

## Leitthema

Ophthalmologe 2005 · 102:764–771  
 DOI 10.1007/s00347-005-1245-z  
 Online publiziert: 13. Juli 2005  
 © Springer Medizin Verlag 2005

J. Neidhardt · K. Wycisk · B. Klöckener-Gruissem

Abteilung für Medizinische Molekulargenetik und Gendiagnostik des Instituts für Medizinische Genetik, Universität Zürich, Schwerzenbach, Schweiz

# Virale und nichtvirale Gentherapieansätze zur Behandlung von Netzhauterkrankungen

**Die Entwicklung und Umsetzung von Gentherapiestrategien zur Heilung von Netzhauterkrankungen erfordert die Integration einer Vielzahl von Faktoren. Allen Strategien gemeinsam ist die Beeinflussung des Krankheitsverlaufs auf der Ebene der Gene oder ihrer Transkripte. Einige verfolgen hierbei die gezielte Manipulation des defekten Gens, während andere über sekundäre Effektoren in die Mechanismen der Pathogenese eingreifen. Die Behandlung dominanter Gendefekte erfordert meist die Entfernung des toxischen Genprodukts, wogegen bei rezessiv vererbten Krankheiten das defekte Gen ersetzt wird. In diesem Zusammenhang ermöglichte erst die Identifizierung von Mutationen in zahlreichen Genen die Entwicklung von gentherapeutischen Strategien zur Heilung von Netzhauterkrankungen.**

**Im Folgenden möchten wir einige erfolgreiche Strategien zur Behandlung von Neovaskularisierungsdefekten und Netzhautdegenerationen diskutieren.**

## Nichtvirale Gentherapie: Therapeutische Oligonukleotide zur Behandlung von Neovaskularisierungsdefekten

Die Neovaskularisierung unterliegt einem komplexen Prozess, an dem eine Vielzahl

von Genen beteiligt ist. Zur Behandlung hat sich der Einsatz von therapeutischen Oligonukleotiden (ON) als erfolgreich erwiesen.

ON sind in der Regel 15 bis 30 Nukleotide lang und können aus DNA oder RNA bestehen. Die spezifische Sequenz des ON wird so gewählt, dass es selektiv an die RNA des Zielmoleküls bindet. Über verschiedene zelluläre Prozesse kann die Assoziation von ON und RNA dazu führen, dass die Reifung der Pre-mRNA verhindert wird, dass der mRNA-Abbau initiiert wird oder dass die Translation zum Protein ausbleibt.

Aus therapeutischer Sicht sind ON interessant, da sie gegen jedes Gen generiert werden können, von dem die Sequenz bekannt ist. Aufgrund des degenerierten DNA-Kodes lassen sich sogar evolutionär stark konservierte Homologe unterscheiden.

Zudem ist die Suche nach dem geeigneten ON weniger aufwändig als bei anderen Methoden zur Medikamentenentwicklung. ON können meist innerhalb von wenigen Wochen entworfen, synthetisiert und in Zellkultur auf ihre Wirkung getestet werden. Hierbei ist zu bedenken, dass die Suche nach dem richtigen ON meist empirisch erfolgt, da die Vorhersage der optimalen Bindungsstelle nur schwer möglich ist. Neuere Studien zeigen, dass die Chance für einen erfolgreichen Einsatz der in vitro entwickelten ON in verschiedenen Tiermodellen und im Menschen hoch ist.

Die drei wichtigsten therapeutischen ON sind „Antisense“-ON, Aptamere, und sog. „short interfering RNAs“ (siRNA).

„Antisense“-ON werden zurzeit am häufigsten verwendet, da sie sehr spezifisch sein können und ihr Design einfach ist. Der Mechanismus, der zum Abbau der RNA führt, kann unterschiedlich sein ( Abb. 1). Die Bindung an die Ziel-RNA erfolgt bei „Antisense“-ON mittels Watson-Crick-Hybridisierung und Assoziation zu den komplementären Nucleotiden der RNA. Die so entstandene Heteroduplex aktiviert die endogen exprimierte Ribonuklease H, welche die RNA der Heteroduplex und somit das Transkript des Zielgens zerstört. Weiterhin kann die Bildung des DNA/RNA-Hybrids auch dazu führen, dass wichtige Sequenzen zur Reifung der mRNA blockiert werden. Unreife mRNA wird in der Regel schnell degradiert. Ein anderer Mechanismus der Inhibition durch einen Heteroduplex wirkt über die sterische Blockade der Bindung von Proteinen an die RNA. Ribosomen und Polymerase können durch den RNA/DNA-Duplex in ihrer Funktion behindert werden.

Aptamere stellen eine zweite wichtige Klasse von therapeutischen ON dar. Sie wurden ursprünglich aus ON-Bibliotheken, bestehend aus randomisierten Sequenzfolgen, entwickelt ( Abb. 2). Diese wurden in vitro auf ihre Wirksamkeit und spezifische Bindung zu Proteinen getestet und durch künstliche Evolution verbessert [30]. Selektiert werden Aptamere

mit besonders hochaffinen Bindungen zu gegebenen Proteinen. Die Assoziation von ON und Protein führt über eine weitgehende Konfigurationsänderung der Aptamere zu einer sehr stabilen Verbindung zwischen den beteiligten Molekülen [12] und damit zum Funktionsverlust des Proteins. Da die Vorhersage der dreidimensionalen Struktur der Aptamere noch wenig erfolgreich ist, werden bis zu  $10^{10}$  verschiedene ON parallel nach ihrer Eigenschaft als Ligand für Proteine beurteilt und die besten ausgewählt.

siRNA ist die jüngste und wahrscheinlich vielversprechendste Form der therapeutischen ON. Diese Methode basiert auf einem natürlichen Abwehrmechanismus der Zellen gegen Virusinfektionen oder Transposonaktivität [13]. Die Nuklease Dicer und der Proteinkomplex RISC („RNA induced silencing complex“) spielen hierbei eine zentrale Rolle (■ **Abb. 3**). Von der Nuklease Dicer werden doppelsträngige RNAs erkannt und gespalten. Dabei entstehen verkürzte doppelsträngige RNAs, deren Enden überzählige Nucleotide tragen (siRNA). RISC katalysiert die Erkennung und den Abbau der zur siRNA komplementären mRNA, was zur Abnahme der entsprechenden Proteinkonzentration führt [8]. Der gesamte Prozess wird auch als RNAi („RNA interference“) bezeichnet. Da methodisch der Umgang mit längeren doppelsträngigen RNAs schwierig ist, bedient man sich eines Tricks, um ein geeignetes Template für Dicer zu erzeugen. Es werden Plasmide hergestellt, die kurze komplementäre DNAs gefolgt von 5-Thymidin-Nucleotiden enthalten. Die RNA-Polymerase III schreibt diese in RNAs um und spaltet sie aufgrund des 5-Thymidin-Signals nach dem zweiten Thymidin. Das Ergebnis ist eine einzelsträngige RNA, deren komplementärer Anteil Watson-Crick-Bindungen eingeht. Diese kann ebenfalls als doppelsträngige RNA von Dicer erkannt werden und somit als siRNA funktionieren.

### Applikationen

Zur Verabreichung der ON sind verschiedene Injektionsmethoden (intravitreal, subretinal (■ **Abb. 4a**) und systemisch) beschrieben. Zu beachten ist, dass ON modifiziert werden sollten, um ihren Abbau

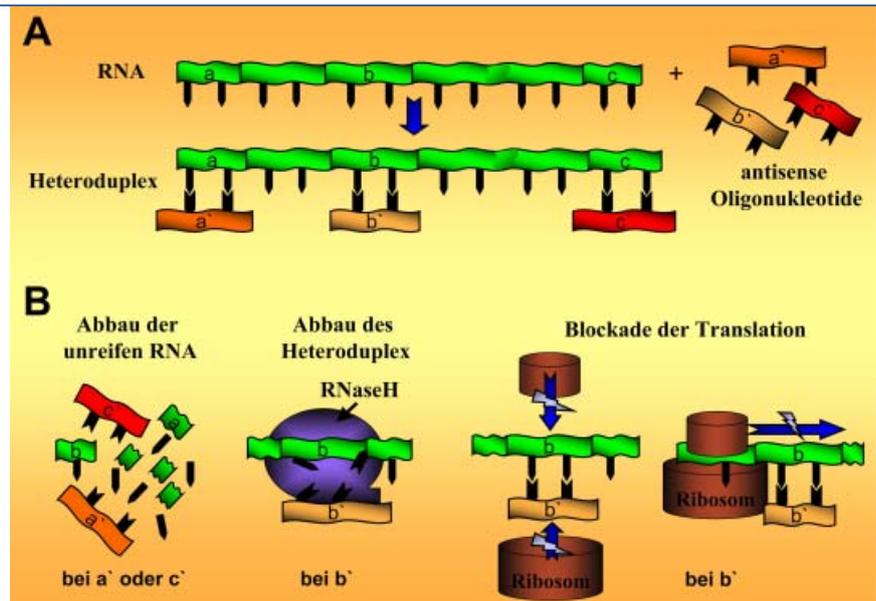


Abb. 1 ▲ a Watson-Crick-Hybridisierung von Antisense-ON (a', b', c') an funktionelle Sequenzen (a, b, c) der Ziel-RNA. b Wirkung der Antisense-ON auf die Ziel-RNA

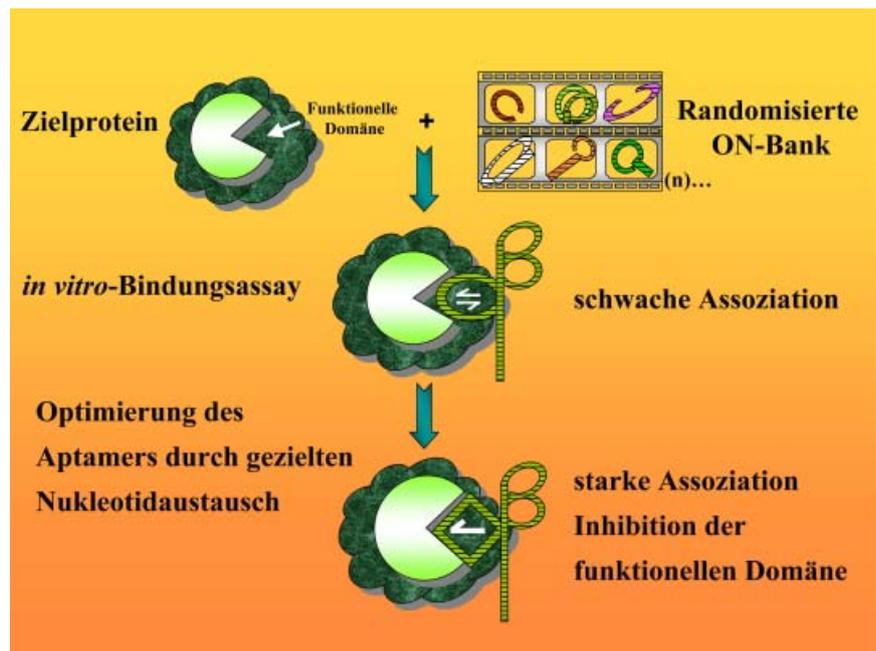


Abb. 2 ▲ Selektion eines passenden Aptamers zur Blockierung der Funktion des Zielproteins

nach Eintritt in die Zelle zu verhindern [16]. Häufig zeigen diese veränderten ON sogar eine verbesserte Pharmakokinetik und eine gesteigerte Affinität zur RNA.

