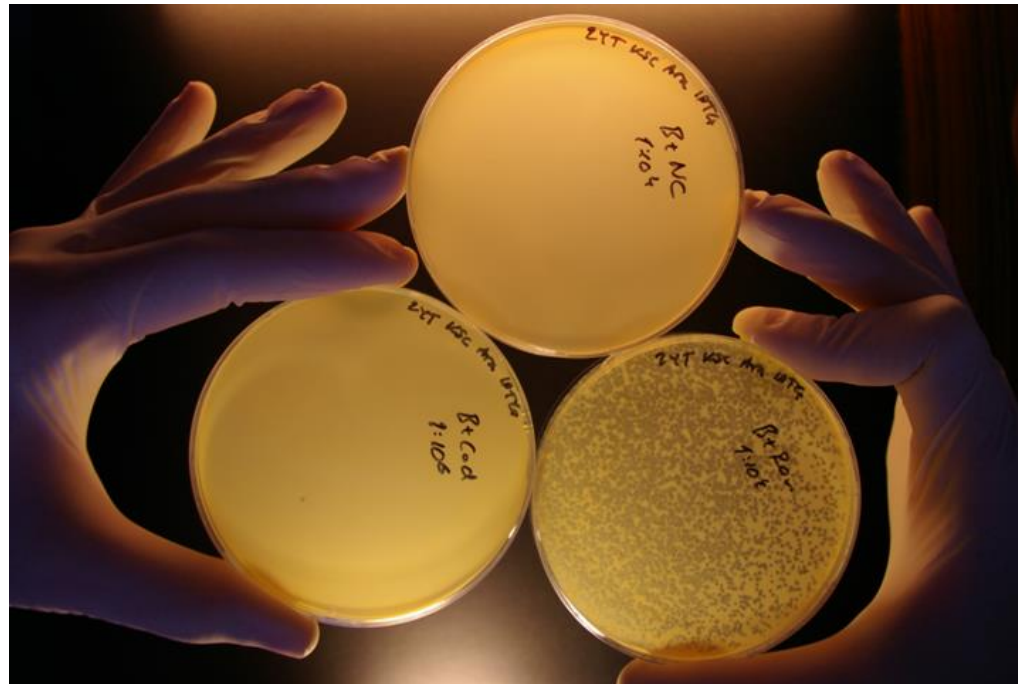


# CRISPR-Cas

*van biologie tot toepassing*



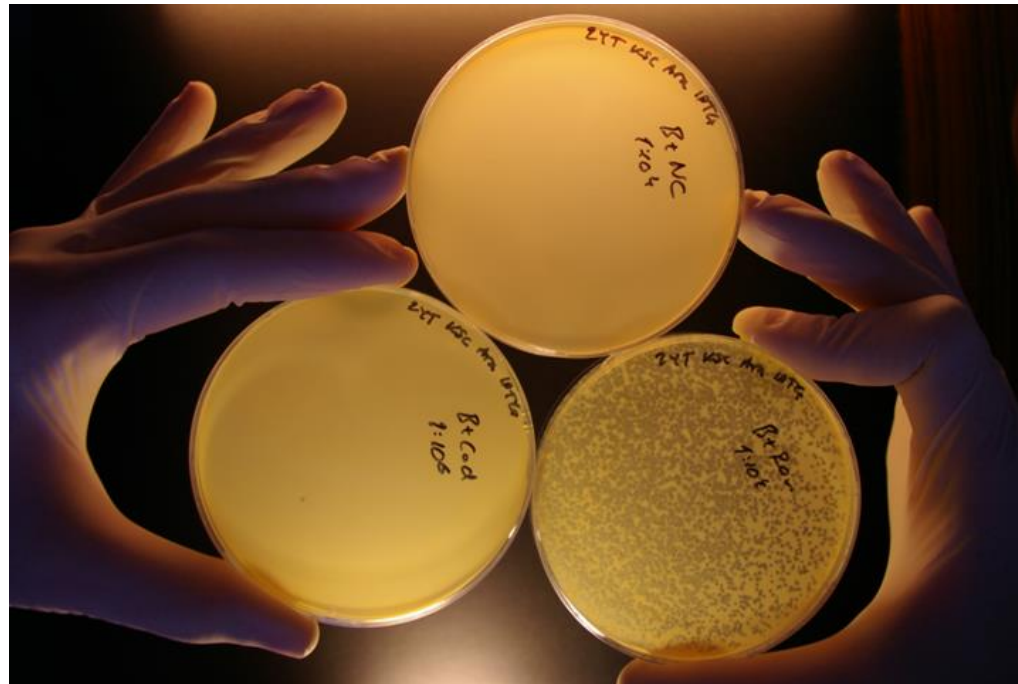
John van der Oost

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)

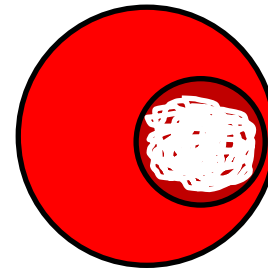
de erfelijke informatie van deze organismen is opgeslagen in het **DNA** op de chromosomen



