https://www.gen-ethisches-netzwerk.de/node/3208

Gen-ethischer Informationsdienst

Zwischen Labor und Versprechen

CRISPR-Cas9 und das Potenzial der Methode

AutorIn
Jasmin Schlotterbeck

Medieninteresse ist dem Genome Editing sicher, selbst das schwer auszusprechende *CRISPR-Cas9* hat es zu einiger Bekanntheit gebracht. Was steckt dahinter? Ein Blick auf Verfahren und Technik.

Unser Erbgut ist ein Text, in dem wir lediglich Rechtschreibfehler korrigieren müssen, um Erkrankungen zu heilen. Dieses Bild wird in der Diskussion um das sogenannte *Genome Editing* gern gezeichnet. Das Bild eines Textes, der molekular „korrigiert“ wird, bietet sich hier einfach an. Denn der Begriff Genome Editing bezeichnet ganz gezielte und zum Teil kleinteilige Veränderungen von Bestandteilen der DNA, etwa von bestimmten Sequenzen, also Basenabfolgen, aber auch von einzelnen Basenpaaren. Der „Text“ DNA wird umgeschrieben, „Buchstaben“ oder „Satzteile“ ersetzt oder gestrichen.

CRISPR-Cas9: „Genschere“…

Ein Verfahren des Genome Editing ist unter der Bezeichnung CRISPR-Cas9 (***C****lustered* ***r****egularly* ***i*** *nterspaced* ***p****alindromic* ***r****epeats - CRISPR-associated protein* ***9***) bekannt geworden. Dieses molekularbiologische System ist ursprünglich Teil der bakteriellen Immunabwehr. Bei einer Infektion bauen Bakterien in das auch als CRISPR-Cas9-*Komplex* bezeichnete Molekül Sequenzen der viralen DNA ein. Kommt es zu einem erneuten Virenangriff, kann das Bakterium über RNA die entsprechende komplementäre Stelle auf der Virus-DNA binden, deshalb wird hier von *Single Guide RNA* (sgRNA) gesprochen.1 CRISPR-Cas9 besteht außerdem aus der Nuklease Cas9, mit der die DNA des Virus dann genau an dieser Stelle geschnitten und das Virus so deaktiviert wird.

Diese beiden Eigenschaften von CRISPR-Cas9 machen das System als Methode interessant: Eine bestimmte Sequenz auf der DNA zum einen zu erkennen, und zum anderen an genau dieser Stelle schneiden zu können. Deshalb wird CRISPR-Cas9 auch als „Genschere“ bezeichnet. Da das Erbmaterial in allen Lebewesen mehr oder weniger gleich aufgebaut ist, lässt sich diese „Genschere“ - leicht modifiziert - bei Menschen, bei Tieren, bei Pflanzen und bei Bakterien gleichermaßen verwenden.

…und Instrument zur „Reparatur“

Bei der Anwendung von CRISPR-Cas9 als Methode ist das Schneiden der DNA allerdings nur der erste Schritt. Der durch das Schneiden erzielte Bruch des DNA-Doppelstrangs setzt zelleigene

Reparaturmechanismen in Gang, die den DNA-Strang wieder zusammenfügen. Diese Mechanismen können nun für zwei verschiedene Prozesse genutzt werden: Für das *Non-homologous end-joining* (NHEJ), um Gene „auszuschalten", oder für die *homologe Rekombination*, um Gene zu verändern.

Beim NHEJ werden einzelne Basen gelöscht oder willkürlich in die Sequenz eingefügt. Es entstehen also Basenabfolgen, die das Gen unleserlich machen und somit deaktivieren. Für eine homologe Rekombination hingegen muss zusammen mit dem CRISPR-Cas9-Konstrukt eine DNA-Vorlage, ein so genanntes *Template*, in die Zelle eingeschleust werden. Das Template ist eine Basen-Sequenz, die eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit mit dem Ziel-Gen aufweist, das heißt, *homolog* zu ihm ist. Die zelleigenen Enzyme, die den Doppelstrangbruch reparieren, fügen dann diese Vorlage an der Bruchstelle ein, fehlerhafte Gene werden also durch funktionierende Varianten ersetzt.[2]

