berlin-brandenburgische
AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN

Boris Fehse

Rote Gentechnik und die neuen Verfahren des Genome Editing

In:
Die Gentechnologie in der Gesellschaft : von großen Versprechungen, hohen Erwartungen und Missverständnissen : Streitgespräch in der Wissenschaftlichen Sitzung der Versammlung der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften am 1. Dezember 2017. – ISBN: 978-3-939818-78-6. – Berlin: 2018, S. 20-29
(Debatte ; 19)

Persistent Identifier: urn:nbn:de:kobv:b4-opus-29216

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (cc by-nc-sa 4.0) Licence zur Verfügung gestellt.

Boris Fehse

Rote Gentechnik und die neuen Verfahren des Genome Editing

Sehr geehrter Herr Präsident, sehr geehrte Damen und Herren,
bevor ich anfange, nehme ich kurz die beiden vorhergehenden Statements auf. Interessant an dem Punkt von Herrn Hucho ist, dass 1973 als Beginn der Gentechnik gilt und tatsächlich fand bereits 1973/74 die erste Gentherapiestudie in Deutschland statt, ohne dass man zu diesem Zeitpunkt auch nur ein menschliches Gen kloniert gehabt hätte. Zu den Ausführungen von Herrn Renn ist vielleicht der Gedanke interessant, dass in Deutschland tatsächlich eine höhere Bereitschaft vorhanden ist, sich genetisch selbst modifizieren zu lassen als *Gene food* zu essen.
Jetzt möchte ich noch einmal einen kurzen Überblick über die Gentherapie geben: Die Uridee der Gentherapie bestand ja darin, dass man Erkrankungen, die auf Fehlern in der Erbsubstanz beruhen, dadurch heilen wollte, dass man die Erbsubstanz korrigiert und dies vielleicht im Idealfall im Sinne einer genetischen Chirurgie oder Genomchirurgie. Sie haben sicher alle von dem zuletzt viel zitierten *Genome Editing* gehört – und man hätte das auch als Thema für den Vortrag nehmen können –, das jetzt als *Game changer* in der Gentherapie gilt. Und wenn man über Editing spricht, kann man auch über Bücher sprechen. In Abbildung 1 ein Beispiel für einen Druckfehler in einer Bibel, wo im sechsten Gebot das Wort „nicht" vergessen oder auch weggelassen wurde, was sicherlich nicht der Intention der Kirche entsprach und deshalb ein Fehler war, der unbedingt korrigiert werden musste. Das ist aber leichter gesagt als getan, weil wir bei Büchern natürlich das Problem haben, dass es in den Bibliotheken meist nicht nur ein Buch gibt, sondern viele tausend Bücher, und da es schon den Buchdruck gab, als diese Canstein-Bibel erschien, gab es nicht nur eine Bibel mit diesem Fehler, sondern viele Exemplare davon. So ein ähnliches Problem haben wir auch in der Gentherapie in Form unserer sehr zahlreichen Gene. Wie wir gehört haben, sind dies über 20.000, die auch gut verpackt im Genom, so ähnlich wie in einer Bibliothek sind, geschützt im Kern und auch noch vom Zytoplasma, d. h. man muss da erst mal herankommen. Zudem haben wir nicht nur eine Zelle, sondern unser Körper besteht ja aus Dutzenden

