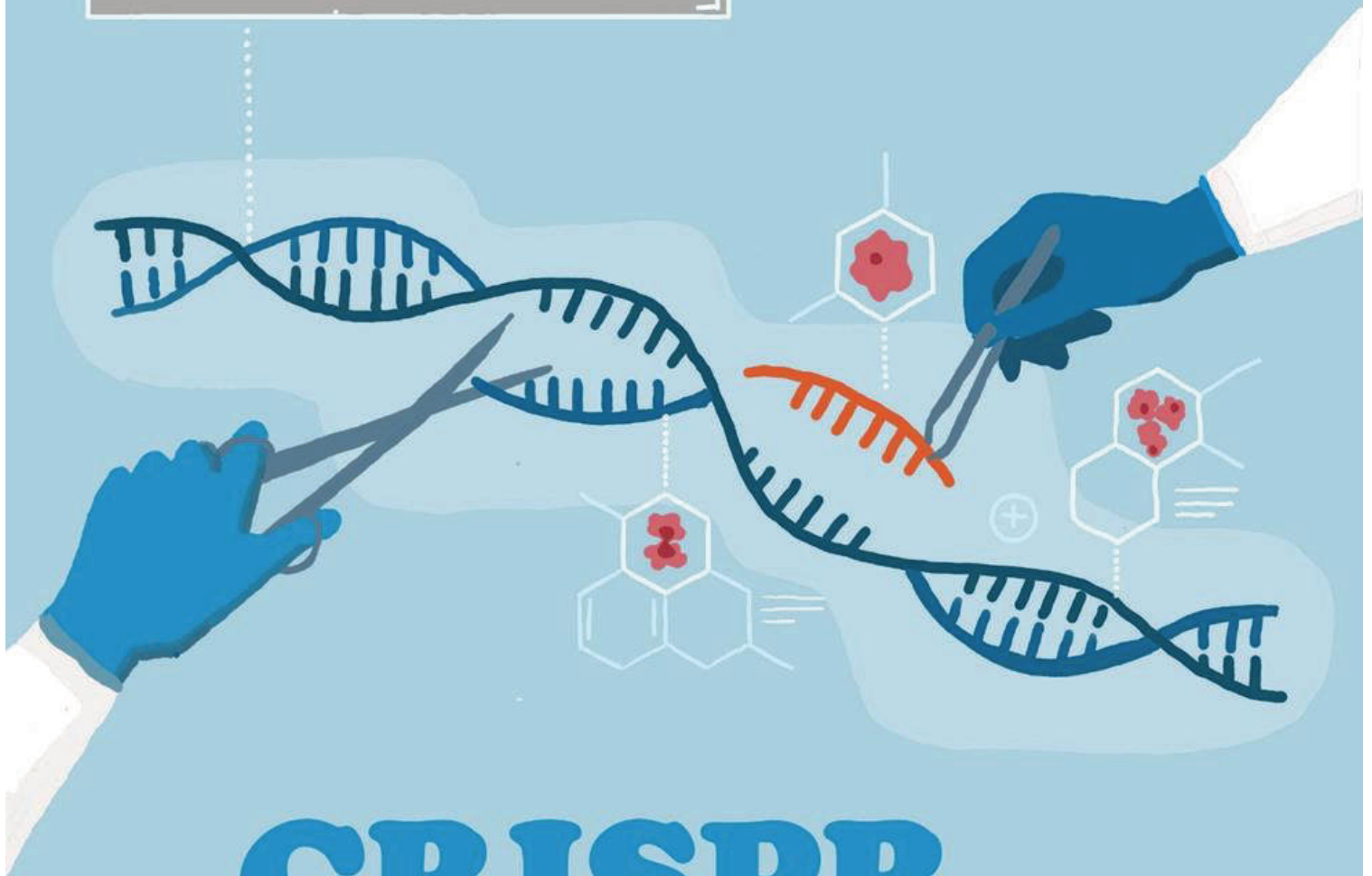


Anwendung,
Nutzen und
Risiken von



CRISPR

in der

Krebstherapie

Anwendung, Nutzen und Risiken von CRISPR in der Krebstherapie

ABSTRACT

Das programmierbare Nuklease System CRISPR, ein Genom-Editierungsverfahren, veränderte die Welt der Medizin und der Genforschung in den letzten Jahren eminent.

Ziel der Arbeit ist die Analyse von Anwendung, Nutzen und Risiken dieser Methode in der klinischen Medizin speziell der Krebstherapie mittels deskriptiv-analytischem Vorgehen und einer Nutzen/Risiko-Abwägung.

CRISPR revolutioniert bereits heute die Krebstherapie durch seine Genauigkeit. Die „Genschere“, wie CRISPR auch genannt wird, schafft in den drei Anwendungsfeldern Diagnostik, Therapie und Weiterentwicklung der Methoden bereits heute einen sehr hohen Nutzen. Die Vielseitigkeit und Einfachheit des Systems bilden die Grundlage für eine weitere, effiziente Innovation in der Krebsforschung.

Obwohl sich bislang ein Großteil der Forschung auf das CRISPR-System an sich konzentrierte, sind die Anwendungsbereiche von CRISPR in der Medizin ein Schwerpunkt derzeitiger und zukünftiger Forschung.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	3
2.	Hauptteil.....	3
2.1	Forschungsgegenstand und Historie	3
2.1.1	Geschichte Genome-Editing	3
2.1.2	Geschichte CRISPR-Cas	4
2.1.3	Vorgang bei CRISPR	4
2.1.4	Unterschiedliche CRISPR-Systeme.....	6
2.1.5	Unterschiedliche Genomeditierungsmethoden.....	6
2.2	Anwendung in der Gentechnik.....	7
2.3	Komplikationen des CRISPR-Systems	8
2.4	Anwendungen von CRISPR-basierter Technologie in der Krebstherapie	9
2.4.1	Diagnostik/Anfänge der Krebsbehandlung	10
2.4.1.1	Diagnostik	10
2.4.1.2	Screening	10
2.4.1.3	Karzinogene Virusinfektionen	10
2.4.1.4	DNA-basiertes Knock-out	11
2.4.2	Therapien.....	12
2.4.2.1	T-Zell Therapien.....	12
2.4.2.1.1	CAR-T-Zell Immuntherapie	12
2.4.2.1.2	TCR-Immuntherapie	13
2.4.2.1.3	Anwendungen an den Checkpoint Signalwegen	13
2.4.2.2	Nk Zell Therapien.....	14
2.4.3	Forschung und Weiterentwicklung	14
2.4.3.1	Entwicklung allogener Therapien	14
2.4.3.2	Beseitigung der Hindernisse in der konventionellen Krebstherapie.....	14
2.4.3.3	Überwindung von On-Target-Off-Tumor Herausforderungen.....	15
2.4.3.4	Entwicklung neuer Krebstherapien	15
3.	Abwägung und Fazit	15
4.	Schluss	16
5.	Abkürzungsverzeichnis	17
6.	Literaturverzeichnis.....	18

1. Einleitung

Seit der Entdeckung der Möglichkeit zur gezielten Bearbeitung des menschlichen Genoms avanciert das programmierbare Nuklease System CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), welches erstmalig in Bakterien entdeckt wurde¹, zum meist angewendeten Hilfsmittel für gezielte Genmodifikation.² Die Genschere, wie CRISPR auch genannt wird, eröffnet völlig neue Therapiemöglichkeiten und verändert, durch ihre konstante Weiterentwicklung, die Welt der Medizin und der Genforschung eminent.³ In dieser Seminararbeit sollen die Anwendung, Nutzen und Risiken dieser molekulargenetischen Methode in der klinischen Medizin mittels deskriptiv-analytischem Vorgehen inkl. Literatuarbeit, Internetrecherche über aktuelle Publikationen und der Analyse der Anwendungsstärke evaluiert werden und die unterschiedlichen Krebstherapien systematisiert werden. Hierbei wird die Anwendung des CRISPR-Systems entlang des Diagnose-Therapie-Zyklus bezüglich Nutzen und Risiko analysiert. Für die Seminararbeit soll deswegen folgende Struktur berücksichtigt werden: zunächst wird der Forschungsgegenstand und dessen Historie beschrieben, daraufhin wird auf die Anwendung und mögliche Limitationen eingegangen. Abschließend werden die Anwendungen in der Krebstherapie analysiert.

