

Molekulare Medizin

Genom-Editierung – neue Wege im klinischen Alltag

VIVIANE DETTMER^{1, 2}, TONI CATHOMEN^{1, 3}, MARKUS HILDENBEUTEL^{1, 3}

¹ INSTITUT FÜR ZELL- UND GENTHERAPIE UND CENTRUM FÜR CHRONISCHE IMMUNDEFIZIENZ, UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG

² FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, UNIVERSITÄT FREIBURG

³ MEDIZINISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄT FREIBURG

Programmable nucleases, such as zinc finger nucleases, TALE nucleases, and CRISPR-Cas nucleases, allow for the introduction of precise modifications in the human genome. As a consequence, targeted genome editing has heralded a new area for gene therapy and the treatment of acquired and inherited disorders. Here, we describe the concept of designer nuclease-mediated genome engineering, discuss risks and potential limitations of its usage, highlight some of the achieved milestones, and review the most prominent studies that have made it from the laboratory to the clinic.

DOI: 10.1007/s12268-017-0781-9

© Springer-Verlag 2017

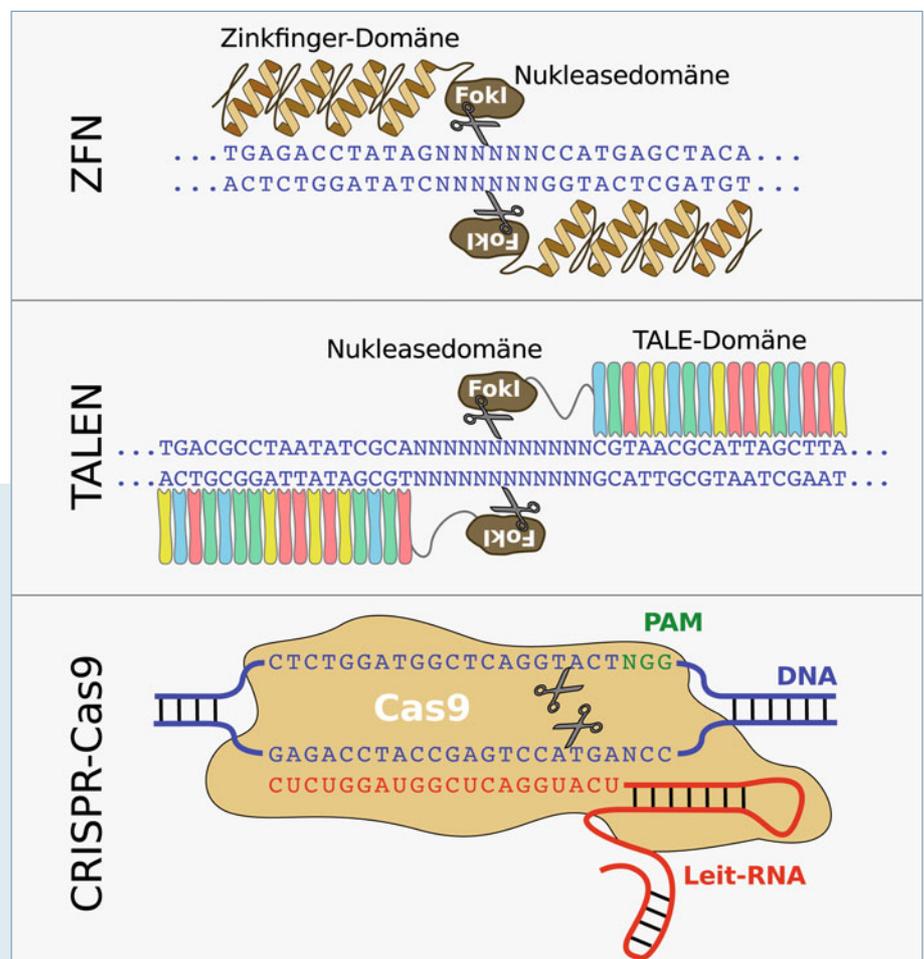
Die Vorstellung, das menschliche Genom nach Belieben zu modifizieren, ist ein lang gehegter Traum der Wissenschaft, der spätestens seit der Entwicklung von Designer-Nukleasen Realität ist. Designer-Nukleasen sind im Labor erzeugte Werkzeuge, die aus einer maßgeschneiderten DNA-Bindedomäne zum Ansteuern der gewünschten Zielsequenz sowie einer Endonukleasedomäne, die die DNA an dieser Stelle spaltet, bestehen [1]. Neben dem Einsatz in der Grundlagenforschung und der Biotechnologie, eröffnen sich besonders für den klinischen Einsatz dieser

