

Theoretische Grundlagen von Gentherapien

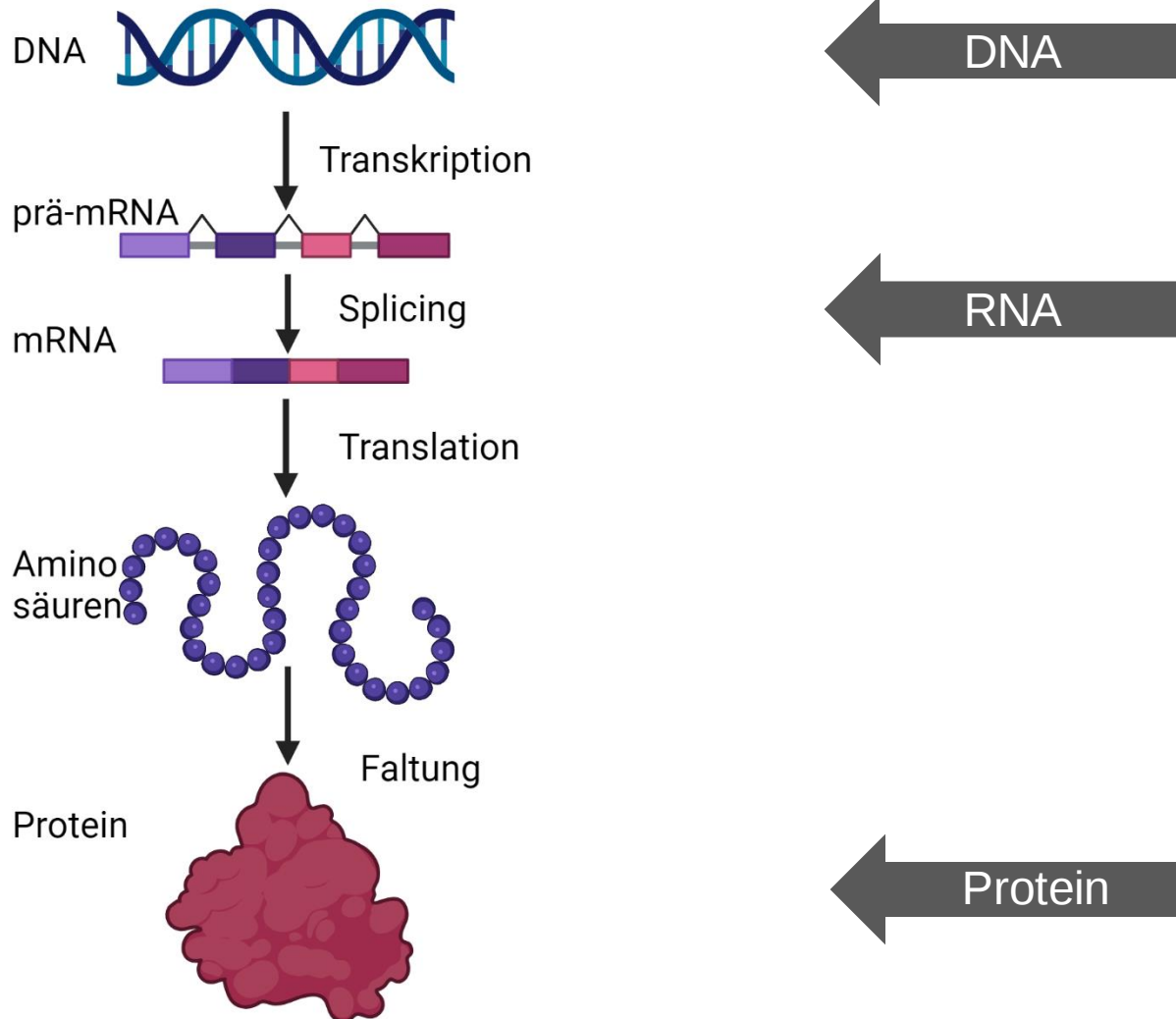
Prof. Dr. Dr. med. Christiane Zweier, Universitätsklinik für Humangenetik



