

Genome Editing –Prinzipien und Anwendung der Genomeditierung–

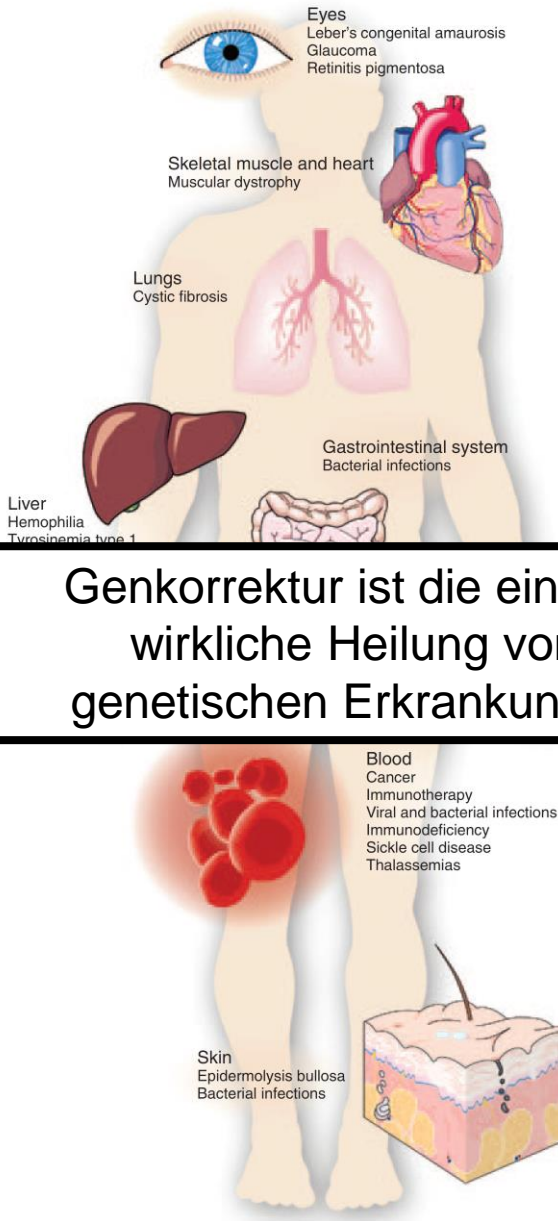
29.09.2018



Hannover Medical School

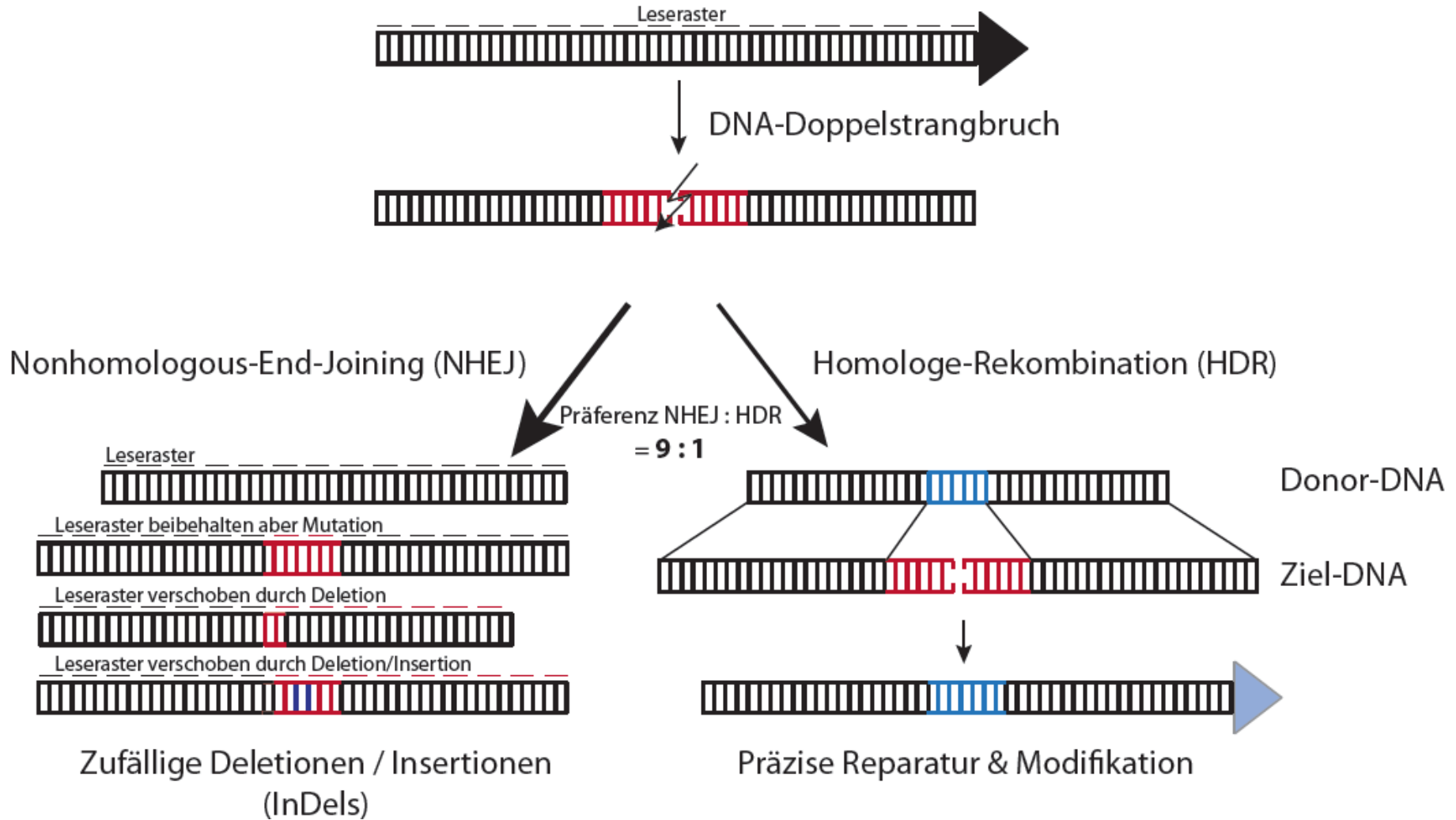
Dirk Heckl
Pediatric Hematology & Oncology

Genkorrektur ist die einzige
wirkliche Heilung von
genetischen Erkrankungen



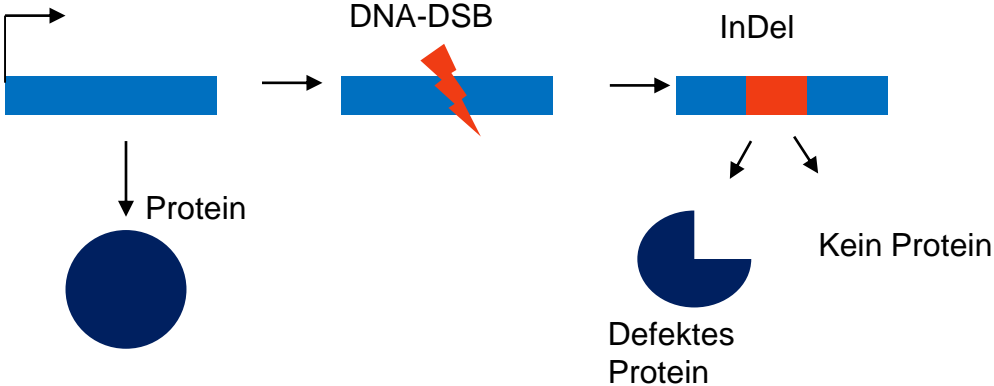
- Das Prinzip der Genomeditierung
- Verfügbare Technologien
- Off-Target Aktivität und Lösungsansätze
- CRISPR-Cas9 Applikationen
 - Gentherapie
 - CAR-T Zellen
 - Keimbahnmodifikation
 - Gene Drive

