Zusatzmaterial

Einheit 1: Was ist CRISPR/Cas9?

1. Ablauf

Die erste Einheit umfasst eine Unterrichtsstunde von 45 min. Der Einstieg in die Unterrichtseinheit geschieht mit Hilfe von verschiedenen Überschriften von Zeitungsartikeln. Ohne weiteres Nachfragen seitens der Lehrkraft werden die ersten Gedanken, Anmerkungen und Stichpunkte, die von den Schülerinnen und Schülern genannt werden, an der Tafel gesammelt. Auch mögliche Fragen zur Thematik helfen dabei, die übergeordnete Problemfrage der Reihe „CRISPR/Cas9 als Fluch und/oder Segen?“ zu formulieren. Anschließend wird gemeinsam der erste, kurze Teil des Films „CRISPR/Cas9 im Genlabor“ vorgespielt, in dem die Wissenschaftlerin Dr. Iryna Charapitsa eine Abbildung zeigt, die den Abwehrmechanismus von Bakterien gegen Viren, der der CRISPR/Cas9-Technik zugrunde liegt, darstellt. Nachdem die Begriffe „CRISPR“ und „Cas9“ gemeinsam definiert wurden, sollen die Lernenden den Abwehrmechanismus mithilfe von Informationskärtchen (AB1) erarbeiten und diesen anschließend im Plenum erklären. Die Frage, die abschließend aufgebracht werden soll ist, wie dieser Mechanismus in der Gentechnik verwendet werden könnte, um eine Anknüpfung an die folgende Unterrichtsstunde zu schaffen und Spannung aufzubauen.

* 1. Übersicht der Unterrichtseinheit

Tabelle 1: Verlaufsplan der 1. Einheit

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Phase | Inhalt | Produkt | Sozialform/Medien |
| Einstieg | Überschriften:  🡪 Hinleiten zum Thema  🡪 Fragestellung: Was wisst ihr schon darüber? Anwendungen? Fragen? | Sammlung an der Tafel | Stiller Impuls, UG  Überschriften (Beamer oder OHP)  Tafel |
| Überleitung | Fragestellung erarbeiten | Fragestellung: CRISPR/Cas9 als Fluch und/oder Segen? | UG |
| Erarbeitung | Film Teil 1 (bis 1:13min)  🡪 CRISPR und Cas9 definieren  AB: Abwehrmechanismus | **CRISPR**: kurze DNA-Wiederholungssequenzen, die durch andere Erbgutstücke getrennt sind  **Cas9:**in Bakterien vorkommende Endonuklease, die DNA schneiden kann  Schrittweise Darstellung der Abwehrreaktion | EA, PA  Film  PP  AB |
| Sicherung | Zusammentragen der Ergebnisse, gemeinsames Ausfüllen der Abbildung  Verwendung in der Gentechnik? | Ausgefüllte Abbildung | UG  PP |

1. Erläuterungen

Das CRISPR/Cas9-System wurde 2012 von den Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen um Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna als ein zelleigener genetischer Abwehrmechanismus von Bakterien und Achaeen vorgestellt (vgl. Jinek et al. 2012). Der Ausdruck CRISPR steht für „clustered regularly interspaced short palindromic repeats” (Knox 2015; Jinek et al. 2012), also kurze palindromische Abschnitte sich wiederholender DNA, die durch andere Erbgutstücke getrennt sind. Cas9 ist ein „CRISPR associated“-Protein, ein Protein, das DNA schneiden kann und dadurch eine Endonuklease-Aktivität aufweist. Der ausführliche Abwehrmechanismus gliedert sich in drei Stufen (vgl. Makarova et al. 2011; Wagner & Paul 2011; Makarova & Koonin 2015):

