

SPECULUM

Geburtshilfe / Frauen-Heilkunde / Strahlen-Heilkunde / Forschung / Konsequenzen

Reischer T

**Genomchirurgie: CRISPR/Cas9 eine Revolution im
Genom-Editing**

*Speculum - Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe 2017; 35 (4)
(Ausgabe für Österreich), 16-18*

Homepage:

www.kup.at/speculum

Online-Datenbank
mit Autoren-
und Stichwortsuche

Krause & Pachernegg GmbH • Verlag für Medizin und Wirtschaft • A-3003 Gablitz

P.b.b. 02Z031112 M, Verlagsort: 3003 Gablitz, Linzerstraße 177A/21

**Erschaffen Sie sich Ihre
ertragreiche grüne Oase in
Ihrem Zuhause oder in Ihrer
Praxis**

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



Genomchirurgie: CRISPR/Cas9 eine Revolution im Genom-Editing

Th. Reischer

Mit Schlagzeilen wie „Genschere heilt Erbkrankheiten“, „Das Spiel mit der Schöpfung“ oder „Mit der Genschere zum Designerbaby“ wurde erst kürzlich ein weiterer Meilenstein der molekularbiologischen Forschung in das Rampenlicht der Öffentlichkeit gerückt. Die „Genschere“ CRISPR/Cas9 wurde erstmals 2012 in Bakterien zur Immunabwehr gegen Viren von Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier beschrieben. Seither sind unzählige Publikationen zu dieser Technik veröffentlicht worden. In China gelang es 2015, mit Hilfe von CRISPR/Cas9 eine krankheitsauslösende genetische Veränderung in humanen Embryonen zu korrigieren. Eine rezente „Nature“-Publikation berichtet eine noch effizientere Anwendung dieser Methode in humanen Embryonen. Die Verwendung von CRISPR/Cas9 zur Korrektur humaner Embryonen ist zum jetzigen Zeitpunkt sowohl technisch unausgereift als auch ethisch sehr umstritten.

Wie funktioniert CRISPR/Cas9?

Das wesentliche Prinzip dieser Methode ist es, im ersten Schritt präzise an einer spezifischen Stelle des Erbguts an die DNA zu binden und dort einen Doppelstrangbruch zu induzieren. Im zweiten Schritt wird durch verschiedene Mechanismen die Reparatur des DNA-Doppelstrangs erreicht.

Das CRISPR/Cas9-System basiert auf einem natürlichen Mechanismus (adaptives Abwehrsystem) von Bakterien, das dazu dient, sich vor schädlichen Viren oder Plasmiden zu schützen. CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) sind kurze, sich wiederholende DNA-Sequenzen im Erbgut der Bakterien, die zwischen diesen identischen palindromi-

sehen DNA-Abschnitten spezifische DNA-Sequenzen beinhalten, welche viralen DNA-Sequenzen entsprechen (Spacer-DNA).

Wenn ein Virus in ein Bakterium eindringt, wird ein Teil der Virus-DNA in die CRISPR-DNA integriert (Spacer-DNA), folglich produziert das Bakterium zwei Typen von RNA: die CRISPR-RNA (welche einen kleinen Teil der Sequenz des Virus beinhaltet) und die tracrRNA (transactivating CRISPR-RNA), welche das Cas9-Protein rekrutiert und gemeinsam einen Komplex bildet. Cas9 (CRISPR associated protein) ist eine Endonuklease, ein Enzym, das DNA schneiden kann. Wenn die CRISPR-RNA die komplementäre Sequenz in dem Genom des Virus findet, bindet diese, so dass Cas9 dort die DNA schneiden kann und das Virus ausgeschaltet wird.

Die CRISPR-RNA und die tracrRNA lassen sich zu einem Molekül der sgRNA (single-guide RNA) fusionieren. Man kann die Sequenz dieser fusionierten RNA-Moleküle variieren und dadurch genau bestimmen, wo das CRISPR/Cas9-System einen Doppelstrangbruch auslöst. Ein Vorteil zu anderen Genom-Editing-Verfahren ist, dass diese Methode kein Protein-Engineering (spezifische Proteinherstellung) erfordert, sondern nur die Herstellung der sgRNA, dadurch ist das Verfahren schneller und kostengünstiger.

