



# Crispr, Crispr, Knäuschen ...

## Was knabbert da am Erbgut? Neue Genschere eröffnen der Biotechnologie ungeahnte Möglichkeiten

Es war einmal ... Wie anders als märchenhaft könnte diese Geschichte begonnen werden, die da handelt vom zufälligen Entdecken einer fabelhaften Genschere namens „Crispr“ in vernachlässigten, abgeschiedenen Gefilden der Biologie, vom Heben des Schatzes durch tapfere Grundlagenforscher, vom Erobern unzähliger Labors, vom Ermöglichen neuer Therapien und vom baldigen Triumphzug in den noblen Wissenschaftsolymp in Stockholm?

Es waren also einmal zwei Biologinnen, die US-Amerikanerin Jennifer Doudna aus Hawaii und die Französin Emmanuelle Charpentier aus Paris, die daran forschten, wie sich Bakterien gegen Virusinfektionen wehren. Grundlagenforschung also, wie sie einer konkreten Anwendung ferner kaum sein kann. Und wie so oft sollte es eben diese nur von Neugier getriebene Forschung sein, die der Wissenschaft eine völlig neue Dimension des Zugriffs auf das Erbgut ermöglicht. Eine Technik, die vier Jahre nach ihrer Entdeckung bereits Tausende von Labors und Dutzende Biotechfirmen weltweit einsetzen und um die schon jetzt ein teurer Patentstreit entbrannt ist.

Die Geschichte beginnt mit merkwürdigen, kryptischen Wiederholungen in der Erbgutsequenz von Bakterien, sogenannten „Clustered regularly interspaced small palindromic repeats“, kurz Crispr. Schon 1987 hatten Forscher diese bis zu 47 DNA-Bausteine langen „regelmäßigen Anordnungen von kleinen, symmetrischen Wiederholungen“ entdeckt. In den letzten zehn Jahren dann stellte sich heraus, dass mit den Crispr-Sequenzen fast immer auch bestimmte „Cas“-Gene (Crispr-assoziierte Gene) einhergehen. Außerdem sind zwischen den

Crispr-Abschnitten Reste von Viren-Erbgut abgelegt, das mit der Erbgutsequenz von Bakteriophagen übereinstimmt, also „bakterienfressenden“ Viren. Als erster interpretierte Rodolphe Barrangou von der Firma Danisco das Crispr-System 2007 im Fachblatt „Science“ als eine Art adaptives Immunsystem der Bakterien gegen Viren, denn sobald er Bakterien mit Bakteriophagen infizierte, bauten die Bakterien neue Bruchstücke der Viren-DNA zwischen Crispr-Abschnitte ein und waren danach weniger anfällig für die Viren als vorher. Wie die Crispr-Stücke und die Cas-Gene diese Immunreaktion bewerkstelligten, das konnten erst Doudna und Charpentier, unabhängig voneinander, 2011 aufklären.

Wenn die Zelle von der Crispr-Region im Erbgut eine RNA-Kopie macht, dann entstehen zum einen lange RNA-Molekülfäden, die in CAS-Proteine übersetzt werden. Zum anderen gibt es aber auch zwei kleine RNA-Stücke. Eines nennt sich „tracrRNA“ und enthält Crispr-Sequenz. Das andere Stück die „crRNA“, enthält eine Kopie der Virus-Erbgut- und ebenfalls ein Stück Crispr-Sequenz. Weil beide RNAs Crispr-Sequenz enthalten, können sie aneinander binden, bilden also einen doppelsträngigen Bereich. Der wird von einem CAS-Protein erkannt und gebunden, das Emmanuelle Charpentier in Streptokokken-Bakterien gefunden hat: Cas9. Sobald das Cas9-Enzym sich die RNA gegriffen hat, ist die Genschere scharf gestellt und zerschneidet jede DNA in der Zelle, die die Viruserbgutsequenz enthält. Das Bakterium wird immun. Und diese Fähigkeit kann sogar an die Nachkommen vererbt werden, weil die Virus-DNA in Bruchstücken im Bakteriengenom gespeichert ist.

