

T-Zellen nach Maß

Lukas T. Jeker

Zellen, Gewebe und Organe können als „lebendige Medizinalprodukte“ verwendet werden. Revolutionäre Entwicklungen der modernen Gentechnologie ermöglichen präzise „Genchirurgie“. Dies erlaubt einerseits eine permanente Korrektur ausgewählter genetischer Krankheiten. Andererseits können Zellen zunehmend für medizinische Zwecke umprogrammiert und mit Funktionen nach Maß ausgerüstet werden. Blutzellen und im Speziellen T-Zellen eignen sich hierzu besonders. Auf Grund eines soliden Verständnisses grundsätzlicher zellbiologischer Prinzipien können zunehmend synthetische Schaltkreise entworfen werden, die spezifische Funktionen in Zellen ermöglichen. Durch die Kulmination dieser Fortschritte entstehen bisher ungeahnte Möglichkeiten, neuartige medizinische Therapien zu entwickeln.

Schlüsselwörter: Programmierbare T-Zelltherapie, CAR-T, Genome Engineering, CRISPR/Cas, Synthetische Biologie

Zelltherapie: ein altes, erfolgreiches Konzept

Zellen, Gewebe und Organe werden schon seit geraumer Zeit als lebende Therapeutika eingesetzt. So mildern Erythrozyten und Blutplättchen regelmäßig Leid und retten manches Leben. Auch Knochenmark und angereicherte hämatopoetische Stammzellen (HSZ) werden heute routinemäßig transplantiert, wobei die Zellen hauptsächlich unverändert transplantiert werden. Es gibt nur vereinzelt Berichte von Zellen, die vor einer Transplantation genetisch manipuliert wurden. So wurden beispielsweise um die Jahrtausendwende HSZ von Patienten mit *severe combined immunodeficiency syndrome* (SCID) viral mit einem Wildtyp-Transgen transduziert, um einen

zugrunde liegenden Gendefekt zu beheben. Die genetisch veränderten HSZ wurden anschließend transplantiert, was in der Tat zu einer permanenten Heilung führte [1]. Diese Resultate zeigen das enorme Potenzial von Gen- und Zelltherapien. Leider entwickelten jedoch mehrere der behandelten Patienten sekundär eine akute Leukämie und einer der Patienten starb [2]. Diese Extreme zeigen, dass manche genetische Krankheiten geheilt werden können, zeigen aber auch mögliche Gefahren auf.

Technik des Einbringens der Transgene limitiert breitere Anwendung

Die meisten Techniken, mit denen eukaryotische Zellen permanent genetisch verändert werden können, beruhen

bis vor Kurzem auf einer viralen Transduktion der Zielzelle. Retro- oder Lentiviren, die Säugerzellen infizieren und ihr Genom in das Säuger-genom einbauen können, wurden biotechnologisch so angepasst, dass sie sich nach dem Einbau im Genom nicht weiter replizieren können. Dies verhindert eine unkontrollierte Vermehrung der Viren, die als Vektoren dienen. Bisher war es aber nicht möglich, zu steuern, wo ein bestimmtes Transgen ins Genom eingebaut wird. Die Integration der Transgene erfolgt also zufällig. Das Zufallsprinzip birgt jedoch Gefahren, z. B. wenn ein Transgen in ein Tumorsuppressorgen integriert und dieses dadurch zerstört. Deshalb sollte zufällige Genomintegration für therapeutische Zwecke nach Möglichkeit verhindert wer-

den [3]. Bei den von Leukämie betroffenen SCID-Patienten stellte sich heraus, dass die viralen Promotoren Onkogene der Wirtszellen aktivierten. Neuere Generationen viraler Vektoren sind nun zwar sicherer, die Integration kann aber weiterhin nicht gesteuert werden, wodurch eine potenzielle Gefahr bestehen bleibt. Dieser Prozess ist für hämatopoetische Zellen, v. a. Immunzellen, speziell gefährlich, da sich diese tausendfach vermehren können. Eine Risikoabschätzung zwischen Grunderkrankung und möglicher Therapiekomplicationen ist deshalb zwingend.

Eine weitere Limitierung viraler Vektoren ist die beschränkte Größe der Transgene, die mittels viralem Vektor in eine Zelle eingebracht werden können. Es ist zwar möglich, einzelne Gene einzubringen, eine Kombination mehrerer Gene kann jedoch schwierig oder unmöglich sein.

CAR-T: ein revolutionäres Konzept

In den späten 1980er-Jahren entwickelte die Gruppe um Zelig Eshhar ein revolutionäres Konzept, um die Spezifität der T-Zellrezeptoren (TZR) umzuprogrammieren. T-Zellen exprimieren hochspezifische TZR, erkennen das zugehörige Antigen aber nur im Kontext von HLA-Molekülen, die auf körpereigenen

Zellen exprimiert sind. Da HLA-Moleküle interindividuell sehr unterschiedlich sind, können T-Zellen für therapeutische Zwecke nicht ohne weiteres von einem Spender auf einen Empfänger übertragen werden. Um eine hohe, definierte Spezifität zu programmieren und gleichzeitig von HLA unabhängig zu werden, kombinierten die Forscher die variablen, antigen-erkennenden Regionen eines Antikörpers mit denjenigen TZR-Teilen, die für die Signalübertragung in der T-Zelle notwendig sind. Der Trick liegt darin, dass Antikörper Oberflächenproteine ohne HLA-Restriktion erkennen. Erstaunlicherweise funktionieren solche chimären Rezeptoren tatsächlich. Da sie chimär aus einem B-Zellrezeptoranteil (Antikörper) und TZR zusammengesetzt sind, werden sie chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) genannt. Eine ausführliche Besprechung wurde kürzlich in diesem Journal publiziert [4]. CAR T-Zelltherapien führten zu nie dagewesenen klinischen Erfolgen bei Patienten mit CD19-positiven B-Zelltumoren [5, 6]. Da das Prinzip nun klinisch mehrfach nachgewiesen und die CAR-Therapie zur Behandlung von B-Zell-Lymphomen kürzlich zugelassen wurde [7], werden in über 200 klinischen Studien weitere Anwendungen getestet.

Limitierungen von CAR-T-Zellen

Damit diese neue Therapieform für viele Patienten mit diversen Krankheiten sicher und ökonomisch skaliert werden kann, müssen noch große Hürden übersprungen werden. Bis heute sind zwei CAR-T-Produkte als kommerzielle Therapeutika von den regulatorischen Behörden zugelassen. Diese werden jeweils für einzelne Patienten maßgeschneidert. T-Zellen des Patienten werden entnommen. In diese werden dann ex vivo mittels viraler Transduktion die CARs eingebracht. Anschließend werden die umprogrammierten CAR-T-Killerzellen als therapeutisches, körpereigenes Produkt in den Körper zurückgeführt. Wie oben erwähnt, wäre es wünschenswert, wenn die virale Transduktion durch gezielte Insertion in einen bestimmten, sicheren Genom-Lokus ersetzt werden könnte. Zudem wäre es sinnvoll, vorgefertigte, allogene CAR-T-Zellen anzuwenden. Aktuell dauert es mehrere Wochen, bis ein CAR-T-Produkt ex vivo hergestellt ist. Schon vorgefertigte CAR-T-Produkte wären schneller verfügbar, was insbesondere bei aggressiven Krebsformen ein Vorteil wäre. Dieses Verfahren wäre auch günstiger, da von einem Spender Zellprodukte für mehrere Empfänger hergestellt werden könnten. Hierfür gilt es allerdings immunologische Hürden zu eliminieren.

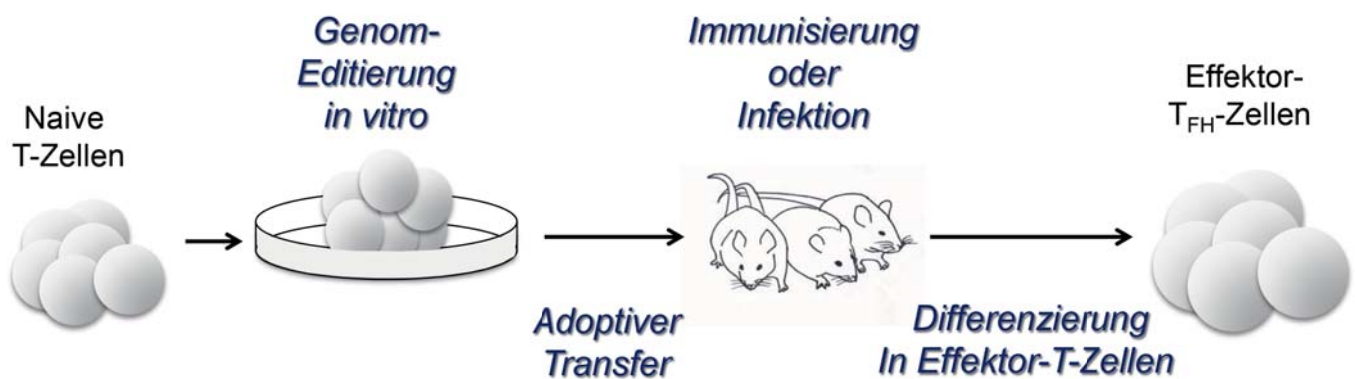


Abb. 1: Realität – das Genom von T-Zellen kann relativ einfach in vitro editiert werden.

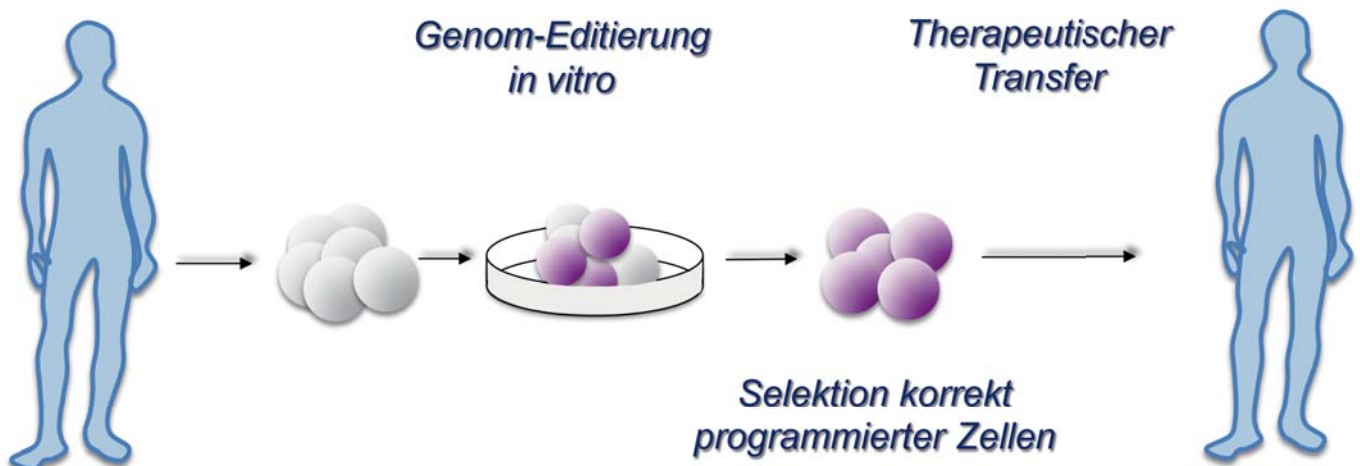


Abb. 2: Zukunftsvision – Zellen als programmierbare, therapeutische Medizinalprodukte.

