



Stand der Wissenschaft Mukoviszidose

Gentherapie auf dem Vormarsch?

von
Dr. Eva A. Schulte

Sebastian, Jahrgang 1989 und Mukoviszidose-Patient, ist im selben Jahr geboren, in dem auch das für seine Krankheit verantwortliche Gen entschlüsselt wurde [1]. Doch die Hoffnung auf Gentherapie, die Wissenschaftler und Betroffene seitdem hegen, hat sich trotz intensivster Forschung in den letzten 15 Jahren nicht im erwarteten Umfang erfüllt. Allerdings wurden parallel zu den Bemühungen um eine genetische Korrektur der Defekte einige interessante pharmakologische Strategien entwickelt, die teilweise bereits die klinische Phase II erreicht haben. Und trotz einiger Rückschläge in der Gentherapie wurden gerade in den letzten Jahren in der Verwendung viraler wie nicht-viraler Vektoren vielversprechende Fortschritte hinsichtlich Sicherheit und Effizienz erzielt.

Pathophysiologie

Bei der Mukoviszidose liegt eine generalisierte Dysfunktion exokriner Drüsen vor. Die klinischen Symptome sind vor allem geprägt durch die beiden Manifestationsorte Lunge und Pankreas – die Patienten leiden hauptsächlich an den Folgen einer chronisch progressiven, obstruktiven Lungenerkrankung,

häufigen bronchopulmonalen Infektionen und einer exokrinen Pankreasinsuffizienz. Die pulmonalen Erkrankungen sind primär für die Mukoviszidose-Morbidität und -Mortalität verantwortlich. Der extrem zähe Bronchialschleim bietet idealen Nährboden für eine Vielzahl bakterieller Infektionen. In den frühen Stadien der Erkrankung findet man vor allem *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*, die in der Regel zu einer chronischen Kolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa* führen. Durch die chronischen Entzündungen wird die Lunge der betroffenen Patienten allmählich fibrotisch und die Lungenfunktion nimmt beständig ab. Derzeit umfasst die symptomatische Behandlung vor allem Inhalation und Krankengymnastik, um den Abtransport des zähflüssigen Mucus zu unterstützen, sowie aggressive antibakterielle Therapie (vgl. Abb. 1). Hier scheint sich für die chronische *Pseudomonas aeruginosa*-Besiedlung nach neuesten Studienergebnissen eine Behandlung mit dem Makrolid-Antibiotikum Azithromycin anzubieten. Klinische Studien haben zu der Empfehlung geführt, Azithromycin bei Kindern über sechs Jahren einzusetzen, die an einer chronischen *Pseudomonas*-Infektion leiden [2].

Schauplatz Membran

Mukoviszidose-Patienten müssen unter ihrer Erkrankung leiden, weil bei ihnen ein einziger Chlorid-Kanal namens CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulators) nicht so funktioniert wie bei anderen Menschen. Fehlfunktionen im CFTR, der vor allem in der apikalen Membran von Epithelzellen zu finden ist, resultieren in einem gestörten Chlorid-, Natrium- und Wasserhaushalt, was zu erhöhter Viskosität des Bronchialschleims führt. Die Mukoviszidose-Inzidenz liegt in der kaukasischen Bevölkerung bei bis zu vier Prozent, was die heterozygote Form betrifft; homozygot tritt Mukoviszidose mit einer Häufigkeit von 1 zu 2200 bis 7700 Geburten auf [3]. Mukoviszidose ist keine genetisch homogene Krankheit. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind mehr als tausend unterschiedliche Mutationen für das CFTR-Gen beschrieben worden. Die unterschiedlichen Mutationen werden je nach ihren Auswirkungen auf CFTR in fünf Gruppen eingeteilt:

Klasse I: es wird kein CFTR-Protein produziert;

Klasse II: CFTR erreicht die Zellmembran nicht oder nur in geringem Maße, weil es vorzeitig von den Proteasomen abgebaut wird;

Klasse III & IV: CFTR erreicht die Apikalmembran, reagiert dort aber entweder gar nicht oder nur vermindert auf Aktivatoren;

Klasse V: es werden deutlich geringere Mengen an CFTR produziert.

Der bei weitem häufigste Gendefekt im CFTR ist die Klasse-II-Mutation $\Delta F508$, bei der das Codon für Phenylalanin in Position 508 fehlt, so dass die Aminosäure nicht synthetisiert und eingebaut wird. 75 bis 90 Prozent aller

Mukoviszidose-Patienten tragen zumindest ein Allel mit der $\Delta F508$ -Mutation.

Funktionell ist CFTR zusammen mit einer Anzahl von anderen Chloridkanälen, beispielsweise dem volumenabhängigen oder kalziumregulierten Chloridkanal, für den Chloridtransport über die apikale Membran verantwortlich. Ebenfalls in der apikalen Membran sitzt der amiloridsensitive epitheliale Na-Kanal (ENaC), der mit CFTR in engem funktionellen Kontakt steht. Da eine normale Viskosität des Bronchialschleims sowohl von funktionstüchtigen Cl⁻ als auch Na-Kanälen abhängig ist, haben Wissenschaftler unterschiedliche, zum Teil von CFTR unabhängige Therapieansätze entwickelt, mit denen sie einen normalen Ionen- und Wassertransport im Bronchialepithelium herstellen wollen (vgl. Abb. 2). So wird unter anderem versucht, die übrigen Chloridkanäle der Apikalmembran gezielt zu aktivieren, um den fehlerhaften CFTR zu kompensieren. In einem anderen Ansatz bemühen sich Forscher, die Reabsorption von Na-Ionen über ENaC zu inhibieren, um die Viskosität des Bronchialschleims zu reduzieren [4]. Weitere Strategien konzentrieren sich auf die mutierten CFTRs. Durch die Gabe spezifischer CFTR-Aktivatoren soll zum Beispiel die reduzierte Leistungsfähigkeit der Klasse-IV- und -V-Mutationen ausgeglichen werden. Zum anderen wird mit sogenannten chemischen Chaperonen versucht, CFTR-Proteine der Mutationsklasse II, zu der auch $\Delta F508$ gehört, gegen den Abbau im Proteasomen-Komplex zu schützen. Die Forscher hoffen, dass $\Delta F508$ -CFTR nach Erreichen der Apikalmembran funktionell voll aktiv werden kann.

Abb. 1: Entwicklung und Behandlung der respiratorischen Probleme bei Mukoviszidose

CFTR Gen-Mutation	Behandlung
Störung der CFTR-Funktion und dadurch verschlechterter epithellaler Ionentransport	
Zunahme der Mukoviskosität	Inhalation und Physiotherapie
Chronische Infektionen und Entzündungen	Antibiotika und Steroide
Abnahme Lungenfunktion bis zum progressiven Lungenversagen	Bronchodilatoren

Chaperone helfen bei der Synthese des CFTR.

Genistein ist ein Phytoöstrogen und kommt u.a. in Sojabohnen vor.

Therapieansätze im Einzelnen

Kindermädchen für CFTR

Damit frisch synthetisierte Proteine korrekt gefaltet am richtigen Bestimmungsort landen, stehen ihnen endogene Hilfsmoleküle, die Chaperone (engl. Kindermädchen), zur Seite. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass der Natur mit sogenannten chemischen Chaperonen auf die Sprünge geholfen werden kann. Im Fall von CFTR haben sich **Natriumphenylbutyrat (NPB)**, das zur Behandlung von Stoffwechselstörungen des Harnstoffzyklus zugelassen ist, und **S-Nitroglutathion (GSNO)** als Kandidaten angeboten. Versuche an bronchialen Zelllinien haben gezeigt, dass die Prävalenz von $\Delta F508$ -CFTR in der Zellmembran nach Inkubation mit SPB deutlich erhöht werden kann [5]. In zwei klinischen Studien konnten diese Effekte zwar auch am Patienten beobachtet werden, allerdings schien die Zunahme von $\Delta F508$ -CFTR in der Zellmembran an sich keine signifikanten Effekte auf Elektrolytspiegel oder Lungenfunktion zu haben [6, 7]. Dennoch glauben Wissenschaftler, dass NPB im Zusammenspiel mit CFTR-Aktivatoren einen vielversprechenden Behandlungsansatz bietet (s.a. unter „Schleusenöffner für Chlorid“). Deutlich erfolgreicher waren die klinischen Studien mit S-Nitroglutathion (GSNO) [8]. Sauerstoffsättigung und ausgeatmete Nitritoxid-(NO)-Werte verbesserten sich in dieser Untersuchung bei Probanden unter GSNO-Behandlung deutlich gegenüber der Kontrollgruppe. Zusätzlich weist GSNO noch zahlreiche weitere heilsame Effekte auf. So ist GSNO ein potenter Bronchodilatator, erhöht den ziliären Mucustransport und verfügt über antibakterielle und antiinflammatorische Eigenschaften.

