

SONDERHEFT
2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**MATERIAL-
FORSCHUNG**
Gesteinsbesiedelnde
Pilze

PFLANZENGENETIK
Genomsequenzen
sichtbar machen

EXPERIMENT
Pauline und die
Ausreißer

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

CRISPR-Cas

... mehr als nur
Verteidigung

Heilung von Sichelzellenanämie und β -Thalassämie

Wie die CRISPR-Genschere dauerhafte Heilung verspricht

MARCUS ZIEMANN | WOLFGANG R. HESS

Die Gentechnik hat in den letzten Jahrzehnten viele Fortschritte gemacht. Mit der nun zugelassenen Gentherapie gegen Sichelzellenanämie und β -Thalassämie hat sie einen weiteren Schritt nach vorne gemacht. Nach nur fünf Jahren Erprobungszeit ist es dem internationalen Team der Firma CRISPR Therapeutics gelungen, beide Krankheiten zu heilen und eine medizinische Zulassung in Großbritannien, den USA sowie innerhalb der Europäischen Union und vieler weiterer Staaten zu erhalten.

Das Phänomen der Sichelzellenanämie (auch Sichelzellenkrankheit) und ihrer genetischen Grundlagen ist vielleicht das erste Beispiel, auf das man stößt, wenn man sich mit genetisch bedingten Krankheiten beschäftigt. Das liegt zum einen daran, dass es eine auch auf der molekularen Ebene verhältnismäßig einfach zu erklärende Krankheit ist, zum anderen daran, dass Merkmalsträger eine erhöhte Resistenz gegenüber Malaria aufweisen und die Krankheit somit in Gebieten mit hoher Malariabelastung auch einen evolutionären Vorteil darstellen kann. Viele genetische Aspekte lassen sich auf der Grundlage dieses Krankheitsbildes erklären und verstehen. Gleichzeitig handelt es sich auch um die am weitesten verbreitete Krankheit, basierend auf nur einer Genmutation mit über 7,7 Millionen Betroffenen weltweit [1, 2].

Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Sichelzellenanämie nun auch das Ziel der ersten zugelassenen CRISPR-basierten Gentherapie ist [1]. Im November 2023 akzeptierte das Vereinigte Königreich die neue Therapie [3], gefolgt von den USA [4] und einer bedingten Zulassung der *European Medicines Agency* (EMA) innerhalb der EU [5]. Doch um was für eine Therapie handelt es sich?

Krankheitsbild der Sichelzellenanämie

Man kennt verschiedene Typen von Sichelzellenkrankheiten; die häufigste Ursache hierfür ist jedoch eine Punktmutation im Gen für das β -Protein von Hämoglobin (E6V) [1, 6]. Bedingt durch diese Mutation kann das atypische Hämoglobin S (HbS) bei Abgabe von Sauerstoff polymerisieren, wodurch sich die roten Blutkörperchen verformen und eine charakteristische Sichelform bilden. Diese Zellen können zu Gefäßverschlüssen führen, was sich in einer Sauerstoffunterversorgung von Geweben sowie deren dauerhafter Schädigung und starken Schmerzen äußert [6]. Die Lebenserwartung von Betroffenen liegt häufig nur bei etwa 50 Jahren [7].

Hämoglobin ist ein tetrameres Protein in roten Blutkörperchen und wird zum Transport von Sauerstoff durch den Körper benötigt. Die Struktur baut sich aus zwei α -Ketten (α_2) und einem anderen Proteinketten-Paar zusammen. In Erwachsenen ist dies zum größten Teil HbA ($\alpha_2\beta_2$) [1]. In Föten und Neugeborenen findet sich aber

IN KÜRZE

- Sichelzellenanämie wird durch **Punktmutationen im Hämoglobin- β -Gen** verursacht.
- Eine **Heilung** war bisher **nur in seltenen Fällen** möglich.
- Mit Hilfe von CRISPR-Cas wurde **erstmalig eine Umprogrammierung des fetalen Hämoglobin-F-Gens** in Sichelzellpatienten erreicht.
- **Krankheitssymptome** wurden dadurch **reduziert oder verschwanden** vollständig.
- Die Therapie wurde in den USA und in Großbritannien **bereits zugelassen**.