Einerseits können die CAR-T-Zellen im Empfänger Schaden anrichten, wenn ihr endogener T-Zellrezeptor nicht ausgeschaltet wird. Andererseits können die allogenen CAR-T-Zellen vom Empfänger abgestoßen werden. Zudem sollte die CAR-T-Zell-Aktivität nach dem Transfer in den Empfänger kontrollierbar sein, um *On-* oder *Off-target*-Nebenwirkungen zu behandeln. Wünschenswert wäre auch eine Programmierbarkeit der Wanderung in vordefinierte Körperrischen, z. B. in spezifische Tumoren, sowie die Programmierbarkeit von Effektorfunktionen, wie z. B. der Zytokinsekretion. Nicht-hämato-logische Tumoren bilden lokal ein immunsuppressives Milieu. Deshalb stellte sich die Adaptation des CAR-T-Zell-Konzeptes für solide Tumoren als speziell schwierig heraus. Entsprechend wären auch hierfür programmierbare Strategien erwünscht, welche die CAR-T-Zellen gegen die tumorinduzierte Immunsuppression resistent machen.

Genome Engineering vereinfacht Programmierbarkeit von T-Zellen

Das gezielte Verändern des Genoms (*Genome Engineering*) in Säugerzellen ist seit Jahren möglich, war aber bisher äußerst aufwendig. Die Entdeckung und

Entwicklung der CRISPR/Cas-Systeme als biotechnologische Werkzeuge hat dies schlagartig verändert [3]. Der große Vorteil der CRISPR/Cas-Systeme liegt darin, dass für den DNA-Schnitt immer das gleiche Enzym (eine Endonuklease) verwendet werden kann. Die am häufigsten verwendete Endonuklease wird Cas9 genannt, es sind aber viele Varianten bekannt. Der Ort des Schnitts wird durch eine spezifische RNA, die sogenannte guide-RNA (gRNA), bestimmt, die synthetisch einfach herzustellen ist. Mittels Computer-Algorithmen kann auf einfache Art eine passende gRNA entworfen und auch gleich über entsprechende kommerzielle Webseiten bestellt werden. Für technische Details möchte ich auf einen kürzlich erschienenen Artikel hinweisen ([8] und Zündorf & Dingermann, diese Ausgabe).

Aufgrund der Einfachheit der CRISPR/Cas-Systeme versuchten wir eine Herangehensweise zu entwickeln, um mittels CRISPR/Cas9 primäre T-Zellen von Mäusen genetisch zu verändern [9]. Wir erforschen komplexe genetische Netzwerke, die in T-Zellen von mikroRNAs kontrolliert werden. Unsere Werkzeuge wurden jedoch den Anforderungen moderner mikroRNA-Forschung nicht

gerecht. Unser Ziel ist es, in einzelnen T-Zellen gleichzeitig mehrere Gene gezielt zu mutieren. Dies ist mit herkömmlichen Methoden nicht bzw. nur sehr langsam möglich. Bisher brauchte es einige Jahre, um das Genom einer Maus gezielt zu verändern. Im Gegensatz dazu können CRISPR/Cas-Mutationen innerhalb von Tagen gesetzt werden. Wir begannen, Oberflächenproteine in T-Zelllinien auszuschalten. Wir wollten ein virusfreies System entwickeln, das uns maximale Flexibilität geben sollte. Da CRISPR/Cas das Genom permanent verändert, bleiben die Mutationen bestehen. Deshalb reicht eine vorübergehende Anwesenheit der Gen-Editierungs-Werkzeuge, um langfristige Effekte zu erzielen. Cas9 und die gRNA müssen nicht permanent als Transgen eingebracht werden. Wir testeten viele verschiedene Methoden, CRISPR-Werkzeuge in die T-Zellen einzuschleusen und entschlossen uns schließlich für eine Elektroporationsmethode. In ersten Tests funktionierten Plasmide gut, mit kommerziellem rekombinantem Cas9 oder Cas9-mRNA waren wir hingegen nicht erfolgreich. In der Zwischenzeit bietet rekombinantes Cas9 jedoch je nach Anwendung eine attraktive Alternative. Wir konnten bald auch