Nach einem Doppelstrangbruch gibt es in der Zelle zwei Arten von Reparaturmechanismen:

- **NEHJ (nicht homologes Endjoining):** Dabei handelt es sich um einen fehleranfälligen Reparaturmechanismus, der oft Veränderungen in der Gensequenz (Mutationen) oder auch Deletionen (Verlust an genetischem Material) zur Folge hat. Diese Methode wird vor allem beim

Knockout von Genen verwendet, da man durch die induzierten Fehler in der DNA-Sequenz ein gewünschtes Gen ausschalten kann.

- **Homologe Rekombination (HDR):** Diese durch einen präzisen Reparaturvorgang charakterisiert, der es ermöglicht, ganze Gene auszutauschen, Gene gezielt zu fusionieren, DNA-Sequenzen einzufügen (Insertion) oder diese gezielt zu verändern. Mit diesem Mechanismus können fehlerhafte Gene oder eine fehlerhafte DNA-Sequenz, nach dem Ausschneiden durch CRISPR/Cas9, mit Hilfe von Reparaturvorlagen (repair template DNA) korrigiert werden, indem so genau die gewünschte DNA-Sequenz an der Bruchstelle eingebaut wird. Dieser Reparaturmechanismus ist jedoch vorrangig in Zellen, welche sich in der Zellteilung befinden, aktiv, wobei NEHJ in allen Zellzyklusphasen aktiv ist.

Zusammenfassend ist das CRISPR/Cas9-System im Vergleich zu anderen Genom-Editing-Verfahren einfach, effizient, robust und in allen Spezies anwendbar. Außerdem ist es mit dieser Methode möglich, in einem Experiment an mehreren Stellen gleichzeitig DNA zu verändern (= Multiplexing). Jedoch gibt es auch einige Limitierungen, wie zum Beispiel ungezielte (off-target) Aktivitäten des Cas9-Proteins, die zu ungewollten Veränderungen an der DNA führen können. Des Weiteren ist eine Verbesserung der Kontrolle über Reparaturmechanismen in der Zelle notwendig, um die Zelle vor fehlerhaften DNA-Veränderungen zu schützen.

Klinische Anwendungen von CRISPR/Cas9

- Tiermodelle der nächsten Generation: Allen voran bietet CRISPR/Cas9 unzählige Anwendungsmöglichkeiten in diversen Bereichen der Forschung, wie zum Beispiel zur Herstellung von Krankheitsmodellen komplexer Erkrankungen, wie Krebserkrankungen, in welchen multiple parallel auftretende Veränderungen im Genom charakteristisch sind.
- Gentherapie in monogenetischen Erkrankungen: Wie bereits beschrieben, ist es mit CRISPR/Cas9 möglich, krankheitsverursachende Mutationen zu löschen und zu ersetzen. Dies ist vor allem bei genetischen Erkrankungen des Immunsystems gut umsetzbar, in welchen die Her-

stellung von funktionellen Kopien des krankheitsverursachenden Gens die Erkrankung heilen kann. In einem Mausmodell wurden bereits Erfolge in der Behandlung der Muskeldystrophie Duchenne berichtet.

- Antivirale Therapie: Aus der Entdeckung von CRISPR/Cas9 als erworbenes Immunsystem von Bakterien gegen Viren ergibt sich die Überlegung, diese Strategie zur Behandlung von viralen Erkrankungen in Pflanzen und Säugetieren zu verwenden. Mit Hilfe von CRISPR/Cas9 wäre es zum Beispiel möglich, eine bestimmte virale DNA-Sequenz, welche für die virale Replikation verantwortlich ist, zu eliminieren, um die Vermehrung des Virus zu hemmen. Daraus könnten sich in der Zukunft weitere Therapiemöglichkeiten für HIV-, Hepatitis B- und Hepatitis C-Infektionen ergeben.
- Korrektur pathogener Mutationen in menschlichen Embryos: 2015 berichtete ein chinesisches Forschungsteam erstmals über die Anwendung von CRISPR/Cas9 in menschlichen Embryonen. Ziel dieses Projekts war es, eine genetische Veränderung im *HBB*-Gen, welche homozygot ursächlich für Beta-Thalassämie ist (autosomal rezessive Erkrankung), in den embryonalen Zellen zu korrigieren. Dies gelang zwar, jedoch entstanden in den Embryonen häufig Mosaik (= das Vorliegen des defekten und des korrigierten Genotyps in einem Embryo als Mosaik) sowie ungewollte DNA-Veränderungen. Zwei Jahre später wurde nun im Journal „Nature“ eine verbesserte und effizientere Anwendung von CRISPR/Cas9 beschrieben. Den Wissenschaftlern aus Oregon gelang es, in menschlichen Embryonen, welche eine heterozygote Veränderung im *MYBPC3*-Gen (ursächlich für hypertrophe Kardiomyopathie, eine autosomal dominante Erkrankung) trugen, durch eine verbesserte Doppelstrang-Reparatur mittels homologer Rekombination effizient zu korrigieren und Mosaik in Embryonen zu verhindern.

Ethische Aspekte der Anwendung in humanen Embryonen

Im Allgemeinen sind hierbei zwei grundlegende Aspekte zu unterscheiden: Zum einen die möglichen Risiken bei fehlerhafter Anwendung und zum anderen die Folgen einer erfolgreichen Anwendung. Wie bereits

erwähnt, sind ungewollte genetische Veränderungen bei diesem Verfahren möglich, wobei auch weitere Generationen davon betroffen sein können und deren Folgen zum jetzigen Zeitpunkt nicht einschätzbar sind.

Bei erfolgreichem Gebrauch von CRISPR/Cas9 in menschlichen Embryonen rückt der Begriff „Eugenik“ in den Vordergrund. Diesbezüglich unterscheidet man zwischen der Auswahl positiver Merkmale (positive Eugenik) und der Verhinderung von Erkrankung (oder auch negativer Merkmale/negative Eugenik). Während ein möglicher Verlust der genetischen Vielfalt in folgenden Generationen wenig diskutiert wird, sind vielmehr Bedenken über die Erschaffung von „Designerbabys“ oder „Übermenschen“ in den medialen Diskussionen vorrangig. In welchem Ausmaß eine Anwendung von CRISPR/Cas9 in der Zukunft möglich sein wird, obliegt der Gesellschaft und den Gesetzgebern. Die Novelle des Gentechnikgesetzes 2015 hat gezeigt, dass in Österreich diesbezüglich eine eher zurückhaltende Haltung eingenommen wird. Das bedeutet, dass man zumindest in Österreich bezüglich der Angst einer CRISPR/Cas9-Anwendung zur Produktion von „Designerbabys“ eher Entwarnung geben kann.

Zukunftsperspektiven

Technologien basierend auf CRISPR/Cas9 werden das Verständnis der genetischen Basis von menschlichen Erkrankungen grundlegend verbessern. Es wird ohne Zweifel in der Zukunft möglich sein, genetische Erkrankungen, die momentan nicht behandelbar sind, gezielt und erfolgreich zu therapieren. Außerdem werden diese Technologien zur Verbesserung der personalisierten Medizin und dadurch zur effektiveren Behandlung von Patienten führen. Eine An-

wendung von CRISPR/Cas9 in der menschlichen Keimbahn, nicht nur zur Behandlung von genetischen Erkrankungen, sondern auch zur Veränderung von Intelligenz oder anderen Merkmalen und Eigenschaften wird in naher Zukunft realistisch und somit zu einer wachsenden ethischen Herausforderung.

LITERATUR:

1. Bolotin A et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005; 151: 2551–61.
2. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* 2015; 21: 121–31.
3. Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med* 2016; 48: e265.
4. Howe SJ et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008; 118: 3143–50.
5. Jinek M et al. A programmable dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 37: 816–21.
6. Liang P et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & Cell* 2015; 6: 363–72.
7. Ma H et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017; 548: 413–9.
8. Men K et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of human genetic disease. *Science China Life Sciences* 2017; 60: 447–57.
9. Ormond KE et al. Human germline genome editing. *Am J Hum Genet* 2017; 101: 167–76.

Korrespondenzadresse:

Dr. Theresa Reischer
Abteilung für Geburtshilfe und fetomaternale Medizin
Universitätsklinik für Geburtshilfe
A-1090 Wien, Währinger Gürtel 18–20
E-mail:
theresa.reischer@meduniwien.ac.at

Mitteilungen aus der Redaktion

Abo-Aktion

Wenn Sie Arzt sind, in Ausbildung zu einem ärztlichen Beruf, oder im Gesundheitsbereich tätig, haben Sie die Möglichkeit, die elektronische Ausgabe dieser Zeitschrift kostenlos zu beziehen.

Die Lieferung umfasst 4–6 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Das e-Journal steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) zur Verfügung und ist auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung kostenloses e-Journal-Abo](#)

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)