

Genetische Modifikation des CFTR Gens zur Langzeit-Korrektur bei zystischer Fibrose



➤ **Mukoviszidose (oder zystische Fibrose, CF) ist eine angeborene Erkrankung, die in Deutschland mit einer Häufigkeit von etwa 1: 2.500 Neugeborenen vorkommt. Damit zählt sie zu den seltenen Erkrankungen, ist unter diesen aber eine der häufigsten. In Deutschland haben rund 8.000 Menschen Mukoviszidose. Mehr als 4 Millionen Bundesbürger können diese unheilbare Krankheit potenziell weitervererben.**

Die Erkrankung ist bedingt durch eine Veränderung des CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) – Gens. Dieses Gen dient als Bauplan für das CFTR-Protein, einem Ionenkanal, der den Durchtritt von Chlorid-Ionen durch die Zellmembran aus dem Zellinneren in die Umgebung der Zelle erlaubt. Zudem hat das Protein einen regulierenden Einfluss auf den Austausch der Natriumionen von Zellen der Deck- und Drüsenorgane: Die Ionen ziehen Wasser aus den umliegenden Zellen an sich und beeinflussen damit die Flusseigenschaften aller Körpersekrete, die von sogenannten exokrinen Drüsen abgegeben werden. Bei CF-Patienten ist wegen des defekten Chlorid-Ionenkanals der Ionenaustausch gestört und dadurch der Wassergehalt der Drüsensekrete erniedrigt. Die Auswirkungen betreffen zahlreiche Körperfunktionen.

Ein erster Hinweis auf CF ist die oft salzig schmeckende Haut von Neugeborenen, denn die Störung des Ionenaustausches an den Schweißdrüsen führt zu einem erhöhten Salzverlust über den Schweiß. Dies wird mittels Schweißtest zur Diagnostik von CF genutzt. Bereits im Säuglingsalter zeigt die Mehrzahl der betroffenen Patienten eine Funktionsstörung der Bauchspeicheldrüse, in deren Folge es zu Problemen bei der Verdauung und der Aufnahme der Nährstoffe über den Darm kommt. Dies führt, unbehandelt, zu einer Gedeihstörung der betroffenen Kinder.

In den Atemwegen kommt es bereits im Säuglingsalter zu einer obstruktiven Symptomatik mit Überblähung der Lunge. Dies ist bedingt durch eine gestörte Selbstreinigung der Bronchien und eine Entzündungsreaktion in den kleinen Atemwegen. Bei manchen Kindern können sehr quälende Hustenepisoden hinweisend auf die zugrunde liegende Erkrankung sein.

Im weiteren Verlauf kommt es neben viralen Infektionen zu wiederholten bakteriellen Infektionen der Atemwege. Begünstigt werden diese durch eine für CF typische Überreaktion des Immunsystems, das auf Dauer das Lungengewebe schädigt und anfällig für weitere Infektionen macht. Der Verlauf der Lungenerkrankung ist bei 90-

95 % der CF-Patienten der wesentliche Faktor, der die Lebensqualität und Lebenserwartung bestimmt: Die Lebenserwartung der CF-Patienten, die in den 1950er Jahren noch bei deutlich unter 20 Jahren lag, ist durch verbesserte therapeutische Konzepte, neue Medikamente sowie einer Behandlung in Spezialzentren auf über 40 Jahre in Mitteleuropa angestiegen.

Im Verbundprojekt GALENUS arbeiten deutschlandweit Wissenschaftler aus den Bereichen Kinderheilkunde, Biotechnologie, Tierphysiologie und pharmazeutische Forschung zusammen. Ihr gemeinsames Ziel ist eine genetische Korrektur betroffener somatischer Stammzellen bei CF. Ausgehend von den zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen werden zwei Strategien verfolgt: Im ersten Ansatz soll die gesunde („Wildtyp-“) Sequenz des CFTR-Gens in die Oberflächenzellen der Luftwege, bevorzugt Stammzellen, eingeschleust werden (Paul Ehrlich Institute; Kinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München). Neben der korrekten Gensequenz liefern die Forscher den Zellen auch das nötige Werkzeug – das Enzym Transposase - zum Einbau des Gens in ihr Genom. Besitzt eine Zelle das Wildtyp-Gen, so kann sie auch korrekt gefaltete und verarbeitete CFTR-Proteine herstellen und die für CF typischen Ionensekretionsstörungen beheben. Dieser experimentelle Ansatz wird zunächst an Mäusen getestet, denen die molekularen Bestandteile der Therapie über die Atemwege (Vernebelung) verabreicht werden (Kinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München). Um zu überprüfen, ob eine Reparatur des defekten CFTR-Gens tatsächlich zu einer funktionellen Wiederherstellung des CFTR-Kanals führt, messen Forscher am Institut für Tierphysiologie der Universität Münster anschließend die elektrophysiologischen Veränderungen an den korrigierten Zellen.

Eine Schwierigkeit bei diesem Verfahren ist die relativ geringe Effizienz beim Einschleusen von DNA in die Zelle. DNA kann die gewünschte Funktion erst im Zellkern erfüllen. Dessen Membran stellt jedoch eine schwer zu überwindende Barriere dar.