Die Wirksamkeit und Wirkdauer der Gentherapeutika kann ebenfalls durch liposomale Transfektionsvehikel gesteigert werden. Liposomen kondensieren die ON durch deren ionische Interaktion so stark, dass die DNA gänzlich von ihnen umhüllt und so vor dem Verdau durch Nucleasen abgeschirmt wird. Zusätzlich erleichtern die Liposomen die Aufnahme in die Zelle

(■ **Abb. 4b**). Eine Verbesserung der Transfektionsrate kann auch durch Elektroporation erzielt werden (■ **Abb. 4c**). Bei dieser wird durch ein elektrisches Feld die Permeabilität der Zellmembran erhöht und so die Aufnahme 100- bis 1000fach gesteigert. Trotz vielversprechender und erfolgreicher Resultate in Tiermodellen, ist die Applikation der Elektroporation für gentherapeutische Fragestellungen am Mensch noch nicht zugelassen [20].

Trotz vieler Vorteile der therapeutischen ON gegenüber anderen Medika-

Ophthalmologe 2005 · 102:764–771  
DOI 10.1007/s00347-005-1245-z  
© Springer Medizin Verlag 2005

J. Neidhardt · K. Wycisk · B. Klöckener-Gruissem

### Virale und nichtvirale Gentherapieansätze zur Behandlung von Netzhauterkrankungen

#### Zusammenfassung

Für die Behandlung von Netzhauterkrankungen eröffnet der Einsatz der Gentherapie neue Perspektiven. Die Verwendung von verschiedenartigen Oligonukleotiden oder viralen Expressionsvektoren erlaubt die Entwicklung von neuen Heilungsstrategien für Neovaskularisierungskrankheiten und retinale Degeneration. Therapeutische Oligonukleotide („Antisense“-Oligonukleotide, Aptamere und siRNA) können den gezielten Abbau von Transkripten und damit die Konzentrationsabnahme eines an der Pathogenese beteiligten Proteins induzieren. Dagegen wird mit viralen Vektoren

(rAAV und Lentivirus) häufig die Funktion eines defekten Gens durch die eines gesunden ersetzt und so die Ursache der Krankheit bekämpft. Die an Tiermodellen erfolgreich angewandten Gentherapien führten bereits zur Entwicklung von Medikamenten, und weitere werden zurzeit klinisch erprobt.

#### Schlüsselwörter

Gentherapie · Oligonukleotid · Virale Vektoren · Neovaskularisierung · Netzhautdegeneration

### Viral and nonviral gene therapy for treatment of retinal diseases

#### Abstract

The development of gene therapeutic approaches offers new perspectives for the treatment of retinal diseases. The use of both, nonviral methods employing oligonucleotides as well as viral expression vectors provide the possibility to treat neovascularization defects and retinal degeneration, respectively. The mechanism by which the therapeutic oligonucleotides (antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA) work is based on degradation of specific transcripts. Consequently, a reduction of the corresponding protein, which is in-

involved in the particular pathogenesis, follows. In contrast, viral vector transduction can substitute the disease-associated gene with an intact copy. So far, animal models have successfully contributed to the development of gene therapeutic medication and further treatments are at the recruiting phase of clinical trials.

#### Keywords

Gene therapy · Oligonucleotide · Viral vectors · Neovascularization · Retinal degeneration

menten existiert ein entscheidender Nachteil: Zurzeit gibt es keine wirksame Methode, die ON oral zu applizieren. Hinzu kommt, dass verschiedene Zelltypen die ON unterschiedlich effizient aufnehmen, was eine systemische Applikation erschwert. Jedoch ist in einigen Tiermodellen gezeigt worden, dass die systemische Gabe bei Netzhauterkrankungen erfolgreich sein kann [17].

Die Wirkung von ON ist in der Regel transient und erfordert eine häufigere Applikation. Diese erhöht besonders bei intravitrealer Injektion die Wahrscheinlichkeit für Komplikationen. Andererseits ist bei der intravitrealen Applikation die direkte Abgabe des Medikaments an den Wirkort von Vorteil.

### Anwendungsbeispiele der ON-Therapie

Prominente Anwendungsbeispiele von ON mit klinischer Relevanz kommen nicht nur aus den Gebieten der Krebs-, Herz-Kreislauf-, und HIV-Therapie, sondern auch aus dem Gebiet der Augenheilkunde. Tatsächlich ist das erste auf ON basierende Medikament auf dem Gebiet der Ophthalmologie zugelassen worden. Es heißt Formivirsen (Produktname: Vitravene™) und wird zur Behandlung von Zytomegalievirus-Retinitis eingesetzt. Die Antisense-ON von Formivirsen sind komplementär zu einer Sequenz in der mRNA des Zytomegalievirus und unterdrücken so seine Replikation. Das Medikament ist gut verträglich und wird intravitreal appliziert. Unerwünschte Nebenwirkungen entstehen meist nur aus der Art der Applikation.

Weitere therapeutische Antisense-ON wurden gezielt zur Behandlung von Neovaskularisierungsdefekten im Auge entwickelt und in verschiedenen Tiermodellen getestet. Die Inhibition des Y2-Rezeptors für das Neuropeptid NPY führt durch ein Antisense-ON zu verringerter Neovaskularisierung. Getestet wurde dieses Antisense-ON in einem Rattenmodell für diabetische Retinopathie. Die vermehrte Neovaskularisierung konnte durch tägliche intraperitoneale Applikation des Oligonukleotids reduziert werden [17]. Weiterhin wurden in einem porkinen Tiermodell für retinale Ischämie Hinweise gesammelt, dass

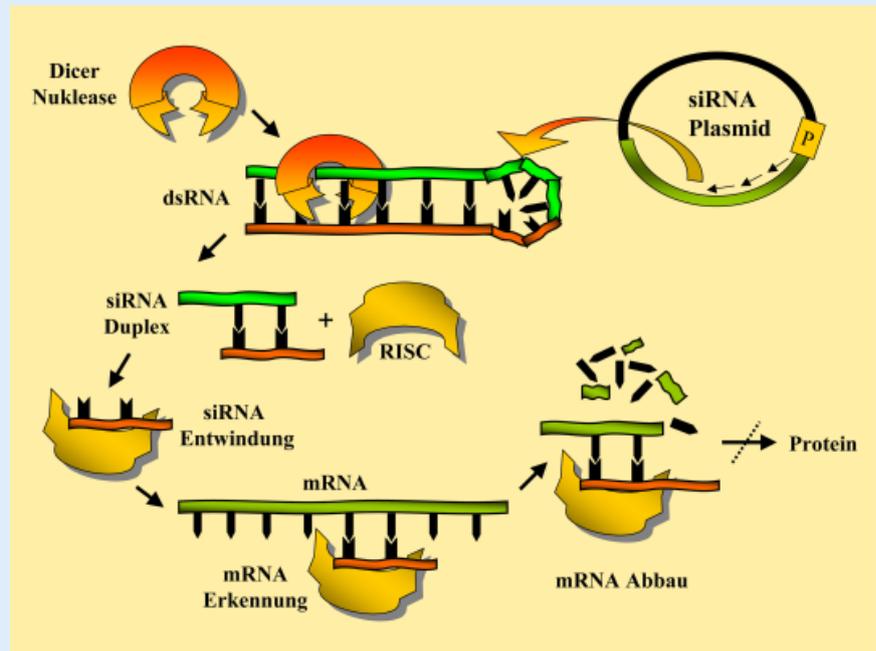


Abb. 3 ▶ Prinzip der Wirkung von siRNA. Doppelsträngige RNA wird von der Nuklease Dicer zu siRNA prozessiert. Diese vermittelt über die Bindung von RISC den Abbau der Ziel-RNA

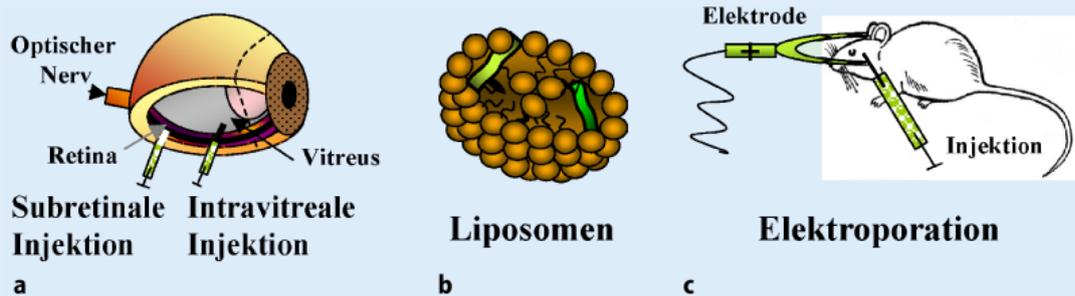


Abb. 4 ▲ Applikationsmethoden und unterstützende Maßnahmen. a Schematische Darstellung subretinaler und intravitrealer Applikationen am Auge. b Steigerung der Wirksamkeit und Wirkdauer der Gentherapeutika durch liposomale Transfektionsvehikel. c Verbesserung der Transfektionsrate durch Elektroporation

die Inhibition der Raf-1-Kinase durch intravitreale Injektion eines „Antisense“-ON die Neovaskularisierung verringern kann [9].

Die Mehrzahl der Studien beschäftigt sich jedoch mit der Inhibition von VEGF („Vascular Endothelial Growth Factor“) zur Therapie von Neovaskularisierungen im Auge und der Retina. VEGF kann mit allen Klassen der therapeutischen ON in vitro und in vivo stark inhibiert werden. So wurde z. B. ein „Antisense“-ON erfolgreich zur Verringerung der Irisneovaskularisierung in Affen verwendet. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass sich das ON nach intravitrealer Injektion auch in den meisten retinalen Zellen anreichert [6] und so auch zur Behandlung der Neovaskularisierung der Retina eingesetzt werden könnte. In anderen Tiermodellen, z. B.

der laserinduzierten retinalen Neovaskularisierung in Ratten, wurde eine reduzierte Gefäßneubildung über mehrere Wochen durch intravitreale Applikation eines VEGF-spezifischen „Antisense“-ON erreicht [10].

Auf dem Gebiet der therapeutischen Aptamere konnte in den USA bereits ein Medikament zur Behandlung von choroidaler Neovaskularisierung zugelassen werden. Pegaptanib (Macugen®) bindet an VEGF und wird bei altersabhängiger Makuladegeneration eingesetzt. In der dritten klinischen Erprobungsphase wurden 1186 Patienten mit 3 verschiedenen Dosen und durchschnittlich 8,5 Injektionen im Abstand von 6 Wochen behandelt [11]. Es gehörten etwa ein Viertel der Patienten zur Kontrollpopulation. Schon nach der ersten Injektion des Aptamers wurde eine

positive Wirkung festgestellt, die sich bis zur 54. Woche nach Beginn der Behandlung noch verstärkte. Ungeachtet jeglicher Subgruppen der altersabhängigen Makuladegeneration stabilisiert Pegaptanib den Krankheitsverlauf, verringert das Risiko der Erblindung und führt bei einem kleinen Prozentsatz der Patienten zu einer Verbesserung der Symptomatik. In dieser verhältnismäßig kurzen Studie waren unerwünschte Nebenwirkungen vornehmlich mit der intravitrealen Injektion assoziiert.

