

Seminararbeit

DIY-CRISPR Kit – pädagogische Möglichkeit?

Von Marie von Egloffstein

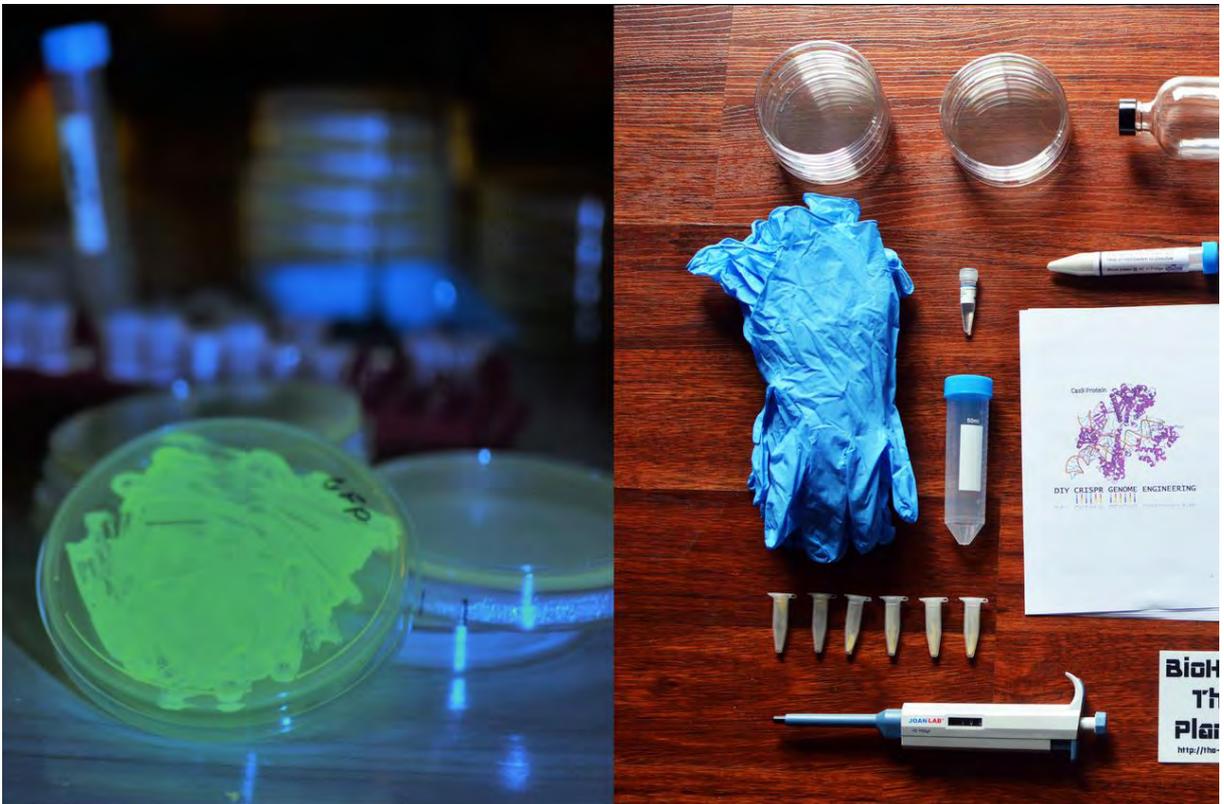


Abb. 1

KURZFASSUNG

Ein Experimentier-Kit um Laien das Thema Gentechnik und insbesondere die CRISPR/Cas9 Methode praxisnah beizubringen? Das Unternehmen „The Odin“ bietet genau das unter dem Namen „Bacterial CRISPR and Fluorescent Yeast Combo Kit“ an. Mithilfe zweier Versuche werden einerseits Hefekulturen zum Leuchten gebracht (Engineer Any Yeast to Fluoresce) und können andererseits E. coli Bakterien antibiotikum-resistent gemacht werden (DIY CRISPR Genome Engineering). Ziel dieser Arbeit war, das Kit auf seine Tauglichkeit als Lehrmittel im Unterricht zu prüfen. So musste festgestellt werden, dass das Kit aufgrund zahlreicher Mängel bezüglich des Equipments, der Anweisungen, der Qualität sowie der Möglichkeit damit an Schulen zu arbeiten, in seinem jetzigen Zustand nicht im Biologieunterricht eingesetzt werden kann.

GLIEDERUNG

1. EINLEITUNG
2. HINTERGRUNDINFORMATIONEN UND RECHTLICHE VORSCHRIFTEN
3. VERSUCH 1 – „ENGINEER ANY YEAST TO FLUORESCENCE“
 - 3.1 Geplanter Versuchsaufbau
 - 3.2 Voraussichtliches Ergebnis
 - 3.3 Erklärung
 - 3.4 Schwierigkeiten beim Versuch
 - 3.5 Ergebnis
4. VERSUCH 2 – „DIY CRISPR GENOME ENGINEERING“
 - 4.1 Geplanter Versuchsaufbau
 - 4.2 Voraussichtliches Ergebnis
 - 4.3 Erklärung
 - 4.4 Schwierigkeiten beim Versuch
 - 4.5 Ergebnis
5. FAZIT
6. DANKSAGUNG
7. LITERATURVERZEICHNIS
8. BILDVERZEICHNIS
9. ANHANG

1. EINLEITUNG

Nach einer Klage mehrerer gentechnikkritischer Lobbygruppen in Frankreich, musste nun der europäische Gerichtshof zu Rate gezogen werden. Grund der Klage waren Zweifel an einer Einschätzung der dortigen Behörde, dass Gentechnikpflanzen ohne fremdes Erbgut wie Züchtungen zu behandeln seien [1]. Somit ist das Thema der Gentechnik und insbesondere der CRISPR-Methode, welche kein fremdes Erbgut benötigt, wieder zur Sprache gekommen. Dabei ist das Thema Gentechnik eigentlich gar nicht so neu. Denn Forscher verfügen schon seit den 1970er Jahren über Werkzeuge, um die Genome von Lebewesen zu ändern, jedoch waren diese Methoden lange Zeit aufwändig, kostspielig und ungenau. Nun erweist sich jedoch ein neues Verfahren namens CRISPR/Cas9 in der Gentechnik als revolutionär. Die Wissenschaftler um Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna machen sich einen Immunabwehrmechanismus bei Bakterien zu Nutze, wodurch Gentechnik schneller, billiger und weniger kompliziert als frühere Techniken geworden ist. Deren Forschungsergebnisse wurden 2012 veröffentlicht. Bereits jetzt entwickeln Unternehmen kommerzielle Anwendungen für CRISPR/Cas9, etwa neue Therapieverfahren für Krankheiten wie Aids oder Schizophrenie. Durch die Einfachheit der Methode befürchten Ethiker allerdings schon jetzt unkontrollierbare Folgen [2].

