

Schneiden, 'uəyərɪp' kleben

Schneiden, drehen, kleben

Mit Designer-Rekombinasen bekommt CRISPR ernsthafte Konkurrenz: Sie schneiden das Erbgut nicht nur äußerst präzise, sondern reparieren es auch gleich. Voraussichtlich im Herbst startet eine erste klinische Studie mit HIV-Patienten. – Susanne Donner

Lange bevor die Französin Emmanuelle Charpentier 2020 den Nobelpreis für die berühmte Genschere CRISPR/Cas bekam, dachte Frank Buchholz, dass er das eleganteste Werkzeug zum Verändern von Erbgut eigentlich schon vor sich hätte: die Rekombinasen. Das sind Enzyme, die wie CRISPR aus der Welt der Mikroorganismen stammen. Sie gleichen einer Nagelschere, fein und präzise, wohingegen CRISPR/Cas eher wie eine Heckenschere arbeitet: Sie ist zwar schnell und effizient, durchtrennt aber radikal den DNA-Doppelstrang, den die Zelle dann wieder reparieren muss. Dabei können sich Fehler einschleichen, und der entstehende genetische Code lässt sich nicht präzise vorhersagen. Gleichwohl gibt es durch CRISPR erste Heilungserfolge, bei Patienten mit Sichelzellenanämie zum Beispiel (siehe TR 05/2023, S. 62). Weltweit laufen mehr als 50 klinische Studien zu CRISPR-Therapien.

Der Rummel um CRISPR/Cas hat Molekularbiologe Buchholz, Professor für Medizinische Systembiologie an der TU Dresden, nie beirrt. Er begann schon vor zwei Jahrzehnten, die Rekombinasen zu erforschen, und glaubt seither beharrlich an ihr Potenzial als besonders feines Schneidwerkzeug für die Genom-Editierung. Rekombinasen können die DNA spalten, Genabschnitte herausschneiden, umdrehen oder austauschen und Schnittstellen gezielt neu verknüpfen. Daher der Name: Sie rekombinieren die DNA. „Es hat mich schon damals fasziniert: Wenn man ein solches Enzym für den Menschen umprogrammieren könnte, wäre es ideal für die Gentherapie, also etwa, um krankheitsrelevante Gene herausszuschneiden“, sagt Buchholz. Seit wenigen Jahren kommen die Fortschritte in seinem Forschungsgebiet nun Schlag auf Schlag: Gleich zwei Start-ups sind aus seiner Arbeitsgruppe hervorgegangen. Die erste klinische Studie mit einer Rekombinase gegen HIV soll noch dieses Jahr beginnen. Die Verfechter von CRISPR/Cas horchen auf einmal auf.

Erstmals wurden Rekombinasen in Phagen gefunden. Dieser besondere Virentyp befällt ausschließlich Bakterien, vermehrt sich mit ihrer Hilfe und vernichtet sie schließlich. Daher auch ihr Name: „phagus“ für „aufessen“. Einer der bekanntesten Vertreter ist der Phage P1. Er infiziert *Escherichia coli*, ein im Labor häufig verwendetes Darmbakterium. Um sich in *E. coli* vermehren zu können, braucht P1 eine Rekombinase. Das Enzym sorgt unter anderem dafür, dass durch Zufall gebildete DNA-Doppelsätze des Phagen-Genoms im attackierten Bakterium wieder getrennt werden. Das steigert die Vermehrungsrate.

„Cre“ (für „cyclization recombinase“ oder „causes recombination“) taufte Biotechnologen dieses Schneidwerkzeug. Sie erkannten bald: Dieses Enzym dockt immer von zwei Seiten an die herauszutrennende DNA-Sequenz an. Die beiden Andockbereiche heißen Erkennungsstellen und tragen das Kürzel loxP. Ihr genetischer Code ist identisch, aber spiegelbildlich angeordnet – wie wenn das Wort TEXT einmal von rechts und einmal von links buchstabiert wird, also: T-E-X-T beziehungsweise T-X-E-T. Die Rekombinase bindet beide Stellen gleichzeitig, legt die herauszutrennende Einheit in eine Art Schlinge und bringt dadurch die Erkennungsstellen nebeneinander in Position. So liegen auch die Schnittstellen nebeneinander und lassen sich leicht verknüpfen.