2. Hauptteil

2.1 Forschungsgegenstand und Historie

2.1.1 Geschichte Genome-Editing

Wenn Wissenschaftler von Genome-Editing sprechen, sind Verfahren gemeint, die gezielt Schäden im Genom von lebenden Zellen korrigieren.² Die Geschichte dieser Verfahren geht weit zurück. Um das Genom eines Lebewesens zu bearbeiten, mussten die Forschenden zunächst geeignete Werkzeuge entwickeln, sogenannte Nukleasen, welche die Fähigkeit besitzen, DNA zu lädieren. Darüber hinaus war es nötig, diese DNA-schneidenden Enzyme mit einer DNA-Bindedomäne zu koppeln.² Zu einem Durchbruch im Genome-Editing kam es, als solche Designernukleasen entwickelt werden konnten. Die daraus entstandene Genschere basiert auf einem Enzym, welches die Fähigkeit besitzt, eine vorgegebene Stelle im Erbgut anzusteuern und dort den DNA-Strang innerhalb der Sequenz-spezifischen Restriktionsnuklease zu zerschneiden.⁴ Vor der Revolution dieser Werkzeuge durch CRISPR

¹ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

² (Elsner, 2021)

³ (Zhan, Rindtorff, & Betge, 2019)

⁴ (Carroll, 2017), (Wirth, 2018)

wurden weitere Genscheren wie Talen (Transcription activator-like effector nucleases) und Zinkfinger-Nukleasen entwickelt.⁵

2.1.2 Geschichte CRISPR-Cas

Doch erst durch CRISPR gelang eine Revolution im Bereich der Gentechnik. Im Jahre 1987 entdeckte man die erste CRISPR-Sequenz (eine wiederholende Struktur von 29 Basen, welche durch variable Regionen mit jeweils 32 Basen unterbrochen werden) ohne offensichtliche Funktion im Darmbakterium *E.Coli*.⁵ Erst nach zwei Jahrzehnten Forschung konnten die Wissenschaftler sich den Nutzen erschließen: die palindromischen Sequenzen dienen dem Bakterium als adaptives Immunsystem zum Schutz vor Bakteriophagen. Damit leitete das CRISPR-System einen Umbruch ein. Im Unterschied zu den „Designernukleasen“ besteht die DNA-bindende Domäne des CRISPR-Systems aus einer RNA (guide-RNA) und nicht aus einer Proteindomäne, was das Design pro spezifische Anwendung beachtlich vereinfacht.⁵ Die Herstellung einer gRNA⁶ ist mithilfe frei verfügbarer Online-Tools heute sehr einfach, denn ein jeder kann diese im Reagenzröhrchen mit zwei DNA-Oligonukleotiden selbst herstellen.⁶ CRISPR war aber noch aus einem anderen Grund eine echte Neuheit: das große Problem der unbeabsichtigten Schnitte im DNA-Strang außerhalb der Zielregion (Off-Target-Effekte) konnte signifikant reduziert werden. Das Problem mit den Off-Target-Effekte der Designernukleasen war deren drastische Konsequenz auf Genaktivität oder -expression, und das komplizierte Detektieren durch Qualitätskontrollen wie dem Sanger-Genotyping.⁷ Die eigentliche Revolution des CRISPR Systems ereignete sich jedoch erst, als Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier 2012 den Beweis lieferten, dass ein Cas9 Enzym aus dem Scharlacherreger *Streptococcus pyogenes* im Reagenzglas mit einer entsprechenden crRNA (synthetisch hergestellte RNA, die bei der CRISPR/Cas-Methode verwendet wird) programmiert werden kann, um eine beliebige DNA-Sequenz zu schneiden, ohne dass weitere Mittel notwendig sind.⁸ Dafür erhielten die beiden Frauen 2020 den Nobelpreis in Chemie.⁵

2.1.3 Vorgang bei CRISPR

Nachdem die Historie erläutert wurde, soll nun in diesem Abschnitt die Funktionsweise des Verfahrens dargestellt werden. Nach zahlreichen Jahren der Forschung konnten Wissenschaftler nun auch den Vorgang des CRISPR-Systems rekonstruieren.⁷ CRISPR beschreibt ursprünglich DNA-Abschnitte im Erbgut von Bakterien, welche das Immunsystem

⁵ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

⁶ Synthetisch hergestellte RNA, die bei der CRISPR/Cas-Methode verwendet wird

⁷ (Weisheit, 2021)

⁸ (Charpentier, et al., 2012)

der Bakterien bilden. Bakterien oder Archaeen⁹ bauen nach der Infektion mit Viren eine Art „Gedächtnis“ auf, indem die überlebenden Prokaryoten die Viren-DNA im eigenen Erbgut als Spacer einbauen.¹⁰ Das Akronym CRISPR steht für Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und beschreibt also die kurzen sich wiederholenden Palindrome¹¹, die durch die Viren DNA unterbrochen werden.¹² Das System im Genom der Bakterien (der CRISPR-Genlocus) besteht aus drei Bauteilen. Der erste Bestandteil ist der CRISPR-Array, ein DNA-Bereich aus abwechselnden Spacern und Repeats, wobei Repeats durch die kurzen DNA-Abschnitte Palindromischer Struktur beschrieben werden, die dann mit den Tracer RNAs paaren können.¹³ Der Vorteil der Palindromischen Struktur besteht darin, dass DNA-schneidende Proteine häufig Palindrom-Abschnitte als Erkennungssequenz nutzen, an der sie das Erbgutmolekül durchtrennen.¹⁴ Spacer sind Unterbrechungen der Repeatsequenzen aus dem Erbgut der Viren und sind komplementär zur Target DNA¹⁵. Ein weiterer Bestandteil des CRISPR-Genlocus ist der Promotor (die Leader Sequenz), also ein DNA-Abschnitt der als Startregion wirkt, um das Ablesen des CRISPR-Genlocus in CRISPR RNA zu ermöglichen.¹⁶ Der letzte Bestandteil des Genlocus sind die Cas (CRISPR-associated) Proteine, die neben den CRISPR Genen notwendig sind. Diese enthalten den Bauplan für Enzyme, die wichtig für das Abwehrsystem sind (Endonukleasen und Helikasen).¹⁷ Auf die CRISPR und Cas Sequenzen folgt ein Abschnitt für ein als tracrRNA (trans-activating crRNA) bezeichnetes RNA-Molekül, das die Schneidemoleküle zusammen mit der crRNA zu ihren Zielorten auf der Viren-DNA führt. Hierbei bindet die tracrRNA per Basenpaarung an die crRNA und ist damit Bestandteil des Ribonukleoproteinkomplexes der Cas Proteine (z.B. Cas9, Cas12b). Der RNA Doppelstrang aus crRNA und tracrRNA wird durch die RNase III¹⁸ aktiv gemacht und dient als Adapter der Bindung zur zu schneidenden Ziel-DNA.¹⁹ Die natürliche Aufgabe des CRISPR Systems ist nun Bakterien zur Verteidigung zur Verfügung zu stehen, wenn diese mit Bakteriophagen infiziert werden. Die Viren docken hierbei an das Bakterium an und injizieren ihr Erbgut, wodurch die Bakterien dieses vermehren und neue Viren produzieren, was in den

