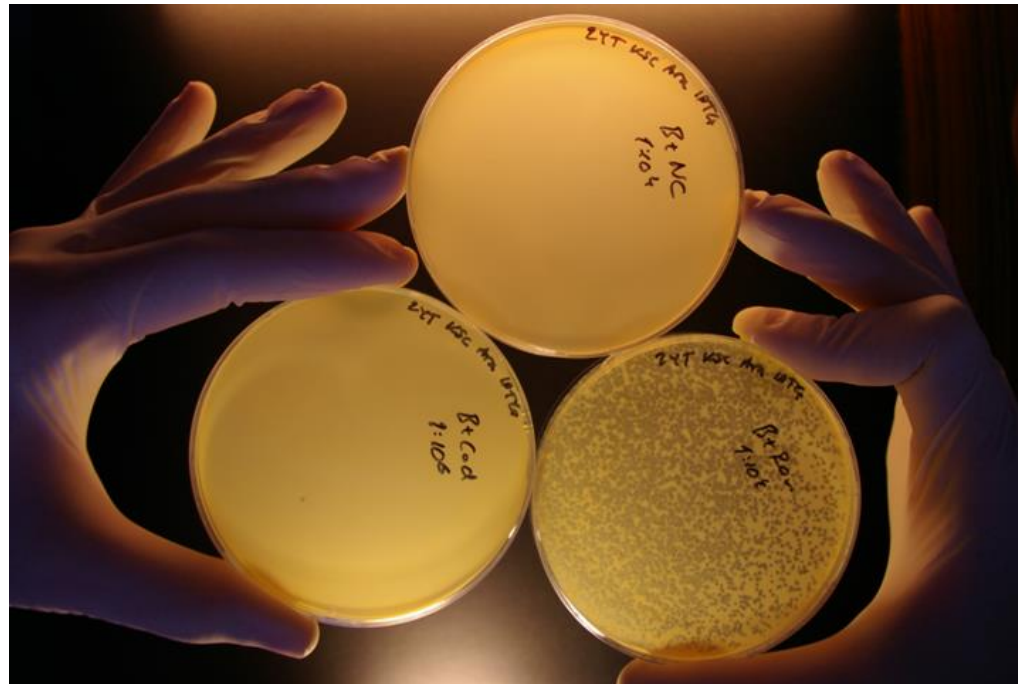


CRISPR-Cas

van biologie tot toepassing



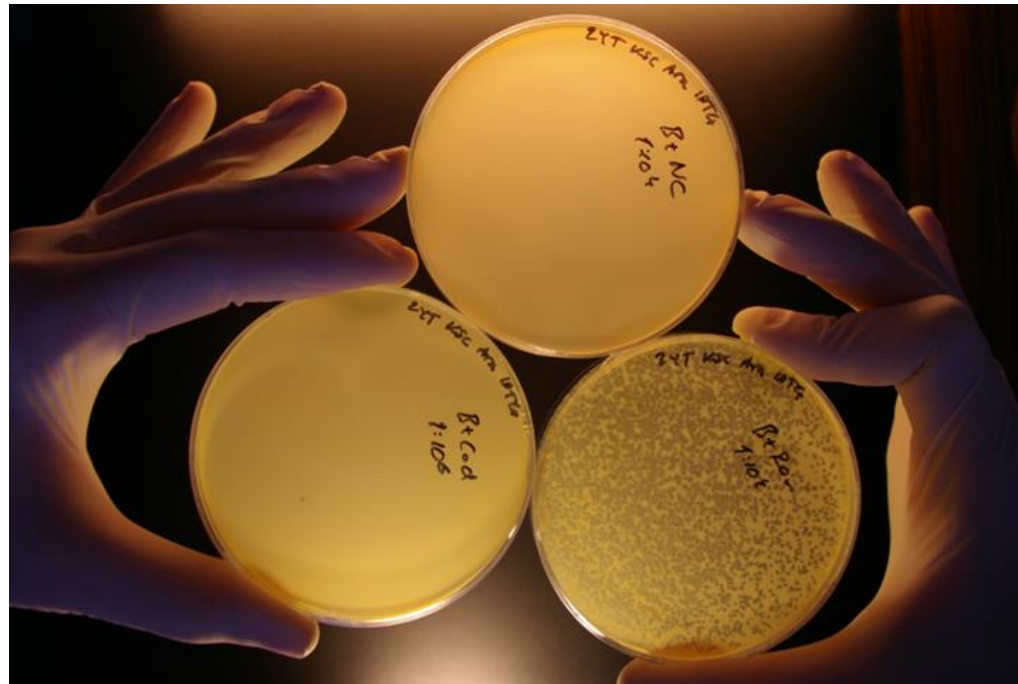
John van der Oost

Laboratory of Microbiology
Wageningen University



CRISPR-Cas

hoe werkt het, en wat kunnen we ermee ?



John van der Oost

Laboratory of Microbiology
Wageningen University





inleiding

- CRISPR ontdekking
- CRISPR mechanisme
- CRISPR toepassingen
- CRISPR voedsel

DNA, RNA & eiwit

bacteriën, virussen & immuniteit

zoeken & knippen

mutatie & reparatie

is dat gevaarlijk ?

cellen & DNA



alle levende organismen zijn opgebouwd uit **cellen**, variërend van 1 (bacterie) tot 1.000.000.000.000 (mens)

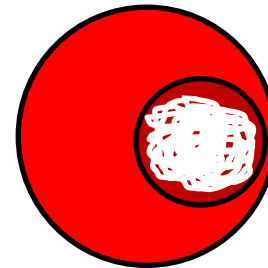
de erfelijke informatie van deze organismen is opgeslagen in het **DNA** op de chromosomen



**bacterie
cel**

Ø 1-5 µm

DNA 3.000.000
letters
(baseparen, bp)

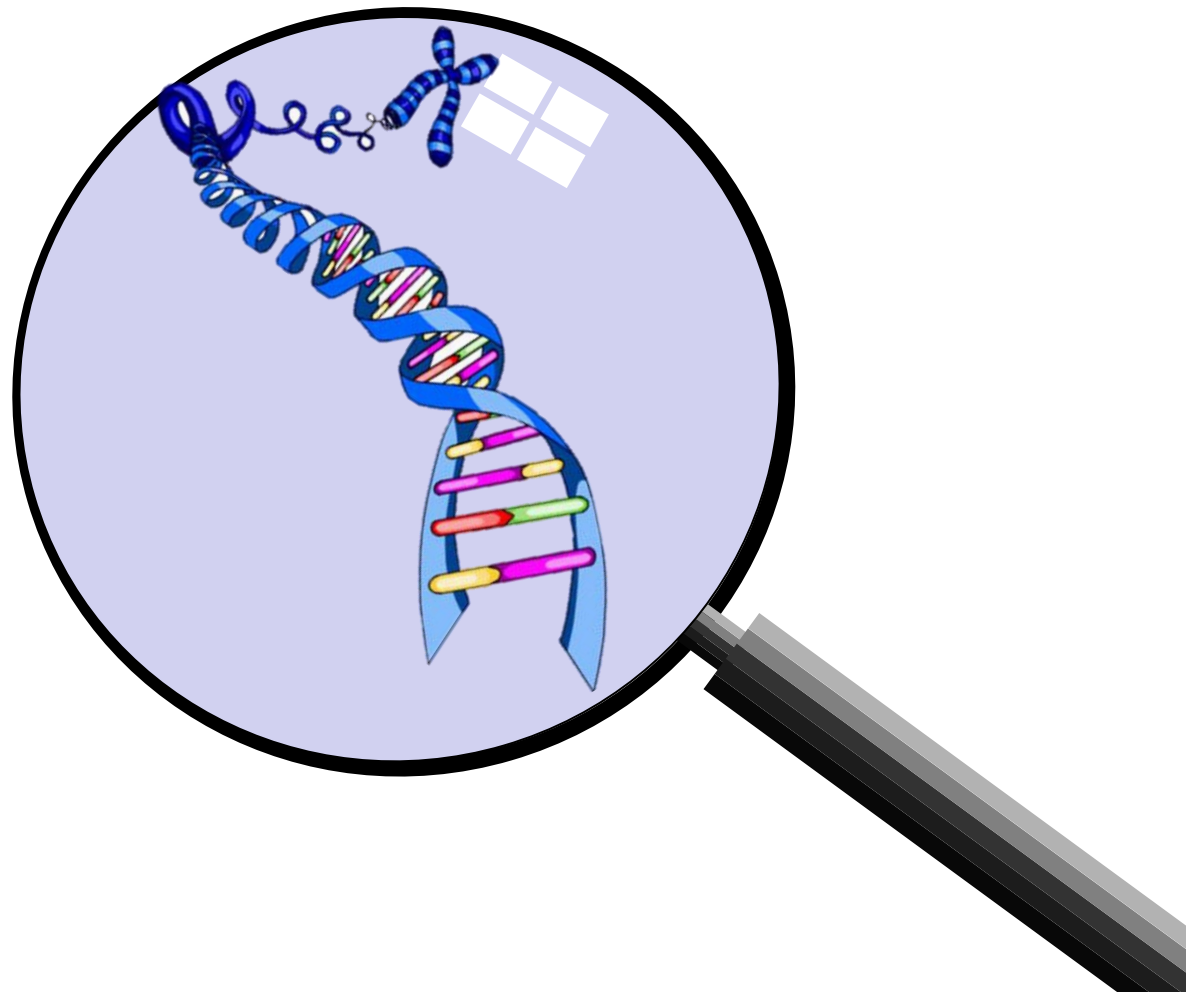


**planten / dieren
cel**

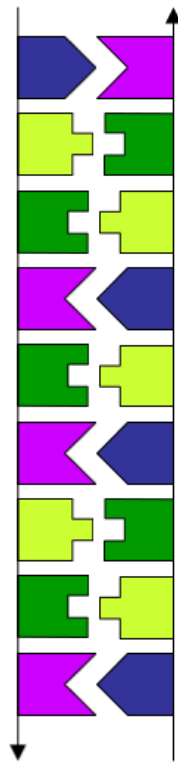
50-100 µm

3.000.000.000
letters
(bp)

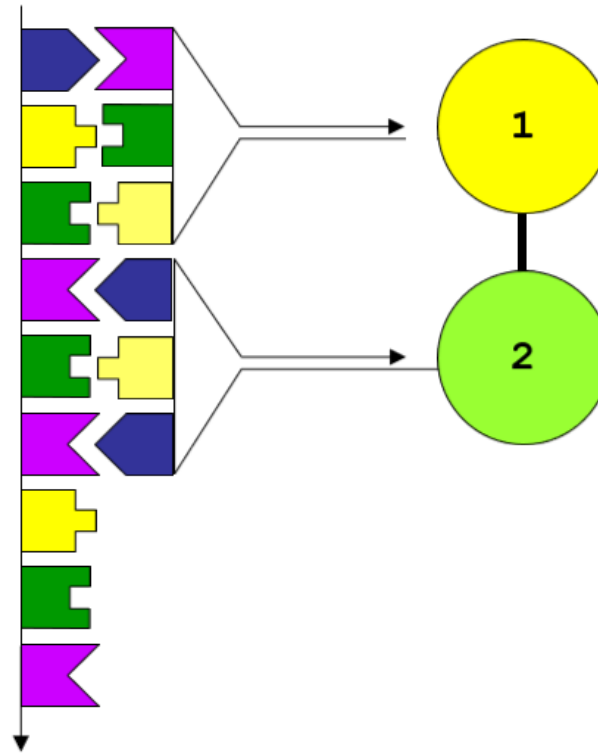
cellen & DNA



DNA > RNA > eiwit



DNA



mRNA

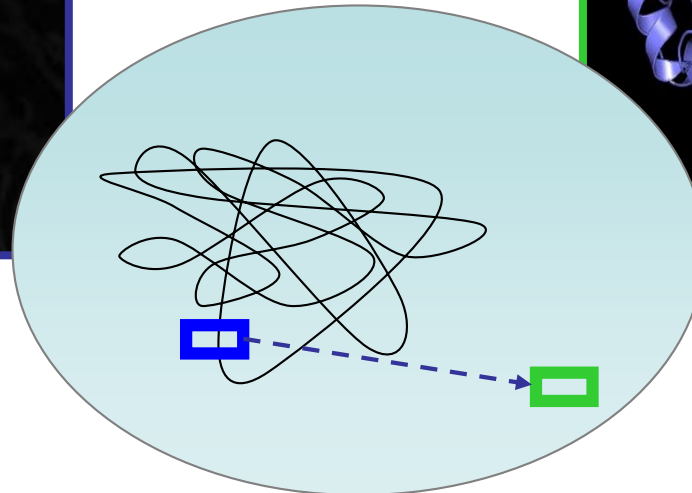
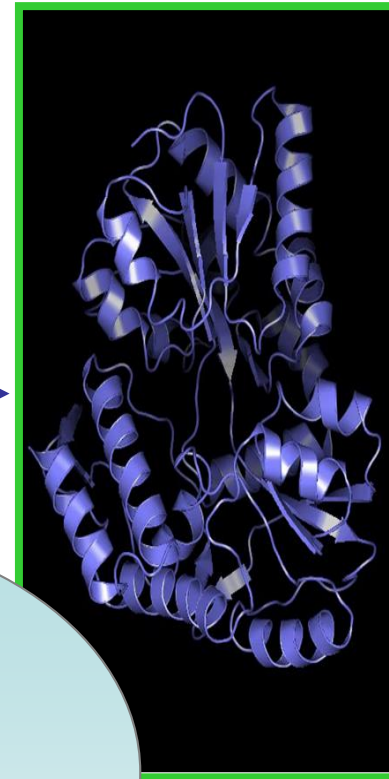
tRNA-aminozuur

DNA > RNA > eiwit



informatie - opslag

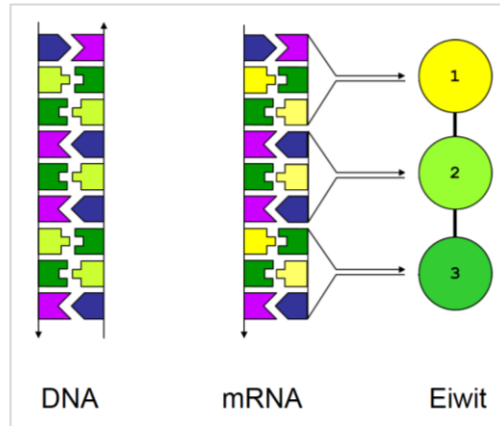
biologische functie



DNA

Eiwit

conclusies (1)



- DNA streng bindt **specifiek** aan DNA streng door **baseparing** (DNA en DNA)
- DNA streng wordt **specifiek** overgeschreven in RNA door **baseparing** (DNA en mRNA)
- RNA wordt **specifiek** vertaald naar eiwit door **baseparing** (mRNA en tRNA-aminozuur)

belangrijk: bij kopiëren van DNA worden af en toe fouten gemaakt,
dat kan positief of negatief uitvallen (evolutie, genetische ziekten)



- inleiding DNA, RNA & eiwit
- ➔ CRISPR ontdekking bacteriën, virussen & immuniteit
- CRISPR mechanisme zoeken & knippen
- CRISPR toepassingen mutatie & reparatie
- CRISPR voedsel is dat gevaarlijk ?

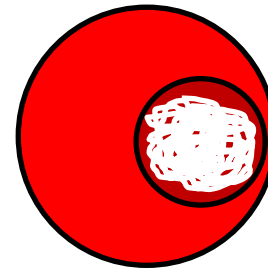
virussen zijn afhankelijk van cellen



virus



**bacterie
cel**



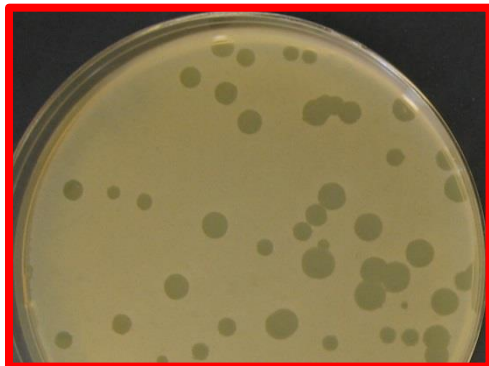
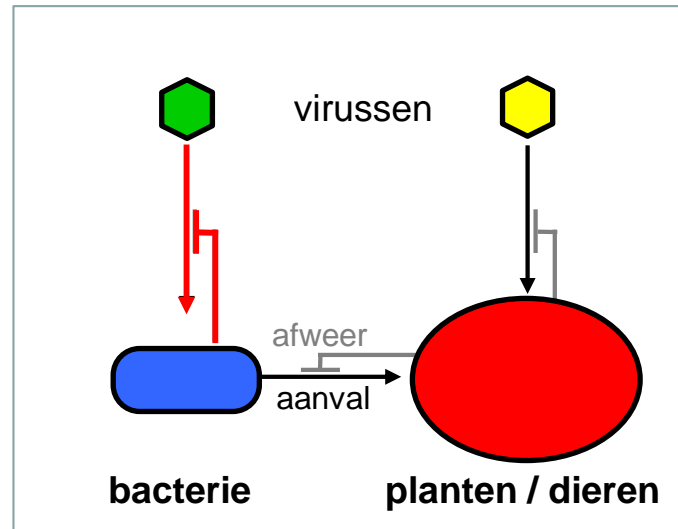
**planten / dieren
cel**