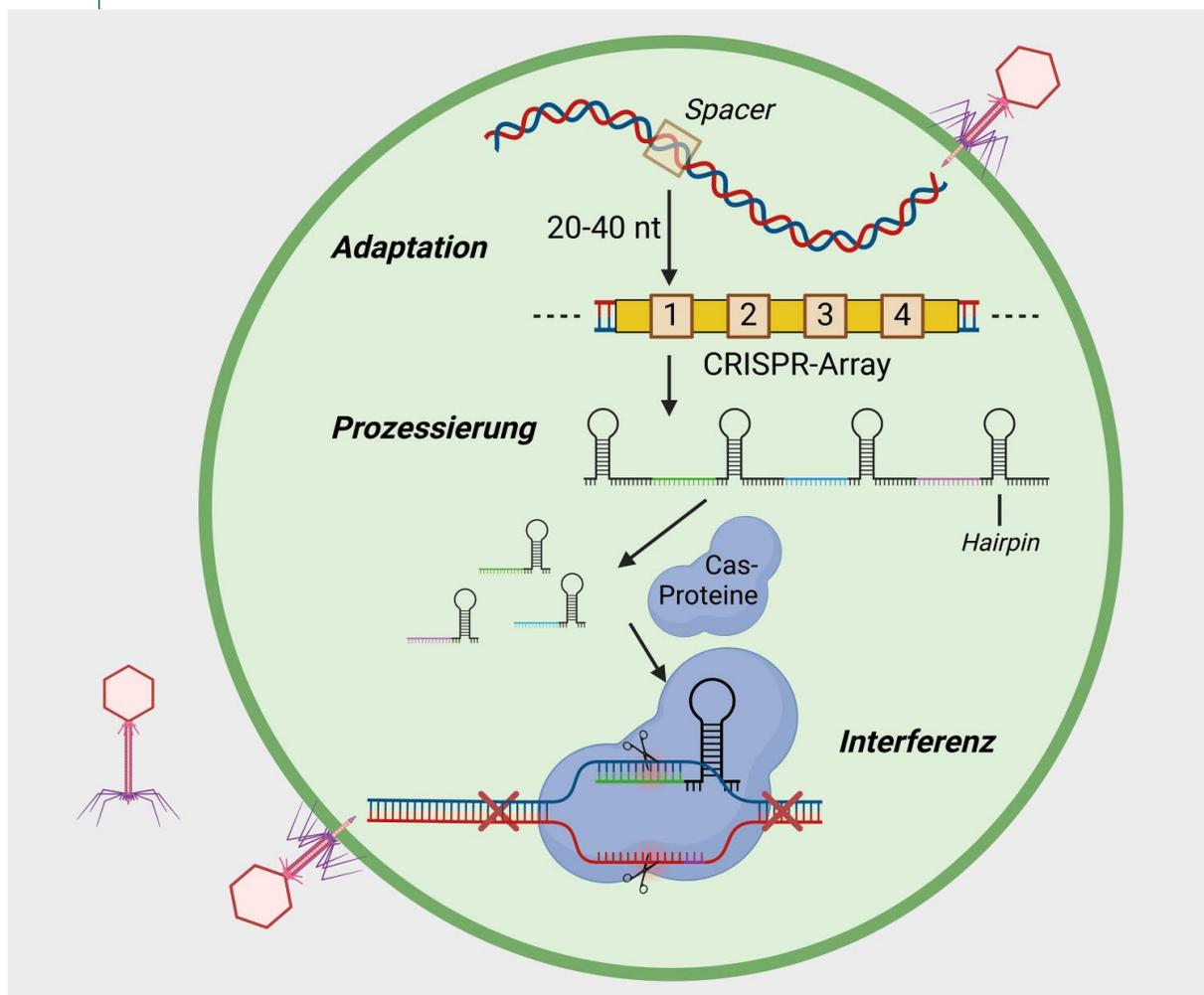
hauptsächlich das fetale Hämoglobin HbF ($\alpha_2\gamma_2$), was innerhalb der ersten Lebensmonate nach und nach durch HbA ersetzt wird. Der Grund für diesen Wechsel ist, dass HbF eine höhere Sauerstoffaffinität besitzt und dem Fötus somit eine gute Sauerstoffaufnahme ermöglicht [8]. Die Sichelzellularmutation existiert nur in der β -Kette, darum beeinflusst sie nur das HbA (bei Mutation auch als HbS bezeichnet) und äußert sich daher in Kindern erst ab etwa dem 3. Monat [1]. Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen HbF von Erwachsenen in hohen Mengen produziert wird, was die Auswirkungen von Sichelzellenanämie deutlich abmildert [9].

