

Charles Coutelle

Von der klassischen Biochemie zur pränatalen Genterapie. Die Entwicklung der Molekularen Humangenetik im Rückblick eines beteiligten Zeitzeugen

Beim Nachdenken über meinen Beitrag zu dieser Veranstaltung wurde mir bewusst welche großen Veränderungen die Biowissenschaften durchgemacht haben seitdem ich Mitja Rapoport 1965 zum ersten Mal begegnete und, dass diese Veränderungen aus der Sicht meines Werdegangs vielleicht mitteilenswert seien. Für mich sind sie vor allem durch die Entwicklung der Molekularen Humangenetik (1) gekennzeichnet.

Ursprünglich wollte ich Kinderarzt werden und dachte diese Laufbahn mit einer fundierten Ausbildung in der Biochemie zu beginnen. So fing ich 1965 in Rapoport's Institut für Physiologische und Biologische Chemie als Assistent an und die Erfahrungen der folgenden sieben Lehrjahre haben mich in meinem weiteren Berufsleben ständig begleitet. So z.B. die in der Arbeitsgruppe Wagenknecht zuerst erfahrene Verbindung von Grundlagenforschung (zur Atmungskette) mit einem Anwendungsprojekt (zur Enzymdiagnostik).

Als Lehrassistent lernte ich, erst einmal lehrend, die ganze Breite der Medizinischen Biochemie. Vor Allem aber faszinierten mich die Probleme der genetisch bedingten Erkrankungen, die damals, mit der von Garrod 1908, am Beispiel der Alkaptonurie (AKU) geprägten klassisch-biochemischen Terminologie, als angeborene Stoffwechselstörungen, „inborn errors of metabolism“, bezeichnet wurden. In Einzelfällen, wie bei der Phenylketonurie (PKU), hatte die Kenntnis der Stoffwechselkette des Phenylalanin (Abb. 1) den Defekt im Gen der Phenylalanin-Hydroxylase identifiziert, der durch einen toxisch-erhöhten Phenylalanin Blutspiegel, zu schweren geistigen Entwicklungsstörungen führt. Ein Neugeborenentest zur Früherkennung war entwickelt worden und es gab eine Eiweiß-Hydrolysat-Diät, die diese Aminosäure nicht enthielt. Allerdings schmeckte sie so abscheulich, dass sie nur mit großen Schwierigkeiten als Grundlage für eine jahrelange Therapie die-

nen konnte. Erst 20 Jahre später eröffnete die Molekulare Humangenetik neue Möglichkeiten für Familien mit dieser Erkrankung.

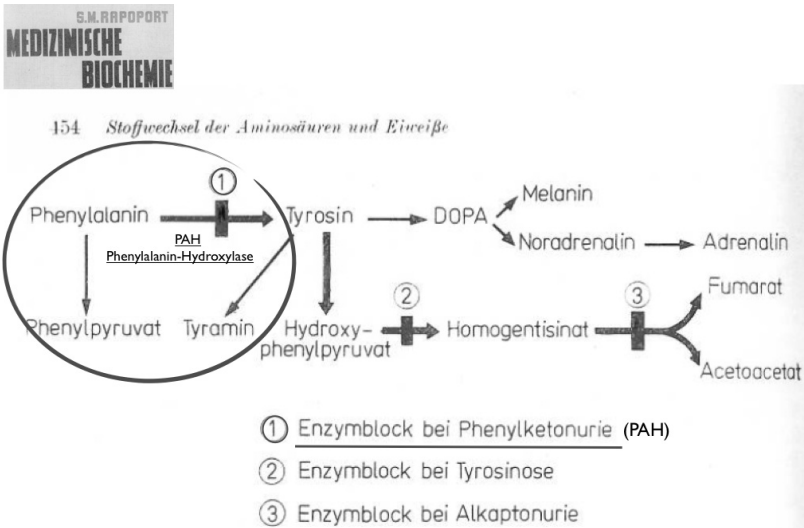


Abb. 1: Stoffwechselweg des Phenylalanins identifiziert Mutation der Phenylalanin-Hydroxylase (PHA) als Ursache der klassischen Phenylketonurie

Mitja förderte meine genetischen Interessen: Ich kam in Sina Rosenthals Gruppe in der über die Reifungs- und Differenzierungsprozesse roter Blutzellen geforscht wurde und wurde für ein halbes Jahr an das Akademieinstitut für Molekularbiologie nach Moskau delegiert, um Nukleinsäure-Biochemie zu lernen. Damit begann mein Weg in die noch junge Molekularbiologie, zuerst mit der Isolierung von Globin mRNA, der Biosynthesematrix des roten Blutfarbstoffs, Hämoglobin (2). Die Globin mRNA war, über ihre direkte Nutzung in unseren Forschungsarbeiten hinaus, ein wichtiger Beitrag zu der von Sina koordinierten DDR-Mitwirkung am Multilateralen Revertase Programm der UdSSR, CSSR und DDR, das zum Ziel hatte, die Grundlagen für eine breitere Einführung der Gentechnik in diesen Ländern zu schaffen; in der DDR unter anderem mit der Absicht, die schon länger schwelende Idee aus dem Hause Rapoport zur gentechnischen Produktion von Insulin zu verwirklichen. Im Mittelpunkt der Gentechnik stehen die Methoden der Molekularen Klonierung, durch die reine, spezifische Gensequenzen in größeren Mengen isoliert werden können. Im Rahmen des Revertase Programms erfolgte in

Prag und Berlin auch die Produktion der Reversen Transkriptase, die die *in vitro* Biosynthese von Gensequenzen (cDNA) ermöglicht; und in allen 3 Partnerländern wurde außerdem eine Palette verschiedener Sequenz-spezifischer, DNA schneidender Restriktionsendonukleasen hergestellt.

Die Globin mRNA brachte mich in Kontakt mit Bob Williamson in Großbritannien und führte zur Mitarbeit an der Klonierung von cDNA-Gensequenzen der Hämoglobine des Menschen im Jahre 1978 in seiner Londoner Gruppe (3). Die Human-Globin cDNA-Sequenzen waren die zweiten klonierten Humangensequenzen überhaupt und ihre Klonierung leitete den Beginn der Entwicklung der Molekularen Humangenetik ein. Mit Hilfe dieser isolierten Gensequenzen konnten erstmalig molekulare DNA-Analysen und die DNA-Diagnostik der genetischen Erkrankungen des roten Blutfarbstoffes (Hämoglobinopathien), wie der Sichelzellanämie und der Thalassämien, durchgeführt werden. Im Mittelmeerraum, in Südostasien und in Großbritannien, unter den Einwanderern aus diesen Gebieten, sind diese schweren genetischen Erkrankungen auf Grund ihrer Häufigkeit von großer medizinischer Wichtigkeit: Auch bei diesen Krankheiten, gab es wie bei der PKU, eine symptomatische Therapie – lebenslange Bluttransfusionen – die schwer organisierbar und teuer sind, keine Heilung bewirken und auf die Dauer durch Eisenablagerungen zum Tode führen. Auf Grund des 2-fachen Chromosomensatzes, den wir alle haben, zeigen Eltern der erkrankten Kinder gewöhnlich keine Zeichen dieser autosomal rezessiven Erkrankungen, da sie neben dem mutierten Gen auf einem Chromosom auch ein kompensierendes nicht-mutiertes Allel auf seinem homologen Partnerchromosom tragen. In diesen Familien besteht ein 1:4 Risiko, dass die Nachkommen von beiden Eltern das Chromosom mit dem mutierten Allel erhalten und dadurch krank werden (Abb. 2A).

Die isolierten Hämoglobin-Gensequenzen boten nun die neue Möglichkeit, durch DNA-Analyse (aus Chorionzotten oder Amniozyten) die Vorgeburtsdiagnose dieser Erkrankung zur Vermeidung eines kranken Kindes aus dem dritten Schwangerschaftstrimester (Hämoglobinanalyse aus Nabelschnurblut) in das erste bzw. frühe zweite Trimester vor zu verlegen. Am einfachsten war das bei der schweren alpha-Thalassaemie (Hydrops fetalis), die durch ein völliges Fehlen (Deletion) des alpha-Globin Genkomplexes hervorgerufen wird (4). Nach Schneiden isolierter Human-DNA mit bestimmten Restriktionsenzymen und Auftrennung der entstehenden DNA-Fragmente mittels Elektrophorese kann, durch eine Basenpaarungs-Reaktion mit der spezifischen klonierten cDNA-Globin-Gensequenz, ein charakteristisches

Bandenmuster des untersuchten Gens sichtbar gemacht werden. Beim Hydrops fetalis ist bei den Anlagenträger-Eltern eine um 50% verminderte Bandenintensität und bei dem betroffenen Kind bzw. Fetus ein völliges Fehlen der alpha-Globinbande erkennbar (Abb. 2B). Zuerst im UK und dann vor allem in Zypern und Sardinien gelang es in den folgenden Jahren, durch eine derartige Frühdiagnose und gegebenenfalls einen Schwangerschaftsabbruch, eine erhebliche Reduktion der Erkrankungen zu erreichen und vielen Familien zu gesunden Nachkommen zu verhelfen (5).

