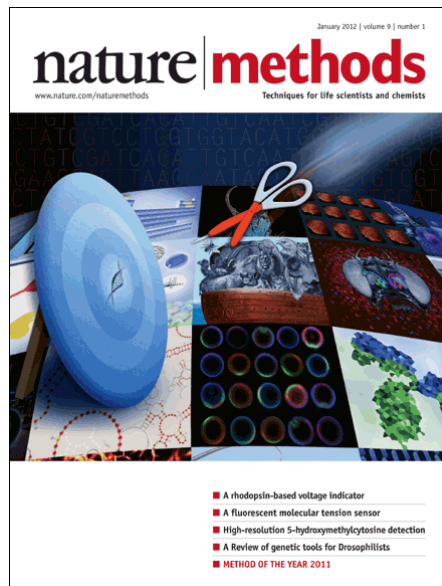


# Genome Editing beim Menschen

## Naturwissenschaftlich-medizinischer Sachstand



**Prof. Dr. Boris Fehse**

Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie  
Klinik für Stammzelltransplantation

### Method of the Year 2011

The ability to introduce targeted, tailored changes into the genomes of several species will make it feasible to ask more precise biological questions.

# Was bedeutet Genome Editing?

**Zielgerichtete Veränderung der Erbinformation *lebender* Organismen!**

Insertionen

Einfügen von Mutationen

Korrektur defekter Gene

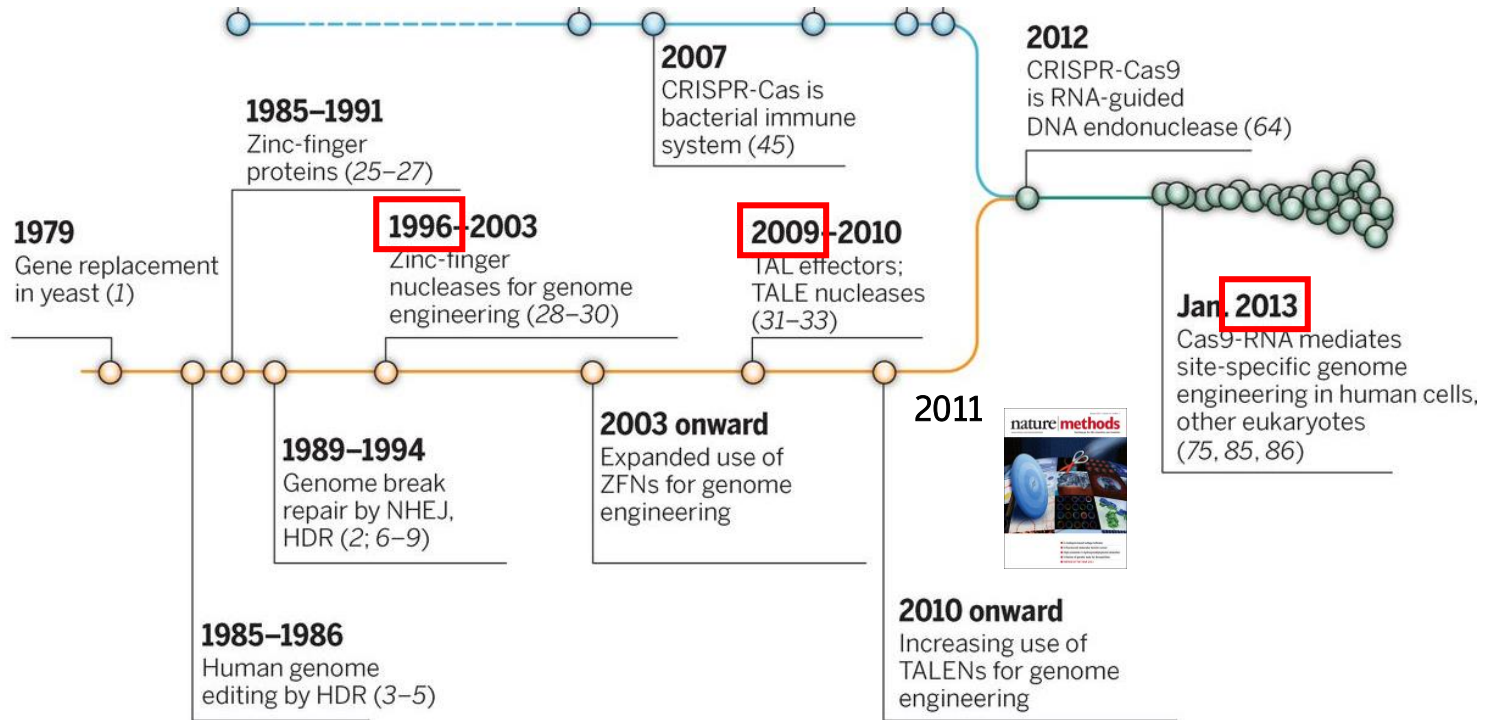
„Knock-out“

Deletionen (von z.B. Exons)