Beim Auftreten der HbS-Mutation muss zwischen heterozygoten und homozygoten Krankheitsbildern unterschieden werden. Personen, die nur ein mutiertes Hämoglobin-Allel (β^S) besitzen, bilden deutlich weniger Sichel-

zellen, da neben dem HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) auch HbA ($\alpha_2\beta_2$) gebildet wird, welches nicht polymerisiert und dadurch die Sichelzellenbildung blockiert [6, 10].

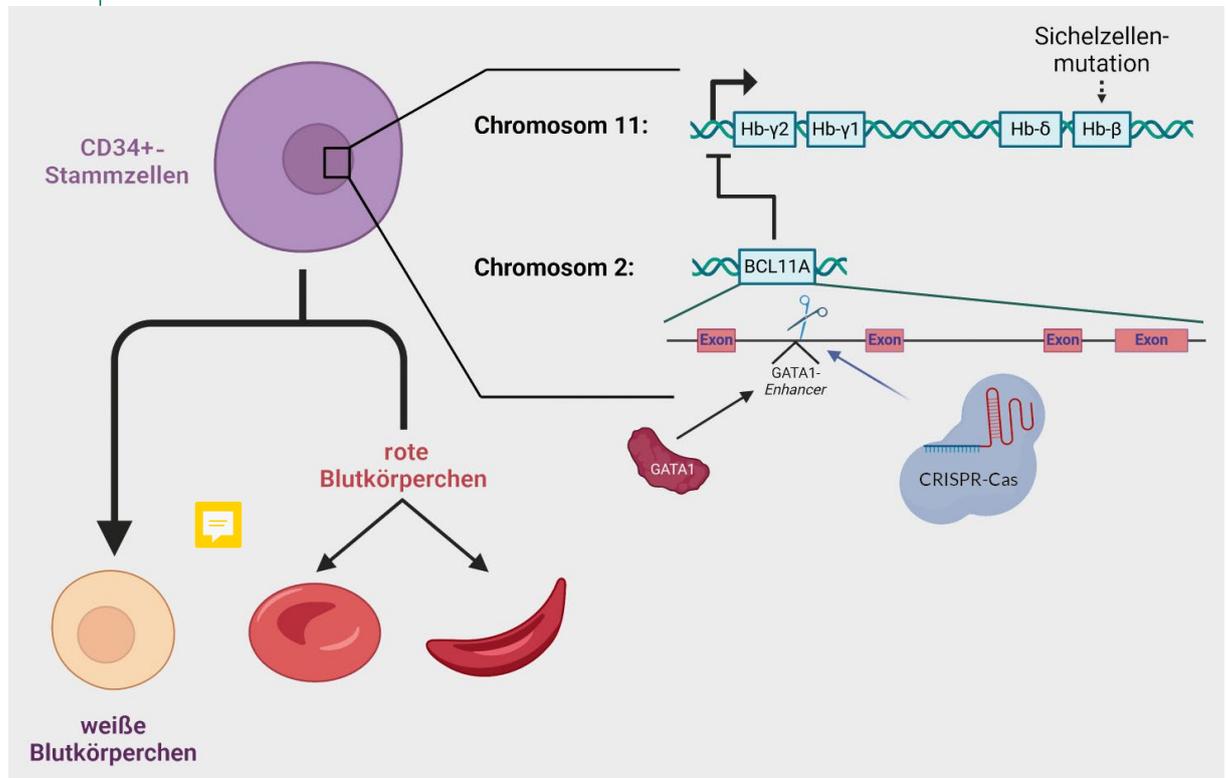
Ein verwandtes Krankheitsbild bildet die β -Thalassämie, bei der zu wenig oder fast kein Hämoglobin β produziert wird [11]. Die Patienten bilden keine Sichelzellen, leiden aber auch an ständiger Blutarmut und entwickeln dadurch Wachstumsstörungen und ein schwaches Immunsystem. Die gängige Behandlung sowohl für β -Thalassämie als auch für Sichelzellenanämie sieht regelmäßige Bluttransfusionen oder Knochenmarktransplantationen vor [11]. Letztere können eine dauerhafte Heilmethode darstellen, aber nicht für jeden Patienten kann ein geeigneter Spender gefunden werden. Hier kommt CRISPR ins Spiel.

