

BIOMEDIZIN

Reparatur von Gendefekten in menschlichen Embryonen durch CRISPR/Cas

Mit der Genschere CRISPR/Cas lässt sich das Erbgut von Lebewesen verändern. Nun haben Forscher erstmals mit der Technologie einen Gendefekt bei menschlichen Embryonen behoben. Die Forscher hoffen, dass mit dem Verfahren zur Keimbahntherapie künftig Erbkrankheiten geheilt werden können. Es ist aber auch zu befürchten, dass die Methode zum Zwecke der genetischen „Verbesserung“ von Menschen missbraucht wird.

Es gibt Tausende genetisch bedingte, autosomal-dominante Erkrankungen, von denen Millionen von Menschen weltweit betroffen sind. Manche dieser Erbkrankheiten manifestieren sich erst im Erwachsenenalter; sie entgehen daher der natürlichen Selektion und werden an die nächste Generation weitergegeben. Aus diesem Grund ist die Prävalenz dieser Mutationen in bestimmten Bevölkerungsgruppen relative hoch (bis zu 8%).

Eine Möglichkeit, die Weitergabe derartiger Mutationen zu verhindern, ist der Einsatz von Gentests während einer *In vitro*-Fertilisation (IVF)-Behandlung. Dies erlaubt, unter den Embryonen solche für eine Implantation auszuwählen, die die spezifische Mutation nicht enthalten. Voraussetzung für die Verhinderung einer genetischen Weitergabe ist, dass die Elternteile bezüglich des Gendefekts heterozygot sind. Im günstigsten Fall, wenn nur ein Elternteil betroffen ist, sind 50% der Embryonen frei von der Mutation und für eine Implantation geeignet. Gäbe es ein Verfahren, das defekte Gen in den Embryonen zu korrigieren, stünden mehr Embryonen für eine Implantation zur Verfügung, womit auch die Chancen einer erfolgreichen IVF-Behandlung erhöht wären.

In den letzten Jahren ist die Entwicklung der Genschere CRISPR/Cas (CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) so weit vorangeschritten, dass diese Technologie zur Genom-Editierung in Säugetierzellen und tierischen Embryonen eingesetzt werden kann. Das CRISPR/Cas-System benötigt nur zwei Komponenten, um DNA zu verändern: eine sogenannte guide-RNA, die an die zu modifizierende DNA bindet, und eine Cas-Endonuclease, die den Komplex aus guide-RNA und DNA erkennt und dort Doppelstrangbrüche herbeiführt. Diese DNA-Brüche können dann durch zwei Mechanismen repariert werden: entweder durch nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ) oder durch einen Prozess, bei dem die Verknüpfung an homologen Strangstücken, also gezielter, erfolgt (allgemein als homologiegerichtete Reparatur, homology-directed repair, kurz HDR bezeichnet). Bei der nicht-homologe Endverknüpfung werden zur Reparatur des Bruches Nucleotide zufällig eingefügt und/oder ausgeschnitten. Dies führt zu sogenannten Indels – durch die *Insertionen* bzw. *Deletionen* entstandene Mutationen. Zur Korrektur von Gendefekten eignet sich diese Methode daher nicht. Der HDR-Prozess benötigt zur Reparatur homologe DNA-Sequenzen. Diese können entweder vom nicht-mutierten homologen Chromosom oder von zugefügten DNA-Vorlagen (in Form von Einzelstrang-Oligodesoxynukleotiden) stammen. Auf diesem Weg können mutierte DNA-Bereiche maßgeschneidert korrigiert werden.

Jetzt hat ein internationales Wissenschaftlerteam aus den USA, Südkorea und China die CRISPR/Cas-Methode eingesetzt, um einen Gendefekt in menschlichen Embryonen zu reparieren [1, 2]. Es handelte sich um eine Mutation im Gen für das kardiale Myosin-bindenden Protein C3 (cardiac myosin-binding protein C3, MYBPC3). Mutationen im *MYBPC3*-Gen verursachen die hypertrophe Kardiomyopathie, eine monogene Erkrankung der Herzmuskulatur mit Manifestation im Erwachsenenalter (25 bis 50 Jahre). Ausgangspunkt für die Versuche war ein männlicher Patient, bei dem das eine Allel des *MYBPC3*-Gens durch eine 4-Basenpaar-Deletion im Exon 16 mutiert war. Kontrollexperimente bestätigten, dass jeweils die Hälfte seiner Spermien das Gen in mutierter bzw. in nicht-mutierter Form

trug. Wurden Spender-Eizellen mit diesen Spermien befruchtet und den entstandenen Zygoten 18 Stunden später die Genom-editierenden Komponenten (guide-RNA, Cas-Endonuklease und DNA-Vorlage) injiziert, führte das zur Bildung von Embryonen, bei denen das mutierte Gen vollständig oder unvollständig editiert war (Abb. a). Die Bildung von Mosaikembryonen, die sowohl aus Zellen mit dem ererbten mutierten als auch mit dem korrigierten *MYBPC3*-Gen bestehen, stellt jedoch ein besonderes Problem dar. Denn die Identifizierung einer einzelnen mutierten Zelle im Blastomerenstadium ist nicht einfach und erschwert die Selektion für die IVF-Behandlung. Dies stellt für die klinische Anwendung der Technologie eine große Hürde dar. Da zum Zeitpunkt der Injektion der Gen-editierenden Komponenten die Zygote bereits eine vollständiger DNA-Replikation durchlaufen (S-Phase des Zellzyklus) und somit zwei mutierte Allele produziert hatte, die von der injizierten Genschere CRISPR/Cas zu korrigieren waren, wollten die Forscher wissen, ob eine frühere Zugabe der Genom-editierenden Komponenten die Mosaikbildung verhindern könnte. Zu diesem Zweck wurden die CRISPR/Cas-Elemente zusammen mit einem Spermium in Metaphase-II-Eizellen injiziert, so dass während der Genomeditierung nur ein mutiertes Spermienallel vorhanden war (Abb. b). Anschließende Analysen zeigten, dass 72,4% (42 von 58) der Embryonen ausschließlich aus Zellen mit der korrigierten Version des *MYBPC3*-Gens bestanden. Die übrigen 16 Embryonen hatten Kopien des *MYBPC3*-Gens mit Indel-Mutationen, was auf eine Reparatur durch den NHEJ-Mechanismus hindeutete.

Mit der Injektion der Genom-editierenden Komponenten wurde auch eine DNA-Vorlage mit der Sequenz des gesunden *MYBPC3*-Gens verabreicht. Da die DNA-Vorlage so konzipiert war, dass sie zwar für die gleichen Aminosäuren codierte wie die gesunde Kopie des *MYBPC3*-Gens der Eizelle, hierfür aber andere Nucleotide nutzte, konnten die Wissenschaftler feststellen, ob die Reparatur mittels der exogenen DNA-Vorlage oder der mütterlichen Kopie durchgeführt wurde. Analysen zeigten, dass von den 42 Embryonen nur einer die DNA-Vorlage zur Korrektur des mutierten *MYBPC3*-Gens nutzte. Die Forscher erklärten dies damit, dass Cas-induzierte DNA-Brüche in einer Eizelle wahrscheinlich eher mit der Maschinerie behoben werden, die auch für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen eingesetzt wird, die immer wieder einmal während der meiotischen Rekombination auftreten.

Ein mögliches Sicherheitsproblem, das den klinischen Einsatz der CRISPR/Cas-Technologie verhindern könnte, sind sogenannte Off-Target-Effekte. Diese können dann vorkommen, wenn die guide-RNA an einer anderen Stelle im Genom bindet, deren Sequenzen eine hohe Homologie zu der eigentlichen Zielsequenz aufweisen. Die CRISPR/Cas-Genschere würde dann an diesen Stellen unerwünschte Mutationen einführen. Jedoch ergab eine umfassende Gesamtgenom-Sequenzierungsanalyse keine Hinweise auf etwaige Off-Target-Effekte. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die CRISPR/Cas-Technologie mit sehr großer Genauigkeit arbeitet.

Auch wenn diese Studie gezeigt hat, dass die CRISPR/Cas-Technologie ein passgenaues Verfahren zur gezielten Veränderung von Genen in menschlichen Embryonen ist, sind weitere Untersuchungen zu unerwünschten Neben- und Langzeiteffekten notwendig, bevor die Methode in der Humanmedizin eingesetzt werden kann. Zudem bleibt unklar, welchen Vorteil das Gen-Editing an Embryonen gegenüber der Präimplantationsdiagnostik bringt. Nur bei einem Wegfall des Selektionsprozesses wäre die CRISPR/Cas-Technologie der Präimplantationsdiagnostik überlegen. Darüber hinaus bestehen ethische und soziale Bedenken, ob ein Gen-Editing an Embryonen wünschenswert ist. So würden genetische Interventionen in die Keimbahn an künftige Generation weitervererbt und mithin in die Evolution des Menschen eingreifen. Eine andere Sorge betrifft den möglichen Einsatz des Gen-Editings an Embryonen zur Verbesserung von Eigenschaften des Menschen (Enhancement und Designerbabies). Eine gesellschaftliche Auseinandersetzung mit dieser Thematik steht noch weitgehend aus, aber sozialetische Bedenken würden wohl einen

Einsatz des Gen-Editings zur genetischen „Verbesserung“ von Menschen jenseits von Therapiezwecken verbieten.

[1] H. Ma et al., Nature **548**, 413 (2017). – [2] N. Winbald, F. Lahner, Nature **548**, 398 (2017).

Priv.-Doz. Dr. Dietmar Steverding, Norwich, UK

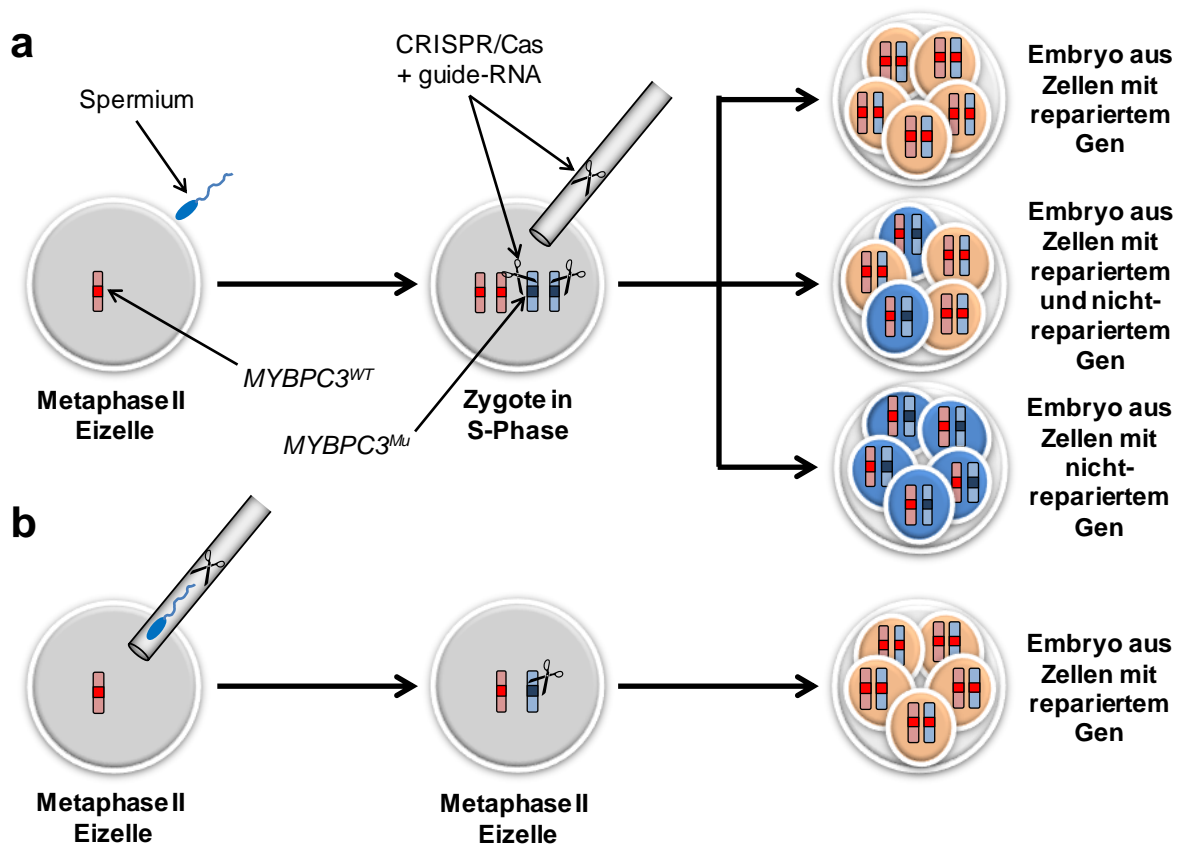


Abb. Korrektur einer Mutation im *MYBPC3*-Gen in Embryonen. – **a.** Eizellen mit dem Wildtyp *MYBPC3*-Gen ($MYBPC3^{WT}$) wurde jeweils durch ein Spermium mit mutiertem *MYBPC3*-Gen ($MYBPC3^{Mu}$) fertilisiert. Nach 18 Stunden wurden die genomeditierenden Komponenten (guide-RNA, CRISPR/Cas und DNA-Vorlage) in die Zygoten während der S-Phase injiziert. Unter diesen Bedingungen war das Genediting ineffizient, und es entstanden Embryonen (gezeigt im Blastomerenstadium), die entweder nur aus gesunden, aus gesunden und kranken (Mosaikembryonen) oder nur aus kranken Zellen bestanden. – **b.** Metaphase II-Eizellen wurden die genomeditierenden Komponenten zusammen mit einem Spermium injiziert. Der Großteil der entstandenen Embryonen bestand nur aus gesunden Zellen; es wurden keine Mosaikembryonen detektiert. Schema: D. Steverding verändert nach [1] und [2].