

Elsner, Markus

**Research Report**

## Aktueller Stand der CRISPR-Technologie: Potenziale und Herausforderungen

Studien zum deutschen Innovationssystem, No. 11-2021

**Provided in Cooperation with:**

Expertenkommission Forschung und Innovation (EFI)

*Suggested Citation:* Elsner, Markus (2021) : Aktueller Stand der CRISPR-Technologie: Potenziale und Herausforderungen, Studien zum deutschen Innovationssystem, No. 11-2021, Expertenkommission Forschung und Innovation (EFI), Berlin

This Version is available at:

<https://hdl.handle.net/10419/231479>

**Standard-Nutzungsbedingungen:**

Die Dokumente auf EconStor dürfen zu eigenen wissenschaftlichen Zwecken und zum Privatgebrauch gespeichert und kopiert werden.

Sie dürfen die Dokumente nicht für öffentliche oder kommerzielle Zwecke vervielfältigen, öffentlich ausstellen, öffentlich zugänglich machen, vertreiben oder anderweitig nutzen.

Sofern die Verfasser die Dokumente unter Open-Content-Lizenzen (insbesondere CC-Lizenzen) zur Verfügung gestellt haben sollten, gelten abweichend von diesen Nutzungsbedingungen die in der dort genannten Lizenz gewährten Nutzungsrechte.

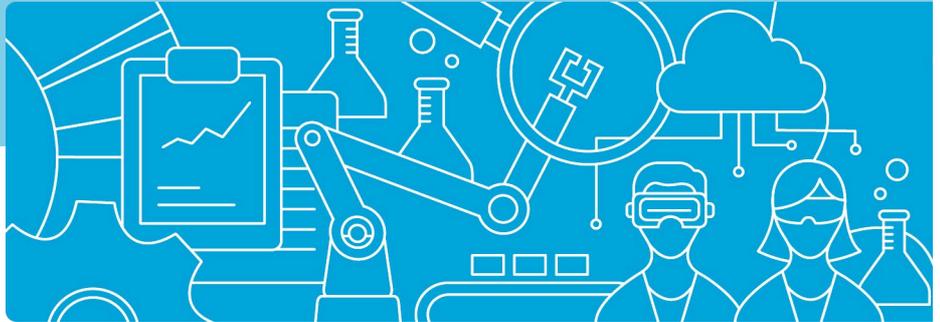
**Terms of use:**

*Documents in EconStor may be saved and copied for your personal and scholarly purposes.*

*You are not to copy documents for public or commercial purposes, to exhibit the documents publicly, to make them publicly available on the internet, or to distribute or otherwise use the documents in public.*

*If the documents have been made available under an Open Content Licence (especially Creative Commons Licences), you may exercise further usage rights as specified in the indicated licence.*

# Studie zum deutschen Innovationssystem | Nr. 11-2021



Markus Elsner

## Aktueller Stand der CRISPR- Technologie

Potenziale und Herausforderungen

Diese Studie wurde im Auftrag der Expertenkommission Forschung und Innovation (EFI) erstellt. Die Ergebnisse und Interpretationen liegen in der alleinigen Verantwortung der durchführenden Institute. Die EFI hat auf die Abfassung des Berichts keinen Einfluss genommen.

**Durchführende Person**

Dr. Markus Elsner  
Behlstraße 22 D, 65366 Geisenheim

**Studien zum deutschen Innovationssystem**

Nr. 11-2021  
ISSN 1613-4338

**Stand**

Februar 2021

**Herausgeberin**

Expertenkommission Forschung und Innovation (EFI)

**Geschäftsstelle**

Pariser Platz 6 | 10117 Berlin  
[www.e-fi.de](http://www.e-fi.de)

Alle Rechte vorbehalten, insbesondere das Recht auf Vervielfältigung und Verbreitung sowie die Übersetzung. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (durch Fotokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung der EFI oder der Institute reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme gespeichert, verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

**Kontakt und weitere Informationen**

Dr. Markus Elsner  
Behlstraße 22 D, 65366 Geisenheim  
T + 49 (0) 6722 750 63 51  
[markus.elsner@posteo.de](mailto:markus.elsner@posteo.de)

## Inhalt

Einleitung.....	4
Box 1 Molekularbiologische Grundlagen .....	4
Historische Entwicklung der Methoden zu gezielten Veränderung von Genen. ....	5
Box 2 DNA Reparatur und Genome-Editing .....	5
Praktische Anwendungen von nicht-CRISPR Methoden .....	8
Zusammenfassung.....	9
Die CRISPR Revolution.....	10
Woher kommt CRISPR? .....	10
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9 – eine prototypisches CRISPR Enzym.....	11
Natürliche Diversität von CRISPR Systemen.....	12
Technologische Weiterentwicklung natürlicher CRISPR Systeme.....	13
Verbesserte Spezifität .....	13
Erweiterte Spezifität.....	14
Erweiterte Fähigkeiten .....	14
Base-Editing.....	15
Prime-editing.....	16
Nicht-genomverändernde Anwendungen.....	17
Gene Aktivierung und Inhibition .....	17
RNA-editing .....	18
Ausblick: Neue Möglichkeiten am Horizont.....	19
Programmierbare Transposasen .....	19
Programmierbare Rekombinasen .....	20
Zusammenfassung.....	21
Anwendungen in der medizinischen Forschung .....	21
Identifikation neuer Therapieansätze .....	21
Modellsysteme für medizinische Forschung.....	23
Zusammenfassung.....	24
CRISPR in der Klinik.....	25
<i>Ex vivo</i> Therapien .....	26
<i>In vivo</i> Therapien .....	30
Diagnostik.....	34
Zusammenfassung.....	35
Drug Delivery.....	36

Viren .....	36
Nicht-virale Methoden .....	38
Zusammenfassung .....	40
Patienten- und Zell-spezifische Einflüsse .....	41
Homologe Reparatur in verschiedenen Zelltypen.....	41
Genetische Variabilität von Patienten.....	42
Immunreaktion gegen die CRISPR Proteine .....	43
Zusammenfassung.....	44
Schlussbemerkungen.....	45
Referenzen .....	47
Bildnachweis:.....	70

## Einleitung

Das Bestreben, die Erbinformation von Lebewesen zu verändern ist fast so alt wie die menschliche Zivilisation. Erste Belege für das gezielte Domestizieren von Pflanzen und Tieren durch die Auswahl von Individuen mit bevorzugten Eigenschaften liegen schon für die Zeit vor dem 9. vorchristliche Jahrtausend vor <sup>1-3</sup>. Bis in das späte 20. Jahrhundert konnten Genome nur durch klassische Züchtungsmethoden, wie die Auswahl zufälliger Veränderungen und die Kreuzung bestehender Arten, verändert werden und ihre Anwendung war auf Tiere und Pflanzen beschränkt. Erst mit der Entschlüsselung der molekularen Grundlagen der Vererbung wurde die Entwicklung gezielterer Methoden möglich. Die hohe Präzision und Effizienz, die diese Technologien erreicht haben, erlaubt nun auch Anwendungen in der Grundlagenforschung und in der Medizin.

Die derzeit fortschrittlichste Methode zur gezielten Veränderung genetischer Information, die CRISPR-Cas Technology, ist Gegenstand dieser Studie. Dieser Bericht beschreibt die Grundlagen und derzeitigen Möglichkeiten der Methode, ihre Limitationen und ihre mögliche Anwendung bei der Erforschung und Behandlung menschlicher Krankheiten.

### Box 1 Molekularbiologische Grundlagen

Das Verändern von Erbinformationen bedingt, dass die physikalische Struktur derjenigen Moleküle geändert werden muss, die diese Information tragen. Trotz aller Unterschiede ist allen Lebewesen auf der Erde eines gemeinsam: Ihre Erbinformation ist auf einem oder mehreren Strängen einer Desoxyribonukleinsäure (DNA) Doppelhelix gespeichert. Die Information ist in der Abfolge von vier Nukleinbasen codiert (Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T)), die an einem repetitiven Rückgrat aus Desoxyribose- und Phosphorsäure-Untereinheiten hängen. Jeweils A und T, sowie G und C können exklusiv aneinanderbinden, was dazu führt, dass eine Doppelhelix aus zwei komplementären Strängen gebildet wird. Beim Menschen ist die Erbinformation in 23 Chromosomenpaare aufgeteilt, von jedem Paar erhalten wir eine Kopie vom Vater und eine von der Mutter. Mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen beim Mann, ist die Erbinformationen somit grundsätzlich in jeder unserer Zellen (mit Ausnahme von Spermien und Eizellen) zweimal vorhanden. Die unterschiedliche Herkunft der Chromosomen führt zu kleinen, aber unter Umständen wichtigen, Unterschieden zwischen beiden Kopien.

Einzelne Abschnitte der DNA werden in Ribonukleinsäure (RNA) Moleküle kopiert (Transkription), die dann in der Regel in Proteine übersetzt werden (Translation), die für den Großteil der Funktionen in unserem Körper verantwortlich sind. Diese proteincodierenden Abschnitte nennt man Gene. Neben den Genen, gibt es noch viele weitere funktionstragende Sequenzen, die z. B. das Ablesen der Gene regulieren.

RNAs, die als Bauanleitung für Proteine dienen, nennt man Messenger RNA (mRNA). Jeweils drei Basen auf der RNA kodieren für eine von 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Codons). Während der Proteinsynthese wird die mRNA dann in Dreierschritten abgelesen und die Aminosäuren zu Proteinen zusammengefügt. Jede mRNA hat somit drei mögliche Leseraster, von denen im Allgemeinen nur eines das gewünschte Protein kodiert. Potenziell proteinkodierende Abschnitte nennt man „open reading frames“. Sie beginnen mit einem bestimmten Startcodon (ATG) und enden mit einem von mehreren Stopcodons.

## Historische Entwicklung der Methoden zu gezielter Veränderung von Genen.

Als im Jahre 1944 entdeckt wurde, dass die DNA die materielle Grundlage der Vererbung ist<sup>4</sup>, war an deren gezielte Veränderung noch nicht zu denken. Erst in den frühen 1970er Jahre gelang es Wissenschaftler\*innen erstmals, DNA-Sequenzen im Reagenzglas („*in vitro*“) gezielt zu verändern. Diese konnten dann zunächst in Viren und Bakterien<sup>5-8</sup> und später auch in höhere Organismen<sup>9-12</sup> eingeführt werden, um damit die Funktion von lebenden Organismen zu verändern.

Die klassische DNA Technologie ermöglichte zwar das Einführen zusätzlicher genetischer Information in verschiedene Organismen und fand auch schon bald praktische Anwendung (z.B. mit der Produktion von rekombinantem Insulin in Bakterien<sup>13</sup>), konnte aber nicht dazu benutzt werden, das vorhandene genetische Material gezielt zu verändern.

Das Verändern bestehender genetischer Information gelang in eukaryotischen Organismen (d.h. Organismen, deren Zellen einen Zellkern haben) zum ersten mal 1979 in Hefe mit Hilfe eines Prozess namens homologe Rekombination<sup>14</sup>. Bei der homologen Rekombination werden ähnliche Sequenzen zwischen zwei DNA Molekülen ausgetauscht. Sie dient im Organismus normalerweise dazu, Beschädigungen in einem DNA Molekül akkurat zu reparieren. Mechanismen zur Reparatur durch homologe Rekombination existieren in allen Domänen des Lebens, von Bakterien bis zu Säugetieren und Pflanzen.

Später wurden ähnliche Methoden auch dazu benutzt, um in Säugerzellen Gene auszuschalten oder zu verändern<sup>15,16</sup>, und aus embryonalen Stammzellen genveränderte Mäuse zu produzieren<sup>17,18</sup>. Die Fähigkeit das Genom von Mäusen (und anderen Tieren) zu verändern, erlaubt es unter anderem, Ursachen menschlicher Krankheiten in Tiermodellen zu erforschen und neue therapeutische Ansätze zu erproben.

Obwohl diese Methoden komplexe genetische Manipulationen erlauben, ist ihr großer Nachteil, dass sie sehr ineffizient (nur eine von einer Millionen Zellen enthält am Ende die gewünschte Veränderung<sup>19</sup>) und arbeitsintensiv sind. Zudem ist es oft notwendig neben der gewünschten Veränderung auch zusätzliches genetische Material in die Zellen einzubringen, um erfolgreich modifizierte Zellen isolieren zu können<sup>20</sup>.

Die Ära dessen, was wir heute „Genome-Editing“ nennen, begann Anfang der 1990er Jahre mit der Entdeckung, dass das Einfügen gezielter Brüche in die DNA von Säuger- oder Pflanzenzellen benutzt werden kann, um die Effizienz der Genomveränderung maßgeblich (um einen Faktor 1000 und mehr) zu steigern<sup>21,22</sup>. Hierbei macht man sich die zellulären Mechanismen zu Reparatur von Brüchen in der DNA zu Nutze, um Gene entweder auszuschalten, zu verändern oder neue DNA Sequenzen zielgenau einzufügen (Box 2).

### Box 2 DNA Reparatur und Genome-Editing

Die Grundlage der meisten Genome-Editing Methoden ist eine Kombination von natürlichen Reparaturmechanismen in der Zielzelle mit Enzymen, sogenannte Endonukleasen oder Genschere<sup>23</sup>, die gezielt Doppelstrangbrüche in die DNA einführen. Eukaryotische Zellen (Pflanzen, Tiere, Pilze) benutzen hauptsächlich zwei Mechanismen, um solche Doppelstrangbrüche zu reparieren: Non-homologous end-joining und homologen Rekombination. Genschere werden aus anderen Organismen in die Zielzelle übertragen, um dort spezifische Stellen in der DNA zu schneiden, die dann wiederum von den körpereigenen Mechanismen repariert werden (Abbildung 1).

Beim **Non-homologous end-joining (NHEJ)** werden die beiden Enden des DNA Stranges wieder verbunden. In den meisten Fällen wird die ursprünglich Sequenz bei der Reparatur wiederhergestellt. Da Doppelstrangbrüchen in jeder Körperzelle pro Tag ca. 10-50 mal auftreten<sup>24</sup> ist dieser Mechanismus

essentiell, um die genetische Information intakt zu halten. In Gegenwart einer Sequenz-spezifischen Genschere sorgt eine genaue Reparatur dafür, dass diese wieder und wieder geschnitten wird. Die Non-homologous end-joining Maschinerie ist nicht perfekt und so treten bei der Reparatur gelegentlich Fehler auf. Hierbei werden kurze DNA Abschnitte rund um den Schnitt gelöscht oder eingefügt. Diese modifizierten Sequenzen werden dann von der Genschere nicht mehr erkannt und das Genom ist permanent verändert. Ist die Anzahl der eingefügten Nukleotide kein Mehrfaches von drei wird bei proteinkodierenden Genen der Leserahmen (s. Box 1) und damit die gesamte Proteinsequenz ab der Stelle des Schnitts verändert. Schneidet man am Anfang einer proteinkodierenden DNA Sequenz wie in den meisten Fällen die Funktion des Gens somit ganz ausgeschaltet.

Schneiden zwei Genscheren im selben DNA Strang wird die dazwischenliegende Sequenz oft aus dem Genom entfernt bevor die beiden Enden des Chromosoms wieder mit einander verbunden werden<sup>25</sup>.

**Homologe Reparatur (homology directed repair, HDR)** nutzt gleiche oder sehr ähnliche Sequenzen in anderen Teilen der DNA als Vorlage zur Reparatur des beschädigten DNA Stranges. Natürlicherweise werden hierbei meist die homologen Sequenzen im Schwesterchromosom (also dem gleichen Chromosom, das aber vom anderen Elternteil stammt) oder, nach der DNA Verdopplung vor der Zellteilung, in der neuen Kopie des Genoms verwendet.

Experimentell kann man sich diesen Mechanismus zu Nutze machen, um beispielsweise präzise Sequenzen einzufügen, zu löschen oder auszutauschen. Hierbei bietet man der Zelle künstliche DNA Reparaturvorlagen an, die auf jeder Seite der zu verändernden Sequenz exakt die gleiche Sequenz wie der zu verändernde genomische Locus haben. Entscheidet sich die Zelle zur Reparatur durch homologe Rekombination werden die in hoher Konzentration verfügbaren künstlichen Konstrukte bevorzugt als Reparaturvorlage benutzt und somit die gewünschte Veränderung eingefügt.

Während homologe Reparatur für Wissenschaftler\*innen viele Vorzüge bietet, ist sie leider in den meisten Säuger und Pflanzenzellen nicht die bevorzugte Reparaturmethode und die meisten Doppelstrangbrüche werden über non-homologous end-joining repariert. Besonders in Zellen, die sich selten oder gar nicht mehr teilen, findet homologe Reparatur praktisch gar nicht mehr statt, weil die entsprechende Maschinerie nur während und kurz nach der DNA Verdopplung produziert wird.

Die ersten Enzyme, die man hierfür verwendete, waren sogenannte Meganukleasen (auch homing endonucleases genannt), die zunächst in Hefe entdeckt wurden<sup>21,22</sup>. Diese erkennen lange Sequenzen in der DNA und schneiden dann beide Stränge der DNA Doppelhelix. Obwohl Meganukleasen sehr nützlich waren, um die Prinzipien der Reparatur von DNA zu erforschen, ist ihre praktische Anwendung durch die Schwierigkeit, ihre Spezifität zu ändern, stark limitiert.

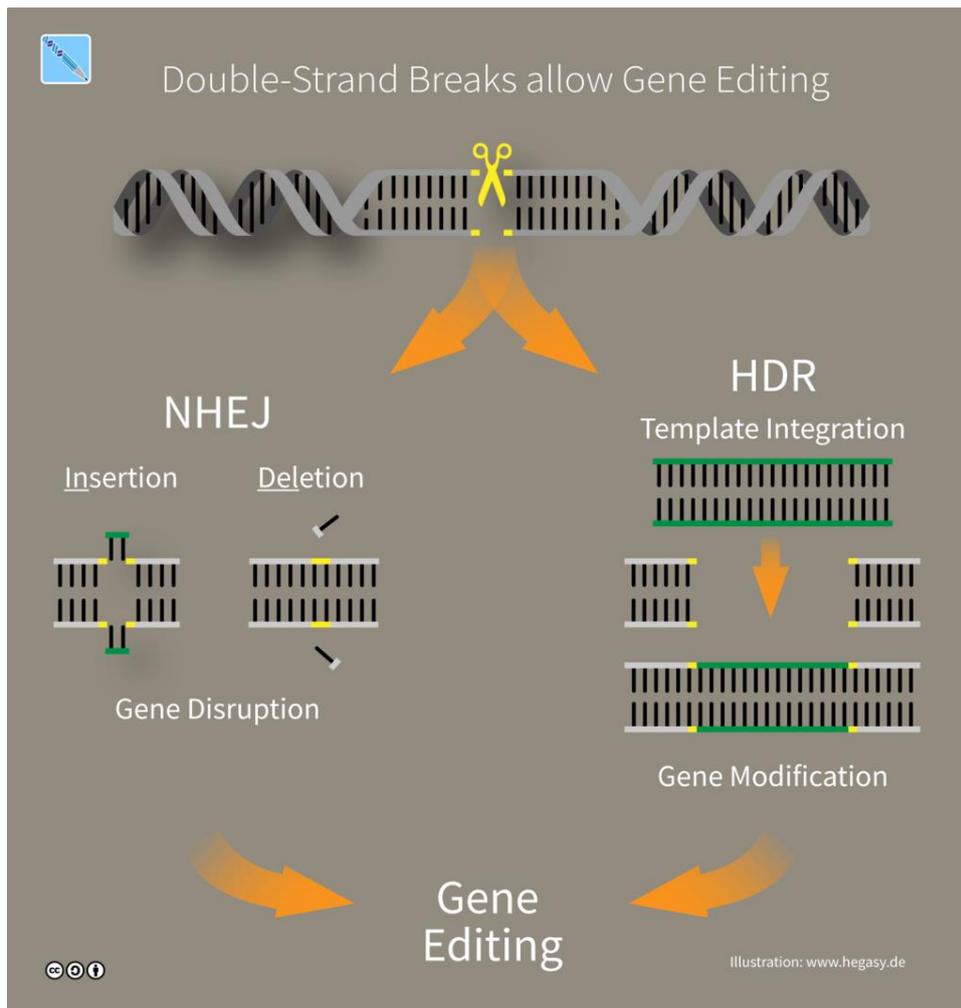


Abbildung 1: Prinzipien des Genome-Editing (Illustration: [www.hegasy.de](http://www.hegasy.de))

Deutlich mehr Flexibilität wurde durch den Einsatz von Zinkfingernukleasen erreicht, die Anfang der 2000er entwickelt wurden<sup>26-28</sup>. Zinkfingernukleasen (ZFNs) bestehen aus einem DNA-bindenden Teil, der aus natürlich vorkommenden Zinkfinger Transkriptionsfaktoren entwickelt wird, und einem DNA-schneidenden Teil, normalerweise einem bakteriellen Enzym namens FokI, das unspezifisch beide Stränge einer DNA schneidet (Endonuklease) (Abbildung 2A). FokI funktioniert nur als homodimer (d.h. zwei gleiche FokI Moleküle müssen aneinanderbinden), daher wird meist ein ZFN Paar gebraucht, das an benachbarte Sequenzen bindet, um eine bestimmte Sequenz zu schneiden.

Die DNA-bindende Domäne besteht aus mehreren Untereinheiten, die jeweils 3 DNA Basen erkennen, so dass ein ZFN mit 3 Untereinheiten, eine Sequenz aus 9 Basenpaaren erkennt (18 für ein Paar). Obwohl dieser modulare Aufbau das Design einer ZFN im Prinzip einfach macht, zeigte sich bald, dass die einzelnen Module ihre drei Basenpaare nicht unabhängig voneinander erkennen, was in der Praxis eine oft aufwendige Entwicklungsarbeit nötig macht, bevor ein ZFN Paar mit genügend hoher Effizienz und Spezifität zur Verfügung steht<sup>29,30</sup>.

Das erste komplett modulare System wurde etwa 10 Jahre später vorgestellt<sup>31-33</sup>. Die „Transcription activator-like effector nucleases“ (TALENs) sind nach einem ähnlichen Prinzip aufgebaut wie Zinkfingernukleasen. Auch sie bestehen aus einer Endonukleasedomäne und einer DNA-Bindedomäne

Domäne (Abbildung 2B). In diesem Fall ist ein Protein eines Pflanzenpathogens aus der *Xanthomonas* Familie für die Erkennung der DNA Sequenz zuständig. Die Bakterien injizieren sogenannte „Transcription activator-like effectors“ (TALEs) in Pflanzenzellen, um damit Gene der Pflanze anzuschalten, die den Krankheitsserregen bei der Infektion helfen<sup>34</sup>. Was TALEs für die Entwicklung von Werkzeugen zur Veränderung von Genomen besonders attraktiv macht, ist die Tatsache, dass es für ihre DNA Erkennung einen einfachen Code gibt. TALEs bestehen aus fast identischen Untereinheiten, die sich meist nur durch zwei Aminosäuren an Position 12 und 13 unterscheiden. Bestimmte Kombinationen aus Aminosäuren an diesen Positionen erkennen bestimmte Basen in der DNA. Da die Untereinheiten sich so gut wie nicht in ihren Bindeeigenschaften beeinflussen, kann man für jede beliebige DNA Sequenz nun einfach eine Abfolge von TALE Untereinheiten bestimmen und diese synthetisieren. Schnell wurden hierfür sehr effiziente Methoden entwickelt, die es unter anderem ermöglichten, eine Bibliothek von TALEN für jedes menschliche Gen zu produzieren<sup>35</sup>.

TALENs waren ein großer Schritt, um Genomveränderungen zu vereinfachen und für die meisten Labore zugänglich zu machen. Eine weite Verbreitung wurde allerdings durch die Entwicklung der noch einfacheren CRISPR Methode kurze Zeit später verhindert.

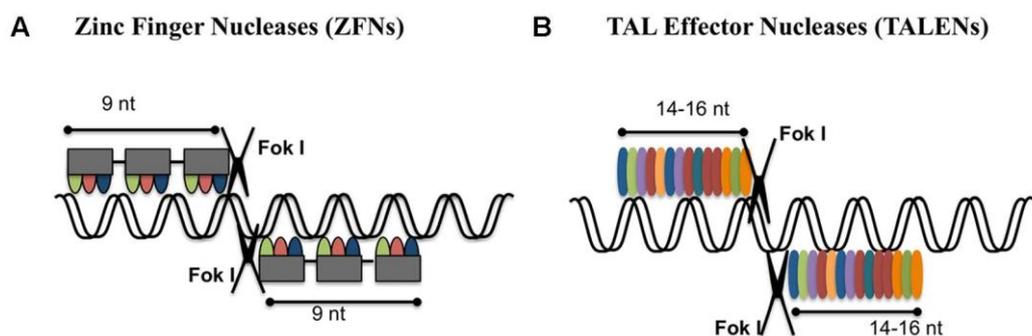


Abbildung 2: Zinkfinger-nukleasen (A) und „Transcription activator-like effector nucleases“ (B) (Illustration aus<sup>36</sup>)

## Praktische Anwendungen von nicht-CRISPR Methoden

Obwohl das Thema Genome-Editing einer weiteren Öffentlichkeit erst mit der Entwicklung der CRISPR Methoden bekannt wurde, wurden und werden ZFNs und TALENs für verschiedene praktische Anwendungen, auch am Menschen, eingesetzt.

Am weitesten fortgeschritten ist die klinische Entwicklung bei den ZFNs, in vielen Fällen vorangetrieben von der 1995 gegründeten kalifornischen Firma *Sangamo Therapeutics*. Seit den ersten mühsamen Versuchen ZFNs für bestimmte Sequenzen zu entwickeln, hat *Sangamo* nach eigenen Angaben große Fortschritte gemacht, allerdings sind diese Technologien firmeneigen und nicht öffentlich bekannt<sup>37</sup>.

Die erste klinische Studie begann 2009 an HIV Patienten, bei denen *ex vivo* (d.h. außerhalb des Körpers) T-Zellen des Immunsystems modifiziert wurden, um die Expression eines Moleküls zu verhindern, das essenziell für den Zelleintritt von HIV ist<sup>38,39</sup>. Inzwischen sind mindestens 15 klinische Studien zur

therapeutischen Anwendung von ZFNs in verschiedenen Krankheiten im Menschen entweder abgeschlossen, oder laufen zurzeit noch<sup>40</sup>. Bis auf eine Studie in China sind diese Studien alle in den USA beheimatet.

Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte des Genome-Editing wurde auch mit ZFNs erreicht. 2017 wurde das erste Mal das Genom von Patienten direkt im Körper verändert (*in vivo*). In diesem Fall litten die Patienten unter einer seltenen genetischen Krankheit namens Hurler Syndrom, bei der ein bestimmtes metabolisches Enzym defekt ist. Im Zuge dieser Studie wurde mittels homologer Rekombination (s. Box 2) eine funktionierende Kopie des Gens an einer bestimmten Stelle im Genom von Zellen der besonders betroffenen Leber eingefügt<sup>41,42</sup>. In dieser ersten therapeutischen Anwendung war die Effizienz des Einfügens nicht hoch genug, um nennenswerte therapeutische Effekte zu erzeugen, es wurden allerdings bisher auch keine besorgniserregenden Nebenwirkungen beobachtet<sup>43,44</sup>.

Auch TALENs werden nach wie vor für klinische Anwendungen getestet. Führend ist hier die französische Firma *Collectis*, die an mehreren laufenden klinischen Studien beteiligt ist, bei denen T-Zellen des Immunsystems zur Krebstherapie (s. unten) benutzt werden<sup>45-48</sup>. Aus China sind auch *in vivo* (d.h. direkt im lebenden Tier oder Menschen) Anwendungen von TALEN in Patientinnen zur Behandlung von Vorstufen von Gebärmutterkrebs bekannt, über den derzeitigen Staus dieser klinischen Studien gibt es allerdings keine öffentlichen Informationen<sup>49-51</sup>.

Auch Meganukleasen, die Werkzeuge mit denen die Prinzipien des Genome-Editing entdeckt wurden, werden bis heute zum Verändern von Genomen verwendet. Fortschritte in den Verfahren zum Design von spezifischen Meganukleasen erlauben es mittlerweile, ein neues Enzym in ungefähr 100 Tagen zu kreieren<sup>37</sup>, was für die klinische Anwendung ein realistischer Zeitrahmen ist. *Precision Biosciences* in den USA betreibt z.B. drei klinische Studien bei denen mit Meganukleasen veränderte T-Zellen verwendet werden<sup>52-54</sup> und klinische Studien *in vivo* sind in Vorbereitung<sup>55</sup>.

Obwohl sich vor-CRISPR Werkzeuge durchaus gut für klinische Anwendungen eignen, hat das Forschungsfeld mit der Entdeckung von CRISPR Enzymen eine ungleich größere Dynamik entwickelt.

## Zusammenfassung

- Methoden zur genetischen Veränderung lebender Organismen werden seit den 1970er Jahren entwickelt
- Obwohl erste Methoden auch komplexe Veränderungen in höheren Organismen wie Mäusen erlaubten waren sie ineffizient und arbeitsintensiv.
- Mit der Entdeckung von Enzymen, die DNA an sehr spezifischen Stellen schneiden konnten, wurde die Effizienz der Erzeugung von Genomveränderung um eine Faktor 1000 oder mehr gesteigert
- Mit der Entwicklung von Zinkfinger-nukleasen (ZFNs) und „Transcription activator-like effector nucleases“ (TALENs) wurde es möglich, fast jede Stelle im Genom zu schneiden und gezielt zu verändern
- TALENs und ZFNs ermöglichten erste klinische Anwendungen von Genome-Editing und werden nach wie vor in klinischen Studien eingesetzt

## Die CRISPR Revolution

Kaum jemals hat eine Methode die Biologie und Medizin so im Sturm erobert wie die CRISPR Technologie. Der Erfolg erklärt sich aus der großen Einfachheit mit der nun innerhalb weniger Tage Werkzeuge entwickelt werden können, mit denen sich beliebige Gene ausschalten, anschalten oder verändern lassen. Hinzu kommt, dass eine große Gemeinschaft von Forscher\*innen die Fähigkeiten dieser Technologie Stück für Stück erweitert hat.

### Woher kommt CRISPR?

Das CRISPR-Cas System wurde nicht entdeckt, weil Wissenschaftler\*innen nach besseren Werkzeugen zur Veränderung von Genomen gesucht haben. Im Gegenteil, es ist ein Produkt ungerichteter Grundlagenforschung.

Die genomischen Regionen, die CRISPR ihren Namen geben, wurden das erste Mal 1987 beschrieben. Forscher\*innen in Japan fiel auf, dass es im Genom des Darmbakteriums *E. coli* Abschnitte gibt, in denen sich wiederholende Sequenzen von 29 Basen von variablen Regionen mit jeweils 32 Basen unterbrochen werden<sup>56</sup>. Später wurden ähnliche Sequenzen auch in 45% aller Bakterien und in 87% aller Archaeen entdeckt<sup>57</sup>. Bald bürgerte sich für diese Regionen der Name Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ (übersetzt etwa gebündelt, regelmäßig angeordnete, kurze, palindromische Wiederholungen) ein.

Heute weiß man, dass diese CRISPR Loci Teil eines adaptiven bakteriellen Immunsystems sind, mit dem sich Bakterien gegen Viren (Bakteriophagen) verteidigen. Wenn ein Bakterium eine Infektion durch einen Bakteriophagen überlebt, baut es Teile des viralen Genoms in seine eigene DNA ein. Diese Kopien des viralen Genoms werden zusammen mit den flankierenden konstanten Regionen wieder in eine RNA übersetzt. Mit diesen sogenannten crispr RNAs (crRNAs) können nun sogenannte CRISPR-assoziierte Proteine (CAS-Proteine) programmiert werden, eindringende Bakteriophagen DNA zu erkennen, sie zu schneiden und damit unschädlich zu machen.

Unter der Vielzahl unterschiedlicher CRISPR Systeme, die man in der Natur findet, sind besonders die sogenannten Typ II Systeme für praktische Anwendungen interessant. Viele CRISPR Systeme benötigen eine Vielzahl von Proteinen, um ihre Ziel-DNA zu erkennen und zu schneiden. Im Gegensatz hierzu, benötigen Typ II Systeme nur ein Protein (Cas9) und zwei RNAs (die crRNA und eine konservierte tracrRNA). Heute verwendet man sogar nur noch eine „single guide RNA“ (sgRNA) genannte Fusion aus beiden. Die entscheidenden letzten Schritte, die CRISPR-Cas9 zu dem erfolgreichsten Genome-Editing Werkzeug machten, wurden um den Jahreswechsel 2012/2013 entwickelt. Zuerst zeigten Gruppen um Jennifer Doudna (UC Berkeley, USA) und Emmanuelle Charpentier (heute Max-Planck-Forschungsstelle für die Wissenschaft der Pathogene, Berlin) und um Virginijus Siksnys (Universität Vilnius, Litauen), dass ein Cas9 Enzym aus *Streptococcus pyogenes* Bakterien im Reagenzglas mit einer entsprechenden crRNA programmiert werden kann, um eine beliebige DNA Sequenz zu schneiden, ohne dass weitere Faktoren nötig sind<sup>58,59</sup>. Nur wenig später zeigte ein Reihe von Forscher\*innen fast

gleichzeitig, dass man mit Cas9 und einer entsprechenden guideRNA, auch in tierischen Zellen DNA schneiden und damit Genome editieren kann<sup>60-64</sup>.

Durch die große Einfachheit mit der die kurzen sgRNA zu synthetisiert werden können, war nun schnell jedes molekularbiologische Labor in der Lage, gezielt Gene auszuschalten und zu verändern.

Um ein Gen verändern zu können ist jetzt nicht mehr nötig, als eine kurze sgRNA zu synthetisieren und zusammen mit Cas9 in Zellen einzubringen, was schnell und einfach in jedem molekularbiologischen Labor möglich ist. Schnell zeigte sich, dass Cas9 in Zellen von fast jedem Organismus funktioniert<sup>23</sup> und auch in Mausmodellen von Krankheiten eingesetzt werden kann<sup>65</sup>. Damit begann eine breite Anwendung von CRISPR, die bislang für die allermeisten Forschenden unmöglichen Experimente und Anwendungen, zu einer Routineaufgabe machte.

### *Streptococcus pyogenes* Cas9 – eine prototypisches CRISPR Enzym

Das mit Abstand am häufigsten benutzte Cas9 Protein stammt aus dem Scharlach Erreger *Streptococcus pyogenes* (spCas9) (Abbildung 3). Es ist mit 1368 Aminosäuren ein relativ großes Protein. Wie bei allen Cas9s müssen zwei separate Erkennungsereignisse stattfinden, bevor spCas9 die DNA schneiden kann. Zum einen muss das Cas9 Protein selbst an eine bestimmte „protospacer-adjacent motif“ (PAM) genannte Sequenz binden. Zum anderen muss die sgRNA Basenpaare mit einer komplementären DNA Sequenz direkt nachfolgend der PAM Sequenz bilden. Das Vorhandensein der PAM Sequenz ist unbedingt notwendig. In der Natur ist es eine Sicherheitsvorkehrung, damit Cas9 nicht die eigene DNA des Bakteriums schneidet, für den Einsatz als Genome-Editing Werkzeug ist diese Anforderung in der Praxis eher hinderlich (s. unten).

spCas9 erkennt ein GG Dinukleotid als PAM gefolgt von einer 20 Basen langen Erkennungssequenz (spacer genannt) in der sgRNA. Um die Erkennung der DNA Sequenz durch die sgRNA zu ermöglichen, trennt Cas9 die beiden DNA Stränge, eine Eigenschaft die CRISPR Enzyme grundsätzlich von anderen DNA Scheren unterscheidet und wichtig Weiterentwicklungen der Technologie ermöglicht (s. unten). Das Schneiden der beiden DNA Stränge nach erfolgreicher Erkennung erfolgt durch zwei unterschiedliche Teile des Enzymes. Durch gezieltes Einfügen von Mutationen können diese beiden aktiven Stellen entweder einzeln oder zusammen inaktiviert werden. Im ersten Fall wird nur ein DNA Strang geschnitten, im letzteren Fall kann Cas9 (nun dead Cas9 (dCa9) genannt) die DNA noch binden, aber nicht mehr schneiden. Auch diese Eigenschaften sind für die weitere technologische Entwicklung wichtig (s. unten).

Die Voraussetzung, dass die PAM Sequenz direkt an die spacer Sequenz angrenzen muss, limitiert die Anzahl der Stellen, an der ein Genom geschnitten werden kann. Bei spCas9 mit seiner GG PAM ist das statistisch etwa an jeder 8. Stelle im Genom<sup>66</sup>, allerdings sind GG Dinukleotide nicht streng zufällig verteilt, so dass in der Praxis eine fehlende PAM Sequenz in der Nähe der Änderung, die man einfügen möchte, häufig limitierend ist.

Ein weiteres potentiell Problem, das schnell erkannt wurde ist, dass Cas9, wie andere Nukleasen auch, nicht immer nur an der Stelle schneidet an der es schneiden soll<sup>67-69</sup>. Methoden um diese

sogenannten off-targets zu finden und Cas9 spezifischer zu machen sind seitdem Gegenstand intensiver Forschung und werden weiter unten besprochen.

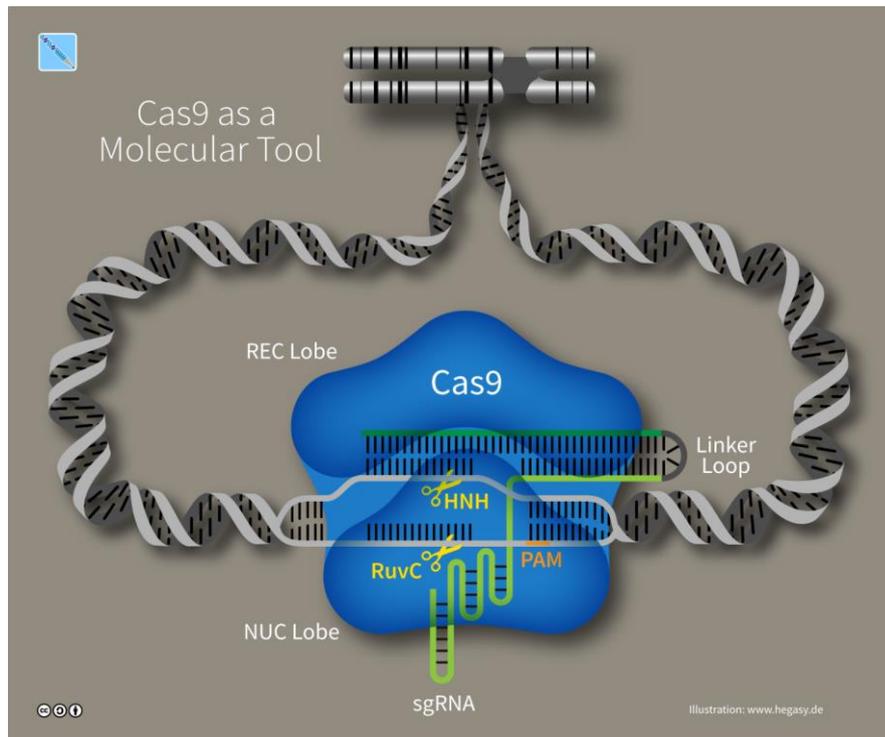


Abbildung 3: CRISPR-Cas9 (Illustration: [www.hegasy.de](http://www.hegasy.de))

## Natürliche Diversität von CRISPR Systemen

Neben spCas9 finden sich in der Natur noch viele weitere nützliche Werkzeuge. So sind mittlerweile viele weitere Cas9s anderer Organismen charakterisiert worden. Manche bieten Vorteile durch ihre geringere Größe oder durch ihre Fähigkeit andere PAMs zu erkennen.

In der Praxis finden die meisten dieser Enzyme jedoch selten Gebrauch, da ihre PAMs noch seltener sind als die von spCas9, oder sie weniger spezifisch oder aktiv sind. Zwei wichtige Ausnahmen sind *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) und Cas12a Enzyme aus verschiedenen Organismen.

SaCas9 ist fast ein Drittel kleiner als spCas9 und dadurch deutlich einfacher in Zellen einzubringen. Das Enzym verfügt über eine relativ hohe Aktivität und Spezifität und hat eine PAM, die relativ häufig in Genomen zu finden ist (ca. 1 mal in 32 Basenpaare)<sup>70,71</sup>.

Cas12a gehört zu einer anderen Familie von CRISPR Systemen (Type V). Cas12 unterscheidet sich von Cas9 in verschiedenen biochemischen Details. Die wichtigsten hiervon sind die PAM Sequenzen, die einen Teil des Sequenzspektrums abdecken, der von Cas9 Varianten nicht abgedeckt wird, und die Fähigkeit multiple sgRNAs selbst aus einem langen Vorläufermolekül herauszuschneiden, was wichtig ist, wenn man effizient mehrere Gene in derselben Zelle editieren will<sup>72,73</sup>.

Eine Schwierigkeit mit allen bisherigen CRISPR-Enzymen wurde potenziell mit der Entdeckung von CasΦ gelöst<sup>74</sup>. Die gängigen CRISPR Enzyme sind sehr groß, was zu Problemen führt, wenn man sie in

Zellen einführen will (s. unten). Mitte 2020 wurde die Entdeckung eines Enzyms namens CasΦ verkündet, das nur etwa halb so groß ist wie bisher bekannte CRISPR-Cas Enzyme, aber trotzdem in der Lage ist, das menschliche Genom in Zellkultur effektiv zu verändern. Eine umfangreiche Charakterisierung des Enzyms steht noch aus, aber eine kurze PAM Sequenz (d.h. viele Stellen im Genom sind editierbar) und eine Effizienz, die mit Cas9 vergleichbar zu sein scheint, lassen hoffen, dass CasΦ viele Anwendungen finden wird.

Weitere CRISPR System könne für andere Anwendungen als das Editieren von DNA eingesetzt werden und werden weiter unten besprochen.

Die Suche nach neuen natürlichen Systemen mit besseren oder neuen Eigenschaften ist bei weitem nicht abgeschlossen und mag in Zukunft noch neue Überraschungen bieten<sup>75</sup>.

## Technologische Weiterentwicklung natürlicher CRISPR Systeme

Während spCas9 und andere natürliche CRISPR Enzyme einen Boom in der Anwendung von Genome-Editing auslösten, machten sich andere Forscher\*innen sofort daran, die aus der Natur bekannten Proteine zu verbessern. Hierbei standen zunächst eine Verbesserung der Spezifität und eine Ausweitung der möglichen Zielsequenzen im Vordergrund, während später Systeme mit gänzlich neuen Eigenschaften geschaffen wurden.

### Verbesserte Spezifität

Speziell für klinische Anwendungen könnten Schnitte in der DNA an anderen Orten, als den beabsichtigten, schweren Folgen haben, wenn z.B. Gene inaktiviert würden, die vor Tumoren schützen. Diese Off-Target-Schnitte sind nicht zufällig sondern geschehen an Stellen des Genoms mit ähnlichen aber nicht identischen Sequenzen, manchmal mit ähnlich hoher Effizienz wie am eigentlichen Ziellokus<sup>67-69</sup>.

Frühe Versuche die Spezifität zu steigern waren Cas9 Varianten die DNA nur schneiden konnten wenn zwei Cas9 Moleküle gleichzeitig an benachbarte Sequenzen binden<sup>67,76</sup> oder spezielle sgRNAs<sup>77</sup>.

Seitdem haben sich die Anstrengungen darauf konzentriert die intrinsische Spezifität von meist spCas9 zu verbessern. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe Varianten, die mit einer Mischung aus gezielten Veränderungen anhand von mechanistischen Einsichten in die Funktion von Cas9 und evolutionärer Selektion geeigneter Varianten entwickelt wurden<sup>78-84</sup>. Mit diesen Varianten konnte die off-target Aktivität um bis zu ca. 90% reduziert werden<sup>85</sup>. In einem Vergleich von sieben dieser Varianten zeigte sich, dass eine erhöhte Spezifität bisher immer mit einer niedrigeren Aktivität einhergeht<sup>85</sup>. Ob dies eine generelle Beziehung ist, ist bisher unklar und die Suche nach Varianten mit höhere Spezifität bei gleicher Aktivität geht weiter<sup>86</sup>.

Obwohl diese Varianten mit Hinblick auf klinische Anwendungen entwickelt wurden, benutzen bisher alle klinischen Studien das in seiner Spezifität unveränderte Cas9 Protein<sup>87</sup>, auch wenn auch in

klinischen Studien off-target Veränderungen beobachtet wurden<sup>88</sup>. Im Moment scheint im Feld die Überzeugung vorzuherrschen, dass eine hohe Aktivität am Ziellokus wichtiger ist als hohe Spezifität, und dass Risiken durch off-target Effekt durch sorgfältige Experimente im Vorfeld klinischer Studien beherrschbar sind.

Methoden zum Entdecken solcher off-target Schnitte sind von verschiedenen Gruppen entwickelt worden. Mit diesen Ansätzen kann man die Spezifität von CRISPR Enzymen entweder im Reagenzglas<sup>89-91</sup> oder direkt in Zellen<sup>92-94</sup> bestimmen. Auch Methoden um die Spezifität *in vivo* zu bestimmen sind verfügbar<sup>95,96</sup>.

Während diese Methoden essentiell für die Weiterentwicklung spezifischer Nukleasen und die Optimierung von Genom-Editing Werkzeugen für klinische Einsätze sind, ist ihre Sensitivität noch nicht hoch genug, um potentiell problematische Schnittstellen komplett ausschließen zu können. Im besten Fall können derzeit off-target Stellen detektiert werden, die in mindestens 0,01% der Zellen geschnitten werden. Da Patienten bei Therapien 100 Millionen und mehr Zellen gegeben werden<sup>97-99</sup>, ist es möglich, dass auch off-target Schnitte, die bei einem deutlich geringeren Teil von Zellen auftreten, Probleme bereiten. Weitere Fortschritte in der Sensitivität sind vermutlich von Fortschritten bei Techniken zur Bestimmung von DNA Sequenzen abhängig.

## Erweiterte Spezifität

Die Tatsache, dass natürliche CRISPR Enzyme eine PAM Sequenz benötigen, ist in der Praxis häufig ein Problem, wenn es keine geeignete Sequenz in der Nähe des Genabschnitts gibt, den man verändern möchte. Daher wurden die ersten gezielten Veränderungen von Cas9 vorgenommen, um diese Limitation zu beseitigen und den Anteil adressierbarer Sequenzen zu vergrößern<sup>70,100</sup>.

Mittlerweile gibt es eine große Anzahl von künstlichen Cas9 und Cas12a Varianten, die es möglich machen fast jede beliebige Sequenz zu schneiden<sup>101</sup>. Besonders hervorzuheben ist hierbei die im Jahr 2020 veröffentlichte SpRY Variante, die fast jede beliebige Sequenz schneiden kann<sup>102</sup>.

Weitere Verbesserungen sind in Zukunft besonders auf dem Gebiet der Effizienz zu erwarten, da diese immer noch deutlich geringer ist als die der natürlichen Enzyme. Aber auch hier gibt es bereits Vorschritte<sup>86</sup>.

## Erweiterte Fähigkeiten

Natürliche CRISPR Enzyme sind Genschere, deren einzige Fähigkeit darin besteht DNA Stränge zu durchschneiden. Die Veränderungen im Genom entstehen dann, wie oben gesehen, durch zelluläre Reparatursysteme. Um die Abhängigkeit von zellulären Werkzeugen zu verringern und die Zielgenauigkeit der Genomveränderungen zu erhöhen, haben Wissenschaftler\*innen neue CRISPR basierte Methoden entwickelt, die Eigenschaften besitzen, die es so in der Natur nicht gibt.

## Base-Editing

Knapp die Hälfte aller potenziell pathogenen Variationen im menschlichen Genom sind Veränderungen in einem einzelnen Basenpaar<sup>103</sup>. Um diese experimentell zu erzeugen oder therapeutisch rückgängig zu machen, musste man wie oben beschrieben auf die ineffiziente homologe Rekombination zurückgreifen, die praktisch nur in sich teilenden Zellen funktioniert und die therapeutische Anwendung stark limitierte.

Um die gezielte Veränderung eines einzelnen Basenpaars zu ermöglichen, erfanden die Gruppen von David Liu<sup>104</sup> und Akihiko Kondo<sup>105</sup> 2016 die Base-Editing Methode (Abbildung 4). Beim Base-Editing wird ein bakterielles Enzym (eine sogenannte Desaminase) eingesetzt, das Cytosin-Basen (C) so verändert, dass sie von der Zelle als beschädigte DNA erkannt werden und im Zuge der Reparatur von einem C in ein T umgewandelt werden. Cas9 dient hierbei dazu, das Enzym an eine bestimmte Stelle im Genom zu bringen. Zusätzlich ist die Fähigkeit von Cas9 die beiden DNA Stränge zu trennen essentiell, da diese Desaminasen grundsätzlich nur einzelsträngige DNA angreifen. Basen-Editoren sind in dieser Form daher auch nur mit CRISPR Enzymen und mit keiner der Vorläufertechnologien denkbar.

Später wurde das Prinzip der Cytosin Basen-Editoren (CBEs) auf Adenin-Basen erweitert, um sehr effiziente Adenin-Basen-Editoren (ABEs) zu erschaffen, die ein A in ein G umwandeln<sup>106</sup>. Mit ABEs und CBEs können theoretisch etwa 30% aller bekannten, potentiell pathogenen natürlichen genetischen Varianten beim Menschen korrigiert werden<sup>103,107</sup>. Seit kurzem gibt es auch Basen-Editoren die Gs in Ts umwandeln können<sup>108,109</sup>. Diese sind allerdings noch recht wenig effizient und produzieren einen hohen Anteil an Nebenprodukten.

Die erste Generation von Basen-Editoren hatte verschiedene Limitationen, die Gegenstand umfangreicher Forschung sind. Zum einen wird die Effizienz der Enzyme ständig verbessert<sup>110-112</sup>, zum anderen werden immer weitere Cas9 Varianten zur Konstruktion von Basen-Editoren verwendet<sup>101</sup>.

Ein noch nicht ganz gelöstes Problem ist die Lage und Größe des Fensters, in denen Basen verändert werden. Derzeit editieren Basen-Editoren jede Base in einem Fenster von ca. 5 Basen, was je nach Anwendung ein zu großes oder zu kleines Fenster darstellt. Neue Varianten verbessern diese Eigenschaften ständig<sup>113-117</sup>. Für viele Anwendungen hätte man allerdings gerne Enzyme, die spezifisch immer nur eine bestimmte Base an der Bindestelle editieren. Diese existieren noch nicht.

Auch bei Basen-Editoren gibt es das Problem der off-target Aktivität an unerwünschten Stellen im Genom. Während sich off-target Aktivität durch das Binden der Cas9 Domäne an falsche Stellen im Genom durch die Verwendung von hoch spezifischen Cas9 Varianten (s. oben) verhindern lässt, kommt speziell bei Cytosin-Basen Editoren noch eine zusätzliche Komplikation hinzu. Unabhängig von der durch die sgRNA spezifizierte Bindestelle, verändert die Desaminase der Basen-Editoren auch noch zufällig Basen sowohl in der genomischen DNA<sup>118-120</sup> als auch in zellulären RNAs<sup>121</sup>. Auch hier wurde durch Verwendung unterschiedlicher natürlicher und im Labor optimierter Varianten die Spezifität deutlich erhöht<sup>122-125</sup>, allerdings oft auf Kosten der Aktivität. Im Vergleich zu den DNA-schneidenden Cas Enzymen sind die potentiellen Probleme der off-target Aktivität von Basen-Editoren aber als deutlich geringer einzuschätzen.

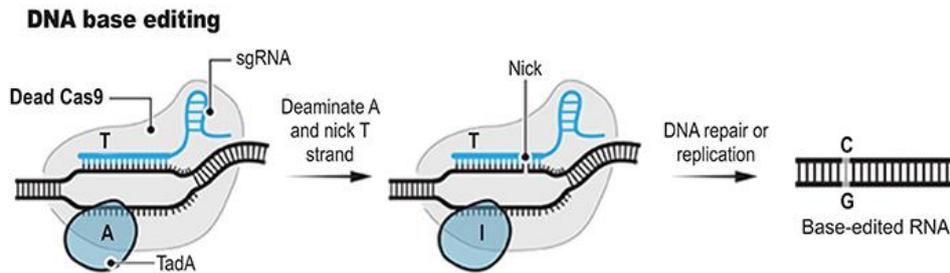


Abbildung 4: Basen Editor (Illustration aus <sup>126</sup>)

### Prime-editing

Während Base-Editing die effiziente Korrektur von bestimmten Mutationen in einzelnen Basen erlaubt, sind mehr als die Hälfte aller bekannten genetischen Varianten von komplexerer Natur oder bestehen aus Mutationen einzelner Basen, die von derzeitigen Basen-Editoren nicht korrigiert werden können. Obwohl die meisten dieser genetischen Varianten sich durch homologe Rekombination (s. oben) verändern ließen, lässt die geringe Effizienz dieser Methode Wissenschaftler\*innen weiter nach Alternativen suchen.

Die neueste Methode um die Versatilität von Genome-Editing Werkzeugen weiter zu vergrößern, wurde Ende 2019 von der Gruppe um David Liu von der Harvard University vorgestellt (Abbildung 5)<sup>127</sup>. Diese Prime-Editing genannte Methode erlaubt es, alle 12 möglichen Vertauschungen einzelner Basen durchzuführen, sowie kurze DNA Sequenzen zu entfernen oder einzufügen. Wie Base-Editing auch ist Prime-Editing eine grundsätzlich neue Erfindung, die man so in der Natur nicht findet.

Das Protein, das die für die Prime-Editing Reaktion verantwortlich ist („Prime Editor“), besteht aus einer Cas9 Variante, die nur einen der beiden DNA-Stränge schneidet („Nickase“) und aus einer sogenannten Reversen Transkriptase, die RNA in DNA übersetzen kann. Der Prime-Editor wird von einer prime editing guideRNA (pegRNA) an sein Ziel im Genom geleitet. Die pegRNA kodiert zusätzlich zum Ziellokus auch noch die gewünschte Mutation, die am Ziellokus eingefügt werden soll.

Nachdem der Prime-Editor mit der pegRNA an das Genom angedockt hat, schneidet er einen der beiden genomischen DNA Stränge. Danach wird die RNA Sequenz mit der gewünschten Mutation in DNA übersetzt und unter Ausnutzung zellulärer Reparaturmechanismen an Stelle der Originalsequenz in das Genom eingefügt. So konnten z. B. in Zellkultur Mutationen eingefügt bzw. korrigiert werden, die Krankheiten wie Sichelzellanämie oder das Tay-Sachs-Syndrom verursachen<sup>127</sup>.

Da die Prime-Editing Technologie noch sehr neu ist, ist noch nicht klar, ob es in der derzeitigen Form für praktische Anwendungen brauchbar ist. So ist z.B. unklar, ob die zum Teil recht hohen Effizienz, die in Zelllinien in der Originalveröffentlichung beobachtet wurden, auf primäre (d.h. direkt aus dem Körper isolierte) Zellen oder auf *in vivo* Anwendungen übertragbar ist und in wie weit andere als die gewünschte Veränderung an der Zielstelle und andernorts im Genome eingefügt werden. Außer in Zellkulturzellen wurden bisher Anwendungen in Pflanzen<sup>128</sup>, Mausembryonen<sup>129</sup>, primären kortikalen Neuronen von Mäusen<sup>127</sup> und induzierten pluripotenten Stammzellen<sup>130</sup> publiziert. In der Genome-

Editing Community ist allerdings auch bekannt, dass die Effizienz vom Prime-Editing in manchen Zelltypen sehr niedrig ist. Weitere Forschung ist daher nötig, um die Möglichkeiten und Grenzen der derzeitigen Prime-Editoren auszuloten und weiter zu verbessern.