Ogleich sich die Inhibition von VEGF zur Behandlung von Neovaskularisierung im Auge als erfolgreich herausgestellt hat, limitiert die Komplexität des Neovaskularisierungsprozesses den Erfolg der VEGF-basierten Therapie. Ähnlich wie VEGF beeinflussen zusätzliche Faktoren, wie z. B. Angiopoietin-2, die Gefäßneubildung. In

Tabelle 1

**Effekte der Verabreichungsorte auf die Effizienz der Transduktion [2,5,19,21,23,29]**

	Subretinale Injektion	Intravitreale Injektion
<b>Adenovirus (AV)</b>		
• Effizienz und Zellspezifität	Vorrangig in RPE-Zellen, aber auch PR-Zellen, gelegentlich Müller-Zellen	Vorrangig Müller-Zellen, aber auch Korneaendothel, Irispigmentepithel und Zellen des trabekularen Netzwerkes
• Dauer der Transgenexpression	1–3 Monate, mit verringernder Intensität der Effekte	48 h bis 2 Wochen
<b>Adenoassoziierter Virus (rAAV) Serotyp 2</b>		
• Effizienz und Zellspezifität	PR-Zellen, RPE-Zellen	Ganglienzellen
• Dauer der Transgenexpression	Kürzere Latenzzeit: 1–3 Wochen, längere Dauer: bis zu einem Jahr	Keine transduzierten Zellen
<b>HIV-1-Lentivirus</b>		
• Effizienz und Zellspezifität	PR-, RPE- und Ganglienzellen, 50–80%	Vorrangig Ganglienzellen, aber auch RPE-Zellen
• Dauer der Transgenexpression	Bis 6 Monate	Mindestens 3 Wochen
<b>Felines Lentivirus</b>		
• Effizienz und Zellspezifität	PR-Zellen, Müller-Zellen	Geringe Effizienz
• Dauer der Transgenexpression	1,75 Monate	
<b>Bovines Lentivirus</b>		
• Effizienz und Zellspezifität	RPE-Zellen	Geringe Effizienz
• Dauer der Transgenexpression	5 Monate	
<b>Simian Lentivirus</b>		
• Effizienz und Zellspezifität	RPE-Zellen	Geringe Effizienz
• Dauer der Transgenexpression	3 Monate	
<b>Onkovirus (MLV)</b>		
• Effizienz und Zellspezifität	Geringe Effizienz, ausschließlich mitotische Zellen	Geringe Effizienz, ausschließlich mitotische Zellen
• Dauer der Transgenexpression	Geringe Effizienz	Geringe Effizienz

einem Rattenmodell konnte die Neovaskularisierung in der Kornea durch ein angiopoietin-2-spezifisches Aptamer verringert werden [32]. Ob eine Kombination von Aptameren gegen Angiopoietin-2 und VEGF zu einer Verbesserung der Therapie führt, ist noch nicht untersucht. Dagegen wurde bereits gezeigt, dass die Kombination von verschiedenen siRNAs gegen VEGF und zwei seiner Rezeptoren (VEGF-Rezeptor 1 und 2) in Mäusen zu einer verbesserten Therapie der Neovaskularisierung im Auge beiträgt [15].

**Unerwünschte Nebenwirkungen**

ON sind nicht frei von Nebenwirkungen. Ihre stark negativ geladene Oberfläche kann zu Immunantworten, Thrombozytopenie oder Blutplättchenaggregation führen [14]. In der klinischen Erprobungsphase II zu Pegaptanib wurden 24 h nach intravitrealer Injektion erhöhte Konzentrationen der Aptamere im Blut gemessen. Tatsächlich ereigneten sich zwei Fälle von schweren Herz-Kreislauf-Komplikationen unter den Testpersonen, wobei aber keine

direkte Korrelation zwischen den zirkulierenden Mengen an Pegaptanib und den Vorfällen nachweisbar war. Auch in der klinischen Erprobungsphase III des Medikaments fanden sich keine schweren Nebenwirkungen, die auf den Wirkstoff zurückgeführt werden konnten. Aufgrund der bisher kurzen Dauer der Studien kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass prädisponierte Personen bei langfristiger Anwendung mit schweren Nebenwirkungen zu rechnen haben. Die wesentlichsten, korrelierbaren Nebenwirkungen waren dagegen mit der intravitrealen Applikation verbunden. Endophthalmitis, Linsentraumata und retinale Ablösungen traten bei 0,6 bis 1,3% der Patienten nach 8–9 Behandlungen auf und sind damit nicht höher als bei anderen intravitrealen Injektionen. Wünschenswert wäre eine Applikationsmethode mit geringerem Risiko für Komplikationen, besonders bei langfristiger Behandlung.

