

03. November 2020

CRISPR/Cas9 – Genom Editing in der Onkologie und Hämatologie November 2020

Die Bedeutung des Genom Editings für Klinik und Wissenschaft zeigt sich in der Verleihung des Nobelpreises für Chemie 2020 für die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems. Seit einer bahnbrechenden Publikation der Forscherinnen Emanuelle Charpentier, derzeit Direktorin am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin, und Jennifer Doudna von der University of California in Berkeley im Jahr 2012 (1) wurde umfassend gezeigt, wie die Methode zum spezifischen Entfernen, Einfügen und Austauschen von Gensequenzen genutzt werden kann. Neben neuen Studienmodellen werden weltweit Therapieansätze mithilfe von CRISPR/Cas9 entwickelt, um neue therapeutische Möglichkeiten durch eine zielgenaue Korrektur mutierter und krankheitsauslösender Gene zu finden.

Das System fußt in einem 2007 entdeckten Abwehrsystem der Bakterienart *Streptococcus pyogenes*, die sich hiermit gegen Viren, sog. Bakteriophagen, schützen. Bei einer ersten Infektion durch die Viren integrieren die Bakterien virale Gene in ihr Genom und nutzen diese später als Erkennungssequenz bei einer erneuten Infektion. Auf diese Weise können sie die Nukleinsäure des Virus gezielt eliminieren, ohne Gefahr zu laufen, das eigene Genom zu schädigen (2).

Genom Editing

Schon länger wird daran gearbeitet, wie sich künstlich ins Genom verschiedener Organismen eingreifen lässt. Anfangs wurden Mutanten durch klassische Mutagenese mittels Chemikalien oder UV-Licht induziert. Diese enthalten relativ wahllos Mutationen im Genom und müssen durch Rückkreuzung aufwändig auf die gewünschten Veränderungen selektioniert werden. Im letzten Jahrzehnt wurden dann gezielt Nukleinsäure-schneidende Enzyme wie Zinkfinger-nucleasen und die künstlichen Restriktionsenzyme TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) entwickelt. Diese Editing-Systeme bestehen aus einem spezifisch an DNA-bindenden Erkennungsprotein und einer DNA-spaltenden Endonuclease. Wird beides in eine Zelle eingebracht, bindet das Erkennungsprotein an die zu verändernde DNA und die Endonuclease schneidet und modifiziert die Sequenz. Die bisherigen Systeme sind aber nicht zuletzt wegen der Herstellung des Erkennungsproteins relativ kosten- und zeitintensiv sowie im Editing fehleranfällig (3).

Auch das CRISPR/Cas9-System (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (CRISPR-associated)-System 9), besteht aus 2 Basiselementen: zum einen die Cas9-Endonuclease zum Schneiden der Zielzell-DNA, zum anderen ein kurzes RNA-Molekül (sgRNA, single guide RNA), das als Leit- und Erkennungssequenz die Endonuclease an die relevante Stelle im Genom leitet und die auszutauschende Sequenz mitführt. In die Zelle eingebracht, wandert die sgRNA die DNA entlang und sucht den passenden Abschnitt im Genom. Durch die **Bindung der sgRNA an Cas9** wird auch die eigentliche Schere an die passende Stelle geführt und schneidet die DNA zielgenau. Nun wird die neue Matrize eingebaut und der Schnitt durch das zelleigene Reparatursysteme wieder versiegelt. Die abgeänderte Sequenz wird bei der nachfolgenden Zellteilung an die nächste Generation weitergegeben und ist damit fixiert. Für das Einbringen des CRISPR/Cas9-Systems in Zellen werden verschiedene Transfersysteme untersucht, die von viralen Vektorsystemen bis Liposomen (Nanopartikel) reichen. Im Vergleich zu anderen Editing-Systemen wie Zinkfinger-nucleasen und TALEN bietet die neue Genschere eine verbesserte Genauigkeit, was für das zielgerichtete Editing entscheidend ist. Inzwischen wurden etliche Varianten des CRISPR/Cas9-Systems entwickelt und unzählige Einsatzmöglichkeiten nicht nur im DNA Editing, sondern auch im RNA- und Epigenom Editing beschrieben. So lassen sich gezielt Mutationen korrigieren, veränderte Zellproteine generieren, die Genexpression regulieren und ganze Gene durch Gene Silencing abschalten oder induzieren. (3,4).

Trotz aller Begeisterung mehren sich die Hinweise auf bisher **unerwartete Effekte** des CRISPR/Cas9-Systems auf das Genom. So wurde beispielsweise von einer unbeabsichtigten Aktivierung von p53 (5) und dem Auftreten unerwarteter Chromosomenverkürzungen beim Einsatz von CRISPR/Cas9 berichtet (6). Der Einfluss dieser Nebeneffekte auch hinsichtlich der Sicherheit der Methode darf trotz aller Euphorie nicht unbeachtet bleiben. Die Mehrzahl der Anwendungen von CRISPR/Cas9 im humanen Bereich sind derzeit noch experimentell und werden, wie auch die meisten klinischen Studien von China, USA und Kanada vorangetrieben. Besonders viele Anwendungen liegen im Bereich der Immunonkologie und Hämatologie (7).