**bacterie  
cel**

Ø 1-5 µm

**DNA** 3.000.000  
letters  
(baseparen, bp)

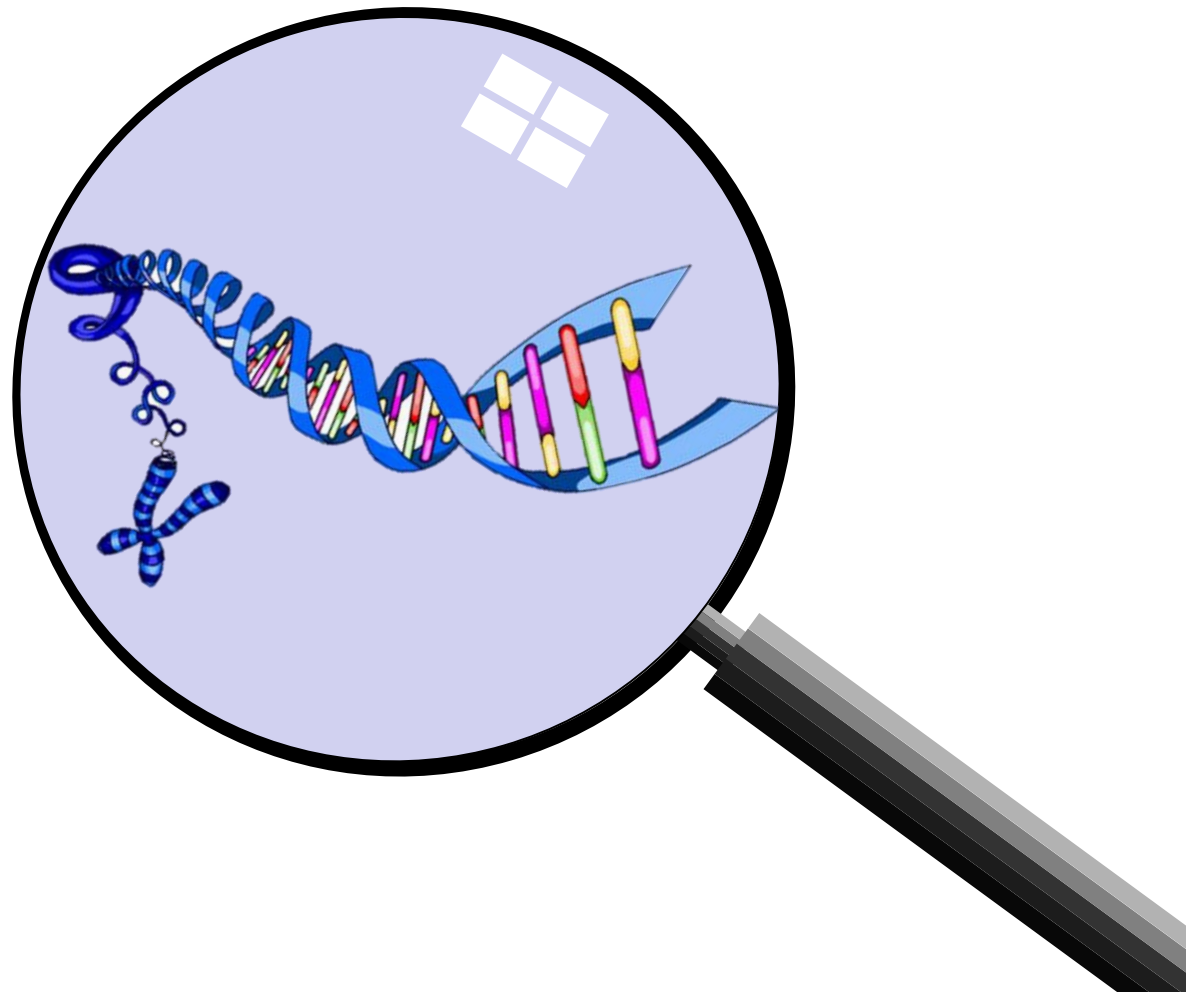


**planten / dieren  
cel**

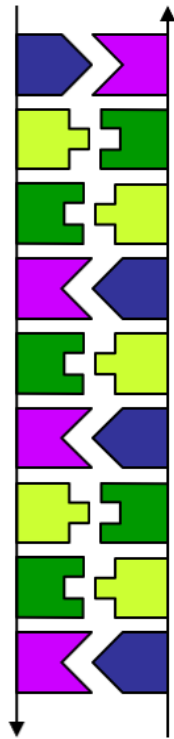
50-100 µm

3.000.000.000  
letters  
(bp)

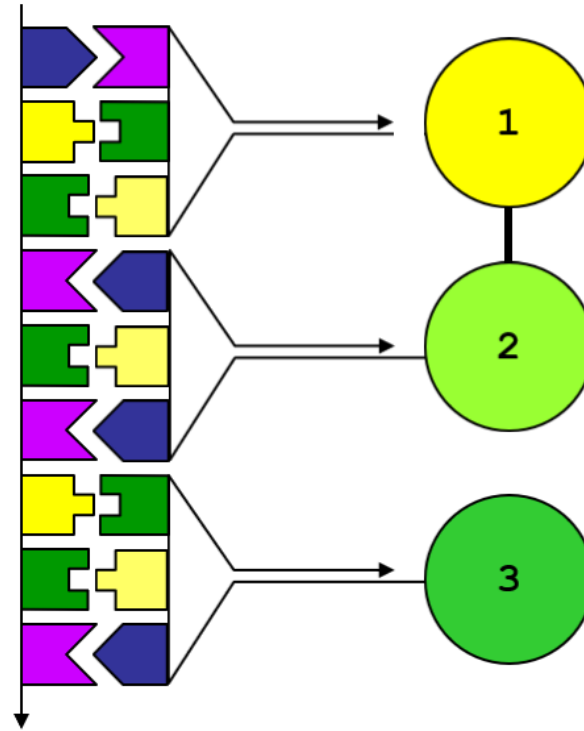
# cellen & DNA



# DNA > RNA > eiwit



DNA



mRNA

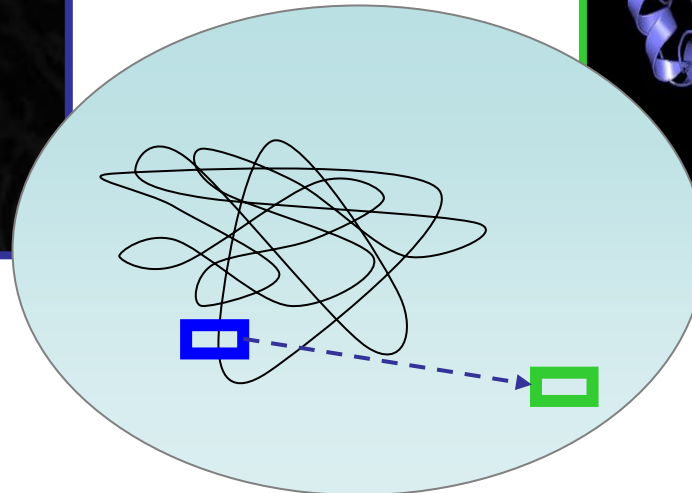
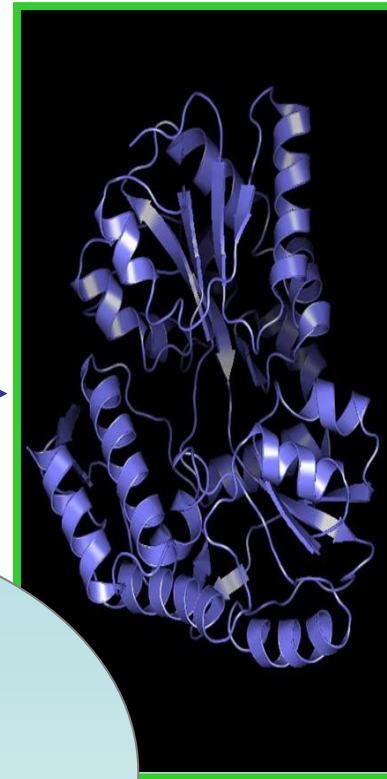
tRNA-aminozuur

# DNA > RNA > eiwit



informatie - opslag

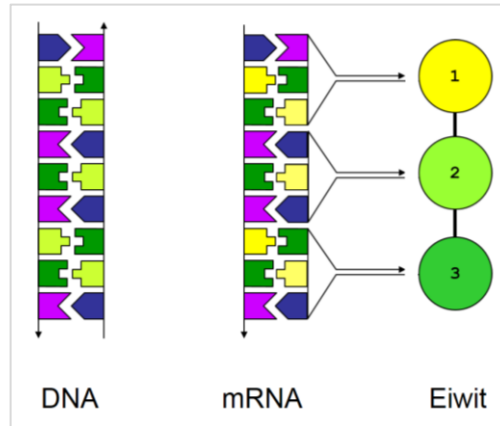
biologische functie



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,  
soms is dat positief (evolutie), maar soms ook negatief (genetische ziekten)





