

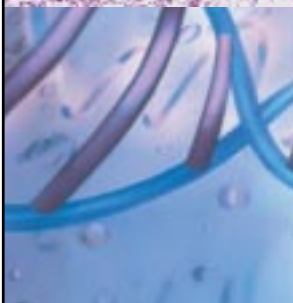
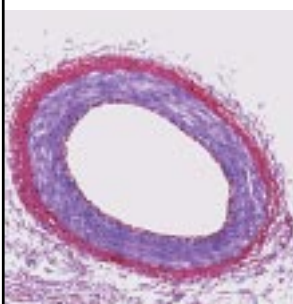


Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

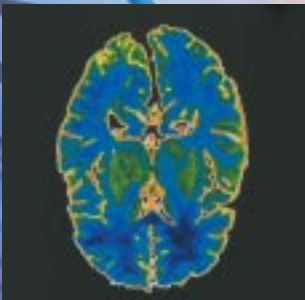
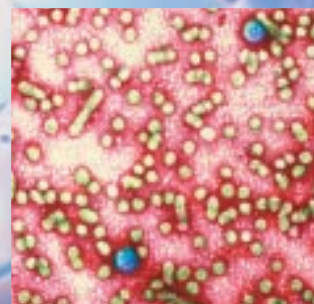
**bmb+f**

# Workshop Gentherapie 15./16. Mai 2001

Gesundheitsforschung: Forschung für den Menschen



**BMBF PUBLIK**



# Workshop Gentherapie

**Einleitung**

**Grundlagen der Genforschung**

**Historische Aspekte und  
Möglichkeiten der Gentherapie**  
(Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher)

**Gentherapie der Familiären  
Hypercholesterinämie**  
(Dr. med. Günter Cichon)

**Gentherapie bei  
Infektionserkrankungen**  
(PD Dr. med. Ulrike Protzer)

**Gentherapie bei Tumoren  
des Nervensystems**  
(Dr. Regina Reszka)

**Biomedizin –  
Die öffentliche Debatte**

**Genforschung zum Anfassen –  
Versuche im Gläsernen Labor**

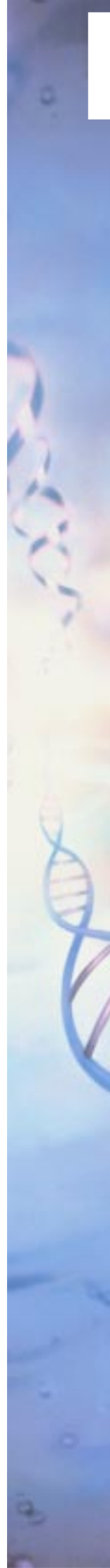
**Chronologie der Genforschung**

**Glossar**

**Die Förderung der Gentherapie  
durch das BMBF**

**Embryonenschutzgesetz**

# Workshop Gentherapie



## Einleitung

Die Gentechnik zählt zu den Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Sie wird nahezu alle Bereiche unseres Lebens beeinflussen. Die Grundlagenforschung in der Biomedizin hat sie bereits revolutioniert, und auch in der Medizin findet die Gentechnik eine Vielzahl erfolgreicher Anwendungen. Insbesondere das Potenzial der Gentherapie wird als hoch eingeschätzt, weil sie für zahlreiche bisher nicht heilbare Krankheitsformen völlig neue Anwendungs- und Behandlungschancen eröffnet. Für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Infektionen und Erkrankungen des Nervensystems werden in absehbarer Zeit erfolgreiche Gentherapien für möglich gehalten. Ärzte wie betroffene Patienten knüpfen deshalb große Hoffnungen an die Fortschritte dieser wissenschaftlichen Fachrichtung.

Aber auch keine andere wissenschaftliche Disziplin hat in den letzten Jahrzehnten die Gemüter und die Phantasie der Menschen so bewegt und angeregt wie die Gentechnik. Der Begeisterung für die enormen Möglichkeiten des neuen Wissens standen und stehen immer auch Zweifel und Sorgen der Menschen gegenüber. Die Forscherinnen und Forscher werden daher zukünftig stärker als bisher gefordert sein, ihre Ziele und Methoden transparent zu machen und zu begründen.

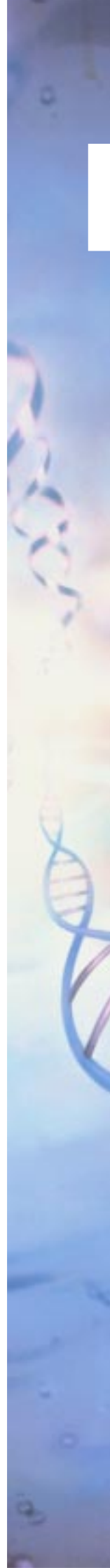
Eine Debatte über Hoffnungen und Ängste, über Anwendungsmöglichkeiten, ethische Grenzen und wirtschaftliche Erwartungen darf sich deshalb nicht auf die Scientific Community beschränken. Den Medien kommt als Vermittler dieses komplexen neuen Wissens eine besondere Rolle zu.

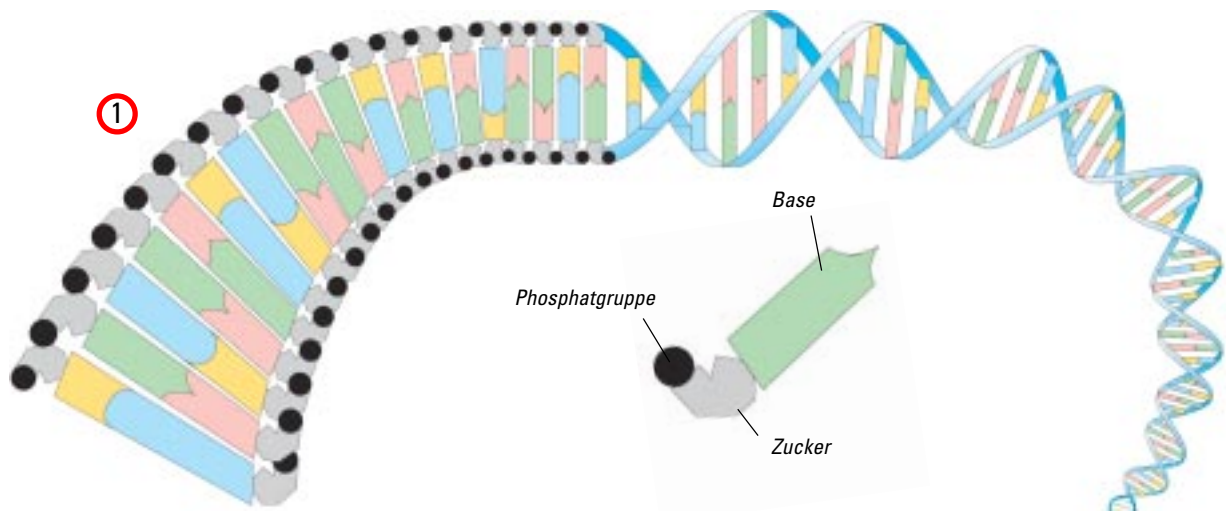
Der Workshop Gentherapie will auf der Basis des aktuellen Kenntnisstandes und neuer Tendenzen in der Gentherapie informieren und dazu beitragen, ein Diskussionsklima zwischen den Forscher/innen und Medienvertreter/innen wachsen zu lassen, welches dazu beitragen kann, die wissenschaftlichen Zusammenhänge umfassend und verständlich aufzubereiten. Die Möglichkeit, sich vor Ort mit den Forschern auszutauschen, soll den offenen Dialog über die Chancen und Risiken der Gentherapie fördern.



**Grundlagen der Genforschung**

# **Workshop Gentherapie**





## DNA – der Stoff, aus dem die Gene sind

Bereits 1869 wurde die DNA als Zellbestandteil entdeckt. Um die Jahrhundertwende erfolgte die chemische Analyse ihrer Einzelbausteine. Dabei fand man gleiche Mengen von

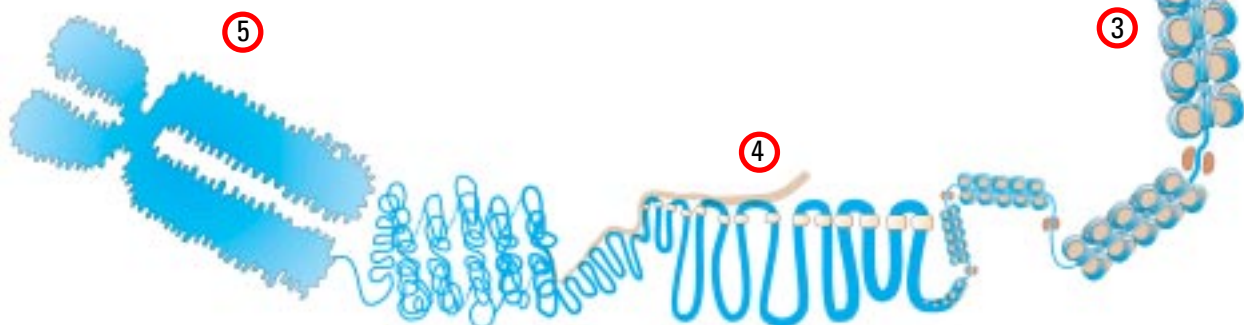
- Desoxyribose (ein Zucker),
- Phosphorsäure und
- vier verschiedenen Basen: Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C).

Grundbausteine der DNA sind die so genannten Nukleotide (= Desoxyribose + Phosphatgruppe + Base). Die gleichen Mengen ließen auf einen regelmäßigen Aufbau der DNA schließen. Sie ist aus bis zu einigen Millionen Nukleotiden aufgebaut (Polynukleotid). Die Verbindung zwischen den einzelnen Bauteilen erfolgt immer auf die gleiche Art und Weise. Chargaff fand heraus, dass bei der DNA verschiedener Lebewesen die Anzahl der Adenin- und Thyminmoleküle bzw. der Guanin- und Cytosinmoleküle immer gleich ist.

Watson und Crick konnten auf der Basis der biochemischen Daten mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse die räumliche Struktur der DNA aufklären. 1953 stellten sie das Doppelhelixmodell der DNA vor.

Daraus ergaben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Die DNA besteht aus zwei Einzelsträngen, die umeinander gedreht sind („Strickleiter-Modell“).
- Die Außenseite wird von abwechselnd miteinander verknüpften Zucker- und Phosphatgruppen gebildet.
- Die Basen zeigen ins Innere der Doppelhelix. Dabei liegen immer A und T sowie G und C gegenüber (komplementäre Basenpaarung). Sie sind (über so genannte Wasserstoffbrückenbindungen) relativ fest miteinander verbunden ①.



Die DNA erfüllt alle Anforderungen, die sich einem Träger von Informationen stellen. Sie kann Informationen verschlüsseln. In der Computertechnik wird ein Code aus den Ziffern 0 und 1 verwendet. Das Morsealphabet, die Blindenschrift oder unser Buchstabenalphabet verwenden eine größere Anzahl von Zeichen. In der DNA wird die Erbinformation durch vier verschiedene Zeichen (die Basen A, T, G, C) codiert. Die Basenabfolge innerhalb eines Einzelstranges (= Basen- oder Nukleotidsequenz) verschlüsselt die Erbinformation, so wie aneinandergereihte Buchstaben ein Wort ergeben können. Ihrer Stabilität und der Fähigkeit, selbständig Reparaturvorgänge (bei schadhafter DNA) durchzuführen, ist es zu verdanken, dass die genetische Information über Generationen mit nur geringen Veränderungen weitergegeben wird.

Die genetische Information einer Zelle ist sehr umfangreich. In jeder menschlichen Zelle beträgt die DNA-Länge knapp zwei Meter (mit rund sechs Milliarden Basenpaaren). Die DNA muss bei dieser Länge „verpackt“ werden (= Kondensierung). Dabei wickelt sich die DNA zweimal um so genannte Histonkomplexe, die wie „Lockenwickler“ wirken. Diese Struktur wird als Grundeinheit der Chromosomen Nukleosom genannt ②. Jedes Chromosom enthält durchschnittlich 675.000 solcher Nukleosomen, die im Elektronenmikroskop wie Perlen an einer Schnur erkennbar sind. Die Dicke der DNA beträgt hier etwa elf Nanometer (ca. 1/100.000 mm). Dadurch wird der Strang auf rund ein Sechstel verkürzt. Der Nukleosomenstrang wird nochmals regelmäßig zu einer 30 Nanometer (nm) dicken Faser aufgewunden ③, die durch andere Proteine weiter zu Schleifen geordnet wird ④. Diese werden wiederum bei einer Zellteilung um ein zentrales Proteingerüst zu einer 700 nm dicken so genannten Chromatide kondensiert ⑤.