CRISPR/Cas9-Studien in der Immunonkologie

Seitdem eine ganze Reihe von experimentellen Studien Einsatzmöglichkeiten des CRISPR/Cas9-Systems im T-Zell-Engineering zeigen konnten, werden zunehmend auch klinische Studien mit Indikation in der Immunonkologie initiiert (8, 9).

So wurden im Februar 2020 in einer Phase-I-Studie erste Ergebnisse zu einem Ansatz mit CRISPR/Cas9-modifizierten autologen T-Zellen bei refraktärem multiplen Myelom und metastasiertem Sarkom berichtet. Für den Therapieansatz wurden ex-vivo autologe T-Zellen durch Ausschalten der 3 Gene *trac*, *trbc* und *pdc1* verändert, um die Antitumor-Immunität nach Reinfusion zu verbessern. Zumindest Machbarkeit, Sicherheit und Toleranz der modifizierten Zellen konnten im untersuchten Setting gezeigt werden (10).

In einer ganzen Reihe weiterer klinischer Studien werden ex-vivo generierte modifizierte T-Zellen getestet. Beispiele sind **CD19-CAR-T-Zellen** zur Therapie von B-Zell-Leukämien, CD7-Knockout in CAR-T-Zellen bei T-Zell-Leukämie sowie PD-1-Knockout in T-Zellen zum Targeting EBV-positiver Malignome. Außerdem sind Studien zu tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit CISH (Cytokine-induced SH2 protein)-Knockout für den Einsatz bei metastasierten, epithelialen gastrointestinalen Tumoren sowie durch PD-1-Knockout modifizierte T-Zellen für verschiedenste Tumorentitäten wie NSCLC, RCC, Blasen, Prostata- und Ösophaguskarzinom registriert. Neben diesen ex-vivo modifizierten Zellen sind auch Studien zur In-vivo-Modifikation durch Plasmidtransfer auf Basis des CRISPR/Cas-Systems initiiert, wie beispielsweise die Deletion von E6/E7-Onkogen bei HPV-assoziierten Malignomen (9).

CRISPR/Cas9-Therapie bei β -Thalassämie und Sichelzellanämie

Eine Arbeitsgruppe aus Deutschland ist Vorreiter im therapeutischen Einsatz von CRISPR/Cas9 bei Thalassämie und Sichelzellanämie. So wurde Mitte 2020 von bisher guten Erfolgen bei der ersten Studie zur autologen Zelltherapie bei β -Thalassämie (CTX001) berichtet (11). Ziel der Therapie ist nicht die Reparatur des ursächlichen Gendefekts im β -Globin, sondern die Aktivierung des fetalen Hämoglobins (γ -Globin), das den Sauerstofftransport übernehmen soll. Hierzu wird in hämatopoetischen Stammzellvorläuferzellen (hHSPC) BCL 11A, der Inhibitor des fetalen Hämoglobins (HbF), mittels CRISPR/Cas-9 ausgeschaltet und so die Produktion von HbF induziert. In die Phase I/II-Studie sollen an sechs Studienzentren weltweit (Europa, USA, Kanada) 45 Patienten mit β -Thalassämie im Alter zwischen 18 und 35 Jahren eingeschlossen werden. Diese erhalten einmalig modifizierte Stammzellvorläuferzellen und werden im zweijährigen Follow-up engmaschig beobachtet. Für den ersten behandelten Patienten wurde Mitte 2020, 15 Monate nach Studienbeginn, von nahezu Beschwerdefreiheit bei Normalisierung der Blutwerte und weiterhin ausbleibendem Transfusionsbedarf berichtet. Ebenso wurden im Rahmen einer parallelen Studie von vergleichbar günstigen Ergebnissen bei der Therapie von Patienten mit Sichelzellanämie berichtet (11, 12). Beide Studien werden von Vertex Pharmaceuticals (Boston, USA) und CRISPR Therapeutics (Schweiz) finanziert und sind damit die ersten unternehmensfinanzierten klinischen Studien mit einem CRISPR/Cas9-editierten Zellprodukt in Europa und Nordamerika (9).

Neben klinischen Studien wird CRISPR/Cas9 auch im experimentellen Setting zum Auffinden neuer Therapietargets für die Onkologie genutzt. So untersuchten Wissenschaftler im High-Throughput-Screening von 324 und 517 Zelllinien, wie sich die Deletion einzelner Gene auf Überleben und Proliferation von Krebszellen auswirkt (13, 14). Dabei wurde nach synthetischen Gen-Gen-Interaktionen in Form sogenannter **letalere Verkettungen** (synthetic lethality) geforscht. Diese treten immer dann auf, wenn Defekte in zwei oder mehr Genen

in Kombination zu Zelltod führen, dies aber bei Mutation der einzelnen Gene nicht auftritt. Ein Beispiel hierfür ist das DNA-Reparaturmolekül **PARP** (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase), dessen Hemmung durch PARP-Inhibitoren bereits bei Mamma- und Ovarialkarzinom therapeutisch eingesetzt wird (15). Hintergrund ist, dass zelleigene Reparatursysteme, wie Nucleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und **DNA-Mismatch-Reparatur** (MMR) Veränderungen beheben, die auch ganz natürlich durch Lesefehler der Replikationsenzyme bei der Zellteilung auftreten, aber eben auch die Tumorigenese vorantreiben können. Im Rahmen des Screenings der Zelllinien wurde bereits die an der Reparatur beteiligte WRN-Helicase als mögliches neues therapeutisches Ziel beschrieben (14).