CRISPR-Cas9 ist nicht das erste Genome Editing-Verfahren, das ein zielgerichtetes Schneiden und Einfügen von Genen erlaubt. Im Gegensatz zu anderen Verfahren - die zum Beispiel Zink-Finger-Nukleasen oder *Transcription Activator-Like Nucleases* (TALENs) nutzen - beruht es aber nicht auf der Interaktion von Proteinen, sondern von RNA mit der Ziel-DNA. Im Gegensatz zu Proteinen kann die komplementäre sgRNA für ein bestimmtes Ziel-Gen beziehungsweise eine gewünschte Basensequenz vergleichsweise einfach und schnell hergestellt werden, CRISPR-Cas9 ist daher deutlich zeitsparender und billiger.

Verfahrensfragen

Damit scheint das System andere Verfahren also in mehrfacher Hinsicht zu übertreffen: CRISPR-Cas9 kann in verschiedensten Organismen angewendet werden, der Komplex ist einfach in der Herstellung und überdies kostengünstig. Zumindest was den Einsatz am Menschen anbelangt, ist aber dennoch Skepsis angebracht. Hier stellen sich nicht nur - wie die öffentliche Debatte um das Genome Editing bisweilen suggeriert - ethische Fragen, sondern auch eine ganze Reihe technischer Probleme, die einen Einsatz der Methode in der Medizin schwierig machen.

So hängt die therapeutische Wirksamkeit des eingebrachten Konstrukts von dessen *Effizienz* ab, das heißt davon, in wie vielen Zellen eines Organs oder Gewebes das Ziel-Gen verändert werden konnte. Werden nicht alle Zellen erreicht, entsteht ein genetisches Mosaik, das heißt ein Muster an Zellen mit funktionierenden und nicht funktionierenden Varianten des Gens. Die Effizienz wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, etwa von der Art des Vektors, der das CRISPR-Cas9-System in die Zelle transportiert, oder auch von der Menge der verwendeten sgRNA. Generell gilt: Je mehr sgRNA verwendet wird, desto mehr Zielsequenzen werden geschnitten und die Effizienz steigt. Allerdings steigt damit auch die Wahrscheinlichkeit von *Off-Target-Effekten*, da die Sequenz-Spezifität der gewählten sgRNA nicht immer perfekt ist.

Die Frage nach der *Sequenz-Spezifität* stellt sich auch bei anderen Genome Editing-Verfahren. Schneidet CRISPR-Cas9 (beziehungsweise das jeweilige Konstrukt) tatsächlich nur an der gewünschten Zielsequenz? Oder an einer anderen Stelle, sodass es zu so genannten Off-Target-Effekten kommt?[3] Es besteht also zum Beispiel das Risiko, unbeabsichtigt Gene zu verändern oder „auszuschalten", die bei grundlegenden Körperfunktionen eine Rolle spielen. Deshalb muss bei der Konstruktion der sgRNA unter anderem beachtet werden, ob es im Genom andere, der Ziel-Sequenz ähnelnde Sequenzen gibt, an die die sgRNA fälschlicherweise binden könnte.[4]

Ein weiteres Problem sind Sequenzvariationen zwischen den Genomen verschiedener Organismen. Auch Sequenzen, die zwar homolog zum Ziel-Gen sind, aber nicht *genau* so in jedem Organismus vorkommen, können unerwartete Off-Target-Effekte zur Folge haben.[5]

Das Problem des Vektors

Einige Anforderungen stellt eine Anwendung von CRISPR-Cas9 am Menschen auch an den Vektor. Der Vektor ist das „Transportmittel“, das das Konstrukt erstens in möglichst viele Zellen einbringen soll. Zweitens muss er ein großes Fassungsvermögen besitzen. Außerdem soll er drittens zielgenau funktionieren und die „Genschere“ nur in Zellen des gewünschten Zelltyps befördern. Und nicht zuletzt darf der Vektor nicht toxisch wirken oder eine Immunreaktion auslösen.6 Mögliche Fähren sind Viren und kleine, im menschlichen Körper vorkommende Membranbläschen, die sogenannten *Liposomen*.

