

Chemie jménem CRISPR

Tisková zpráva

Sedmého října tohoto roku proběhla médii krátká zpráva: Nobelův výbor rozhodl o udělení ceny za chemii v roce 2020. Společně ji obdržely Emmanuelle Charpentier a Jennifer A. Doudna za svůj objev metody editace genomu.

Klíčová práce oceněných laureátek byla přitom uveřejněna v roce 2012. K rozhodnutí o udělení Nobelovy ceny tedy uplynula v historickém kontextu relativně krátká doba. Co stojí za úspěchem této metody a jak se může dotýkat problematiky experimentální a klinické onkologie?

Genetické nůžky

Charpentier a Doudna objevily přesný nástroj genové technologie: genetické nůžky CRISPR/Cas9. Jejich použitím lze změnit DNA mikroorganismů, rostlin i živočichů s extrémně vysokou přesností. Tato technologie má revoluční vliv na biologii, přispívá k rozvoji nových protinádorových terapií a může konečně uskutečnit sen o vyléčení dědičných nemocí. Toto stojí ve zdůvodnění Královské švédské akademie věd.

Jak se často ve vědě stává, objev genetických nůžek byl neočekávaný. Charpentier studovala *Streptococcus pyogenes* a objevila dříve neznámou molekulu, tracrRNA. Její práce ukázala, že tracrRNA je součástí starého bakteriálního imunitního systému CRISPR/Cas, který ničí viry rozštěpením jejich DNA. V roce 2011 zahájila Charpentier spolupráci s Doudna. Společně se jim podařilo vytvořit bakteriální genetické nůžky ve zkumavce a dále systém molekulárních komponent zjednodušit, aby byl snáze použitelný. V klíčovém experimentu pak dokázaly genetické nůžky reprogramovat. Ve své přirozené podobě nůžky rozpoznávají DNA virů, ale Charpentier a Doudna dokázaly, že nůžky mohou být kontrolovány tak, aby rozstříhly jakoukoli molekulu DNA na předem stanoveném místě. Když je DNA přerušena, pak je již relativně snadné přepsat genetický kód.

Od doby, kdy Charpentier a Doudna objevily genetické nůžky CRISPR/Cas9, se jejich použití explozivně rozšířilo. Nástroj přispěl k mnoha objevům v základním výzkumu: byly geneticky modifikovány rostliny, které mohou odolávat nepříznivým vnějším vlivům, v medicíně byly zahájeny klinické studie nových metod léčby nádorů a nyní se můžeme pokusit naplnit přání o vyléčení dědičných chorob.

Historie objevu

Práce, která vedla k objevu CRISPR/Cas9 systému pro editaci genomu, začala objevem opakujících se genomových struktur v bakteriích a mikroorganizmech říše *Archea*. V roce 1987 vyšla práce všímající si opakovaných struktur genomu *E. coli*, který obsahoval pět vysoce homologních sekvencí 29 párů bází, které byly přerušeny spacery o variabilních sekvencích. O několik let později byly podobné opakující se sekvence objeveny v genomu *Archea*. Následně bylo prokázáno, že tento typ sekvencí je běžný u prokaryot a vždy obsahuje krátký palindromický úsek opakující se v clusterech oddělených sekvencemi konstantní délky. Termín CRISPR proto označuje tzv. clustered regularly interspaced short palindromic repeats.

Další krok k porozumění funkci CRISPR přišel s identifikací tzv. CRISPR-associated genů (*Cas*). Tyto geny kódovaly proteiny s motivy helicázy a nukleázy, významné v metabolismu DNA. V roce 2005 bylo prokázáno, že unikátní sekvence CRISPR pochází z přenosných genetických elementů, jakými jsou bakteriofágy. Prokaryota s těmito sekvencemi se jevila jako chráněná před infekcemi. CRISPR byly přepisovány do dlouhé molekuly pre-crRNA, která byla následně štěpena na malé molekuly crRNA. Následně bylo prokázáno, že crRNA se váže na protein Cas a tento komplex se zaměřuje na invazivní nukleové kyseliny. CRISPR-Cas systém tak funguje jako adaptabilní obranný systém proti cizorodé DNA: spacery v CRISPR vedly k roz-

štěpení DNA s odpovídající sekvencí. Proč však CRISPR neštěpí vlastní spacery? Brání tomu krátká sekvence nukleotidů vedle sekvencí protospaceru, která byla nazvána protospacer adjacent motifs (PAM).

Když v roce 2011 Charpentier studovala mechanismus maturace crRNA, identifikovala abundantní RNA transkribované z regionu tzv. upstream CRISPR locusu. Transkript byl nazván trans-encoded small RNA (tracrRNA) s komplementaritou k opakujícím se oblastem CRISPR locusu. Charpentier dospěla k závěru, že přidání crRNA k vyčištěné Cas9 nebude stimulovat štěpení DNA. Přidání tracrRNA do *in vitro* reakce však spustilo štěpení cílové DNA! Ke štěpení dochází tři páry bází směrem tzv. upstream sekvence PAM a k rozvinutí dvojité DNA je požadován PAM motiv.

Na základě své *in vitro* biochemické analýzy autorky předpověděly, že strukturální vlastnosti dvou RNA molekul by mohly být zachyceny do jediné RNA molekuly. RNA komponenty crRNA a tracrRNA bylo možné fúzovat dohromady, přičemž vytvořily jedinou aktivní chimérickou molekulu, tzv. single-guide RNA (sgRNA). Navíc autorky prokázaly, že sekvence chimérické sgRNA může být změněna tak, že CRISPR-Cas9 bude cílit na záměrnou sekvenci DNA. Vytvořily tak jednoduchou dvoukomponentní endonukleázu skládající se z sgRNA a Cas9, kterou bylo možné naprogramovat tak, aby štěpila sekvenci DNA podle přání.

Aplikace CRISPR/Cas9

Editace genomu závisí na existenci přirozených pochodů opravy DNA a rekombinace. Dvojité zlomy DNA typicky vedou k nehomolognímu spojování volných konců (non-homologous end joining – NHEJ) nebo k homologně zaměřené opravě (homology directed repair – HDR). V případě NHEJ jsou konce zlomů přímo svázány dohromady, což obvykle vede k malým inzercím nebo delecím DNA, které mají často za následek ztrátu proteinové exprese. Cesta HDR naproti

tomu používá homologní DNA sekvenci jako templát pro opravu zlomu. Poskytnutím modifikované genetické sekvence jako templátu pro HDR je možné vložit do DNA definované genomové změny.

Významným předcházecím objevem byl vývoj tzv. zinc finger nukleáz (ZFN) a transkripční aktivátorové efektorové nukleázy (transcription activator-like effector nuclease – TALEN). Oba typy nukleáz (ZFN i TALEN) jsou silnými nástroji pro editaci genomu, nicméně jejich širší použití je limitováno problémy v designu proteinů, jejich syntéze a validaci.

Charpentier a Doudna definovaly jednoduchý dvoukomponentní systém, který může být rychle naprogramován k sekvencně specifickému střihu cílové DNA. První experimentální data pocházejí již z roku 2013 z prací na myších i lidských buňkách. Systém byl použit ke genomovým modifikacím eukaryotů, vč. *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* a dalších organismů. Také bylo navrženo mnoho homologních Cas, které rozpoznávají rozličné sekvence PAM. Dalším obohacením metody je fúze Cas9 nukleázy s reverzní transkriptázou. V tomto přístupu sgRNA obsahuje navíc úsek RNA, který vytváří tzv. prime editing guide RNA, jenž specifikuje cílové místo i editovanou sekvenci. Jakmile je vytvořena reverzní transkriptázou, syntetizovaná DNA je instalována ve zlomu a nahrazuje originální DNA sekvenci.

Úsvit genové terapie

Genetické nemoci byly považovány za nevyhléditelné, takřka vytesány do kamene genomu těch nešťastníků, kteří je „vyhráli“ v genové loterii života. Nyní tomu tak již není. Podívejme se zpět na začátky evoluce genové terapie z futuristické myšlenky do klinicky uchopitelné léčby. V roce 1972 byla publikována práce Friedmanna a Roblina „Gene therapy for human genetic disease?“, kde autoři podtrhli potenciál inkorporace sekvencí DNA určených k léčbě genetické nemoci do pacientových buněk. Zároveň nabádali k trpělivosti a opatrnosti, neboť některé klíčové body ve vědeckém porozumění problému dosud nebyly objasněny.

