

## Genomeditierung

# Menschliche T-Zellen reagieren auf CRISPR-assoziierte Nukleasen

DIMITRIOS L. WAGNER<sup>1, 2</sup>, MICHAEL SCHMUECK-HENNERESSE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE IMMUNOLOGIE, BERLIN-BRANDENBURGER CENTRUM FÜR REGENERATIVE THERAPIEN (BCRT) UND BERLIN CENTER FOR ADVANCED THERAPIES (BECAT), CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

<sup>2</sup> BERLINER INSTITUT FÜR GESUNDHEITSFORSCHUNG, CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

**CRISPR-Cas genome editing enables precise modification of human DNA in living cells. The technology was adapted from a mechanism by which bacteria protect themselves from viruses. Previous exposure to these bacteria can sensitize human immune cells to Cas proteins. Preexisting antibodies and T cells directed toward Cas antigens warrant a careful evaluation during clinical application of CRISPR-Cas gene therapy *in vivo*. Here, we summarize recent evidence on Cas-directed T cell immunity in humans and discuss the implications for the clinical translation of the technology.**

DOI: 10.1007/s12268-019-1022-1  
© Springer-Verlag 2019

■ Von der Entdeckung einer „ungewöhnlichen Struktur im Bakteriengenom“ im Jahre 1980 bis zur endgültigen Klärung vergingen 27 Jahre, bis Rodolphe Barrangou und

seine Gruppe die eigentliche Funktion von *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) präzise darlegen konnten [1]. Die Mikrobiologen erkannten,

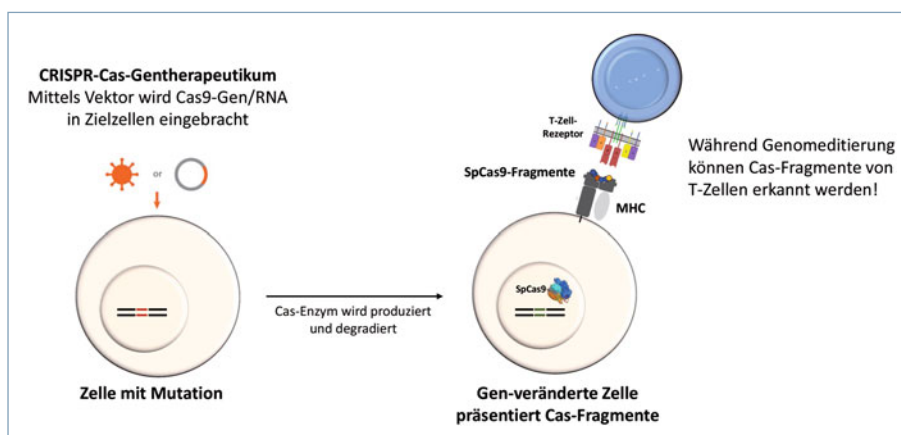
dass die Sequenzen zwischen den CRISPR-Loci für DNA aus Bakteriophagen (Viren, die Bakterien infizieren) codieren und entschlüsselten dadurch ihre Aufgabe: Nach der Infektion eines Bakteriums durch den Virus wird eine Kopie der Phagen-DNA in das Bakteriengenom als Platzhalter (*spacer*) zwischen CRISPR integriert. In der Nähe dieser DNA-Sequenzen im Bakteriengenom befindet sich die genetische Information einer Nuklease. Kommt es nun zu einem erneuten Eindringen des Virus in das Bakterium, erkennt der Komplex aus CRISPR-RNAs und Nuklease die „gespeicherte“ DNA-Sequenz und zerschneidet den Phagen. Somit dient das CRISPR-Cas-System einem Mechanismus, der Bakterien eine Resistenz gegen das Eindringen fremden Erbguts verschafft.