Kein Vektor würde benötigt, wenn der Komplex direkt in einzelne Zellen injiziert würde. Die Erfolgsquote ist dabei relativ hoch, allerdings ist das Verfahren auch sehr viel aufwändiger. Wie auch bei der so genannten somatischen Gentherapie (beziehungsweise den Versuchen, Erkrankungen gentherapeutisch zu behandeln), würden dem menschlichen Körper zunächst Zellen - etwa Immun- oder auch Blutstammzellen - entnommen, im Labor genetisch verändert, vermehrt und dann reimplantiert.

Insgesamt ist bei einer Gentherapie mit CRISPR-Cas9 mit ähnlichen Problemen zu rechnen wie bei älteren Ansätzen. Einen Vorteil ihnen gegenüber hätte CRISPR-Cas9 aber vermutlich: Da die DNA-Sequenzen nicht nur kurzfristig in die Zelle eingebracht, sondern direkt in das Genom integriert und an Nachfolgerzellen weitergegeben würden, wäre gegenüber herkömmlichen gentherapeutischen Versuchen mit einer deutlich längeren und eventuell sogar nachhaltigen Wirksamkeit der Veränderungen zu rechnen - zumindest in der Theorie.7

Hoffnung im Labor

Anlass für die Hoffnung, CRISPR-Cas9 künftig auch therapeutisch einsetzen zu können, geben einige Laborstudien, die nachweisen, dass gezielte Veränderungen menschlicher DNA mit CRISPR-Cas9 - jedenfalls auf zellulärer Ebene - machbar sind. So belegte beispielsweise 2015 eine Forschungsgruppe, dass mit dem Komplex eine genetische Veränderung beseitigt werden kann, die Hämophilie hervorruft. Der Anteil der modifizierten Zellen allerdings war recht klein.8

In der HIV-Forschung wurde mithilfe von CRISPR-Cas9 wiederholt der CCR5-Rezeptor an T-Immunzellen erfolgreich verändert, sodass das HI-Virus nicht mehr in die Zelle eindringen konnte. Die Zellen werden durch die Veränderung faktisch resistent gegen das Virus - allerdings gibt es Hinweise darauf, dass sie sich dann leichter mit anderen Viren infizieren.9

Auch im Fall von Mukoviszidose weckt CRISPR-Cas9 Hoffnungen. Im Labor war es möglich, das - bei der Erkrankung veränderte - CFTR-Gen in Dickdarmstammzellen mit einem CRISPR-Cas9-Konstrukt zu modifizieren und aus den Zellen ein Organoid mit wiederhergestellter physiologischer Funktion heranzuzüchten.10 Allerdings wurden nur wenige isolierte Zellen behandelt, beim Menschen dagegen ist in der Regel eine große Anzahl von Zellen in verschiedenen Geweben betroffen.11

Voreilige Therapieversprechen

CRISPR-Cas9 hat allerdings nicht nur Hoffnungen auf künftige Therapien geweckt; auch die Idee, menschliche Keimzellen oder Zygoten zu verändern und so die Vererbung genetisch bedingter Erkrankungen zu verhindern, wird (wieder) diskutiert - und verfolgt: Im April 2015 veröffentlichten chinesische WissenschaftlerInnen Ergebnisse eines Versuches, mithilfe von CRISPR-Cas9 menschliche Zygoten genetisch zu verändern.

Ihre Erfolgsquote war äußerst gering: Von den ursprünglich 86 - nicht lebensfähigen - Embryonen überlebten 71 die Versuche. 54 von ihnen wurden anschließend genetisch getestet, nur etwas über die Hälfte (28) wies überhaupt einen Strangbruch an der gewünschten Stelle auf, und lediglich vier die neue DNA-Sequenz. Überdies war es zu Mosaikbildungen gekommen, die vier Embryonen trugen die Veränderung also nicht in jeder Zelle. Hinzu kam eine hohe Zahl von Off-Target-Effekten; einige Wissenschaftler_Innen meldeten