Historie klinických studií genové terapie sahá až do roku 1989, kdy Rosenberg et al použili retrovirus k zavedení genu rezistence na neomycin do tumor infiltrujících lymfocytů a tyto podali pěti pacientům s melanomem. Od té doby proběhlo a probíhá několik tisíc studií zaměřených na genové terapie; úspěšných produktů je bohužel stále poskromnu. V prvních fázích byly jako vektory používány plazmidy, retroviry i adenoviry. V roce 1990 podstoupila čtyřletá dívka léčbu těžké kombinované imunodeficiency. Chyběl jí enzym adenosindeamináza, jehož nedostatek poškodil její imunitní systém natolik, že byla neustále vystavena infekcím s potenciálně fatálním průběhem. Virový vektor s kopií genu *ADA* zlepšil funkci jejího imunitního systému a dovolil jí žít normální život.

Nadšení pro genomovou terapii však záhy zchladila úmrtí prvních pacientů. V roce 1999 osmnáctiletý mladík s deficitem ornitintranskarbamylázy zemřel čtyři dny poté, co byl léčen adenovirovým vektorem, a to na katastrofickou imunitní reakci na léčbu. Dalším momentem byla studie A. Fischera, který léčil děti se syndromem těžké imunodeficiency SCID-X1 pomocí aplikace modifikovaného retrovirového vektoru do hematopoetických kmenových buněk. Výsledky byly velmi nadějně, ale v roce 2003 se u dvou dětí objevily příznaky leukemie a nábor do studie byl přerušen. Když se objevil třetí případ leukemie, studie byla v roce 2005 definitivně zastavena. Ukázalo se, že použité vektory nemají přesnou kontrolu nad integrací do genomu a mohou vést k závažným až infaustním nežádoucím účinkům. Bezpečnost virových vektorů se dostala pod drobnohled. Na genomovou terapii bylo nahlíženo tak, že se příliš rychle dostala příliš daleko. Bylo potřeba opatrnosti.

Výzkum přes všechny potíže a dočasné zastavení studií genomových terapií pokračoval a postupně bylo regulačními úřady schváleno několik přípravků genové terapie. V posledních letech počet schválených genomových terapií rychle stoupá. To je možné vývojem nových virových vektorů odlišných od retrovirových vektorů a vysoce imunogenních adenovirových vektorů, zejména tzv.

AAV (adeno-associated viruses). Genová terapie překonala velké zkoušky, aby se stala realitou medicíny, a její vývoj zdaleka není u konce. Silnější a elegantnější molekulární nástroje budou nadále rozšiřovat naši schopnost léčit závažné nemoci.

CRISPR a nádory

Vývoj klinických studií s technologií CRISPR postoupil neuvěřitelně rychle kupředu a dnes již máme přes 15 registrovaných nebo běžících klinických studií využívajících tuto metodu u nádorových onemocnění. Když se podíváme podrobněji na schválené klinické studie zabývající se technologií CRISPR, zjistíme dvě skutečnosti: řada klinických studií byla schválena v Číně a většina klinických studií modifikuje signální proteiny v somatických buňkách *ex vivo*. Příkladem studie schválené v Číně může být protokol modifikující buňky CART (chimeric antigen receptor T cells) vyražením funkce genů pro PD-1 a endogenní T-buňkový receptor (T cell receptor – TCR) pomocí CRISPR technologie. Jiné americké studie modifikují tumor infiltrující lymfocyty inhibicí genu pro intracelulární imunitní checkpoint pomocí CRISPR u gastrointestinálních malignit nebo studují CRISPR modifikované buňky CART s CRISPR eliminovaným endogenním TCR zaměřené proti různým cílům (B malignitám, T malignitám, mnohočetnému myelomu a karcinomu ledviny).

Pojďme se podívat na zajímavé publikované výsledky první čínské studie autorů Lu et al s CRISPR editovanými T lymfocyty s ablací genu PD-1 u pacientů s pokročilými stadii karcinomu plic. Celkem 12 pacientů dostalo transfúze editovaných buněk a bylo monitorováno po dobu 96 týdnů. Autoři elektroporací vložili do mononukleárních buněk periferní krve, které byly pacientům odebrány, plazmidy obsahující Cas9 a tzv. guide RNA cílené na druhý exon genu *PD-1*. Transfektované buňky byly expandovány *ex vivo* po dobu 17–40 dnů. Účinnost editace a perzistence *in vivo* byla monitorována pomocí sekvenování nové generace (next generation sequencing – NGS) mutací v lokusu *PD-1*. Autoři zjistili relativně nízkou míru editace v infundovaných buňkách, a to

5,8 %. Editované buňky nezůstávaly v těle pacientů po dlouhou dobu. Pouze 0,05 % mutací bylo zjištěno v 18 potenciálních „off-target“ místech. Infuze editovaných PD-1 T lymfocytů byly dobře tolerovány. Tato studie poukázala na bezpečnost a proveditelnost celulární terapie založené na CRISPR technologii, nicméně odhalila také její nedostatky. Současné protokoly produkující CRISPR editované pacientovy buňky jsou stále poněkud neefektivní. Tyto metody zůstávají v časném stadiu preklinického vývoje, nicméně lze očekávat, že výsledky studie urychlí přípravu budoucích protokolů založených na inovovaných technologiích.