Ø 0,05-0,1 μm
DNA 3.000 bp

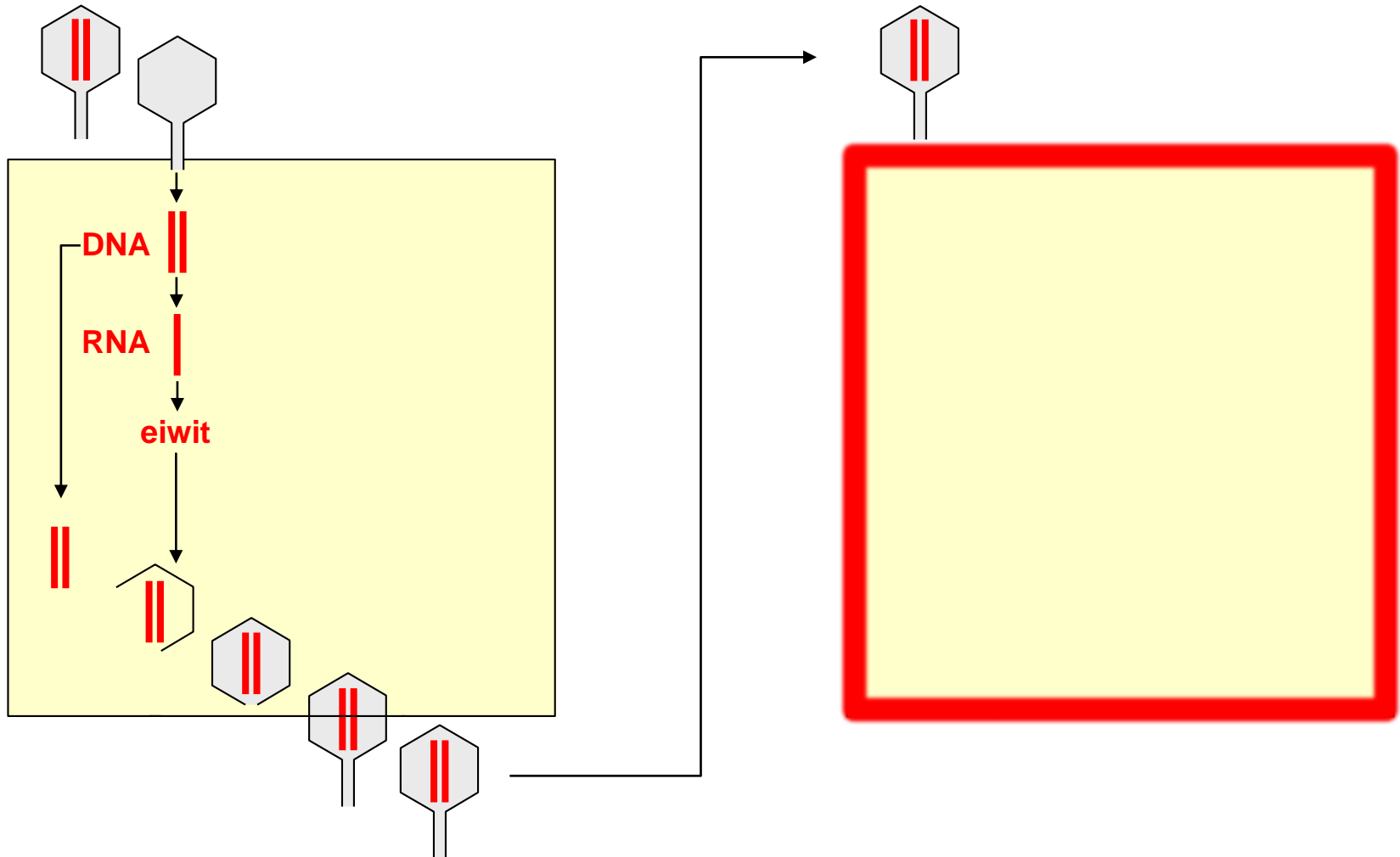
1-5 μm
3.000.000 bp

50-100 μm
3.000.000.000 bp

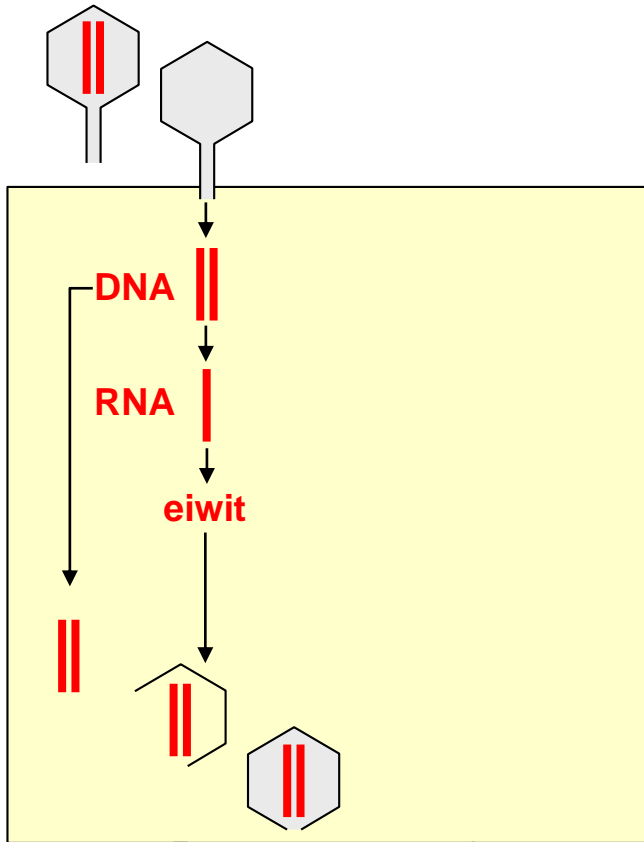
virussen zijn afhankelijk van cellen



virus infectie van bacteriën



anti-virus systemen van bacteriën



bekende anti-virus systemen

- remming van aanhechting
- remming van DNA injectie
- afbraak van vreemd DNA
- zelfmoord systeem

nieuw afweersysteem

➔ CRISPR-Cas

CRISPR-Cas - ontdekking



```
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCTTTCGCAGACGCGCGGCGA  
TACGCTCACGCAGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCAGCCGAA  
GCCAAAGGTGATGCCGAACACGCTGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA  
ACCGGGCTCCCTGTCGGTTGTAATTGATAATGTTGAGAGTTCCCCGCGC  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTTCGC  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
CGTCGCCGCCTGCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGTCAGCTT  
TATAAATCCGGAGATACGGAAACTAGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATA
```

- CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats

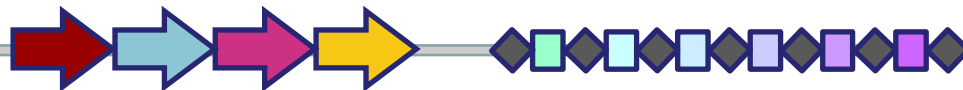


CRISPR-Cas - ontdekking



```
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCTTTCGCAGACGCGCGGCGA  
TACGCTCACGCA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCAGCCGAA  
GCCAAAGGTGATGCCGAACACGCTGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA  
ACCGGGCTCCCTGTCGGTTGTAATTGATAATGTTGAGAGTTCCCCGCGC  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTTCGC  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
CGTCGCCGCCTGC GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGTCAGCTT  
TATAAATCCGGAGATACGGAAACTA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATA
```

- CRISPR – DNA cluster met afwisselende repeats & spacers
- Cas – CRISPR-associated genen & eiwitten

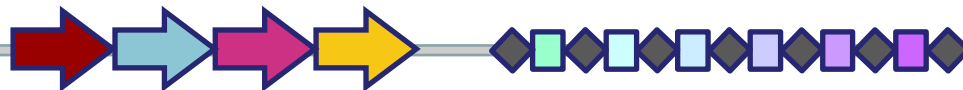


CRISPR-Cas - ontdekking

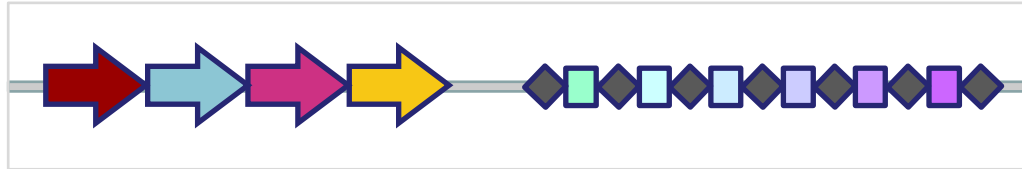


```
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCTTTCGCAGACGCGCGGCGA  
TACGCTCACGCA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCAGCCGAA  
GCCAAAGGTGATGCCGAACACGCTGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA  
ACCGGGCTCCCTGTCGGTTGTAATTGATAATGTTGAGAGTTCCCCGCGC  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTCGC  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
CGTCGCCGCCTGC GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGTCAGCTT  
TATAAATCCGGAGATACGGAAACTA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATA
```

- CRISPR – spacers lijken op DNA fragmenten van virussen
- CRISPR-Cas is mogelijk een uniek anti-virus system in bacteriën ...



conclusies (2)




- CRISPRs zijn DNA clusters van repeats & spacers op bacteriële chromosomen
- naast CRISPRs liggen de *cas* genen, die coderen voor Cas eiwitten
- het DNA van de spacers lijkt vaak op stukjes DNA van virussen

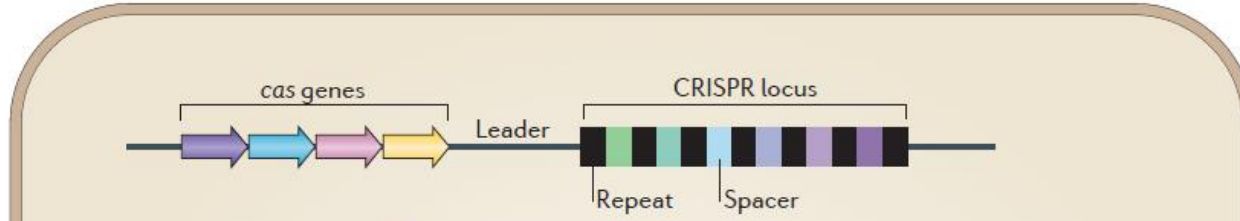
CRISPR-Cas is potentieel afweer systeem...

