

## 4. Genomeditierung durch CRISPR und Co

### 4.1 Das Genom, Genomreparatur und Genome-Editing

Die Gesamtheit der Erbinformation eines Organismus wird als „Genom“ bezeichnet. Die doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“, DNA) ist Träger der genetischen Information in Eukaryonten<sup>1</sup>. Da die vollständige Weitergabe eines intakten Genoms essenziell für das Überleben einzelner Zellen wie auch ganzer Organismen ist, wird die Integrität der DNA gleich auf mehreren Ebenen geschützt. Nichtsdestotrotz kann es in einzelnen Zellen immer wieder zu Einzelstrang- wie auch Doppelstrangbrüchen kommen, unter anderem infolge der Einwirkung schädigender externer Faktoren wie zum Beispiel UV-Strahlung. Daher haben die Zellen eine ganze Reihe von Reparaturmechanismen für solche Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche entwickelt. Einer der für die Reparatur von DNA-Schäden genutzten Prozesse, die sogenannte „homologe Rekombination“, beruht auf einer Art Copy-and-paste-Mechanismus (Orr-Weaver et al., 1981). Dabei werden Teile zwischen homologen, also einander sehr ähnlichen, DNA-Sequenzen ausgetauscht.<sup>2</sup> Schon in den 1980er Jahren konnten drei Wissenschaftler, Mario R. Capecchi, Oliver Smithies und Martin J. Evans, zeigen, dass sich dieser Mechanismus, wenn auch mit geringer Effizienz, für die gezielte genetische Modifikation embryonaler Stammzellen eignet. Dies stellte die Voraussetzung für die erfolgreiche Generierung von Tieren dar, bei denen bestimmte Gene ausgeschaltet sind (sogenannte Knockout-Tiere) oder die artfremde Gene enthalten und damit als „transgen“ bezeich-

---

1 Eukaryonten sind Organismen, deren Zellen einen membranumgebenen Zellkern aufweisen und kompartimentiert sind, also verschiedene abgegrenzte Bereiche unterschiedlicher Funktion enthalten. Diese Merkmale unterscheiden sie von Bakterien und Archaeobakterien, die als „Prokaryonten“ bezeichnet werden.

2 Man kann heute durch Zugabe einer homologen Spender-DNA erreichen, dass diese künstlich zugefügte DNA für die Reparatur genutzt wird. Fügt man nun kleine Änderungen in die Spender-DNA ein, wird diese Änderung auch in die Zielsequenz im Genom übernommen.

net werden (Smithies et al., 1985; Capecchi et al., 1989). Hierfür wurde den Genannten im Jahr 2007 der Nobelpreis für Medizin zuerkannt. Ein weiterer wichtiger Reparaturweg beruht auf der sogenannten nicht homologen End-zu-End-Verknüpfung („non-homologous end-joining“, NHEJ), die ohne eine Vorlage auskommt, dafür aber fehleranfälliger ist (Moore/ Haber, 1996).<sup>3</sup> Das grundlegende Verständnis der genannten Reparaturprozesse ebnete schließlich den Weg für die heute als „Genome-Editing“ oder auch „Genomchirurgie“ bezeichneten Verfahren, die letztendlich darauf beruhen, gezielt Schäden im Genom lebender Zellen zu setzen, um diese durch die genannten Mechanismen in gewünschter Weise korrigieren zu lassen. Die Analogie zum Editieren geschriebener Texte ergibt sich daraus, dass auch beim Genome-Editing sowohl einzelne falsche Nukleotide (wie Buchstaben, also quasi Druckfehler), aber auch größere Genbereiche wie zum Beispiel ganze Exone (fehlerhafte Wörter oder ganze Textabschnitte) ausgetauscht beziehungsweise korrigiert werden können.

Um ein solches Genome-Editing zu ermöglichen, war es jedoch zunächst notwendig, geeignete Werkzeuge zu entwickeln, die gezielt DNA-Brüche mit höchster Präzision genau an der gewünschten Stelle, also zum Beispiel innerhalb des zu reparierenden Gens, einfügen. Dazu benötigte man DNA-schneidende Enzyme (Nukleasen), bei denen die enzymatische (Schneide-)Funktion mit einer DNA-Bindedomäne gekoppelt war. Um die Spezifität zu gewährleisten, musste die DNA-Bindedomäne genau eine einzige, ausreichend lange DNA-Sequenz (Abfolge der vier DNA-Bausteine A, G, C und T) erkennen. Die Entwicklung solcher Designernukleasen (sog. molekulare Skalpelle) stellte den entscheidenden Durchbruch für das Genome-Editing dar.

## 4.2 Designernukleasen – Prinzip und erste Enzymklassen

Die ersten solcher artifiziellen Enzyme basierten auf natürlich vorkommenden Nukleasen, die die oben genannten Anforderungen bereits teilweise erfüllten. Viele Mikroorganismen benutzen nämlich spezielle, sequenzspezifische Nukleasen<sup>4</sup>, um sich vor Viren zu schützen. Die DNA-bindende Domäne erkennt dabei Sequenzen, die im eigenen Genom nicht (oder nur besonders geschützt) vorkommen. Dringt ein Virus<sup>5</sup> in die Zelle ein, wird dessen Erbsubstanz zerschnitten, sodass es sich nicht vermehren kann.

<sup>3</sup> Dabei werden die DNA-Enden nach einem Doppelstrangbruch wieder miteinander verknüpft, wobei es häufig dazu kommt, dass DNA-Stücke verloren gehen oder eingefügt werden (Deletion oder Insertion).

<sup>4</sup> Die verwehrte Virusinfektion wird auch als „Restriktion“ bezeichnet, die Enzyme heißen daher (und weil sie innerhalb einer DNA schneiden) Restriktionsendonukleasen.

<sup>5</sup> Viren, die Bakterien infizieren, heißen Bakteriophagen. 16.09.2024, 06:16:17

Vertreter einer speziellen Klasse solcher bakteriellen Nukleasen, die Meganukleasen, binden an besonders lange Zielsequenzen (Plessis et al., 1992; Rouet et al., 1994). So erkennt die Meganuklease I-SceI eine spezifische Abfolge von 18 Nukleotiden. So lange Abschnitte mit genau der richtigen Sequenz kommen selbst im Genom von Säugerzellen oft nur ein einziges Mal vor, was für das gezielte Genome-Editing eine unabdingbare Bedingung darstellt. Allerdings lässt sich mit den Meganukleasen nicht ein bestimmter, gewünschter Genlocus im Genom ansteuern, sondern nur genau die durch die Nuklease vorgegebene Zielsequenz, was die praktische Nutzbarkeit natürlich stark begrenzt. Um dieser Limitation zu begegnen, wurde versucht, die DNA-bindende Domäne der Meganukleasen durch eine gezielte Mutagenese zu modifizieren (Smith et al., 2006). Allerdings stand diesem Vorhaben die Struktur dieser Enzyme entgegen, bei denen die DNA-bindende und die DNA-schneidende (Nuklease-)Aktivität in einer Proteindomäne vereint sind. In Folge dessen blieb die Meganukleasen-Technologie eine Nischenanwendung für hochspezialisierte Labore, auch wenn es im Laufe der letzten 25 Jahre gelang, eine Reihe solcher Designernukleasen für ausgewählte Zielsequenzen zu entwickeln. Zugleich wurde aber das Konzept der gezielten Evolution DNA-modifizierender Enzyme weiter entwickelt und auf andere Proteine übertragen. So gelang es kürzlich deutschen Forschern, die aus dem Bakteriophagen P stammende Rekombinase Cre durch gerichtete Evolution zu einem hochaktiven Enzym (Brec1) umzubauen, welches integrierte HI-Viren aus dem Genom menschlicher Immunzellen herausschneiden kann (Karpinski et al., 2016). Die beteiligten Wissenschaftler um Frank Buchholz und Joachim Hauber arbeiten daran, dieses Prinzip möglichst bald in einer klinischen Studie im Kontext der Transplantation autologer (eigener) Blutstammzellen bei HIV-infizierten Patienten zu testen. Dabei sollen den Patienten Blutstammzellen entnommen, außerhalb des Körpers mithilfe der Genschere modifiziert und danach reinfundiert werden. Die modifizierten Zellen tragen im Körper zur Blutbildung bei, das heißt aus ihnen entstehen unter anderem die Zellen des Immunsystems, die von HIV angegriffen werden. Sollten die mit Brec1 ausgestatteten Zellen von HIV infiziert werden, wird die Rekombinase aktiviert und schneidet das Virus sofort wieder aus dem Genom aus, sodass es sich nicht weiterverbreiten kann. Blutstammzellen eignen sich für therapeutische Eingriffe beim Menschen in besonderem Maße, da sie gut isoliert, *in vitro* modifiziert und dann wieder in den Körper zurückgeführt werden können.

Nachdem prinzipiell gezeigt worden war, dass ein gezieltes Genome-Editing mithilfe von Designernukleasen möglich ist, bestand die große Herausforderung darin, den Prozess des Designs dieser Enzyme wesentlich zu vereinfachen, um eine breite Anwendung zu ermöglichen. Der Schlüssel zu diesem Ziel bestand in der Trennung der beiden Hauptfunktionen der Designernukleasen, also der DNA-Bindung und der Schnittset-

zung. Wie schon mit den Meganukleasen half auch hier der Blick in das Arsenal der in der Natur vorkommenden Endonukleasen. Tatsächlich existiert eine bestimmte Klasse dieser Enzyme, sogenannte Typ-IIS-Endonukleasen, bei denen die beiden Domänen, welche die DNA-Bindung und die Nukleasefunktion vermitteln, physisch voneinander separiert sind. Das machte die praktische Aufgabe relativ klar (wenn auch nicht einfach) – die Nukleasedomäne einer Typ-IIS-Endonuklease (wie z. B. FokI<sup>6</sup>) musste gentechnisch mit einer artifiziellen, gegen die gewünschte Zielsequenz gerichteten DNA-Bindungsdomäne verknüpft werden.

Mit der Aufdeckung der Struktur der sogenannten „Zinkfinger“ wurde dieses Vorhaben realisierbar (Thiesen/Bach, 1991). Bei Zinkfingern handelt es sich um hochkonservierte, ein Zink-Ion enthaltende, fingerförmige Proteindomänen, die sich zum Beispiel in vielen Transkriptionsfaktoren finden (Miller et al., 1985). Ein Zinkfinger (ZF) bindet dabei spezifisch an ein Tripletts aus drei Nukleotiden (also z. B. ZF1 an AAA, ZF2 an AAG, ZF3 an AAT usw.). Danach ging es natürlich darum, möglichst viele unterschiedliche Zinkfinger zu identifizieren, um alle vorkommenden 64 (4<sup>3</sup>) Tripletts spezifisch binden zu können. Schon bald nach der Aufdeckung der Struktur und Funktionsweise der Zinkfinger wurden diese genetisch an verschiedene andere Proteinstücke (sog. Effektor-domänen) fusioniert, um quasi chimäre Zinkfingerproteine zu generieren, wie zum Beispiel künstliche Transkriptionsfaktoren (Wu et al., 1995; Segal et al., 1999).

Bald darauf wurden analog dazu von Srinivasan Chandrasegaran und Mitarbeitern die ersten hybriden Restriktionsenzyme beschrieben, deren Nukleasefunktion über die Schneidedomäne von FokI vermittelt wurde (Kim et al., 1996). Dieselbe Gruppe setzte solche Zinkfingernukleasen (ZFN) auch erstmals dazu ein, gezielt das Genom lebender Zellen zu modifizieren (Bibikova et al., 2001 und 2002). Seitdem wurde eine Reihe von ZFN für unterschiedlichste Forschungsanwendungen entwickelt. Die ZFN waren auch die ersten Designernukleasen, die den Weg in die klinische Anwendung fanden, und zwar im Rahmen einer klinischen Studie, bei der T-Lymphozyten von HIV-Patienten vor einer Infektion mit dem HI-Virus geschützt werden (Tebas et al., 2014). Dazu wird mithilfe des Genome-Editings eine der zwei von HIV benötigten Eintrittspforten (der sog. HIV-Korezeptor CCR5) ausgeschaltet. Diese von der Firma Sangamo entwickelte Strategie wird mittlerweile auch genutzt, um in klinischen Studien hämatopoetische Stammzellen vor HIV zu schützen.<sup>7</sup> Analog zu dem oben für die Brec1-Rekombinase beschriebenen Ansatz werden die Blutstammzellen außerhalb des Körpers genetisch mo-

6 Gelesen „Fok 1“, stammt aus dem Mikroorganismus *Flavobacterium okeanokoites*. Fok 1 funktioniert als sog. Dimer (von griech. „dimer“ = „zweiteilig“), d.h. es müssen zwei Untereinheiten an die gegenläufigen Stränge der DNA binden.

