



CRISPR/CAS9

Erbgut auf dem Schneidetisch

Verfahren

Gezielter Eingriff
ins Erbgut

Gesetzgebung

Gentechnik
ohne Gene?

Ausblick

Was wir von CRISPR
erwarten können



Antje Findekleer
E-Mail: findekleer@spektrum.de

Liebe Leserin, lieber Leser,
unser Erbgut verändert sich – ständig und meist unbemerkt. Diese Veränderungen macht sich der Mensch selbst schon lange zu Nutze: Jede Züchtung ist letztlich eine gezielte Manipulation des Genpools einer Population. Aber natürlich suchen Forscher nach möglichst gezielten Methoden, um schnell ans Ziel zu gelangen und Fehlschläge zu vermeiden.

Mit CRISPR/Cas9 ist die Gentechnik um ein erstaunlich günstiges und leicht anzuwendendes Werkzeug reicher, und entsprechend groß ist die Begeisterung unter Wissenschaftlern weltweit. Da das Verfahren zudem offenbar sehr exakt ist, könnte es vielleicht auch Kritiker besänftigen, die in derart direkt auf die Erbsubstanz wirkenden Methoden zu große Risiken sehen. Allerdings stellt es Gesellschaft und Gesetzgeber aber auch vor die große Frage, wie genau ein gentechnisch veränderter Organismus zu definieren ist – denn die Anwendung von CRISPR/Cas9 ist im Nachhinein nicht mehr nachzuweisen. Neben wissenschaftlicher Euphorie bleibt der ethische Aspekt daher noch ein großes Fragezeichen.

Eine spannende Lektüre wünscht Ihnen

Erscheinungsdatum dieser Ausgabe: 23.05.2016

CHEFREDAKTEURE: Prof. Dr. Carsten Könneker (v.i.S.d.P.), Dr. Uwe Reichert
REDAKTIONSLEITER: Christiane Gelitz, Dr. Hartwig Hanser, Dr. Daniel Lingenhöhl
ART DIRECTOR DIGITAL: Marc Grove
LAYOUT: Oliver Gabriel
SCHLUSSREDAKTION: Christina Meyberg (Ltg.), Sigrid Spies, Katharina Werle
BILDREDAKTION: Alice Krüßmann (Ltg.), Anke Lingg, Gabriela Rabe
PRODUKTMANAGERIN DIGITAL: Antje Findekleer
VERLAG: Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Tiergartenstr. 15-17, 69121 Heidelberg, Tel. 06221 9126-600, Fax 06221 9126-751; Amtsgericht Mannheim, HRB 338114, UStd-Id-Nr. DE147514638
GESCHÄFTSLEITUNG: Markus Bossle, Thomas Bleck
MARKETING UND VERTRIEB: Annette Baumbusch (Ltg.)
LESER- UND BESTELLSERVICE: Helga Emmerich, Sabine Häusser, Ute Park, Tel. 06221 9126-743, E-Mail: service@spektrum.de

Die Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH ist Kooperationspartner der Nationales Institut für Wissenschaftskommunikation gGmbH (NaWik).

BEZUGSPREIS: Einzelausgabe € 4,99 inkl. Umsatzsteuer
ANZEIGEN: Wenn Sie an Anzeigen in unseren Digitalpublikationen interessiert sind, schreiben Sie bitte eine E-Mail an anzeigen@spektrum.de.

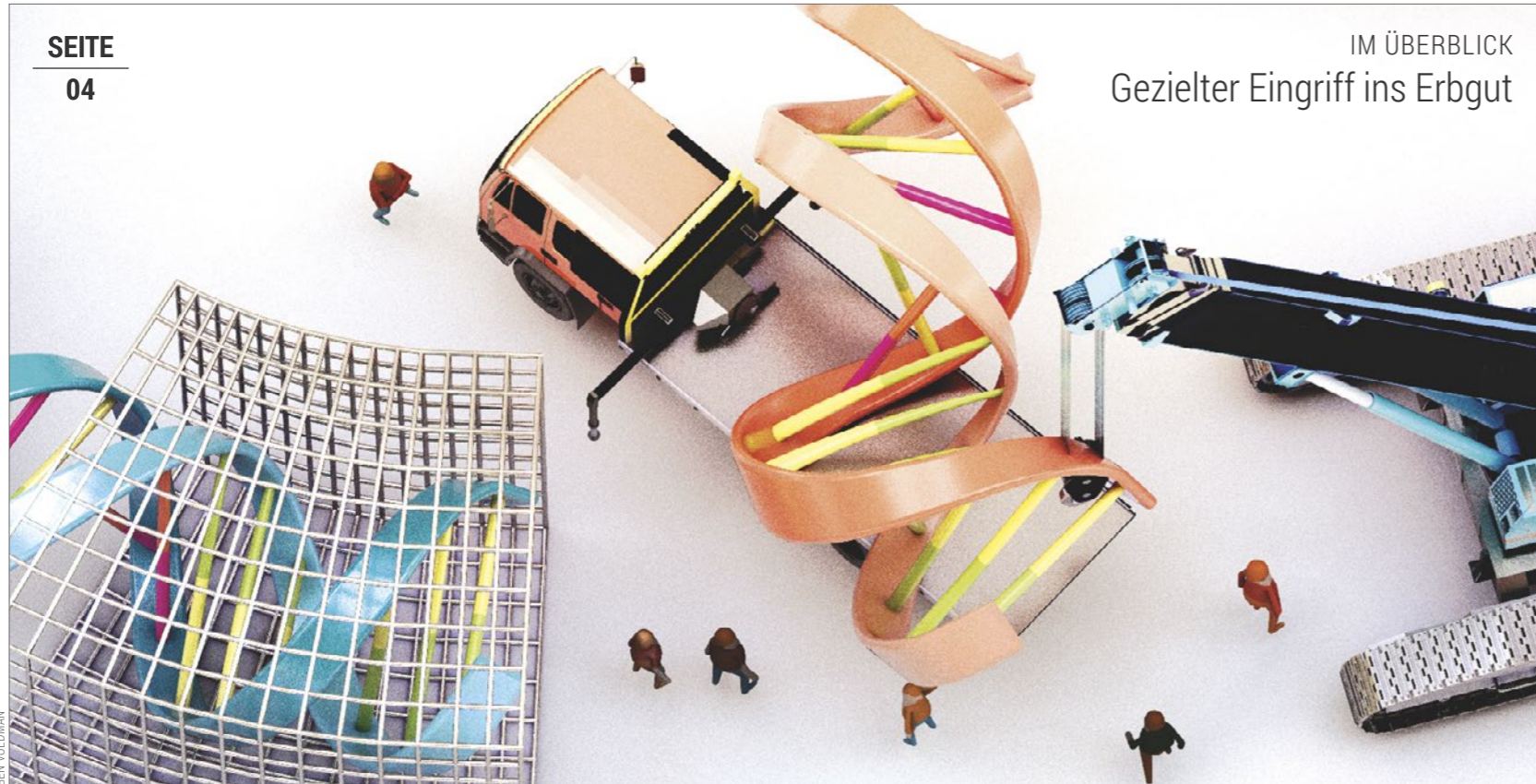
Sämtliche Nutzungsrechte an dem vorliegenden Werk liegen bei der Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH. Jegliche Nutzung des Werks, insbesondere die Vervielfältigung, Verbreitung, öffentliche Wiedergabe oder öffentliche Zugänglichmachung, ist ohne die vorherige schriftliche Einwilligung des Verlags unzulässig. Jegliche unautorisierte Nutzung des Werks berechtigt den Verlag zum Schadensersatz gegen den oder die jeweiligen Nutzer. Bei jeder autorisierten (oder gesetzlich gestatteten) Nutzung des Werks ist die folgende Quellenangabe an branchenüblicher Stelle vorzunehmen: © 2016 (Autor), Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg. Jegliche Nutzung ohne die Quellenangabe in der vorstehenden Form berechtigt die Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH zum Schadensersatz gegen den oder die jeweiligen Nutzer. Bildnachweise: Wir haben uns bemüht, sämtliche Rechteinhaber von Abbildungen zu ermitteln. Sollte dem Verlag gegenüber der Nachweis der Rechtsinhaberschaft geführt werden, wird das branchenübliche Honorar nachträglich gezahlt. Für unaufgefordert eingesandte Manuskripte und Bücher übernimmt die Redaktion keine Haftung; sie behält sich vor, Leserbriefe zu kürzen.

