

Paper of the month, August 2016

Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model

Christien Bednarski, Katja Tomczak, Beate vom Hövel, Wolf-Michael Weber, Toni Cathomen

PLoS ONE 11(8), 2016 Aug 15

Für die meisten seltenen (Erb)krankheiten gibt es bislang keine kausale Therapie. Eine medikamentöse Therapie kann die Krankheit oftmals lindern, aber eben nicht vollständig heilen. Eine lebenslange Einnahme von Medikamenten ist daher notwendig. Chance auf dauerhafte Heilung bietet die Gentherapie. Entsprechende klinische Studien gibt es seit den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts, allerdings bergen die Vektoren der frühen Generationen hohe Risiken, insbesondere hinsichtlich der Entstehung von Malignomen. Hoffnung bieten neue molekularbiologische Methoden, die zielgerichteter und damit wahrscheinlich risikoärmere Modifikationen erlauben. Sie sind als „Genetic engineering“ oder „Genchirurgie“ bekannt, zu nennen sind TALEN, Zinkfinger-Nukleasen und in letzter Zeit CRISPR/Cas9.

Ein Beispiel für eine präklinische Anwendung dieser Methoden stellt die Publikation aus dem GALENUS-Netzwerk dar: Am Beispiel des *CFTR*-Gens zeigten die Forscher eine Möglichkeit, wie ein mutiertes Gen in einer aus einem Patienten gewonnenen Zelllinie korrigiert werden kann. Dabei wurde eine Sequenz, ein sogenanntes Super-Exon, verwendet, welches die Exone 11 bis 27 beinhaltet. Damit können alle bekannten Mutationen des *CFTR*-Gens ersetzt werden. Die Forscher verwendeten eine Zinkfinger-Nuklease, die es ermöglicht, eine zielgerichtete Integration der korrigierten Sequenz vor das erste mutierte Exon zu erreichen. Um zu verhindern, dass die korrigierte Sequenz ebenfalls durch die Zinkfinger-Nuklease erkannt wird, wurden in der Erkennungssequenz stille Mutationen eingefügt; diese erleichtern gleichzeitig die Überprüfung der so veränderten Zellen. Alle so korrekt veränderten Zellen weisen eine mono-allelische Veränderung auf, die aber ausreicht, um die *CFTR*-Funktion und die bioelektrischen Eigenschaften der Zellen vollständig wiederherzustellen.

Ein Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Methode ist es, dass durch die Korrektur des Gens im natürlichen Kontext eine physiologische Regulation des neuen Super-Exons ermöglicht wird. Somit könnte eine Fehlregulation von genetisch veränderten Zellen verhindert werden. Durch die Verwendung eines Super-Exons können die Ergebnisse dieser Arbeit problemlos auf andere genetische Veränderungen von *CFTR* übertragen werden. Die Forscher zeigen hier einen vielversprechenden Ansatz zu einer Gentherapie, der zu einer neuen Möglichkeit der Behandlung einer CF-Erkrankung führen kann. Selbstverständlich sind weitere präklinische Daten in Zell- und Tiermodellen erforderlich, um die Wirkung und vor allem die Sicherheit der Methode zu testen, bevor es zu einer Anwendung am Menschen kommen kann.

Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model

Christien Bednarski, Katja Tomczak, Beate vom Hövel, Wolf-Michael Weber, Toni Cathomen

PLoS ONE 11(8), 2016 Aug 15

So far, there is no causal therapy for most hereditary diseases. Medical treatment can often ease but not to cure the disease. Lifelong medication is therefore necessary. Opportunity for permanent cure is provided by gene therapy. Clinical studies have been conducted since the nineties of the past century, but vectors of the early generation harbour high risks, in particular with regard to the development of malignomas. New methods in molecular biology raise hope as they allow more targeted modifications and therefore probably have fewer risks. These methods are known as “genetic engineering” or “genetic surgery” and include TALEN, zinkfinger nucleases and - more recently - CRISPR/Cas9.

A publication of the GALENUS-network is an example of a preclinical application of these methods: The researchers show how to correct a mutated gene in a patient-derived cell line, working in the Cystic fibrosis-related gene *CFTR*, used a genetic sequence called super-exon which contains exons 11 to 27 of the wildtype sequence. This can be used to correct every known mutation of the *CFTR* gene. The group was able to achieve a targeted integration of the corrected super-exon upstream of the first mutated exon by using a zinkfinger nuclease. To ensure that the inserted sequence is not cut out by the zinkfinger nuclease as well, they included silent mutations in the recognition site. These mutations also facilitate a screening of the modified cells. All correctly modified cells harbour a mono-allelic change. However, this is sufficient to completely restore CFTR function and the bioelectric features of the cells.

It is an advantage of the method that it works by correcting the gene in the natural context; therefore a physiologic regulation of the gene is made possible. This minimizes the risk of misregulation of the genetically modified cells. By using a super-exon, the results of this work can easily be transferred to other *CFTR* mutations. This promising approach could clear the way for a new treatment of cystic fibrosis. Obviously more preclinical data from cellular and animal models are necessary to evaluate the effect and particularly the safety of this method before it can be applied to patients.

Comment by

Susanne Artmeier & Dr. Tilmann Schober,
Dr. von Hauner Children’s Hospital, Ludwig Maximilians
University Munich

Susanne.artmeier@med.uni-muenchen.de; tilmann.schober@med.uni-muenchen.de