

## Gentherapie

# Neue Ansätze zur Therapie genetisch bedingter Blindheit

STYLIANOS MICHALAKIS<sup>1</sup>, REGINE MÜHLFRIEDEL<sup>2</sup>, SUSANNE KOCH<sup>1</sup>,  
TIM GOLLISCH<sup>3</sup>, MARTIN BIEL<sup>1</sup>, MATHIAS W. SEELIGER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CENTER FOR INTEGRATED PROTEIN SCIENCE MUNICH (CIPSM), DEPARTMENT  
PHARMAZIE – ZENTRUM FÜR PHARMAFORSCHUNG, LMU MÜNCHEN

<sup>2</sup>FORSCHUNGSINSTITUT FÜR AUGENHEILKUNDE, UNIVERSITÄT TÜBINGEN

<sup>3</sup>MAX-PLANCK-FORSCHUNGSGRUPPE VISUELLE KODIERUNG, MAX-PLANCK-INSTITUT  
FÜR NEUROBIOLOGIE, MARTINSRIED

**Achromatopsie ist eine erblich bedingte und bislang unheilbare Augenkrankheit, bei der die Zapfen funktionslos sind. Im Mausmodell konnten nun erste, sehr Erfolg versprechende Ergebnisse zur Gensatztherapie der Achromatopsie erzielt werden.**

Achromatopsia is a hereditary disorder characterized by lack of cone photoreceptor function. Currently there is no treatment available. First results obtained in an achromatopsia mouse model provide evidence for successful restoration of vision using gene replacement therapy.

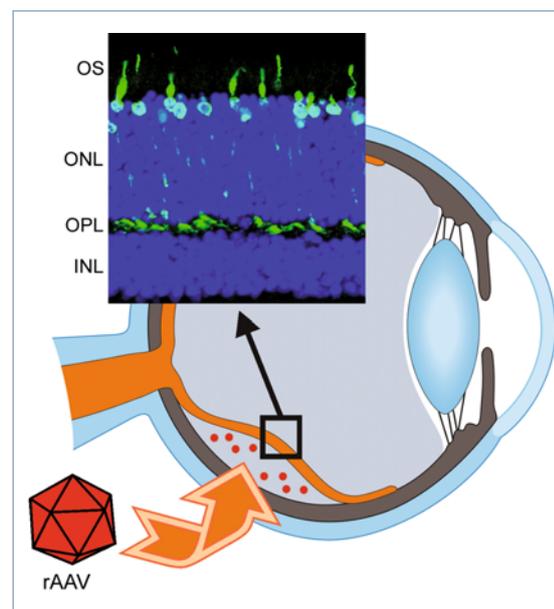
■ Die Netzhaut des Auges enthält zwei Arten von Photorezeptoren, die jeweils hochspezialisierte Aufgaben übernehmen. Die besonders lichtempfindlichen Stäbchen erlauben das Sehen im Dämmerlicht, die Zapfen ermöglichen das Farbsehen sowie das scharfe Sehen bei Tageslicht. Der Mensch besitzt drei Zapfenklassen mit unterschiedlicher spektraler Empfindlichkeit. Menschen mit Achromatopsie fehlt, meist von Geburt an, die Funktion der Zapfen. Im Gegensatz zur Rot-Grün-Farbfehlsichtigkeit, welche durch den Verlust eines Farbpigments verursacht wird [1], sind diese Patienten allerdings nicht nur farbenblind, sondern haben außerdem eine sehr geringe Sehschärfe und leiden unter besonderer Lichtempfindlichkeit sowie Augenzittern (Nystagmus). Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einer progressiven Degeneration der Zapfen, die mit globalen Veränderungen der Netzhaut (z. B. Gliose) einhergeht.

Die Krankheit ist autosomal rezessiv und wird in der Mehrzahl der Fälle durch Mutationen im *CNGA3*- (20 bis 28 Prozent der Fälle) oder *CNGB3*-Gen (40 bis 50 Prozent) ausgelöst [2]. In seltenen Fällen (jeweils ein bis zwei Prozent) finden sich Mutationen in den Genen *GNAT2* oder *PDE6c* [2]. *CNGA3* und

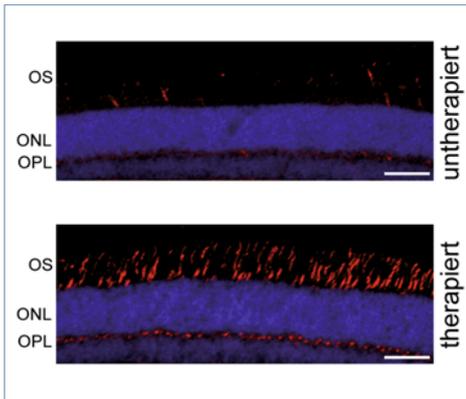
*CNGB3* codieren für die A- bzw. für die B-Untereinheit des cGMP(zyklisches Guanosinmonophosphat)-gesteuerten Kationenkanals (CNG-Kanal, *cyclic nucleotide gated channel*) der Zapfen. Der CNG-Kanal nimmt eine Schlüsselposition im Sehprozess bei Tageslicht ein, der mit der Lichtdetektion in den