Genome Editing: Genmodifikation durch DNA-Schädigung



Genome Editing: Anwendungen

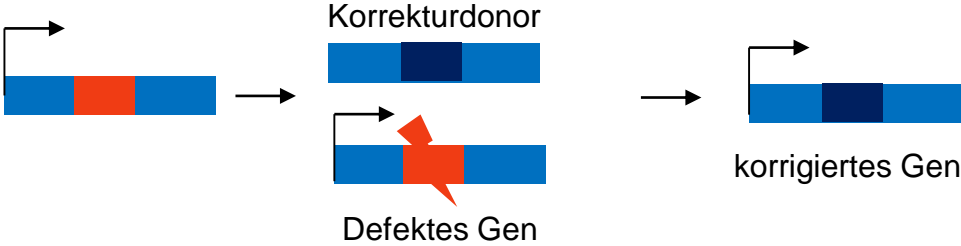
Inaktivierung von Genen



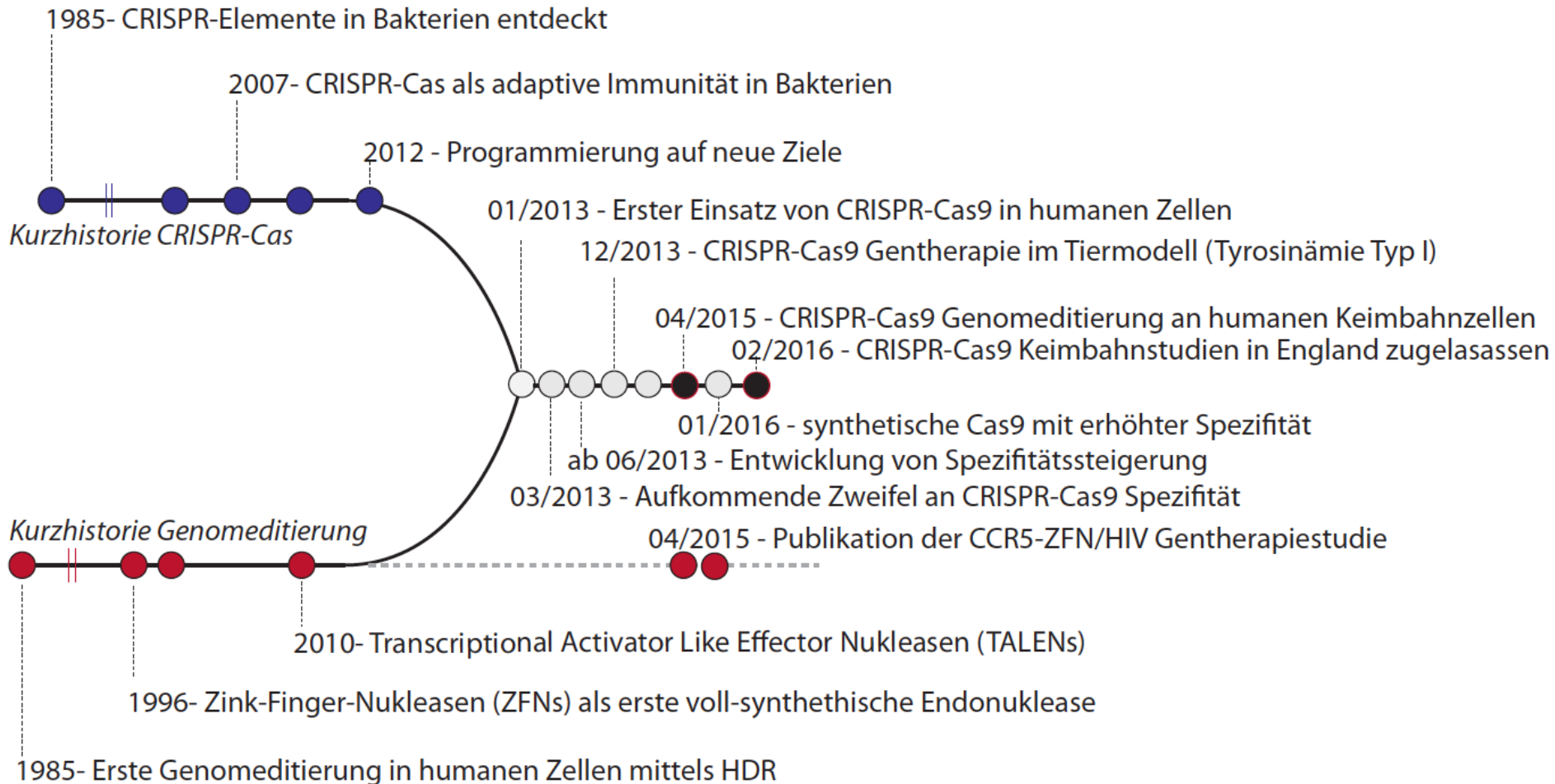
Entfernen von
Genbestandteilen



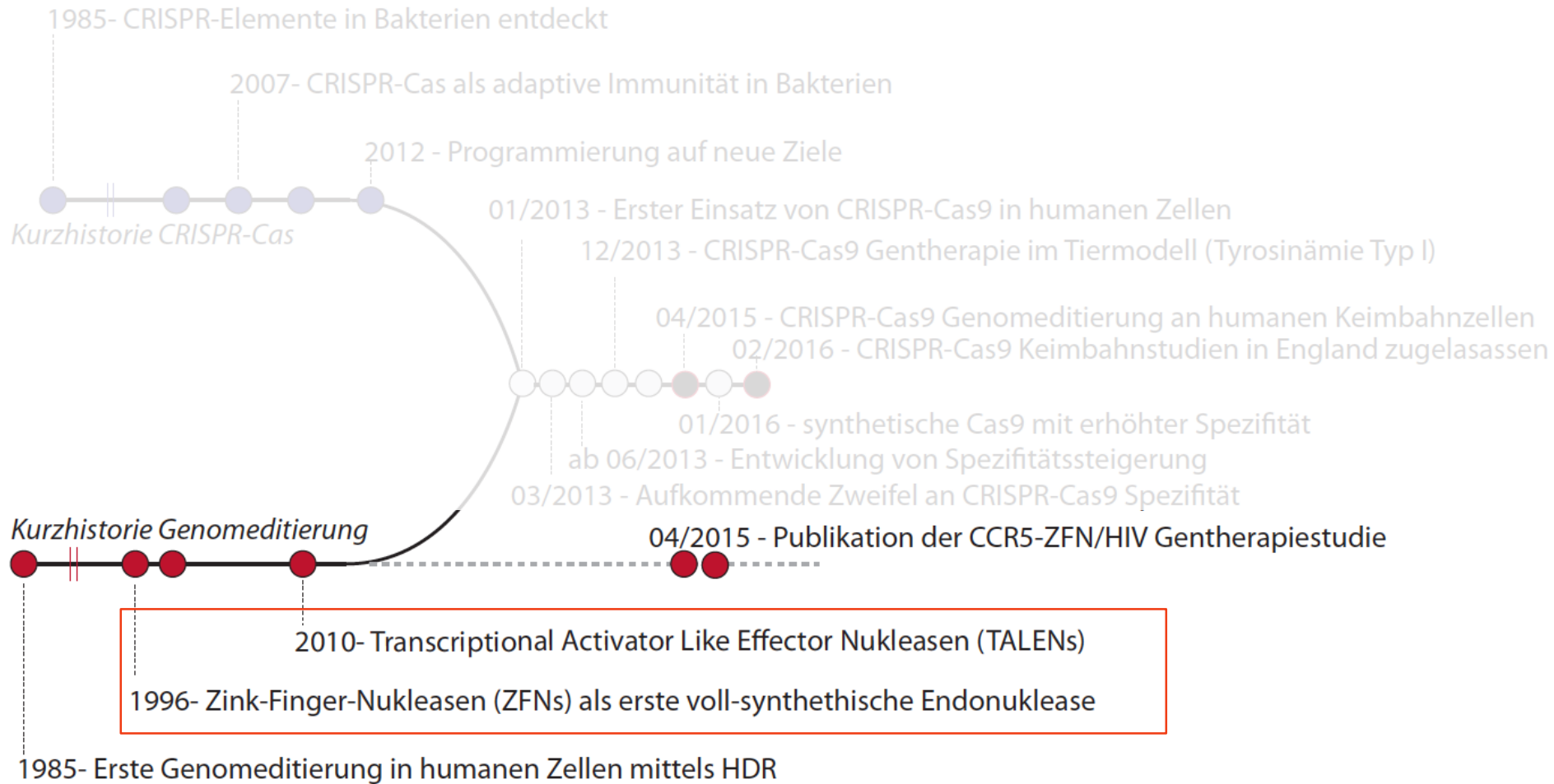
Korrektur von Genen



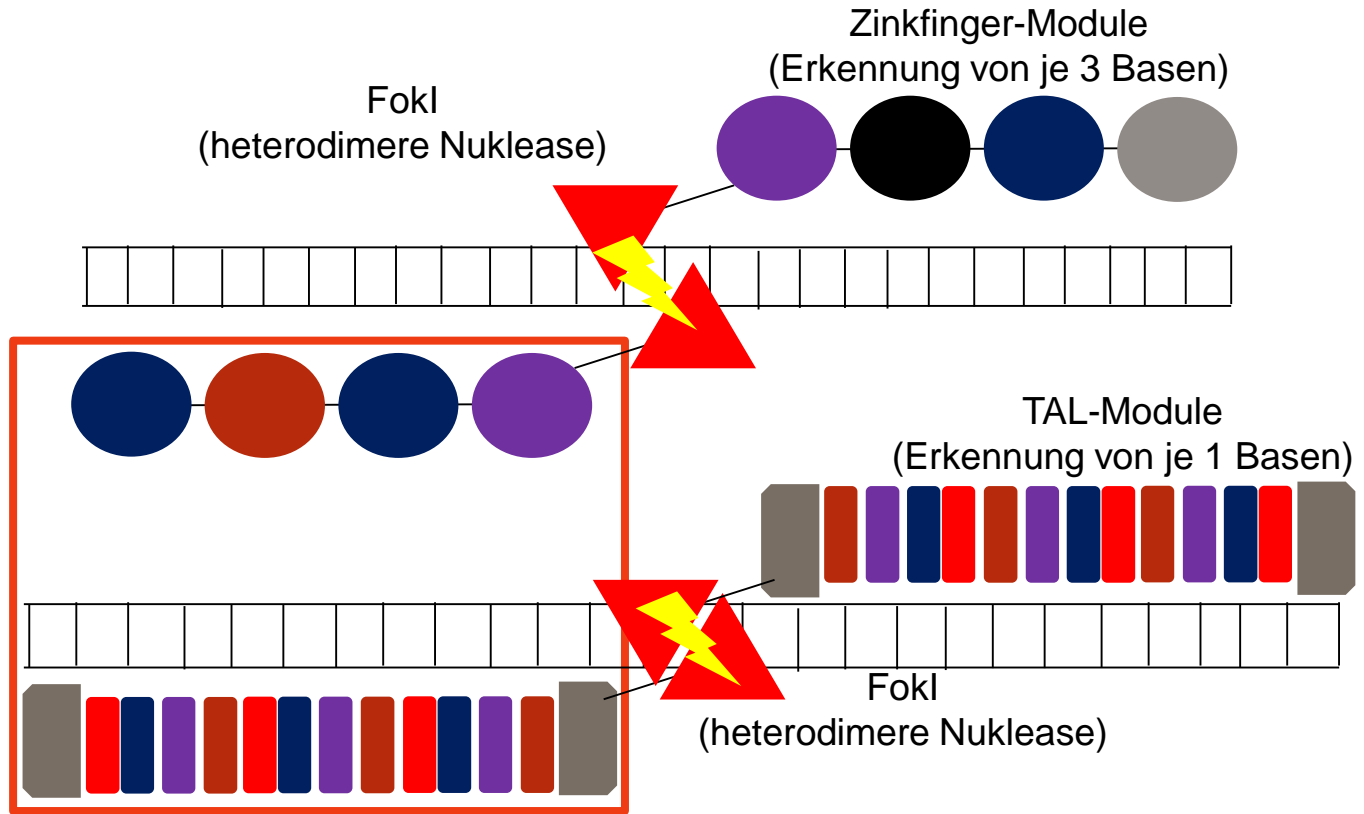
Genome Editing und CRISPR-Cas9



Genome Editing und CRISPR-Cas9



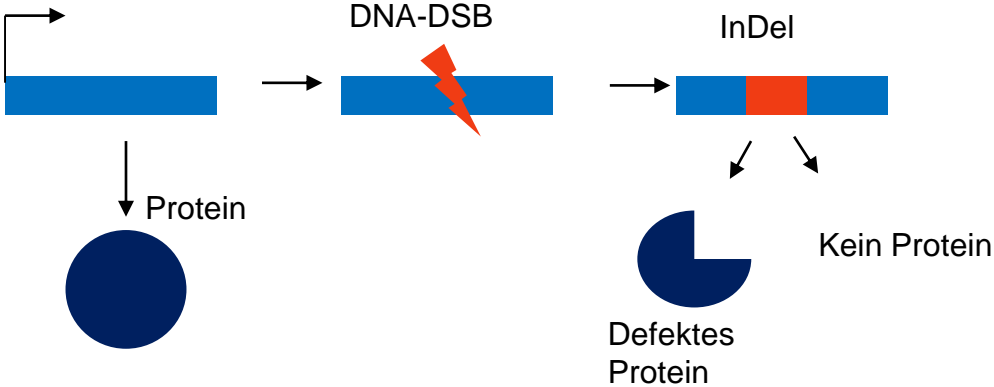
ZFN und TALENs - Aufbau



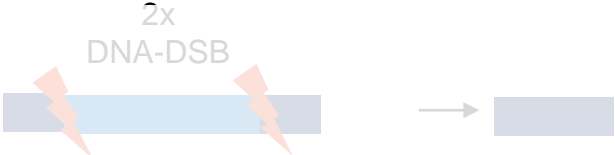
DNA-bindender Proteinarm

Genome Editing: Anwendungen

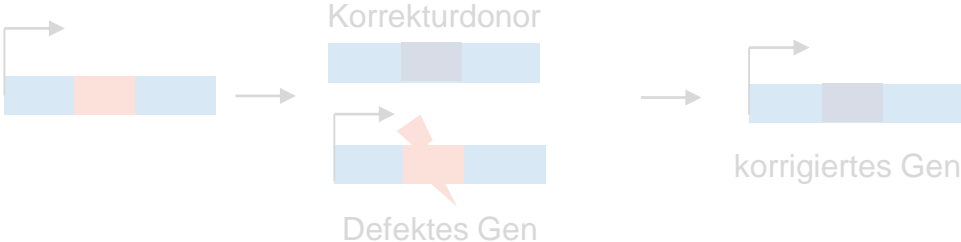
Inaktivierung von Genen



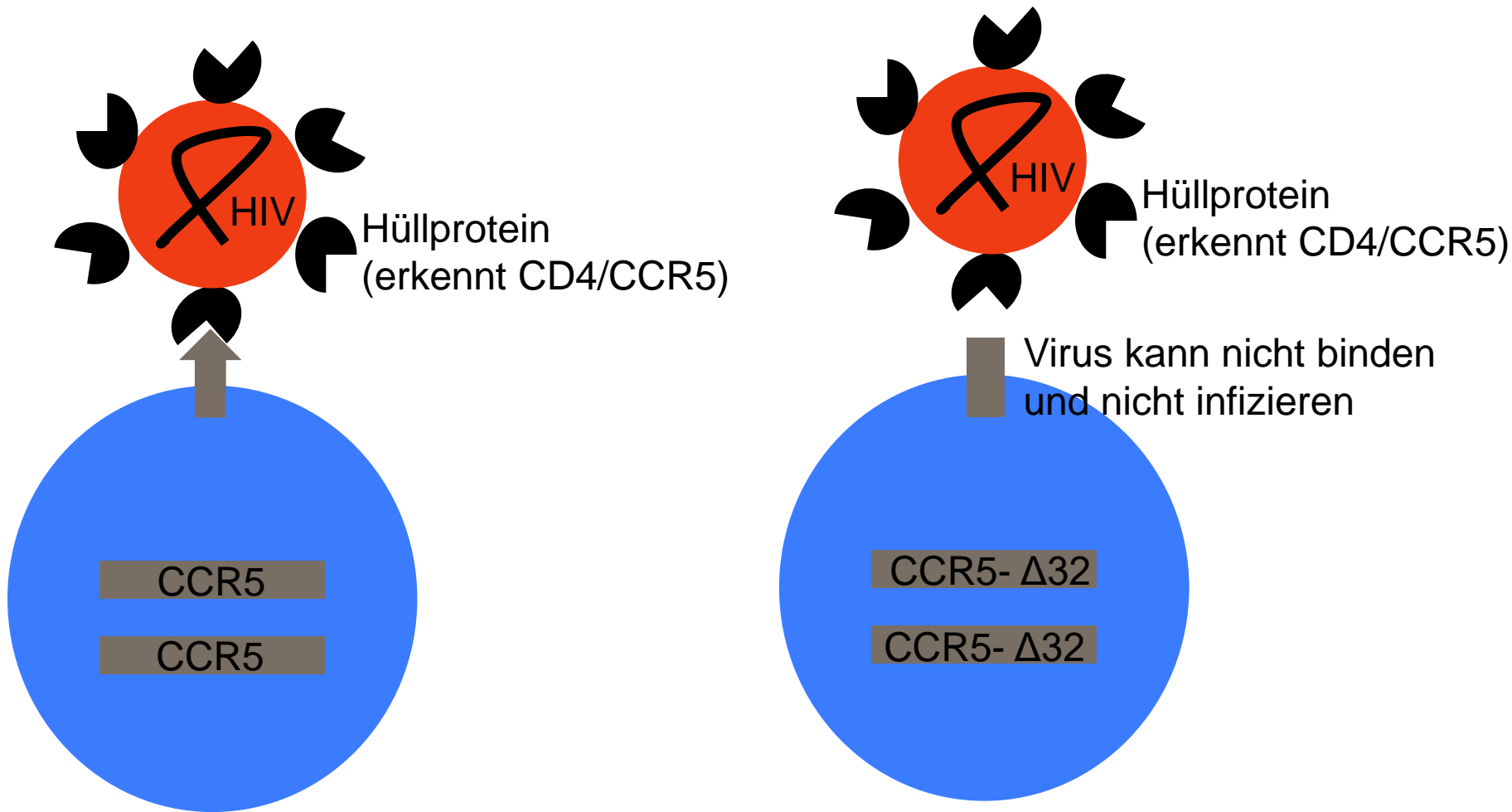
Entfernen von
Genbestandteilen



Korrektur von Genen



HIV Resistenz durch Genomeditierung



- CCR5: Ko-Rezeptor von HIV
- CCR5 Δ 32 in 3% der mitteleuropäischen Bevölkerung vermittelt Resistenz

Zink-Finger-Nukleasen

-Klinische Studie gegen HIV Ausbreitung-

CCR5-Zinkfinger Clinical trial

→ Persistenz der modifizierten T-Zellen

→ Absinken der Viruslast in einem Patienten

Ergebnis

- Wirksamkeit in 1/12 Patienten
- Keine Nebenwirkungen

Details in:

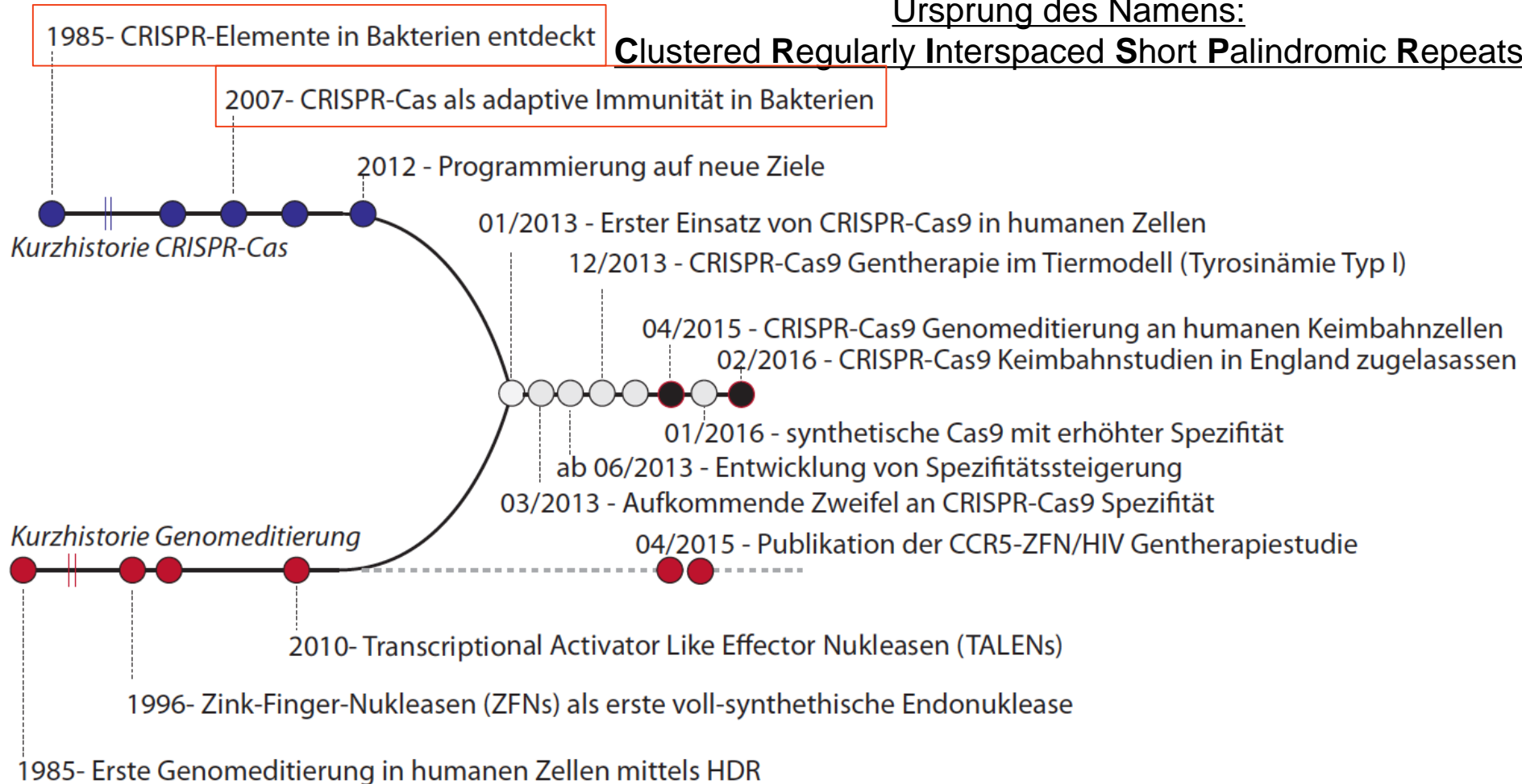
Tebas et al, NEJM 2014

<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1300662>

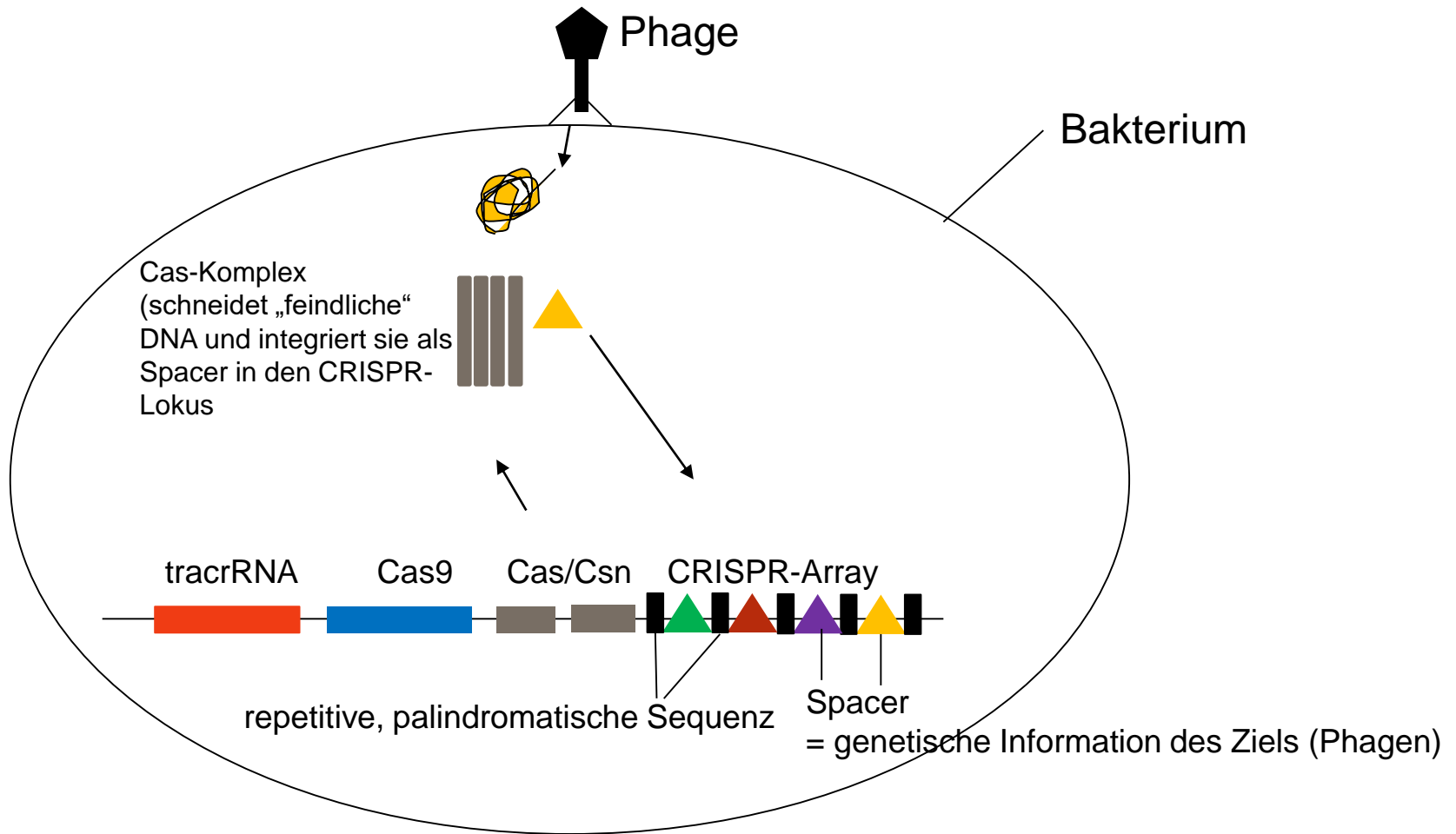
Genome Editing und CRISPR-Cas9

Ursprung des Namens:

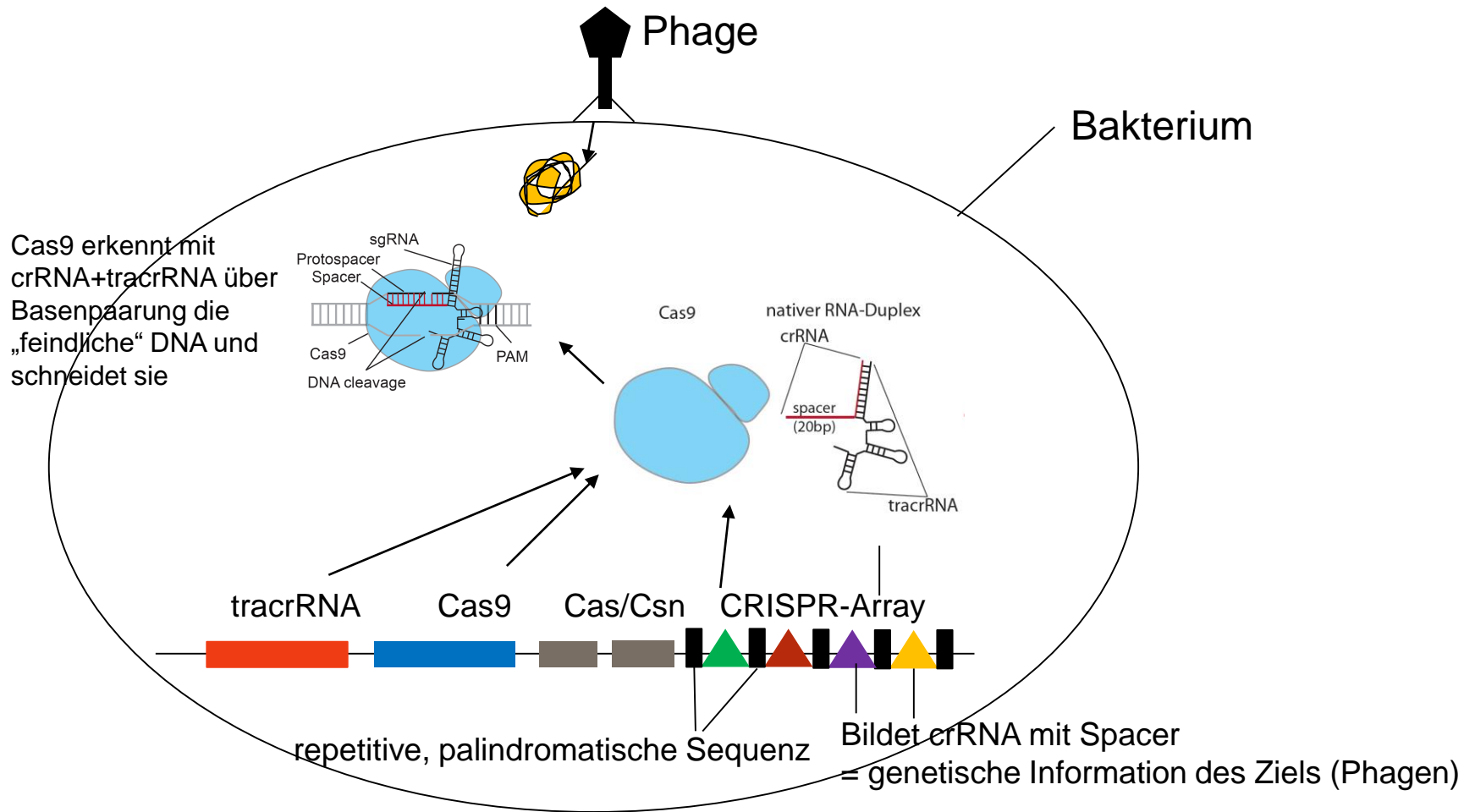
Clustered Regularly Interspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats



CRISPR-Cas9 nativ -Immunisierung-

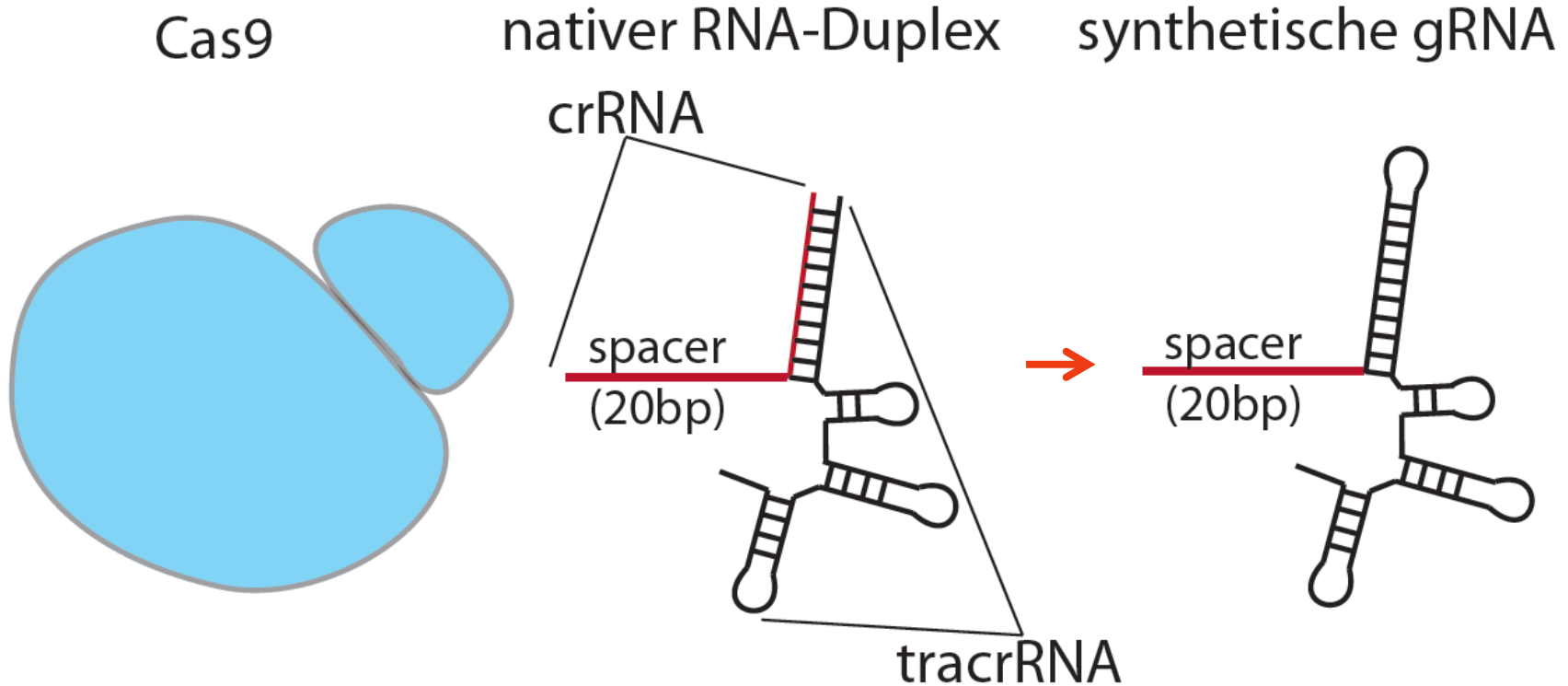


CRISPR-Cas9 nativ -Abwehr-



CRISPR-Cas9

Faszinierende Einfachheit trifft höchste Effizienz



Die Evolution des Genome Editing

	ZFN ¹	TALEN ²	CRISPR-Cas9 ³
Ursprung	Eukaryotic (Human)	Prokaryotic (Pflanzenpathogen)	Prokaryotic (Humanpathogen)
Erstmals	~1996	2009	2012
Prinzip	Protein:DNA	Protein:DNA	Protein:RNA:DNA
Flexibilität (Design)	niedrig	hoch	sehr hoch
Activität	variabel	hoch	hoch
Toxizität (akut)	hoch	niedrig	nicht geklärt
Kosten	sehr hoch	hoch	niedrig

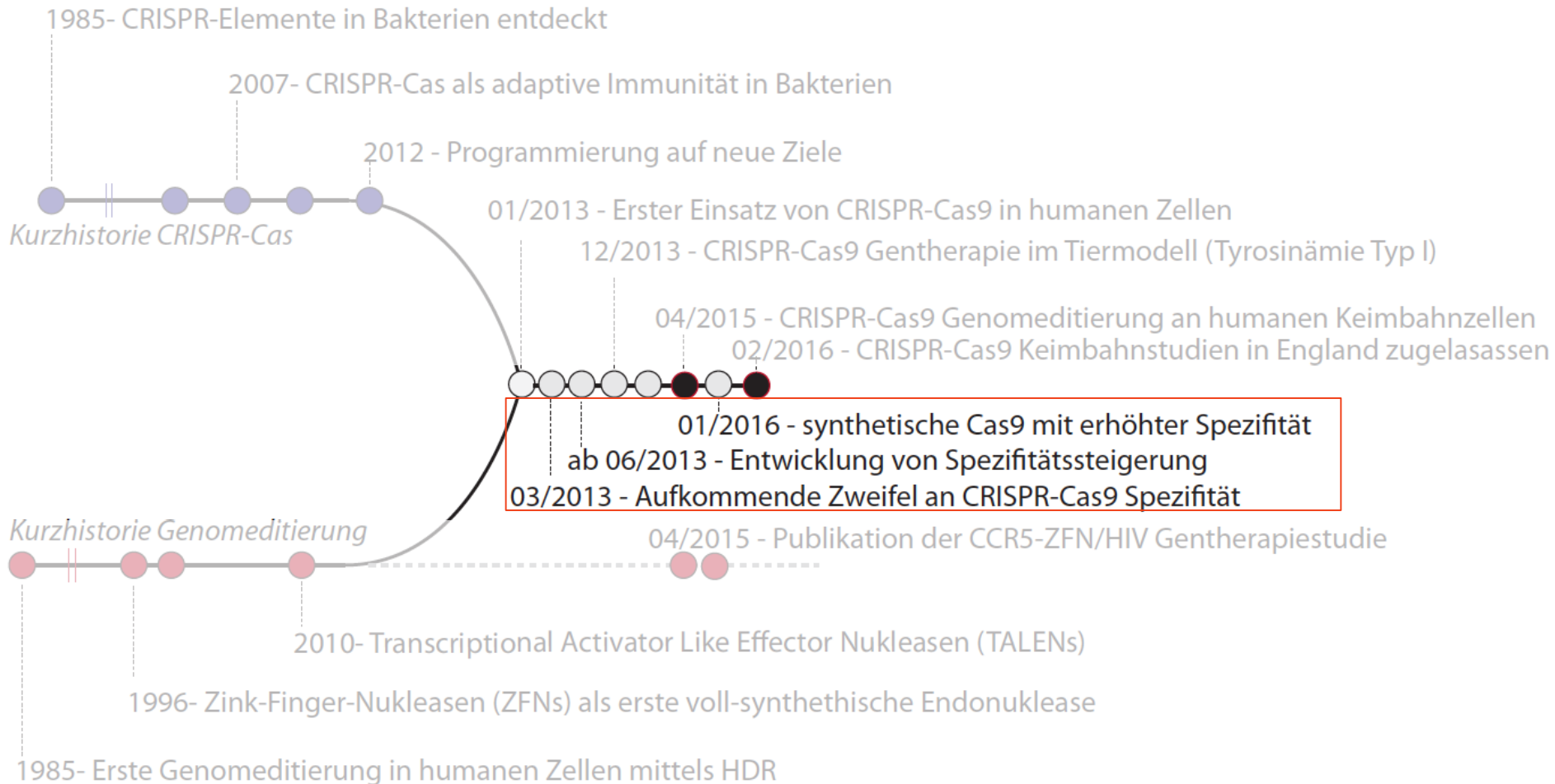
1: Zinc Finger Nucleases

2: Transcriptional Activator Like Effector Nucleases

3: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) – CRISPR-associated 9

- Das Prinzip der Genomeditierung
- Verfügbare Technologien
- **Off-Target Aktivität und Lösungsansätze**
- CRISPR-Cas9 Applikationen
 - Gentherapie
 - CAR-T Zellen
 - Keimbahnmodifikation
 - Gene Drive

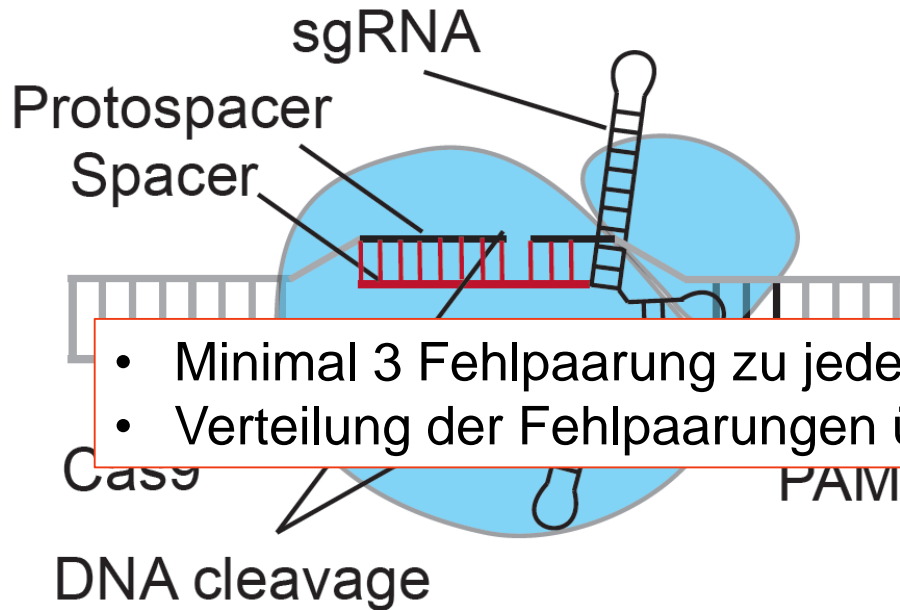
Das Off-Target Dilemma



Das Off-Target Dilemma - Das Problem -

Fehlpaarungen zwischen gRNA und Ziel

Aktivität



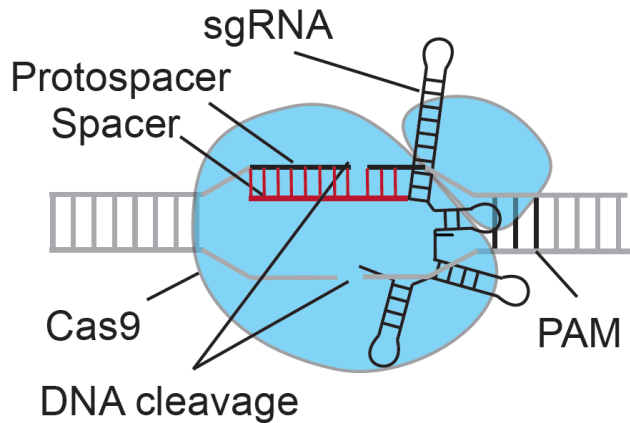
Bei einer Fehlpaarung der Basen zwischen sgRNA und Ziel-DNA schneidet die Cas9 Immernoch mit fast vollständiger Aktivität