Die Hauptakteure dieser bakteriellen Virusabwehr sind CRISPR-assoziierte Nukleasen (Cas). In den letzten Jahren hat eine besondere Klasse von Cas-Enzymen große Aufmerksamkeit errungen. Emmanuelle Charpentier und ihre Gruppe belegten 2012, dass CRISPR-Cas zur gezielten Manipulation von DNA genutzt werden kann [2]. Der Komplex aus Cas-Protein und einer kurzen Leit-RNA (*guide RNA*) erlaubt es, DNA präzise zu schneiden und damit Gene in Zellen einzufügen oder zu eliminieren. In präklinischen Studien ermöglicht diese Methode die effiziente Korrektur von krankheitsverursachenden Mutationen.

Beflügelt vom Hype der CRISPR-Cas-Methode rückte das Feld der Gentherapie von einer vernachlässigten Spezialdisziplin in den Fokus der Öffentlichkeit. Erste klinische Studien am Menschen stehen in den Startlöchern. Hier werden zunächst Therapien für Krebs und monogenetische Erkrankungen des blutbildenden Systems erprobt (z. B.  $\beta$ -Thalassämie) [3, 4].

### Bakterieller Ursprung der Genschere – ein Problem?

Die populärste Cas-Variante stammt aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Dieses Bakterium ist einer der häufigsten



▲ **Abb. 1:** Der Weg des Cas-Proteins im menschlichen Körper. Für erfolgreiche Genveränderung *in vivo* muss CRISPR-Cas in die Zielzellen eingebracht werden. Hierzu können z. B. virale Vektoren oder Nanopartikel mit DNA/RNA eingesetzt werden. Nach erfolgreicher Produktion können CRISPR-Cas-Komplexe die genetische Veränderung auslösen. Im Verlauf wird das Cas-Protein abgebaut und im Proteasom gespalten. Fragmente der Cas-Nuklease werden an der Zelloberfläche auf MHC (*major histocompatibility complex*)-Molekülen präsentiert. Der Komplex aus Cas-Antigen und MHC-Molekül kann von speziellen T-Zellen erkannt werden.

Gründe für bakterielle Infektionen im Menschen, und viele sind vermutlich auch damit kolonisiert. Im Laufe unseres Lebens entwickeln wir ein Immungedächtnis gegen viele Bestandteile dieser Bakterien. Dazu gehören beispielsweise die Bakterienhülle, aber auch intrazelluläre Proteine der Bakterien, wie SpCas9. Ausgehend von der hohen Prävalenz der *S. pyogenes*-Infektionen stellten wir die Hypothese auf, dass unser Immunsystem bereits gelernt hat, SpCas9 zu erkennen.

Im Januar 2018 berichtete eine erste Arbeitsgruppe, dass sich im peripheren Blut von erwachsenen Menschen SpCas9-spezifische Antikörper nachweisen lassen [5]. Im Rahmen der meisten gentherapeutischen Ansätze wird die Cas9-Nuklease jedoch nur temporär innerhalb der Zielzellen exprimiert oder direkt in das Zellinnere eingeführt. Deshalb sind Cas9-spezifische Antikörper zu vernachlässigen, da diese nur frei liegende Partikel erkennen und eliminieren können.

Ein größeres Problem stellen SpCas9-spezifische T-Zellen dar, die mittels ihrer Rezeptoren auch „in das Innere von Zellen“ blicken können. Wie jedes Protein wird Cas in den Zellen biochemisch degradiert. Dabei wird das komplexe Protein in kurze Fragmente gespalten und auf den Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) geladen und an die Zelloberfläche transportiert. Die mit Cas9-Peptiden beladenen MHC-Komplexe können dann im Schlüssel-Schloss-Prinzip mit einem Cas9-spezifischen T-Zell-Rezeptor der T-Zellen interagieren (**Abb. 1**).

### Menschliche Gedächtnis-T-Zellen reagieren auf Cas-Enzyme

Im Blut der meisten erwachsenen Menschen lassen sich SpCas9-reaktive T-Zellen nachweisen [6]. Die Frequenzen von SpCas9-reaktiven Effektor-T-Zellen, die gleich mehrere entzündungsfördernde Cytokine produzieren, sind sehr niedrig. Diese multipotenten Effektor-T-Zellen sind jedoch maßgeblich an Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen in der Gentherapie mit viralen Vektoren (z. B. Adeno-assoziierte Viren, AAV) beteiligt. Trotz der geringen Konzentrationen zeigen *in vitro*-Experimente, dass artifizielle und aktivierte SpCas9-reaktive Effektor-T-Zellen Gen-veränderte Zellen töten, wenn das Cas9-Protein überexprimiert wird [6].