Schleusenöffner für Chlorid

Auch auf diesem Gebiet ist eine Substanz, die bereits in einem anderen Bereich der Medizin eingesetzt wird, in das Interesse der Forschung gerückt. Das Isoflavon **Genistein** kommt u.a. in Sojabohnen vor und wird auf Grund seiner inhibitorischen Eigenschaften auf diverse Signaltransduktionswege in der Leukämiebehandlung verwendet [9].

Möglicherweise haben Phytoöstrogene wie das Genistein auch einen vorbeugenden Effekt auf die Entstehung hormonabhängiger Tumore

wie z.B. Brust- oder Prostatakrebs. Für die Therapie der Mukoviszidose ist interessant, dass Genistein direkt mit einer Untereinheit des CFTR-Moleküls interagieren und somit den Kanal und den Chloridfluss direkt über die Apikalmembran aktivieren kann. Dies ist bereits bei einer Genistein-Plasmakonzentration von $2,5 \mu\text{mol/l}$ der Fall [10]. Plasmakonzentrationen dieser Größenordnung könnten relativ einfach durch eine sojareiche Ernährung erreicht werden. Mediziner versprechen sich besonders von einer Kombination aus NSPB und Genistein eine effektive Strategie gegen Mukoviszidose. Eine multizentrische Phase-I-Studie zur Dualtherapie mit diesen beiden Substanzen wird derzeit in den USA durchgeführt. Ein weiterer Therapieansatz ist die Stimulation Ca-abhängiger Chloridkanäle mit Adenosin- und Uridintriphosphat- (ATP- und UTP-)Analoga. Zwei **UTP-Analoga** wurden bereits in Phase-I-Studien auf ihre Sicherheit untersucht [11, 12] und werden demnächst in Phase-II-Studien geprüft.

Natrium muss draußen bleiben

Bereits seit Anfang der 90er Jahre wird versucht, den Ionenfluss in den epithelialen Zellen nicht ausschließlich über den CFTR zu korrigieren, sondern auch über den amilorid-sensitiven Na-Kanal (ENaC). CFTR und ENaC sind funktionell eng verbunden: Defekte im Chloridtransport führen zu übermäßiger Absorption von Na-Ionen und damit zu noch größerem Wasserverlust im Mucus. Aus diesem Grund hat sich die Forschung bemüht, ENaC mit seinem spezifischen Inhibitor **Amilorid** zu hemmen und einer Dehydratisierung des Mucus entgegenzuwirken. Allerdings waren die Ergebnisse bei der Anwendung von inhalativem Amilorid am Menschen teilweise sehr widersprüchlich. In einigen Studien wurden signifikante Verbesserungen in der forcierten expiratorischen Vitalkapazität gegenüber Placebo festgestellt [13, 14], während eine der größten bis jetzt durchgeführten Studien mit über 130 Teilnehmern diese Ergebnisse nicht bestätigte [15]. Derzeit werden die Resultate aus den verschiedenen Studien allerdings einer gründlichen Re-Evaluierung unterzogen, da ein Teil der Negativergebnisse eventuell auf die relativ geringe Halbwertszeit und Stabilität des Amilorids zurückzuführen ist.

Hinein in den Kern

Mukoviszidose als monogenetische Erkrankung ist ein idealer Kandidat für die **Gentherapie**. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass bereits fünf bis sechs Prozent gesundes respiratorisches Epithelium ausreichen, um einen normalen Ionentransport zu gewährleisten [16]. Größte Herausforderung für die Gentherapeuten ist die Wahl eines sicheren und spezifischen Vektors *, da die Turnover-Rate des Atemwegsepithels von einigen Wochen eine regelmäßige Wiederholung der Gentherapie bedeuten würde. Damit stiege allerdings auch das Risiko der Integration und Expression viraler Vektoren, also der Übertragung viraler DNA, und die Gefahr von Immunreaktionen gegen den Vektor. Virale Vektoren der Adenovirus-Familie sind zur Zeit das Transportvehikel der Wahl. Alternative, nicht-virale Vektoren wie Liposomen oder kationische Phospholipide haben bis jetzt nicht die gleiche Effektivität wie ihre viralen Kollegen bewiesen. Allerdings beschreibt eine aktuelle Veröffentlichung deutliche Verbesserungen in Effizienz und Sicherheit bei der Expression von CFTR in einer humanen

Nasenschleimhautzelllinie mit kationischen Phospholipiden [17]. Doch diese neueren Resultate sind noch weit von der Anwendung beim Menschen entfernt.