- Minimal 3 Fehlpaarung zu jeder Stelle im Genom notwendig
- Verteilung der Fehlpaarungen über die gRNA Länge effizienter

Je nach Position im Ziel und in Abhängigkeit vom Ziel ist eine Fehlpaarung nicht ausreichend die Aktivität zu senken

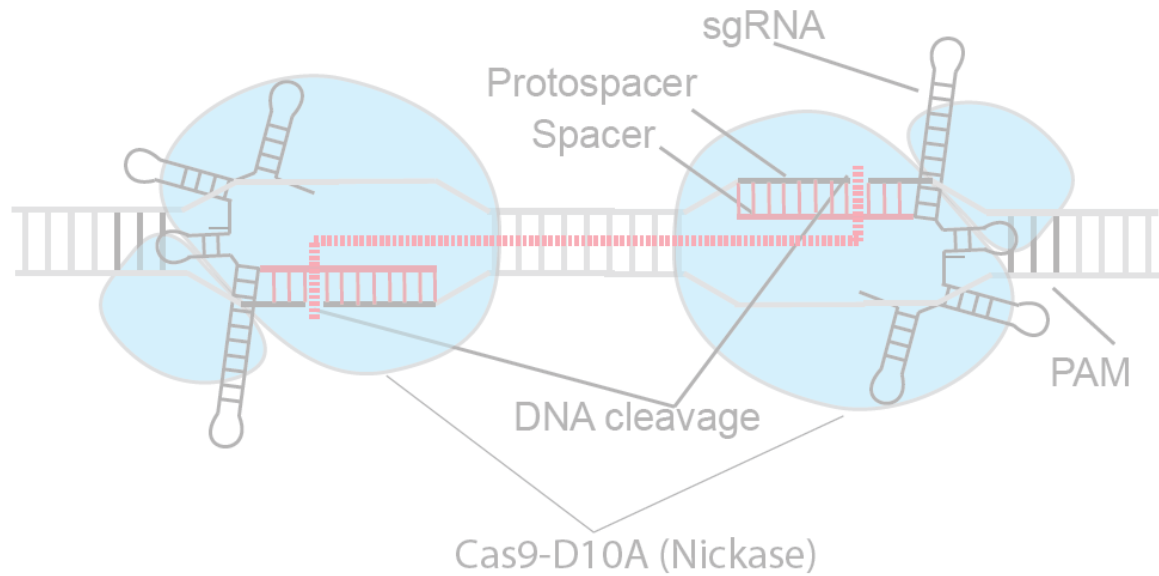
Das Off-Target Dilemma

- Lösungsansätze: "Double-Knicking" -



**DNA-Schnitt erfolgt getrennt
für beide Stränge**

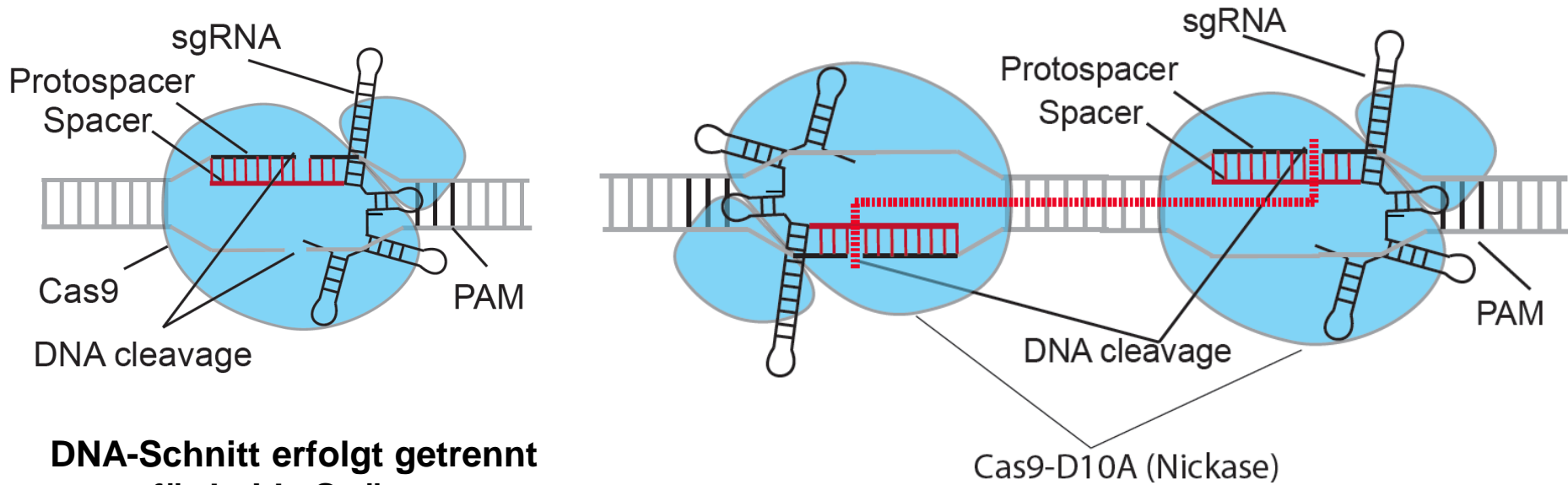
**→ Inaktivierung einer Schnittdomäne
= Cas9-Nickase**



**Erzeugung eines Doppelstrangbruchs
durch kombinierte Einzellstrangbrüche**

Das Off-Target Dilemma

- Lösungsansätze: "Double-Knicking" -



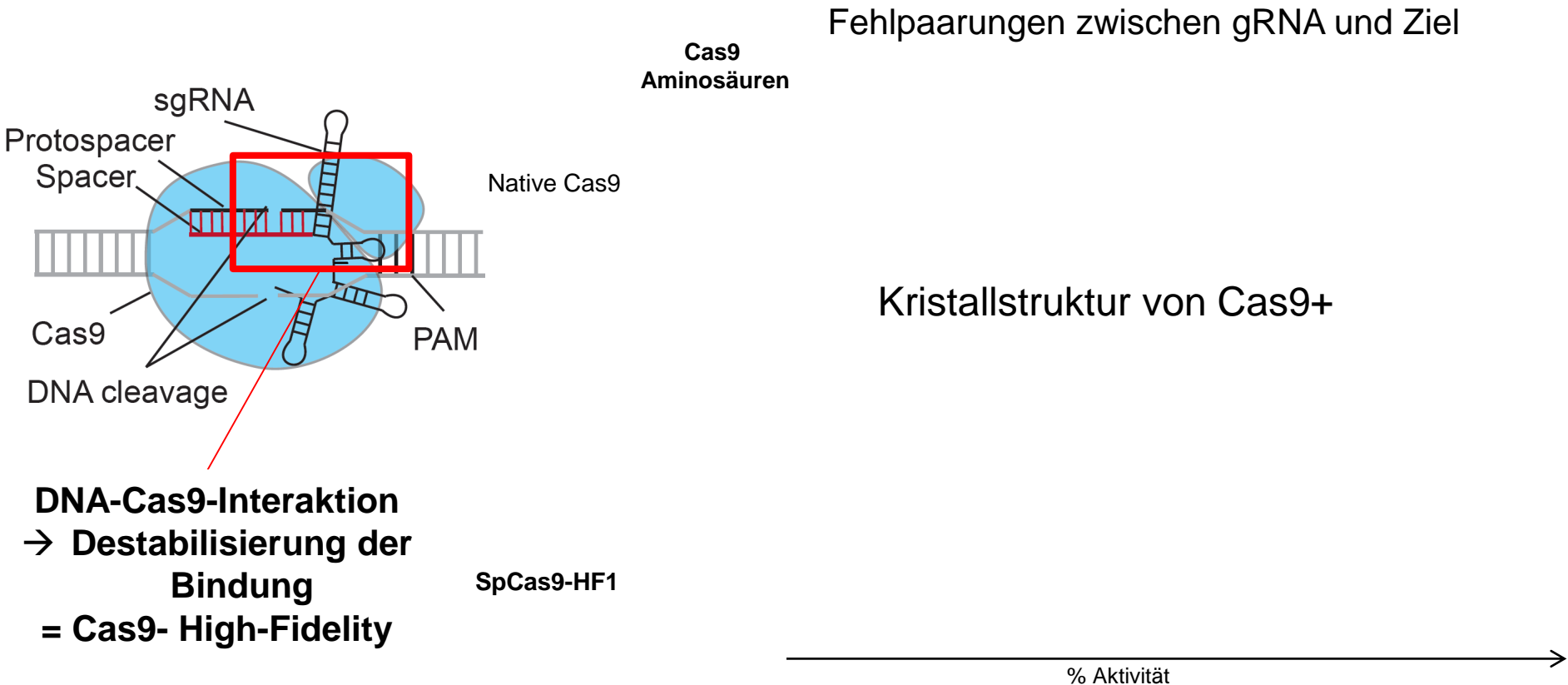
**DNA-Schnitt erfolgt getrennt
für beide Stränge**

**→ Inaktivierung einer Schnittdomäne
= Cas9-Nickase**

**Erzeugung eines Doppelstrangbruchs
durch kombinierte Einzellstrangbrüche**

Das Off-Target Dilemma

- Lösungsansätze: "Protein-Engineering" -

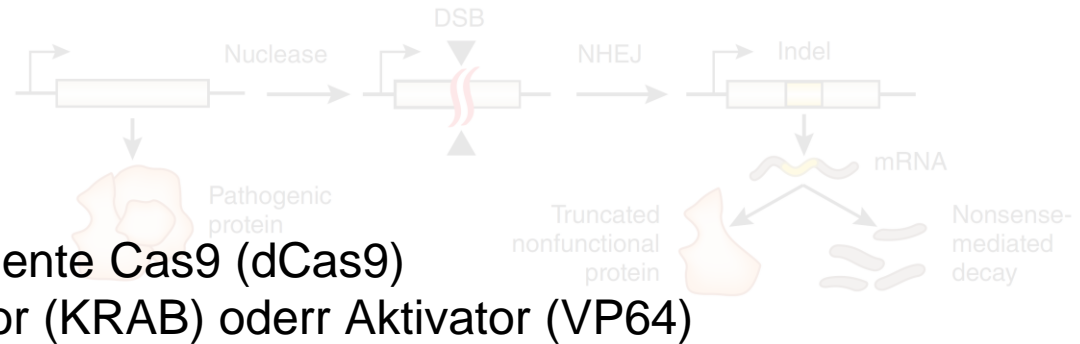


- Das Prinzip der Genomeditierung
- **Verfügbare Technologien**
- Off-Target Aktivität und Lösungsansätze
- CRISPR-Cas9 Applikationen
 - Gentherapie
 - CAR-T Zellen
 - Keimbahnmodifikation
 - Gene Drive

CRISPR-Cas9

- mehr als DNA Modifikation-

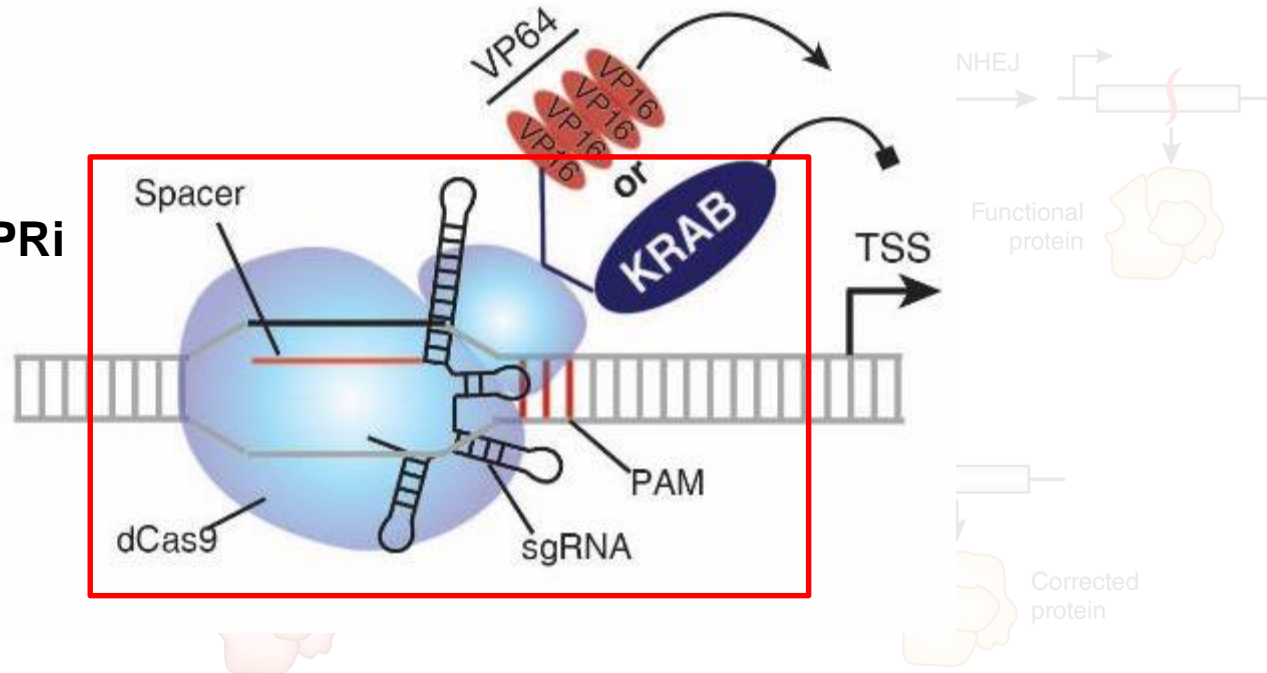
Inactivation of genes



- Endonuklease-defiziente Cas9 (dCas9)
- Transkriptions Inhibitor (KRAB) oder Aktivator (VP64)