CRISPR-Cas



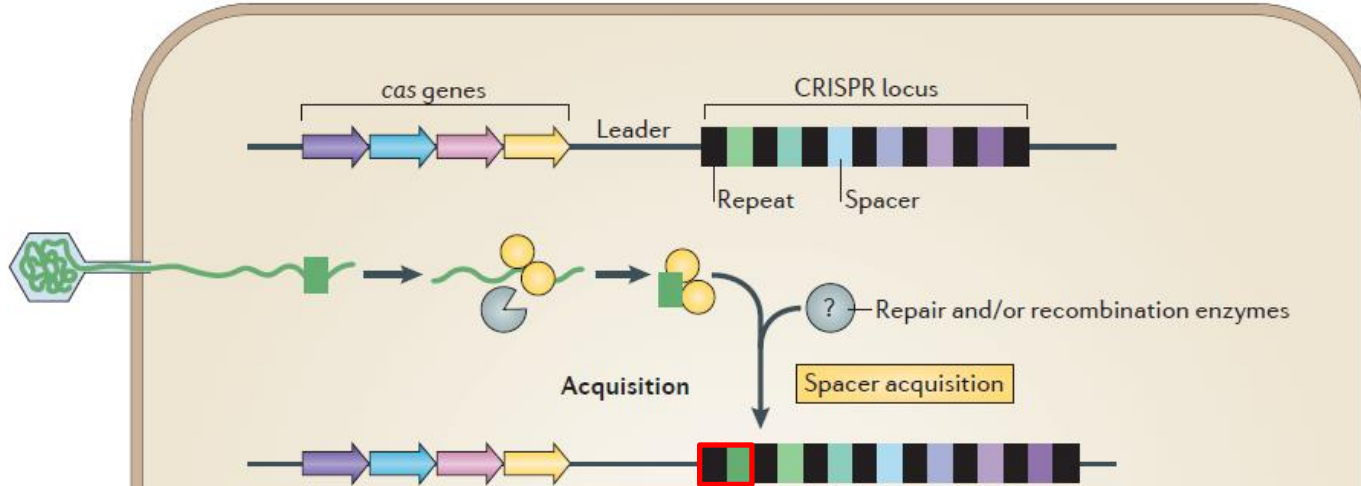
- inleiding DNA, RNA & eiwit
- CRISPR ontdekking bacteriën, virussen & immuniteit
-  **CRISPR mechanisme** zoeken & knippen
- CRISPR toepassingen mutatie & reparatie
- CRISPR voedsel is dat gevaarlijk ?