außerdem Zweifel am methodischen Aufbau der Studie an.12

Unabhängig davon, wie erfolgreich solche Forschungen sind oder sein werden, ist vor allem der Nutzen einer so genannten „Keimbahntherapie“ höchst fraglich, da es kaum sinnvolle Anwendungsgebiete gibt. Dennoch bestimmt das Thema die öffentliche Debatte um das Genome Editing.13 Sinnvollerweise sollten aber zunächst die umfangreichen Versprechen zur somatischen Gentherapie in den Blick genommen werden, denn schließlich gibt es einige Studienergebnisse, die eine Anwendung von CRISPR-Cas9 zur Behandlung beispielsweise von Erkrankungen des Immunsystems durchaus denkbar machen. Dass es sich hier bislang lediglich um eine *theoretische* Möglichkeit handelt, muss kenntlich gemacht werden. Therapieversprechen jedenfalls sind mit Vorsicht zu genießen, da CRISPR-Cas9 zum jetzigen Zeitpunkt weder sicher noch effizient genug ist, um am Menschen angewandt zu werden.

- 1Dabei muss die wiederholte Attacke nicht dasselbe Bakterium treffen. Da die Virus-DNA in die die DNA des Bakteriums aufgenommen wurde, stehen diese Informationen auch späteren Generationen zur Verfügung.
- 2P.Hsu, E.Lander, F.Zhang: Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering . Cell 2014, im Netz unter www.sciencedirect.com oder www.kurzlink.de/gid234_k.
- 3Off-Target: außerhalb des Ziels.
- 4Die Fehlerhäufigkeit kann durch ein Double-Nickage-Verfahren reduziert werden. Statt Cas9 erzeugen dann zwei Nukleasen mit zugehöriger sgRNA jeweils einen DNA-Einzelstrangbruch. Nur wenn beide Enzyme an der richtigen Stelle schneiden, entsteht auch ein Bruch des Doppelstrangs. Vgl. H.O’Geen, A.Yu, D.Segal: How specific is CRISPR-Cas9 really? Current Opinion in Chemical Biology 2015, im Netz unter www.sciencedirect.com oder www.kurzlink.de/gid234_i. Die Spezifität kann auch erhöht werden, indem eine gekürzte, 18 Nukleotide (NT) lange sgRNA verwendet wird. Deren Bindung an die DNA allerdings ist schwächer als die der normalerweise 20 NT langen sgRNA; letztere ist sehr stabil und kann mehrere Basenfehlpaarungen tolerieren, während eine verkürzte sgRNA nur dann stabil genug ist, wenn wirklich alle Basen korrekt komplementär binden. Vgl. Hsu, Lander und Zhang 2014, a.a.O.
- 5Vgl. O’Geen, Yu und Segal 2015, a.a.O.
- 6J.Doudna, E.Charpentier: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 2014, im Netz unter http://science.sciencemag.org oder www.kurzlink.de/gid234_l.
- 7Vgl. Hsu, Lander und Zhang 2014, a.a.O.
- 8In dem Laborexperiment wurde die verkehrt herum eingebaute DNA-Sequenz (Inversion) in einem Gen ersetzt, das für einen Blutgerinnungsfaktor codiert. Vgl. C.Park et al.: Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell 2015, im Netz unter www.sciencedirect.com oder www.kurzlink.de/gid234_m.
- 9P.Mandal et al.: Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effetor cells using CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell 2014, im Netz unter www.sciencedirect.com oder www.kurzlink.de/gid234_n.
- 10Ein Organoid ist eine dreidimensionale Organknospe, die im Labor gezüchtet wurde.
- 11G.Schwank et al.: Functional Repair of CFTR by CRISPR-Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. Cell Stem Cell 2013, im Netz unter www.cell.com oder www.kurzlink.de/gid234_o.
- 12P.Liang et al.: CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human triponuclear zygotes. Protein & Cell 2015, im Netz unter http://link.springer.com oder www.kurzlink.de/gid234_p.
- 13Vgl. dazu auch den Artikel von Sigrid Graumann auf S. 15 in diesem Heft.

Informationen zur Veröffentlichung

Erschienen in:
GID Ausgabe 234 vom Februar 2016
Seite 8 - 10