**Virale Genterapie: Adenovirus, adenoassozierte Viren und Retroviren in der Genterapie**

Alternativ zu den nichtviralen Therapieansätzen wird auch intensiv an der Möglichkeit geforscht, degenerative Netzhauterkrankungen durch viral eingeschleuste Gene zu behandeln. Prinzipiell wird das Virus als Vehikel zur Transduktion der Netzhautzellen benutzt, wobei die pathogenen Virenabschnitte durch die „Behandlungssequenz“ ersetzt werden. Getestet wurden die rekombinanten Konstrukte in Tiermodellen verschiedener Spezies wie Maus, Ratte, Hund und Affe. Retinales Gewebe wurde bereits 1997 erfolgreich mit HIV-1-basierendem Lentivirus (Retrovirus) transduziert [21]. In parallelen Ansätzen forschten andere Gruppen an rekombinanten Adenoviren zur Transduktion, doch schon bald zeigte sich, dass dieser Virus problematische Nebenwirkungen zeigte und somit für genterapeutische Fragen ungeeignet ist. Dies konnte mit der Entwicklung des rekombinanten adenoassozierten Virus (rAAV), einem nichtpathogener Parvovirus, zum größten Teil umgangen werden [2, 4]. Obwohl auch rAAV starke Antikörperproduktionen im Körper auslösen, sind diese immunologisch harmlos. Eine Vielzahl von Versuchen zeigte, dass der

Tabelle 2

## Effekte der rAAV-Serotypen-Transduktion nach subretinaler Injektion

Spezies- und Zellspezifität	rAAV-2/1	rAAV-2/2	rAAV-2/3	rAAV-2/4	rAAV-2/5	rAAV-5/5
Mausleber und -muskel	+++++	++	+++	+	++++	
Rattenretina	+++	RPE (+), PR (+)	(+)	RPE +++++	RPE +++++, PR +++++	–
Mausretina	RPE (kurze LZ)	RPE, PR	kA	–	RPE, PR	RPE, PR
Hunderetina	–	RPE, PR	kA	RPE, PR	RPE	–
Affenretina	–	RPE, PR	kA	RPE	–	RPE, PR

Serotypen rAAV2/x-Chimäre enthalten rAAV2-charakteristische „Inverted Terminal Repeats“ (ITR) kombiniert mit rAAV-2- bis 5-charakteristischen Virenhüllen; rAAV5/5 enthält beide Eigenschaften vom Typ 5. RPE retinales Pigmentepithelium; PR Photorezeptor; LZ Latenzzeit; kA keine Angaben; + und – symbolisieren die Stärke der Transgenexpression; (+) sehr schwache Expression [24, 25].

Ort der Applikation (■ **Abb. 4a**) von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Transduktion der Zielzellen ist (■ **Tabelle 1**).

Es existiert eine Fülle von Forschungsarbeiten, die sich mit der Optimierung der viralen Transduktion beschäftigen. Wichtige Vorteile brachte die Entwicklung verschiedener Serotypen des rAAV (■ **Tabelle 2**). Diese sind durch die Kombination von rAAV-spezifischen Enden (z. B. rAAV2) mit den Virushüllen anderer Subtypen (z. B. rAAV1,3,4, oder 5) generiert worden [25]. Ihr Einsatz kann, abhängig von der Spezies, die Zellspezifität erhöhen und die Latenzzeit merklich verkürzen.

Das letale Potenzial der HIV-1-basierten Vektoren kann trotz genetischer Manipulation des nativen Virus nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wird alternativ auch das HIV-2, das einen milderen Phänotyp der AIDS-Erkrankung verursacht, eingesetzt [7]. Es existiert mittlerweile eine Vielfalt von nichtpathogenen Lentiviren („Feline Immunodeficiency Virus“ (FIV), „Simian Immunodeficiency Virus“, „Equine Infectious Anemia Virus“ oder „Bovine Immunodeficiency Virus“), die zur Entwicklung weiterer Transfervehikel dienen.

Sowohl systemische Effekte als auch die biologische Sicherheit der Virusanwendung müssen bedacht werden. So wurden z. B. DNA-Sequenzen vom Serotyp rAAV2/2 18 Monate nach Transduktion der Zielorgane (Muskel und Lunge) im gesamten Körper nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist virale Vektor-DNA, die ins Auge injiziert wurde, nur kurze Zeit nach der Injektion in wenigen Blutzellen gefunden worden [25].

Während eine vorübergehende Immunreaktion bei akuten Erkrankungen tole-

riert werden kann, erfordert die virale Behandlung chronischer Augenerkrankungen die Verwendung nichtimmunogener Vektoren. Von Vorteil ist, dass das Auge einen Immunsonderstatus hat [28]. Obwohl gegen den viralen Vektor gerichtete Antikörper in intraokulärer Flüssigkeit und im Serum nachgewiesen werden konnten, gab es keinen Hinweis einer zellvermittelten Immunreaktion im Auge oder anderen Körperteilen.

### Anwendungsbeispiele

Im Folgenden möchten wir an Beispielen erfolgreicher Gentherapien in verschiedenen Tiermodellen einen Einblick in zukünftige Gentherapien von Netzhauterkrankungen im Menschen geben.

#### Genaustausch von RPE65

Im Menschen werden Mutationen im RPE65-Gen autosomal-rezessiv vererbt und führen zu Leberscher kongenitaler Amaurose (LCA). Das Gen kodiert für ein membranassoziertes, evolutionär stark konserviertes Protein, welches fast ausschließlich in den Zellen des retinalen Pigmentepitheliums (RPE) exprimiert wird. Fehlt das Protein, akkumuliert All-trans-retinylester, die Funktion der Photorezeptorzellen ist gestört und Fetteinschlüsse lagern sich im RPE ab. Die Folge ist eine Schädigung der Retina. Auch bei Hunden führt ein defektes RPE65-Gen zu LCA-ähnlichen Symptomen. In diesem Tiermodell wurde erstmals gezeigt, dass eine virusbasierte Gentherapie die Sehfähigkeit in großen Säugetieren positiv beeinflusst. In zwei unabhängigen Studien wurde das rAAV-System erfolgreich angewandt [1, 22]. In beiden Studien konnte aufgrund von erhöhten b-Wellen-Amplitu-