1978 Prenatale DNA Diagnose (Deletionsnachweis) bei Hydrops fetalis alpha-Thalassämie

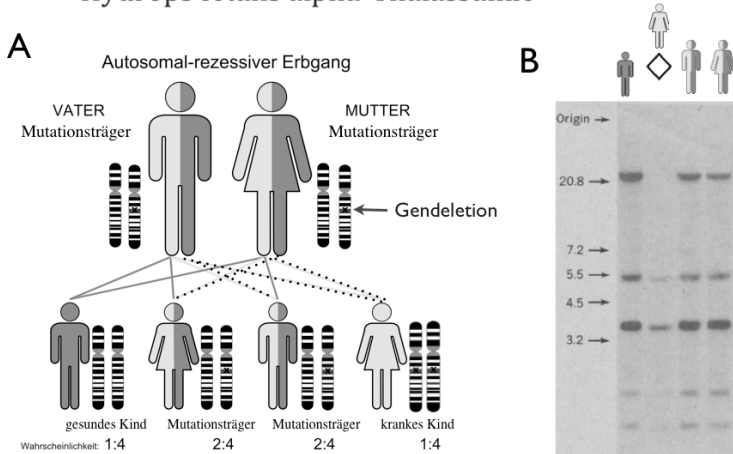


Abb. 2: Autosomal-rezessiver Erbgang bei alpha-Thalassämie (A) und Nachweis der Deletion der alpha Globingene durch DNA-Analyse: Aufspaltung der DNA einzelner Familienmitglieder durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen, elektrophoretische Auftrennung der Fragmente und Nachweis der spezifischen alpha-Globingen-Fragmente durch Reaktion mit radioaktiver alpha- und beta- Globin-cDNA. Die 20,8Kb Bande repräsentiert die alpha-Globingene. Zu beachten ist die 50% reduzierte Bandenintensität bei den heterozygoten Eltern und ihr völliges Fehlen bei dem erkrankten Kind bez. Fetus (B). Adaptiert nach (4)

In der DDR spielten Mittelmeeranämien nur eine geringe Rolle, wohl aber andere monogenetisch bedingte Erkrankungen, darunter auch die PKU, für die auch das inzwischen verbesserte Diät-Hydrolysat noch keine befriedigende Lösung bot. Im Gegensatz zur alpha-Thalassämie liegen aber bei der PKU nicht Deletionen vor, die eine solche relativ einfache Ja/nein Analyse ermöglichen, sondern sind Punktmutationen die Ursache der meisten genetischen

Erkrankungen wie z.B. der Sichelzellanämie, der β -Thalassämien, der Cystischen Fibrose oder eben der PKU. Nur wenn das Kind von beiden Eltern das Chromosom mit einem mutierten Gen erhält erkrankt es an PKU. Aber an Sequenzierung der DNA von Probanden, um solche Mutationen festzustellen, war für die nächsten 20-30 Jahre nicht zu denken.

Eine Prinzip-Lösung dieses Problems wurde 1978 am Beispiel der Sichelzellanämie durch YW Kan (6) in den USA, in Form der Molekularen Genetischen Kopplung mit DNA-Polymorphismen entwickelt. Genetische Kopplung war schon lange aus der klassischen Genetik bekannt. Sie beschreibt die Beobachtung, dass bestimmte genetische Merkmale wie z.B. blaue Augen und blonde Haare bzw. dunkle Augen und braune Haare häufig zusammen bei ein und derselben Person auftreten. Diese Merkmale können aber nicht durch ein und dasselbe Gene vererbt sein, da ja bekannt ist, dass es – wenn auch seltener – Personen mit dunklem Haar und blauen Augen (und visa versa) gibt. Der Grund hierfür ist, dass die Gene für diese beiden Merkmale dicht beieinander auf dem gleichen Chromosom liegen und daher meist zusammen oder – im Fachausdruck – gekoppelt vererbt werden. Jedoch kommt es bei der Reifung der Keimzellen immer zu einem Austausch zwischen homologen Abschnitten der von den Eltern ererbten Chromosomen. Dabei kann auch mal das Gen, das blaue Augen bestimmt, mit dem für braune Augen ausgetauscht werden und so dieses dann mit dem Gen für blondes Haar zusammen vererbt werden. Solche „Entkopplungen“, also Abweichungen vom normalen Vererbungsmuster, treten umso seltener auf, je dichter die gekoppelten Genorte beieinander liegen. Aus der Häufigkeit des Auftretens solcher Entkopplungsereignisse in einer Population lässt sich daher auch der Abstand der beiden gekoppelten Gene (in Centimorgan) berechnen. Kan übertrug dieses alte Prinzip der klassischen Genetik mit Hilfe klonierter Gensequenzen auf die DNA-Ebene und nutzte es, um innerhalb einer Familie die Vererbung der Chromosomen, die die mutierten Sichelzellanämie Gene tragen, ohne Notwendigkeit einer Sequenzierung, zu markieren und zu verfolgen. Hierfür dienen geringfügige, harmlose, DNA-Sequenz-Variationen, sogenannte DNA-(Sequenz)Polymorphismen, die in jedem Genom auftreten. DNA-Polymorphismen, die sich in, oder in der Nähe, des untersuchten Gens auf dem selben Chromosom befinden und daher mit diesem gekoppelt vererbt werden, können hierbei zur Markierung und Unterscheidung der homologen Chromosomen, am einfachsten durch RFLP-Analyse, genutzt werden. Manche DNA-Polymorphismen führen nämlich zu Veränderungen im Restriktionsendonuklease-„Schnittmuster“ der DNA und dadurch zu Variationen in

der Länge der entstehenden DNA-Fragmente, also zu sogenannten Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP). Kurz gesagt, hierdurch wurde es möglich, alleine durch die Analyse der DNA-Restriktions-Bandenmuster der Eltern, von deren erkranktem Kind und von dem ungeborenen Fetus vorauszusagen, ob der Fetus von seinen beiden Eltern das mutierte Gene geerbt hat, und damit ob es krank oder gesund sein würde.

