



# CRISPR-CAS9 UND GENOMCHIRURGIE

Neue Methoden zur Veränderung  
unseres Erbguts

Michael Boutros

Auszug aus dem Jahresbericht  
2016 / 2017 des Marsilius-Kollegs





## CRISPR-CAS9 UND GENOMCHIRURGIE

Neue Methoden zur Veränderung unseres Erbguts

Wie kaum eine andere Technologie hat in den letzten Jahren die Entdeckung und Anwendung von CRISPR-Cas9 die Lebenswissenschaften revolutioniert. Während das „Lesen“ in unseren genetischen Daten seit einigen Jahren standardisiert und in großem Umfang durchgeführt wird, ermöglicht CRISPR-Cas9 das gezielte „Umschreiben“ von DNA Sequenzen in Genomen.

Ziel der Marsilius Fellowship war es, die aktuellen Entwicklungen im Bereich des „Genome-Engineerings“ und die sich daraus ergebenden Herausforderungen interdisziplinär zu diskutieren.

### Lesen und Schreiben im Genom

Seit der Entdeckung des genetischen Codes vor mehr als 50 Jahren bleibt eine wichtige wissenschaftliche Aufgabe, Genome in ihrer Gesamtheit zu untersuchen und zu verstehen. Während der letzten Jahrzehnte wurden sehr große Fortschritte gemacht, die das „Lesen“ von Genomen beschleunigen. Neue DNA-Sequenzieretechnologien ermöglichen es seit einigen Jahren, Genome in ihrer Gesamtheit zu lesen und durch bioinformatische Verfahren in ihrer Tiefe zu analysieren. Diese Ganzgenom-Sequenzierungen erlauben detaillierte Einblicke in Veränderungen von individuellen Genen, um zum Beispiel genetische Risikofaktoren von Krankheiten zu erkennen, die evolutionäre Entwicklung von Genen in verschiedenen Organismen zu beschreiben und übergreifende strukturelle Merkmale von Genomen besser zu verstehen. Ganzgenom-

Sequenzierungen haben auch zur Identifikation von Genen geführt, die bei Krankheiten eine wichtige Rolle spielen. Ganzgenom-Sequenzierungen erreichen mittlerweile auch erste klinische Anwendungen, wie in der molekularen Diagnostik von Tumoren oder der Charakterisierung von Erbkrankheiten.

Gezielte Änderungen in Genen einzufügen ist seit vielen Jahren möglich, jedoch waren die Prozesse bisher aufwendig und der Eingriff in komplexe Genome fehleranfällig und langwierig. Durch gentechnologische Verfahren wurde in der Grundlagenforschung die Funktionsweise von Genen überprüft und sie wurden auch in biotechnologischen Prozessen eingesetzt, um Pharmazeutika zu produzieren oder Nutzpflanzen genetisch zu ändern.

Die Anwendung von CRISPR-Cas9 beschleunigt gentechnologische Verfahren erheblich und ermöglicht Änderungen in komplexen und sehr großen Genomen, die zuvor nicht praktikabel gewesen sind. CRISPR-Cas9 öffnet so eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten in der Grundlagenforschung, in der „roten“ und „grünen“ Biotechnologie, aber auch die Möglichkeit für Änderungen im menschlichen Genom, die zu einer breiten gesellschaftlichen Diskussion über die Grenzen ihres Einsatzes geführt haben. Während auch die ethischen Fragestellungen – wie der Eingriff in die menschliche Keimbahn – an sich nicht neu sind, erhalten sie durch die rasante Entwicklung in diesem Bereich eine neue Aktualität und Dringlichkeit.