Charpentier und Doudna erkannten schnell, dass sich das Crispr-System mit ein paar Veränderungen nutzen lassen müsste, um nicht nur bakterielles Erbgut gezielt zu verändern. Nachdem sie sich 2011 auf einer Konferenz getroffen hatten, arbeiteten die beiden Labors gemeinsam an dieser Idee. Sie fusionierten die beiden RNAs (cr und tracrRNA) zu einer „Lotsen“-RNA (single guide-RNA), die die Crispr-Sequenz und eine beliebige Erbgutsequenz enthielt, die Cas9 für sie schneiden sollte. Das Ergebnis veröffentlichten sie gemeinsam im Fachmagazin „Science“ am 17. August 2012, – dem Geburtstag der Crispr-Technik.

### Ein Genforscher-Märchen wird wahr

Ein Datum, das in die Geschichte der Genforschung eingehen dürfte, obwohl Crispr längst nicht die erste Genschere war, mit der Forscher das Erbgut an einer bestimmten Stelle verändern konnten. Schon länger gibt es die „Zinkfinger“- oder „Talen“-Technik – Proteine, die wie Crispr jede gewünschte Erbgutsequenz in den drei Milliarden DNA-Bausteinen des menschlichen Erbguts finden und dann schneiden oder anderweitig verändern können. Doch dafür muss jedes Mal das Protein aufwendig verändert werden, wenn ein Forscher eine neue Erbgutsequenz ansteuern und verändern will. Beim Crispr/Cas9-System hingegen bleibt die Genschere, das Cas9-Enzym, immer gleich, verändert wird nur die „Lotsen“-RNA.

Durch dieses modulare System braucht ein Forscher nur in den Erbgutdatenbanken die DNA-Sequenz herauszusuchen, die er bearbeiten will. Dann beauftragt er eine DNA-Synthesefirma, ihm ein kurzes Stück „Lotsen“-RNA per Post zu schicken. Diese RNA wird dann zusammen mit dem Cas9-Enzym (oder die Erbinformation für dessen Herstellung) in eine Zelle gespritzt, sodass das Erbgut an der gewünschten Stelle geschnitten wird.

Man kann auch mehrere verschiedene Lotsen hinzugeben, sodass Cas9 an mehreren Stellen schneidet. So lassen sich komplette Gene aus dem Erbgut ausschneiden. Soll Erbgut eingefügt werden, werden der Lotsen-RNA zusätzlich DNA-Stücke der gewünschten Sequenz mitgegeben. George Church von der Harvard University in Cambridge hat die Technik bereits so weit optimiert, dass er beim Schwein auf einen Schlag über 60 Gene verändern konnte. So könnte verhindert werden, dass Schweine-Organe bei einer Transplantation in den Menschen vom Immunsystem eines Patienten abgestoßen werden und Viren, die im Erbgut der Schweine sitzen, Infektionen verursachen. Andere Forschungsgruppen haben bereits im Genom von Hochleistungs-Weizen und -Reis gegen Schädlinge resistent machende Genmutationen eingestellt, Orangen mit Vitamingenen angereichert oder bei Rindern das Hornwachstum abgeschaltet. So können früher langwierige Züchtungsverfahren in kurzer Zeit umgesetzt werden.

### Neue Werkzeuge für die Biotechnologie

„Durchbruch“, „Revolution“, „game changing“ – Genforscher scheuen kaum einen Superlativ, wenn sie von Crispr schwärmen. Das liegt vor allem daran, dass sie nun endlich einige unhandliche, umständliche und kostspielige Gentechwerkzeuge an den Nagel hängen. Vor Crispr war das „Gene Targeting“ die Standardmethode, um Gene beispielsweise in Mäusen zu verändern oder gar völlig aus dem Erbgut zu entfernen („Knock-