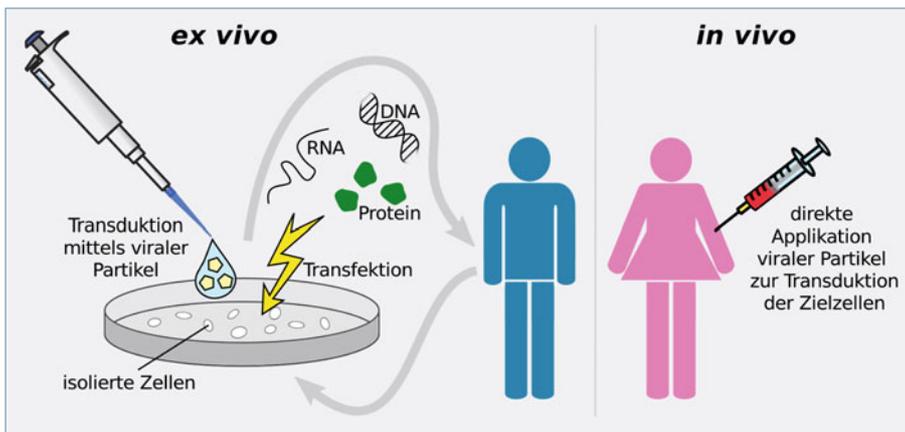
► **Abb. 1:** Schematische Darstellung klinisch relevanter Designer-Nukleasen. Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und *transcription activator-like effector*-Nukleasen (TALEN) bestehen aus zwei Untereinheiten, die jeweils aus einer DNA-Bindedomäne, die die Zielsequenz ansteuert, und einer FokI-Nukleasedomäne, welche die Spaltung der DNA-Zielsequenz nach erfolgter Dimerisierung der beiden Untereinheiten vermittelt, bestehen. Die CRISPR(*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/Cas9-Technologie basiert auf der Cas9-Nuklease, die nach Komplexbildung mit einer Leit-RNA (*guide RNA*, gRNA) zur komplementären DNA-Zielsequenz geleitet wird. PAM (*protospacer adjacent motif*) ist eine essenzielle Substanz, die durch die Cas9-Nuklease gebunden wird.

Genscheren ungeahnte Perspektiven in Form neuartiger gentherapeutischer Ansätze für bislang unheilbare Krankheiten.

Designer-Nukleasen – Werkzeuge zur Genom-Editierung

Gegenwärtig finden drei Arten von Designer-Nukleasen in der Klinik Anwendung: Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) [2], *transcription activator-like effector*-Nukleasen (TALEN) [3] und Cas9 als zentrale Komponente der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*(CRISPR)-Technologie [4] (**Abb. 1**). ZFN und TALEN bestehen aus zwei Monomeren mit jeweils zwei funktionalen Einheiten: eine DNA-Bindedomäne, die spezifische DNA-Sequenzen erkennt und dadurch die daran





▲ **Abb. 2:** Einschleusen von Designer-Nukleasen in Zielzellen. Blutstammzellen können aus dem Körper isoliert und anschließend *ex vivo* durch Einschleusen von Designer-Nukleasen mittels Transfektion (z. B. Elektroporation der Genscheren in Form von Protein, RNA oder DNA) oder Transduktion (z. B. Gentransfer mit Virusvektoren) genetisch modifiziert werden. Bei der Genom-Editierung von Zellen *in vivo* wird die Designer-Nuklease hauptsächlich mittels viralem Gentransfer dem Patienten appliziert.

