

**WERKZEUG**

**GENSCHERE**

WERKZEUG GENSCHERE

# PRÄZISE SCHNITTE INS ERBGUT

MICHAEL BOUTROS

**Wie kaum eine andere Technik haben molekularbiologische Instrumente wie die „Genschere“ CRISPR/Cas und verwandte Methoden zur Genomeditierung die Lebenswissenschaften verändert. Mit ihrer Hilfe lässt sich Erbgut ausschneiden, verändern und wieder einbauen. Das bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, auch beim Menschen – und wirft zahlreiche ethische und rechtliche Fragen auf. Nötig ist daher eine breite gesellschaftliche Diskussion, die Chancen und Risiken gleichermaßen sorgfältig abwägt.**

# M

Mehr als drei Milliarden „Buchstaben“ des Erbmoleküls DNA sind in jeder einzelnen unserer 100 Billionen Zellen enthalten, meist in doppelter Ausführung. Das gesamte Erbgut einer Zelle – das Genom – wird fortlaufend kopiert, abgelesen und modifiziert. Die Reihenfolge der Buchstaben („Basenpaare“) der DNA sowie der Ort und der Zeitpunkt ihres Ablesens bestimmen die Identität einer Zelle.

Die Erforschung des Genoms hat fundamentale Einblicke in die komplexe Informationsfülle der Zelle ermöglicht: Das Lesen von Genomen hat dazu beigetragen, dass wir Krankheiten besser verstehen, evolutionäre Zusammenhänge nachvollziehen und das Zusammenwirken von Genen und Umwelt erkennen können. Methoden, mit denen man Genome bearbeiten kann, gibt es schon seit rund einem halben Jahrhundert. Die neuen molekularbiologischen Werkzeuge zur

Genomeditierung aber – allen voran die „Genschere“ CRISPR/Cas – ermöglichen Eingriffe in das Erbgut mit bislang ungeahnter Präzision und Effizienz. Das eröffnet neue Chancen der Anwendung, etwa in der Biotechnologie zum Herstellen von Medikamenten oder in der Medizin, um schwere Krankheiten zu heilen. Zugleich werfen die neuen Methoden zahlreiche ethische und rechtliche Fragen auf.

## Lesen im Erbgut

Noch bis vor zwei Jahrzehnten war es mit erheblichem Aufwand verbunden, die Buchstaben im Buch des Lebens zu lesen, also die Reihenfolge (Sequenz) der Basenpaare der DNA zu bestimmen, fachsprachlich „Sequenzierung“ genannt. Das erste Genom, das vollständig entziffert wurde, war im Jahr 1997 das eines Bakteriums. Kurz darauf folgten im Jahr 1998 die rund 100-fach größeren Genome des Fadenwurms „Caenorhabditis elegans“ und im Jahr 2000 die Genome der Ackerschmalwand „Arabidopsis thaliana“ und der Fruchtfliege „Drosophila melanogaster“, drei in der genetischen Forschung beliebten Modellorganismen. Eine erste Version des menschlichen Genoms wurde im Jahr 2003 veröffentlicht – ein internationales, mit mehreren Hundert Millionen US-Dollar ausgestattetes Unterfangen. Heute kann die komplette Sequenzierung eines menschlichen Genoms innerhalb von Tagen und zu Kosten von wenigen Tausend Euro erfolgen.

# „Die Möglichkeiten zur Genomeditierung werfen zahlreiche ethische und rechtliche Fragen auf.“

Zwischenzeitlich hat das Lesen von Genomen Einzug in die klinische Anwendung gehalten, zum Beispiel zur Diagnose von Krebs oder von seltenen Erbkrankheiten. Auch Studien, die genetische Risikofaktoren für Krankheiten identifizieren wollen, nutzen zunehmend und in großem Maßstab die Genomsequenzierung. Ein Beispiel ist ein Projekt in Großbritannien, das darauf zielt, nahezu 100.000 menschliche Genome zu lesen und auszuwerten. Andere Projekte wollen mehr als eine Million Genome sequenzieren, um genetische Varianten in sehr hoher Auflösung zu katalogisieren. In einem weiteren Projekt soll der Vergleich des Erbguts vieler unterschiedlicher Organismen es möglich machen, anhand genetischer Informationen einen „Tree of Life“ zu erstellen.

## Schreiben im Erbgut

Molekularbiologische Instrumente – sogenannte Genschere –, mit denen DNA-Sequenzen verändert werden können, gibt es seit fünf Jahrzehnten. Es handelt sich dabei um Nukleasen (Enzyme), die DNA (Nukleinsäuren) an bestimmten Stellen abbauen oder „schneiden“ können. Sie wurden einst in Bakterien entdeckt, ihre Weiterentwicklung war die Grundlage für ihren Einsatz in vielen biotechnologischen Prozessen, sei es in der „roten“ medizinischen Biotechnologie, um neue therapeutische und diagnostische Verfahren zu entwickeln, oder in der „grünen“ Biotechnologie, um Nutzpflanzen zu verbessern oder pflanzliche Inhaltsstoffe zu gewinnen. Das Erbgut von Mikroorganismen, pflanzlichen und tierischen Zellen wird dazu mithilfe von Nukleasen verändert. Wenn es aber um die Modifikation

sehr großer Genome ging, erwiesen sich die bisherigen Verfahren häufig als zu ungenau und zu kompliziert. Mit der Entdeckung der Genschere CRISPR/Cas9, kurz CRISPR, hat sich das geändert.

„CRISPR“ ist die Abkürzung für „Clustered regularly interspaced short palindromic repeats“, kurze Wiederholungssequenzen, die durch andere Erbgutstücke getrennt sind und im Genom an bestimmten Stellen gehäuft auftreten. Abschnitte sich derart wiederholender DNA (Repeats) wurden erstmals in den 1990er-Jahren in Bakterien entdeckt. Damals konnten sich die Wissenschaftler dieses auffällige Sequenzmuster nicht erklären. Als Forscher vor rund 15 Jahren erkannten, dass die Wiederholungssequenzen dem Erbgut von Viren ähneln, die speziell Bakterien infizieren, entstand die Hypothese, dass die CRISPR-Sequenzen eine wichtige Aufgabe im Immunsystem von Bakterien erfüllen könnten. In weiteren Forschungsarbeiten wurden sogenannte Cas-Proteine (CRISPR-assoziierte Proteine) als diejenigen identifiziert, die notwendig für die Immunität der Bakterien gegenüber Viren sind. Schließlich ließ sich folgender Zusammenhang aufklären: Zwei kleine Moleküle (eine „CRISPR-targeting RNA“ und eine „transaktivierende RNA“) bewirken zusammen mit dem Cas9-Protein, dass Gene von Viren zielgenau inaktiviert werden können. In den folgenden Jahren wurde das CRISPR/Cas9-System so modifiziert, dass es verwendet werden konnte, um die Genome verschiedener Organismen gezielt zu bearbeiten und Änderungen auch in großen Genomen wie dem des Menschen vorzunehmen. Weitere ähnlich programmierbare „Genschere“ wurden entdeckt, und mittlerweile ist ein breites Spektrum an Werkzeugen zur Genomeditierung verfügbar. Der besondere Erfolg von CRISPR/Cas9 und verwandten Werkzeugen beruht darauf, dass sie vergleichsweise einfach für definierte Zielsequenzen in Genomen synthetisch hergestellt werden können und dass sie sich sehr flexibel in verschiedensten Organismen einsetzen lassen, angefangen von einfachen Bakteriengenomen bis hin zu komplexen Genomen.

Die Zielgenauigkeit der neuen Erbgut-Bearbeitungssysteme stellt alle vorherigen gentechnologischen Verfahren in den Schatten. Das eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. In der Medizin etwa wird der Einsatz von CRISPR/Cas bei der „ $\beta$ -Thalassämie“ erprobt, einer schweren erblichen Blutkrankheit. Die Vorstellung dabei ist es, dem Körper Blutzellen zu entnehmen, die krankhaft veränderten Gene mit CRISPR/Cas zu reparieren, dem Patienten zurückzuführen und ihn so zu heilen. Auch schwere Immunerkrankungen hofft man eines Tages mit einer derartigen „somatischen“ – die Zellen des Körpers (altgriechisch „soma“) betreffenden – Gentherapie heilen zu können. In der Krebsmedizin wird CRISPR/Cas erprobt, um Immunzellen gleichsam „scharf zu schalten“, damit sie entartete Zellen gezielter angreifen und entschlossener abtöten. Erste

klinische Versuche mit diesen allesamt hochemperimentellen Ansätzen erfolgen weltweit. Ob die Studien erfolgreich sein werden, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilen.

