



HAMBURG

Forschungsabt. Zell- und Gentherapie, Klinik für Stammzelltransplantation



# Gentherapeutische Strategien: Heilung oder Manipulation?

Alt-Rehse, 09.06.2017

Prof. Dr. Boris Fehse



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf



Erkrankungen durch  
*Fehler* der  
Erbinformation



Therapie durch  
*Korrektur* der  
Erbinformation



**1865: Mendelsche Gesetze- Begründung der Genetik**

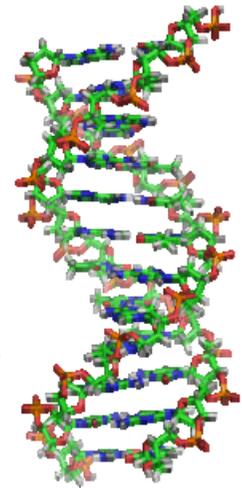
**1944: DNA als Träger der Erbsubstanz**

**1953: DNA-Doppelhelix**

**1966: Tatum/Lederberg: gezielte Modifikation humaner Zellen**

**1970: 1. Gentherapie-Versuch am Menschen (Köln!)**

**1974: 1. menschliches Gen kloniert & sequenziert**





Z. Kinderheilk. 110, 1-3 (1975)  
© by Springer-Verlag 1975

## Unsuccessful Trial of Gene Replacement in Arginase Deficiency

H. G. Terheggen

Municipal Children's Hospital, Cologne

A. Lowenthal and F. Larinha

Born-Bunge Foundation, Berchem-Antwerp

J. P. Colombo

Chemisches Zentrallabor, Inselspital, University of Berne, Berne

S. Rogers

The University of Tennessee, College of Basic Medical Sciences, Memphis

Received July 30, 1974

**Therapieansatz:** Injektion des Shope papilloma virus (SPV) in zwei Schwestern mit Hyperarginämie (Wildtyp SPV – Warzen b. Kaninchen)

### Wissenschaftlicher Hintergrund:

- Ersatz („**replacement**“) des fehlenden Enzyms durch virale Arginase
- geringere Serumargininspiegel bei Shope & einigen Labormitarbeitern



**1975: Asilomar-Konferenz (internationale Richtlinien)**

**1980: illegale Gentherapie-Versuche bei  $\beta$ -Thalassämie**

**1989: 1. offizielle Genmarkierungsstudie**

**1990: 1. therapeutische Studie**

**1999: 1. Todesfall infolge Gentherapie**

**2000: 1. überzeugender Heilungserfolg**

**2011: CD19-CAR-Gentherapie funktioniert**

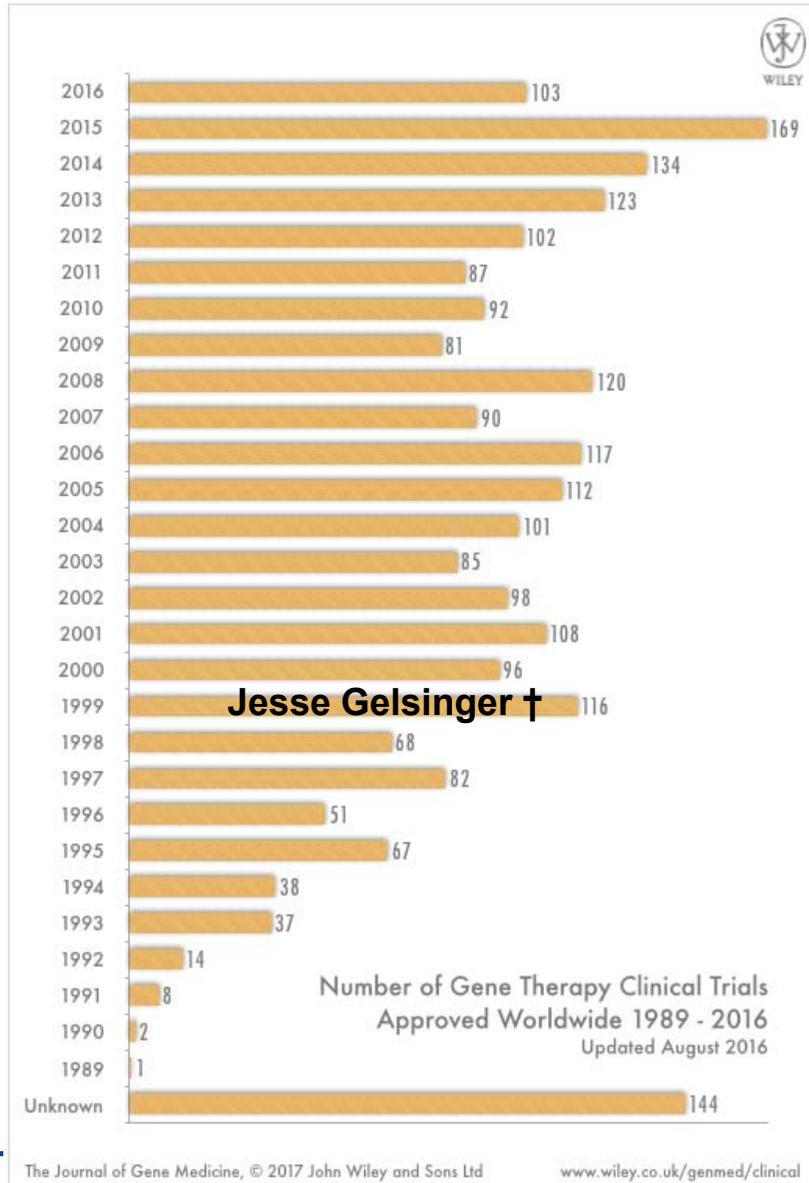
**2014: CRISPR/Cas**

**2017: Brauchen wir Asilomar 2.0?**

---



# Geschichte der Gentherapie II



- ← CRISPR/Cas9 → Sputnik 2.0
- ← CARs & Onkolyse
- ← Leukämien in WAS-Studie
- ← Hämophilie (FIX)
- ← Lysosomale Speichererkrankung
- ← ALS und b-Thalassämie
- ← Phase I-Erfolg GT bei Blindheit
- ← Todesfall in CGD-Studie
- ← CGD-Studie bei Erwachsenen
- ← Todesfall in SCID-X1-Studie
- ← ADA-SCID Studie erfolgreich
- ← 1. Leukämie in Paris
- ← SCID-X1 Studie erfolgreich
- ← STOP Suizidgen-Studie in USA
- ← Suizidgen-Ansatz funktioniert
- ← kein therap. Nutzen bei ADA
- ← 1. pädiatr. Studie ADA-SCID
- ← 1. therapeutische Studie ADA-SCID



# Der gute Patient von Sezuan (Sichuan)

**nature** International weekly journal of science

Search  Go [Advanced search](#)

Home | News & Comment | Research | Careers & Jobs | Current Issue | Archive | Audio & Video | For Authors

The introduction of CRISPR will probably accelerate the [race to get gene-edited cells into the clinic](#) across the world, says Carl June, who specializes in immunotherapy at the University of Pennsylvania in Philadelphia and led one of the earlier studies.

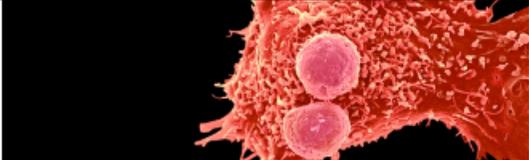
"I think this is going to trigger 'Sputnik 2.0', a biomedical duel on progress between China and the United States, which is important since competition usually improves the end product," he says.

The move by Chinese scientists could spark a biomedical duel between China and the United States.

**David Cyranoski**

15 November 2016

[Rights & Permissions](#)

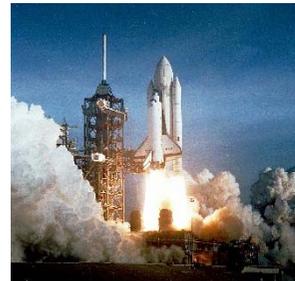
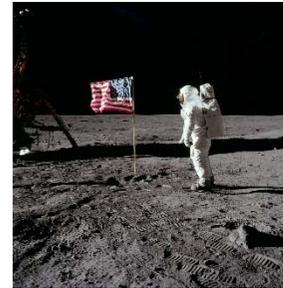
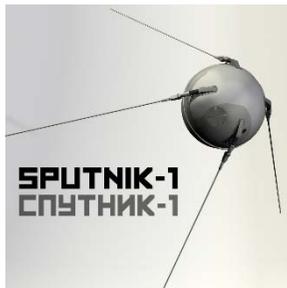


**CRISPR gene-editing tested in a person for the first time**

The move by Chinese scientists could spark a biomedical duel between China and the United States.



# Sputnik 2.0 (?!)





# „Ur-Prinzip“ der Gentherapie

„DER TYP IST VOLL“



„Falsche Information korrigieren“



„DER TYP IST TOLL“





# Ein winziges Wörtchen...

... in einer Cansteinbibel\*



Exodus 20,14

Wichtige Information  
→ Korrektur notwendig!