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

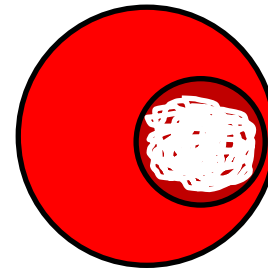
# virussen zijn afhankelijk van cellen



**virus**



**bacterie  
cel**



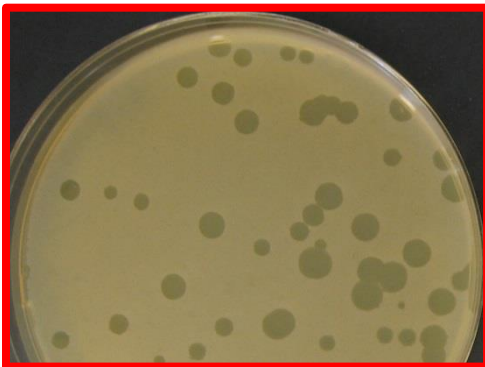
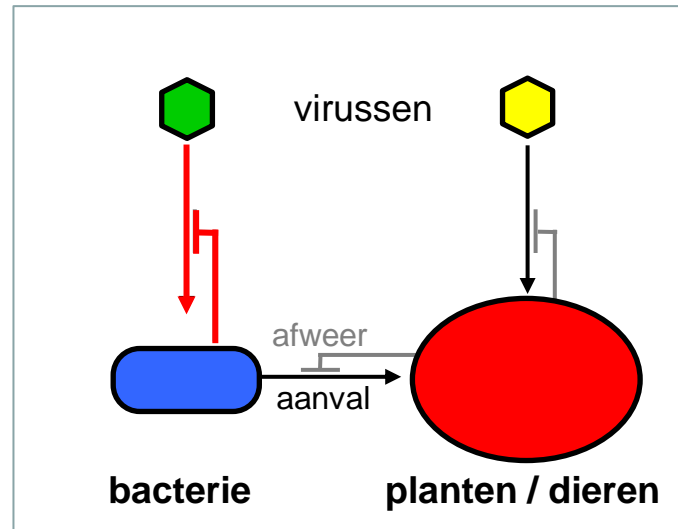
**planten / dieren  
cel**

**Ø** 0,05-0,1  $\mu\text{m}$   
**DNA** 3.000 bp

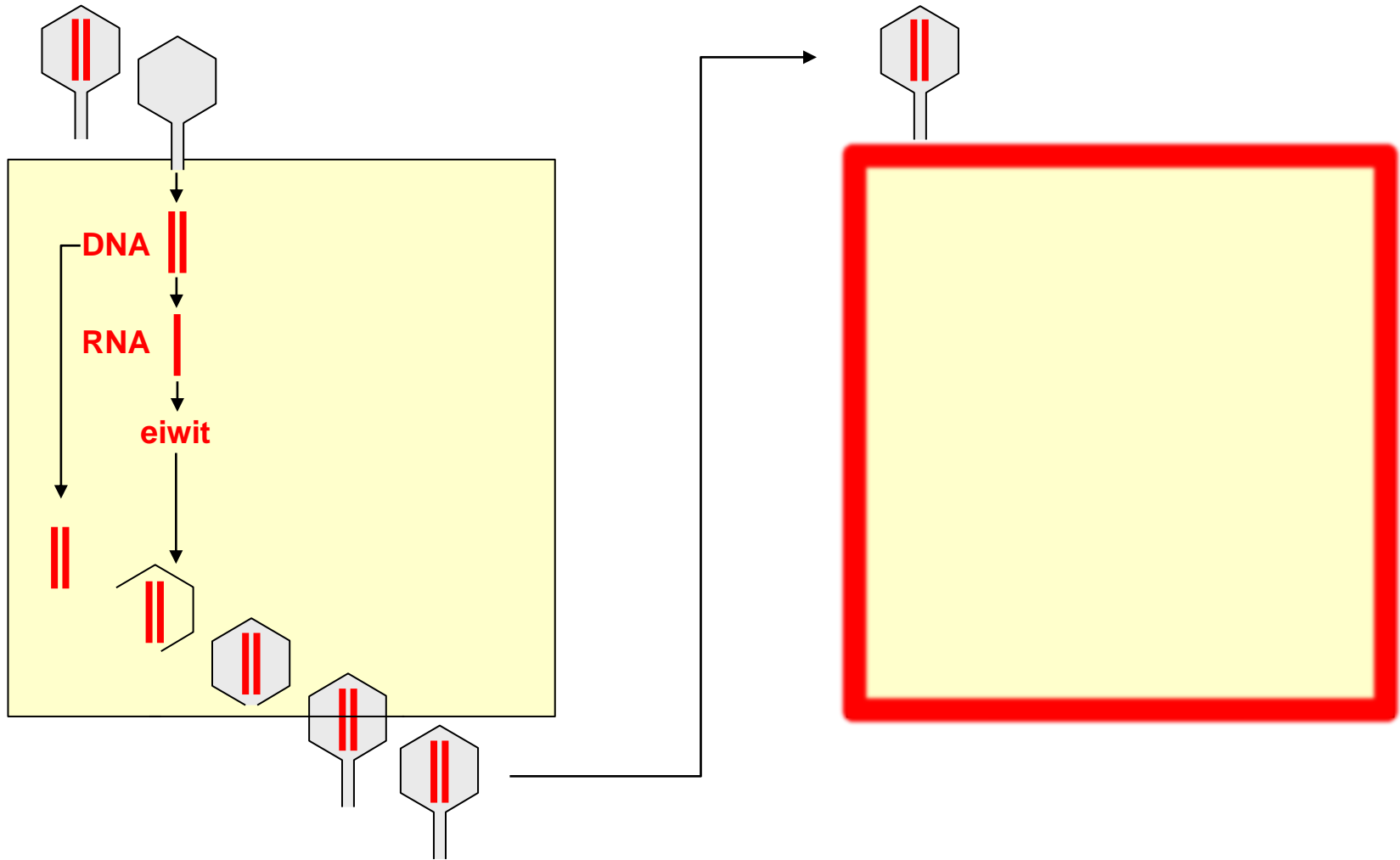
1-5  $\mu\text{m}$   
3.000.000 bp

50-100  $\mu\text{m}$   
3.000.000.000 bp

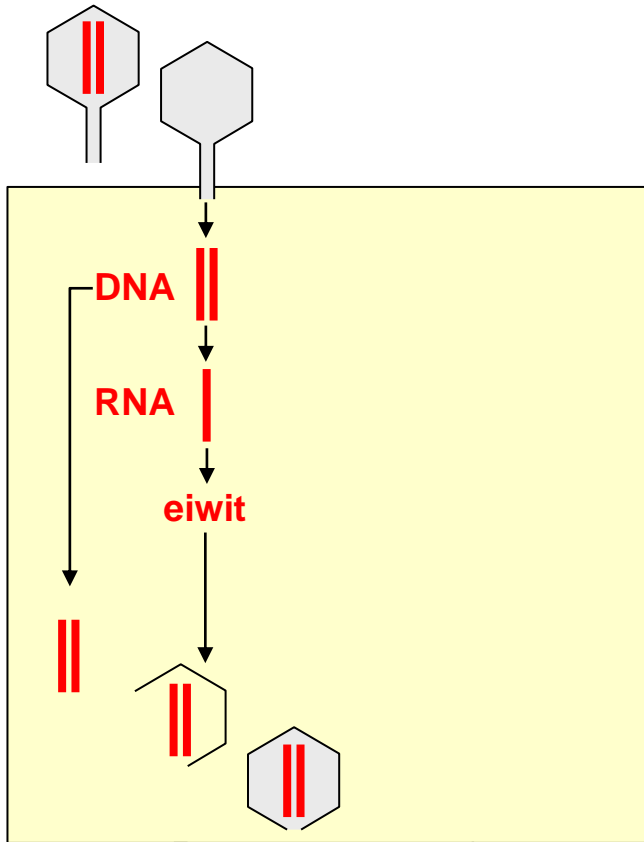
# virussen zijn afhankelijk van cellen



# 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  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTCGC  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
CGTCGCCGCTGCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGTCAGCTT  
TATAAATCCGGAGATACGGAAACTAGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATA
```

- CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats
- Cas – CRISPR-associated genes & proteins
- present in genomes of 40% of bacteria and 85% of archaea



# CRISPR-Cas - ontdekking