gekoppelte *FokI*-Nukleasedomäne so ausgerichtet, dass die DNA nach Dimerisierung gezielt gespalten wird (**Abb. 1**). ZFN werden durch mehrere gekoppelte Zinkfinger-Motive, die DNA-Muster aus mehreren (meist zwei bis vier) zusammenhängenden Nukleotiden erkennen, geleitet. Bei TALEN erkennen dagegen kurze, repetitive Module ein einzelnes Nukleotid, wodurch TALEN wesentlich leichter herzustellen sind. Die CRISPR/Cas-Technologie basiert auf Cas-Nukleasen, die mit einer Leit-RNA (*guide RNA*, gRNA) ein Ribonukleoprotein(RNP)-Komplex bilden. Diese gRNA ist zur gewünschten Schnittstelle komplementär und dirigiert so die Nuklease zur Zielsequenz. Dementsprechend unterscheiden sich die gegen verschiedene Zielgene gerichteten CRISPR/Cas-Nukleasen lediglich in ihrer gRNA, die vergleichsweise leicht generiert werden kann und somit der CRISPR-Technologie einen entscheidenden Vorteil gegenüber ZFN und TALEN verschafft.

Grundlagen

Ungeachtet ihres Aufbaus, initiieren alle Designer-Nukleasen einen Doppelstrangbruch in der DNA. Solche Schäden an der DNA stellen eine potenzielle Gefahr für die Zelle dar und werden umgehend über einen von zwei möglichen DNA-Reparaturmechanismen behoben [5]. Beide Wege macht man sich für therapeutische Zwecke zunutze. In den meisten Fällen werden die freien DNA-Enden durch einen Mechanismus, der als nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) bezeichnet wird, wieder

zusammengeführt. Da dieser Mechanismus fehleranfällig ist, kommt es häufig zu kurzen Insertionen oder Deletionen im Bereich des Doppelstrangbruchs. Dadurch werden Therapieansätze ermöglicht, bei denen ein Gen ausgeschaltet werden soll (Knock-out), wie beispielsweise bei der Behandlung von Patienten, die mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind.

Unter bestimmten Bedingungen kann ein Doppelstrangbruch auch durch Homologie-vermittelte Reparatur (*homology-directed repair*, HDR) behoben werden. Hierbei verwendet die Zelle eine Vorlage, in der Regel das Schwesterchromatid, zur fehlerfreien Reparatur des DNA-Schadens. Wird der Zelle nach Expression der Designer-Nukleasen eine alternative Vorlage angeboten, kann die Sequenzinformation dieses DNA-Donors auf die genomische Zielregion übertragen werden. HDR wird somit hauptsächlich zur zielgerichteten Korrektur eines krankheitsauslösenden Fehlers im Erbgut, wie beispielsweise bei primären Immundefizienzen (*primary immunodeficiencies*, PID), herangezogen.

Das Einschleusen von Designer-Nukleasen

Der Schlüssel zum erfolgreichen gentherapeutischen Ansatz ist das effektive Einschleusen der Genom-Editierungswerkzeuge in die zu modifizierenden Zellen (**Abb. 2**, [6]). Hierzu wird entweder die Designer-Nuklease direkt als Protein oder ihr Bauplan in Form von DNA bzw. RNA, aus denen das Enzym in der Zelle hergestellt wird, in die Zelle einge-