### Umstrittene Eingriffe in die Keimbahn

Der Einsatz von CRISPR/Cas in der somatischen Gentherapie ist ethisch insgesamt wenig umstritten. Anders sieht es mit Eingriffen in die menschliche Keimbahn aus. Man spricht von „Keimbahn-Gentherapie“, weil Gene in befruchteten Eizellen (Keimzellen) verändert werden. Ende des Jahres 2018 stellte – trotz des weltweiten Rufs nach einem Mora-

torium – ein chinesischer Forscher auf einer internationalen Konferenz erste Versuche zum Eingriff mit CRISPR/Cas in die menschliche Keimbahn vor, bei denen ein Gen verändert wurde, das eine Rolle bei der HIV-Infektion spielt. Diese ersten Versuche am Menschen waren zuvor nicht von einer Ethikkommission genehmigt worden, sind bislang nicht publiziert und wurden weltweit verurteilt. Der deutsche Ethikrat hat eine ausführliche Stellungnahme zum Einsatz von CRISPR/Cas und anderen gentechnischen Methoden in der menschlichen Keimbahn erstellt. Auch an der Universität Heidelberg fanden im Rahmen des Marsilius-Kollegs zahlreiche Veranstaltungen statt – von öffentlichen Diskussionsforen („Dürfen wir Menschen designen?“) über eine Winterschule mit jungen Wissenschaftlern aus aller Welt bis hin zu einem Symposium zur Regulierung von Eingriffen in die menschliche Keimbahn im internationalen Kontext. Am Marsilius-Kolleg nahm zudem das EURAT-Projekt seinen Ausgang, das sich mit Fragen zu den ethischen und rechtlichen Aspekten der Totalsequenzierung des menschlichen Genoms beschäftigt (siehe Infobox zum Expertengespräch auf Seite 10).

Auch wenn der Eindruck entstehen könnte, dass wir mit CRISPR/Cas ein ausgereiftes Werkzeug zur Genombearbeitung in der Hand halten, verstehen wir viele der zugrunde liegenden biologischen Prozesse bisher nur

### Netzwerkfehler mit schwerwiegenden Folgen

Mit sogenannten Wnt-Signalwegen, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Organismen und der Entstehung von Krankheiten beim Menschen spielen, beschäftigt sich seit Juli 2017 der Sonderforschungsbereich 1324 „Mechanismen und Funktionen des Wnt-Signalwegs“ an der Universität Heidelberg. Wnt-Proteine und die davon abhängigen molekularen Mechanismen sind bereits sehr früh in der Evolution der Tiere entstanden und spielen auch beim Menschen eine große Rolle. Als universelle Entwicklungsfaktoren regulieren sie die Entstehung von Organen und Nervengewebe und sind an der Herausbildung der Körperachsen im Embryo beteiligt. Treten in dem zeitlich und räumlich fein abgestimmten Wirkmuster des Signalnetzwerkes Fehler auf, sind schwere Erkrankungen wie Krebs die Folge.

Ziel des Sonderforschungsbereichs ist es, die molekularen Mechanismen des Wnt-Signalwegs mithilfe biochemischer, genetischer und mathematischer Ansätze zu entschlüsseln. Dafür wird in interdisziplinären Ansätzen ein großes Spektrum von Modellsystemen mit neuesten Technologien kombiniert, unter anderem hoch entwickelte Fluoreszenz-Mikroskopie, genetische Screens und Genomeditierung. Beteiligt sind Forscherinnen und Forscher des Biochemie-Zentrums, des Centre for Organismal Studies, des Instituts für Angewandte Mathematik sowie der Medizinischen Fakultäten in Heidelberg und Mannheim. Ebenso wirken Wissenschaftler des Deutschen Krebsforschungszentrums und des European Molecular Biology Laboratory sowie des Karlsruher Instituts für Technologie und der Universitätsmedizin Göttingen mit. Sprecher ist Prof. Dr. Thomas Holstein vom Centre for Organismal Studies. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft fördert den 16 Teilprojekte umfassenden SFB mit rund 8,5 Millionen Euro.

