

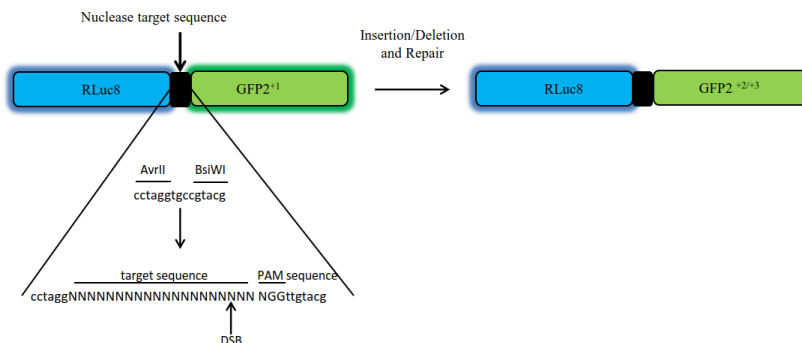
# Methode zur Bestimmung der CRISPR/Cas9 Restriktionseffizienz mittels BRET

Biosensor, CRISPR/Cas9, Restriktionseffizienz, BRET

## BESCHREIBUNG DER TECHNOLOGIE

Die Technologie umfasst eine neue Methode, mit der mittels **Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)** die Restriktionseffizienz von Endonukleasen oder Endonuklease-Systemen, die eine guide-RNA enthalten und zur Induktion von Doppelstrangbrüchen an einer DNA-Zielsequenz die für Genom-Editing-Ansätze von Interesse sind verwendet werden, bestimmt werden kann.

Die Methode eignet sich für Hochdurchsatzanalysen von potenziellen DNA-Zielsequenzen in Kombination mit verschiedenen gRNA-Endonuklease-Komplexen, z. B. CRISPR-Cas9-gRNA-Komplexen.



© K. Stieger, T. Wimmer, JLU Giessen

Abb. 1: Schematische Darstellung des Biosensors. Die DNA-Zielsequenz und eine PAM-Sequenz werden in das Plasmid kloniert. Bei einem Doppelstrangbruch (DSB) in der DNA-Zielsequenz entstehen durch die Wirkung von CRISPR/Cas9-gRNA, Insertionen oder Deletionen von Nukleotiden. Bei 66 % der induzierten Doppelstrangbrüche bleiben diese Insertionen oder Deletionen erhalten, wenn der DSB durch nicht-homologes End-Joining (NHEJ) repariert wird, was zu einem Frameshift im GFP2 kodierenden Gen führt und dadurch die Expression von GFP2 verloren geht. Die Expression der Luciferase (RLuc8) ist jedoch nicht betroffen.

## AUF EINEN BLICK...

### Anwendungsfelder

- Messung der CRISPR/Cas9 Restriktionseffizienz in biotechnologischen oder medizinischen Applikationen

### Branche

- Pharmazie
- Biotechnologie
- Medizin

### Alleinstellungsmerkmale

- Biosensor für CRISPR/Cas9 Effizienz
- Leicht anwendbar, günstig & hohe Sensitivität
- Methode nutzt **BRET**
- Anwendbar für Hochdurchsatz-Analysen

### Entwicklungsstand

- Im Labor an ausgewählten Targets getestet
- Nächste Schritte: Proof of Concept & Adaption für Hochdurchsatzmethoden

### Patentstatus

EP Patent wurde erteilt.

## ANWENDUNGSFELDER

Off-Target-Mutationen sind ein großes Problem von Endonukleasen die für Genom-Editing-Ansätze (z. B. das CRISPR-Cas9-System) verwendet werden, und die adressiert werden müssen. Selbst eine geringe Anzahl von unbeabsichtigten Mutationen kann schädliche Auswirkungen haben, weshalb die Optimierung der CRISPR-Cas9-Spezifität eine wesentliche Voraussetzung für eine zuverlässige Genom-Editierung ist.

Für die Entwicklung von CRISPR-Cas9-Systemen bestehend aus hochspezifischen gRNAs, die deutlich weniger oder gar keine Off-Target-Mutationen hervorrufen, wird eine zuverlässige und kostengünstige Methode zur Analyse von neu synthetisierten CRISPR-Cas9-Systemen und der durch sie induzierten DNA-Doppelstrangbrüche benötigt, die zudem für Hochdurchsatzanwendungen geeignet ist.

Das hier vorgestellte Sensor bietet hierfür eine Lösung.

## VORTEILE GEGENÜBER DEM STAND DER TECHNIK

Dem Stand der Technik mangelt es an Methoden, die kostengünstig, weniger aufwendig und empfindlich genug sind. Außerdem sind die bekannten Technologien nicht für Hochdurchsatzanalysen geeignet.

All diese Nachteile werden durch die neue Methode zur Bestimmung der CRISPR/Cas9-Restriktionseffizienz unter Verwendung des BRET-Systems überwunden.

## STAND DER PRODUKTENTWICKLUNG

Die Methode wurde an ausgewählten Targets im Labor getestet. Der nächste Schritt wird der Proof of Concept und die Anpassung an Hochdurchsatzverfahren sein.

## MARKTPOTENTIAL

Für den Markt für CRISPR/Cas-Systeme wird bis 2030 ein Wachstum von bis zu 25 Milliarden US-Dollar vorhergesagt. Der Markt für Genom-Editierung, auf dem CRISPR/Cas9 bereits mehr als die Hälfte des Marktes ausmacht, wird in den kommenden Jahren stark expandieren.

Der Markt für Screening-Bibliotheken und gRNA-Design-Tools hat noch eine geringe Marktdurchdringung. Umfassende End-to-End-Screening-, Design- und gRNA-Plattformen sind jedoch noch nicht verfügbar und stellen daher einen Schlüsselfaktor dar.

## KOOPERATIONSMÖGLICHKEITEN

Im Auftrag der Justus-Liebig-Universität Giessen sucht die TransMIT GmbH Kooperationspartner für die Weiterentwicklung oder Lizenznehmer weltweit.

## EINE TECHNOLOGIE DER



### Kontakt

TransMIT Gesellschaft  
für Technologietransfer mbH  
Kerkrader Straße 3  
35394 Gießen  
GERMANY  
[www.transmit.de](http://www.transmit.de)

### Kontakt Person

Dr. Michaela Kirndörfer  
Tel: +49 (0) 641 9 43 64 - 16  
Fax: +49 (0) 641 9 43 64 - 55  
[michaela.kirndorfer@transmit.de](mailto:michaela.kirndorfer@transmit.de)