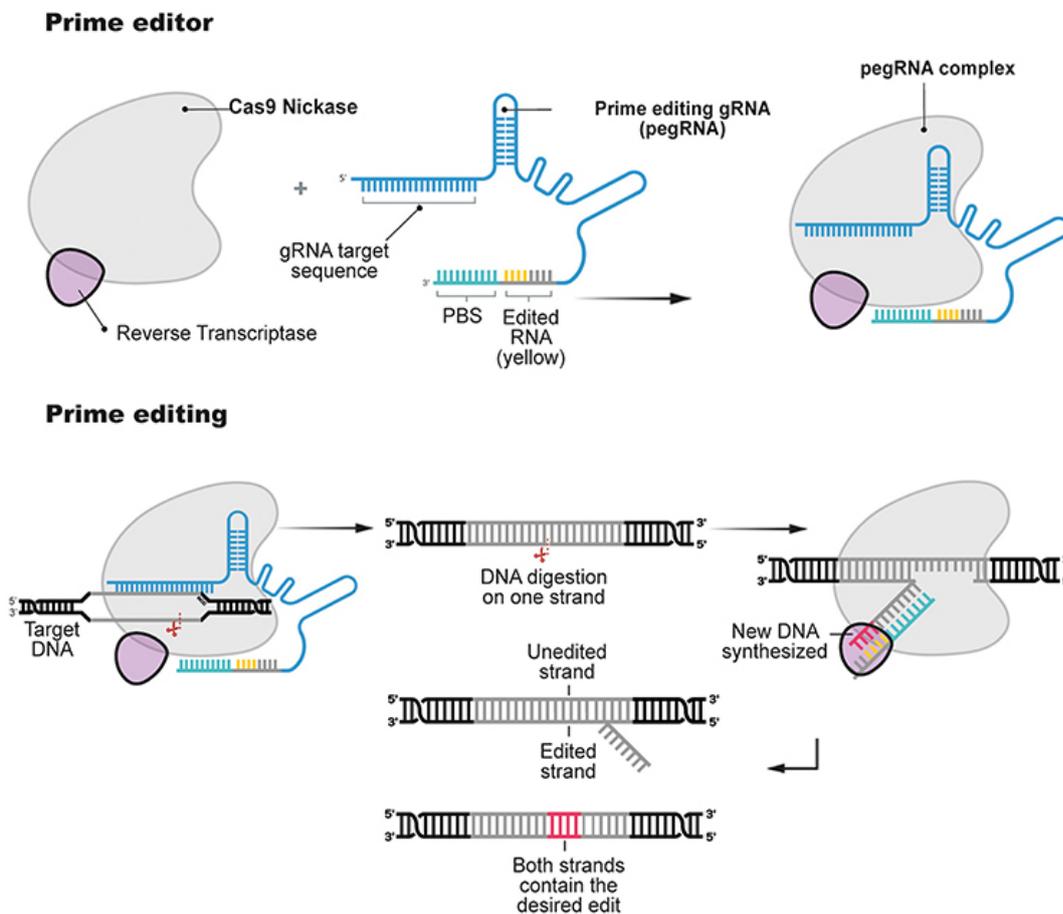


Abbildung 5: Prime Editing (Illustration aus<sup>126</sup>)

## Nicht-genomverändernde Anwendungen

Neben dem Editieren von Genomen sind für praktische Anwendungen noch zwei andere CRISPR Techniken potentiell wichtig: Gene Aktivierung und Inhibition sowie RNA-Editing.

### Gene Aktivierung und Inhibition

Nicht alle Gene werden ständig abgelesen und in Proteine übersetzt. Im Gegenteil ist das zeit- und ortsgenaue An- und Ausschalten essenziell für die Entwicklung und Gesundheit von Organismen.

Um die Aktivität von Genen experimentell und in Zukunft vielleicht auch therapeutisch kontrollieren zu können, machen sich Forscher\*innen die Fähigkeit von Cas9 und andern CRISPR Enzymen zu Nutze,

zielgenau an bestimmte DNA Abschnitte binden zu können. Da bekannt ist, welche Teile des Enzyms dafür verantwortlich sind die DNA zu schneiden, kann man diese so verändern, dass Cas9 noch an die DNA bindet, diese aber nicht mehr schneiden kann.

Um Gene zu aktivieren oder zu inhibieren, stattet man Cas9 nun mit Teilen von natürlichen Regulatoren der Genaktivität aus, von denen durch jahrzehntelange Grundlagenforschung viele bekannt sind. Häufig wird z.B. ein Teil eines Herpes Simplex Virus Proteins (VP64) benutzt (Abbildung 6) <sup>131</sup>. Wenn das so modifizierte Cas9 Protein nun in der Nähe des Anfangs eines Gens (in einer sogenannten Promotor Region) bindet, rekrutiert es all die zellulären Faktor, die für das Ablesen des Gens zuständig ist (Aktivierung) oder rekrutiert inhibitorische Faktoren, die das Ablesen verhindern<sup>132</sup>. Durch die einfache Programmierbarkeit der CRISPR Protein, kann man mit mehreren sgRNA auch eine große Anzahl von Genen gleichzeitig hoch oder runter regulieren.

Diese Methoden sind immer dann nützlich, wenn man die Genaktivität nur temporär modulieren muss und das Genom nicht dauerhaft verändern will oder kann. So kann man z.B. CRISPR Aktivierung dazu benutzen, die Entwicklung von Stammzellen in gewünschte Zelltypen (z.B. Patienten-spezifische Nervenzellen) zu steuern<sup>131</sup>.

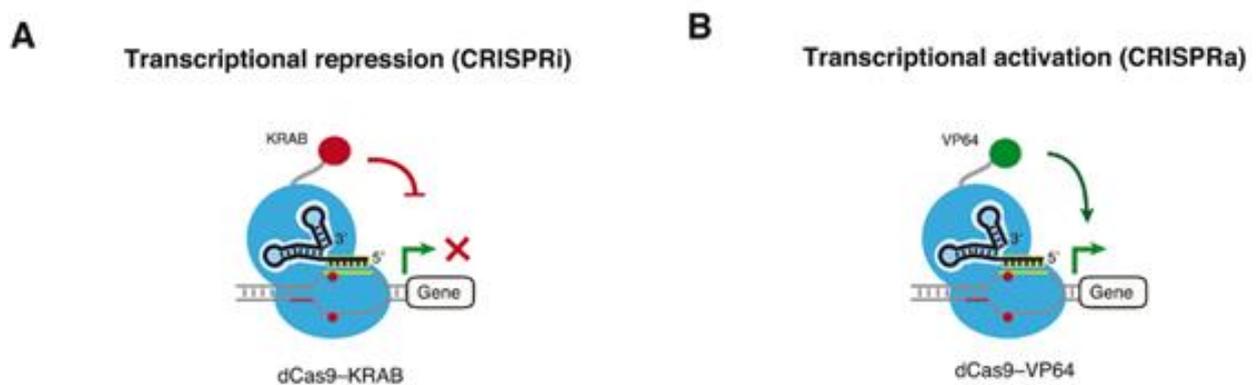


Abbildung 6: Gen Aktivierung und Inhibition mit CRISPR-basierten Werkzeugen (Illustration adaptiert aus<sup>133</sup>)

## RNA-editing

RNA kommt die zentrale Rolle beim Übersetzen von genetischer Information in Proteine zu. Genauso wie in der DNA liegt die Information in einer Abfolge von vier Basen vor. RNA wird allerdings ständig neu produziert und wieder abgebaut und kann daher für temporäre Interventionen genutzt werden.

Hierzu bietet der CRISPR Werkzeugkasten zwei Möglichkeiten. Zum einen gibt es spezielle CRISPR Enzyme, die spezifisch RNA abbauen und damit die Produktion des von der RNA kodierten Proteins verhindern. Die Familie der Cas13 Proteine z.B. ist in der Lage mit hoher Effektivität bestimmte RNAs in Zellen abzubauen<sup>134</sup>.

Hierbei steht die CRISPR Technologie in Konkurrenz zu den schon länger etablierten RNA Interferenz und anti-sense Technologien, die eine ähnliche Funktion haben, bereits in zahlreichen klinischen

Studien getestet wurden und werden und auf deren Prinzip auch schon mehrere Medikamente zugelassen wurden<sup>135,136</sup>. Das Anwendungsspektrum ist ähnlich und beinhaltet Erkrankungen, die von viralen Infektionen bis zu neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs reichen.

CRISPR Proteine können aber auch dazu genutzt werden spezifisch die Sequenz von RNAs zu verändern. Hierbei fusioniert man Cas13 ähnlich wie bei Base-Editing (s. oben) mit einem Enzym, das gezielt einzelne Basen verändert. Bisher kann man so spezifische Adenosin in Inosin (das wie ein Guanin gelesen wird)<sup>137</sup> und Cytosin in Uracil (das wie ein Thymin gelesen wird)<sup>138</sup> verwandeln.

Auch hier gibt es eine konkurrierende Methode, die darauf beruht endogene menschliche Enzyme mit guideRNAs zu reprogrammieren<sup>139,140</sup>. Diese Methoden haben den Vorteil, dass kein externes Protein in die Zelle eingebracht werden muss. Hier gehört die Gruppe von Thorsten Stafforst in Tübingen zu den Pionieren.

Wie wir weiter unten sehen werden ist ein großer Nachteil von CRISPR-basierenden Modulatoren der Genaktivität und RNA-Editoren, dass sie für längere Zeiträume in Zellen aktiv sein müssen. Da es sich dabei um nicht-menschliche Proteine handelt, werden sie aller Wahrscheinlichkeit nach vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden. Ob sich dieses Problem umgehen lässt ist noch unklar.

## Ausblick: Neue Möglichkeiten am Horizont

Ein großer Nachteil bisheriger Genome-editing Werkzeuge ist es, dass sie sich, zumindest zum Teil, auf DNA-Reparatur-Mechanismen der Wirtszelle verlassen müssen, um die gewünschte Veränderung des Genoms herbeizuführen. Dies ist in vielen Fällen problematisch, da es die Effizienz limitiert und für eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Zelltypen (und vielleicht auch Individuen) sorgt. Zudem macht es die Abhängigkeit von zellulären Mechanismen auch schwierig, Methoden zu finden um die Genome-Editing Effizienz zu steigern, da größere Eingriffe in diese Maschinerie in Patienten schwierig oder sogar gefährlich sein können (Defekte in DNA-Reparatur-Enzymen sind häufig auch an der Entstehung von Krebs beteiligt). Es wäre daher wünschenswert, Genome-Editing Methoden zu entwickeln, die möglichst unabhängig von der Wirtszelle arbeiten.

In der Natur gibt es zwei Klassen von Systemen, die sich hierfür anbieten: Transposasen und Rekombinasen. An beiden Systemen wird intensiv geforscht, um sie programmierbar und damit für praktische Anwendungen einsetzbar zu machen.

## Programmierbare Transposasen

Transposasen sind Enzyme, die in der Lage sind, ihre eigene kodierende Sequenz aus der DNA (Transposon) herauszuschneiden und an andere Stellen des Genoms zu übertragen oder zu kopieren. Transposons kommen in fast allen Organismen, von Bakterien bis zum Menschen, vor (fast die Hälfte des menschlichen Genoms stammt z.B. von Transposons ab<sup>141</sup>). Eine Aufgabe von CRISPR Systeme, ist auch die Abwehr von Transposons.

Die meisten natürlich vorkommenden Transposasen erkennen nur eine einzige ganz bestimmte Sequenz. Sie sind daher nicht programmierbar und nicht für eine gezielte Veränderung des Genoms zu gebrauchen.

2017 entdeckte man, dass es bakterielle Transposons gibt, die auch Gene des CRISPR Systems tragen, welches eigentlich zu ihrer Abwehr gedacht ist<sup>141</sup>. Die CRISPR Proteine dienen dazu, die Transposase an eine bestimmte Stelle im Genom zu bringen, um dort die Integration des Transposons zu katalysieren.

2019 zeigten zwei Forschungsgruppen, dass sich über diesen Mechanismus große, künstliche DNA Fragmente in eine bestimmte Stelle in das Genom von Bakterien integrieren lassen<sup>142,143</sup>. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die Transposase nur kurze Sequenzen an den beiden Enden des zu integrierenden DNA Stücks erkennt. Dazwischen kann jede beliebige genetische Information liegen, die eingefügt werden soll. Die Integration kann mit sehr hoher Genauigkeit<sup>142</sup> und Effizienz erfolgen<sup>142,143</sup>.

Die Funktion dieser CRISPR–Transposasen wurde bisher nur in Bakterien gezeigt, wo sie z.B. dazu beitragen könnten, in Bakterien Gene für Stoffwechselwege zur Synthese von z.B. Pharmazeutika oder Biokraftstoffen einzubringen<sup>142,143</sup>.

Eine Demonstration, dass CRISPR–Transposasen auch in menschlichen Zellen funktionieren, steht noch aus. Das Potential für Anwendungen beim Menschen ist allerdings groß. So könnten z.B. CRISPR–Transposasen bei genetischen Krankheiten zielgenau funktionsfähige Versionen des beim Patienten defekten Gens in eine sichere Position des Genoms einschleusen, oder Gene für andere therapeutische Moleküle in menschliche Zellen einführen und so den Patienten das Therapeutikum selbst produzieren lassen.

## Programmierbare Rekombinasen

Sequenz-spezifische Rekombinasen sind Enzyme, die den Austausch genetischer Information in zwei DNA Strängen zwischen genau definierten Erkennungssequenzen katalysieren. Der große Vorteil von Rekombinasen ist, dass die Austauschreaktion alleine von der Rekombinase mit hoher Effizienz und Genauigkeit ausgeführt wird, ohne dass dabei andere Proteine benötigt werden. Allerdings haben die natürlich vorkommenden Rekombinasen eine hohe intrinsische Spezifität für eine ganz bestimmte Erkennungssequenz, die sich nicht einfach verändern lässt, und lassen sich daher nur sehr eingeschränkt zur gezielten Genomveränderung benutzen.

Die Entwicklung von programmierbaren Rekombinasen steht schon lange ganz oben auf der Wunschliste von Forscher\*innen. So wurden z.B. Zink Finger und TALEs (s. oben) dazu benutzt die DNA-binde Domäne von Rekombinasen zu ersetzen und sie damit an andere Teile des Genoms zu bringen<sup>144–146</sup>. Auch mit Cas9 wurden ähnliche Versuche unternommen<sup>147</sup>. Alle bisherigen programmierbaren Rekombinasen haben allerdings nur bedingt Verwendung gefunden, weil die immer noch vorhandene intrinsische Sequenzspezifität der Rekombinase kombiniert mit einer geringen Effizienz möglichen Anwendungen zu sehr einschränken. Die Suche nach und Entwicklung von Rekombinasen mit geringer intrinsischer Spezifität, die sich mit Cas9 oder anderen CRISPR Proteinen kombinieren lassen, ist in vollem Gang.

Besonders für klinische Anwendungen ist auch ein anderer Weg denkbar, bei der die Gruppe von Frank Buchholz an der TU Dresden Pionierarbeit geleistet hat. Hierbei ist die Idee nicht, eine einfach zu programmierende Rekombinase zu schaffen, sondern für eine ganz bestimmte Anwendung eine Rekombinase mit neuer, definierter Spezifität zu entwickeln. Hierbei wird nicht auf ein CRISPR System zurückgegriffen, sondern in einem aufwendigen Verfahren Stück für Stück eine bestehende Rekombinase so verändert, dass sie nicht mehr ihre ursprünglich Erkennungssequenz, sondern nur noch eine neue erkennt<sup>148-150</sup>. Eine Anwendung, die laut Frank Buchholz bald in klinische Studien gehen wird, liegt in der HIV/AIDS Therapie. Hierbei wird eine Rekombinase verwendet, die in jahrelanger Arbeit so verändert wurde, dass sie speziell HIV Genome erkennt und entfernt, die sich im Patientengenom integriert haben und für die Persistenz der Infektion verantwortlich sind<sup>148,150</sup>. Da die Entwicklung solcher Rekombinasen sehr aufwendig und zeitraubend ist, wird diese Technologie wohl eine Nischenanwendung bleiben. Der Zeitaufwand kann allerdings für klinischen Anwendungen, bei denen die gesamte Entwicklungsdauer einer Therapie bis zu einem Jahrzehnt oder länger dauern kann, gerechtfertigt sein.

## Zusammenfassung

- CRISPR Systeme sind bakterielle Immunsysteme
- Bestimmte Cas (CRISPR-associated) -Proteine lassen sich durch eine kurze RNAs (guideRNAs ) programmieren, um eine bestimmte DNA Sequenz zu schneiden und damit zu verändern
- Diese guideRNAs lassen sich leicht und schnell in jedem molekularbiologischen Labor synthetisieren
- Cas9 und Cas12a sind die am weitest verbreiteten natürlichen CRISPR-Cas Proteine
- Durch die Entdeckung neuer natürlicher und gezielter Veränderungen bestehender CRISPR Proteine wird Genome-Editing immer effizienter und spezifischer, und kann auf eine größere Anzahl von Zielsequenzen angewendet werden
- Methoden zu Charakterisierung der Spezifität von bestimmten Genome-Editing Werkzeugen müssen noch genauer werden um klinische Risiken zu minimieren
- Forscher\*innen haben CRISPR Systeme mit Funktionen geschaffen, die es in der Natur nicht gibt, um gezielte Veränderungen mit größerer Genauigkeit und Effizienz einfügen zu können
- Programmierbare Transposasen und Rekombinasen werden in Zukunft neue Möglichkeiten eröffnen

## Anwendungen in der medizinischen Forschung

### Identifikation neuer Therapieansätze

Die meisten Medikamente bestehen aus relativ kleinen Molekülen, die an bestimmte Proteine im menschlichen Körper binden und deren Funktion stören oder ausschalten. Der Mensch hat ca. 19.000 Gene, die für Proteine kodieren<sup>151</sup> und sich damit grundsätzlich als Ziele für klassische, klein-

molekulare Medikamente eignen. Da Medikamentenentwicklung aufwendig und teuer ist, gibt es nur für einen kleinen Teil dieser Proteine passende Medikamente. Herauszufinden, für welche Krankheit es sich lohnt passende Medikamente für ein bestimmtes Protein zu entwickeln, ist eine komplizierte und langwierige Aufgabe, bei der CRISPR Systeme mittlerweile eine zentrale Rolle spielen.

Dies lässt sich beispielhaft anhand der Krebsforschung illustrieren.

Die häufigste Funktion von Medikamenten ist es, die Funktion eines bestimmten Proteins einzuschränken oder ganz zu verhindern. Die Fähigkeit von CRISPR-basierten Genome-Editing mit großer Einfachheit Gene auszuschalten, macht es ideal dazu geeignet, Ziele für die Entwicklung von Medikamenten zu finden. Wenn das Ausschalten eines Gens dazu führt, dass die krankheitsbedingten Veränderungen verschwinden oder abgemildert werden, ist es zumindest wahrscheinlich, dass ein Medikament, das das korrespondierende Protein inhibiert, auch wirksam sein könnte. Diese Forschung geschieht natürlich nicht an Patienten\*innen, sondern zunächst in möglichst einfachen Modellsystemen.

Um die Forschung effizienter zu gestalten, wird nicht ein Gen nach dem anderen ausgeschaltet, sondern es gibt mittlerweile eine Reihe von Bibliotheken, die mehrere optimierte sgRNAs für jedes Gen des Menschen und der Maus enthalten (z.B.<sup>152-155</sup>) oder sich auch auf Untergruppen von Genen konzentrieren, die besonders attraktive Ziele für die Medikamentenentwicklung sind<sup>156-160</sup>.

Im einfachsten Fall sucht man nach Genen, die die Wachstumsrate von Zellen reduziert oder krankhafte Zellen tötet. Dies ist meist bei der Suche nach neuen Krebsmedikamenten der Fall<sup>161</sup>, aber auch komplexere Veränderungen können in Zellen analysiert werden<sup>162,163</sup>. Um Gene zu finden, die das Zellwachstum reduzieren wird ein sogenannter CRISPR-Screen durchgeführt. Im einfachsten Fall, bringt man zuerst Cas9 und die sgRNA Bibliothek in eine Population von Krebszellen ein (meist in einer Zellkulturschale). Hierzu benutzt man meist Lentiviren. Jedes Virus trägt eine sgRNA für ein bestimmtes Gen und durch titrieren der Viruskonzentration stellt man sicher, dass jede Zelle nur von einem Virus infiziert wird. Die Zellen produzieren nun Cas9 und die sgRNA und das Zielgen wird ausgeschaltet. Als nächstes lässt man die Zellen einige Tage wachsen und vergleicht das Verhältnis der verschiedenen sgRNAs am Anfang des Experiments mit denen am Ende. sgRNAs, die Gene ausschalten, die für das Wachstum wichtig sind, werden am Ende des Experiments weniger häufig vorhanden sein als am Anfang.

CRISPR-Screens um die Verwundbarkeit von Krebszellen zu finden, wurden in einer Vielzahl akademischer Laboren und pharmazeutischer Firmen angestellt<sup>161</sup>. Mit der sich ständig verbessernden Technologie (sowohl in Bezug auf die verwendeten Bibliotheken als auch der Analyse der Ergebnisse im Nachhinein<sup>161</sup>) kann man solche Experimente nun auch gleichzeitig in einer Vielzahl von Krebszelllinien verschiedener Tumortypen machen und Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede charakterisieren<sup>161</sup>.

Sowohl in der klinischen Praxis als auch schon in Laborexperimenten zeigt sich oft, dass für eine erfolgreiche Therapie die Inhibition eines einzelnen Proteins nicht ausreicht, da Zellen komplexe, oft redundante Signal- und Stoffwechselwege haben und sich Krebszellen zusätzlich auch noch schnell verändern. Auch hier kann die CRISPR Technologie helfen. Es ist möglich Kombinationen aus mehreren sgRNAs in die Zellen einzubringen, um synergistische Kombination von möglichen oder schon bestehenden Medikamenten zu finden. Dies ist kommerziell von besonderem Interesse, da unter Umständen so Medikamente, die als Monotherapie nicht wirksam waren, aber schon klinische Studien

durchlaufen habe, in Kombination mit anderen verwendet werden können<sup>164</sup>. Dieses sogenannte kombinatorische Screening ist technisch sehr anspruchsvoll und erst in den letzten Jahren haben es technische Fortschritte robust genug gemacht um praktikabel zu sein<sup>165-168</sup>.

Eine besonders interessante Anwendung von CRISPR ist die Identifikation sogenannter synthetisch letaler Interaktionen<sup>169</sup>. In vielen Fällen kennt man wichtige Gene, die in vielen Tumoren mutiert sind, oder generelle Eigenschaften von bestimmten Tumorzellen, hat aber trotz jahrelanger Bemühung keine Medikamente gefunden, die dieses Wissen ausnutzen. Synthetische Letalität bezeichnet das Phänomen, das eine Kombination von genetischen Veränderungen für die Zelle tödlich ist, während jede einzelne es nicht ist. Wenn man in einem CRISPR Screen Zellen mit einer Tumor-spezifischen Mutation und normale Zellen vergleicht, findet man unter Umständen Ziele für Medikamente, die nur in Verbindung mit der Tumormutation tödlich und daher ein potenzielles ideales Ziel für die Medikamentenentwicklung sind. Noch vor der CRISPR Ära ist ein solches Medikament für Brustkrebs zugelassen worden<sup>170</sup>, aber mit der neuen Technologie ist die Suche nach solchen Interaktionen intensiviert worden<sup>169,171-174</sup>.

Weniger verbreitet aber potenziell von hoher praktischer Relevanz sind auch Methoden, die versuchen herauszufinden welche Teile von großen Proteinen besonders wichtig für deren Funktion sind<sup>175</sup> oder schon vor Einsatz des Medikaments beim Menschen mögliche Resistenzmechanismen vorhersagen<sup>176,177</sup>.

Eine Limitation ist, dass derzeit die meisten dieser Experimente in einfacher Zellkultur mit Zelllinien durchgeführt werden, deren Biologie sich deutlich von der Situation im Patienten unterscheidet. Der Einsatz von primären Patientenzellen, komplexeren *in vitro* Systemen und Tiermodellen ist aber auch möglich<sup>161,178</sup>. Tiermodelle sind bei Therapien besonders wichtig, die in die Physiologie des Körpers eingebunden sind. In der Krebsforschung ist hier besonders die Immunotherapie (s. unten) zu nennen, bei der CRISPR Experimente auch Ansätze für neue Therapien liefern<sup>179</sup>.

Neben dem größeren logistischen Aufwand von komplexeren Krankheitsmodellen, ist im Moment besonders limitierend, dass man für einen typischen CRISPR Screen recht viele Zellen benötigt. Bei primären Patientenzellen oder in Tiermodellen kann die Zellanzahl schnell limitierend werden. Hier ist weiter Forschung nötig um die Effizienz der Screens zu erhöhen.

CRISPR Screens werden natürlich in einer Vielzahl weiterer Krankheiten eingesetzt, wie z.B.: neurologische Krankheiten<sup>180</sup>, Infektionskrankheiten<sup>181-184</sup> oder metabolische Krankheiten<sup>185,186</sup>.

## Modellsysteme für medizinische Forschung

Bei vielen Krankheiten ist es unklar durch welche Mechanismen sie genau entstehen. Auch gibt es oft keine Labor- oder Tiermodelle an denen man Medikamente oder andere Therapien testen kann. Durch Genome-Editing ist die Entwicklung von solchen Modellen deutlich einfacher geworden. Zwei Entwicklungen sind hier besonders wichtig.

Zum einen ist die Entwicklung von Tiermodellen deutlich einfacher geworden. Genauso wie in anderen Zellen kann man einzellige Embryos mit den CRISPR Reagenzien injizieren und die so generierten genomveränderten Embryos wieder in die Weibchen einsetzen. So können auch sehr komplexe

Modelle mit vielen veränderten Genen relativ schnell unter anderem in Mäusen<sup>187</sup>, Ratten<sup>188</sup>, Schweinen<sup>189</sup>, Kaninchen<sup>190</sup>, Affen<sup>191</sup> und Fischen<sup>192</sup> erzeugt werden. Im Vergleich zur vor-CRISPR Zeit haben sich z.B. die Kosten und der Zeitaufwand der Entwicklung von Mausmodellen mehr als halbiert<sup>188</sup>.

In manchen Fällen ist es wünschenswert, wenn die Genveränderungen noch nicht während der Embryonalentwicklung vorhanden sind. In diesen Fällen ist es möglich die CRISPR Reagenzien erst im adulten Organismus in eine begrenzte Zahl von Zellen einzubringen. Dies ist z.B. bei neurodegenerativen oder Tumor-Erkrankungen nützlich, die erst im Erwachsenenalter auftreten und oft von einer kleinen Anzahl von Zellen ausgehen<sup>193-196</sup>.

Zum anderen ermöglicht die CRISPR Technologie Modelle aus menschlichen, sogar Patientenspezifischen Zellen herzustellen. Ein Problem daran Krankheiten an menschlichen Zellen zu untersuchen war bislang, dass man immer nur Zellen von Patienten mit Vergleichszellen von anderen Personen vergleichen konnte. Da diese Personen eine Vielzahl von genetischen Unterschieden hatten, war es schwer physiologische Unterschiede auf bestimmte Genvarianten zurückzuführen. Mit der CRISPR Technologie kann man nun Genvarianten in Zellen einfügen oder Mutationen korrigieren und behält die ansonsten genetisch identischen (isogenen) Zellen zum Vergleich.

Mit den sprunghaften Fortschritten in der Stammzellforschung, ist es möglich aus induzierten pluripotenten Stammzellen isogene Zellmodelle zu erschaffen und diese in viele Zelltypen des menschlichen Körpers zu verwandeln. So wurden z.B. *in vitro* Modelle von Parkinson<sup>197</sup>, Alzheimer<sup>198</sup>, Autismus<sup>199</sup>, Herzkrankheiten<sup>200-202</sup> und Krebs<sup>203-205</sup> erzeugt, die man nun zum Testen neuer Medikamente und zur Erforschung der Mechanismen menschlicher Krankheiten benutzen kann.

Noch näher an die Bedingungen im lebenden Organismus kommt man mit organähnlichen, bis zu einigen Millimetern großen Zellstrukturen, die im Labor erzeugt werden können und manche der Funktionen von vollständigen Organen ausführen können. Erzeugt man diese, Organoiden genannten Strukturen aus genomveränderten Zellen, können sie wertvolle Forschung und Arzneimittelentwicklung ermöglichen. In Verbindung mit der Stammzelltechnologie können Organoide auch patientenspezifisch erzeugt werden und als Plattform für personalisierte Medizin dienen<sup>206-208</sup>. Organoide gibt es mittlerweile für die meisten menschlichen Organe und viele Tumorarten<sup>209,210</sup>.