Unzählige Möglichkeiten der Genschere

Neben dem Abschalten einzelner Gene bietet CRISPR/Cas9 eine ganze Reihe weiterer Möglichkeiten zur Modifikation von Zellen. So können sehr ähnliche Allele (Genvarianten) gleichzeitig editiert werden und größere Genombereiche im Multiplexing durch den Einsatz mehrerer sgRNAs parallel verändert werden (7). Außerdem kann RNA inaktiviert werden oder das Editing-System zum Tracking von Nucleinsäuren genutzt werden (16). Nicht zuletzt dient CRISPR/Cas9 auch als Transportsystem im Epigenom Editing. So lassen sich mithilfe von Cas-Molekülen ohne schneidende Aktivität (dead Cas, dCas) zielgenau DNA-Methyltransferasen und Demethylasen in Zellen einbringen und so das Epigenom spezifisch verändern, um Einfluss auf die Genexpression zu nehmen (17).

Fazit

Die Entdeckung immer weiterer Einsatzmöglichkeiten von CRISPR/Cas9 für das zielgerichtete Genom Editing nicht nur in der Humanmedizin gibt aber auch immer wieder Anlass zu Diskussionen, welcher und wieviel Eingriff in das Genom verschiedenster Organismen sinnvoll und erlaubt ist. Der Einsatz von CRISPR/Cas9 wurde vom Europäischen Gerichtshof (EuGH) als Gentherapie eingestuft, was den Einsatz im Menschen regelt. Bisher unerwartete Effekte und die Sicherheit der Methode sind weiterhin im Auge zu behalten. Welche Möglichkeiten tatsächlich umsetzbar und in die Klinik translatierbar sind, und welchen Herausforderungen und Unsicherheiten wir uns gegenübergestellt sehen, wird sich zeigen (18).

Literatur:

- (1) Jinek, M. et al. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17; 337(6096): 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
- (2) Barrangou, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007. 315:1709–12. doi:10.1126/science.1138140
- (3) Li, H. et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020. Vol. 5
- (4) Schneider, S. CRISPR-Cas: Ein universelles Werkzeug für die Gentechnik. *Nachrichten aus der Chemie*. 2016. 64. www.gdch.de/nachrichten
- (5) Haapaniemi, E. et al. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat. Medicine*. 2018. 24. 927-930. doi: 10.1038/s41591-018-0049-z.
- (6) Cullot, G. et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. *Nat. Commun*. 2019. 8;10(1):1136. doi: 10.1038/s41467-019-09006-2.
- (7) Schmietow, B. et al. Gene Editing in der Krebsforschung: technische, ethische und rechtliche Aspekte. *Der Onkologe*. 2019. 25 (Suppl 1) S116-S124. DOI: 10.1007/s00761-019-0599-9
- (8) Fesnak, A. D. et al. Engineered T Cells: The Promise and Challenges of Cancer Immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 Aug 23; 16(9): 566–581. doi: 10.1038/nrc.2016.97
- (9) Hirakawa, M. P. et al. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. *Biosci Rep*. 2020 Apr 30; 40(4). doi: 10.1042/BSR20200127
- (10) Stadtmayer, E. A. et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020. Vol 367. DOI: 10.1126/science. aba7365)
- (11) Universitätsklinikum Regensburg. UKR. <https://www.ukr.de/service/aktuelles/06349.php>. Aufgerufen 25.10.2020
- (12) *Ärztezeitung.de*. Erfolg mit Genschere bei Sichelzellerkrankung. 2020. Online <https://www.aerztezeitung.de/Medizin/Erfolg-mit-Genschere-bei-Sichelzellerkrankung-410766.html?bPrint=true>. Aufgerufen 25.10.2020
- (13) Behan, F. M. et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature*. 2019- Vol. 568, 511-516
- (14) Chan, E. M. et al. WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. *Nature*. 2019. Vol. 568, 551–556
- (15) Chopra, N. et al. Homologous recombination DNA repair deficiency and PARP inhibition activity in primary triple negative breast cancer. *Nature communications*. 2020. 11. art. 2662(2020)

- (16) Burmistrz, M. et al. RNA-Targeting CRISPR-Cas Systems and Their Applications. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 7;21(3):1122. doi: 10.3390/ijms21031122.
- (17) Syding, L. a. et al. CRISPR/Cas9 Epigenome Editing Potential for Rare Imprinting Diseases: A Review. *Cells.* 2020 Apr; 9(4): 993. doi: 10.3390/cells9040993
- (18) Gießelmann, K. & Richter-Kuhlmann, E. Genome Editing: Die Zukunft der Gentechnik. *Dtsch Arztebl.* 2018.115(37)