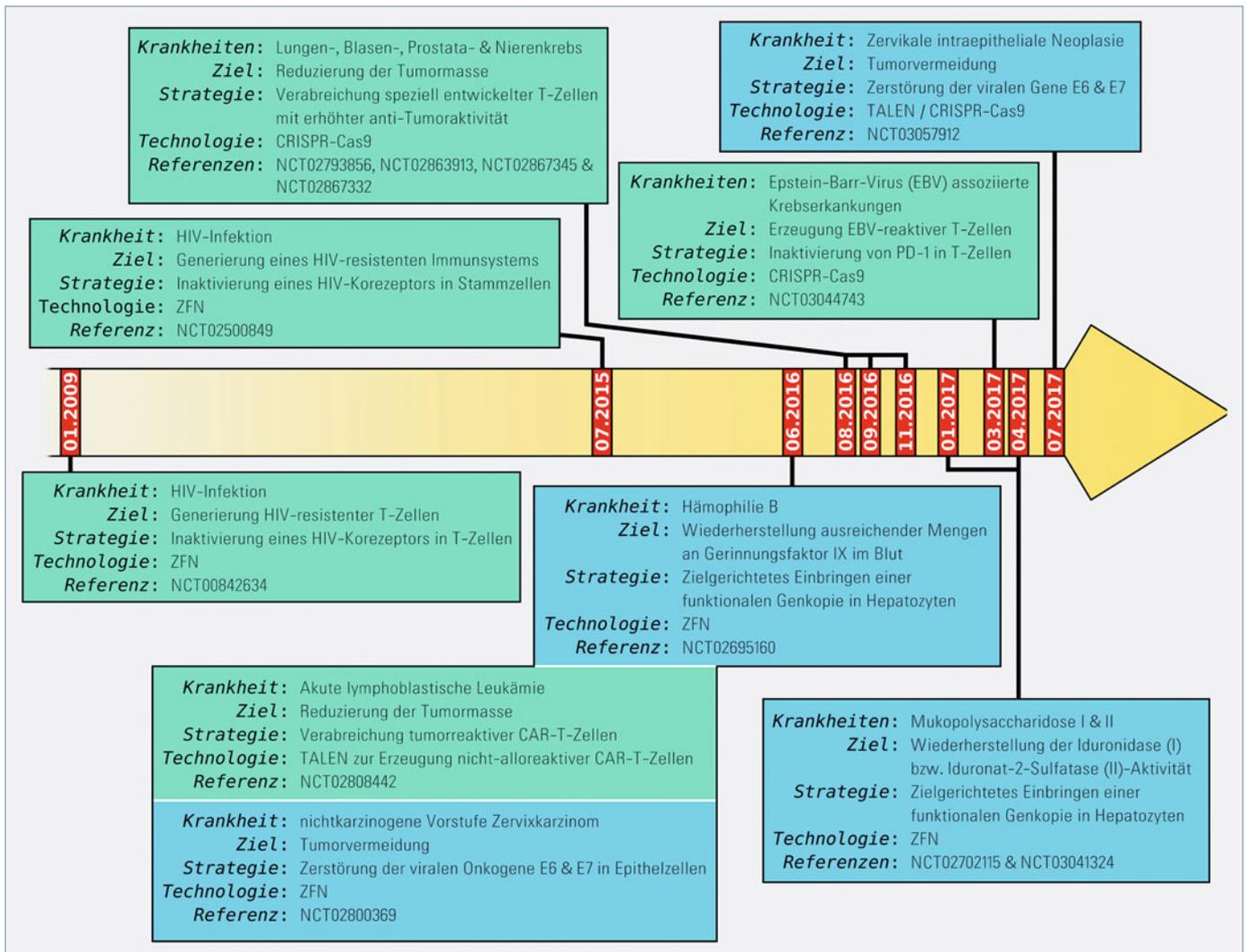
schleust. Abhängig vom Zelltyp können die Zielzellen entweder transfiziert oder transduziert werden. Bei der Transfektion von primären Zellen wird üblicherweise die Designer-Nuklease als Protein oder als mRNA mittels Elektroporation in die Zellen eingeführt. Zur Transduktion wird der Bauplan der Genscheren in Viruspartikel verpackt. Falls Genkorrektur mittels HDR angestrebt wird, muss zusätzlich zur Designer-Nuklease der DNA-Donor in die Zelle eingeschleust werden. Aufgrund der hohen Zytotoxizität nackter DNA in verschiedenen primären Zellen, erfolgt dies gewöhnlich mit Virusvektoren.

Zellen des Blut- und Immunsystems lassen sich vergleichsweise leicht mit Designer-Nukleasen editieren, da sie sich relativ einfach isolieren und außerhalb des Körpers (*ex vivo*) modifizieren lassen. Kniffliger ist das Einschleusen der Editierungswerkzeuge direkt in das Zielorgan im Körper des Patienten (*in vivo*), da einige Zelltypen nur schwer zugänglich sind. In solchen Fällen ist es möglich, die Designer-Nuklease und die DNA-Korrekturvorgänge mithilfe von viralen Genfähren (Vektoren) direkt dem Patienten zu applizieren.

Die Spezifität von Designer-Nukleasen

Wie bereits diskutiert, initiieren Designer-Nukleasen gezielt Doppelstrangbrüche innerhalb des Genoms. In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass Sequenzen, die der eigentlichen Erkennungssequenz ähneln, auch gespalten werden können. Solche fälschlicherweise geschnittenen Sequenzen werden als *off*-Targets bezeichnet [7]. Befindet sich ein *off*-Target im Bereich eines Gens oder regulatorischen Elements, kann dies zum Funktionsverlust dieser Elemente führen. Obwohl in vielen Fällen ein solches Ereignis folgenlos bleibt, kann es aber auch den Zelltod oder die Entartung der Zelle und somit die Ausbildung eines Tumors zur Folge haben. Gerade im Hinblick auf therapeutische Ansätze ist es daher essenziell, die möglichen *off*-Targets einer Designer-Nuklease zu identifizieren, um so potenzielle Risiken zu erkennen und zu minimieren.

