



# Die CRISPR/Cas9-Genschere in der Erforschung erblicher Kavernome

Dr. rer. nat. Stefanie Spiegler, Dr. med. Matthias Rath, Christiane D. Much & Prof. Dr. med. Ute Felbor

**Durch die Entwicklung der CRISPR/Cas9-Genschere ist es erleichtert worden, gezielte Änderungen am Erbgut vorzunehmen. Über diese Genschere berichteten wir in Ausgabe 3 (2017). Jetzt stellen wir die Ergebnisse eines eigenen Forschungsprojekts über erbliche Kavernome vor. Vorläuferzellen von Gefäßzellen wurden gezielt mit CRISPR/Cas9 verändert, um anschließend das Wachstumsverhalten der Zellen vergleichend zu beobachten.**

Erbliche Kavernome sind Gefäßfehlbildungen im Gehirn und Rückenmark, die sich durch wiederkehrende Kopfschmerzen, Krampfanfälle und neurologische Ausfallerscheinungen bemerkbar machen können. Bei Patienten mit erblichen Kavernomen wird in der Regel eine Erbgutveränderung in einem von drei Genen im Blut gefunden: *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3* (Cerebral Cavernous Malformation = Zerebrale kavernöse Malformationen).

Auslöser für die Entstehung von Kavernomen scheint eine weitere Erbgutveränderung in der zweiten elterlichen Genkopie von *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3* zu sein, die sich im Laufe des Lebens im Rahmen von Zellteilungen in einer Gefäßvorläuferzelle ereignen kann. Dies ist in operativ entfernten Kavernomgeweben nur sehr schwer zu untersuchen, weil Endothelzellen nur einen kleinen Anteil der Zellen im blutigen und oftmals verkalkten Kavernomgewebe ausmachen.

## Isolation von Patienten-spezifischen Endothelzellen

Um der Situation in Kavernomgeweben besonders nahezukommen, wurde ein Patienten-spezifisches Zellkulturmodellsystem etabliert, welches die Erforschung der veränderten Prozesse nach einer zweiten Erbgutveränderung erlaubt. Dazu wurden von einem Patienten mit einer nachgewiesenen Erbgutveränderung im *CCM1*-Gen 50 ml Blut entnommen. Anschließend wurden zirkulierende Vorläuferstadien der Gefäßauskleidenden Endothelzellen isoliert. Diese Methode ist zwar schon seit längerer Zeit bekannt, jedoch komplex und nicht immer erfolgreich. Zudem ist die Zahl endothelialer Vorläuferzellen in 50 ml Blut mit weniger als 20 Zellen sehr gering.

*Gelingt die Isolation, können nach etwa zwei bis vier Wochen unter speziellen Kulturbedingungen erste Endothelzellkulturen beobachtet werden.*

## Modellierung der Kavernomentstehung in der Zellkultur

Unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Genschere ist es uns anschließend gelungen, in den aus Blut gewonnenen Gefäßzellen des Patienten mit einer von einem Elternteil ererbten *CCM1*-Variante gezielt die zweite *CCM1*-Genkopie zu verändern. Somit entstanden neben der ursprünglich isolierten Endothelzelllinie weitere Linien, in denen beide *CCM1*-Genkopien derart verändert waren, dass in diesen Zellen kein funktionsfähiges *CCM1*-Protein (Eiweiß) mehr gebildet wird. Damit hatten wir in Patienten-spezifischen Zellkulturen die 1971 erstmals von Knudson beschriebene Zweischritt-Inaktivierung nachgestellt.

Zusätzlich gelang es in einem weiteren experimentellen Ansatz, mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Genschere die Patienten-spezifische Erbgutveränderung zu korrigieren. Diese Zellen enthielten folglich zwei normale *CCM1*-Genkopien, die voll funktionsfähiges *CCM1*-Protein bilden. Es zeigte sich, dass Zellkolonien mit einer kompletten Inaktivierung von *CCM1* ein schnelles Wachstum aufwiesen, während Zellen mit korrigierter *CCM1*-Anlage nicht weiter kultiviert werden konnten.

Um dieser Beobachtung auf den Grund zu gehen, wurde zu einem Zellgemisch aus korrigierten Zellen (Abb. 1, grün) und normalen Zellen des Patienten (Abb. 1, grau), die eine intakte und eine veränderte Anlage aufweisen, Zellen gegeben, in denen *CCM1* komplett ausgeschaltet worden war (Abb. 1, rot). Dieses Zellgemisch wurde über einen Zeitraum von mehreren Wochen gezüchtet.

