

## Paper of the Quarter – QII/2024 – [MyPred](#)

### CRISPR-Cas9n-mediated ELANE promoter editing for gene therapy of severe congenital neutropenia

Molecular Therapy 2024 Jun 5. [>>PubMed-Link<<](#)

Masoud Nasri, Malte U Ritter, Perihan Mir, Benjamin Dannenmann, Masako M Kaufmann, Patricia Arreba-Tutusaus, Yun Xu, Natalia Borbaran-Bravo, Maksim Klimiankou, Claudia Lengerke, Cornelia Zeidler, Toni Cathomen, Karl Welte, Julia Skokowa

---

Neutrophile sind die häufigsten Immunzellen im menschlichen Körper und bilden die Grundlage der ersten Abwehrmechanismen des Körpers gegen Krankheitserreger. Die angeborene kongenitale Neutropenie (CN) ist eine seltene genetische Erkrankung, die bei den betroffenen Patient:innen zu einer sehr niedrigen Neutrophilenzahl im Blut und damit zu schweren Infektionen führt. Die häufigste Ursache sind Mutationen im ELANE-Gen. Derzeit erhalten die Patient:innen in der Regel den Wachstumsfaktor G-CSF als regelmäßige Injektion, um die Zahl der Neutrophilen zu erhöhen und schwere, lebensbedrohliche Infektionen zu verhindern. Diese Therapie verhindert jedoch nicht, dass etwa jeder sechste Patient im Laufe seines Lebens an Leukämie erkrankt. Daher besteht ein hoher medizinischer Bedarf an sicheren Behandlungsmethoden für die angeborene Neutropenie.

Bei der Mehrzahl (über 50 %) der Patient:innen mit schwerer kongenitaler Neutropenie sind Mutationen im neutrophilen Elastase-Gen (ELANE) nachweisbar. Für ELANE-Mutationen haben wir ein innovatives gentherapeutisches Konzept namens MILESTONE entwickelt. Dabei wird mit zwei komplementären CRISPR/Cas9-Nickasen die regulatorische Einheit (Promotor) des ELANE-Gens in Blutstammzellen verändert. Diese genetische Veränderung führt zu einer stark verminderten Expression der ELANE-mRNA und des ELANE-Proteins.

In Labor- und Mausexperimenten konnten wir zeigen, dass die Blutstammzellen von CN-Patient:innen durch diese Modifikation wieder in der Lage sind, eine ausreichende Anzahl von funktionsfähigen Neutrophilen zu bilden, während die Stammzeleigenschaften erhalten bleiben. Mit Hilfe verschiedener Sequenzierungsmethoden (GUIDE-Seq, CAST-Seq, rhAmp-Seq und RNA-Seq) konnten wir zeigen, dass dieser Ansatz nicht zu unerwünschten genetischen Veränderungen in der DNA der behandelten Zellen führt und das Transkriptom der Zellen normal bleibt.

Der MILESTONE-Ansatz ist ein vielversprechender Ansatz für eine *ex vivo* Gentherapie für CN-Patient:innen mit ELANE-Mutationen. Darüber hinaus birgt der Promotor-Targeting-Ansatz ein breites Potenzial für die effiziente Inaktivierung von Genen als therapeutischen Ansatz in Zellen.

---

**Autorin:** Prof. Julia Skokowa

**Kontakt:** [julia.skokowa@med.uni-tuebingen.de](mailto:julia.skokowa@med.uni-tuebingen.de)

## Paper of the Quarter – QII/2024 – [MyPred](#)

### CRISPR-Cas9n-mediated ELANE promoter editing for gene therapy of severe congenital neutropenia

Molecular Therapy 2024 Jun 5. [>>PubMed-Link<<](#)

Masoud Nasri, Malte U Ritter, Perihan Mir, Benjamin Dannenmann, Masako M Kaufmann, Patricia Arriba-Tutusaus, Yun Xu, Natalia Borbaran-Bravo, Maksim Klimiankou, Claudia Lengerke, Cornelia Zeidler, Toni Cathomen, Karl Welte, Julia Skokowa

---

Severe congenital neutropenia (CN) is an inherited pre-leukemia bone marrow failure syndrome commonly caused by autosomal-dominant ELANE mutations (ELANE-CN). ELANE-CN patients are treated with daily injections of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF). However, some patients do not respond to rhG-CSF, and approximately 15% of ELANE-CN patients develop myelodysplasia or acute myeloid leukemia. Here, we report the development of a curative therapy for ELANE-CN through inhibition of ELANE mRNA expression by introducing two single-strand DNA breaks at the opposing DNA strands of the ELANE promoter TATA box using CRISPR-Cas9D10A nickases-termed MILESTONE. This editing effectively restored defective neutrophil differentiation of ELANE-CN CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in vitro and in vivo, without affecting the functions of the edited neutrophils. CRISPResso analysis of the edited ELANE-CN CD34+ HSPCs revealed on-target efficiencies of over 90%. Simultaneously, GUIDE-seq, CAST-Seq, and rhAmpSeq indicated a safe off-target profile with no off-target sites or chromosomal translocations. Taken together, ex vivo gene editing of ELANE-CN HSPCs using MILESTONE in the setting of autologous stem cell transplantation could be a universal, safe, and efficient gene therapy approach for ELANE-CN patients.

---

**Author:** Prof. Julia Skokowa

**Contact:** [julia.skokowa@med.uni-tuebingen.de](mailto:julia.skokowa@med.uni-tuebingen.de)