



# CRISPR/Cas9 - Möglichkeiten und Grenzen der „genetischen Schere“

C. Much, Dr. med. M. Rath & Prof. Dr. med. U. Felbor

**Mehr als 40 Jahre ist es her, dass Wissenschaftler die ersten sogenannten Genschere entdeckt haben. Seitdem hat die biomedizinische Forschung durch die Möglichkeiten, die sich aus ihrer Nutzung als molekularbiologisches Werkzeug ergeben, eine rasante Entwicklung genommen.**

Mit neu entdeckten **Genschere** wie dem CRISPR/Cas9-System scheint eine gezielte Veränderung des menschlichen Erbguts (**Genomeditierung**) in greifbare Nähe gerückt zu sein.

*Während diese Technologie in der Wissenschaft zunehmend Anwendung findet, ist eine direkte und breite therapeutische Nutzung zur Korrektur von genetischen Veränderungen bei Patienten mit erblichen Erkrankungen wie der zerebralen Kavernomatose derzeit jedoch nicht möglich.*

## Woher stammt das CRISPR/Cas9-System?

Clustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats (kurz **CRISPR**) stellen zusammen mit den CRISPR-assoziierten Eiweißen, den **Cas-Proteinen**, ein in vielen Bakterien zu findendes, spezifisches Abwehrsystem dar. Beim Eindringen eines Erregers werden kleine Sequenzen der fremden DNA in CRISPR-Abschnitte der eigenen Erbinformation des Bakteriums eingebaut. Hierdurch wird gewissermaßen ein „spezifisches Gedächtnis“ für

den Eindringling gebildet. Dies ermöglicht es Bakterien, die Erreger und dabei besonders die mit Ihnen eingebrachte DNA bei erneutem Kontakt durch den Vergleich mit den „abgespeicherten“ Sequenzen schneller erkennen, schneiden und damit zerstören zu können.

Das CRISPR-System wird entsprechend der beteiligten Proteine und den leicht unterschiedlichen Funktionsweisen in verschiedene Klassen und Subtypen eingeteilt. Das in der Forschung am häufigsten eingesetzte System ist jedoch **CRISPR/Cas9** aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes*, dem weit verbreiteten Erreger von Scharlach und anderen Atemwegs- und Hautinfektionen beim Menschen.

## Wo wird das CRISPR/Cas9-System eingesetzt?

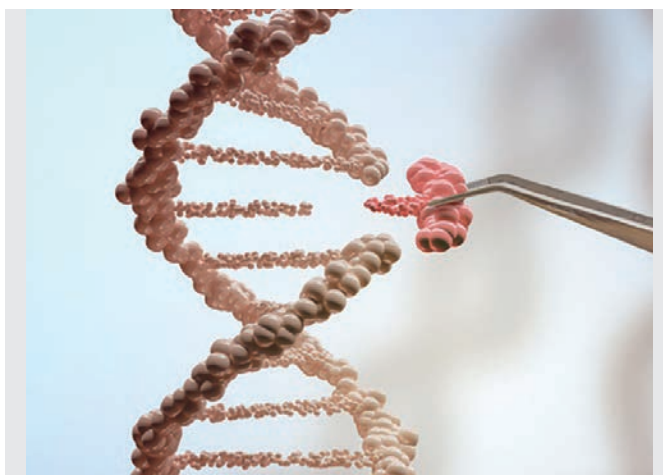
Durch biotechnologische Modifikationen ist im Labor heute auch die Anwendung in menschlichen Zellen möglich. In Zellkulturen und Modellorganismen wurde gezeigt, wie Cas9 sehr genau an den Ort gesteuert werden kann, an dem eine genetische Veränderung eingeführt werden soll. So können Gene beispielsweise gezielt ausgeschaltet werden.

Das Hauptanwendungsgebiet der Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9 ist derzeit die **biomedizinische Grundlagenforschung**. Während hier durch die Cas9-Genschere eine vergleichsweise schnelle genetische Manipulation möglich wird, ist die Übertragung in einen therapeutischen Ansatz beim Menschen extrem schwierig.

## Wie funktioniert die Veränderung des Genoms durch das CRISPR/Cas9-System?

Für die gezielte Veränderung der Erbinformation durch das CRISPR/Cas9-System werden im Wesentlichen **zwei Komponenten** benötigt, die hierfür einen Komplex eingehen: Das Cas9-Protein, welches durch seine enzymatische Aktivität den DNA-Doppelstrang schneiden kann und die sogenannte guide RNA, welche dem Cas9-Protein seinen Weg zur Zielsequenz leitet (Abbildung A). Die Funktionsweise der guide RNA basiert hierbei in gewisser Weise auf dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“. Durch Paarung der guide RNA mit der Ziel-DNA kann das Cas9-Enzym sehr spezifisch an den Ort der Editierung gesteuert werden.