7 Vgl. NCT02500849; [www.clinicaltrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov) (21.01.2017).

difiziert, hier indem das Gen für CCR5 durch kurzzeitige Expression der spezifischen ZFN ausgeschaltet wird. Nach Transplantation der modifizierten Stammzellen bilden diese Immunzellen, die nicht mehr von R5-tropen HIV-Stämmen infiziert werden können. Blutstammzellen haben den großen Vorteil, dass sie sich permanent selbst erneuern und somit über die gesamte Lebenszeit eines Menschen erhalten bleiben. Damit können sie auch einen langfristigen Schutz gegen HIV vermitteln.

Zugleich bleibt zu konstatieren, dass die Entwicklung und Herstellung von ZFN sehr kompliziert und aufwendig ist, sodass nur wenige spezialisierte Labors weltweit über die notwendige Technologie verfügen. Zwar kann man individuell entwickelte ZFN seit einigen Jahren auch kommerziell erwerben, allerdings kostet ein einzelnes Enzym viele Tausend Euro, ohne dass man eine Garantie hätte, dass es auch effizient und spezifisch funktioniert. Tatsächlich weisen die ZFN aufgrund des von ihnen benutzten Erkennungsprinzips sowie einiger technischer Limitationen im Vergleich mit neueren Systemen (siehe folgende Abschnitte) einige Nachteile in Bezug auf Genauigkeit und Effizienz auf.<sup>8</sup> Zugleich wurde mithilfe der ZFN als den ersten echten Designernukleasen das Prinzip des Genome-Editings etabliert, auf dem alle späteren Entwicklungen aufbauen konnten.

Die Aufdeckung der Struktur einer neuen Klasse DNA-bindender Proteine, der sogenannten „Transcription-factor like effectors“ (TALEs) (Moscou/Bogdanove, 2009; Boch et al., 2009) brachte eine Menge neuen Enthusiasmus ins Feld des Genome-Editings. TALE-Effektoren wurden aus Pflanzenbakterien isoliert, denen sie dazu dienen, die Transkriptionsmaschinerie in befallenen Pflanzenzellen auf die eigenen Bedürfnisse umzuprogrammieren. Dazu verfügen die TALEs über eine separate DNA-Bindedomäne, welche aus einer Vielzahl miteinander verknüpfter, nahezu identischer Monomere besteht. Jedes dieser Monomere besteht aus 34 Aminosäuren und bindet genau ein Nukleotid. Die Spezifität der Bindung wird über zwei variable Aminosäuren auf den Positionen 12 und 13 vermittelt, die sogenannten „repeat variable di-residues“ (RVDs). Durch den 1-zu-1-Code wird nicht nur eine höhere Spezifität als beim 1-zu-3-Code der ZFN gewährleistet<sup>9</sup>, er ermöglicht auch einen viel einfacheren Zusammenbau künstlicher TALE-Moleküle anhand der ausgesuchten Zielsequenz. Entsprechend dauerte es auch nur wenige Monate, bis die ersten TALE-Nukleasen (TALEN) designet wurden (Christian et al., 2010), und schon bald stand eine breit anwendbare TALEN-Technologie zur Ver-

<sup>8</sup> I. d. R. können nur vier Zinkfinger aneinander gekoppelt werden (max. Zielsequenz: 12 Nukleotide bzw. bei zwei Armen: 24 Nukleotide), benachbarte Zinkfinger können sich zudem gegenseitig beeinflussen.

<sup>9</sup> Für die Bindung eines Zinkfingers sind vor allem die ersten beiden der drei Zielnukleotide entscheidend, beim dritten sind Fehler möglich.

fügung (Miller et al., 2011). Die Entwicklung eleganter Klonierungsprotokolle (Sanjana et al., 2012; Reyon et al., 2012) schaffte die Voraussetzung dafür, dass hocheffiziente TALENs für unterschiedlichste Zielgene schon bald in vielen Labors weltweit designt und hergestellt werden konnten, zum Beispiel auch in unserer Arbeitsgruppe (Berdien et al., 2014; Mock et al., 2015). Die sehr schnelle Einführung der TALEN-Technologie und die in der Folge deutlich breitere Anwendung des Genome-Editings in Biologie und Biomedizin führte dazu, dass die führende internationale Fachzeitschrift *Nature Methods* in seiner Januarausgabe 2012 das Genome-Editing zur „Method of the year 2011“ auswählte. Schon im Jahr 2015, also nur circa sechs Jahre nach der Erstbeschreibung, wurden die ersten klinischen Anwendungen der TALEN-Technologie berichtet, welche im Kontext der adoptiven Immuntherapie erfolgten (Qasim et al., 2015 und 2017). Als vielversprechend werden für TALEN auch klinische Strategien zur genetischen Modifikation von Blutstammzellen, zum Beispiel zum CCR5-Knockout (siehe oben), angesehen.

### 4.3 CRISPR/Cas – Designernuklease, die eigentlich gar keine ist

Allerdings verloren die TALEN sehr schnell ihren Status als Methode der Wahl. Schon bald gab es einen neuen Shootingstar mit dem sperrigen Namen CRISPR/Cas. „CRISPR“ steht für „Clustered regularly interspaced short palindromic repeats“, „Cas“ für „CRISPR-assoziiert“ (-es Protein). Der komplizierte Name mag die Konfusion der Entdecker der CRISPR-Sequenzen widerspiegeln, die Mitte der 1980er Jahre im Genom des Bakteriums *E. coli* sich regelmäßig wiederholende Strukturen palindromischer<sup>10</sup> Sequenzen ohne offensichtliche Funktion gefunden hatten (Ishino et al., 1987). In den folgenden Jahren wurden CRISPR-Abschnitte auch in einer Reihe anderer Mikroorganismen nachgewiesen (Mojica et al., 2000). Die Konservierung<sup>11</sup> dieser Genomstrukturen in völlig verschiedenen Bakterien deutete bereits darauf hin, dass es sich dabei um funktionell wichtige Elemente handeln könnte. Jedoch brauchte es ab der Erstbeschreibung zwei Jahrzehnte intensiver Forschungen, ehe die erstaunliche Funktion der seltsamen CRISPR-Sequenzen entdeckt wurde: Sie dienen Bakterien als adaptives, also lernendes Immunsystem, um sich vor Bakteriophagen zu schützen (Barrangou et al., 2007). Nachdem die prinzipielle Funktion des CRISPR/Cas-Systems identifiziert worden

<sup>10</sup> Palindrome lassen sich vorwärts wie rückwärts lesen: ANNA, ABBA, oder auch LAGERTONNEN-NOTREGAL. Im Genom sind es Sequenzen, die auf dem Leit- und dem Gegenstrang der DNA jeweils in 5'-3'-Leserichtung identisch sind.

<sup>11</sup> Gensequenzen werden als konserviert bezeichnet, wenn sie in verschiedenen Organismen unverändert auftreten. Dies ist ein Indikator dafür, dass es sich um wichtige Genomabschnitte handelt.

war, gelang es vergleichsweise schnell, auch die zugrunde liegenden Mechanismen und die Rolle seiner einzelnen Komponenten aufzudecken (Garneau et al., 2010; Deltcheva et al., 2011; Wu et al., 2014). Diese sind im Folgenden kurz unter Einschluss späterer Entdeckungen zusammengefasst.

Das bakterielle Immunsystem arbeitet ähnlich wie das menschliche in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird der Angreifer als solcher erkannt und soweit möglich durch die erste Barriere, unspezifische Immunmechanismen, zerstört. Bei der Zerstörung der Viren werden kurze Abschnitte ihrer Erbinformation zurückbehalten und in das eigene Genom, nämlich in die CRISPR-Region, eingebaut. Diese kurzen Stücke viraler Erbinformation werden somit quasi in der Immundatenbank der Bakterien gespeichert und können als kurze, komplementäre RNA-Moleküle (sog. crRNA) abgelesen werden. Diese crRNAs passen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip exakt zur Erbinformation der Viren. Sollten die Bakteriophagen ein zweites Mal versuchen, die Bakterien anzugreifen, sind diese gewappnet – die Viren werden sofort als solche erkannt und ihre Erbinformation wird über die Cas9-Nuklease zerschnitten. Zugleich haben die Bakterien Mechanismen entwickelt, die dafür sorgen, dass die Schlüssel-Schloss-Erkennung nicht bei den im eigenen Genom integrierten viralen Abschnitten funktioniert – insgesamt also ein sehr effektives und elaboriertes Abwehrsystem.

Bereits im Jahr 2011 wurde gezeigt, dass sich das bakterielle Immunsystem von einer Bakterienart auf eine andere übertragen lässt (Sapranaukas et al., 2011) – ein erster Hinweis für eine breite Anwendbarkeit. Der entscheidende Durchbruch in Richtung einer möglichen Anwendung für das Genome-Editing ergab sich aus dem Nachweis der Funktion von CRISPR/Cas9 als RNA-gesteuerte DNA-Endonuklease durch Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna (Jinek et al., 2012). Die Eignung zum Editieren humaner Zellen wurde dann Anfang 2013 zunächst in zwei parallel publizierten Arbeiten aus den Laboren von Feng Zhang und George Church (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013) und kurz danach in einer Publikation aus dem Labor von Jennifer Doudna (Jinek et al., 2013) gezeigt. Nach diesen Meilensteinarbeiten ist das Feld regelrecht explodiert – CRISPR/Cas fand in kürzester Zeit breite Anwendung in den Grundlagenwissenschaften, aber auch in der grünen (Landwirtschaft), weißen (Industrie) und roten (Medizin) Biotechnologie. Vor Kurzem wurde schließlich auch vom ersten Einsatz einer CRISPR/Cas-Nuklease im Rahmen einer Gentherapiestudie in China berichtet (Cyranoski, 2016). Die Translation hin zur klinischen Anwendung ging also noch etwas schneller als bei den TALENs.<sup>12</sup> Für die nahe Zukunft wird allgemein mit einem extrem schnellen An-

<sup>12</sup> Inzwischen (14.07.2017) laufen in China bereits fünf klinische Studien unter Einsatz von CRISPR/Cas ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), [doi.org/10.5771/9783845287720-96](https://doi.org/10.5771/9783845287720-96), am 16.09.2024, 06:16:18

stieg der Zahl der Studien gerechnet, wobei oft von einem „Wettrennen“ vor allem zwischen China und den USA die Rede ist.<sup>13</sup>

Was macht das CRISPR/Cas-System so besonders? Die kürzeste Antwort auf diese Frage lautet sicher – seine Einfachheit. Im Unterschied zu den früheren Designernukleasen wird die DNA-bindende Domäne des CRISPR/Cas-Systems von einer RNA (der sog. guide-RNA bzw. gRNA<sup>14</sup>) und nicht von einer Proteindomäne gebildet. Das bedeutet, dass das eigentliche Enzym (die Nuklease Cas9) stets dasselbe bleibt und im Gegensatz zu den herkömmlichen Designernukleasen gerade nicht für jede Zielsequenz neu designt werden muss. Stattdessen reicht es aus, für jede spezifische Anwendung eine neue, spezifische gRNA passend zur Zielsequenz zu designen und zusammen mit der Cas9 einzubringen. Das Designen einer gRNA ist mithilfe frei verfügbarer Online-Tools sehr einfach. Als Matrize für ihre Herstellung im Reagenzröhrchen dienen zwei kurze DNA-Oligonukleotide, die für wenige Euro online geordert werden können und gewöhnlich innerhalb eines Werktages geliefert werden. Anders betrachtet – wenn eine „klassische“ (proteinbasierte) Designernuklease nicht funktioniert hat, waren Vorarbeiten von Wochen oder sogar Monaten hinfällig. Wenn eine gRNA nicht funktioniert (was durchaus nicht selten ist), bestellt man eine neue und kann innerhalb weniger Tage neu anfangen, sofern man nicht vorausschauend von vornherein mehrere alternative gRNAs bestellt hatte.

Da dieselbe Nuklease (Cas9) von allen verschiedenen gRNAs des gegebenen Typs<sup>15</sup> zu deren Zielsequenz geleitet werden kann, ist es auch möglich, in einer Zelle gleichzeitig mehrere Schnitte an völlig unterschiedlichen Orten im Genom zu setzen. So können auf einen Schlag gleich mehrere Gene ausgeschaltet werden (sog. „Multiplexing“) (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Wang et al., 2013; Zetsche et al., 2017). Allerdings erfordern solche Studien eine sehr gründliche Analyse, da ein hohes Risiko besteht, dass zum Beispiel durch einen falsch laufenden Reparaturprozess zwei verschiedene Chromosomen miteinander verknüpft werden (Poirot et al., 2015).<sup>16</sup> Für klinische Anwendungen ins-

**13** Der führende US-amerikanische Gentherapeut Carl H. June bezeichnete dieses Wettrennen in Anlehnung an das frühere Wetteifern um die Führung im Weltall als „Sputnik 2“ (Cyranoski, 2016).