out“). Dabei wurde ein Stück DNA in die Zellen geschleust, das in großen Teilen der Sequenz des zu verändernden Gens entsprach. Zumindest in einigen Zellen fand diese eingeschleuste DNA das Gen und lagert sich am Erbgutfaden an, sodass durch einen Vorgang namens „Homologe Rekombination“ die künstliche DNA die natürliche Sequenz ersetzte. Die Prozedur dauerte Monate, mitunter über ein Jahr, und funktionierte auch nicht immer. Mit Crispr änderte sich all das schlagartig. Während das Bestellen eines Zinkfingers zum Schneiden einer bestimmten Erbgutsequenz etwa 5000 Dollar kostet, tut es Crispr schon für 30 Dollar. Forscher, die bisher aufgrund der limitierten Werkzeuge für Genveränderungen auf Modellorganismen beschränkt waren, können nun offenbar jeden Organismus, ob Pilz, Pflanze, Tier, Einzeller oder Bakterie verändern.

Das hat nicht nur für die Forschung Folgen, sondern auch für innovative Unternehmen. Obwohl erst drei Jahre alt gibt es bereits eine ganze Reihe von Biotechfirmen, die die Technik für unterschiedliche Anwendungen nutzen. Firmen wie Taconic, die von Jennifer Doudna gegründete Caribou Science, die südkoreanische ToolGen oder Horizon Discovery haben sich darauf spezialisiert, binnen weniger Wochen Zelllinien, Mäuse oder Ratten zu liefern, denen ein oder mehrere Gene nach Wunsch der Kunden (in der Regel Forschungslabors) mit Crispr verändert wurden. Das kostet nur etwa ein Drittel so viel wie Zellen oder Tiere, die mit der alten Gene-Targeting-Methode verändert wurden. Wer seine Modellorganismen lieber selbst verändern mag, kann inzwischen Crispr-Kits bei ThermoFisher, biocat oder anderen Laborbedarfsdienstleistern bestellen.

Längeren Atem brauchen Unternehmen wie Editas Medicine, gegründet vom Crispr-Experten des Massachusetts Institute of Technology, Charpentiers Crispr Therapeutics oder Doudnas Intellia Therapeutics. Diese Firmen wollen das Crispr-System für die Entwicklung neuer (Gen-)Therapien einsetzen – was im Erfolgsfall allerdings auch erheblich höhere Erlöse verspricht. Bei den ersten Therapieversuchen mit Crispr wird es sich allerdings zunächst um Ex-vivo-Ansätze handeln, bei denen beispielsweise Gendefekte in den Blutzellen oder blutbildenden Stammzellen eines Patienten mit Crispr repariert und dann zurückgespritzt werden. Sichelzellenanämie, die Bluterkrankheit Hämophilie oder gar Aids könnten sich so behandeln lassen. In letztem Fall gibt es bereits erste Hinweise, dass das Verändern eines Gens namens CCR5 dazu führt, dass die Aids verursachenden HIViren keine Immunzellen (T-Zellen) mehr befallen können, weil ein Rezeptor, das Einfallstor für die Viren, so verschlossen wird. Dem Patienten gespritzt überleben die genchirurgisch veränderten T-Zellen und können eine Immunreaktion gegen die Viren etablieren.

### Ungenaueres Crisprern

So überwältigend positiv die Vorteile von Crispr für die Forschung sind, so vielfältig sind auch die Fragen und Bedenken, die die Technik aufwirft. Eine „Gänsehaut“ hat Jennifer Doudna laut Fachblatt „Nature“ bekommen, als sie auf einer Konferenz von einem Experiment hörte, bei dem das Crispr-Werkzeug mit Hilfe von Viren in die Lunge von Mäusen gespritzt wurde, um die Entstehung von Lungenkrebs zu studieren. „Ein kleiner Fehler im Design der Guide-RNA hätte dazu führen können, dass Crispr auch in menschlichen Lungen wirkt.“ Umso wichtiger ist es Doudna, auf einen verantwortlichen Umgang mit der Technik



© Dickov / Fotolia

hinzuweisen.

Von der Lotsen-RNA hängt es ab, wie genau Crispr wirkt. Wird eine Sequenz ausgewählt, die nicht nur einmal, sondern (zumindest in ähnlicher Bausteinabfolge) mehrfach im Erbgut vorhanden ist, dann wird das Erbgut auch mehrfach geschnitten. Zu kontrollieren, ob Crispr wirklich immer nur dort im Genom schnippelt, wo es schneiden soll, ist deshalb gar nicht so einfach. Denn für jede Guide-RNA und für jedes Erbgut ändert sich die Ausgangslage. In einem Organismus mag die gewählte Sequenz der Lotsen-RNA nur einmal vorhanden sein, in einem anderen vielleicht häufiger. Die Häufigkeit solcher „Off-Target“-Effekte variiert stark und hängt von Zelltyp, Zielsequenz, Enzymstruktur und anderen Variablen ab.

Beim Verändern von Nutztieren und -pflanzen wären solche Fehlschnitte im Erbgut vielleicht noch zu vernachlässigen. Ihr Erbgut wird penibel überprüft, bevor sie vermehrt werden und in Umlauf kommen. Für Veränderungen am menschlichen Erbgut, von Patienten oder gar von Ei- und Samenzellen kann das jedoch nicht gelten. Denn jede ungezielte Veränderung im Erbgut könnte auch ein Gen treffen, das in die Entstehung von Krebs involviert ist. Bei klassischen Gentherapien, bei denen Genabschnitte in der Vergangenheit unkontrolliert ins Erbgut geschleust wurden, hat das bereits zu einigen Leukämiefällen geführt.

Ohne Zweifel ist eine genauere Genomchirurgie mit Crispr möglich und einfacher und kontrollierter als die bisherigen gentherapeutischen Ansätze. Das hat die Arbeitsgruppe von Daniel Anderson vom Massachusetts Institute of Technology in Cambridge als Erste gezeigt. Die Forscher korrigierten in Mäusen eine erbliche Stoffwechselerkrankung, die auch Menschen haben, die Tyrosinaemie. Ein Erfolg, der eine Genchirurgie-Euphorie ausgelöst hat.

Dass aber (nach der Gen-, der Antisense und der RNA-Interferenz-Therapie) auch auf diesen Hype eine Phase des Realismus folgen wird, liegt auf der Hand. Denn der Haken ist immer der Gleiche: der Transport. Wie bekommt man das, was das defekte Gen reparieren oder stilllegen soll, in Millionen von Zellen? Um überhaupt nennenswerte Mengen der Genschere Cas9 samt Lotsen-RNA in die Leberzellen der Maus einschleu-

sen zu können, musste Andersons Team das Organ mit dem Mix geradezu vollpumpen, um sage und schreibe 0,4 Prozent der Zellen zu verändern. Ernüchternd wenig, auch wenn es in anderen Geweben und mit anderen Transportsystemen, die die Crispr-Komponenten in die Zellen schleusen, vielleicht besser funktionieren dürfte.

#### Gene auf Wanderschaft

Mangel an alternativen Anwendungsmöglichkeiten der Technik gibt es nicht: Eine Besonderheit von Crispr ist, dass die Schere so eingesetzt werden kann, dass sich eine bestimmte Erbinformation in einer Population von Organismen besonders schnell verbreitet. Normalerweise vererbt eine Mücke, die auf einem ihrer beiden elterlichen Chromosomen eine steril machende Mutation trägt, diese Genveränderung nur an 50 Prozent ihrer Nachkommen. Wird dieser Mücke aber zusätzlich zu der Mutation auch noch das Crispr-Werkzeug mitgegeben, dann schreibt die Crispr-Genschere die steril machende Mutation auch ins andere elterliche Chromosom – und 100 Prozent der Nachkommen erben die vorteilhafte Genveränderung.

Mithilfe dieser „Gen-Drift“ („Gene drive“) könnten ganze Populationen reduziert oder gar ausgelöscht werden. Ein wirksames Mittel gegen invasive, eingeschleppte Pflanzen oder krankheitsübertragende Insekten. Welche Folgen es aber für die Umwelt haben könnte, wenn binnen weniger Generationen ein ganze Art aus einem Ökosystem verschwindet oder plötzlich neue Eigenschaften hat, weiß niemand. Außerdem könnte die Genschere sich im Laufe der Zeit verändern, andere Gensequenzen zerschneiden und so unvorhersehbare Veränderungen vornehmen, die sich dann in der Population schnell verbreiten. Die Idee eine „Gene Drives“ ist nicht neu, nur mit der Crispr-Technik ist eine Umsetzung nähergerückt. Wie mit der Gendrift-Technik umzugehen sein wird, ist zurzeit Gegenstand der Diskussion. In den USA beschäftigt sich das National Research Council mit der Frage, wie Gendrift-Experimente bzw. die Freisetzung von Gendrift-Organismen zu regulieren sind. Die Unesco hat zu „mehr Regulierung“ von Genome-Editing-Verfahren aufgerufen. Auch eine Stellungnahme der deutschen Wissenschaftsakademien (Leopoldina, acatech und Akademi-

enunion) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft warnt, dass „derartige Eingriffe [...] in Ökosysteme sehr weitreichende Folgen haben [können], so dass es zunächst noch der Entwicklung entsprechender Rückhol- bzw. Schutzmaßnahmen sowie eines gesellschaftlichen Diskurses über den Einsatz und die Grenzen dieser Anwendung bedarf.“

### **Vielseitiges Crisprn**

Die Gendrift wird nicht die einzige Weiterentwicklung der Crispr-Technik bleiben. Schon jetzt wird das Crispr-System auch für mehr als zum Schneiden von Genen eingesetzt. George Church, in dessen Labor gut 30 Forscher an der Methode feilen, nutzt Crispr bereits, um Gene zu aktivieren, statt zu zerschneiden. „Wir können die Genexpression mit großer Präzision hoch- und runterregulieren“, sagt Church, der das Verfahren an Hefe, Fliegen, Mäusen und menschlichen Zellkulturen ausprobiert hat. Die Ergebnisse zeigen, dass sich dies auch für therapeutische Zwecke nutzen lässt, indem überaktive, krankmachende Gene gebremst oder fälschlich abgeschaltete Gene reaktiviert werden – ohne dabei die Erbgutsequenz selbst zu verändern. Außerdem können Stammzellen dazu gebracht werden, sich in die gewünschte Richtung zu entwickeln.

Während Church das Crispr/Cas9-System schon ausbaut und verändert, hat Feng Zhang vom Broad Institute auf der anderen Seite des Charles River in Cambridge ein alternatives Crispr-System entdeckt. Statt des Cas9-Enzyms nutzt Zhang Cpf1, ein Enzym aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus*. Es ist kleiner als Cas9, wodurch es sich laut Zhang leichter in Zellen einschleusen lässt. Während Cas9 zwei RNA-Moleküle braucht, um DNA zu schneiden, braucht Cpf1 nur eines. Außerdem wird die DNA an einer etwas anderen Stelle und so geschnitten, dass einer der beiden Doppelstränge der DNA-Helix etwas übersteht und anstelle eines „stumpfen“ ein „klebriges“ Ende des Moleküls entsteht. Solche Enden könnten das Einfügen von Erbgut noch präziser machen, als das schon mit Cas9 möglich ist.

### **Kampf um den Crispr-Schatz**

Selbst wenn Cpf1 nur genauso gut funktioniert wie Cas9 – für Zhangs Biotechfirma Editas ist es allein schon aus Patentgründen wichtig, eine Alternative zum Cas9-System zu haben. Denn derzeit liefern sich Patentanwälte in den USA einen Kampf um die Verwertungsrechte des Crispr-Systems. Ein Kampf um einen Schatz, wie er einem echten Märchen würdig ist, denn es geht um Milliarden von Dollars. Zhang bekam im April dieses Jahres vom US-Patentamt ein Patent im „Fast-Track“-Verfahren zugesprochen, das ihm die Kontrolle über die wirtschaftliche Verwertung der Crispr-Technik gibt. Er überholte damit Charpentiers und Doudnas Institutionen, darunter auch die Universität Wien, die ebenfalls Patente eingereicht hatten. Doch sie haben bereits zum (juristischen) Gegenschlag ausgeholt. Entscheidend dürfte der genaue zeitliche Ablauf der Entdeckung des Crispr-Systems und der Weiterentwicklung zu einer universellen Genschere sein. Während Doudna und Charpentier 2011 das Funktionieren der Crispr-Schere im Reagenzglas zeigten, waren Zhang und Church im Januar 2013 ein paar Wochen schneller als Doudna mit dem Nachweis, dass die Schere auch in menschlichen Zellen schneidet. Sollte das Patentamt aber entscheiden, dass die Anwendbarkeit von Crispr

in menschlichen Zellen „offensichtlich“ ist, dann ist Zhangs und Churchs Patent hinfällig, und Doudna und Charpentier sind wieder im Rennen, die in ihrem Patent die Möglichkeit der Anwendung beim Menschen immerhin erwähnen.

### **Neue Regeln fürs Crisprn?**

Während man in den USA also darum ringt, wer mit den noch nicht existenten Crispr-Therapien und sonstigen Anwendungen Geld verdienen darf, streitet man in der Europäischen Union lieber um die Regulierung des „Genome Editing“. Die Frage ist: Fallen Crispr und andere Genome-Editing-Methoden unter die bestehende Gentechnikgesetzgebung oder nicht? Das ist vor allem deshalb knifflig, weil eine Veränderung des Erbguts einer Pflanze oder eines Tiers aufgrund der Präzision von Crispr unter Umständen nachher nicht mehr nachweisbar ist. So kann zum Beispiel in einer Hochleistungs-Maissorte ein DNA-Baustein so geändert werden, dass wieder eingestellt wird, was in einer der zahlreichen Wildvarianten vorhanden ist, aber im Zuchtverlauf verloren ging. Kontrolleure hätten dann unter Umständen keine Möglichkeit festzustellen, ob diese Gensequenz nun durch Crispr oder durch natürliche Kreuzung von Wild- und Hochleistungs-Mais zustande gekommen ist, denn Crispr hinterlässt (anders als ältere Gentechnik-Methoden) keine nachweisbaren Spuren im Erbgut.

Zweifelsohne fallen Pflanzen, bei denen neue oder artfremde (transgene) Sequenzen ins Erbgut eingebracht werden, unter die deutsche und europäische Gentechnikgesetzgebung. Schließlich wird erkennbar fremdes Erbgut eingebracht. Gilt das aber auch, wenn eine Gensequenz eingestellt wird, die auch natürlicherweise vorkommt? Für GMO-kritische Organisationen wie „Testbiotech“ und viele andere ist allein schon der Gebrauch von Crispr Indikator genug, um einen Organismus als GMO zu klassifizieren. Sie fordern, dass jeder damit veränderte Organismus auch unter die Gentechnikgesetzgebung der EU fallen muss. Die Europäische Kommission lässt diese Streitfrage derzeit prüfen, hat in der Sache aber noch nicht entschieden.

Ein einfaches Ja oder Nein dürfte allerdings nicht zu erwarten sein, denn nicht alle Genome-Editing-Methoden funktionieren wie Crispr. Die US-Biotechfirma Cibus nutzt eine Technik namens RTDS (Rapid Trait Development System), um eine Rapsorte resistent gegen bestimmte Unkrautvernichtungsmittel zu machen. Das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) prüfte die Methode und stufte die Pflanze als nicht gentechnisch veränderten Organismus ein. RTDS schleust kurze Erbgutstücke (40 Bausteine lang) in den Zellkern ein, die aber nicht ins Pflanzenerbgut eingebaut werden. Sie sorgen lediglich dafür, dass in einem ganz bestimmten Abschnitt im Erbgut eine Fehlpaarung entsteht. Die zelleigenen Korrekturenzyme, die die Fehlpaarung korrigieren, verändern dann das Gen. Daher handelt es sich um eine Mutagenese-Methode, die im deutschen Gentechnik-Gesetz ausdrücklich nicht als Gentechnik bezeichnet wird.

Wie das Crispr-Märchen, das in wenig beachteten Forschungsgefilden begann, weitergehen wird, welche Dramen oder Heldentaten das Genome Editing noch birgt, ist offen. Sicher ist nur die Moral von der Geschichte: Vernachlässige niemals nie die Grundlagenforschung nicht. 