ABB. 1 | CRISPR-CAS-SYSTEM IN EINER BAKTERIELLEN ZELLE



Der Bakteriophage infiziert die Zelle und das CRISPR-Cas-System kann einen kleinen Teil (*spacer*) des Phagen-genoms in den CRISPR-Array aufnehmen (**Adaptation**). Anschließend kann dieser Array transkribiert und in eine kurze RNA mit den charakteristischen *hairpin*-Strukturen prozessiert werden (**Prozessierung**). Bestimmte Enzyme erkennen diese und zerschneiden das RNA-Stück in kürzere *spacer-repeat*-Segmente, die danach den CRISPR-Cas-Komplex bilden. Bei einer erneuten Phageninfektion kann dieser Komplex dann den zum *spacer* passenden Bereich wiedererkennen und die Phagen-DNA zerstören (**Interferenz**). Abb. erstellt mit BioRender.com.

ABB. 2 | REGULATION VON HÄMOGLOBIN IN CD34+-ZELLEN



Die Stammzelle CD34+ entwickelt sich zu verschiedenen weißen und roten Blutkörperchen. Wenn sie sich zu roten Blutkörperchen entwickelt, produziert sie Hämoglobin. Die Hämoglobingene befinden sich hauptsächlich auf Chromosom 11. Die Bildung von fetalem Hämoglobin ($\alpha_2\gamma_2$) erfordert die Produktion von γ -Hämoglobin (Hb- γ). Dessen Expression wird nach der Neugeborenenzeit bei Menschen durch BCL11A gestoppt. Dieses Gen wird von dem universellen Regulator GATA1 kontrolliert. GATA1 aktiviert das Gen *bcl11a* durch Bindung an eine *enhancer*-Region zwischen zwei Exonen innerhalb des *bcl11a*-Gens. Diese *enhancer*-Region ist die Schnittstelle der Casgevy-Therapie. Abb. erstellt mit BioRender.com.

Geneditierung mit dem CRISPR-Cas9-System

Der große Durchbruch ist mit dem CRISPR-Cas9-System gelungen. CRISPR-Cas-Systeme bilden eigentlich einen in Bakterien und Archaeen vorkommenden Mechanismus zur Abwehr von Bakteriophagen bzw. Viren. Das System agiert hierbei in drei Schritten: Integration, Prozessierung und Interaktion [12]. Der erste Schritt geschieht, nachdem die Zelle Kontakt zu einem Bakteriophagen oder Virus hatte und dessen Angriff überstanden hat. Dann kann sie ein kleineres Fragment der antagonistischen DNA von meist 20 bis 40 Nukleotiden Länge in ihr eigenes Genom einbauen. Allein dieser Schritt ist schon spektakulär: Damit baut das Bakterium einen genetischen Speicher auf, um sich später an frühere Infektionen zu „erinnern“. Diese kurzen Fragmente (genannt *spacer*) werden in Segmenten gespeichert, wo sie durch kurze, palindromische *repeats* getrennt werden (Abbildung 1). Diese CRISPR-Arrays (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) geben dem System seinen Namen und werden im zweiten Schritt in Form von RNA exprimiert und zugeschnitten. Die *repeat*-Elemente bilden durch ihre palindromische Sequenz charakteristische *hairpin*-Struktu-

ren, die durch spezifische CRISPR-assoziierte Proteine (Cas) erkannt werden, woraufhin sich der sogenannte CRISPR-Cas-Komplex ausbildet, bestehend aus den Cas-Proteinen und dem kurzen RNA-Fragment, welches sich aus dem geschnittenen *repeat* und der ursprünglichen Phagen-Sequenz zusammensetzt. Der Komplex ist nun im dritten Schritt in der Lage, Phageninfektionen zu erkennen, indem er das RNA-Fragment durch Basenpaarung mit der DNA in der Zelle vergleicht. Wenn der Komplex diese Sequenz wiedererkennt, zerschneidet er die DNA an dieser Stelle und verhindert somit die Phagenbedrohung [12].

Durch den Aufbau dieses Systems kann eine beliebige Zielsequenz in der DNA vorgegeben werden, indem eine passende Sequenz in dem CRISPR-Array eingefügt wird. Noch direkter kann das System umprogrammiert werden, wenn es eine einzige Sequenz zur Zielsuche enthält, man spricht dann von einer *single guide-RNA* [1]. Für dieses umprogrammierte CRISPR-Cas-System gibt es viele Anwendungsbereiche; der aber wohl interessanteste ist die Veränderung von genetischem Material, das sogenannte *genome editing*. Hierfür wird dem System ein Zielgen

oder eine Zielsequenz vorgegeben, welche geschnitten wird. Durch den DNA-Reparaturapparat der Zelle wird die entstandene Lücke zunächst vergrößert, dann werden die angrenzenden DNA-Abschnitte jedoch wieder zusammengefügt [13]. Wird der Zelle zusätzlich ein passendes alternatives DNA-Fragment angeboten, kann dieses in den geschnittenen Bereich inseriert werden. Hierzu wird das zu inserierende Fragment zwischen zwei DNA-Bereiche eingebettet, die den Bereichen um die Schnittstelle herum entsprechen [13]. Das Reparatursystem erkennt die Ähnlichkeit und fügt den Abschnitt an der Stelle des ursprünglichen Schnitts ein [13].

Das CRISPR-Cas-System existiert in vielen Bakterien und Archaeen, es ist aber kein universelles System. Zum heutigen Zeitpunkt sind sechs Typen mit über 33 Unterkategorien bekannt, welche auch alternative Funktionen ausüben können wie etwa die Abwehr von Plasmiden oder den Abbau von RNA [12]. Das am besten erforschte System ist der Typ II, da der CRISPR-Cas-Komplex dort nur aus einem einzigen Protein (Cas9) besteht. Dieses System wurde auch für die Sichelzellen-Gentherapie genutzt.

Die Gentherapie Casgevy zur Behandlung von Sichelzellanämie und β -Thalassämie

Die Gentherapie Casgevy (manchmal auch Exa-cel genannt) wurde in den letzten fünf Jahren zur Behandlung von Sichelzellanämie und β -Thalassämie entwickelt und ist für Patienten ab dem Alter von zwölf Jahren zugelassen [3]. Hierbei werden die Stammzellen der roten Blutkörperchen (CD34+) entnommen und durch CRISPR-Cas9-bedingtes *genome editing* außerhalb des Körpers verändert [1]. Die verbliebenen CD34+-Stammzellen im Körper des Patienten werden medikamentös unterdrückt und anschließend werden die veränderten Zellen wieder zurück zum Patienten gegeben. Durch die CRISPR-Behandlung außerhalb des Körpers wird sichergestellt, dass keine anderen Zellen von der Veränderung betroffen sind. Das in der Keimbahn der Patienten befindliche Erbgut wird nicht beeinflusst; somit betrifft die Behandlung nur den Patienten selbst und nicht dessen mögliche Nachkommen.

Das Verfahren der Casgevy-Therapie verändert jedoch nicht – wie man annehmen würde – das mutierte β -Hämoglobingen, sondern stabilisiert den Patienten stattdessen durch die Aktivierung des fetalen Hämoglobins (HbF) [1]. Es ist schon seit längerem bekannt, dass die Expression von HbF in Sichelzellpatienten nach dem Säuglingsalter zur Unterdrückung der Sichelzellenbildung führt und einzelne zugelassene Medikamente nutzen diesen Umstand bereits [9]. Um diesen Effekt dauerhaft zu erhalten, greift die CRISPR-Therapie an dem Regulator BCL11A ein, welcher für die Repression von γ -Hämoglobin und somit auch von HbF verantwortlich ist (Abbildung 2). Im Genaueren wird eine regulatorische Region, der GATA1-*enhancer*, der sich außerhalb des *bcl11A*-Leserasters befindet, zerstört [1]. Diese *enhancer*-Region ist notwendig, damit der

BCL11A-Repressor in Erythrozyten-Stammzellen produziert wird, aber nicht in anderen Blutzellen [14]. Dies hat den Vorteil, dass dem Körper dieser Regulator erhalten bleibt und nur in diesem Zelltyp ausfällt. Durch den fehlenden Repressor kann HbF produziert und die Sichelzellenbildung verhindert werden.

In Studien wurden 75 Patienten mit dieser Therapie behandelt – 44 Patienten mit β -Thalassämie und 31 mit Sichelzellanämie – und über einen längeren Zeitraum beobachtet (zum Zeitpunkt der Veröffentlichung: zwischen 1 und 36 Monaten) [15]. Keiner der Sichelzellanämie-Patienten hatte in diesem Zeitraum eine Gefäßverschlusskrise, die zuvor durchschnittlich fast vier Mal pro Jahr auftrat und lediglich zwei der β -Thalassämie-Patienten benötigten danach noch Bluttransfusionen, wobei die Zahl benötigter Transfusionen deutlich geringer ausfiel. Bei allen Patienten konnte eine gesundheitlich relevante Menge an HbF im Blut nachgewiesen werden [15]. Das heißt, die Therapie war bei allen Patienten erfolgreich.

„Was soll das wieder kosten?“

In den Medien war zu Beginn des Jahres 2024 viel über die hohen Kosten dieser Behandlung zu hören. Aktuelle Schätzungen gehen von etwa 1,5 bis 2 Millionen Euro pro Behandlung aus [3]. Dies klingt zunächst geradezu absurd teuer – eine Behandlung, die keine reguläre Person bezahlen kann. Hier muss aber bedacht werden, dass die herkömmlichen Behandlungen auch nicht kostenlos sind. Eine Studie kam zu dem Schluss, dass die lebenslangen medizinischen Kosten eines Sichelzellanämie-Patienten sich auf etwa 1,6 bis 1,7 Millionen US-Dollar belaufen (ca. 1,5 Millionen Euro) [7]. Hinzu kommen lange Krankenhausaufenthalte, ein schwächeres Immunsystem des Patienten, was diesen anfälliger gegen andere Krankheitsbilder macht, häufige und lange Arbeitsausfallzeiten usw. Es darf andererseits natürlich auch nicht vergessen werden, dass potenzielle spätere Kosten für diese Therapie noch nicht erfasst werden können. Zum Beispiel, ob die Mengen an HbF über längere Zeiträume gehalten werden können oder ob noch potenzielle Langzeitnebenwirkungen auftreten. Es ist auch zu überlegen, wie Krankenversicherungen diesen finanziellen Vorschuss kompensieren können. Unter diesem Aspekt sollte natürlich auch erwähnt werden, dass dies nicht nur eine Herausforderung für Deutschland ist. Sichelzellanämie und β -Thalassämie sind wesentlich stärker in Afrika, dem östlichen Mittelmeerraum und dem südlichen Indien verbreitet. Mittelfristig wird es eine Aufgabe sein, diese Regionen zu befähigen, Behandlungen vor Ort durchführen zu können. Eine klare finanzielle Prognose ist zur Zeit sicherlich nicht ganz einfach, aber die Therapie ist sicher nicht so unmöglich zu bezahlen, wie es auf den ersten Blick scheint.

Nicht von der Hand zu weisen ist, dass diese Therapie vielen Menschen – auch in Deutschland – helfen und ihre Lebensqualität und Lebensdauer deutlich erhöhen kann. Dies und die Tatsache, dass wir gerade erst am Anfang

dieser revolutionären medizinischen Entwicklung stehen, lässt einen optimistisch in die Zukunft schauen.

Zusammenfassung

Sichelzellanämie und β -Thalassämie sind Krankheiten, die durch Punktmutationen im Hämoglobin- β -Gen verursacht werden. Beide Krankheiten beeinträchtigen die Gesundheit der Betroffenen erheblich und sind global weit verbreitet. Mit Hilfe der CRISPR-Cas-Technologie wurde das fetale Hämoglobin-F-Gen in CD34+-Stammzellen reaktiviert, wodurch diese Form des Hämoglobins die mutierte β -Variante ersetzen kann. Die Zellen wurden für dieses Verfahren entnommen und später in den Patienten zurückgegeben, so dass die Keimbahn des Patienten nicht beeinflusst wurde. Alle behandelten Patienten bildeten eine gesundheitlich relevante Menge an Hämoglobin F und zeigten deutlich reduzierte oder gar keine Krankheitssymptome mehr. Die EU, Großbritannien und die USA haben diese erste CRISPR-Cas-Therapie bereits zugelassen.

Summary

Healing sickle cell anemia and β -thalassemia:

Sickle cell anemia and β -thalassemia are diseases caused by point mutations in the hemoglobin β gene. Both diseases significantly affect the health of patients and are widespread worldwide. Using CRISPR-Cas technology, the fetal hemoglobin F gene was reactivated in CD34+ stem cells, allowing this form of hemoglobin to replace the mutated β variant. The cells were harvested for this procedure and later returned to the patient so that the patient's germline was not affected. All treated patients produced a health-relevant amount of hemoglobin F and showed significantly reduced or no symptoms at all of the disease. The EU, the UK and the USA have already approved this first CRISPR-Cas therapy.

Schlagworte

CRISPR-Cas, Gentherapie, Sichelzellanämie, β -Thalassämie

Literatur

- [1] H. Frangoul et al. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med* 384, 252–260.
- [2] A. M. Thomson et al. (2023). Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Haematology* 10, e585–e599.
- [3] C. Sheridan (2024). The world's first CRISPR therapy is approved: who will receive it? *Nat Biotechnol* 42, 3–4.
- [4] S. Reardon (2023). FDA Approves First CRISPR Gene Editing Treatment for Sickle Cell Disease. *Scientific American*.
- [5] V. Simon. Erste Genschere-Therapie soll in der EU zugelassen werden. *tagesschau.de*, <https://www.tagesschau.de/wissen/forschung/crispr-eu-100.html>
- [6] R. E. Ware et al. (2017). Sickle cell disease. *The Lancet* 390, 311–323.
- [7] K. M. Johnson et al. (2023). Lifetime medical costs attributable to sickle cell disease among nonelderly individuals with commercial insurance. *Blood Advances* 7, 365–374.
- [8] E. Pritišanac et al. (2021). Fetal Hemoglobin and Tissue Oxygenation Measured With Near-Infrared Spectroscopy – A Systematic Qualitative Review. *Front. Pediatr.* 9, 710465
- [9] I. Akinsheye et al. (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 118, 19–27.
- [10] M. Suhail (2024). Biophysical chemistry behind sickle cell anemia and the mechanism of voxelator action. *Sci Rep* 14, 1861.
- [11] R. Origa (2017). β -Thalassemia. *Genetics in Medicine* 19, 609–619.
- [12] K. S. Makarova et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* 18, 67–83.
- [13] J. Y. Wang, J. A. Doudna (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science* 379, eadd8643.
- [14] D. E. Bauer et al. (2013). An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level. *Science* 342, 253–257.
- [15] J. De La Fuente et al. (2023). Efficacy and safety of a single dose of exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent-thalassemia and severe sickle cell disease. *HemaSphere* 7, 2–3.

Verfasst von:



Marcus Ziemann studierte von 2012 bis 2019 Biologie an der Universität Marburg. In seiner Bachelorarbeit beschäftigte er sich mit der alternativen Aminosäure Selenocystein in der Arbeitsgruppe von Johann Heider. Seine Masterarbeit thematisierte die Selbsterkennung von Typ IV CRISPR-Cas-Systemen im Labor von Lennart Randau. Seit 2019 promoviert er an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Fachbereich experimentelle Bioinformatik in der Arbeitsgruppe von Wolfgang R. Hess und forscht an CRISPR-Cas-Systemen von Cyanobakterien.



Wolfgang R. Hess studierte von 1982 bis 1987 Biologie an der Universität Rostock und der Humboldt-Universität Berlin. Nach der Promotion zum Dr. rer. nat. 1990 und Habilitation im Fach Genetik 1999 sowie Forschungsaufenthalten am Friedrich-Miescher-Institut in Basel, am CNRS-Institut in Roscoff, Frankreich und am MIT (Massachusetts Institute of Technology), USA, wechselte er 2003 zur U.S. Biotechnologiefirma New England Biolabs. Seit 2004 ist Hess Professor für Experimentelle Bioinformatik und seit 2008 Professor für Genetik an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Wolfgang R. Hess
Institut für Biologie 3
Genetik & Experimentelle Bioinformatik
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Schänzlestr. 1
79104 Freiburg
E-Mail: wolfgang.hess@biologie.uni-freiburg.de



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