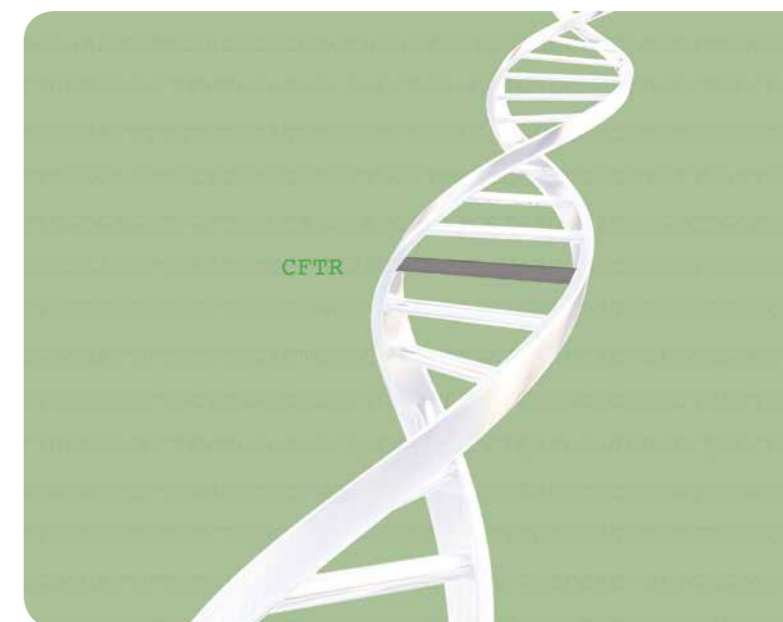
Daher greifen die Wissenschaftler auf eine neue Methode, die sogenannte SNiM® mRNA-Technologie (ethris GmbH, Martinsried) zurück. Anstelle der DNA schleusen sie das zugehörige mRNA-Transkript in die Zelle, dessen Bestimmungsort das Zellplasma ist. Damit lässt sich der Umweg über die Kernmembran vermeiden. SNiM® mRNAs sind therapeutisch nutzbare, synthetisch hergestellte Nukleinsäuren. Beim oben beschriebenen Verfahren wird die Information zur Herstellung der Transposase in Form von SNiM® mRNA in die Oberflächenzellen der Lunge eingebracht. Mit deren Hilfe produzieren die Zellen das Enzym, das dann den Einbau des intakten CFTR-Gens in das Genom übernimmt.

Mit dem zweiten Ansatz soll eine genetische Korrektur des defekten CFTR-Gens in Stammzellen des blutbildenden Systems erreicht werden, um dadurch die bei CF abnorme Immunantwort zu korrigieren. Evaluiert wird dieses Verfahren in einem Infektionsmodell bei CF-Mäusen (Medizinische Hochschule Hannover). Mit Hilfe von „Designer“-Nukleasen (sogenannten Transcription Activator-like Effector Nukleasen; TALENs) – Enzymen, die an vorgegebenen Stellen im Genom DNA-Doppelstrangbrüche einführen können - erfolgt die genetische Korrektur direkt im mutierten CFTR-Gen (Universitätsklinikum Freiburg) der entnommenen Stammzellen. Darin unterscheidet sich dieser Therapieansatz vom ersten Ansatz, bei dem die gesamte Wildtyp-Sequenz des CFTR-Gens in das Genom der respiratorischen Zellen eingeschleust wird.

Aktuell werden die skizzierten Therapieansätze in Mäusen getestet. Das langfristige Ziel von GALENUS ist jedoch die Etablierung klinisch relevanter Gentherapieprotokolle zur dauerhaften Korrektur des CFTR-Gendefekts - damit Mukoviszidose irgendwann keine unheilbare Krankheit mehr ist.

TEILPROJEKTE:

- *In vivo*-Applikation von Nukleinsäuren für die Langzeit-Expression von CFTR (Prof. J. Rosenecker, LMU München)
- Optimierung stabilisierter nicht-immunogener mRNA zur Verbesserung der Sleeping Beauty Transposition und ZFN-vermittelten Genkorrektur (Dr. C. Rudolph, Planegg)
- Sleeping Beauty Transpositions-basierte Ansätze für die *in vivo*-Gentherapie von Cystischer Fibrose (Dr. Z. Ivics, Langen)
- Gezielte Genommodifikation zur Korrektur des Immunphänotyps (Prof. T. Cathomen, Freiburg)
- Funktionaler Nachweis der CFTR-Korrektur nach genetischer Modifikation von Epithelzellen bei Cystischer Fibrose (Prof. WM Weber, Münster)
- Funktionelle Evaluation des Gentransfers in CF-Mäusen in einem Infektionsmodell (Prof. B. Tümmler, Hannover)



Mutationen im CFTR-Gen, die einen defekten Chlorid-Ionenkanal zur Folge haben, führen zum Krankheitsbild der zystischen Fibrose (Mukoviszidose). Diese Störung im Chlorid-Ionenkanal führt zu einer Beeinträchtigung zahlreicher Körperfunktionen. Betroffen sind vor allem die Atemwege, aber auch das Verdauungssystem. Galenus untersucht mit Hilfe moderner Verfahren der Molekularbiologie, ob die fehlerhafte genetische Information in den Stammzellen des Körpers korrigiert werden kann, um somit langfristig eine neue Therapie für Patienten mit zystischer Fibrose zu entwickeln.

Foto: iStockphoto

KOORDINATION:

Prof. Dr. Joseph Rosenecker
Klinikum der Universität München
Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen
Kinderspital

Lindwurmstr. 4
80337 München

Phone: +49 (0)89 5160-7711

E-mail: joseph.rosenecker@med.uni-muenchen.de

Neue Rufnummern ab 1.6.2014!

Zentrale: 089 4400 – 0