[www.sfb1324.de](http://www.sfb1324.de)

„Die Präzision der neuen Bearbeitungssysteme stellt alle vorherigen gentechnologischen Verfahren in den Schatten.“



**PROF. DR. MICHAEL BOUTROS** leitet seit 2008 die Abteilung „Signalwege und Funktionelle Genomik“ am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und ist Professor für Zell- und Molekularbiologie an der Universität Heidelberg. Zuvor forschte er an der Harvard Medical School in Boston (USA), dem European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und dem Cold Spring Harbor Laboratory in New York (USA). Seine Forschung beschäftigt sich mit den Mechanismen und der Wirkung von Signalwegen, die während der Entwicklung und bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielen. Er ist Vize-Sprecher des Sonderforschungsbereichs 1324 „Mechanismen und Funktionen des Wnt-Signalwegs“, an dem er ein Projekt zu CRISPR/Cas9-Genomeditierung leitet, und Fellow an der Max Planck School Matter To Life. Michael Boutros' Forschungen zu genetischen Interaktionen wurden von 2012 bis 2018 mit einem Advanced Grant des Europäischen Forschungsrats (ERC) mit 2,5 Millionen Euro gefördert, seit 2019 werden seine Forschungen zu kontextabhängigen genetischen Netzwerken mit einem ERC Synergy Grant unterstützt. 2016/17 war er Fellow am Marsilius-Kolleg der Universität Heidelberg.

Kontakt: [boutros@uni-heidelberg.de](mailto:boutros@uni-heidelberg.de)

unzureichend. Die Wissenschaft weiß inzwischen recht viel über die Spezifität der beteiligten Enzyme – der biologische Prozess aber, der etwa dafür sorgt, dass die DNA-Enden nach dem Schnitt der CRISPR-Genschere wieder korrekt zusammgefügt werden, ist bislang nur unvollständig verstanden. Kürzlich veröffentlichte wissenschaftliche Studien zeigen, dass „On-Target-Fehler“ zu unbeabsichtigten Effekten führen können, wie beispielsweise größeren Verlusten an Genmaterial (Deletionen). Diese Studien machen auch deutlich, wie wichtig weitergehende Forschungsarbeiten sind, um die mithilfe von CRISPR/Cas erzeugten Änderungen in Genomen umfassend zu charakterisieren und damit einen zielgenauen Einsatz zu ermöglichen. Insbesondere dann, wenn es um den Einsatz der CRISPR/Cas-Methode zur somatischen Gentherapie beim Menschen geht, ist es unerlässlich, vorab alle beteiligten biologischen Prozesse intensiv zu untersuchen und tief greifend zu verstehen.

#### Was geschieht in Heidelberg?

In der Grundlagenforschung hat CRISPR/Cas wie kaum eine andere Methode die Herangehensweise und die Möglichkeiten zur Erforschung der Funktion von Genen verändert. Seit ihrem ersten Einsatz 2013 haben sich die Methoden der Genomeditierung zu einem machtvollen Werkzeug weiterentwickelt, um mit gezielten Änderungen die Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp systematisch zu untersuchen und die Funktion von Genen aufzuklären. Die nachfolgend beschriebenen drei Beispiele sollen den Einsatz von „CRISPR“ in Heidelberger Forschungsprojekten illustrieren.