IN K.-O.-MÄUSEN BEWÄHRT

In den 1990er-Jahren entdeckten Forschende, dass die Cre-Rekombinase auch bei Säugetieren funktioniert. Zum Beispiel lassen sich mit ihrer Hilfe ganz präzise einzelne Gene ausschneiden. Dafür muss man die Erkennungsstellen loxP links und rechts neben das Gen einschleusen, das man loswerden möchte. Trifft dann das Enzym auf das so eingefriedete Erbgut, schneidet es das Gen heraus. Die Genome vieler Knock-out-Mäuse wurden mithilfe von Rekombinasen kreiert – etwa solcher Mäuse, die gegen die schwere Gehirnerkrankung *Bovine Spongiforme Enzephalopathie*, kurz BSE, resistent sind. Heute sind sie aus den Genetiklaboren weltweit nicht mehr wegzudenken.

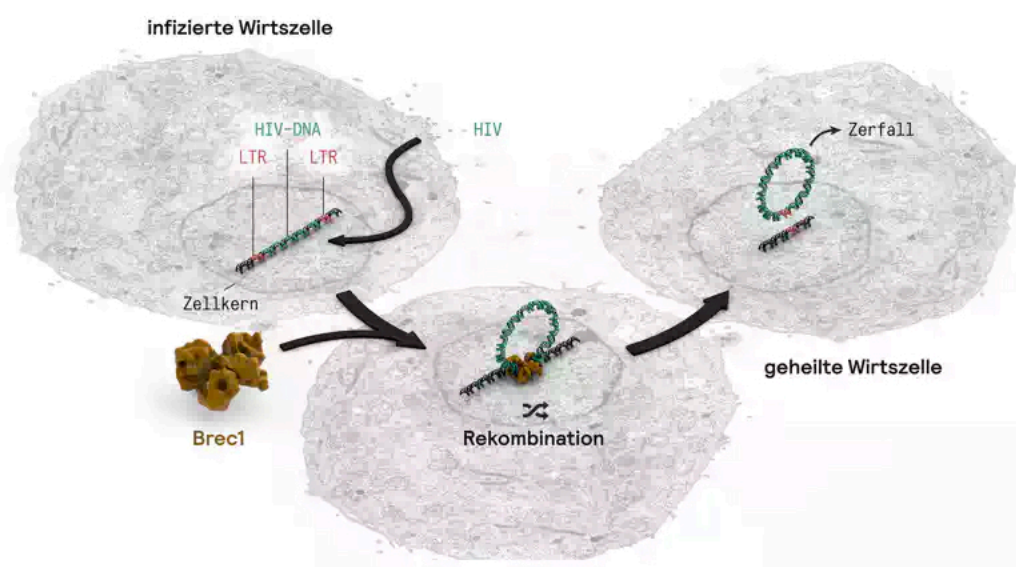
„Heute sind Rekombinasen aus den Genetiklaboren weltweit nicht mehr wegzudenken.“

„Wir wissen aus dieser breiten Anwendung: Rekombinasen sind sicher. Die hervorgerufenen Genveränderungen sind stabil. Die Mäuse leben ganz normal“, betont Frank Buchholz. Allerdings funktioniert das Editieren mit der Cre-Rekombinase nur in zwei Schritten: Erst müssen die beiden loxP-Stellen an der richtigen Stelle in das Genom der Tiere eingebaut werden. Dann erst lässt sich im nächsten Schritt das unerwünschte Gen ausschneiden. Das nimmt mehrere Tiergenerationen in Anspruch – kostet also viel Zeit und Geld.

ERKENNUNGSSTELLEN KREIEREN

Buchholz' Ziel war daher schnell klar: Für einen therapeutischen Einsatz musste eine Methode gefunden werden, mit der die loxP-Erkennungsstellen für die Arbeit der Rekombinase überflüssig werden. Es galt, das Enzym so zu verändern, dass es natürlich vorkommende Sequenzen in der menschlichen DNA als Startsignale erkennt. Zumal das Einführen der körperfremden Erkennungsstellen loxP – wie jede genetische Manipulation – nicht kalkulierbare Folgen haben könnte.

Es war seine fast stoische Beharrlichkeit, die Buchholz seinem Ziel näherbrachte. Das HI-Virus wurde sein erster Kandidat. Es schleust sein Genom mit etwas mehr als 9000 Basenpaaren in bestimmte Immunzellen, die CD4-Helferzellen, ein, damit es sich vermehren kann. Da es damit das Virenabwehrsystem des Körpers untergräbt, hat das Immunsystem kaum eine Chance, das Virus zu eliminieren. Um es wieder loszuwerden, müssten die 9000 Basenpaare aus dem Genom der CD4-Helferzellen herausgeschnitten werden. Und genau dafür stellte das Dresdner Team eine Rekombinase her. Sie erkennt eine charakteristische Stelle im Genom des HI-Virus.



Die Rekombinase Brec1 schneidet das HIV-Erbgut zwischen den beiden LTR-Erkennungsstellen heraus, verknüpft die Enden wieder und heilt die Zelle.

Abbildung: Provirex

Die Wissenschaftler nutzen die Prinzipien der Evolution, um die Rekombinase an das HI-Virus anzupassen: Sie lassen die loxP-Erkennungsstellen, die für die Rekombinase der zentrale Andockpunkt sind, nach und nach mutieren und nähern ihre Sequenz dem genetischen Code des HI-Virus Schritt für Schritt an. Durch die kleinschrittige Veränderung kann die Cre-Rekombinase ihre Proteinstruktur sukzessive anpassen, bis sie schließlich Teile des HI-Virus-Genoms für ihre loxP-Stellen hält und andocken kann. 169 Evolutionszyklen waren nötig, bis Buchholz und Joachim Hauber vom Leibniz-Institut für Virologie in Hamburg einen Durchbruch erzielten. 2007 stellten sie in einer viel beachteten Arbeit zum ersten Mal das Maßschneidwerkzeug für das HI-Virus vor und nannten es Tre-Rekombinase. Die Vorsilbe „Tre“ ist eine Buchstabenspielererei der Forschenden, gemischt aus der Abkürzung LTR für die DNA-Wiederholungseinheiten (Long Terminal Repeats), die das HIV-Gen flankieren und zugleich als Erkennungsstellen fungieren, sowie der Vorsilbe „Cre“ der Ursprungs-Rekombinase.

Die Tre-Rekombinase könne nun das Virusgenom aus infizierten Immunzellen wieder ausschneiden, berichtet Buchholz. Auch genetisch manipulierte Mäuse, die mit HIV infiziert wurden, kann die Tre-Rekombinase „heilen“. Studien bestätigten: Das Enzym wirft das Viruserbgut komplett und verlässlich aus den Immunzellen heraus. Beflügelt von diesen Erfolgen gründete Buchholz mit den Hamburger Kollegen 2019 das Unternehmen Provirex. Das Start-up will schon im Herbst eine erste klinische Studie mit einer noch verfeinerten Rekombinase namens Brec1 an acht ausgewählten Personen mit HIV-Infektion starten.

Das kranke Immunsystem der Probanden soll über eine Stammzelltransplantation durch ein neues ersetzt werden, das gegen HIV resistent ist, indem es die heilende Rekombinase selbst produziert. Dafür müssen die Stammzellen des Spenders genetisch verändert werden. In ihr Erbgut muss das Gen Brec1 eingeschleust werden. Die Genom-Editierung sei bei vierzig bis achtzig Prozent der Zellen erfolgreich, sagt der Virologe Jan Chemnitz, Geschäftsführer von Provirex. „Das haben wir ganz gut im Griff.“

Im Körper des Patienten sollen dann aus den manipulierten Stammzellen jene gewünschten Immunzellen hervorgehen, die ein HIV-Genom aus ihrem eigenen Erbgut ausschneiden und so die Vermehrung des Virus stoppen können. Die Stammzellen mit dem Rekombinase-Gen werden im Labor vermehrt. Im Körper des Patienten werden die virusbefallenen Immunzellen des Patienten mit dem Chemotherapeutikum Busulfan zerstört, und er erhält die frischen HIV-resistenten Immunzellen. „Die HIV-resistenten Immunzellen sollen dann das HI-Virus im gesamten Körper bekämpfen“, erklärt Chemnitz. Läuft alles nach Plan, soll die therapierte Person fortan gegen das HI-Virus immun sein. Als eine Art Notfallversicherung werden zudem infizierte Immunzellen des Patienten eingefroren, die er erhält, wenn die Transplantation nicht anschlägt.

ERSTE KLINISCHE STUDIE

„Wir hoffen natürlich, dass die Therapie gut anschlägt. Eine Heilung wäre fantastisch“, sagt Buchholz. „Aber uns ist klar, dass das ein dickes Brett ist.“ Das HI-Virus infiziert zwar mit Vorliebe Immunzellen, aber nicht nur diese. Es attackiert auch Nerven- und andere Körperzellen. Aus diesen Hinterhalten kann es womöglich auch nach dem Austausch des Immunsystems der Gesundheit zusetzen. „Aber wenn HIV-positive Menschen weniger Medikamente brauchen und wenn sie beispielsweise niemand mehr anstecken könnten, weil die Viruslast so gering ist, wäre schon viel gewonnen.“



Der Molekularbiologe Frank Buchholz glaubte trotz CRISPR-Hype an die Rekombinasen. Der Schritt vom Labor in die Klinik steht kurz bevor.

Foto: TU Dresden / S. Rose Fotografie

Sollte die Rekombinase sich tatsächlich als Wunderwaffe gegen das HI-Virus erweisen, wären theoretisch auch prophylaktische Anwendungen denkbar, etwa der Schutz von Risikogruppen wie Sexarbeitenden. Doch solchen Ideen erteilt Jan Chemnitz eine klare Absage: „Eine Stammzelltransplantation macht man nicht zwischen Einkauf und Brötchen essen. Da werden Krankenhausbetten wochenlang belegt. Immer wieder sterben einzelne Patienten daran. Wir rechnen mit wenigen Tausend Therapien pro Jahr“, erklärt er. Wegen des Risikos dürfen an der ersten klinischen Studie auch nur HIV-Patienten mit einer Vorerkrankung teilnehmen, mit einem bereits erfolgreich therapierten B-Zelllymphom.

**„Eine Heilung wäre fantastisch!
Aber uns ist klar, dass das ein dickes Brett ist.“**

Gleichwohl ist Frank Buchholz überzeugt, dass die Behandlung von HIV-Patienten nicht die einzige Gentherapie mit den heilenden Enzymen bleiben wird. Rekombinasen könnten auch in anderen Therapien zum Einsatz kommen, die bisher auf CRISPR/Cas gründeten, sagt er. Zwar sei ihre Entwicklung aufwendiger, doch der genetische Code, den sie erzeugten, lasse sich eben im Gegensatz zur CRISPR-Methode zuverlässig vorhersagen.

Ein Grund für den Optimismus des Forschers ist außerdem, dass ein zweites Problem der Ursprungs-Rekombinase aus dem Phagen P1 – neben der Anpassung der Erkennungsstellen – heute als gelöst gilt. Denn dieses Enzym bindet bekanntlich nur an spiegelbildlich angeordnete Erkennungsstellen (T-E-X-T beziehungsweise T-X-E-T). „Das schränkte die Anwendung der Rekombinasen lange sehr ein, weil es Erkennungsstellen mit dieser Besonderheit selten im menschlichen Genom gibt“, sagt Anne-Kristin Heninger, Molekularbiologin und Geschäftsführerin von Seamless Therapeutics, dem zweiten Start-up aus Buchholz' Gruppe. Erst 2020 gelang es, aus zwei mittels künstlicher Evolution erzeugten Rekombinasen ein Enzym zu entwickeln, das auch zwei vollkommen unterschiedlich aufgebaute Erkennungsstellen akzeptiert, T-E-X-T und W-O-R-T beispielsweise. Damit steht nun aus Heningers Sicht ein perfektes Werkzeug für Therapien verschiedenster genetischer Erkrankungen zur Verfügung – etwa das schwere Nervenleiden Chorea Huntington, bestimmte Krebserkrankungen oder einige Formen der Demenz.

HILFE DURCH KI

Seamless Therapeutics entwickelt jedoch keine Therapien, sondern will Pharma- und Biotechunternehmen mit Rekombinasen beliefern, genauer gesagt mit den entsprechenden Gen-Codes. Erst Anfang des Jahres ist es an den Start gegangen und hat im März schon 12,5 Millionen Euro Startkapital eingesammelt. Die unternehmenseigene Enzym-Bibliothek umfasst bereits einige Hunderttausend Rekombinasen. Bei der Entwicklung hat eine Künstliche Intelligenz geholfen, die die Strukturen der Enzyme abhängig vom herauszuschneidenden genetischen Code ein Stück weit vorhersagen kann. Die Einschätzungen der KI werden bei der Auswahl der bestangepassten Enzyme für den nächsten Evolutionszyklus berücksichtigt. „Das beschleunigt den Entwicklungsprozess der Rekombinasen sehr“, sagt Heninger.

So groß das therapeutische Potenzial der Rekombinasen auch sein mag: Noch ist unklar, wie gut sie für die Praxis taugen. „Es heißt zwar, die Rekombinasen hätten keine unerwünschten Off-target-Effekte, schneiden also nicht versehentlich an anderen Stellen im Genom. Das muss aber in Studien erst noch gezeigt werden“, sagt Toni Cathomen, Professor für Zell- und Gentherapie an der Uni Freiburg, der an Zell- und Gentherapien, nicht aber an Rekombinasen forscht. CRISPR/Cas und weitere Instrumente zur Gentherapie, vorrangig verschiedene Nukleasen, würden hingegen schon heute in zahlreichen klinischen Studien am Menschen geprüft. „Eine weitere Herausforderung ist, eine ausreichend große Zahl an Zellen gentherapeutisch zu verändern“, gibt der Molekularbiologe zu bedenken. Denn wenn sich nur ein kleiner Anteil der erkrankten Zellen aus dem Körper entnehmen und korrigieren lässt, hat diese Zellspende es später schwer, sich gegen die Übermacht an erkranktem Restgewebe durchzusetzen.

Die ersten Therapien würden sich daher voraussichtlich gegen genetisch bedingte Erkrankungen des Blutes und der Leber richten, weil sich dort bereits eine große Zahl an Zellen gentherapeutisch korrigieren lasse, glaubt Cathomen. Schließlich verfügen die Forschenden inzwischen über Lipidpartikel, die in nahezu jede Leberzelle eindringen können und diese, beladen mit mRNA zur Produktion der Rekombinase, in großer Zahl gentherapeutisch korrigieren können. Krankheiten des Blutes wiederum sind gut geeignet, weil es einfach ist, Blut zu entnehmen, Blutzellen zu Stammzellen umzuprogrammieren und diese mit Rekombinasen zu korrigieren.