Off-Targets können entweder *in silico*, das heißt computergestützt, vorhergesagt oder experimentell bestimmt werden. Algorithmen zur *in silico*-Analyse basieren auf fest definierten Parametern, einschließlich der Ähnlichkeit zur Zielsequenz. Im Gegensatz zur *in silico*-Analyse ermöglichen es experimentelle Methoden, *off*-Targets parameter-



▲ **Abb. 3:** Überblick über klinische Studien mit Designer-Nukleasen. Angegeben ist der Zeitpunkt, zu dem eine Studie begonnen wurde. Studien, bei denen isolierte Patientenzellen *ex vivo* modifiziert werden, sind grün unterlegt. Studien, bei denen virale Partikel zur Transduktion von Zielorganen im Patienten *in vivo* eingesetzt werden, sind blau hinterlegt (Quelle: www.clinicaltrials.gov).

unabhängig zu identifizieren. Allerdings sind experimentelle Methoden arbeitsintensiv und unterliegen einigen technischen Hürden. Gegenwärtig sind zwei experimentelle Methoden, die beide auf Hochdurchsatzsequenzierung (*Next Generation Sequencing*, NGS) basieren, von Bedeutung: Guide-Seq und Digenome-Seq. Guide-Seq erlaubt die *off*-Target-Bestimmung direkt in einer Zelle, wenn auch nur in ganz bestimmten Zelltypen. Dieses Problem besteht bei Digenome-Seq nicht, da die genomische DNA *in vitro* mit den Designer-Nukleasen geschnitten und danach untersucht wird. Zusammenfassend ist die *in silico*-Analyse schnell und relativ günstig. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass nicht alles *off*-Targets identifiziert werden. Dagegen erlauben Guide-Seq und Digenome-Seq die Identifizierung „echter“ *off*-Targets, sind aber experimentell

sehr aufwendig, teuer, stark zelltypabhängig (Guide-Seq) oder unabhängig von der Chromatinstruktur (Digenome-Seq). Generell lässt sich aber festhalten, dass moderne Designer-Nukleasen durch die in den letzten beiden Jahren erfolgte Weiterentwicklung hochspezifisch und *off*-Target-Ereignisse relativ selten sind [7, 8].

Von der Petrischale in die Klinik

Von der Petrischale bis hin zur klinischen Anwendung wird eine Designer-Nuklease intensiv *in vitro* und *in vivo* untersucht, um potenzielle Risiken für den Patienten zu identifizieren und zu minimieren. Gegenwärtig befinden sich mehrere Designer-Nukleasen, die die präklinischen Tests bestanden haben, in klinischen Studien der Phase I und II zur Therapie von Patienten mit erblichen und erworbenen Krankheiten (**Abb. 3**, [6]). Ein

Großteil dieser Therapieansätze basiert auf dem Einsatz von ZFN, da diese Klasse der Designer-Nukleasen seit mehr als 20 Jahren erforscht und damit im Unterschied zu TALEN und CRISPR/Cas am besten verstanden ist.

Der erste Meilenstein, der mithilfe von ZFN erreicht wurde und gleichzeitig die Genom-Editierung als Therapieansatz ins Rampenlicht rückte, gelang im Kontext der HIV-Therapie. Zur erfolgreichen Infektion von T-Zellen ist HIV auf die Interaktion mit einem speziellen Chemokinrezeptor (CCR5) auf deren Zelloberfläche angewiesen. 2009 schafften es Forscher, diesen Rezeptor mithilfe von ZFN *ex vivo* auszuschalten und so HIV-resistente T-Zellen zu erzeugen. Da T-Zellen meist nur eine beschränkte Lebensdauer haben, wurde 2015 eine Folgestudie mit dem Ziel initiiert, das CCR5-Gen in Patienten-eigenen Blutstammzellen zu inak-

tivieren, um so nach Transplantation dieser editierten Zellen eine lebenslange HIV-Resistenz zu vermitteln. 2016 wurden erstmals auch klinische Studien mit TALEN und CRISPR/Cas9 zugelassen. In einer laufenden Studie wird z. B. eine allogene Immunzelltherapie (CAR-T-Zellen) gegen die akute lymphoblastische B-Zell-Leukämie eingesetzt. Essenziell in diesem Zusammenhang ist hierbei der TALEN-vermittelte Knock-out des T-Zell-Rezeptors, um eine immunologische Reaktion dieser Zellen gegen den Empfänger (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) zu verhindern.