In der funktionellen Genomforschung ist die systematische Charakterisierung von Genen und deren Zusammenspiel eine wichtige Fragestellung. Mit CRISPR/Cas lassen sich beispielsweise in Zellkulturmodellen bestimmte genetische Veränderungen (Mutationen) „nachbauen“, von denen angenommen wird, dass sie beim Entstehen von Krebs eine Rolle spielen. So treten bei circa 80 Prozent aller Darmkrebspatienten verschiedene Mutationen im sogenannten APC-Gen auf. Die krankhaften Veränderungen des Gens lassen sich zu Forschungszwecken mittels der CRISPR/Cas-Methode in gesunde Zellen einfügen und die Auswirkungen der Genmutationen somit studieren. Die Zellkulturmodelle können ebenso verwendet werden, um weitere Gene – oder kleine chemische Moleküle – zu identifizieren, die den Effekt der Mutation abschwächen. All dies trägt dazu bei, die vom APC-Gen verursachten biochemischen Veränderungen, die Krebszellen zu unkontrolliertem Wachstum antreiben, besser zu verstehen und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Im Rahmen des vom Europäischen Forschungsrat (ERC) geförderten Projektes DECODE soll mithilfe von CRISPR/Cas zunächst in Modellorganismen – der Fruchtfliege *Drosophila* und der Ackerschmalwand *Arabidopsis* –

systematisch der Einfluss von Genen und deren Interaktion mit der Umwelt untersucht werden. Am DECODE-Projekt sind die Universität Heidelberg, das European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) beteiligt – drei Institutionen, die in Heidelberg über den Forschungsraum der Exzellenzstrategie miteinander verbunden sind. Während des Projektes sollen zunächst einzelne Gene und sodann Genkombinationen mit CRISPR/Cas ausgeschaltet werden. Das Ziel ist, genetische Netzwerke vorherzusagen und einen Atlas der Genaktivitäten zu erstellen.

Ein drittes Beispiel ist die Verwendung von CRISPR/Cas, um die molekularen Signalwege im Innern der Zellen zu erforschen. Mehrere Projekte in Heidelberg beschäftigen

#### Schaltpläne für Genaktivitäten

Die Grundlage für hochkomplexe Schaltpläne der Genaktivitäten in vielzelligen Organismen zu legen ist das Ziel des Forschungsprojekts DECODE (Decoding Context-Dependent Genetic Networks in vivo), an dem Wissenschaftler der Universität Heidelberg, des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) und des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) beteiligt sind. Das DECODE-Projekt, das der Europäische Forschungsrat (ERC) mit einem ERC Synergy Grant fördert, vereint Expertise im Bereich der Einzelzellanalysen und des Genome Engineering mit hochkarätiger Bioinformatik. Es wird über sechs Jahre mit 10,6 Millionen Euro unterstützt. Neben Prof. Dr. Michael Boutros vom DKFZ gehören dem Forscherteam Prof. Dr. Jan Lohmann von der Universität Heidelberg, Dr. Wolfgang Huber vom EMBL sowie Dr. Oliver Stegle (DKFZ / EMBL) an.

Veränderungen in einer Erbanlage wirken sich häufig auf die Aktivität einer Vielzahl anderer Gene aus – mit weitreichenden Folgen. Das Zusammenspiel sehr vieler Genaktivitäten macht die Identität einer Zelle aus und entscheidet letztlich darüber, ob beispielsweise eine Nervenzelle oder ein weißes Blutkörperchen entsteht – bei weitestgehend identischem Erbgut. Schaltpläne, die die Gesamtheit solcher genetischen Abhängigkeiten abbilden, wurden zunächst für Einzeller wie Hefe erstellt, später in der Kulturschale auch für Zellen höherer Organismen. Nun besteht die Herausforderung darin, solche Analysen auf die teilweise kompliziert aufgebauten Gewebe von Vielzellern auszuweiten, die meist aus verschiedenen Zelltypen bestehen, sich im Lauf des Lebens weiterentwickeln und auf veränderte Umweltbedingungen reagieren müssen. Mit DECODE wollen die Forscher den Beweis antreten, dass dies möglich ist.

GENETIC SCISSORS

# PRECISION CUTS IN OUR DNA

MICHAEL BOUTROS

CRISPR/Cas and related methods for genome editing have changed the life sciences like no other previously known technology. These new tools allow scientists to make complex modifications to the genome of organisms in order to study the function of genes or replace abnormal genes with healthy ones (gene therapy). We expect the development of these methods to continue at a breakneck pace in the coming years, permitting ever more targeted interventions in the genome. Progress in the reading – and rewriting – of genomes will go hand in hand with this development. That is why the new applications require extensive public discussion in order to weigh the opportunities against the risks.

