

# Chronische Virusinfektionen mit der Gen-Schere CRISPR/Cas9 bekämpfen?

Irene Görzer

Im Jahr 2012 haben die beiden Forscherinnen Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna mit ihren Teams eine molekulare Gen-Schere, CRISPR/Cas9, in Bakterien entdeckt, die diese zur Abwehr von Bakteriophagen verwenden [1]. Dabei fügen Bakterien zahlreiche Kopien kurzer DNA-Stücke des Phagen (die als CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - bezeichnet werden) in ihr eigenes Erbgut ein, um bei einem neuerlichen Virusbefall die Phagen-DNA wieder zu erkennen und mit der Endonuklease Cas9 (CRISPR-associated 9) abzubauen.

Nach dieser Entdeckung hat sich CRISPR/Cas9 sehr rasch als molekularbiologisches Werkzeug etabliert, um einfach, schnell und punktgenau jede beliebige DNA-Sequenz auch in eukaryontischen Zellen zu verändern. Benötigt wird dafür eine kurze Einzelstrang RNA (guide RNA, gRNA), die Cas9 zur komplementären DNA-Sequenz leitet. Der von Cas9 katalysierte DNA-Doppelstrangbruch wird entweder fehlerhaft durch das „non-homologous end joining“ oder bei vorhandener DNA-Vorlage fehlerfrei durch das „homology-directed“ Reparatursystem repariert.

Derzeit wird intensiv erforscht, ob man das CRISPR/Cas9 System dazu verwenden kann, latente oder persistierende virale DNA aus den zellulären Reservoiren chronisch infizierter Personen zu entfernen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die chronische Hepatitis-B-Virus (HBV)- und HIV-Infektion gelegt. Bestehende antivirale Therapien können in diesen Fällen zwar die Virusvermehrung eindämmen, die virale DNA, also die episomale HBV cccDNA-Form in Hepatozyten bzw. die integrierte provirale HIV-DNA in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wird jedoch nicht angegriffen. Diese dient als Matrize für die Virusreplikation, und somit ist eine vollständige Heilung dieser Viruserkrankungen derzeit nicht möglich.

Erste Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit der Frage, wie die virale DNA mit CRISPR/Cas9 direkt zerstört werden kann. In einer Reihe von Zellkulturversuchen mit HBV bei Verwendung unterschiedlicher Zelltypen konnte gezeigt werden, dass die cccDNA mit der passenden Wahl an gRNAs und einer anhaltenden Cas9/gRNA Expression so verändert werden kann, dass die Virusvermehrung deutlich reduziert wird [2]. Weiterführende Versuche im experimentellen HBV-Mausmodell demonstrierten auch die Möglichkeit einer *in vivo* Anwendung von CrispR/Cas9. Mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion wurden HBV- und Cas9/gRNA-Expressionsvektoren in die Leberzellen der Mäuse transferiert. Bei

gleichzeitigem Einschleusen beider Vektoren wurde die HBV-Vermehrung deutlich reduziert [2].

Auch das HIV Provirus ist mit CRISPR/Cas9 direkt angreifbar. Versuche dazu wurden mit latent infizierten Zelllinien, HIV-1-infizierten primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die von HIV-1-infizierten Patienten gewonnen wurden, durchgeführt. Durch die Koexpression von Cas9 und HIV-1-spezifischer gRNAs konnte in einem Großteil der infizierten Zellen die provirale DNA inaktiviert oder vollständig entfernt werden [2,3]. Weitere kürzlich erschienene Arbeiten zeigten jedoch, dass nach der CRISPR/Cas9 Anwendung resistente Virusmutanten auftreten, die vor allem durch die fehlerhafte Reparatur des Cas9-bedingten Doppelstrangbruchs entstehen. Man hofft, durch eine passendere Wahl an gRNAs und modifizierten Cas9 Enzymen das Auftreten dieser Resistenzmutanten zu minimieren [4,5,6].

Eine weitere Anwendung von CRISPR/Cas9 als mögliche HIV-spezifische Therapie zielt darauf ab, das Provirus in langlebigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu reaktivieren (Latenz-Reversion), damit durch die induzierte Virusvermehrung die infizierten Zellen durch die körpereigene Immunabwehr erkannt und eliminiert werden können. Dazu wird ein katalytisch inaktives Cas9, das mit unterschiedlichen Transkriptionsaktivatorproteinen fusioniert ist, verwendet. Der Proteinkomplex wird mit den entsprechenden gRNAs gezielt zur HIV LTR Promoterregion geleitet. Studien mit latenten HIV-Zellmodellen haben gezeigt, dass das modifizierte CRISPR/Cas9 System spezifischer und effizienter wirken könnte als die derzeitigen Mittel zur Latenz-Reversion, die vor allem die Aktivierung der T-Zelle induzieren [2,3,7].

Die größte Herausforderung dieser Strategien ist, herauszufinden, mit welcher Transfermethode CRISPR/Cas9 *in vivo* sicher und effizient zu den viralen Reservoiren transportiert wird, ohne dass es zu toxischen Nebenwirkungen oder unerwünschten Immunreaktionen gegen Cas9 kommt. Deshalb zielt ein anderer therapeutischer Ansatz darauf ab, CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder hämatopoetische Vorläuferzellen aus HIV-infizierten Personen zu gewinnen, *ex vivo* in diesen Zellen den HIV-Korezeptor CCR5 mit CRISPR/Cas9 gezielt so zu verändern (32bp Deletion), dass die modifizierten Zellen nach Rücktransplantation nicht mehr mit CCR5-tropen HI-Viren infiziert werden können. Einige Zellkulturstudien mit HIV-permissiven Zelllinien, induzierten pluripotenten Stammzellen, und primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten zeigen, dass die CCR5-modifizierten Zellen gegen CCR5-trophe HI-Viren resistent sind [2,3].

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse all dieser Forschungsarbeit die berechtigte Hoffnung zu, dass durch eine entsprechende Weiterentwicklung mit CRISPR/Cas9 in Zukunft

eine neue antivirale Therapieform zur Verfügung stehen könnte, um chronische Virusinfektionen zu behandeln oder vielleicht sogar zu heilen.

- 1: Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-821.
- 2: Price AA, Grakoui A, Weiss DS. Harnessing the Prokaryotic Adaptive Immune System as a Eukaryotic Antiviral Defense. *Trends Microbiol*. 2016 Apr;24(4):294-306.
- 3: Liang C, Wainberg MA, Das AT, Berkhout B. CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology*. 2016 May 27;13(1):37.
- 4: Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol Ther*. 2016 Mar;24(3):522-526.
- 5: Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, Wainberg MA, Liang C. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep*. 2016 Apr 19;15(3):481-489.
- 6: Yoder KE, Bundschuh R. Host Double Strand Break Repair Generates HIV-1 Strains Resistant to CRISPR/Cas9. *Sci Rep*. 2016 Jul 12;6:29530.
- 7: Bialek JK, Dunay GA, Voges M, Schäfer C, Spohn M, Stucka R, Hauber J, Lange UC. Targeted HIV-1 Latency Reversal Using CRISPR/Cas9-Derived Transcriptional Activator Systems. *PLoS One*. 2016 Jun 24;11(6):e0158294.