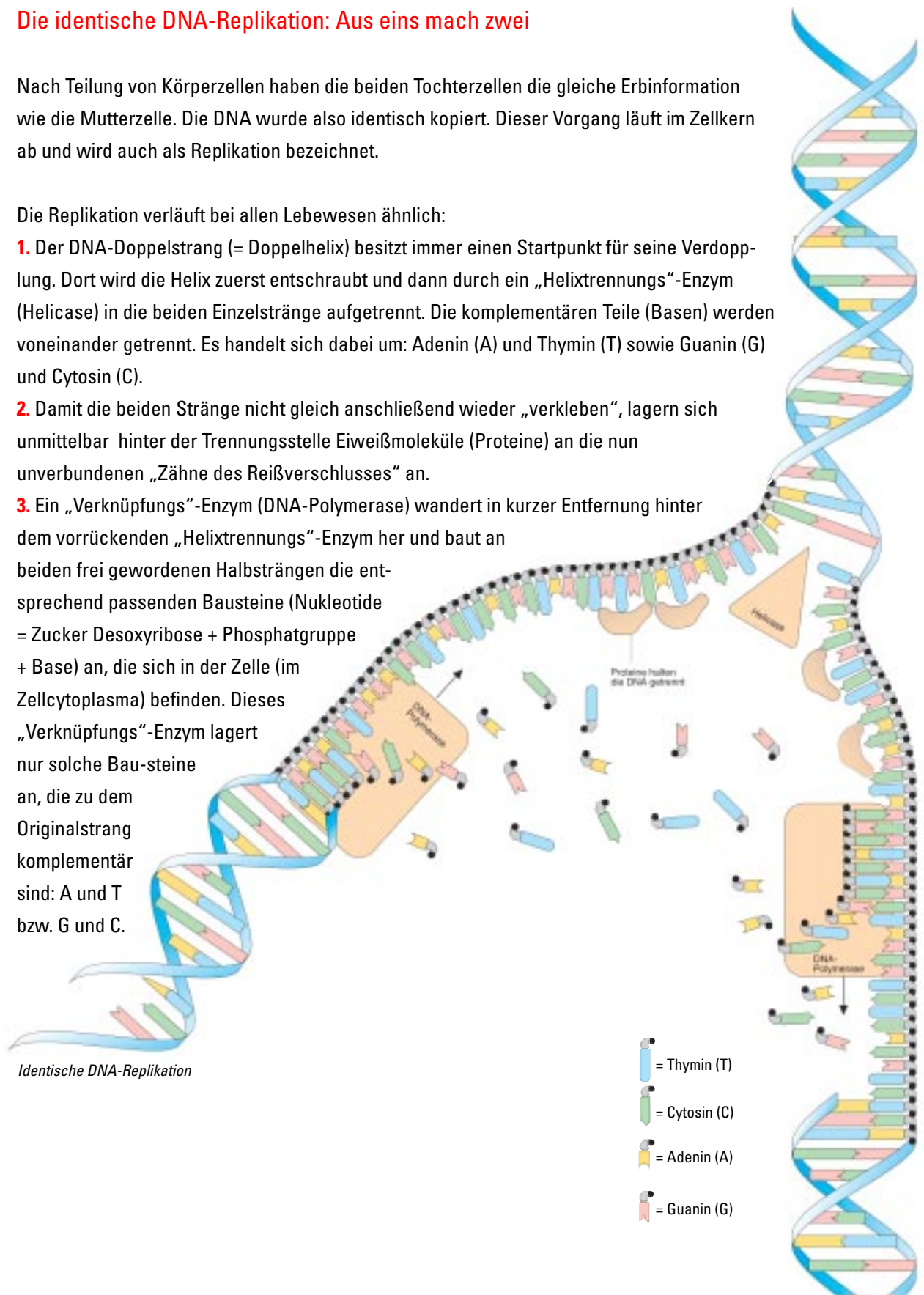


## Die identische DNA-Replikation: Aus eins mach zwei

Nach Teilung von Körperzellen haben die beiden Tochterzellen die gleiche Erbinformation wie die Mutterzelle. Die DNA wurde also identisch kopiert. Dieser Vorgang läuft im Zellkern ab und wird auch als Replikation bezeichnet.

Die Replikation verläuft bei allen Lebewesen ähnlich:

- 1.** Der DNA-Doppelstrang (= Doppelhelix) besitzt immer einen Startpunkt für seine Verdopplung. Dort wird die Helix zuerst entschraubt und dann durch ein „Helixtrennungs“-Enzym (Helicase) in die beiden Einzelstränge aufgetrennt. Die komplementären Teile (Basen) werden voneinander getrennt. Es handelt sich dabei um: Adenin (A) und Thymin (T) sowie Guanin (G) und Cytosin (C).
- 2.** Damit die beiden Stränge nicht gleich anschließend wieder „verkleben“, lagern sich unmittelbar hinter der Trennungsstelle Eiweißmoleküle (Proteine) an die nun unverbundenen „Zähne des Reißverschlusses“ an.
- 3.** Ein „Verknüpfungs“-Enzym (DNA-Polymerase) wandert in kurzer Entfernung hinter dem vorrückenden „Helixtrennungs“-Enzym her und baut an beiden frei gewordenen Halbsträngen die entsprechend passenden Bausteine (Nukleotide = Zucker Desoxyribose + Phosphatgruppe + Base) an, die sich in der Zelle (im Zellcytoplasma) befinden. Dieses „Verknüpfungs“-Enzym lagert nur solche Bausteine an, die zu dem Originalstrang komplementär sind: A und T bzw. G und C.



**4.** Als Ergebnis erhält man im neuen Doppelstrang dieselbe „Bausteinsequenz“ (Basensequenz) wie in der ursprünglichen Doppelhelix. Dadurch wird die Identität der genetischen Information gewahrt.

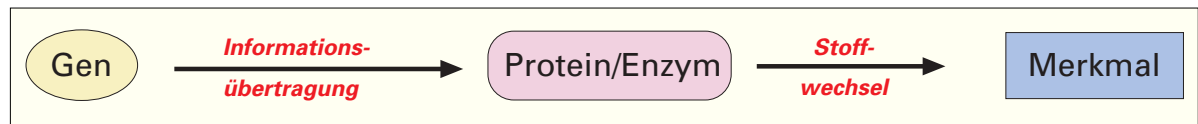
Kopierfehler bei der Replikation können schwere Schäden für die entstehenden Tochterzellen bedeuten. Die Kopiergenauigkeit liegt bei etwa einem Fehler pro eine Milliarde ( $10^9$ ) Bausteinverbindungen. Das entspricht etwa einem Tippfehler auf ca. 500.000 Schreibmaschinenseiten. In der Zelle stehen besondere Enzyme zur Verfügung, die hinter der Replikationsgabel „Korrektur lesen“ und nicht passende Bausteine durch die richtigen ersetzen.

Und schnell geht es darüber hinaus auch noch: Nimmt man z. B. für das Darmbakterium *Escherichia coli* (verfügt über rund 4,2 Millionen Basenpaare) einen Replikationszyklus von rund 20 Minuten an, errechnet sich daraus eine Replikationsgeschwindigkeit von 7.000 Verknüpfungen pro Sekunde.



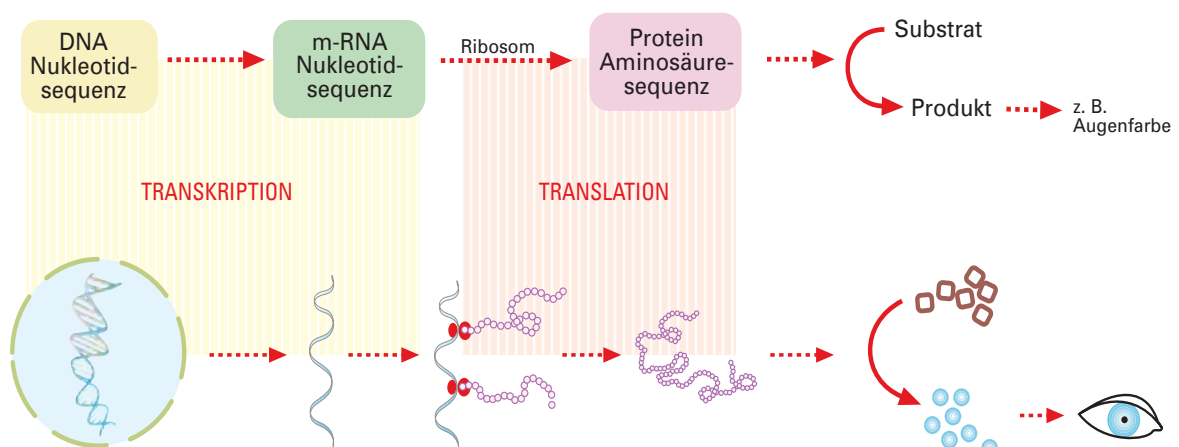
## Vom Gen zum Merkmal

Ein Gen ist eine Funktionseinheit. Es gibt vor, wie ein bestimmtes genetisch bedingtes Merkmal aufgebaut wird. Die Nukleotidsequenz (Basenabfolge) eines Gens ist verantwortlich für die Struktur eines Proteins (= Polypeptids), z. B. beim Aufbau der Proteinketten des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin. Das ist die Aussage der Ein-Gen-ein-Protein-Hypothese. Auf der anderen Seite beruhen viele Merkmale nicht direkt auf der Synthese eines Proteins, sondern anderer Stoffe. Die Augenfarbe (Augenfarbstoff) wird beispielsweise nicht durch ein bestimmtes Protein hervorgerufen. Zum Aufbau dieser Stoffe sind wiederum Proteine, nämlich Enzyme notwendig, die die nötigen biochemischen Reaktionen katalysieren. Ihre Struktur und Funktion beruhen, wie bei allen anderen Proteinen, auf einem bestimmten Gen. Weil die durch bestimmte Gene gebildeten Proteine sehr häufig Enzyme sind, bezeichnet man diesen Zusammenhang oft als Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese. Ein Gen ist also ein DNA-Bereich, in dem die Information für den Aufbau eines bestimmten Polypeptids (die „Bauanleitung“) enthalten ist.



Schema der Informationsübertragung vom Gen zum Merkmal

Seit langem ist bekannt, wie die DNA in einzelne Gene unterteilt ist. Eine bestimmte Basenfolge (der so genannte Promoter) gibt den Anfangspunkt eines Gens an und bestimmt, wie oft es abgelesen wird. Das Ende eines Gens ist ebenfalls durch eine bestimmte Basensequenz bestimmt (die besonders viele Guanin-Cytosin-Paare enthält). Nicht immer liegen Gene unmittelbar hintereinander, oft sind dazwischen DNA-Abschnitte, die anscheinend nicht in Merkmale übersetzt werden. Ihre Bedeutung ist bis heute allerdings noch unklar.

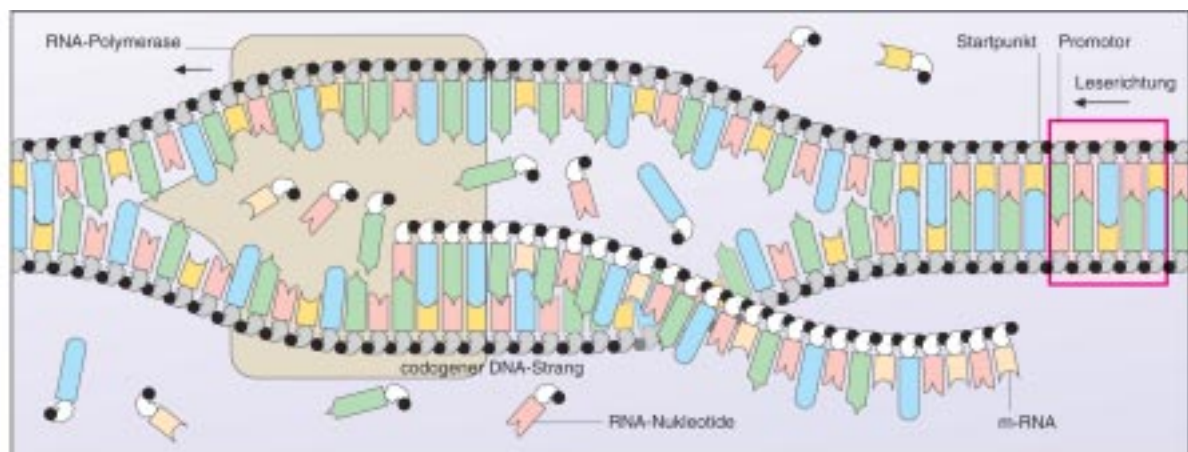


Vom Gen zum Merkmal (Übersicht)



## Transkription – die genetische Information wird beweglich

Das lange, im Zellkern befindliche DNA-Molekül enthält viele Gene, die nicht alle gleichzeitig in Proteine übersetzt werden. Auf dem Weg vom Gen zum Merkmal wird daher in einem ersten Schritt ein Gen auf einen Überträgerstoff umgeschrieben. Diesen Vorgang nennt man Transkription. Von einem DNA-Strang wird im Zellkern eine Kopie erstellt. Die genetische Information wird damit auch beweglich. Das Transportmolekül für die genetische Information ist die sogenannte RNA (= Ribonukleinsäure, engl. Ribonucleinacid). Die RNA, die die genetische Botschaft überträgt, nennt man m-RNA (= messenger-RNA). Bevor die m-RNA den Zellkern verlässt, werden nicht informationstragende Abschnitte (so genannte Introns) herausgeschnitten, so dass nur die Abschnitte, die wichtige Informationen tragen (Exons) den Zellkern durch die Kernporen verlassen und zu im Zellzytoplasma befindlichen Strukturen, den Ribosomen (= „Proteinbildungsfabriken“) gelangen. Die Veränderungen an der m-RNA werden Processing genannt, das „Heraus-schneiden“ der Introns als Splicing bezeichnet. Im Zytoplasma an den Ribosomen erfolgt der Protein-zusammenbau (= Proteinbiosynthese). Die RNA besteht im Vergleich zur DNA aus einem Einzelstrang, ist sehr viel kürzer (sie trägt ja nur die Information eines Gens), verfügt über Ribose als Zuckerbaustein und weist anstelle von Thymin eine andere Base (U= Uracil) auf.



Transkriptionsvorgang (schematisch)

Es existieren zwei weitere Typen von RNA: ribosomale RNA (r-RNA) und transfer-RNA (t-RNA). Die r-RNA dient als Baueinheit der Ribosomen, die t-RNA transportiert die passenden im Zytoplasma befindlichen Aminosäuren (als Grundbausteine für ein Protein) zu den Ribosomen.

Die Transkription verläuft in einigen Punkten ähnlich wie die Replikation der DNA: Die DNA entwindet sich an einer Stelle und trennt sich in zwei Stränge. Die passenden (komplementären) Nukleotide werden nach den Gesetzen der Basenpaarung angelagert und die RNA-Nukleotide zu einem RNA-Einzelstrang (die m-RNA) mit Hilfe eines Enzyms (RNA-Polymerase) verbunden. Dieses Enzym kann anhand eines speziellen DNA-Abschnittes vor dem abzulesenden Gen (dem Promotor) erkennen, welcher der beiden DNA-Stränge abgelesen wird. Dadurch sind der Startpunkt und die Ableserichtung vorgegeben. Der abgelesene Strang wird auch als codogener Strang bezeichnet. Genauso wie eine bestimmte Basenabfolge den Start kennzeichnet, enthält die DNA auch eine Stoppssequenz, die die Transkription beendet.