## Zusammenfassung

CRISPR-basierende Methoden können die klassische Arzneimittelforschung unterstützen und beschleunigen, indem sie:

- Für Krankheiten relevante Proteine identifizieren, die als Ziele für neue Medikamente dienen können
- die Auswahl von Kombinationstherapien systematisieren
- genetische Marker für Arzneimittelwirksamkeit finden
- neue Zell- und Tiermodelle generieren.

## CRISPR in der Klinik

Es liegen kaum 6 Jahre zwischen der Entdeckung, das CRISPR-Cas9 zur gezielten Veränderung von Genomen eingesetzt werden kann<sup>60,61</sup> und den ersten klinischen Studien am Menschen<sup>19</sup>. Doch darf man nicht vergessen, dass der schnelle Einzug von auf CRISPR-basierendem Genome-Editing in die Klinik nur möglich war, weil bereits viel Erfahrungen mit anderen Genome-Editing Werkzeugen und Gentherapie Ansätzen vorhanden war, die sich auf CRISPR-basierende Therapien übertragen ließen.

Nach wie vor befinden sich Therapien, die auf ZFNs, TALENs und Meganukleasen beruhen, in klinischer Entwicklung und diese Methoden haben auch potenzielle Vorteile gegenüber CRISPR<sup>87,211,212</sup>.

Klinische Anwendungen von CRISPR-Werkzeugen kann man grob in drei Gebiete aufteilen:

1. *Ex vivo* Therapien

Hierbei werden Zellen des Patienten isoliert, im Reagenzglas behandelt und dann wieder zurück in den Körper gebracht (Abbildung 7).

2. *In vivo* Therapien

Hierbei werden die CRISPR Werkzeuge in bestimmte Zellen im Körper eingebracht und verändern dort direkt das Genom (Abbildung 7).

3. Diagnostik

Hierbei werden Eigenschaften von CRISPR Enzymen benutzt, um RNA und DNA schnell und mit hoher Spezifität und Sensitivität zu detektieren.

Bisher dominieren drei große Anwendungsbereiche die klinische Entwicklung von Genome-Editing Therapien. Der erste Bereich ist die Korrektur genetischer Krankheiten. Von den ca. 5000 bekannten genetischen Krankheiten, unter denen ca. 250 Millionen Menschen leiden<sup>213</sup>, sind bisher nur ein paar wenige Ziel von klinischen Entwicklungsprogrammen. Des Weiteren ist es das Gebiet der Krebsimmuntherapie, bei der Immunzellen so verändert werden, dass sie Tumorzellen erkennen und töten. Und nicht zuletzt gibt es einige Studien, die sich mit der Therapie von viralen Infektionen beschäftigen. Während diese Gebiete für den Großteil der klinischen Studien verantwortlich sind, werden zahlreiche weitere therapeutische Indikationen im Labor und in Tiermodellen untersucht.

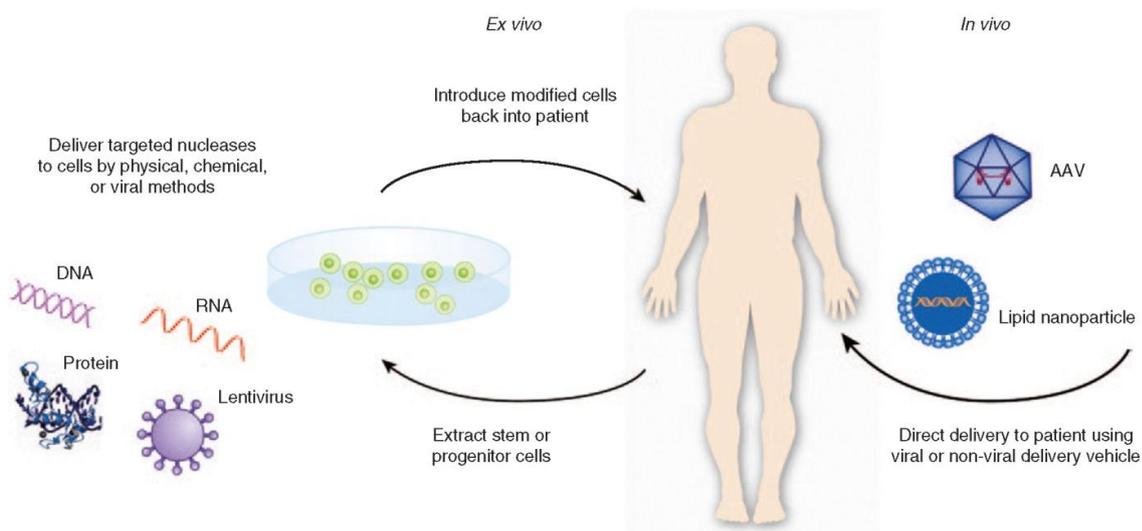


Abbildung 7: Genome-Editing als Therapie (Illustration aus<sup>214</sup>)

## Ex vivo Therapien

Die am weitesten fortgeschrittene klinische Anwendung von Genome-Editing Therapien ist die Modifikation von Zellen *ex vivo*. *Ex vivo* Therapien haben verschiedene Vorteile gegenüber *in vivo* Therapien. Erstens, ist es im Reagenzglas deutlich einfacher die notwendige Maschinerie in die Zellen einzubringen, als im lebenden Organismus. Zweitens, kann man die Zellen noch einmal untersuchen bevor man sie in die Patienten zurück transplantiert, was einen wesentlichen Sicherheitsgewinn bringt. Drittens, gibt es im Reagenzglas kein Immunsystem, das die nicht-menschlichen Proteine erkennen und bekämpfen kann. Viertens, kann die Dosis der modifizierten Zellen, die die Patienten erhalten viel besser kontrolliert werden.

Wie bereits oben erwähnt, war die erste therapeutische Anwendung von Genome-Editing eine klinische Studie der US-Amerikanischen Firma *Sangamo*, die versucht hat HIV Patienten von der Krankheit zu heilen. Hierzu wurden den Patienten sogenannte CD4 T-Zellen, bestimmte Immunzellen, die das Hauptziel von HIV sind, entnommen. Mit Hilfe von ZFNs wurde dann das Gen eines Oberflächenproteins (CCR5) inaktiviert, welches das Virus zum Eindringen in die Zelle benötigt, aber für die Funktion der Zelle nicht essenziell ist<sup>39,215</sup>. Diese HIV resistenten T-Zellen sollten im Patienten ein Funktionieren des Immunsystems sicherstellen und dem Virus keine Möglichkeit geben sich weiter zu vermehren. Die Ergebnisse der klinischen Studien zeigten, dass die Methode sicher ist und die T-Zell Anzahl stieg. Allerdings war der Effekt auf den Krankheitsverlauf zu gering, und die Firma hat die weitere Entwicklung mittlerweile eingestellt.

Blutzellen bleiben allerdings das Ziel einer großen Anzahl klinischer Studien. Eine Gruppe von Studien beschäftigt sich mit der Therapie von zwei Krankheiten,  $\beta$ -Thalassämie und Sichelzellanämie, die den roten Blutfarbstoff Hämoglobin betreffen. Hämoglobin besteht aus zwei Proteinketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) und bei beiden Krankheiten ist das Gen für die  $\beta$ -Kette defekt.

Bei der  $\beta$ -Thalassämie ist die Produktion der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins eingeschränkt oder gar nicht vorhanden. Auf genetischer Ebene gibt es eine Reihe von Ursachen bei denen entweder Teile des Gens fehlen oder regulatorische Regionen mutiert sind. Die Krankheit tritt weltweit in ca. 1 von 100.000 Geburten auf (in der EU 1 in 10.000)<sup>216</sup> und ist in schwerer Form ( $\beta$ -Thalassämie major) unbehandelt tödlich. Die bisher einzige Therapie sind regelmäßige Bluttransfusionen, die allerdings auch unter optimalen Bedingungen zu weiteren klinischen Komplikationen führen.

Die Sichelzellanämie wird durch eine Mutation in einer einzelnen Base verursacht, wodurch sich in der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins eine einzige Aminosäure verändert. Diese Mutation sorgt dafür, dass das Hämoglobin zur Bildung von langen Ketten neigt, die schlecht löslich sind und zu einer Verformung der roten Blutkörperchen führt. Diese Sichelzellen genannten verformten Zellen sind deutlich weniger elastisch als die normalen roten Blutkörperchen und verstopfen kleine Kapillare, was zu sehr schmerzhaften Anfällen führen kann. Zusätzlich werden die Sichelzellen schnell abgebaut, was zu einer Blutarmut (Anämie) führt.

Um diese Krankheiten zu heilen, setzen Forscher\*innen bei den blutbildenden Stammzellen im Knochenmark an (hämatopoetische Stammzellen), die für ständigen Nachschub an den kurzlebigen roten Blutkörperchen sorgen. Diese Stammzellen können direkt aus dem Patienten isoliert, im Reagenzglas behandelt und dann wieder an den Patienten zurückgeben werden.

Im Idealfall würde man die Mutationen gerne direkt in den Stammzellen korrigieren, die die Krankheit auslösen. Dieser Weg wird aber in der Praxis nicht gewählt. Die Gründe hierfür illustrieren die Limitationen derzeitiger Technologie. Bei der  $\beta$ -Thalassämie gibt es mehr als 200 verschiedene Mutationen, die die Krankheit auslösen<sup>217</sup> und es ist derzeit nicht möglich für jede dieser Mutationen eine eigene Therapie zu entwickeln und durch den regulatorischen Prozess und die damit verbundenen klinischen Studien zu führen. Zum anderen gibt es auch technologische Limitationen in der Korrektur von Mutationen. Mit derzeitiger Technik hat man dazu zwei Möglichkeiten (s. oben): Homologe Rekombination und Base-Editing. Bei der Sichelzellanämie ist die Mutation nicht mit den derzeitigen Base Editoren zu korrigieren und das gleiche gilt auch für viele der Mutationen für die  $\beta$ -Thalassämie. Reparatur durch homologe Rekombination ist auch in hämatopoetische Stammzellen recht ineffizient, so dass nur ca. 30% der Zellen am Ende das gewünschte korrigierte Gene haben<sup>218</sup>.

Die Lösung dieses Problems liegt in der gut verstandenen Biologie der Genregulation des menschlichen Hämoglobin-Lokus, die in jahrelanger Grundlagenforschung aufgeklärt wurde. Es ist schon lange bekannt, dass im menschlichen Embryo statt  $\beta$ -Globin ein spezielles fetales  $\gamma$ -Globin produziert wird.  $\beta$ -Thalassämie Patienten, die auch nach der Geburt weiter  $\gamma$ -Globin produzieren, haben einen viel milderen Krankheitsverlauf. Der Switch von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globin wird durch das Binden eines bestimmten Proteins (BCL11A) an eine bestimmte Sequenz in der Nähe der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globin Gene ausgelöst<sup>219</sup>. Da es mit CRISPR einfacher ist, wichtige Sequenzen zufällig zu verändern, als zu genau zu reparieren, war es schnell klar, dass diese Bindestelle ein ideales Ziel für Genome-Editing ist. Mit entsprechend optimierten sgRNAs und experimentellen Bedingungen kann man die BCL11A Bindestelle mit einer Effizienz von über 75% zerstören und damit die Produktion von  $\beta$ -Globin aus und die von  $\gamma$ -Globin anschalten<sup>220</sup>.

Mittlerweile testen mindestens drei Firmen auf BCL11A abzielende Therapien für  $\beta$ -Thalassämie und Sichelzellanämie am Menschen (*Sangamo(USA)/Sanofi(F)* (ZFN)<sup>221</sup>, *Intellia (USA)/Novartis(CH)* (CRISPR-Cas9)<sup>219</sup>, *CRISPR Therapeutics(CH)/Vertex (USA)* (CRISPR-Cas9)<sup>222,223</sup>). *CRISPR Therapeutics* und *Vertex* haben für die ersten zwei Patienten schon positive Ergebnisse in einer Pressemitteilung veröffentlicht. In den ersten 9 Monaten brauchte der/die  $\beta$ -Thalassämie Patient\*in keine Bluttransfusion mehr (davor im Durchschnitt 16.5 pro Jahr) und der/die Sichelzellanämie Patient\*in hatte keine Sichelzellkrise mehr (davor im Durchschnitt 7 pro Jahr).<sup>224,225</sup>

Da das Isolieren und Transplantieren von hämatopoetische Stammzellen klinisch etabliert ist und es bereits effiziente Protokolle für Genome-Editing in ihnen gibt, verwundert es nicht, dass es weitere Therapieansätze für genetische Krankheiten gibt, für die klinische Studien entweder bereits laufen oder die Entwicklung in späten vorklinischen Phasen ist. Zur ersten Gruppe gehören zwei weiteren Studien zur HIV Therapie<sup>226–228</sup>. Zur zweiten ein weiterer Therapieansatz für  $\beta$ -Thalassämie und Sichelzellanämie<sup>229</sup>, sowie Therapien verschiedener Erbkrankheiten des Immunsystems z.B. septische Granulomatose<sup>230,231</sup>, Wiskott-Aldrich Syndrom<sup>232</sup> oder X-chromosomal schwerer kombinierter Immundefekt<sup>233</sup>. Bei den beiden letzteren setzen Forscher\*innen auf eine Reparatur des genetischen Defekts mittels homologer Reparatur und es wird sich zeigen, ob die erreichbaren Effizienzgrade ausreichen um einen therapeutischen Erfolg zu gewährleisten.

Die mit Abstand größte Gruppe laufender Gene-Editing Studien findet sich im Gebiet der Krebs-Immuntherapie. Hier werden von verschiedenen Firmen und Forschungsgruppen alle bisher bekannten Methoden zum gezielten Verändern von Genomen angewandt (CRISPR, TALENs, ZFNs und Meganukleasen). Das Gebiet der Immuntherapie ist eines der am schnellsten wachsenden Gebiete der

medizinischen Forschung mit Hunderten von derzeit laufenden klinischen Studien<sup>234</sup> und einer riesigen Anzahl vorklinischer Experimente<sup>235,236</sup>. Eine komplette Diskussion der verschiedenen Ansätze und wie Genome-Editing zu ihrem Erfolg beitragen kann, würde hier zu weit führen, aber es soll exemplarisch verdeutlicht werden, welche Rolle CRISPR und andere Genome-Editing Werkzeuge spielen (Abbildung 8).

Das große Interesse an Krebstherapie mit biotechnologisch modifizierten Immunzellen liegt im großen Erfolg, den modifizierte T-Zellen bei der Behandlung verschiedener Leukämien erzielen, begündet<sup>237-239</sup>. T-Zellen sind ein zentraler Teil des Immunsystems, die z.B. Tumor oder virusinfizierte Zellen erkennen und töten können. Da dies wie bei Tumorerkrankungen nicht immer richtig funktioniert, ist die Idee hinter diesem Therapieansatz, dass man T-Zellen im Reagenzglas mit einem künstlichen Erkennungsmolekül (entweder einem T-Zell-Rezeptor oder einem Chimeric Antigen Rezeptor) ausstattet, das bekannte Merkmale der Krebszellen erkennt und die T-Zelle in die Lage versetzt, die Krebszelle zu töten. Diese Zellen, als Car-T-Zellen bekannt, werden dann im Labor vermehrt und wieder in die Patienten eingeführt.

Das Einführen der künstlichen oder von anderen Patienten isolierten T-Zell-Rezeptor Gene in T-Zellen geschieht klassischerweise mit Methoden der Gentherapie, die auf modifizierten Lenti-<sup>240</sup> oder Retroviren beruhen<sup>241</sup>. Diese Viren bauen das gewünschte Gen in das Genom der Zellen ein, tun dies aber nicht zielgerichtet immer am selben Ort. Damit findet der Einbau unter Umständen in oder in der Nähe von Genen statt, die für die Entwicklung von Tumoren wichtig sind und der Tumorentwicklung Vorschub leisten könnte. Während bei T-Zellen bisher noch keine schwerwiegenden Probleme mit diesen Methoden aufgetaucht sind (nach über 500 Patientenjahren)<sup>242,243</sup>, ist aus hämatopoetischen Stammzellen bekannt, dass zumindest die Möglichkeit einer Tumorentwicklung, die durch solche ungewünschten Integrationen vorgetrieben wird, besteht<sup>244</sup>. Eine Möglichkeit, um die Sicherheit der modifizierten T-Zellen zu erhöhen, ist Genome-Editing dazu zu benutzen, die therapeutischen Gene an Stelle der endogenen T-Zell Rezeptoren über homologe Reparatur in das Genom einzuschleusen<sup>245,246</sup>. Neben der erhöhten Sicherheit sorgt es auch dafür, dass die Produktion der neuen Rezeptoren genauso reguliert wird wie die der natürlichen, was zumindest im Tiermodell die Wirksamkeit der Therapie erhöht<sup>245</sup>.

Genome-Editing kann auch dazu benutzt werden, die Effektivität der Therapie anderweitig zu erhöhen. Für T-Zellen sind eine Reihe von Signalmolekülen („Checkpoint Moleküle“) bekannt, die Tumore dazu benutzen, die T-Zellen in einen Ruhezustand zu versetzen und damit sowohl körpereigene als auch therapeutische T-Zellen unwirksam zu machen. Gerade bei der Immuntherapie solider Tumore ist das ein großes Problem und sorgt dafür, dass T-Zell-Therapien bisher nur in verschiedenen Blutkrebsarten erfolgreich waren. Mittlerweile gibt es eine Reihe von Medikamenten, die an diesen sogenannten Checkpoints angreifen<sup>236</sup>, aber auch Genome-Editing kann einen Beitrag leisten, um diesen Resistenzmechanismus bei T-Zell Therapien zu umgehen. Die Checkpoints werden durch die Interaktion von Signalmolekülen der Tumorzellen mit entsprechenden Rezeptoren an der Oberfläche der T-Zellen ausgelöst<sup>245</sup>. Eine naheliegende Idee ist es, die Gene für die entsprechenden Rezeptoren auszuschalten und die T-Zelle damit für die negativen Einflüsse des Tumors unempfindlicher zu machen. Diese Strategie wurde erfolgreich in Mausmodellen getestet<sup>247-250</sup> und ist nun Gegenstand klinischer Studien<sup>251-254</sup>. Erste Ergebnisse zeigen die Sicherheit des Ansatzes, auch wenn sich über die Effektivität noch wenig sagen lässt<sup>88</sup>.

Einen noch größeren Beitrag könnte Genome-Editing bei der Entwicklung von universal verwendbaren Car-T-Zellen spielen. Während T-Zell Therapien in der Klinik sehr erfolgreich sein können, ist ein großes praktisches Problem, dass sie im Moment aus patienteneigenen Zellen hergestellt müssen. Bei vielen Patienten kann die Gewinnung eigener T-Zellen problematisch sein, weil die T-Zell Anzahl oder Funktion durch den Tumor selbst oder vorangegangenen Behandlungen niedrig ist<sup>255</sup>, was dazu führen kann, dass die Produktion von Car-T-Zellen fehlschlägt<sup>256</sup>. Auch dauert die Herstellung der individualisierten Zellen ca. 3 Wochen<sup>257</sup>, was bei aggressiven Tumoren zu lange sein kann. Zusätzlich ist die personalisierte Behandlung mit sehr hohen Kosten verbunden (ca. 320.000 € pro Behandlung<sup>256</sup>).

Um diese Problem zu lösen wäre es erstrebenswert, die Car-T-Zellen in großem Maßstab unter kontrollierten Bedingungen, z.B. aus pluripotenten Stammzellen, herstellen zu können. Damit wäre es leichter, eine gleichbleibende Qualität für alle Patienten sicherzustellen, die Zellen wären in gefrorenem Zustand jederzeit verfügbar und es wäre möglich zusätzliche Dosen zu geben. Außerdem wären bei industrieller Produktion große Kosteneinsparungen möglich.

Die Verwendung von allogenen T-Zellen (d.h. Zellen aus einer anderen Quelle als dem Patienten selbst) hat allerdings zwei große Nachteile. Zum einen, tragen diese Zellen noch ihre ursprünglichen T-Zell-Rezeptoren, die nach Transplantation in einen neuen Organismus diesen als fremd erkennen und damit zu schwerwiegenden Komplikationen führen können (Graft-versus-Host-Reaktion)<sup>257-259</sup>. Zum anderen, erkennt das Patientenimmunsystem die T-Zellen als fremd und stößt diese ab, was die Lebensdauer der therapeutischen Zellen und damit ihre Effektivität stark einschränkt<sup>243,257,260</sup>.

Genome-Editing bietet eine Möglichkeit beide Probleme anzugehen. Die Wahrscheinlichkeit einer Graft-versus-Host-Reaktion kann reduziert werden, indem die Produktion des endogenen T-Zell-Rezeptors unterbunden wird. Dies wurde mit fast allen bekannten Genome-Editing Werkzeugen bereits gemacht<sup>261-263,263-265</sup>. Wie oben erwähnt kann man auch das neue T-Zell-Rezeptor Gen, anstelle des natürlichen Gens, einschleusen, wobei gleichzeitig die Produktion des alten Proteins unterbunden wird<sup>245,266</sup>. Bis zu 80% der T-Zellen tragen am Ende dieses Prozesses keinen T-Zell-Rezeptor mehr und T-Zell-Rezeptor positive Zellen können auch noch im Nachhinein entfernt werden. In vorklinischen Tiermodellen wurden diese Strategien bereits erfolgreich angewendet<sup>257,265</sup>. Mehrere klinische Studien mit T-Zellen ohne endogene T-Zell-Rezeptor-Produktion laufen zurzeit (z.B. <sup>253,267-270</sup>), oft kombiniert mit dem knockout inhibitorischer Rezeptoren oder mit Modifikationen, die das Eliminieren nicht-genomveränderter Zellen erleichterten. Mit CRISPR gibt es bisher gibt nur vorläufige Ergebnisse einer Phase-I Studie<sup>88</sup>, die zeigen, dass es in kleinen Gruppen von Patienten, keine sicherheitsrelevante Nebenwirkungen gab. Größere Studien sind nötig, um klinische Wirksamkeit und Sicherheit zu etablieren. In zwei Studien mit T-Zellen, bei denen die T-Zell-Rezeptoren mit TALEN ausgeschaltet wurden, konnte bei 5 von 6 bzw. 8 von 10 Leukämie-Patienten eine komplette Remission erreicht und keine Graft-versus-Host-Reaktion beobachtet werden (diese Daten sind vorläufig und noch nicht peer reviewed)<sup>258,271</sup>.

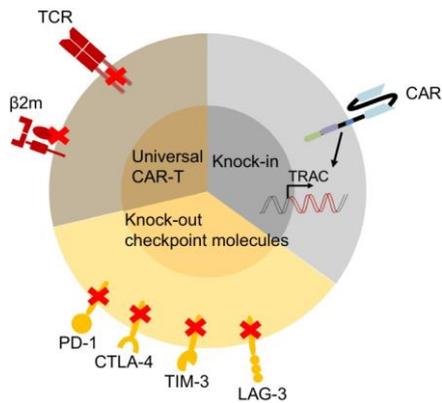


Abbildung 8: Anwendungen von Genome-Editing in der T-Zell Therapie von Tumoren (Illustration aus<sup>272</sup>)

Die Lebensdauer von allogenen Car-T-Zellen wird durch Genome-Editing Methoden verlängert, indem die Produktion von Oberflächenmolekülen verhindert wird, die vom Immunsystem des Patienten erkannt werden. Die wichtigsten dieser Moleküle sind die Humanen Leukozytenantigene (HLA), von denen jeder Mensch mehrere Varianten besitzt. Zellen, die eine Variante an der Oberfläche tragen, die nicht denen des Patienten entspricht, werden vom Patientenimmunsystem attackiert. Dies macht es z.B. bei Organtransplantationen nötig, diese HLA Merkmale zwischen Spender und Empfänger genau abzugleichen. Um universelle T-Zellen zu erschaffen wird nun das Ausschalten eines Gens erprobt, das für die Produktion aller für die initiale Abstoßung von T-Zellen HLA Proteine essentiell ist ( $\beta_2$ -microglobulin, Teil der sogenannten Typ I HLAs). Diese Strategie wurde mit verschiedenen Editing Werkzeugen in Tiermodellen validiert<sup>262,273</sup> und wird in China bereits klinisch getestet<sup>232</sup>, während andere klinische Studien in Europa und den USA noch in Vorbereitung sind<sup>258</sup>.

Eine letzte Gruppe von gesellschaftlich wichtigen Krankheiten, die potentiell mit *ex vivo* Genom-veränderten Immunzellen behandelt werden können, soll hier nicht unerwähnt bleiben. Hierbei handelt es sich um Autoimmunkrankheiten (die ca. 5-8% der Bevölkerung betreffen<sup>274</sup>, z.B. rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose) oder Krankheiten, die durch eine fehlgeleitete Immunantwort ausgelöst oder verschlimmert werden (Allergien, Immunantworten gegen Therapeutika). Das Immunsystem verfügt über eine Klasse von Zellen, die sogenannten T-regulatorischen Zellen ( $T_{reg}$ ), die in der Lage sind Immunreaktionen gegen bestimmte Merkmale zu unterdrücken. Die therapeutische Entwicklung von Genom-modifizierten  $T_{regs}$  ist noch in frühen Stadien<sup>275</sup>, aber potentiell nützlich, da die Möglichkeit diese Krankheiten mit klassischen Methoden zu behandeln, beschränkt ist.

### In vivo Therapien

Viele Krankheiten lassen sich nicht dadurch behandeln, dass man Zellen aus dem Körper des Patienten isoliert und dort verändert. Stattdessen muss die Genveränderung direkt im Patienten erfolgen (*in vivo*), was eine Reihe weiterer Schwierigkeiten mit sich bringt. Zum einen können die veränderten Zellen nicht mehr überprüft werden, bevor sie in den Patienten gelangen, was die Ansprüche an die Sicherheit der Genome-Editing Werkzeuge erhöht. Zum anderen muss die gesamte Maschinerie zum

Verändern des Genoms in eine, je nach Krankheit unterschiedlich große, Zahl von Zellen in bestimmten Geweben eingebracht werden. Das Einbringen von großen Molekülen in Körperzellen ist eine der größten Herausforderungen der biomedizinischen Forschung (s. unten). Besonders für CRISPR-basierte Ansätze kann auch die Präsenz des Immunsystems eine große Herausforderung sein (s. unten).

Während bei *ex vivo* Anwendungen Therapien gegen Krebs und Sichelzellanämie/  $\beta$ -Thalassämie dominieren, ist das Spektrum möglicher Anwendungen *in vivo* größer. Allerdings sind die meisten Programme weniger weit fortgeschritten.

Der derzeitige Stand der Entwicklung sei hier in einigen charakteristischen Beispielen aufgeführt.

Auch bei *in vivo* Therapien stand zunächst die Behandlung genetischer Krankheiten im Vordergrund. Historisch gesehen machte wieder die US-amerikanische Firma *Sangamo* den Anfang, als sie versuchte ein Gen, das bei Patienten mit Morbus Hunter defekt ist, gezielt in das Genom von Leberzellen einzuführen. Hierzu wurden die Gene zweier ZFNs und das einzufügende Gen in drei verschiedene Viren eingebaut, die diese in Leberzellen einbringen sollten. Das therapeutische Gen sollte dann zielgenau zwischen die beiden Schnitte der ZFNs eingefügt werden. Trotz positiver Daten in Tierversuchen<sup>276</sup> waren die Ergebnisse in Patienten enttäuschend<sup>43</sup>, wahrscheinlich weil der Therapieansatz mit drei verschiedenen Komponenten zu kompliziert war. Das Programm ist mittlerweile in dieser Form eingestellt. Momentan wird ein Ansatz, der mit nur zwei Komponenten auskommt, entwickelt<sup>87</sup>. Ein ähnlicher Ansatz wird derzeit noch zur Behandlung von Hämophilie B getestet<sup>232</sup>. Ergebnisse hierzu stehen noch aus.