```
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCTTTCGCAGACGCGCGGCGA  
TACGCTCACGCA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCAGCCGAA  
GCCAAAGGTGATGCCGAACACGCTGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA  
ACCGGGCTCCCTGTCGGTTGTAATTGATAATGTTGAGAGTTCCCCGCGC  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTTCG  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
CGTCGCCGCCTGC GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGTCAGCTT  
TATAAATCCGGAGATACGGAAACTAGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATA
```

- CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats
- Cas – CRISPR-associated genes & proteins
- present in genomes of 40% of bacteria and 85% of archaea



# CRISPR-Cas - ontdekking



```
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCTTTCGCAGACGCGCGGCGA  
TACGCTCACGCA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCAGCCGAA  
GCCAAAGGTGATGCCGAACACGCTGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA  
ACCGGGCTCCCTGTCGGTTGTAATTGATAATGTTGAGAGTTCCCCGCGC  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTCGC  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
CGTCGCCGCCTGC GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGTCAGCTT  
TATAAATCCGGAGATACGGAAACTAGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATA
```

- CRISPR – DNA cluster met afwisselende repeats & spacers
- Cas – CRISPR-associated genen & eiwitten
- present in genomes of 40% of bacteria and 85% of archaea



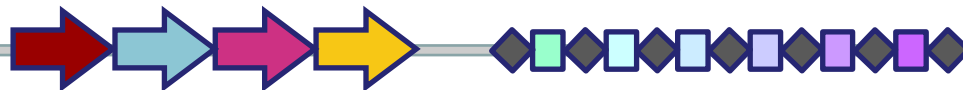


# CRISPR-Cas - ontdekking



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

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

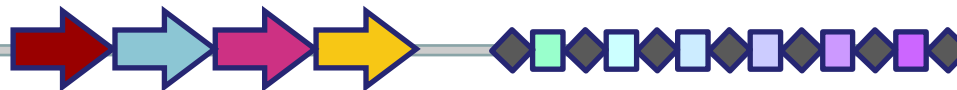


# CRISPR-Cas - ontdekking



```
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCTTTCGCAGACGCGCGGCGA  
TACGCTCACGCA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCAGCCGAA  
GCCAAAGGTGATGCCGAACACGCTGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA  
ACCGGGCTCCCTGTCGGTTGTAATTGATAATGTTGAGAGTTCCCCGCGC  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTTCGC  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
CGTCGCCGCCTGC GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGTCAGCTT  
TATAAATCCGGAGATACGGAAACTAGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATA
```

- CRISPR – spacers lijken op DNA fragmenten van virussen

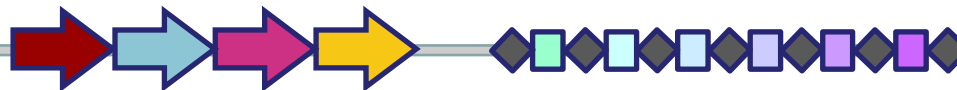


# CRISPR-Cas - ontdekking

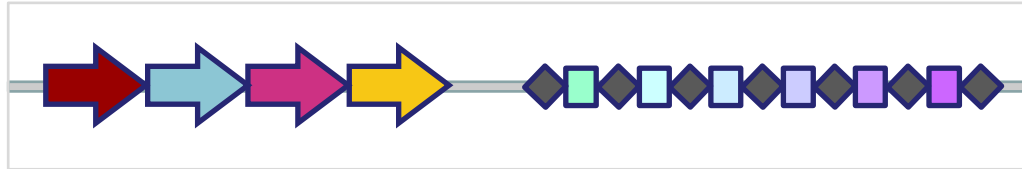


```
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCTTTCGCAGACGCGCGGCGA  
TACGCTCACGCA GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCAGCCGAA  
GCCAAAGGTGATGCCGAACACGCTGAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA  
ACCGGGCTCCCTGTTCGGTTGTAATTGATAATGTTGAGAGTTCCCCGCGC  
CAGCGGGGATAAACCGTTTGGATCGGGTCTGGAATTTCTGAGCGGTCGC  
GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCGCGAATCGCGCATACCCTGCG  
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

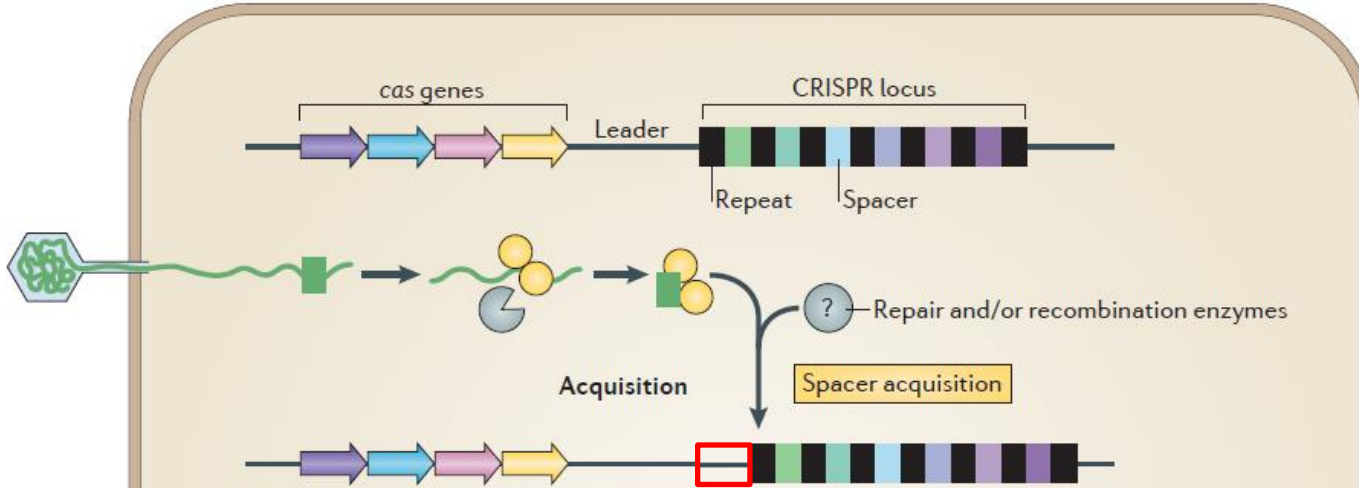
CRISPR-Cas is potentieel afweer systeem...