Dagegen befinden sich die viralen Vektoren bereits in Phase-II-Studien. In einer doppelblinden multizentrischen plazebokontrollierten Studie aus den USA wurde ein aerolisierter Adeno-assoziiierter Vektor (AAV2) mit CFTR-DNA an 20 Probanden im Alter ab 12 Jahren verabreicht, und zwar im monatlichen Intervall über drei Monate hinweg [18]. Es traten keine bedeutenden unerwünschten Ereignisse auf, und bei allen Teilnehmern wurde eine deutliche Verbesserung in der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV1) gegenüber Plazebo beobachtet.

Trotz dieser Erfolgsmeldungen aus den USA wird es nach Meinung von Experten noch einige Jahre dauern, bis eine der beschriebenen Behandlungsstrategien in die breite Anwendung gehen wird – und Sebastian und die etwa achtausend weiteren Mukoviszidose-Kranken in Deutschland davon profitieren können.

Hinweis: Literatur kann in der Redaktion erfragt werden

* Vektor: Hilfsmittel der Gentechnik, um fremdes Erbgut in Zellen einzuschleusen. Meist werden Plasmide in Bakterien oder Viren als Vektoren eingesetzt.

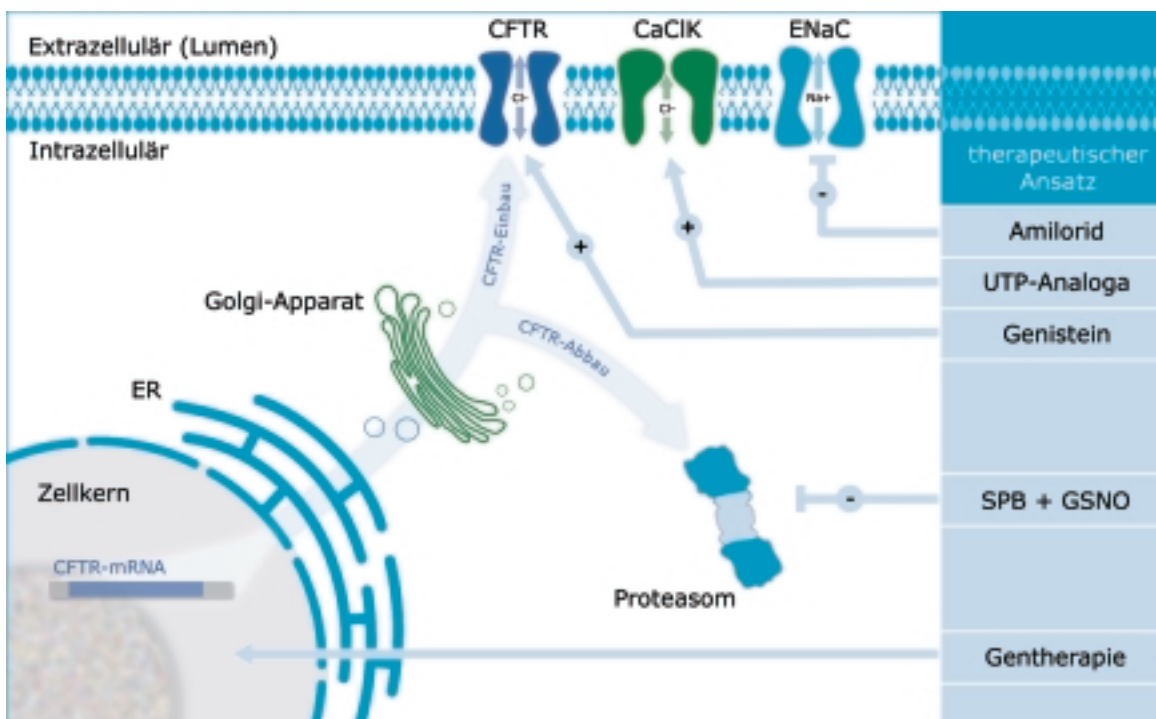


Abb. 2: Schematische Übersicht der intrazellulären Transportwege des CFTR-Proteins vom Zellkern zur Zellmembran und Ansatzpunkte für Mukoviszidose-Therapie

Quelle: modifiziert nach Rubenstein, RC et al: A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 157(2): 484-90.