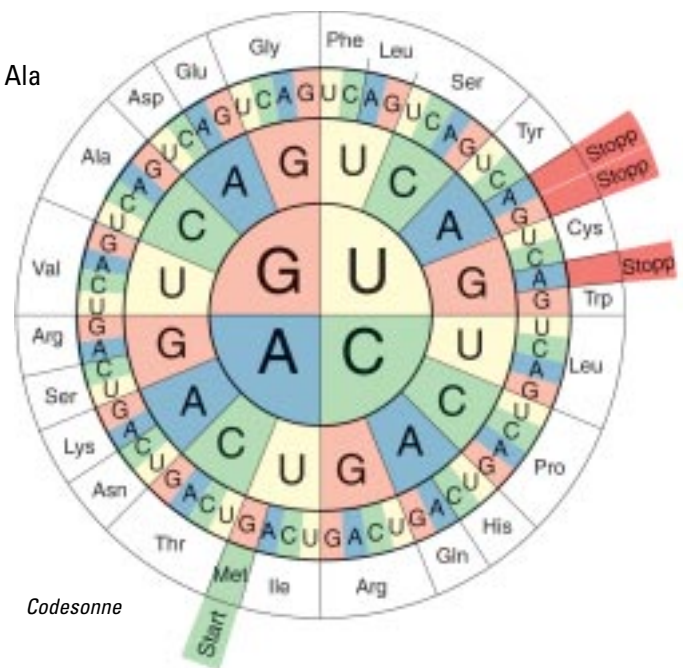
## Der genetische Code – Wörterbuch des Lebens

In der Basenabfolge der m-RNA ist der Bauplan für ein Protein verschlüsselt. Sie legt die Struktur des Proteins durch die Reihenfolge der durch die t-RNA an die Ribosomen herantransportierten Aminosäuren (Aminosäuresequenz) fest.

Wie ein Codebuch die Übersetzung verschiedener Schriften erlaubt, z. B. die des Morsealphabetes in normale Buchstaben, so ist der genetische Code eine direkte Übersetzungsvorschrift für diesen Prozess. Er bestimmt, welche Aminosäure durch eine bestimmte Basenabfolge auf der m-RNA (Codon) codiert wird. Da es nur vier verschiedene Basen gibt, im Körper aber 20 verschiedene lebenswichtige Aminosäuren vorkommen, muss eine Gruppe von mehreren Nukleotiden ein Codon bilden und für eine Aminosäure stehen. Stünde eine Base für eine Aminosäure, könnten nur vier verschiedene Aminosäuren gebildet werden und Zweiergruppen von Nukleotiden ergäben lediglich  $16 (4^2)$  verschiedene Aminosäuren. Erst durch Dreiergruppen (Basentriplett) können die 20 erforderlichen Aminosäuren verschlüsselt werden. Die Codesonne gibt an, welches Codon der m-RNA an den Ribosomen in welche Aminosäure „übersetzt“ wird. Das erste Nukleotid des Codons steht innen; die Codons werden von innen nach außen gelesen.

Die Basenabfolge GCC steht z. B. für die Aminosäure Ala (= Alanin), UCA für die Aminosäure Ser (= Serin). Der Code ist redundant, d. h. es gibt mehr Tripletts als zu codierende Aminosäuren.

Die einzelnen Codons haben bei nahezu allen Lebewesen die gleiche Bedeutung. Eine bestimmte m-RNA wird in fast allen Organismen in das gleiche Protein übersetzt. Der genetische Code ist praktisch universell.



## t-RNA – Vermittler zwischen RNA und Aminosäuren

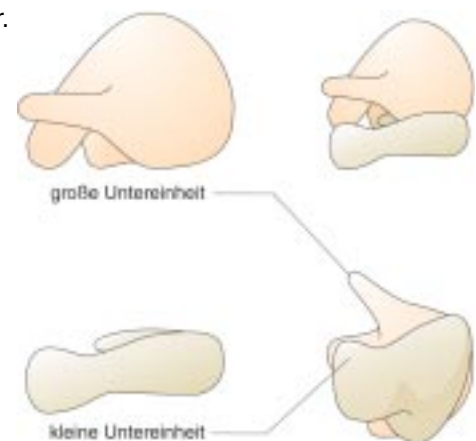
Der genetische Code gibt an, welche Basendreiergruppe (Basentriplett) der m-RNA in welche Aminosäure des Proteins übersetzt wird. Dieser Code ist das Wörterbuch für die Übersetzung. Die verschiedenen t-RNAs agieren dabei als Vermittlermoleküle, die die Basentriplets und die zugehörigen Aminosäuren miteinander in Verbindung bringen (wie ein Dolmetscher, der zwei Sprachen spricht). Der Begriff „Kleeblattstruktur“ deutet auf das Aussehen des t-RNA-Moleküls hin. An einer speziellen Stelle besitzt das t-RNA-Molekül das passende Basentriplett, welches zum m-RNA-Basentriplett (Codon) komplementär ist. Es wird auch Anticodon genannt. An der „gegenüberliegenden“ Stelle des t-RNA-Moleküls liegt die Verbindungsstelle zwischen t-RNA und der zu transportierenden Aminosäure. Mit den herausragenden Schleifen verfügt es über weitere Regionen, die spezifische Funktionen haben (z. B. eine Anlagerungsregion für das Ribosom oder Erkennungsregionen für besondere Enzyme, die die Substanzen miteinander verbinden und die richtigen biochemischen Vorgänge gewährleisten). Rund 50 verschiedene t-RNA-Arten sind bekannt, genug, um jeweils eine der 20 Aminosäuren spezifisch zu binden.

Die Ribosomen stellen die „Montagewerke“ für die Proteine dar. Mit rund 25 nm (= 1/40.000 mm) sind sie so klein, dass sie selbst im Elektronenmikroskop nur schwer darzustellen sind. Sie bestehen immer aus einer kleinen und einer großen Untereinheit.

Die kleine Untereinheit hat primär die Aufgabe, m-RNA und t-RNA zusammenzuführen und so für die richtige Reihenfolge der Aminosäuren im Protein zu sorgen. Die große Untereinheit ist für die chemische Verknüpfung der Aminosäuren zuständig.



t-RNA-Molekül



Ribosom mit seinen beiden Untereinheiten



## Translation – ein Protein wird „montiert“

Durch die Transkription wurde die Information eines Gens von der DNA auf die m-RNA übertragen. Nach dieser Information wird ein Protein mit einer bestimmten Aminosäureabfolge zusammengebaut. Dieser Vorgang wird als Translation zusammengefasst.

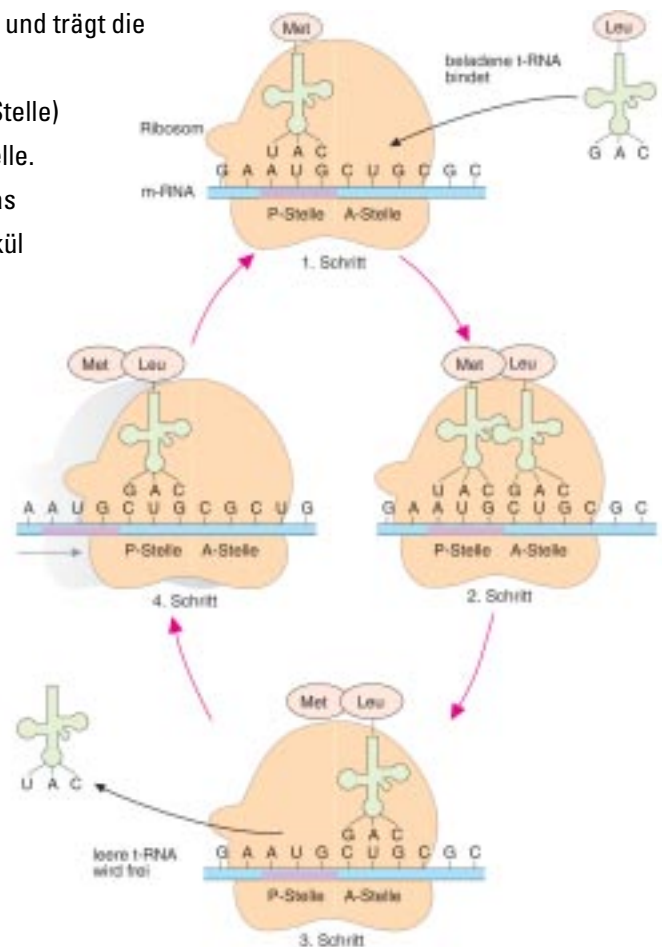
Die Translation erfolgt an den Ribosomen. Diese lagern sich zunächst am Startcodon der m-RNA zum funktionsfähigen Ribosom (aufgebaut aus den beiden Untereinheiten) zusammen. Das Starter-Basentriplett der m-RNA ist immer AUG. Das Anticodon der t-RNA ist entsprechend dem Prinzip der komplementären Basenpaarung UAC und trägt die Aminosäure Methionin (siehe Codesonne).

Neben dieser ersten Bindungsstelle (so genannte P-Stelle) verfügt jedes Ribosom über eine weitere Bindungsstelle. An diese zweite Bindungsstelle (A-Stelle) wird nun das nächste mit einer Aminosäure beladene t-RNA-Molekül angelagert (1. und 2. Schritt).

Ihr Anticodon (in der Abbildung GAC) kommt mit dem zweiten Codon der m-RNA (hier CUG) in Kontakt und wird fest verbunden. Nun werden die beiden Aminosäuren chemisch miteinander verknüpft. Die Aminosäurekette wird nach Vorgabe des nächsten Codons der m-RNA verlängert. Dabei rückt die t-RNA an der P-Stelle aus dem Ribosom heraus. Ihre Aminosäure bleibt aber an das entstehende Protein gebunden (3. Schritt).

Die t-RNA der A-Stelle rückt zur P-Stelle vor, die A-Stelle wird frei und kann eine neue t-RNA mit passendem Anticodon binden (4. Schritt).

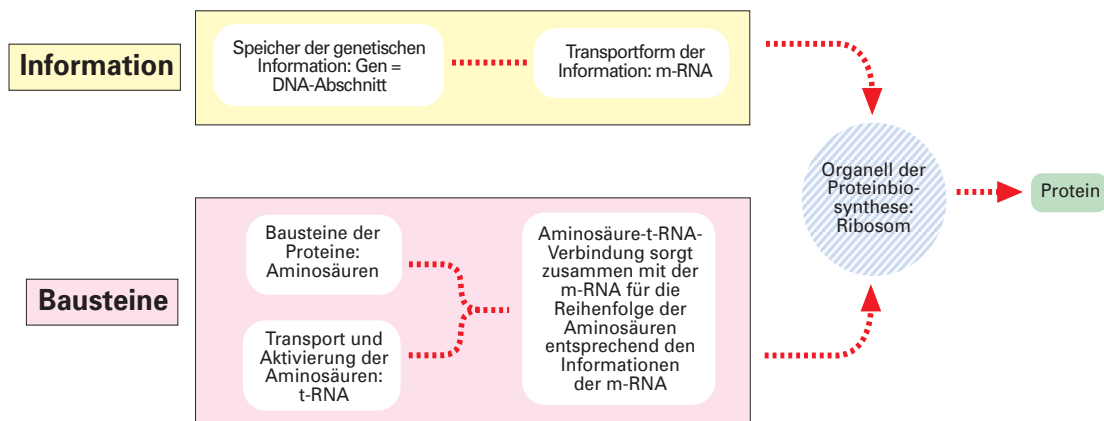
Durch die Wiederholung dieses Vorganges wird das angefangene Protein jeweils um eine Aminosäure verlängert. Und zwar exakt so, wie es die Codons der m-RNA vorschreiben.



Translationsvorgang (schematisch)

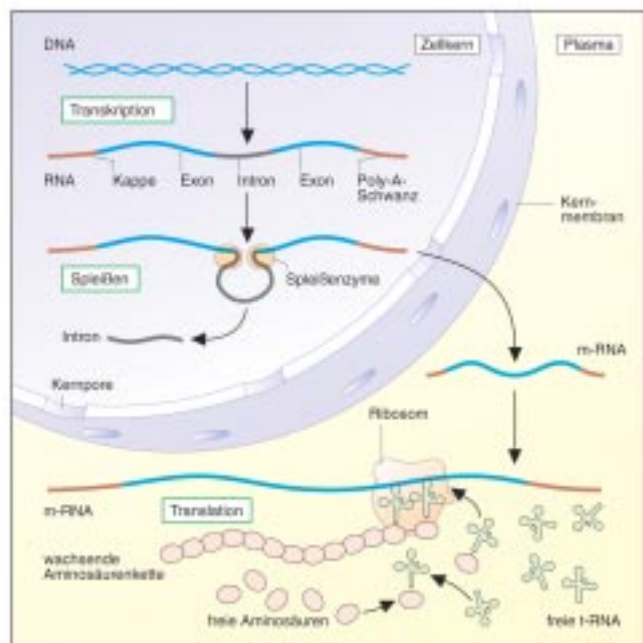


Wenn das Ribosom einige Codons weiter vorgerückt ist, kann sich an das frei gewordene Startcodon derselben m-RNA bereits das nächste Ribosom anlagern. So können zeitgleich mehrere Proteine synthetisiert werden. Die Aminosäureketten „wachsen“, bis das benötigte Protein fertig ist. Kommt das Ribosom an ein Terminator- oder Terminationscodon der m-RNA (UAA, UAG oder UGA), stoppt der Translationsprozess und das Ribosom zerfällt in seine Untereinheiten. Das gebildete Protein wird frei und nimmt seine funktionsfähige Struktur ein.



*Proteinbiosynthese: Beteiligte Stoffe und Aufgaben*

Zusammenfassung: Die Proteinbiosynthese umfasst Transkription und Translation. Nach der Übersetzung der DNA in die RNA wird diese noch an mehreren Stellen verändert: Processing und Splicing. An den m-RNA-Enden schützen „Kappe“ und „Schwanz“ die m-RNA vor einem ungewollten Abbau. Die so veränderte m-RNA verlässt den Zellkern und kann ihre Funktion im Zytoplasma an den Ribosomen aufnehmen. Die entstehenden Proteine können ihre Funktion in der Zelle bzw. im Organismus übernehmen.



*Zusammenfassende Gesamtübersicht zur Proteinbiosynthese*



## Methoden der Gentechnik

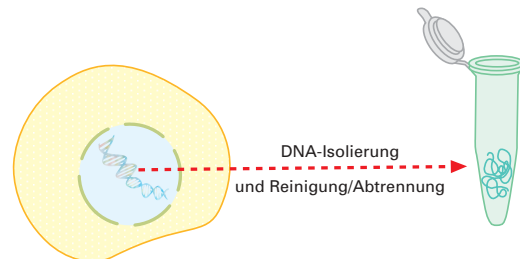
Die Gentechnik umfasst sämtliche Methoden, die sich mit der Isolierung, Charakterisierung, Vervielfältigung und Neukombination von Genen (auch über die Artgrenzen hinweg) befassen.

Die Gentechnikmethoden haben in der modernen Medizin Einzug gehalten. Man spricht hier von der roten Gentechnik, im Unterschied zur grünen und grauen Gentechnik. Die grüne Gentechnik bezeichnet die Anwendung neuer Züchtungsmethoden in der Landwirtschaft. Unter grauer Gentechnik versteht man ihren Einsatz in der Mikrobiologie und in der Umweltschutztechnik. Gentechnische Verfahren werden in der Medizin bei der Entwicklung und Herstellung von Arzneimitteln, in der Gendiagnostik und bei der Gentherapie eingesetzt.

Mit Hilfe gentechnischer Verfahren werden bestimmte Abschnitte aus dem im Zellkern befindlichen Träger der Erbsubstanz (DNA) „herausgeschnitten“ und in das Genom eines anderen Organismus eingesetzt. Folgende Verfahren sind dazu notwendig:

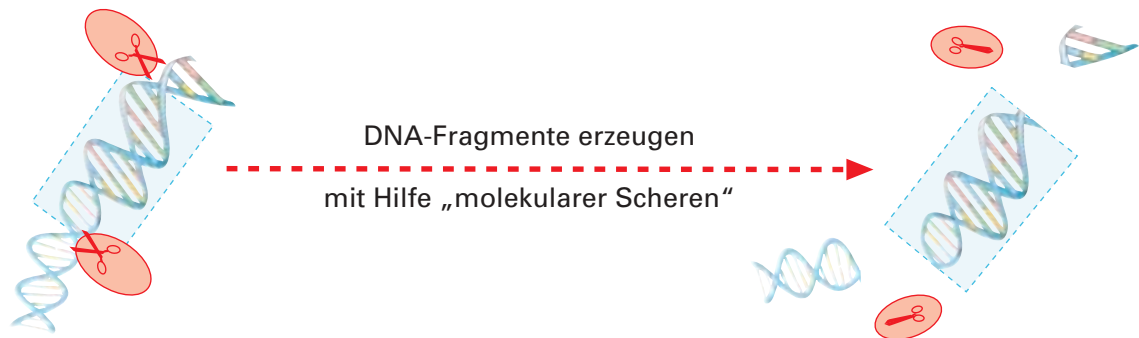
### ■ Erbgut gewinnen

Das genetische Material kann mit relativ einfachen chemischen Verfahren aus Zellen isoliert und von anderen Substanzen abgetrennt werden.



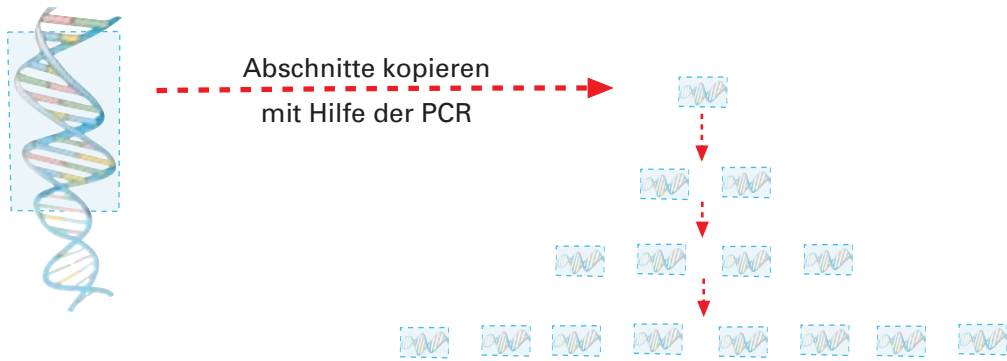
### ■ Fragmente erzeugen oder Abschnitte kopieren

Um einen bestimmten Abschnitt der DNA zu erhalten und untersuchen zu können, bieten sich zwei Wege an:



- Die gewonnene DNA wird mit so genannten Restriktionsenzymen behandelt. Restriktionsenzyme sind aus Bakterien gewonnene Proteine, die als „molekulare Scheren“ DNA in definierte Teilstücke (Fragmente) zerschneiden.





- Mit der PCR (= Polymerase Chain Reaction, dt.: Polymerase-Kettenreaktion) wird eine hohe Kopienzahl erzeugt. Die Vervielfältigung erfolgt durch ein Eiweiß, das (in hitzeliebenden Bakterien) die Funktion der DNA-Verdopplung (identische Replikation) erfüllt.

Die durch die beiden Verfahren erhaltenen Fragmente werden dann mittels der Gel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt: Dabei durchwandern die Fragmente in einem Gel (eine Art „molekulares Sieb“) ein elektrisches Feld. Abschließend werden sie z. B. mit Farbstoffen sichtbar gemacht, wodurch sich Verlauf und Ergebnis des Experiments überprüfen und vergleichen lassen. Die markierten und nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente können nun isoliert und weiterverarbeitet werden.

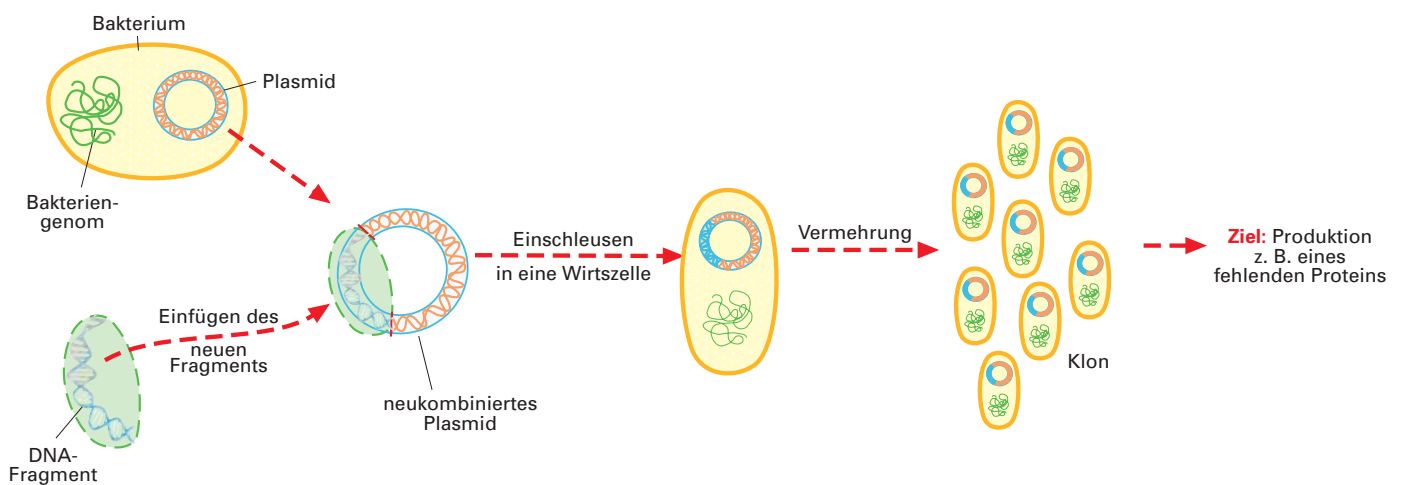
Bereits bekannte Gene und Veränderungen (Mutationen) lassen sich mittels „DNA-Sonden“ nachweisen. Eine endgültige Analyse der gesuchten Gene oder ihrer Mutationen wird durch die „Sequenzierung“, d. h. die Bestimmung der Basenabfolge auf der DNA vorgenommen.

### ■ Fragmente klonieren

Isolierte Gene können in verschiedene Organismen übertragen werden. Dort werden sie vermehrt, und es entstehen die (gewünschten) Eiweiße. Zur Übertragung und Vermehrung von Genen oder Genabschnitten werden häufig Plasmide und Viren als „Träger“ (= Vektoren) verwendet.

Erbmaterial, in das DNA aus einem anderen Organismus eingefügt wurde, nennt man rekombinant.

Organismen, denen ein oder mehrere Gene aus einer anderen Art eingesetzt wurden, nennt man transgen.



## Verfahren der Gentherapie

Zum Einschleusen therapeutischer Gene in den Menschen verwenden die Genforscher mehrere biologische, chemische und physikalische Transportmittel und -methoden. Besonders effiziente Genfähren (Vektoren) sind Viren, wenn man sie „entschärft“. Beim Umbau zur Genfähre (auch „Gentaxi“) müssen alle viralen Gene entfernt werden, die der Vermehrung dienen oder Krankheiten verursachen. An ihre Stelle tritt das therapeutisch wirksame Gen. Und da sich ein solches Vehikel äußerlich nicht vom ursprünglichen Virus unterscheidet, kann es eine Wirtszelle befallen und seinen nunmehr nützlichen genetischen Inhalt einbringen – ohne aber krank zu machen. Das neue genetische Material braucht sich nicht unbedingt in das menschliche Erbgut zu integrieren, um wirksam zu werden. Es muss nur überleben und so aktiv sein, dass das entsprechende Protein auch in therapeutisch ausreichender Menge hergestellt wird.

Die Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich der Anwendungsbereiche und Eignung (ex vivo und/oder in vivo). Erfolgt die Einschleusung der Gene direkt in den Körper, handelt es sich um ein In-vivo-Verfahren. Oft lassen sich Körperzellen am einfachsten mit einem zusätzlichen Gen ausrüsten, wenn man sie vorübergehend aus dem Organismus entfernt. Für diese so genannte Ex-vivo-Behandlung eignen sich vor allem leicht zugängliche Zellen (z. B. Blut, Knochenmark, Haut, Bindegewebe, Leber). Dazu werden die Zellen im Reagenzglas (in vitro) mit dem gewünschten Gen ausgestattet und den Patienten anschließend zurückgegeben. Sie bilden dann das gewünschte Produkt, etwa ein Hormon, ein Enzym oder eine für den Körper wichtige Substanz. Die Ex-vivo-Methoden werden auch als indirekte, die In-vivo-Methoden als direkte Methoden bezeichnet. Die angewandten Verfahren weisen verschiedene Vor- und Nachteile auf. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die Stabilität der transferierten DNA. Die Therapieerfolge sind unterschiedlich und zurzeit teilweise noch umstritten.

Häufig eingesetzte gentherapeutische Verfahren lassen sich in virale und nichtvirale Strategien unterscheiden. Bei einigen Verfahren erfolgt der „Einbau“ des neuen Gens in das Genom der Wirtszelle zufällig, und die Forscher können nicht vorherbestimmen, an welchem Ort innerhalb der DNA das Gen eingebaut wird.

Virale Vektoren	Nichtvirale Vektoren		
Retroviren Herpesviren Adenoviren Adenoassoziierte Viren	<b>Biochemische Methoden</b> Liposomen Rezeptortargeting	<b>Chemische Mittel</b> Kalziumphosphat DEAE-Dextran	<b>Physikalische Methoden</b> Elektroporation Mikroinjektion „Gen-Kanone“ (= Partikelbeschuss) „Jet Injection“ Direkte Injektion

Häufig eingesetzte virale und nichtvirale Vektorsysteme in der Gentherapie



Grundsätzlich lassen sich mit den Methoden der Gentherapie zwei unterschiedliche Ziele verfolgen. Man kann einerseits Kopien eines normalen, gesunden Gens in eine Zelle einschleusen, um einen Defekt zu kompensieren (Beispiel: fehlendes Enzym bei der ADA-Immunschwäche, ADA = Adenosin-Desaminase). Andererseits kann aber auch ein künstlich verändertes Gen in die Zelle eingebracht werden, um diese mit neuen Eigenschaften auszustatten (Beispiel: eine Strategie bei der HIV-Infektion ist es, den weißen Blutkörperchen die Kopie eines Gens einzuschleusen, das die Vermehrung des HIV beeinträchtigt). Aber auch die Prävention gewisser Krankheiten durch eine Gentherapie ist denkbar. Man könnte beispielsweise Frauen, die aufgrund erblicher Veranlagung ein hohes Risiko für Brustkrebs tragen, vorbeugend mit schützenden Genen versehen.



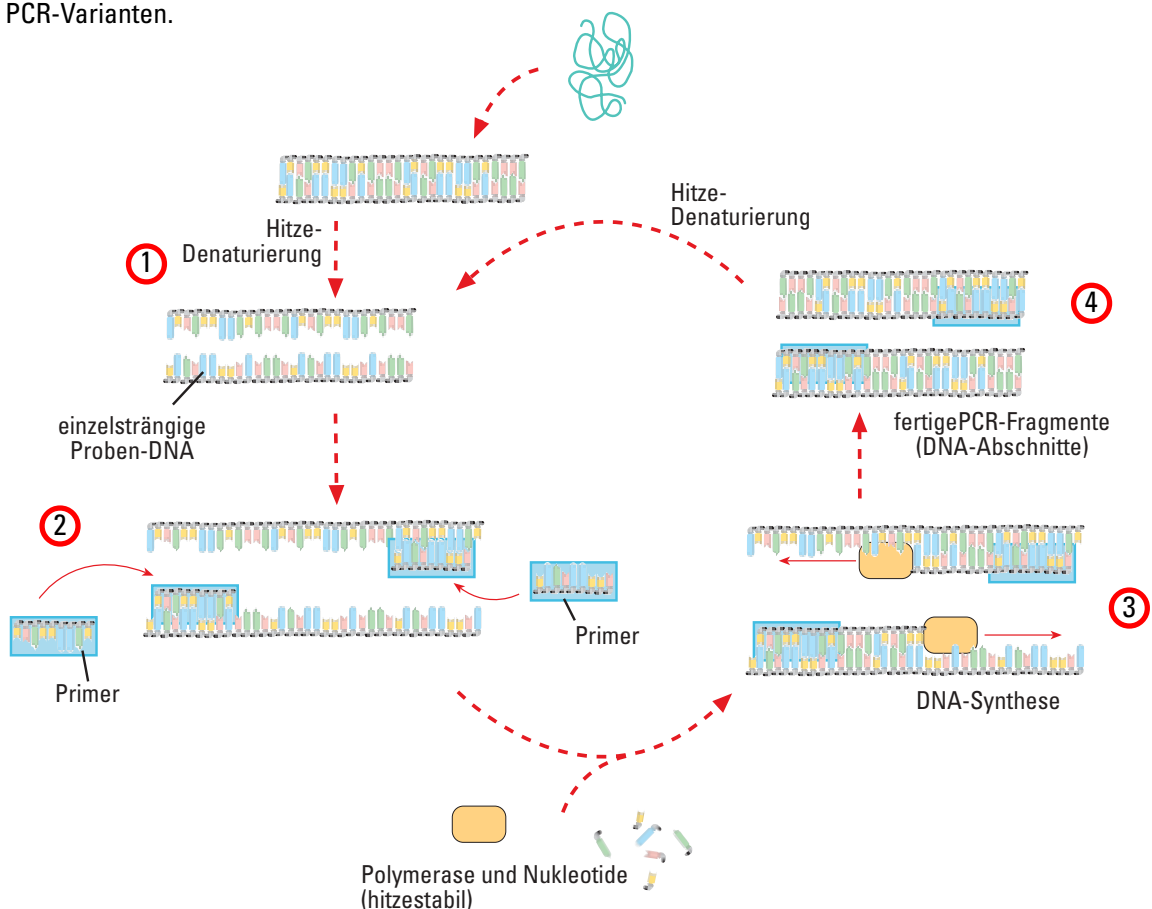
## Was ist PCR?

Die PCR (Polymerase Chain Reaction, dt.: Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Technik zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Es handelt sich um eine enzymatische DNA-Vermehrung, die es ermöglicht, aus wenig Probenmaterial innerhalb von Stunden genügend Material für die genetische Analyse der Nukleinsäuresequenzen zu gewinnen.

Interessante DNA-Abschnitte können beispielsweise Teile eines bestimmten Virus oder Bakteriums sein, dessen Nachweis erbracht werden muss. Durch die enorme Menge an Vervielfältigungen kann der Krankheitserreger nachgewiesen werden. Mit der geringen Ausgangsmenge wäre dies nicht möglich gewesen. In einigen Fällen kann nicht nur der Nachweis eines Krankheitserregers erbracht werden, sondern mit Hilfe der PCR auch die Menge bestimmt werden.

Weitere Anwendungsgebiete neben der medizinischen Diagnostik sind: Archäologie, Gerichtsmedizin, Vaterschaftsnachweise, genetische und biologische Forschung.

In der Natur erfolgt die DNA-Synthese bei der Zellteilung. Hierbei wird die genetische Information von Zellgeneration zu Zellgeneration unverändert weitergegeben. Der DNA-Doppelstrang windet sich auf und die Basenpaare lösen sich kurzfristig. Jeder der bisherigen DNA-Einzelstränge bildet die Vorlage für den neu zu bildenden komplementären Strang. Es entstehen zwei gleiche Kopien des ursprünglichen DNA-Doppelstranges. Dieses Vorgehen wird bei der PCR nachgeahmt, wobei man sich jedoch auf eine für den Nachweis charakteristische Zielsequenz begrenzt. Inzwischen existieren eine Vielzahl unterschiedlicher PCR-Varianten.



## PCR-Ablauf

### ① Denaturierung („Auftrennung“)

Der erste Schritt ist die Denaturierung: Bei über 90°C wird der DNA-Doppelstrang in die beiden komplementären Einzelstränge getrennt.

### ② Annealing („Primer-Anlagerung“)

Im zweiten Schritt werden (bei ca. 37-65 °C) die zwei so genannten Primer (= „Startermoleküle“ unterschiedlicher Länge zur Synthese von DNA-Abschnitten) angelagert. Sie sind wiederum komplementär zu dem Startabschnitt auf dem jeweiligen DNA-Einzelstrang. Ziel ist es nicht, die gesamte DNA zu vervielfältigen, sondern lediglich eine charakteristische Sequenz. Meist handelt es sich dabei um 100 bis 600 Basenpaare.

### ③ Elongation („Verlängerung“, Extension)

Beim anschließenden Erhitzen (auf maximal 72°C) erfolgt die Verlängerung der DNA-Stränge. In der Reaktionslösung ist neben den vier DNA-Bausteinen (Nukleotide) auch ein hitzestabiles Enzym enthalten (Taq-DNA-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*), das die Reaktion beschleunigt. Die Verlängerung der DNA-Stränge erfolgt stets in einer bestimmten Richtung.

### ④ Endprodukt

Endprodukte des ersten PCR-Zyklus sind nunmehr zwei DNA-Stränge (PCR-Fragmente).

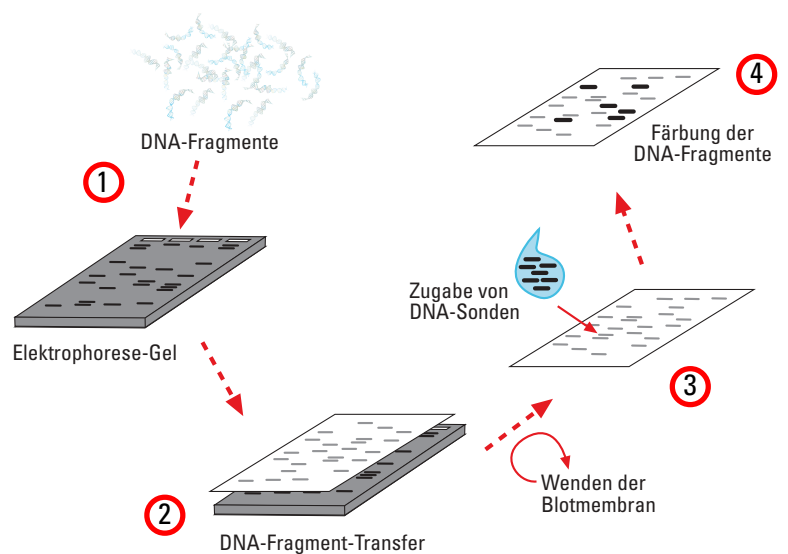
Die selektive Vervielfachung eines bestimmten Gens wird auch als Amplifikation („Vervielfältigung“) bezeichnet. Jeder weitere PCR-Schritt erhöht die Anzahl der DNA-Stränge um jeweils die doppelte Zahl. Nach der PCR mit 30 bis 40 Zyklen liegt eine ausreichende Menge spezifischer DNA-Stränge für die anschließende Detektion vor:

① Die Fragmente durchwandern in einem Gel („molekulares Sieb“) ein elektrisches Feld. Mit diesem Verfahren der Gel-Elektrophorese werden die DNA-Teilstücke (Fragmente) z.B. der Größe nach getrennt.

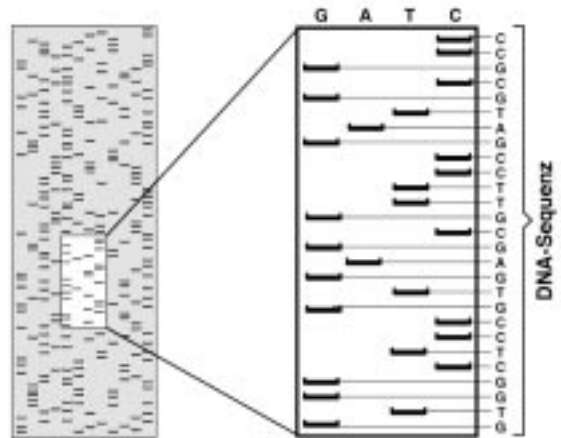
② Das Ergebnis der Elektrophorese wird übertragen (= Transfer der DNA-Fragmente auf eine so genannte Blot-Membran).

③ Markierten „DNA-Sonden“ werden der Blotmembran zugesetzt (= Hybridisierung der Blotmembran mit markierter DNA-Sonde). Unter Hybridisierung wird in der Biochemie eine molekularbiologische Technik zum Vergleich von Nukleotidsequenzen und zur Definition der genetischen Information verstanden.

④ Abschließend können die entsprechend markierten DNA-Fragmente mit Farbstoffen sichtbar gemacht werden, wodurch sich Verlauf und Ergebnis des Experiments überprüfen und vergleichen lassen.



Für eine angenommene Zahl von 20 Zyklen lässt sich die theoretische Anzahl der DNA-Stränge berechnen: rund eine Million. Dabei wird zwischen der Anzahl von DNA-Strängen definierter und nicht definierter Länge unterschieden.



### Klinisch bedeutsam: RNA-PCR?

Neben der DNA-PCR ist die RNA-PCR von Bedeutung: Die Genome etlicher klinisch relevanter Viren bestehen anstelle von DNA aus RNA.

Die wichtigsten Viren sind:

- das Humane Immundefizienz Virus (HIV) und
- das Hepatitis C-Virus (HCV)

Die RNA ist mit der DNA eng verwandt, beide unterscheiden sich jedoch in drei Punkten.

Die wichtigsten Unterschiede zwischen DNA und RNA sind:

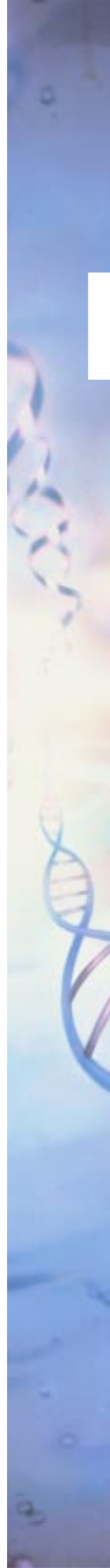
- Der Zuckerkomponente der RNA ist Ribose (anstelle von Desoxyribose).
- Statt Thymin enthält sie die Base Uracil.
- Sie liegt üblicherweise als Einzelstrang vor.

Und: Das Enzym, welches bei der DNA-PCR die Reaktion katalysiert (Taq-DNA-Polymerase), kann eine RNA nicht als Vorlage (Matrize) verwenden. Daher muss vor der eigentlichen DNA-Vervielfältigung (PCR-Amplifikation) ein anderer, zusätzlicher Mechanismus mit einem weiteren speziellen Enzym (die so genannte Reverse Transkription mit der Reversen Transkriptase) durchgeführt werden.



# Workshop Gentherapie

**Historische Aspekte und  
Möglichkeiten der Gentherapie**  
(Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher)



## Historische Aspekte und Möglichkeiten der Gentherapie

(Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher)



Durch Identifizierung von Genen, die in menschlichen Tumorzellen fehlen, defekt sind oder die das Immunsystem stimulieren können, kann man heutzutage Tumortherapiestrategien entwickeln, die noch bis vor kurzer Zeit undenkbar waren. Außerdem hat man 1990 mit dem Humangenom-Projekt begonnen. Der Plan war, bis zum Jahr 2005 alle menschlichen Gene einer Zelle zu sequenzieren und zu identifizieren. Die Entwicklung von High-tech-Sequenzierungsapparaten und -Software hatte aber zur Folge, dass dieses Projekt vorzeitig im Jahre 2001 abgeschlossen wurde. Circa 36.000 Gene, ungefähr dreimal soviel wie eine Drosophila-Fliege, enthält das menschliche Genom.

Es stehen ungefähr 5.000 Gene zur Verfügung, die man in gentherapeutischen Ansätzen verwenden könnte. Moderne Gentransfertechnologien ermöglichen es uns, Gene direkt in Tumorzellen einzuschleusen. Rekombinante virale Vektorsysteme haben schon vielversprechende Resultate im experimentellen Tiermodell erzeugt, die zu klinischen Protokollen geführt haben. Weltweit sind bisher über 4.000 Patienten behandelt worden. Der Großteil dieser Patienten hatte bösartige Tumorerkrankungen, ein Teil hatte monogenetische Krankheiten, und ein kleiner Teil hatte infektiöse Krankheiten wie z.B. AIDS. Die Resultate sind bisher nicht beeindruckend, aber man hat Erfahrungen während der vergangenen sieben Jahre angesammelt und kennt jetzt potentielle Probleme. Diese Probleme werden diskutiert.



■ **Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher**

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
Klinikum rechts der Isar  
Ismaninger Str. 22  
81675 München



Tel.: 089/41 40-44 50  
Fax: 089/41 40-44 76  
E-Mail: b.gansbacher@lrz.tum.de

Geburtsort: Sarnthein, Italien  
Studienabschluss: 1976 Dr. med., Universität Innsbruck

**Weiterführende Berufsausbildung:**

- 1980-1983 Facharztausbildung Innere Medizin, Medizinische Fakultät, Presbyterian University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia
- 1983-1985 Forschungsstipendium im Bereich Allergologie / Immunologie, Klinikum der University of Pennsylvania, Philadelphia (USA)
- 1985-1986 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Wistar Institute of Anatomy, Labor von Dr. Carlo Croce, Philadelphia
- 1986-1988 Forschungsstipendium Onkologie, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York

**Beruflicher Werdegang:**

- 1988–1991 Memorial Sloan Kettering Cancer Center  
*Clinical Assistant Physician*, Leukemia Service, Memorial Hospital for Cancer and Allied Diseases
- 1988–1991 Dozent an der medizinischen Fakultät, Cornell University Medical College
- 1992–1994 *Assistant Member*, Memorial Sloan Kettering Cancer Center  
*Assistant Attending Physician*, Memorial Sloan Kettering Cancer Center  
*Assistant Professor* an der medizinischen Fakultät, Cornell University Medical College
- 1994–1996 *Associate Member*, Memorial Sloan Kettering Cancer Center.  
*Associate Attending Physician*, Leukemia and Autologous Bone Marrow Transplant Service, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center  
*Associate Professor* an der medizinischen Fakultät, Cornell University Medical College
- seit 1996 Ordinarius und Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München



**Medizinische Examina:**

- 21. Juli 1976
- 4. September 1981

**Approbationen:**

1976	Approbation in Österreich
1976	Approbation in Italien
1978	Approbation in Deutschland
1981	Approbation in Pennsylvania, USA
1986	Approbation im Staat New York, USA

**Facharztausbildung und -prüfungen:**

1983	Amerikanischer Fachausschuss für Innere Medizin (American Board of Internal Medicine)
1985	Amerikanischer Fachausschuss für Allergologie und Immunologie (American Board of Allergy and Immunology)
1989	Amerikanischer Fachausschuss für Onkologie (American Board of Oncology)

**Facharztausbildung:**

- Amerikanischer Fachausschuss für Hämatologie (American Board of Hematology)