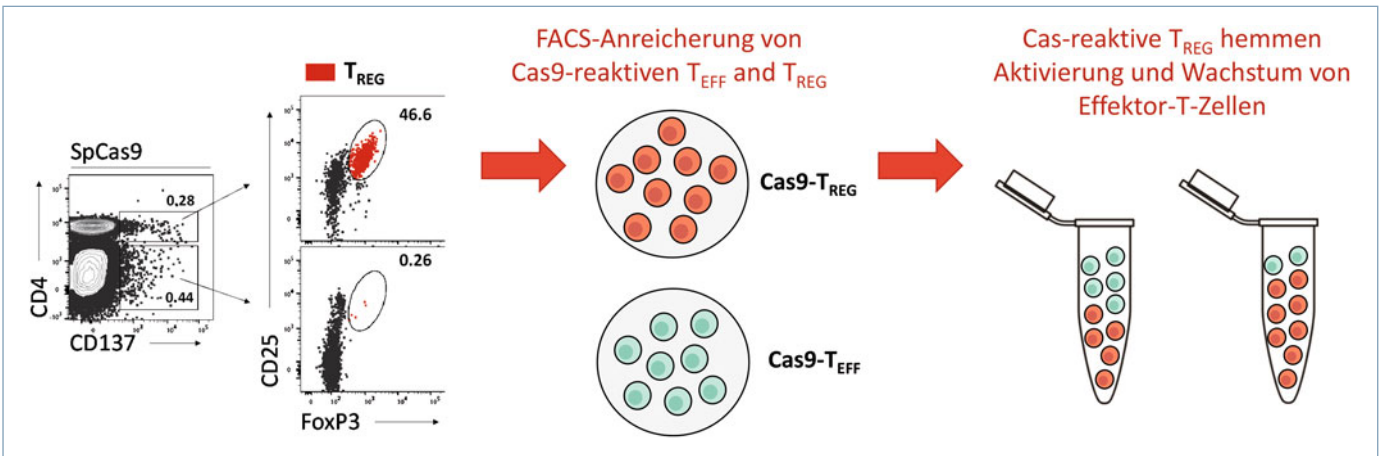
Auch Cas-Enzyme aus anderen Bakterienspezies scheinen dieses Problem zu haben: Sowohl das Cas9-Homolog aus *Staphylococcus aureus* (SaCas9) als auch das Cas9-ähnliche Cpf1 aus *Acidaminococcus* sp. (ein Darmbakterium) führen zu einer vergleichbaren Aktivierung von T-Zellen [5, 6]. Diese Ergebnisse müssen jedoch noch in größeren Stichproben bestätigt werden. Beide Cas-Varianten stammen aus Bakterien, mit denen wir häufig in Kontakt stehen. Zusätzlich ähneln sich die Cas-Proteine strukturell. Eventuell könnte dies dazu führen, dass Proteinfragmente, die in mehreren Cas9-Varianten vorkommen, durch die gleichen Immunzellen erkannt werden.

Wird das elegante Gentherapiewerkzeug also von der Körperabwehr der Patienten beseitigt, bevor es Gutes bewirken kann? CRISPR-Cas fügt genetische Veränderungen schnell und effizient ein. Trotzdem ist denkbar, dass effizient reparierte Zellen von Effektor-T-Zellen erkannt und abgebaut werden, wenn Cas-Fragmente zu lange in den Zellen verbleiben. Dies könnte die Effektivität der Therapie verringern und potenziell gefährliche Immunreaktionen hervorrufen.