CRISPR („clustered regularly interspersed short palindromic repeats“) wurden erstmals durch experimentelle und bioinformatische Analysen in den 90er Jahren in Bakterien entdeckt.<sup>1,2</sup> Die Funktion dieser repetitiven DNA Sequenzen, die in vielen bakteriellen Genomen gefunden wurden, blieb lang unklar und wurde erst viele Jahre später besser verstanden. Um 2005 fanden mehrere Forschungsgruppen heraus, dass diese repetitiven Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit mit der DNA von bakteriellen Viren haben. Dies führte zu der Hypothese, dass sie Teil eines adaptiven Immunsystems von Bakterien sind und Bakterien CRISPR Sequenzen verwenden, um die Infektion mit Viren zu verhindern.<sup>3,4,5,6</sup> In den folgenden Jahren wurde die Funktionsweise der CRISPR-Sequenzen weiter aufgeklärt und es wurde gezeigt, dass sie ihre Wirkung durch den Einbau in einen Protein-RNA Komplex entfalten, der DNA an gezielten Stellen schneidet.<sup>7,8</sup> Die repetitiven CRISPR-Sequenzen werden so zum Teil einer „programmierbaren Genschere“, die gleiche Sequenzen im Genom sucht und die DNA-Stränge durch einen Schnitt an definierter Stelle zertrennt.

Durch weitere Optimierung und Forschungsarbeiten zu der Struktur des CRISPR-Cas9 Komplexes gelang es wenig später, diesen als programmierbare Genschere auch in anderen Organismen wie in menschliche Zellen einzusetzen, um DNA an gezielten Stellen zu ändern.<sup>9</sup> Experimentell lässt sich dies einfach durchführen, indem eine 20-Basenpaar lange Sequenz, die als Leit-RNA Sequenz („guide-RNA“) ausgewählt wird und der zu modifizierenden Stelle entspricht, zusammen mit einer gleichbleibenden Hilfs-RNA Sequenz („tracr-RNA“) und dem für den Schnitt verantwortlichen Protein Cas9 in Zellen eingebracht wird. Dieser Komplex sucht die der Leit-Sequenz entsprechenden Stelle im Genom und schneidet die DNA. Zwei verschiedene Szenarien führen zu gezielten Änderungen im Genom: (1) das geschnittene Gen wird inkorrekt repariert (sg. „non-homologous end-joining“, NHEJ), was in den meisten Fällen zu einem Verlust der Gen-Funktion führt; (2) das Einbringen einer zusätzlichen DNA Sequenz ersetzt das Gen oder „repariert“ Mutationen („homologous-directed repair“, HDR) (Abbildung A und B, S.114).

Mit diesem „Zwei-Komponenten“ System, bestehend aus allgemein verwendbarer DNA-Schere und programmierbarer Leit-Sequenz, wurde ein sehr flexibles Werkzeug entwickelt, das zur Änderung von Informationen in Genomen breit einsetzbar ist und im Gegensatz zu vorherig zur Verfügung stehenden Methoden schnell angepasst werden kann. Änderungen, die zuvor Monate dauerten und große Ressourcen benötigten, können nun innerhalb von Tagen umgesetzt werden. CRISPR-Cas9 wurde auch angepasst, um Gene zu inhibieren und aktivieren, oder epigenetische Änderungen durchzuführen. Die Simplizität und Anpassbarkeit der Technologie macht CRISPR-Cas9 zu einem der mächtigsten Werkzeuge in der Genetik und beschleunigt viele Forschungsgebiete.

### Anwendungen von CRISPR-Cas9 beim Menschen

Während der Einsatz von CRISPR-Cas9 in der Grundlagenforschung weitgehend unumstritten ist, haben mögliche Eingriffe in das menschliche Genom, und insbesondere in die menschliche Keimbahn zu einer weitgehenden Diskussion über den Einsatz der Technologie geführt. In der sog. somatischen Gentherapie, für die erste klinische Anwendungen zur Zeit erprobt werden, werden Zellen aus dem menschlichen Körper entfernt und außerhalb des Körpers geändert. So können zum Beispiel Immunzellen genetisch manipuliert werden, um Gene gezielt zu reparieren oder sie gegen Krebszellen zu aktivieren. Diese Ansätze sind insgesamt wenig umstritten, da

die eingefügten Änderungen nicht in die menschliche Keimbahn übergehen und es vorrangig Sicherheits- und Effizienzfragen sind, die in den klinischen Studien erprobt werden. Demgegenüber sind Eingriffe in die menschliche Keimbahn, d.h. die Änderungen von menschlichen Keimbahnzellen durch CRISPR-Cas9 (oder auch andere gentechnologische Verfahren) hochumstritten und in vielen Ländern, wie auch in Deutschland, nicht erlaubt.