Gentherapien

- Gentherapie im engeren Sinne: Ersatz eines defekten Gens durch intakte Sequenz
 - z.B. Integration der intakten Gensequenz in die Zelle = **Genersatztherapie**
 - z.B. Korrektur einer Variante = **Gen-/Genomeditierung**
- Gentherapie im weiteren Sinne: Veränderung der Genexpression/funktion = **Genmodulation**
 - z.B. neue Funktion
 - z.B. Inaktivierung einer nicht-funktionalen oder toxischen Genkopie
 - z.B. Hochregulation oder Induktion einer funktionalen Genkopie

Ansatzpunkte von (Gen)therapien



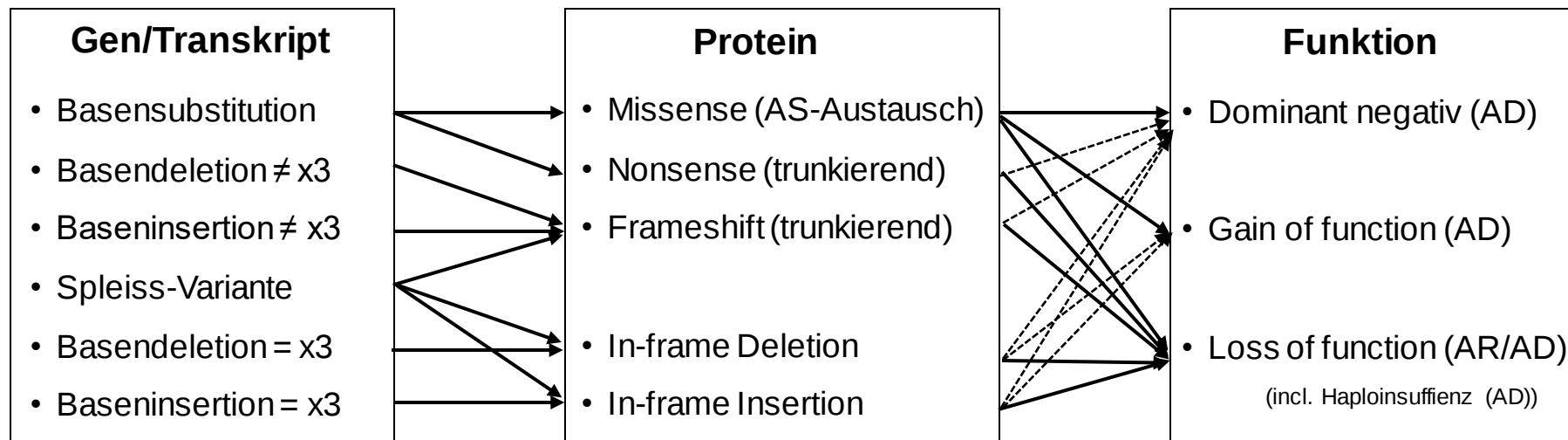
- Gen-Ersatz-Therapie
- Gentransfer → neue Funktion
- Genomeditierung

- siRNA
- Antisense-Oligonukleotide (ASO)

- «Read-Through»-Therapie

- Protein-Modulatoren

Varianten und ihre Konsequenzen



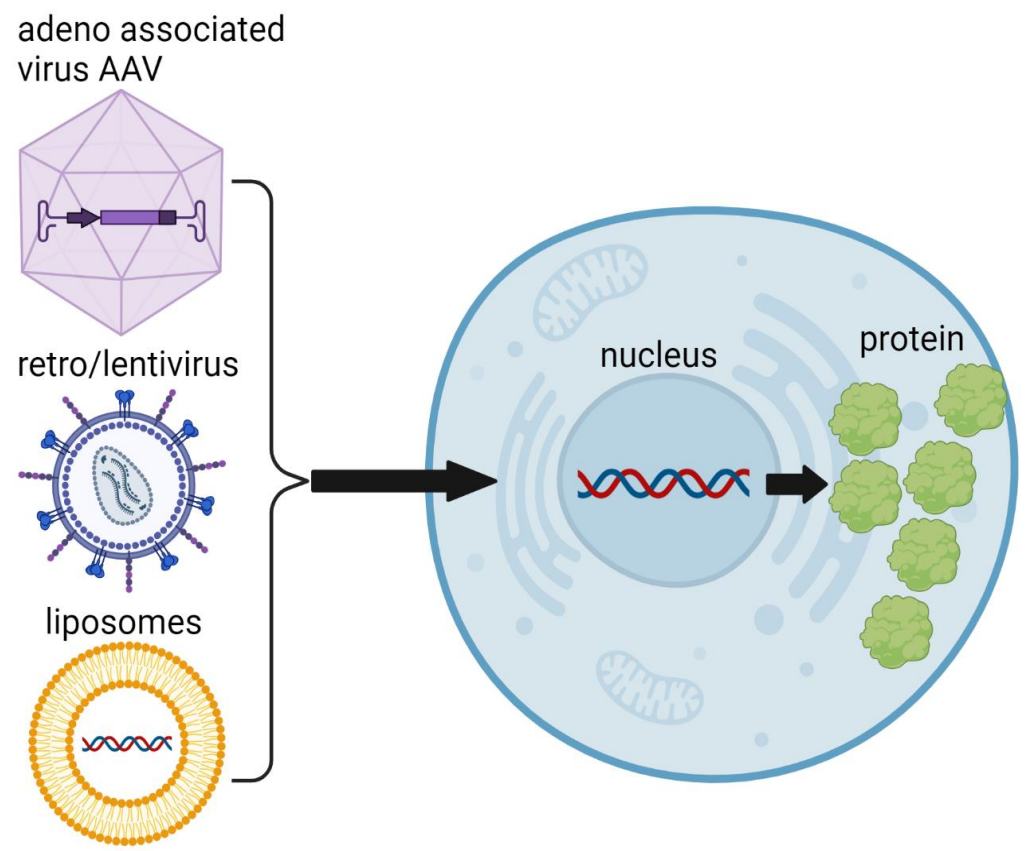
Effekt der Variante	Pathomechanismus	Möglicher Wirkmechanismus
Dominant negativ	Mutiertes Allel beeinträchtigt auch Funktion des zweiten Allels	Inaktivierung mutiertes Allel?
Gain of function	Funktionszugewinn, z.B. Aktivierung Rezeptor, toxische Aggregate	Inaktivierung mutiertes Allel?
Loss of function	Funktionsverlust, bei trunkierenden Varianten (ausser C-terminal) meist durch nonsense mediated mRNA-decay keine Proteinexpression	Gen-Ersatz? Verhinderung NMD? Aktivierung funktionales Allel?

Prinzipien der Gentherapie

- In den meisten Ländern nur somatische Gentherapie erlaubt
 - Genmodifikation nicht vererbbar
- *Ex vivo* Anwendung: Zielzellen werden aus dem Körper entnommen, ausserhalb modifiziert und in den Körper zurücktransferiert
- *In vivo* Anwendung: Modifikation direkt in Zielgewebe im Körper

1. Gen-Ersatz-Therapie

Intaktes Transgen wird mittels Vektor in die Zelle eingeschleust → Translation eines funktionalen Proteins