⁹ Einzellige Mikroorganismen

¹⁰ (Minol, kein Datum)

¹¹ die Buchstaben des genetischen Codes haben in einem DNA-Strang dieselbe Reihenfolge wie im zweiten komplementären DNA-Strang- dort allerdings in entgegengesetzte Richtung

¹² (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

¹³ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

¹⁴ (studyflix, 2021)

¹⁵ Die Ziel DNA, bei Bakterien die DNA der Bakteriophagen

¹⁶ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

¹⁷ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

¹⁸ Endonuklease mit spezifischer Endonukleasen-Domäne (3)

¹⁹ (Max-Planck- Gesellschaft, 2021)

meisten Fällen im Tod der Bakterie resultiert.²⁰ Wenn das Bakterium aber überlebt, baut es im ersten Schritt, auch Akquisition genannt, kurze Abschnitte der Viren-DNA als Spacer in sein eigenes Genom ein. Innerhalb der Expression wird der CRISPR-Array nun abgelesen und es entsteht die prä-CRISPR-RNA²¹, in welcher die palindromischen Repeats Schleifen bilden. Durch nachfolgende post-transkriptionelle-Modifikation wird der Strang der prä-CRISPR-RNA zu kürzeren Stücken (crRNA mit je einem Spacer) zerschnitten. Die crRNA weist nun, in einem Doppelstrang mit der tracrRNA, den Proteinen den Weg zur zu zerschneidenden DNA-Sequenz (Viren-DNA).²² Um nicht ihre eigene DNA zu zerschneiden, gibt es neben der Viren-DNA-Sequenz die PAM (protospacer-adjacent-motiv) -Sequenz, die erkannt werden muss. Ohne die Erkennungssequenz kann der Cas-RNA-Komplex zwar an die virale DNA binden, sie allerdings nicht schneiden. Wenn die PAM-Sequenz benachbart zur Erkennungssequenz ist, wird der DNA-Doppelstrang aufgewunden, die crRNA lagert sich an das komplementäre DNA-Stück an und das Cas-Enzym zerschneidet beide Stränge (Doppelstrangbruch).²³

2.1.4 Unterschiedliche CRISPR-Systeme

Essentiell für die spätere Anwendung von CRISPR in der Krebtherapie ist die Unterscheidung der einzelnen CRISPR-Systeme. Im Allgemeinen klassifiziert man drei verschiedene CRISPR-Systeme, die sich voneinander aufgrund der beteiligten Cas-Proteine und Erkennungsmerkmalen auf der Target-DNA differenzieren. Für Typ I und Typ III ist eine Endoribonuklease der Cas6 Familie sowie andere Cas Proteine nötig. Das Typ II System ist für die Wissenschaft besonders interessant und praktikabel, da nur ein einziges Protein (das Cas9-Protein) und eine tracrRNA gebraucht werden,²⁴ wobei man das Cas9 Protein einfach aus dem Scharlacherreger *Streptococcus pyogenes* (spCas9) isolieren kann.²⁵ Mittlerweile existieren auch eine große Anzahl künstlicher Cas9 Enzyme, die es möglich machen, fast jede beliebige Sequenz zu schneiden.²

2.1.5 Unterschiedliche Genomeditierungsmethoden

CRISPR kann nicht nur auf dem „konventionellen“²⁶ Weg des Genome-Editings angewendet werden, sondern hat ein breites Nutzenspektrum.²⁷ Das eigentliche Editieren des Genoms kann

²⁰ (Zhan, Rindtorff, & Betge, 2019)

²¹ Eine Vorläufer-RNA

²² (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

²³ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

²⁴ (Kang, 2017)

²⁵ (Carroll, 2017)

²⁶ Als konventionell wird hier die Anwendung bei den Bakterien beschrieben (DNA identifizieren, Doppelstrangbruch, Gen inaktivieren)

²⁷ (Elsner, 2021)

auf zahlreiche unterschiedliche Weisen passieren. Man unterscheidet hier zwischen Prime Editing und Base Editing. Base Editing beschreibt die gezielte Veränderung eines einzelnen Basenpaares. Dafür wird ein bakterielles Enzym (eine Desaminase) benötigt, die Cytosin-Basen zu Thymin-Basen verändert. CRISPR-Cas9 bringt das Enzym an die vorgegebene Stelle und trennt den DNA-Doppelstrang. Mit dem Base-Editing werden etwa 30% aller bekannten, potenziell pathogenen natürlichen genetischen Variationen beim Menschen korrigiert.²⁸ Im Gegenzug zum Base-Editing erlaubt das Prime Editing nicht nur die Korrektur einzelner Basen, sondern alle 12 möglichen Vertauschungen dieser. Cas9 transportiert hier eine Prime-Editing guide RNA²⁹ und schneidet nur einen Strang, womit RNA in DNA übersetzt wird. Dieses System wird häufig in Zellkultur-Mutationen eingefügt, die Krankheiten wie Sichelzellanämie³⁰ oder das Tay-Sachs-Syndrom³¹ verursachen. Es existieren noch weitere Techniken, mit denen man CRISPR einsetzen kann. Eine ist die Gen Aktivierung und Inhibition. Da nicht alle Gene ständig abgelesen werden und in Proteine übersetzt werden, benutzt man CRISPR um die Aktivität der Gene zu kontrollieren. Das Cas-Enzym wird hierbei mit natürlichen Regulatoren der Genaktivität ausgestattet, bindet an den Promotor eines Gens und rekrutiert entweder zelluläre Faktoren, die für das Ablesen nötig sind oder solche, die das Ablesen verhindern. Damit kann die Genaktivität temporär moduliert werden, was z.B. zur Entwicklung von Stammzellen in gewünschten Zelltypen genutzt werden kann.³²

2.2 Anwendung in der Gentechnik

Das CRISPR System beschränkt sich jedoch nicht nur auf Bakterien, sondern funktioniert bei allen Organismen, mit dem Unterschied, dass die CRISPR-RNA und das Cas-Schneideprotein synthetisch hergestellt werden und in eine Zelle eingeführt werden.³³ Dies kann mit bekannten gentechnischen Verfahren geschehen. Wenn die CRISPR-Werkzeuge ihren Zweck erfüllt und die beabsichtigte Mutation ausgelöst haben, werden sie nicht mehr benötigt und sind in den Nachkommen nicht mehr vorhanden.³⁴ Das Verfahren, Gene gezielt zu verändern funktioniert in drei Schritten.³⁵ Im ersten Schritt, der Ziel-Erkennung, erkennt das Cas-Protein mithilfe der integrierten Guide-RNA (ein Ersatz der crRNA-tracrRNA Bindung) die Schnittstelle der Ziel DNA. Im zweiten Schritt zerschneidet die Endonuklease beide Stränge in einem

²⁸ (Liu, Wang, & Luo, 2018)

²⁹ Auch pegRNA, eine sgRNA mit einer Primerbindungssequenz (PBS) und der Informationen enthaltenden Matrize