In ersten Publikationen wurden Experimente beschrieben, in denen mit Hilfe von CRISPR-Cas9 gezielte Änderungen an (nicht implantierten) menschlichen Embryonen durchgeführt wurden, um gezielt Erbkrankheiten zu modifizieren. So wurde von einer US-amerikanischen Gruppe eine Mutation in dem *MYBPC3* Gen ersetzt, das zur angeborenen Kardiomyopathie führt<sup>10</sup>. Diese Studie behauptete, dass es möglich ist, Gen-Änderungen mit hoher Effizienz in menschlichen Embryonen einzufügen; allerdings wurden die Ergebnisse der Studie von anderer Seite in Zweifel gezogen. Bisherige wissenschaftliche Studien, die verkündeten, erfolgreich „Gen X“ in menschlichen Embryonalzellen „repariert“ zu haben, erwiesen sich bei kritischem Blick als vielfach zu optimistisch und es wird abzuwarten sein, ob sie kritischen Nachprüfungen standhalten. Eine Reihe von interdisziplinären Studiengruppen, wie die „Hinxtion Group“<sup>11</sup> oder eine Arbeitsgruppe der „National Academy of Sciences“ (NAS) haben weitergehende Forschungen angeregt<sup>12</sup>, sich aber nicht grundsätzlich

gegen Keimbahntherapien ausgesprochen.<sup>13</sup> Aufgrund der unterschiedlichen nationalen Rahmenbedingungen und bisherigen Stellungnahmen, hat der Deutsche Ethikrat auch eine Diskussion auf internationaler Ebene angemahnt.<sup>14</sup>

### Diskussionen im Marsilius-Kolleg und *Marsilius kontrovers*

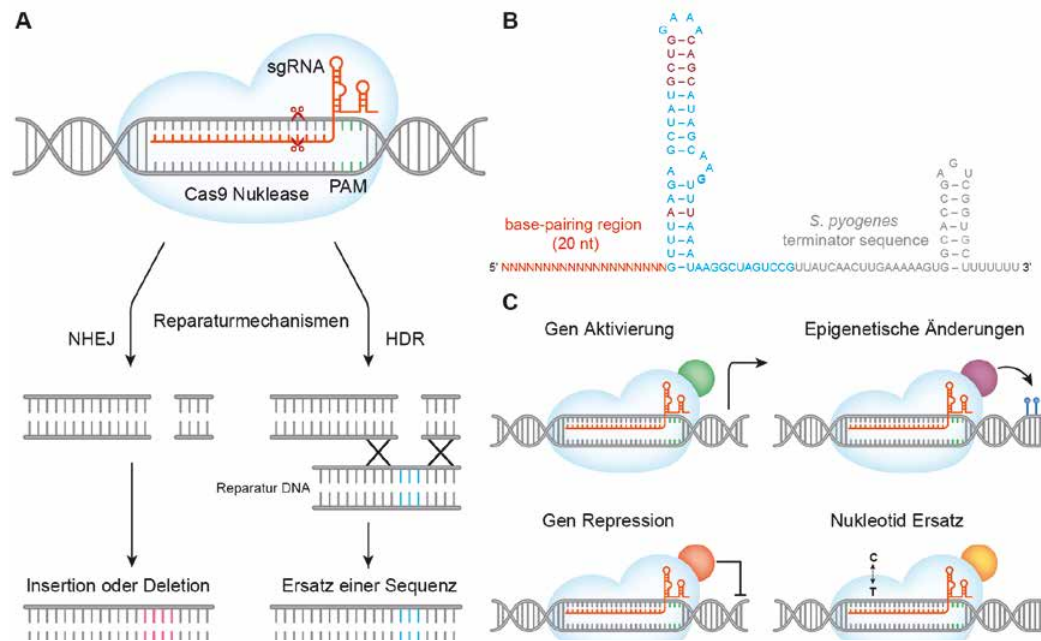
Bei den regen Diskussionen im Marsilius-Kolleg standen vor allem die umstrittenen Einsatzmöglichkeiten beim Menschen von CRISPR-Cas9 im Vordergrund. Es wurde auch unterschieden zwischen dem Einsatz als neue Forschungsmethode, die sich prinzipiell nicht von vorhandenen Technologien unterscheidet, und neuen, nun technologisch möglich gewordenen Ansätzen des Einsatzes beim Menschen. In den Diskussionen wurde auch herausgearbeitet, dass neue Methoden zum „Genome-Engineering“ keine grundlegend neuen Fragen aufwerfen, sie jedoch häufig bisherige Standpunkte auf den Prüfstand stellen, da es technisch wesentlich näher rückt, Eingriffe in das menschliche Erbgut vornehmen zu können.

