

Charles Coutelle

Individualisierte Medizin bei genetisch bedingten Erkrankungen. Die Anwendung personeneigener Genominformation zur Diagnose und Therapie der Zystischen Fibrose

*„Vor der Therapie haben die Götter die Diagnose gesetzt“.
(Franz Vollhard)*

Einleitung

Der Begriff individualisierte (personalisierte) Medizin ist im Grunde genommen eine Tautologie. Eine korrekte Diagnose und daraus abgeleitete Therapie sollte immer „personalisiert“ sein; bestimmt eben für diese Krankheit unter weitest gehender Kenntnis und Berücksichtigung der Person des Kranken. Diese traditionell- personalisierte Sicht geht allerdings leicht verloren in unserem Zeitalter der Technisierung und Spezialisierung. Im Kontext dieses Kolloquiums wurde der Begriff „Personalisierte Medizin“ in der Bedeutung eines Diagnostik- und Therapiekonzepts übernommen, das auf der Kenntnis und Nutzung personeneigener genetischer Variationen beruht. Der Begriff sollte aber auch hinweisen, darauf zu achten, dass das enorme Potential der neuen Technologien der Molekularen Medizin nicht zu neuen „Schubladen“ führt, sondern, dass die Kenntnis der genomischen und epigenomischen „Einzelheiten“ einer Person wieder zur Synthese der biologischen Ganzheit des Patienten führt.

Gegenwärtig sind wir allerdings in den besten Fällen auf die Kenntnis einzelner Mutationen und mehr oder weniger guten Voraussagen über ihren Effekt auf Gesundheit und Krankheit der untersuchten Person angewiesen. Vor allem wissen wir so gut wie nichts darüber wie

sich verschiedene genetische und epigenetische Effekte und Umweltfaktoren gegenseitig beeinflussen. So können bisher unbekannt genetische Faktoren, sogenannte „modifier genes“, bei einer Reihe, bisher eindeutig – bis hin zur Kenntnis der verantwortlichen Mutation(en) – als monogenetisch identifizierte Erkrankungen, die Manifestation, den Schweregrad und die Prognose dieser Krankheiten erheblich beeinflussen [1]. Das sollte uns bei allem perspektivischen Optimismus des folgenden Beitrags stets in Erinnerung bleiben.

Bei vielen Krankheiten können Variationen im Genom einer Person individuelle Krankheitsdispositionen anzeigen, die zur Empfehlung eines bestimmten Lebensstils oder den Einsatz einer spezifischen Therapie indizieren oder kontraindizieren. Krebserkrankungen sind meist durch erworbene genetische Veränderungen – Mutationen – im Genom bestimmter Zellpopulationen hervorgerufen. Bei erblich bedingten Erkrankungen ist die Krankheits-relevante Mutation des Genoms in allen Zellen der betroffenen Person nachweisbar. Dieser Artikel befasst sich ausschließlich mit der Anwendung einer mutationsspezifischen molekularen Medizin auf monogenetisch bedingte erbliche Erkrankungen. Bei diesen Erkrankungen ist eine solche Mutation gewöhnlich indikativ für die Diagnose der Erkrankung und ist in manchen Fällen auch die Grundlage für eine spezifische Therapie. Vielleicht wäre dafür die Bezeichnung mutationsspezifische molekulare Diagnostik und Therapie genauer und angebrachter als „personalisierte Medizin“

Molekulare Diagnostik

Frühe Studien

Die erste molekulare Diagnose erfolgte durch Pauling und Mitarbeiter fast 5 Jahre vor der Entdeckung der DNA-Struktur, mit der Beschreibung der Sichelzell-Anämie als „molecular disease“. Diese Bezeichnung begründete sich auf einem unterschiedlichen elektrophoretischen Verhalten der Hämoglobin β - Kette eines Sichelzell-Patienten im Vergleich mit der einer gesunden Person [2]. 1957 gelang es Ingram durch Aminosäureanalyse eine Mutation von Glutaminsäure zu Valin in Position 6 dieses Polypeptids nachzuweisen [3]. Aber erst die Entwicklung der DNA-Rekombinanten-Technik Ende der 70iger Jahre ermöglichte

eine molekulare Diagnostik auf der DNA-Ebene. Das Prinzip der ersten DNA-Diagnosen, beruhend auf einer molekularen Kopplungsanalyse mit Hilfe von Restriktionsfragment Polymorphismen (RFLP), wurde bereits 1 Jahr vor Publikation der ersten DNA-Sequenzierungsmethoden durch W.Y. Kan beschrieben [4]. Restriktionsfragment Polymorphismen sind variable Schnittmustern, die beim Schneiden (Restriktion) der genomischen DNA mit spezifischen Enzymen entstehen und sich bei verschiedenen Menschen voneinander unterscheiden können. Sie beruhen auf normalen, gewöhnlich harmlosen, Variationen in der Genomsequenz verschiedener Menschen. Bestimmte RFLP-Muster können für eine Familie und sogar für ihre ethnisch definierte Population charakteristisch sein. Kan stellte eine genetische Assoziation (Kopplung) zwischen einem bestimmten, in afrikanischen Populationen vorkommenden Restriktionsfragment Muster und dem defekten β -Globin-Gen der Sichelzellanämie fest und nutzte diese zur Diagnostik. Erst mit der Entwicklung und zunehmenden Effizienz der DNA-Sequenzierungsmethoden wurden zuerst Kopplungsanalysen mit SNPs (Single Nucleotide Polymorphismen) und bald auch direkte Mutationsnachweise in den betroffenen Genen durchführbar.

Das Beispiel der Zystischen Fibrose

Die Zystische Fibrose (CF, Mukoviszidose) ist mit einer Inzidenz von etwa einem betroffenen Kind auf 2000–3000 Neugeborenen – allerdings mit erheblichen Unterschieden in verschiedenen Populationen [5] – eine der häufigsten und schwerwiegendsten autosomal-rezessiv vererbten genetischen Erkrankungen in unserer Bevölkerung. Das betroffene Protein, CFTR, ist ein integrales Eiweiß der Zellmembran mit der Funktion eines cAMP-regulierten Chloridkanals [6]. CFTR-Mutationen führen zu Störungen im Ionen- und Wassertransport der sekretorischen Epithelien des Darms, des Pankreas, der Lunge, der Gallenwege und der Samengänge. Die Störungen im Ionen- und Wassertransport verursachen die Bildung des für CF charakteristischen dehydrierten, zähflüssigen Schleimes [7]. Hierdurch verursachte Obstruktionen der Atemwege sind die Grundlage für die wiederholten Infektionen und die chronische Entzündung der Lunge, für die Fibrosierung des Pankreas, die biliäre Leberzirrhose und Infertilität, insbesondere bei männlichen

Patienten. Verdauungsstörungen und wiederholte Infektionen führen zu Minderwuchs, Ateminsuffizienz und eine verminderte Lebensqualität und Lebenserwartung.

Die Zystische Fibrose gehörte zu den ersten genetischen Erkrankungen deren bis dahin völlig unbekannte molekulare Ursache und Pathogenese 1989 durch Genidentifizierung und Sequenzanalyse aufgeklärt wurde. Ein von Lap-Chee Tsui geleitetes Konsortium beschrieb die chromosomale Lokalisation, die kodierende Sequenz und die genetische Analyse dieses als Cystic Fibrosis Conductance Regulator Gene (CFTR-Gen) benannten Gens [8–10]. Mutationen in diesem Gen wurden als molekulare Ursache der Zystischen Fibrose identifiziert und damit wurde eine der ersten und wohl bis heute noch eine der umfangreichsten Genomanalysen eines menschlichen Gens eingeleitet. Bemerkenswerter Weise wurde bei dieser ersten Analyse festgestellt, dass ca. 70% aller gefundenen CF-Allele der untersuchten CF-Patienten mit überwiegend europäischer Herkunft, eine charakteristische Mutation (DeltaF508) aufwiesen. Diese Mutation, eine Deletion von 3 Nukleotidbasen, führt zum Fehlen der Aminosäure Phenylalanin in Position 508 des CFTR-Proteins. Auf der Grundlage dieses Wissens konnte sehr bald eine Mutations-spezifische DNA-Diagnostik für betroffene Familien angeboten werden [11].

Da CF eine autosomal-rezessive Erkrankung ist, sind Personen bei denen nur eines der beiden in ihrem Genom vorhandenen CFTR-Allele mutiert ist, gewöhnlich phänotypisch gesunde Anlagenträger. Daher resultiert die häufig völlig überraschende Konfrontation zweier gesunder Anlagenträger-Eltern mit dem Auftreten eines erkrankten Kindes, was sich, entsprechend den Mendelschen Regeln, mit einer Wahrscheinlichkeit von einem in vier ihrer Nachkommen ereignen kann. Es stellte sich allerdings bald heraus, dass die DeltaF508-Mutation, zwar die in der nordeuropäischen kaukasischen Bevölkerung häufigste, aber durchaus nicht die einzige Krankheits-bedingende Mutation des CFTR-Gens ist, und dass in anderen Populationen andere Mutationen vorherrschen. Inzwischen sind etwa 2000 bei CF-Patienten gefundene Nukleotidvariationen im CFTR-Gen bekannt, die als Mutationen mit potentielltem Krankheitswert angesehen werden [12]. Von diesen kann allerdings nur relativ wenigen eine eindeutige Krankheitsdisposition zugeschrieben werden [13]. In einer 2004 durchgeführten Studie wurden in einer pa-

nethnischen USA-Populationen mit klinisch eindeutig gesicherter Zystischer Fibrose nur 25 Mutationen mit einer Allel-Frequenz von $>0.1\%$ gefunden. Die Delta F508 Mutation wies dabei eine Allel-Frequenz von 66% auf. Weitere sechs Mutationen – G551D, W1282X, G542X, N1303K 621+1G>T und R553X – lagen bei 1–3%. Bei der Analyse distinkter ethnischer Populationen zeigten sich allerdings auch deutliche Unterschiede sowohl in der Mutationsallel-Art wie in ihrer Frequenz [14]. 2013 wurde eine an fast 40000 CF-Patienten mit verschiedenen Ethnizitäten aus Amerika und Europa durchgeführte Ko-operative Studie veröffentlicht, bei der eine Zuordnung von streng-definierten CF-Phänotypen zu CFTR-DNA-Variationen mit einer Allel-Frequenz von ≥ 0.01 geprüft wurde. Von den gefundenen 159 Varianten konnten dabei 127 (80%) auf Grund von klinischen und funktionellen Kriterien als Krankheitsmutationen eingestuft werden.

Die DNA-Analyse ermöglicht sowohl die Sicherung der Diagnose eines betroffenen Patienten und Einleitung einer frühen symptomatischen oder auch mehr spezifischen Therapie. Prä- oder postkonzeptionelle DNA-Screening Untersuchungen ermöglichen die Identifizierung von Risiko-Elternpaaren und gegebenenfalls auch frühzeitige pränatale Analysen mit der Option des Schwangerschaftsabbruchs bei Feststellung eines betroffenen Feten. Die DDR gehörte zu den ersten Ländern in denen die DNA-Diagnostik für Zystischen Fibrose und bald darauf auch für andere genetische Erkrankungen bereits in den 80iger Jahren eingeführt wurde [15].

Bei Mutationshomozygotie korrelieren einzelne Mutationen häufig mit unterschiedlichen Schweregraden der Erkrankung und lassen daher in gewissem Grade Aussagen zu Verlauf und Prognose beim individuellen Patienten zu. Bei der Vielzahl der Mutationen des CFTR-Gens können jedoch die beiden CFTR-Allele im Genom eines CF-Patienten unterschiedliche Mutationen tragen (Compound Heterozygotie). Bei ihnen sind prognostische Aussagen weitgehend eingeschränkt. Wie wir noch sehen werden, kann die Kenntnis der zugrundeliegenden Mutationen bei individuellen Patienten der Auswahl neuartiger mutationsspezifischer Therapien für eine Korrektur der mutationsspezifischen molekularen Fehlfunktion des CFTR-Proteins dienen.

CFTR-Struktur und Mutationsklassen

Die DNA-Sequenzaufklärung führte zur Kenntnis der Aminosäuresequenz des CFTR-Proteins aus der sich die Möglichkeit zur Aufklärung der molekularen Proteinstruktur und seiner wahrscheinlichen Funktion(en) ergab. Diese Analysen zeigten, dass CFTR ein in der Zellmembran gelegenes Multidomainprotein mit der Funktion eines Chlorid-Kanals ist. Es besteht aus zwei Transmembran-Domänen, die die Kanalpore bilden, sowie aus einer Regulator-Domäne und zwei Nukleotidbindungs-Domänen [9]. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung der Regulator-Domäne und die Anlagerung von Adenosintriphosphat (ATP) an die Nukleotidbindungs-Domänen zur Dimerisierung der Transmembran-Domänen und zum Öffnen des Chlorid-Kanals führen. Bei nachfolgender ATP-Hydrolyse wird der Kanal wieder verschlossen [16]. Auf diese Weise wird der physiologische epitheliale Chlorid-Transport reguliert und mit ihm der Natrium- und Wassertransport, der entscheidend für die normale Befeuchtung der Schleimhäute und die normale Schleimsekretion ist. Mutationen in den verschiedenen Domänen führen durch Störungen des normalen Ionen- und Wasser-Transportflusses zu den oben beschriebenen Symptomen.

Auf der molekularen Ebene bewirken Mutationen in diesen Domänen entweder Störungen der Synthese des CFTR-Proteins, seiner zellulären Lokalisation oder der spezifischen zellphysiologischen Funktion. Auf der Grundlage der durch sie erfolgenden Veränderung der Proteinfunktion werden die CFTR-Mutationen in sechs Klassen unterteilt: Klasse-I-Mutationen führen zu Fehlen oder Instabilität und Abbau der CFTR-mRNA oder des CFTR-Proteins. Klasse-II-Mutationen bewirken eine fehlerhafte Aufbereitung (Prozessierung) des Proteins und eine dadurch bedingte Störung des anschließenden intrazellulären Proteintransports zur Zellmembran. Zu dieser Klasse gehört die DeltaF508 Mutation. In der Klasse III sind „gaiting“ Mutationen erfasst, die die Synthese und korrekte intrazelluläre Lokalisation des Proteins nicht behindern, aber die normale Öffnungs- und Schließfunktion des CFTR-Kanals in der Zellmembran, und damit den normalen epithelialen Chlorid-Transport, stören. Klasse IV CFTR-Mutationen führen ohne Störung der Proteinlokalisierung oder der Öffnung und Schließung des Kanals zu Veränderungen in den Flussraten der Chlorid-Ionen. Klasse

V-Mutationen verringern die Synthese des CFTR-Proteins und bei den Klasse VI-Mutationen erfolgt ein beschleunigter Abbau des sonst korrekt lokalisierten und funktionierenden Proteins.

Die verschiedenen mutationsbedingten Störungen der normalen CFTR-Funktion spiegeln sich in unterschiedlichen Schweregraden der Zystischen Fibrose bei einzelnen Patienten wider, ohne dass an Hand des Genotyps eine genaue Voraussage individueller Krankheitsverläufe gemacht werden kann [17]. So zeigen homozygote Patienten, der Klassen I-III –Mutationen wie Stoppcodon-Mutationen (z.B. W1282X und G542X), Processing-Mutationen (z.B. DF508) und „gaiting“-Mutationen (z.B. G551D), häufiger schwerere Krankheitsbilder als solche mit Mutationen der Klassen V und VI. Die bei vielen Patienten gefundenen Allel-Kombinationen verschiedener Mutationen (Compound-Heterozygotie) führt zu weiteren Phänotyp-Variationen und prognostischen Unsicherheiten [17]. Darüber hinaus üben die bereits erwähnten und bisher wenig aufgeklärten, genetischen Modulatoren („modifier genes“), die nicht durch das CFTR-Gen selbst kodiert werden ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf den individuellen Phänotyp aus [1].

Mutationsspezifische Molekulare Therapie

Trotz dieser komplexen Situation ist die Zystische Fibrose eine hoffnungsvolle Zielerkrankung, sowohl für die mutationsspezifische Diagnostik wie auch für eine mutationsspezifische Therapie.

Prinzipiell stehen zwei grundsätzlich verschiedene Strategien für eine solche „personalisierte“ Therapie zur Verfügung: Die auf das defekte Gen zielende Gentherapie, und die auf das defekte Protein wirkende mutationsspezifische Korrektur der Proteinfunktion.

Gentherapie

Die Gentherapiestrategie beruht, in ihrer gegenwärtigen Form, überwiegend auf Addition einer funktionellen Gensequenz, die die Aufgabe der mutierten Genallele übernehmen soll. Sie stellt durch Einbringen einer normalen Gensequenz in betroffenen Zellen den Zustand einer funktionellen Heterozygotie in diesen Zellen her. Diese Strategie ist für autosomal-rezessive monogenetische Erkrankungen wie die Zystische

Fibrose prinzipiell geeignet, da wie bereits erwähnt, heterozygote Anlagenträger des Gendefekts phenotypisch gesund sind. Auch bei haploinsuffizient-dominanten Erkrankungen (z.B. Hypercholesterinämie in Folge eines LDL-Rezeptor-Defekts), bei denen das Genprodukt eines normalen Allels nicht ausreicht, um den gesunden Phänotyp zu gewährleisten, ist solche Additions-Gentherapie geeignet. Dagegen kann diese Strategie nicht bei dominanten monogenetischen Erkrankungen bei denen das Defektallel eine pathogene Funktion ausübt, angewendet werden da hier die Therapie auch eine Eliminierung oder Inaktivierung des toxischen Genprodukts erreichen muss.

Für die meisten autosomal-rezessiven monogenetisch bedingten Erkrankungen hat die Genadditions-Gentherapie des normalen funktionellen Genes den Vorteil, dass sie unabhängig vom Typ der einzelnen Mutation wirksam sein sollte. Diese Therapie ist zwar durch die exakte molekulare Diagnostik in Form der Mutationsanalyse personalisiert, sie braucht aber auf die Einzelmutation des Patienten keine Rücksicht zu nehmen.

Die Gentherapie hat sich allerdings insgesamt als wesentlich schwieriger erwiesen als ursprünglich angenommen und auch bei der Zystischen Fibrose ist es, trotz sehr umfangreicher Anstrengungen unter Verwendung verschiedener viraler und nicht-viraler Gentransfer-Vektoren, leider bisher nicht gelungen eine klinische Anwendung zu erreichen. Das liegt vor allen an Problemen bei der Entwicklung von Vektoren, die einen sicheren, effektiven und anhaltenden Gentransfer in die spezifischen Zielzellen gewährleisten, sowie an den immunologischen Abwehrmechanismen der Patienten gegen den Vektor oder das therapeutische Eiweiß. Die prinzipielle klinische Wirksamkeit der Genadditionsstrategie ist allerdings, wenn auch nicht für die Zystische Fibrose, so doch für andere schwerwiegende genetisch bedingte Erkrankungen, gezeigt worden. Am überzeugendsten wurde das für verschiedene kindliche Immun-Defizienzen, wie der X-SCID (X-Chromosomal Severe Combined Immunodeficiency) und dem Adenosin Desaminase Mangel (ADA-Deficiency) mit einer *ex vivo*-Strategie demonstriert [18]. Bei diesen Erkrankungen machte man sich die Möglichkeit zu Nutze, dass der Gentransfer in die hämatopoietischen Zielzellen in Zellkultur an Knochenmarkzellen des Patienten, durchgeführt werden kann. Die genetisch modifizierten Zellen werden danach in den Patienten transfun-

diert (*ex vivo* Gentherapie). Darüber hinaus gibt die genetische Korrektur den genmanipulierten hämatopoietischen Knochenmarkszellen einen selektiven Proliferationsvorteil gegenüber den defekten Zellen, so dass sie nach Infusion in der Lage sind die unveränderten Zellen im Knochenmark der Immundefizienz-Patienten zu „überwachsen“. Bei CF dagegen, muss das Genkonstrukt *in vivo*, also direkt in den Körper des Patienten eingebracht werden und die verschiedenen epithelialen Zielzellen der Lunge, des Darm, des Pankreas und der Leber des Patienten erreichen. Darüber hinaus gewinnen die relativ wenigen Zellen, die auf diese Weise korrigiert werden können, keinen Wachstumsvorteil gegenüber den CFTR-defekten unkorrigierten Zellen des Patienten.

Neuere, noch in Entwicklung befindliche Gentherapiestrategien zielen auf eine wirkliche Korrektur/Austausch oder auf die Inaktivierung der mutierten Gensequenz [19]. Vor allem die Korrekturstrategie ist im Kontext der personalisierten Medizin von Interesse, da hierdurch die Möglichkeit geschaffen wird, Gensequenzen einer Person gezielt zu verändern. Methodisch basiert diese Strategie auf der Entwicklung sequenzspezifischer Nukleasen. Diese erzeugen einen gezielten DNA-Doppelstrangbruch und ermöglichen damit einen nachfolgenden Sequenzaustausch an der Matrize einer sequenzspezifisch korrekten Donor-Nukleinsäure durch das zelluläre DNA-Rekombinationssystem. Zu diesen Enzymen gehören die Zink-Finger Nukleasen [20, 21] oder alternative DNA-Korrektursysteme wie Meganukleasen [22], TALENs [23] und CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) [24]. Besonders das in den letzten 3 Jahren entwickelte CRISPR/Cas 9 System hat auf Grund seiner Versatilität, Effektivität und technischen Einfachheit die Korrekturstrategie erheblich beschleunigt [25]. So wurde mit diesem System die CFTR DeltaF-Mutation in adulten menschlichen intestinalen Stammzellen und den daraus differenzierten Organoiden *in vitro* korrigiert [26]; im vergangenen Jahr gelang die fehlerfreie Genommanipulation befruchteter Rhesusaffen-Oozyten durch das CRISPR/Cas9 System. Die so veränderten Embryonen entwickelten sich zu genetisch manipulierten Jungtieren, wodurch der Weg zur Erzeugung von Modellen menschlicher Erkrankungen an nicht-human-Primaten eröffnet worden ist [27].