³⁰ Eine Erbkrankheit, die durch einen genetischen Defekt zur Bildung von irregulärem Hämoglobin führt

³¹ Eine verheerende Fettstoffwechselkrankheit, die bis heute unheilbar ist

³² (Elsner, 2021)

³³ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

³⁴ (Weisheit, 2021)

³⁵ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

Doppelstrangbruch, wobei hier auch Multiplexing möglich ist (in einer Zelle gleichzeitig mehrere Schnitte an unterschiedlichen Orten des Genoms setzen).³⁶ Die Reparatur des Doppelstrangbruchs erfolgt nun entweder nicht-homolog (zufällig) oder homolog (gezielt). Beim NHEJ (Non-homologous end-joining) werden die Stränge entweder direkt zusammengefügt, sodass ein Stück fehlt, oder es werden zufällig neue Basenpaare eingesetzt. Beides führt dazu, dass das Gen inaktiviert wird und nicht mehr gelesen werden kann.³⁷ Bei der HDR (homology directed repair) erfolgt eine gezielte Reparatur des Bruchs unter Einfügen eines neuen Gens oder einer veränderten Form des Gens.² Durch die Primitivität dieser Gen-Bearbeitungsmethode finden sich zahlreiche klinische und Nicht-klinische Anwendungen von CRISPR. Besonders häufig wird CRISPR im klinischen Bereich angewendet, z.B. im Bereich der Diagnostik, der Arzneimittelforschung, der somatischen Gentherapie, der Keimbahntherapie³⁸ und der Antimicrobial-Therapie.³⁹ Aber auch im nichtklinischen Bereich birgt CRISPR einen hohen Nutzen, so zum Beispiel in der Grünen Gentechnik, dem Gene-Drive und der Epigenetik.¹ Einige dieser Anwendungsfelder werden im Folgenden untersucht.

2.3 Komplikationen des CRISPR-Systems

CRISPR birgt allerdings nicht nur Nutzen, sondern auch Risiken. Trotz der hohen Verlässlichkeit des CRISPR-Systems sind Kollateralschäden am Genom nicht auszuschließen⁴⁰ (die Off-Target-Aktivität kann allerdings schon bis zu 90% reduziert werden⁴¹). Des Weiteren ist bei klinischen Anwendungen von CRISPR zu beachten, dass viele Erkrankungen multifaktoriell bedingt sind und Eingriffe ins Genom hier allenfalls ein Baustein der Therapie darstellen.⁴² Ein weiteres Hindernis ist die in Punkt 2.1.3 angesprochene Voraussetzung der PAM-Sequenz, welche direkt an die spacer-Sequenz angrenzen muss, was die Anzahl der Stellen, an der ein Genom geschnitten werden kann, limitiert (bei spCas9⁴³ jede 8. Stelle im Genom).⁴⁴ Auch ist nicht nur die Detektion der Off-Target-Effekte schwierig⁴⁵, sondern auch die Detektion der On-Target-Effekte (onTE). Die Gefahr unentdeckter onTEs macht CRISPR unzuverlässig. Es wird hier allerdings an neuen Methoden zu deren Nachweis (z.B. quantitative

³⁶ (Charpentier, et al., 2012)

³⁷ (Grimm & Dürnberger, 2021)

³⁸ (Dederer & Frenken, 2021)

³⁹ Therapie zur Tötung oder Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen

⁴⁰ (Krauter, 2020)

⁴¹ (Carroll, 2017)

⁴² (Deutscher Ethikrat, 2019)

⁴³ Cas Protein aus *Streptococcus pyogenes*

⁴⁴ (Elsner, 2021)

⁴⁵ (He, 2020)

Genotypisierungs-PCR/ qgPCR) geforscht.⁴⁶ Wenn NHEJ erfolgen soll, ist es nötig, dass sich Genome Editing Werkzeuge auf die DNA-Reparaturmechanismen der Wirtszelle verlassen können, um die gewünschte Veränderung des Genoms herbeizuführen. Dies ist ein Problem, weil dadurch die Effizienz limitiert wird. Auch hier existieren bereits Lösungsansätze für Genome Editing Verfahren, die unabhängig von der Wirtszelle arbeiten² (Transposasen, Rekombinasen). Eine weitere Komplikation stellt das Einführen des CRISPR-Genlocus in die Zelle dar, da CRISPR-Cas Enzyme große Moleküle sind, die nicht von alleine über die Zellmembran in Zellen gelangen oder sich im Körper gleichmäßig verteilen. Um die Moleküle einzuführen, braucht man entweder Viren/von Viren abgeleitete Vektoren oder Synthetische Komplexe. Diese mindern demgegenüber die Effizienz in vivo⁴⁷ und sind limitierend für den Einsatz von Genome-Editing in der klinischen Praxis.²

2.4 Anwendungen von CRISPR-basierter Technologie in der Krebstherapie
CRISPR-basierte Technologie findet eine breite Anwendung in der Krebstherapie. Durch CRISPR kann eine frühe Detektion von Krebs erfolgen und neue Therapiemöglichkeiten können entwickelt werden. Außerdem kann CRISPR die Krebs-verursachenden Gene identifizieren und Risikofaktoren für Krebs ausschalten. Damit verbessert CRISPR bereits bestehende Behandlungsformen, die durch hohe Toxizität,⁴⁸ geringe Erfolgsquoten und begrenzte Herstellerkapazitäten aufgrund hoher Komplexität gekennzeichnet sind. CRISPR kann im Gegensatz zu bestehenden Therapien eine kürzere Behandlungsdauer, höhere Erfolgsquoten, inhärente Programmierbarkeit und höhere Sicherheit, Wirksamkeit und Skalierbarkeit bieten.⁴⁹ CRISPR ermöglicht außerdem die unbegrenzte serielle Bearbeitung endogener Gene, wodurch keine viralen Integrationen mehr nötig sind (Hit and run Strategie).⁵⁰ In welcher Hinsicht und in welchem Ausmaß das CRISPR System aber genau die Krebstherapie avanciert, wird anhand von ausgewählten Therapieformen im Folgenden analysiert. Hierbei werden die unterschiedlichen Schritte einer Krebsbehandlung (Diagnostik, Therapie, Weiterentwicklung) jeweils anhand der Vor- und Nachteile durch CRISPR und deren Gesamtnutzen betrachtet.

⁴⁶ (Elsner, 2021)

⁴⁷ Am lebenden Objekt

⁴⁸ (Özcan, Krajewski, Joannidi, & Lee, 2021)

⁴⁹ (Zhan, Rindtorff, & Betge, 2019)

⁵⁰ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

2.4.1 Diagnostik/Anfänge der Krebsbehandlung

2.4.1.1 Diagnostik

Eine frühe Diagnostizierung ist bei der schnell fortschreitenden Erkrankung Krebs essentiell. CRISPR wird hier dazu eingesetzt, die spezifischen Nukleinsäuren mit dem diagnostischen System SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) zu detektieren.⁵¹ Das SHERLOCK System besteht hierbei aus der RNase Cas13a und einem Reporter Signal.⁵² Mutationen lassen sich schnell detektieren (z.B. die maligne Melanom Mutation BRAF V600E) und der Krebs kann entdeckt werden. Den Bereich der Diagnostik avanciert CRISPR durch seine Genauigkeit und hohe Resolution in der Detektion und eignet sich durch hohe Erfolgsquoten mehr als andere Diagnostikmethoden.⁵³

2.4.1.2 Screening

Ähnlich wie die Diagnostik, ist die Methode Screening von zentraler Bedeutung für die Krebstherapie, da die Identifikation der Gene, die die Tumorevolution vorantreiben, möglich ist. CRISPR wird in diesem Bereich innerhalb des Large-scale-genomic-screening⁵⁴ eingesetzt, mit dem man die mutierten Gene verschiedener Krebsarten erkennen kann. Ein Hauptziel gepoolter CRISPR/Cas9-Screenings in der Krebsforschung ist es auch, Genotyp spezifische Schwachstellen zu identifizieren. Diese „essentiellen“ Gene können potenzielle Angriffspunkte für Medikamente sein.⁵⁵ Hier profitiert die Krebstherapie wieder von der hohen Spezifität des CRISPR-Systems. Obwohl der Bereich des Screenings mit CRISPR-basierter Technologie noch nicht sehr gut erforscht ist, wird aufgrund der Vielseitigkeit und Einfachheit dieses Systems in Zukunft vermutlich eine hohe Forschungsaktivität zu beobachten sein.

2.4.1.3 Karzinogene Virusinfektionen

Eine spezifische Art des Screenings und ein weiteres Anwendungsgebiet von CRISPR ist die Identifikation karzinogener Virusinfektionen. Krebserregende Infektionen sind eine häufige Ursache für Krebs (z.B. die Infektion Hepatitis-B-Virus) und CRISPR ist von großer Bedeutung für die Abwehr und Beseitigung infizierter Viren. Die sgRNA⁵⁶, die das virale Genom spezifisch erkennen kann, zielt hierbei direkt auf die Onkogene viraler Gene, die für die Aufrechterhaltung der viralen Replikation erforderlich sind. Durch eine Mutation im viralen Genom kann die Expression viraler Gene unterdrückt werden, was zum Tod der Krebszellen

⁵¹ (Batista & Pacheco, 2016)

⁵² (Kellner, Koob, & Gootenberg, 2019)

⁵³ (Zenke, Fehse, & Marx-Stölting, 2018)

⁵⁴ Charakterisierung der Genfunktion und Analyse der zellulären Struktur

⁵⁵ (Elsner, 2021)

⁵⁶ Künstlich hergestelltes RNA-Molekül, um die Funktion von Cas zu steuern

führt.⁵⁷ Durch CRISPR können hiermit die verschiedenen Ursachen von Krebs erforscht werden und in diesem Bereich wird CRISPR in Zukunft vermutlich auch zur gängigen Methode avancieren.

2.4.1.4 DNA-basiertes Knock-out

Des Weiteren findet das CRISPR-System Anwendung im Gen-Knockout. Häufig ist hier das Knockout von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, Chemotherapie-resistenten-Genen und Stoffwechsel-bezogenen-Genen. Onkogene sind Teile des Erbgutes einer Zelle, die im Falle ihrer übermäßigen Aktivierung den Übergang von normalem Wachstumsverhalten der Zelle zu ungebremstem Tumorwachstum fördern. Das CRISPR/Cas-System bietet eine Maßnahme zur Deletion, Störung der Expression und Veränderung der Aktivität von Onkogenen. Hierbei lassen sich signifikante hemmende Effekte in der Cell-Migration/Invasion⁵⁸ der Onkogene feststellen.⁵⁹ In diesem Bereich zeigt sich eine hohe Forschungsaktivität. Zum Beispiel bei der Ausschaltung des RNA-Gens miR-3064 mittels der CRISPR/Cas9-Technologie, was die Proliferation, Invasion und tumorigene Kapazität von Pankreaskarzinomen⁶⁰ signifikant reduzierte. Außerdem vermittelte CRISPR/Cas9 die Zerstörung der E3-Ubiquitin-Ligase in einem Mausmodell für dreifach negativen Brustkrebs.⁶¹ Tumorsuppressor-Gene tragen zur Krebsentstehung bei, wenn sie durch Mutation ausgeschaltet werden und unterdrücken das Zellwachstum durch Bildung von Eiweißen. Das CRISPR/Cas9-System ermöglicht eine schnelle Validierung von Tumorsuppressorgenen in vitro⁶² und in vivo, was dazu führt, dass die Tumorsuppressorgene nicht ausgeschaltet werden. Dies resultiert in einer Vermeidung des Krebswachstums. Ebenfalls ist die CRISPR/Cas9-Technologie in der Lage Tumorsuppressorgene zu identifizieren. Geforscht wurde hier bereits an der Deletion von mehreren Tumorsuppressorgenen im Mäusegehirn durch CRISPR/Cas9⁶³, was zur Entwicklung eines Glioblastoms führte, und damit die Annahme bestätigt, dass Tumorsuppressorgene nicht eliminiert werden dürfen.⁶⁴ Ein großes Problem der Krebstherapie ist, dass manche Krebszellen resistente Gene gegenüber chemotherapeutischen Mitteln entwickeln. CRISPR kann chemoresistente Krebszellen identifizieren und einen Knockout durchführen. Der Knockout von NRF2 Lungenkrebszellen in einem Xenograft-Mausmodell führte zu einer erhöhten

⁵⁷ (Bellizzi, Ahye, & Jalagadugula, 2019)

⁵⁸ Zentraler Prozess bei der Erhaltung vielzelliger Organismen

⁵⁹ (Zhang, Qin, & An, 2021)

⁶⁰ Bauchspeicheldrüsenkrebs, (Maresch, 2021)

⁶¹ (Zhang, Qin, & An, 2021)

⁶² Außerhalb des lebenden Organismus

⁶³ (Maresch, 2021)

⁶⁴ (Zhang, Qin, & An, 2021)

Empfindlichkeit gegenüber den chemotherapeutischen Stoffen Cisplatin und Carboplatin.⁶⁵ Im Bereich des DNA-basierten Knock-outs lässt sich also sagen, dass das CRISPR System eine breite Anwendung und einen großen Nutzen korrelierend mit einem geringen Risiko mit sich bringt.

2.4.2 Therapien

2.4.2.1 T-Zell Therapien

Die T-Zell Therapie gilt als eine der vielversprechendsten Therapieformen für die Krankheit Krebs.⁶⁶ Die Anwendung von CRISPR/Cas in den verschiedenen Arten der T-Zell Therapie wird nun analysiert.

2.4.2.1.1 CAR-T-Zell Immuntherapie

Das Prinzip der CAR-T-Zell Immuntherapie besteht darin, T-Zell Rezeptoren an die Oberfläche der T-Zellen zu bringen. Diese Rezeptoren können nun an bestimmte Tumorzellen andocken und diese zum Absterben bringen.⁶⁷ Ein CAR (chimärer Antigenrezeptor) ist ein solcher Rezeptor.⁶⁸ CRISPR wird hier eingesetzt, um allogene universelle T-Zellen mit Hilfe eines One-Shot CRISPR-Protokolls herzustellen. Hierbei werden mehrere guide-RNAs in einen CAR-Vektor eingebaut. Bereits angewendet wurde dieses Verfahren an Patienten mit Sarkom⁶⁹ und Multiplem Myelom⁷⁰, wobei T-Zellen entnommen und mit der Genschere modifiziert wurden. Den patienteneigenen T-Zellen wurden drei Gene ausgeschaltet. Die T-Zellen wanderten bei allen Patienten zu den Tumoren und es war eine Verringerung der Zielantigene zu beobachten.⁷¹ Mit CRISPR lassen sich also die Gene der inhibitorischen Moleküle unterbrechen. CRISPR kann auch nachweislich die Funktion der CAR-T-Zellen verbessern und das Risiko von Entzündungen und der Zytokinfreisetzungssyndroms (CRS) mindern.⁷² Auch reduziert CRISPR das Risiko des Fehlschlagens bei der Herstellung und verhindert eine Dysfunktionierung der T-Zellen. Das CRISPR-System birgt allerdings in der CAR-T-Zell-Immuntherapie nicht nur Vorteile. Die klinische Wirksamkeit der Krebsimmuntherapie hängt von geeigneten T-Zellen für die Refusion ab. CRISPR gezüchtete T-Zellen für klinische Studien wurden jedoch durch Elektroporation transduziert, was zu Zellschäden führen und die

⁶⁵ (Batista & Pacheco, 2016)

⁶⁶ (Borchmann, 2020)

⁶⁷ (Charite Berlin)

⁶⁸ (Männel, 2019)

⁶⁹ Seltener, bösartiger Tumor, der von Bindegewebe- und Muskelzellen ausgeht

⁷⁰ Bösartige Tumorerkrankung, die durch Entartung einer Plasmazelle im Knochenmark entsteht

⁷¹ (Stadtmauer, Fraietta, & June, 2020)

⁷² (Zhang, Qin, & An, 2021)

T-Zell-Proliferation ex vivo⁷³ behindern könnte.⁷⁴ Die Beseitigung der inhärenten Kontrollen und Gleichgewichte, die die T-Zell-Reaktionen einschränken, kann das Risiko des Zytokinfreisetzungssyndroms (eine häufige und schwerwiegende Nebenwirkung der CAR-T-Zelltherapie) erhöhen und/oder eine unkontrollierte Lymphoproliferation in vivo verursachen.⁷⁵ Damit lässt sich sagen, dass CRISPR in der CAR-T-Zell-Immuntherapie breite Anwendung findet, aber bei dessen Anwendung auch mit potentiellen Risiken gerechnet werden muss.

2.4.2.1.2 TCR-Immuntherapie

Statt die zur Therapie bestimmten T-Zellen mit einem chimären Rezeptor zu versehen, kann man sie auch mit einem passgenauen natürlichen T-Zell-Rezeptor (TCR) ausrüsten, der aus gesunden Spendern isoliert wurde. Das CRISPR System schaltet endogene TCRs aus (bereits vorhandene TCRs auf den T-Zellen, die mit den transgenen TCRs konkurrieren und zu Fehlpaarungen führen).⁷⁶ Angestrebt wird ein doppelter Knockout der endogenen $\alpha\beta$ TCR (Knockout der α -Kette (TRAC) als auch der β -Kette (TRBC)) und damit ein endgültiges Ausschließen des Risiko der Fehlpaarung eines endogenen TCRs und eines tgTCRs (transgenic T cell receptor). Durch CRISPR lässt sich hier eine verbesserte Expression und Funktion der transgenen TCRs erkennen, da CRISPR Unterbrechungen eingesetzt werden um das TCR Mispairing fast vollständig zu eliminieren.⁷⁷ In der TCR-Immuntherapie birgt CRISPR somit einen hohen Nutzen durch seine Fähigkeit des präzisen Knockouts.

2.4.2.1.3 Anwendungen an den Checkpoint Signalwegen

Um nicht konstant T-Zellen zu aktivieren. Die zu den Tumoren gelangen, existieren immunregulatorische Checkpoint-Signalwege, die vor einer überschießenden Reaktion des Immunsystems schützen. CRISPR wird verwendet, um CTLA-4-einen homologe Rezeptor, der nach der Bindung an die T-Zelle einem Liganden hemmende Signale liefert-auszuknocken. Dies resultiert in der Steigerung der anti-Tumor-Aktivität von CTLs. CRISPR schaltet hemmende Rezeptoren an den T-Zellen aus, die normalerweise die Funktion besitzen, Autoimmunität zu verhindern. Die selbstreaktiven TCRs werden aus dem Infusionsprodukt entfernt.⁷⁸ Die Effizienz des Gen-Editierens ist allerdings auch hier je nach Zielgenen und Patienten sehr unterschiedlich.

⁷³ Aus dem Lebenden entnommen

⁷⁴ (Müller, 2020)

⁷⁵ (Ou, Ma, & Yin, 2021)

⁷⁶ (Pharma-Unternehmen, 2021)

⁷⁷ (Zhang, Qin, & An, 2021)

⁷⁸ (Ou, Ma, & Yin, 2021)

2.4.2.2 Nk Zell Therapien

Nk-Zellen können den Krebs direkt abtöten. Die Nk-Zellen vermittelte Abtötung ist nicht antigenspezifisch und löst bei allogener Behandlung kein GvHD⁷⁹ aus, allerdings kann die Wirkung durch hemmende Faktoren in der Mikroumgebung des Tumors unterdrückt werden. CRISPR wird genutzt um die Nk-Zellen durch Genom-Editierung zu verbessern.⁸⁰ Nachdem CRISPR hier das inhibitorische Molekül PD-1 ausknockte, wurde die Funktionsfähigkeit primärer Nk-Zellen in vitro erhöht und ihre Antitumor-Wirksamkeit in einem Eierstockkrebsmodell verstärkt.⁸¹

2.4.3 Forschung und Weiterentwicklung

2.4.3.1 Entwicklung allogener Therapien

Die meisten TCR und CAR-Zellen werden aus autologen Zellen gebildet. Für sehr schnell fortschreitende Erkrankungen (wie zum Beispiel das Glioblastoma multiforme) ist dies zu zeitaufwendig. Durch allogene Therapien können die T-Zellen eines einzigen gesunden Spenders für die Herstellung vieler Dosen von TCR-Produkten verwendet werden, was in einer kürzeren Behandlungszeit resultiert.⁸² Eine Herstellung allogener Zellen ist allerdings gefährlich, da sie das Risiko einer GvHD und einer Alloreaktivität birgt, die zu einer schnellen Abstoßung der übertragenen Zellen führt. CRISPR kann diese Herausforderungen überwinden. Bereits angewendet wurden allogene Therapien mit CRISPR an Patienten mit Leukämie, die mit dem CRISPR-Knockout von CD7 (zur Vermeidung von Brudermord an den CAR-T-Zellen) und TRAC⁸³ (zur Vermeidung von GvHD) behandelt wurden. Bei allen Patienten kam es zu einer kompletten Remission.⁸⁴

2.4.3.2 Beseitigung der Hindernisse in der konventionellen Krebstherapie

T-Zellen können eine Resistenz gegenüber ACTs (adoptive cell therapy) entweder intrinsisch (wenn die übertragenen T-Zellen nicht im Patienten verbleiben oder unempfindlich auf Tumorzellen werden) oder extrinsisch aufbauen (Veränderungen der Tumorzellen, die sich gegen die T-Zellen resistent machen). Außerdem werden in Tumoren häufig hemmende Proteine PB-L1 gebildet, die sich mit den T-Zellenrezeptoren PD-1 verbinden und die Antitumoraktivität unterdrücken. CRISPR kann T-Zellen so verändern, dass sie die Wege der Immunsuppression überwinden, die zu T-Zell Resistenz gegen ACTs führen. Dies ist

⁷⁹ Graft-versus-Host-Disease, Eine lebensgefährliche Erkrankung des Spenderimmunsystems gegen Gewebe des Empfängers

⁸⁰ (Zhang X. , 2021)

⁸¹ (Ou, Ma, & Yin, 2021)

⁸² (Elsner, 2021)

⁸³ Alpha-T-Zell-Rezeptor

⁸⁴ (Elsner, 2021)

entscheidend, da ACTs vielversprechende Behandlungsmethoden sind.⁸⁵ Damit kann auch die Wirksamkeit, Sicherheit und Skalierbarkeit zellulärer Produkte verbessert werden.