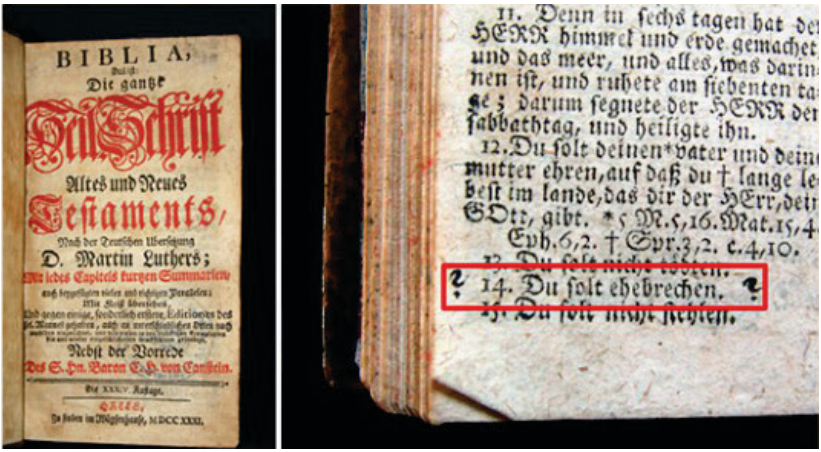

Abbildung 1
Die als „Ehebrecherbibel" berühmt gewordenen Cansteinbibel (Exodus 20, 14). [Biblia, Deutsch (1731): Biblia, Das ist. Die gantze Heil. Schrift Altes und Neues Testaments ... Canstein 34. Auflage Halle Waisenhaus, 1731. 708 Bl. 12°; Sign.: Bibel-S. 102.]
Im 6. Gebot fehlt das Wort „nicht". „Das Exemplar der ‚Ehebrecherbibel' wurde Besuchern der Herzog August Bibliothek bei Führungen so häufig gezeigt, daß es auf den entsprechenden Seiten gänzlich abgegriffen und vergilbt ist." Heimo Reinitzer: Biblia Deutsch, 1983, S. 228.
Bildquelle: www.bibelarchiv-vegelahn.de/Bibel_buntgemischt.html

von Billionen Zellen (eine Billion ist eine Zahl mit 12 Nullen). Das ist also schon ein ziemlich großes Problem, wenn man die **alle** korrigieren möchte. Deshalb haben wir in der Gentherapie etwas gemacht, was man – übertragen auch wieder auf das Buch, die Bibel, – wie folgt beschreiben könnte: Anstatt das Buch zu korrigieren, haben wir einfach gesagt: Okay, wir stellen eine neue, korrekte Bibel in die Bibliothek, und wenn jetzt jemand die Bibel ausleihen möchte, dann bekommt er das Exemplar, welches den Druckfehler nicht enthält, also im konkreten Fall mit einem korrekten sechsten Gebot. Angewandt auf die Gentherapie bedeutete dies das Einbringen einer zusätzlichen Genkopie – wir haben das dann so schön Neudeutsch „*Replacement*" genannt –, um die fehlende Funktion zu ersetzen, aber das hat natürlich eine ganze Reihe von Problemen mit sich gebracht. Zum Beispiel dass die neue Genkopie irgendwo im Genom eingebaut wurde, wodurch in manchen Fällen schwere Nebenwirkungen wie Leukämien (Blutkrebs) auftraten. Gleichzeitig hat dieses Prinzip der Genaddition viele neue Möglichkeiten eröffnet, weil wir nicht nur Gene korrigieren, sondern auch völlig neue Gene in die Zellen bringen konnten.

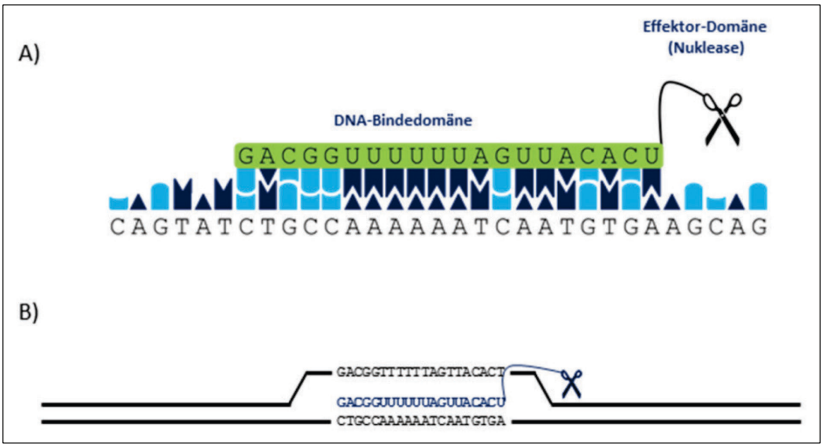

Abbildung 2
Vereinfachtes Prinzip der Genschere
A) Die Erkennung der Zielsequenz durch die DNA-Bindedomäne erfolgt bei CRISPR/Cas nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip über die Bindung komplementärer Basenpaare G-C und A-T bzw. A-U (bei RNAs wird die DNA-Nukleobase Thymin durch Uracil ersetzt). B) Die DNA-Bindedomäne bindet ihre Erkennungsstelle (unter Verdrängung des komplementären Genomstrangs), wodurch der Schnitt der Doppelhelix durch die Effektordomäne (Nuklease, z. B. Cas9) initiiert wird.

Wenn wir jetzt zum Genome Editing übergehen, wo es wirklich darum geht, die Fehler zu korrigieren, dann lautet die Frage, wie so was überhaupt funktionieren kann. Die Erkennung der Zielsequenz erfolgt in diesem Fall nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip (Abb. 2). Man kann sich im einfachsten Fall das DNA-Prinzip der Komplementärbindung zunutze machen, also A verbindet sich mit T (bei RNAs steht an Stelle des T ein U) und G mit C und dann baut man sich eine Sonde, die den Platz im Genom findet, wo sie spezifisch anheften soll, und wir bauen noch eine Schere dran, die dann den Schnitt setzt. Genauso gehen wir beim Genome Editing vor: Es gibt diese zwei Domänen, eine Bindedomäne und eine Effektordomäne, die zusammen die sogenannten Genscheren oder Designernukleasen bilden (Abb. 2). Dies ist aber nur die eine Komponente des Genome Editing. Die zweite Komponente, die ebenso wichtig ist, das sind die zellulären Reparaturmechanismen. Wir müssen uns darauf verlassen, dass die Zelle auch das macht, was wir von ihr erwarten. Wenn wir eine exakte Korrektur haben möchten, müssen wir auch noch eine Matrize einbringen, weil diese Korrektur nicht so funktioniert, dass die Zelle weiß, was sie machen soll, sondern sie braucht für das Copy/Paste eine korrekte

Vorlage (Matrize). Und nun kann man sich fragen, ob das überhaupt spezifisch ist, denn es ist ja ein bisschen kontraintuitiv, da unser genetischer Code nur vier Buchstaben beinhaltet und unser Genom immerhin aus 3 Milliarden solcher A, G, C und T besteht. Wie komme ich da überhaupt auf die Spezifität? Bei näherer Betrachtung ist das eigentlich relativ einfach, weil es sich um eine mathematische exponentielle Funktion handelt. Wenn ich eine Folge aus nur einem Buchstaben mit vier Möglichkeiten habe, ist die Varianz natürlich nur 4, bei 2 Buchstaben ist es aber eben schon 4 mal 4 und schon bei einer Abfolge von 20 Nukleotiden habe ich 4^{20} bzw. mehr als eine Billion (10^{12}) Möglichkeiten. Das bedeutet, dass eine solche 20er-Buchstabenkette (Sequenz) statistisch nur ein einziges Mal im Genom vorkommt, und auch das nur mit einer Chance von 1:333. Allerdings wäre diese Zahl nur dann korrekt, wenn unser Genom eine völlig statistische Abfolge von Nukleotiden wäre, was nicht ganz stimmt, weil z. B. ähnliche Gene oft auch homologe Bereiche aufweisen. Aber wir verfügen jetzt über eine ungefähre Größenordnung, denn wir sind mit einer Erkennung von 20 Nukleotiden im relativ sicheren Bereich, dass wir wirklich nur einmal ein Genom schneiden. Eine Übersicht über die gebräuchlichsten Genscheren, die auch schon klinisch genutzt werden, bietet Abbildung 3.

	Off-target	Herstellung	Kosten (Euro)	Anwendbarkeit		Effektor-domänen
				Genom	Organismen	
Zink-Finger Nukleasen	Möglich (abhängig vom Target)	2-12 Monate *Large scale* aufwendig	DIY: 480 – 740 Sangamo: 9 000-18 000	Abhängig von erhältlichen Modulen	Bakterien Pflanzen Säuger Fische Insekten	Nukleasen Nickasen
TALEN	Selten (abhängig vom Target)	1-12 Wochen *Large scale* möglich	DIY: 50 (-1000) Cellectis: 600-5000	Abhängig von *upstream T*	Bakterien Pflanzen Säuger Fische Insekten	Nukleasen Nickasen Aktivatoren Repressoren
CRISPR/Cas	z.T. häufig (abhängig von Design)	1 Woche *Large scale* möglich	DIY: 10 (-200)	Abhängig von PAM	Bakterien Pflanzen Säuger Fische Insekten	Nukleasen Nickasen Aktivatoren Repressoren

Abbildung 3
Klinisch eingesetzte Genscheren
Alle gebräuchlichen Genscheren haben spezifische Vor- und Nachteile, die an anderer Stelle diskutiert werden. Entscheidend für den Siegeszug des CRISPR/Cas-Systems war sicher die Erkennung der Zielsequenz über eine nicht-Protein-Struktur, die guide-RNA, was eine sehr einfache und schnelle Generierung neuer Genscheren innerhalb weniger Tage ermöglicht und somit die permanente Optimierung des Systems garantiert (falls mal eine bestimmte guide-RNA nicht funktionieren sollte, ist im Nu eine neue hergestellt).

Diese drei verschiedenen Genscheren, Zinkfingernukleasen, TALENs und CRISPR/Cas, haben alle ihre Vor- und Nachteile. Man kann nicht unbedingt sagen, dass eine alles besonders gut macht und die anderen nicht, aber es gibt einen großen Unterschied, nämlich die Einfachheit und die Kosten der Herstellung: Für die Herstellung von Zinkfingernukleasen braucht man Monate, für die von TALEN Wochen und für CRISPR/Cas Tage. Der einfache Grund dafür besteht darin, dass die ersten beiden Proteine benutzen, um die Zielsequenz zu erkennen, während das CRISPR/Cas-System eine Nukleinsäure benutzt, die man natürlich sehr schnell synthetisieren kann. Man muss nicht jedes Mal ein neues Enzym generieren, sondern tatsächlich nur diese Erkennungssequenz ändern. Das bedeutet auch, dass das CRISPR/Cas-System, selbst wenn es einmal nicht funktioniert, so schnell optimiert werden kann, dass man in kürzester Zeit eine funktionierende Variante davon erhält. Darauf aufbauend ist das Genome Editing vielfältig einsetzbar: So können wir in das Genom etwas einbauen (Insertion), wir können etwas herausnehmen (Deletion) oder wir können auch Textbausteine editieren. Praktisch heißt das, wir können einzelne Nukleotide austauschen, defekte Gene reparieren, ausschalten oder auch ein sogenanntes *Enhancement* durchführen, d. h. Zellen mit völlig neuen Funktionen ausstatten. Dies hat dazu geführt, dass das Genome Editing in vielen Bereichen angewandt wird, z. B. in der Grundlagenforschung, der biomedizinischen Forschung, der Arzneimittelforschung, der Weißen und Grünen Gentechnologie sowie in dem Bereich, über den ich spreche. Er ist einer der kleinsten Anwendungsbereiche, aber sicherlich einer, der mit am stärksten in der öffentlichen Wahrnehmung steht. Man darf aber auch nicht verschweigen, dass die klinische Anwendung des Genome Editing, auch wenn es so faszinierend einfach klingt, immer noch mit vielen Hindernissen konfrontiert ist. Viele dieser Hürden sind die gleichen, die wir seit 30 Jahren in der Gentherapie haben. Die Wichtigste ist sicherlich die, die man so schön auf Neudeutsch „*Delivery*-Problem" nennt, nämlich das Problem, wie bekomme ich meine Gene überhaupt dahin, wo sie arbeiten sollen. Das hat sich ja nicht dadurch, dass die Genscheren besonders genau arbeiten, vereinfacht, sondern es ist genauso schwierig, manchmal sogar schwieriger, weil ich eben noch die Matrizen mit in die Zellen bringen muss. Wenn ich genetische Informationen in die Körperzellen hineinbringen möchte, brauche ich dafür geeignete Gentaxis, die Vektoren. Wie schon gesagt, unser Körper besteht aus Dutzenden Billionen Zellen, allein die Leber besteht aus mehr als einer Billion (10^{12}) Zellen, d. h. wenn ich ein Prozent der Leber genetisch korrigieren möchte, muss ich

10 Milliarden Zellen genetisch modifizieren. Und natürlich schützt sich unser Körper sehr gut vor allen fremden Erbinformationen, denn fremde Erbinformationen bedeuten Alarm – Viren, Bakterien oder andere Pathogene. Die meisten der hier Anwesenden haben z. B. Antikörper gegen Cas9. Die heute gebräuchlichsten CRISPR/Cas-Systeme stammen aus Streptokokken und Staphylokokken. Die meisten von uns sind mit diesen Bakterien schon einmal konfrontiert worden und haben deshalb Antikörper gegen die entsprechenden Cas9-Proteine. Das bedeutet, wenn wir Ihnen jetzt Cas9 injizieren würden, hätten Sie sofort eine massive Immunreaktion – das ist also gar nicht so trivial, als dass man das sofort anwenden könnte. Und im Hinblick auf jede klinische Anwendung muss man natürlich immer auch fragen, wie effizient und präzise ist das System. Die Aktivität der Genscheren ist sehr unterschiedlich und nicht alle Genscheren funktionieren gleich gut. Auch bei CRISPR/Cas ist das so, und es gibt tatsächlich nicht für alle Zielsequenzen Genscheren, d. h. es gibt z. B. auch Abschnitte im Genom, für die es im Moment (noch) nicht möglich ist, ein CRISPR/Cas zu bauen. Je mehr homologe Varianten eines (Ziel-)Genes im Genom existieren, desto wahrscheinlicher ist es, dass eine Genschere noch anderswo als an der gewünschten Stelle schneidet, wodurch die oft zitierten *off-target*-Effekte entstehen. In der Forschung spielen solche *off-target*-Schnitte in der Regel überhaupt keine Rolle – wir selektionieren sie eben weg, aber bei der klinischen Anwendung muss man zumindest im Blick haben, dass möglicherweise auch Schnitte an Stellen im Genom vorkommen, an denen wir dies nicht möchten.

Kurz zu den Vektoren, die in der Gentherapie benutzt werden. Abbildung 4 beruht auf Daten aus dem verdienstvollen Wiley-Register des Journals of Gene Medicine. Wie deutlich zu sehen ist, gibt es da nicht *einen* Supervektor, sondern es werden für unterschiedliche Anwendungen verschiedene Vektoren benutzt, die man entsprechend passend zu seiner Anwendung herstellen muss. Das Bittere daran ist, dass wir bisher Vektoren entwickelt haben, die die eingebrachten Gene in der Regel besonders lange und/oder hoch im Körper exprimieren sollten, aber genau das brauchen wir für das Genome Editing nicht. Dafür benötigen wir vielmehr eine sogenannte *Hit-and-Run*-Strategie, also das Genome Editing soll erfolgen, und danach möchte ich die Proteine, die Nukleasen gar nicht mehr im Körper haben. Diese Vektoren haben wir bisher nicht gebaut, weil wir sie nicht brauchten, d. h., wir benötigen auch wieder eine eigene Forschung für die klinische Umsetzung. Vielleicht noch ein bisschen provokativ die Frage: somatisches Genome Editing, also das, was

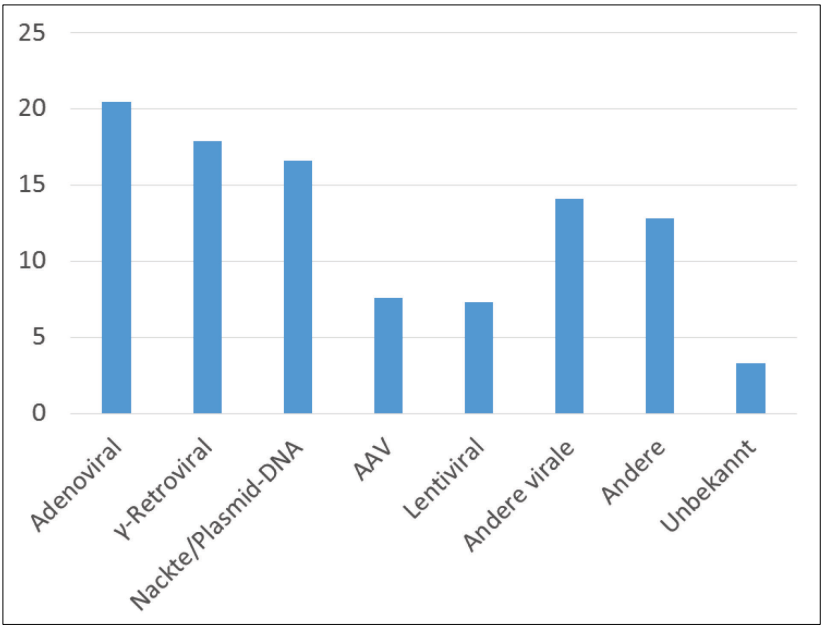

Abbildung 4
Klinisch eingesetzte Gentransfervektoren (Gentaxis)
In den bisherigen Studien zur „klassischen Gentherapie" wurde eine Reihe unterschiedlicher, zumeist von Viren abgeleiteten Vektoren benutzt. Die Abbildung beruht auf kumulativen Daten für die Jahre 1989 bis 2017, die vom Wiley-Register des *The Journal of Gene Medicine* erhoben wurden (www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

wir in Deutschland machen – oder Genome Editing in der Keimbahn, was auch immer mehr in die Diskussion kommt. Somatisches Genome Editing bedeutet Korrektur in klinisch relevanten Körperzellen. Das ist technisch kompliziert, denn unser Körper ist hinsichtlich unserer Zellzahl einfach riesig. Es könnte zudem bei einigen monogenen Erbkrankheiten bereits zu spät sein, da sich viele Krankheiten schon in der Embryonalentwicklung manifestieren. Darüber hinaus wird die Krankheit natürlich weitervererbt, aber es handelt sich um eine kausale Therapie und es gibt eigentlich kaum Menschen, die damit ethische Probleme haben. Beim Keimbahn-Genome Editing ging es darum, Keimbahnzellen genetisch zu modifizieren. Das ist mittlerweile technisch relativ einfach, denn man hat es ja nur mit einer Zelle zu tun und es könnte sogar in gewissem Maße sicherer sein, zumindest aus statistischer Sicht: Wenn ich z. B. eine Inzidenz von 1 % *off-target*-Schnitten annehme,

dann hieße das, dass ein *off-target*-Ereignis nur in einer von 100 Keimbahnzellen zu erwarten wäre. Modifizierte ich jedoch alle (also >1 Billion) Leberzellen, würde dies zu mehr als 10 Milliarden *off-targets* führen.
Beim Keimbahn-Genome Editing wird die Krankheit eliminiert; kausal, aber korrekt betrachtet, handelt es sich eigentlich nicht um eine Therapie. Es geht eigentlich um eine Prävention, weil es ja noch Niemanden zum Therapieren gibt. Ethisch sind solche Keimbahneingriffe natürlich sehr umstritten. Man kann auch die Notwendigkeit in Frage stellen, da sie nach bisherigem Stand der Technik immer mit einer Präimplantationsdiagnostik (PID) verbunden sein muss. Daraus ergibt sich für die meisten potentiell behandelbaren Krankheiten die Frage, wenn ich ohnehin PID mache – warum sollte man dann nicht die gesunden Embryonen heraussuchen, was in Deutschland aber natürlich nur für schwerste Krankheiten erlaubt wäre.
Hinsichtlich möglicher klinischer Anwendungen ergibt sich: Die ersten Genome Editing-Ansätze, die jetzt schon laufen, benutzen Blutzellen (auch wenn gerade eine erste Studie zum in-vivo-Genome Editing initiiert wurde). Der Grund ist natürlich der, dass man leichter an Blutzellen herankommt und diese auch außerhalb des Körpers behandeln und analysieren kann. Es gibt eine ganze Reihe von Krankheiten, von denen wir wissen, dass Gentherapie prinzipiell funktioniert, weil wir sie schon mit der klassischen Gentherapie behandelt haben, sodass sie nun auch für das Genome Editing interessant sind. Wir wissen bereits, dass mit dem Genome Editing Immuntherapien verbessert werden können, und es gibt Ansätze zum Schutz von Blutzellen vor HIV. Wenn man das Genome Editing insgesamt betrachtet, dann ist das sicherlich eine Revolution in vielen Bereichen sowohl der Grundlagen- als auch der angewandten Forschung. Für klinische Anwendungen sind die Probleme die gleichen oder in vieler Hinsicht ähnlich wie bei bisherigen Gentherapieansätzen. Da sie am einfachsten kontrollierbar sind, sind sicher ex-vivo-Anwendungen die, die jetzt am meisten vorangetrieben werden.
Und vielleicht abschließend folgende Bemerkung: Ende 2015 wurde über die ersten Hunde mit einem editierten Genom berichtet (Abb. 5). Wenn Sie es geschafft haben, die Bildunterschrift zu lesen, dann haben Sie gesehen, dass es in der Studie um Beagle ging. Man muss kein Hundeexperte sein, um zu wissen, dass das auf den Bildern (Abb. 5A) keine Beagles sind, das rechts ist ein Whippet und links ist ein Bully Whippet, und dabei handelt es sich um eine natürliche Mutante. Das war also überhaupt kein Genome Editing, sondern es waren natürliche Hunde. Und wenn man sich dann die Mühe macht,