Die Diskussionen im Marsilius-Kolleg waren auch eine hervorragende Vorbereitung einer öffentlichen Diskussion im Rahmen von „Marsilius kontrovers“ mit dem Thema „Dürfen wir Menschen designen? – CRISPR/Cas und Genomchirurgie als Verheißung oder Alptraum“, die in einer interdisziplinären Diskussionsrunde zusammen mit den Marsilius Fellows Phillip Stoellger (Theologie) und Albrecht Jahn (Public Health) Fragen zu dem Einsatz der CRISPR-Cas9 Technologie erörterte. Zu der Veranstaltung, die in Kooperation mit der Rhein-Neckar Zeitung stattfand, kamen mehr als 200 Teilnehmer, um zu CRISPR-Cas9 und Genom-Editing zu diskutieren. Aus unterschiedlichen Blickpunkten wurde darüber gesprochen, was neu an der CRISPR-Cas9 Technologie ist, welche Möglichkeiten sie eröffnet und was sie zum Beispiel in Bezug auf Änderungen an der menschlichen Keimbahn bedeutet. In einer breit gefächerten und durchaus differenzierten Diskussion ging es um Themen der Sinnhaftigkeit von genetischen Änderungen an der menschlichen Keimbahn, aber auch um die Frage des Zugangs und der Kosten aus gesundheitsökonomischer Sicht, ob ein Verbot des Einsatzes ein Akt „unterlassener Hilfeleistung“ an zukünftigen Generationen sein könnte und um die Gefahren des möglichen Einsatzes von genetischen „Enhancements“. Die Diskussion zeigte, dass häufig die Erwartungen und Befürchtungen zum Einsatz von CRISPR-Cas9 die heutigen Möglichkeiten bei weitem überschreiten – verdeutlichte aber auch die Notwendigkeit eines breiten gesellschaftlichen Diskurses.



## Interdisziplinäres Marsilius Seminar zu CRISPR-Cas9 und dem Einsatz der Genomchirurgie

Ein weiteres Ergebnis der Marsilius Fellowship war ein interdisziplinäres Seminar im Rahmen der Marsilius Studien, das im Sommersemester 2017 zum ersten Mal stattfand und im Wintersemester 2017/18 wiederholt wird. In diesem Seminar (zusammen mit Fruzsina Molnar-Gabor von der Juristischen Fakultät) beschäftigten sich Studierende aus einem breiten Fächerspektrum – u.a. Biowissenschaften, Medizin, Naturwissenschaften Physik, Jura, Politikwissenschaften – mit der Historie, den Möglichkeiten, den gesetzlichen Grundlagen des Verbots von Änderungen von menschlichen Embryos und mit Fragen, inwieweit die rechtlichen Rahmenbedingungen von den technischen Möglichkeiten überholt werden. Besonders interessant war auch eine vergleichende Betrachtung der unterschiedlichen Rechtssysteme und Forschungsförderung in Amerika, Europa und Asien.



CRISPR-Cas9 System zur Änderung von DNA.

(A) Aufbau und Einsatz von CRISPR-Cas9. (B) Struktur und Beispiel der Leit-RNA.