Vektorsysteme

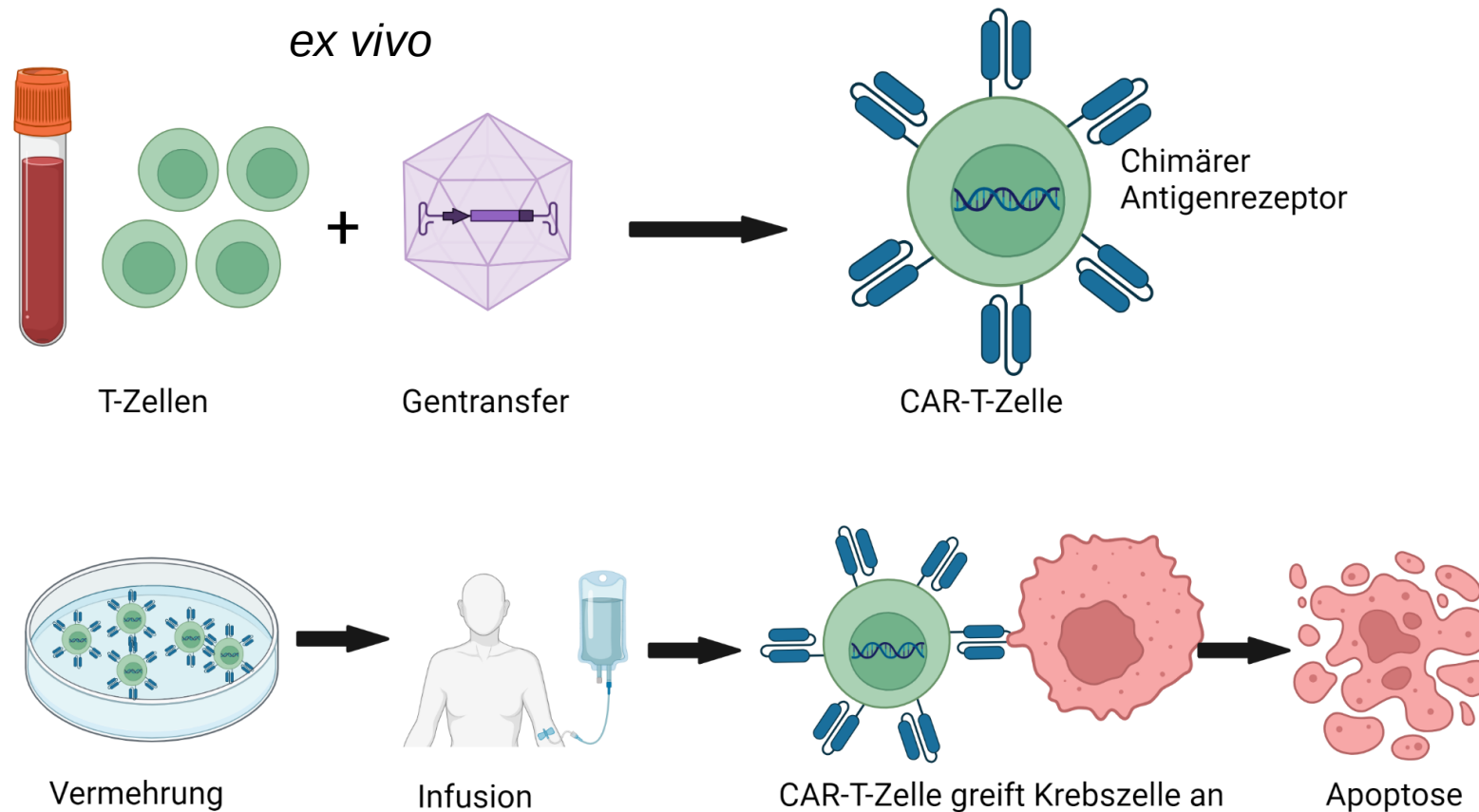
viral	Material	Nukleus	Zielzellen	Immunreaktion	Vorteile	Risiken/Limitationen
AAV	ssDNA	episomal	nicht-teilend	niedrig	nicht-integrierend, Tropismus	geringe Kapazität
RV/LV	RNA	integriert	teilend (+nicht-teilend)	niedrig	dauerhaft	Onkogenese
nicht-viral	Material	Nukleus	Zielzellen	Immunreaktion	Vorteile	Risiken/Limitationen
Liposomen	ssDNA	episomal	nicht-teilend	niedrig	nicht-integrierend	geringe Effizienz, ungezielt