**Ehrungen und Auszeichnungen:**

- Reisestipendium zur 41. Jahrestagung der American Academy of Allergy and Immunology, März 1985, New York, N.Y., USA
- Auszeichnung als „Nachwuchsforscher“ der American Academy of Allergy and Immunology, März 1985, New York, N.Y., USA
- Klinisches Forschungsstipendium der American Cancer Society, Juli 1987 - Juni 1988
- Gastprofessor, Targeted Genetics Institute, Seattle, 30.-31. Oktober 1992
- Gastprofessor, University of Illinois, Chicago, 5.-6. Januar 1993
- Klinisches Forschungsstipendium für onkologische Immunologie des F.M. Kirby Krebsforschungsinstituts 1993-1996
- Preis der Degussa-Stiftung, Universität Frankfurt, November 1993
- Leitender Forscher der drei klinischen Versuchsreihen zur Gentherapie am Memorial Sloan Kettering Cancer Center 1992-1996
- Mitglied der europäischen Task Force für Gentherapie, 1993 -1996
- Vorsitzender der europäischen Task Force für Gentherapie, 1995 -1996



- Vorsitzender des internationalen Prüfungsausschusses des BMFT (damals: Bundesministerium für Forschung und Technologie) zum Thema: Die Anwendung der Gentransfertechnologie auf Krankheiten des Menschen 1994 -1995
- CaP CURE Forschungsstipendium 1994
- Mitglied und Sprecher der Genterapie-Informationsveranstaltung der American Society for Clinical Oncology (ASCO), 1995
- Veranstalter (zusammen mit Prof. Hofschneider, MPI, Martinsried) der GAAC-Konferenz über Genterapie, Kloster Seeon, München, Deutschland, 1.-3. Oktober 1995
- Vorstandsmitglied der European Working Group for Gene Therapy (EWGT), 1995-
- Zweiter Vorsitzender der EWGT 1996-
- Gastprofessor, Kyushu University, Beppu, Japan, Januar 1998

**Berufliche Ämter:**

- Präsident der European Society of Gene Therapy (ESGT)
- Mitglied der Kommission für Somatische Genterapie bei der Bundesärztekammer
- Mitglied der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit

***Associate Editor:***

- Fachzeitschrift "Cancer Gene Therapy"

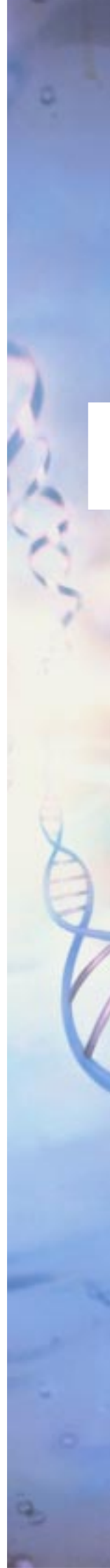
***Editorial Board:***

- Cytokines, Cellular and Molecular Therapy
- PDQ External Advisory Board (NCI)
- The Journal of Gene Medicine
- Current Opinion in Molecular Therapeutics



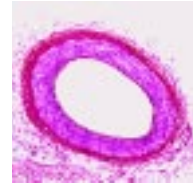
# Workshop Gentherapie

**Gentherapie der Familiären  
Hypercholesterinämie**  
(Dr. med. Günter Cichon)



## Gentherapie der Familiären Hypercholesterinämie

(Dr. med. Günter Cichon)



### Einführung

Die gesellschaftliche Bedeutung einer Gentherapie für Familiäre Hypercholesterinämie ist angesichts der kleinen Zahl von Patienten, die an der homozygoten Form der Erkrankung leiden (1 von 1.000.000 Menschen), und wirksamer medikamentöser Behandlungsmöglichkeiten für die heterozygote Form der FH (1 von 500 Menschen) eher gering. Der wissenschaftliche und medizinische Wert liegt im Modellcharakter, den diese Krankheit für die Entwicklung molekularer Therapieansätze hat.

Die Behandlung einer angeborenen Stoffwechselstörung der Leber durch Gentherapie stellt andere Anforderungen an das Gentransfersystem als der Versuch, die Einsprossung neuer Blutgefäße in einen geschwächten Herzmuskel zu induzieren oder durch Gentransfer eine Restenose von Koronararterien nach mechanischer Bougierung zu verhindern. An die Behandlung einer angeborenen Stoffwechselstörung knüpft man die Erwartung, dass die therapeutischen Gene in fast allen Zellen des betroffenen Organs lebenslang zuverlässig arbeiten. Bei den beiden letztgenannten kardiologischen Anwendungen ist eine lokale Wirkung des therapeutischen Gens für die Dauer von wenigen Tagen möglicherweise bereits ausreichend, um einen therapeutischen Effekt zu vermitteln.

Hinsichtlich der Notwendigkeit, die Gene sehr präzise ins Zielgewebe einzuschleusen und dort in einem Umfang arbeiten zu lassen, der die Zellen einerseits nicht überfordert, andererseits aber einen wirkungsvollen therapeutischen Effekt sicherstellt, unterscheiden sich die drei genannten Anwendungen nicht. Die menschliche Anatomie auf der einen Seite und das biologische Verhalten der eingesetzten Gentransfersysteme auf der anderen Seite setzen einer Umsetzung dieses Anspruches zur Zeit noch enge Grenzen.

Die Erfahrungen bei tierexperimentellen Untersuchungen zur Gentherapie der Familiären Hypercholesterinämie können einige dieser Schwierigkeiten illustrieren.

### Familiäre Hypercholesterinämie

Ursache für die Familiäre Hypercholesterinämie ist eine angeborene Funktionsstörung des *low density lipoprotein*-Rezeptors (LDL-Rezeptors). Dieses Protein wird überwiegend in Leberzellen hergestellt und dient der Aufnahme von überschüssigem Cholesterin aus dem Blut in die Leberzelle. Bei der heterozygoten Form ist nur eine der beiden Kopien des LDL-Rezeptors, die jede Zelle in ihrem Kern trägt, durch Mutation funktionslos geworden. Durch den Funktionsverlust einer Kopie sinkt die Anzahl der funktionsfähigen LDL-Rezeptoren auf etwa 50% ab. Diese Zahl ist nicht mehr ausreichend, um den Cholesterinstoffwechsel in gesunden Grenzen zu halten. Der Serumspiegel steigt auf etwa 300-500 mg/dl an. Sind beide Kopien des Gens betroffen (homozygote Form der FH), liegt der Serumcholesterinspiegel zwischen 500 – 1000 mg/dl.



Die gestörte Aufnahme von Cholesterin in die Leberzelle induziert eine schwerwiegende physiologische Fehlregulation. Cholesterin ist seiner Natur nach kein überflüssiger Nahrungsbestandteil, sondern ein wichtiger Rohstoff für zahlreiche körpereigene Verbindungen und darüber hinaus ein Baustein für den Aufbau von Zellmembranen. Wird kein Cholesterin durch die Nahrung aufgenommen, beginnt die Leber selbst Cholesterin zu produzieren, um den Bedarf des Körpers zu decken. Das entscheidende Signal für die Leberzelle mit der Cholesterinsynthese zu beginnen, ist die Konzentration von Cholesterin im Inneren der Zelle. Ist jedoch die Aufnahme von Cholesterin in die Leberzelle durch einen fehlerhaften LDL-Rezeptor gestört, beginnt die Leber Cholesterin zu produzieren, obwohl die Cholesterinkonzentration im Blut, bedingt durch den Defekt des LDL-Rezeptors, bereits erhöht ist. Die Folge ist eine weitere Verstärkung der bestehenden Hypercholesterinämie.

### **Geneherapie der FH**

Ziel einer Geneherapie der FH ist es, eine funktionsfähige Kopie des LDL-Rezeptorgens in möglichst viele Leberzellen einzuschleusen und dadurch zum einen die Entsorgung überschüssigen Cholesterins aus dem Blut zu verbessern und zum anderen indirekt die endogene Produktion von Cholesterin zu senken. Die direkte Applikation nackter DNA in das Körpergewebe führt nur zu sehr niedrigen Gentransferraten. Der Umfang des auf diese Weise vermittelten Gentransfers sowie die Dauer der Genexpression wäre zur Behandlung einer schweren Stoffwechselstörung der Leber auf keinen Fall ausreichend. Im Gegensatz dazu können sich diese Handicaps zur Therapie lokaler Durchblutungsstörungen als sinnvoll erweisen, da von vornherein nur eine zeitliche begrenzte lokale Freisetzung von geringen Mengen eines Gefäßwachstumsfaktors angestrebt ist.

Generell lassen sich Gentransferraten um Größenordnungen erhöhen, wenn die therapeutischen Gene zuvor in sogenannte Gentransfersysteme (auch Vektoren genannt) eingebaut werden. Diese können vollsynthetischer Natur sein, wie z. B. Liposomen, oder aus genetisch veränderten, replikationsdefekten Viren bestehen. Virale Vektoren gehören zu den leistungsfähigsten Gentransfersystemen. Die biologischen Eigenschaften des Vektorsystems hängen unmittelbar von der Natur des verwendeten Virus ab, aus dem das Vektorsystem konstruiert wurde. Rekombinante Adenoviren, adeno-assoziierte Viren und Retroviren gehören zu den zur Zeit am häufigsten verwendeten Vektorsystemen.

### **Therapeutische Effekte in Tieren**

Es existieren zwei Tiermodelle für Familiäre Hypercholesterinämie: Das Watanabe-Kaninchen und die LDL-Rezeptor-knock-out-Maus. Das Watanabe-Kaninchen entwickelt bereits unter einer cholesterinfreien Diät Serumcholesterinspiegel, die denen homozygot erkrankter Menschen vergleichbar sind. Auch die Tiere leiden an ausgeprägter Atherosklerose und sterben früh.

Im Watanabe-Kaninchen führt die Applikation einer ausreichend hohen Dosis rekombinanter Adenoviren, die eine funktionsfähige Kopie eines LDL-Rezeptorgens tragen, zu einer Reduktion des Serumcholesterinspiegels um bis zu 80%, was einer Normalisierung entspricht. Das Maximum des therapeuti-



schen Effektes wird etwa 3–5 Tage nach Applikation des Virus erreicht, danach beginnt der Serumcholesterinspiegel kontinuierlich zu steigen und erreicht 2–3 Wochen nach der initialen Gabe wieder sein Ausgangsniveau (Abb. 1). Hauptgrund für die zeitliche Begrenzung der Genexpression sind immunologische Abwehrreaktionen des Kaninchen-Immunsystems. Eine Wiederholung der Virusgabe zeigt keine Wirkung mehr, da das Kaninchen in der Zwischenzeit Antikörper gegen das Virus produziert hat, die eine erneute künstliche Infektion der Leberzellen verhindern.

Führt man das gleiche Experiment in Mäusen durch, die an Familiärer Hypercholesterinämie leiden und gleichzeitig einen Immundefekt tragen, der es ihnen nicht erlaubt, eine Immunantwort gegen das Gentransfersystem oder das therapeutische Protein aufzubauen (LDL-R k.o./SCID Mäuse), so sieht man noch nach mehr als 4 Monaten eine Senkung des Cholesterinspiegels um bis zu 70% (Abb. 2). Diese Untersuchungen demonstrieren die prinzipielle Leistungsfähigkeit einer adenoviralen Gentherapie, unterstreichen aber gleichzeitig den problematischen Einfluss des körpereigenen Immunsystems beim Einsatz adenoviraler Vektoren. Immunologische Barrieren sind nicht die einzigen Hürden, die in Hinblick auf eine klinische Anwendung noch überwunden werden müssen.

### **Der geeignete Applikationsweg**

Die Aufnahme eines funktionsfähigen LDL-Rezeptorgens versetzt im Prinzip jede Körperzelle in die Lage, das Rezeptorprotein herzustellen und auf diese Weise große Mengen von Cholesterin aus dem Blut aufzunehmen. Allerdings sind nur Leberzellen in der Lage, das aufgenommene Cholesterin in ausreichendem Maße weiterzuverarbeiten. Da andere Körperzellen nicht über die notwendige enzymatische Ausstattung verfügen, würden diese nach Infektion mit einem LDL-Rezeptor-Adenovirus das Cholesterin zwar aufnehmen, könnten es aber nicht weiterverarbeiten. Es würde zu einer krankhaften intrazellulären Speicherung von Cholesterin kommen, an der die Zellen zugrunde gingen, was z.B. im Fall von Herzmuskelzellen oder auch Lungen- oder Nierenepithelzellen ernste Komplikationen hervorrufen könnte. Dieser Sachverhalt erfordert eine zuverlässige Restriktion des Gentransfers auf das Zielorgan. Es liegt nahe, eine solche Restriktion durch Nutzung des organeigenen Gefäßsystems zu erreichen. Im Falle der Leber sind dies die Portalvene und die Leberarterie. Man könnte vermuten, dass die Viren, wenn sie über die Portalvene appliziert werden, in der Leber „hängen“ bleiben und die Leber als eine Art Filter fungiert. Einen vergleichbaren Zugangsweg würden am Herzen die Koronargefäße darstellen.

Eine Messung der Viruspartikelzahl im peripheren Blut nach lokaler Applikation eines Reportervirus über die Portalvene zeigt allerdings deutlich, dass diese einfache Vorstellung einer Abfilterung der Viren durch das Organ (Leber) nicht zutreffend ist. Die Konzentration an Viruspartikeln im peripheren Blut steigt auch nach lokaler Applikation auf Werte, die der nach peripherer Gabe (Ohrvene) vergleichbar sind (Abb. 3). Eine Analyse der Reporterexpression in verschiedenen Organen bestätigt diese Beobachtung. Der Gentransfer in andere Organe wie Lunge, Niere oder Ovarien kann durch eine lokale Virusgabe nicht verhindert werden (Abb. 4).



Wir gehen davon aus, dass bei einmaliger Passage der Viren durch das Zielorgan kaum mehr als 1% der Viren aus der Blutbahn entfernt werden. Wie hoch diese Zahl in anderen Organen wie Herz, Niere oder Lunge ist, hängt neben physikalischen Faktoren wie dem Durchmesser der Kapillaren, der Durchflusszeit und der Virusgröße auch von der Anzahl der Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen ab, die dem Virus die Aufnahme in die Zelle ermöglichen.