1985 Pränatale DNA Kopplungs-Diagnose für PKU

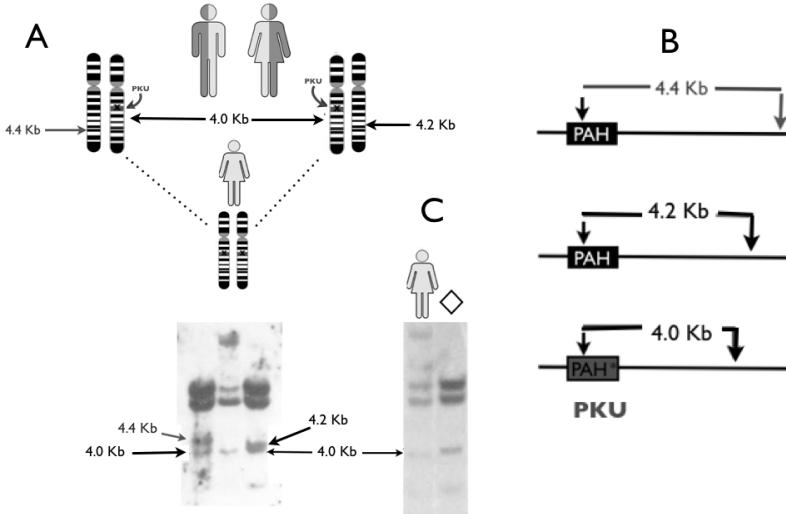


Abb. 3: Nachweis von DNA-Polymorphismen im PAH-Gen durch RFLP-Analyse und Verfolgung des Erbgangs der PKU-verursachenden Chromosomen beider Eltern. Banden-Detektion durch radioaktiv markierte klonierte PAH-cDNA (A,B). In utero Diagnose eines erkrankten Fetus durch Vergleich der RFLP-Muster des Fetus mit dem des erkrankten Kindes (C), (7,8).

Genau das brauchten wir für die PKU. Die gerade von Dahl und Cotton in Australien klonierte PAH-Gensequenz wurde uns zur Verfügung gestellt. In einer mehrjährigen Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe am Akademieinstitut für Molekularbiologie in Berlin-Buch mit Kollegen des Instituts für Humangenetik, der Kinderklinik und der Frauenklinik der Charité wurden zuerst DNA-Polymorphismen, die mit dem Phenylalanin-Hydroxylase Chromosomenort gekoppelt sind, durch DNA-Testung an PKU kranken Kindern und deren Eltern ermittelt und so die Mutations-tragenden Chromosomen markiert (7) (Abb. 3A,B). Durch die Markierung der PKU-Chromosomen konnte PKU-Familien, die bisher aus Furcht vor einem weiteren PKU-erkrankten

Kind auf weitere Nachkommen verzichtet hatten, bei einer erneuten Schwangerschaft, eine frühen Vorgeburtsdiagnostik mit der Möglichkeit eines frühzeitigen Schwangerschaftsabbruchs im Falle der Diagnose eines PKU betroffenen Kindes, angeboten werden (Abb. 3C). So haben wir 1985 die erste pränatale DNA-Diagnose der PKU in Europa durchgeführt und die untersuchte Familie entschied sich, auf Grund der Diagnose eines erkrankten Feten, zu einem Schwangerschaftsabbruch (8). Eine erneute Schwangerschaft führte dann zu einem gesunden Kind für diese Familie.

Diese sehr gute und erfolgreiche interdisziplinäre Zusammenarbeit wurde über mehrere Jahre in einem Projekt des Ministeriums für Gesundheitswesen weitergeführt und auf weitere 5 universitäre Zentren und auf andere genetische Erkrankungen ausgeweitet (9).

Andere genetische Erkrankungen waren allerdings komplizierter da z.B. für die Mukoviszidose (Cystische Fibrose) damals nicht einmal bekannt war, welches Gen für diese Erkrankung verantwortlich ist. Und hier zeigte sich die Eleganz und das Potential der Molekularen Kopplungsanalyse, die zur Grundlage des Internationalen Projektes zur Kartierung des Humangenoms, also zur Lokalisation aller Gene auf den 24 Chromosomen des Menschen, wurde und das der Vorläufer des 1990 begonnenen Internationalen Genom-Sequenzierungsprojektes war. Hierbei spielten monogenetisch vererbte Krankheiten eine zentrale Rolle: Sie lieferten, in Form der charakteristischen Krankheitsbilder, den Ausgangspunkt der Analyse. Die Verfolgung des genetischen Koppelungs- und Entkopplungsverhaltens eines bestimmten Krankheitsbildes mit verschiedenen definierten polymorphen DNA-Markern in umfangreichen Familienstammbäumen führte schrittweise zur Lokalisation und Identifizierung des gesuchten krankheitserzeugenden Gens (Abb. 4).

