

Genommodifizierung

Editierung induzierter pluripotenter Stammzellen mittels CRISPR/Cas9

SUSAN SGODDA, TOBIAS CANTZ

TRANSLATIONALE HEPATOLOGIE UND STAMMZELLBIOLOGIE, EXZELLENZCLUSTER REBIRTH, KLINIK FÜR GASTROENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE UND ENDOKRINOLOGIE, MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER

The rapid development of the new genome editing technique CRISPR/Cas9 enables easy and efficient modifications to the human genome. In combination with autologous cell transplants derived from induced pluripotent stem cells, a versatile platform for individualised cell therapies is entering pre-clinical evaluation.

DOI: 10.1007/s12268-018-0984-8
© Springer-Verlag 2018

■ CRISPR/Cas9 hat aufgrund seiner einfachen Anwendung, Vielseitigkeit und Effizienz viele Aspekte der Gentechnik revolutioniert. Dabei handelt es sich nicht um die erste Methode zur DNA-Modifizierung. In den Anfängen der Gentherapie wurde vorwiegend mit viralen Vektoren als Transportvehikel gearbeitet, die zusätzliche Gene nach dem Prinzip der additiven Gentherapie einschleusten. Ab den 2000er-Jahren wurden dann molekularbiologische Techniken entwickelt, mit denen eine Fehlfunktion direkt am Genlocus repariert werden konnte. Während die anfänglich genutzten Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und TAL-Effektor-Nukleasen (TALEN) in ihrer Konstruktion und Herstellung noch sehr aufwendig waren [1], stellten Doudna und Charpentier 2012 mit der Entdeckung der CRISPR-associated 9 (Cas9)-Endonuklease ein System vor, welches für die Genomeditierung einen technischen Quantensprung bedeutete [2]. CRISPR/Cas9 wurde als Teil eines bakteriellen Abwehr-

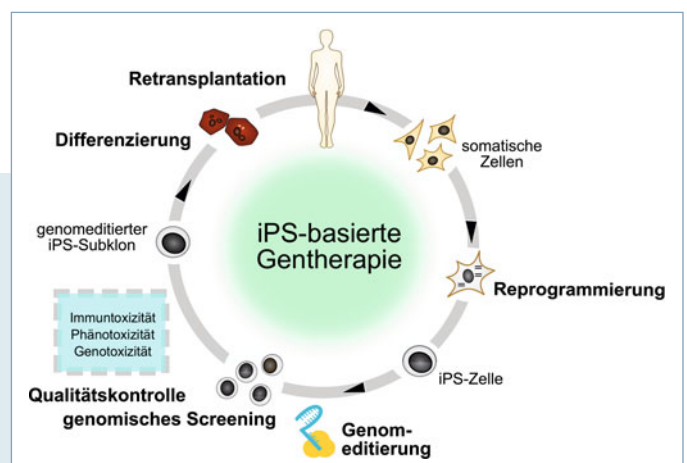
systems gegen Viren entdeckt, kann aber im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren allein durch das Anpassen einer kleinen RNA-Sonde, der *guide*-RNA, fast jeglichen Genort ansteuern und verändern. Nicht zuletzt, weil das Design einer neuen *guide*-RNA, die komplementär zur Zielsequenz ist, effizient, vergleichsweise kostengünstig und schnell durchgeführt werden kann [3], hat das CRISPR/Cas9-System zu einem Durchbruch bei den Anwendungsmöglichkeiten der Genomeditierung für viele Forschungsfelder geführt.

Das CRISPR/Cas9-Prinzip

CRISPR steht für *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*. Das CRISPR/Cas9-Prinzip beruht auf der CRISPR-assoziierten Endonuklease Cas9 und einer *guide*-RNA, welche die Cas9 an die zu bearbeitende

DNA-Zielsequenz führt [2]. Zur Bindung und Einleitung eines Doppelstrangbruchs benötigt die Cas-Nuklease eine spezielle Detektionssequenz (PAM, *protospacer adjacent motif*) auf der zu schneidenden DNA [4]. Nachdem der Cas-*guide*-RNA-Komplex einen DNA-Doppelstrangbruch vermittelt hat, kann dieser durch zwei zelluläre Mechanismen repariert werden. Der von der Zelle gängigerweise eingesetzte Reparaturmechanismus ist die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ, *non-homologous end joining*) [5, 6]. Dies ist ein effektiver, aber fehleranfälliger Mechanismus und führt an der Zielsequenz häufig zu Sequenzvariationen wie Insertionen oder Deletionen. Der zweite Reparaturmechanismus ist die Homologie-gerichtete Reparatur (HDR, *homology-directed repair*) [5, 6]. Bei diesem Mechanismus wird der Doppelstrangbruch unter Anwendung einer Reparaturschablone geschlossen. Ein Nachteil ist jedoch, dass dieser Reparaturmechanismus weniger effizient und nur begrenzt steuerbar ist [7]. Inzwischen weiterentwickelte Formen des CRISPR/Cas-Systems modifizieren Einzelbasen ohne Doppelstrangbruch (*base editing*) oder greifen statt in die DNA-Sequenz in die Regulation der Genexpression ein (*epigenome editing*) [8, 9]. In der Grundlagenforschung ermöglicht dies die Untersuchung neuer Genfunktionen, die Entwicklung neuer Zell- oder Tiermodelle

► Die iPS-basierte Gentherapie. Humane somatische Zellen werden mittels der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 (und c-Myc) in induzierte pluripotente Stammzellen überführt. Diese können als subklonale Zelllinien relativ einfach kultiviert werden und eignen sich somit sehr gut für genetische Modifikationen. Zur Qualitätskontrolle müssen solche Klone aber hinsichtlich genetischer, phänotypischer und immunologischer Aspekte untersucht werden. Anschließend können geeignete Subklone ausgewählt und in gewünschte Zelltransplantate differenziert werden, welche dann den Patienten transplantiert werden könnten, um die gestörte Zellpopulation im Organismus zu ersetzen.



sowie die Erforschung entwicklungsbiologischer Fragen.

Anwendungshorizonte iPS-basierter Zellsysteme in der klinischen Therapie

Aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) abgeleitete Zell- und Gewebetransplantate werden derzeit entwickelt (Abb. 1) und in frühen Phasen klinischer Studien auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit getestet. Besondere Aufmerksamkeit fällt dabei auf die erste klinische Studie, bei der iPS-Zellen zum Ersatz von Pigmentepithelzellen der Retina bei einer Makuladegeneration zum Einsatz kamen. Hierbei wurden zunächst autologe (patienteneigene) iPS-Zellen generiert, zum Zelltransplantat weiter differenziert und retransplantiert. Dies ist bei der ersten Patientin gut gelungen [10], bei der zweiten Anwendung zeigte sich jedoch bei den Sicherheitsanalysen vor der Transplantation, dass es zu chromosomalen Auffälligkeiten in den iPS-Derivaten gekommen war. Somit wurde das Konzept der autologen Zelltransplantation in dieser Studie hinterfragt und daran gearbeitet, allogene Zelltherapien mit immunkompatiblen Zellen zu etablieren. Diese Zellen werden über eine iPS-Biobank von Gewebemerkmale-typisierten Spendern zur Verfügung gestellt. Dieses konkrete Beispiel zeigt, dass eine Generierung genetisch intakter iPS-Transplantate prinzipiell möglich ist, dass jedoch relativ rigide Qualitätskontrollen und Sicherheitsanalysen nötig sind, um vermeidbare Risiken und Nebenwirkungen einer solchen Zelltherapie einschätzen zu können. Diese Problematik wird umso schwerwiegender, je aufwendiger die vom Patienten abstammenden iPS-Zellen ggf. genetisch korrigiert werden müssen, um einen der Erkrankung zugrunde liegenden genetischen Defekt zu beheben.

Translationale Aspekte zu genommodifizierten iPS-basierten Zelltransplantaten

Die Adaption der CRISPR/Cas-Technologie von der bakteriellen auf eukaryotische Zellen erfolgte vergleichsweise rasch und wird bereits in ersten klinischen Studien getestet. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Therapieversuche von Tumorerkrankungen. Beispielsweise werden T-Zellen (z. B. als PD-1-Knock-out-T-Zellen) *in vitro* so modifiziert, dass diese nach Transplantation eine personalisierte T-Zell-vermittelte Tumormimmuntherapie ermöglichen [11]. Bisher lässt sich allerdings das Spektrum an möglichen Nebenwirkungen der Genmodifikation noch nicht abschließend und vollständig einschätzen.

Gegenwärtig geht man vor allem von zwei möglichen Risiken aus:

1. die nicht exakte Bindung des Cas9-Enzyms am gewünschten Genlocus und die Veränderung anderer Zielsequenzen (*off-Target-Effekte*), die mittels *in silico*-Algorithmen aber immer besser ermittelbar sind;
2. eine ungewollte und unspezifische genetische Integration der DNA-Reparatur-schablonen während des Vorgangs der HDR.

In Bezug auf eine Anwendung der CRISPR/Cas9-vermittelten Geneditierung in iPS-Zellen ist die Technologie zur Analyse von iPS-Subklonen erfreulicherweise mittlerweile so weit fortgeschritten, dass sich relativ einfach korrigierte iPS-Zellen identifizieren lassen. Die in Zukunft als Routineverfahren zu erwartende Vollgenomanalyse kann dann die genomische Integrität der modifizierten iPS-Zellen (Genotoxizität) und die Qualität der Genommodifizierung (Phänotoxizität) hinreichend sicher untersuchen. Für eine eventuelle Immuntoxizität, also eine Immunantwort gegen die iPS-Zellderivate oder speziell gegen das durch die CRISPR/Cas9-Korrektur veränderte Protein, müssen Untersuchungen in geeigneten präklinischen Modellen oder frühen Studienphasen erfolgen.

Wenngleich dieses Szenario der individuellen autologen iPS-basierten Gentherapie gegenwärtig noch als extrem aufwendig und nur schwer in der medizinischen Regelversorgung darstellbar erscheint, so ist doch auch eine enorme Entwicklung im Bereich der Automatisierung und Miniaturisierung von Zellkultur- und Genommodifizierungstechniken zu verzeichnen. Es scheint daher durchaus plausibel, dass diese technischen Herausforderungen relativ schnell für iPS-basierte Zelltransplantate lösbar sind. Denn aus den

bisherigen Erkenntnissen zur Handhabung der iPS-Zellen und ihrer genomischen Veränderung lässt sich ableiten, dass sich diese Arbeitsschritte prinzipiell in Robotiksystemen automatisieren lassen, womit eine zukünftige kommerzielle Produktion und Vermarktung von individualisierten, genetisch editierten iPS-Zelltransplantaten realisierbar werden würde. ■

Literatur

- [1] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1156–1160
- [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] Cong L, Ran FA, Cox D et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819–823
- [4] Sander JD, Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32:347–355
- [5] Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47:497–510
- [6] Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD (2016) Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol* 26:52–64
- [7] Shibata A (2017) Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutat Res* 803–805:51–55
- [8] Komor AC, Kim YB, Packer MS et al. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533:420–424
- [9] Thakore PI, Black JB, Hilton IB et al. (2016) Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods* 13:127–137
- [10] Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y et al. (2017) Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *New Engl J Med* 376:1038–1046
- [11] Delhove JM, Qasim W (2017) Genome-edited T cell therapies. *Curr Stem Cell Rep* 3:124–136

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. Tobias Cantz
 Translationale Hepatologie und Stammzellbiologie
 Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
 Medizinische Hochschule Hannover
 Carl-Neuberg-Straße 1
 D-30625 Hannover
 Tel.: 0511-532-5251
 Fax: 0511-532-5760
 cantz.tobias@mh-hannover.de
 www.rebirth-hannover.de/cantz

AUTOREN



Susan Sgodda

Jahrgang 1977. Biologiestudium an der Universität Halle-Wittenberg mit dem Schwerpunkt Entwicklungsbiologie; dort 2004–2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologische Chemie und 2005–2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie. Seit 2011 wissenschaftliche Mitarbeiterin in verschiedenen interdisziplinären BMBF-Projekten an der Medizinischen Hochschule Hannover.



Tobias Cantz

Jahrgang 1972. Medizinstudium an der Universität Heidelberg. 2000 Promotion in der Abteilung Tumorbiochemie bei Prof. Dr. D. Keppler am DKFZ Heidelberg. 2000–2004 Assistenzarzt an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie bei Prof. Dr. M. Manns, Medizinische Hochschule Hannover. 2004–2008 Postdoc am Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin Münster bei Prof. Dr. H. Schöler. Seit 2008 Gruppenleiter im Exzellenzcluster REBIRTH und seit 2014 Professor für Translationale Hepatologie und Stammzellbiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover.