

Detlev H. Krüger (MLS)

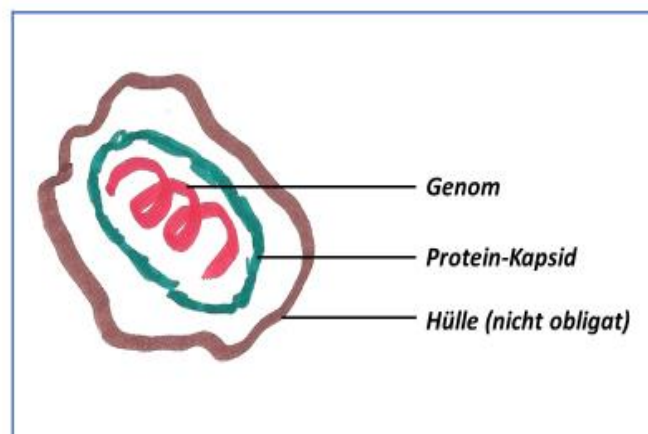
## Molekulare Diagnostik macht Krankheitserreger auffindbar

Vortrag in der Klasse für Naturwissenschaften und Technikwissenschaften am 12. März 2020

Veröffentlicht: 4. Juni 2020

Die sichere Diagnostik von Virusinfektionen hat gerade in der gegenwärtigen Zeit der Corona-Krise eine ganz neue gesellschaftliche Aufmerksamkeit gefunden. Aber auch viele andere virale Krankheitserreger bedürfen einer entsprechenden Diagnostik. Ich möchte im Folgenden an ausgewählten Beispielen kurz darlegen, welche Bedeutung dabei die molekulargenetische Diagnostik hat, wie neue Krankheitserreger erstmalig aufgefunden werden können und warum eine wirksame Virusdiagnostik, aber auch die Entwicklung neuer Impfstoffe, ohne „Gentechnik“ nicht mehr denkbar sind.

Bis vor einiger Zeit wurde eine Virusinfektion hauptsächlich an der Bestimmung von spezifischen Virus-Antikörpern festgemacht, also am Nachweis der Immunreaktion des infizierten Organismus. Die Antikörper richten sich dabei vor allem gegen Protein-Komponenten des Virus, wie das um das Virusgenom gelagerte Kapsid, weitere Proteinschichten und bei einigen Viren die Virushülle (Abbildung 1). Diese Methoden haben nichts an Bedeutung verloren, werden aber höchst effizient erweitert durch molekulare Verfahren, die ganz neue Dimensionen der Diagnostik eröffnen.



**Abbildung 1:** Schema eines Viruspartikels. Die Antigene von Kapsid und (falls vorhanden) Hülle rufen im Organismus eine diagnostisch verwertbare Immunreaktion hervor. Im Zentrum des Partikels befindet sich das aus DNA oder RNA bestehende Virusgenom.

Quelle: Autor.

### Anreicherung von Virus-Nukleinsäure und Sequenzanalyse

In der molekularen Diagnostik geht es um den Nachweis und die nähere Charakterisierung des Erbmaterials des Virus, das aus Desoxyribonukleinsäure (engl. DNA) oder Ribonukleinsäure (engl. RNA) besteht, im Inneren des Viruspartikels liegt und vom Kapsid und weiteren proteinhaltigen Komponenten umgeben ist (Abbildung 1). RNA-Genome werden dazu zunächst enzymatisch in DNA umgeschrieben.

Die bekannteste molekulare Methode ist die Polymerasekettenreaktion (PCR), in der ein spezifischer Abschnitt von etwa 3.000 Basenpaaren Länge um viele Zehnerpotenzen angereichert wird. Das angereicherte Produkt lässt sich dann weiter charakterisieren, z.B. durch Bestimmung der Nukleotidsequenz, aber es kann auch eine Quantifizierung der ursprünglichen Menge des Virusgenoms im Untersuchungsmaterial erfolgen. Daneben gibt es eine Reihe anderer molekularer Virus-Detektionsmethoden, die allein oder mit der PCR gekoppelt eingesetzt werden können. Die Methoden sind inzwischen weitestgehend automatisiert.

### **Infektiosität und Viruslast im Organismus**

Von großer Bedeutung ist der Einsatz molekularer Virus-Detektionsmethoden im Blutspende- und Transplantationswesen. Auf diese Weise lässt sich sehr sensitiv feststellen, ob das Blut oder Gewebe bestimmte Viren enthält, die den Empfänger schädigen könnten. So werden beispielweise Blutspender bei jeder Spende mittels PCR auf das Vorhandensein von Humanem Immundefizienzvirus (HIV), Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Virus und weiteren Viren untersucht.

Die Quantifizierung der sogenannten „Viruslast“ im Organismus schafft auch die Möglichkeit, den Erfolg einer antiviralen Therapie zu messen. Beispielsweise zeigt sich der erfolgreiche Einsatz von Chemotherapeutika bei einem HIV-Infizierten im Abfall der Viruskonzentration im Blut. Treten beim Patienten Virusmutanten auf, die gegen den Hemmstoff resistent sind, oder gibt es andere Probleme bei der Durchführung der Therapie, wird dies durch den Wiederanstieg der Viruskonzentration angezeigt.

### **Genotypische Resistenzbestimmung**

Die Entstehung wirkstoffresistenter Krankheitserreger ist ein zentrales Problem der Medizin. Dies betrifft nicht nur das Auftreten antibiotikaresistenter Bakterien, die uns insbesondere als Hospitalkeime große Probleme bereiten, sondern - mit der Einführung von virusspezifischen Chemotherapeutika - auch das Auftreten resistenter Viren.

Die Resistenz ist bedingt durch Mutationen in demjenigen Virus-Gen, dessen Produkt der Angriffspunkt des Wirkstoffes ist. Das ist z.B. das Gen für die virale Protease im Falle der Protease-Hemmstoffe gegen HIV. Man kennt die Mutationen, die zur Resistenz führen – die Amplifikation und Nukleotidsequenz-Analyse des entsprechenden Genabschnittes aus dem Virusgenom ermöglicht somit eine Vorhersage der Resistenz von Viren gegen bestimmte Wirkstoffe, deren (meist teurer) Einsatz gegen die Infektion dann also unterbleiben kann.

### **Typisierung von Viren**

Die molekulare Unterteilung bestimmter Viren in einzelne Virusstämme ist von großer Bedeutung für die Einschätzung ihres krankmachenden Potentials und ihrer Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Wirkstoffen (wie Interferon), aber auch zur epidemiologischen Verfolgung ihrer Ausbreitung in der Bevölkerung oder von Tier zum Menschen.

Humane Papillomviren (HPV) verursachen Wucherungen der Haut oder der Schleimhäute. Es sind weit über 100 verschiedene HPV-Typen bekannt. Ihre Unterscheidung ist bedeutsam, weil sie ganz unterschiedlichen Krankheitswert haben. Manche der Viren (wie HPV-1, -3, -10) gelten als gutartig, andere (wie HPV-6, -11, die eher gutartige Warzen im Genitalbereich auslösen) als „low risk“-Viren. Besondere Bedeutung hat die diagnostische Erkennung von Hochrisiko-Typen, wie HPV-16, -18 und weiteren, die in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung des Zervixkarzinoms und anderer maligner Tumoren stehen.

### **Rekombinante Virusimpfstoffe**

Methoden der Gentechnik und der molekularen Virologie haben es auch erlaubt, neue und sichere (extrem nebenwirkungsarme) Impfstoffe zu entwickeln. Diese Impfstoffe beinhalten nicht die kompletten Viren (in abgeschwächter oder inaktivierter Form), sondern nur einzelne immunogene Virusproteine bzw. die genetische Information dazu. So beruhen die Impfstoffe gegen das Hepatitis-B-

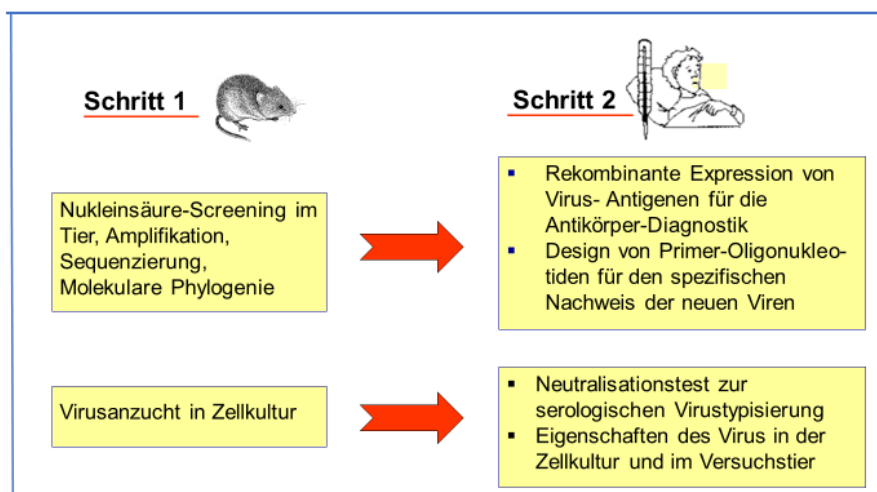
Virus und die Hochrisiko-HPV-Typen auf gentechnisch hergestellten, einzelnen Virusproteinen, die sich zu Partikeln zusammenlagern – diese sind selbst nicht infektiös (da das komplette Virusgenom im Impfstoff gar nicht vorhanden ist), lösen aber eine schützende Immunantwort gegen diese Viren aus.

Nach den kürzlich in Afrika grassierenden Ausbrüchen von Ebola sind sehr schnell effektive rekombinante Impfstoffe entwickelt worden, die auf dem gentechnischen Einbau von einzelnen Genen des Ebolavirus in das Genom anderer, nicht-pathogener Viren (Trägerviren) beruhen. Diese rekombinanten Impfstoffe gelten als protektiv und nebenwirkungsarm. Ihr Einsatz beim aktuellen Ebola-Ausbruch im Kongo wird aber leider gegenwärtig durch die dortigen kriegerischen Auseinandersetzungen begrenzt.

### „Virus Hunting“ am Beispiel der Hantaviren

Die molekulare Diagnostik ist eine Voraussetzung auch für die Auffindung neuer bzw. bisher unbekannter Krankheitserreger. Meine Gruppe beschäftigt sich seit etlichen Jahren mit Infektionen durch Hantaviren. Dies sind Erreger, die von kleinen Säugetieren auf den Menschen übertragen werden und hier Nieren- und/oder Lungenversagen auslösen. Zur Abschätzung der Infektionsrisikos war dringend eine Kenntnis derjenigen Viren notwendig, die in verschiedenen geographischen Regionen in bestimmten Tieren vorkommen, auf den Menschen übertragbar sind und bei ihm Krankheiten auslösen.

Abbildung 2 zeigt unsere prinzipielle Strategie zur Lösung dieser Probleme. Dabei wird auch deutlich, dass zur Identifizierung neuer Viren, zur Charakterisierung der Nukleotidsequenz ihrer Genome und auch zur gentechnischen Expression von Virusproteinen - die zum Nachweis von Virus-Antikörpern oder zur Konstruktion gentechnischer Vakzine genutzt werden können - die oft komplizierte Anzucht der Viren in Zellkultur nicht mehr zwingend nötig ist. Ähnliches erleben wir gegenwärtig bei den Entwicklungen zur Diagnostik und Immunprophylaxe von Infektionen mit dem neuen Coronavirus.



**Abbildung 2:** Schema der Auffindung neuer Hantaviren im Tier und der Nutzung der amplifizierten Genomabschnitte für die Diagnostik am Menschen. Quelle: Autor

### Hochdurchsatz-Sequenzierung: Das Virom

In den letzten Jahren sind die technischen Möglichkeiten geschaffen worden, um immer schneller und kostengünstiger die Nukleotidsequenzen von kompletten Genomen identifizieren zu können. Man bestimmt dabei nicht mehr mehrere Tausend Basenpaare eines bestimmten Genoms, sondern alle sinnvoll zuzuordnenden Sequenzen aus einer Patientenprobe. Neben der Hochdurchsatz-Sequenzierung sind also auch leistungsfähige Datenverarbeitungsprogramme notwendig, um aus der erhaltenen Fülle von Informationen verwertbare Schlüsse zu ziehen. Diese Untersuchungen sind ergebnisoffen, da man nicht – wie in der Antikörperdiagnostik – virusspezifische Antigene einsetzt oder

– wie in den meisten bisherigen Formen der molekularen Diagnostik – bestimmte Ziel-Nukleotidsequenzen von Viren vorgibt. Damit besteht auch leichter die Möglichkeit, neue, bisher nicht untersuchte Erreger aufzufinden.

Je nach Infektionszustand und Entnahmeort der Untersuchungsprobe im Organismus entsteht als Ergebnis der Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Fülle von Daten, die Genome von Viren, Bakterien, Parasiten und natürlich der Körperzellen repräsentieren. Was die Viren betrifft, so erkennt man beispielsweise bei einer Probe aus dem Darm nicht nur pathogene und nicht-pathogene Viren, sondern auch eine große Anzahl sogenannter endogener retroviraler Elemente (die im Laufe der Evolution in unser Genom gelangt sind) und vor allem Bakterienviren, die sich in Wechselwirkung mit der umfangreichen bakteriellen Flora unseres Darms befinden. Unser Bild wird immer komplexer.

### **Weiterführende Literatur**

Artika IM, Wiyatno A, Ma'roef CN (2020). Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect. Genet. Evol.* 81:104215.

Feldmann H, Feldmann F, Marzi A (2018). Ebola: Lessons on vaccine development. *Annu. Rev. Microbiol.* 72:423-446.

Kruger DH, Figueiredo LT, Song JW, Klempa B (2015). Hantaviruses: Globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.* 64:128-36.

Neil JA, Cadwell K (2018) The intestinal virome and immunity. *J. Immunol.* 201:1615-1624.

**E-Mail-Adresse des Verfassers:** [detlev.kruger@charite.de](mailto:detlev.kruger@charite.de)