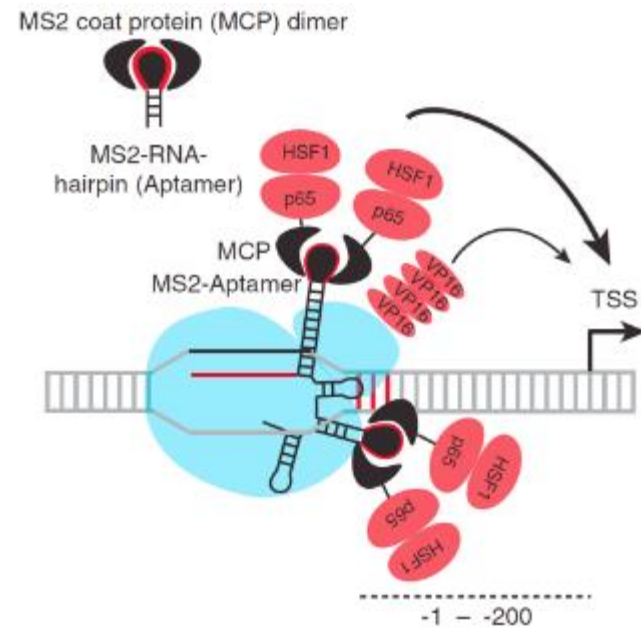
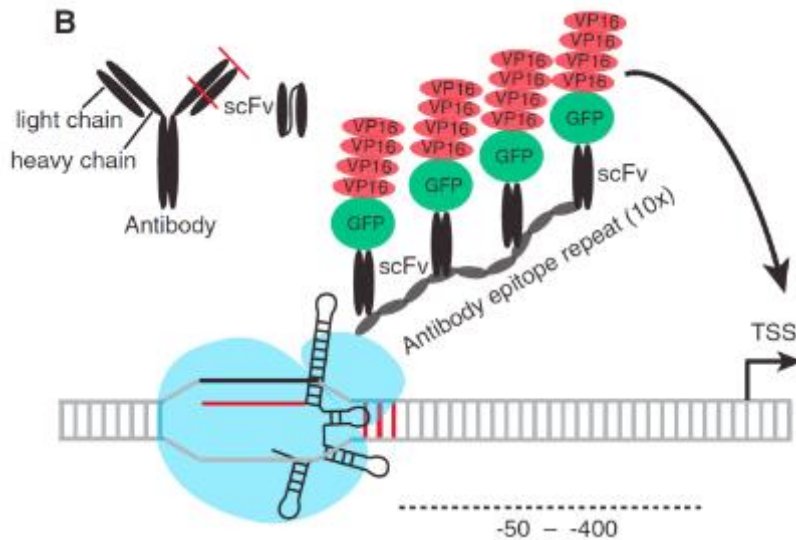
Removal of genetic

CRISPRi



Correction of gene

Transkriptionelle Regulation mit dCas9-Fusionen



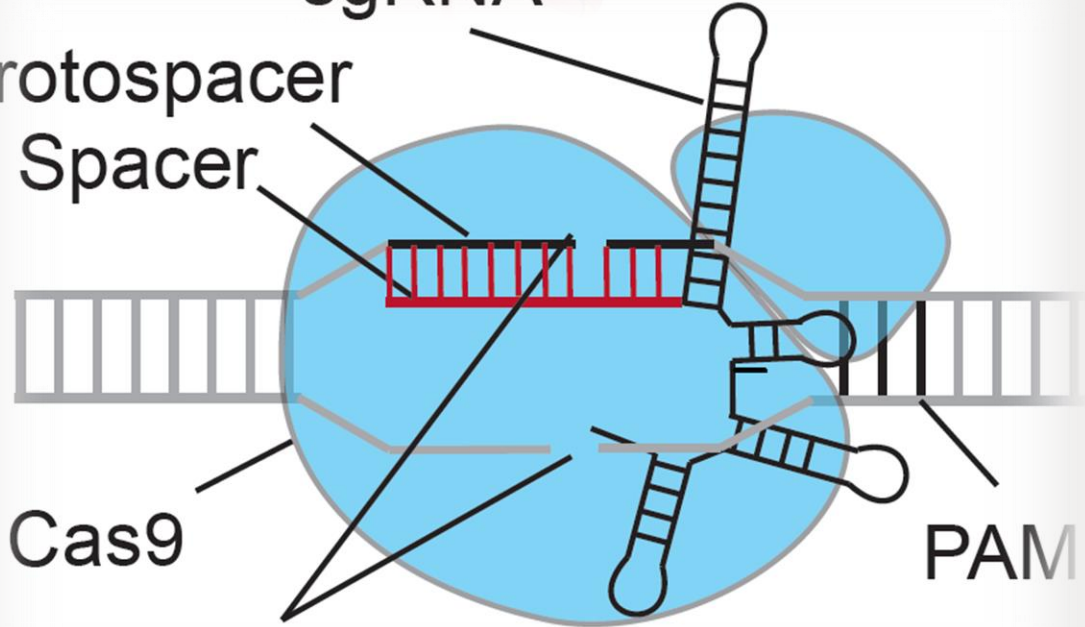
- Das Prinzip der Genomeditierung
- Verfügbare Technologien
- Off-Target Aktivität und Lösungsansätze
- **CRISPR-Cas9 Applikationen**
 - **Gentherapie**
 - CAR-T Zellen
 - Keimbahnmodifikation
 - Gene Drive

Eyes
Leber's congenital amaurosis
Glaucoma
Retinitis pigmentosa

Skeletal muscle and heart
Muscular dystrophy

sgRNA

Protospacer
Spacer

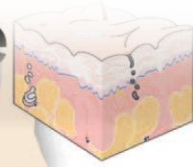


Cas9

PAM

DNA cleavage

Skin
Epidermolysis bullosa
Bacterial infections



Limitationen der Gentherapie

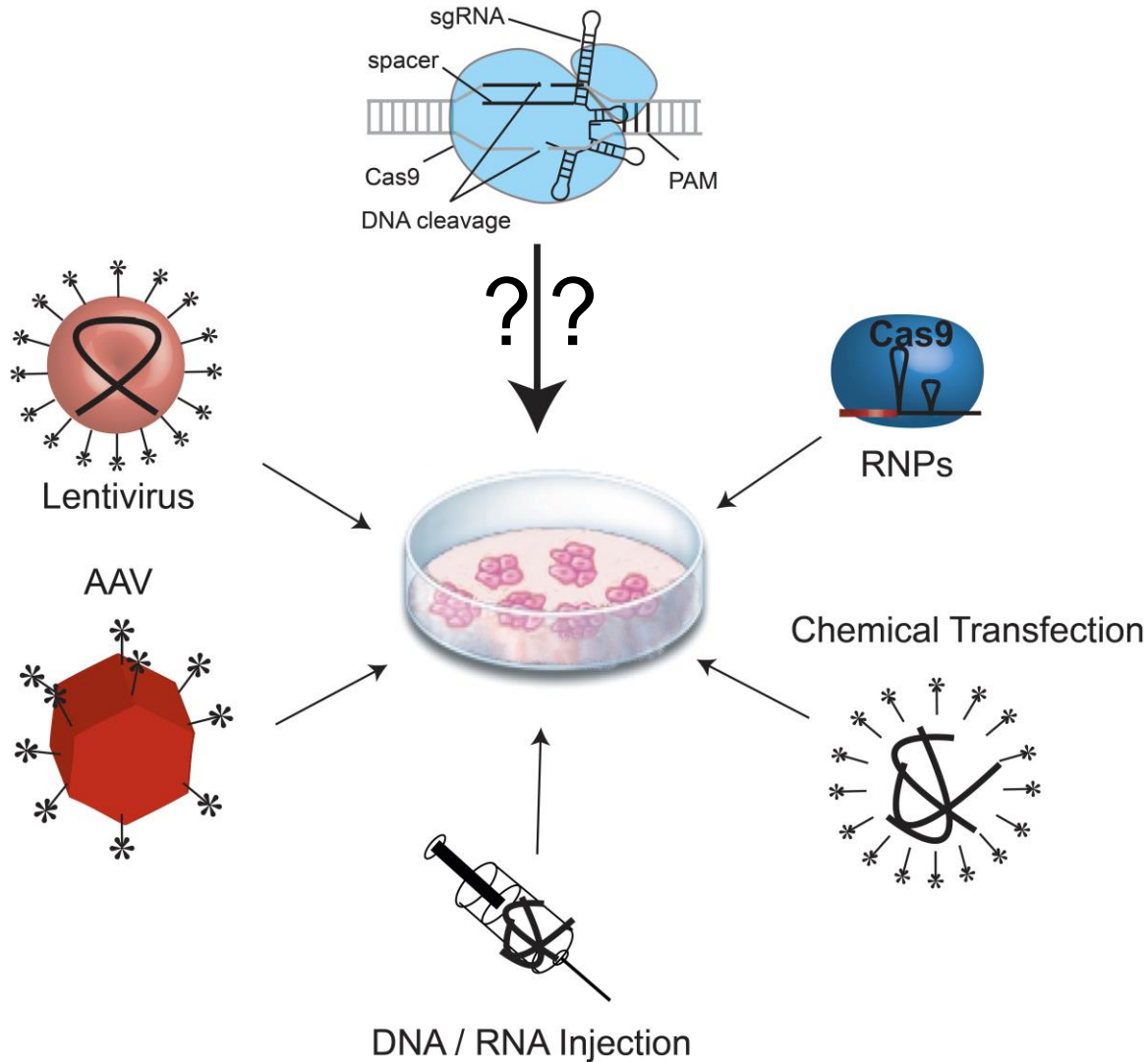
Genome Editing besitzt eine variable Effizienz.

Bei der Planung einer Therapie ist daher die Effizienz sowie der Einfluss auf die Zelle zu betrachten:

- A) Besitzt die veränderte Zelle einen Wachstumsvorteil durch die Veränderung?
- B) Besitzt die veränderte Zelle einen Wachstumsnachteil durch die Veränderung?
- C) Die Veränderung hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum

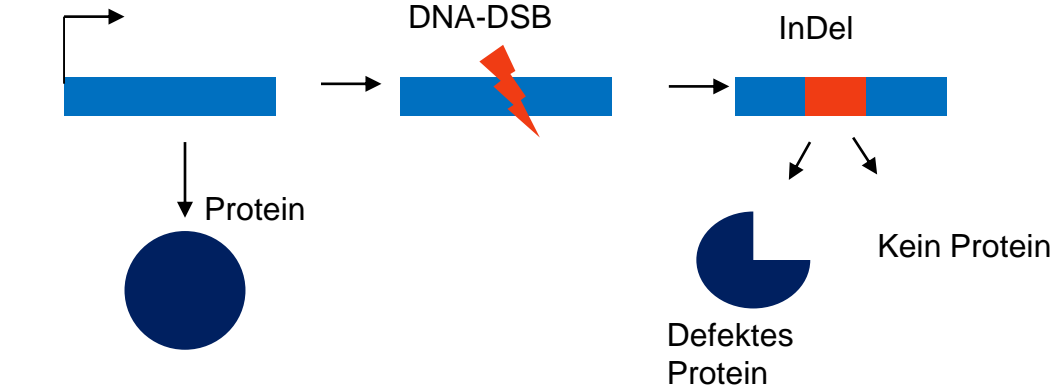
→ Können genug Zellen mit korrigiertem Defekt generiert werden um den Defekt zu beheben?

CRISPR-Cas9 Anwendung - Zulieferung

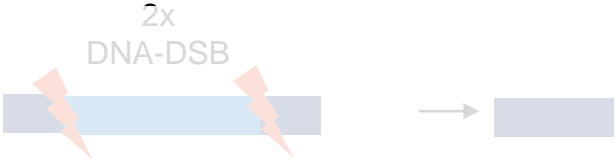


Genome Editing: Anwendungen

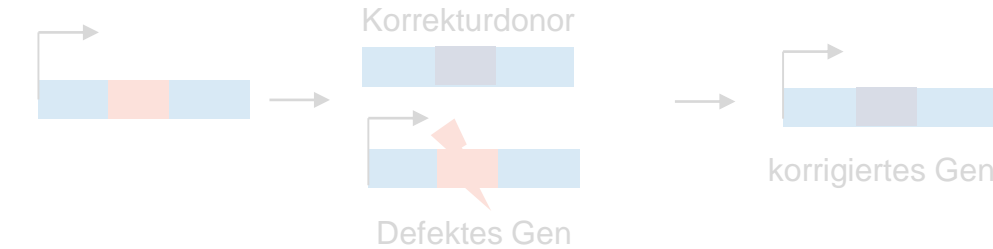
Inaktivierung von Genen



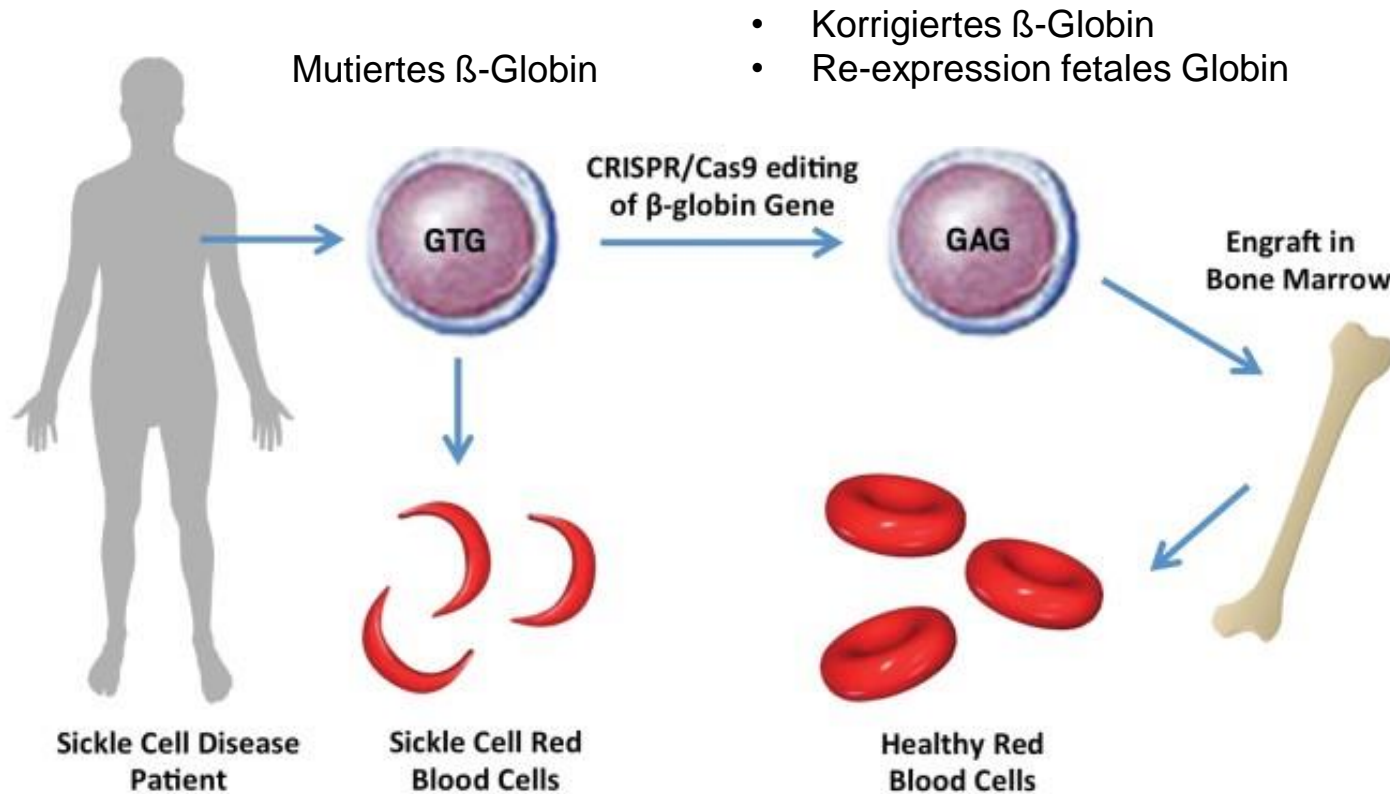
Entfernen von
Genbestandteilen



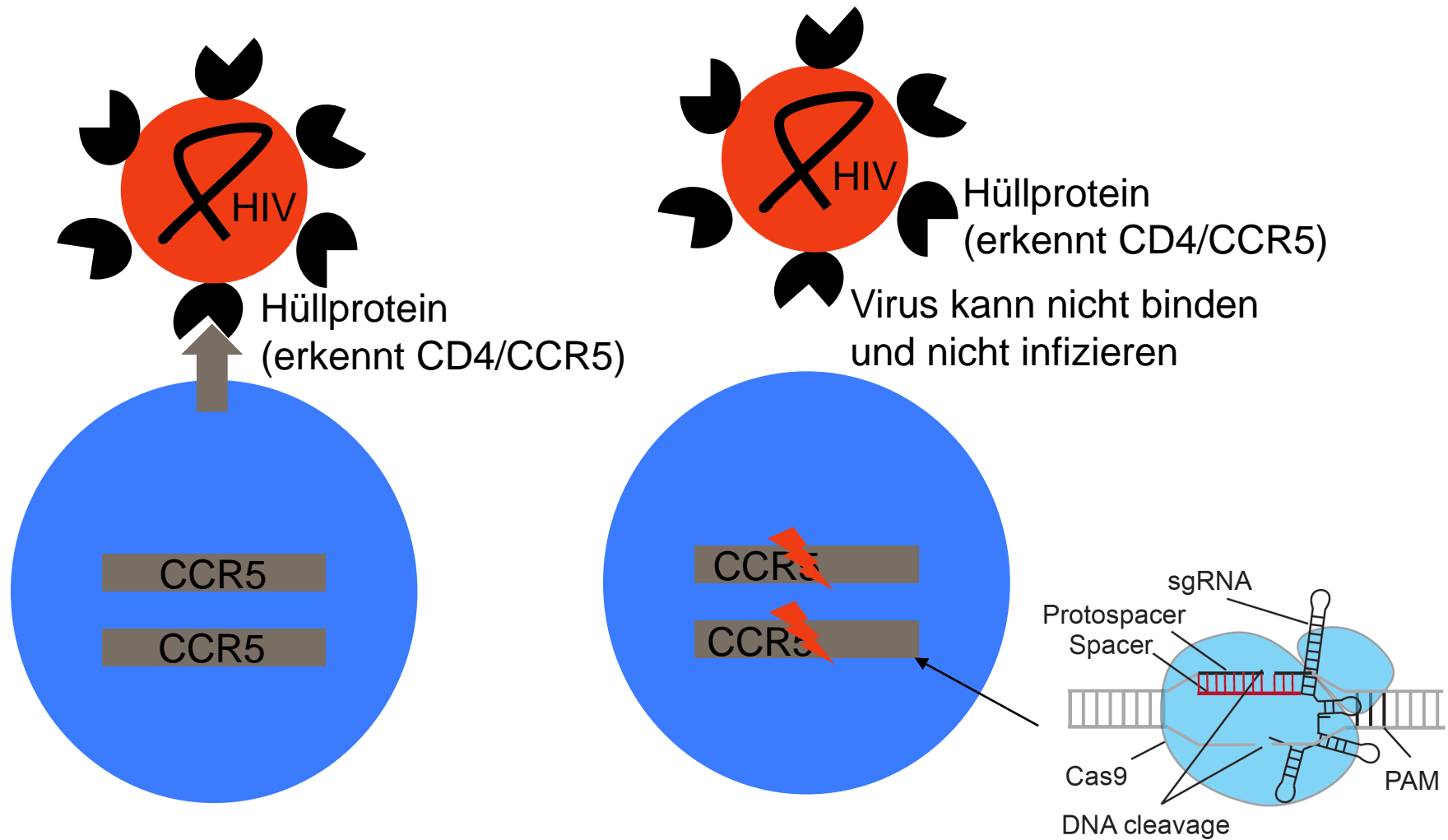
Korrektur von Genen



Behandlung der Sichelzellanämie



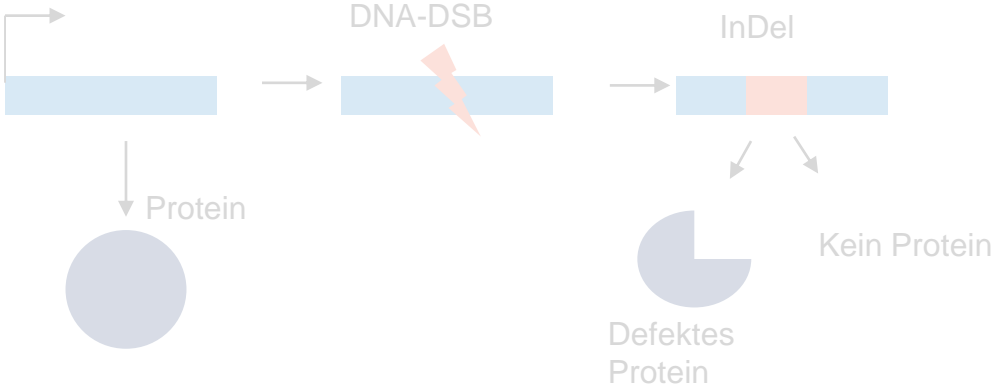
HIV Resistenz durch Genomeditierung



- CCR5: Ko-Rezeptor von HIV
- CCR5 Δ 32 in 3% der mitteleuropäischen Bevölkerung vermittelt Resistenz

Genome Editing: Anwendungen

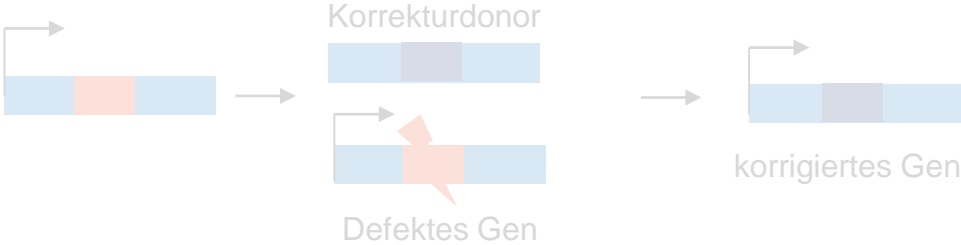
Inaktivierung von Genen



Entfernen von
Genbestandteilen

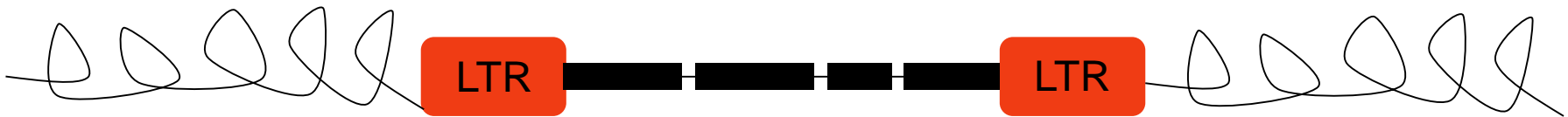


Korrektur von Genen



HIV Exzision mit CRISPR-Cas9

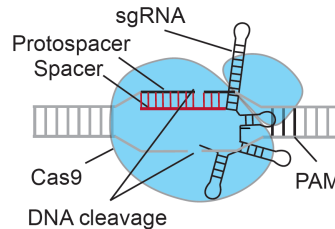
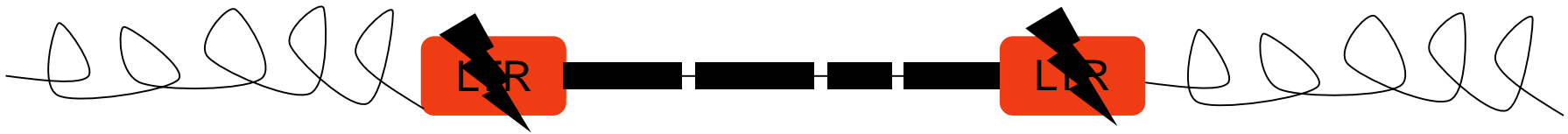
Latenter HI-Virus im Genom bildet potentiell dauerhafte Gefahr der Re-Infektion



- HIV: Keine Behandlungsoptionen für latenten Virus
- CRISPR-Cas9 kann latent Infektion beheben
- Resistenz durch Abwehr neu eindringender Viren

HIV Exzision mit CRISPR-Cas9

Latenter HI-Virus im Genom bildet potentiell dauerhafte Gefahr der Re-Infektion
→ Exzision mittels CRISPR-Cas9



- HIV: Keine Behandlungsoptionen für latenten Virus
- CRISPR-Cas9 kann latent Infektion beheben
- Resistenz durch Abwehr neu eindringender Viren

Genherapie Duchenne Muscular Dystrophy

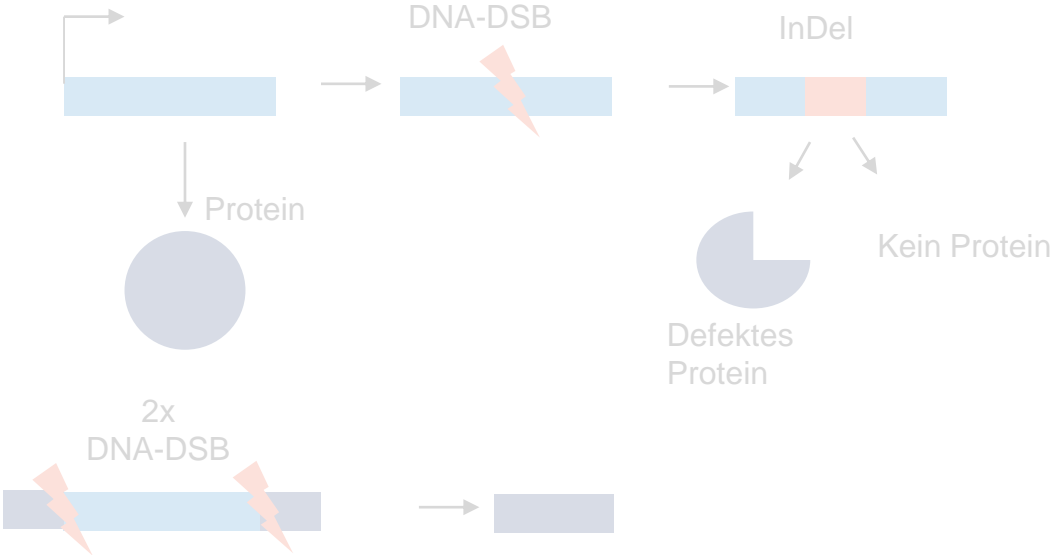
Genkorrektur durch partielles Entfernen eines Genbestandteils und folgender Wiederherstellung des Leserasters

- Durchgeführt in iPSC Zellen
 - In vivo mittels AAV
- Siehe Referenzen

- in iPSC
- in vivo (lokal)
- alle Muskeln betroffen

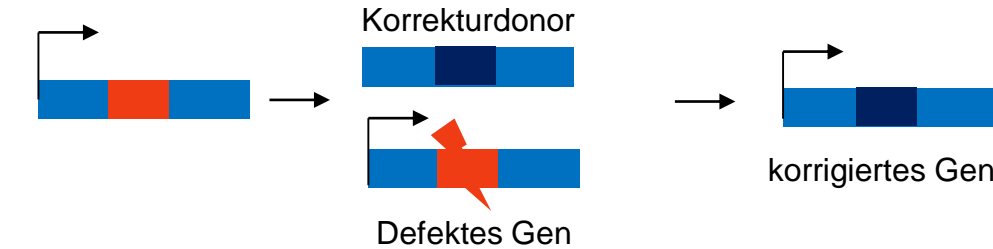
Genome Editing: Anwendungen

Inaktivierung von Genen



Entfernen von
Genbestandteilen

Korrektur von Genen

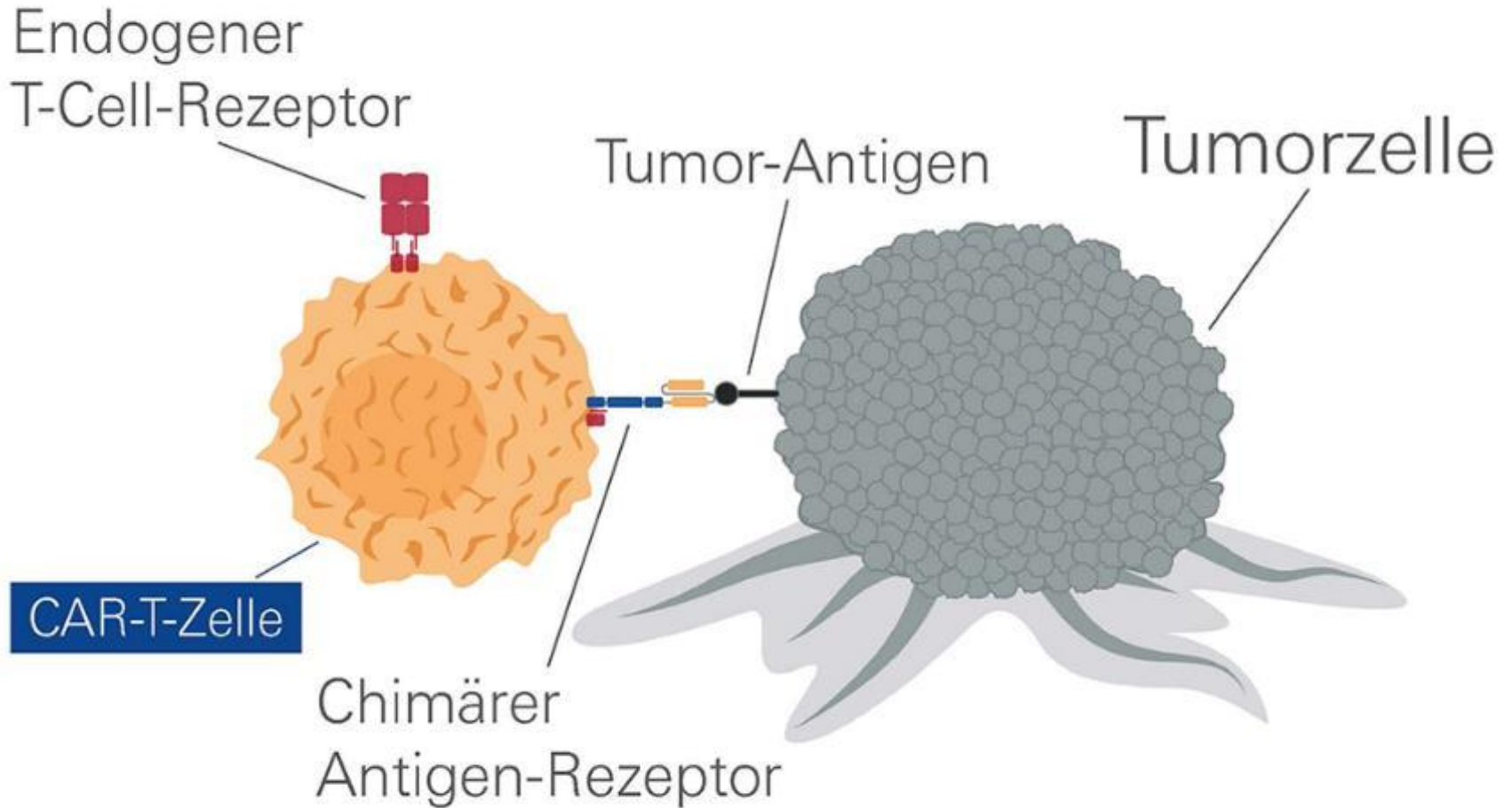


Genherapie: Hereditary Tyrosinemia

- Genkorrektur des FAH (fumarylacetoacetate hydrolase) Gens
- korrigiert Tyrosin-Abbau und verhindert Leberschäden

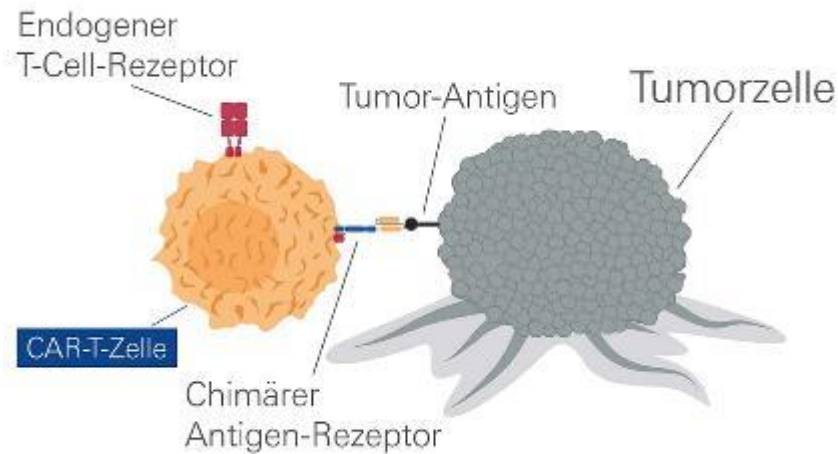
- Das Prinzip der Genomeditierung
- Verfügbare Technologien
- Off-Target Aktivität und Lösungsansätze
- **CRISPR-Cas9 Applikationen**
 - Gentherapie
 - **CAR-T Zellen**
 - Keimbahnmodifikation
 - Gene Drive

CAR T-Zellen



Chimeric Antigen Receptor T-Zellen

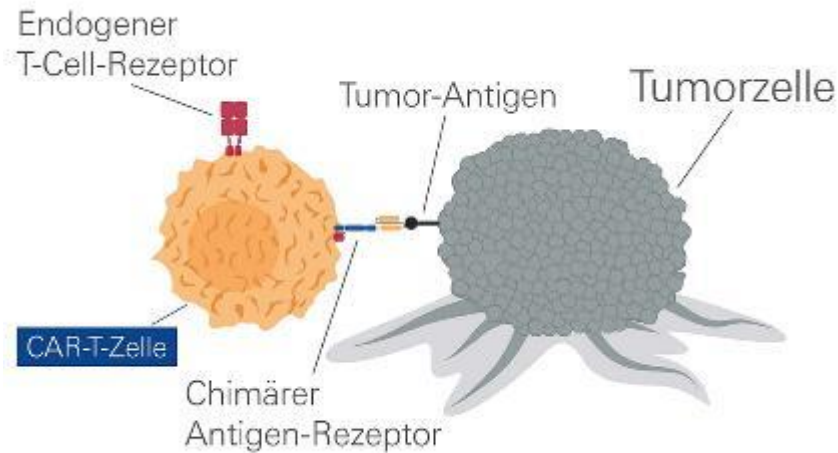
CD19 CAR T-Zellen – pädiatrische B-ALL



- Anwendung des CD19-CAR in pädiatrischer ALL
- >60 Patienten behandelt
- ~60% overall survival
- Siehe Maude et al.

Chimeric Antigen Receptor T-Zellen

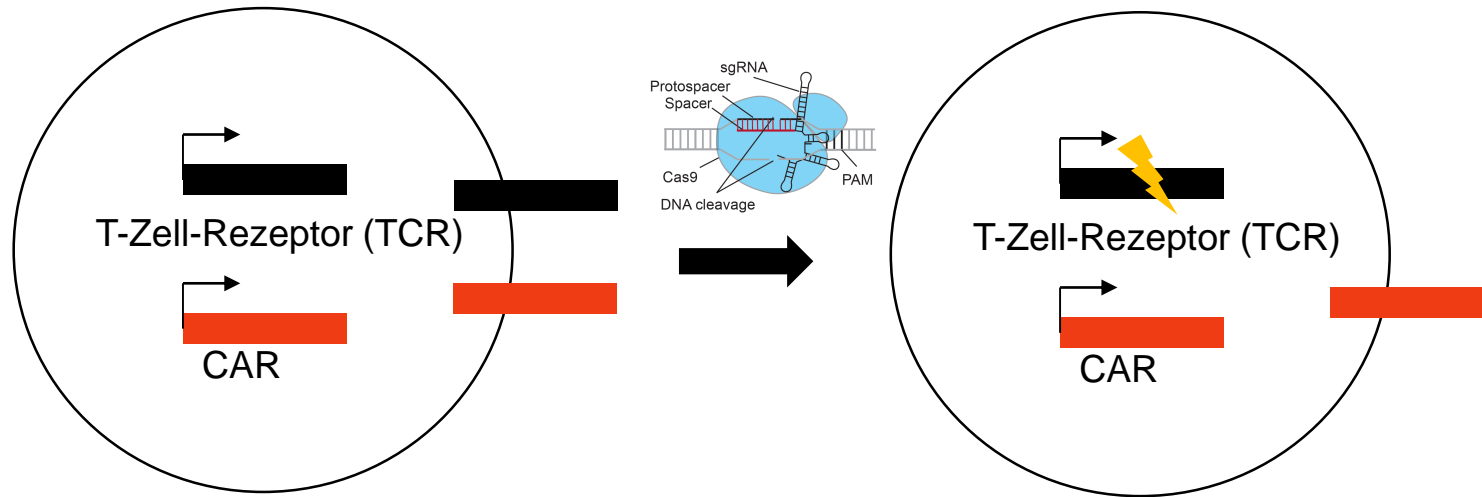
CD19 CAR T-Zellen – pädiatrische B-ALL



Krebs	Antigen
Lymphom/ Akute Lymphoblastische Leukemie	CD19 CD20 CD22
Multiples Myelom	BCMA NG2D
Akute Myeloische Leukemie	CD33 CD123
Glioblastom	EGFR IL13Ra
Pancreas Karzinom	MSLN
Brustkrebs	HER2
Darmkrebs	HER2 CEA

Chimeric Antigen Receptor T-Zellen

CAR T-Zellen & ALL



Aktuell:

- CAR wird mittels lentiviralen Gentransfer in die Zelle eingebracht
- additiv
 - T-Zelle trägt CAR und TCR auf der Oberfläche
 - Aktivierung des CAR stimuliert T-Zelle, welche dann durch den TCR autoimmun werden kann

Genome Editing:

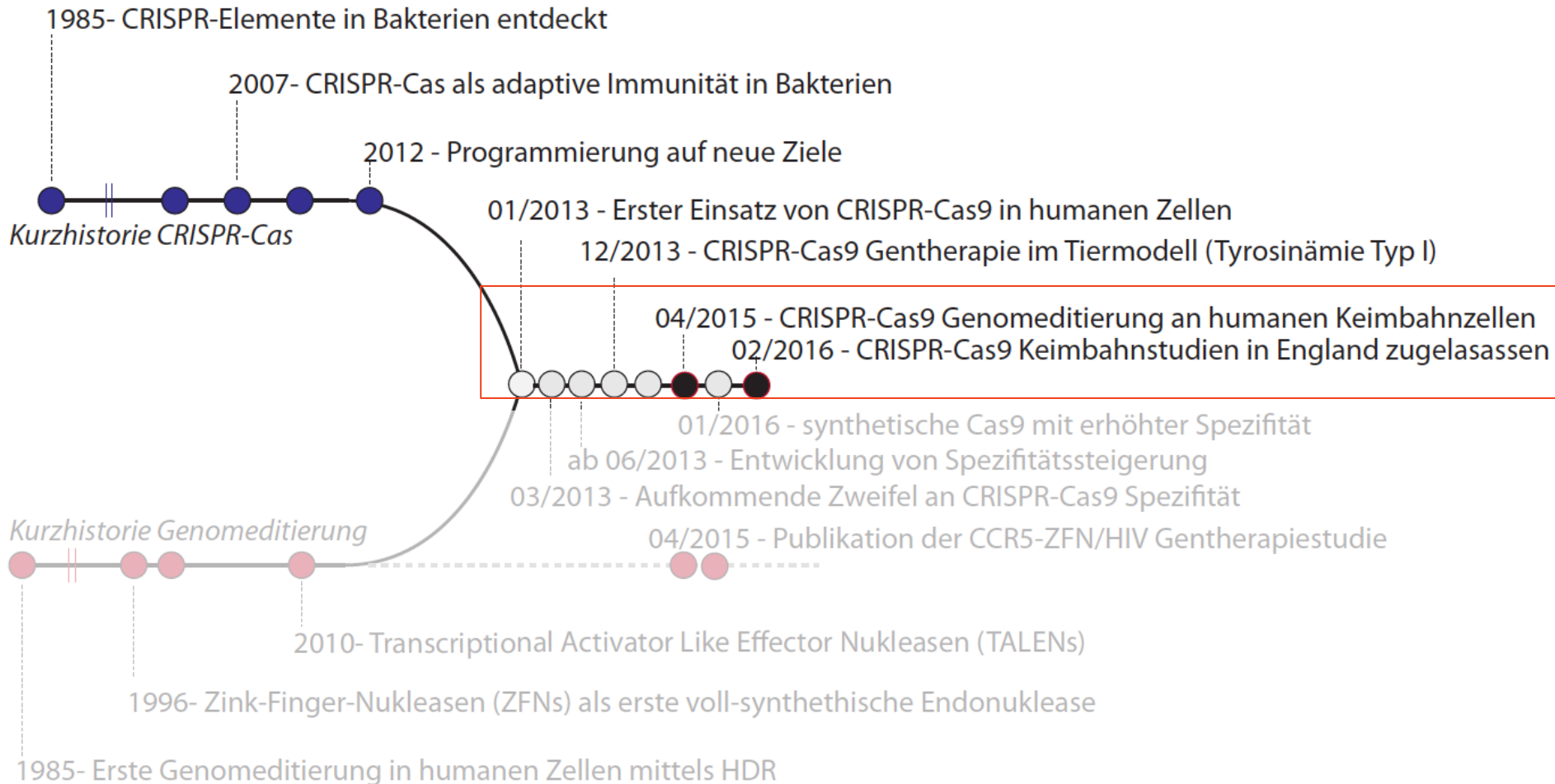
- TCR-knock-out oder CAR knock-in in den TCR Lokus
- T-Zelle trägt nur CAR
 - Theoretisch T-Zellen von Fremdspender möglich

Weitere Anwendungen:

z.B. PD1 knock out (Immuntherapie)

- Das Prinzip der Genomeditierung
- Verfügbare Technologien
- Off-Target Aktivität und Lösungsansätze
- **CRISPR-Cas9 Applikationen**
 - Gentherapie
 - CAR-T Zellen
 - **Keimbahnmodifikation**
 - Gene Drive

CRISPR-Cas9 - Applikationen



Modifikation embryonaler Zellen -CRISPR-Cas9 in humanen Zygoten-

RESEARCH ARTICLE

CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid embryos

Puping Liang, Yan
Yuxi Chen, Yujing

Guangdong Province
Engineering of the Mir

✉ Correspondence: P

Received March 30, 2015 Accepted April 1, 2015

Durchschnittliche Schnittrate

Rekombination mit homologem Gen (HBD)

Unerwartete Off-Target Aktivität

v, Xiaowei Xie,
ou✉, Junjiu Huang✉

ey Laboratory of Gene
u 510275, China

- β -Thalassämie Gentherapie Ansatz
- Mikroinjektion von Cas9 mRNA und gRNA
- 3PN Zygoten aus Cryokonservierung

Modifikation embryonaler Zellen -CRISPR-Cas9 in humanen Zygoten-

ARTICLE

doi:10.1038/nature23301

Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Hong Ma^{1*}, Nuria Marti-Gutierrez^{1*}, Sang-Wook Park^{2*}, Jun Wu^{3*}, Yeonmi Lee¹, Keichiro Suzuki³, Amy Koski¹, Dongmei Ji¹, Tomonari Hayama¹, Riffat Ahmed¹, Hayley Darby¹, Crystal Van Dyken¹, Ying Li¹, Eunju Kang¹, A.-Reum Park², Daesik Kim⁴, Sang-Tae Kim², Jianhui Gong^{5,6,7,8}, Ying Gu^{5,6,7}, Xun Xu^{5,6,7}, David Battaglia^{1,9}, Sacha A. Krieg⁹, David M. Lee⁹, Diana H. Wu⁹, Don P. Wolf¹, Stephen B. Heitner¹⁰, Juan Carlos Izpisua Belmonte^{3§}, Paula Amato^{1,9§}, Jin-Soo Kim^{2,4§}, Sanjiv Kaul^{10§} & Shoukhrat Mitalipov^{1,10§}

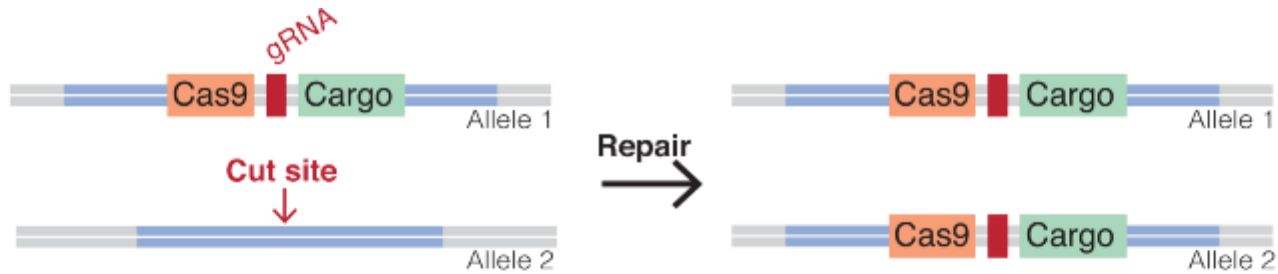
Hohe Genkorrektur

Mechanistische Untersuchungen

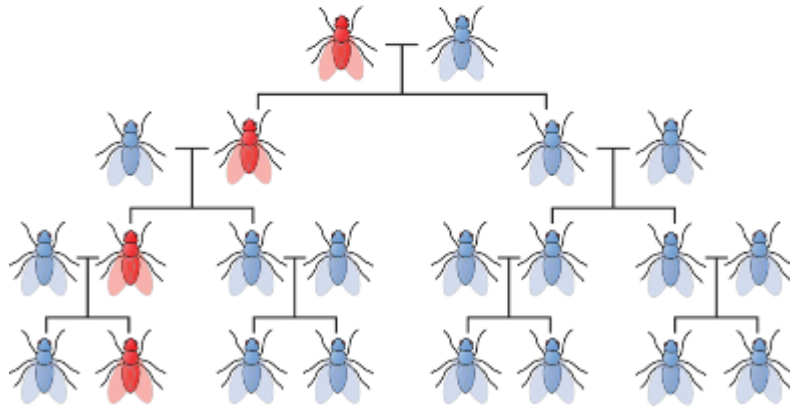
keine Off-Target Aktivität

- Das Prinzip der Genomeditierung
- Verfügbare Technologien
- Off-Target Aktivität und Lösungsansätze
- **CRISPR-Cas9 Applikationen**
 - Gentherapie
 - CAR-T Zellen
 - Keimbahnmodifikation
 - **Gene Drive**

Gene Drive

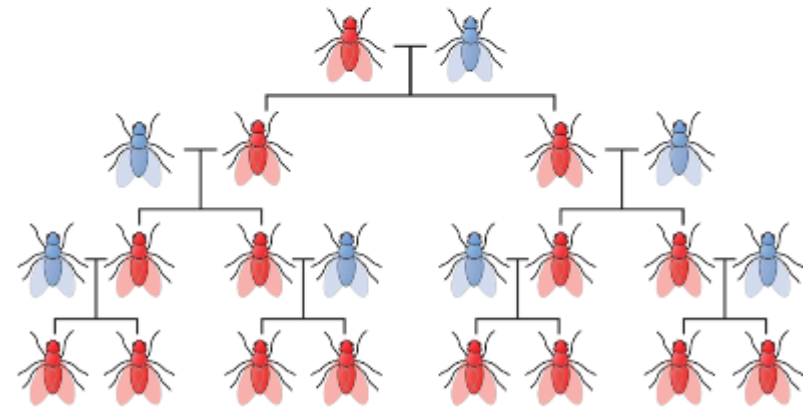


Normal inheritance



Altered gene does not spread

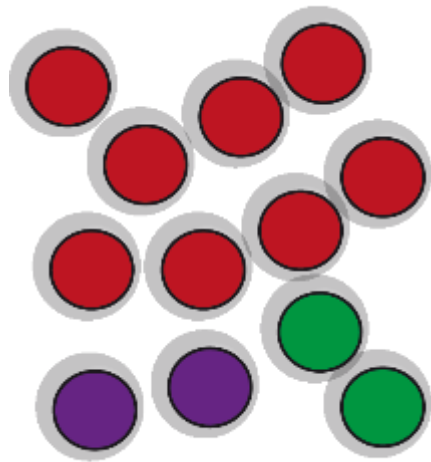
Gene drive inheritance



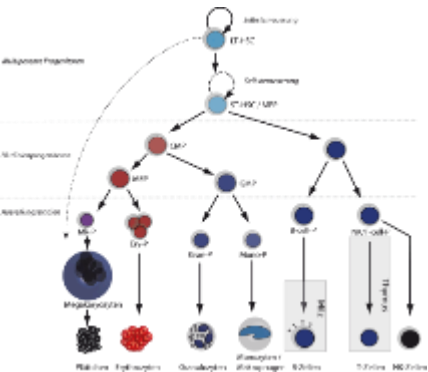
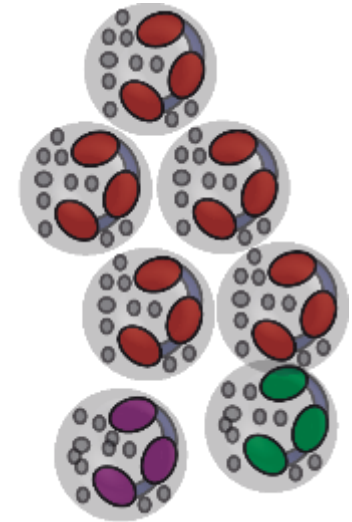
Altered gene is always inherited

- Das Prinzip der Genomeditierung
- Verfügbare Technologien
- Off-Target Aktivität und Lösungsansätze
- **CRISPR-Cas9 Applikationen**
 - Gentherapie
 - CAR-T Zellen
 - Keimbahnmodifikation
 - Gene Drive
 - **Krebsforschung**

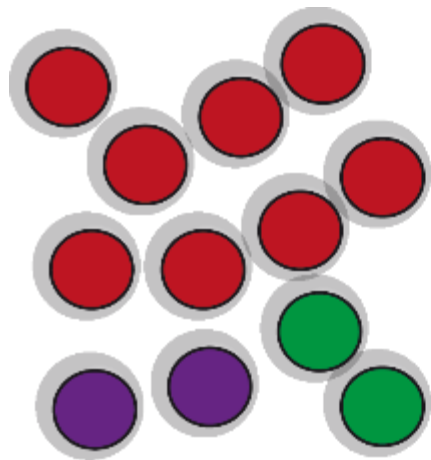
Selbsterneuerung und Differenzierung: Schlüssel zur Transformation



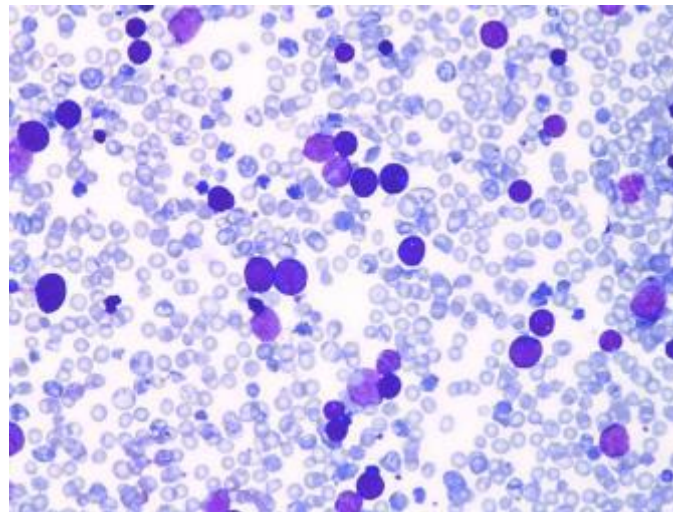
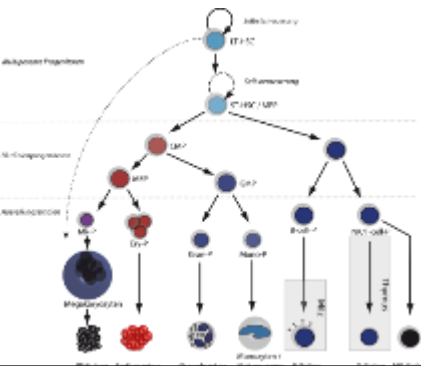
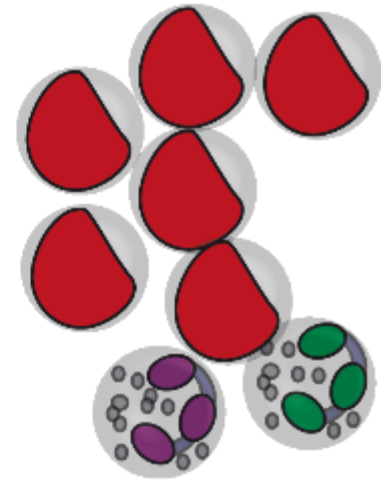
Hämatopoetische
Stammzellen



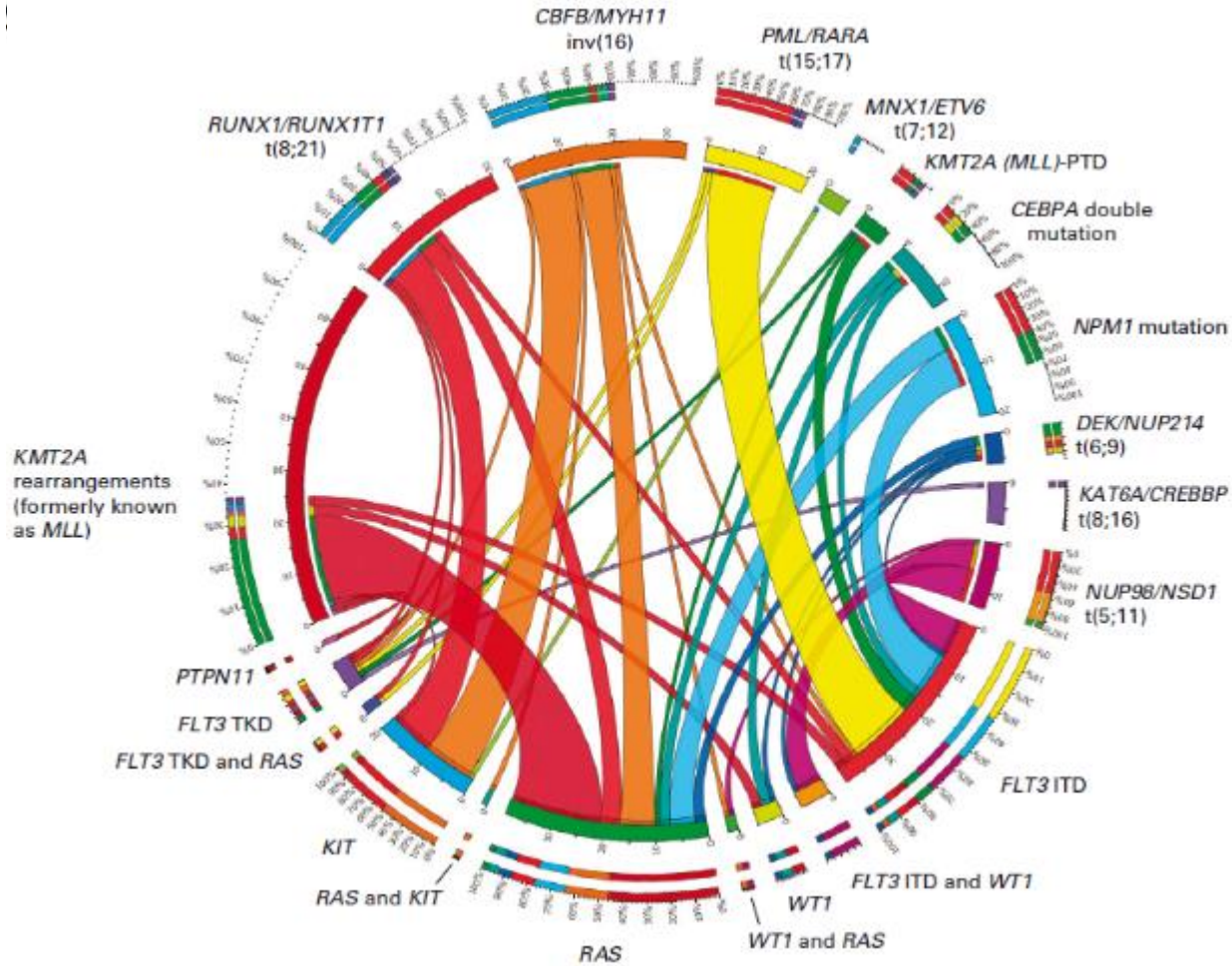
Selbsterneuerung und Differenzierung: Schlüssel zur Transformation



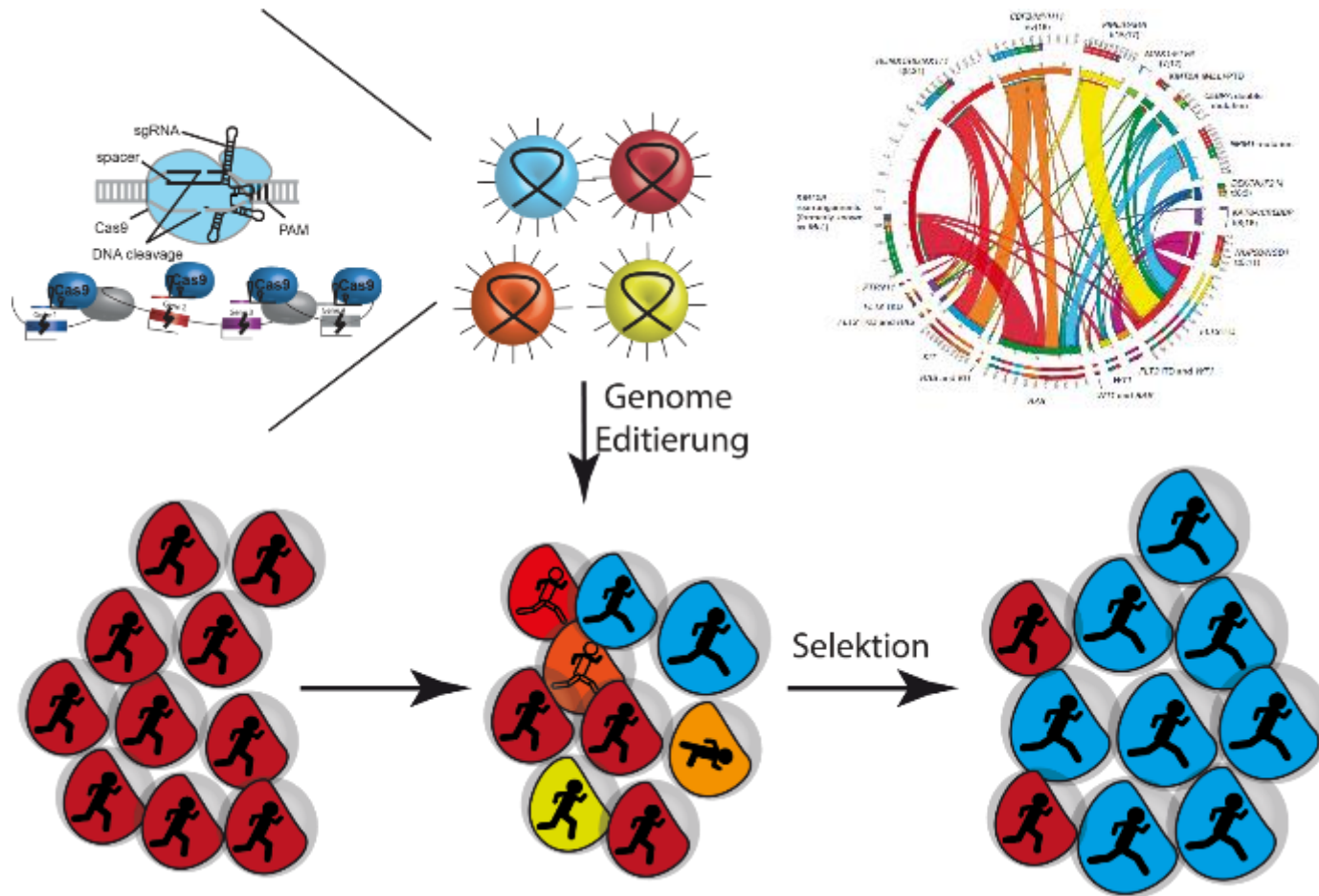
Hämatopoetische
Stammzellen



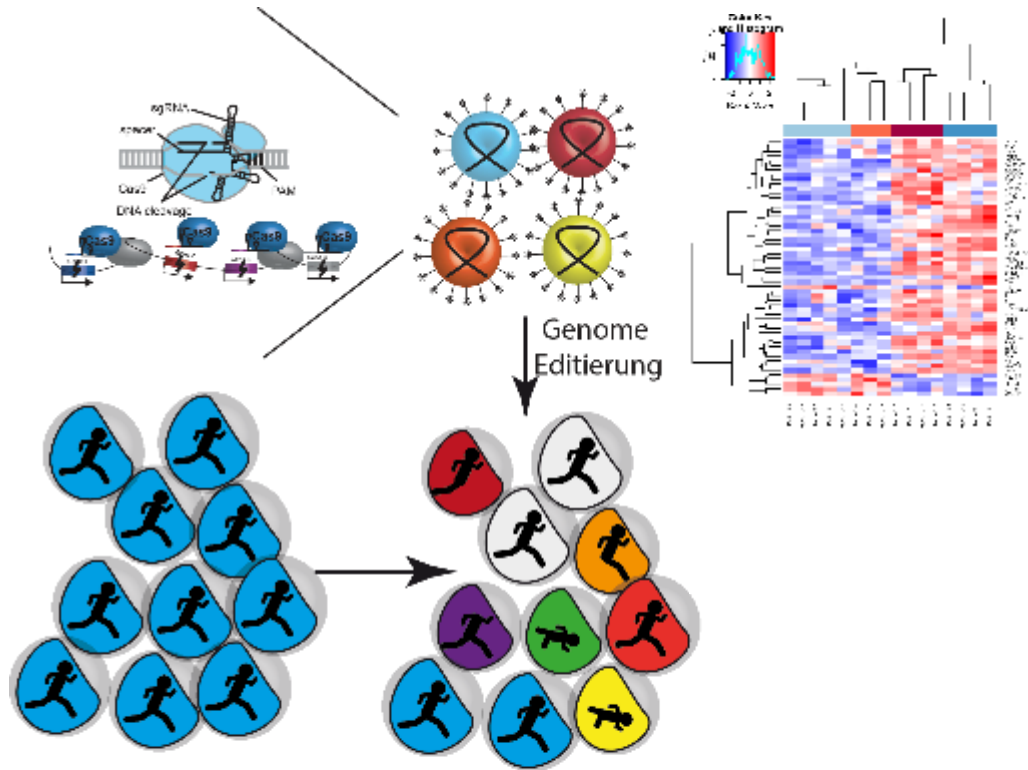
Die Synergie der Mutationen



Identifikation onkogener Kooperation in der Onkogenese



Aufdeckung neuer Therapieziele in der AML durch genetische Perturbation



Fazit

- CRISPR-Cas9 ist in jedem bisher getesteten Organismus anwendbar
- Nur ein kleiner Teil der vorhandenen Technologien wird bisher für therapeutische Ansätze genutzt
- Genome Editierung hat das Potential nahezu jede angeborenen, genetische Krankheit zu heilen
- Genome Editierung findet Einsatz bei Infektionskrankheiten
- Genomeditierte CAR T-Zellen stellen eine vielversprechende Behandlungsmethode in der Krebstherapie dar
- Gene Drive ermöglicht die schnelle Veränderungen ganzer Populationen (z.B. Malariaresistente Mücken)
- Modellierung von Erkrankungen und genetische Screenings werden zur Entwicklung pharmakologischer Behandlungswege beitragen

MHH

JRG PHO (Heckl)

Dorit Schneider
Maurice Labuhn
Sabine Knöb
Sofia Gialesaki
Lukas Matthes
Jana Reimer
Farina Strüwe
Katrin Teich
Sonja Groß

UKH

PHO Halle

Jan-Henning Klusmann
Oriol Alejo
Michelle Ng
Raj Bhayadia
Lonneke Verboon

MHH

PHO:

Christian Kratz

Mol Pathology:

Prof. B. Schlegelberger
Gudrun Göhring

Exp. Hematology

Axel Schambach
Adrian Schwarzer
Felix Adams

Hematology

Michael Heuser

MPI Infection Biology:
Emmanuelle Charpentier
Ines Fonfara



MAX PLANCK GESELLSCHAFT

AML-BFM Group:
Dirk Reinhardt
Ursula Creutzig

Universitätsklinikum Ulm
Prof. K. Döhner
Jan Krönke

MPI Molecular Genetics:
Marie-Laure Yaspo
Sören Matzk



MAX PLANCK GESELLSCHAFT

CRI at UTSW:
Jian Xu
Zhimin Guo
Yuxuan Liu



gefördert durch **Max-Eder Programm**
 **Deutsche Krebshilfe**
HELLEN. FORSCHEN. INFORMIEREN.

Deutsche
Forschungsgemeinschaft

DFG



Verein für krebskranke Kinder
Hannover e.V.