

## Gentherapie

## Sehkraft aus der Wüste

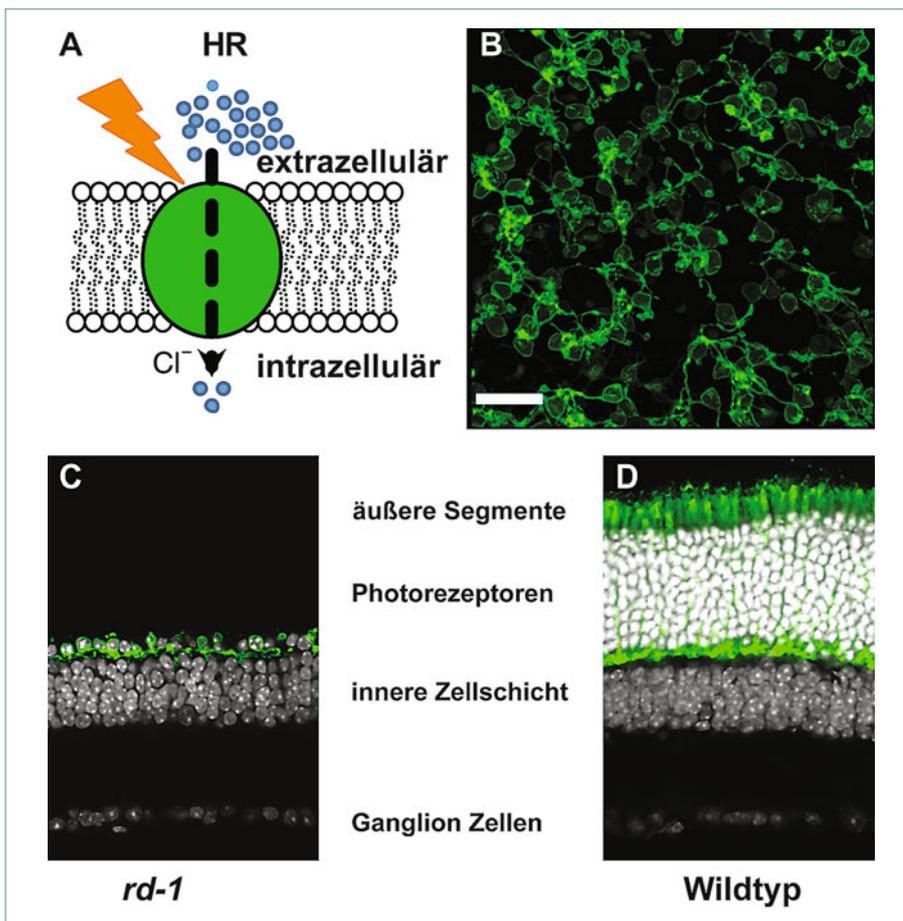
VOLKER BUSSKAMP

HARVARD MEDICAL SCHOOL, BOSTON, MA, USA

## Elisabeth-Geffert-Preis der GfG

Die gezielte Expression einer mikrobiellen licht-sensitiven Chloridpumpe in verbliebenen Zellen führt zur funktionellen Reaktivierung der vormals blinden Netzhäuten in der degenerativen Erkrankung Retinitis Pigmentosa und verspricht somit Heilung.

The targeted expression of a microbial light-sensitive chloride pump to remaining cells in degenerative retinas led to a functional reactivation of this former blind retinas. This opens a new treatment for the disease retinitis pigmentosa.



▲ **Abb. 1:** A, Schema der Chloridpumpe Halorhodopsin (HR) aus dem Archaeon *Natronomonas pharaonis*, welche durch Licht aktiviert wird und daraufhin Chloridionen in die Zelle pumpt. B, Mikroskopische Aufnahme von angefärbten Zapfen (grün) in der Netzhaut einer *rd-1*-Maus. Diese Mausmutante verliert nach der Geburt alle Stäbchen, der lichtempfindliche Teil der Zapfen wird zurückgebildet. C, D, Seitenansicht von angefärbten Zapfen (grün) in *rd-1*- (C) und Wildtyp-Netzhäuten (D). Die Zellschichten sind mit DAPI (weiß) angefärbt. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

■ Wie können kleine Mikroben aus den Salzseen der Sahara helfen, blinden Menschen wieder Sehkraft zu verleihen? Der Schlüssel hierzu liegt in einem Gen dieser „primitiven“ Überlebenskünstler. In den richtigen Zellen der Netzhaut eingeschleust, kompensiert dieses eine Gen die Funktion von mehreren ausgefallenen hoch spezialisierten menschlichen Genen und ermöglicht so wieder das Sehen.

Die Erbkrankheit Retinitis pigmentosa [1] kann im Laufe des Lebens eines Patienten zur vollständigen Erblindung führen. Es gibt viele Formen von Retinitis pigmentosa, die jedoch alle einen ähnlichen Krankheitsverlauf haben. Mutationen in den Stäbchen-Photorezeptoren sind hierfür verantwortlich. Zuerst verlieren die Stäbchen, die für das Nachtsehen verantwortlich sind, ihre Lichtempfindlichkeit und sterben ab. Dies geschieht oft unbemerkt von den Patienten, da sich die Stäbchen hauptsächlich in der peripheren Netzhaut befinden. Schreitet die Krankheit weiter fort, wird die zweite Klasse der Photorezeptoren, die Zapfen, betroffen. Nun kommt für die Patienten das böse Erwachen; denn die Zapfen sind für das Farb- und Scharfsehen verantwortlich. Die zentrale Stelle der Netzhaut, die Fovea, besteht fast ausschließlich aus diesen Rezeptorzellen. Es entsteht ein immer enger werdender Tunnelblick, der im Endstadium zur Blindheit führt.

Um einen Ansatz zur Milderung des Krankheitsverlaufs bzw. zur Heilung zu finden, ist es elementar, sich mit dem gesunden Sehprozess auseinanderzusetzen. Beim Lesen dieser Zeilen wandeln Zapfen Licht in elektrochemische Signale um [2], die bereits in der Netzhaut gefiltert, ausgewertet und bearbeitet werden. Diese modulierten Lichtsignale werden schließlich über den optischen Nerv weiter zum Gehirn geleitet, welches das Lesen ermöglicht [3]. Der erste Schritt, der in Photorezeptoren abläuft, wird als Phototransduktion bezeichnet und involviert mehr als 30 bekannte Genprodukte. Im Endeffekt führt Licht zu einer Änderung des Membranpotenzials zum Negativen hin, also zu einer Hyperpolarisation.

Bei Retinitis-pigmentosa-Patienten verlieren die Zapfen aus noch unbekanntten Gründen zuerst ihre äußeren Segmente, bevor sie

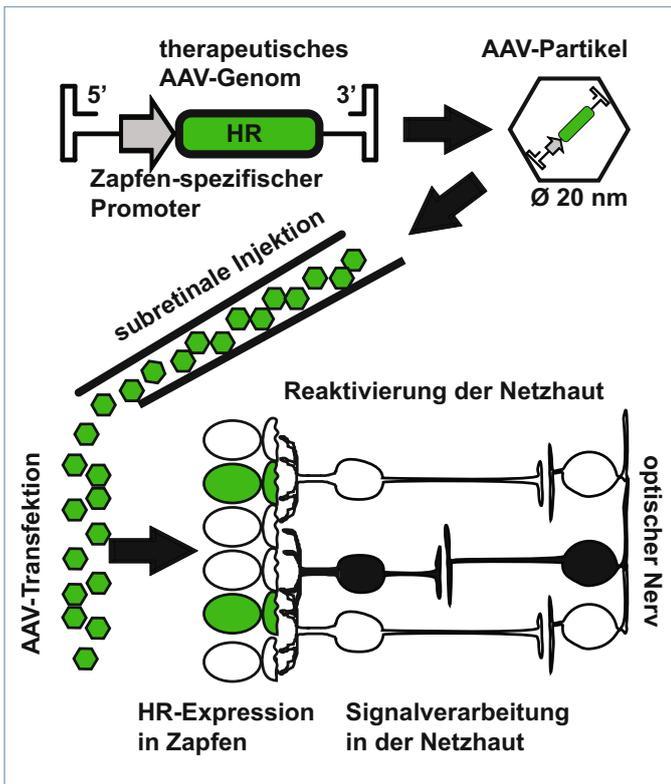
eventuell ganz absterben. Es ist praktisch unmöglich, diese Zellteile zu rekonstruieren und die Gene der Phototransduktionskaskade wieder zu aktivieren. Mein Forschungsansatz war es, nur auf ein Gen – für Halorhodopsin (HR) – aus einem Archaeon aus den Salzseen der Sahara, *Natronomonas pharaonis*, zurückzugreifen [4]. Dieses enthält die genetische Information für eine licht-sensitive Chloridpumpe, die auf Lichtreize hin negativ geladene Chlorid-Ionen in die Zelle pumpt, wodurch eine Hyperpolarisation induziert wird (**Abb. 1A**). Die Annahme war, dass dieses Genprodukt auf Lichtreize hin die gleichen physiologischen Prozesse in den verbliebenen Zapfenzellkörpern bei Patienten in Gang bringen könnte.

Für die Forschung an der Krankheit Retinitis pigmentosa gibt es sehr viele verschiedene Mausmodelle. Das etablierteste Modell, die *rd-1*-Maus [5], verliert innerhalb von vier Wochen nach der Geburt alle Stäbchen. Währenddessen bilden die Zapfen ihre lichtsensitiven äußeren Segmente zurück und die

Maus erblindet vollständig (**Abb. 1B–D**). Diese Mauslinie wurde seit Jahrzehnten genauestens untersucht, und es galt als postuliert, dass alle Zapfen im Laufe der Zeit vollständig degenerieren. Jedoch gab es Hinweise, dass das Absterben der Zapfen nicht vollständig erfolgt. Immunhistochemische Untersuchungen in der *rd-1*-Maus ergaben, dass etwa 25 Prozent dieser Zellen noch Monate nach der kompletten Degeneration der Stäbchen in der Netzhaut vorhanden sind [6]. Außerdem wurde mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen, dass die verbliebenen Zellen Zapfen sind, indem die genetischen Profile der *rd-1*-Zapfen mit gesunden Wildtyp-Zapfen verglichen wurden. Die Microarray-Analyse ergab, dass die Proben der *rd-1*-Maus typische Genexpressionsmuster der Wildtyp-Zapfen aufwiesen.

Nun musste die Chloridpumpe spezifisch in die verbliebenen Zellkörper der Zapfen der *rd-1*-Maus gebracht werden (**Abb. 2**). Dazu wurden Adeno-assoziierte Viren (AAV) als genetische Transportvehikel umfunktioniert.

Das Gen der Chloridpumpe wurde mit photorezeptorspezifischen Promotorelementen versehen, und diese wurden anstatt des ursprünglichen viralen Genoms in die Partikel verpackt, welche dann unter die Netzhaut injiziert wurden. Eine Vielzahl von erkrankten Zapfen produzierte nun HR, wodurch sie tatsächlich wieder lichtsensitiv wurden. Der eigentliche Durchbruch aber bestand darin, dass die Zapfen immer noch mit den nachgeschalteten Nervenzellen verbunden waren, und diese nun wieder mit Lichtsignalen füttern konnten. Es wurde vermutet, dass im Laufe des Degenerationsprozesses die synaptischen Verbindungen aufgrund von Inaktivität zurückgebildet würden. Angespornt durch die ersten Ergebnisse entstand eine internationale Kooperation, um die Qualität des wiedergewonnenen Sehens der ehemals blinden Mäuse zu untersuchen. Die Signalverarbeitung innerhalb der Netzhaut war intakt, und die Reize wurden korrekt verarbeitet und als Aktionspotenzial über den optischen Nerv an höhere Gehirnareale gesen-



◀ **Abb. 2:** Einbringen des Gens für Halorhodopsin (HR) aus dem Archaeon *Natromonas pharaonis* mithilfe von Adeno-assoziierten Viren (AAV-Partikel) in die Netzhaut einer rd1-Maus. Nach der Transfektion wird die Chloridpumpe HR in den Zapfen exprimiert, erkrankte Zapfen werden wieder lichtsensitiv, optische Signale werden verarbeitet und über den optischen Nerv an nachgeschaltete Gehirnareale weitergegeben. Weitere Erklärungen im Text.

Langfristig gibt es so einen neuen Hoffnungsschimmer für Retinitis-pigmentosa-Patienten auf Besserung ihrer Situation [8]. Allerdings ist es unverantwortlich, vorschnell falsche Hoffnungen zu wecken. Bevor Menschen behandelt werden dürfen, muss der Ansatz noch langwierige biologische Sicherheitstests bestehen. ■

### Literatur

- [1] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368:1795–1809
- [2] Wang JS, Kefalov VJ (2011) The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res* 30:115–128
- [3] Gollisch T, Meister M (2010) Eye smarter than scientists believed: neural computations in circuits of the retina. *Neuron* 65:150–164
- [4] Zhang F, Wang LP, Brauner M et al. (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446:633–639
- [5] Baehr W, Frederick JM (2009) Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes. *Vision Res* 49:2636–2652
- [6] Busskamp V, Duebel J, Balya D et al. (2010) Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329:413–417
- [7] Cepko C (2010) Seeing the light of day. *Science* 329:403–404
- [8] Busskamp V, Roska B (2011) Optogenetic approaches to restoring visual function in retinitis pigmentosa. *Curr Opin Neurobiol* (im Druck)

det. Es konnten Lichtreize im visuellen Cortex gemessen werden. Noch wichtiger, die Lichtsignale wurden von den behandelten Mäusen richtig interpretiert, sodass diese Tiere visuelle Verhaltenstests erfolgreich meistern konnten.

Was bedeuten diese Ergebnisse für Retinitis-pigmentosa-Patienten? Aus klinischen Studien weiß man, dass viele Zapfenzellkörper zunächst in der Fovea der Patienten vorhanden bleiben, also ist die Grundlage für eine Therapie nach diesem Ansatz gegeben. Jedoch ist der Weg von der Laborbank zum Patienten sehr steinig, und viele Hürden müssen überwunden werden. Als Erstes muss nachgewiesen werden, dass HR in Zapfen nicht toxisch ist. Bereits erfolgte Langzeitstudien im Mausmodell wiesen auf keine Immunreaktion hin. Außerdem musste untersucht werden, dass die benötigte Lichtmenge zur Anregung der Chloridpumpe nicht schädlich ist, da zu viel Licht Zellen abtöten kann. Die Lichtintensität war unter den gesetzlichen Richtwerten somit sicher und zulässig. AAVs sind prinzipiell für die menschliche Anwendung zugelassen. In einem ersten Schritt konnte in menschlichen Netzhäuten von Organspendern gezeigt werden, dass diese Viren die Chloridpumpe erfolgreich in menschliche Photorezeptoren transportieren. Menschliche Netzhäute von Organspendern in Zellkultur sind lichtinsensitiv und daher für funktio-

nelle Tests nutzlos. HR jedoch reaktivierte auch menschliche Zapfen, sodass nun ein funktionales menschliches Netzhautsystem in der Petrischale zur Verfügung steht, welches viele Tierversuche überflüssig machen könnte.

Wie würde das Sehen für einen gentherapierten Patienten aussehen? Da die Chloridpumpe nur ein Pigment darstellt, wäre das Sehen monochromatisch, also Schwarz-Weiss. Die Sehschärfe wäre abhängig von der Anzahl der erfolgreich behandelten und verbliebenen Zapfenzellkörper. Nach der Gentherapie müsste der Patient noch eine spezielle Brille tragen, die aus einer Kamera und Mikrodisplays bestünde. Die Kamera würde die Bilder aufnehmen, sie auf optimale Farbe und Intensität konvertieren und anschließend auf den Displays vor den Augen darstellen. Die Bildinformation würde über die natürliche Linse auf die Netzhaut projiziert und von den behandelten Zapfen detektiert werden [7].

### Korrespondenzadresse:

Dr. Volker Busskamp  
Harvard Medical School  
Genetics Department  
NRB-238 (Church lab)  
77 Ave. Louis Pasteur  
Boston, MA 02115, USA  
Fax: +1-(0)617-432-6513  
vbusskamp@genetics.med.harvard.edu

### AUTOR



#### Volker Busskamp

Jahrgang 1980. 2001–2005 Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig, Diplomarbeit am Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research (FMI) in Basel, Schweiz. 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Laboratory of Virology and Genetics (LVG) der Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) Lausanne, Schweiz. 2007–2010 Promotion am Friedrich Miescher Institute bei Dr. Botond Roska. Seit 2011 Postdoc an der Harvard Medical School, Boston, MA, USA.