Selbst innerhalb des Organs führt die Applikation von Viren über das Gefäßsystem nicht zu einer idealen Gleichverteilung. Im Falle der Leber zeigt die histologische Analyse eine Konzentration von „getroffenen“ Zellen in der Nähe der Zentralvene des Leberläppchens, während periphere Bereiche des Leberläppchens eher schlecht erreicht werden. Diese Ungleichverteilung birgt ein weiteres Problem: Wird eine einzelne Zelle von mehr als einem Virus getroffen, kann dies zu toxischen Schädigungen der Zelle führen, da viele der viralen Hüllproteine potenziell zellschädigende Eigenschaften entfalten können. Über die Ursachen für diese lokale Ungleichverteilung kann nur spekuliert werden. Die Fließgeschwindigkeit des Blutes, der lokale pH, der Rezeptorbesatz der Zielzellen sind Faktoren, die in schwer berechenbarer Weise zusammenwirken.

Da die Nutzung organeigener Blutgefäße keine zuverlässige Restriktion des Gentransfers auf das Zielorgan gewährleistet, sind alternative Maßnahmen erforderlich, um Nicht-Zielgewebe vor den Folgen eines unbeabsichtigten Gentransfers zu schützen. Eine elegante Möglichkeit bestünde (zumindest theoretisch) in der Nutzung von Steuerelementen, die nur im Zielgewebe eine Aktivierung des therapeutischen Gens erlauben und die dafür sorgen, dass das Gen in anderen Geweben stumm bleibt. Solche Steuerelemente (sog. gewebespezifische Promotoren) existieren, allerdings arbeiten sie selten in der gewünschten Zuverlässigkeit. Eine andere Alternative bestünde in der direkten Applikation des Vektors in das Zielgewebe. Aber zum einen kann diese Technik eine Ausschwemmung von Viren aus dem Zielgebiet nicht zuverlässig verhindern, zum anderen treten dadurch sehr hohe lokale Viruskonzentrationen im Gewebe auf, die toxische Wirkung auf die Zellen haben können.

Eine ideale Problemlösung könnte ein Gentransfersystem sein, das in der Lage ist, hochspezifisch an eine Oberflächenstruktur der Zielzelle (z.B. an einen spezifischen Rezeptor auf Herzmuskelzellen) zu koppeln und sein Gen in die Zelle einzuschleusen. Nach einer einfachen Spritze in die Armvene würde der Vektor dann über den Blutweg zu seinen Zielzellen gelangen und diese spezifisch infizieren. Voraussetzung für ein Gelingen dieses Ansatzes wäre allerdings, dass ein Vektor existiert, der wirklich nur an seinen Zielrezeptor koppelt und nicht auch noch an Oberflächenstrukturen auf anderen Geweben bindet. Ein solches System ist zur Zeit noch Utopie.

### **Physiologisch kontrollierte Genexpression**

Die histologische Analyse von Leberzellen nach Gentransfer des LDL-Rezeptors hat gezeigt, dass es selbst in Leberzellen zu einer pathologischen intrazellulären Ablagerung von überschüssigem Cholesterin kommen kann. Dies hängt damit zusammen, dass die Steuerelemente im eingeschleusten Gen der Zelle eine



ununterbrochene Produktion des LDL-Rezeptors diktieren. Die Produktion des therapeutischen Eiweiß richtet sich nicht nach dem physiologischen Bedarf der Zelle, sondern läuft, salopp ausgedrückt, die ganze Zeit auf Vollgas. Steuerelemente zu verwenden, die eine regulierte Genexpression ermöglichen, ist im Prinzip möglich, bedarf bei vielen therapeutischen Genen jedoch noch intensiver Entwicklungsarbeit.

Es ist wahrscheinlich, dass sich die Stärke der Genexpression nach einer lokalen Gabe von Gefäßwachstumsfaktorgenen (z. B. zum Zweck der Behandlung einer peripheren Verschlusskrankheit oder bei drohendem Herzinfarkt) in noch stärkerem Umfang als bei Gentherapie der FH an physiologischen Expressionverhältnissen orientieren muss, um einen positiven therapeutischen Effekt zu vermitteln.

### **Akut toxische Wirkungen des Gentransfersystems**

Werden bei einer Gentherapie virale Gentransfersysteme verwendet, die sich von Viren ableiten, die für den Menschen auch im Alltag Bedeutung besitzen, wie z. B. Adenoviren (häufige Ursache von Erkältungskrankheiten) bedeutet dies, dass bei vielen potenziellen Patienten bereits vor Gabe des therapeutischen Virus ein Immunstatus gegen Adenoviren besteht. Der erneute Kontakt mit adenoviralen Antigenen kann sich nachteilig auf die Gentransfereffizienz auswirken, er kann darüber hinaus auch lokale und systemische Entzündungsreaktionen induzieren, die potenzielle therapeutische Effekte gefährden bzw. in Abhängigkeit von der applizierten Dosis ernste gesundheitliche Probleme hervorrufen können. Ein Beispiel für eine solche Reaktion ist eine Aktivierung des Komplementsystems. Das Komplementsystem ist ein körpereigenes Schutzsystem, das eingedrungene Krankheitserreger normalerweise schnell und zuverlässig eliminiert. Dieser Schutzmechanismus wird auch bei Gabe von Adenoviren induziert und kann in Abhängigkeit von der applizierten Dosis lokale und systemische Entzündungsreaktionen hervorrufen, die sogar zum Tod führen können. Einfache Reagenzglasuntersuchungen mit Blutplasma des Patienten erlauben aber bereits vor Therapiebeginn eine Abschätzung des individuellen Risikos und eine entsprechende Dosisanpassung (Abb. 5).

### **Zusammenfassung**

Die klassische Pharmakotherapie verwendet meist körperfremde synthetische Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheitszuständen. Die physiologischen Wirkungen der Medikamente erfassen häufig den ganzen Organismus, und entsprechend werden therapeutische Effekte meist um den Preis einer Reihe von unvermeidbaren Nebenwirkungen erkaufte. Molekulare Therapieansätze erlauben die Nutzung körpereigener Eiweiße zur Behandlung von erworbenen und angeborenen Erkrankungen. Ihre therapeutischen Einsatzmöglichkeiten gehen weit über die Grenzen einer Pharmakotherapie hinaus und machen es zumindest theoretisch möglich, punktgenau körpereigene Regulationsmechanismen anzustoßen und diese im Sinne einer Heilbehandlung zu nutzen.

Voraussetzung für eine erfolgreiche molekulare Therapie ist jedoch, therapeutische Gene sehr präzise in potenzielle Zielzellen zu lenken und sie dort in enger Abstimmung mit den physiologischen Erfordernissen zu aktivieren.



Die zurzeit verwendeten Gentransfersysteme erlauben eine präzise Lenkung der therapeutischen Gene nur in unzureichendem Umfang. Das gleiche gilt für Regulationsmechanismen, die die Aktivität künstlich eingeführter Gene steuern. Auf beiden Feldern ist noch viel Entwicklungsarbeit notwendig. Aber tragfähige Problemlösungen werden nicht nur das Spektrum konventioneller Therapiemaßnahmen zu erweitern helfen, sondern echte Therapieansätze für eine große Gruppe angeborener Erkrankungen eröffnen, die bislang als unheilbar galten.

■ **Dr. med. Günter Cichon**

Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
Robert-Rössle-Str. 10  
13122 Berlin-Buch



Tel.: 030/94 06-33 08

Fax: 030/94 06-33 06

E-Mail: gcichon@mdc-berlin.de

- 23.1.60 geboren in Steinfurt, Westfalen
- 1978 Abitur am mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium Steinfurt
- 1979-81 Mitarbeiter einer Berliner Tageszeitung
- 1981-91 Studium der Biochemie und der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
- 1991 Drittes Staatsexamen Humanmedizin
- Promotion am Klinikum Steglitz Berlin, Gynäkologische Endokronologie, Eikosanoidforschung; Thema: „Die Bedeutung der Hepoxiline im Entzündungsprozess“
- 1992-94 Tätigkeit als Arzt in England (House officer) in den Bereichen: Gastroenterologie  
Hämatologie  
Nephrologie  
Abdominalchirurgie  
Notfallmedizin
- 1994-97 Max-Planck-Gesellschaft: Gastarbeitsgruppe „Zellzyklusregulation und Gensubstitution“ am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
- seit 1997 Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin, Projektleiter „Gentherapie der Familiären Hypercholesterinämie – Vektor-entwicklung“

**Schwerpunkte:**

- Gentherapie monogenetischer Erkrankungen der Leber
- Entwicklung adeno- und lentiviraler Gentransfervektoren
- Untersuchung akut entzündlicher und hämatologischer Veränderungen nach adenoviralem Gentransfer in Säugern



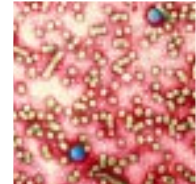
# Workshop Gentherapie



**Gentherapie bei  
Infektionserkrankungen**  
(PD Dr. med. Ulrike Protzer)

## Gentherapie von Infektionserkrankungen

(PD Dr. med. Ulrike Protzer)



Die Gentherapie wird zurzeit als therapeutische Alternative für eine Reihe von Infektionserkrankungen erwogen, für die keine oder keine befriedigende konventionelle Therapie zur Verfügung steht. Hierbei handelt es sich meist um chronische, virusbedingte Erkrankungen wie z. B. die HIV-Infektion, die chronische Hepatitis B oder C, Papilloma-Virus oder Epstein-Barr-Virus, assoziierte Tumorerkrankungen oder persistierende Infektionen durch Herpesviren (Cytomegalievirus, Herpes Simplex-Virus). Aber auch bei schwer therapierbaren anderen Infektionserkrankungen, wie zum Beispiel der Malaria oder der Tuberkulose, werden Möglichkeiten der Gentherapie überprüft.

Die genterapeutischen Strategien, die derzeit zur Anwendung kommen, lassen sich in drei breite Kategorien einteilen: (i) Nukleinsäure-basierende Therapien wie Antisense-DNA oder -RNA, RNA-Decoys oder katalytisch wirksame RNA-Einheiten (Ribozyme); (ii) Protein-basierende Therapien wie transdominant negative Proteine, Rezeptor-Analoga oder intrazelluläre Antikörper-Fragmente; (iii) Immuntherapien wie der adoptive Transfer von T-Zellen, DNA-basierende Impfstoffe oder die Expression von Zytokinen. Mit diesen Strategien lassen sich ein Einfluss auf die Vermehrung des jeweiligen Erregers, ein Schutz uninfizierter Zellen oder eine Stimulation des Immunsystems des infizierten Patienten erreichen.

Für Infektionen mit Erregern, für die keine (z.B. HIV oder Hepatitis C-Virus) oder nur sehr teure Impfstoffe (z.B. Influenza) zur Verfügung stehen, werden DNA-basierende Impfstoffe als alternative Präventions- und Therapie-Strategien untersucht. Gegenüber konventionellen Impfstoffen haben DNA-Impfstoffe den Vorteil, dass sie einfach und kostengünstig in großen Mengen produziert werden können und keiner speziellen Transport- oder Lagerungsbedingungen bedürfen. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine DNA-Vakzine eine breite Immunantwort induziert, die ausreichend war, Neuinfektionen (z.B. Influenza-Infektion) oder zumindest prognostisch ungünstige Krankheitsverläufe (z.B. bei Infektionen mit HIV-verwandten Viren) zu verhindern. In ersten klinischen Studien von DNA-Impfstoffen an HIV-Infizierten zeigten sich keine relevanten Nebenwirkungen, und es konnte eine Stimulation des Immunsystems nachgewiesen werden.

Die meisten Studien zur Gentherapie von Infektionserkrankungen im engeren Sinne befinden sich derzeit im experimentellen bzw. vorklinischen Stadium. Bis heute gibt es 36 abgeschlossene oder noch laufende klinische Studien. Damit stellen Infektionskrankheiten neben vaskulären Erkrankungen nach den Tumorerkrankungen und monogenetischen Erkrankungen die wichtigste Indikation zur Durchführung klinischer Gentherapie-Studien dar. Die überwiegende Mehrzahl der klinischen Gentherapie-Studien wurde an HIV-infizierten Patienten durchgeführt, indem man *ex vivo*, d. h. außerhalb des Körpers, therapeutisch wirksame Gene in T-Lymphozyten des Patienten oder deren Vorläuferzellen einbringt, und diese dann dem HIV-Infizierten injiziert. Erste Ergebnisse dieser Studien sind zwar vielversprechend, jedoch stehen therapeutische Erfolge noch aus. Dauerhafte therapeutische Erfolge sind aber auch erst zu erwarten, wenn die Effizienz des Gentransfers verbessert werden kann und in experimentellen Systemen die therapeutischen Strategien optimiert sind.