1. **Aquisitionsphase:** Nach einer Infektionsphase mit Phagen werden Protospacer der DNA in die CRISPR-Region des Bakteriengenoms integriert, um *spacer* zu bilden.
2. **Expressionsphase:** 
   * Transkription des CRISPR-Abschnittes zu einem Vorläufer-CRISPR-Transkript, der *pre-cRNA*
   * *pre-cRNA* wird im Komplex mit der *tracrRNA* (transactivation CRISPR-RNA) und Proteinen zu einer reifen *crRNA* prozessiert, die komplementär zu einer Stelle des eingedrungenen Erbmaterials ist 🡪 die fertige *crRNA* liefert Cas9 die Erkennungssequenz, an der die DNA geschnitten werden soll
   * *cRNA* und *tracrRNA* bilden mit dem Cas9-Protein einen Komplex
3. **Interferenzphase**: die *crRNA* führt den Komplex an die Zielsequenz. Liegt hier in direkter Nähe eine *PAM* („proto-spacer adjacent motif“, besteht aus drei Basen: GGN) schneidet Cas9 die virale DNA an dieser Stelle und zerstört den DNA-Doppelstrang

Hinweis: In ihrem eigenen Genom kommt keine PAM-Stelle vor, was der Unterscheidung zur Fremd-DNA dient und damit ein Schneiden der eigenen DNA verhindert (vgl. Max-Planck-Gesellschaft 2013-2019).

Einheit 2: CRISPR/Cas9 in der Gentechnik

1. Ablauf

Die zweite Einheit der Unterrichtsreihe nimmt mit 4 Stunden die meiste Zeit in Anspruch. Nach einer kurzen Wiederholung der Definitionen von „CRISPR“ und „Cas9“ wird der zweite Teil des Films „CRISPR/Cas9 im Genlabor“ gemeinsam in voller Länge angeschaut und wichtige Begriffe der einzelnen Schritte währenddessen durch die Lehrkraft an die Tafel geklebt. Anschließend sollen (falls möglich) die Schülerinnen und Schüler in Zweier- oder Kleingruppen den Film ein weiteres Mal im eigenen Tempo sowie eigens definierten Abschnitten anschauen, um das Vorgehen im Video wiederzugeben und zu erläutern. Erst danach werden Fragen geklärt und die Schritte der CRISPR/Cas9-Methode mithilfe der Stichwortkarten an der Tafel besprochen, geordnet, ergänzt und in Zusammenhang gebracht (siehe Abb. 1). Dies dient einerseits als Sicherung des Filminhalts, andererseits als Grundlage für die kommende Phase der Unterrichtseinheit. Nach der Bildung von Kleingruppen werden diesen jeweils vorgefertigtes Material (siehe Filmmaterial) ausgeteilt, mit dem sie eigene Stummfilme entwickeln sollen, in denen sie die CRISPR/Cas9-Methode auf molekularer Ebene erklären. Dafür können Tablets zur Verfügung gestellt werden oder die Lernenden können ihre eigenen Smartphones für das Filmen verwenden. Das vorgegebene Material kann durch Stichwortkarten oder sonstige Materialien ergänzt werden. Die Präsentation der Kurzfilme kann je nach Zeitpensum und Ergebnissen auf zwei Weisen geschehen: Entweder werden alle Filme in der Großgruppe gemeinsam angeschaut, oder es schließen sich mehrere Kleingruppen zusammen, die die Filme der jeweiligen Gruppen anschauen und den besten Film auswählen, der anschließend im Plenum gezeigt wird. Durch die abschließende Fragestellung, welche Schwierigkeiten bei dem Verfahren auftreten könnten, wird die Lerngruppe aufgefordert, den dargestellten Inhalt von einer anderen Sichtweise aus zu betrachten.

* 1. Übersicht der Unterrichtseinheit

Tabelle 2: Verlaufsplan der 2. Einheit

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Phase | Inhalt | Produkt | Sozialform/Medien |
| Einstieg | Wiederholung CRISPR  Fragestellung/Wiederholung: Wie benutzt man das Phänomen CRISPR/Cas9 in der Gentechnik? | Definition CRISPR und Cas9 | UG   * Ausgefüllte Schema-Zeichnung |
| Erarbeitung 1 | Film Teil 2  🡪 Gemeinsames/individuelles Anschauen  🡪 Fragen klären  🡪 Begriffe und Inhalte darstellen | Begriffe: gRNA, Cas9, PAM, Reparatur des Doppelstrangbruchs, crRNA, tracrRNA, NHEJ, HDR | PA, UG   * Film * Begriffe |
| Erarbeitung 2 | Erstellung eigener Erklärvideos über den Mechanismus auf molekularer Ebene | Entwickelte Videos | GA   * Tablets/Smartphones * Filmmaterial |
| Sicherung | Betrachten der Videos | Entwickelte Videos | GA, UG |
| Vertiefung | Fragestellung: Welche Schwierigkeiten/Risiken könnten auftauchen? | * Richtige Wahl des Zelltyps u. der einzubringenden Sequenz * Weiterführende Folgen + Veränderungen durch die Methode noch nicht bekannt * Off-target-Effekte * Mehrfache Veränderungen möglich * Keine Unterscheidung zum ursprünglichen Organismus | PA 🡪 UG |

1. Erläuterungen

Abbildung 1 zeigt die gemeinsam zu erarbeitende Darstellung der CRISPR/Cas9-Technik. In der Gentechnik nutzt man die Eigenschaft des Cas9-Proteins aus Bakterien (*Streptococcus pyogenes*), das als molekulare Schere durch eine Leit-RNA gelenkt werden kann und so zur Veränderung gewählter Zielsequenzen programmiert werden kann (vgl. Cathomen & Puchta 2018). Die **Leit-RNA** (engl: guideRNA, gRNA) muss synthetisch aus einer *crRNA* und *tracrRNA* hergestellt werden, die zu einer Zielsequenz passt, diese erkennt und den Komplex mit **Cas9** an die zu schneidende Stelle im Genom führt. Dort verbindet sich die *gRNA* mit der Ziel-DNA-Sequenz, woraufhin sich der DNA-Doppelstrang öffnet und *Cas9* diesen übereinstimmenden Sequenzabschnitt **drei Basen vor einer PAM**-Stelle schneidet (vgl. Doudna & Charpentier 2014). Kommt es dazu, dass Cas9 an eine falsche Stelle im Erbgut geführt wird und dort schneidet, spricht man von sogenannten Off-target Effekten. Die Reparatur des Doppelstrangbruchs muss ergänzend zum Filminhalt besprochen werden und kann auf zwei Weisen geschehen (vgl. Rembold 2017):

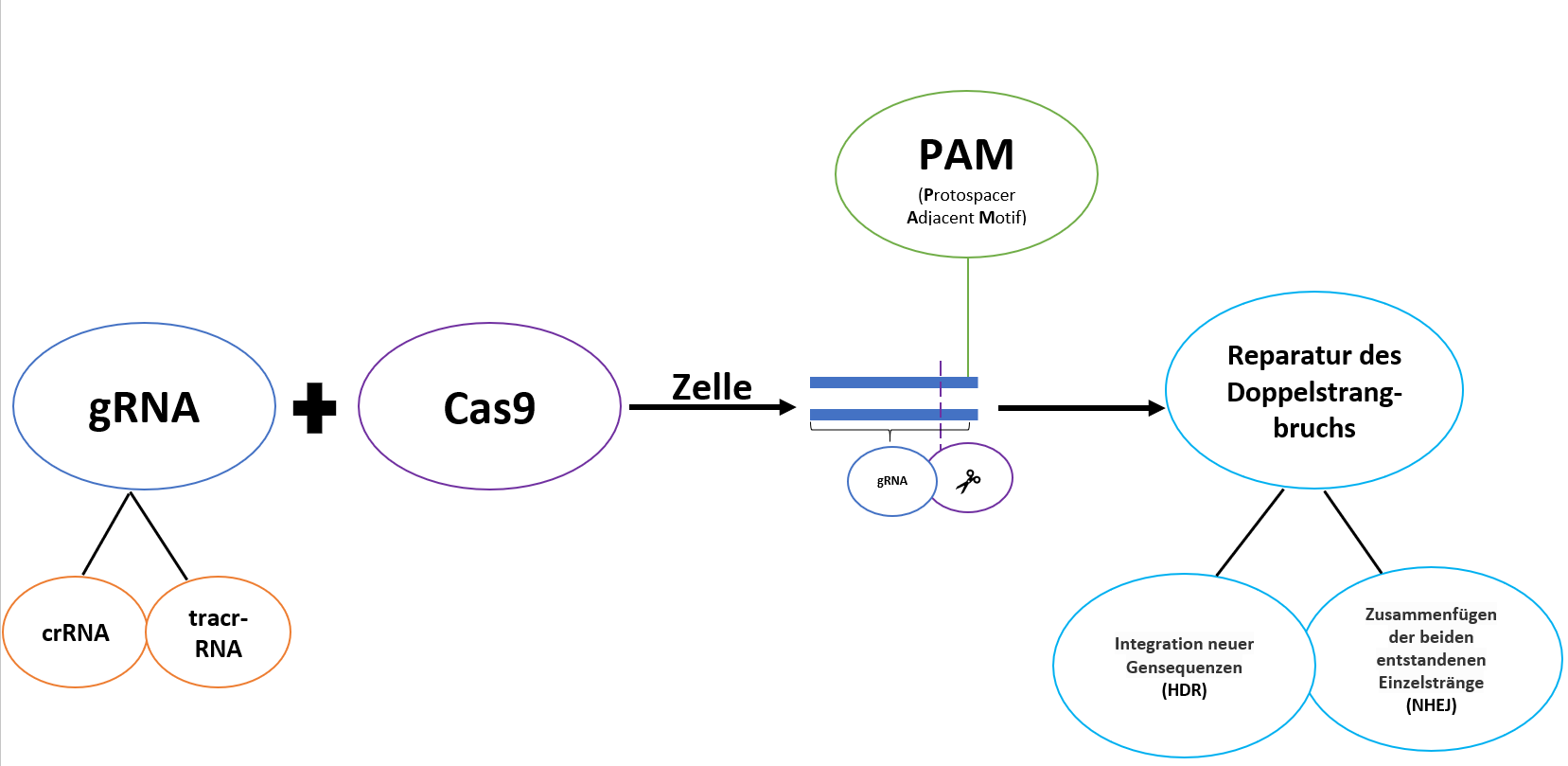
1. **NHEJ** (non-homologous end joining): die Zelle übernimmt die Reparatur des Doppelstrangbruchs, indem die losen Enden durch Ligasen zusammengefügt werden. Diese Art ist sehr fehleranfällig und kann bspw. Mutationen oder Deletionen zur Folge haben 🡪 *Gene Silencing.*
2. **HDR** (homology-directed repair): Integration von Nukleotiden in das Genom, die zusätzlich zu den homologen Sequenzen des aufgebrochenen Teils neue Erbinformationen beinhalten und so neue festgelegte Änderungen kreieren 🡪 *Genome Editing.*

Abbildung 1: Zusammenfassung der Funktionsweise von CRISPR/Cas9 in der Gentechnik

Einheit 3: Anwendungsbereiche von CRISPR/Cas9

1. Ablauf

Um einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand von CRISPR/Cas9 in verschiedenen Anwendungsbereichen zu erhalten, wird dieser in der folgenden Einheit in einer Doppelstunde erarbeitet. Hierbei wird auf die zu Beginn der Einheit angelegte Sammlung zurückgegriffen, in der die Schülerinnen und Schüler bereits unterschiedliche Anwendungen gesammelt hatten. Für die Erarbeitung der Anwendungsbereiche Lebensmittelproduktion/Pflanzen, Tiere und Menschen wird die Klasse zuerst in Kleingruppen unterteilt, um diese mithilfe eines Arbeitsblattes zu erschließen. Einerseits soll das *Genome Editing* mit anderen bekannten Methoden der Gentechnik verglichen werden (hierzu ist ein Hilfs-AB vorhanden), andererseits sollen Chancen und Risiken des Verfahrens in den verschiedenen Anwendungen diskutiert werden. Der Diskurs über die rechtliche Lage des Verfahrens wird über das EuGH-Urteil (2018) hinaus nicht weiter vertieft. Die Ergebnisse der Gruppenarbeit werden anschließend in einer Großgruppe (aus bspw. zwei Kleingruppen desselben Themas) auf einem Plakat dargestellt, um sie den anderen Gruppen zu präsentieren. Für die Präsentation finden sich jeweils Kleingruppen der verschiedenen Themen zusammen, die die im Raum verteilten Poster rotierend den übrigen Lernenden anderer Gruppen vorstellen. Durch ein folgendes Verteilen aller Arbeitsblätter ist davon auszugehen, dass die gesamte Lerngruppe über den gleichen Wissensstand verfügt. Zum Abschluss der Stunde kann eine vorläufige Positionierung der Schülerinnen und Schüler erfragt werden, um auf die anschließende Diskussionsrunde vorzubereiten.

* 1. Übersicht der Unterrichtseinheit

Tabelle 3: Verlaufsplan der 3. Einheit

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Phase | Inhalt | Produkt | Sozialform/Medien |
| Einstieg | Fragestellung: Welche Anwendungen sind bekannt/vorstellbar? | Ergänzte Sammlung der 1. Stunde | UG   * Mindmap |
| Erarbeitung | Arbeitsteilige Erarbeitung der Bereiche   1. Lebensmittelproduktion/Pflanzen 2. Tiere 3. Menschen | Poster | GA   * ABs |
| Sicherung | Vorstellung der Arbeitsergebnisse | Gestaltete Poster | GA, UG |
| Überleitung | Positionierung: Fluch und/oder Segen?   * Ja, weil… * Nein, weil… | **Segen**, weil…   * … dient dem Allgemeinwohl * … Heilung von Krankheiten   **Fluch**, weil…   * … Menschen nach Wunsch 🡪 Definition von „krank“ verschiebt sich * … Verlust der Menschlichkeit (Leiden, Tod) * … Folgen noch unklar | Blitzlicht |

1. Erläuterungen

Als Genome Editing-Verfahren findet CRISPR/Cas9 Anwendung in vielen Bereichen:

1. **Lebensmittelproduktion/Nutzpflanzen:** Einsetzen von CRISPR/Cas9 im Bereich der Grünen Gentechnik zur Züchtung neuer Arten, zum Ausbilden von Resistenzen gegen Krankheiten, zur Entfernung von Allergenen oder zur Optimierung der Haltbarkeit (vgl. Cathomen & Puchta 2018, S. 69f.). Im Vergleich zur klassischen Gentechnik erfolgt die Veränderung im Erbgut nicht an einem zufälligen, sondern an einem vorbestimmten Ort. Außerdem lassen sich mit CRISPR/Cas9 nicht nur Gene hinzufügen, sondern im Erbgut vorhandene Gene ausschalten, verändern oder entfernen und es ist möglich, gleichzeitig mehrere Orte im Erbgut gezielt zu verändern. Außerdem können Pflanzenarten so verändert werden, dass sie resistenter gegenüber Folgen des Klimawandels, wie Trockenheit, Hitze und Salinität sind. In Deutschland unterliegt das CRISPR/Cas-Verfahren den strengen Auflagen der EU-Gentechnikregeln (siehe EuGH Urteil 2018).
2. **Tiere:** Verwendung in der Tierzucht zur Bekämpfung von Krankheiten, Ertragssteigerung oder Bekämpfung der Krankheitsüberträger von Malaria durch die sogenannte Gene-Drive-Methode (vgl. Kyrou et al. 2018).
3. **Menschen:**- Keimbahntherapie: Veränderung des Erbguts von Eizellen, Samenzellen oder einer Veränderung in Zellen eines frühen Embryos 🡪 nach deutschem Embryonenschutzgesetz verboten (vgl. Duden 2015).