Neben der *ex vivo*-Anwendung des *Genome Editing* wurden 2016 weitere Studien bewilligt, bei denen ZFN zur *in vivo*-Behandlung von Erbkrankheiten eingesetzt werden. So versprechen sich Wissenschaftler beispielsweise Therapieerfolge durch zielgerichtetes Einschleusen therapeutischer Expressionskassetten in Leberzellen bei der Hämophilie und der Stoffwechselerkrankung Mukopolysaccharidose I (Abb. 3).

Ausblick

Die Entwicklung von Designer-Nukleasen zur Genom-Editierung eröffnet außerordentliche Möglichkeiten bei der Therapie von Krebs, Infektionskrankheiten sowie erblichen Erkrankungen. Obwohl ZFN bislang noch am häufigsten in der Klinik vertreten sind, ist davon auszugehen, dass diese Plattform zukünftig mehr und mehr durch TALEN und CRISPR/Cas abgelöst wird. Die verbesserte Aktivität und Spezifität von TALEN und CRISPR/Cas-Nukleasen im Vergleich zu ZFN erhöhen die Sicherheit und machen sie damit zu geeigneten Kandidaten für die klinische Translation.

Danksagung

Wir bedanken uns bei allen Mitarbeiter/innen des Labors für kritische Diskussionen. Die

Forschungstätigkeit im Labor wird unterstützt durch das BMBF (IFB-01EO0803; iMACnet-01EK1602B; HBV-TALE-01DG15005), die DFG (SFB1160-TP17), die Europäische Kommission (SCIDNET-666908; CARAT-667980), den DAAD, Collectis S. A. und Casebia Therapeutics. ■

Literatur

- [1] Bednarski C, Cathomen T (2015) Maßgeschneidertes Genom – Designer-Nukleasen im Einsatz. *BIOspektrum* 1:22–24
 [2] Carroll D (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188:773–782
 [3] Mussolino C, Cathomen T (2012) TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr Opin Biotechnol* 23:644–650
 [4] Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096
 [5] Carroll D (2014) Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem* 83:409–439

- [6] Haas SA, Dettmer V, Cathomen T (2017) Therapeutic genome editing with engineered nucleases. *Hamostaseologie* 37:45–52
 [7] Tsai SQ, Joung JK (2016) Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet* 17:300–312
 [8] Miller JC, Zhang L, Xia DF et al. (2015) Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire. *Nat Methods* 12:465–471

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Toni Cathomen
 Institut für Zell- und Gentherapie
 Universitätsklinikum Freiburg
 Hugstetter Straße 55
 D-79106 Freiburg
 Tel.: 0761-270-34800
 Fax: 0761-270-37900
 toni.cathomen@uniklinik-freiburg.de

AUTOREN



Viviane Dettmer

2009–2014 Bachelor- und Masterstudium in Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes. 2014–2015 ASTAR Trainee Scholarship Singapore. Seit 2015 Doktorandin am Institut für Zell- und Gentherapie und am Centrum für Chronische Immundefizienz, Universitätsklinikum Freiburg.



Toni Cathomen

1998 Promotion an der Universität Zürich, Schweiz. 1999–2003 Postdoktorat am Salk Institute in San Diego, CA, USA. 2003–2009 W1-Professur an der Charité in Berlin. 2009–2012 W2-Professur an der Medizinischen Hochschule Hannover. Seit 2012 W3-Professor und Direktor des Instituts für Zell- und Gentherapie am Universitätsklinikum Freiburg.



Markus Hildenbeutel

2006 Diplom in Biologie an der Universität Heidelberg. 2007–2011 Promotion an der TU Kaiserslautern. 2011–2014 Postdoktorandenstipendium der Wenner-Gren-Stiftung, Universität Stockholm, Schweden. Seit 2015 Postdoktorand am Institut für Zell- und Gentherapie und am Centrum für Chronische Immundefizienz, Universitätsklinikum Freiburg.