CRISPR-Cas mechanisme



- veel CRISPR spacers zijn homolog aan DNA van virussen

CRISPR-Cas mechanisme

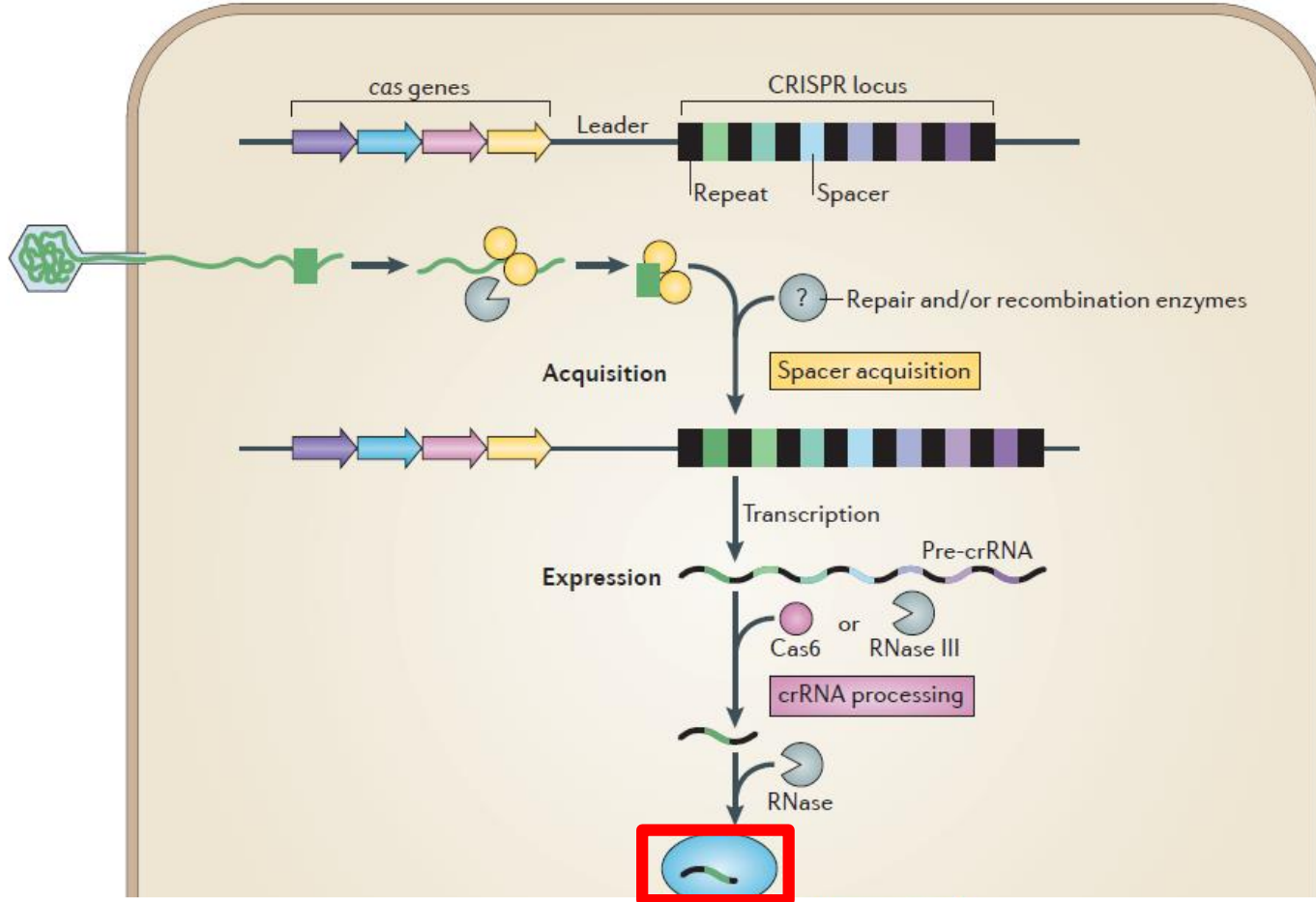


1. Spacer inbouw

CRISPR = geheugen van afweer systeem

- veel CRISPR spacers zijn homolog aan DNA van virussen

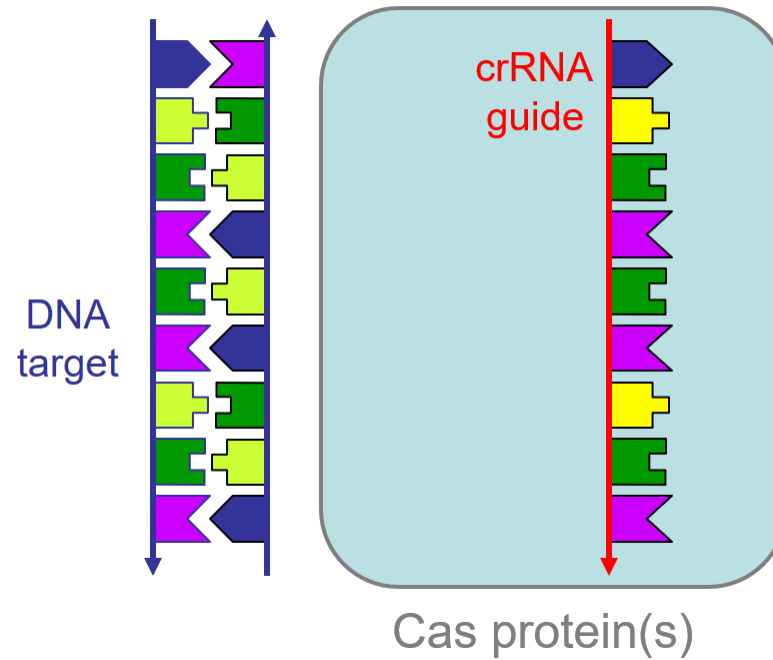
CRISPR-Cas mechanisme



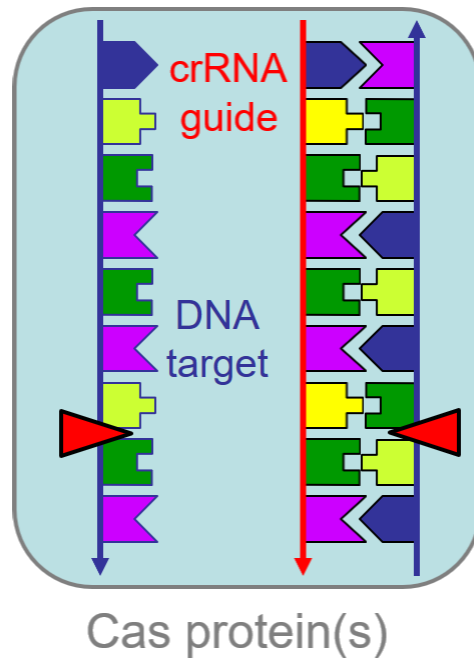
1. Spacer inbouw

2. Guide expressie

crRNA guide leidt Cas eiwit naar DNA target



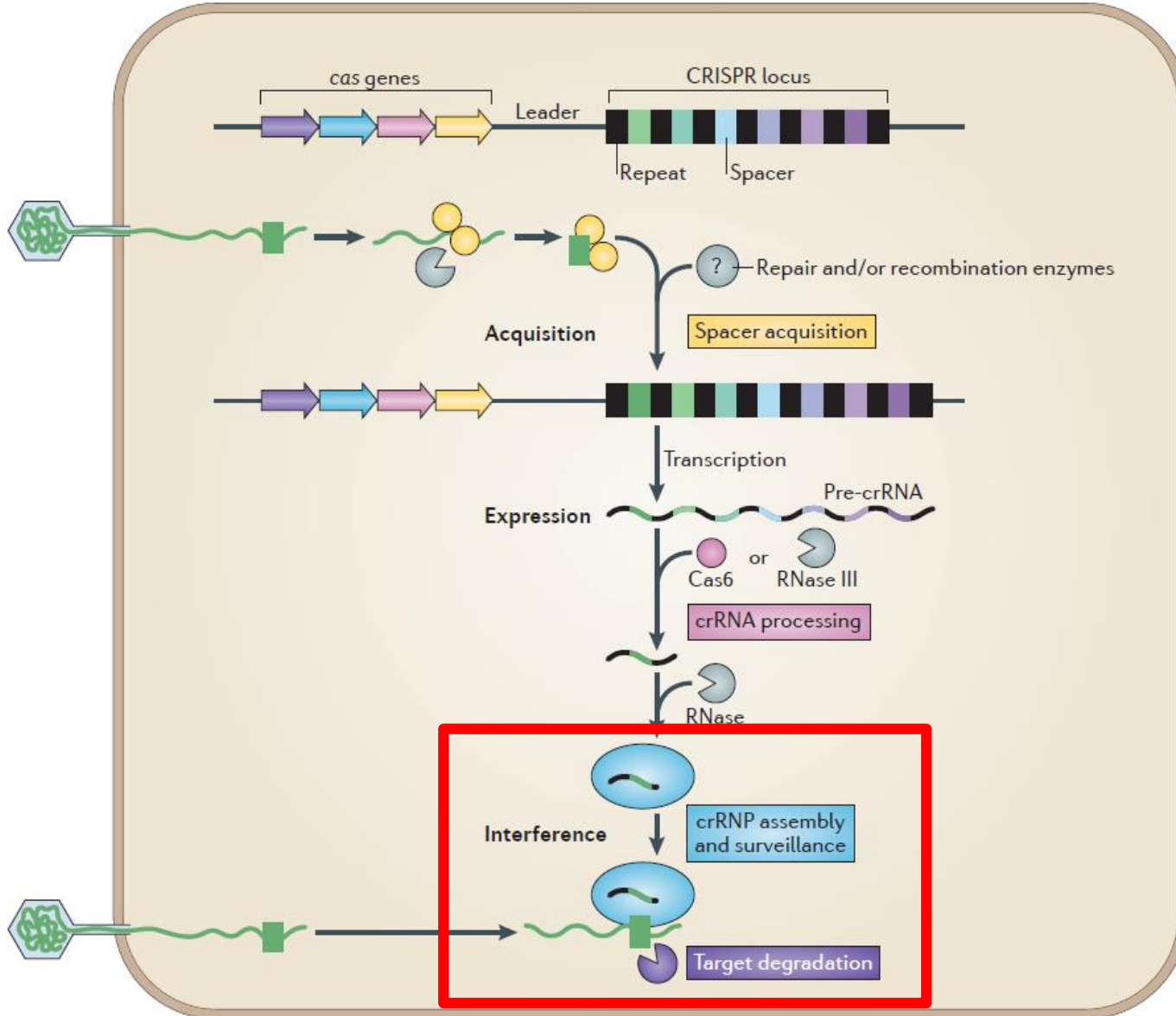
crRNA guide leidt Cas eiwit naar DNA target



een crRNA/Cas complex
kan heel **specifiek**
een DNA fragment (bijv. van virus)
herkennen door **baseparing**

daarna wordt het DNA
kapot geknipt
door Cas nuclease
(en virus geïnactiveerd)

CRISPR-Cas mechanisme

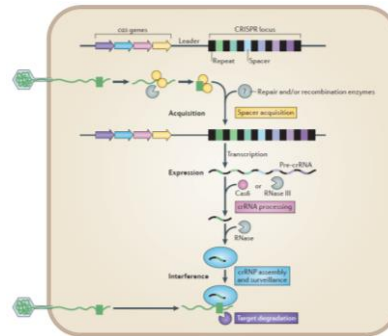


1. Spacer inbouw

2. Guide expressie

3. Target aanval

conclusies (3)



- DNA fragmenten van virus worden ingebouwd in CRISPR op bacterie chromosoom
- CRISPR DNA streng wordt overgeschreven als CRISPR RNA (crRNA)
- crRNA (guide) leidt Cas nuclease naar virus DNA, waarna dat kapotgeknipt wordt

belangrijk: door aanpassing van CRISPR RNA volgorde,
en door 'transplantatie' van het Cas/crRNA complex naar ander organisme,
kan in principe elk DNA in elk organisme worden geknipt

CRISPR-Cas

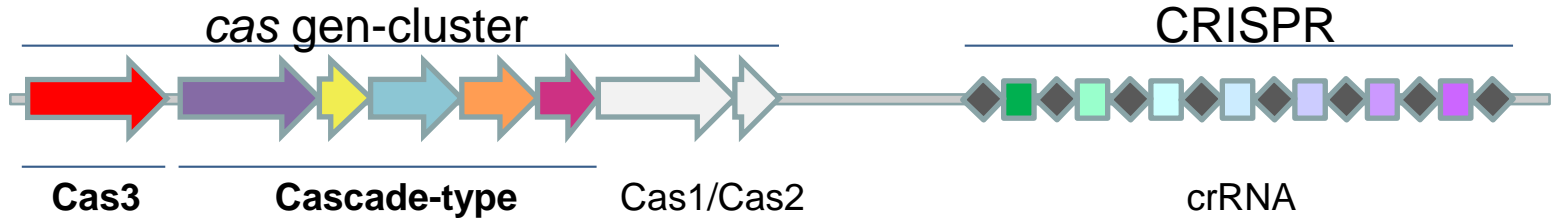


- inleiding DNA, RNA & eiwit
- CRISPR ontdekking bacteriën, virussen & immuniteit
- CRISPR mechanisme zoeken & knippen
-  CRISPR toepassingen mutatie & reparatie
- CRISPR voedsel is dat gevaarlijk ?

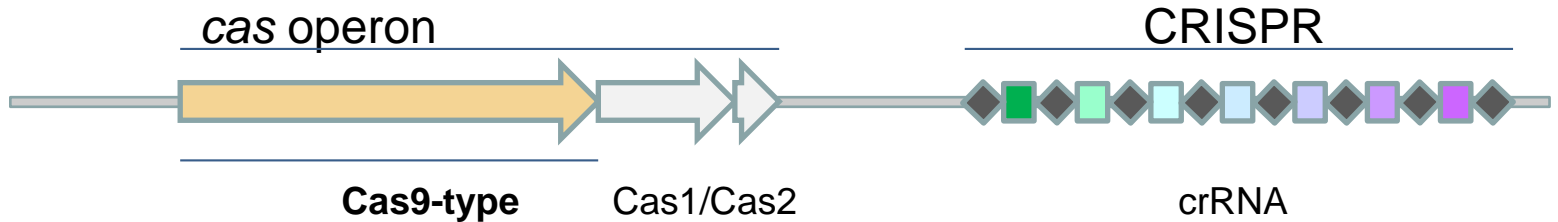
CRISPR-Cas – 2 classes



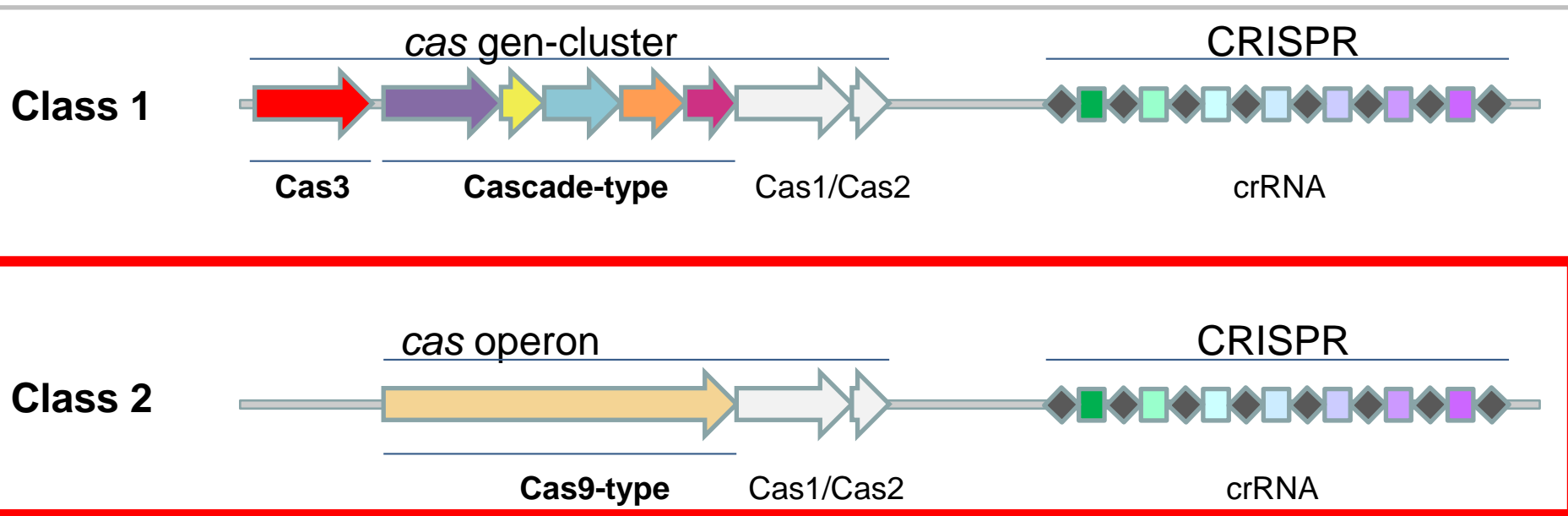
Class 1



Class 2



CRISPR-Cas – 2 classes

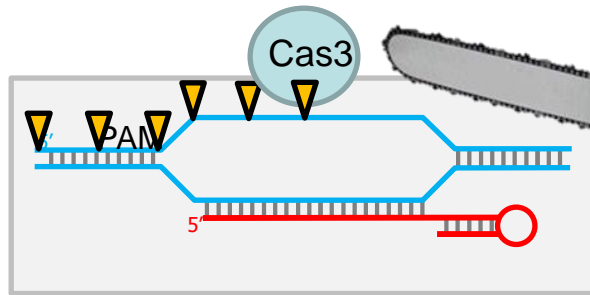


CRISPR-Cas – DNA editing



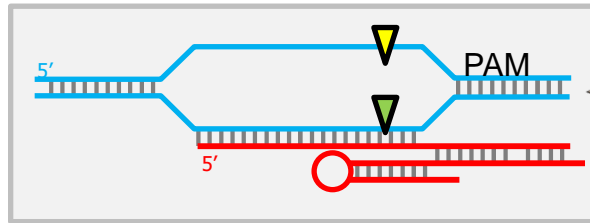
Class-1

Type I
Cascade

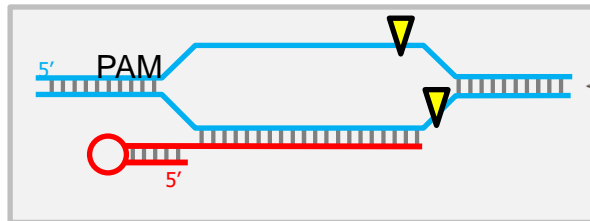


Class-2

Type II
Cas9



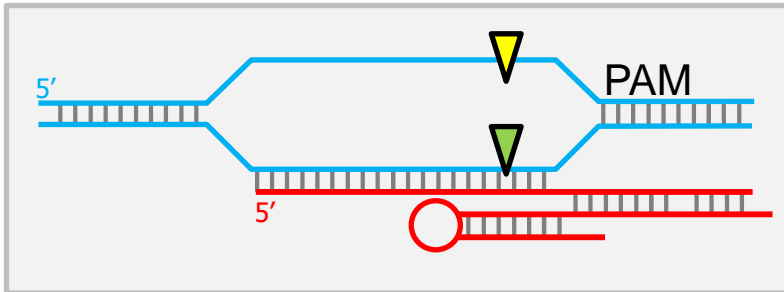
Type V
Cas12a



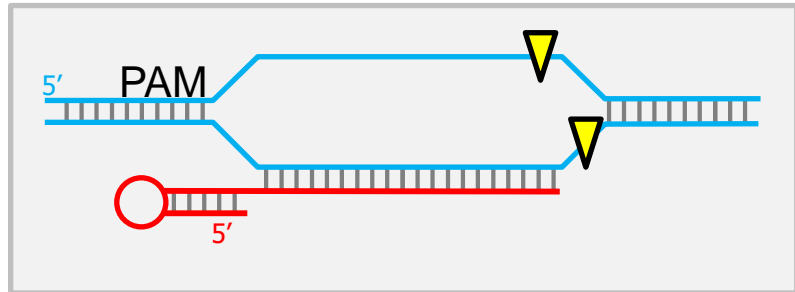
CRISPR-Cas – DNA editing



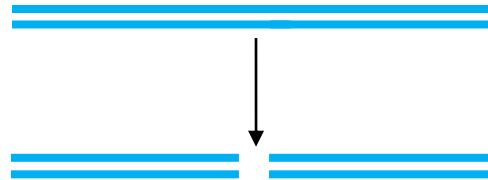
CRISPR-Cas9



CRISPR-Cas12



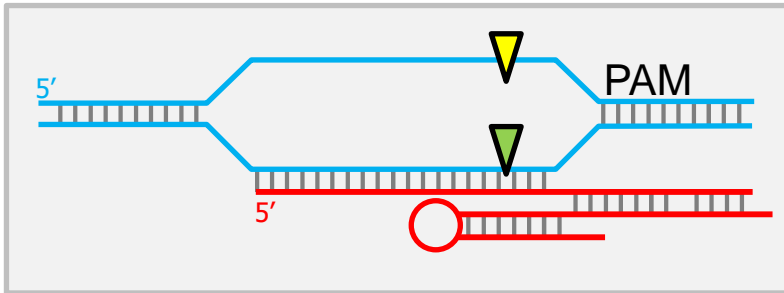
specifieke knip door Cas9 / Cas12



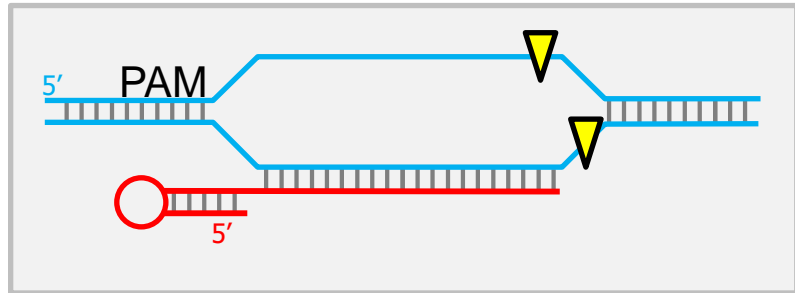
CRISPR-Cas – DNA editing



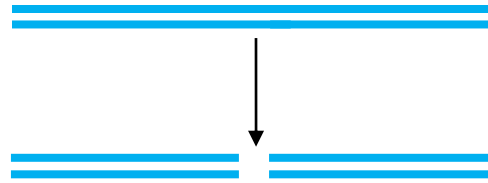
CRISPR-Cas9



CRISPR-Cas12



specifieke knip door Cas9 / Cas12



niet-homologe reparatie

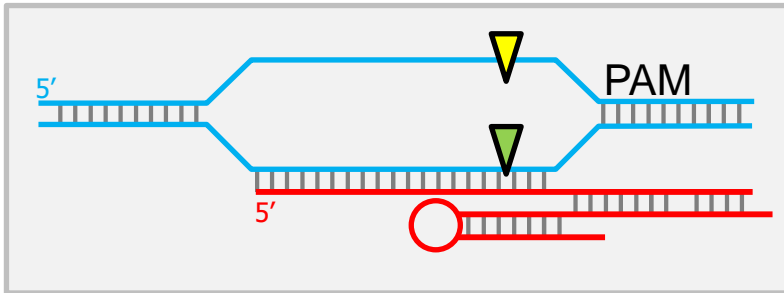


gen inactivatie

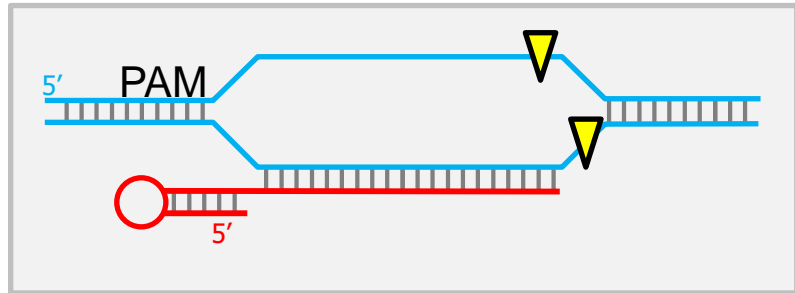
CRISPR-Cas – DNA editing



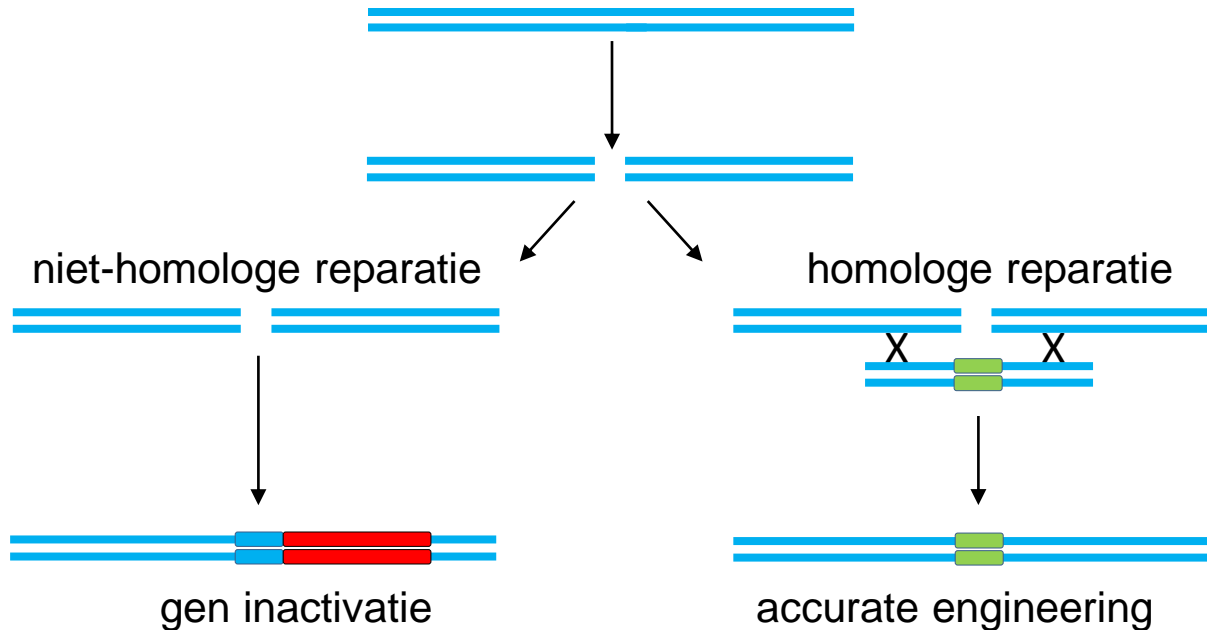
CRISPR-Cas9



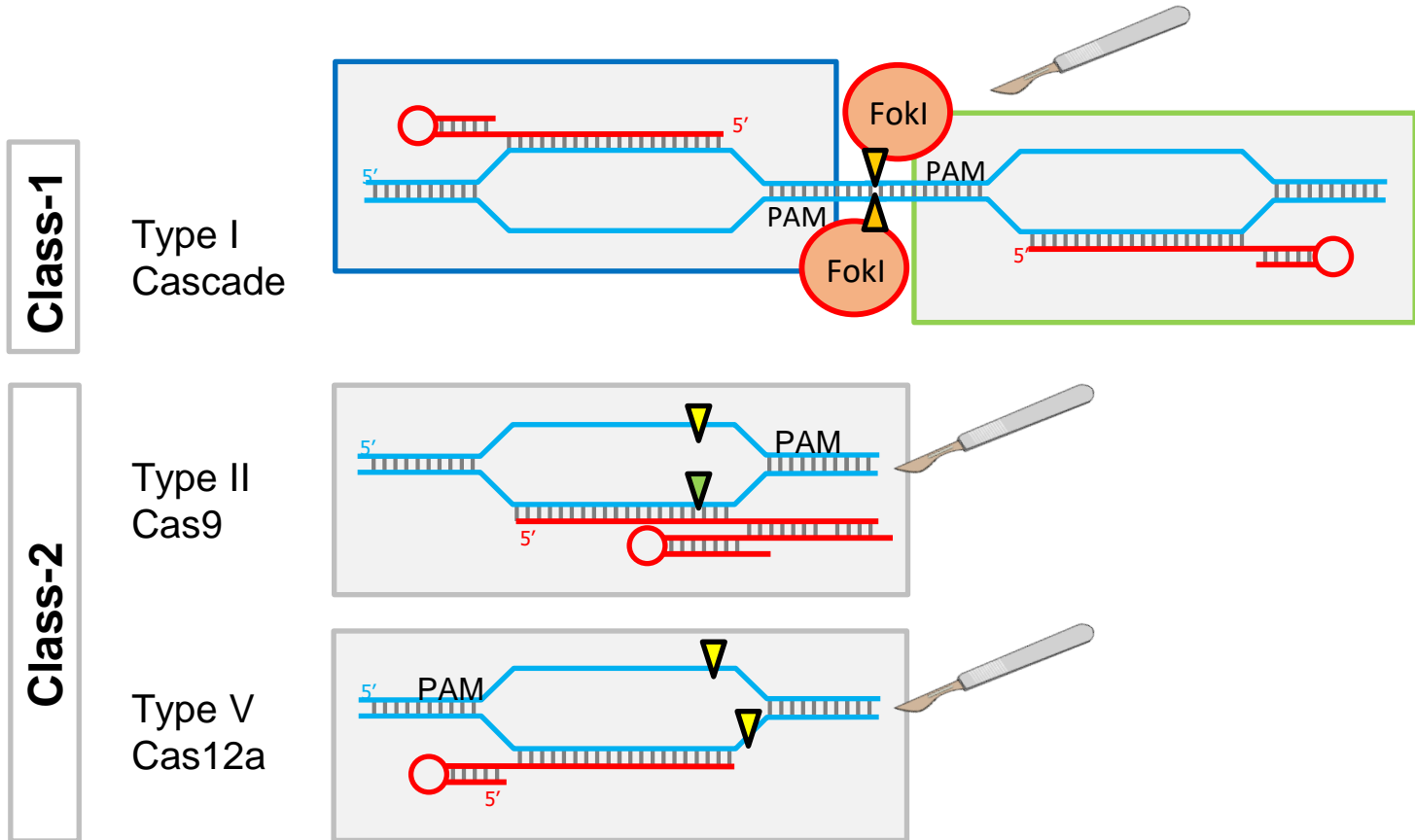
CRISPR-Cas12



specifieke knip door Cas9 / Cas12



CRISPR-Cas – DNA editing



conclusies (4)



- CRISPR-Cas wordt nu gebruikt in biotechnologie (bacteriën, gisten, algen, planten)
- Clinical trials lopen om met CRISPR-Cas humane genetische ziekten te genezen

brede discussies over grenzen van genome editing

(veiligheid & ethiek)

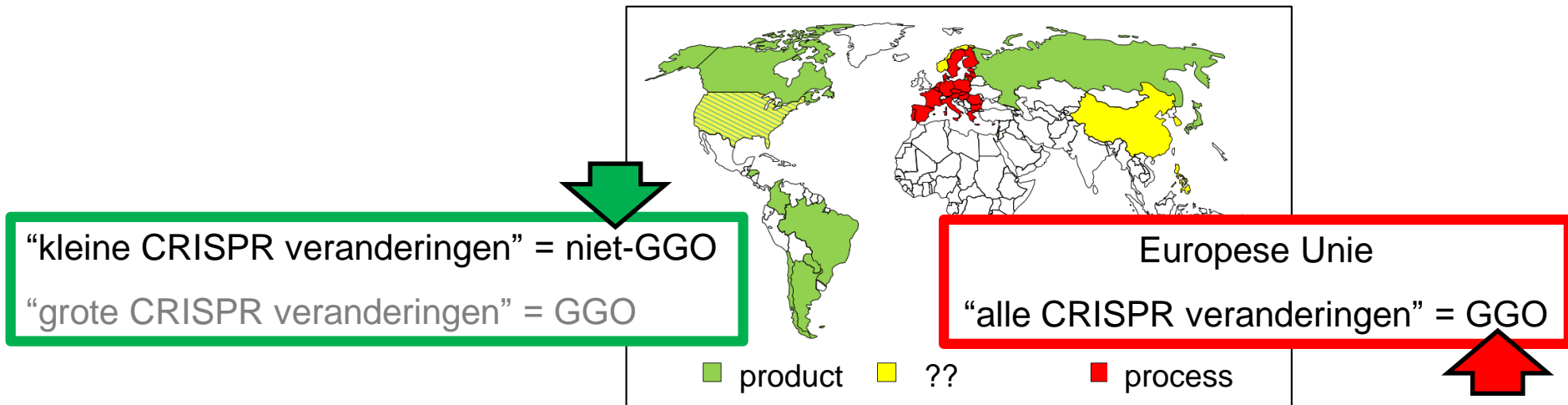


- inleiding DNA, RNA & eiwit
- CRISPR ontdekking bacteriën, virussen & immuniteit
- CRISPR mechanisme zoeken & knippen
- CRISPR toepassingen mutatie & reparatie
- ➔ CRISPR voedsel is dat gevaarlijk ?

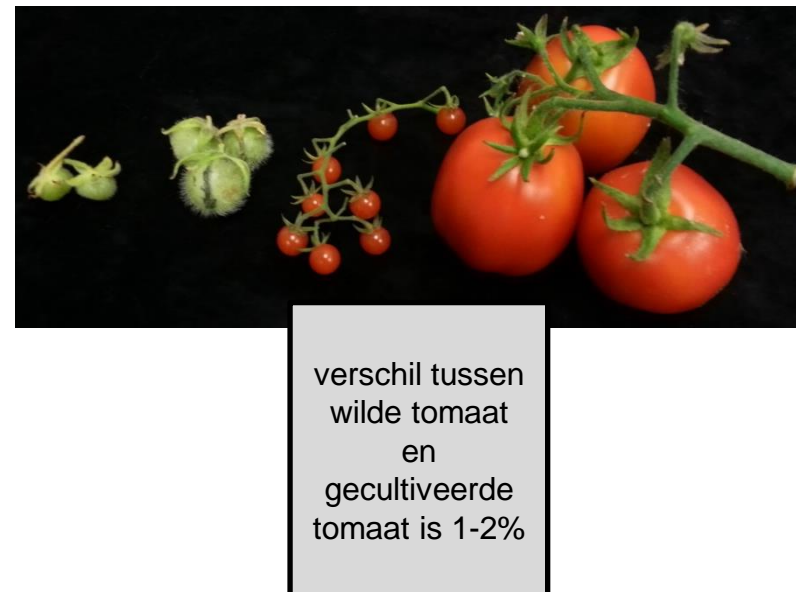
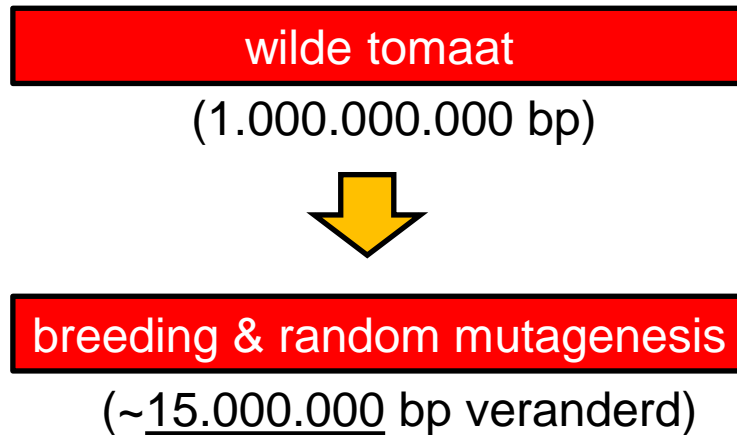
GGO/GMO discussie



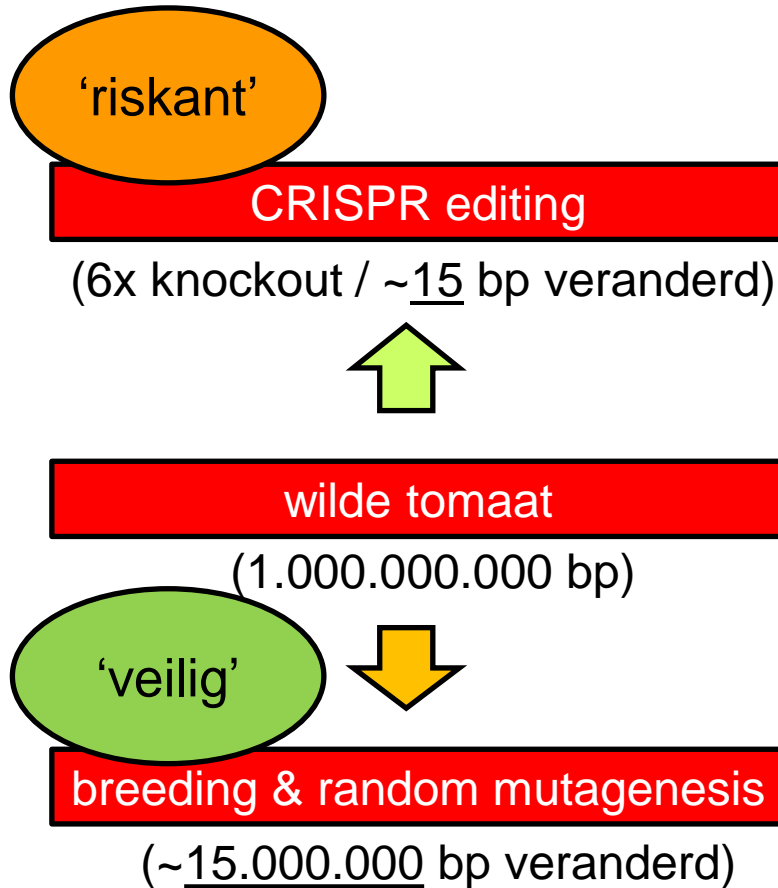
- **GGO regels & veiligheidstesten** uitgevoerd bij **grotere genetische veranderingen**
(*uitwisseling van genen tussen verschillende soorten, bijv. van bacterie naar plant*)
- **GGO regels zouden niet nodig moeten zijn** als product lijkt op natuurlijk product
(*kleine veranderingen: gen uitschakelen & uitwisseling van genes binnen soort*)



veiligheid – klassieke mutagenese / CRISPR



veiligheid – klassieke mutagenese / CRISPR



(mijn) conclusies (5)



- **GGO regels & veiligheidstesten** uitgevoerd bij **grotere genetische veranderingen**
(uitwisseling van genen tussen verschillende soorten, bijv. van bacterie naar plant)
- **GGO regels zouden *niet* nodig moeten zijn als product lijkt op natuurlijk product**
(kleine veranderingen: gen uitschakelen & uitwisseling van genes binnen soort)
- Discussie over veiligheid voeren op met **solide (wetenschappelijke) argumenten**
- “Noorwegen model” - genome editing alleen indien **veilig & goed voor samenleving**
- Streven naar **compromis tussen voor & tegenstanders** van genome editing
*(hun **doel is gelijk**: duurzame productie van voldoende voedsel, ook in toekomst)*

maar wat vinden jullie er zelf van ?



evaluatie van EU besluit CRISPR
= GGO/GMO, gebaseerd op
wetenschappelijke argumenten

Statement by the Group of Chief Scientific Advisors

A Scientific Perspective on the Regulatory Status of Products Derived from Gene Editing and the Implications for the GMO Directive

On 25 July 2018, the Court of Justice of the European Union ('the Court') decided that organisms obtained by the new techniques of directed mutagenesis are genetically modified organisms (GMOs), within the meaning of the Directive 2001/18/EC on the release of genetically modified organisms into the environment ('GMO Directive')^{1,2}, and that they are subject to the obligations laid down by the GMO Directive.

New techniques of directed mutagenesis include gene editing such as CRISPR/Cas9 methodologies. The legal status of the products of such techniques was uncertain, because it was unclear whether they fell within the scope of the GMO Directive.

These techniques enable the development of a wide range of agricultural applications and the ethical, legal, social and economic issues of their use are discussed intensively. The European Commission's Group of Chief Scientific Advisors (the 'Chief Scientific Advisors')³ recognises the complex nature

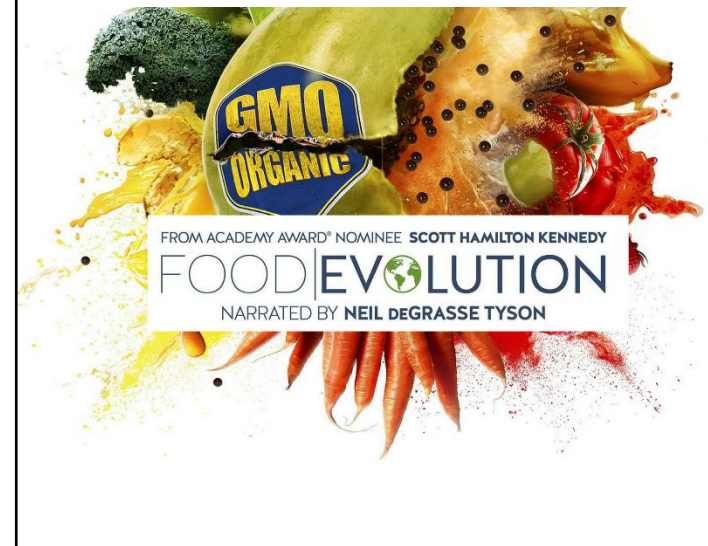
Biotechnology' (SAM, 2017a), we have examined the GMO Directive taking into account current knowledge and scientific evidence.

1. The Ruling of the Court of Justice

On request by the French *Conseil d'État*, the Court was asked to determine whether organisms obtained by mutagenesis⁴ should be considered GMOs and which of those organisms are exempt according to the provisions of the GMO Directive. In particular, the Court was asked to determine whether organisms obtained by new directed mutagenesis techniques are exempt from the obligations imposed by the GMO Directive, as are those obtained by conventional, random mutagenesis techniques that existed before the adoption of the Directive, or are regulated like those obtained by established techniques of genetic modification (ETGM).

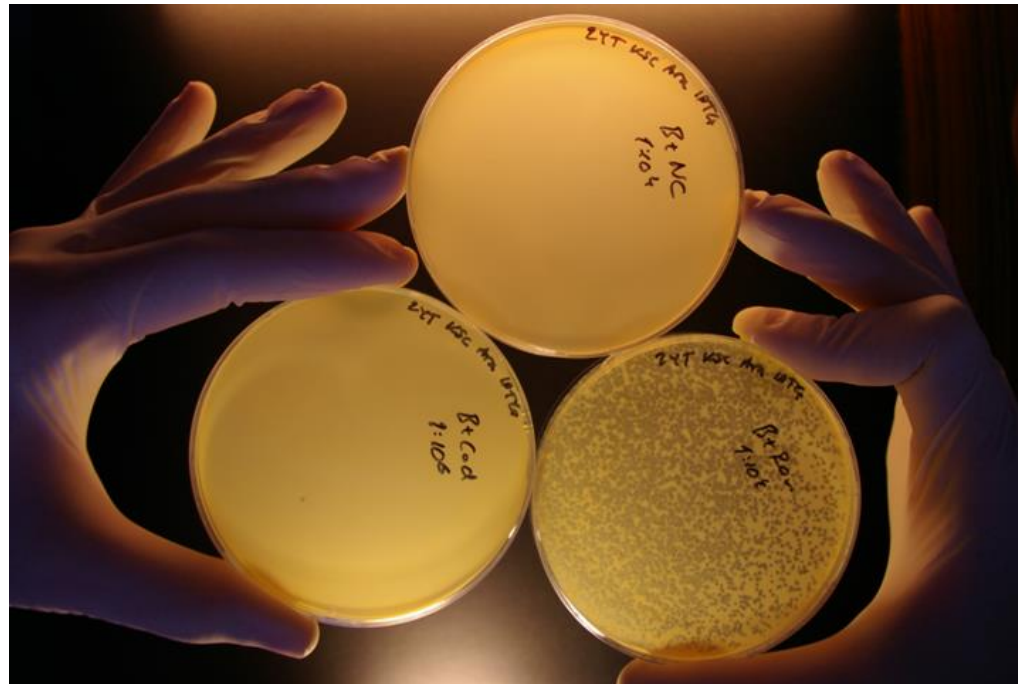
The Court declared that organisms produced by

documentaire over
organisch & GG/GM
voedsel



CRISPR-Cas

hoe werkt het, en wat kunnen we ermee ?



John van der Oost

Laboratory of Microbiology
Wageningen University