**14** Am besten wahrscheinlich als „Leit-RNA“ zu übersetzen. Die gRNA besteht aus einer 20-Nukleotid-Sequenz, die exakt an die Zielsequenz bindet (also jeweils neu designt werden muss), und der Adaptersequenz, die die Verbindung zur CAS9-Nuklease herstellt.

**15** Da CRISPR/Cas-Systeme in verschiedenen Bakterien vorkommen, gibt es auch unterschiedliche Typen von gRNAs, die spezifische Charakteristika aufweisen und mit den zugehörigen Cas-Nukleasen interagieren.

**16** Auch generell darf der Aufwand der Analyse beim Genome-Editing nicht unterschätzt werden; man kann sagen: Das „Crispern“ braucht eine Woche – die Analyse ein Jahr. Entsprechend lassen sich



besondere mit Stammzellen ist das gleichzeitige Editing mehrerer Gene aus derzeitiger Sicht daher nicht empfehlenswert.

Nicht zuletzt garantiert die extreme Schnelligkeit des CRISPR/Cas-Systems seine permanente Optimierung. Daher können Probleme wie die geringe Spezifität (siehe im folgenden Abschnitt) der ersten CRISPR/Cas-Nukleasen durch Untersuchungen zum Einfluss einzelner Komponenten und ihre gezielte Modifikation sehr schnell adressiert werden (Wu et al., 2014; Kleinstiver et al., 2016; Tsai/Joung, 2016). Zudem kann das CRISPR/Cas-System etwa durch die Inaktivierung beziehungsweise den Austausch der Nuklease-Domäne modifiziert werden, um völlig neue Anwendungen zu ermöglichen, zum Beispiel um die Aktivität oder Zugänglichkeit von Genen zu beeinflussen (Epigenetik; Thakore et al., 2016) oder sogar einzelne Nukleotide ohne Schnitte im Genom auszutauschen („base editing“; Komor et al., 2016).

Ein zunächst unterschätztes Problem des Genome-Editings scheint auf den ersten Blick etwas abwegig: Woher weiß man, dass es funktioniert hat? Tatsächlich sind die durch das Genome-Editing eingebrachten Änderungen in den meisten Fällen nicht einfach messbar.<sup>17</sup> Schon außerhalb des Körpers (*ex vivo*), bei der Arbeit mit im Reagenzglas kultivierten Zellen, wird es oft schwierig, kleinste genomische Änderungen nachzuweisen, umso mehr, wenn diese nur in einem geringen Prozentsatz der betreffenden Zielzellen erfolgreich waren. Entsprechend wird an der Entwicklung molekularer Methoden gearbeitet, um ein erfolgreiches Genome-Editing möglichst genau zu quantifizieren (Mock et al., 2015 und 2016).

Zugleich darf man nicht außer Acht lassen, dass die praktische Anwendung von CRISPR/Cas in vielerlei Hinsicht mit ähnlichen Problemen konfrontiert ist, wie die der anderen Designernukleasen. Dies betrifft sowohl die Frage der Effizienz (bei Weitem nicht alle gRNAs vermitteln eine hohe, spezifische Nukleaseaktivität) wie auch die der Spezifität (abhängig von der Zielsequenz kann es teilweise zu sehr hohen Off-target-Aktivitäten kommen (Fu et al., 2013), also zu unerwünschten DNA-Schnitten an anderen Stellen des Genoms). Mögliche Off-target-Stellen lassen sich häufig, aber leider nicht immer, über Computeranalysen<sup>18</sup> vorhersagen, bei denen Sequenzen im Genom aufge-

---

die Kosten auch nicht auf die wenigen Euro für die Bestellung der Oligonukleotide reduzieren – es bedarf zudem einer kostenintensiven etablierten Infrastruktur und ausreichender Fachkenntnisse.

**17** Der Nachweis ist relativ einfach, wenn sich infolge des Genome-Editings eine klare phänotypische Veränderung ergibt, also z. B. ein Protein wie der HIV-Korezeptor CCR5 von der Oberfläche einer behandelten Zelle verschwindet (Vgl. Tebas et al., 2014; Mock et al., 2015).

**18** Die Vorhersage potenzieller Off-target-Loci ist Teil der für das Design der gRNA benutzten Computeralgorithmen, sodass man schon bei der Auswahl der gRNAs möglichst darauf achten sollte, die Wahrscheinlichkeit der Off-target-Aktivität möglichst gering zu halten.

spürt werden, die eine große Homologie mit der Zielsequenz der verwendeten gRNA aufweisen. Ein wichtiges Forschungsfeld im Genome-Editing beschäftigt sich damit, die Off-target-Aktivität der Designernukleasen genau zu analysieren und aufbauend darauf zu minimieren. Wie oben bereits berichtet, gewährleistet vor allem die einfache Anwendbar- wie auch Modifizierbarkeit der CRISPR/Cas-Technologie hier sehr schnelle Verbesserungen in kürzester Zeit (Kleinstiver et al., 2016; Tsai/Joung, 2016).

## 4.4 Stammzellforschung und klinische Anwendung des Genome-Editings

Die neuen Möglichkeiten, die das Genome-Editing für die Forschung bietet, wurden bereits mehrfach beschrieben und werden auch in anderen Kapiteln dieses Themenbandes diskutiert, sodass hier nur eine kurze Übersicht erfolgen kann. Zum Beispiel erlaubt das Genome-Editing, krankheitsspezifische Mutationen in der Zellkultur exakt nachzustellen, sodass es viel einfacher wird, die Entstehung und Entwicklung der jeweiligen Krankheit genau zu analysieren. Hier kommen vor allem die sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) ins Spiel, die sich *in vitro* problemlos kultivieren und in nahezu alle Gewebe des Körpers differenzieren lassen. Da diese Zellen auch einem Genome-Editing sehr gut zugänglich sind, eignen sie sich ideal für die genannten Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung bestimmter Mutationen, möglicherweise sogar für neuartige Therapien mithilfe korrigierter Gewebe oder Organe, die außerhalb des Körpers gezüchtet wurden („tissue engineering“) (Hotta/Yamanka, 2015). Zudem lassen sich durch eine Kombination des Genome-Editings mit diesem iPS-Zell-basierten Tissue Engineering Gewebe herstellen, die exakt die Mutationen tragen, die bei einer zu untersuchenden Krankheit relevant sind. Dies wird völlig neue Chancen im Bereich der Medikamententestung eröffnen.