Damit das funktioniert sind rigoros gesicherte klinische Diagnosen und DNA von erkrankten Patienten und deren Familienmitgliedern, wo möglich über mehrere Generationen, die Grundvoraussetzung. Diese waren daher international hochbegehrte. Auf Grund der sehr guten Erfassung und Betreuung von Patienten mit den wichtigsten genetischen Erkrankungen in spezialisierten Zentren in der DDR waren gut diagnostizierte Familien und DNA-Proben von ihnen genau das, was unser Nationales Projekt zu einer über mehrere Jahre laufenden Kooperation mit Gruppen in London und Oxford anbieten konnte. Damit hat unser Projekt mit zur Kartierung der Gene für Cystische Fibrose (CF) und Duchenne Muskeldystrophie beigetragen, die schließlich zu deren Lokalisation, Sequenzierung und der Identifizierung ihrer Funktion führte. Das Schöne an diesen Arbeiten war, dass sich aus jedem neu gefunde-

nen, dichter am Genort gelegenen, gekoppelten RFLP, verbesserte Möglichkeiten zur DNA-Diagnostik dieser Erkrankungen mittels Kopplungsanalyse ergaben bis diese schließlich von spezifischen Mutationsanalysen der identifizierten Gene abgelöst wurden.

1984 Beginn des Human Genom Kartierungs Projekts

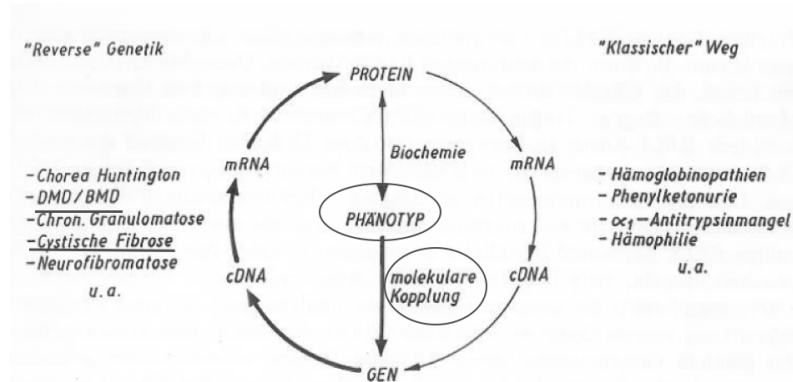


Abb. 4: Molekulare Kopplungsanalyse als Grundlage des Human-Gen-Kartierungsprojekts. Identifizierung bislang unbekannter Gene des Menschen deren Mutationen zu bekannten genetisch-bedingten Krankheiten führen. Rechts der „klassische“ biochemische Weg der Genidentifizierung: Kenntnis des defekten, krankheitsverursachenden Proteins erlaubt Isolation der kodierenden mRNA und Nutzung der cDNA-Sequenz zur Suche des genomischen Gens. Links die Molekulare Kopplungsstrategie der Genidentifizierung: Suche nach genetischer Kopplung zwischen Krankheitsbild und DNA Polymorphismen. Kopplung deutet auf Lokalisation des Polymorphismus in der Nähe des für die Krankheit verantwortlichen Gens. Häufigkeit der Kopplung und „Entkopplung“ in Erbgängen vieler Familien erlaubt Bestimmung der genetischen Distanz zwischen Gen und Polymorphismus. Schrittweise Identifizierung immer stärker gekoppelter Polymorphismen führt zum Auffinden der verantwortlichen Gensequenz. Die Identifizierung einer Protein-kodierenden Sequenz (mRNA-Sequenz) ermöglicht die Ableitung der Proteinsequenz, die ihrerseits wieder Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins bzw. des gesuchten Gens erlaubt (1).

Bei der Cystischen Fibrose stellte sich sogar heraus, dass in unserer Bevölkerung die häufigste aller krankheitserzeugenden Mutationen eine 3 Basenpaar Deletion (DF508) in dem verantwortlichen Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Gen ist (10, 11) (Abb. 5). Diese Erkenntnis, zusammen mit der in der DDR üblichen frühzeitigen Erfassung von schwangeren Frauen in Schwangerenbetreuungsstellen, erlaubte uns, 1990, in Zu-

sammenarbeit mit der Schwangerenbetreuungsstelle in Berlin Pankow, ein Pilotprojekt zur Vorgeburtsdiagnostik von CF zu beginnen (12). Wir hatten eine fast 100% Annahme des Angebotes zu dieser Untersuchung bei Schwangeren vor der 16. Schwangerschaftswoche und fanden bei 18 von 637 ein $\Delta F508$ -mutiertes CF-Gen. In einem Fall wurde dann auch bei einem Vater diese Mutation gefunden und es erwies sich, dass der Fetus beide mutierten elterlichen Gene geerbt hatte. Die Familie entschied sich für einen Schwangerschaftsabbruch und eine spätere Schwangerschaft führte auch in diesem Fall zu einem gesunden Kind. Obwohl inzwischen eine fast 100%ige Identifizierung der in unserer Bevölkerung vorkommenden CF-Mutationen möglich ist, wurde diese präventive Strategie zur Vermeidung der Geburt von an CF-erkrankten Kindern in Deutschland nicht weiter verfolgt.

1989 Pränatale DNA-Diagnose von CF: DeltaF508 PCR

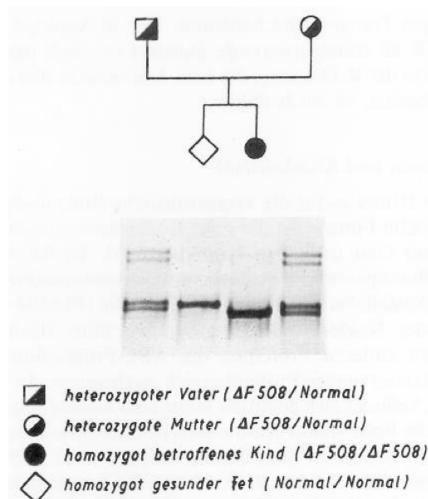


Abb. 5: Elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenz-Nachweis von mittels spezifischer Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifizierter Gensequenzen im Bereich der Cystische Fibrose verursachenden $\Delta F 508$ Mutation (drei Basenpaar-Mutation) im Cystische Fibrose Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Gen. Die heterozygoten Eltern weisen sowohl die normale, langsamer laufende obere Bande, wie die schneller laufende untere Deletions-Bande auf. Das erkrankte Kind ist homozygot für die Deletions-Bande; der untersuchte Fetus hat nur die obere Bande und kann daher als gesund diagnostiziert werden.

Nun ist die Verhinderung einer genetischen Erkrankung durch einen Schwangerschaftsabbruch zwar eine Lösung, aber natürlich durchaus keine ideale,

und so war für mich – als ohnehin im Zuge der Übernahme Alt-Bundesdeutscher Forschungs- und Gesundheitsprioritäten Akademie-Institute abgewickelt und die Schwangerschaftsberatungsstellen und spezialisierte Betreuungsstellen verschwanden – das Angebot an einer kausalen Lösung durch Gentherapie mitzuwirken, sehr reizvoll.

1992 übernahm ich in London die Leitung einer Gruppe, die dieses Ziel verfolgte. Das Prinzip der Gentherapie ist bekanntlich theoretisch sehr einfach: Da genetische Erkrankungen durch defekte Gene hervorgerufen werden, sollten diese Krankheiten durch das Einbringen der normalen Gene heilbar sein. 1993 führten wir, gemeinsam mit 2 anderen britischen Gruppen den ersten klinischen Versuch zur Korrektur der Störungen im Chloridtransport der Atemwege bei CF-Patienten durch einen Liposomen-vermittelten Transfer von CFTR-Gensequenzen in das Nasenepithel durch. Parallel dazu wurden in den USA von mehren Gruppen gleichartige Versuche mit Adenovirus-Vektoren durchgeführt. Die Ergebnisse waren in allen Versuchen ähnlich: Sie zeigten zwar eine positive Veränderung in den gemessenen elektrophysiologischen Parametern, aber diese waren sehr variabel und nur kurzzeitig (13). Offensichtlich war hier viel mehr Labor-experimentelle Arbeit notwendig, bevor weitere klinische Versuche ins Auge gefasst werden könnten. Ineffektivität des Gentransfers, Immunreaktionen und toxischen Nebenwirkungen sind noch immer ernsthafte Hindernisse einer effektiven Gentherapie. Hinzu kommt, dass viele genetische Erkrankungen sich sehr früh manifestieren und irreversible Organschäden hervorrufen. Erst im Jahre 2000 gelang, nach zahlreichen Enttäuschungen und Rückschlägen, die erste erfolgreiche Klinische Gentherapie-Studie der kindlichen Immundefizienzen (X-SCID, „Bubble-Babies“) (14).

Diese Überlegungen führten uns zum Konzept der fetalen Gentherapie (15-17). Diese sollte bereits *in utero* die Krankheitsmanifestation und Organschäden verhindern. Der Vorteil dieser Strategie liegt u. A. in einem besseren Zugang zu den noch relativ einfach-strukturierten fetalen Geweben und ihren expandierenden Stammzellpopulationen und in der Nutzung der Immuntoleranz gegen den Vektor und das therapeutische Eiweiß auf Grund der Unreife des fetalen Immunsystems.

Die folgenden 15 Jahre waren der Prüfung dieser Hypothese an Tiermodellen gewidmet; zuerst an Mäusen (18), (19) um die Gentransfer-Effizienz und die therapeutischen Effekte zu studieren, dann an Schafen (20, 21), um den Einsatz von minimal invasiven Methoden der fetalen Medizin zu erproben und schließlich an Primaten (22). Primaten sind das geeignetste Tiermodell für langfristige Beobachtungen zum Nachweis persistenter Expressions-

höhen des therapeutischen Proteins und zum Ausschluss von kurz- oder langfristig auftretenden Nebenwirkungen wie Entwicklungsstörungen, Tumoren oder einer Keimbahntransmission in Vorbereitung auf eine mögliche Humananwendung.

2011 Andauernde Expression therapeutischer hFIX- Blutspiegel nach fetaler Gentherapie in Rhesus-Affen

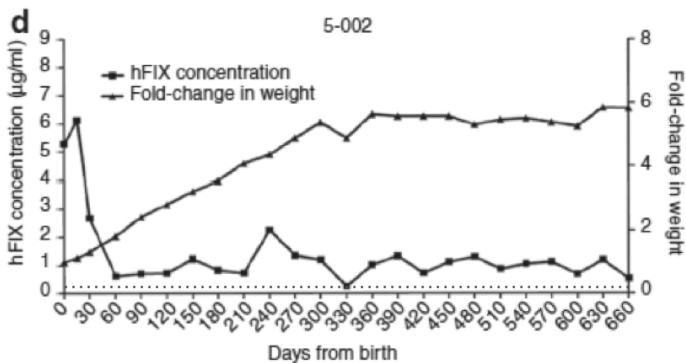


Abb. 6: Mehrjährig-stabile postnatale Expression eines potentiell therapeutischen Blutspiegels von Human-Faktor IX nach pränataler Gentherapie in einem Rhesus Äffchen. (Oberhalb der punktierten Linie). (24)