Die therapeutische Anwendung einer Genkorrektur wurde erstmalig in einem *ex-vivo* Gentherapie-Experiment im Mausmodell der mensch-

lichen Krankheit Sichelzell-Anämie demonstriert. Hierbei wurden aus der Haut einer Sichelzell-Maus gewonnene Fibroblasten durch Gentransfer in Induzierte Pluripotente Stammzellen (IPS) umgewandelt und dann in Zellkultur einer *in vitro* Genkorrektur durch homologe Rekombination unterworfen. Nach Rücktransplantation in das Donor-Tier konnten diese Zellen als erythroide Stammzellen die Bildung normaler Blutzellen bewirken [28]. In einem Mausmodell für Hämophilie B (Bluterkrankheit) konnte durch eine Zn-Finger-Nuklease vermittelte partielle Genkorrektur von Leberzellen *in vivo* eine schwere Form dieser Erkrankung in eine leichte Form umgewandelt werden [29]. Zn-Finger-Nuklease vermittelte Genkorrektur ist auch zur Eliminierung einer unerwünschten Gensequenz verwendet worden. So wurde das Gen, das den HIV-Ko-Rezeptor (CCR5) kodiert, auf diese Weise gezielt aus dem Genom der menschlichen Zielzellen des AIDS-Virus entfernt und diese Strategie ist nun Gegenstand einer laufenden klinischen Studie [30]. Eine solche Eliminations-Strategie könnte prinzipiell vor allem auch für eine personenspezifische gezielte Genomkorrektur dominanter genetischer Erkrankungen (s.o.) Anwendung finden.

Bei allen diesen ersten klinisch relevanten Erfolgen darf nicht verschwiegen bleiben, dass noch viel Arbeit erforderlich ist, um eine größere Zielspezifität zu erreichen und insbesondere fehlerhafte Korrekturen der Zielsequenz oder „Korrekturen“ im falschen Genom-Ort zu vermeiden [31, 22, 25].

Trotz dieser „technischen“ Einschränkung erscheint die beschriebene gezielte Genomkorrektur auf den ersten Blick als „heiliger Gral“ der individuellen Gentherapie oder gar der personalisierten Medizin überhaupt. Das mag auch prinzipiell für bestimmte Erkrankungen richtig sein, so z.B. für hämatologische Erkrankungen bei denen die Kombination von Gentherapie und Zelltherapie in Form von *ex vivo* Stammzell-Genkorrektur, wie am Tiermodell demonstriert, sehr hoffnungsvoll erscheint. Ebenso scheint diese Strategie für einige dominante genetische Erkrankungen, bei denen es gelingen könnte das mutierte Gen in einer ausreichenden Menge zu korrigieren oder gezielt auszuschalten, um die toxische Wirkung seines Genprodukts zu verringern oder zu eliminieren, als sehr attraktiv [19]. Die jüngsten Fortschritte bei der Entwicklung von iPS-abgeleiteten, pluri- und totipotenten Human-Stammzellen [32, 33] haben diese Kombinationsstrategie für eine Vielzahl mensch-

licher Zellen und Gewebe in greifbare Nähe gerückt. In den meisten Fällen aber ist die Notwendigkeit genügend Zellen mit großer Spezifität, Korrekturgenauigkeit und -effizienz zu erreichen auch für diese Genthapiestrategie das größte Hindernis. Das Problem des effektiven Gentransfers ist, insbesondere für die Zystische Fibrose, infolge der bereits erwähnten Multiorganmanifestation und sehr komplexen Gewebestruktur und Zugänglichkeit der betroffenen Organe (Lunge, Pankreas, Gallengänge) bei den kindlichen und erwachsenen Patienten, ein bisher ungelöstes Problem. Bei einigen frühmanifestierenden schwereren genetischen Erkrankungen könnten eventuell diese Barrieren und auch die der Immunabwehr durch Einsatz der Genthapie in utero überwunden werden [34–35].

Mutationsspezifische pharmakologische Therapie

Glücklicherweise standen die aus der genetisch-molekularbiologischen Analyse gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur, zur Funktion und zu den Mutationen des CFTR Gens, die von Genetikern mit Erfolg zur individualisierten Diagnose und für die Entwicklung der Genthapie dieser Erkrankung eingesetzt wurden, auch Zellbiologen, Pharmakologen und Chemikern zur Verfügung. Diese haben, unbeirrt von den Versprechungen der Genthapie, einen anderen Weg verfolgt, nämlich die Suche nach niedermolekularen, systemisch applizierbaren, Organ-, Gewebe- und Zell-zugänglichen Verbindungen, die die verschiedenen Funktionen des multifunktionellen CFTR-Proteins beeinflussen und vor allem die mutationsbedingten Funktionsstörungen beheben könnten.

Die hierbei angewandte Strategie benutzt umfangreiche hierarchische Screening-Programme von der Zellkultur über Tiermodelle bis zur klinischen Testung, um häufig bereits bekannte und zum Teil auch klinisch schon eingesetzte Verbindungen auf neue pharmakologische Eigenschaften zu untersuchen.

Durchlesekorrektur bei Klasse-I-Mutationen: Die ersten Versuche in dieser Richtung zielten auf die Behebung des Effekts von Nonsense-Mutationen (Klasse I-Mutationen), die als unphysiologische Stoppcodons wirken und dadurch einen Abbruch der Polypeptidkettensynthese bewirken. 2003 berichteten Wilschanski et al. dass das Aminoglycid-Antibiotikum Gentamicin den durch Nonsense-Mutationen bewirkten

Kettenabbruch im CFTR-Protein aufheben und dadurch einige der elektrophysiologischen Funktionen dieses Proteins in Zellen der Nasenschleimhaut von Patienten mit Zystischer Fibrose wiederherstellen konnte [36]. Die Wirkung des Antibiotikums beruht auf seiner Interferenz mit der Korrekturfunktion des Ribosoms bei der Proteinsynthese, wodurch der Einbau einer inkorrekten Aminosäure am mutationsbedingten Stoppsignal das Durchlesen der vollen CFTR-Polypeptidkette erlaubt [37]. Obwohl eine Wirksamkeit auch für Patienten mit anderen auf einem Proteinsyntheseabbruch beruhenden genetischen Erkrankungen gezeigt wurde (z.B. Duchennesche Muskeldystrophie, DMD), ist eine klinische Behandlung mit Gentamicin, die ja lebenslang durchgeführt werden muss, vor allem auf Grund seiner Toxizität nicht akzeptabel. Daher wird nach anderen Pharmaka, die einen „Durchlese“-Mechanismus erzielen können gesucht. Eine dieser Verbindungen ist Ataluren, das eine stärkere Durchleseaktivität als Gentamicin aufweist und in der bisherigen klinischen Testung keine Nebenwirkungen zeigte [38]. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden klinische Studien zur Behandlung von Nonsense-Mutationen bei Zystischer Fibrose (<http://www.cff.org/research/ClinicalResearch/FAQs/Ataluren/>) und der Duchenneschen Muskeldystrophie (DMD) durchgeführt. Oral verabreichtes Ataluren zeigte in beiden Studien einen hoffnungsvollen therapeutischen Effekt; in der DMD-Studie, jedoch nur bei niedriger Dosierung (http://www.parentprojectmd.org/site/DocServer/2012-07_ataluren_update.pdf?docID=13103). Zur Überprüfung dieser Resultate und Sammlung weiterer Sicherheitsdaten sind gegenwärtig neue Nonsense-Mutations-Studien mit niedriger Dosierungen sowohl für Zystische Fibrose (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02139306?term=Ataluren&rank=15>) wie für DMD in Vorbereitung (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02090959?cond=%22Muscular+Dystrophy%2C+Duchenne%22&lup_s=05%2F11%2F2012&lup_d=1000).

Wie schwierig sich aber diese scheinbar einfache Strategie erweist, zeigt eine kürzlich erschienene unabhängige Untersuchung nach der die Stoppcodon-Repression durch Alaturen in anderen als den von Wilschanski et al. publizierten Zellkultur-Testsystemen nicht reproduzierbar war und die daher Zweifel an der Wirkung in den klinischen Untersuchungen aufkommen lassen [39].

Faltung- und Modifikationskorrektur bei Klasse-II Mutationen: Ein weiteres pharmakologisches Ziel ist die Überwindung der, durch die DeltaF508-Mutation hervorgerufene, Behinderung der post-translationalen Proteinmodifikation und Faltung. Diese Proteinmodifikation (processing) ist für den korrekten intrazellulären Transport und den Einbau in die Zellmembran erforderlich. Ein *in vitro* hoch-Durchsatz Screening Test an 164000 chemischen Verbindungen und der nachfolgenden chemischen Modifikation einer der gefundenen aktiven Substanzen führte zur Synthese einer VX809 benannten Substanz, mit potentieller therapeutischer Wirkung. Hierzu gehört die Fähigkeit die post-translationalen Faltung und Glycosylierung des DeltaF508 Proteins zu bewirken und dadurch den Transport, die Membranintegration und die Erfüllung physiologischer CFTR-Funktionen zu etwa 14% des Wertes in Normalzellen zu erreichen. In Patienten sollte das genügen, um ein schweres CF-Krankheitsbild in ein leichteres zu verwandeln. In Kombination mit einem weiteren niedermolekularen Pharmakon (VX770), das eine Potenzierung der elektrophysiologischen Eigenschaften von CFTR bewirkt, wurde sogar eine Korrektur des bei CF-Zellen defekten Chlorid-Transports zu 25% des Wertes bei normalen Zellen erreicht [40]. Weiterhin wurde in Versuchen an Ratten gezeigt, dass bei oraler Applikation Plasmawerte oberhalb der in Zellkultur beobachteten effektiven Dosis erreicht wurden [40]. Eine auf dieser Grundlage durchgeführte klinische Studie zur Untersuchung von Wirksamkeit und Sicherheit von oral dosiertem VX809 zeigte keine medikament-spezifischen Nebenwirkungen. Ein therapeutischer Effekt konnte allerdings nur in Form einer Reduktion der Chlorid-Sekretion der Schweißzellen der Patienten beobachtet werden. Im Nasenepithel zeigte sich keine Korrektur der pathologischen elektrophysiologischen Veränderungen und in einer Biopsie des Darmepithels konnte ebenfalls kein Hinweis auf eine Normalisierung der post-translationalen Proteinfaltung gefunden werden. Die Lungenfunktionsteste der Patienten zeigten ebenfalls keine klinische Besserung der Patienten, was allerdings bei der Kürze der Studie (28 Tage) nicht so verwunderlich ist [41]. Eine jüngere Untersuchung des molekularen Mechanismus der Korrektur des Delta F508-Faltungdefekts durch VX09 weist darauf hin, dass diese Korrektur nur partiell ist, und dass die Kombination mit anderen niedermolekularen Faltungskorrektoren, die an anderen Domänen die-

ses Proteins angreifen, eine bessere Faltung und Erhöhung der therapeutischen Wirksamkeit erreichen könnte. Es ist also denkbar, dass bei Patienten mit anderen Klasse II-Mutationen entsprechende mutations-spezifische Korrektoren eingesetzt und gegebenenfalls auch miteinander kombiniert werden könnten [42].