Wie oben bereits angedeutet, gibt es derzeit nur eine Handvoll klinischer Anwendungen des Genome-Editings. Zugleich wird in vielen Veröffentlichungen davon ausgegangen, dass es in den nächsten Jahren zu einer Explosion der Zahl klinischer Gentherapiestudien kommen wird. Allerdings ergeben sich insbesondere in Bezug auf die für viele Aufgabenstellungen der klinischen Gentherapie wünschenswerte *In-vivo*-Anwendung eine Reihe grundsätzlicher Probleme. Eine schon traditionelle Schwierigkeit besteht darin, die Werkzeuge für das Genome-Editing in die richtigen Zellen im Körper zu transportieren. Für den menschlichen Organismus stellen fremde Erbinformationen und Proteine zunächst unerwünschte Eindringlinge dar, vor denen die eigenen Zellen geschützt werden müssen, wofür eine Reihe von Abwehrmechanismen auf ver-

schiedenen Ebenen existieren.<sup>19</sup> Deshalb arbeiten Gentherapeuten seit Jahrzehnten an der Entwicklung effizienter Gentransfervektoren (sog. „Gentaxis“), also an Methoden, Gene erfolgreich in Zellen einzubringen, sodass sie dort die gewünschte Funktion erfüllen (Übersicht: Fehse/Domasch, 2015). Zwar kann das Genome-Editing auf diese Vorarbeiten zurückgreifen, allerdings müssen die Vektoren für das Genome-Editing spezifischen Anforderungen genügen, die denen für andere Gentherapieanwendungen teilweise entgegengesetzt sind. So ist etwa bei der klassischen Gentherapie oft eine stabile Expression der eingebrachten (therapeutischen) Gene wünschenswert, während die für das Genome-Editing benötigten Komponenten nur vorübergehend in der Zelle vorhanden sein sollen (sog. „Hit-and-run-Strategie“). Auch ist zu beachten, dass alle Designernukleasen Elemente enthalten, die aus Bakterien<sup>20</sup> stammen, sodass sie sehr immunogen sind (Porteus, 2016a). Die Erfahrungen der somatischen Gentherapie lehren, dass therapeutische Effekte durch Immunreaktionen gegen eingebrachte Proteine und Vektoren konterkariert werden können (Manno et al., 2006; Porteus, 2016a).

Um den genannten Schwierigkeiten aus dem Weg zu gehen, konzentrieren sich die ersten Anwendungen des Genome-Editings wie oben dargelegt auf die Ex-vivo-Modifikation von Zellen des Blutsystems. Dabei lassen sich Effizienz und Sicherheit besonders gut kontrollieren, und auch eine Aktivierung des Immunsystems kann weitgehend ausgeschlossen werden. Bereits besprochen wurden Ansätze zur Immuntherapie sowie zur Behandlung beziehungsweise potenziellen Verhinderung einer HIV-Infektion, in deren Rahmen Immunzellen oder auch Blutstammzellen genetisch modifiziert werden. Daneben wird derzeit vor allem an Genome-Editing-basierten Strategien zur Behandlung monogener verursachter Erbkrankheiten des Blutes gearbeitet. Dabei sollen die jeweiligen Gendefekte außerhalb des Körpers in den patienteneigenen Blutstammzellen korrigiert werden, bevor sie dem Patienten zurückgegeben werden. In diesem Bereich der Gentherapie hat man in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte bis hin zur wahrscheinlichen Heilung schwerster Immundefekte gemacht.<sup>21</sup> Allerdings führte das bisher genutzte Prinzip der Genaddition<sup>22</sup> in einigen Studien auch zum Auftreten sehr

**19** Fremde Proteine und Nukleinsäuren deuten auf eine Infektion mit Mikroorganismen oder Viren hin. Davor schützen das Immunsystem wie auch viele zelluläre Strukturen und Mechanismen.

**20** Die am häufigsten verwendeten CRISPR/Cas-Systeme stammen z. B. aus *Staphylococcus aureus* sowie *Streptococcus pyogenes*, zwei bei Menschen häufig anzutreffenden Bakterien. Sehr viele Menschen besitzen daher Antikörper gegen die entsprechenden Cas9-Proteine (Porteus, 2016b; Charlesworth, 2018).

**21** Die längsten Nachbeobachtungszeiten erreichen derzeit fast 20 Jahre. Die positiven klinischen Daten führten im Jahr 2016 zur ersten Zulassung einer Stammzellgentherapie in Europa (Strimvelis®).

**22** Hierbei wird zusätzlich zu der/n defekten Genkopie/n eine „gesunde Genkopie“ ins Genom eingebaut. Da der Einbau ungerichtet irgendwo im Genom erfolgt, können dabei wichtige andere Gene

schwerer Nebenwirkungen (Leukämien). Indem der Ansatz der Genaddition durch eine echte Genreparatur per Genome-Editing ersetzt wird, könnte das Risiko der Insertionsmutagenese eliminiert werden. Natürlich müssen in eine Risiko-Nutzen-Abwägung mögliche neue Risiken des Genome-Editings (wie die oben erwähnten Off-target-Effekte) einbezogen werden. Insgesamt dürften aber Gentherapieansätze, die auf ein Genome-Editing in Blutstammzellen zielen, zu den ersten gehören, die sich erfolgreich klinisch umsetzen lassen.