Zumeist kommt es hier durch die enzymatische Aktivität von Cas9 zu einem Bruch des DNA-Doppelstrangs. Die Zelle versucht den gesetzten „Schaden“ durch die eigenen Reparaturmechanismen zu reparieren (Abbildung B).



CRISPR / Cas9 - die sogenannte „Genschere“

Die Reparatur von **Doppelstrangbrüchen** ist jedoch fehleranfällig, sodass es häufig zu einem Verlust oder auch zu einem zusätzlichen Einbau von DNA-Bausteinen kommt. Da dies meist mit einem veränderten Leserahmen bei der Umschreibung der DNA auf dem Weg zum Eiweiß vergesellschaftet ist, nutzt man diesen Mechanismus in der Forschung, um Gene gezielt auszuschalten. Hier wird auch eine derzeit noch bestehende Limitation des Systems deutlich:

*Ein Gen auszuschalten, ist ganz offensichtlich nicht das Ziel einer therapeutischen Anwendung bei erblichen Gefäßfehlbildungen wie der Kavernomatose.*

Zwar besteht prinzipiell mit dem CRISPR/Cas9-System die Möglichkeit, einzelne Bausteine der DNA gezielt auszuschneiden, auszutauschen oder fehlende Bereiche einzubauen, dies ist jedoch nicht nur deutlich schwieriger, sondern in den meisten Fällen auch weniger effizient.

### Grenzen und Herausforderungen des CRISPR/Cas9-Systems

Mit dem CRISPR/Cas9-System sind auch für die Behandlung von verschiedenen Erkrankungen Hoffnungen verbunden. Im Oktober 2016 wurden in China einem an Lungenkrebs erkrankten Patienten mittels CRISPR/Cas9 erstmals genetisch veränderte Abwehrzellen verabreicht. In dem **Therapieversuch**, der sich derzeit noch in

einem sehr frühen Stadium befindet, entnahmen chinesische Krebspezialisten dem Patienten Abwehrzellen, schalteten mit CRISPR/Cas9 ein Eiweiß aus, das die Immunantwort normalerweise abbremst, und vermehrten die genetisch veränderten Zellen in Kultur. Die Ärzte hoffen nun, dass die veränderten Zellen nach deren Rückführung in den Patienten die Krebszellen angreifen und zerstören.

Eine breite therapeutische Anwendung der Genomeditierung direkt an Patienten mit z.B. familiären Kavernomen ist derzeit jedoch nicht absehbar. So ist nicht geklärt, wie der CRISPR/Cas9-Komplex spezifisch in die jeweiligen Körperzellen in unterschiedlichen Geweben gelangen könnte. Oftmals handelt es sich dabei um Zellen, die sich nicht mehr teilen. Bei der Kavernomatose beispielsweise müsste der CRISPR/Cas9-Komplex gezielt in Gefäßwandzellen von kleinen Hirngefäßen gesteuert werden, um hier genetische Veränderungen in den CCM-Genen zu „korrigieren“. Spezielle Verpackungssysteme für ein in ausdifferenzierten Endothelzellen wirksames CRISPR/Cas-System müssten entwickelt werden, die ihrerseits jedoch mit einem Nebenwirkungspotential verbunden sein können.

Trotz der großen Genauigkeit des CRISPR/Cas9-Systems wird in Zellkulturen zudem immer wieder beobachtet, dass neben der eigentlichen Zielsequenz auch andere, weit entfernte Bereiche des Genoms verändert werden.

*Solche „Off-Target-Effekte“ sind schwer vorherzusagen und die hierdurch gesetzten Schäden derzeit nicht einzuschätzen.*

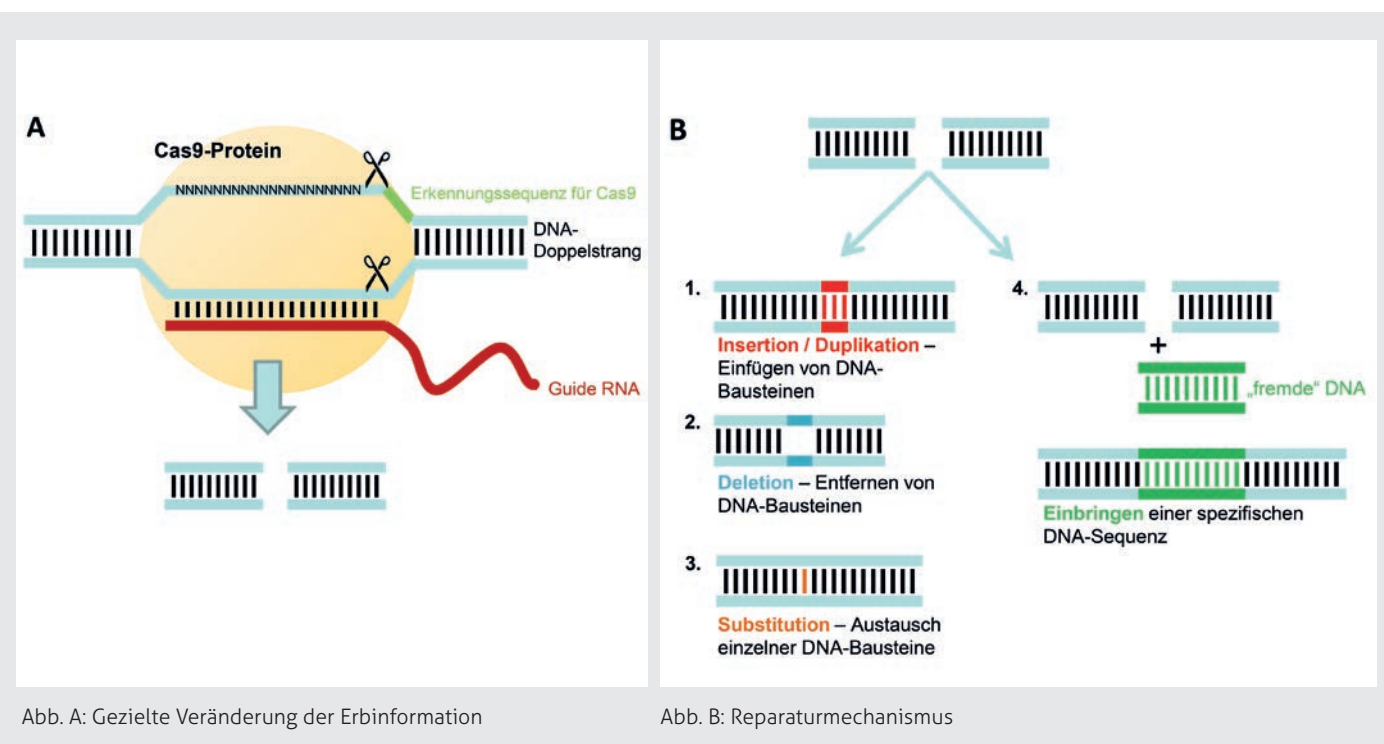


Abb. A: Gezielte Veränderung der Erbinformation

Abb. B: Reparaturmechanismus



Dies ist ein Grund, warum vereinbart wurde, dass eine Anwendung von CRISPR/Cas9 an menschlichen Ei- und Spermazellen derzeit nicht in Frage kommt.

Schließlich stellen die vielen verschiedenen genetischen Veränderungen, die in den Genen *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* in den jeweiligen Familien gefunden wurden, eine Herausforderung dar. Für jede Familie müssten eigene auf ihre spezifische Mutation zugeschnittene Ansätze entwickelt werden, die nicht in Vergleichskohorten auf ihre Wirksamkeit und mögliche Nebenwirkungen getestet werden könnten.

*In der wissenschaftlichen Aufklärung der Fragen, wie Gefäßfehlbildungen entstehen und wie stabile Zell-Zell-Verbindungen für eine dichte Gefäßwand aufrechterhalten werden, leistet das CRISPR/Cas9-System schon heute einen unschätzbaren Beitrag.*

In der biotechnologischen Forschung wird zudem daran gearbeitet, durch Veränderungen des Cas9-Proteins oder durch die Identifizierung weiterer CRISPR-assoziiierter Systeme Möglichkeiten der noch genaueren und effizienteren Genomeditorierung zu finden. So konnte beispielsweise kürzlich Cpf1 als weiteres CRISPR-assoziiertes Protein mit verändertem Wirkmechanismus identifiziert werden.

## Zusammenfassung

Zusammenfassend muss man heute sagen, dass CRISPR/Cas9 und andere Genschere ein unschätzbar wertvolles Werkzeug in der molekularbiologischen Forschung geworden sind. Neue Erkenntnisse und ein besseres Verständnis der Entstehung vieler Krankheitsbilder werden hierdurch ermöglicht. Die Erwartungen an eine breite und vor allem schnelle therapeutische Anwendung direkt am Patienten müssen jedoch derzeit deutlich gedämpft werden, da viele Fragen zur Umsetzbarkeit und zu möglichen Nebenwirkungen noch Gegenstand der aktuellen Forschung und ethischer Diskussionen sind.

Quellen:

- 1) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337: 816-821.
- 2) Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013, 339:819-23.
- 3) Hsu PD, Lander ES, Zhang F: Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157: 1262-1278.
- 4) Sander JD, Joung JK: CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 347-355.
- 5) Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina, der acatech – Deutsche Akademie der Technikwissenschaften und der Union der deutschen Akademien der Wissenschaften: Chancen und Grenzen des genome editing / The opportunities and limits of genome editing. Halle (Saale) 2015; 1. Auflage, 30 Seiten; ISBN: 978-3-8047-3493-7.
- 6) Cyranoski D: CRISPR gene editing tested in a person. *Nature* 2016; 539: 479.

**Was wir wissen, ist ein Tropfen,  
was wir nicht wissen, ein Ozean.**

(Isaac Newton)