V roce 2017 se objevila silná kritika připravované studie fáze I autologních T buněk produkujících NY-ESO-1 TCR a genově editovaných k eliminaci endogenního TCR a PD-1. Stručně řečeno, od pacientů byly shromážděny T lymfocyty periferní krve, které prošly transdukcí lentivirovým vektorem, aby exprimovaly vysoce afinitní TCR se specificitou pro NY-ESO-1 peptid, což je vysoce imunogenní antigen lidských nádorových buněk. Navíc byly T lymfocyty genově editovány technologií CRISPR, aby byly vyřazeny geny pro endogenní TCR- α , TCR- β a PD-1 protein (předpokládá se, že genová editace předejde vyčerpání T lymfocytů a udrží jejich aktivitu). Editované T lymfocyty byly expandovány *ex vivo*. Pacient podstoupí lymfodepleční chemoterapii a poté dostane

dávku 1×10^8 autologních editovaných T lymfocytů na kg hmotnosti. Ukázala se však řada pochybností. Předložená data vycházela ze studie na SCID/NOD myších, avšak výzkum byl proveden pouze na 17 myších a v terapeutickém rameni bylo pouze 5 myší. Navíc byla v experimentu použita buněčná linie karcinomu plic, zatímco studie byla designována pro pacienty s melanomem, synoviálním sarkomem a mnohočetným myelomem. Kritika poukázala na mnohé další nedostatky předkládaných dat a efektů. Po zařazení tří pacientů byla tato studie předčasně ukončena. Je vidět, že podobně odvážné designy mohou generovat skvělé výsledky, ale nedostatečná příprava experimentálních a preklinických dat je riziková a může vést k předčasnému ukončení nevyzrálé studie.

Závěrem

V roce 2012 Charpentier a Doudna prokázaly, že Cas9 endonukleáza může být naprogramována pomocí guide RNA, aby rozstříhla libovolnou dvojitou DNA sekvenci. Jejich objev vedl k širokým aplikacím CRISPR-Cas9 systému jakožto silnému a flexibilnímu nástroji k editaci genomu. Technika CRISPR představuje elegantní využití biologických molekul jednoduššího organismu v organismu složitějším a může být přirovnáno k principu použití Shimomurova zeleného fluorescenčního proteinu (green fluorescent protein – GFP) pro fluorescentní označení buněk nebo k použití Blinksova

aequorinu z medúzy *A. victoria* pro měření intracelulární koncentrace vápníku v jiných buňkách. Díky vektoru, který kóduje Cas9 nukleázu a vyrobenou sgRNA, jsme dnes schopni precizní výměny jednotlivých bází nebo provedení větších inzercí. Společně s uplatněním znalosti genových sekvencí celých organismů technologie umožňuje zkoumat tyto genomy a zjišťovat funkce jednotlivých genů, vytvářet mutace, které jsou spojeny s nemocí, nebo je naopak opravovat. Technologie se nyní vyvíjí směrem k léčbě a vyléčení geneticky podmíněných nemocí, ale i jiných onemocnění, vč. nádorových.

Technologie CRISPR se velmi rychle dostala do fáze klinických studií zaměřených na genovou terapii. V onkologii je navázána převážně na celulární terapii, a to zejména na modifikaci buněk CART. Velká síla nástroje CRISPR-Cas9 také vyvolává vážné etické otázky. Přinesou tyto klinické studie pozitivní výsledky? Není příprava těchto klinických studií úspěšná a nebude to technologií CRISPR spíše na škodu? Zařadí se technologie CRISPR do přípravy celulární terapie uplatnitelné v léčbě nádorů? Zvládneme nadále připravovat klinické studie podle platných mezinárodních etických norem?

Na odpovědi na tyto i další otázky si budeme muset ještě chvíli počkat.

*prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.
Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc*