



Viren mit einer Gen-Schere bekämpfen?

Irene Görzer

Im Jahr 2012 hat die französische Molekularbiologin Emmanuelle Charpentier mit ihrem Team eine molekulare Gen-Schere (CrispR/Cas9) in Bakterien entdeckt, die diese zur Abwehr von Bakteriophagen (Viren, die Bakterien infizieren) verwenden (Jinek *et al.*, Science. 2012). Dabei fügen sie zahlreiche Kopien kurzer DNA-Stücke des Phagen (die als CrispR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - bezeichnet werden) in ihr eigenes Erbgut ein. Diese eingebauten DNA-Sequenzen dienen der Bakterienzelle als ‚Gedächtnis‘, um die virale DNA bei einem neuerlichen Virus-Befall zu erkennen und mit dem Enzym Cas9 (CrispR associated 9) spezifisch zu zerstören.

Nach dieser Entdeckung haben Forscher schnell erkannt, dass man sich diese sequenz-spezifische, natürlich vorkommende Gen-Schere zunutze machen kann, um jede beliebige DNA-Sequenz in Zellen oder Virus-Genomen gezielt zu verändern. Somit hat sich in der Grundlagenforschung diese Gen-Schere als molekularbiologisches Werkzeug sehr rasch etabliert, um damit einfach, schnell und punktgenau Gene und regulatorische DNA-Abschnitte zu verändern und mehr über deren Funktionsweise zu erfahren.

Derzeit wird intensiv erforscht, wie man die Gen-Schere CrispR/Cas9 auch dafür nutzen kann, krankmachende virale DNA aus menschlichen Zellen zu entfernen. Somit hätte diese Gen-Schere das Potential, als antivirale Therapie eingesetzt zu werden. Die Forscher konzentrieren sich dabei vor allem auf chronische Virusinfektionen, die durch humanpathogene Viren wie zum Beispiel das Hepatitis-B-Virus (HBV) oder HIV verursacht werden können. Bei diesen chronischen Virusinfektionen kann die virale DNA ein Leben lang in bestimmten Zellen des Menschen überdauern. Ausgehend von diesem Virus-Reservoir kann es immer wieder zu einer Virusvermehrung kommen. Die bestehenden antiviralen Therapien können nur die Virusvermehrung eindämmen, die virale DNA wird jedoch nicht angegriffen. Das erstrebenswerte Ziel ist, mit der Gen-Schere die virale DNA aus den infizierten Zellen zu entfernen und somit diese chronischen Virusinfektionen vollständig auszuheilen.

Die große Herausforderung der Forschung ist es nun, diese Gen-Schere so weiter zu entwickeln, dass sie in Zukunft tatsächlich als spezifische antivirale

Therapie angewendet werden kann, ohne das humane Genom anzugreifen. Die ersten Forschungsarbeiten beschäftigten sich damit zu untersuchen, ob die Gen-Schere die virale DNA in der menschlichen Zelle gezielt und effektiv schneiden und zerstören kann. Dafür wurden zum Beispiel Versuche mit modifizierten Leberzellen durchgeführt. In der Zellkultur wurden diese Zellen mit HBV infiziert und anschließend die Gen-Schere in die infizierten Zellen eingebracht. Unter diesen *in vitro* Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Gen-Schere die HBV-DNA gezielt verändert und die Virusvermehrung dadurch reduziert wird (Price *et al.*, Trends in Microbiology, April 2016). Andere Forschungsgruppen wiederum konnten zeigen, dass auch HIV-DNA mit der Gen-Schere angreifbar ist. Dafür verwendeten die Forscher zunächst eine Zelllinie, die im zellulären Genom die HIV-DNA stabil eingebaut hat. In weiterführenden Experimenten wurden weiße Blutzellen verwendet, die aus Blutproben von HIV-infizierten Patienten gewonnen wurden. Man weiß, dass in einigen dieser weißen Blutzellen die HIV-DNA ebenfalls im zellulären Genom enthalten ist und davon ausgehend HIV vermehrt wird. Nach dem Einschleusen der Gen-Schere wurde sowohl in der Zelllinie als auch in den weißen Blutzellen die HIV-DNA gezielt verändert und die HIV-Vermehrung gehemmt (Price *et al.*, Trends in Microbiology, April 2016). All diese Arbeiten haben aber auch gezeigt, dass die Gen-Schere noch nicht perfekt funktioniert. Die virale DNA wird nicht in allen Zellen gleich gut geschnitten, und es kann manchmal vorkommen, dass auch Stellen im humanen Genom verändert werden. Außerdem zeigten zwei kürzlich erschienene Arbeiten, dass HIV auch gegen die Gen-Schere resistent werden kann (Wang G. *et al.*, Molecular Therapy, März 2016; Wang Z. *et al.*, Cell Reports, April 2016). Deshalb arbeiten zur Zeit viele Labore intensiv daran, die Gen-Schere so zu verbessern, damit sie noch effizienter und spezifischer wird.