Die erste *in vivo* Anwendung von CRISPR-Cas9 hat sich ein etwas einfacheres Ziel gesetzt. Statt ein Gen einzuführen, wollen die Forscher\*innen der Firmen *Editas* (US) und *Allergan* (Ire) einen Teil eines Gens entfernen. In einer klinischen Studie<sup>277</sup>, in der Anfang 2020 die ersten Patienten behandelt wurden, wird eine spezielle Form der Leberschen Kongenitalen Amaurose (LCA), der häufigsten Ursache von genetischer Blindheit (ca. 3 Fälle pro 100.000 Geburten), therapiert. Konkret handelt es sich um Lebersche Kongenitalen Amaurose Typ 10 (LCA10), bei der das Prozessieren der mRNA eines Gens gestört ist, das für die Entwicklung und Funktion der lichtempfindlichen Zellen (Photorezeptoren) in der Netzhaut essenziell ist. LCA10 ist für ca. 30% der LCA verantwortlich und im Gegensatz zu anderen LCA Typen nicht durch Gentherapie behandelbar, weil das verantwortliche Gen zu groß ist<sup>278</sup>. Die verantwortliche Mutation liegt in einem Teil des Gens, der vor Produktion des Proteins aus der entsprechenden mRNA herausgeschnitten wird (splicing). Durch die Mutation wird dieser Prozess gestört und die veränderte mRNA kodiert nur noch für ein verkürztes Protein<sup>279</sup>. Da die Mutation in einem Teil des Gens liegt, der nicht für das Protein kodiert, war die Idee der Forscher\*innen bei *Editas*, nicht die Mutation zu korrigieren, was mit homologer Reparatur wegen ihrer Ineffizienz schwierig und mit Base Editing nicht möglich wäre, sondern den Teil des Gens mit der Mutation einfach so herauszuschneiden, dass die mRNA wieder normal prozessiert wird. Zwei optimierte sgRNAs und die kleine Cas9 Variante aus *Staphylococcus aureus* werden hierzu in ein Virus gepackt und in die Retina gespritzt. In explantierten menschlichen Netzhäuten, einem Mausmodell der Krankheit und Affen wurden so in bis zu 60% der Photorezeptoren die Mutation beseitigt<sup>279</sup>. Daten aus der klinischen Studie am Menschen liegen noch nicht vor.

Es ist kein Zufall, dass die erste *in vivo* Anwendung von CRISPR-Cas9 im Auge stattfindet. Zum einem ist es durch die schon zugelassene Gentherapie für Lebersche Kongenitalen Amaurose Typ 2<sup>280</sup> wahrscheinlich, dass sich auch die Genome-Editing Werkzeuge in die Netzhautzellen einbringen lassen.

Zum anderen bietet das Auge verschiedene Vorteile. Weil es immunprivilegiert ist, ist eine Immunantwort auf fremde Proteine unwahrscheinlich. Da die direkte Verbindung durch Blutgefäße zu anderen Organen eingeschränkt ist, bleibt die Wirkung der Therapie auf das Auge beschränkt. Auch sind Photorezeptoren sehr langlebig, weshalb ein therapeutischer Erfolg prinzipiell ein Leben lang anhalten sollte<sup>87</sup>.

In vorklinischen Studien werden eine Reihe weiterer Anwendungen bei genetischen Krankheiten vorbereitet. Beispielhaft sei hier die häufigste muskuläre Erbkrankheit, Duchenne-Muskeldystrophie (ca. 1 in 3.600–6.000 männlicher Lebendgeburten<sup>281</sup>) genannt, bei der verschiedene Gruppen zeigen konnten, dass sich in Maus-<sup>282–287</sup> und Hundemodellen<sup>288</sup> der Krankheit eine deutliche Besserung der Symptome durch CRISPR-Cas9 erreichen ließ.

Wie in anderen Fällen, ist es auch bei der Duchenne-Muskeldystrophie schwer, die eigentlichen Mutationen (auch bei dieser Krankheit gibt es viele verschiedene) zu korrigieren. Erschwerend kommt in diesem Fall hinzu, dass sich Muskelzellen nicht mehr teilen und homologe Rekombination deshalb kaum noch stattfindet. Bei ca. 80% der Patienten kann es jedoch helfen, gezielt einzelne Teile des Gens zu entfernen oder die Zellen durch zusätzlich eingeführte Mutationen dazu zu bringen, im Rahmen des normalen Prozessierens von mRNA entsprechenden Teilen herauszuschneiden. Verschiedene Firmen arbeiten an Duchenne Genome-Editing Therapien, aber klinische Studien sind noch nicht angekündigt (z.B. <sup>289–291</sup>).

Bevor wir uns *in vivo* Behandlungsmöglichkeiten nicht-genetischer Krankheiten zuwenden, sei noch eine letzte geplante Studie erwähnt, die noch dieses Jahr mit der klinischen Phase beginnen soll<sup>292</sup>. *Intellia* und *Regeneron* (beide USA) planen eine Genome-Editing Therapie der seltenen Transthyretin-bedingte ATTR-Amyloidose. Diese Krankheit wird entweder durch Mutationen im Gen für das Protein Transthyretin oder durch meist unbekannte andere Einflüsse ausgelöst und sorgt dafür, dass sich das Protein in unlöslichen Fasern in Geweben ablagert. Dies führt bei Patienten zu einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome in verschiedenen Organen. Das Ziel ist es, die Produktion des Proteins durch das Ausschalten des entsprechenden Gens in einer möglichst großen Anzahl von Zellen zu verhindern. Im Gegensatz zu anderen Krankheiten, lag der Grund für die Entscheidung genau diese Krankheit zu behandeln nicht in der Abwesenheit anderer Therapiemöglichkeiten. Im Gegenteil sind schon zwei, auf ganz anderen Modalitäten beruhende Medikamente zugelassen, die aber auch die Produktion des relevanten mutierten Genprodukts verhindern (siRNA und antisense RNA<sup>293,294</sup>). Die Verantwortlichen gehen davon aus, dass die Tatsache, dass die biologische Grundlage der Krankheit bereits verstanden und ausgenutzt wurde, das Risiko der Entwicklung deutlich reduziert<sup>87</sup>. In Mausmodellen gelang es bis zu 97% der Transthyretin Produktion in der Leber, dem Hauptproduktionsort, dauerhaft zu unterbinden<sup>292</sup>.

Bei nicht-genetischen Krankheiten sind Indikationen im Bereich der Infektionskrankheiten am weitesten fortgeschritten.

In diesem Feld hat die US-amerikanische Firma *Locus Biosciences* einen Ansatz zur Bekämpfung antibiotikaresistenter bakterieller Harnwegsinfektionen entwickelt und eine klinische Studie gestartet<sup>295</sup>. Dabei werden Bakterien infizierende Viren (Bakteriophagen) dazu genutzt, gezielt krankmachende Bakterien zu töten. Während die Idee Bakteriophagen zur anti-bakteriellen Therapie zu nutzen schon über 100 Jahre alt ist<sup>296</sup>, bietet die Entdeckung der CRISPR Systeme weitere Möglichkeiten deren Wirkung zu verstärken und zielgenauer zu machen. Die Idee von *Locus*

*Biosciences* ist es, das eingebaute CRISPR-Cas Verteidigungssystem der Bakterien gegen die Bakterien selbst zu verwenden. Hierbei setzen die Forscher\*innen auf CRISPR-Cas3, das im Gegensatz zu Cas9 keinen sauberen Schnitt in der DNA macht, sondern lange Abschnitte der DNA abbaut und irreparabel beschädigt. *Locus Biosciences* identifiziert Phagen, die das gewünschte Bakterium erkennen (im Fall der derzeitigen Studie *E. coli*) und statten sie mit einer RNA aus, die das endogene Cas3 der Bakterien dazu bringt, das eigene Erbgut des Bakteriums zu schneiden und abzubauen. Nichtsdestotrotz kann in den meisten Fällen das Bakterium noch hunderte weitere Phagen produzieren, die dann weitere Bakterien befallen und töten können<sup>297</sup>. Sowohl *in vitro* als auch in einem Mausmodell sind die so bewaffneten Phagen deutlich effektiver als die Phagen alleine<sup>297</sup>.

Der CRISPR-basierende antibakterielle Ansatz, den *Locus Biosciences* verfolgt ist, nicht der einzige, der derzeit entwickelt wird, auch wenn er der erste ist, der in der Klinik getestet wird. *Eligo Bioscience* in Paris versucht, noch spezifischere Methoden zu entwickeln. Neben dem Ziel krankmachende Bakterien zu töten, arbeiten sie unter anderem auch daran, z.B. Antibiotikaresistenzgene aus Populationen zu entfernen. Hierzu verwenden sie Phagen, die mit Cas9 und speziellen sgRNAs ausgestattet sind<sup>298,299</sup>. *Nemesis Biosciences* setzt auf ein System, bei dem therapeutische DNA initial mit Phagen in Bakterien eingebracht wird, sich dann aber von Bakterium zu Bakterium weiterverbreitet. Die DNA kodiert z.B. für Cas9 und sgRNAs, die Antibiotikaresistenzgene inaktivieren und damit Bakterien wieder für Antibiotika sensitiviert<sup>296</sup>.

Nicht zuletzt wurde vor kurzem ein Ansatz vorgestellt, der auf Cas13 beruht. Cas13a erkennt eine spezielle Sequenz in RNA (nicht DNA) und zerstört nach der initialen Erkennung unspezifisch alle RNAs im Bakterium unabhängig von ihrer Sequenz. Programmiert man Cas13 darauf RNAs pathogener Bakterien zu erkennen, kann es diese sehr effektiv töten<sup>300</sup>.

Auch für virale Erkrankungen sind *in vivo* Gene Editing Therapien in Vorbereitung. Ziel ist hier die virale DNA, die Viren in den Zellkern oder das Genom befallener Zellen einschleusen und die dort verweilt, bis sie reaktiviert wird, um neue Viren zu produzieren. So bereitet *Excision Biotherapeutic* eine klinische Studien vor, um HIV Proviren mit Hilfe von CRISPR-Cas9 aus Patientengenomen zu entfernen<sup>301</sup>. Ähnliches plant *Precision Biosciences* (USA) für Hepatitis B mit Meganukleasen<sup>302</sup>.

Noch fern von klinischen Studien ist die Behandlung von viralen Erkrankungen, die durch RNA Viren ausgelöst werden. Hier wurde zumindest in Zellkultur gezeigt, dass RNA abbauendes Cas13 spezifisch die Vermehrung mehrerer RNA Viren unterbinden kann. *In vivo* Studien stehen noch aus, aber dieser Ansatz könnte wertvoll sein, um bei zukünftigen Pandemien schnell Therapien entwickeln zu können, da im Prinzip die Sequenz eines neuen Virus reicht, um eine bestehende Therapie anzupassen<sup>303</sup>.

Eine weitere *in vivo* Anwendung von CRISPR-Cas9 bei infektionsbedingten Tumoren befindet sich eventuell bereits in klinischen Studien. Hierbei handelt es sich um eine Therapie von Gebärmutter-schleimhauttumoren, die durch humane Papillomviren ausgelöst werden. Die Therapie beruht auf der Beobachtung, dass Papillomviren ihre Genome in das der Wirtszellen integrieren, was für die Tumorentwicklung essenziell ist. Das Ausschalten der integrierten viralen Gene verlangsamt Zellwachstum und hat therapeutische Effekte in Mausmodellen<sup>304-306</sup>. Entsprechende klinische Studien, bei denen die Genome-Editing Werkzeuge (ZFNs, TALENs und CRISPR-Cas9) mit Hilfe eines Gels an die Schleimhaut geliefert werden sind zwar in China angemeldet<sup>307-309</sup>, aber der derzeitigen Status, und ob Patienten diese Therapie bereits erhalten haben, ist nicht bekannt.

Bei chronischen Krankheiten gibt es bisher nur wenige ernsthafte Entwicklungsprogramme zur Therapie durch Genome-Editing Methoden. Nur bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen gibt es interessante Studien in Mäusen und Affen, die zeigen, dass man durch gezieltes Ausschalten eines Gens der Cholesterinsynthese in der Leber den Spiegel des LDL („schlechten“) Cholesterins deutlich senken kann. Zumindest eine Kopie des Gens (PCSK9) ist bei ca. 2% der Menschen natürlich defekt, was zu einer bis zu 88% Reduzierung des Risikos von koronaren Herzkrankheiten führt<sup>310</sup>. PCSK9 wurde in Mäusen mit CRISPR-Cas9<sup>65</sup> und Base Editoren<sup>311</sup> und in Affen mit Base Editoren<sup>312</sup> und Meganuklease<sup>313</sup> ausgeschaltet, was in allen Fällen zu einer deutlichen Reduktion des LDLs im Blut führte. Klinische Studien werden von Verve (USA) und *Precision Biosciences* (USA) vorbereitet. Verve gelang es auch mit Base Editing in den Lebern von Affen ein Gen für die Synthese von Triglyzeriden, eines weiteren Risikofaktors für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, mit großer Effizienz auszuschalten.

Es scheint als ob Base Editing bald sein Debüt in der Klinik geben könnte, wenn nicht bei der Reduktion von Blutfetten, vielleicht bei der  $\beta$ -Thalassämie und Sichelzellanämie<sup>314</sup>, genetischer Taubheit<sup>315</sup> oder amyotrophe Lateralsklerose<sup>316</sup>.

Eine letzte potenzielle Anwendung sei noch erwähnt: Der Mangel an Spenderorganen ist ein großes Problem in allen Industrienationen. Seit Langem steht daher die Idee im Raum, Tierorgane in Menschen zu transplantieren (Xenotransplantation). Gerade Organe aus Schweinen sind physiologisch ihren menschlichen Äquivalenten ähnlich genug, um in Betracht gezogen zu werden. Organe von genveränderten Schweinen wurden schon in Affen transplantiert und überlebten dort für bis zu 5 Monate<sup>317</sup>. Bevor man an Transplantationen in Menschen denken kann, müssen allerdings noch weitere Genveränderungen vorgenommen werden, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden und Sicherheit zu gewährleisten. Die US-amerikanische Firma *eGenesis* hat sich zum Ziel gesetzt, mit Hilfe der Fähigkeit von CRISPR-basiertem Genome-Editing gleichzeitig mehrere Gene pro Generation auf einmal zu verändern, Schweine zu züchten, deren Organe man in Menschen verpflanzen kann. 2015 zeigte die Firma, dass man mit Hilfe von CRISPR-Cas9 62 endogene Retroviren im Genom von Schweinen ausschalten kann, von denen befürchtet wird, dass sie nach einer Transplantation in den Menschen wieder aktiv werden könnten<sup>318</sup>.

## Diagnostik

Nicht erst seit Beginn der Covid-19 Pandemie ist klargeworden, wie wichtig schnelle, sensitive und spezifische diagnostische Tests für die medizinische Praxis sind. Um Nukleinsäuren (DNA und RNA) von Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten), Tumorzellen oder Tatverdächtigen (Forensik) in Patienten oder Umweltproben sicher nachweisen zu können, werden heute standardmäßig noch Polymerase-Kettenreaktion-basierende Verfahren eingesetzt, einer fast 40 Jahre alte Technologie, die zwar sehr sensitiv und spezifisch, aber auch langsam und teuer ist und nur in speziellen Laboren mit geeigneter Ausstattung ausgeführt werden kann.

In den letzten Jahren wurden zwei wichtige CRISPR-basierte Methoden vorgestellt, die bei gleichen analytischen Eigenschaften die Detektion von Nukleinsäuren beschleunigen und soweit vereinfachen, dass zumindest in jeder Arztpraxis der Test ausgeführt werden kann.

Die beiden Methoden nennen sich Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing (SHERLOCK)<sup>319</sup> und DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter (DETECTR)<sup>320</sup> und werden von den US-amerikanischen Firmen *Sherlock Biosciences* und *Mammoth Biosciences* weiterentwickelt und vermarktet. Beide Methoden nutzen die Eigenschaft der CRISPR-Enzyme Cas13 (Sherlock) und Cas12a (DETECTR) nach Erkennung ihrer Zielsequenz nicht nur diese zu schneiden, sondern auch beliebige einzelsträngige RNA bzw. einzelsträngige DNA abzubauen. Die Idee hinter den Methoden ist, dass die CRISPR Enzyme mit einer geeigneten guideRNA programmiert werden, eine spezifische DNA oder RNA zu erkennen. Wenn diese in der Probe vorhanden ist (Nukleinsäuren müssen unter Umständen aufgereinigt und vermehrt werden), bindet und aktiviert sie das CRISPR Enzym. In der Detektionslösung befindet sich auch noch eine einzelsträngige RNA bzw. einzelsträngige DNA an deren einem Ende sich ein Fluoreszenzfarbstoff befindet und am andern ein Molekül, das diesen Farbstoff inaktiviert (Quencher). Solange Quencher von RNA oder DNA in räumlicher Nähe gehalten werden, kann der Farbstoff nicht leuchten, sobald aber das aktivierte Enzym durch seine unspezifische Aktivität die Verbindung durchschneidet entfernen sich Quencher und Farbstoff voneinander und die Probe beginnt zu leuchten.

Beide Methoden lassen sich als sogenannter Lateral Flow Test (gleiches Format wie bei einem Schwangerschaftstest) betreiben, was sie einfach und universell einsetzbar macht. Die Methoden haben schon demonstriert, dass sie nah verwandte Viren unterscheiden können<sup>321,322</sup> oder Tumorspezifische Mutationen in Blutproben von Patienten<sup>323</sup> detektieren können. Die Ergebnisse liegen innerhalb von weniger als zwei Stunden vor und Spezifität und Sensitivität stehen der PCR in nichts nach.

Mit aufwendigeren Detektionsapparaten kann man Proben auch auf mehr als 4.500 verschiedenen Zielsequenzen auf einmal untersuchen<sup>324</sup> (damit kann man eine Probe in einem Durchlauf auf alle ca. 1.400 bekannten menschlichen Krankheitserreger<sup>325</sup> untersuchen).

Sowohl *Mammoth* als auch *Sherlock* haben von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA eine „Emergency Use Authorization“ zur Diagnose von SARS-Covid2 bekommen<sup>326,327</sup>.

## Zusammenfassung

- Genome-Editing Therapien werden seit fast 10 Jahren in der Klinik getestet
- Werkzeuge, die auf CRISPR und anderen Genome-Editing Verfahren basieren, werden eingesetzt um das Genom von Patientenzellen außerhalb (*ex vivo*) und innerhalb des Körpers (*in vivo*) zu verändern
- Bei den *ex vivo* Therapien befinden sich zahlreich Ansätze zur Therapie zweier genetischer Krankheiten roter Blutkörperchen ( $\beta$ -Thalassämie und Sichelzellanämie) und zur Optimierung von Krebs Immuntherapien in klinischen Studien
- Therapien für andere genetische Krankheiten werden in Tiermodellen getestet
- Bei *in vivo* Therapien sind die Anforderungen an die Sicherheit und Effizienz der Therapien größer und es ist schwieriger, die nötigen Werkzeuge in die richtigen Zellen zu bringen
- Klinische Studien zu Behandlung verschiedener Erb- und Infektionskrankheiten laufen derzeit und weitere sind in Vorbereitung

- Bisher wurde noch keine Genome-Editing Therapie zugelassen oder befindet sich in einer Phase 3 Studie, bei der die Wirksamkeit endgültig überprüft wird
- Bisher gibt es noch keine Berichte über schwere Nebenwirkung, die auf das Editieren von Genomen zurückzuführen sind
- CRISPR Methoden werden auch zu Diagnostik eingesetzt

## Drug Delivery

Eines, wenn nicht das zentrale Problem für alle modernen Therapieverfahren ist die Frage, wie man große Moleküle im Körper von Patienten in das Innere von Zellen bringt. CRISPR-basierende Methoden bilden hier keine Ausnahme. CRISPR-Cas Enzyme und sgRNAs sind große geladene Moleküle, die nicht von alleine über die Zellmembran in Zellen gelangen oder sich im Körper gleichmäßig verteilen.

Prinzipiell werden zwei Klassen von Methoden angewendet, um Genome-Editing Werkzeuge in Zellen einzubringen:

- 1) Viren und von Viren abgeleitete Vektoren
- 2) Synthetische Komplexe

*Ex vivo* kommen noch physikalische Methoden wie Mikroinjektion oder Elektroporation hinzu. Bei der Mikroinjektion wird eine Lösung mit den gewünschten Proteinen und Nukleinsäuren direkt in die Zellen gespritzt. Bei der Elektroporation werden durch Anlegen einer Spannung, transiente kleine Löcher in der Zellmembran geschaffen, durch die Moleküle in die Zelle eindringen können. Elektroporation wird z.B. bei T-Zellen<sup>266</sup> und hämatopoetische Stammzellen<sup>328</sup> verwendet, Mikroinjektion in Embryos<sup>328</sup>.

*In vivo* müssen die Genome-Editing Werkzeuge auf dem Weg zu ihren Zielzellen eine Reihe von Hindernissen überwinden. Hierzu zählen Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen), die größere Partikel aufnehmen und inaktivieren, Proteasen und Nukleasen (Enzyme die Proteine und Nukleinsäuren abbauen), spezifische und unspezifische Immunantworten, die Ausscheidung durch Niere und Darm, und physikalische Anreicherung in anderen Organen als dem gewünschten. Zu guter Letzt muss auch das Blutsystem verlassen und die Zellmembran überwunden werden, um in das Innere der Zelle zu gelangen<sup>329</sup>.

## Viren

Modifizierte Viren sind noch immer die gängigste Methode, um Genome-Editing Werkzeuge an bestimmte Zellen zu liefern. Viren haben sich seit Jahrmillionen entwickelt, um all die oben beschriebenen Hindernisse zu überwinden, die zwischen ihrer Zielzelle und ihnen liegen. Über Viren können nicht die Genome-Editing Werkzeuge direkt als Protein (oder Protein-sgRNA Komplex) in die Zellen eingebracht werden, sondern nur deren genetische Bauanleitung.

Eine Reihe verschiedener Viren wurden über die Jahre entwickelt, um Genmaterial in Zellen zu bringen. Die Früchte der Pionierarbeit, die für die klassische Gentherapie erbracht wurden, werden nun für das Einbringen gezielter Genomveränderungen genutzt.

Am häufigsten werden Lenti- und Adeno-assoziierte Viren verwendet. Andere Viren wurden zwar als mögliche Alternativen beschrieben<sup>330,331</sup>, aber nur Adenoviren werden in der Praxis noch gelegentlich verwendet<sup>332,333</sup>.

Lentivirale Vektoren stammen meist von HIV-1 ab. Die meisten viralen Originalkomponenten sind allerdings entfernt worden, so dass die viralen Partikel sich nicht mehr vermehren können<sup>334,335</sup>. Lentiviren zeichnen sich durch eine hohe Effizienz *in vitro* und einem großen Fassungsvermögen aus. Mit ihnen kann genetisches Material mit bis zu 10.000 Basenpaaren in Zellen eingebracht werden, was gerade für Cas9, das schon allein fast 4.000 Basenpaare verbraucht, sehr wichtig ist.

Lentiviren bauen ihr Genom meist direkt in das Genom der Wirtszelle ein. Das hierfür nötige Enzym, die Integrase, kann je nach Anwendung aus den Viren für klinische Anwendung entfernt werden. Ein Einbau in das Wirtszellgenom kann für therapeutische Gene durchaus gewünscht sein, da ansonsten das gelieferte Genmaterial nicht repliziert wird und in sich schnell teilenden Zellen schnell verdünnt wird. Integrase kompetente Lentiviren werden z.B. in CRISPR screens eingesetzt<sup>155</sup> oder um Car-T-Zellen zu produzieren<sup>336</sup>. Für therapeutisches Genome-Editing sind solche Vektoren wenig geeignet, weil die lange Präsenz der Editing Werkzeuge, die Gefahr verstärkt, dass an nicht gewünschten Stellen im Genom geschnitten wird (off-targets). Daher werden z.B. beim Genome-Editing in Stammzellen<sup>155</sup> meist Integrase defiziente Viren eingesetzt, bei denen das genetische Material nicht in das zelluläre Genom eingebaut wird.

Lentiviren befallen natürlicherweise nur wenige Zelltypen im menschlichen Körper, was sie, trotz einiger Anstrengungen, so zu verändern, dass weitere Zelltypen infiziert werden können<sup>337</sup>, für *in vivo* Anwendungen wenig geeignet macht. Zusätzlich scheint Ihre *in vivo* Effizienz auch geringer zu sein als die anderer Viren<sup>338,339</sup>.

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind menschliche Viren, die allerdings nicht mit Krankheiten assoziiert sind. Sie sind mittlerweile die für *in vivo* Anwendungen am meisten verwendete Gruppe von Viren und bilden die Grundlage für zwei zugelassene Gentherapien<sup>340,341</sup> und die ersten klinischen Studien mit CRISPR-Cas9 und ZFN *in vivo*<sup>42,277,342</sup>. AAV gibt es in einer Reihe unterschiedlicher Typen, die sich in ihrer Zelltyppräferenz unterscheiden, was sie für eine Reihe von Anwendungen in unterschiedlichen Organen nützlich macht<sup>343</sup>. AAVs sind in der Lage sowohl sich teilende und nicht-mehr teilende Zellen zu infizieren. Das Genom integriert sich meist nicht in das der Wirtszelle, was zu einer Verdünnung des Materials in sich vermehrenden Zellpopulation führt, allerdings auch die Sicherheit der Therapie erhöht.

Zwei substantielle Nachteile haben AAVs allerdings. Zum einen die geringe Kapazität (nur unter 5.000 Basenpaare), die mit Cas9 und der sgRNA schon ausgeschöpft ist und kaum noch Platz für regulatorische Sequenzen oder zusätzliche Modifikation von Cas9 lässt (z.B. Base Editoren)<sup>283</sup>. Zum anderen haben viele Menschen schon eine erworbene Immunität gegenüber AAVs, die eine Behandlung mit bestimmten AAV Typen unmöglich oder schwierig macht<sup>344,345</sup>. Für beide Probleme gibt es potentielle Lösungen (z.B. kann man die AAVs gezielt verändern, um Immunitäten gegenüber natürlichen AAV Subtypen zu umgehen<sup>346</sup>, den Patienten zeitweise immunsupprimieren<sup>340</sup>, oder große Lasten auf zwei oder mehr AAVs aufteilen<sup>347</sup>). Es ist aber unklar, in wie weit diese Interventionen die Effizienz und breite Anwendbarkeit in Patienten beeinträchtigen.

Zusätzlich sind vor kurzem Sicherheitsbedenken nach Langzeitstudien in Hunden aufgetaucht, die zeigten, dass mit AAV geliefertes genomisches Material sich doch in nennenswertem Umfang in das Genom von Zellen einlagert, und dass dies zu einer verstärkten Vermehrung einzelner Zellen sorgt<sup>348</sup>. In wie weit das für ein erhöhtes Krebsrisiko sorgt ist noch unklar. Zusätzlich starben dieses Jahr zwei Patienten in einer AAV Gen Therapie Studie an Leberkomplikation und Sepsis<sup>349</sup>. Toxizität wurde auch nach Verabreichung hoher Dosen in Tiermodellen beobachtet<sup>333</sup>.

AAVs wurden in Tiermodellen oder Patienten bisher dazu verwendet CRISPR und andere Genome-Editing Werkzeuge in die Leber<sup>42,71,350,351</sup>, in das Gehirn<sup>352-354</sup>, in Muskeln<sup>285-287</sup>, und das Herz<sup>285-287,355,356</sup> einzubringen.

Neben den oben erwähnten Sicherheitsbedenken und Problemen mit der Kapazität von und Immunität gegenüber AAVs, bringen virale Vektoren noch weitere Herausforderungen mit sich. Zum einen ist die Produktion ausreichender Mengen außerordentlich schwierig und teuer, was auch an ihrer oft geringen Effizienz liegt, die sehr hohen Dosen nötig macht<sup>357</sup>. Auch gibt es für viel Zelltypen und Gewebe noch keine effizienten und sicheren viralen Vektoren<sup>343</sup>.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass alternative Methoden, speziell ZFNs und Meganukleasen, gegenüber CRISPR-Cas den großen Vorteil haben, dass sie viel kleiner sind als z.B. Cas9, was es deutlich einfacher macht ihre Gene in AAVs zu verpacken. Mit der Entdeckung von CasΦ<sup>74</sup> (s. oben) hat sich dies vielleicht geändert, es ist aber noch zu früh um zu sagen, ob CasΦ sich als generelles Genome-Editing Werkzeug eignet.