(C) Einsatz von CRISPR zur Änderung von Gensequenzen, Repression oder Aktivierung von Genen und Ändern von epigenetischen Merkmalen.

## Schlussbetrachtung

Das Jahr als Marsilius Fellow war geprägt von einer Vielzahl von interessanten und auch unerwarteten Diskussionen. Es war ein sehr bereicherndes Jahr, in dem in den Montagssitzungen Themen breit diskutiert wurden und aus unterschiedlicher Fächerperspektive kontrovers, aber immer respektvoll miteinander gesprochen und debattiert wurde. Auch ergaben sich für mein Thema eine Reihe von interessanten Überlappungen mit anderen Themen, wie Diskussionen zur Deutungsmacht der Lebenswissenschaften, Gesundheitsökonomie oder auch rechtlichen Fragen der Leihmutterchaft. Besonders bemerkenswert waren die Diskussionen aus den Perspektiven von sehr unterschiedlichen Fachrichtungen, über die biowissenschaftlichen Grundlagen, mögliche medizinische Anwendungen, aber auch gesundheitspolitische und gesellschaftliche Auswirkungen des Einsatzes der CRISPR-Cas9 Technologien. Für mich persönlich war dies ein sehr anregendes Jahr mit vielen interessanten Gesprächen, die in einem disziplinären Kontext nicht möglich gewesen wären.

- <sup>1</sup> Y. Ishino et al.: Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, in: *J Bacteriol* (1987), 169:5429-33. PMID: 3316184
- <sup>2</sup> F.J. Mojica et al.: Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning, in: *Mol Microbiol* (1995), 17:85-93. PMID: 7476211.
- <sup>3</sup> F.J. Mojica et al.: Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, in: *J Mol Evol* (2005), 60:174-82. PMID: 15791728.
- <sup>4</sup> C. Pourcel, G. Salvignol und G. Vergnaud: CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies, in: *Microbiology* (2005), 151:653-63. PMID: 15758212.
- <sup>5</sup> A. Bolotin et al.: Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin, in: *Microbiology* (2005), 151:2551-61. PubMed PMID: 16079334.
- <sup>6</sup> K.S. Makarova et al.: A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action, in: *Biol Direct* (2006), 16:1:7. PMID: 16545108
- <sup>7</sup> E. Deltcheva et al.: CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III, in: *Nature* (2011) Mar 31;471(7340):602-7. doi: 10.1038/nature09886. PubMed PMID: 21455174

- <sup>8</sup> **M. Jinek** et al.: *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*, in: *Science* (2012), 337:816-21. doi: 10.1126/science.1225829. PubMed PMID: 22745249.
- <sup>9</sup> **L. Cong** et al.: *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*, in: *Science* (2013), 339:819-23. doi: 10.1126/science.1231143. PubMed PMID: 23287718;
- <sup>10</sup> **H. Ma** et al.: *Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos*, in: *Nature* (2017), 548:413-419. doi: 10.1038/nature23305. PubMed PMID: 28783728.
- <sup>11</sup> **S. Chan** et al.; Hinxton Group: *Genome Editing Technologies and Human Germline Genetic Modification: The Hinxton Group Consensus Statement*, in: *Am J Bioeth* (2015), 15:42-7. doi: 10.1080/15265161.2015.1103814. PubMed PMID: 26632362.
- <sup>12</sup> **National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine**: *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance*. Washington, DC: *The National Academies Press* 2017. <https://doi.org/10.17226/24623>.
- <sup>13</sup> **P. Sykora und A. Caplan**: *The Council of Europe should not reaffirm the ban on germline genome editing in humans*, in: *EMBO Rep.* (2017), e201745246. doi: 10.15252/embr.201745246. PubMed PMID: 28986351.
- <sup>14</sup> Ad-hoc Stellungnahme des **Deutschen Ethikrats**, 2017: <http://www.ethikrat.org/dateien/pdf/empfehlung-keimbahn Eingriffe-am-menschlichen-embryo.pdf>, aufgerufen am 15.11.2017.