## Biblia, Deutsch (1731):

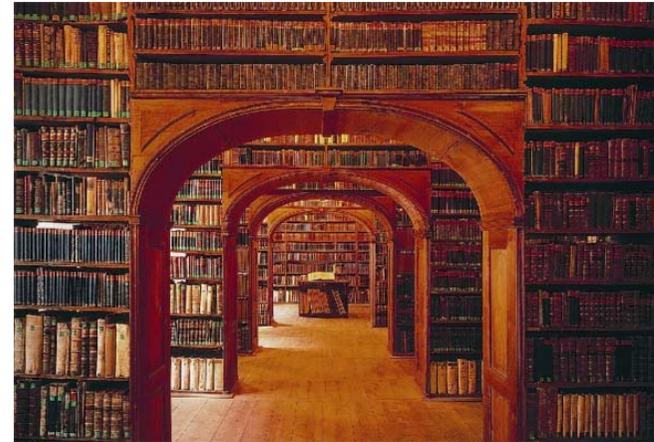
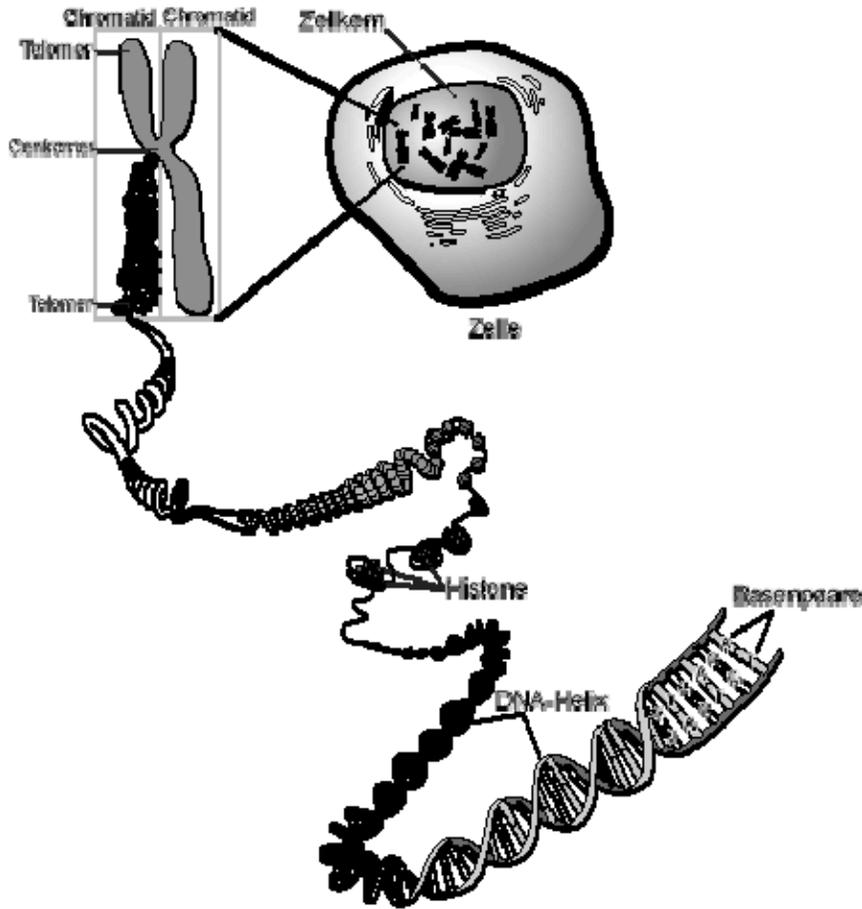
Biblia, Das ist. Die gantze Heil. Schrift Altes und Neues Testaments ...

Canstein 34. Auflage Halle Waisenhaus, 1731. 708 Bl. 12°; Sign.: Bibel-S. 102

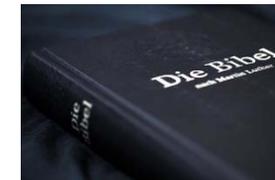
\*"Das Exemplar der "Ehebrecherbibel" wurde Besuchern der Herzog August Bibliothek bei Führungen so häufig gezeigt, daß es auf den entsprechenden Seiten gänzlich abgegriffen und vergilbt ist." Heimo Reinitzer: Biblia Deutsch, 1983, S.228



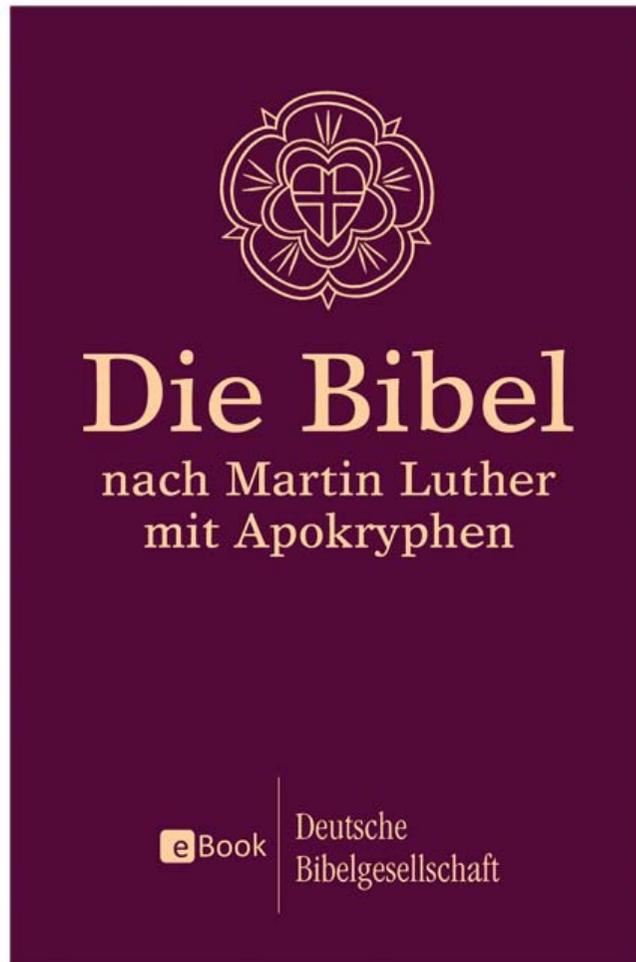
# Korrigieren ist leicht gesagt...



„Ehebrecher-Bibel“



Korrekte Bibel





# 1. Druckfehler finden

## 2. Mose - Kapitel 20

### Die Zehn Gebote

<sup>1</sup> Und Gott redete alle diese Worte:

<sup>2</sup> Ich bin der HERR, dein Gott, der ich dich aus Ägyptenland, aus dem Diensthause, geführt habe.

<sup>3</sup> Du sollst keine anderen Götter neben mir haben.

<sup>4</sup> Du sollst dir kein Bildnis noch irgend ein Gleichnis machen, weder des, das oben im Himmel, noch des, das unten auf Erden, oder des, das im Wasser unter der Erde ist.

<sup>5</sup> Bete sie nicht an und diene ihnen nicht. Denn ich, der HERR, dein Gott, bin ein eifriger Gott, der da heimsucht der Väter Missetat an den Kindern bis in das dritte und vierte Glied, die mich hassen;

<sup>6</sup> und tue Barmherzigkeit an vielen Tausenden, die mich liebhaben und meine Gebote halten.

<sup>7</sup> Du sollst den Namen des HERRN, deines Gottes, nicht mißbrauchen; denn der HERR wird den nicht ungestraft lassen, der seinen Namen mißbraucht.

<sup>8</sup> Gedenke des Sabbattags, daß Du ihn heiligest.

<sup>9</sup> Sechs Tage sollst du arbeiten und alle dein Dinge beschicken;

<sup>10</sup> aber am siebenten Tage ist der Sabbat des HERRN, deines Gottes; da sollst du kein Werk tun noch dein Sohn noch deine Tochter noch dein Knecht noch deine Magd noch dein Vieh noch dein Fremdling, der in deinen Toren ist.

<sup>11</sup> Denn in sechs Tagen hat der HERR Himmel und Erde gemacht und das Meer und alles, was darinnen ist, und ruhte am siebenten Tage. Darum segnete der HERR den Sabbattag und heiligte ihn.

<sup>12</sup> Du sollst deinen Vater und deine Mutter ehren, auf daß du lange lebest in dem Lande, daß dir der HERR, dein Gott, gibt.

<sup>13</sup> Du sollst nicht töten.

<sup>14</sup> Du sollst ehebrechen.

<sup>15</sup> Du sollst nicht stehlen.

<sup>16</sup> Du sollst kein falsch Zeugnis reden wider deinen Nächsten.

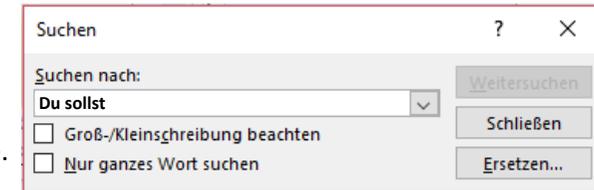
<sup>17</sup> Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Hauses. Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Weibes, noch seines Knechtes noch seiner Magd, noch seines Ochsen noch seines Esels, noch alles, was dein Nächster hat.

<sup>18</sup> Und alles Volk sah den Donner und Blitz und den Ton der Posaune und den Berg rauchen. Da sie aber solches sahen, flohen sie und traten von ferne

<sup>19</sup> und sprachen zu Mose: Rede du mit uns, wir wollen gehorchen; und laß Gott nicht mit uns reden, wir möchten sonst sterben.

<sup>20</sup> Mose aber sprach zum Volk: Fürchtet euch nicht; denn Gott ist gekommen, daß er euch versuchte und daß seine Furcht euch vor Augen wäre, daß ihr nicht sündigt.

<sup>21</sup> Also trat das Volk von ferne; aber Mose machte sich hinzu in das Dunkel, darin Gott war





## 2. Druckfehler markieren

### 2. Mose - Kapitel 20

#### Die Zehn Gebote

<sup>1</sup> Und Gott redete alle diese Worte:

<sup>2</sup> Ich bin der HERR, dein Gott, der ich dich aus Ägyptenland, aus dem Diensthause, geführt habe.

<sup>3</sup> Du sollst keine anderen Götter neben mir haben.

<sup>4</sup> Du sollst dir kein Bildnis noch irgend ein Gleichnis machen, weder des, das oben im Himmel, noch des, das unten auf Erden, oder des, das im Wasser unter der Erde ist.

<sup>5</sup> Bete sie nicht an und diene ihnen nicht. Denn ich, der HERR, dein Gott, bin ein eifriger Gott, der da heimsucht der Väter Missetat an den Kindern bis in das dritte und vierte Glied, die mich hassen;

<sup>6</sup> und tue Barmherzigkeit an vielen Tausenden, die mich liebhaben und meine Gebote halten.

<sup>7</sup> Du sollst den Namen des HERRN, deines Gottes, nicht mißbrauchen; denn der HERR wird den nicht ungestraft lassen, der seinen Namen mißbraucht.

<sup>8</sup> Gedenke des Sabbattag

<sup>9</sup> Sechs Tage sollst du arb

<sup>10</sup> aber am siebenten Tag

Knecht noch deine Magd

<sup>11</sup> Denn in sechs Tagen h

Darum segnete der HERR den Sabbattag und heiligte ihn.

<sup>12</sup> Du sollst deinen Vater und deine Mutter ehren, auf daß du lange lebest in dem Lande, daß dir der HERR, dein Gott, gibt.

<sup>13</sup> Du sollst nicht töten.

<sup>14</sup> Du sollst ehebrechen.

<sup>15</sup> Du sollst nicht stehlen.

<sup>16</sup> Du sollst kein falsch Zeugnis reden wider deinen Nächsten.

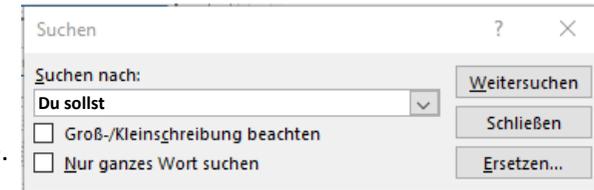
<sup>17</sup> Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Hauses. Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Weibes, noch seines Knechtes noch seiner Magd, noch seines Ochsen noch seines Esels, noch alles, was dein Nächster hat.

<sup>18</sup> Und alles Volk sah den Donner und Blitz und den Ton der Posaune und den Berg rauchen. Da sie aber solches sahen, flohen sie und traten von ferne

<sup>19</sup> und sprachen zu Mose: Rede du mit uns, wir wollen gehorchen; und laß Gott nicht mit uns reden, wir möchten sonst sterben.

<sup>20</sup> Mose aber sprach zum Volk: Fürchtet euch nicht; denn Gott ist gekommen, daß er euch versuchte und daß seine Furcht euch vor Augen wäre, daß ihr nicht sündigt.

<sup>21</sup> Also trat das Volk von ferne; aber Mose machte sich hinzu in das Dunkel, darin Gott war



„Du sollst“ wäre als  
Korrekturanker NICHT geeignet



# 1a) Suche reloaded (verfeinern!)

## 2. Mose - Kapitel 20

### Die Zehn Gebote

<sup>1</sup> Und Gott redete alle diese Worte:

<sup>2</sup> Ich bin der HERR, dein Gott, der ich dich aus Ägyptenland, aus dem Diensthause, geführt habe.

<sup>3</sup> Du sollst keine anderen Götter neben mir haben.

<sup>4</sup> Du sollst dir kein Bildnis noch irgend ein Gleichnis machen, weder des, das oben im Himmel, noch des, das unten auf Erden, oder des, das im Wasser unter der Erde ist.

<sup>5</sup> Bete sie nicht an und diene ihnen nicht. Denn ich, der HERR, dein Gott, bin ein eifriger Gott, der da heimsucht der Väter Missetat an den Kindern bis in das dritte und vierte Glied, die mich hassen;

<sup>6</sup> und tue Barmherzigkeit an vielen Tausenden, die mich liebhaben und meine Gebote halten.

<sup>7</sup> Du sollst den Namen des HERRN, deines Gottes, nicht mißbrauchen; denn der HERR wird den nicht ungestraft lassen, der seinen Namen mißbraucht.

<sup>8</sup> Gedenke des Sabbattags, daß Du ihn heiligest.

<sup>9</sup> Sechs Tage sollst du arbeiten und alle dein Dinge beschicken;

<sup>10</sup> aber am siebenten Tage ist der Sabbat des HERRN, deines Gottes; da sollst du kein Werk tun noch dein Sohn noch deine Tochter noch dein Knecht noch deine Magd noch dein Vieh noch dein Fremdling, der in deinen Toren ist.

<sup>11</sup> Denn in sechs Tagen hat der HERR Himmel und Erde gemacht und das Meer und alles, was darinnen ist, und ruhte am siebenten Tage. Darum segnete der HERR den Sabbattag und heiligte ihn.

<sup>12</sup> Du sollst deinen Vater und deine Mutter ehren, auf daß du lange lebest in dem Lande, daß dir der HERR, dein Gott, gibt.

<sup>13</sup> Du sollst nicht töten.

<sup>14</sup> Du sollst ehebrechen.

<sup>15</sup> Du sollst nicht stehlen.

<sup>16</sup> Du sollst kein falsch Zeugnis reden wider deinen Nächsten.

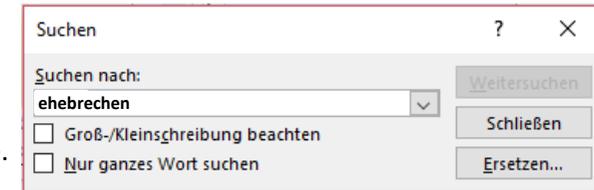
<sup>17</sup> Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Hauses. Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Weibes, noch seines Knechtes noch seiner Magd, noch seines Ochsen noch seines Esels, noch alles, was dein Nächster hat.

<sup>18</sup> Und alles Volk sah den Donner und Blitz und den Ton der Posaune und den Berg rauchen. Da sie aber solches sahen, flohen sie und traten von ferne

<sup>19</sup> und sprachen zu Mose: Rede du mit uns, wir wollen gehorchen; und laß Gott nicht mit uns reden, wir möchten sonst sterben.

<sup>20</sup> Mose aber sprach zum Volk: Fürchtet euch nicht; denn Gott ist gekommen, daß er euch versuchte und daß seine Furcht euch vor Augen wäre, daß ihr nicht sündigt.

<sup>21</sup> Also trat das Volk von ferne; aber Mose machte sich hinzu in das Dunkel, darin Gott war





## 2a. Druckfehler markieren

### 2. Mose - Kapitel 20

#### Die Zehn Gebote

<sup>1</sup> Und Gott redete alle diese Worte:

<sup>2</sup> Ich bin der HERR, dein Gott, der ich dich aus Ägyptenland, aus dem Diensthause, geführt habe.

<sup>3</sup> Du sollst keine anderen Götter neben mir haben.

<sup>4</sup> Du sollst dir kein Bildnis noch irgend ein Gleichnis machen, weder des, das oben im Himmel, noch des, das unten auf Erden, oder des, das im Wasser unter der Erde ist.

<sup>5</sup> Bete sie nicht an und diene ihnen nicht. Denn ich, der HERR, dein Gott, bin ein eifriger Gott, der da heimsucht der Väter Missetat an den Kindern bis in das dritte und vierte Glied, die mich hassen;

<sup>6</sup> und tue Barmherzigkeit an vielen Tausenden, die mich liebhaben und meine Gebote halten.

<sup>7</sup> Du sollst den Namen des HERRN, deines Gottes, nicht mißbrauchen; denn der HERR wird den nicht ungestraft lassen, der seinen Namen mißbraucht.

<sup>8</sup> Gedenke des Sabbattags, daß

<sup>9</sup> Sechs Tage sollst du arbeiten u

<sup>10</sup> aber am siebenten Tage ist de

Knecht noch deine Magd noch d

<sup>11</sup> Denn in sechs Tagen hat der H

Darum segnete der HERR den Sa

<sup>12</sup> Du sollst deinen Vater und deine Mutter ehren, auf daß du lange lebest in dem Lande, daß dir der HERR, dein Gott, gibt.

<sup>13</sup> Du sollst nicht töten.

<sup>14</sup> Du sollst **ehebrechen**.

<sup>15</sup> Du sollst nicht stehlen.

<sup>16</sup> Du sollst kein falsch Zeugnis reden wider deinen Nächsten.

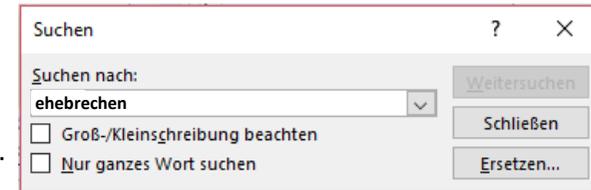
<sup>17</sup> Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Hauses. Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Weibes, noch seines Knechtes noch seiner Magd, noch seines Ochsen noch seines Esels, noch alles, was dein Nächster hat.

<sup>18</sup> Und alles Volk sah den Donner und Blitz und den Ton der Posaune und den Berg rauchen. Da sie aber solches sahen, flohen sie und traten von ferne

<sup>19</sup> und sprachen zu Mose: Rede du mit uns, wir wollen gehorchen; und laß Gott nicht mit uns reden, wir möchten sonst sterben.

<sup>20</sup> Mose aber sprach zum Volk: Fürchtet euch nicht; denn Gott ist gekommen, daß er euch versuchte und daß seine Furcht euch vor Augen wäre, daß ihr nicht sündigt.

<sup>21</sup> Also trat das Volk von ferne; aber Mose machte sich hinzu in das Dunkel, darin Gott war



Nur einmal im Text → als  
Korrekturanker geeignet



# 3. Druckfehler korrigieren

---

## 2. Mose - Kapitel 20

### Die Zehn Gebote

<sup>1</sup> Und Gott redete alle diese Worte:

<sup>2</sup> Ich bin der HERR, dein Gott, der ich dich aus Ägyptenland, aus dem Diensthause, geführt habe.

<sup>3</sup> Du sollst keine anderen Götter neben mir haben.

<sup>4</sup> Du sollst dir kein Bildnis noch irgend ein Gleichnis machen, weder des, das oben im Himmel, noch des, das unten auf Erden, oder des, das im Wasser unter der Erde ist.

<sup>5</sup> Bete sie nicht an und diene ihnen nicht. Denn ich, der HERR, dein Gott, bin ein eifriger Gott, der da heimsucht der Väter Missetat an den Kindern bis in das dritte und vierte Glied, die mich hassen;

<sup>6</sup> und tue Barmherzigkeit an vielen Tausenden, die mich liebhaben und meine Gebote halten.

<sup>7</sup> Du sollst den Namen des HERRN, deines Gottes, nicht mißbrauchen; denn der HERR wird den nicht ungestraft lassen, der seinen Namen mißbraucht.

<sup>8</sup> Gedenke des Sabbattags, daß Du ihn heiligest.

<sup>9</sup> Sechs Tage sollst du arbeiten und alle dein Dinge beschicken;

<sup>10</sup> aber am siebenten Tage ist der Sabbat des HERRN, deines Gottes; da sollst du kein Werk tun noch dein Sohn noch deine Tochter noch dein Knecht noch deine Magd noch dein Vieh noch dein Fremdling, der in deinen Toren ist.

<sup>11</sup> Denn in sechs Tagen hat der HERR Himmel und Erde gemacht und das Meer und alles, was darinnen ist, und ruhte am siebenten Tage. Darum segnete der HERR den Sabbattag und heiligte ihn.

<sup>12</sup> Du sollst deinen Vater und deine Mutter ehren, auf daß du lange lebest in dem Lande, daß dir der HERR, dein Gott, gibt.

<sup>13</sup> Du sollst nicht töten.

<sup>14</sup> Du sollst **nicht** ehebrechen.

<sup>15</sup> Du sollst nicht stehlen.

<sup>16</sup> Du sollst kein falsch Zeugnis reden wider deinen Nächsten.

<sup>17</sup> Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Hauses. Laß dich nicht gelüsten deines Nächsten Weibes, noch seines Knechtes noch seiner Magd, noch seines Ochsen noch seines Esels, noch alles, was dein Nächster hat.

<sup>18</sup> Und alles Volk sah den Donner und Blitz und den Ton der Posaune und den Berg rauchen. Da sie aber solches sahen, flohen sie und traten von ferne

<sup>19</sup> und sprachen zu Mose: Rede du mit uns, wir wollen gehorchen; und laß Gott nicht mit uns reden, wir möchten sonst sterben.

<sup>20</sup> Mose aber sprach zum Volk: Fürchtet euch nicht; denn Gott ist gekommen, daß er euch versuchte und daß seine Furcht euch vor Augen wäre, daß ihr nicht sündigt.

<sup>21</sup> Also trat das Volk von ferne; aber Mose machte sich hinzu in das Dunkel, darin Gott war

---



# Geht das auch bei Genen?

---

Vier "Buchstaben" (Nukleotide)\*:

A = Adenosin  
G = Guanosin  
C = Cytidin  
T = Thymin



**genetischer Code: 3 Nukleotide → 1 Aminosäure**

CTG . CCA . AAA . AAT . CAA . TGT . GAA . GCA . AAT . CGC . AGC . CCG . CCT . CCT . GCC . TCC . GCT . CTA . CTC . ACT  
**Leu Pro Lys Asn Gln Gys Glu Ala Asn Arg Ser Pro Pro Pro Ala Ser Ala Leu Leu Thr**

---

\* Die Namen sind verkürzt, eigentlich handelt es sich um Phosphate



# Geht das auch bei Genen?

Genom = Abfolge von 3 Milliarden ( $3 \times 10^9$ ) Buchstaben (A, G, C, T)

```
AGATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAATGTGAAGCAA  
ATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCT  
GATAAACTGCAAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCC ...
```

Diese Abfolge ist spezifisch, bildet also quasi einen eigenen (Sequenz-) Code:

Länge der Buchstabenfolge	Varianten	Varianz
1	A,G,C oder T	4

Eine 20er Sequenz kommt statistisch nur 1x im Genom vor (Chance: 1:333)



# 1. Sequenzspezifische Suchfunktion

## DNA-bindende Domäne

```
121 tgctggtcatacctcatcctg agatggattatcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatcggagcct  
181 gcaaaaaatcaatgtgaagcaaatcgcagccgcctcctgcctccgctctactcactgg  
241 tgttcatctttggttttgtgggcaacatgctggtcatacctcatcctgataaactgcaaaa  
301 ggctgaagagcatgactgacatctacctgctcaacctggccatctctgacctgttttcc  
361 ttcttactgtccccttctgggctcactatgctgccgccagtgaggactttggaatacaa  
421 tgtgtcaactcttgacagggctctattttataggcttcttctctggaatcttcttcatca  
481 tcctcctgacaatcgataggtacctggctgtcgtccatgctgtgtttgctttaaagcca  
541 ggacggtcacctttgggggtggtgacaagtgtgatcacttgggtgggtggctgtgtttgcgt  
601 ctctcccaggaatcatctttaccagatctcaaaaagaaggcttcttattacacctgcagct  
661 ctcatthttccatacagtcagtatcaattctggaagaatttccagacattaaagatagtca  
721 tcttggggctggctcctgccgctgcttgtcatggtcatctgctactcgggaatcctaaaaa ...
```

CCR5 Gen (kodierender Bereich)



## 2. Sequenzspezifische Markierung

### DNA-bindende Domäne

```
121 agatggattatcaagtgtcaagccaatctatgacatcaattattatacatcggagcct
181 gccaaaaaatcaatgtgaagcaaatcgagcccgctcctgctccgctctactcactgg
241 tgttcactctttggttttgtgggcaacatgctggtcatcctcatcctgataaactgcaaaa
301 ggctga cc
361 ttctta aa
421 tgtgt ca
481 tcctcc ca
541 ggacggtcaccttgggggtggtgacaagtgtgatcacttgggtgggtggctgtgtttgcgt
601 ctctcccaggaatcatctttaccagatctcaaaaagaaggcttccattacacctgcagct
661 ctcatthttccatacagtcagtatcaattctggaagaatttcagacattaaagatagtca
721 tcttggggctggtcctgcccgtgcttgtcatggtcatctgctactcgggaatcctaaaaa ...
```

Die zu modifizierende Stelle  
ist markiert → gerichtete  
Genomeditierung möglich

CCR5 Gen (kodierender Bereich)



# Und wie funktioniert das praktisch?

## Erkennung der Sequenz anhand der Sequenz per **Schlüssel-/Schlossprinzip**

Vier "Buchstaben" (Nukleotide):

- A: Adenosin
- G: Guanodin
- C: Cytidin
- T: Thymin



Zwei Komplementärpaare:

- A=T
- C≡G

Jetzt noch die  
Schere dazu!





# Und wie funktioniert das praktisch?

## Erkennung der Sequenz anhand der Sequenz per **Schlüssel-/Schlossprinzip**

Vier "Buchstaben" (Nukleotide):

- A: Adenosin
- G: Guanosin
- C: Cytidin
- T: Thymin

Zwei Komplementärpaare:

- A=T
- C≡G

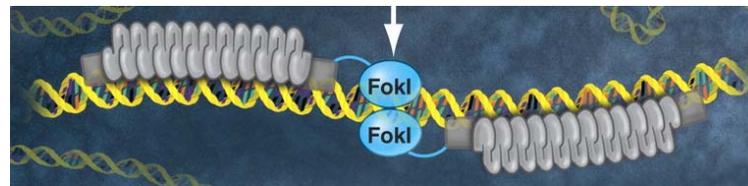




## Genschere (Designernuklease)

DNA-Bindedomäne („Gen“)

Effektordomäne („Schere“)



Reparaturmechanismen der Zelle

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



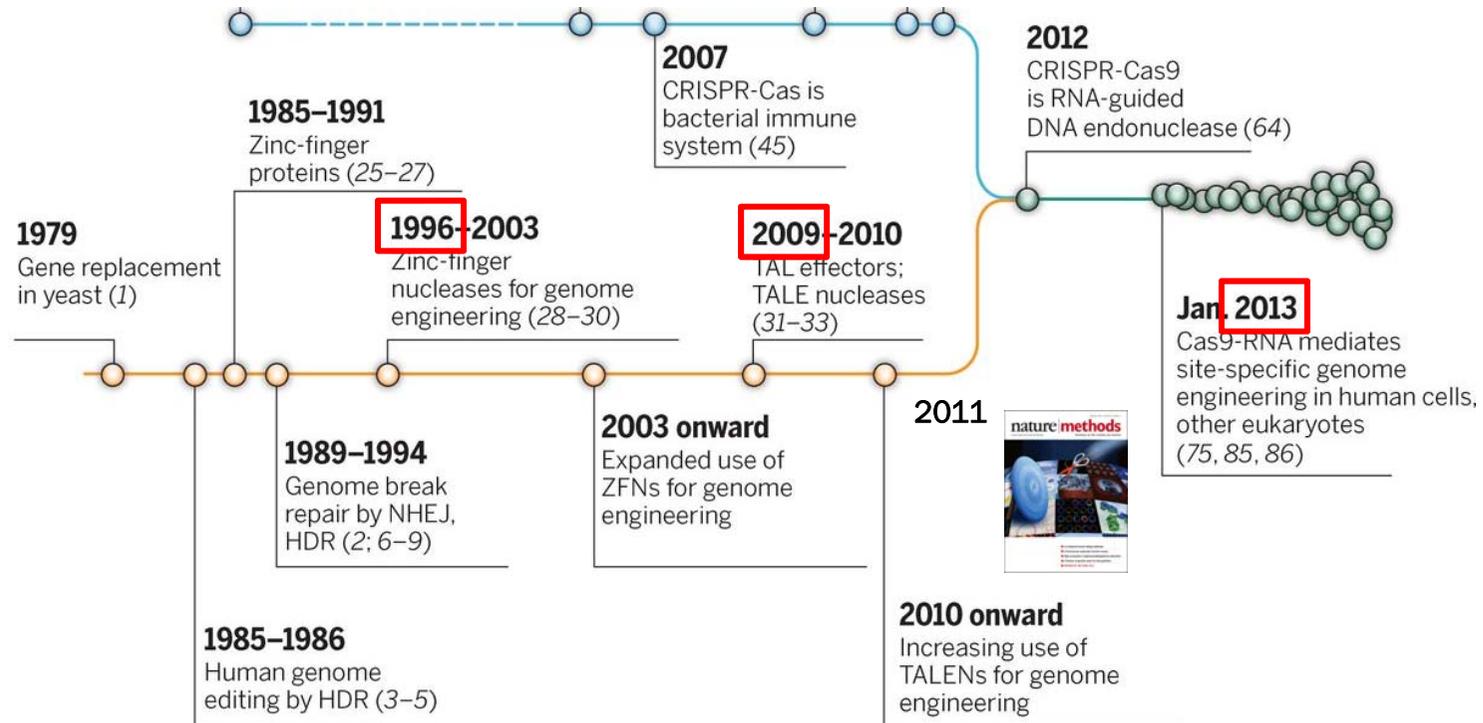
# Gebräuchliche Genscheren

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

→ CRISPR/Cas wird permanent mit großer Geschwindigkeit optimiert



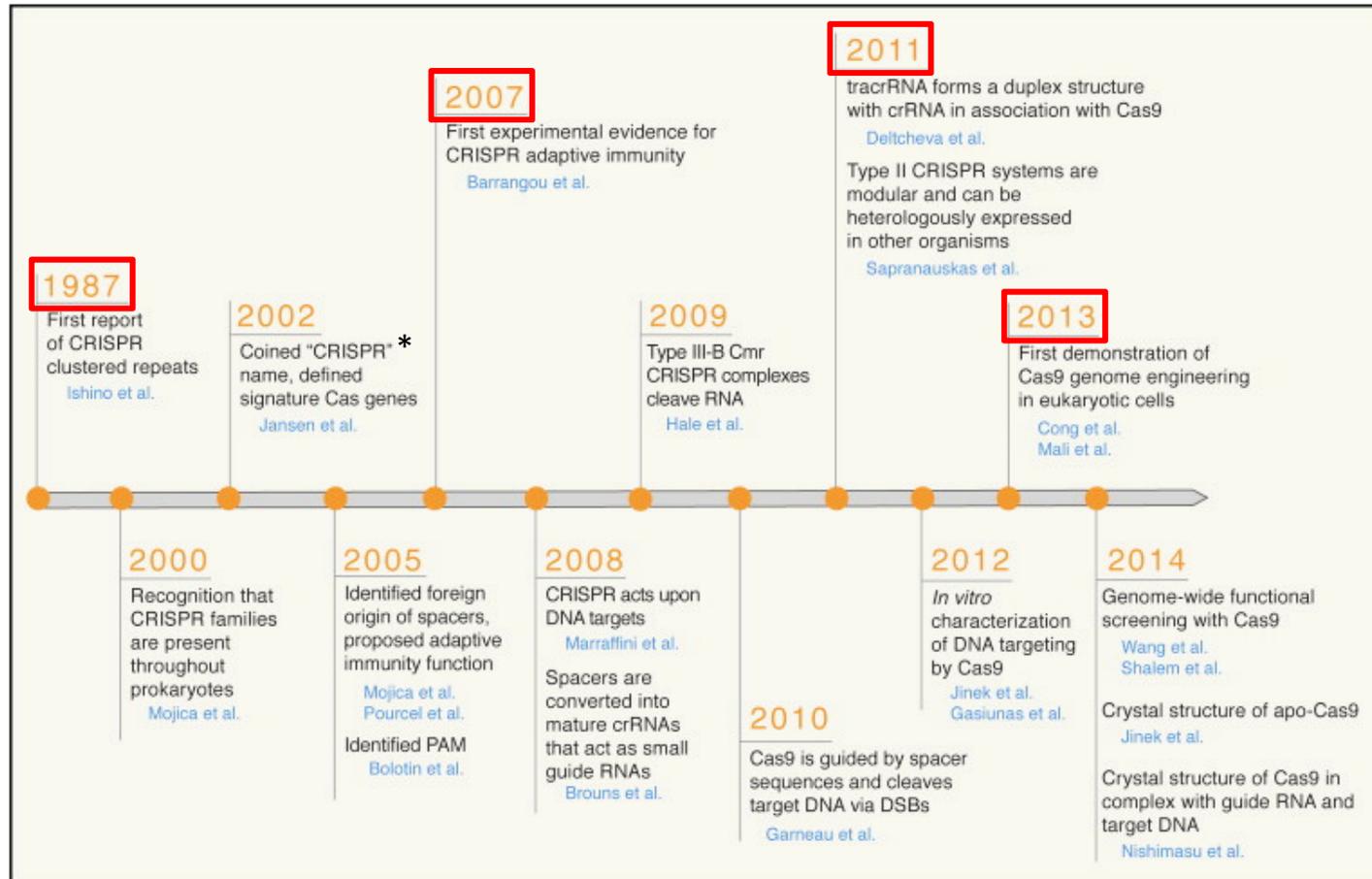
# Geschichte des Genome Editing



**Nobelpreis 2007:**  
Capecci & Smithies



# Evolution des CRISPR-Cas Systems



\*Clustered regularly interspaced palindromic repeat



# Was kann Genome Editing?

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

Insertionen (Addition von Information)

Deletionen (Entfernung von Information)

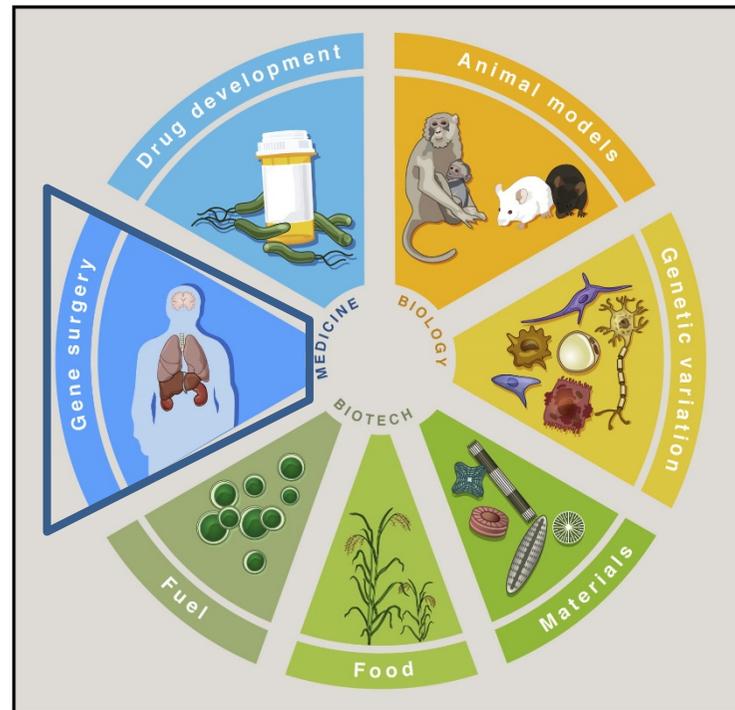
Modifikationen

Reparatur defekter Gene

„Knockout“ (Ausschalten)

Enhancement (Verbessern)

## **Anwendungsgebiete:**





# „Ur-Prinzip“ der Gentherapie



Schwester,  
ein  
Guanin...

Erkrankungen durch  
*Fehler* der  
Erbinformation

Steht die Genchirurgie  
jetzt vor der Tür?

Therapie durch  
*Korrektur* der  
Erbinformation



**I. „Delivery“ (Zustellung)**

II. Immunogenität

III. Effizienz (Korrekturrate)

IV. Präzision (Fehlerrate)

---



# I. Das Zustellproblem

---

1999

Inder Verma  
Salk Institute

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

DELIVERY

DELIVERY

DELIVERY"

---



# Vektoren als Gentaxis



autoplenum.de

## Anforderungen:

- zielgenau
- effizient
- sicher
- „one way“
- günstig

## Realität:

- unspezifisch
- rel. ineffizient
- „Restrisiko“
- Insertion
- teuer



motor-talk.de



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



# Den „Supervektor“ gibt es nicht

## Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



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





I. „Delivery“ (Zustellung)

**II. Immunogenität**

III. Effizienz (Korrekturrate)

IV. Präzision (Fehlerrate)

---



ZFNs: konserviert, aber Fok1

TALEN: Ursprung – Pflanzenbakterien; dazu Fok1

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

## ***In vivo***

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

## ***Ex vivo***

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



I. „Delivery“ (Zustellung)

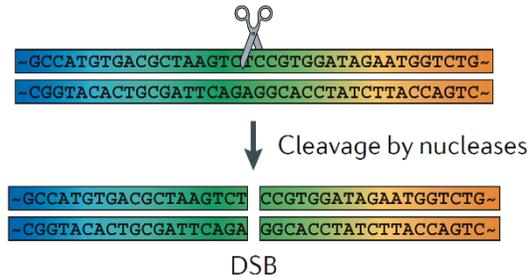
II. Immunogenität

**III. Effizienz (Korrekturrate)**

IV. Präzision (Fehlerrate)

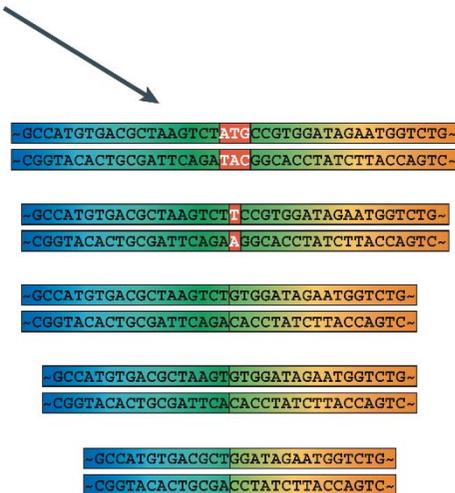
---

## Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der Zelle



Ohne Matrix:

NHEJ

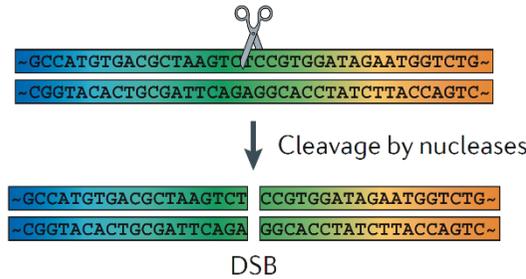


### Nicht-homologes Endjoining:

- Reparaturmechanismus, der **ohne Matrix** funktioniert
- fehleranfällige Reparatur (Insertion / Deletion von bp)
- führt oft zu einer Verschiebung des Leserahmens (=k.o.)
- „*quick and dirty*“ Reparatur, vor allem in der G1-Phase
- funktioniert NUR bei Doppelstrangbrüchen!

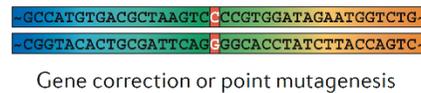
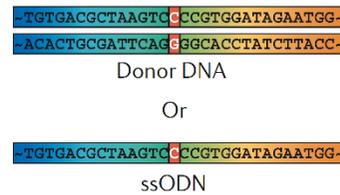


## Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der Zelle



Mit Matrix:

Knockout ist einfacher als Editing (HDR)



Funktioniert nur mit Template:  
(z.B. Fremd-DNA oder Schwesterchromatid)

- Reparatur exakt
- Vor allem in der G2- und M-Phase
- Funktioniert auch bei Einzelstrangbrüchen
- Genkorrektur, gerichtete Mutationen etc.



I. „Delivery“ (Zustellung)

II. Immunogenität

III. Effizienz (Korrekturrate)

**IV. Präzision (Fehlerrate)**

---

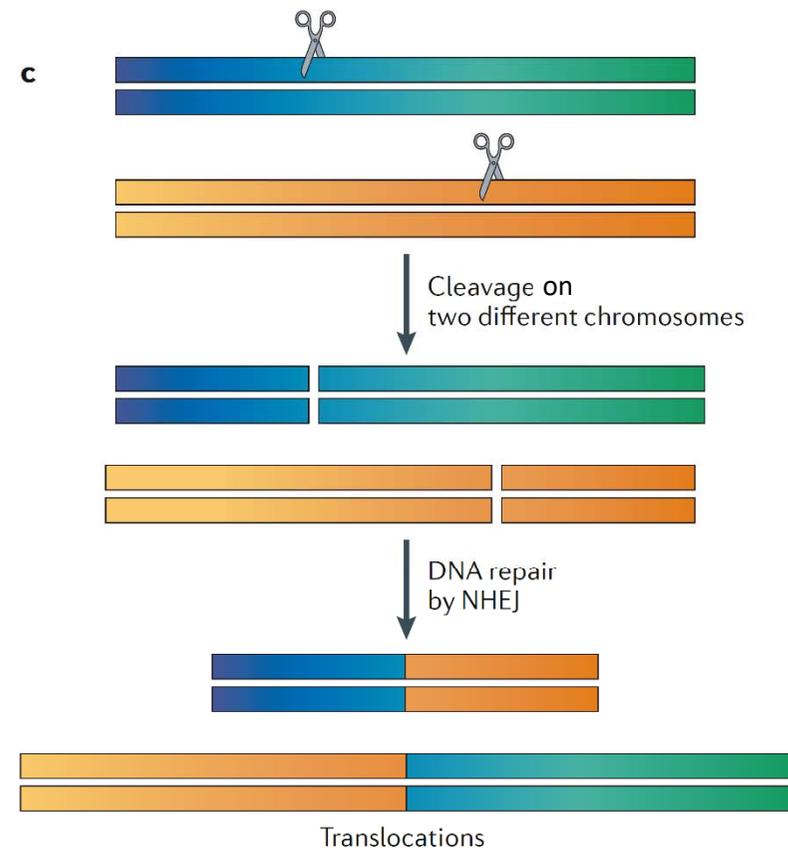
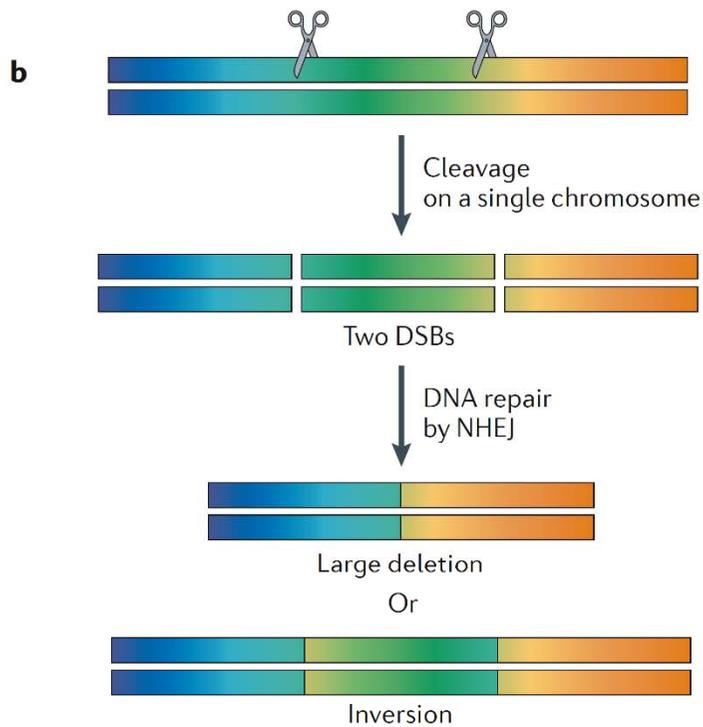


- Spezifität hängt von der Genauigkeit der Einzelbindungen sowie der Länge der Erkennungssequenz ab
  - *Cave!* Nicht alle Nukleotide in der Zielsequenz sind gleich wichtig für die Bindung der Designernukleasen
  - Viele Gene haben homologe “Verwandte” im Genom  
→ Potentielle *off-target* Bindestellen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



# Risiken der *off-target* Aktivität

a Inaktivierung eines anderen Gens im Genom (Risiko gering)





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

Der Körper eines Erwachsenen besteht aus  $\sim 3 \times 10^{13}$ , die Leber:  $> 10^{12}$  Zellen

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

✓  $> 10^4$  *off-target* Ereignisse

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

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

---



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

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

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

**ABER:**

→ Risiko = Eintrittswahrscheinlichkeit \* Schadensschwere

→ bisher werden solche Spezifitäten bei weitem NICHT erreicht

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

---



... und was ist nun mit der Therapie?

---



## ... benutzen Blutzellen

- ✓ Leicht zu bekommen, können außerhalb der Körpers (*ex vivo*) behandelt werden
  - ✓ Lebensbedrohliche monogene Erbkrankheiten des Blutsystems, die sich durch Transplantation, aber auch Gentherapie heilen lassen (z.B. Immundefekte,  $\beta$ -Thalassämie)
  - ✓ Verbesserung von Immuntherapien für Krebs
  - ✓ Schutz von Blutzellen, z.B. vor HIV
-



# CCR5 knockout: Eine mögliche klinische Anwendung

**Interessenskonflikt:**

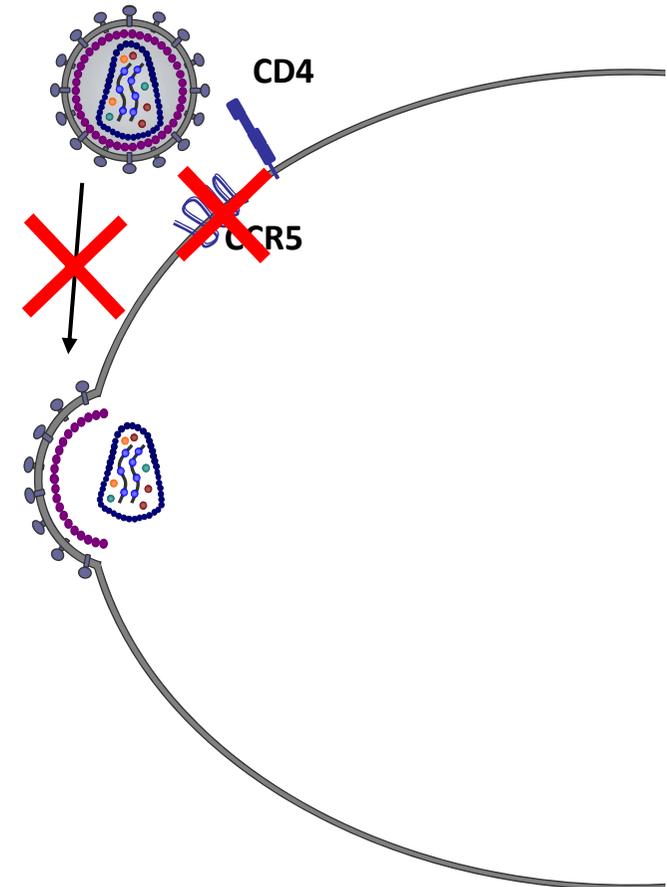
Das Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) hat für CCR5-Uco-TALEN einen Patentantrag gestellt (noch nicht entschieden)

Erfinder: Ulrike Mock and Boris Fehse

---

## CCR5

- CC-motif chemokine receptor 5
- **Ko-Rezeptor für HIV** (“CCR5-trope Stämme”)
- Natürliche Mutation (CCR5 $\Delta$ 32) führt zu nahezu vollständigem Schutz vor HIV-Infektion (10% der Europäer sind Träger, 1% homozygot)
- **Keine signifikanten negativen Effekte** der CCR5 $\Delta$ 32-Mutation





The NEW ENGLAND  
JOURNAL of MEDICINE

## Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/ Delta32 Stem-Cell Transplantation

Gero Hütter, M.D., Daniel  
Susanne Ganepola, M.D.,  
Thomas Schneider, M.D., Ph.D.,  
Olga Blau, M.D., Igor W  
and B





The NEW ENGLAND  
JOURNAL of MEDICINE

Machbarkeitsstudie.  
Verbesserungsbedarf.

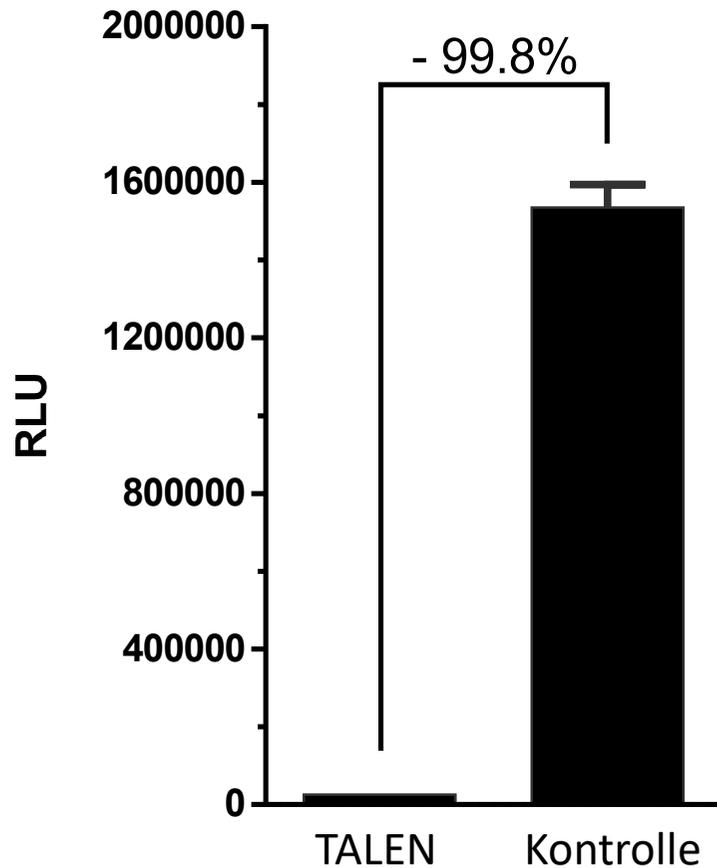
Pablo Tebas, M.D., David Stein, M.D., Winson W. Tang, M.D., Ian Frank, M.D., Shelley Q. Wang, M.D., Gary Lee, Ph.D.,  
S. Kaye Spratt, Ph.D., Richard T. Surosky, Ph.D., Martin A. Giedlin, Ph.D., Geoff Nichol, M.D.,  
Michael C. Holmes, Ph.D., Philip D. Gregory, Ph.D., Dale G. Ando, M.D., Michael Kalos, Ph.D.,  
Ronald G. Collman, M.D., Gwendolyn Binder-Scholl, Ph.D., Gabriela Plesa, M.D., Ph.D.,  
Wei-Ting Hwang, Ph.D., Bruce L. Levine, Ph.D., and Carl H. June, M.D.

---





# Modifizierte T-Zellen sind vor HIV geschützt



**Praktisch vollständige  
Unterdrückung der HIV-  
Ausbreitung in der  
Zellkultur**



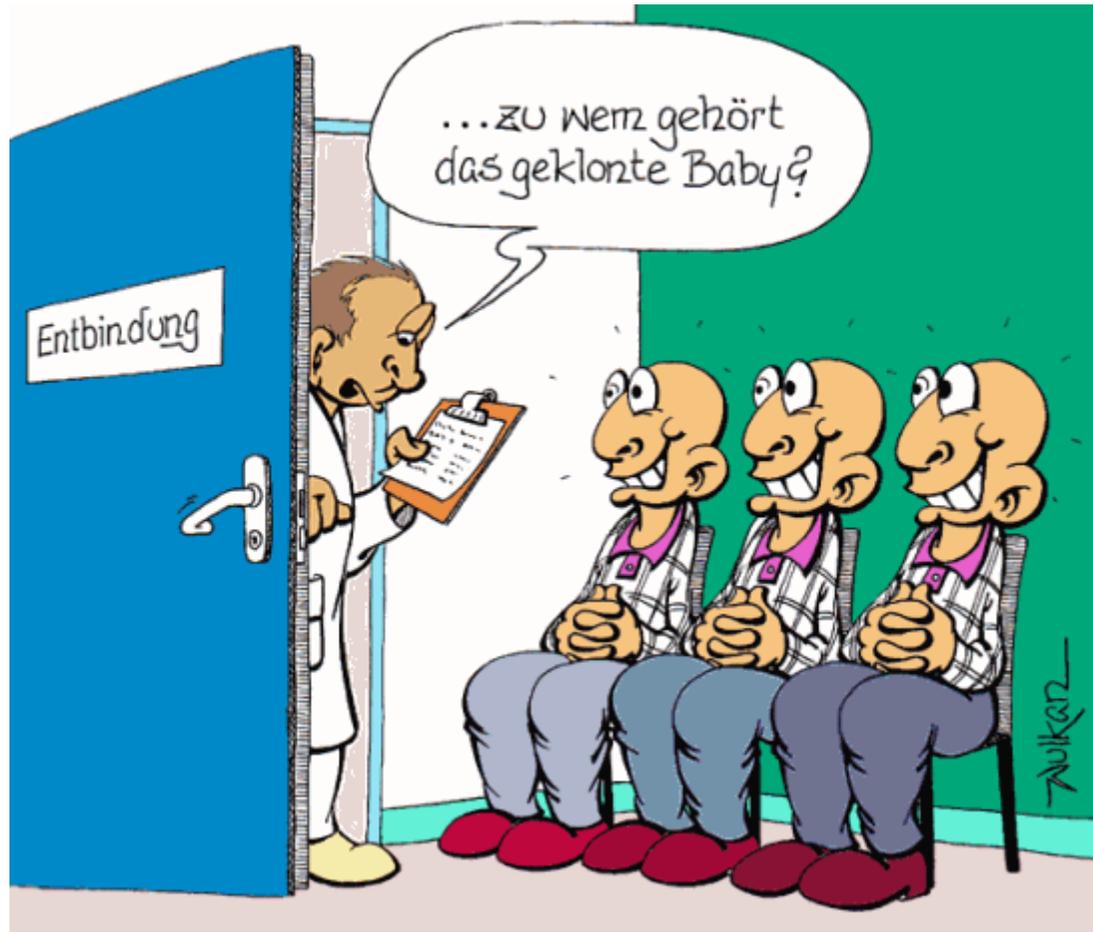
## Das Genome Editing

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



# Gentherapie – Darf man das ...

... oder spielt hier jemand Gott?