# 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

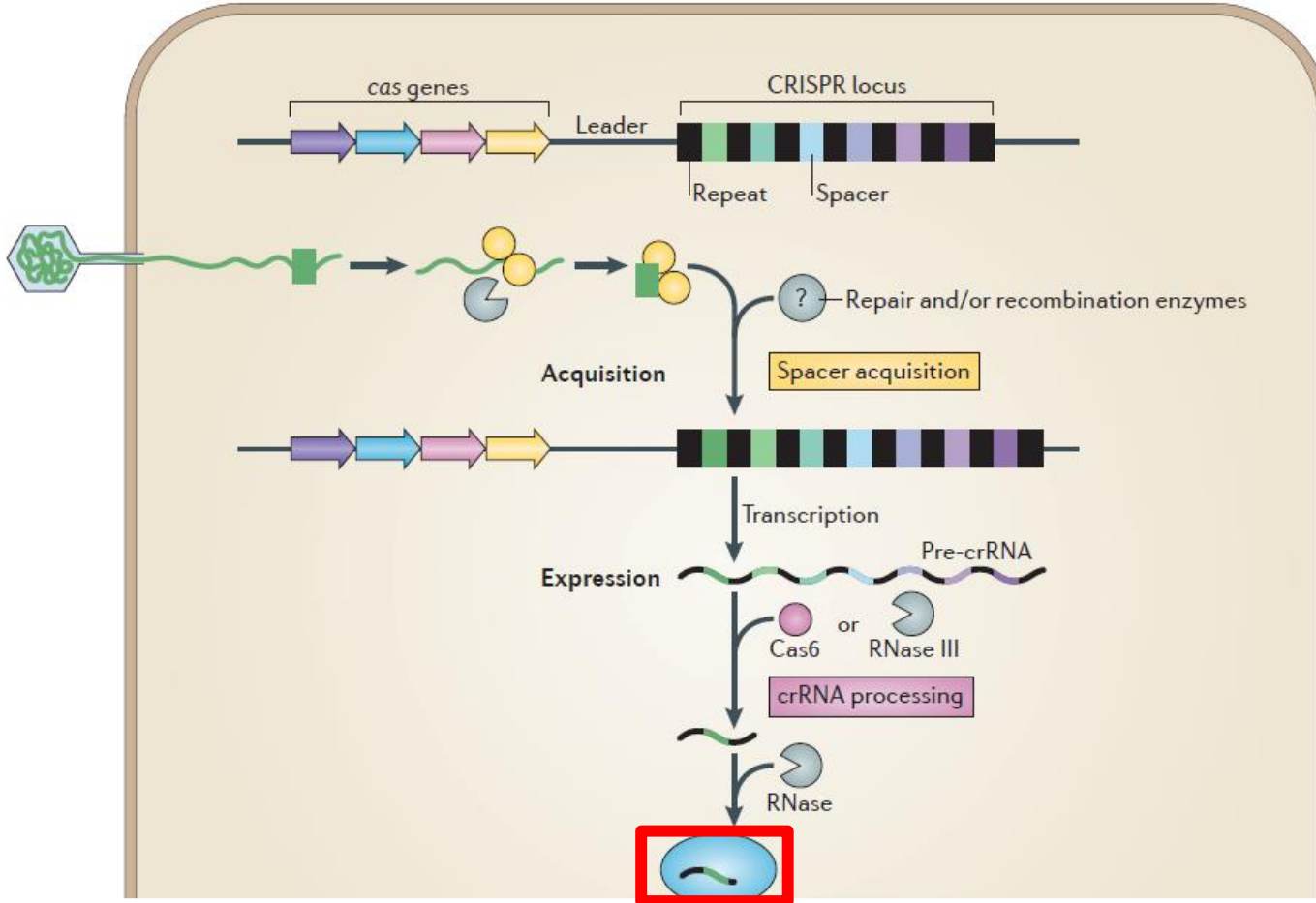


1. Spacer inbouw

CRISPR = geheugen van afweer systeem

- veel CRISPR spacers zijn homolog aan DNA van virussen

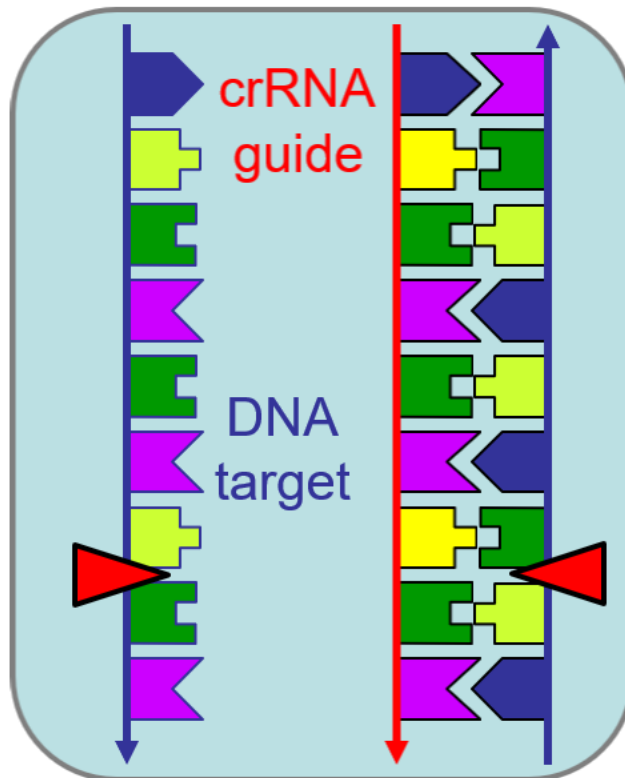
# CRISPR-Cas mechanism



1. Spacer inbouw

2. Guide expressie

# crRNA guide leidt Cas eiwit naar DNA target



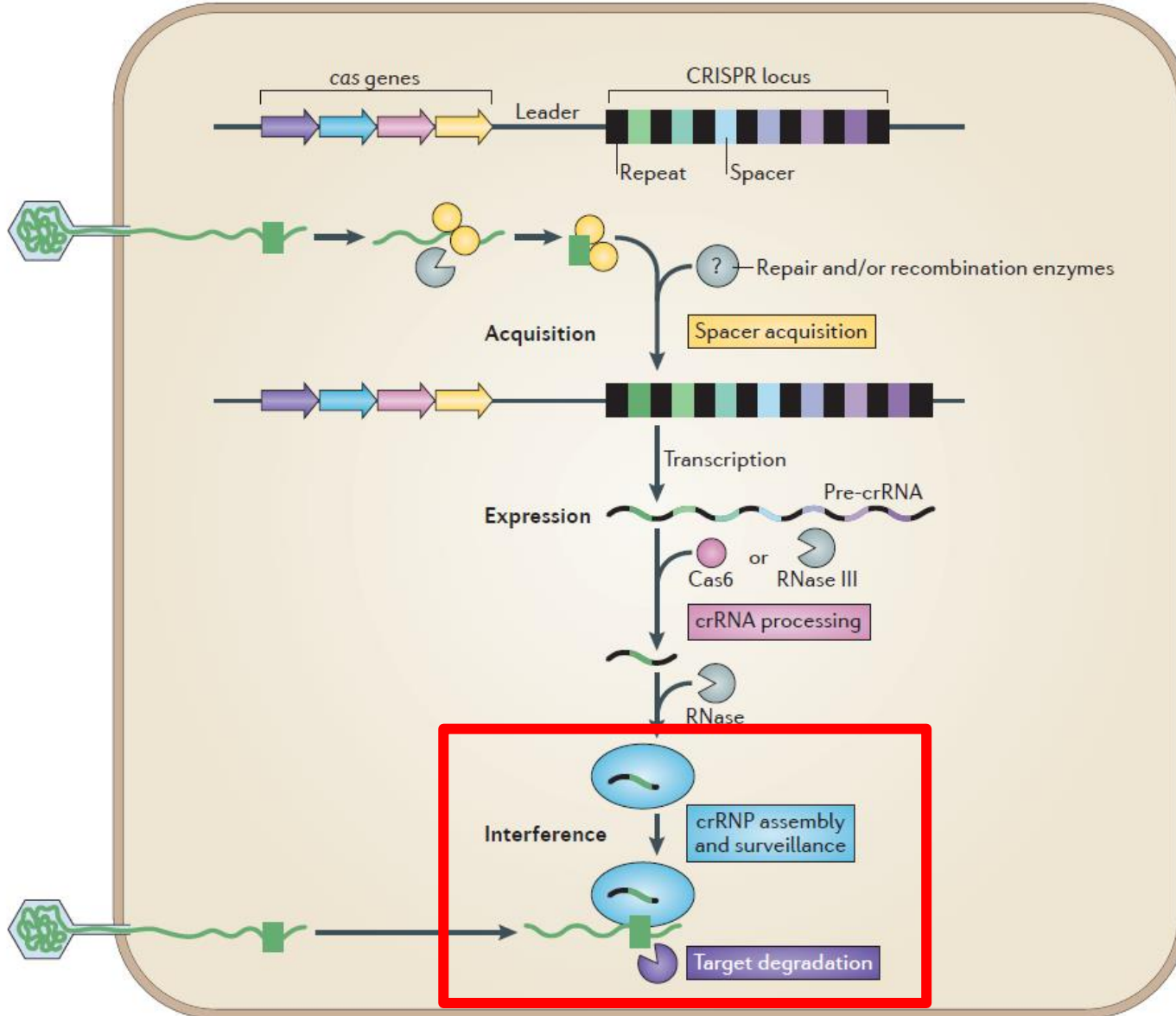
Cas eiwit(ten)