Korrektur von Kanalöffnungsdefekten bei Klasse-III Mutationen: Der wohl bisher eindrucksvollste klinische Erfolg in der Entwicklung niedermolekularer Verbindungen zur pharmakologischen Korrektur von CFTR-Mutationen ist wohl mit Invacator (VX770) gelungen. Diese Verbindung potenziert die Ionenkanalfunktion des CFTR und kann so den Effekt von Klasse-III Mutationen (gating-mutations) wie G551D korrigieren. Invacor bewirkt eine Erhöhung des cAMP abhängigen Chlorid-Ionenflusses durch den CFTR-Chloridkanal. In Zellkulturexperimenten führte Invacor zu einem >10fachen Anstieg des Chloridtransports von einem Ausgangswert von etwa 10% des Basiswertes der Zellen ohne CFTR-Mutation. Interessanterweise hat Invacor einen korrigierenden Effekt auf alle bekannten „gating“-Mutationen [43]. Die Mutationsspezifität von Invacator betrifft nicht so sehr die spezifische Einzelmutation als den funktionellen Mutationstyp. In einer auf der Grundlage dieser Ergebnisse durchgeführten Phase II klinische Sicherheitsstudie haben Patienten mit klinisch eindeutiger Zystischer Fibrose, die mindestens ein G551D-Mutations Allel hatten, dass Invacator gut vertragen. Darüber hinaus wurde gefunden, dass sich, im Gegensatz zu Patienten, die Placebo erhalten hatten, die Chlorid-Konzentration im Schweiß normalisierte, und dass eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktionstests feststellbar war [44]. In nachfolgenden Phase III (therapeutischen) klinischen Studien wurden G551D-Patienten in Altersgruppen unter [45, 46] und über 12 Jahre [47] für 48 Wochen mit oral verabreichtem Ivacaftor behandelt. In beiden Patientengruppen wurden beträchtliche und andauernde Verbesserungen der Lungenfunktionsteste, der Chlorid-Konzentration im Schweiß, sowie eine verringerte Häufigkeit akuter klinischer Zustandsverschlechterungen und eine deutliche Gewichtszunahme beobachtet. Inzwischen wird Invacator in weiteren Phase III klinischen Studien an Kindern von 2–5 Jahren und als Kombinationstherapie mit Lumicoftor, einem Faltungskorrektor, an DF508-homozygoten CF-Patienten erprobt. Invacator ist bereits in den USA und EU als Medikament für die Behandlung von

CF-Patienten mit der G551D-Mutation ab 6 Jahren zugelassen (http://www.google.co.uk/search?q=Ivacafto+phase+III+clinical+trial&hl=en-GB&gbv=2&oq=&gs_l=).

Es ist damit das erste zugelassene Medikament zur Behandlung der Zystischen Fibrose, das an der kausalen, also krankheitsverursachenden Proteinmutation des individuellen Patienten angreift. Allerdings wird die Zukunft erst zeigen, ob es in der Lage ist, bereits bestehende Krankheitssymptome nachhaltig zu verbessern und vor allem auch, ob es die klinische Manifestation und/oder Progredienz bei jungen Kindern verhindern kann. Trotz dieser Einschränkungen besteht jetzt berechtigte Hoffnung, dass neue Pharmaka das Spektrum der personalisierten funktionellen Mutationskorrektur erweitern und auf andere monogenetische Erkrankungen ausweiten werden.

Ausblick

Das Zeitalter der auf Genomanalysen beruhenden Molekularen Medizin hat gerade erst begonnen. Es ist zu erwarten, dass neben den personenspezifischen pharmakologischen Therapien monogenetischer Erkrankungen auch Gen-, (Stamm)zell-, Immuntherapien und andere neue therapeutische Verfahren einzeln und in Kombination miteinander zum personalisierten Therapiekonzept beitragen werden und, dass in den kommenden Jahren dieses Herangehen auch im Sinne der „evidence based medicine“, mehr und mehr zur guten medizinischen Praxis wird.

Graduell wird es wahrscheinlich auch möglich werden „modifier“ Gene zu identifizieren und in diese Konzepte einzubeziehen und vielleicht ist das auch ein Schritt auf dem Weg zu der ungleich komplizierteren Anwendung der personalisierten Medizin bei polygenetisch bedingten Krankheiten.

Literaturzitate

1. Cutting, G.R., *Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1214**: p. 57–69.
2. Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J. and Wells, I. C., *Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease*. Science, 1949. **110**(25): p. 543–548.