Zapfen-Außensegmenten beginnt. Man kann den CNG-Kanal als molekularen Schalter ansehen, der lichtvermittelte Änderungen der cGMP-Konzentration in ein Spannungssignal umsetzt, das die Glutamatfreisetzung an der Zapfen-Synapse steuert. Dieses neuronale Signal wird zunächst über Interneurone (Bipolarzellen) an die Output-Neurone der Netzhaut (Ganglienzellen) weitergeleitet. Die Ganglienzellen übermitteln die visuellen Informationen schließlich in Form von Aktionspotenzialen an das Gehirn.

Bisher existiert keine Therapie für Achromatopsie beim Menschen. In den letzten Jahren wurden auf Grundlage von Adeno-assoziierten Viren (rAAV) sichere rekombinante virale Vektoren entwickelt, die für den Gentransfer in die Netzhaut verwendet werden können [3]. Die *Cnga3*-Knock-out-Maus [4], bei der mittels klassischer Gen-Knock-out-Technik eines der bekannten Achromatopsie-Gene (*Cnga3*) inaktiviert wurde, stand uns als Tiermodell für Achromatopsie zur Verfügung, um eine Gensatztherapie mithilfe von rAAV zu etablieren. In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass die *Cnga3*-Knock-out-Maus ein valides Modell für Achroma-



◀ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Gensatztherapie. Therapeutische Viren (rAAV) werden unter die Netzhaut der Achromatopsie-Mäuse injiziert. Nach einer Inkubationszeit von ca. zehn Wochen kann die Virus-vermittelte Expression des CNGA3-Proteins beobachtet werden. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt eine konfokalmikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnitts von der Netzhaut einer therapierten *Cnga3*-Knock-out-Maus. Das exogene CNGA3-Protein (grünes Signal) wurde mit einem Anti-CNGA3-Antikörper visualisiert. INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; OS: Außensegmente.



◀ **Abb. 2:** Erfolgreiche Verlangsamung der Zapfen-Photorezeptordegeneration durch Gensatztherapie. Vergrößerte Ausschnitte der Netzhaut therapiert und untherapierter Achromatopsie-Mäuse. Die Zapfen wurden mit dem spezifischen Zapfen-Marker Erdnusslektin (rotes Signal) visualisiert; die Zellkerne wurden mit dem DNA-Marker Hoechst 33342 gefärbt (blaues Signal). Oben: Die Zapfen einer untherapierten, drei Monate alten Achromatopsie-Maus degenerieren mit der Zeit (es sind fast keine Zapfen mehr vorhanden). Unten: Durch die Therapie wird die Zapfendegeneration signifikant verlangsamt, sodass zum gleichen Zeitpunkt deutlich mehr lebende Zapfen zu finden sind (rotes Signal). Maßstabsbalken: 50 µm. ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; OS: Außensegmente.

topsie darstellt [5]. In Analogie zu den Patienten zeigen die *Cnga3*-Knock-out-Mäuse einen zapfenspezifischen Funktionsverlust, der mit molekularen, strukturellen und morphologischen Veränderungen einhergeht, die letztlich zur Degeneration und zum Zelltod der betroffenen Zapfen führen.

Zu Beginn des Projekts war unter anderem unklar, ob es (1) möglich ist, einen großen Membran-Protein-Komplex (hier den CNG-Kanal) in den Zapfen der Netzhaut zu exprimieren, und ob (2) bei erfolgreicher Expression von *Cnga3* die Zapfen die fehlende Funktion erlangen würden.

Wir konnten nun im Mausmodell zeigen, dass das Gen erfolgreich in die funktionslosen Zapfen eingebracht werden kann. Dazu stellten wir rAAV-Vektoren her, die eine Expression von *Cnga3* unter Kontrolle eines zapfenspezifischen Promotors (S-Opsin-Promotor) ermöglichten [6]. Derartige therapeutische Viren wurden in zwei Wochen alte *Cnga3*-Knock-out-Mäuse subretinal injiziert (**Abb. 1**). Nach acht Wochen konnten wir eine rAAV-vermittelte Expression von *Cnga3* erkennen [6]. Das exogene CNGA3-Protein war in der Lage, mit endogenen CNGB3-Untereinheiten Heteromere zu bilden, welche erfolgreich in das Außensegment transportiert wurden. Diese neu generierten Kanal-komplexe konnten die bis zu diesem Zeitpunkt inaktive Phototransduktionskaskade in den Knock-out-Zapfen aktivieren, um erstmals die Generierung Zapfen-vermittelter Lichtantworten zu ermöglichen. Mittels Elektroretinografie (ERG) und Ableitung von Aktionspotenzialen konnten wir außerdem zeigen, dass diese neuen Zapfen-vermittelten Lichtinformationen an nachgeschaltete Bipolar- und Ganglienzellen übermittelt werden [6]. Die Ganglienzellen waren nun in der Lage, zapfenspezifische, lichtabhängige Aktionspotenziale zu erzeugen und an das Gehirn weiterzuleiten [6].