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 geïnactiverd)



# CRISPR-Cas mechanism

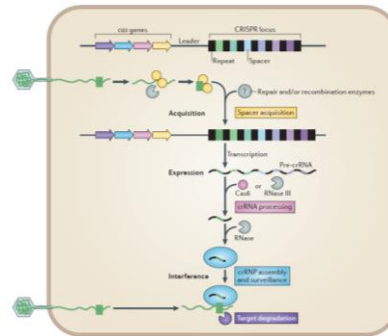


1. Spacer inbouw

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 crRNA letters ('design guide'),  
en door 'transplantatie' van het Cas/crRNA complex naar ander organisme,  
kan in principe elk DNA in elk organisme worden geknipt

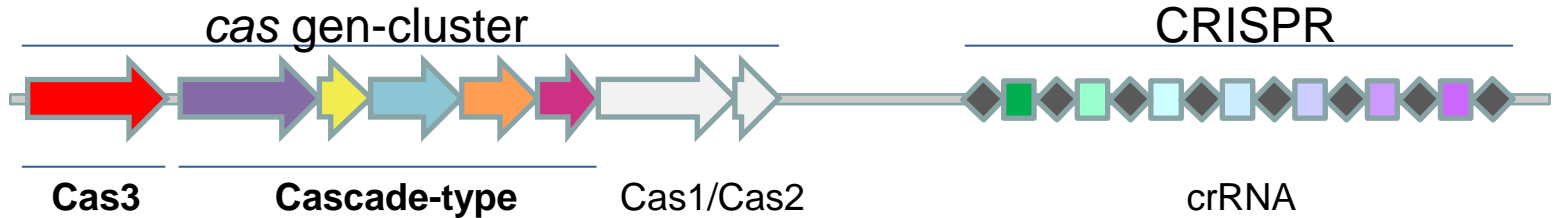


- inleiding DNA, RNA & eiwit
- CRISPR ontdekking bacteriën, virussen & immuniteit
- CRISPR mechanisme zoeken & knippen
-  **CRISPR toepassingen** mutatie & reparatie
- CRISPR voedsel is dat gevaarlijk ?

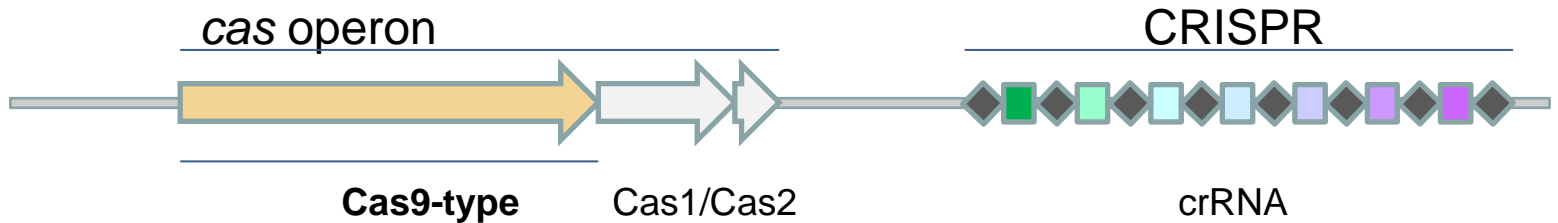
# CRISPR-Cas – 2 classes



**Class 1**



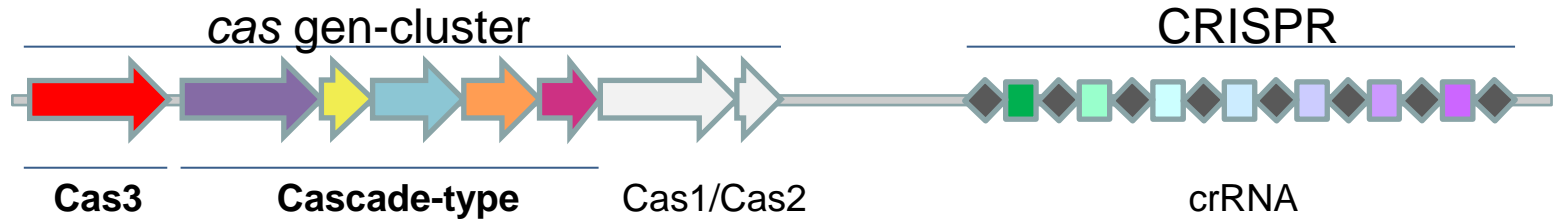
**Class 2**



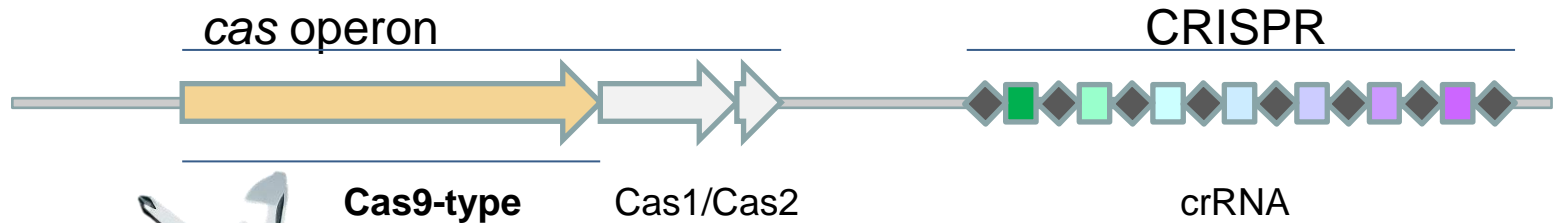
# CRISPR-Cas – 2 classes



**Class 1**



**Class 2**

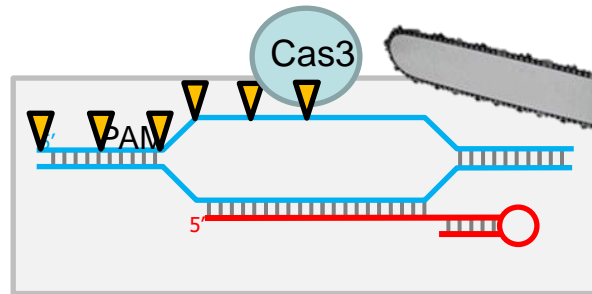


# CRISPR-Cas – DNA editing



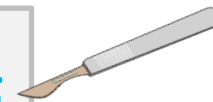
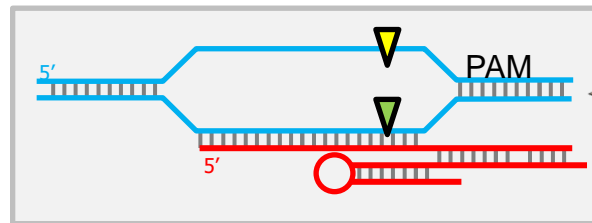
Class-1

Type I  
Cascade

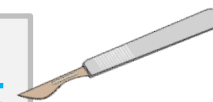
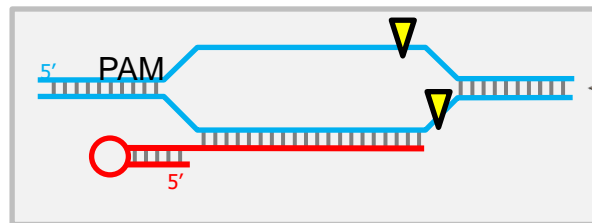


Class-2

Type II  
Cas9



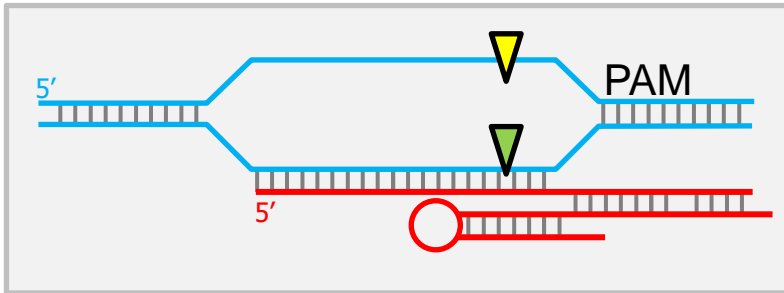
Type V  
Cas12a



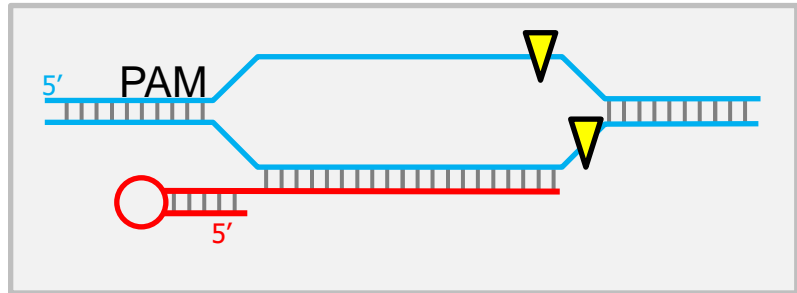
# CRISPR-Cas – DNA editing



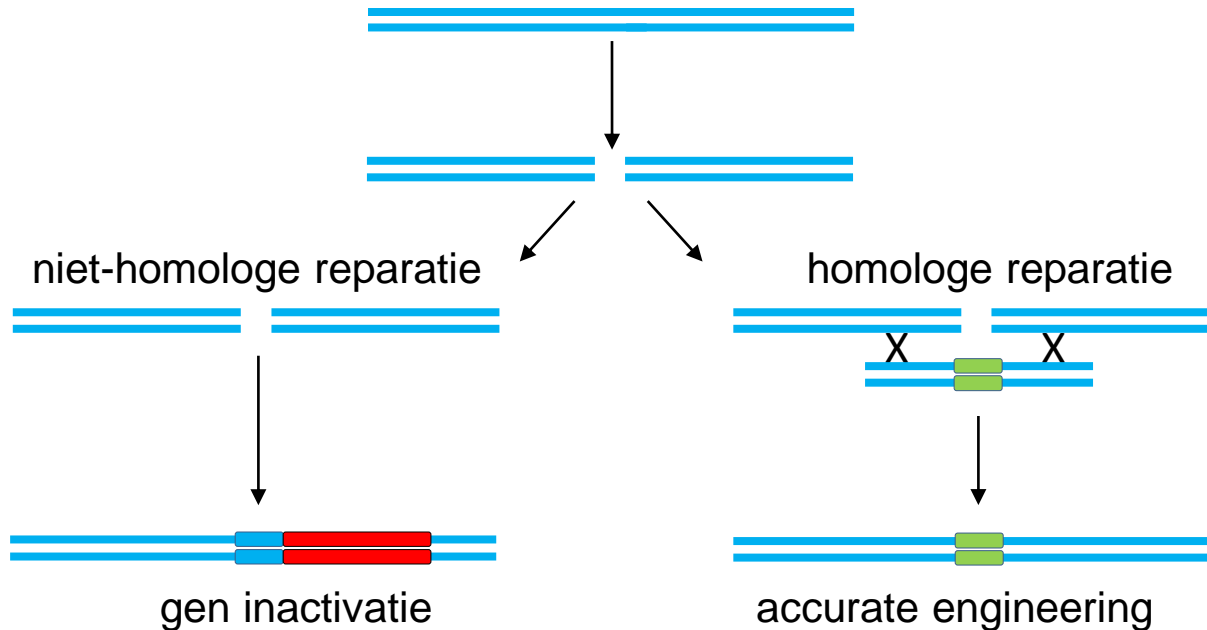
CRISPR-Cas9



CRISPR-Cas12



specifieke knip door Cas9 / Cas12



# 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)



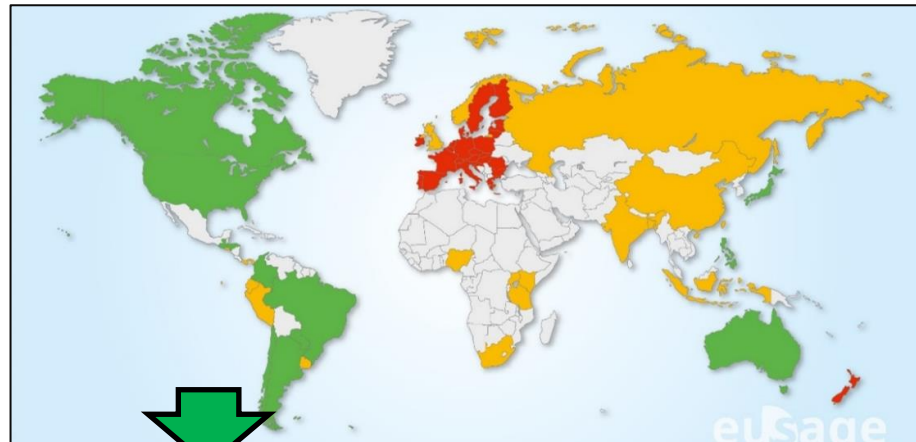


- inleiding DNA, RNA & eiwit
  - CRISPR ontdekking bacteriën, virussen & immuniteit
  - CRISPR mechanisme zoeken & knippen
  - CRISPR toepassingen mutatie & reparatie
-  CRISPR voedsel is dat gevaarlijk ?