3. Ingram, V.M., *Gene Mutation in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin*. Nature, 1957 **4581**: p. 326–328.
4. Kan, Y.W. and A.M. Dozy, *Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. **75**(11): p. 5631–5.
5. Bobadilla, J.L., et al., *Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening*. Hum Mutat, 2002. **19**(6): p. 575–606.
6. Bear, C.E., et al., *Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)*. Cell, 1992. **68**: p. 809–818.
7. Boucher, R.C., et al., *Na transport in cystic fibrosis respiratory epithelia*. J.Clin.Invest., 1986. **78**: p. 1245–1252.
8. Rommens, J.M., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science, 1989. **245**: p. 1059–1065.
9. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**: p. 1066–1073.
10. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chairavarti, A., and M. Buchwald, Tsui, L-C, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis*. Science, 1989 **245**(4922): p. 1075–108.
11. Ballabio, A., Gibbs, R.A., Caskey, C.T., *PCR Test for cystic fibrosis*. Nature, 1990. **343**: p. 220.
12. Cystic-Fibrosis-Centre, *Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics at the Hospital for Sick Children in Toronto*. <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>, 2011.
13. Foundation, C.F., *CFTR2 – Clinical and Functional Translation of CFTR*. <http://www.cftr2.org/howtouse1.php>, 2015.
14. Watson, M.S., et al., *Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel*. Genetics in Medicine, 2004. **6**(5): p. 387–391.
15. Coutelle, C. and A. Speer, *Genomics in the German Democratic Republic*. Genomics, 1990. **8**(1): p. 182–6.
16. Kirk, K. and W. Wang, *A unified view of CFTR gating: combining the allosterism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ABC transporter*. The Journal of Biological Chemistry, 2011. **268**: p. 12813–12819

17. Castellani, C., et al., *Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice*. J Cyst Fibros, 2008. **7**(3): p. 179–96.
18. Zhang, L., A.J. Thrasher, and H.B. Gaspar, *Current progress on gene therapy for primary immunodeficiencies*. Gene Ther, 2013. **20**(10): p. 963–9.
19. Cox, D.B., R.J. Platt, and F. Zhang, *Therapeutic genome editing: prospects and challenges*. Nat Med, 2015. **21**(2): p. 121–131.
20. Urnov, F.D., et al., *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 646–51.
21. Rahman, S.H., et al., *Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier*. Human Gene Therapy, 2011. **22**(8): p. 925–33.
22. Galetto, R., P. Duchateau, and F. Paques, *Targeted approaches for gene therapy and the emergence of engineered meganucleases*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(10): p. 1289–303.
23. Li, T., Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B., *TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain*. Nucleic Acids Res, 2011 **39**(1): p. 359–72
24. Cong, L., Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013 **339**(6121): p. 819–23.
25. Baker, M., *Gene editing at CRISPR speed*. Nat Biotechnol. , 2014 **32**(4): p. 309–12.
26. Schwank, G., et al., *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(6): p. 653–8.
27. Niu, Y., et al., *Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos*. Cell, 2014. **156**(4): p. 836–43.
28. Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1920–3.
29. Li, H., et al., *In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia*. Nature, 2011. **475**: p. 217–221.
30. Maier, D.A., et al., *Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5*. Human gene therapy, 2013. **24**(3): p. 245–58.
31. Cathomen, T. and J.K. Joung, *Zinc-finger nucleases: the next generation emerges*. Mol Ther, 2008. **16**(7): p. 1200–7.

32. Gafni, O., et al., *Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells*. Nature, 2013. **504**(7479): p. 282–6.
33. Irie, N., et al., *SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate*. Cell, 2015. **160**(1–2): p. 253–68.
34. Coutelle, *Hoffnungen und Risiken einer präventiven pänatalen Gentherapie* Leibniz Online 08/2010, 2010. http://www.leibniz-sozietat.de/journal/archive/08_10/coutelle.pdf: p. 2–28.
35. Coutelle, C., *Prospects for Prenatal Gene Therapy*. 2014 Online publication LS 2014, John Wiley & Sons Ltd: Chichester. <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a0025275]
36. Wilschanski, M., et al., *Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations*. N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1433–41.
37. Palmer, E., J.M. Wilhelm, and F. Sherman, *Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics*. Nature, 1979. **277**(5692): p. 148–50.
38. Wilschanski, M., et al., *Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis*. Eur Respir J, 2011. **38**(1): p. 59–69.
39. McElroy, S.P., et al., *A lack of premature termination codon read-through efficacy of PTC124 (Ataluren) in a diverse array of reporter assays*. PLoS Biol, 2013. **11**(6) e1001593: p. 1–8.
40. Van Goor, F., et al., *Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1117–30.
41. Clancy, J.P., et al., *Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(7): p. 1683–92.
42. Ren, H.Y., et al., *VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain I*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(19): p. 3016–24.
43. Yu, H., et al., *Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations*. J Cyst Fibros, 2012. **11**(3): p. 237–45.
44. Accurso, F., Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, Moss RB, Pilewski JM, Rubenstein RC, Uluer AZ, Aitken ML, Freedman SD, Rose LM, Mayer-Hamblett N, Dong Q, Zha J, Stone AJ, Olson ER, Ordoñez CL, Campbell PW, Ashlock MA, Ramsey BW., *Effect of VX-770 in persons with cystic*

- fibrosis and the G551D-CFTR mutation*. N Engl J Med. , 2010. **363**(21): p. 1991–2003.
45. Davies, J.C., et al., *WS6.5 Ivacaftor in subjects 6 to 11 years of age with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation*. Journal of Cystic Fibrosis, 2012. **11**: p. S13.
46. Davies, J.C., et al., *Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(11): p. 1219–25.
47. Ramsey, B., Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group, *A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation*. N Engl J Med., 2011. **365** (18): p. 1663–72.