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Netzhaut nach erfolgreicher Gensatztherapie Zapfen-vermittelte, lichtabhängige Signale an das Gehirn sendet. Ist das Gehirn aber auch in der Lage, diese „neuen“ Signale zu verarbeiten? Um diese Frage zu beantworten, testeten wir die therapierten Mäuse auf ihre Fähigkeit, zwischen zwei Objekten mit unterschiedlicher spektraler Information zu unterscheiden. Dazu benutzen wir einen Test, der auf der Abneigung von Mäusen gegen Wasser beruht. Wir trainierten die Mäuse in einem Wasserbecken mit einer rot markierten Fluchtplattform. Im Anschluss testeten wir, ob die Mäuse in der Lage waren, diese stabile („richtige“) Plattform von einer zweiten, gleichartigen Plattform zu unterscheiden, die jedoch mit einer anderen Farbe (grün) markiert war und sank, sobald eine Maus auf diese kletterte. Die therapierten Mäuse konnten, ähnlich wie die Kontrollmäuse, die beiden Farben unterscheiden und steuerten bevorzugt die „richtige“ Plattform an [6]. Hingegen zeigten nicht-therapierte *Cnga3*-Knock-out-Mäuse keine Präferenz für die richtige Plattform.

Zusammenfassend können wir sagen, dass es uns mittels rAAV-vermittelter Gensatztherapie gelungen ist, im Mausmodell Photorezeptoren, die von Geburt an funktionslos waren, zu therapieren. Dadurch konnten die davor Zapfen-blinden Mäuse zum ersten Mal Farben diskriminieren. Die Behandlung zeigte einen weiteren positiven Effekt: Die Degeneration der Zapfen und der Netzhaut wurde deutlich verlangsamt (**Abb. 2**). Im Moment ist es noch zu früh, um zu beurteilen, wie wirksam solche Behandlungsansätze beim Menschen sein können. Unsere Ergebnisse

lassen aber auf neue Optionen zur Vorbeugung und Behandlung genetisch bedingter Blindheit hoffen.

## Danksagung

Dieses Projekt ist als Kooperation zwischen der Pharmakologie für Naturwissenschaften der LMU München, dem Bereich Neurodegeneration des Auges am Forschungsinstitut für Augenheilkunde der Universität Tübingen sowie der Max-Planck-Forschungsgruppe Visuelle Kodierung, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried entstanden und wird durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen der klinischen Forschergruppe KFO134, der Heisenberg-Proffessur Se837/6-1 und durch die Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. ■

## Literatur

- [1] Wissinger B, Kohl S (2005) Genetische Ursachen der Farbenblindheit. *BIOSpektrum* 1:29–33
- [2] Poloschek CM, Kohl S (2010) Achromatopsia. *Ophthalmologe* 107:571–580, Quiz 581–582
- [3] Surace EM, Auricchio A (2008) Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. *Vision Res* 48:353–359
- [4] Biel M, Seeliger M, Pfeifer A et al. (1999) Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7553–7557
- [5] Michalakis S, Geiger H, Haverkamp S et al. (2005) Impaired opsin targeting and cone photoreceptor migration in the retina of mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNGA3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1516–1524
- [6] Michalakis S, Mühlfriedel R, Tanimoto N et al. (2010) Restoration of Cone Vision in the CNGA3(–/–) Mouse Model of Congenital Complete Lack of Cone Photoreceptor Function. *Mol Ther* Jul 13 (im Druck)

## Korrespondenzadresse:

Dr. Stylianos Michalakis  
Department Pharmazie – Zentrum für  
Pharmaforschung  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Butenandtstraße 5–13  
D-81377 München  
Tel.: 089-2180-77325  
Fax: 089-2180-77326  
michalakis@lmu.de

## AUTOR



### Stylianos Michalakis

1995–1999 Staatsexamen Pharmazie, LMU München.  
2000 Approbation zum Apotheker.  
2003 Promotion in Pharmakologie, LMU München.  
Seit 2003 Wissenschaftlicher Assistent, ab 2006 Akademischer Rat, ab 2007 Habilitand am Department Pharmazie, LMU München.