■ **PD Dr. med. habil. Ulrike Protzer-Knolle**

Universitätsklinikum Heidelberg  
Abteilung Virologie, Hygiene-Institut  
Im Neuenheimer Feld 324  
69120 Heidelberg



Tel.: 06221/56 50 15  
Fax: 06221/56 50 03  
E-Mail: [ulrike\\_protzer@med.uni-heidelberg.de](mailto:ulrike_protzer@med.uni-heidelberg.de)

- 2.11.1962 geboren in Stuttgart-Bad Cannstatt
- 1982 Abitur Humanistisches Melanchthon Gymnasium Nürnberg
- 1982-1988 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, Stipendiatin der Bayerischen Hochbegabtenförderung
- 1986 während des Studiums Auslandsaufenthalte in Pirgos (Ilias, Griechenland), Durban und Ingwavuma (Südafrika) sowie Basel (Schweiz)
- 1990 Promotion an der Medizinischen Fakultät der FAU Erlangen
- 1989-1990 Ärztin im Praktikum, 1. Medizinische Klinik, St. Markus-Krankenhaus, Frankfurt; Chefarzt: Prof. Dr. med. K.-H. Holtermüller
- 1990 Approbation als Ärztin
- 1990-1992 Assistenzärztin, 1. Medizinische Klinik, St. Markus-Krankenhaus, Frankfurt
- 1992-1996 Wissenschaftliche Angestellte der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz; Direktor: Prof. Dr. Dr. K.-H. Meyer zum Büschenfelde
- Klinischer Schwerpunkt:** Infektionserkrankungen (v. a. virale Hepatitiden und HIV-Infektionen)
- Forschungstätigkeit (Labor Prof. Dr. G. Gerken): Hepatitis B Virus
- 1996 Erwerb der Facharzt-Bezeichnung: „Ärztin für Innere Medizin“
- seit 1996 Postdoc am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) in der Forschungsgruppe Prof. Dr. H. Schaller: „Virus-Wirt-Interaktion der Hepatitis B Viren“
- 1997-2000 Habilitationsstipendium der Universität Heidelberg im Rahmen der Förderung des Hochschullehrerinnen-Nachwuchses



2000 Erwerb der Venia legendi für das Fach Virologie  
seit 1.9.2000 Leiterin einer Arbeitsgruppe in der Abteilung Virologie, Hygiene-Institut,  
Universitätsklinikum Heidelberg; Direktor: Prof. Dr. H.-G. Kräusslich  
**Schwerpunkt:** Genterapie viraler Hepatitiden und Virus-Wirt-Interaktion  
von Hepatitis B Viren

Leiterin zweier von der DFG im Einzelverfahren geförderter Projekte,  
Projektleiterin im Graduiertenkolleg „Kontrolle der Genexpression in  
pathogenen Mikroorganismen“

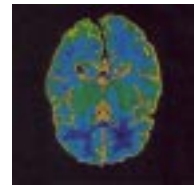
stellvertretende Projektleiterin im BMBF-Schwerpunkt „Somatische  
Genterapie“



# Workshop Genterapie



**Genterapie bei Tumoren  
des Nervensystems  
(Dr. Regina Reszka)**



## Gentherapie von Tumoren des Nervensystems

(Dr. Regina Reszka)

An primären Hirntumoren erkranken 5-15/100 000 Patienten pro Jahr. Davon entfällt die Hälfte auf die Gliome und ein Viertel auf die Gruppe der Glioblastome, wobei generell männliche Patienten (62,7%) häufiger betroffen sind als weibliche.

Zu den malignen Gliomen zählen das anaplastische Astrozytom, das Oligodendrogliom und das Ependymom sowie das Glioblastom (GBM).

Die Prognose des GBM ist denkbar schlecht. Unbehandelt geht man von einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 17 Wochen aus. Mit chirurgischer Entfernung und postoperativer Bestrahlung lässt sich eine durchschnittliche Lebenserwartung von 37 Wochen erzielen, durch kombinierte Chemotherapie ist diese auf 47 Wochen zu steigern. 80% der Patienten sterben innerhalb eines Jahres nach Diagnose an Rezidiven. Der Grund, warum die meisten malignen Gliome nicht kurativ therapiert werden können, sind:

- hochinvasives Wachstum
- die Fähigkeit, das Immunsystem zu umgehen
- die hohe Bestrahlungsresistenz
- eine starke Neigung zur Rezidivbildung.

Einen nur palliativen Ansatz in der Therapie maligner Gliome bildet die chirurgische Entfernung in Kombination mit postoperativer Bestrahlung und eventueller adjuvanter Chemotherapie.

Aufgrund der jüngsten Fortschritte der molekularen Medizin wird seit mehr als 15 Jahren versucht, diese Strategien auch zur Behandlung von malignen Hirntumoren anzuwenden.

So wurden speziell Suizid-Gentransfer-Systeme (z. B. das Gen der Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus[HSVtk]/Ganciclovir[GCV]) als sogenannte Prodrug-Therapien präklinisch wie auch klinisch eingesetzt. Neben Retroviren, in Form von Retrovirus-produzierenden Zellen (VPC) kamen besonders Adenoviren und erstmals auch nicht-virale Transfersysteme (Liposomen) als Shuttle für das HSVtk-Gen zum Einsatz. Weitere Therapiegene, für die es erste klinische Daten hinsichtlich der Toxizität und der möglichen Nebenwirkungen gibt, sind Apoptose-induzierende und Immun-stimulierende Gene.

Zukünftig werden auch onkolytische Viren, die nur in Tumorzellen replikationsaktiv sein können, zu den experimentellen Therapiekonzepten gehören.



■ **Dr. Regina Reszka**

Arbeitsgruppe Drug Targeting  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
Robert-Rössle-Str. 10  
13122 Berlin-Buch



Tel.: 030/94 06-38 63  
Fax: 030/94 06-33 06  
E-Mail: reszka@mdc-berlin.de

29.5.1953	geboren in Untermaßfeld
1972	Abitur mit Berufsausbildung (Chemiefacharbeiter)
1972-1976	Studium der Chemie an der Universität zu Leipzig
1976	Diplom zum Thema „ $\beta$ -Oxosulfonylchloride als bifunktionelle Bausteine für die Synthese“
1976-1990	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentralinstitut für Krebsforschung Berlin-Buch, Abt. Experimentelle Chemotherapie
1988	Promotion zum Thema „Untersuchungen zum liposomalen Einschluß der Antineoplastika Daunorubicin und cis-Dichlordiamminplatin (II)“
1989	Forschungsaufenthalt an der Universität Utrecht (Prof. D.J.A. Crommelin)
1991	Studienaufenthalt am Institut für Pathologie der Eidgenössisch-Technischen Hochschule Zürich (Dr. Schwendener)
1991	Abschluss des Postgradualstudiums auf dem Gebiet der Biochemie zum „Fachchemiker der Medizin“, Akademie für Ärztliche Fortbildung, Berlin
seit 1991	Arbeitsgruppenleiterin am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, AG Drug Targeting
1995	Gründung der Firma G.O.T. GmbH & CO. KG (Gesellschaft für Therapieoptimierung und Targeting), Geschäftsführende Gesellschafterin
1997	Gründung der Firma G.O.T. EmbH (FUTURE-Förderung), Geschäftsführerin
1998	Innovationspreis Berlin/Brandenburg (G.O.T. GmbH & CO. KG)
2001	Umfirmierung zur G.O.T. Therapeutics GmbH

**Mitgliedschaften:**

- CESAR (AWO)
- American Association for Cancer Research, INC.
- Deutsche Vereinigung für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)
- Association for Pharmaceutical Technology (A.P.V.)



# Workshop Gentherapie



**Biomedizin –  
Die öffentliche Debatte**

## Biomedizin: Die öffentliche Debatte

Gentechnische Verfahren erlangen in der modernen Medizin zunehmende Bedeutung für innovative Diagnose- und Therapiemethoden. Gleichzeitig bewegen sie sich in einem ethischen Spannungsfeld, das sich in einer kritischen öffentlichen Diskussion manifestiert.

### **Gendiagnostik: Pro und Contra**

Mit gendiagnostischen Methoden können gezielt Veränderungen im Erbgut nachgewiesen werden. Sie ermöglichen frühzeitige Aussagen darüber, welche Veränderungen vorliegen und welchen Krankheitsverlauf sie bewirken könnten. Ausgangspunkte dafür sind Gewebe- oder Fruchtwasserproben bei Ungeborenen (pränatal) oder Blut-, Haar- und andere Gewebeproben bei Kindern und Erwachsenen (postnatal). Bisher sind 7.000 Erbkrankheiten bekannt, die auf genetischen Veränderungen beruhen. Für 500 davon sind bisher Gentests verfügbar.

#### **Pro-Argumente:**

- Frühes bzw. schnelleres Erkennen von Erbleiden und von Prädispositionen bei schweren Erkrankungen
- Unmittelbare Krankheitsbehandlung vor oder nach der Geburt
- Entwicklung individualisierter Behandlungsmethoden
- Möglichkeit präventiven Verhaltens

#### **Contra-Argumente:**

- Überbewertung bzw. Diskriminierung aufgrund genetischer Eigenschaften
- Anwendung von Gentests ohne umfassende Patientenberatung  
z.B. hinsichtlich Präventions- und Therapiemöglichkeit
- Gefahr des Missbrauchs, z. B. im Berufsleben oder durch das Versicherungswesen

### **Präimplantationsdiagnostik (PID): Pro und Contra**

Die Präimplantationsdiagnostik (PID) ist eine spezifische Art der Gendiagnostik, bei der künstlich befruchtete Embryonen vor der Implantation in den Mutterleib in vitro, d.h. im Reagenzglas, auf bestimmte Erbkrankheiten und Chromosomenstörungen (z. B. Down-Syndrom) hin getestet werden. Dabei werden die Embryonen nur dann in den Mutterleib eingesetzt (implantiert), wenn sie erblich nicht belastet sind.

In den meisten europäischen Ländern und den USA ist die PID erlaubt. Es ist umstritten, ob die PID nach dem Embryonenschutzgesetz von 1990 in Deutschland angewendet werden darf.



#### Pro-Argumente:

- Verbesserung der Chance auf gesunden Nachwuchs bei Paaren, bei denen ein hohes Risiko für eine schwere Erbkrankheit besteht
- In Anknüpfung an die Regelung des §218 StGB könnte auch die Auslese erbkranker Embryonen bei medizinischer Indikation von der Strafbarkeit ausgenommen werden.

#### Contra-Argumente:

- Gefahr einer zukünftigen Diskriminierung behinderter Menschen
- Gefahr einer eugenischen Selektion oder Manipulation
- Möglichkeit des Missbrauchs der nicht implantierten Embryonen
- Veränderung der Beziehungen zwischen Eltern und Kind

### **Somatische Gentherapie: Pro und Contra**

Das Prinzip der somatischen Gentherapie basiert auf der Übertragung von Genen in die Körperzellen eines Patienten und der daraus folgenden Heilung.

Seit 1990 wurden weltweit über 300 entsprechende klinische Studien mit 3.000 bis 4.000 Patienten durchgeführt. Rund 70 Prozent aller Gentherapie-Studien befassen sich mit dem Thema Krebs. Weitere Studien befassen sich mit der Behandlung von AIDS und der Therapie von Erbkrankheiten, die auf den Defekt eines einzelnen Gens zurückzuführen sind (monogene Erbkrankheiten). In Deutschland erproben nahezu alle Humangenetik-Zentren genetische Therapieformen.

Die somatische Gentherapie trifft auf wenig ethische Bedenken.

#### Pro-Argumente:

- Breites Spektrum an zukünftigen Therapiemöglichkeiten
- Therapiemöglichkeit bisher unheilbarer Krankheiten
- Möglichkeit der ursächlichen Behandlung auf der Ebene der Gene
- Die somatische Gentherapie hat ihre Wirksamkeit bereits im Tierexperiment, vor allem bei der Behandlung von Tumoren, erwiesen. Auch über erste Erfolge beim Menschen wird berichtet.

#### Contra-Argumente:

- Nach zehn Jahren intensiver Forschung und über 300 klinischen Versuchen wurde noch kein Patient durch eine somatische Gentherapie nachweisbar dauerhaft geheilt.
- Es lassen sich nur wenige Krankheitsbilder auf den Defekt eines einzelnen Gens zurückführen. Bei der Entstehung vieler Krankheiten, wie Krebs oder Herz-Kreislauf-Schwächen, gibt es ein komplexes Wechselspiel von Umweltfaktoren und mehreren genetischen Fehlfunktionen.
- Mögliche schwere Unverträglichkeitsreaktionen gegenüber den viralen Transportmitteln (den so genannten „Genfähren“)
- Möglichkeit einer Veränderung der menschlichen Keimbahn als unerwünschte Nebenwirkung



### **Keimbahntherapie: Pro und Contra**

Im Gegensatz zur somatischen Gentherapie werden bei der Keimbahntherapie die Gene nicht in die Körperzellen, sondern in die Keimzellen (Eizelle/Spermium) eingeführt.

Seit 1990 ist die Keimbahntherapie beim Menschen in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz verboten.

#### **Contra-Argumente:**

- Die Nachkommen, bei denen ein Keimbahneingriff erst wirksam wird, haben keine Möglichkeit, ihr Einverständnis bzw. ihre Ablehnung zu erklären.
- Die Risiken einer Keimbahntherapie, die heute noch nicht bekannt sind, manifestieren sich in allen folgenden Generationen
- Züchtung von Menschen mit „gewünschten“ Eigenschaften
- Verbrauch von Embryonen für die Forschung
- Überbewertung bzw. Diskriminierung aufgrund genetischer Eigenschaften

Für die Keimbahntherapie würde die Möglichkeit einer Heilung von Erbkrankheiten sprechen. Die dagegen sprechenden Argumente (s. o.) sind jedoch so schwerwiegend, dass es in Politik, Wissenschaft und Gesellschaft einen Konsens gibt, diese Therapieform nicht anzuwenden.

### **Stammzellforschung: Pro und Contra**

Forschung an Stammzellen wird weltweit betrieben, da die Wissenschaft davon ausgeht, mit Hilfe von Stammzellen zerstörtes oder krankes Gewebe (z. B. Bereiche des Gehirns bei Parkinson-Patienten und Herzgewebe nach einem Infarkt oder, langfristig gesehen, ganze Organe) zu ersetzen.

Es gibt zwei Arten von Stammzellen: So genannte *adulte Stammzellen* stammen z. B. aus dem Blut oder Knochenmark erwachsener Menschen. Diese sind Vorläufer einer Reihe verschiedener Zellarten und können so reprogrammiert werden, dass sie ganz bestimmte Gewebe bilden. Da diese Zellen aus dem Körper des Patienten stammen, gibt es keine Abstoßungsreaktion. Allerdings können sich diese Zellen nicht mehr in alle Gewebe differenzieren (pluripotent), und es ist derzeit noch nicht klar, wie breit ihr Differenzierungspotenzial ist.

Die *embryonalen Stammzellen* sind in der Lage, alle verschiedenen Arten von Körperzellen zu bilden (totipotent). Sie werden aus den Zellen eines Embryonen gewonnen und vermehrt und können entsprechend des Bedarfs in verschiedene Gewebe differenziert werden. Da diese Zellen aus einem fremden Embryo gewonnen werden, sind sie nicht erbgleich mit denen des Patienten, dem sie implantiert werden. Es kommt daher zu Abstoßungsreaktionen.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung embryonaler Stammzellen ist das *therapeutische Klonen*: Aus einer Körperzelle eines Patienten wird der Zellkern mitsamt dem darin enthaltenen Erbgut entnommen und in eine zuvor vom Erbgut befreite Eizelle injiziert. Die aus diesen Embryonen gewonnenen Stammzellen besitzen das gleiche Erbgut wie der Patient. Es kommt daher zu keiner Abstoßungsreaktion.