Folgen Sie uns:



SEITE
04

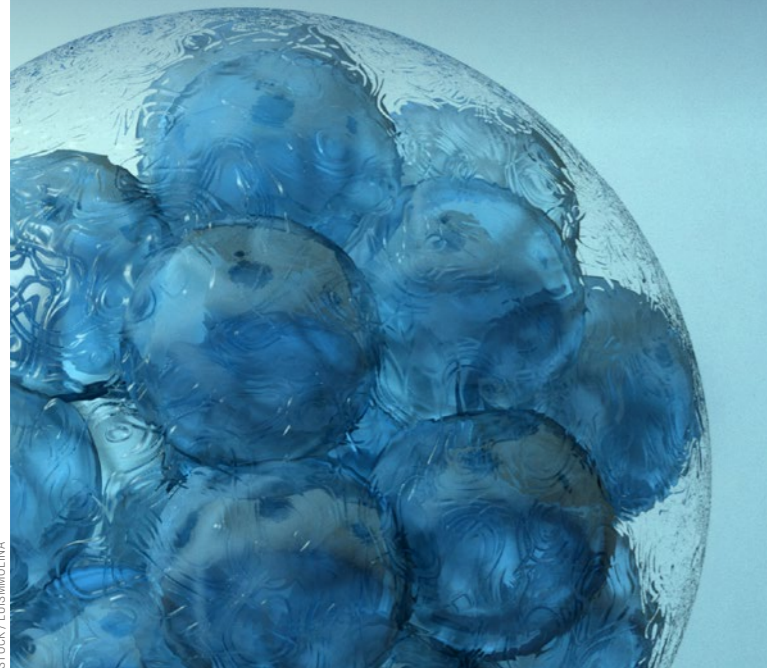
IM ÜBERBLICK
Gezielter Eingriff ins Erbgut



BEN VOLDMAN

SEITE
59

MEDIZIN
Umstrittener Eingriff ins
embryonale Erbgut



ISTOCK / LUISMOLINA

GENTHERAPIE-EXPERIMENT
Forscher manipulieren Genom
menschlicher Embryonen

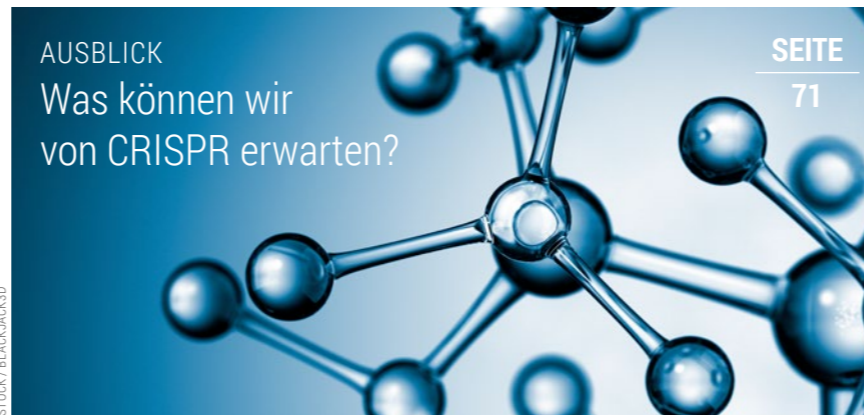
SEITE
63



FOTOLIA / INGENIUM-DESIGN/DE

AUSBLICK
Was können wir
von CRISPR erwarten?

SEITE
71



ISTOCK / BLACKJACK3D

- 12 NEUE WERKZEUGE
CRISPR verändert alles
- 23 GESETZGEBUNG
Gentechnik ohne Gene?
- 28 ZELLANALYSE
Die CRISPR-Welle
- 39 GRÜNE GENTECHNIK
Gentechnik-Innovation auch
für die Landwirtschaft
- 40 NAHRUNGSMITTEL
CRISPR-Pilz darf ohne Auflagen
in die Supermarktregale
- 42 MEINUNG
Was wollen wir wirklich?
- 44 TRANSPLANTATION
Spenderorgane aus dem Schwein
- 54 TROPENKRANKHEIT
Gentechnisch manipulierte Mücken
gegen Malaria
- 56 GENTECHNIK
Werkzeug mit Selbstzerstörung
- 68 MEINUNG
Wer hat Angst vorm CRISPR/Cas9-Baby?



IM ÜBERBLICK

Gezielter Eingriff ins Erbgut

von Margaret Knox

Eine neue Methode, um DNA-Moleküle zu verändern, könnte die Medizin revolutionieren. Doch manche Wissenschaftler befürchten unkontrollierbare Entwicklungen.

Im Jahr 1973 zeigten der Genetiker Stanley Cohen und der Biochemiker Herbert Wayne Boyer, wie sich das Genom eines Lebewesens verändern lässt. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen gelang es den beiden, Frosch-DNA in Bakterien einzuschleusen und dort ablesen zu lassen. Ende der 1970er Jahre produzierte Boyers Unternehmen Genentech bereits Insulin für Diabetiker, und zwar mit Hilfe gentechnisch veränderter *Escherichia-coli*-Bakterien, die künstlich hergestellte Sequenzen aus dem menschlichen Genom enthielten. Wenig später schufen Forscher am Salk Institute for Biological Studies im kalifornischen La Jolla die erste »transgene« Maus mit eingefügten artfremden Erbgutstücken.

Schon diese frühen Erfolge der Gentechnik hatten großen Einfluss auf die moderne Medizin. Allerdings unterlagen die damaligen gentechnischen Methoden zwei wichtigen Beschränkungen: Sie waren erstens ungenau und ließen sich zweitens nur schwer in großem Maßstab medizinisch anwenden. Das erste Problem überwandene Wissenschaftler in den 1990er Jahren, indem sie Enzyme mit gezielt angepassten Eigenschaften erzeugten, die DNA-Moleküle an

ganz bestimmten Stellen schneiden. Dazu mussten sie aber immer noch für jede DNA-Sequenz, die sie ins Visier nahmen, ein dazu passendes Enzym herstellen – eine Zeit raubende, mühsame Arbeit.

Das zweite Problem scheint nun ebenfalls vor einer Lösung zu stehen. 2012 stellten Wissenschaftler um Emmanuelle Charpentier (damals an der Universität Umeå, Schweden) und Jennifer Doudna von der University of California in Berkeley (USA) einen zelleigenen genetischen Mechanismus vor, der es ermöglicht, Genome so einfach und schnell wie noch nie zu verändern. Kurz darauf zeigten andere Forscher, dass man damit mehrere Veränderungen gleichzeitig im Genom einer Zelle vornehmen kann. Bereits jetzt hat diese Entwicklung den gentechnischen Fortschritt massiv beschleunigt, und sie wird sich wohl auch tiefgreifend auf die Medizin auswirken.

Bezeichnet wird die Technik meist als CRISPR/Cas9, wobei der Ausdruck CRISPR für »clustered regularly interspaced, short palindromic repeats« steht (deutsch: gehäuft auftretende, mit regelmäßigen Zwischenräumen angeordnete, kurze palindromische Wiederholungen). Das sind kurze, sich wiederholende DNA-Sequenzen im

AUF EINEN BLICK

Revolution in der Gentechnik

- 1 Schon seit den 1970er Jahren verfügen Forscher über Werkzeuge, um die Genome von Lebewesen zu verändern. Doch die Methoden waren lange Zeit aufwändig, kostspielig und ungenau.
- 2 Ein neues Verfahren namens CRISPR/Cas9 erweist sich in der Gentechnik als revolutionär. Es basiert auf einem Immunabwehrmechanismus bei Bakterien und ist schneller, billiger und weniger kompliziert als frühere Techniken.
- 3 Unternehmen entwickeln bereits kommerzielle Anwendungen für CRISPR/Cas9, etwa neue Therapieverfahren für so unterschiedliche Krankheiten wie Aids und Schizophrenie. Die Methode macht es derart einfach, Genome zu verändern, dass Ethiker schon jetzt unkontrollierbare Folgen befürchten.

Erbgut von Bakterien und Archeen. Sie wechseln sich ab mit ebenfalls kurzen Zwischensequenzen, die ihrerseits übereinstimmen mit DNA-Bauplänen Bakterien infizierender Viren (Bakteriophagen). Mit Hilfe dieses Apparats »erinnern« sich Bakterien an Viren, von denen sie schon einmal attackiert wurden. Wissenschaftler untersuchen CRISPR-Sequenzen, seit japanische Forscher diese in den späten 1980er Jahren entdeckten. Doch welches machtvolles Werkzeug der Gentechnik darin schlummert, zeigte sich erst, als die Teams um Charpentier und Doudna auf ein Protein namens Cas9 stießen.

Charpentier, die heute am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig arbeitet, und Doudna lernten sich 2011 auf einer Konferenz in San Juan (Puerto Rico) kennen. Sie hatten viele Gemeinsamkeiten: Beide leiteten Arbeitsgruppen, die sich mit der Frage beschäftigten, wie Bakterien sich gegen Viren verteidigen. Und beide hatten herausgefunden, dass Bakterien angreifende Viren mit Hilfe eines molekularen »Gedächtnisses« identifizieren: Wenn die Mikroben ihr erstes Zusammentreffen mit einem Bakteriophagen überleben, bauen sie kurze Fragmente

aus seiner DNA in ihr Erbgut ein, und zwar zwischen ihre CRISPR-Sequenzen. Auf diese Weise legen Bakterien ein Archiv viraler DNA von früheren Eindringlingen an – und das hilft ihnen, die infektiösen Partikel wiederzuerkennen, sobald diese erneut auftauchen. Allerdings reicht das allein für eine erfolgreiche Virenabwehr nicht aus, die Bakterien benötigen weitere Komponenten hierfür. Und genau darum dreht sich die folgenden Studien Charpentiers und Doudnas.

Kurz nach der Tagung in San Juan entschlossen sich die beiden Forscherinnen, künftig zusammenzuarbeiten. Charpentier und ihre Mitarbeiter überprüften Hinweise, wonach Streptokokken (Bakterien der Gattung *Streptococcus*) ein Protein namens Cas9 benutzen, um eindringende Viren zu eliminieren. Doudnas Team hingegen widmete sich der Frage, wie Cas9 funktioniert.

Zerschnitten und wieder zusammengeflickt

Es stellte sich heraus, dass Krzysztof Chylinski, ein Mitarbeiter Charpentiers, und Martin Jinek, damals in Doudnas Team, in benachbarten Städten aufgewachsen waren und denselben polnischen Dialekt

sprachen. »Sie konferierten über Skype, verstanden sich gut und tauschten von da an Daten und Ideen aus«, erzählt Doudna. »Die Zusammenarbeit unserer Gruppen nahm hierdurch deutlich an Fahrt auf.«

Den Wissenschaftlern beider Teams wurde schon bald klar: Cas9 könnte sich als nützliches Instrument zum Manipulieren des Genoms erweisen. Zwar gab es bereits gentechnische Werkzeuge in Form von Enzymen namens Nukleasen, die den DNA-Doppelstrang an bestimmten Stellen schneiden, worauf die zelluläre Maschine den Schnitt repariert und dabei manchmal genetisches Material einbaut, das zuvor in den Zellkern eingeschleust wurde. Doch als Doudna und Charpentier ihre Zusammenarbeit begannen, bestand der am weitesten entwickelte Ansatz darin, maßgeschneiderte Enzyme herzustellen, die den jeweils interessierenden DNA-Abschnitt selektiv durchtrennten. Jede genetische Modifikation benötigte also ein eigenes Enzym.

Das Streptokokken-Enzym Cas9 hingegen funktioniert anders, wie Doudna und Charpentier erkannten: Es begibt sich nicht von selbst zum jeweiligen Zielort auf der DNA, sondern wird von RNA-Molekülen

So funktioniert CRISPR/Cas9

Streptokokken nutzen ein DNA-Archiv, um eindringende Viren zu zerstören. Ihr Genom enthält kurze, sich wiederholende Abschnitte, so genannte CRISPR. Dazwischen liegen DNA-Sequenzen, die mit denen von Viren übereinstimmen. Diese dienen als Vorlage für kurze RNA-Stücke, die eine Endonuklease namens Cas9 an die DNA eindrin-

gender Viren heranführen. Passt die Sequenz der Viren-DNA zu jener der RNA-Stücke, schneidet Cas9 an der entsprechenden Stelle und zerlegt damit die virale DNA. Dieses natürliche System kann man zweckentfremden, um beliebige Sequenzen aus beliebigen DNA-Molekülen zu schneiden. Man muss hierfür eine passende Leit-RNA

herstellen, die Cas9 an die gewünschte Stelle führt, was heute relativ einfach umzusetzen ist. Cas9 selbst als DNA-manipulierendes Enzym bleibt dabei unverändert – ein großer Vorteil gegenüber früheren Verfahren, die für jeden Eingriff die Herstellung eines spezifischen Enzyms erforderten.

1

Herstellung einer Leit-RNA mit Sequenzanteilen, die zur Zielsequenz passen (rot).

2

Bildung eines Komplexes aus Leit-RNA und der Endonuklease Cas9

Zielsequenz in der Zell-DNA

komplementäre Sequenz in der Leit-RNA

DNA-Spaltung

künstlich eingebrachte DNA

3

Einschleusen des CRISPR/Cas9-Werkzeugs in die zu manipulierende Zelle. Die Leit-RNA führt den Komplex an den Zielort im Genom heran.

4

Cas9 schneidet den DNA-Doppelstrang an der entsprechenden Stelle. Wenn der Zellapparat den Schnitt anschließend repariert, fügt er manchmal genetisches Material ein, das zuvor in den Zellkern eingebracht wurde.

dorthin geleitet – solchen RNAs nämlich, die durch Ablesen der CRISPR-Sequenzen und ihrer Zwischensequenzen entstehen. Der Komplex aus Cas9 und RNA gleitet dabei auf dem DNA-Strang (etwa dem eines eindringenden Virus) entlang. Jedes Mal, wenn er eine kurze Signalsequenz aus drei Nukleotiden erkennt, stoppt er kurz. Passt die Basenabfolge in der Umgebung dieser Stelle zu jener der RNA des Komplexes, schneidet Cas9 den DNA-Strang – falls nicht, wandert der Komplex weiter.

Würde man sich diese natürliche Maschinerie zu Nutze machen, überlegten Charpentier und Doudna, könnte man allein über die Sequenz der RNA vorgeben, wo der Komplex den DNA-Strang kappt. Man müsste also nicht mehr für jeden Ort, an dem man schneiden will, ein eigenes Enzym konstruieren. Dies würde gentechnische Eingriffe viel einfacher, billiger und schneller machen.

Nach monatelangen Forschungsarbeiten schafften die Wissenschaftlerinnen den Durchbruch. Doudna hat den Moment noch lebhaft in Erinnerung. Jinek, damals Postdoc, hatte eine Testreihe mit Cas9 abgeschlossen und kam in Doudnas Büro, um mit ihr über die Ergebnisse zu sprechen.

Dabei streiften sie ein Thema, das er bereits mit Chylinski erörtert hatte: Unter natürlichen Bedingungen nutzen Streptokokken nicht nur eine RNA, um Cas9 zur gewünschten Stelle auf der DNA zu dirigieren, sondern zwei davon. Wie wäre es, überlegten die Forscher, wenn man beide zu einem einzigen, künstlich hergestellten Strang zusammenfasste, einer so genannten Leit-RNA? Das hätte den Vorteil, dass man nur noch mit einem Zweikomponentensystem aus Leit-RNA und Cas9 umgehen würde – und dass man lediglich die Leit-RNA verändern müsste, um den Komplex, den sie mit Cas9 bildet, zu einem anderen Ort auf der DNA zu lenken.

»Es war einer dieser Momente, da sieht man die Daten, und irgendwas macht klick!«, sagt Doudna. »Uns wurde klar, dass wir die Leitsequenzen in einem Molekül vereinen konnten. Ein einziges Protein und ein einziges Leitmolekül ergäben zusammen ein äußerst leistungsfähiges gentechnisches Werkzeug. Mir lief es kalt den Rücken herunter, und ich dachte: Du liebe Güte, wenn das klappt ...«

Es klappte. Und zwar so gut, wie es sich Doudna bei aller Begeisterung nicht hatte träumen lassen. Als Charpentier und sie

am 17. August 2012 gemeinsam die Ergebnisse ihrer CRISPR/Cas9-Forschungen veröffentlichten, erkannten Fachkollegen sofort, welches Potenzial darin steckte. Ein globaler Wettlauf kam in Gang, um die neue Methode in verschiedenen Anwendungen zu testen.

Bereits 2013 hatten die Wissenschaftler so große Fortschritte gemacht, dass sie CRISPR/Cas9 nicht nur an Bakterien einsetzen konnten, sondern auch an den viel komplexeren Zellen von Pflanzen und Tieren. Man spekulierte sogar darüber, Neandertaler und Wollhaarmammuts gentechnisch zu rekonstruieren. An der Harvard University machte sich ein Team unter Leitung des Genetikers George Church daran, mittels CRISPR/Cas9 die Erbanlagen in menschlichen Zellen zu verändern, womit sich neue therapeutische Möglichkeiten eröffneten.

Flotten Schritts zur Kommerzialisierung

Wie nicht anders zu erwarten, floss nun immer mehr Geld in die CRISPR/Cas9-Forschung. Ende 2013 tat sich Doudna mit George Church, Feng Zhang vom MIT (Massachusetts, USA) und anderen Wissenschaftlern zusammen, um das Unterneh-

men Editas Medicine zu gründen. Die Firma verfolgt das Ziel, auf der Basis der CRISPR/Cas9-Methode neue Medikamente gegen ein breites Spektrum genetisch bedingter Erkrankungen zu entwickeln. Im April 2014 ging das Unternehmen CRISPR Therapeutics in Basel und London an den Start, das ähnliche Ziele wie Editas Medicine hat. Bis diese Firmen neue Therapieverfahren entwickelt haben, werden noch Jahre vergehen. Laborzulieferer bieten aber bereits injektionsfertige CRISPR/Cas9-Sets an und liefern auf Bestellung auch CRISPR/Cas9-modifizierte Mäuse, Ratten und Kaninchen.

Im Jahr 2014 besuchte ich die SAGE Labs in St. Louis, eines der ersten Unternehmen, welche die CRISPR/Cas9-Technologie in Lizenz einsetzen, um Nagetiere gentechnisch zu manipulieren (es wurde inzwischen von der englischen Horizon Discovery Group übernommen). Die Wissenschaftler, die dort arbeiten, erhalten Onlinebestellungen, beispielsweise von einem Labor im kalifornischen Sacramento, das 20 Pink1-Knockout-Ratten ordert, um an den Tieren verschiedene Aspekte der Parkinsonkrankheit zu erforschen. In einem Nebengebäude sind Ratten mit die-

sem Gendefekt untergebracht – ebenso wie andere Nager, die per CRISPR/Cas9-Technik gentechnisch manipuliert wurden, um sie zu Modellorganismen für Schizophrenie oder Schmerzerkrankungen zu machen. Nach Eingang der Bestellung suchen die Mitarbeiter die gewünschte Anzahl Ratten der richtigen Sorte heraus und verschicken sie per Luftfracht.

Manchmal benötigt ein Kunde jedoch gentechnisch veränderte Nager, die nicht vorrätig sind. Möchte er etwa einen bisher unbeachteten Zusammenhang zwischen der Parkinsonkrankheit und einem bestimmten Gen beziehungsweise einer spezifischen Mutation untersuchen, hat er bei der Bestellung diverse Möglichkeiten. Die SAGE-Wissenschaftler können mit CRISPR/Cas9 das Gen zum Beispiel abschalten, gezielt eine Mutation in ihm erzeugen oder es durch ein menschliches Allel ersetzen. Bei etlichen Krankheiten, von Parkinson über Mukoviszidose bis hin zu Aids, ist eine Vielzahl genetischer Varianten beteiligt, und all diese komplexen Mutationen nacheinander in lebenden Tieren zu erzeugen, dauerte früher bis zu einem Jahr. CRISPR/Cas9 hingegen erlaubt es den Wissenschaftlern, multiple genetische Verände-

rungen auf einen Schlag vorzunehmen, indem sie zeitgleich mehrere solcher Komplexe mit verschiedenen Leit-RNAs injizieren. Das reduziert die Zeitspanne auf wenige Wochen.

Zunächst stellen die Wissenschaftler maßgeschneiderte Leit-RNA(s) her. Dann fügen sie diese und Cas9 zu einem molekularen Komplex zusammen: dem CRISPR/Cas9-Werkzeug. Dieses Konstrukt testen die Forscher ungefähr eine Woche lang, indem sie es mit Hilfe kurzer, starker Spannungspulse in tierische Zellen einschleusen. Dort schneidet der Komplex die zelluläre DNA. Wenn die Zelle den Schnitt repariert, werden zusätzliche Nukleotide ins Erbmolekül eingebaut oder Teile der DNA-Sequenz entfernt.

CRISPR/Cas9 erzeugt allerdings nicht in allen behandelten Zellen solche Mutationen. Um festzustellen, wie effizient der Komplex gearbeitet hat, extrahieren die Wissenschaftler die DNA-Moleküle aus den Zellen und untersuchen diese mit molekularbiologischen Methoden. Am Ende der Prozedur steht ein Signal auf einem Computermonitor, das umso heller leuchtet, je mehr DNA-Moleküle CRISPR/Cas9 verändert hat.