# Gentherapie – Ängste





... **keine** Korrektur komplexer Erbanlagen





## *somatisches* Gentherapie

= Korrektur in den **klinisch relevanten Körperzellen**

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

## *Keimbahn*-Gentherapie

= Korrektur in der **Keimbahn**

- eventuell „einfacher“
- Krankheit wird „eliminiert“
- reproduktives Klonen
- **kausal, KEINE Therapie**
- **ethisch sehr umstritten\***
- **in Deutschland verboten**

**\* „Designer-Babys“,  
„Embryonenverbrauch“**



## *somatisches* Genome Editing

= Korrektur in den **klinisch relevanten Körperzellen**

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

## *Keimbahn*-Genome Editing

= Korrektur in der **Keimbahn**

- technisch einfacher
- evtl. „sicherer“
- Krankheit wird eliminiert
- **kausal, KEINE Therapie**
- **ethisch sehr umstritten\***
- **in Deutschland verboten\***

**\* „Designer-Babys“,  
„Embryonenverbrauch“**

**\* Gesetzeslage z.T. lückenhaft**

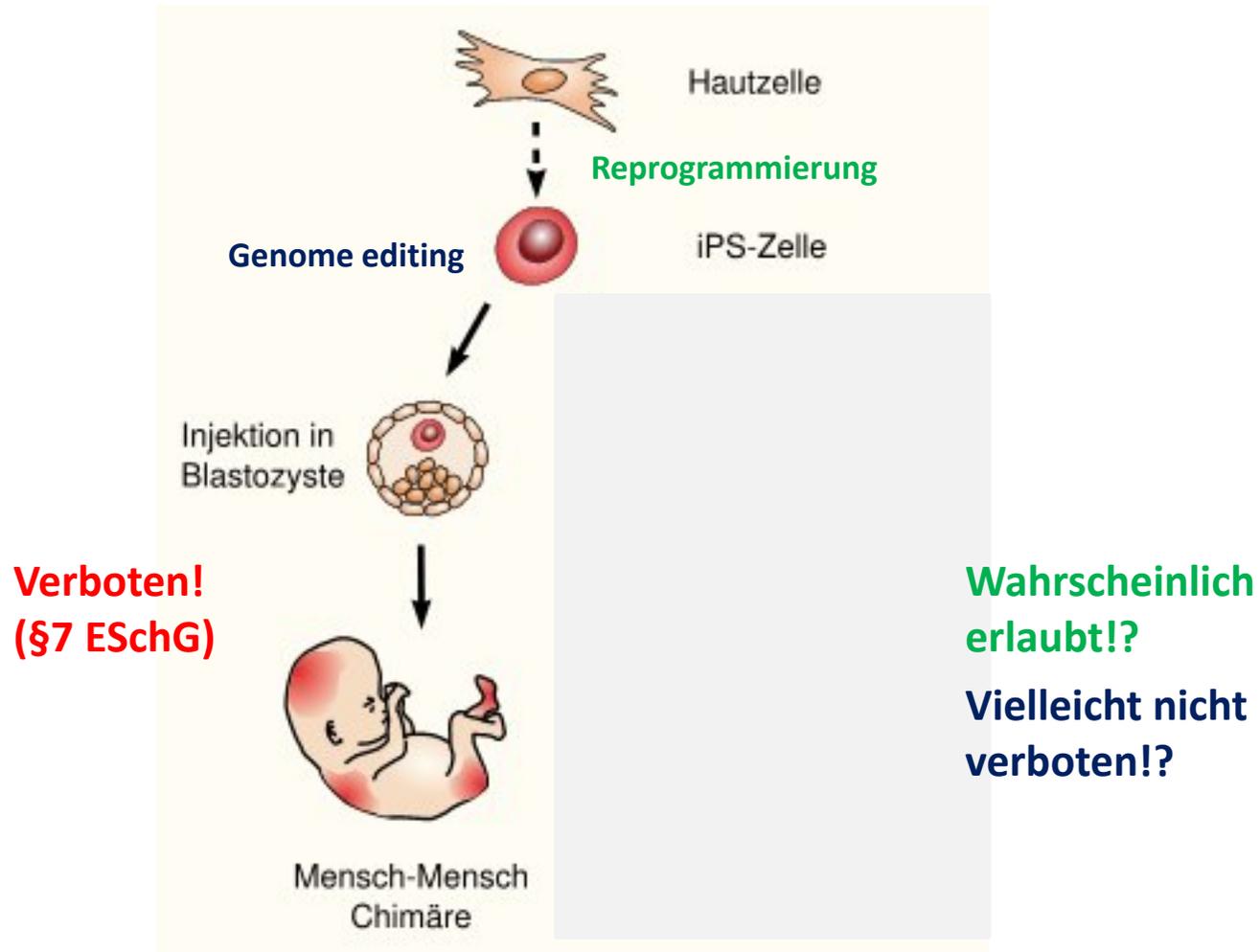


## § 5 ESchG: Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen

- (1) Wer die Erbinformation einer menschlichen Keimbahnzelle **künstlich** verändert, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.
  - (2) Ebenso wird bestraft, wer eine menschliche Keimzelle mit künstlich veränderter Erbinformation zur Befruchtung verwendet.
  - (3) Der Versuch ist strafbar.
  - (4) Absatz 1 findet keine Anwendung auf
    1. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer außerhalb des Körpers befindlichen Keimzelle, wenn ausgeschlossen ist, daß diese zur Befruchtung verwendet wird,
    2. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer sonstigen körpereigenen Keimbahnzelle, die einer toten Leibesfrucht, einem Menschen oder einem Verstorbenen entnommen worden ist, wenn ausgeschlossen ist, daß
      - a) diese auf einen Embryo, Foetus oder Menschen übertragen wird oder
      - b) aus ihr eine Keimzelle entsteht,sowie
    3. Impfungen, strahlen-, chemotherapeutische oder **andere Behandlungen**, mit denen eine Veränderung der Erbinformation von Keimbahnzellen **nicht beabsichtigt ist**.
-



# Legale Keimbahnmodifikation?





➤ Juristisch

- Intention des ESchG: Schutz des EMBRYOS, nicht der KEIMBAHN
- Aus juristischer Sicht müsste die Keimbahntherapie neu geprüft werden, wenn sie für den Embryo SICHER wäre

➤ Ethisch

- Werteabwägung, z.B. gegen (Spät-) Abtreibung
  - Eingriff in Leben eines zukünftigen Individuums: Einwilligung?!
  - Verteilungsgerechtigkeit
  - Rettung des Embryo?
-



- **Genome editing erfordert PID**

- Gesunde Embryonen würden identifiziert

- Nach dem Editing müsste wahrscheinlich **eine 2. PID** durchgeführt werden

[Theoretische Alternative bei **100%iger** Effizienz und Sicherheit: GE an allen Embryonen]

- **Genome editing bei potentiellen Krankheitsgenen [BRCA1 etc.]**

- PID wäre vergleichsweise sicherer

- IVF hochbelastend und mit eigenen Risiken assoziiert

- **GE bei komplexen Erbanlagen**

- nach bisheriger Datenlage wenig effizient und sehr riskant

→ **Brauchen wir das Genome editing in der Keimbahn überhaupt?**

---

## China: Erste Hunde mit editiertem Genom

Technology  
Review

25.11.2015 15:02 Uhr - Antonio Regalado



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

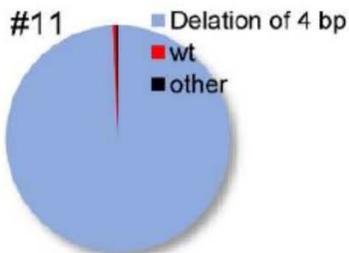
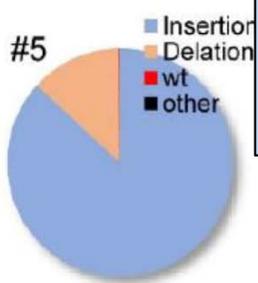
Chinesische Wissenschaftler haben nach eigenen Angaben erstmals mithilfe der Gen-Editiermethode CRISPR-Cas9 die Gene von Hunden verändert.

# ... so sehen die Hunde wirklich aus

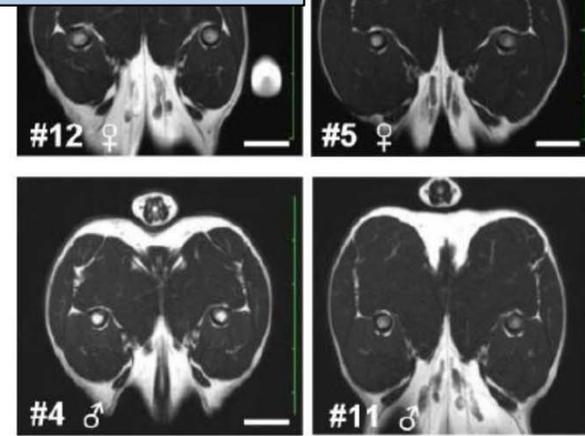
A



C



Glauben Sie nicht unbesehen alles,  
was in den Medien berichtet wird!





Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

---

**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!**

**Prof. Dr. Boris Fehse**  
**Forschungsabt. Zell- und Gentherapie**  
**Klinik für Stammzelltransplantation**

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)**  
**Martinstraße 52**  
**D-20246 Hamburg**  
**Telefon: +49 (0) 40 7410-55518**  
**fehse@uke.de**  
**www.uke.de**