den im ERG übereinstimmend gezeigt werden, dass eine funktionelle Verbesserung erzielt wurde. Diese Aussage wurde mit Pupillometriemessungen und Verhaltenstests der behandelten Hunde 4 Monate nach subretinaler Injektion unterstützt. Fetteinschlüsse in transduzierten RPE-Zellen waren nicht mehr nachweisbar [22]. Die erfolgreich therapierten Hunde zeigen noch heute, 4 Jahre nach Beginn der Therapie, das verbesserte Sehvermögen. Systemische Nebenwirkungen wurden nicht gefunden, jedoch entwickelte sich in der Mehrzahl (75%) der behandelten Augen kurz nach der Injektion eine Uveitis. Diese konnte nach antiinflammatorischer Behandlung in 90% der Fälle geheilt werden. Als Ursache der Uveits wird eine immunpathologische Reaktion auf das RPE65-Protein diskutiert.

RPE65-Knockout-Mäuse dienen ebenfalls als LCA-Tiermodell und wurden erfolgreich mit einem RPE65-rAAV-Vektor behandelt [18]. Über den Zeitraum von 18 Monaten nach subretinaler Injektion nahm die anfänglich hohe Intensität der Expression allerdings ab. Die verringerte Anzahl der Fetteinschlüsse in RPE-Zellen und die erhöhte Anzahl von opsinpositiven Zapfen konnte bis zum Ende der Untersuchungsphase nachgewiesen werden. Dies betraf jedoch nur solche Zellen, die in der Nähe der Injektionsstelle lagen. Letzterer Befund unterstreicht die Notwendigkeit, sowohl die Effizienz der Vektorverabreichung als auch die Expression des Transgens *in vivo* zu erhöhen. Überraschenderweise konnte trotz verbesserter ERG-Funktion und hoher Transgenexpression der progressive Verlust der Photorezeptorzellen nicht aufgehalten werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Mausmodellen gemacht (siehe unten).

## Gen austausch von MertK

*MertK* kodiert eine nicht augenspezifische Tyrosinkinase, die eine Rolle bei der Phagozytose der Außensegmente der Photorezeptorzellen spielt. Der Stamm der „Royal College of Surgeons“- (RCS-) Ratten trägt eine homozygote Deletion im *MertK*-Gen, die über einen RPE-zellspezifischen Defekt zum apoptotischen Zelltod der Photorezeptorzellen führt. Die Unfähigkeit der defekten RPE-Zellen, die Photorezeptorzellfragmente zu phagozytieren, führt zur Anhäufung von Zellmüll und stoppt den Signalfuss. Eine intakte Kopie des Ratten-*MertK*-Gens wurde in einem adenovirusbasierten Vektor subretinal in junge RCS-Rattenaugen injiziert [31]. 30 Tage später konnte eine deutliche funktionelle und strukturelle Verbesserung der Zellen beobachtet werden, die allerdings nur von kurzer Dauer war. Die Transduktion mit anderen rAAV-Serotypen erzielte eine längere Wirkung [27]. Zusätzlich wurde deutlich, dass die Promoterwahl einen entscheidenden Einfluss auf die zellspezifische Expression des transduzierten Gens hat.

## Gen austausch von Prph2

*Prph2* kodiert ein photorezeptorspezifisches Membranglykoprotein, Peripherin<sub>2</sub>, welches eine Strukturkomponente der Außensegmente der Photorezeptoren ist. Mutationen in diesem Gen führen zu verschiedenen Netzhautdystrophien. Die rds- („retinal degeneration slow“-) Maus trägt eine homozygote Mutation im *Prph2*-Gen, was früh in der Entwicklung (P16) zum Verlust der Außensegmente der Photorezeptoren und einem völligen Funktionsverlust führt. Diese Mäuse gelten als Modell zur Erforschung von Retinitis pigmentosa. Dabei wurden 10 Tage alte homozygote Mutanten mit einem rAAV-Vektor transduziert, der die intakte Kopie des *Prph2*-Gens unter der Kontrolle des Rhodopsin-Promoters trägt [3]. Bis zu 10 Wochen nach Injektion zeigten alle Tiere die Bildung von Außensegmenten der Photorezeptoren, die sowohl Peripherin als auch Rhodopsin aufwiesen. Im ERG war eine verbesserte b-Wellen-Amplitude messbar. Es wurden keine Entzündungen gefunden, aber die Transduktionsrate war, ähnlich wie in allen oben beschriebenen Experimenten, mit 30% nicht merklich verbessert [26]. Anzahl und Qualität

der Außensegmente hing wesentlich vom Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Injektion ab. Dieser Befund muss bei erfolgreicher Anwendung humaner Gentherapie berücksichtigt werden.

Wie schon bei den *RPE65*-Mäusen beobachtet, wird auch in transduzierten rds-Mäusen der Verlust von Photorezeptorzellen, trotz struktureller und funktioneller Verbesserung, nicht verhindert. Untersuchungen ergaben, dass Überexpression von *Peripherin2* selbst in normalen Mäusen einen apoptotischen Effekt auf Photorezeptorzellen ausüben kann. Diese Befunde verdeutlichen die Notwendigkeit, zunächst die Mechanismen der Genregulation zu verstehen, um sie entsprechend manipulieren zu können. Die Anwendung von photorezeptorspezifischen, induzierbaren Promotern könnte hier von großer Bedeutung sein.

## Ausblick

Der immense Fortschritt im Bereich der Gentherapie von Netzhauterkrankungen ist offensichtlich. Eine häufige Voraussetzung für die Anwendung der Strategien am Patienten ist die Kenntnis der krankheitsauslösenden Mutation und des Vererbungsmodus. Dieses kann nur durch effiziente Verfahren zur Analyse des Patienten-genotyps erreicht werden.