Es ist uns in diesen Modellen gelungen, einen Gentransfer in praktisch alle klinisch-relevanten Gewebe mit hoher Effektivität zu erreichen und Toleranz gegenüber dem therapeutischen Protein nachzuweisen. Im Mausmodell für Hämophilie B wurde eine lebenslange Heilung dieser Krankheit erreicht (23) und mehr als 10 Rhesusäffchen, die jetzt über ein Jahr therapeutische Human-FIX-Spiegel aufweisen (Abb. 6), haben keine negativen Nebenwirkungen gezeigt (24). Im Mausmodell sind inzwischen, durch verschiedene internationale Gruppen, therapeutische Effekte für mehrere Gendefekte, unter anderem auch für PKU, gezeigt worden (25).

Die fetale Gentherapie wirft eine Reihe von spezifischen ethischen Fragen auf, auf die ich hier aus Zeitgründen nicht näher eingehen kann, die aber ihre klinische Einführung sehr wesentlich beeinflussen werden. Am Ende jedoch werden die Effektivität, Einfachheit, Sicherheit und Verlässlichkeit einer *in utero* Gentherapie im Vergleich zu anderen therapeutischen Optionen, wie eine pharmakologische Therapie oder eine prä- oder postnatale Zelltherapie,

entscheidend sein (17). Am Wahrscheinlichsten wird diese wohl zuerst bei schweren frühmanifestierenden Gendefekten für die es keine erfolgversprechende postnatale Behandlung gibt, in Familien, die einen Schwangerschaftsabbruch prinzipiell ablehnen, Anwendung finden.

Zwei Dinge sind aber jetzt schon klar, die auch wesentlich einfachere ethische Situationen darstellen: Erstens, dass die pränatale Gentherapie auch zur relativ kurzfristigen Behandlung von Schwangerschaftskomplikationen wie z.B. der Eklampsie, fetalen Wachstumsrestriktion und Diaphragma-Atresie beginnt Anwendung zu finden (26). Zweitens haben die Prinzip-Demonstrationen einer erfolgreichen *in utero* Gentherapie mit dazu beigetragen, die postnatale Einsatzgrenze der Gentherapie bis in das Kindesalter akzeptabel zu machen. Es kann auch vorausgesagt werden, dass sie auch bald in die Neonatologie, also dem medizinischen Fachgebiet das unsere verehrte Jubilarin mit aus der Wiege gehoben und geformt hat, bald Einzug halten wird.

Das vielleicht Wichtigste was ein Lehrer seinem Schüler vermitteln kann ist wohl nicht so sehr das unmittelbar gelehrt Fachwissen sondern insbesondere die Fähigkeit zum Lernen und Verstehen des Wissens, das der Lehrer selbst noch gar nicht wissen konnte; und in diesem Sinne war mein Lehrer Mitja Rapoport bei meiner Wissenschaftsreise ins Unbekannte immer dabei (Abb.7).

1908 Garrod formuliert das Konzept der angeborenen Stoffwechselstörungen ("Inborn errors of metabolism")

1938 Fölling beschreibt die Phenylketonurie

1953 Watson/Crick: DNA Struktur Entdeckung

1962 Guthrie: Neonataler Screening Test für PKU

1968 Entdeckung der Restriktionsenzyme

1970 Entdeckung der Reverse transcriptase

1971 Human Globin mRNA Isolation

1972 Erste *in vitro* DNA-Rekombination (molekulare Klonierung)

1972 Erste globin cDNA Synthese

1978 Human Globin Genesequenzen kloniert

1978 Prenatale DNA Diagnose alpha-Thalassämie

1978 Molekulare DNA-Kopplungsanalyse

1984 Beginn des Human Genom Kartierungs Projekts

1985 Pränatale DNA-Kopplungs-Diagnose für PKU

1985 PCR Erfindung und Anwendung zur Pränatal Diagnose von HB⁵

1986 DNA-Kopplungs-Diagnosen für CF

1989 Identifizierung des CF Gens und erste spezifische Mutationsdiagnostik

1990 Beginn des Human Genom (Sequenzierungs-) Projekts

1990 Erste Gentherapie Studien (Krebs und Adenosyl-Dehydrogenase Defizienz)

1990 Heterozygoten Mutations-Test und pränatale Diagnosen für CF

1992 Heterozygoten Schwangerenscreening für CF

1993 Erste Phase 1 Gentherapie-Studien für CF

1995 Erste Arbeiten zur Fetalen Gentherapie (Nagermodelle)

1996 Dolly: Kerntransfer in Säuger-Oozyten (Reproduktive Klonierung)

1999 Ultraschall-gesteuerter Gentransfer im Schaf-Fetus

1999 Tod Jesse Gelsingers in Phase 1 Gentherapie Studie

2000 Erste erfolgreiche klinische Gentherapie Studie (X-SCID)

2004 Langzeit Gentherapie-Korrektur von PKU in Mäusen

2004 Dauerhafte *in utero* Gentherapie der Hämophilie in der Maus

2011 Andauernde Expression therapeutischer hFIX-Blutspiegel nach *in utero* Gentherapie in Rhesus Affen

Abb. 7: Subjektive Auswahl wichtiger Meilensteine der Entwicklung der Molekularen Humangenetik.