Weitere Forschungsarbeiten beschäftigen sich bereits mit der Frage, ob die Gen-Schere auch in einen lebenden, vielzelligen Organismus eingeschleust werden kann und ihre Funktion am richtigen Ort ausübt. Erste Versuche dazu wurden im experimentellen Mausmodell mit HBV durchgeführt. Dafür wurde sowohl die HBV-DNA als auch die Gen-Schere mit der so genannten hydrodynamischen Transfermethode, die man aus der Gentherapie kennt, in die Versuchsmäuse so eingebracht, dass sie vorwiegend in die Leberzellen transportiert wurden. Die ersten Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass es ohne Gen-Schere zu einer Virusvermehrung kommt und mit dem gleichzeitigen Einschleusen der Gen-Schere

die Virusvermehrung deutlich reduziert wird. Auch bei diesen Versuchen ist es nicht zu einer vollständigen Hemmung der Virusvermehrung gekommen, weil nicht in allen infizierten Leberzellen die HBV-DNA durch die Gen-Schere zerstört wurde (Price *et al.*, Trends in Microbiology, April 2016). Dennoch zeigen diese *in vivo* Experimente, dass die Gen-Schere im Prinzip auch in lebenden Organismen funktioniert. Aber es sind noch eine Reihe von Verbesserungen nötig, bis es zu einer möglichen Anwendung beim Menschen als antivirale Therapie kommt. Die größte Herausforderung dabei ist es, herauszufinden, mit welcher Methode die Gen-Schere, ähnlich wie bei der Gentherapie, am effizientesten und sichersten nur in die virusbefallenen Zellen im Menschen eingebracht werden kann. Weiters muss vor einer möglichen Anwendung genau geklärt werden, wie das Immunsystem des Menschen auf das CrispR/Cas9 System reagiert.

Deshalb verfolgen einige Forschungsgruppen einen anderen therapeutischen Ansatz, der darauf abzielt, die weißen Blutzellen von HIV-infizierten Personen gegen eine Infektion mit dem HI-Virus resistent zu machen. Dabei muss die Gen-Schere nicht in den Organismus eingebracht werden. Man weiß, dass Personen, die eine bestimmte Variante des CCR5-Rezeptors mit einer Deletion von 32 Aminosäuren auf ihren weißen Blutzellen tragen, kaum mit HIV infizierbar sind (siehe VEI 06/09). In diesem therapeutischen Ansatz werden HIV-infizierten Patienten weiße Blutzellen entnommen, die dann in der Kulturschale, also *ex vivo*, weiterbehandelt werden. Die Gen-Schere wird dazu verwendet, die 32 Aminosäuren aus dem CCR5-Rezeptor der weißen Blutzellen herauszuschneiden. Diese modifizierten Zellen können in der Zellkultur weiter vermehrt werden, um anschließend wieder zurück in den Körper injiziert zu werden. Man nennt diesen Vorgang autologe Transplantation. Die modifizierten weißen Blutzellen sollten nicht mehr mit HIV infiziert werden können (Price *et al.*, Trends in Microbiology, April 2016).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse all dieser Forschungsarbeit die berechtigte Hoffnung zu, dass durch eine entsprechende Weiterentwicklung dieser Gen-Schere in Zukunft eine neue antivirale Therapieform zur Verfügung stehen könnte, um chronische Virusinfektionen zu behandeln oder vielleicht sogar zu heilen.