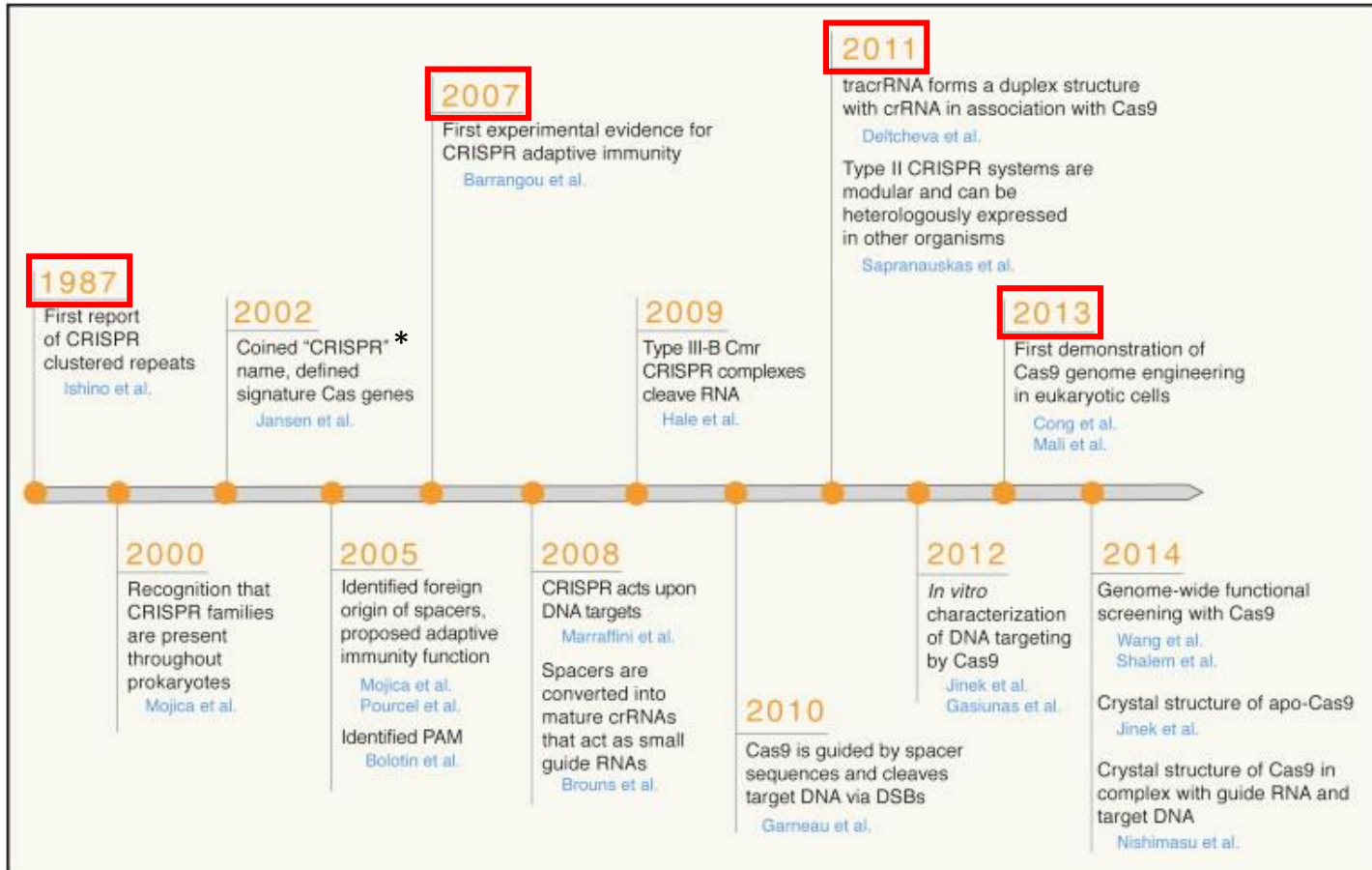
**Anwendungsgebiete:**



# Evolution der Designernukleasen / des GE



# Evolution des CRISPR-Cas Systems



\*Clustered regularly interspaced palindromic repeat

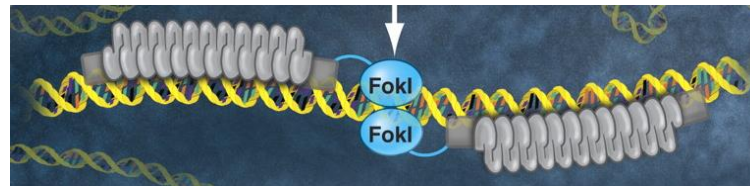
# Was braucht man für's GE?

Aller guten Dinge sind 3 (oder auch 4)

**Designernukleasen**

DNA-Bindedomäne

Effektordomäne



Reparaturmechanismen der Zelle

Donor-DNA / Matrix  
(Exakte Genomchirurgie bzw.  
Ersatz ganzer Abschnitte)

# Wie erreicht man die Spezifität?

... über die Zielsequenz!



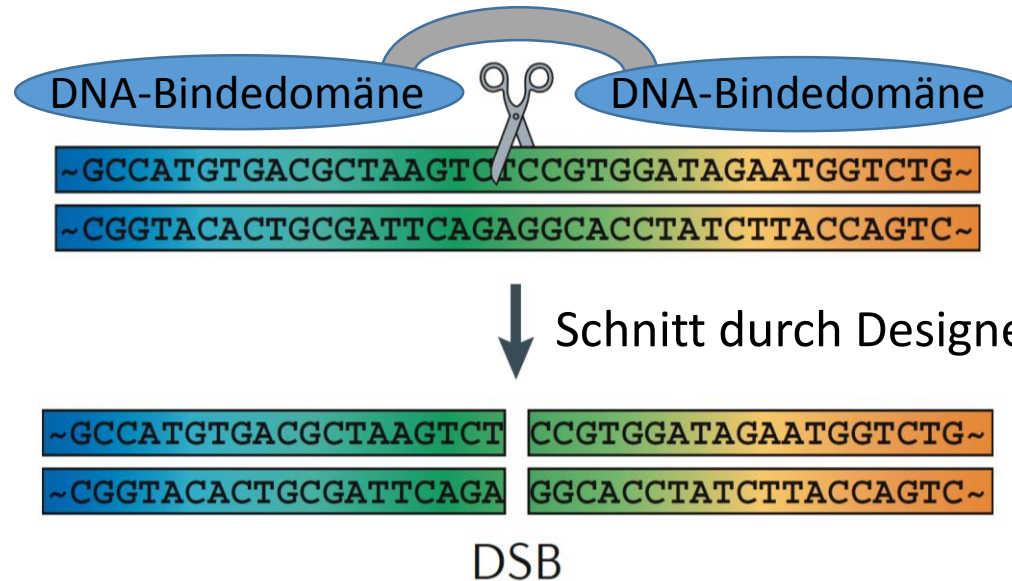
Humanes Genom: ca. 3 Milliarden ( $10^9$ ) Nukleotide

20 Nukleotide  $\rightarrow 4^{20} = > 1$  Billion ( $10^{12}$ ) Möglichkeiten

20er Sequenz: **theoretische** Chance auf Duplikation im Genom: 1:333

# Wie erreicht man die Spezifität?

... über die Zielsequenz!



Humanes Genom: ca. 3 Milliarden ( $10^9$ ) Nukleotide

20 Nukleotide  $\rightarrow 4^{20} = > 1$  Billion ( $10^{12}$ ) Möglichkeiten

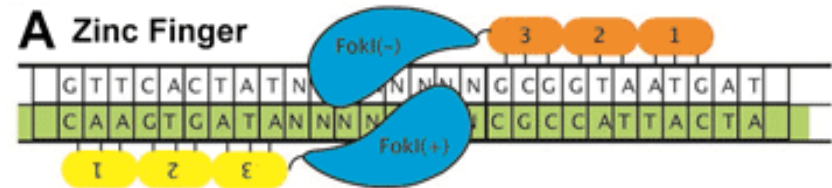
20er Sequenz: **theoretische** Chance auf Duplikation im Genom: 1:333



## Designernuklease = molekulare Schere (eher „molekulares Skalpell“)

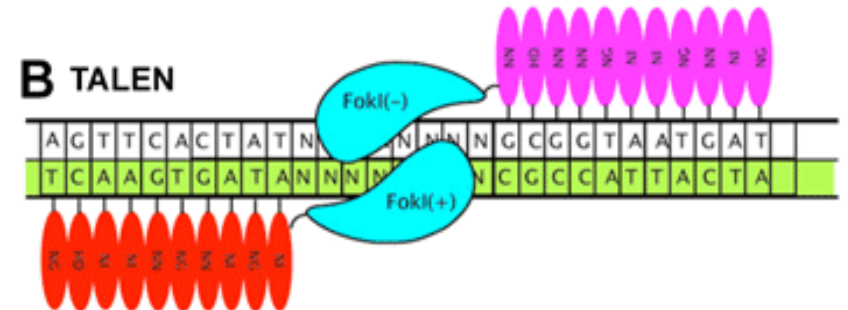
### “1. Generation”: Zinc-finger nucleases (ZFN)

- DNA-Bindung: Protein-basierend
- älteste, am besten charakterisiert
- rel. kurze Erkennungssequenz (2x12)
- **bereits in klinischen Studien**
- komplexes Design und Produktion



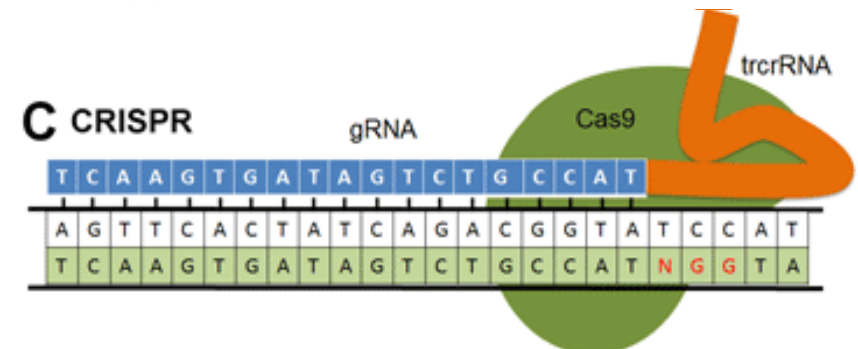
### “2. Generation”: TAL-effector nucleases (TALEN)

- DNA-Bindung: Protein-basierend
- Wenig *off-target* (lange Erkennungssequenz: 2x20)
- **Klinische Studien beginnen**
- Design und Produktion rel. einfach



### “3. Generation”: CRISPR/Cas9

- DNA-Bindung: RNA-basierend
- extrem einfache in Design/Produktion
- rel. kurze Erkennungssequenz (20) → initial hohe off-target-Aktivität
- Vermeidungsstrategien in Arbeit





# Designernukleasen im Überblick

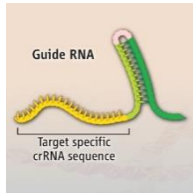
	Off-target	Produktion	Kosten (Euro)	Anwendbarkeit		Effektor- domänen
				Genom	Organismen	
<b>Zink-Finger</b>	Möglich  (abhängig von Target)	2-12 Monate  kein <i>Large scale</i> möglich	DIY: 480 – 740  Sangamo: 9 000- 18 000	Abhängig von erhältlichen Modulen	Bakterien Pflanzen <b>Säuger</b> Fische Insekten	Nukleasen Nickasen
<b>TAL - Effektoren</b>	Selten  (abhängig von Target)	1-12 Wochen  <i>Large scale</i> möglich!	DIY: 50 (-1000)  Collectis: 600-5000	Abhängig von <i>upstream T</i>	Bakterien <b>Pflanzen</b> Säuger Fische Insekten	Nukleasen Nickasen Aktivatoren Repressoren
<b>CRISPR/Cas</b>	z.T. häufig  (abhängig von Design)	3 Tage – 1 Woche  <i>Large scale</i> möglich	DIY: 10 (-200)	Abhängig von PAM	<b>Bakterien</b> Pflanzen Säuger Fische Insekten	Nukleasen Nickasen Aktivatoren Repressoren

Was ZFN und TALEN nicht können:

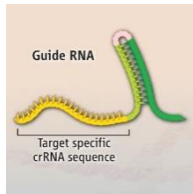
**Mehrere Mutationen auf einmal  
in derselben Zelle! (Cave!)**

## Multiplexing!

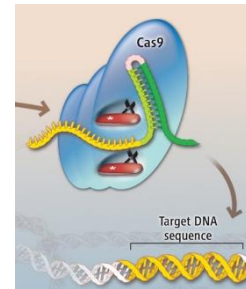
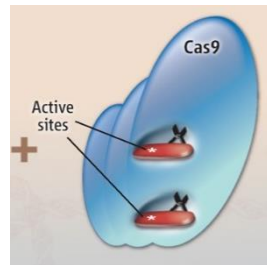
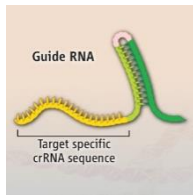
gRNA 1



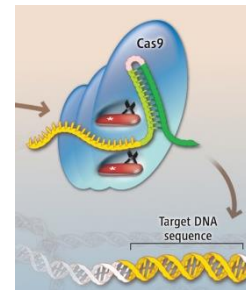
gRNA 2



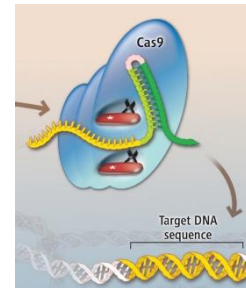
gRNA 3



**Knock-out Target 1**

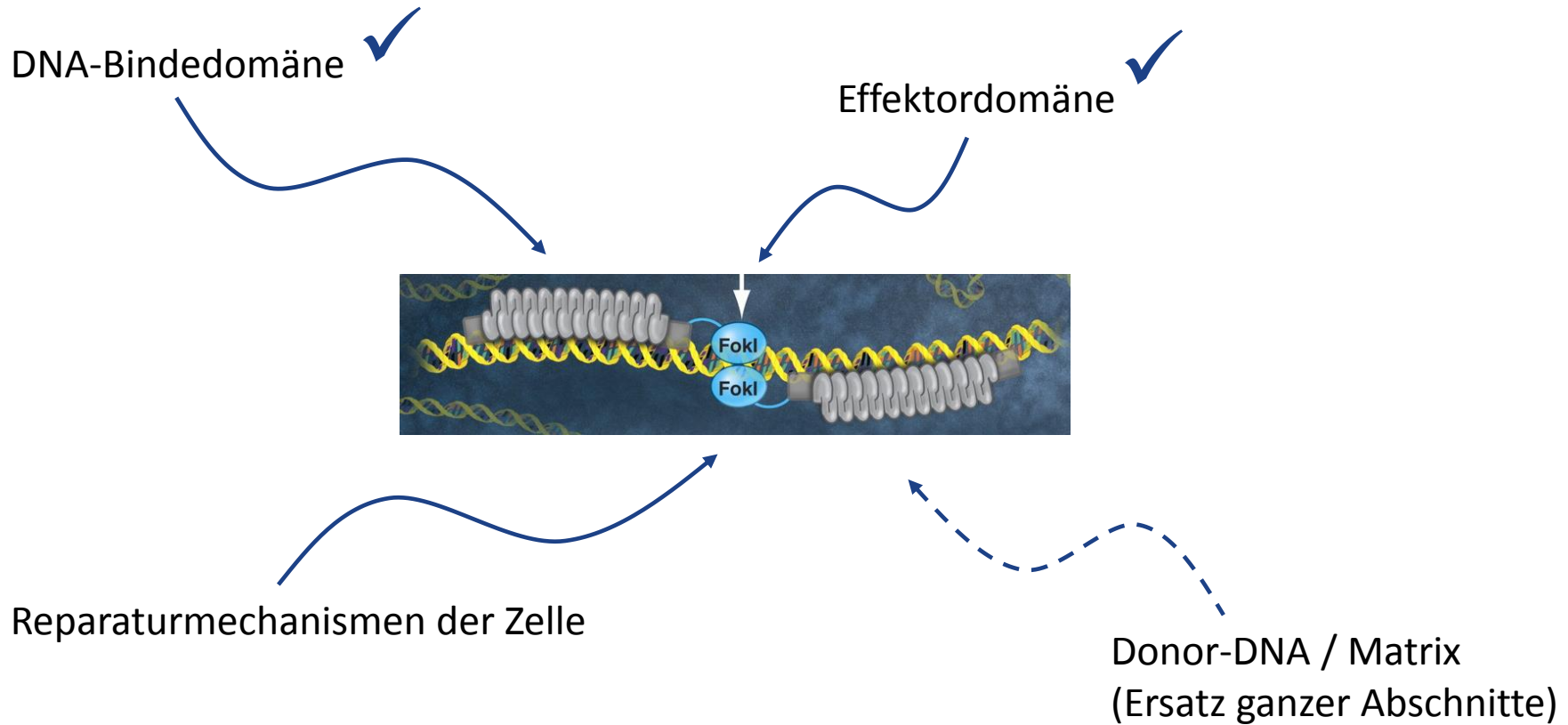


**Knock-out Target 2**

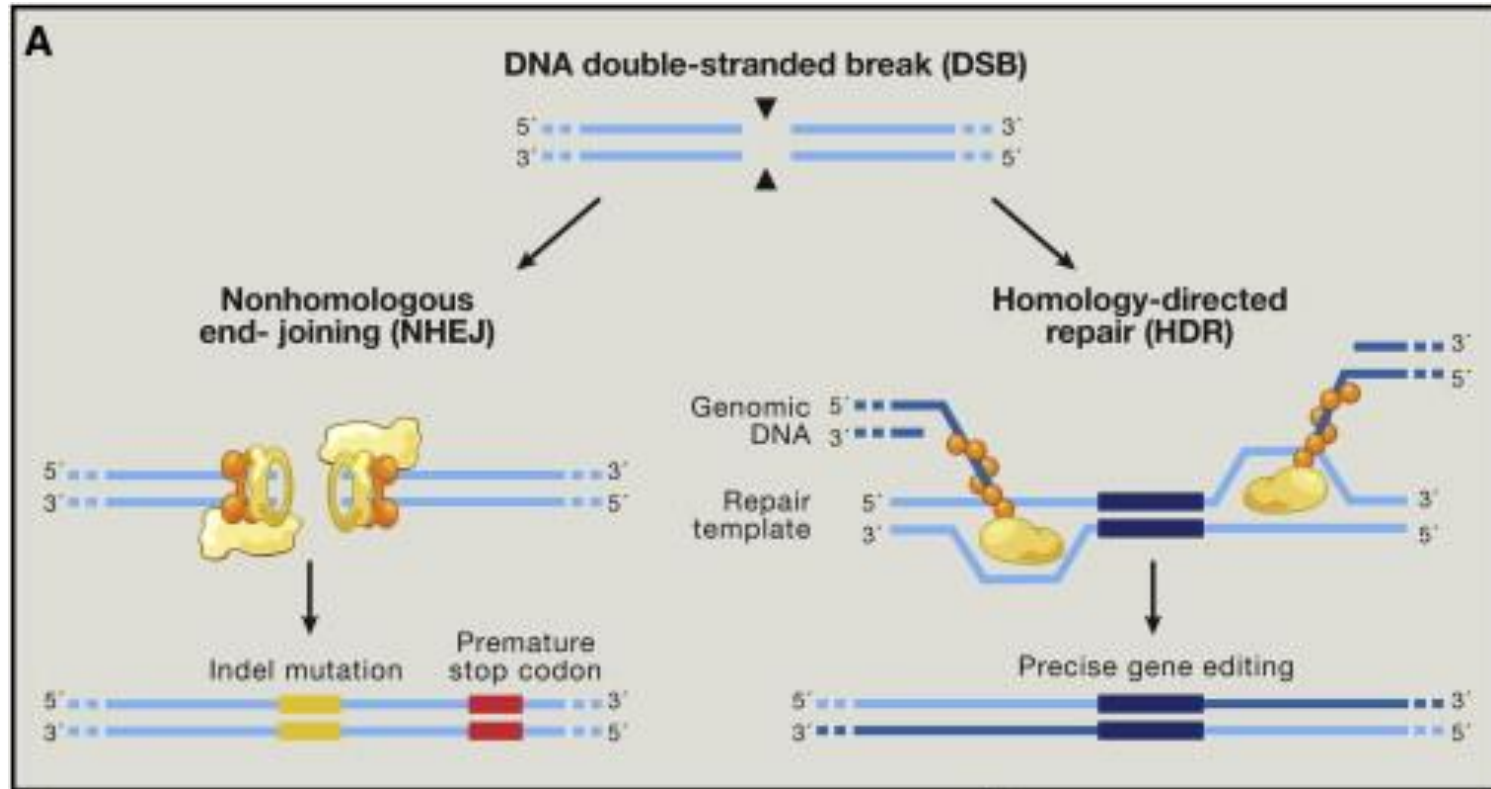


**Knock-out Target 3**

# Prinzip des Genome Engineering



# Wie funktioniert das Genome Editing?



“Gen-Knockout”

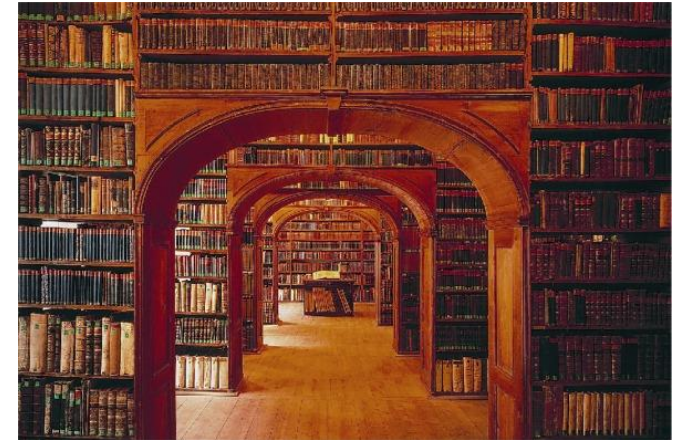
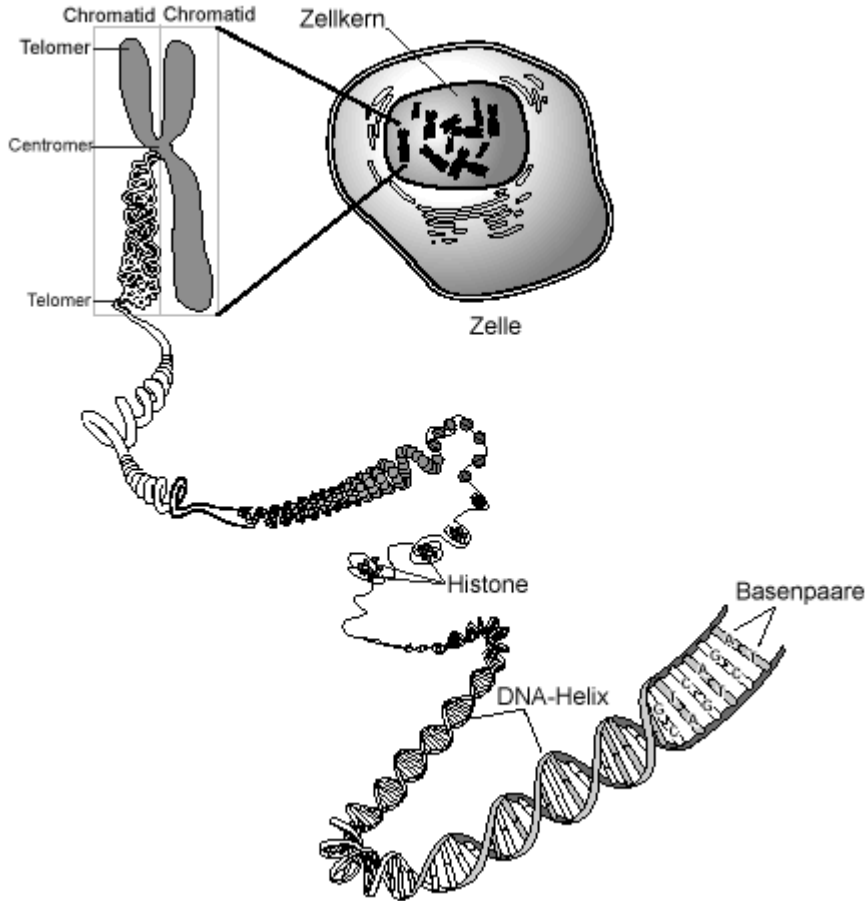
“Gen-Korrektur”



Erkrankungen durch  
*Fehler* der  
Erbinformation

Therapie durch  
*Korrektur* der  
Erbinformation

# Gendefekte als Druckfehler



„Ehebrecher-Bibel“ (1631)



Exodus 20,14



# I. Die drei (alten) Probleme der GT

---

1999  
Inder Verma  
Salk Institute

"There are only 3 problems in gene therapy...

DELIVERY

DELIVERY

DELIVERY"

---





- Effizient und einfach in der Anwendung
  - Zellspezifisch
  - Adequate Expression, ideal: regulierbar
  - Nicht toxisch, nicht immunogen
  - Große Verpackungskapazität
  - Leichte Produktion unter "GMP"
  - Biosicherheit
  - Kostengünstig
-

## Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



**Viele der heute klinisch  
verwendeten Vektoren sind für  
*in-vivo*-Anwendungen des  
Genome Editing eher ungeeignet**





ZFNs: konserviert, aber Fok1

TALEN: Ursprung – Pflanzenbakterien; dazu Fok1

CRISPR/Cas9: Ursprung – Bakterien (z.B. Streptokokken)

### ***In vivo***

- Postnatal: sehr wichtig, Einfluss von Expressionsdauer/-system
- Pränatal: wahrscheinlich irrelevant

### ***Ex vivo***

- Postnatal: Dauer der Antigenexpression (transient!) und wahrscheinlich Art der Zielzellen entscheidend
  - Pränatal: wahrscheinlich irrelevant
-



- Spezifität hängt von der Genauigkeit der Einzelbindungen sowie der Länge der Erkennungssequenz ab
  - *Cave!* Nicht alle Nukleotide in der Zielsequenz sind gleich wichtig für die Bindung der Designernukleasen
  - Viele Gene haben homologe “Verwandte” im Genom  
→ Potentielle *off-target* Bindestellen
  - Zudem beeinflussen Expressionshöhe und Dauer einer DN ihre *off-target* Aktivität
-



### III. *On-target* vs. *Off-target*

---

Wir postulieren eine gegebene *off-target* Frequenz von 1 in 1 Mio.  
(unabhängig vom Zelltyp)

Der Körper eines Erwachsenen besteht aus  $\sim 10^{14}$ , die Leber:  $>10^{12}$  Zellen

→ Genome Editing in ca. 1% der Hepatozyten ( $>10^{10}$  Zellen)

✓  $> 10^4$  *off-target* Ereignisse

→ **Hohe Anforderungen an Effizienz und Spezifität bei *in-vivo*-Gentherapie**

→ **Erste klinische Anwendungen an Blutzellen *ex vivo***

---



Wir postulieren eine gegebene *off-target* Frequenz von 1 in 1 Mio.  
(unabhängig vom Zelltyp)

Hat man es nur mit einer Zelle zu tun (Zygote)

→ Wahrscheinlichkeit eines *off-target*-Schnittes:  $10^{-6}$

**ABER:**

→ Risiko = Eintrittswahrscheinlichkeit \* Schadensschwere

→ bisher werden solche Spezifitäten bei weitem NICHT erreicht

→ *Off-target* Aktivität kann sich in verschiedenen Zellen unterscheiden

---

## *somatische* Gentherapie

= Korrektur in den **klinisch relevanten Körperzellen**

- technisch kompliziert
- evtl. zu spät
- Krankheit wird vererbt
- kausale Therapie
- ethisch unbedenklich

## *Keimbahn*-Gentherapie

= Korrektur in der **Keimbahn**

- eventuell „einfacher“
- Krankheit wird „eliminiert“  
(- reproduktives Klonen)
- ethisch sehr umstritten\*
- **in Deutschland verboten**

\* „Designer-Babys“,  
„Embryonenverbrauch“





## *somatisches* GE

= Korrektur in den **klinisch relevanten Körperzellen**

- technisch kompliziert
- evtl. zu spät
- Krankheit wird vererbt
- kausale Therapie
- ethisch unbedenklich

## *Keimbahn*-GE

= Korrektur in der **Keimbahn**

- technisch einfacher
  - evtl. sicherer
  - Krankheit wird eliminiert
  - kausal, keine Therapie
  - ethisch sehr umstritten
  - **in Deutschland verboten**
-



## Das Genome Editing

- ✓ stellt eine Revolution in der Grundlagen- wie auch angewandten Forschung in unterschiedlichen Gebieten (rote, weiße, grüne Gentechnik) dar
  - ✓ steht hinsichtlich der klinischen Anwendung vor ähnlichen Herausforderungen wie andere Gentherapieansätze, insbesondere in Bezug auf *in-vivo*-Anwendungen
  - ✓ *Ex-vivo*-Anwendungen, insbesondere an Stammzellen, könnten technisch am einfachsten und hinsichtlich Effizienz und Sicherheit am besten kontrollierbar sein
-

## China: Erste Hunde mit editiertem Genom

Technology  
Review

25.11.2015 15:02 Uhr – Antonio Regalado



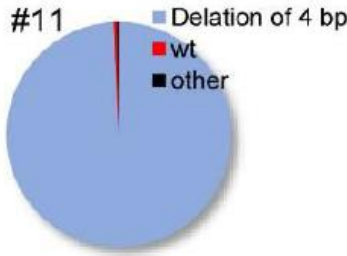
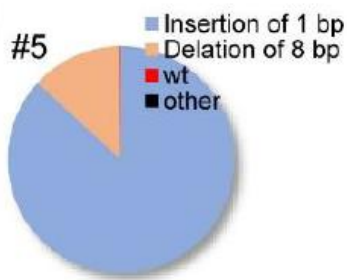
Mehr Muskelmasse: Chinesische Forscher haben das Genmaterial von Beagles verändert. (Bild: Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Diane Shelton, and Neuromuscular Disorders)

**Chinesische Wissenschaftler haben nach eigenen Angaben erstmals mithilfe der Gen-Editiermethode CRISPR-Cas9 die Gene von Hunden verändert.**

**A**



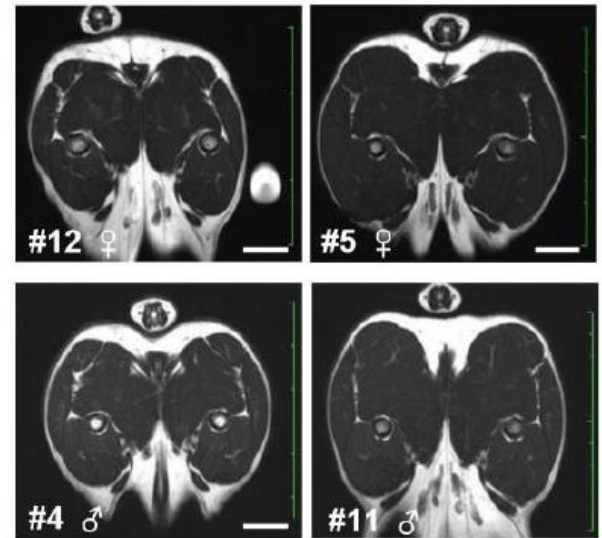
**C**



**D**



**E**



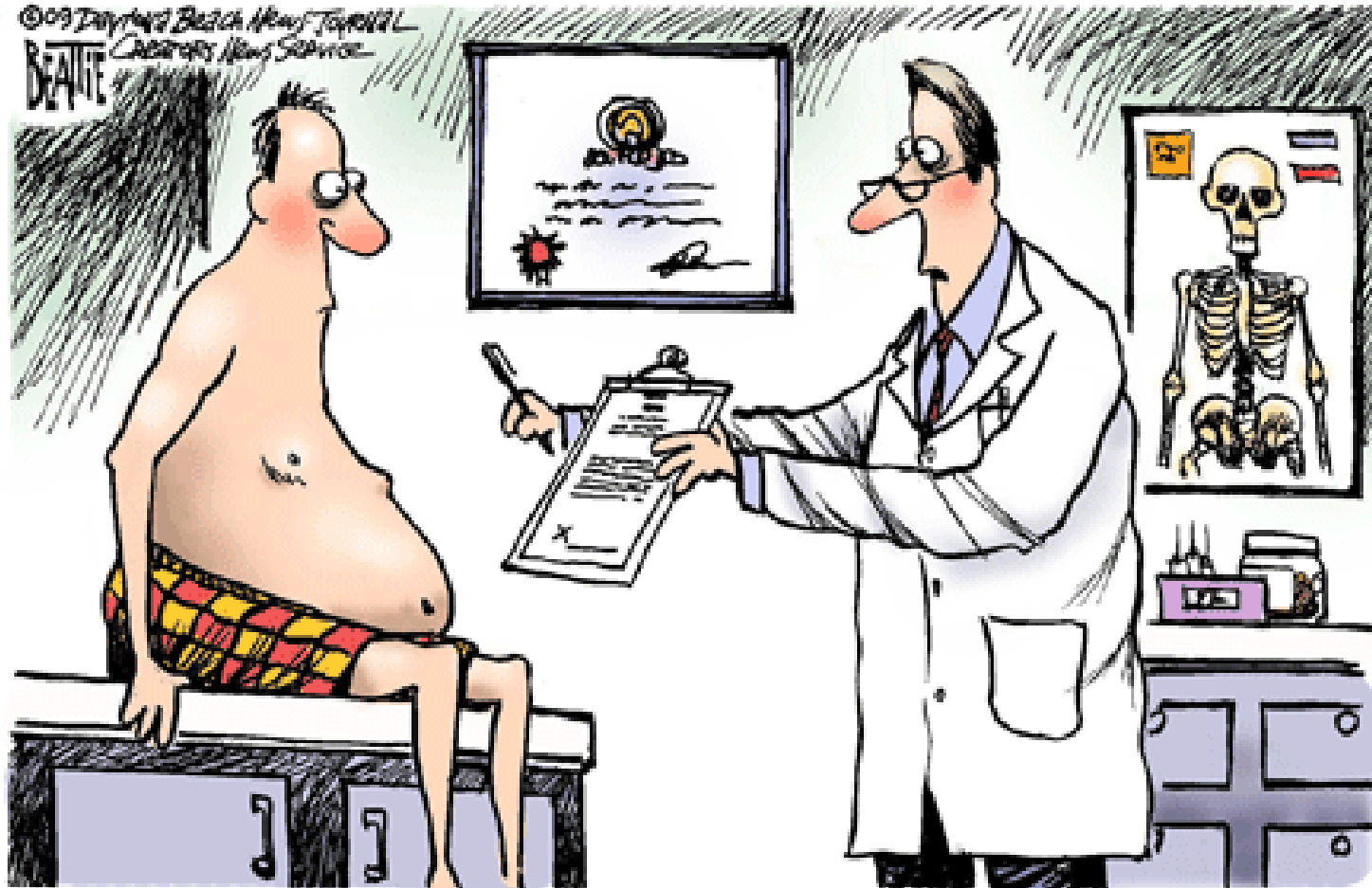
**D**

Types of transplantation	Embryo flushed	Embryo injected	Embryo transferred	Host mother	Pregnancy	Birth	Mutation	Biallelic mutation
Allo-transplantation	30	25	25	6	0	0	0	0
Auto-transplantation	48	35	35	10	8	27	2	2

### Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung:

- ✓ Nur **#5** biallelisch mutiert, **#11** nach Aussagen der Autoren “Chimäre”?!
- ✓ **#11** (“Herkules”): Nur 1 von 10 Spermien zeigte die Mutation!
- ✓ Kein *off-target*-Effekt beobachtet (molekulare Analysen?!).

→ Studie nicht sehr überzeugend, möglicher Machbarkeitsnachweis, jedoch mit sehr geringer Effizienz



**"The cure to your disease came from stem cell research. Sign here if you wish to refuse treatment for moral, religious or ideological reasons."**