Literatur

1. Coutelle, C., Speer, A., Grade, K., Rosenthal, A., and Hunger, H.-D. (1989) *Pädiatr. Grenzgeb.* 28, 319-346.
2. Ladhoff, A., Thiele, B., Coutelle, C. (1975) *Eur. J. Biochem.* 58, 431-438.
3. Little, P., Curtis, P., Coutelle, C., Van den Berg, J., Dalgleish, R., Malcolm, S., Courtney, M., Westaway, D., and Williamson, R. (1978) *Nature* 273, 640-643.
4. Dozy, A., Forman EN, Abuelo DN, Barsel-Bowers G, Mahoney MJ, Forget BG, Kan YW. (1979) *JAMA.* 241, 1610-1612.
5. Modell, B. (1983) *British Medical Bulletin* 39, 386-391.
6. Kan, Y. W., and Dozy, A. M. (1978) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 5631-5635.
7. Speer, A., Dahl, H. H., Riess, O., Cobet, G., Hanke, R., Cotton, R. G., and Coutelle, C. (1986) *Clin Genet* 29, 491-495.
8. Speer, A., Bollman, R., Michel, A., Neumann, R., Bommer, C., Hanke, R., Riess, O., Cobet, G., and Coutelle, C. (1986) *Prenat Diagn* 6, 447-450.
9. Coutelle, C., and Speer, A. (1990) Genomics in the German Democratic Republic, *Genomics* 8, 182-186.
10. Kerem, B.-S., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L.-C. (1989) *Science* 245, 1073-1080.
11. Coutelle, C., and Grade, K. (1992) *Pädiatr. Grenzgeb.* 31, 73-95.
12. Jung, U., Urner, U., Grade, K., and Coutelle, C. (1994) *Hum. Genet.* 94, 19-24.
13. Caplen, N. J., Alton, E. W. F. W., Middleton, P. G., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., Durham, S., Jeffrey, P. K., Hodson, M. E., Coutelle, C., Huang, L., Porteous, D. J., Williamson, R., and Geddes, D. M. (1995) *Nature Medicine* 1, 39-46.
14. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. (2000) *Science* 288, 669-672.
15. Coutelle, C. (1995) *Nature Med.* 1, 9, 864-866.
16. Coutelle, C. Douar, A.-M., Colledge, W.H. and Froster, U. (2010) *Leibniz Online Publication.*, 08, 2-29. http://www.leibniz-sozietae.de/journal/archive/08_10/coutelle.pdf
17. Coutelle, C., and Ashcroft, R. (2012) *Methods in molecular biology. Springer Protocols* 891, 371-387.
18. Douar, A. M., Adebakin, S., Themis, M., Pavirani, A., Cook, T., Coutelle, C. (1997) *Gene Ther* 4, 883-890.
19. Roybal, J. L., Endo, M., Buckley, S. M., Herbert, B. R., Waddington, S. N., and Flake, A. W. (2012) *Methods in molecular biology. Springer Protocols* 891, 201-218.
20. Abi-Nader, K. N., Boyd, M., Flake, A. W., Mehta, V., Peebles, D., and David, A. L. (2012) *Methods in molecular biology* 891, 219-248.

21. Themis, M., Schneider, H., Kiserud, T., Cook, T., Adebakin, S., Jezzard, S., Hanson, M., Pavirani, A., Rodeck, C., Coutelle, C. (1999) *Gene Therapy* 7, 1239-1248.
22. Mattar, C. N., Biswas, A., Choolani, M., and Chan, J. K. (2012) *Methods in molecular biology. Springer Protocols* 891, 249-271.
23. Waddington, S., Nivsarkar, M., Mistry, A, Buckley, S M.K, Al-Allaf, F, Bigger, B, Holder, M, Kemball-Cook, G, Mosley, K L, Brittan, M, Ali, R, Gregory, L, Cook, H. T, Thrasher, A., Tuddenham, E G.D , Themis, M, Coutelle, C. (2004) *Blood* 104, 2714-2721.
24. Mattar, C. N., Nathwani, A. C., Waddington, S. N., Dighe, N., Kaepfel, C., Nowrouzi, A., McIntosh, J., Johana, N. B., Ogden, B., Fisk, N. M., Davidoff, A. M., David, A., Peebles, D., Valentine, M. B., Appelt, J. U., von Kalle, C., Schmidt, M., Biswas, A., Choolani, M., and Chan, J. K. (2011) *Molecular Therapy* 19, 1950-1960
25. Oh, H. J., Park, E. S., Kang, S., Jo, I., and Jung, S. C. (2004) *Pediatr Res* 56, 278-284.
26. David, A. L., and Waddington, S. N. (2012) *Methods in molecular biology. Springer Protocols* 891, 9-39.