### Cas-reaktive regulatorische T-Zellen verringern Entzündung *in vitro*

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass eine kontinuierliche Kolonisierung und wiederkehrende Exposition von Umwelkeimen auf den Schleimhäuten regulatorische T-Zellen ( $T_{REG}$ ) induzieren [7].  $T_{REG}$ -Zellen limitieren die Autoimmunität und Immunpathologie, indem sie suppressorisch auf Effektor-T-Zellen wirken und somit für eine Gegenregulation nach erfolgter Immunaktivierung sorgen. Somit werden täglich tausendfach im Organismus unerwünschte oder überschießende Immunreaktionen auf körpereigene Strukturen unterdrückt [8]. Zudem tragen  $T_{REG}$ -Zellen entscheidend zur Induktion von Toleranz der Schleimhäute oder im Darm gegenüber Mikroorganismen zu deren Koexistenz bei [9].

Wir stellten deshalb die Frage, ob der wiederholte Kontakt mit Streptokokken auch zur Ausbildung von Cas-reaktiven  $T_{REG}$ -Zellen führt. Um den Beitrag der  $T_{REG}$ -Zellen zur SpCas9-induzierten T-Zell-Antwort zu bestimmen, evaluierten wir mehrere  $T_{REG}$ -Zell-assoziierte Marker innerhalb der aktivierten T-Zellen und konnten nachweisen, dass ein Anteil der SpCas9-reaktiven T-Zellen zu der regulatorischen Population gehört (**Abb. 2**). Wir konnten zudem *in vitro* zei-



**▲ Abb. 2:** Cas-reaktive regulatorische T-Zellen hemmen Entzündung in der Petrischale. Links sind repräsentative FACS-Plots von lebenden T-Zellen nach Stimulation mit SpCas9-Protein gezeigt. Die Zahlen geben den Prozentsatz der Zellen an, die sich im jeweiligen Gate befinden. Innerhalb der SpCas9-aktivierte (CD137-positiven) T-Zellen finden sich regulatorische T-Zellen (Foxp3-positiv, CD25<sup>high</sup>, rot markiert). In einem separaten Schritt lassen sich Cas9-reaktive Regulatoren (T<sub>REG</sub>) und Effektoren (T<sub>EFF</sub>) anhand von mehreren Oberflächenmerkmalen getrennt isolieren. Anschließend können die Populationen *ex vivo* expandiert und in definierten Verhältnissen funktionell untersucht werden. *In vitro* waren angereicherte T<sub>REG</sub>-Zellen in der Lage, die Proliferation und Sekretion entzündungsfördernder Substanzen durch SpCas9-spezifische Effektor-T-Zellen zu verringern (für Details siehe [6]).

gen, dass Cas9-reaktive T<sub>REG</sub>-Zellen die Proliferation und Funktion der Effektor-T-Zellen hemmen. Diese SpCas9-reaktiven T<sub>REG</sub>-Zellen wirken entzündungshemmend und tragen nicht zur Produktion von Entzündungsmediatoren bei [6].

**Bedeutung von Cas9-reaktiven T-Zellen für CRISPR-Cas9-Therapien**

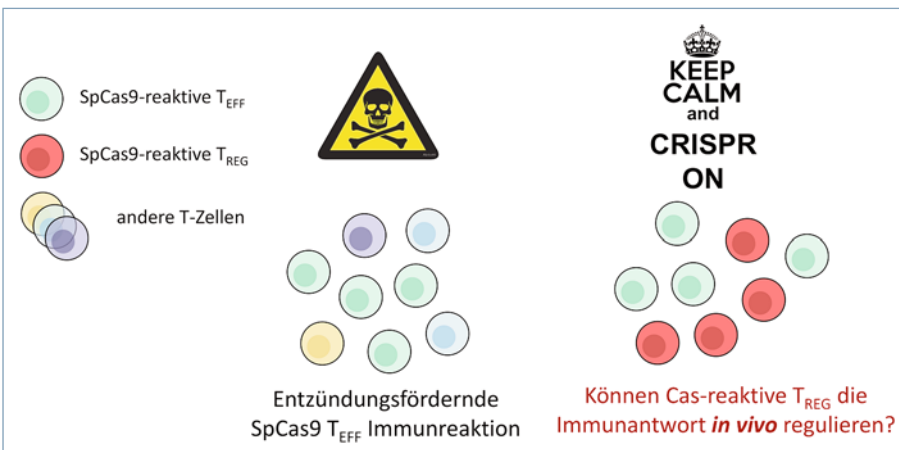
Anders als herkömmliche Gentherapien benötigt der therapeutische Effekt von CRISPR-Cas keine konstante Expression der Bestandteile in den Zielzellen. Für die Genomeditierung (*genome editing*) ist eine kurze Expres-

sion sogar von Vorteil, weil die CRISPR-Cas9-Komplexe in ausreichend hoher Konzentration sehr schnell die gewünschten Änderungen einfügen. Zusätzlich verringert eine kurze Verweildauer des Proteins das Risiko für unerwünschte Genveränderungen (*off-target events*) [10].

Die aktuellen klinischen Studien, die CRISPR-Cas9 zur Genmodifikation nutzen, arbeiten hauptsächlich mit Blutzellen, da diese in den meisten Fällen einfach aus dem Körper entnommen, im Labor modifiziert und anschließend zurückgegeben werden können. Hier wird meist Cas9 als Protein oder RNA

in die Zellen hineinkatapultiert, welches dann innerhalb weniger Tage komplett verschwindet. Für die klinische Anwendung von solchen Zellprodukten entwickelten wir einen Test, der verbleibende Cas9-Peptide auf den Zellen sensitiv nachweist.

Andere Zelltypen lassen sich nicht gut im Labor kultivieren oder sind nach Rückgabe in den Patienten nicht mehr in der Lage, funktionelles Gewebe zu bilden. In solchen Fällen sind *in vivo*-Gentherapien von Vorteil: Hierbei zielt man darauf ab, ein bestehendes Gewebe mit genetischem Defekt direkt im Körper zu korrigieren. Dies untersucht man aktuell z. B. bei monogenetischen Erkrankungen, die Muskeln oder Augen befallen, oder bei metabolischen Erkrankungen, bei denen Leberzellen geschädigt sind. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass *in vivo*-Therapien nicht für jeden einzelnen Patienten persönlich hergestellt werden müssen und potenziell günstiger produziert werden können. Jedoch könnte eine längere *in vivo*-Cas9-Expression das Risiko einer gefährlichen Entzündungsreaktion erhöhen [11]. Aktuell werden von verschiedenen Forschungsgruppen neue Strategien zur transienten *in vivo*-Cas9-Expression erprobt (z. B. RNA-Transfer durch Liposomtechnologie oder Anwendung von sich selbst inaktivierenden Vektoren).



**▲ Abb. 3:** Modulation der gegen Cas gerichteten Immunreaktion während einer Gentherapie im Menschen. Viele SpCas9-reaktive Effektor-T-Zellen (T<sub>EFF</sub>, grün) im Gewebe könnten die Effektivität und Sicherheit von CRISPR-Cas-basierter Gentherapie verringern. Eine Verschiebung des endogenen Verhältnisses von Cas-reaktiven T-Zellen in Richtung der regulatorischen Population (T<sub>REG</sub>, rot) könnte gefährliche Immunreaktionen antigenspezifisch verhindern und erlauben, dass auf eine globale Immunsuppression durch Medikamente verzichtet werden kann. Hierzu muss geklärt werden, ob Cas-reaktive Regulatoren im Körper eine Toleranz gegen CRISPR-Cas-verändertes Gewebe induzieren können.

**Resümee und Ausblick**

Die neuen Forschungsergebnisse bedeuten eine wichtige Warnung für die klinische Umsetzung von CRISPR-Cas9 bei direkter Applikation in den Menschen. Wie Cas-reak-

tive Effektoren und ihr regulatorischer Gegenspieler im menschlichen Körper während der Gentherapie interagieren, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht vorhergesagt werden.

Wir vermuten, dass Menschen mit wenig Effektoren und mehr Cas9-reaktiven regulatorischen T-Zellen ein geringeres Risiko für gefährliche Immunreaktionen haben könnten. Wir planen deshalb, SpCas9-reaktive T<sub>REG</sub>-Zellen als Immuntherapeutikum in Kombination mit gentherapeutischen Vektoren einzusetzen. Die Hoffnung bei diesem Ansatz ist, dass eine eventuelle Immunreaktion zumindest gedämpft, wenn nicht unterbunden wird (**Abb. 3**).

Außerdem arbeiten aktuell mehrere Gruppen an speziell modifizierten Cas-Varianten, die von menschlichen Immunzellen nicht mehr erkannt werden. Eine andere Lösung wäre die Identifikation neuer Cas-Enzyme aus Bakterienspezies, die Menschen normalerweise nicht infizieren.

Zusammenfassend sollte das Problem der Immunreaktion auf Cas9 ernst genommen werden. Es gibt jedoch Anlass zur Annahme, dass diese Schwierigkeiten zu meistern sind: Solange wir mit Vorsicht voranschreiten, hat die Genomeditierung eine große Zukunft.

## Danksagung

Wir danken unserer Arbeitsgruppe und insbesondere den Studentinnen Leila Amini, Jacqueline Wending und Lisa-Marie Burkhardt für ihren Beitrag zum Projekt. Außerdem möchten wir Petra Reinke und Hans-Dieter Volk für ihre Unterstützung und Leitung in diesem Projekt danken. Die Arbeiten wurden finanziert von dem Bundesministerium für Bildung und For-

schung (B-CRT grant), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG SFB-TR36), dem Berliner Institut für Gesundheitsforschung (BIH-MD Promotionsstipendium an DLW) und dem Einstein Center for Regenerative Therapies (Kickbox Grants 2017, 2018). ■

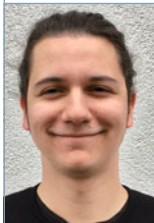
## Literatur

- [1] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821
- [3] Clinicalregister.eu, EudraCT Number: 2017-003351-38
- [4] ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02793856
- [5] Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP et al. (2018) Identification of pre-existing adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *bioRxiv*, doi: 10.1101/243345
- [6] Wagner DL, Amini L, Wending DJ et al. (2019) High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat Med* 25:242–248
- [7] Sagaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T et al. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775–787
- [8] Bacher P, Heinrich F, Stervbo U et al. (2016) Regulatory T cell specificity directs tolerance versus allergy against aeroantigens in humans. *Cell* 167:1067–1078
- [9] Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM et al. (2011) Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478:250–254
- [10] Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR et al. (2018) A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med* 24:1216–1224
- [11] Chew WL (2018) Immunity to CRISPR Cas9 and Cas12a therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 10, doi: 10.1002/wsbm.1408

## Korrespondenzadresse:

Dr. Michael Schmueck-Henneresse  
Development of T Cell Therapy Products  
Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien (BCRT)  
Berlin Center for Advanced Therapies (BeCAT)  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Föhrer Straße 15  
D-13353 Berlin  
Tel.: 030-450-539495  
michael.schmueck-henneresse@charite.de

## AUTOREN



### Dimitrios Laurin Wagner

Seit 2012 Medizinstudium an der Charité Berlin. 2015–2016 Pre-doctoral Fellow am Center for Cell and Gene Therapy des Baylor College of Medicine in Houston, USA. Seit 2016 Doktorarbeit im Rahmen des MD/PhD Advanced Tracks der Charité am Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien, Charité – Universitätsmedizin Berlin.



### Michael Schmueck-Henneresse

2012 Dr. rer. medic. zu Zelltherapien am Institut für medizinische Immunologie und der Abteilung für Nephrologie und Intensivmedizin der Charité Berlin. 2012–2017 Postdoc am Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien (B-CRT), Berlin. 2014 Postdoc am Center for Cell and Gene Therapy des Baylor College of Medicine in Houston, USA. Seit 2018 Nachwuchsgruppenleiter am B-CRT der Charité – Universitätsmedizin Berlin.