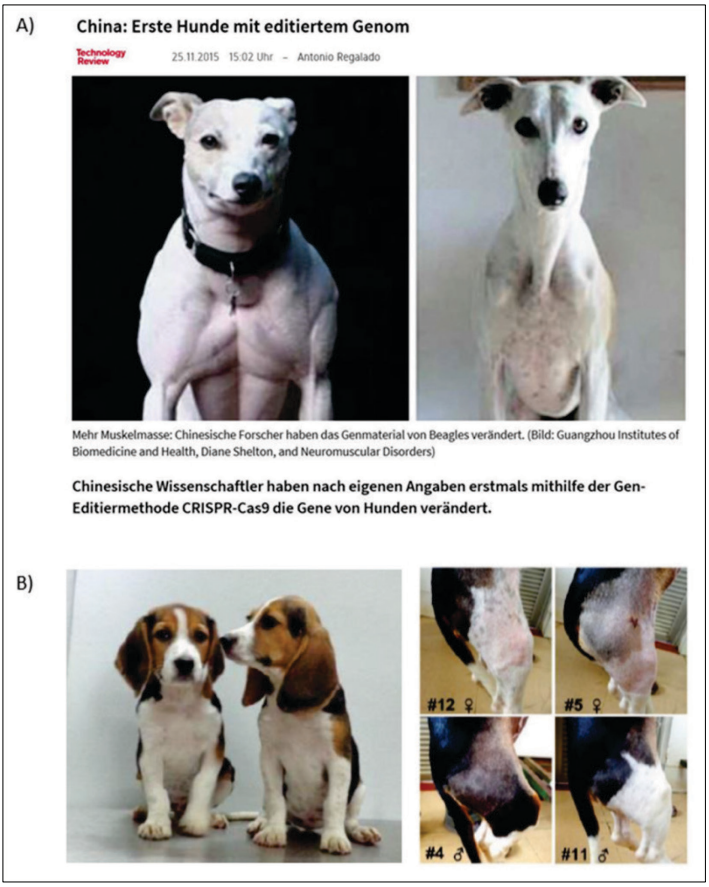

Abbildung 5
„Fake news" zum Genome Editing
Ende 2015 gab es einen großen Medienrummel um eine Publikation chinesischer Wissenschaftler, die berichteten, durch Genome Editing könne die Muskelmasse von Hunden vergrößert werden. A) Dies sind die von vielen News outlets verbreiteten (offensichtlich von der chinesischen Heimatinstitution der Forscher in Umlauf gebrachten) Abbildungen zur Illustration des vermeintlichen Effekts des Editings. Man beachte, dass in der Bildunterschrift von Beagle die Rede ist, auf den Fotos sind jedoch Whippets zu sehen – rechts ein normaler Vertreter dieser englischen Rasse, links, ein sog. „Bully Whippet", bei dem es sich um eine natürlich entstandene Zuchtvariante handelt. B) Abbildungen der tatsächlich in der Studie beschriebenen Hunde (Beagle, links) sowie des in der Arbeit beobachteten Muskelzuwachses (rechte Fotos: links jeweils der Wildtyp, rechts Tiere mit dem induzierten Muskelzuwachs). Die Abbildungen unter A) stammen vom Heise.de Newsticker (25.11.2015), Heise hat diese jedoch (im Gegensatz zu vielen anderen Internetquellen) nach entsprechenden Hinweisen sofort aus dem Netz genommen. Die Abbildungen unter B) wurden mit freundlicher Genehmigung der Autoren aus dem Supplement der Originalarbeit von Zou et al. (Journal of Molecular Cell Biology 2015; 7: 580-583) reproduziert.

in die Originalveröffentlichung zu schauen, dann findet man dort Fotos der Hunde, die in der Studie behandelt worden sind (Abb. 5B). Die lassen sich natürlich viel schlechter verkaufen, weil sie einfach viel zu niedlich aussehen und der Phänotyp überhaupt nicht eindrucksvoll ist. Also auch hier gilt, glauben Sie nicht alles, was in den Medien steht.