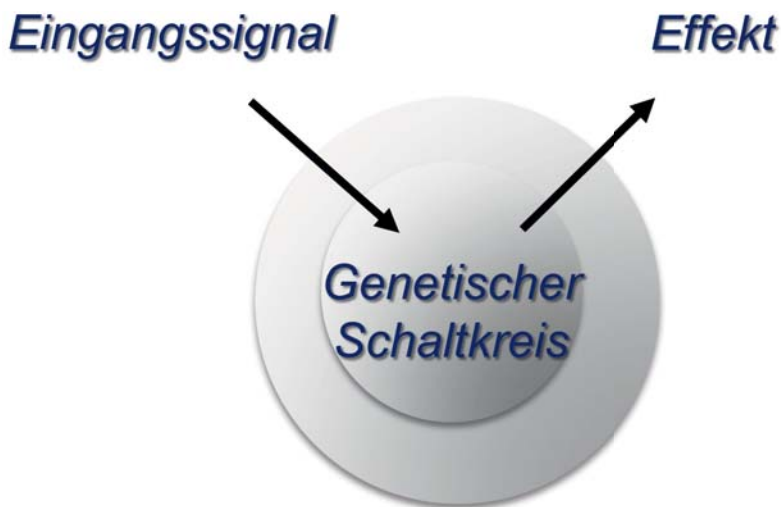


Abb. 3: Zellen als programmierbare, intelligente, therapeutische Medizinalprodukte.

Oberflächenproteine und sogar zwei Gene gleichzeitig in primären T-Zellen mit hoher Effizienz ausschalten. Wichtig ist, dass die editierten T-Zellen nach einer kurzen, 2-tätigen Phase *ex vivo* wieder in Empfängermause transferiert werden können, in denen sie sich größtenteils verhalten wie genetisch unveränderte T-Zellen.

Die transferierten Zellen überleben, wandern in sekundäre lymphoide Organe und verhalten sich nach viraler Infektion der Empfängermause wie erwartet. Wir konnten zeigen, dass eine CRISPR/Cas-induzierte Deletion von ICOS dazu führt, dass weniger folliculäre T-Zellen entstehen. Wir konnten damit zeigen, dass sich die mit unserem Protokoll editierten T-Zellen verhalten, wie das von konventionell hergestellte ICOS-defiziente T-Zellen, d. h. T-Zellen von ICOS-defizienten Mäusen, bekannt ist. Diese Resultate legen nahe, dass die CRISPR-basierte Genom-Editierung in T-Zellen für gewisse Fragestellungen den konventionellen Methoden, um Gene in Mäusen auszuschalten, ebenbürtig ist. Da die Methode aber viel günstiger und schneller ist, können mit weniger Aufwand mehrere Kandidatengene rasch getestet werden.

Für die interessantesten Gene kann dann in einem zweiten Schritt eine Maus mit einer klassischen genomischen oder konditionellen Mutation etabliert werden.

Als nächstes optimierten wir die Methode, um gezielt Punktmutationen in T-Zellen einzubringen und konnten damit in kurzer Zeit ein B-Zell-Epitop in primären Zellen bestimmen. Schließlich verwendeten wir die Methode, um eine krankmachende Genmutation zu korrigieren. Wir wählten dazu eine Mutation im *Foxp3*-Gen, die bei einem Patienten mit dem *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked* (IPEX)-Syndrom auftrat. Der Transkriptionsfaktor *Foxp3* ist für regulatorische T-Zellen (Treg) essenziell, weshalb *Foxp3*-Mutationen zu einer gestörten Immunregulation und dadurch zu einem Syndrom mit multiplen, schweren Organschäden führen kann. Vor Jahren wurde die entsprechende Patientenmutation ins Genom von Mäusen eingebracht, um ein Mausmodell dieser monogenen Erkrankung zu schaffen [10]. Wir entnahmen den kranken Mäusen T-Zellen, reparierten den Gendefekt und konnten zeigen, dass dadurch *Foxp3* wieder exprimiert werden kann. Im Gegensatz zu den ein-

gangs erwähnten SCID-Patienten, bei denen die mutierten Gene durch Wildtyp-Transgene ersetzt werden, erlauben Genom Editierungs-Techniken eine direkte, kausale Korrektur krankmachender Gene.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass es möglich ist, das Genom in primären T-Zellen virusfrei effizient und gezielt zu verändern. Dies ist für Forschungsprojekte von Interesse, um präzise regulatorische genetische Elemente auszuschalten und deren Funktion zu erkunden. Da T-Zellen derzeit große therapeutische Erfolge erzielen, ist aber auch eine Translation zu humanen T-Zellen von großem Interesse.

Translation in das humane T-Zell-Gebiet

Die Translation der CRISPR/Cas-Methode auf humane T-Zellen und hämatopoetische Stammzellen ist bereits weit fortgeschritten. Kollegen aus den USA entwickelten eine effiziente Methode, mittels Elektroporation rekombinantes Cas9 und guide-RNA in humane T-Zellen einzubringen [11]. Damit können effizient Gene ausgeschaltet werden. Weiterhin gelang es auch, gezielte Mutationen einzubringen. Bisher konnten T-Zellen aber nur nach Aktivierung genetisch verändert werden. Vor Kurzem wurde nun aber eine weitere Methode publiziert, mit der auch naive T-Zellen von Mäusen und Menschen ohne Voraktivierung verändert werden können [12]. Dies ermöglicht u. a. die Untersuchung der Funktion eines Genes während der T-Zellaktivierung. Schließlich konnte die Methode weiterentwickelt werden, sodass nun in humanen T-Zellen auch ganze Genmodule gezielt ins Genom eingeschleust werden können. Die Gruppe um Alexander

Marson konnte kürzlich erfolgreich in humanen T-Zellen den endogenen TZR durch einen tumorspezifischen TZR ersetzen [13]. Durch diese rasante methodische Entwicklung kommen wir der erwünschten virusfreien T-Zell Programmierbarkeit über das Ausschalten oder Anschalten eines oder mehrerer Gene und somit der gezielten Programmierung genetischer Schaltkreise in humanen T-Zellen bereits sehr nahe. In Anlehnung an Computer-Programmierung wird solches biologisches Programmieren auch als *genome hacking* umschrieben.

Erfreulicherweise sind humane T-Zellen verhältnismäßig gut in vitro expandierbar. Dies erleichtert es, die Machbarkeit, den Nutzen und die Sicherheit programmierbarer T-Zelltherapien in klinischen Studien zu erforschen. Erste Studien wurden bereits lanciert, Protokolle mit weit komplexeren Veränderungen werden sicherlich folgen.

Offene Fragen und mögliche weitere Entwicklungen

Aufgrund der bahnbrechenden Entwicklungen in verschiedenen Bereichen ist zu erwarten, dass Zelltherapien mit genetisch veränderten Zellen hoch effiziente und zurzeit noch undenkbare Therapiemöglichkeiten eröffnen werden. Methoden für genetische Veränderungen lebender Zellen entwickeln sich rasant. Es kann angenommen werden, dass Zellen bald routinemäßig mittels minimal invasiver Methoden effizient umprogrammiert werden können. Dabei können Zellen zu Tumorkillern, Beschützern transplantierten Organe, mobilen Sensoren, kleinen biosynthetischen Fabriken und vielem mehr programmiert werden.

Ein verbessertes Verständnis verschiedener Immunzellen und optimierte

Expansionsbedingungen werden Zelltherapien weiter Vorschub leisten. Eine kostengünstige, sichere industrielle Produktion individueller oder allogener *Off-the-shelf*-Zellen ist eine weitere Grundvoraussetzung, damit Zelltherapien breit angewendet werden können. Schließlich werden Langzeitstudien auch die Sicherheit von T-Zelltherapien untersuchen und, wo nötig, werden die Zellen mit Sicherheitsvorkehrungen versehen werden.

Aufgrund der Konvergenz der Erforschung und Entwicklung zellulärer Prozesse, der Machbarkeit der Editierung des Genoms und Fortschritten in der Herstellung synthetischer biologischer Schaltkreise, werden Zellen sehr wahrscheinlich zunehmend als "intelligente Therapien" eingesetzt werden [14]. Bei aller Euphorie für die sich abzeichnenden medizinischen Anwendungen darf aber die Grundlagenforschung nicht vergessen werden, damit die nächste Revolution vorbereitet werden kann. Die Entwicklung der revolutionären CRISPR/Cas-Methode basiert auf jahrelanger eher hypothesengenerierender Grundlagenforschung. Bei der Erarbeitung von politischen Richtlinien und der Vergabe von Fördergeldern gilt es deshalb zu bedenken, dass nicht vorausgesagt werden kann, welche grundlegende Forschungsfrage die nächste anwendbare Revolution einläuten wird.

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (SNSF Förderprofessur PP00P3_144860 und PP00P3_176986/1), sowie dem National Institute Of Allergy And Infectious Diseases of the National Institutes of Health, USA (Award Number R56/R01AI106923) unterstützt.

Referenzen

1. Hacein-Bey-Abina, S. et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med.* 2002. 346(16): 1185–1193.
2. Hacein-Bey-Abina, S. et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2010. 363(4): 355–364.
3. Urnov, F. D., *Genome Editing B.C. (Before CRISPR): Lasting Lessons from the "Old Testament". The CRISPR Journal.* 2018. 1(1): 34–46.
4. Abken, H. CAR-T-Zellen: Wie Designer-Immunzellen gegen den Krebs scharf gemacht werden können. *Trillium Immunologie* 2017; 1(1): 43 ff.
5. Park, J. H. et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018. 378(5): 449–459.
6. Maude, S. L. et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018. 378(5): 439–448.
7. Deutscher Ärzteverband GmbH and Ärzteblatt, R. D., US-Zulassung der CAR-T-Zelltherapie: Die teuerste Krebsbehandlung. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/77957/US-Zulassung-der-CAR-T-Zelltherapie-Die-teuerste-Krebsbehandlung-aller-Zeiten>. Accessed 31 May 2018.
8. Herold, M. and Hochheiser, K. Die CRISPR/Cas9-Technologie in der Immunologie. *Trillium Immunologie* 2017; 1(1): 48 ff.
9. Kornete, M. et al. Highly Efficient and Versatile Plasmid-Based Gene Editing in Primary T Cells. *J Immunol.* 2018. 200(7): 2489–2501.
10. Lin, W. et al. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2005. 116(5): 1106–1115.
11. Schumann, K. et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. 112(33): 10437–10442.
12. Seki, A. and Rutz, S. Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. *J Exp Med.* 2018. 215(3): 985–997.
13. Roth, T. L. et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting 2017. DOI: 10.1101/183418. <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/12/07/183418>.
14. Kitada, T. et al. Programming gene and engineered-cell therapies with synthetic biology. *Science.* 2018. 359(6376).



Lukas T. Jeker, MD PhD
 Departement Biomedizin
 Universitätsspital und Universität Basel
 und
 Transplantationsimmunologie & Nephrologie
 Universitätsspital Basel, Schweiz
 lukas.jeker@unibas.ch