Schließlich soll kurz auf die rechtlichen und ethischen Dimensionen der technischen Möglichkeiten hingewiesen werden, die aus dem Genome-Editing erwachsen. Dabei ist davon auszugehen, dass die Anwendung des Genome-Editings im Rahmen der somatischen Gentherapie keine prinzipiell neuen rechtlichen oder ethischen Fragen aufwirft.<sup>23</sup> Jedoch wurde gezeigt, dass das CRISPR/Cas-basierte Genome-Editing eine im Vergleich zu früheren Methoden sehr effiziente Modifikation von Keimbahnzellen (etwa befruchteten Eizellen) zulässt. Mit den CRISPR/Cas-basierten Ansätzen wird die Generierung genetisch modifizierter Organismen (z. B. Knockout-Tiere oder auch transgene Tiere) sehr viel einfacher, effizienter und schneller. Tatsächlich wurden inzwischen auch genetisch modifizierte Tiere (bis hin zu Hunden und landwirtschaftlichen Nutztieren) geschaffen, für deren Spezies das zuvor nicht möglich war, weil sich zum Beispiel keine embryonalen Stammzellen gewinnen oder kultivieren ließen. Aus technischer Sicht bedeutet das, dass Keimbahneingriffe prinzipiell auch beim Menschen möglich sein dürften. Dies führte zu neuen Diskussionen hinsichtlich der Möglichkeit, Zulässigkeit oder sogar Notwendigkeit von Keimbahnmodifikationen beim Menschen (Baltimore et al., 2015a; Lanphier et al., 2015; Miller, 2015), die durch erste Genehmigungen für entsprechende Studien sowie Machbarkeitsnachweise in menschlichen (nicht entwicklungsfähigen) Embryonen weiter befeuert wurden (Liang et al., 2015). In Stellungnahmen haben internationale Forscher sowie in Deutschland zunächst die IAG *Gentechnologiebericht* der BBAW (Reich et al., 2015) und später auch die Leopoldina (Leopoldina et al., 2015) ein Moratorium für das Genome-Editing gefordert. Allerdings ist die Leopoldina (2017) zwischenzeitlich wieder von der Forderung nach einem Moratorium abgerückt. Auch ließ sich ein allgemein erwartetes, auch international von vielen Wissenschaftlern unterstütztes (Lanphier et al., 2015) generelles Moratorium des Genome-Editings an menschlichen Keimbahnzellen im Rahmen eines eigens hierfür ein-

---

oder deren Kontrollregionen zerstört bzw. beeinflusst werden (sog. „Insertionsmutagenese“), was im schlimmsten Fall zu einer Entartung betroffener Zellen und, im Fall von Blutzellen, zu Leukämien führen kann. Da Leukämien nur bei einigen der Studien auftraten, geht man davon aus, dass auch die bestehende Grundkrankheit einen Einfluss auf das Risiko des Auftretens besagter Nebenwirkungen hat.

23 Zum Hintergrund: Fateh-Moghadam, 2011; Fuchs, 2011; Lenk, 2011; Köchy et al., 2014.

berufenen „Gipfeltreffens“ führender Wissenschaftsakademien<sup>24</sup> in Washington nicht durchsetzen (Carroll, 2015). Zugleich stellten die dort versammelten Wissenschaftler einmütig fest, dass eine klinische Anwendung des Genome-Editings bis hin zur Geburt genetisch modifizierter Babys unverantwortlich („irresponsible“) wäre, solange (i) keine klare Risiko-Nutzen-Analyse vorliegt und (ii) kein breiter gesellschaftlicher Konsens über die geplante Anwendung besteht (Baltimore et al., 2015b). In Deutschland hat das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, 2015) kürzlich eine Förderinitiative gestartet, die Verbundprojekte unterstützt, welche die rechtlichen und ethischen Implikationen des Genome-Editings untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich das Genome-Editing in den letzten 20 Jahren von einer nur von wenigen hoch spezialisierten Labors genutzten Nischentechnologie zu einem breit angewendeten, extrem nützlichen biotechnologischen Verfahren entwickelt hat, welches auch für die Stammzellforschung von großer Relevanz ist. Ohne Übertreibung lässt sich schon heute sagen, dass das Genome-Editing sowohl die Grundlagen- als auch die angewandte Forschung in weiten Bereichen der Biologie, der Biomedizin und der grünen wie auch weißen Gentechnik revolutioniert hat. Ob das Genome-Editing auch für die klinische Anwendung eine ähnliche Bedeutung erlangen wird, wird die Zukunft zeigen.

## 4.5 Danksagung

Untersuchungen des Autors zu den Implikationen des Genome-Editing werden vom BMBF im Rahmen des Verbundprojekts GenE-TyPE unterstützt (Förderkennzeichen 01GP1610B). Ich danke Dr. Kristoffer Riecken, Dr. Lilian Marx-Stölting und Hannah Schickl für das kritische Gegenlesen des Manuskripts.

## 4.6 Literatur

- Baltimore, D. et al. (2015a): A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. In: *Science* 348: 36.
- Baltimore, D. et al. (2015b): On human gene editing: International Summit Statement. *National Academies*, 03. 12. 2015. Unter: [www.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a](http://www.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a) [24.01.2017].
- Barrangou, R. et al. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. In: *Science* 315: 1709–1712.

<sup>24</sup> „The International Summit on Human Gene Editing“, hosted by the scientific academies of China, the United Kingdom, and the United States in Washington, DC (December 2015): 6:18

- Berdién, B. et al. (2014): TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer. In: *Gene Ther* 21(6): 539–548.
- Bibikova, M. et al. (2001): Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. In: *Mol Cell Biol* 21: 289–297.
- Bibikova, M. et al. (2003): Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. In: *Science* 300(5620): 764.
- BMBF (2015) = Bundesministerium für Bildung und Forschung: Forschungsvorhaben Genomeditierung. Unter: <http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/6725.ph>; Nachwuchsförderung. Unter: <http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/5125.php> [24.01.2017].
- Boch, J. et al. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. In: *Science* 326: 1509–1512.
- Capecchi, M. R. (1989): Altering the genome by homologous recombination. In: *Science* 244: 1288–1292.
- Carroll, D. (2016): A Perspective on the State of Genome Editing. In: *Mol Ther* 24: 412–413.
- Charlesworth, C. et al. (2018): Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to CAS9 Proteins in Humans. In: *bioRxiv*, Online-Publikation 05.01.2018. DOI: 10.1101/243345.
- Christian, M. et al. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. In: *Genetics* 186: 757–761.
- Cong, L. et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science* 339: 819–823.
- Cyranoski, D. (2016): CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. In: *Nature* 539: 479.
- Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Deutsche Akademie der Technikwissenschaften = acatech, Union der deutschen Akademien der Wissenschaften (2015): Chancen und Grenzen des „genome editing“. Stellungnahme. Unter: [http://www.leopoldina.org/uploads/tx\\_leopublication/2015\\_3Akad\\_Stellungnahme\\_Genome\\_Editing.pdf](http://www.leopoldina.org/uploads/tx_leopublication/2015_3Akad_Stellungnahme_Genome_Editing.pdf) [24.11.2017].
- Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina (2017): Ethische und rechtliche Beurteilung des genome editing in der Forschung an humanen Zellen. Diskussionspapier Nr. 10. Unter: [https://www.leopoldina.org/uploads/tx\\_leopublication/2017\\_Diskussionspapier\\_GenomeEditing.pdf](https://www.leopoldina.org/uploads/tx_leopublication/2017_Diskussionspapier_GenomeEditing.pdf) [25.07.2017].
- Deltcheva, E. et al. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. In: *Nature* 47: 602–607.
- Fehse, B./Domasch, S. (2015): Themenbereich somatische Gentherapie: Translationale und klinische Forschung. In: Müller-Röber, B. et al. (Hrsg.): *Dritter Gentechnologiebericht. Analyse einer Hochtechnologie*. Nomos Verlagsgesellschaft, Baden-Baden: 211–308.
- Fateh-Moghadam, B. (2011): Rechtliche Aspekte der somatischen Gentherapie. In: Domasch, S./Fehse, B. (Hrsg.): *Gentherapie in Deutschland. Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme*. Forum W – Wissenschaftlicher Verlag, Dornburg: 151–184.
- Fu, Y. et al. (2013): High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. In: *Nat Biotechnol* 31: 822–826.

- Fuchs, M. (2011): Forschungsethische Aspekte der Gentherapie. In: Domasch, S./ Fehse, B. (Hrsg.): *Gentherapie in Deutschland. Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme*. Forum W – Wissenschaftlicher Verlag, Dornburg: 184–208.
- Garneau, J. E. et al. (2010): The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. In: *Nature* 468: 67–71.
- Ishino, Y. et al. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. In: *J. Bacteriol.* 169: 5429–5433.
- Jinek, M. et al. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science* 337: 816–821.
- Jinek, M. et al. (2013): RNA-programmed genome editing in human cells. In: *eLife* 2: e00471.
- Karpinski, J. et al. (2016): Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. In: *Nat Biotechnol* 34: 401–409.
- Kim, Y. G. et al. (1996): Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 1156–1160.
- Kleinstiver, B. P. et al. (2016): High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. In: *Nature* 529: 490–495.
- Köchy, K. et al. (2014): *Gentherapie*. In: Lenk, C. et al. (Hrsg.): *Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen*. Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg: 427–431.
- Komor, A. C. et al. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. In: *Nature* 533: 420–424.
- Hotta A./Yamanaka S. (2015): From Genomics to Gene Therapy: Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. In: *Annual Review, Online-Publikation* 25.09.2015. DOI: 10.1146/annurev-genet-112414-054926.
- Lanphier, E. et al. (2015): Don't edit the human germline. In: *Nature* 519: 410.
- Lenk, C. (2011): *Gentransfer zwischen Therapie und Enhancement*. In: Domasch, S./Fehse, B. (Hrsg.): *Gentherapie in Deutschland. Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme*. Forum W – Wissenschaftlicher Verlag, Dornburg: 209–226.
- Liang, P. et al. (2015): CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. In: *Protein Cell* 6(5): 363–372.
- Mali, P. et al. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823–826.
- Manno, C. S. et al. (2006): Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. In: *Nat Med* 12: 342–347.
- Miller, J. et al. (1985): Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. In: *EMBO J.* 4: 1609–1614.
- Miller, J. C. et al. (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. In: *Nat Biotechnol* 29: 143–148.

- Miller, H. (2015): Germline therapy: we're ready. In: *Science* 348:1325.
- Mock, U. et al. (2015): mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. In: *Nucleic Acids Res* 43: 5560–5571.
- Mock, U. et al. (2016): Digital PCR to assess gene-editing frequencies mediated by designer nucleases. In: *Nat Protoc* 11: 598–615.
- Mojica, F. J. et al. (2000): Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. In: *Mol Microbiol* 36: 244–246.
- Moore, J. K./Haber, J. E. (1996): Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol Cell Biol* 16: 2164–2173.
- Moscou, M. J./Bogdanove, A. J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. In: *Science* 326: 1501.
- Orr-Weaver, T. L. et al. (1981): Yeast transformation: a model system for the study of recombination. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 6354–6358.
- Plessis, A. et al. (1992): Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. In: *Genetics* 130: 451–460.
- Poirot, L. et al. (2015): Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies. In: *Cancer Res.* 75: 3853–3864.
- Porteus, M. (2016a): Genome Editing: A New Approach to Human Therapeutics. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 56: 163–190.
- Porteus, M. (2016b): Vortrag im Rahmen der Konferenz: „Genome Editing for Gene and Cell Therapy“. Schloss Herrenhausen, Hannover 03.11.2016.
- Qasim, W. et al. (2015): First Clinical Application of TALEN Engineered Universal CAR19 T Cells in B-ALL. In: *Blood* 126: 2046.
- Reich, J. et al. (2015): Genomchirurgie beim Menschen. Zur verantwortlichen Bewertung einer neuen Technologie. Analyse der Interdisziplinären Arbeitsgruppe Gentechnologiebericht der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften. Unter: [www.gentechnologiebericht.de/publikationen/genomchirurgie-beim-menschen-2015](http://www.gentechnologiebericht.de/publikationen/genomchirurgie-beim-menschen-2015) [24.01.2017].
- Reyon, D. et al. (2012): FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. In: *Nat Biotechnol.* 30, 460–465.
- Rouet, P. et al. (1994): Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. In: *Mol. Cell. Biol.* 14: 8096–8106.
- Sanjana, N. E. et al. (2012): A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. In: *Nat Protoc* 7: 171–192.
- Sapranaukas, R. et al. (2011): The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. In: *Nucleic Acids Res.* 39, 9275–9282.
- Segal, D. J. et al. (1999): Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2758–2763.



- Smith, J. et al. (2006): A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. In: *Nucleic Acids Res.* 34: e149.
- Smithies, O. et al. (1985): Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. In: *Nature* 317: 230–234.
- Thakore, P. I. et al. (2016): Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. In: *Nat Methods.* 13: 127–137.
- Thiesen, H. J./Bach, C. (1991): Determination of DNA binding specificities of mutated zinc finger domains. In: *FEBS Lett.* 283: 23–26.
- Tsai, S. Q./Joung, J. K. (2016): Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. In: *Nat Rev Genet.* 17: 300–312.
- Wang, H. et al. (2013): One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. In: *Cell* 153: 910–918.
- Wu, H. et al. (1995): Building zinc fingers by selection: toward a therapeutic application. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 344–348.
- Wu, X. et al. (2014): Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. In: *Nat Biotechnol.* 32: 670–676.
- Zetsche, B. et al. (2017): Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. In: *Nat Biotechnol.* 35: 31–34.