Um Laien die Angst vor dem unbekanntem Bereich Gentechnik zu nehmen und erste Grundlagen ebendieser Gentechnikmethode nahezubringen, wird von einem in Amerika ansässigen Unternehmen ein Experimentierbaukasten angeboten. Dieser soll zu Hause verwendbar sein und alle notwendigen Materialien für zwei Versuche enthalten. Dies klingt zunächst wie eine tolle pädagogische Möglichkeit, um auch Schülern praxisnah Grundlagen der Gentechnik – die Teil des Lehrplans der 11. Klasse ist - zu vermitteln. Auch wissenschaftliches Arbeiten könnte so erlernt werden.

Somit stellt sich die Frage, ob ein solcher Baukasten wirklich eine Bereicherung für Lehrer und Schüler und für das Arbeiten an Schulen geeignet wäre.

2. HINTERGRUNDINFORMATIONEN UND RECHTLICHE VORSCHRIFTEN

Das Kit „Bacterial CRISPR and Fluorescent Yeast Kombo Kit“ ist über die Internetseite des Herstellers, the-odin.com, erhältlich. Mithilfe dieses Kits ist es möglich zwei unterschiedliche Experimente durchzuführen. Zum einen „Engineer any yeast to fluoresce“, wobei Hefekulturen zum Leuchten gebracht werden sollen und „DIY CRISPR Genome Engineering“, womit Bakterien eine Antibiotikum-Resistenz entwickeln sollen. Der Preis liegt bei 209\$ und zusätzlichen 30\$ für den Versand. Besonders zu beachten sind dabei die möglicherweise langen Lagerungszeiten am Zoll, welche durch spezifisches Anmerken bei der Bestellung verhindert werden können. Zusätzlich ist es hilfreich das Kit mithilfe UPS an eine Schule bzw. Forschungseinrichtung verschicken zu lassen, um den Versandprozess weiter zu beschleunigen. Da das Kit Übersee verschickt wird könnte die Qualität des Kits bereits während des Versands gefährdet sein, weil Teile des Kits bei 4° beziehungsweise bei -20° gelagert werden müssen und sonst verderben können. Des Weiteren muss man sich auf eine Wartezeit von 4-6 Wochen einstellen.

Folgende Liste des Inhalts ist vom Hersteller gegeben und auch in der beigelegten Anleitung nachzulesen [3,4]:

Inhalt

Yeast Kit [3]

1 - YPD Agar
 1 - YPD Agar containing G418
 1 - 250 mL glass bottle for pouring plates
 1 - 10-100uL professional lab grade variable volume adjustable pipette
 1 - Box (96 count) 1-200uL Pipette Tips
 14 - Petri Plates
 1 - Microcentrifuge tube rack
 5 - Inoculation Loops / Plate spreader / Pairs of Nitrile Gloves in plastic bag
 25~ - microcentrifuge tubes
 6 - 1.5mL microfuge tubes containing YPD
 50mL centrifuge tube for measuring liquid volume
 0.75 mL Yeast transformation buffer 40% PEG 8000, 200mM LiAc, 0.1mg/mL Salmon Sperm DNA
 1 - Preengineered strain of Yeast Containing GFP Plasmid on plate (liquid culture in a tube if international)
 1 - UV Filter glasses and blue light
Saccharomyces cerevisiae strain
 Yeast GFP Expression plasmid 100ng/uL

Bacteria Kit [4]

1 - LB Agar
 1 - LB Strep/Kan/Arab Agar (Kan (25 µg/ml), Strep (50 µg/ml) and Arabinose (1mM))
 1 - 250 mL glass bottle for pouring plates
 1 - 10-100uL variable volume adjustable pipette
 1 - Box 1-200uL Pipette Tips
 14 - Petri Plates
 1 - Microcentrifuge tube rack
 Inoculation Loops / Plate spreader / Pairs of Nitrile Gloves in plastic bag
 25~ - microcentrifuge tubes
 6 - 1.5mL microfuge tubes containing LB broth
 50mL centrifuge tube for measuring liquid volume
 1 mL bacterial transformation buffer 25mM CaCl₂, 10% PEG 8000
 Non-pathogenic *E. coli* bacteria
 55uL of 100ng/uL - Cas9 plasmid Kan^r
 55uL of 100ng/uL - gRNA plasmid Amp^r
 55uL of 1mM- Template DNA

Bei beiden Experimenten wird allerdings mit gentechnisch veränderten Organismen, kurz GVO gearbeitet. Dabei muss man sich zuvor einiger Vorschriften bewusst werden. Denn während es in den USA kaum Regelungen zum gentechnischen Arbeiten gibt, unter welches das Experimentieren mit CRISPR-DIY Kits fällt, müssen in Deutschland zahlreiche Vorschriften beachtet werden. Gentechnisches Arbeiten reicht weit über die Erzeugung gentechnisch veränderter Organismen hinaus. Zu den gentechnischen Arbeiten zählen auch die Vermehrung und Verwendung von GVO sowie ihre Lagerung, Zerstörung, Entsorgung und der innerbetriebliche Transport.

Die Durchführung von gentechnischen Arbeiten setzt die Verfügbarkeit von speziell konzipierten Einrichtungen (sogenannte gentechnische Anlagen) voraus. Diese Anlagen erlauben die Anwendung von spezifischen Einschließungsmaßnahmen, um den Kontakt der verwendeten GVO mit Menschen und der Umwelt zu begrenzen und ein dem Gefährdungspotenzial angemessenes Sicherheitsniveau zu gewährleisten [5]. Denn sonst können nach dem Gentechnikgesetz Bußgelder (GenTG §38 1,2), sowie Freiheitsstrafen (GenTG §39 2,1) fällig werden.

Da das Experimentier-Kit GVO enthält, kann mit diesem nur in gentechnischen Anlagen gearbeitet werden von denen es in Bayern 860 gibt (Stand Juni 2018) [6]. Da nur wenige Schulen über ein solches - für Bildungseinrichtungen zusätzlich kostspieliges – Labor verfügen, spricht dies gegen eine Benutzung des Kits an Schulen.