- Somatische Gentherapie: therapeutisches Eingreifen ins Erbgut von menschlichen Körperzellen (Somazellen), um krankheitsauslösende Gene gezielt auszuschalten; die übertragenen Gene können also nicht weitervererbt werden (vgl. Spektrum 1999).

- Xenotransplantation: Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen zwischen nichtverwandten Arten, also die Humanisierung tierischer Organe für Transplantationen im Menschen (vgl. Niu et al. 2017).

Einheit 4: Ethische Bewertung

1. Ablauf

Zum Abschluss der Unterrichtseinheit soll in einer Doppelstunde die ethische Bewertung der CRISPR/Cas9-Technik im Zentrum stehen. Dafür werden zuerst im Unterrichtsgespräch ethische Probleme gesammelt, die aus Sicht der Schülerinnen und Schüler bei der Methode auftreten. Daraufhin wird eine Fishbowl-Diskussion zum Thema *„Das Designerbaby im Gewand der Heilung“. Wie wollen wir in Zukunft mit dem menschlichen Genom umgehen? Welche Arten der Anwendungen von CRISPR/Cas9 sind rechtlich möglich und ethisch vertretbar?* durchgeführt. Zunächst werden die Vorgehensweise und Regeln einer Fishbowl erklärt. In einer Fishbowl-Diskussion debattiert eine Gruppe über ein vorher festgelegtes Thema in der Mitte des Klassenraums, während der Rest der Klasse die Debatte beobachtet und anschließend eine Rückmeldung über das Verhalten der Debattierenden gibt. Innerhalb der Diskussionsgruppe gibt es verschiedene Teilnehmer, einen Gesprächsmoderator sowie einen freien Stuhl in der Runde, der jederzeit von den übrigen Lernenden eingenommen werden darf (vgl. Mattes 2011, S. 114). Die zu besetzenden sieben Rollen sollen durch die Schülerinnen und Schüler mithilfe von Interviews erarbeitet werden. Da die Interviews unterschiedlich lang sind, kann von der Lehrkraft entschieden werden, welche Inhalte darin vorkommen sollen und die Interviewtexte dementsprechend anpassen. Diejenigen Schülerinnen und Schüler, die anschließend nicht an der Diskussion teilnehmen, sind Beobachter und haben die Aufgabe, am Ende der Diskussion die wesentlichen Punkte noch einmal zusammenzufassen und das Verhalten der Diskutierenden und des Moderators zu bewerten. Der Vorteil einer Fishbowl-Diskussion liegt außerdem darin, dass neben den vorgefertigten Rollen eigene Meinungen und Gedanken von Schülerinnen und Schülern einen Platz in der Diskussionsrunde finden. Außerdem werden den Lernenden durch die vorgefertigten Rollen neue Sichtweisen eröffnet, die ihre bestehenden Gedanken und Urteile erweitern können, und sie werden motiviert, ihre eigenen Meinungen zu überdenken und zu modifizieren. Die dabei entstandenen neuen Sichtweisen können, falls Zeit übrigbleibt, am Ende der Stunde diskutiert werden.