# GGO/GMO discussie



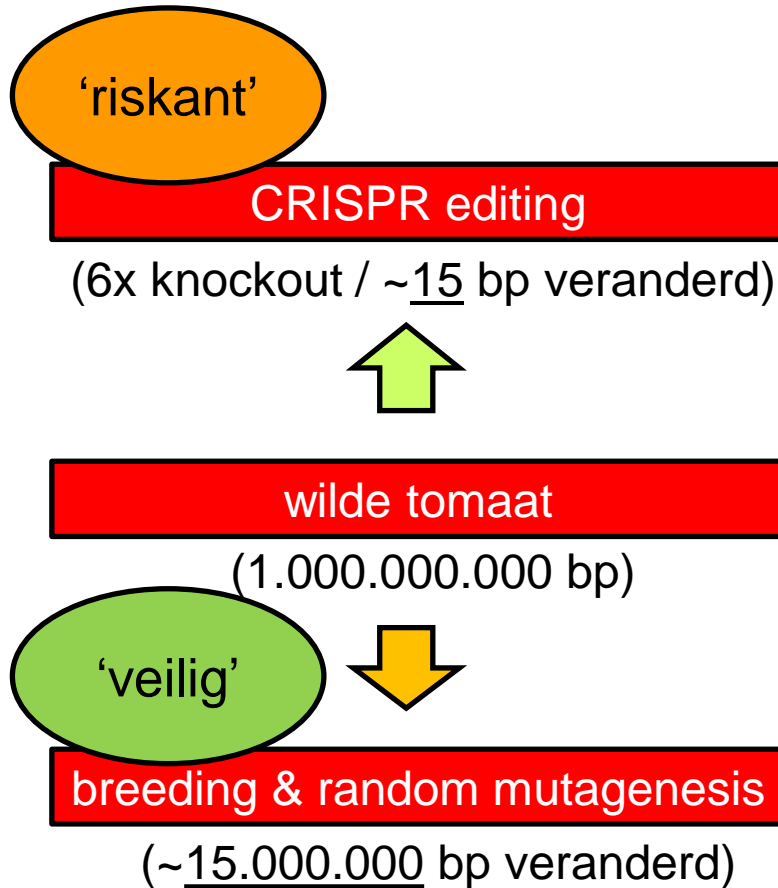
- **GGO regels & veiligheidstesten** zijn nodig bij **grotere genetische veranderingen**  
(*uitwisseling van genen tussen verschillende soorten, bijv. van bacterie naar plant*)
- **GGO regels zouden niet nodig moeten zijn** als product lijkt op natuurlijk product  
(*kleine veranderingen: gen uitschakelen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



“kleine CRISPR veranderingen” = niet-GGO  
“grote CRISPR veranderingen” = GGO

Europese Unie  
“alle CRISPR veranderingen” = GGO

# veiligheid – klassieke mutagenese / CRISPR



# (mijn) conclusies (5)



- **GGO regels & veiligheidstesten** zijn nodig 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  
*want hun doelen zijn gelijk:*
  - **MINDER** – water, kunstmest, bestrijdingsmiddelen & energie
  - **MEER** – duurzame productie van veilig, gezond & smaakvol eten

# 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')<sup>1,2</sup>, 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')<sup>3</sup> recognises the complex nature

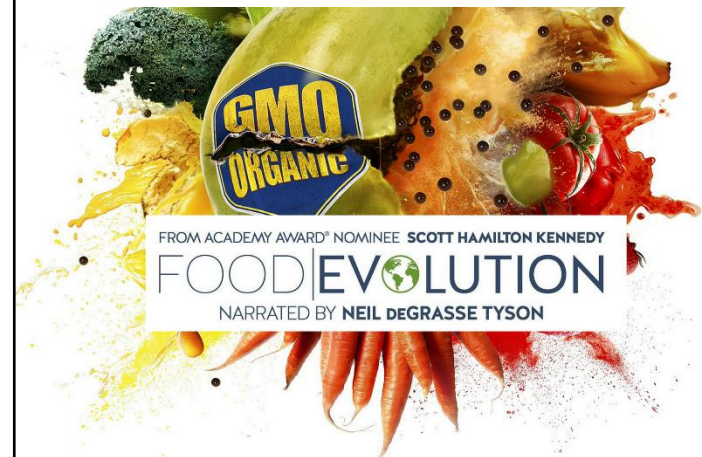
Biotechnology' (SAM, 2017a), we have examined the GMO Directive taking into account current knowledge and scientific evidence.

#### 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 mutagenesis<sup>4</sup> 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).

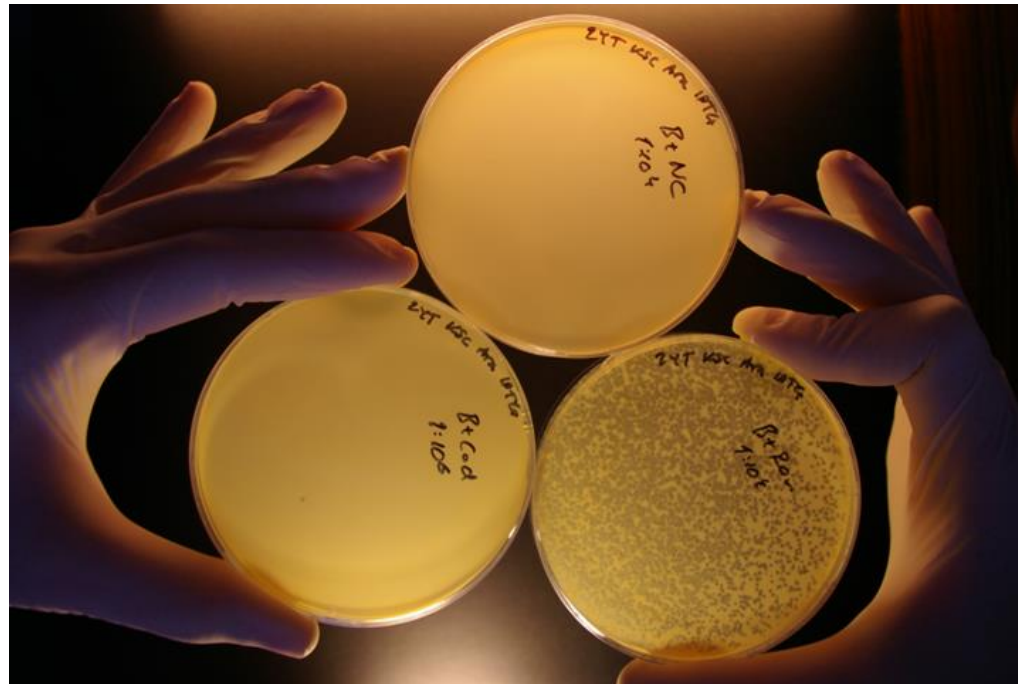
The Court declared that organisms produced by

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