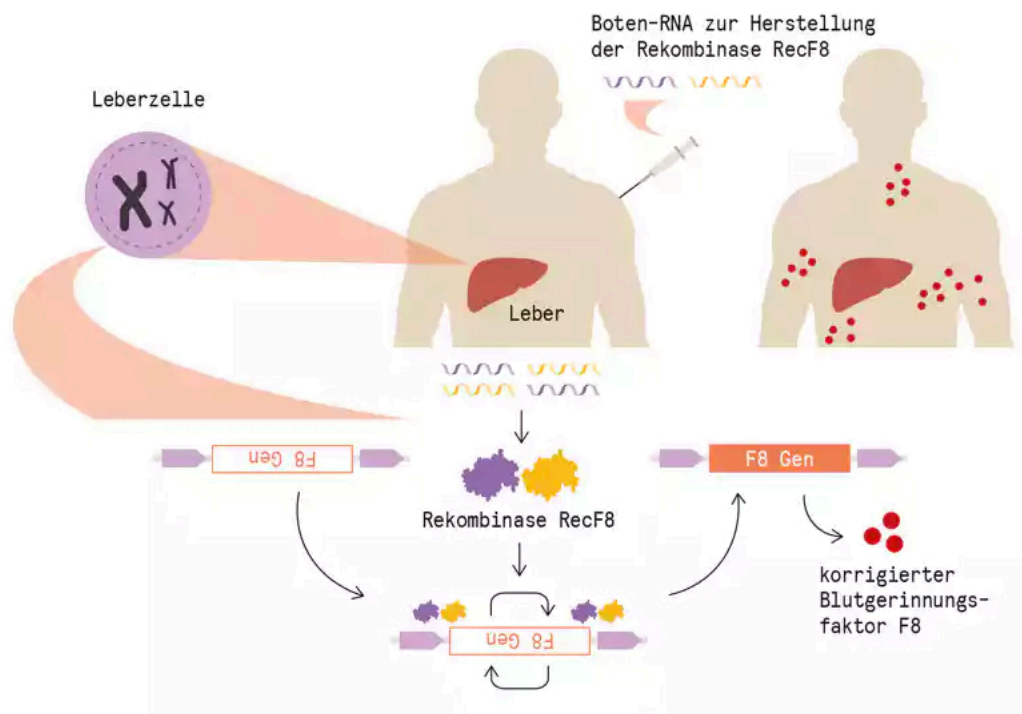


Dr. Anne-Kristin Heninger und Felix Lansing entwickeln neue Rekombinasen mit KI. Die genetischen Codes liefern sie an Pharmafirmen und Forschungsinstitute.

Foto: SeamlessTX

Tatsächlich verfolgt Frank Buchholz an der TU Dresden schon konkrete Pläne für eine Rekombinasen-Therapie der Blutgerinnungsstörung Hämophilie A. Betroffenen fehlt der sogenannte Blutgerinnungsfaktor VIII und ihr Leidensdruck ist hoch. Ihre Gelenke können sich über die Zeit schmerzhaft entzünden und es können lebensbedrohliche innere Blutungen auftreten. Menschen mit Hämophilie A müssen ihr ganzes Leben lang mehrmals wöchentlich den Blutgerinnungsfaktor VIII aus Blutplasmaspenden als Infusion zugeführt bekommen. 2022 aber war dieses lebenswichtige Therapeutikum so knapp, dass viele Patienten um ihre Versorgung bangen mussten.

Rekombinasen könnten helfen, glaubt Buchholz. Denn bei etwa der Hälfte der Betroffenen sind die 140 000 Basenpaare in jenem Gen, das den Faktor VIII produziert, lediglich falsch herum angeordnet. Und Buchholz' Arbeitsgruppe konnte mittels künstlicher Evolution in den letzten Jahren eine Rekombinase namens RecF8 entwickeln, die das fehlerhafte Gen umdreht. Schon bald wollen die Forschenden die Sicherheit und Verlässlichkeit des Werkzeugs an Mäusen testen. In vielen Jahren Arbeit haben sie dafür „Hämophilie-Mäuse“ entwickelt, die den gleichen Gendefekt haben wie menschliche Patienten.



Potenzielle Therapie für Hämophilie-A-Patienten: Die Boten-RNA zur Herstellung der Rekombinase gelangt über das Blut in die Leberzellen. Dort erzeugt sie das Rekombinase-Protein, das den Gen-Code für den Blutgerinnungsfaktor 8 korrigiert. Der Trick: den Code einfach umdrehen.

Quelle: Felix Lansing, Jenna Hoersten, Frank Buchholz

In isolierten Leberzellen von Hämophilie-Patienten ist die Korrektur bereits in einem Drittel der Zellen gelungen. „Wir wissen aus genetischen Untersuchungen, dass es ausreicht, wenn nur fünf Prozent der Zellen den Blutgerinnungsfaktor produzieren, um ganz schwere Formen der Erkrankung abzuwenden. Dann braucht man nicht mehr so viele Medikamente“, gibt sich der Forscher zuversichtlich.

Ob sich seine Hartnäckigkeit am Ende auszahlt und Patienten künftig von Rekombinasen-Therapien gegen HIV und Hämophilie profitieren werden, bleibt abzuwarten. Fallen die anstehenden Tests positiv aus, wird das neue Hoffnungen wecken.