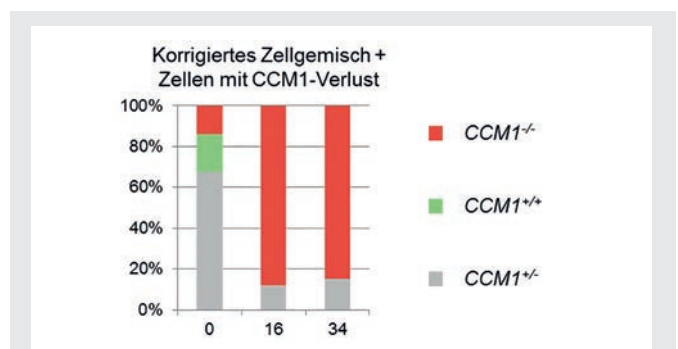


Abbildung 1: Zellen mit komplettem *CCM1*-Verlust (rot) überwachsen korrigierte (grün) und unveränderte (grau) Zellen bereits nach 16 Tagen und dominieren fortan das Zellgemisch. *CCM1*<sup>-/-</sup>: Zellen mit zwei ausgeschalteten *CCM1*-Genkopien, *CCM1*<sup>+/-</sup>: korrigierte Zellen, *CCM1*<sup>+/+</sup>: unveränderte Zellen des Patienten mit einer ererbten *CCM1*-Variante (modifiziert nach Spiegler et al. 2019).

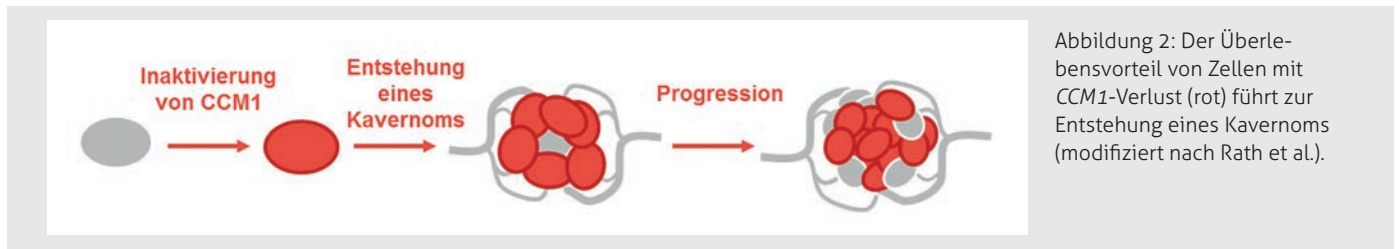


Abbildung 2: Der Überlebensvorteil von Zellen mit *CCM1*-Verlust (rot) führt zur Entstehung eines Kavernoms (modifiziert nach Rath et al.).

Mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung wurde das Zellgemisch zu Beginn des Experiments, nach 16 und nach 34 Tagen untersucht. Dazu wurde das Erbgut aus den Zellen isoliert und die Häufigkeit der normalen und der veränderten Sequenzen bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass das Zellgemisch bereits nach 16 Tagen eine ganz andere prozentuale Zusammensetzung aufwies (Abb. 1). Obwohl Zellen mit komplettem *CCM1*-Verlust anfangs nur 10 % der Zellen ausmachten, hatten sie die anderen Zellen weitgehend überwachsen (Spiegler et al. 2019).

*Zellen ohne CCM1 zeigen einen deutlichen Überlebensvorteil durch eine verminderte Fähigkeit zum gerichteten Zelltod.*

Dieses Ergebnis deckt sich mit weiteren eigenen Beobachtungen, dass der gerichtete Zelltod, ein zelleigener Mechanismus, welcher sowohl von außen als auch aktiv durch einzelne Zellen ausgelöst wird, in *CCM3*-inaktivierten menschlichen Nabelschnurvenenzellen gestört ist (Schwefel et al. 2019). Eine US-amerikanische und eine europäische Forschergruppe konnten jüngst unabhängig voneinander eine klonale Expansion von *CCM3*-inaktivierten Zellen in Mausmodellen zeigen (Detter et al. 2018, Malinverno et al. 2019).

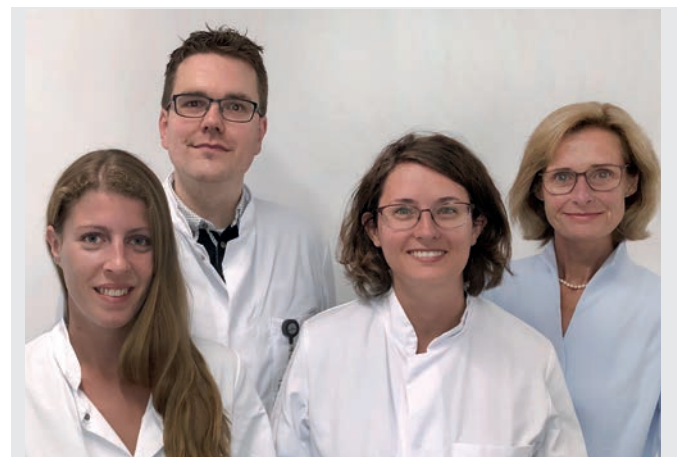
Mit den hervorragend kultivierbaren *CCM*-defizienten Endothelzellen haben wir nun die Möglichkeit, in der Zellkultur die zellulären Prozesse genau zu untersuchen, welche der Kavernomentstehung zugrunde liegen. Darüber hinaus kann durch die Zugabe von Wirkstoffen geprüft werden, ob das veränderte Wachstumsverhalten gezielt beeinflusst werden kann.

*Die gewonnenen, Patienten-spezifischen Zelllinien sind wichtig für die Erforschung von medikamentösen Therapien.*

## Zusammenfassung

Durch den Einsatz der CRISPR/Cas9-Genschere konnte gezeigt werden, dass menschliche Endothelzellen mit Erbgutveränderungen in beiden elterlichen Kopien eines *CCM*-Gens einen Überlebensvorteil haben. Dieser führt im Hirngewebe zur Entstehung von Kavernomen (Abbildung 2). Aus den experimentellen Beobachtungen

lässt sich aber auch schlussfolgern, dass die gezielte Korrektur von Patienten-spezifischen Erbgutveränderungen mittels der CRISPR/Cas9-Genschere in den *CCM*-Genen kein therapeutisches Potential bietet. Die gewonnenen, Patienten-spezifischen Zelllinien sind jedoch von hohem Wert für die Erforschung von Therapiemöglichkeiten, welche auf eine medikamentöse Beeinflussung des veränderten Wachstumsverhaltens abzielt.



Das Autorenteam (v.l.): Dr. Stefanie Spiegler, Dr. Matthias Rath, Christiane Much, M.Sc., Prof. Ute Felbor.

### Quellen:

Much CD, Rath M, Felbor U (2017). CRISPR/Cas9 - Möglichkeiten und Grenzen der „genetischen Schere“. Das Magazin, Ausgabe 3, Juni 2017, 26-28.

Spiegler S, Rath M, Much CD, Sendtner BS & Felbor U (2019). Precise *CCM1* gene correction and inactivation in patient-derived endothelial cells: Modeling Knudson's two-hit hypothesis in vitro. *Mol Genet Genomic Med*, 7(7):e00755.

Schwefel K, Spiegler S, Ameling S, Much CD, Pilz RA, Otto O, Völker U, Felbor U, Rath M (2019). Biallelic *CCM3* mutations cause a clonogenic survival advantage and endothelial cell stiffening. *J Cell Mol Med*, 23(3), 1771-1783.

Detter MR, Snellings DA & Marchuk DA (2018). Cerebral Cavernous Malformations Develop Through Clonal Expansion of Mutant Endothelial Cells. *Circ Res*, 123(10), 1143-1151.

Malinverno M, Maderna C, Abu Taha A, Corada M, Orsenigo F, Valentino M, ..., Dejana E (2019). Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. *Nat Commun*, 10(1), 2761.

Rath M, Pagenstecher A, Hoischen A, Felbor U (2019). Postzygotische Mosaikismen in cerebralen Kavernomen. *J Med Genet*, im Druck.

### Anmerkung der Redaktion:

Einen Bericht aus Patientensicht über die Teilnahme an dieser Forschungsarbeit finden Sie in der Rubrik "Erfahrungsberichte" auf Seite 46.