## Nicht-virale Methoden

Während virale Vektoren die derzeit effizientesten Möglichkeiten sind Genome-Editing *in vivo* einzusetzen, haben nicht-virale Ansätze (Abbildung 9) bestimmte Vorteile<sup>357-359</sup>: 1) Es gibt keine vorbestehende Immunität gegen sie und oft wird auch nach dem ersten Einsatz im Patienten keine erworben. Dies macht es möglich Patienten wiederholt zu behandeln, was hohe initiale und potentielle toxische Dosen unnötig und patientenspezifische Unterschiede leichter beherrschbar machen könnte. 2) Künstliche Systeme lassen sich einfacher an unterschiedliche Arten Genome-Editing Werkzeuge an die Zellen zu liefern anpassen (als DNA, RNA oder gleich als Protein). 3) Die Herstellung ist deutlich einfacher und kostengünstiger.

Am weitesten in der klinischen Entwicklung fortgeschritten sind wahrscheinlich Methoden um Cas9 mRNA und sgRNAs mit Lipid-Nanopartikeln in Zellen einzubringen. Hierbei kann das Genome-Editing Feld auf Erfahrungen aus andern Therapiefeldern (z.B. mRNA Impfstoffen<sup>360</sup> und siRNA Therapien<sup>361</sup>) zurückgreifen. Lipid-Nanopartikel bestehen aus positiv geladenen und neutralen Lipiden, die einen Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50-200 nm um die negative geladene RNA bilden. Speziell in der Leber kann man mit Lipid-Nanopartikeln eine hohe Effizienz erreichen (~80% Genmodifikation)<sup>362,363</sup>. Viele der einzelnen Komponenten dieser Partikel sind schon von den regulatorischen Behörden zugelassen, was die klinische Entwicklung deutlich erleichtert.

Einem ähnlichen Prinzip folgen Polymernanopartikel, bei denen sich ein positiv geladenes Polymer um die negativ geladenen RNA Moleküle faltet. Während man damit sehr effizientes Genome-Editing nach

lokaler Injektion z.B. in Tumore<sup>364,365</sup> erreicht, ist die Effizienz nach systemischer (z.B. intravenöser) Darreichung deutlich geringer.

Ein großer Vorteil synthetischer Systeme ist, dass sie Cas9 oder ein anderes Genome-Editing Werkzeug direkt als Proteine ohne Umweg über RNA oder DNA in Zellen einbringen können. Es hat sich gezeigt, dass dies die Spezifität des Genome-Editings erhöht (weil die Werkzeuge weniger lange in der Zelle verbleiben und damit weniger Zeit haben nicht optimale Stellen im Genom zu schneiden) und die Aktivierung nicht-adaptiven Immunprozesse reduziert.

Im Falle von Cas9 z.B. erlaubt es die negative Ladung des sgRNA-Cas9 Komplexes ähnliche Lipid und Polymer Nanopartikel zu verwenden wie für RNA oder DNA. Nach lokaler Injektion in Mäusen ist dies bereits erfolgreich im Gehirn<sup>366</sup> und im Innenohr<sup>367,368</sup> angewendet worden. Während die zuerst verwendeten Lipide zu toxisch waren, um im Menschen genutzt zu werden, zeigt eine neue Generation deutlich verbesserte Verträglichkeit und die Fähigkeit auch nach intravenöser Injektion sgRNA-Cas9 Komplexe in Zielzellen zu bringen<sup>369</sup>.

Erste Tierversuche legen nahe, dass auch Gold-Nanopartikel zumindest nach lokaler Applikation im Gehirn und im Muskeln<sup>370,371</sup> effizient und gut verträglich sind.

Am einfachsten wäre es natürlich, wenn man das Cas9 oder andere Genome-Editing Werkzeuge so verändern könnte, dass sie ohne Hilfe anderer Substanzen in Zellen gelangen könnten. Sowohl für ZFNs als auch für Cas9 wurde gezeigt, dass das Einführen positiver Ladungen, die Aufnahme in Zellen in Zellkultur und im Gehirn ermöglicht<sup>366,372</sup>. Die Verwendung von Proteinen hätte viele Vorteile, z.B. einfache Herstellung, wenig potenziell toxische Komponenten und geringe Größe, allerdings ist unklar, ob Proteine so verändert werden können, dass sie *in vivo* alleine effizient genug sind, um therapeutisch wirksam zu sein<sup>357</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass effizientes Einbringen von Genome-Editing Werkzeugen in Zellen bisher nur *ex vivo* oder in einigen wenigen Geweben mit ausreichend hoher Effizienz möglich ist, um therapeutisch wirksame Effekte zu erzielen. Hier sind besonders die Leber und das zentrale Nervensystem zu nennen, bei der sowohl virale wie synthetische Methoden in Tiermodellen gute Erfolge erzielen. Hier hat man auch mit anderen Wirkstoffklassen (siRNAs und Antisense Oligonukleotiden<sup>373</sup>) schon positive Erfahrungen mit der Verabreichung großer Moleküle gemacht. Für die meisten anderen Organe sind die Methoden im besten Fall unausgereift oder nicht vorhanden, wenn nicht wie im Auge ein direktes Injizieren in Frage kommt.

Die Herausforderung, wie man große Biomoleküle im Patienten in die Zellen eines Zielorgans hineinbekommt, ist nicht nur für Genome-Editing Therapien von entscheidender Bedeutung. Die Möglichkeiten von Gen-, RNA-, Protein- und Genome-Editing Therapien sind fast unbegrenzt, wenn es möglich wäre die entsprechenden Werkzeuge mit ausreichend hoher Effizienz *in vivo* an den richtigen Ort bringen. Besonders ein Einsatz bei Krankheiten, bei denen eine große Anzahl von Zellen ohne Ausnahme behandelt werden müsste (z.B. Tumorerkrankungen, genetische Erkrankungen, die viele Organe betreffen) sind derzeitige Ansätze nicht einmal annähernd effektiv genug.

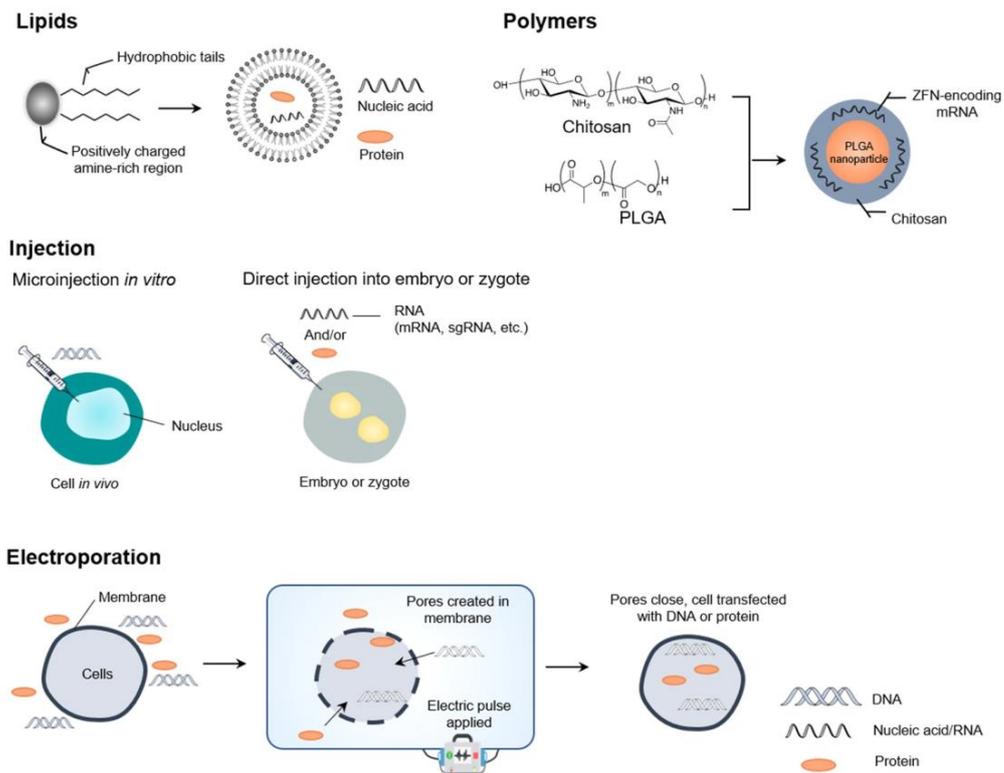


Abbildung 9: Nicht-virale Methoden um Genome-Editing Werkzeuge in Zellen einzubringen (Illustration aus<sup>374</sup>)

## Zusammenfassung

- Die Herausforderung, große Moleküle effizient in Zellen einzubringen, ist ein zentrales Problem biomedizinischer Forschung
- Es werden sowohl Viren als auch synthetische Nanopartikel benutzt
- *Ex vivo* kann die Effizienz sehr hoch sein
- *In vivo* ist die Effizienz abgesehen von Spezialfällen wie der Leber oft niedrig und ist limitierend für den Einsatz von Genome-Editing in der klinischen Praxis

## Patienten- und Zell-spezifische Einflüsse

Neben den allgemeinen Herausforderungen, die bisher besprochen wurden, gibt es auch zell- und patientenspezifische Probleme, die potenziell klinische Anwendungen erschweren können, und Gegenstand intensiver Forschungen sind.

### Homologe Reparatur in verschiedenen Zelltypen

Der wichtigste Zelltyp-spezifische Einfluss ist die oft niedrige Effizienz homologer Reparatur in vielen Zellarten, besonders in sich nicht mehr teilenden Zellen (z.B. Nerven- oder Muskelzellen). Wie in Box 2 erklärt, verfügt die Zelle über zwei Hauptreparaturmechanismen (Non-homologous end-joining (NHEJ) und homologe Reparatur) zur Reparatur von Brüchen in der DNA. Die zellulären Programme, die steuern welcher dieser Mechanismen eingesetzt wird, sind kompliziert und eine erschöpfende Diskussion würde hier zu weit führen. Während die Prozesse in einfachen Modellorganismen (besonders in Hefe) gut verstanden sind, sind viele Einzelheiten beim Menschen noch nicht aufgeklärt<sup>375,376</sup>.

Um die Balance zwischen oft unerwünschten Non-homologous end-joining Reparaturen und den bevorzugten homologen Reparaturen zu beeinflussen, wurden bisher eine Reihe verschiedener Ansätze verfolgt<sup>377</sup>. So wurden z. B. eine Reihe pharmakologischer Interventionen geprüft, die zentrale Komponenten der Non-homologous end-joining Maschinerie (s. Box 2) inhibieren und damit die Reparatur durch homologe Reparatur wahrscheinlicher machen. Da man weiß, dass die Maschinerie für die homologe Reparatur vor allem während und kurz nach der Zellteilung aktiv ist, sind auch Wirkstoffe untersucht worden, die Zellen in diesen Teilen des Zellzyklus festhalten<sup>377</sup>. Auch Cas9 selbst kann dazu verwendet werden die Effizienz homologer Reparaturen zu erhöhen. Entweder indem man Cas9 zusätzlich dazu benutzt, die Gene wichtiger Regulatoren der homologen Reparatur zu aktivieren<sup>378</sup> oder Cas9 mit Proteinen modifiziert, die solche Regulatoren spezifisch an den gewünschten Ort rekrutieren<sup>379</sup>. Alternativ kann Cas9 auch so modifiziert werden, dass es nur in den entsprechenden Phasen des Zellzyklus aktiv ist<sup>380,381</sup>.

Da homologe Reparatur die physikalische Interaktion zwischen genomischer DNA und der künstlichen Reparaturvorlage benötigt, ist ein vielversprechender Ansatz, die Vorlage direkt an die Schnittstelle im Genom zu bringen. Hierfür wurden eine Reihe von Lösungen vorgeschlagen<sup>382-385</sup>. Die derzeit flexibelste und effektivste Methode fügt in die Reparaturvorlage eine nicht ganz komplette Zielsequenz für den Cas9-sgRNA Komplex ein. Durch die verkürzte Zielsequenz kann Cas9 an die Vorlage binden und sie mit in den Zellkern nehmen, schneidet sie aber nicht<sup>385</sup>. Wenn Cas9 nun an die eigentliche Zielsequenz im Genom bindet und den Schnitt ausführt, ist die Reparaturvorlage gleich vorhanden und kann benutzt werden, um die Reparatur auszuführen.

Den meisten dieser Methoden, besonders den pharmakologischen, ist es gemeinsam, dass sie praktisch nur *ex vivo* einsetzbar sind, weil viele der Substanzen toxisch oder potenziell cancerogen sind. Auch ist die Effizienz der meisten Methoden bescheiden und hängt sehr stark vom untersuchten Zelltyp ab. Weil verschiedene Zelltypen im Detail unterschiedliche Reparaturmechanismen benutzen, wird es

eine Herausforderung sein, generell anwendbare Methoden zu entwickeln. Alternativ müsste für jede einzelne Anwendung ein maßgeschneidertes Protokoll entwickelt werden.

Die größte, noch weitgehend ungelöste, Herausforderung bleibt es aber Ansätze zu finden, wie die Effizienz homologer Reparatur *in vivo* und in sich nicht mehr teilenden Zellen gesteigert werden kann.

## Genetische Variabilität von Patienten

Jeder Mensch hat ein individuelles Genom, welches sich zwischen zwei Individuen in ca. 0.6% der Basenpaare unterscheidet<sup>386</sup>. Gegenüber dem sogenannten Referenzgenom (d.h. dem idealisierten Beispielgenom, das für die meisten Anwendungen benutzt wird) gibt es, wenn man alle bekannten Varianten zusammen nimmt, eine bekannte Variante alle acht Basen im menschlichen Genom<sup>387</sup>. Da sgRNAs meist mit Hilfe des Referenzgenoms entworfen werden, können diese Varianten verschiedene Folgen haben<sup>388,389</sup>:

1. Sie können die PAM Sequenz eines CRISPR-Cas Enzyms betreffen und damit die gewünschte Schnittstelle komplett unzugänglich machen. Je nach Enzym haben zwischen 20 und 35% aller möglichen PAM Sequenzen bekannte Varianten in der menschlichen Population. Allerdings sind diese Varianten oft selten und wenn man Varianten betrachtet, die in mehr als 0.01% der Bevölkerung vorkommen sind nur zwischen 2 und 4% der PAM Sequenzen betroffen.
2. Sie können die sgRNA Zielsequenz verändern und damit die Effizienz der Genomveränderung reduzieren. Nur für weniger als 5% der Zielsequenzen findet man gar keine Varianten, die die Unterschiede zwischen sgRNA und genomischer Sequenz erzeugen. Viele dieser Varianten sind aber wieder sehr selten. Wenn man nur Varianten betrachtet, die in mehr als 0.01% der Bevölkerung vorkommen, finden man in einem repräsentativen Set von 12 Genen, dass immerhin 2/3 aller möglichen Zielsequenzen einsetzbar sind. Allerdings sind diese Varianten im Genom ungleich verteilt. So sind bei dem therapeutische wichtigen Gen PCSK9 (s. oben) nur ca. 50% der möglichen Zielsequenzen bei mehr als 99.9% aller Menschen gleich der Referenzsequenz<sup>386</sup>.
3. Es können neue ungewollte Schnittstellen erzeugt werden (off-targets). Die Anzahl von Stellen im Genom, die der Zielsequenz ähnlich genug sind um potentiell von Cas9 geschnitten zu werden ( $\leq 3$  Basenpaare Unterschied) nimmt zum Beispiel für das oben genannte Set repräsentativer sgRNAs von weniger als 30 pro sgRNA auf über 60 zu wenn man alle bekannten Varianten einrechnet<sup>389</sup>.

Zusammengenommen sind genetische Varianten häufig genug, dass man sie beim Design von sgRNA Sequenzen in Betracht ziehen muss und wenn möglich auf Teile des Zielgens zielen sollte, bei denen nur wenig Variation in der Bevölkerung vorhanden ist. Genauso sollte die Verteilung von genetischen Varianten auch bei der Betrachtung von off-target Sequenzen in Betracht gezogen werden. Es ist auch wichtig zu wissen, dass manche Varianten in bestimmten Bevölkerungsgruppen deutlich häufiger sind als in anderen und wir darüber trotz der großen Anzahl sequenzierter Genome noch kein abschließendes Bild haben. In Zukunft wird es möglich sein, eventuelle Risiken durch Sequenzierung des Genoms von Patienten auszuschließen, gerade wenn eine Ziel- oder off-target Sequenz in der Population häufig vorkommt.

## Immunreaktion gegen die CRISPR Proteine

Die beiden Cas9 Proteine die am häufigsten für Therapeutische Anwendungen verwendet werden stammen aus *Staphylococcus aureus* (SaCas9) und *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), zwei Bakterien die Menschen besiedeln und unter Umständen krankmachen. Es ist daher nicht überraschend, dass viele Menschen bereits Immunität gegen diese Proteine haben.

Das adaptive (d.h. lernfähige) menschliche Immunsystem hat zwei Hauptarme: Die sogenannte humorale Immunität, die Antikörper bildet, die an als fremd erkannte Proteine außerhalb von Zellen bindet und die zelluläre Immunität, die von Zellen vermittelt wird, die erkennen, wenn fremde Proteine in menschlichen Zellen gebildet werden (z.B. bei viralen Erkrankungen oder Krebs) und diese Zellen dann töten. Das adaptive Immunsystem behält eine Erinnerung an fremde Proteine, die es bereits gesehen hat (das Prinzip der Impfung) und reagiert, wenn es das Protein noch einmal antrifft bedeutend schneller. Eine Immunität gegen Cas9 oder andere Genome-Editing Werkzeuge, die schon existiert bevor eine Therapie eingeleitet wird, ist deshalb besonders problematisch, weil diese das Genome-Editing schnell und effektiv unterbinden könnte. Die zelluläre Immunantwort ist für Genome-Editing Anwendungen *in vivo* wahrscheinlich entscheidender, weil in den meisten Fällen Cas9 von den Körperzellen produziert werden wird und damit der zellulären Immunkontrolle unterliegt.

Wie weit verbreitet Immunreaktionen gegen Cas9 sind ist umstritten. Zwei Studien fanden dass 58% und 96% der Bevölkerung Reaktionen auf SpCas9 oder SaCa9 zeigen<sup>390,391</sup> und sowohl humorale als auch zelluläre Reaktionen weit verbreitet sind. Eine andere Studie fand Antikörper nur bei 2,5 -10% der Bevölkerung<sup>392</sup>. In wie weit Immunität gegen Cas9 im Zuge klinischer Anwendungen aufgebaut wird ist unklar, es ist aber davon auszugehen, dass sie ein wiederholtes Anwenden derselben Therapie erschweren wird.

In wie weit eine solche Immunität den Erfolg von Genome-Editing Therapien gefährden könnte wurde bisher nur in Tiermodellen untersucht. Auch hier ist die Datenlage im Moment widersprüchlich. In einer Mausstudien wurde gezeigt, dass eine vorhandene Immunität, genomveränderte Zellen angreift und entfernt, nachdem Cas9 mit AAVs an Leberzellen geliefert wurde<sup>392</sup>. Eine andere Studie detektierte auch Cas9-spezifische Immunantworten in Mäusen ohne vorexistierende Immunität (in diesen Fall wurde ein negative Einfluss der Immunantwort nicht quantifiziert)<sup>393</sup>, während eine der oben erwähnten Studien in Duchenne muscular dystrophy Mausmodellen explizit keine T-Zell Immunantwort fand<sup>288</sup>. In vielen andern Studien in Mäusen ohne vorexistierende Immunität wurden mögliche Immunantworten nicht untersucht, waren aber auch kein offensichtliches Problem.

Daten zur praktischen Bedeutung dieser vorexistierenden Immunität liegen weder aus der Klinik noch aus zusätzlichen Tiermodellen vor. Es bleibt daher unklar, ob die beobachteten T-Zellen, eine ausreichend starke Immunantwort produzieren können, um zu einem klinischen Problem zu werden.

Sollte sich herausstellen, dass Patienten mit vorexistierender Immunität ein erhöhtes Risiko von Komplikationen oder Therapieversagen haben, gäbe es verschiedene Möglichkeiten dem entgegenzuwirken. Zum einen müsste die Produktion von Cas9 so kurz wie möglich sein. Hierzu wurden z.B. selbst inaktivierende AAVs entwickelt<sup>394-396</sup> oder man könnte Cas9 als RNA oder Protein einbringen. Auch eine zeitweise Immunsuppression ist klinisch möglich. Grundsätzlich könnte man bei diesen Patienten auf Cas9 Varianten von Organismen zurückgreifen, die keine humanen Pathogene

sind, diese müssten dann aber separat zugelassen werden. Grundsätzlich besteht auch die Möglichkeit, die Teile von saCas9 oder spCas9, die vom Immunsystem erkannt werden (Epitope), so zu verändern, dass sie keine Immunantwort mehr erzeugen. Erste Untersuchungen dazu, welche Epitope von spCas9 erkannt werden, legen allerdings nahe, dass die nötigen Veränderungen zu umfangreich sein könnten, um praktikabel zu sein<sup>347</sup>.

Bei *ex vivo* manipulierten Zellen kommt oft das Cas9 Protein selbst zum Einsatz und man kann davon ausgehen, dass zu dem Zeitpunkt zu dem die genveränderten Zellen in den Menschen injiziert werden, keine Cas9 Protein mehr vorhanden ist. Dies bestätigt sich auch in den ersten klinischen Daten in Cas9 veränderten T-Zellen<sup>88</sup>.

Immunantworten gegenüber anderen Genome-Editing Werkzeugen (ZFNs, TALENs, Meganukleasen) sind deutlich weniger gut untersucht.

## Zusammenfassung

- Homologe Reparatur ist in vielen Zelltypen ineffizient
- Methoden, um die Effizienz zu steigern werden intensiv erforscht, aber eine generell anwendbare Lösung liegt noch nicht vor
- *In vivo* gibt es bisher keine praktikablen Ansätze, um die Effizienz der homologen Reparatur zu steigern
- Patientenspezifische genetische Unterschiede können sowohl die Effizienz, als auch die Sicherheit von Genome-Editing Therapien beeinträchtigen und müssen beim Design solcher Therapien mit in Betracht gezogen werden.
- Vorexistierende oder erworbene Immunität könnte potentiell die Anwendbarkeit von Genome-Editing Technologien beeinträchtigen, die klinische Datenlage ist bisher aber unklar

## Schlussbemerkungen

Das bakterielle Immunsystem CRISPR-Cas hat es in erstaunlich kurzer Zeit geschafft, von einer mikrobiologischen Kuriosität zu einer der dominierenden Technologien biomedizinischer Forschung und klinischer Entwicklung zu werden. Weder in der Grundlagenforschung, noch in der Medikamentenentwicklung ist Genome-Editing heute noch wegzudenken und direkte therapeutische Anwendungen werden viele Krankheiten, für die Therapieansätze bisher nicht denkbar waren, heilbar machen. Während CRISPR-Systeme in der Grundlagenforschung mittlerweile fast ein Monopol haben, werden für klinische Anwendungen auch ältere Technologien weiter eingesetzt, weil der Vorteil der Einfachheit von CRISPR hier weniger stark ins Gewicht fällt und potenzielle Vorteile von ZFNs, TALEN und Meganuklease, wie z.B. geringer Größe, wichtig sein können.

Während die technologische Entwicklung weit genug fortgeschritten ist, um eine breite Anwendung zu erlauben, lassen sich, wie wir gesehen haben, noch einige Gebiete identifizieren, in denen weitere Durchbrüche nötig sind. Hierzu zählt z.B. die Weiterentwicklung von Enzymen, um höhere Spezifitäten bei gleichbleibender Effizienz zu erreichen oder die Größe der CRISPR-Cas Proteinen zu verringern. Auch die Entwicklung von Methoden, um off-target Effekte mit höherer Sensitivität detektieren zu können, wäre wichtig, um die Sicherheit von Therapien zu erhöhen. Um mehr Krankheiten therapierbar zu machen, müssen unsere Fähigkeit genau spezifizierte Änderungen im Genom zu machen verbessert werden. Während homologe Reparatur, und Prime- und Base Editing diese Möglichkeit grundsätzlich eröffnen, limitieren Effizienz oder Diversität der möglichen Änderungen (Base Editing) im Moment eine breitere Anwendung in der Praxis.

Ein besseres Verständnis möglicher Immunkomplikationen wird in den nächsten Jahren erarbeitet werden müssen, und Möglicherweise werden neue Technologien entwickelt werden müssen, um diese zu beherrschen.

Nicht zuletzt ist unsere Fähigkeit die für das Genome-Editing notwendigen Makromoleküle im Körper in die richtigen Zellen einzubringen noch sehr begrenzt. Trotz jahrzehntelanger Forschung zeichnen sich hier keine Durchbrüche ab, und verstärkte Anstrengungen auf diesem Gebiet wären auch über das Genome-Editing Feld hinaus von großer Bedeutung.

Im Moment befinden sich ausschließlich Therapien in klinischer Entwicklung, die somatische und nicht Keimbahnzellen, zum Ziel haben. Die Geburt zweier Babys in China, bei denen schon in den Keimbahnzellen genetische Veränderungen durchgeführt wurden, habe allerdings einer breiten Öffentlichkeit in Bewusstsein gebracht, dass wir nun auch in der Lage sind, das menschliche Erbgut generationsübergreifend zu verändern<sup>397,398</sup>.

Während die ethische Beurteilung von Eingriffen in die menschliche Keimbahn nicht Gegenstand dieser Studie ist, und eine breitere gesellschaftliche Debatte erfordert, sollen hier noch einige Anmerkungen zum Stand der Forschung aufgeführt werden.

Eingriffe in die Keimbahn von Tieren sind in einer Reihe von Tieren, inklusive Primaten<sup>399,400</sup>, vorgenommen worden und auch vor der Geburt der beiden Babys wurden Genome-Editing Experimente sowohl an nicht-lebensfähigen als auch an lebensfähigen menschlichen Embryonen durchgeführt<sup>213,401-404</sup>. Aus diesen Experimenten sind bereits einige potenzielle Problem für therapeutisches Genome-Editing in der Keimbahn ersichtlich. Zum einen ist es bei Tieren praktisch nie

so, dass, nachdem die Genome-Editing Werkzeuge in einen Embryo injiziert wurden, alle Zellen des daraus entstehenden Tieres die gewünschte Veränderung tragen, sondern dass sie aus einer Mischung aus veränderten und nicht-veränderten Zellen bestehen. Beim Menschen sind die Konsequenzen dieses als Mosaik bezeichneten Phänomens, das auch natürlich vorkommt, nur schwer vorherzusagen<sup>405</sup>. Schwerer wiegt, dass wir nur sehr wenig über die Mechanismen der Genomreparatur im frühen menschlichen Embryo wissen<sup>213,404,406</sup> und dass Experimente in Mäusen unter Umständen nicht einfach auf den Menschen übertragbar sind<sup>402</sup>.

Gerade bei Eingriffen in die Keimbahn wiegt die Möglichkeit von unbeabsichtigten Veränderung schwer. Drei Studien<sup>407-409</sup>, die vor kurzem als Vorveröffentlichungen erschienen sind (d.h. noch nicht einem Peer Review unterzogen wurden) zeigen, wie groß das Problem potenziell ist. Genome-Editing beruht darauf, dass der Schnitt, der von Cas9 und anderen Enzymen durchgeführt wird, repariert wird und dass nur kleine Veränderungen eingefügt werden, um ein Gen auszuschalten (s. oben). Während schon länger bekannt ist, dass gelegentlich auch sehr große Teile der DNA während der Reparatur verloren gehen können oder sich die DNA in komplexer Art rearrangieren kann<sup>410</sup>, scheinen diese Prozesse in frühen Embryonen besonders prononciert zu sein. So fand die Gruppe von Kathy Niakan z. B. das in 22% der Embryonen bis zu 20.000 Basenpaare der DNA gelöscht wurden<sup>409</sup>. Dieter Egli und Kollegen fanden in ihren Experimenten, dass ca. die Hälfte der Schnitte gar nicht repariert wurden und ganze Arme von Chromosomen verloren gingen<sup>408</sup>. Mitalipov und Kollegen beobachteten schließlich den Austausch großer DNA Segmente zwischen den mütterlichen und väterlichen Chromosomen, die essentielle Mechanismen der embryonalen Genregulation stören können<sup>407</sup>.

Zusammengenommen lassen diese Studien an der Sicherheit von Keimbahnmanipulationen zweifeln, wenn man zusätzlich bedenkt, dass auch das Risiko von Schnitten abseits der Zielsequenz nach wie vorgegeben ist. Ob sich solche Veränderungen mit der derzeitigen Technologie vor der Implantation von Embryonen entdecken ließen ist unklar. Sollte sich die Menschheit entschließen Keimbahneingriffe zu erlauben, müssen daher noch deutlich bessere Methoden entwickelt werden.

Abseits der Keimtherapie ist Genome-Editing allerdings auf dem besten Weg eine neue Ära der Medizin einzuläuten, die es erlauben wird, genetische und erworbene Krankheiten auf eine grundsätzlich neue Art zu behandeln.

## Referenzen

1. Diamond, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* vol. 418 700–707 (2002).
2. Erickson, D. L., Smith, B. D., Clarke, A. C., Sandweiss, D. H. & Tuross, N. An Asian origin for a 10,000-year-old domesticated plant in the Americas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18315–18320 (2005).
3. Lev-Yadun, S., Gopher, A. & Abbo, S. Archaeology. The cradle of agriculture. *Science* **288**, 1602–3 (2000).
4. Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J. Exp. Med.* **79**, 137–158 (1944).
5. Jackson, D. A., Symons, R. H. & Berg, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2904–2909 (1972).
6. Mertz, J. E. & Davis, R. W. Cleavage of DNA by R 1 restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 3370–3374 (1972).
7. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. & Helling, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3240–3244 (1973).
8. Lobban, P. E. & Kaiser, A. D. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **78**, 453–471 (1973).
9. Jaenisch, R. & Mintz, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 1250–1254 (1974).
10. Costantini, F. & Lacy, E. Introduction of a rabbit  $\beta$ -globin gene into the mouse germ line. *Nature* **294**, 92–94 (1981).
11. Ganem, D., Nussbaum, A. L., Davoli, D. & Fareed, G. C. Propagation of a segment of bacteriophage  $\lambda$ -DNA in monkey cells after covalent linkage to a defective simian virus 40 genome. *Cell* **7**, 349–359 (1976).
12. Goff, S. P. & Berg, P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and  $\lambda$  phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* **9**, 695–705 (1976).
13. Johnson, I. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science (80- )*. **219**, 632–637 (1983).
14. Scherer, S. & Davis, R. W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4951–4955 (1979).
15. Thomas, K. R., Folger, K. R. & Capecchi, M. R. High frequency targeting of genes to specific

- sites in the mammalian genome. *Cell* **44**, 419–428 (1986).
16. Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. & Kucherlapati, R. S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**, 230–234 (1985).
  17. Koller, B. H. *et al.* Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8927–8931 (1989).
  18. Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S. & Jaenisch, R. Germ-line transmission of a disrupted  $\beta$ 2microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* **342**, 435–438 (1989).
  19. Porteus, M. H. A new class of medicines through DNA editing. *N. Engl. J. Med.* **380**, 947–959 (2019).
  20. Urnov, F. D. Genome Editing B.C. (Before CRISPR): Lasting Lessons from the “Old Testament”. *Cris. J.* **1**, 34–46 (2018).
  21. Puchta, H., Dujon, B. & Hohn, B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5034–5040 (1993).
  22. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8096–8106 (1994).
  23. Sander, J. D. & Joung, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* vol. 32 347–350 (2014).
  24. Vilenchik, M. M. & Knudson, A. G. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12871–12876 (2003).
  25. Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J. S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012–1019 (2014).
  26. Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K. & Carroll, D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* vol. 300 764 (2003).
  27. Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. & Carroll, D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**, 1169–1175 (2002).
  28. Porteus, M. H. & Baltimore, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* vol. 300 763 (2003).
  29. Ramirez, C. L. *et al.* Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature Methods* vol. 5 374–375 (2008).
  30. Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188**, 773–782 (2011).
  31. Boch, J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (80-. ).* **326**, 1509–1512 (2009).
  32. Miller, J. C. *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29**, 143–150 (2011).

33. Christian, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 756–761 (2010).
34. Boch, J. & Bonas, U. Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function . *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 419–436 (2010).
35. Kim, Y. *et al.* A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol.* **31**, 251–258 (2013).
36. Arora, L. & Narula, A. Gene editing and crop improvement using CRISPR-cas9 system. *Frontiers in Plant Science* vol. 8 1932 (2017).
37. Tachibana, C. Beyond CRISPR: What’s current and upcoming in genome editing | Science | AAAS. <https://www.sciencemag.org/features/2019/09/beyond-crispr-what-s-current-and-upcoming-genome-editing>.
38. Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-728 for HIV (Zinc-Finger). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00842634>.
39. Tebas, P. *et al.* Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* **370**, 901–910 (2014).
40. No Title.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=zinc+finger+nuclease&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>.
41. Taylor, P. First patient treated with Sangamo’s gene-editing tech. (2017).
42. Ascending Dose Study of Genome Editing by the Zinc Finger Nuclease (ZFN) Therapeutic SB-318 in Subjects With MPS I. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03041324>.
43. Sheridan, C. Sangamo’s landmark genome editing trial gets mixed reception. *Nature Biotechnology* vol. 36 907–908 (2018).
44. FierceBiotech. <https://www.fiercebiotech.com/special-report/13-sb-913>.
45. Qasim, W. *et al.* Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
46. Study Evaluating Safety and Efficacy of UCART123 in Patients With Relapsed/ Refractory Acute Myeloid Leukemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03190278?term=talen&draw=2&rank=5>.
47. Phase I Study of UCART22 in Patients With Relapsed or Refractory CD22+ B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (BALLI-01) - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04150497?term=talen&draw=2&rank=4>.
48. Study Evaluating Safety and Efficacy of UCART Targeting CS1 in Patients With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MELANI-01) - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04142619?term=talen&draw=2&rank=3>.
49. Hu, Z. *et al.* TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy. *J. Clin. Invest.* **125**, 425–436 (2015).
50. A Safety and Efficacy Study of TALEN and CRISPR/Cas9 in the Treatment of HPV-related Cervical Intraepithelial Neoplasia I - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03057912?term=talen&draw=2&rank=1>.

51. Study of Targeted Therapy Using Transcription Activator-like Effector Nucleases in Cervical Precancerous Lesions - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03226470?term=talen&draw=2&rank=2>.
52. Dose-escalation Study of Safety of PBCAR20A in Subjects With r/r NHL or r/r CLL/SLL - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04030195?term=Precision+Bioscience&draw=2&rank=3>.
53. Dose-escalation Study of Safety of PBCAR0191 in Patients With r/r NHL and r/r B-cell ALL - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03666000?term=Precision+Bioscience&draw=2&rank=2>.
54. A Dose-escalation Study to Evaluate the Safety and Clinical Activity of PBCAR269A in Study Participants With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04171843?term=Precision+Bioscience&draw=2&rank=1>.
55. Gorsuch, C. *et al.* A Gene Editing Approach to Eliminate Hepatitis B Virus Using ARCUS Meganucleases. <https://precisionbiosciences.com/wp-content/uploads/2016/01/2020ASGCT-HBV-poster-vfinal.pdf>.
56. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakamura, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987).
57. CRISPR home page. <https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>.
58. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80-. )*. **337**, 816–821 (2012).
59. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2579–E2586 (2012).
60. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (80-. )*. **339**, 823–826 (2013).
61. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (80-. )*. **339**, 819–823 (2013).
62. Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. & Kim, J. S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **31**, 230–232 (2013).
63. Hwang, W. Y. *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* **31**, 227–229 (2013).
64. Jinek, M. *et al.* RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* **2013**, (2013).
65. Ding, Q. *et al.* Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.* **115**, 488–492 (2014).
66. Hwang, W. Y. *et al.* Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System. *PLoS One* **8**, e68708 (2013).

67. Mali, P. *et al.* CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–838 (2013).
68. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832 (2013).
69. Pattanayak, V. *et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* **31**, 839–843 (2013).
70. Kleinstiver, B. P. *et al.* Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1293–1298 (2015).
71. Ran, F. A. *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**, 186–191 (2015).
72. Zetsche, B. *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nature Biotechnology* vol. 35 31–34 (2017).
73. Zetsche, B. *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **163**, 759–771 (2015).
74. Pausch, P. *et al.* CRISPR-Cas $\Phi$  from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science* **369**, 333–337 (2020).
75. Koonin, E. V., Makarova, K. S. & Zhang, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology* vol. 37 67–78 (2017).
76. Guilinger, J. P., Thompson, D. B. & Liu, D. R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.* **32**, 577–582 (2014).
77. Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. & Joung, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279–284 (2014).
78. Vakulskas, C. A. *et al.* A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **24**, 1216–1224 (2018).
79. Casini, A. *et al.* A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nat. Biotechnol.* **36**, 265–271 (2018).
80. Kulcsár, P. I. *et al.* Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage. *Genome Biol.* **18**, 190 (2017).
81. Chen, J. S. *et al.* Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature* **550**, 407–410 (2017).
82. Slaymaker, I. M. *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science (80-. )*. **351**, 84–88 (2016).
83. Hu, J. H. *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **556**, 57–63 (2018).
84. Kleinstiver, B. P. *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* **529**, 490–495 (2016).
85. Kim, N. *et al.* Prediction of the sequence-specific cleavage activity of Cas9 variants. *Nat.*

- Biotechnol.* 1–9 (2020) doi:10.1038/s41587-020-0537-9.
86. Chatterjee, P. *et al.* An engineered ScCas9 with broad PAM range and high specificity and activity. *Nat. Biotechnol.* 1–5 (2020) doi:10.1038/s41587-020-0517-0.
  87. Mullard, A. Gene-editing pipeline takes off. *Nature reviews. Drug discovery* vol. 19 367–372 (2020).
  88. Stadtmauer, E. A. *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science (80-. ).* **367**, (2020).
  89. Lazzarotto, C. R. *et al.* CHANGE-seq reveals genetic and epigenetic effects on CRISPR–Cas9 genome-wide activity. *Nat. Biotechnol.* (2020) doi:10.1038/s41587-020-0555-7.
  90. Tsai, S. Q. *et al.* CIRCLE-seq: A highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR–Cas9 nuclease off-targets. *Nat. Methods* **14**, 607–614 (2017).
  91. Kim, D. *et al.* Digenome-seq: Genome-wide profiling of CRISPR–Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods* **12**, 237–243 (2015).
  92. Tsai, S. Q. *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR–Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.* **33**, 187–198 (2015).
  93. Crosetto, N. *et al.* Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat. Methods* **10**, 361–365 (2013).
  94. Yan, W. X. *et al.* BLISS is a versatile and quantitative method for genome-wide profiling of DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* **8**, 1–9 (2017).
  95. Akcakaya, P. *et al.* In vivo CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *Nature* **561**, 416–419 (2018).
  96. Wienert, B. *et al.* Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq. *Science (80-. ).* **364**, 286–289 (2019).
  97. Kymriah (tisagenlecleucel ) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. <https://reference.medscape.com/drug/kymriah-tisagenlecleucel-1000169>.
  98. Ali, M. Y. *et al.* Ideal or actual body weight to calculate CD34+ cell doses for autologous hematopoietic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* **31**, 861–864 (2003).
  99. Maffini, E. *et al.* CD34+ cell dose effects on clinical outcomes after T-cell replete haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia using peripheral blood stem cells. A study from the acute leukemia working Party of the European Society for blood and marrow transplantation (EBMT). *Am. J. Hematol.* **95**, 892–899 (2020).
  100. Kleinstiver, B. P. *et al.* Engineered CRISPR–Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* (2015) doi:10.1038/nature14592.
  101. Anzalone, A. V., Koblan, L. W. & Liu, D. R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology* vol. 38 824–844 (2020).
  102. Walton, R. T., Christie, K. A., Whittaker, M. N. & Kleinstiver, B. P. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR–Cas9 variants. *Science (80-. ).* **368**, 290–296 (2020).
  103. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and

- human phenotype. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
104. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016).
  105. Nishida, K. *et al.* Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science (80-. )*. **353**, (2016).
  106. Gaudelli, N. M. *et al.* Programmable base editing of T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471 (2017).
  107. Anzalone, A. V., Koblan, L. W. & Liu, D. R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology* (2020) doi:10.1038/s41587-020-0561-9.
  108. Zhao, D. *et al.* New base editors change C to A in bacteria and C to G in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 1–6 (2020) doi:10.1038/s41587-020-0592-2.
  109. Kurt, I. C. *et al.* CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat. Biotechnol.* 1–6 (2020) doi:10.1038/s41587-020-0609-x.
  110. Komor, A. C. *et al.* Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci. Adv.* **3**, eaao4774 (2017).
  111. Gaudelli, N. M. *et al.* Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat. Biotechnol.* **38**, 892–900 (2020).
  112. Richter, M. F. *et al.* Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat. Biotechnol.* **38**, 883–891 (2020).
  113. Kim, Y. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9–cytidine deaminase fusions. *Nat. Biotechnol.* **35**, 371–376 (2017).
  114. Liu, Z. *et al.* Efficient base editing with high precision in rabbits using YFE-BE4max. *Cell Death Dis.* **11**, 1–11 (2020).
  115. Gehrke, J. An APOBEC3A–Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat. Biotechnol.* **36**, 977–982 (2018).
  116. Tan, J., Zhang, F., Karcher, D. & Bock, R. Expanding the genome-targeting scope and the site selectivity of high-precision base editors. *Nat. Commun.* **11**, 1–11 (2020).
  117. Thuronyi, B. W. *et al.* Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nat. Biotechnol.* **37**, 1070–1079 (2019).
  118. Lee, H. K., Smith, H. E., Liu, C., Willi, M. & Hennighausen, L. Cytosine base editor 4 but not adenine base editor generates off-target mutations in mouse embryos. *Commun. Biol.* **3**, 1–6 (2020).
  119. Zuo, E. *et al.* Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science (80-. )*. **364**, 289–292 (2019).
  120. Jin, S. *et al.* Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science (80-. )*. **364**, 292–295 (2019).
  121. Grunewald, J. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base

- editors. *Nature* **569**, 433–437 (2019).
122. Yu, Y. *et al.* Cytosine base editors with minimized unguided DNA and RNA off-target events and high on-target activity. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
  123. Gehrke, J. M. *et al.* An apobec3a-cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat. Biotechnol.* **36**, 977 (2018).
  124. Grünewald, J. *et al.* CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. *Nat. Biotechnol.* **37**, 1041–1048 (2019).
  125. Rees, H. A., Wilson, C., Doman, J. L. & Liu, D. R. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. *Sci. Adv.* **5**, eaax5717 (2019).
  126. Matsoukas, I. G. Prime Editing: Genome Editing for Rare Genetic Diseases Without Double-Strand Breaks or Donor DNA. *Front. Genet.* **11**, 528 (2020).
  127. Anzalone, A. V. *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, 149–157 (2019).
  128. Lin, Q. *et al.* Prime genome editing in rice and wheat. *Nat. Biotechnol.* **38**, 582–585 (2020).
  129. Liu, Y. *et al.* Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discovery* vol. 6 (2020).
  130. Sürün, D. *et al.* Efficient generation and correction of mutations in human iPS cells utilizing mRNAs of CRISPR base editors and prime editors. *Genes (Basel)*. **11**, (2020).
  131. Gilbert, L. A. *et al.* CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* **154**, 442 (2013).
  132. Pickar-Oliver, A. & Gersbach, C. A. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 490–507 (2019).
  133. Qi, L. & Lo, A. Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR-Cas systems. *F1000Research* vol. 6 747 (2017).
  134. Abudayyeh, O. O. *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science (80-. )*. **353**, (2016).
  135. Wang, F., Zuroske, T. & Watts, J. K. RNA therapeutics on the rise. *Nature reviews. Drug discovery* vol. 19 441–442 (2020).
  136. Setten, R. L., Rossi, J. J. & Han, S. ping. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 18 421–446 (2019).
  137. Cox, D. B. T. *et al.* RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science (80-. )*. **358**, 1019–1027 (2017).
  138. Abudayyeh, O. O. *et al.* A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science (80-. )*. **365**, 382–386 (2019).
  139. Fukuda, M. *et al.* Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-To-I RNA editing. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
  140. Wettengel, J., Reautschnig, P., Geisler, S., Kahle, P. J. & Stafforst, T. Harnessing human ADAR2 for RNA repair - Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. *Nucleic Acids Res.* **45**, 2797–2808 (2017).

141. Mills, R. E., Bennett, E. A., Iskow, R. C. & Devine, S. E. Which transposable elements are active in the human genome? *Trends in Genetics* vol. 23 183–191 (2007).
142. Klompe, S. E., Vo, P. L. H., Halpin-Healy, T. S. & Sternberg, S. H. Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature* **571**, 219–225 (2019).
143. Strecker, J. *et al.* RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science (80-. )*. **364**, 48–53 (2019).
144. Gordley, R. M., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. Synthesis of programmable integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5053–5058 (2009).
145. Olorunniji, F. J., Rosser, S. J. & Stark, W. M. Site-specific recombinases: Molecular machines for the Genetic Revolution. *Biochemical Journal* vol. 473 673–684 (2016).
146. Akopian, A., He, J., Boocock, M. R. & Stark, W. M. Chimeric recombinases with designed DNA sequence recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8688–8691 (2003).
147. Chaikind, Brian ; Bessen, Jeffrey L; Thompson, David B; Hu, Johnny H; Liu, D. R. A programmable Cas9-serine recombinase fusion protein that operates on DNA sequences in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9758–9770 (2016).
148. Sarkar, I., Hauber, I., Hauber, J. & Buchholz, F. HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science (80-. )*. **316**, 1912–1915 (2007).
149. Buchholz, F., Angrand, P. O. & Stewart, A. F. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **16**, 657–662 (1998).
150. Karpinski, J. *et al.* Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. *Nat. Biotechnol.* **34**, 401–409 (2016).
151. Piovesan, A. *et al.* Human protein-coding genes and gene feature statistics in 2019. *BMC Res. Notes* **12**, 315 (2019).
152. Doench, J. G. *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **34**, 184–191 (2016).
153. Thomas, J. D. *et al.* RNA isoform screens uncover the essentiality and tumor-suppressor activity of ultraconserved poison exons. *Nat. Genet.* **52**, 84–94 (2020).
154. Wang, T. *et al.* Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science (80-. )*. **350**, 1096–1101 (2015).
155. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods* vol. 11 783–784 (2014).
156. Addgene: Broad GPP - Human Kinome CRISPR Knockout Pooled Libraries. <https://www.addgene.org/pooled-library/broadgpp-human-kinome/>.
157. Addgene: Broad GPP - Mouse Kinome CRISPR Knockout Pooled Libraries. <https://www.addgene.org/pooled-library/broadgpp-mouse-kinome/>.
158. Wang, T. *et al.* Gene Essentiality Profiling Reveals Gene Networks and Synthetic Lethal Interactions with Oncogenic Ras. *Cell* **168**, 890-903.e15 (2017).
159. Chong, Z. S., Ohnishi, S., Yusa, K. & Wright, G. J. Pooled extracellular receptor-ligand interaction screening using CRISPR activation. *Genome Biol.* **19**, (2018).

160. CRISPR Screening Libraries | Arrayed CRISPR-Cas9 Libraries.  
<https://www.synthego.com/products/crispr-kits/screening-libraries>.
161. Haley, B. & Roudnicky, F. Functional Genomics for Cancer Drug Target Discovery. *Cancer Cell* vol. 38 (2020).
162. Wang, C., Lu, T., Emanuel, G., Babcock, H. P. & Zhuang, X. Imaging-based pooled CRISPR screening reveals regulators of lncRNA localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **166**, 10842–10851 (2019).
163. Wheeler, E. C. *et al.* Pooled CRISPR screens with imaging on microarray reveals stress granule-regulatory factors. *Nat. Methods* **17**, 636–642 (2020).
164. Behan, F. M. *et al.* Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR–Cas9 screens. *Nature* **568**, 511–516 (2019).
165. Gonatopoulos-Pournatzis, T. *et al.* Genetic interaction mapping and exon-resolution functional genomics with a hybrid Cas9–Cas12a platform. *Nat. Biotechnol.* **38**, 638–648 (2020).
166. Gier, R. A. *et al.* High-performance CRISPR-Cas12a genome editing for combinatorial genetic screening. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
167. DeWeirdt, P. C. *et al.* Optimization of AsCas12a for combinatorial genetic screens in human cells. *Nat. Biotechnol.* (2020) doi:10.1038/s41587-020-0600-6.
168. Najm, F. J. *et al.* Orthologous CRISPR-Cas9 enzymes for combinatorial genetic screens. *Nat. Biotechnol.* **36**, 179–189 (2018).
169. Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A. & Weber, B. Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 19 23–38 (2020).
170. Fong, P. C. *et al.* Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from *BRCA* Mutation Carriers. *N. Engl. J. Med.* **361**, 123–134 (2009).
171. Dhoonmoon, A., Schleicher, E. M., Clements, K. E., Nicolae, C. M. & Moldovan, G. L. Genome-wide CRISPR synthetic lethality screen identifies a role for the ADP-ribosyltransferase PARP14 in DNA replication dynamics controlled by ATR. *Nucleic Acids Res.* **48**, 7252–7264 (2020).
172. Wang, C. *et al.* Genome-wide CRISPR screens reveal synthetic lethality of RNASEH2 deficiency and ATR inhibition. *Oncogene* **38**, 2451–2463 (2019).
173. Wang, T. *et al.* Gene Essentiality Profiling Reveals Gene Networks and Synthetic Lethal Interactions with Oncogenic Ras. *Cell* **168**, 890-903.e15 (2017).
174. Chan, E. M. *et al.* WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. *Nature* **568**, 551–556 (2019).
175. Shi, J. *et al.* Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nat. Biotechnol.* **33**, 661–667 (2015).
176. Neggers, J. E. *et al.* Target identification of small molecules using large-scale CRISPR-Cas mutagenesis scanning of essential genes. *Nat. Commun.* **9**, 1–14 (2018).
177. Pettitt, S. J. *et al.* Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nat. Commun.* **9**, (2018).

178. Chow, R. D. & Chen, S. Cancer CRISPR Screens In Vivo. *Trends in Cancer* vol. 4 349–358 (2018).
179. Dong, M. B. *et al.* Systematic Immunotherapy Target Discovery Using Genome-Scale In Vivo CRISPR Screens in CD8 T Cells. *Cell* **178**, 1189-1204.e23 (2019).
180. So, R. W. L. *et al.* Application of CRISPR genetic screens to investigate neurological diseases. *Molecular Neurodegeneration* vol. 14 1–16 (2019).
181. Winter, S. V., Zychlinsky, A. & Bardoel, B. W. Genome-wide CRISPR screen reveals novel host factors required for *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin-mediated toxicity. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
182. Flint, M. *et al.* A genome-wide CRISPR screen identifies N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase as a potential antiviral target for Ebola virus. *Nat. Commun.* **10**, 1–13 (2019).
183. Li, B. *et al.* Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection. *Nat. Commun.* **11**, 1–18 (2020).
184. Park, R. J. *et al.* A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat. Genet.* **49**, 193–203 (2017).
185. Cai, E. P. *et al.* Genome-scale in vivo CRISPR screen identifies RNLS as a target for beta cell protection in type 1 diabetes. *Nat. Metab.* 1–12 (2020) doi:10.1038/s42255-020-0254-1.
186. Zhao, D. *et al.* Combinatorial CRISPR-Cas9 Metabolic Screens Reveal Critical Redox Control Points Dependent on the KEAP1-NRF2 Regulatory Axis. *Mol. Cell* **69**, 699-708.e7 (2018).
187. Wang, H. *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**, 910–918 (2013).
188. Smalley, E. CRISPR mouse model boom, rat model renaissance. *Nature Biotechnology* vol. 34 893–894 (2016).
189. Yan, S. *et al.* A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington’s Disease. *Cell* **173**, 989-1002.e13 (2018).
190. Lv, Q. *et al.* Efficient Generation of Myostatin Gene Mutated Rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
191. Chen, Y. *et al.* Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 3764–3774 (2015).
192. Yin, L. *et al.* Multiplex conditional mutagenesis using transgenic expression of Cas9 and sgRNAs. *Genetics* **200**, 431–441 (2015).
193. Maresch, R. *et al.* Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
194. Xue, W. *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* **514**, 380–384 (2014).
195. Platt, R. J. *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* **159**, 440–455 (2014).
196. Bäck, S. *et al.* Neuron-Specific Genome Modification in the Adult Rat Brain Using CRISPR-Cas9 Transgenic Rats. *Neuron* **102**, 105-119.e8 (2019).
197. Ambasadhan, R. *et al.* Isogenic Human iPSC Parkinson’s Model Shows Nitrosative Stress-

- Induced Dysfunction in MEF2-PGC1 $\alpha$  Transcription. *Cell* **155**, 1351 (2013).
198. Paquet, D. *et al.* Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* **533**, 125–129 (2016).
  199. Martinez, R. A. *et al.* Genome engineering of isogenic human ES cells to model autism disorders. *Nucleic Acids Res.* **43**, e65 (2015).
  200. Brandao, K. O., Tabel, V. A., Atsma, D. E., Mummery, C. L. & Davis, R. P. Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: From mechanisms to therapies. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 10 1039–1059 (2017).
  201. Wang, Y. *et al.* Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**, 451–459 (2014).
  202. Rebs, S., Sedaghat-Hamedani, F., Kayvanpour, E., Meder, B. & Streckfuss-Bömeke, K. Generation of pluripotent stem cell lines and CRISPR/Cas9 modified isogenic controls from a patient with dilated cardiomyopathy harboring a RBM20 p.R634W mutation. *Stem Cell Res.* **47**, (2020).
  203. Haagensen, E. J. *et al.* Pre-clinical use of isogenic cell lines and tumours in vitro and in vivo for predictive biomarker discovery; Impact of KRAS and PI3KCA mutation status on MEK inhibitor activity is model dependent. *Eur. J. Cancer* **56**, 69–76 (2016).
  204. Zou, X. *et al.* Validating the concept of mutational signatures with isogenic cell models. *Nat. Commun.* **9**, 1–16 (2018).
  205. Yau, E. H. *et al.* Genome-wide CRISPR screen for essential cell growth mediators in mutant KRAS colorectal cancers. *Cancer Res.* **77**, 6330–6339 (2017).
  206. Alić, I. *et al.* Patient-specific Alzheimer-like pathology in trisomy 21 cerebral organoids reveals BACE2 as a gene dose-sensitive AD suppressor in human brain. *Mol. Psychiatry* **4**, 1–23 (2020).
  207. Dekkers, J. F. *et al.* Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **8**, 344ra84-344ra84 (2016).
  208. Yang, H., Sun, L., Liu, M. & Mao, Y. Patient-derived organoids: A promising model for personalized cancer treatment. *Gastroenterology Report* vol. 6 243–245 (2018).
  209. Kim, J., Koo, B. K. & Knoblich, J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1–14 (2020) doi:10.1038/s41580-020-0259-3.
  210. Drost, J. & Clevers, H. Organoids in cancer research. *Nature Reviews Cancer* vol. 18 407–418 (2018).
  211. Tachibana, C. Beyond CRISPR: What's current and upcoming in genome editing. *Science* 1481–1483 <https://www.sciencemag.org/features/2019/09/beyond-crispr-what-s-current-and-upcoming-genome-editing> (2019).
  212. Li, H. *et al.* Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 5 1–23 (2020).
  213. Doudna, J. A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* vol. 578 229–236 (2020).

214. Maeder, M. L. & Gersbach, C. A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy* vol. 24 430–446 (2016).
215. Perez, E. E. *et al.* Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **26**, 808–816 (2008).
216. Galanello, R. & Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* vol. 5 (2010).
217. Cao, A. & Galanello, R. Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine* vol. 12 61–76 (2010).
218. DeWitt, M. A. *et al.* Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci. Transl. Med.* **8**, 360ra134 (2016).
219. Martyn, G. E. *et al.* Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding. *Nat. Genet.* **50**, 498–503 (2018).
220. Humbert, O. *et al.* Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* **11**, 31 (2019).
221. A Study to Assess the Safety, Tolerability, and Efficacy of ST-400 for Treatment of Transfusion-Dependent Beta-thalassemia (TDT) - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03432364?term=bcl11a&draw=2&rank=2>.
222. A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Severe Sickle Cell Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03745287?term=bcl11a&draw=2&rank=5>.
223. A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03655678?term=bcl11a&draw=2&rank=6>.
224. Zipkin, M. CRISPR’s “magnificent moment” in the clinic. *Nat. Biotechnol.* (2019)  
doi:10.1038/d41587-019-00035-2.
225. CRISPR Therapeutics and Vertex Announce Positive Safety and Efficacy Data From First Two Patients Treated With Investigational CRISPR/Cas9 Gene-Editing Therapy CTX001<sup>®</sup> for Severe Hemoglobinopathies | Vertex Pharmaceuticals. <https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/crispr-therapeutics-and-vertex-announce-positive-safety-and>.
226. Safety Study of Zinc Finger Nuclease CCR5-modified Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in HIV-1 Infected Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02500849>.
227. Safety of Transplantation of CRISPR CCR5 Modified CD34+ Cells in HIV-infected Subjects With Hematological Malignancies - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03164135>.
228. Xu, L. *et al.* CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1240–1247 (2019).
229. Editas Medicine Presents Pre-Clinical Data from a Study of EDIT-301 with Sickle Patient Cells for the Potential Treatment of Sickle Cell Disease Nasdaq:EDIT.  
<https://www.globenewswire.com/news-release/2020/06/12/2047337/0/en/Editas-Medicine-Presents-Pre-Clinical-Data-from-a-Study-of-EDIT-301-with-Sickle-Patient-Cells-for-the-Potential-Treatment-of-Sickle-Cell-Disease.html>.

230. De Ravin, S. S. *et al.* CRISPR-Cas9 gene repair of hematopoietic stem cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
231. De Ravin, S. S. *et al.* Targeted gene addition in human CD34 + hematopoietic cells for correction of X-linked chronic granulomatous disease. *Nat. Biotechnol.* **34**, 424–429 (2016).
232. A Study Evaluating UCART019 in Patients With Relapsed or Refractory CD19+ Leukemia and Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03166878>.
233. Schirotti, G. *et al.* Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
234. Xin Yu, J., Hubbard-Lucey, V. M. & Tang, J. The global pipeline of cell therapies for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 18 821–822 (2019).
235. Guedan, S., Ruella, M. & June, C. H. Emerging Cellular Therapies for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 145–171 (2019).
236. Dougan, M., Dranoff, G. & Dougan, S. K. Cancer Immunotherapy: Beyond Checkpoint Blockade. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **3**, 55–75 (2019).
237. Schuster, S. J. *et al.* Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **380**, 45–56 (2019).
238. Maude, S. L. *et al.* Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 439–448 (2018).
239. Turtle, C. J. *et al.* CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J. Clin. Invest.* **126**, 2123–2138 (2016).
240. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **365**, 725–733 (2011).
241. Kochenderfer, J. N. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* **119**, 2709–2720 (2012).
242. Scholler, J. *et al.* Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med.* **4**, 132ra53 (2012).
243. Bailey, S. R. & Maus, M. V. Gene editing for immune cell therapies. *Nature Biotechnology* vol. 37 1425–1434 (2019).
244. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **118**, 3132–3142 (2008).
245. Eyquem, J. *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* **543**, 113–117 (2017).
246. MacLeod, D. T. *et al.* Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol. Ther.* **25**, 949–961 (2017).
247. Shi, L. *et al.* CRISPR knock out CTLA-4 enhances the anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Gene* **636**, 36–41 (2017).
248. Zhao, Z. *et al.* CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor

- activity of cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget* **9**, 5208–5215 (2018).
249. Rupp, L. J. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-Tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
  250. Choi, B. D. *et al.* CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. *J. Immunother. Cancer* **7**, 304 (2019).
  251. CD19 CAR and PD-1 Knockout Engineered T Cells for CD19 Positive Malignant B-cell Derived Leukemia and Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03298828?term=pd-1+knock+out&draw=2&rank=1>.
  252. PD-1 Knockout Engineered T Cells for Metastatic Non-small Cell Lung Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02793856>.
  253. Study of CRISPR-Cas9 Mediated PD-1 and TCR Gene-knocked Out Mesothelin-directed CAR-T Cells in Patients With Mesothelin Positive Multiple Solid Tumors. - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03545815>.
  254. NY-ESO-1-redirected CRISPR (TCRendo and PD1) Edited T Cells (NYCE T Cells) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03399448?term=NCT03399448&rank=1>.
  255. Thommen, D. S. & Schumacher, T. N. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* vol. 33 547–562 (2018).
  256. www.iqwig.de - [G18-11] Tisagenlecleucel (akute lymphatische B-Zell-Leukämie) - Bewertung gemäß § 35a Abs. 1 Satz 11 SGB V. <https://www.iqwig.de/de/projekte-ergebnisse/projekte/gesundheitsoekonomie/g18-11-tisagenlecleucel-akute-lymphatische-b-zell-leukaemie-bewertung-gemaess-35a-abs-1-satz-11-sgb-v.10617.html>.
  257. Depil, S., Duchateau, P., Grupp, S. A., Mufti, G. & Poirot, L. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 19 185–199 (2020).
  258. Poh, A. The Quest for Off-the-Shelf CAR T Cells. *Cancer discovery* vol. 8 787–788 (2018).
  259. Anwer, F. *et al.* Donor origin CAR T cells: Graft versus malignancy effect without GVHD, a systematic review. *Immunotherapy* vol. 9 123–130 (2017).
  260. Ruella, M. & Kenderian, S. S. Next-Generation Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Going off the Shelf. *BioDrugs* **31**, 473–481 (2017).
  261. Cooper, M. L. *et al.* An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia* **32**, 1970–1983 (2018).
  262. Ren, J. *et al.* Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2255–2266 (2017).
  263. Torikai, H. *et al.* A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood* **119**, 5697–5705 (2012).
  264. Provasi, E. *et al.* Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat. Med.* **18**, 807–815 (2012).
  265. Philip, L. P. B. *et al.* Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for ‘off-the-shelf’ adoptive T-cell immunotherapies. *Cancer Res.* **75**, 3853–3864 (2015).

266. Roth, T. L. *et al.* Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature* **559**, 405–409 (2018).
267. Study Evaluating Safety and Efficacy of UCART123 in Patients With Relapsed/ Refractory Acute Myeloid Leukemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03190278>.
268. A Study Evaluating UCART019 in Patients With Relapsed or Refractory CD19+ Leukemia and Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03166878>.
269. A Feasibility and Safety Study of Universal Dual Specificity CD19 and CD20 or CD22 CAR-T Cell Immunotherapy for Relapsed or Refractory Leukemia and Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03398967>.
270. Dose-escalation Study of Safety of PBCAR0191 in Patients With r/r NHL and r/r B-cell ALL - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03666000>.
271. UCART19, AN ALLOGENEIC ANTI-CD19 CAR T-CELL PRODUCT, IN HIGH RISK.... EHA Library. Benjamin R. Jun 15 2018; 214674. [https://library.ehaweb.org/eha/2018/stockholm/214674/reuben.benjamin.ucart19.an.allogeneic.anti-cd19.car.t-cell.product.in.high.html?f=media=3\\*c\\_id=214674\\*listing=3\\*browseby=8](https://library.ehaweb.org/eha/2018/stockholm/214674/reuben.benjamin.ucart19.an.allogeneic.anti-cd19.car.t-cell.product.in.high.html?f=media=3*c_id=214674*listing=3*browseby=8).
272. Gao, Q. *et al.* Therapeutic potential of CRISPR/Cas9 gene editing in engineered T-cell therapy. *Cancer Medicine* vol. 8 4254–4264 (2019).
273. Torikai, H. *et al.* Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood* **122**, 1341–1349 (2013).
274. Autoimmunerkrankungen: IMD Institut für medizinische Diagnostik, Labor. <https://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/autoimmunerkrankungen.html>.
275. Kim, Y. C. *et al.* Engineered antigen-specific human regulatory T cells: Immunosuppression of FVIII-specific T- and B-cell responses. *Blood* **125**, 1107–1115 (2015).
276. Laoharawee, K. *et al.* Dose-Dependent Prevention of Metabolic and Neurologic Disease in Murine MPS II by ZFN-Mediated In Vivo Genome Editing. *Mol. Ther.* **26**, 1127–1136 (2018).
277. Single Ascending Dose Study in Participants With LCA10 - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03666000>.
278. Ruan, G.-X. *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Mol. Ther.* **25**, 331–341 (2017).
279. Maeder, M. L. *et al.* Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat. Med.* **25**, 229–233 (2019).
280. LUXTURNA | FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/luxturna>.
281. Bushby, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology* vol. 9 77–93 (2010).
282. Amoasii, L. *et al.* Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
283. Bengtsson, N. E. *et al.* Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates

- pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **8**, 1–10 (2017).
284. Nelson, C. E. *et al.* Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* **25**, 427–432 (2019).
  285. Long, C. *et al.* Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science (80-. )*. **351**, 400–403 (2016).
  286. Nelson, C. E. *et al.* In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science (80-. )*. **351**, 403–407 (2016).
  287. Tabebordbar, M. *et al.* In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science (80-. )*. **351**, 407–411 (2016).
  288. Amoasii, L. *et al.* Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science (80-. )*. **362**, 86–91 (2018).
  289. Pipeline | CRISPR. <http://www.crisprtx.com/programs/pipeline>.
  290. Research and Pipeline | Editas Medicine. <https://www.editasmedicine.com/gene-editing-pipeline/#inVivo>.
  291. Vertex signs deals with CRISPR Therapeutics and Exonics. <https://www.biopharmareporter.com/Article/2019/06/12/Vertex-signs-deals-with-CRISPR-Therapeutics-and-Exonics>.
  292. Finn, J. D. *et al.* A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.* **22**, 2227–2235 (2018).
  293. Ionis and Akcea Partner to Commercialize Inotersen for hATTR | Ionis Pharmaceuticals, Inc. <https://ir.ionispharma.com/news-releases/news-release-details/ionis-and-akcea-partner-commercialize-inotersen-hattr>.
  294. Morrison, C. Alnylam prepares to land first RNAi drug approval. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 156–157 (2018).
  295. Safety, Tolerability, and PK of LBP-EC01 in Patients With Lower Urinary Tract Colonization Caused by E. Coli - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04191148?term=LBP-EC01&draw=2&rank=1>.
  296. Schmidt, C. Phage therapy’s latest makeover. *Nature biotechnology* vol. 37 581–586 (2019).
  297. Selle, K. *et al.* In vivo targeting of clostridioides difficile using phage- delivered CRISPR-Cas3 antimicrobials. *MBio* **11**, (2020).
  298. Bikard, D. *et al.* Exploiting CRISPR-cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1146–1150 (2014).
  299. Citorik, R. J., Mimee, M. & Lu, T. K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1141–1145 (2014).
  300. Kiga, K. *et al.* Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nat. Commun.* **11**, 1–11 (2020).
  301. Technology | Excision Bio. <https://www.excision.bio/technology>.
  302. Gorsuch, C. *et al.* HBV-ARCUS-POL Nucleases Show Improved Specificity Across Generations A

*Gene Editing Approach to Eliminate Hepatitis B Virus Using ARCUS Meganucleases.*

303. Freije, C. A. *et al.* Programmable Inhibition and Detection of RNA Viruses Using Cas13. *Mol. Cell* **76**, 826–837.e11 (2019).
304. Hsu, D. S., Kornepati, A. V., Glover, W., Kennedy, E. M. & Cullen, B. R. Targeting HPV16 DNA using CRISPR/Cas inhibits anal cancer growth *in vivo*. *Future Virol.* **13**, 475–482 (2018).
305. Ding, W. *et al.* Zinc finger nucleases targeting the human papillomavirus E7 oncogene induce E7 disruption and a transformed Phenotype in HPV16/18-positive cervical cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **20**, 6495–6503 (2014).
306. Yoshida, T. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncol. Lett.* **17**, 2197–2206 (2019).
307. Study of Molecular-targeted Therapy Using Zinc Finger Nuclease in Cervical Precancerous Lesions - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02800369>.
308. Study of Targeted Therapy Using Transcription Activator-like Effector Nucleases in Cervical Precancerous Lesions - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03226470>.
309. A Safety and Efficacy Study of TALEN and CRISPR/Cas9 in the Treatment of HPV-related Cervical Intraepithelial Neoplasia I - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03057912>.
310. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H. & Hobbs, H. H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272 (2006).
311. Chadwick, A. C., Wang, X. & Musunuru, K. In Vivo Base Editing of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9) as a Therapeutic Alternative to Genome Editing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 1741–1747 (2017).
312. Begley, S. CRISPR base editing slashes cholesterol levels in monkeys - STAT. <https://www.statnews.com/2020/06/27/crispr-base-editing-slashes-cholesterol-in-monkeys/>.
313. Wang, L. *et al.* Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol. *Nat. Biotechnol.* **36**, 717–725 (2018).
314. Zeng, J. *et al.* Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **26**, 535–541 (2020).
315. Yeh, W. H. *et al.* In vivo base editing restores sensory transduction and transiently improves auditory function in a mouse model of recessive deafness. *Sci. Transl. Med.* **12**, 9101 (2020).
316. Lim, C. K. W. *et al.* Treatment of a Mouse Model of ALS by In Vivo Base Editing. *Mol. Ther.* **28**, 1177–1189 (2020).
317. Iwase, H. *et al.* Pig kidney graft survival in a baboon for 136 days: Longest life-supporting organ graft survival to date. *Xenotransplantation* **22**, 302–309 (2015).
318. Yang, L. *et al.* Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science (80-. )*. **350**, 1101–1104 (2015).
319. Gootenberg, J. S. *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science (80-. )*. **356**, 438–442 (2017).

320. Chen, J. S. *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science (80-. )*. **360**, 436–439 (2018).
321. Broughton, J. P. *et al.* CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat. Biotechnol.* **38**, 870–874 (2020).
322. Myhrvold, C. *et al.* Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science (80-. )*. **360**, 444–448 (2018).
323. Gootenberg, J. S. *et al.* Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science (80-. )*. **360**, 439–444 (2018).
324. Ackerman, C. M. *et al.* Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature* **582**, 277–282 (2020).
325. Microbiology by numbers. *Nature Reviews Microbiology* vol. 9 628 (2011).
326. Mammoth Biosciences’s CRISPR-based COVID-19 test receives NIH funding through RADx program | TechCrunch. [https://techcrunch.com/2020/07/31/mammoth-biosciences-crispr-based-covid-19-test-receives-nih-fundings-through-radx-program/?guccounter=1&guce\\_referrer=aHR0cHM6Ly93d3cuZ29vZ2xlLmNvbS8&guce\\_referrer\\_sig=AQAAAEaxf1vh8nGhkUUFylcg1KtGm7G0--eQL-Zj1a9T\\_k7ultbK5PkFC1QMNsOt1HK2Lwpftf6d4S0xwNc1-Uygh2CQCWnHo\\_oIU70sNlyQGyQ7NFMEvC5a-NtjTao5pZQRZlGmB1v3mHiMP9SqQiV9u4azKCNAIJ6-ioJQj4jVrmAt](https://techcrunch.com/2020/07/31/mammoth-biosciences-crispr-based-covid-19-test-receives-nih-fundings-through-radx-program/?guccounter=1&guce_referrer=aHR0cHM6Ly93d3cuZ29vZ2xlLmNvbS8&guce_referrer_sig=AQAAAEaxf1vh8nGhkUUFylcg1KtGm7G0--eQL-Zj1a9T_k7ultbK5PkFC1QMNsOt1HK2Lwpftf6d4S0xwNc1-Uygh2CQCWnHo_oIU70sNlyQGyQ7NFMEvC5a-NtjTao5pZQRZlGmB1v3mHiMP9SqQiV9u4azKCNAIJ6-ioJQj4jVrmAt).
327. Satyanarayana, Megha. A COVID-19 diagnostic that uses CRISPR gets a nod from the FDA. <https://cen.acs.org/analytical-chemistry/diagnostics/COVID-19-diagnostic-uses-CRISPR/98/web/2020/05>.
328. Dever, D. P. *et al.* CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* **539**, 384–389 (2016).
329. Yin, H., Kauffman, K. J. & Anderson, D. G. Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 16 387–399 (2017).
330. Hindriksen, S. *et al.* Baculoviral delivery of CRISPR/Cas9 facilitates efficient genome editing in human cells. *PLoS One* **12**, (2017).
331. Park, A. *et al.* Sendai virus, an RNA virus with no risk of genomic integration, delivers CRISPR/Cas9 for efficient gene editing. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **3**, 16057 (2016).
332. Tebas, P. *et al.* Gene Editing of *CCR5* in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* **370**, 901–910 (2014).
333. Bjursell, M. *et al.* Therapeutic Genome Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates  $\alpha$ 1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine* **29**, 104–111 (2018).
334. Dull, T. *et al.* A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *J. Virol.* **72**, 8463–8471 (1998).
335. Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (80-. )*. **272**, 263–267 (1996).
336. Milone, M. C. & O’Doherty, U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* vol. 32 1529–1541 (2018).

337. Joglekar, A. V. & Sandoval, S. Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises. *Human Gene Therapy Methods* vol. 28 291–301 (2017).
338. Harvey, A. R. *et al.* Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: A comparison with lentiviral vectors. *Mol. Cell. Neurosci.* **21**, 141–157 (2002).
339. Vandendriessche, T. *et al.* Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 16–24 (2007).
340. Mendell, J. R. *et al.* Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1713–1722 (2017).
341. FDA approves novel gene therapy to treat patients with a rare form of inherited vision loss | FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-novel-gene-therapy-treat-patients-rare-form-inherited-vision-loss>.
342. Ascending Dose Study of Genome Editing by Zinc Finger Nuclease Therapeutic SB-FIX in Subjects With Severe Hemophilia B - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02695160>.
343. Kotterman, M. A. & Schaffer, D. V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 445–451 (2014).
344. Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J. M. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J. Infect. Dis.* **199**, 381–390 (2009).
345. Verdera, H. C., Kuranda, K. & Mingozzi, F. AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. *Molecular Therapy* vol. 28 723–746 (2020).
346. Tse, L. V. *et al.* Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4812–E4821 (2017).
347. Chew, W. L. *et al.* A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat. Methods* **13**, 868–874 (2016).
348. Kaiser, J. Virus used in gene therapies may pose cancer risk, dog study hints. *Science* (80-. ). (2020) doi:10.1126/science.aba7696.
349. High-dose AAV gene therapy deaths. *Nature biotechnology* vol. 38 910 (2020).
350. Sharma, R. *et al.* In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood* **126**, 1777–1784 (2015).
351. Song, C. Q. *et al.* In Vivo Genome Editing Partially Restores Alpha1-Antitrypsin in a Murine Model of AAT Deficiency. *Hum. Gene Ther.* **29**, 853–860 (2018).
352. Gaj, T. *et al.* In vivo genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci. Adv.* **3**, (2017).
353. Yang, S. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 2719–2724 (2017).
354. Ekman, F. K. *et al.* CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing Increases Lifespan and Improves Motor Deficits in a Huntington's Disease Mouse Model. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **17**, 829–839 (2019).

355. Xie, C. *et al.* Genome editing with CRISPR/Cas9 in postnatal mice corrects PRKAG2 cardiac syndrome. *Cell Res.* **26**, 1099–1111 (2016).
356. Pan, X. *et al.* In Vivo Ryr2 editing corrects catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ. Res.* **123**, 953–963 (2018).
357. van Haasteren, J., Li, J., Scheideler, O. J., Murthy, N. & Schaffer, D. V. The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing. *Nature Biotechnology* vol. 38 845–855 (2020).
358. Yin, H., Kauffman, K. J. & Anderson, D. G. Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 16 387–399 (2017).
359. Tong, S., Moyo, B., Lee, C. M., Leong, K. & Bao, G. Engineered materials for in vivo delivery of genome-editing machinery. *Nature Reviews Materials* vol. 4 726–737 (2019).
360. Reichmuth, A. M., Oberli, M. A., Jeklenec, A., Langer, R. & Blankschtein, D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther. Deliv.* **7**, 319–334 (2016).
361. Zatsepin, T. S., Kotelevtsev, Y. V. & Koteliansky, V. Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery - Going from bench to bedside. *International Journal of Nanomedicine* vol. 11 3077–3086 (2016).
362. Finn, J. D. *et al.* A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.* **22**, 2227–2235 (2018).
363. Yin, H. *et al.* structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1179–1187 (2017).
364. Wang, H. X. *et al.* Nonviral gene editing via CRISPR/Cas9 delivery by membrane-disruptive and endosomolytic helical polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4903–4908 (2018).
365. Lao, Y.-H. *et al.* HPV Oncogene Manipulation Using Nonvirally Delivered CRISPR/Cas9 or *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Adv. Sci.* **5**, 1700540 (2018).
366. Staahl, B. T. *et al.* Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Biotechnol.* **35**, 431–434 (2017).
367. Zuris, J. A. *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* **33**, 73–80 (2015).
368. Yeh, W. H., Chiang, H., Rees, H. A., Edge, A. S. B. & Liu, D. R. In vivo base editing of post-mitotic sensory cells. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
369. Wei, T., Cheng, Q., Min, Y. L., Olson, E. N. & Siegwart, D. J. Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nat. Commun.* **11**, 1–12 (2020).
370. Lee, B. *et al.* Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. *Nat. Biomed. Eng.* **2**, 497–507 (2018).
371. Lee, K. *et al.* Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 889–901 (2017).
372. Gaj, T., Guo, J., Kato, Y., Sirk, S. J. & Barbas, C. F. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat. Methods* **9**, 805–807 (2012).

373. Delivering the promise of RNA therapeutics. *Nature Medicine* vol. 25 1321 (2019).
374. Li, H. *et al.* Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 5 1–23 (2020).
375. Haber, J. E. A Life Investigating Pathways That Repair Broken Chromosomes. *Annual Review of Genetics* vol. 50 1–28 (2016).
376. Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 698–714 (2019).
377. Yeh, C. D., Richardson, C. D. & Corn, J. E. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nature Cell Biology* vol. 21 1468–1478 (2019).
378. Ye, L. *et al.* Programmable DNA repair with CRISPRa/i enhanced homology-directed repair efficiency with a single Cas9. *Cell Discov.* **4**, (2018).
379. Charpentier, M. *et al.* CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
380. Lomova, A. *et al.* Improving Gene Editing Outcomes in Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Temporal Control of DNA Repair. *Stem Cells* **37**, 284–294 (2019).
381. Gutschner, T., Haemmerle, M., Genovese, G., Draetta, G. F. & Chin, L. Post-translational Regulation of Cas9 during G1 Enhances Homology-Directed Repair. *Cell Rep.* **14**, 1555–1566 (2016).
382. Carlson-Stevermer, J. *et al.* Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
383. Aird, E. J., Lovendahl, K. N., St. Martin, A., Harris, R. S. & Gordon, W. R. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun. Biol.* **1**, (2018).
384. Savic, N. *et al.* Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair. *Elife* **7**, (2018).
385. Nguyen, D. N. *et al.* Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nature Biotechnology* vol. 38 44–49 (2020).
386. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* vol. 526 68–74 (2015).
387. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
388. Lessard, S. *et al.* Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E11257–E11266 (2017).
389. Scott, D. A. & Zhang, F. Implications of human genetic variation in CRISPR-based therapeutic genome editing. *Nat. Med.* **23**, 1095–1101 (2017).
390. Wagner, D. L. *et al.* High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat. Med.* **25**, 242–248 (2019).
391. Charlesworth, C. T. *et al.* Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in

- humans. *Nat. Med.* **25**, 249–254 (2019).
392. Li, A. *et al.* AAV-CRISPR Gene Editing Is Negated by Pre-existing Immunity to Cas9. *Mol. Ther.* **28**, 1432–1441 (2020).
393. Wang, D. *et al.* Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. *Hum. Gene Ther.* **26**, 432–442 (2015).
394. Petris, G. *et al.* Hit and go CAS9 delivered through a lentiviral based self-limiting circuit. *Nat. Commun.* **8**, 1–9 (2017).
395. Li, F. *et al.* Utility of Self-Destructing CRISPR/Cas Constructs for Targeted Gene Editing in the Retina. *Hum. Gene Ther.* **30**, 1349–1360 (2019).
396. Li, A. *et al.* A Self-Deleting AAV-CRISPR System for In Vivo Genome Editing. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **12**, 111–122 (2019).
397. China bestätigt Geburt der Crispr-Babys - Wissen - SZ.de.  
<https://www.sueddeutsche.de/wissen/bestaetigung-crispr-babys-china-1.4296824>.
398. Cyranoski, D. The CRISPR-baby scandal: what's next for human gene-editing. *Nature* vol. 566 440–442 (2019).
399. Chen, Y., Niu, Y. & Ji, W. Genome editing in nonhuman primates: approach to generating human disease models. *J. Intern. Med.* **280**, 246–251 (2016).
400. Liu, Z. *et al.* Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature* **530**, 98–102 (2016).
401. Liang, P. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* **6**, 363–372 (2015).
402. Fogarty, N. M. E. *et al.* Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* **550**, 67–73 (2017).
403. Tang, L. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol. Genet. Genomics* **292**, 525–533 (2017).
404. Ma, H. *et al.* Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* **548**, 413–419 (2017).
405. Freed, D., Stevens, E. L. & Pevsner, J. Somatic mosaicism in the human genome. *Genes* vol. 5 1064–1094 (2014).
406. Egli, D. *et al.* Inter-homologue repair in fertilized human eggs? *Nature* **560**, E5–E7 (2018).
407. Liang, D. *et al.* FREQUENT GENE CONVERSION IN HUMAN EMBRYOS INDUCED BY DOUBLE STRAND BREAKS. *bioRxiv* 2020.06.19.162214 (2020) doi:10.1101/2020.06.19.162214.
408. Zuccaro, M. V *et al.* Reading frame restoration at the EYS locus, and allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos. *bioRxiv* 2020.06.17.149237 (2020) doi:10.1101/2020.06.17.149237.
409. Alanis-Lobato, G. *et al.* Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *bioRxiv* 2020.06.05.135913 (2020) doi:10.1101/2020.06.05.135913.

410. Kosicki, M., Tomberg, K. & Bradley, A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* (2018) doi:10.1038/nbt.4192.

## Bildnachweis:

Abb. 1: Guido Hegasy ([www.hegasy.de](http://www.hegasy.de)). Publiziert unter [CC BY-SA 4.0](#).

Abb. 2: Arora, L. & Narula, A. Gene editing and crop improvement using CRISPR-cas9 system. *Frontiers in Plant Science* vol. 8 1932 (2017). Publiziert unter [CC BY 4.0](#)

Abb. 3: Guido Hegasy ([www.hegasy.de](http://www.hegasy.de)). Publiziert unter [CC BY-SA 4.0](#).

Abb. 4: Matsoukas, I. G. Prime Editing: Genome Editing for Rare Genetic Diseases Without Double Strand Breaks or Donor DNA. *Front. Genet.* **11**, 528 (2020). Publiziert unter [CC BY 4.0](#)

Abb. 5: Matsoukas, I. G. Prime Editing: Genome Editing for Rare Genetic Diseases Without Double Strand Breaks or Donor DNA. *Front. Genet.* **11**, 528 (2020). Publiziert unter [CC BY 4.0](#)

Abb. 6: Adaptiert aus Lo A and Qi L. Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR–Cas systems [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research* 2017, 6(F1000 Faculty Rev):747 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.11113.1>) Publiziert unter [CC BY 4.0](#)

Abb. 7: Maeder, M. L. & Gersbach, C. A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy* vol. 24 430–446 (2016). Publiziert unter [CC BY 4.0](#)

Abb. 8: Gao, Q. *et al.* Therapeutic potential of CRISPR/Cas9 gene editing in engineered T-cell therapy. *Cancer Medicine* vol. 8 4254–4264 (2019). Publiziert unter [CC BY 4.0](#)

Abb. 9: Li, H. *et al.* Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 5 1–23 (2020). Publiziert unter [CC BY 4.0](#)