1. Übersicht der Unterrichtseinheit

Tabelle 4: Verlaufsplan der 4. Einheit

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Phase | Inhalt | Produkt | Sozialform/Medien |
| Einstieg | Fragestellung: Welche ethischen Probleme zeigen sich? | Sammlung von ethischen Problemen/  Fragestellungen | UG |
| Überleitung | Einleitung Fishbowl-Diskussion |  | UG   * PP |
| Erarbeitung | Vorbereitung Fishbowl-Diskussion  Aufgabenstellung:  Bereiten Sie eine Fishbowl-Diskussion vor, indem Sie  1. in Ihrer Gruppe die Meinung der Ihnen zugeteilten Person erschließen und eine gute Argumentation für die Diskussion vorbereiten.  2. eine entsprechende Rollenkarte mit Stichworten als Spickzettel vorbereiten.  3. eine Person aus der Gruppe bestimmen, die in der Diskussion die erarbeitete Rolle vertritt. | Rollenkarten mit Stichpunkten | GA   * Interviews |
| Erarbeitung 2 | Abhalten der Fishbowl-Diskussion |  | Fishbowl |
| Sicherung | Zusammentragen der Ergebnisse durch Zuschauer  Diskussion |  | UG |

1. Literaturverzeichnis

Cathomen, T. & Puchta, H. [Hrsg.] (2018): CRISPR/Cas9 – Einschneidende Revolution in der Gentechnik, Berlin: Springer.

Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2014): The next frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In: Science, Vol. 346, Issue 6213, S. 1077-1087.

Duden (2015): Recht A-Z. Fachlexikon für Studium, Ausbildung und Beruf. 3. Aufl. Berlin: Bibliographisches Institut. Lizenzausgabe Bonn: Bundeszentrale für politische Bildung.

Jinek,M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. & Charpentier, E. (2012): A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. In: Science, Vol.337, Issue 6096, S. 816-821.

Knox, M. (2015): Gezielter Eingriff ins Erbgut. Eine neue Methode, um DNA-Moleküle zu verändern, könnte die Medizin revolutionieren. Doch manche Wissenschaftler befürchten unkontrollierbare Entwicklungen. In: Spektrum der Wissenschaft, 9/15, S. 22-27.

Kyrou,K.; Hammond, A.; Galizi, R.; Kranjc, N.; Burt, A.; Beaghton, A.; Nolan, T. & Crisanti, A. (2018): A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. In: Nature Biotechnology, 36, S. 1062-1066.

Makarova, K. S.; Haft, D.H.; Barrangou, R.; Brouns, S. J.; Charpentier, E.; Horvath, P.; Moineau, S.; Mojica, F. J.; Wolf, Y. I.; Yakunin, A. F.; Van der Oost, J. & Koonin, E. V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. In: Nature reviews Microbiology, 9(6), S. 467-477.

Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015): Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In: Methods in molecular biology, 1311, S. 47-75.

Mattes, W. (2011): Methoden für den Unterricht. Kompakte Übersichten für Lehrende und Lernende. Paderborn: Schöningh.

Max-Planck-Gesellschaft (2003-2019): Arbeitsweisen von CRISPR/Cas9. [online] https://www.mpg.de/11032932/crispr-cas9-mechanismus [01.03.2019].

Niu, D.; Wei, H.; Lin, L.; George, H.; Wang, T., Lee, I.; Zhao, H.; Wang, Y.; Kann, Y.; Shrock, E.; Lesha, E.; Wang, G.; Luo, Y.; Qing, Y.; Jiao, D.; Zhao, H.; Zhou, X.; Wang, S.; Wie, H.; Güell, M.; Church, G.M. & Yang, L. (2017): Inactication of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. In: Science, Vol. 357, Issue 6357, S. 1303-1307.

Rembold, M. (2017): Genauer zielen, besser schneiden. In: Labor Journal, 9/2017, S. 37-41.

Spektrum (1999): Gentherapie. [online] <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/gentherapie/27413> [01.03.2019].

Wagner, R. & Paul, Ü. (2011): Abwehr gegen Fremd-DNA durch das bakterielle CRISPR/Cas-System. In: BIOspektrum, 17/4, S. 393-395.