Until just two decades ago, determining the sequence of the base pairs in a DNA molecule took a great deal of time and effort. The first full sequencing of a genome – belonging to a bacterium – dates back to 1997. The first version of a human genome was published in 2003 – an international undertaking that cost several hundred million US dollars. Today a human genome can be fully sequenced within days, at a cost of a few thousand euros.

Investigations into the genome have yielded fundamental insights into the sheer amount and complexity of information contained in a cell: being able to read genomes helps us to better understand illnesses, trace evolutionary pathways and detect interactions between genes and the environment. Methods of altering genes have existed for roughly half a century. But the new molecular biological tools for genome editing – led by the CRISPR/Cas “gene scissors” – permit direct interventions in the genome. They open up new possibilities of application, e.g. in biotechnology, with the formulation of new drugs, or in medicine, where they might help us cure serious illnesses. At the same time, however, the new tools raise numerous ethical and legal questions. ●

**“The precision of the new genome editing tools leaves all previous genetic engineering methods behind.”**

PROF. DR MICHAEL BOUTROS is a professor of cell and molecular biology at Heidelberg University and has been heading the Division of Signaling and Functional Genomics at the German Cancer Research Center (DKFZ) since 2008. He previously worked as a researcher at Harvard Medical School in Boston (USA), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and the Cold Spring Harbor Laboratory in New York (USA). His research focus is the mechanisms and effect of signaling pathways that play a role in development and in the formation of cancer. He is the vice speaker of Collaborative Research Centre 1324 “Mechanisms and functions of Wnt signaling”, where he heads a project on genome editing with CRISPR/Cas9, and a fellow at the Max Planck School Matter To Life. Between 2012 and 2018, Michael Boutros' research on genetic interactions was funded through an Advanced Grant of the European Research Council (ERC) to the amount of 2.5 million euros; in late 2018 he and his team won an ERC Synergy Grant to support his work on context-dependent genetic networks from 2019 onward. In 2016/17 he was a fellow of the Marsilius Kolleg of Heidelberg University.

Contact: [boutros@uni-heidelberg.de](mailto:boutros@uni-heidelberg.de)

sich im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Sonderforschungsbereichs 1324 „Mechanismen und Funktionen des Wnt-Signalwegs“ mit der Markierung von Proteinen, die am zellulären Wnt-Signalweg beteiligt sind. Mit CRISPR/Cas lassen sich auf Genomebene fluoreszierende Markerproteine – etwa das grün leuchtende Protein GFP – an Signalmoleküle in menschlichen Zellkulturen koppeln. Damit gelingt es, die räumliche und zeitliche Verteilung der Signalwegsaktivität sowie biophysikalische Eigenschaften auf der Ebene der einzelnen Moleküle zu erfassen.

#### **Rasante Entwicklungen**

Die Entdeckung und Anwendung von CRISPR/Cas und verwandten Genomeditierungsverfahren hat die Lebenswissenschaften in den vergangenen Jahren wie kaum

eine andere Technologie verändert. Mit ihrer Hilfe lassen sich in Genomen von Organismen komplexe Änderungen durchführen, um die Funktion von Genen zu studieren oder sie durch andere Gene zu ersetzen. Die Entwicklungen in diesem Bereich sind rasant, und es ist zu erwarten, dass diese Technologien auch in den kommenden Jahren weiter voranschreiten werden, unter anderem, um sie noch zielsicherer zu machen. Die weit fortgeschrittenen Technologien für das Ablesen der Genome dienen als Grundlage für die Durchführung von Genomeditierungen – die Fortschritte von Lesen und Schreiben im Genom werden weiterhin Hand in Hand gehen. Neue Anwendungsmöglichkeiten werden auch eine breite gesellschaftliche und auch internationale Diskussion erfordern – die Möglichkeiten und Risiken müssen wir dabei sorgfältig abwägen. ●

**„Weitere Forschungsarbeiten sind unerlässlich, um alle an der Genombearbeitung beteiligten biologischen Prozesse tief greifend zu verstehen.“**