Zusätzlich wurden vor der Durchführung der zwei Versuche des DIY-Kits Probleme mit den Inhalten des Kits festgestellt. So warnt das bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit vor der Verwendung des Do-it-yourself-Gentechnik-Baukastens „The CRISPR Cas 9 Bacterial Genomic Editing Kit“ der Firma The Odin, USA. Denn das LGL hat in diesem Baukasten potenziell krankheitserregende Bakterien der Risikogruppe 2

nachgewiesen, die darin nicht enthalten sein dürften, darunter *Enterococcus faecalis* und *Klebsiella pneumoniae*. Demzufolge sind die im Experimentier-Kit enthaltenen Bakterien pathogen und können nur in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 verwendet werden. Bei Benutzung der vermeintlichen *Escherichia coli* gäbe es ein gesundheitliches Risiko, da die die Krankheitserreger Sepsis, Harn- und Wundinfektionen hervorrufen können [7]. Um dieses Problem zu umgehen, wurde bei diesen hier beschriebenen Experimenten ein *E. coli* K12-Derivat verwendet, weil so in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 gearbeitet werden konnte. Diese Bakterien können dem Menschen nicht gefährlich werden, da sie außerhalb des Labors nicht überlebensfähig sind [8]. Doch auch der Import des Kits dürfte sich mittlerweile schwierig gestalten, da die Einfuhr nur unter Erlaubnis einer zuständigen Behörde gestattet ist [7].

Beide Versuche wurden in einem S1 Labor am Helmholtz Zentrum München im Institut für Experimentelle Genetik (Direktor Prof. Dr. Martin Hrabě de Angelis) in der Arbeitsgruppe Functional Genetics (Leitung Dr. Gerhard Przemeck) durchgeführt.

3. VERSUCH 1 – „ENGINEER ANY YEAST TO FLUORESCENCE“

3.1 Geplanter Versuchsablauf – Versuch 1

Für den ersten Versuch wird zunächst die Durchlässigkeit oder sog. Permeabilität der Hefezellwände erhöht, sodass die Zellen die fremde DNA annehmen. Dafür wird den Hefezellen ein Yeast Transformation Mix beigemischt, der Polyethylenglycol (PEG), Lithiumacetate und Single Stranded (SS) Carrier DNA enthält. Daraufhin werden diesem Mix Abschnitte grün fluoreszierender Proteine (GFP) und YPD (yeast extract peptone dextrose – ein Wachstumsmedium für Hefe) hinzugefügt [3].

3.2 Voraussichtliches Ergebnis – Versuch 1

Nach zweitägigem Brüten sollten Hefekulturen entstehen, welche auf Anregung durch blaues LED-Licht grün fluoreszieren [3].



Abb. 2 erfolgreiches Experiment laut The Odin

3.3 Erklärung – Versuch 1

Für den Versuch wird der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, der allgemein unter dem Namen Backhefe bekannt ist [3]. Dieser Hefestamm gilt als eukaryotischer Modellorganismus und ist in der Gentechnik sehr beliebt, da sein Genom vollständig sequenziert ist [9]. Somit ist die vollständige Zusammensetzung dieser DNA bekannt und es könnten gezielte Änderungen herbeigeführt werden. Durch die Zugabe eines Mix von Chemikalien und Salzen wird die Permeabilität der Zellwände erhöht, sodass diese durchlässiger werden und die fremde DNA annehmen. Dieser Mix besteht aus:

- 40% Polyethylenglycol 8000; Es spielt zahlreiche Rollen während der Umwandlung, es schirmt die negativ geladene DNA ab, hilft der DNA in die Zelle und macht die Zellmembran poröser.
- 100mM Lithiumacetat, von dem man annimmt, dass es die negativ geladene DNA abschirmt und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sie in die Hefezelle eindringt.
- Single Strand Carrier DNA hilft der DNA in Form von isolierten Plasmiden in die Hefezelle zu gelangen, indem es den Abbau der Plasmide durch Nukleasen verhindert und sich mit der Zellmembran der Hefezellen verbindet [3].

Durch diesen Mix werden die Zellen auf die Zugabe der künstlichen Plasmid DNA vorbereitet, die nun einfach in die Zellen eindringen kann. Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die Informationen für einige Proteine enthalten und sich unabhängig von der DNA im Zellkern der Hefezelle vermehren und von einer Zelle auf die andere übertragen werden können [10]. Im Falle dieses Versuchs wird ein gentechnisch veränderter Hefestamm, der grün fluoreszierendes Protein-Plasmid enthält, den kompetenten Zellen hinzugefügt. Da Plasmide autonom replizierend [11] sind und sich somit selbstständig vermehren können, werden die Plasmide auf die anderen Hefezellen übertragen. Die Zellen nehmen also diese DNA an und durch Hinzufügen YPD's (yeast extract peptone dextrose) werden sie in ihrem Wachstum weiter unterstützt.

Die gewachsenen Hefekolonien haben die DNA erfolgreich angenommen und sich mit der gentechnischen Veränderung der GFP weiter vermehrt [3].

3.4 Schwierigkeiten beim Versuch 1

Die Durchführung der Versuche geschah allerdings nicht ohne weitere Probleme. Neben den zu Beginn schon erörterten Schwierigkeiten einen geeigneten Ort für die Durchführung zu finden, ließen auch weitere Punkte sehr zu wünschen übrig. So war zum einen das Equipment unzureichend. Beispiele dafür sind einerseits eine Glasflasche mit engem Hals, welche laut Anleitung für die Benutzung in der Mikrowelle gedacht ist. Durch den engen Hals wäre es allerdings sehr wahrscheinlich, dass das Gefäß platzt oder es einen Siedeverzug gibt, wovor auch die AG Arbeitssicherheit am Helmholtzzentrum München warnt (siehe Anhang 1). Aus diesem Grund wurde von mir im Labor stattdessen ein Erlenmeyerkolben, welcher eine weit größere Öffnung hat, verwendet. Ein weiteres Beispiel wäre andererseits die mitgelieferte Pipette, welche ein Fassungsvermögen von 10-100µl besitzt. Um die in der Anleitung geforderten 1,5ml zu pipettieren wären so 15 Wiederholungen nötig gewesen. Auch war der wenig vorhandene Hub der Pipette bei eingestellten 10µm zu bemängeln.

