

Der vorliegende Beitrag wurde beim Deutschen Studienpreis 2022 mit dem 2. Preis in der Sektion Natur- und Technikwissenschaften ausgezeichnet. Er beruht auf der 2021 an der Technischen Universität Dresden eingereichten Dissertation „Directed evolution of site-specific recombinases for precise genome editing and rearrangement“ von Dr. Felix Lansing.

## **Neuartige Gen-Skalpelle könnten die Gen-Therapie revolutionieren**

Der Fortschritt in der Medizin hat in den letzten Jahrzehnten einen enormen Sprung gemacht. Dadurch können heutzutage die meisten Erkrankungen geheilt werden. Jeder Mensch, der gegenwärtig eine Arztpraxis betritt, kann eine gut begründete Hoffnung auf Besserung beziehungsweise Heilung haben. Dies liegt daran, dass in den meisten Fällen eine konkrete Behandlung bekannt ist und angewendet werden kann.

Dies ist leider nicht der Fall, wenn der Grund der Erkrankung im Erbgut verankert ist. Oft bleibt nur die Möglichkeit, die Symptome der Krankheit zu lindern, eine permanente Heilung ist derzeit jedoch noch ausgeschlossen. Dies ist leider kein Einzelfall, denn es gibt momentan etwa 8.000 bekannte Gendefekte mit teilweise tragischen Krankheitsverläufen, die nicht aufgehalten werden können. Dies sind zum Beispiel Erkrankungen wie Muskelschwund, Autoimmunschwächen oder Blutgerinnungsstörungen und äußern sich häufig schon in jungen Jahren.

Spätestens seit dem Nobelpreis für Chemie im Jahr 2020 für Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier können Patient\*innen mit genetisch bedingten Erkrankungen und ihre Familien wieder Hoffnung schöpfen. Der Preis wurde für die Entdeckung und Entwicklung einer Gen-Schere, des sogenannten CRISPR/Cas9- Systems, vergeben. Diese Gen-Schere erlaubt es, gezielt Veränderungen im Erbgut vorzunehmen. Man muss sich dieses System wie eine molekulare Schere vorstellen, die mit einer Postleitzahl ausgestattet ist. Je nachdem, wie die Postleitzahl lautet, wird die Schere an die richtige Stelle im Genom geleitet und kann dort das Erbgut schneiden. Der Nachteil dabei ist jedoch, dass die Reparatur des Genoms nach dem Schnitt durch die Zelle selbst durchgeführt werden muss. Die Gen-Schere bringt nämlich kein Werkzeug zur Reparatur mit. Den durch die Gen-Schere herbeigeführten Schnitt im Erbgut muss man sich wie eine schwerwiegende Verletzung vorstellen und die Zelle setzt sofort alle Hebel in Bewegung, um diesen Schaden zu beheben. Dabei kommt es in den meisten Fällen zu kleineren Fehlern, sogenannten indels

(insertions and deletions). Ein Detail, welches den meisten Laien nicht bekannt ist, aber letztendlich bedeutet, dass die Reparatur durch die Zelle nach der Erbgutveränderung nicht kontrollierbar ist. Weiterhin, kann diese Gen-Schere nur kleinere Abschnitte im Erbgut bearbeiten und bietet deswegen nur für einen Teil der Patient\*innen mit genetisch bedingten Erkrankungen eine Chance auf Heilung. Nichtsdestotrotz hat die Einfachheit und kontinuierliche Verbesserung dieses Systems zu etlichen Firmengründungen geführt. Diese Firmen versprechen, einige der genetisch bedingten Erkrankungen zu heilen, und befinden sich zum Teil schon in klinischen Studien. Trotz der bekannten Sicherheitsbedenken und Limitationen in der Anwendungsbreite ist diese Technologie im Moment die einzige Hoffnung auf Heilung für Patient\*innen mit genetisch bedingten Erkrankungen.

### **Die zweite Generation der Genom-Werkzeuge, das Gen-Skalpell**

Das Ziel meiner Dissertation war es, ein neuartiges Gen-Skalpell zu entwickeln, sozusagen die zweite Generation der Genom-Werkzeuge. Dieses Gen-Skalpell soll präzise arbeiten und im Unterschied zur Gen-Schere das Erbgut nach dem Schnitt direkt wieder reparieren. Dadurch wird die fehlerbehaftete zelleigene Reparatur erst gar nicht aktiviert und eine fehlerfreie Korrektur ist sichergestellt. Weiterhin soll das Gen-Skalpell jedwede Art von Mutationen, also auch größere Genabschnitte, bearbeiten können und nicht auf kleine Reparaturen beschränkt sein. Dies würde die Behandlung aller Patient\*innen mit genetisch bedingten Erkrankungen ermöglichen. Bestenfalls soll es auch komplexe Reparaturen großer Genabschnitte, wie z.B. Austausch oder Inversionen, durchführen können. Dieses Ziel mag sich sehr herausfordernd anhören, aber ich musste zum Glück nicht bei ‚null‘ anfangen.

In der Natur gibt es zahlreiche Enzyme, welche die DNS bearbeiten können, wie zum Beispiel Restriktionsenzyme, die seit den 70er-Jahren täglich im Labor benutzt werden. Die Komplexität der Reaktion, welche durch solch ein Enzym katalysiert werden kann, reicht von einfachen Schnitten bis hin zu komplizierten DNS-Remodellierungen.

Besonders vielfältig in ihrer Reaktionsweise sind sequenzspezifische Rekombinasen, wie zum Beispiel die Cre-Rekombinase. Dieses Enzym katalysiert nach Erkennung der loxP DNS-Zielsequenz ein ganzes Repertoire an verschiedenen DNS-Veränderungen. Cre kann DNS-Abschnitte ausschneiden, einfügen, drehen/invertieren oder sogar austauschen. Diese Reaktionen werden präzise und gleichzeitig effizient durchgeführt, da Cre keine ‚Verletzung‘ der DNS verursacht, eine Reparatur durch die Zelle also nicht angestoßen wird.

Das Cre/loxP-System wurde schon 1981 entdeckt und seitdem intensiv erforscht und benutzt. Es wird von zahlreichen Laboren in der Grundlagenforschung standardmäßig eingesetzt, weswegen es vielfältige Belege gibt, welche die Effizienz dieses Systems untermauern. Hinzu kommen unzählige Studien, die zeigen, dass dieses System sogar in verschiedensten Organismen, unter anderem auch in höheren Wirbeltieren, zuverlässig funktioniert und sicher ist. Zusammengefasst gibt es genügend Daten, die Rekombinasen, wie das Cre/loxP-System, als perfektes Gen-Werkzeug beschreiben.

Wenn die Vorteile der Rekombinasen auf der Hand liegen, warum werden sie nicht zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen eingesetzt? Dies liegt vor allem daran, dass es äußerst schwierig ist, die Rekombinase an die richtige Stelle im Erbgut zu bringen. Sie besitzt im Gegensatz zur CRISPR/Cas9-Technologie kein postleitzahlähnliches Adressiersystem. Daher müsste man zum Beispiel erst die loxP-Erkennungssequenz von Cre ins Erbgut einschleusen, damit danach eine Bearbeitung möglich ist. Dies ist in der Grundlagenforschung möglich, aber beim Menschen nicht erlaubt. Zur Anwendung von Cre im Menschen müsste die Rekombinase so verändert werden, dass sie an eine im menschlichen Genom bereits vorhandene DNS-Sequenz adressiert werden kann.

Genau an dieser Fragestellung habe ich während meiner Dissertation geforscht: Wie kann man diesem perfekten Gen-Skalpell, der Rekombinase Cre, beibringen, eine ganz bestimmte Stelle im menschlichen Genom zu erkennen, welche nicht der ursprünglichen loxP-Erkennungssequenz entspricht? Wenn dies gelänge, könnte man theoretisch jede genetisch bedingte Erkrankung korrigieren und somit zahlreiche Leben retten.

Um Cre beizubringen, eine krankheitsrelevante DNS-Sequenz zu erkennen, habe ich die Methode der gerichteten molekularen Evolution benutzt. Diese Technologie funktioniert analog zur natürlichen Evolution, bei der sich bestimmte Phänotypen beziehungsweise Merkmale durch Selektionsdruck herausbilden. Angewandt wird dies schon seit Jahrhunderten bei der Züchtung von Tieren oder Pflanzen. In der Zucht werden nach jeder Generation Individuen ausgewählt, welche einem bestimmten Phänotyp entsprechen, und in die neue Generation eingebracht. Über mehrere Generationszyklen mit der gewünschten Selektion kann man somit neue Individuen einer Art mit veränderten Merkmalen hervorbringen.

Die Cre-Rekombinase bringt schon alle Merkmale mit, die sie zum perfekten Gen-Skalpell machen. Es fehlt nur noch das Merkmal der DNS-Erkennung, damit sie an eine krankheitsrelevante Sequenz in unserem Genom gelangt, um dort die Korrektur herbeizuführen. Mir ist es gelungen, den Prozess der gerichteten Evolution so

weit zu verbessern, dass man nun adressierbare Cre-Rekombinasen herstellen kann, sogenannte Designer-Rekombinasen. Diese Designer-Rekombinasen können theoretisch jede Mutation, welche eine genetisch bedingte Erkrankung hervorruft, korrigieren. Besonders profitieren würden hier Patient\*innen, welche unter einer Mutation leiden, die einen großen Genabschnitt betrifft, da das CRISPR/Cas9 für diese Art von Mutationen nicht anwendbar ist und meist nur kleine Genabschnitte bearbeiten kann.

### **Eine Designer-Rekombinase zur Behandlung der Hämophilie A.**

Die Blutgerinnungserkrankung Hämophilie A, besser bekannt als Bluterkrankheit, wird durch einen Defekt im Faktor-VIII-Gen (F8) hervorgerufen. Da sich das F8-Gen auf dem X-Chromosom befindet, sind fast ausschließlich Männer von dieser Krankheit betroffen; bei Frauen kann die funktionale zweite Kopie des F8-Gens auf dem anderen X-Chromosom den Gendefekt kompensieren. Das F8-Gen produziert in gesunden Individuen das Faktor-VIII-Protein. Ohne das Faktor-VIII-Protein kann einer der letzten Schritte der Blutgerinnungskaskade nicht mehr stattfinden und eine Blutung nicht gestoppt werden. Dies ist besonders gefährlich bei inneren Blutungen der Organe, die nur schwer zu erkennen sind, aber auch bei kleinsten Blutungen z.B. nach zu festem Auftreten zwischen den Gelenken im Knie. Damit sind diese Patienten äußerst vulnerabel und stark in ihrem persönlichen Leben beeinträchtigt, physisch wie auch psychisch. Bei der schwerwiegendsten Form der Hämophilie A ist der zugrunde liegende Gendefekt häufig eine Gen-Inversion. Dabei ist ein Teil des Erbgutes während der Zellteilung umgekehrt bzw. invertiert eingebaut worden, wodurch das F8-Gen inaktiviert wird. Im konkreten Fall der Hämophilie A gibt es zwei Varianten dieser Gen-Inversion, welche ungefähr 50 % der schweren Hämophilie-Fälle auslösen.

Aktuell gibt es eine effektive Behandlung, bei der Patienten zwei- bis dreimal die Woche einen Faktor-VIII-Protein-Ersatz erhalten. Bei dieser sogenannten Protein-Ersatz-Therapie wird das funktionale Faktor-VIII-Protein intravenös verabreicht. Die Einschränkungen, welche mit der Abhängigkeit zur Protein-Ersatz-Therapie verknüpft sind, beeinträchtigen das private Leben immens. Neben der sporadischen Verfügbarkeit der Infrastruktur für eine solche Therapie stellt insbesondere auch die Bildung von Antikörpern gegen das Präparat ein großes Problem dar. Dies ist in circa 30 % der Behandlungen der Fall und erschwert die Fortsetzung der Protein-Ersatz-Therapie enorm. Daher wünschen sich Patienten eine alternative Behandlung, welche zur Heilung führen könnte. Somit wäre eine Therapie, welche an der Krankheitsursache ansetzt und das F8-Gen wieder korrigiert, eine Chance auf eine

lebenslange Heilung und bessere Lebensqualität. Die zugrunde liegenden Gen-Inversionen können nicht oder nur sehr schwer mittels CRISPR/Cas9 behoben werden, da sie mit mehreren Hunderttausend Basenpaaren viel zu groß sind. Die einzigen Gen-Werkzeuge, welche eine so große Gen-Inversion aktiv zurückdrehen könnten, sind Rekombinasen.

Während meiner Dissertation habe ich die Herstellung einer solchen Rekombinase erforscht. Mithilfe der gerichteten Evolution ist es mir gelungen eine Designer-Rekombinase zu entwickeln, welche eine DNS-Sequenz links und rechts von der Gen-Inversion im F8-Gen erkennt und bearbeiten kann. Zunächst konnte ich in Bakterienzellen die Aktivität und Spezifität der Rekombinase auf der Ziel-Sequenz nachweisen. Da die Rekombinase aber letztendlich im Menschen angewandt werden soll, musste ich sie leicht modifizieren, um genügend Aktivität in humanen Zellen zu gewährleisten. Bringt man diese Rekombinase nun in eine menschliche Standard-Zelllinie, ist sie aktiv und kann die 140.000 Basenpaar große Inversion im F8 Gen präzise und effizient zurückdrehen. Dieses Experiment lieferte zum allerersten Mal Hinweise darauf, dass die entwickelte Designer-Rekombinase tatsächlich zur Behandlung von Hämophilie A benutzt werden könnte. Um herauszufinden, ob diese Rekombinase auch in Zellen von einem Hämophilie-A-Patienten aktiv ist, haben wir uns mithilfe der Hämostaseologie-Abteilung der Uniklinik Dresden auf die Suche nach einer Zellspende begeben. Durch die gute Vernetzung der Hämostaseologie-Abteilung konnten wir glücklicherweise zeitnah an diese Spende gelangen. Der anonyme Spender und seine Familie waren von unserem innovativen Ansatz überzeugt und er erklärte sich bereit, eine Zellspende in Form einer Blutspende, bereitzustellen. Da das F8-Gen aber nur in Leberzellen aktiv ist, mussten wir aus den Blutzellen Leberzellen herstellen. Dies ist dank neuester Entwicklungen in der Stammzellbiologie möglich. Aus Blutzellen lassen sich induzierte pluripotente Stammzellen generieren, welche dann zu fast jedem beliebigen Zelltyp differenziert werden können, unter anderem auch zu Leberzellen. Um diese komplexe Technologie zu erlernen, wurde mir ein viermonatiger Forschungsaufenthalt in den USA im Labor von Takanori Takebe, einem weltweit führenden Experten auf diesem Gebiet, ermöglicht. Dieses Wissen konnte ich erfolgreich in Dresden etablieren und aus der Blutspende des Patienten Leberzellen generieren, sogenannte Leber-Endothelzellen. Nach Verabreichung der Designer-Rekombinase in diese Zellen konnte ich zeigen, dass etwa 15.-18 % des F8-Gens korrigiert, also zurückgedreht wurden. Solch eine Korrektur würde einen Patienten von der schweren Form der Hämophilie A heilen. Eine zusätzliche Protein-Ersatz-Therapie wäre, wenn überhaupt, nur bei einer bevorstehenden Operation oder schwersten Verletzungen nötig. Wir konnten

somit als erste Forschungsgruppe der Welt zeigen, dass eine Designer-Rekombinase zur Korrektur von großen Gen-Inversionen eingesetzt werden könnte.

Um dieses einzigartige Gen-Skalpell bei allen genetisch bedingten Erkrankungen einsetzen zu können, habe ich im zweiten Teil meiner Dissertation die molekulare Evolution optimiert und das Konzept, wie die Rekombinase ihre Ziel-Sequenz erkennt revolutioniert. Dadurch ist es uns faktisch, möglich Designer-Rekombinasen für jede Art von genetisch, bedingten Erkrankungen zu generieren wodurch Patient\*innen neue Hoffnung schöpfen können.

Die große wissenschaftlich Bedeutung dieser Thematik erlaubte es mir meine Forschungsergebnisse in den renommierten Fachjournalen ‚Nature Communications‘ und ‚Nucleic Acids Research‘ zu veröffentlichen (<https://www.nature.com/articles/s41467-022-28080-7> und <https://academic.oup.com/nar/article/48/1/472/5634038>).

## **Fazit**

In meiner Dissertation konnte ich zeigen, dass Designer-Rekombinasen eine sehr gute, präzisere und sicherere Alternative zu bestehenden Gen-Werkzeugen darstellen. In einem ersten Anwendungsfall ist es mir gelungen, eine Designer-Rekombinase zu entwickeln, welche zur Behandlung der Hämophilie A genutzt werden kann. Weiterhin konnte ich die Produktion und Entwicklung von Designer-Rekombinasen so weit beschleunigen, dass wir faktisch jegliche Art von Gendefekten adressieren können. Dieses Potenzial wurde auch von der Pharmaindustrie erkannt, sodass wir in einer ersten Kollaboration mit Janssen Pharmaceuticals (Johnson&Johnson) und der Technischen Universität Dresden an der Herstellung weiterer Designer-Rekombinasen arbeiten. Ergänzend wollen wir unsere Plattform zur Herstellung von Designer-Rekombinasen weiter optimieren und zu einem Industriestandard führen. Dazu haben wir dieses Jahr (2022) die RecTech GmbH gegründet mit dem Zweck, die Designer-Rekombinasen-Technologie für Patient\*innen mit genetisch bedingten Erkrankungen zugänglich zu machen. Wir wollen die Hoffnung auf Heilung eines Gendefekts zur Realität werden lassen.