2.4.3.3 Überwindung von On-Target-Off-Tumor Herausforderungen

CAR und TCR-T-Zellen Therapien können Tumore antigenspezifisch abtöten. T-Zellen können allerdings nicht zwischen guten und bösen Tumoren unterscheiden, und es kommt zu On-Target-Off-Tumor-Nebenwirkungen. CRISPR wird eingesetzt, um das Zielantigen in Zellen außerhalb des Ziels (die guten Tumore) auszuschalten. Des Weiteren schaltet CRISPR das Zielantigen in den T-Zellen vor der CAR-Transduktion ab, weil CAR-T-Zellen häufig auch dieselben Antigene entwickeln, die sie bei Tumoren angreifen wollen, damit kommt es zum Brudermord und die CAR-T-Zellen töten sich gegenseitig⁸⁶

2.4.3.4 Entwicklung neuer Krebstherapien

Um neue Krebstherapien zu entwickeln, ist häufig eine Testung an Tieren notwendig. Da dieser Prozess zur Entwicklung der notwendigen Voraussetzungen (Entwicklung des Krebses) langwierig ist, ist eine Beschleunigung des Prozesses gewünscht. Deshalb werden die Tiere (meistens Mäuse) mit CRISPR genmanipuliert.⁸⁷ Damit verkürzt sich die Zeit der Tumorentstehung in der Maus.⁸⁸ Das Potenzial des CRISPR-Cas9-Systems für die somatische Genom-Editierung von Primärzellen ex vivo, das für die schnelle Generierung von Mausmodellen zuständig ist, ist außerdem hoch. Auch ist es mit CRISPR möglich, „personalisierte“ Mäuse herzustellen, an denen man die Wirksamkeit bestimmter Therapien für eine Person testen kann.⁸⁹ Dies stellt eine solide Grundlage für effiziente Innovation in der Krebsforschung, aufgrund ihrer Vielseitigkeit, dar.

3. Abwägung und Fazit

CRISPR ist, nach nur wenigen Jahren intensiver Forschung, bereits fähig, die Krebstherapie durch seine Genauigkeit zu revolutionieren. Trotzdem konnte in kurzer Zeit noch weitaus nicht genügend Forschung in diesem Gebiet getätigt werden, das System avanciert aber zu einem der wichtigsten Komponenten der Krebsforschung und -therapie.⁹⁰ Es gibt darüber hinaus auch zahlreiche Herausforderungen in der Krebstherapie. Durch CRISPR-Editierung können p53-vermittelte DNA-Schadensreaktionen erzeugt werden und es existieren darüber hinaus Berichte über die unbeabsichtigte Veränderung der menschlichen Keimbahn. Auch ist, wie bereits

⁸⁵ (Martinez-Lage, Puig-Serra, & Menendez, 2018)

⁸⁶ (Fix, Jazaeri, & Hwu, 2021)

⁸⁷ (Sanchez-Rivera & Jacks, 2015)

⁸⁸ (Elsner, 2021)

⁸⁹ (Platt, Chen, & Zhou, 2014)

⁹⁰ (Zhang, Qin, & An, 2021)

erwähnt, der Transport des CRISPR-Systems ein Problem, da manche Viren, die CRISPR transportieren können, auch andere Zelltypen infizieren. Trotzdem hat CRISPR/Cas einen gewaltigen Nutzen bei geringem Risiko. Durch CRISPR kann Krebs mit geringeren Dosen hochwirksamer genmodifizierter T-Zellen behandelt werden, was die Herstellung großer Zellzahlen für die klinische Infusion erleichtern würde. CRISPR ist eine solide Grundlage für effiziente Innovation in der Krebsforschung, aufgrund seiner Vielseitigkeit und Einfachheit. Es lässt sich also feststellen, dass CRISPR in der Diagnostik einen sehr hohen Nutzen, in den Therapien einen hohen und in der Forschung und Entwicklung ebenfalls einen sehr hohen Nutzen birgt und damit die Weiterentwicklung der Krebstherapie wesentlich avanciert.

4. Schluss

In den letzten Jahren hat die Präzisionsmedizin CRISPR bei der Behandlung verschiedener Krebsarten für große Furore gesorgt. Es lässt sich sagen, dass die schnell fortschreitenden Entwicklungen von CRISPR-Cas eine neue Generation der Gentherapie und Krebsdiagnostik einläuten. CRISPR erlaubt den Forschern, Krebspatienten personalisiert zu behandeln. Die Sicherheitsbedenken rücken immer mehr in den Hintergrund und CRISPR-basierte Medizin verbessert schon jetzt, nach wenigen Jahren Forschung, die Krebstherapie. Obwohl sich bislang ein Großteil der Forschung auf das CRISPR-System an sich konzentrierte, werden die Anwendungsbereiche von CRISPR in der Medizin in Zukunft wohl im Mittelpunkt der Forschung stehen, da die Präzision von CRISPR die Gentechnik von Grund auf verändert. Es lässt sich auf Basis der zusammenfassenden Auswertung der unterschiedlichen Anwendungen in der Krebstherapie sagen, dass CRISPR die Krebstherapie bereits voranbrachte, immer noch voranbringt, und in Zukunft noch weiter voranbringen wird.

5. Abkürzungsverzeichnis

ACT	adoptive cell therapy
BRAF	proto-oncogene B-Raf
CAR	chimärer Antigenrezeptor
Cas	CRISPR-Associated
CD7	Cluster of Differentiation 7
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR-RNA
CRS	cytokine release syndrome
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. Coli.	Escherichia coli
gRNA	guide- ribonucleic acid
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HDR	homology directed repair
Inkl.	inklusive
miR-3064	MicroRNA 3064
NHEJ	Non homologous end joining
Nk	Natürliche Killerzellen
NRF2	Nuclear E2-related Factor
onTE	on-Target-Effect
PAM	protospacer adjacent motif
PB-L1	Programmed death-ligand 1
P53	Tumorsuppressorgen mit einem Molekulargewicht von 53 kD
qgPCR	quantitative genotyping PCR
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
SHERLOCK	Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking
spCas9	Streptococcus pyogenes Cas9
Talen	Transcription activator-like effector nuclease
TCR	T-Zell-Rezeptor
TRAC	Alpha-T-Zell-Rezeptor
TRBC	Betha-T-Zell-Rezeptor
tracrRNA	Trans-activating crRNA
tgTCR	transgenic TCR
z.B	zum Beispiel

6. Literaturverzeichnis

- Batista, A., & Pacheco, L. (Oktober 2016). Detecting pathogenes with Zinc-Finger, Talen and CRISPR-based programmable nucleic acid binding proteins. *science*. Abgerufen am 16. Februar 2022 von <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701218303932>
- Bellizzi, A., Ahye, N., & Jalagadugula, G. (11. September 2019). A broad application of CRISPR Cas9 in diseases of central nervous systems. Abgerufen am 06. Juni 2022 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6898781/>
- Borchmann, P. (2020). Abgerufen am 17. November 2021 von https://lymphome.de/fileadmin/Media/service/mediathek/Methoden/WEB_CAR-T-ZELL_Methodenflyer_271020.pdf
- Carroll, D. (2017). Genome Editing: Past, Present and Future. Abgerufen am 06. Juni 2022 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733845/>
- Charite Berlin. (kein Datum). Abgerufen am 17. Februar 2022 von https://haema-cbf.charite.de/schwerpunkte/car_t_zell_und_weitere_zellulaere_therapien/
- Charpentier, E., Doudna, J., Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., & Hauer, M. (28. Juni 2012). *pubmed*. Abgerufen am 03. Juni 2022 von <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22745249/>
- Dederer, H. G., & Frenken, G. (Februar 2021). *econstor*. Abgerufen am 03. Januar 2022 von <https://www.econstor.eu/bitstream/10419/231481/1/1750535068.pdf>
- Deutscher Ethikrat. (2019). *ethikrat*. Abgerufen am 03. Juni 2022 von https://www.ethikrat.org/publikationen/publikationsdetail/?tx_wwt3shop_detail%5Bproduct%5D=119&tx_wwt3shop_detail%5Baction%5D=index&tx_wwt3shop_detail%5Bcontroller%5D=Products&cHash=25e88ad52f8b75d311510a9bf7a8dc86
- Elsner, M. (Februar 2021). *econstor*. Abgerufen am 05. Januar 2022 von <https://www.econstor.eu/bitstream/10419/231479/1/175053410X.pdf>
- Fix, S., Jazaeri, A., & Hwu, P. (2021). *cancerdiscovery*. Abgerufen am 01. Juni 2022 von <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/11/3/560>
- Grimm, H., & Dürnberger, C. (2021). Abgerufen am 06. Juni 2022 von https://www.parlament.gv.at/PAKT/VHG/XXVII/AB/AB_06227/imfname_981919.pdf
- He, S. (2020). the first human trial of CRISPR- based cell therapy clears safety concerns as new treatment for late-stage lung cancer. *nature*. Abgerufen am 07. Januar 2022 von <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00283-8>
- Kang, J. (15. Februar 2017). *Uni-Halle*. Abgerufen am 16. Februar 2022 von <https://opendata.uni-halle.de/bitstream/1981185920/12725/1/Bachelorarbeit%20Juanjuan%20Kang.pdf>
- Kellner, M., Koob, J., & Gootenberg, J. (23. September 2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *nature*. Abgerufen am 06. Juni 2022 von <https://www.nature.com/articles/s41596-019-0210-2>
- Krauter, J. (08. Oktober 2020). *TU-Braunschweig*. Abgerufen am 14. Februar 2022 von <https://publikationsserver.tu->

- braunschweig.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dbbs_derivate_00048412/Jahrbuch_2020_Kr
 auter_Operationen_am_offenen_Genom.pdf
- Liu, H., Wang, L., & Luo, Y. (01. Dezember 2018). *science*. Abgerufen am 17. März 2022 von
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405805X18300607>
- Männel, F. (2019). Gezielt aktiviertes Immunsystem gegen Krebs. *Jahresbericht 2019 des Uni-
 Klinikums Erlangen*. Abgerufen am 06. Juni 2022 von [https://www.uk-
 erlangen.de/universitaetsmedizin/schwerpunkt-onkologie/car-t-zellen/](https://www.uk-erlangen.de/universitaetsmedizin/schwerpunkt-onkologie/car-t-zellen/)
- Maresch, R. (2021). *TUM*. Abgerufen am 17. März 2022 von
https://mediatum.ub.tum.de/680890?query=roman+maresch&show_id=1545722&srcnodeid=680890
- Martinez-Lage, M., Puig-Serra, P., & Menendez, P. (6. Dezember 2018). CRISPR/Cas9 for Cancer
 Therapy: Hopes and Challenges. Abgerufen am 06. Juni 2022 von
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315587/>
- Max-Planck- Gesellschaft. (2021). *mpg*. Abgerufen am 12. November 2021 von :
<https://www.mpg.de/11032932/crispr-cas9-mechanismus>
- Minol, K. (kein Datum). *Pflanzenforschung*. Abgerufen am 18. Februar 2022 von Lexikon:
<https://www.pflanzenforschung.de/de/pflanzenwissen/lexikon-a-z/crispr-10139>
- Müller, A. M. (2020). *Onkologie*. Abgerufen am 12. November 2021 von
<https://www.rosenfluh.ch/media/onkologie/2020/01/CAR-T-Zell-Therapie.pdf>
- Ou, X., Ma, Q., & Yin, W. (20. Mai 2021). Abgerufen am 07. Januar 2022 von
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.674467/full>
- Özcan, A., Krajewski, R., Joannidi, E., & Lee, B. (2021). Programmable RNA targeting with the single
 protein CRISPR effector Cas 7-11. *nature*. Abgerufen am 12. November 2021 von
<https://www.nature.com/articles/s41586-021-03886-5>
- Pharma-Unternehmen. (2021). *vfa*. Abgerufen am 17. Februar 2022 von [https://www.vfa-bio.de/vb-
 de/aktuelle-themen/forschung/von-genomchirurgie-und-genome-editing.html](https://www.vfa-bio.de/vb-de/aktuelle-themen/forschung/von-genomchirurgie-und-genome-editing.html)
- Platt, R., Chen, S., & Zhou, Y. (25. September 2014). Abgerufen am 07. Januar 2022 von
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265475/>
- Sanchez-Rivera, F., & Jacks, T. (04. Juni 2015). Abgerufen am 07. Januar 2022 von
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530801/>
- Schreier, D. (kein Datum). *TU-Dresden*. Abgerufen am 12. November 2021 von [https://tu-
 dresden.de/med/mf/ccf](https://tu-dresden.de/med/mf/ccf)
- Stadtmauer, E., Fraietta, J., & June, C. (06. Februar 2020). CRISPR-engineered T-cells patients with
 refractory cancer. *science*. Abgerufen am 1. Januar 2022 von
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aba7365>
- studyflix. (2021). *studyflix*. Abgerufen am 3. November 2021 von [https://studyflix.de/biologie/crispr-
 2911](https://studyflix.de/biologie/crispr-2911)
- Süddeutsche-Zeitung. (2016). *sz*. Abgerufen am 17. Januar 2022 von
[https://www.sueddeutsche.de/wissen/gene-editing-grossbritannien-erlaubt-
 genmanipulation-an-embryos-1.2843782](https://www.sueddeutsche.de/wissen/gene-editing-grossbritannien-erlaubt-genmanipulation-an-embryos-1.2843782)

- Weisheit, I. (02. Februar 2021). *Uni-München*. Abgerufen am 03. Januar 2022 von https://edoc.ub.uni-muenchen.de/28466/1/Weisheit_Isabel.pdf
- Wirth, D. (2018). *TU-Braunschweig*. Abgerufen am 03. Juni 2022 von https://publikationsserver.tu-braunschweig.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dbbs_derivate_00048411/Jahrbuch_2020_Wirth_CRISPR_Cas_Geschichte.pdf
- Zenke, M., Fehse, B., & Marx-Stölting, L. (2018). Genomeditierung durch CRISPR. In M. Zenke, *Stammzellenforschung-aktuelle wissenschaftliche und gesellschaftliche Entwicklungen*. Nomos Verlagsgesellschaft mbH. Abgerufen am 03. Juni 2022 von <https://www.jstor.org/stable/pdf/j.ctv941q2n.9.pdf>
- Zhan, T., Rindtorff, N., & Betge, J. (07. Januar 2019). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *science*. Abgerufen am 07. Januar 2022 von <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X17302742>
- Zhang, H., Qin, C., & An, C. (2021). *molecular-cancer*. Abgerufen am 06. Juni 2022 von <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12943-021-01431-6.pdf>
- Zhang, X. (28. Juni 2021). *clinicaltrials*. Abgerufen am 17. Februar 2022 von <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04264078>