Für virale Therapien sollte die Regulation der Expression des betroffenen Gens bekannt sein, denn sowohl Vektorsystem und Promoter als auch Ort, Zeit und Methode der Applikation beeinflussen den Erfolg der Gentherapie. Die Erkennung und Beseitigung eventueller Nebenwirkungen ist essenziell. Grundsätzlich ist das Verständnis der komplexen biologischen Wirkweise der betroffenen Gene entscheidend.

Auf dem Gebiet der nichtviralen Gentherapie konnten bereits mit zwei zugelassenen Medikamenten (Formivirsen (Vitravene™) und Pegaptanib (Macugen®)) erste Erfolge verbucht werden. Die Anwendung viraler Gentherapie soll erstmals im Herbst 2005 mit der klinischen Erprobungsphase I beginnen, um ein defektes *RPE65*-Gen in LCA-Patienten mit einem intakten zu ersetzen. Der neueste Stand klinischer Anwendungsstudien im humanen Bereich kann unter folgenden Internetseiten nachgelesen werden:

- <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>
- <http://www.orphan.net>, und
- <http://www.fightblindness.org>

## Korrespondierender Autor

**Dr. B. Klöckener-Gruissem**

Abteilung für Medizinische Molekulargenetik und Gendiagnostik des Instituts für Medizinische Genetik, Universität Zürich, Schorenstraße 16, 8603 Schwerzenbach, Schweiz  
E-Mail: [kloeckener@medgen.unizh.ch](mailto:kloeckener@medgen.unizh.ch)

**Interessenkonflikt:** Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

## Literatur

1. Acland GM, Aguirre GD, Ray J et al. (2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28:92–95
2. Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ et al. (1996) Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* 5:591–594
3. Ali RR, Sarra GM, Stephens C et al. (2000) Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 25:306–310
4. Bennett J (2003) Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors. *Gene Ther* 10:977–982
5. Bennett J, Maguire AM, Cideciyan AV et al. (1999) Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9920–9925
6. Bhisitkul RB, Robinson GS, Moulton RS et al. (2005) An antisense oligodeoxynucleotide against vascular endothelial growth factor in a nonhuman primate model of iris neovascularization. *Arch Ophthalmol* 123:214–219
7. Bock PJ, Markovitz DM (2001) Infection with HIV-2. *AIDS* 15 [Suppl 5]:S35–S45
8. Caplen NJ, Mousset S (2003) Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann N Y Acad Sci* 1002:56–62
9. Danis R, Criswell M, Orge F, Wancewicz E, Stecker K, Henry S, Monia B (2003) Intravitreal anti-raf-1 kinase antisense oligonucleotide as an angioinhibitory agent in porcine preretinal neovascularization. *Curr Eye Res* 26:45–54
10. Garrett KL, Shen WY, Rakoczy PE (2001) In vivo use of oligonucleotides to inhibit choroidal neovascularisation in the eye. *J Gene Med* 3:373–383
11. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Feinsod M, Guyer DR (2004) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351:2805–2816
12. Hermann T, Patel DJ (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287:820–825
13. Holen T, Mobbs CV (2004) Lobotomy of genes: use of RNA interference in neuroscience. *Neuroscience* 126:1–7

14. Jansen B, Zangemeister-Wittke U (2002) Antisense therapy for cancer – the time of truth. *Lancet Oncol* 3:672–683
15. Kim B, Tang Q, Biswas PS et al. (2004) Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol* 165:2177–2185
16. Koller E, Gaarde WA, Monia BP (2000) Elucidating cell signaling mechanisms using antisense technology. *Trends Pharmacol Sci* 21:142–148
17. Koulu M, Movafagh S, Tuohimaa J et al. (2004) Neuropeptide Y and Y2-receptor are involved in development of diabetic retinopathy and retinal neovascularization. *Ann Med* 36:232–240
18. Lai CM, Yu MJ, Brankov M et al. (2004) Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65<sup>-/-</sup> knockout mouse eye results in limited rescue. *Genet Vaccines Ther* 2:3
19. Lotery AJ, Derksen TA, Russell SR et al. (2002) Gene transfer to the nonhuman primate retina with recombinant feline immunodeficiency virus vectors. *Hum Gene Ther* 13:689–696
20. Matsuda T, Cepko CL (2004) Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16–22
21. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1997) Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10319–10323
22. Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R et al. (2003) Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1663–1672
23. Quinonez R, Sutton RE (2002) Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 21:937–951
24. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ (2002) Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76:791–801
25. Rolling F (2004) Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene Ther* 11 [Suppl 1]:S26–S32
26. Sarra GM, Stephens C, de Alwis M, Bainbridge JW, Smith AJ, Thrasher AJ, Ali RR (2001) Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds) mouse: the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina. *Hum Mol Genet* 10:2353–2361
27. Smith AJ, Schlichtenbrede FC, Tschernutter M, Bainbridge JW, Thrasher AJ, Ali RR (2003) AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 8:188–195
28. Streilein JW (1987) Immune regulation and the eye: a dangerous compromise. *FASEB J* 1:199–208
29. Takahashi K, Luo T, Saishin Y et al. (2002) Sustained transduction of ocular cells with a bovine immunodeficiency viral vector. *Hum Gene Ther* 13:1305–1316
30. Tuerk C, Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249:505–510
31. Vollrath D, Feng W, Duncan JL et al. (2001) Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12584–12589
32. White RR, Shan S, Rusconi CP, Shetty G, Dewhirst MW, Kontos CD, Sullenger BA (2003) Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5028–5033

# Hier steht eine Anzeige.