Weitere Unklarheiten fanden sich in der Anleitung wieder. Diese ist auf Englisch und somit für den Biologie-Unterricht zunächst nicht geeignet. Da die Arbeitsschritte teilweise nicht sofort verständlich sind, hielt ich es für notwendig mir ein eigenes – deutschsprachiges – Protokoll zu erstellen (siehe Anhang 2). Denn die Reihenfolge der Schritte, sowie die zeitlichen Abfolgen, waren auf den ersten Blick oft nicht ersichtlich. Des Weiteren fehlte in der Anleitung eine Einweisung in steriles Arbeiten, die mir deshalb von Dr. Gerhard Przemeczek gegeben werden musste. Da ich absolut keine vorherige Laborerfahrung vorweisen konnte, war ich als unerfahrene Testperson gut geeignet. So beging ich sogleich den Fehler nicht sofort Handschuhe anzuziehen. Solche und ähnliche Missgeschicke sind unvermeidlich, wenn keine Grundlagen im Bereich steriles Arbeiten vorhanden sind. Ohne eine vorherige Einweisung kann es also leicht zu Verunreinigungen und somit zu unbrauchbaren Ergebnissen kommen. Außerdem waren teilweise ungenaue Angaben in der Anleitung zu finden. So wird zum Beispiel zu Beginn das Anfertigen der Nährböden nur sehr ungenau beschrieben. Die Flasche soll in 30-Sekunden-Intervallen in der Mikrowelle erhitzt werden [3,4], ohne dass eine Energieangabe für die Mikrowelle genannt wird. Auch sind die Zeitangaben nutzlos, da es zu Beginn ca. zwei Minuten bis zum ersten Aufkochen dauert, während später wenige Sekunden reichen. Ein überkochen der Flüssigkeit würde nicht nur für eine Verschmutzung der Mikrowelle führen, es bestünde auch eine akute Verbrennungsgefahr für den Benutzer. Zuletzt wird in der Anleitung komplett auf Kontrollen verzichtet. Somit bleiben die Ergebnisse jedoch fragwürdig und das Arbeiten kann nicht als ein wissenschaftliches bezeichnet werden. Auf Anregung Dr. Gerhard Przemeczek's führte ich auch Kontrollen durch und somit gestalteten sich die Endergebnisse als noch fragwürdiger.

3.5 Ergebnis



Abb. 3 Nährboden; positiv

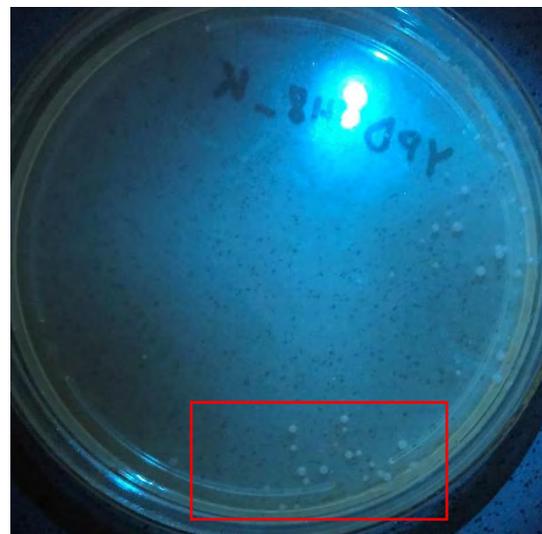


Abb. 4 Nährboden; Kontrolle

Das Endergebnis ähnelt nur sehr entfernt der Abbildung des Ergebnisses von The Odin (Abb.2). Zwar sind sowohl auf der Probe, als auch auf der Kontrolle Hefekulturen gewachsen, jedoch leuchten beide nicht. Dies ist auch auf den Abbildungen der Ergebnisse zu sehen. Diese wurden gemacht, während die Nährböden mit UV-Licht bestrahlt wurden. Da der Kontrolle statt den grün fluoreszierenden Proteinen destilliertes Wasser hinzugefügt wurden, ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Diese Hefebakterien haben das entscheidende Protein, dass sie zum Leuchten bringen soll, nicht erhalten, und können dadurch auch nicht leuchten (Abb.4).

Sonderbar ist allerdings das Ergebnis der Probe selbst, auf der kaum Hefekulturen zu sehen sind, welche auch nicht leuchten (Abb.3). Da ich die Experimente unter Aufsicht von Dr. Gerhard Przemeck durchgeführt habe, ist ein Fehler im Labor nicht ausgeschlossen, aber dennoch unwahrscheinlich. Mögliche Gründe wären so auch Probleme durch den langen Transport, während dem der Inhalt nicht gekühlt wurde oder Probleme mit dem Kit an sich.

4. VERSUCH 2 – „DIY CRISPR GENOME ENGINEERING“

4.1 Geplanter Versuchsablauf – Versuch 2

Escherichia coli (kurz E. coli) Bakterien werden Polyethylenglycol, sowie Calciumchlorid hinzugefügt, um die Zellwände der Bakterien durchlässig zu machen. Daraufhin wird diesen kompetenten Zellen das Cas9 Protein, die guideRNA und Template- oder auch Vorlage-DNA hinzugefügt. Somit sollen die Bakterien streptomycin-resistent werden [4].

4.2 Voraussichtliches Ergebnis – Versuch 2

Nach eintägigem Brüten sollten gentechnisch veränderte Bakterienkolonien als weiß-gelbe Punkte auf einem Nährboden wachsen, der das Antibiotikum Streptomycin enthält [4].



Abb. 5 voraussichtliches Ergebnis des Versuchs 2

4.3 Erklärung – Versuch 2

Die für dieses Experiment verwendeten E. coli Bakterien sind der Sicherheitsstamm K12, der sich weder im menschlichen Darm ansiedeln kann, noch außerhalb des Labors lebensfähig ist [8]. Diese sind aus dem Bestand des Helmholtz Zentrums, während die ursprünglich im Kit enthaltenen Bakterien nicht weiter beschrieben sind und nur als nonpathogen bezeichnet werden. Die benutzten Bakterien sind gramnegativ, was bedeutet, dass die Zellwand aus zwei Membranen und einer dünnen Peptidoglycanschicht besteht [12]. Um diese für die künstliche DNA durchlässig zu machen, werden den E. coli Bakterien wieder Chemikalien und Salze hinzugefügt. Dieser Mix besteht aus:

- 10% Polyethylenglycol 3350, auch wenn nicht belegt ist, welche Rolle PEG 3350 genau spielt, werden folgende Funktionen angenommen: Es schirmt die negative Ladung der künstlichen DNA ab, sodass diese einfacher in die ebenfalls negativ geladene Zellwand

eindringen kann. Außerdem soll PEG 3350 beim Transport der DNA in die Zelle helfen und die Zellwände poröser machen.

- 25mM Calciumchlorid, welches auch die negative Ladung der DNA abschirmt und neutralisiert, um die Wahrscheinlichkeit des Eindringens der DNA in die Zelle zu erhöhen [4].

CRISPR-Cas9 Technik entstand aus einem Abwehrsystem, das Bakterien ein Immunsystem bereitstellt, das anpassungsfähig an Viren und Plasmide ist. Das System hat mehrere Bestandteile. Das Protein Cas9 ist eine Endonuklease, die eine Guide Sequenz aus einem RNA Duplex (tracrRNA und crRNA) benutzt, um Basenpaare zu bilden, die eine bestimmte Ziel-DNA-Sequenz enthalten. Dies erlaubt dem Cas9 Protein die DNA an einer umgebungsspezifischen Stelle doppelsträngig zu schneiden [13].

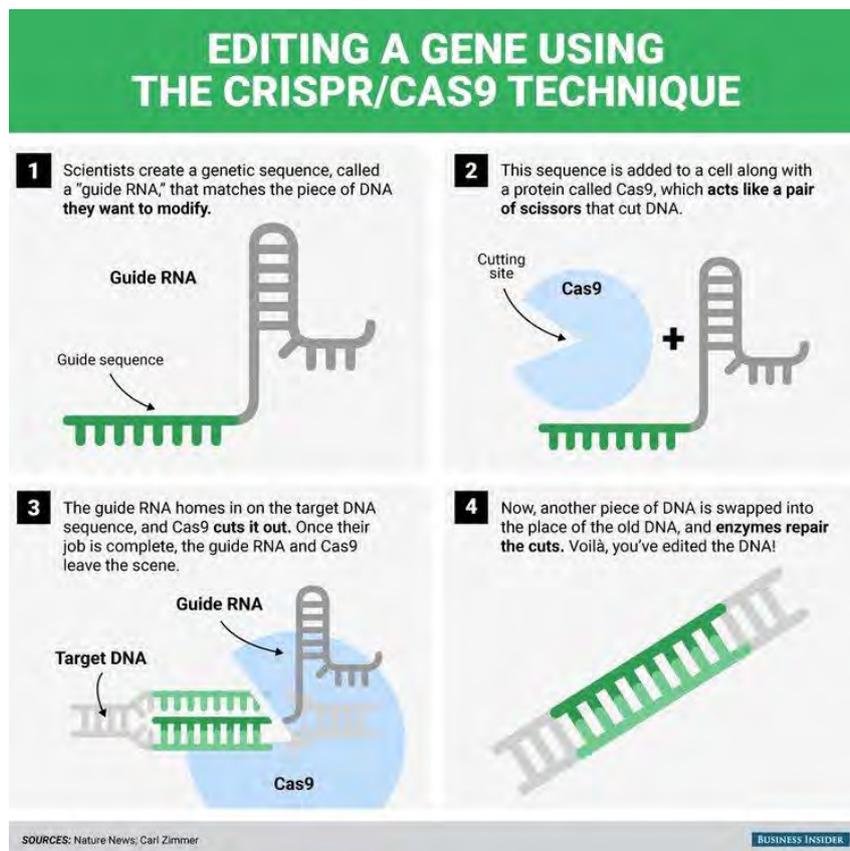


Abb. 6 Graphik der CRISPR/Cas9 Methode

Der RNA Duplex bildet die guideRNA (gRNA). Die tracrRNA verbindet sich mit dem Cas9 Protein und der crRNA, die sich wiederum an die tracrRNA bindet, um somit eine Verbindung zum Cas9 Protein zu haben. Der crRNA Teil passt allerdings vor allem zu dem Teil der DNA des Genoms, der geschnitten werden soll und ist somit das Medium, mit dem das Cas9 Protein erkennt, wo es schneiden soll. Sobald das Cas9 Protein den Schnitt gemacht hat, versucht die Zelle sich wieder selbst zu reparieren. Während dieses Prozesses sucht die Zelle nach einer DNA Vorlage, um herauszufinden, wie es das herausgeschnittene Gen ersetzen soll. Wenn man zu diesem Zeitpunkt die Zelle mit einer Vorlage überflutet, die zwar dem fehlenden Teil ähnlich ist, aber eine Mutation oder Veränderung aufweist, wird die Zelle das für die richtige Kopie des Gens halten und stattdessen die neue Vorlage-DNA benutzen [4].

Hier ist im beigelegten Skript von The Odin ein Fehler enthalten. Darin steht: “ Our template DNA has a single base change from an Adenine (“A”) to a Cytosine (“C”). This change causes the DNA to code for a Lysine instead of a Threonine”. Dabei wurden jedoch Lysin und Threonin vertauscht, was in dem Skript auf The Odin schon ausgebessert wurde. Die Vorlage-DNA hat als eine Änderung in einer Base von Adenin (A) zu Cytosin (C). Dies sorgt, dafür, dass die DNA für Threonin (ACA, ACG, ACU oder ACC) codiert anstatt für Lysin (AAG, AAA).

Dies ist eine Veränderung in einem wichtigen Protein des Bakteriums, die Streptomycin davon abhält, sich mit dem Protein zu verbinden und es zu zerstören. Damit ist es den gentechnisch veränderten Bakterien möglich, auf einem Nährboden mit ebendiesem Streptomycin zu wachsen. Diese sind nun somit dagegen resistent [4].

>rpsL_Ecoli_MG1655 (Codierung der E. coli Bakterien)

```
atgGCAACAGTTAACCAGCTGGTACGCAAACCACGTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTG
CGCTGGAAGCATGCCCGCAAAAACGTGGCGTATGTACTCGTGTATATACTACCACTCCTAAAAAAC
CGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCGTGTTCTGCTGACTAACGGTTTCGAAGTGACTTCCTACAT
CGGTGGTGAAGGTCACAACCTGCAGGAGCACTCCGTGATCCTGATCCGTGGCGGTGCTGTTAAAGA
CCTCCCGGGTGTTCGTTACCACACCGTACGTGGTGCCTTGACTGCTCCGGCGTTAAAGACCGTAA
GCAGGCTCGTCCAAGTATGGCGTGAAGCGTCCTAAGGCTtaa
```

>W542_rpsL_A>C (Codierung der Template DNA)

```
ATACTTTACGCAGCGCGGAGTTCGGTTTTgTAGGAGTGGTAGTATATACACGAGTACAT
```

[14]

4.4 Schwierigkeiten beim Versuch 2

Die zuvor bei Versuch 1 genannten Probleme mit unzureichendem Equipment, ungenauen Angaben und einer fehlenden Sicherheitseinweisung treffen auch auf diesen Versuch zu. Weitere Probleme gab es wie zuvor schon erläutert mit den im Kit mitgelieferten E. coli Bakterien. Denn das bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit warnte schon im März 2017 vor speziell diesem Baukasten. So wurden im Baukasten, statt den vom Hersteller angegebenen Escherichia Coli Stamm eine Mischung aus verschiedenen potenziell krankheitserregenden Bakterien der Risikogruppe 2 festgestellt. Somit ist es Privatpersonen gar nicht gestattet diese einzuführen (IfSG §44) [7]. Des Weiteren konnte während des Versuchs ein Fremdkörper und somit Verunreinigungen in der guideRNA festgestellt werden. Ein weiterer Punkt, bei dem das sterile Arbeiten von der Anleitung nicht eingehalten wurde, war die Anweisung, die bestrichenen Platten 10 Minuten geöffnet an der Luft trocknen zu lassen [4]. Da es in diesem Versuch darum ging, streptomycin-resistente Bakterien auf den Böden wachsen zu lassen, war auch dies eine deutliche Verfälschung der Ergebnisse. Denn durch die Luft könnten die Böden mit anderen streptomycinresistenten Bakterien in Verbindung kommen. Diese begannen dann zu wachsen und somit wären die festgestellten Kulturen auf den Böden nicht zwangsläufig die während des Versuchs gentechnisch veränderten E. coli Bakterien.

4.5 Ergebnis – Versuch 2

Aufgrund eines Fehlers meines Ansprechpartners im Labor, lassen auch die Ergebnisse zum zweiten Versuchs zu wünschen übrig. Denn die vom Helmholtzzentrum bereitgestellten „One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli“ waren vom folgenden Genotyp [15]:

```
F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697
galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ-
```

Hier ist im roten Kasten die Streptomycin-Resistenz schon zu erkennen. Somit sind die Ergebnisse des Versuchs unbrauchbar, da eine Mutation nicht notwendig ist, damit die Bakterien auf den streptomycin-haltigen Böden wachsen. Denn sie sind von vornherein schon resistent. Die Ergebnisse sind somit den - nach dieser Information – Erwartungen entsprechend.

Auf allen Böden sind zahlreiche Bakterienkolonien gewachsen, zu erkennen als „weiß-grauer Film“ auf den Platten. Dies beschränkt sich nicht nur auf die positiven Ergebnisse (Abb.8;10), also die der Versuche, die exakt nach Anleitung gemacht wurden. Auch die Kontrollversuche weisen als Ergebnis ein starkes Wachstum der E. coli Bakterie auf den Platten auf (Abb.7,9). Und dies sowohl auf den Nährböden ohne, wie auch auf denen mit Streptomycin. Bei den Kontrollen wurden die Anweisungen wie bei den positiven Versuchen befolgt. Einzig anstatt der guideRNA wurde die gleiche Menge reines Wasser hinzugefügt.



Abb. 7 Boden mit Streptomycin; Kontrolle



Abb. 8 Boden mit Streptomycin; Positiv



Abb. 9 Boden; Kontrolle

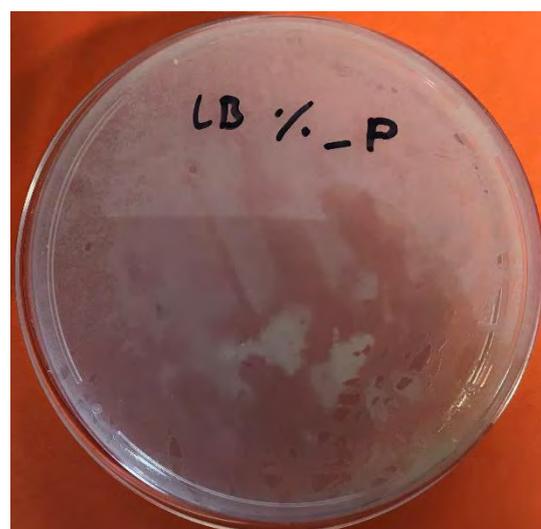
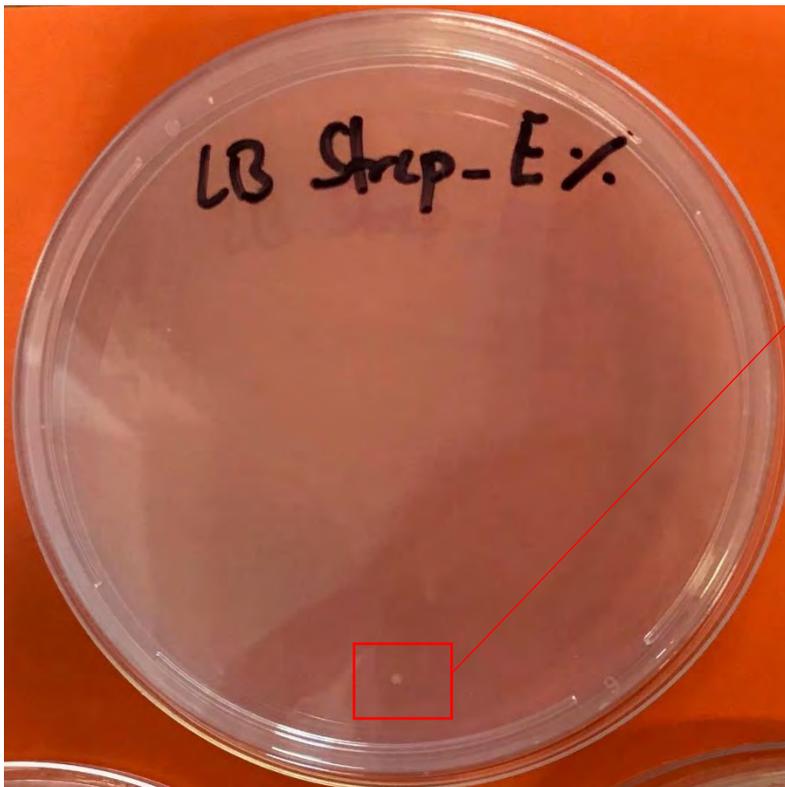


Abb. 10 Boden; Positiv

Einzig das Ergebnis des Nährbodens mit Streptomycin auf dem der ursprüngliche Wildtyp des *E. coli* Bakteriums ausgestrichen wurde, zeigt ein unerwartetes Ergebnis. Denn obwohl der Wildtyp resistent ist, ist auf dem Nährboden nur eine einzige *E. coli* Kultur zu sehen. Eine mögliche Erklärung wäre ein Fehler beim Ausstreichen oder eine nicht vorhandene Resistenz gegen das andere, im Nährboden neben Streptomycin enthaltene, Antibiotikum Kanamycin [4]. Die *E. coli* Bakterien, denen destilliertes Wasser hinzugefügt wurde, wachsen vermutlich trotzdem auf dem Streptomycin-Kanamycin-Boden, da sie durch die Wärme- und Kältebehandlung im Laufe der Prozedur genug Zellstress erfuhren, um zumindest teilweise zu mutieren.



Einzig eine *E. coli* Kolonie ist beim Wildtyp zu erkennen.

Abb. 11 Boden mit Streptomycin; Wildtyp

5. FAZIT

Laut Rüdiger Trojok, einem Biowissenschaftler, sind CRISPR Baukästen „wichtige Instrumente für Auszubildende und Wissenschaftsinteressierte“. Auch wurden mithilfe des Biohackings schon zahlreiche Start-Up Unternehmen gegründet [16]. Dennoch sprechen zahlreiche Argumente gegen diesen speziellen Baukasten. So sind nicht nur während der Durchführung der Versuche die oben beschriebenen Schwierigkeiten zu bedenken. Auch die fachgerechte Entsorgung der letztendlich Antibiotika-resistenten Bakterien, die im schlechtesten Falle krankheitserregend sind, könnte zu Hause nicht gewährleistet werden. Denn Autoklaven gehören nicht zur Einrichtung eines durchschnittlichen Haushalts. Des Weiteren ist die Seriosität des Unternehmens und der Versuche aufgrund zahlreicher Anweisungen bzw. fehlenden Anweisungen in der Anleitung, doch fraglich.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass sich genau dieser Baukasten aufgrund einiger Mängel im Equipment, der Anleitung etc. so nicht für den Unterricht eignet. Auch Probleme mit einem zulässigen Labor, Schwierigkeiten beim Transport und der Entsorgung sprechen nicht für eine Verwendung des Kits an Schulen. Dennoch halte ich das Prinzip eines solchen Kits für sinnvoll. In einer Stellungnahme im März 2017 erwähnt die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit noch einen weiteren Baukasten aus Kanada den sog. „Engineer-It“ Kit von AminoLabs.

Allerdings fällt auch dieser nach Einschätzungen der ZKBS unter die Risikogruppe 1 [17]. Dennoch sollte das Thema Gentechnik nicht verteufelt, aber dennoch mit Vorsicht behandelt werden. Ein Experimentierkasten mit verbessertem Equipment und einem gekühlten Transport für Teile des Kits, sowie einer genaueren Anleitung mit Sicherheitsanweisung wäre trotz allem realisierbar, jedoch wahrscheinlich nicht in der jetzigen Preisklasse.

Auch das Urteil des europäischen Gerichtshofs fiel insgesamt kritisch aus: Die veränderten Pflanzen müssen nun als GVO gekennzeichnet werden und umfassende Prüfungen bestehen. Somit wird der Weg für den breiten Einsatz des CRISPR-Verfahrens blockiert [1].

6. DANKSAGUNG

Das Thema der vorliegenden Arbeit geht auf eine Idee des Dipl.-Ing. Rolf-Dieter Klein zurück, welcher mich auch bei der Konzeption meines Arbeitens und der Organisation des Labors tatkräftig unterstützte. Des Weiteren möchte ich mich besonders bei meinem Seminarlehrer am Ignaz-Günther-Gymnasium, Herrn Dr. Grillenbeck, der stets ansprechbar war und mich voll und ganz unterstützt, sehr herzlich bedanken. Und auch bei Frau Broll vom Ignaz-Günther-Gymnasium, die mir beim Schreiben meiner Arbeit eine große Hilfe war. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Christoph Hoeschen von der Otto von Guericke Universität in Magdeburg für seinen tatkräftigen Einsatz bei der Suche nach einem Labor bedanken. Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Hrabě de Angelis, Direktor des Institute of Experimental Genetics, Helmholtz Zentrum München und Dr. Gerhard Przemec des Institute of Experimental Genetics, beide vom Helmholtz Zentrum, München, für die Unterstützung bedanken, da sie mir ein Labor für die Experimente zur Verfügung stellten. Und bei Dr. Gerhard Przemec für seine persönliche Unterstützung bei meinen Laborarbeiten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] <http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/eugh-blockiert-den-einsatz-neuer-gentechnik-verfahren-a-1220059.html> (30.08.18)
- [2] Spektrum der Wissenschaft kompakt, 02.17, S.8f.
- [3] <http://www.the-odin.com/engineer-any-yeast-to-fluoresce/> (30.08.18)
- [4] <http://www.the-odin.com/crispr-bacterial-guide/> (30.08.18)
- [5] https://www.lgl.bayern.de/rubrikenubergreifende_themen/gentechnik/gentechnische_anlagen_index.htm (30.08.18)
- [6] https://www.lgl.bayern.de/rubrikenubergreifende_themen/gentechnik/gentechnische_anlagen.htm (30.08.18)
- [7] <https://www.lgl.bayern.de/presse/detailansicht.htm?tid=680089> (30.08.18)
- [8] <https://www.roche.de/diagnostics/service-beratung/bluegenes/komponenten-bakterien.html> (31.08.18)
- [9] Ostergaard, Simon, Lisbeth Olsson, and Jens Nielsen. "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiology and molecular biology reviews* 64.1 (2000): 34-50.
- [10] <http://www.u-helmich.de/bio/cytologie/01/Bakterienzelle.html> (31.08.18)
- [11] D. M. Knipe, Peter M. Howley (Hrsg.): *Fields Virology*. 5. Auflage, Philadelphia 2007. ISBN 0-7817-6060-7
- [12] <http://www.u-helmich.de/bio/lexikon/G/grampositiv-negativ.html> (31.08.18)
- [13] Doudna, Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9." *Science* 346.6213 (2014): 1258096.
- [14] <http://nebula.wsimg.com/c776cfb5c8822245d56f7ad33b3da372?AccessKeyId=53E83E90359C5D19EB04&disposition=0&alloworigin=1> (31.08.18)
- [15] https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/oneshottop10_chemcomp_man.pdf (31.08.18)
- [16] <http://www.3sat.de/mediathek/?mode=play&obj=70680> (31.08.18)
- [17] [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/01_allgemeine_Themen/Do-it-yourself-Kits%20\(2017\).pdf?__blob=publicationFile&v=2](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/01_allgemeine_Themen/Do-it-yourself-Kits%20(2017).pdf?__blob=publicationFile&v=2)

8. BILDVERZEICHNIS

- (1) Abb. 1 [http://cdn3.bigcommerce.com/s-89v4ku3/products/242/images/530/YeastAndCRISPR__60293.1505606101.1280.1280.jpg?c=2 (31.08.18)]
- (2) Abb. 2 erfolgreiches Experiment laut The Odin [<http://www.the-odin.com/engineer-any-yeast-to-fluoresce/> (31.08.18)]
- (3) Abb. 3 Nährboden; positiv [eigenes Bild]
- (4) Abb. 4 Nährboden; Kontrolle [eigenes Bild]
- (5) Abb. 5 voraussichtliches Ergebnis des Versuchs 2 [<http://www.the-odin.com/crispr-bacterial-guide/> (31.08.18)]
- (6) Abb. 6 Graphik der Crispr/Cas9 Methode

[<http://static2.businessinsider.com/image/56392539bd86ef135c8bbe4d-1200-1200/crispr-infographic.jpg> (31.08.18)]

- (7) Abb. 7 Boden mit Streptomycin; Kontrolle [eigenes Bild]
- (8) Abb. 8 Boden mit Streptomycin; Positiv [eigenes Bild]
- (9) Abb. 9 Boden; Kontrolle [eigenes Bild]
- (10) Abb. 10 Boden; Positiv [eigenes Bild]
- (11) Abb. 11 Boden mit Streptomycin; Wildtyp [eigenes Bild]

9. ANHANG

- (1) Gefahr durch Siedeverzug beim Aufkochen von Gelen und Flüssigkeiten
- (2) Protokolle der Versuche 1 und 2

Anhang 1

Information des Sicherheitsingenieurs

Gefahr durch Siedeverzug beim Aufkochen von Gelen und Flüssigkeiten

Aufgrund eines aktuellen Unfalls auf unserem Gelände in Neuherberg möchten wir auf die Gefahr eines Siedeverzuges beim Aufkochen von Gelen und Flüssigkeiten hinweisen.

Am häufigsten tritt der Effekt des Siedeverzuges bei Flüssigkeiten auf, bei denen der so genannte Siedekeim fehlt. Wasser kann auf 110 °C erhitzt werden, ohne dass es zum Sieden und damit der Bildung von Wasserdampfblasen kommt. Dieser Zustand ist metastabil und damit gefährlich, da sich schon bei einer geringen Erschütterung innerhalb kürzester Zeit eine große Gasblase ausbilden kann, die dann schlagartig aus dem Gefäß entweicht. Dies kann das Entweichen der Flüssigkeit zur Folge haben und tritt vor allem in engen, hohen Gefäßen auf. Da beispielsweise flüssige Agarose oder andere Gele stark zum Siedeverzug neigen, gibt man einen Glasröhrchen, Siedesteinchen oder einen Rührfisch in die Gefäße hinzu. Sicherer wie in der Flasche ist das Aufkochen in Erlenmeyerkolben oder Becherglas.

Wenn die Zugabe von Siedesteinchen o.a. vergessen wurde, darf man dies nur nachholen, wenn man absolut sicher ist, dass der Siedepunkt noch nicht erreicht wurde. Zugabe von Siedekeimen in eine bereits überhitzte Flüssigkeit führt zu schlagartigem Sieden.

Eine Erwärmung mit der Gefahr eines Siedeverzuges sollte generell immer mit Schutzkleidung (Laborkittel, Schutzbrille, hitzebeständige Handschuhe) erfolgen. Das Gefäß sollte so verwandt werden, dass auch trotz eines Siedeverzuges keinerlei weitere Schäden hervorgerufen werden (auch überhitztes Wasser ist gefährlich!). Gefäße sind mit ihrer Öffnung daher niemals auf das eigene Gesichtsfeld oder andere Personen zu richten. Beim Herausnehmen des Gefäßes immer geeignete hitzebeständige Handschuhe tragen oder geeignete Zangen o.ä. zum geschützten Herausnehmen verwenden.

Zur Herstellung von Gelen mit einer Konzentration $\geq 3\%$ ist das Erhitzen im kochenden Wasserbad oder im Autoklaven (121°C; 15 Minuten) möglich. Die mechanischen Eigenschaften und die Trennfähigkeit werden dadurch nicht geändert.

Sollte es trotz allem zu einem Notfall kommen,

wählen Sie in **Neuherberg** bitte unseren internen **Notruf 333**

Die **Außenstellen** wählen den **Notruf 112**

Anhang 2

Versuchs-ProtokollVersuch 1

- Vorbereitung/Tag 1
 - Inhalt YPD Media in 250ml Glasflasche
 - 50ml kegelförmiges Röhrchen „For Measuring Liquid“ -> 150ml Wasser hinzufügen
 - Im 30s Takt in der Mikrowelle erhitzen; Flasche nicht komplett zuschrauben, Deckel nur einmal leicht drehen insg. 2-3 min
 - ➔ Bis komplett durchsichtig, ca. 30 min abkühlen lassen, bis so warm, dass man es berühren kann
 - 7 Nährböden, sodass untere Hälfte bedeckt ist -> Deckel drauf abkühlen lassen, von da an überkopf lagern (YPD G418 Nährboden nicht vergessen)
 - Getrocknete Hefe -> Wasser bis zum Rand, dann schütteln bis aufgelöst
 - Mit Pipette 100ul (= 0.1ml) der Hefemischung auf Nährboden; Abstrichöse um Hefe auszustreichen
 - ➔ Über Nacht 12-24h wachsen lassen
- Tag 2
 - 100µl Yeast Transformation Mix in Mikrozentrifugierröhrchen
 - Abstrichöse -> Hefe in YTM bis aufgelöst evtl. mit Pipette mischen -> bis undurchsichtig
 - 10µl „Yeast GFP Expression Plasmid“ mit Pipette notfalls sanft schütteln
 - Röhrchen 1h bei 42°C warmen Wasser brüten lassen
 - 1,5 ml Raumtemperatur-Wasser zu YPD Media in Mikrozentrifugierröhrchen -> schütteln
 - Mit Pipette 900µl YPD Media zur Mischung
 - ➔ 4-6h brüten bei 30°C brüten lassen
 - YPD 418 Nährboden zu Zimmertemperatur aufwärmen
 - 400µl Transformation Mischung darauf austreichen, 10 min trocknen lassen
 - ➔ Nährboden umgedreht 1-3 Tage bei 30°C brüten lassen bis man weiße Punkte sieht
- Tag 3-5
 - Brille + Schwarzlicht => leuchtet

Versuchs-Protokoll

Versuch 2

- Vorbereitung/Tag 1
 - Nährböden s. o.
 - E. coli Bakterien mit Abstrichöse auf Nährboden ausstreichen
 - ➔ 12-18h wachsen lassen
- Tag 2
 - 100ul Transformation Mix in neues Mikrozentrifugierröhrchen
 - Mit Abstrichöse Bakterien abkratzen; in Mix bis leicht undurchsichtig, evtl. mit Pipette mischen (muss in Kühlschrank)
 - 10ul „Cas9 and tracr DNA, 10ul „gRNA“, 10ul „Template DNA“(Pipettenspitze wechseln)
 - ➔ Im Kühlschrank/auf Eis 30min (nicht einfrieren)
 - ➔ 30s in 42°C warmen Wasser
 - 1,5ml Raumtemperatur-Wasser zu LB Media Zentrifugierröhrchen, schütteln
 - 500ul Media zu DNA
 - ➔ 2h bei 30°C, 4h bei Raumtemperatur
 - 200ul auf Zimmerwarmen LB/Strep/Kan/Arab Nährboden
 - Mit Abstrichöse darauf verteilen, 10min trocknen lassen, Deckel drauf
 - ➔ 16-24h umgedreht bei 30°C
- Tag 3-4
 - Weiße Punkte wachsen => Antibiotikumresistente Bakterien