Beispiele angewandeter AAV-Gen-Ersatz-Therapien

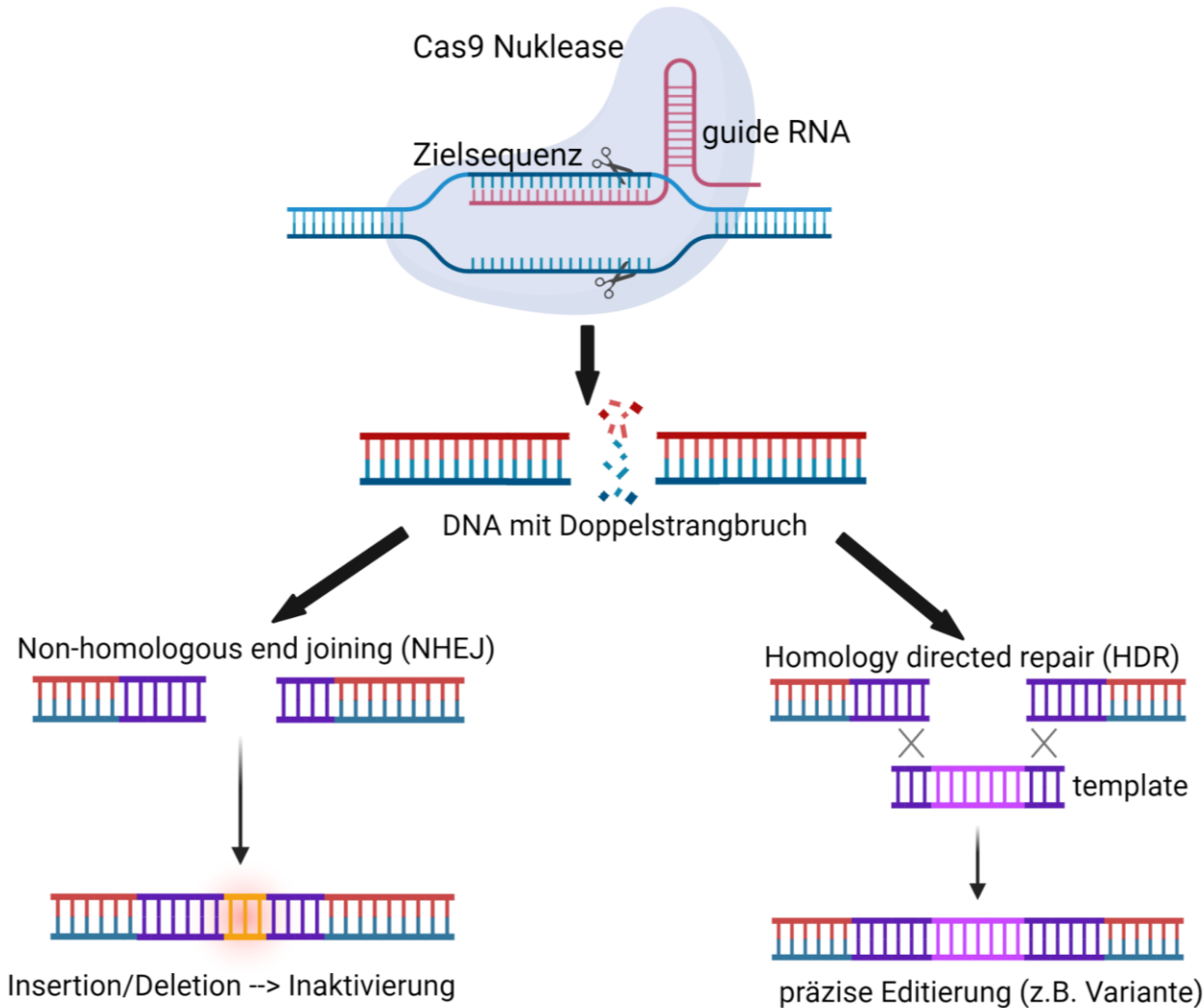
Indikation	Gen	Zielgewebe	Name	Handelsname
Spinale Muskelatrophie (AR)	<i>SMN1</i>	Motoneuronen (intravenös)	Onasemnogene abeparvovec	Zolgensma®
Retinitis pigmentosa und Lebersche kongenitale Amaurose (AR)	<i>RPE65</i>	Auge/Retina (subretinale Injektion)	Voretigene neparvovec	Luxturna®
Hämophilie A (XR)	<i>F8</i>	Leber (intravenös)	Valoctocogene roxaparvovec	Roctavian®
Hämophilie B (XR)	<i>F9</i>	Leber (intravenös)	Entranacogene dezaparvovec	Hemgenix®
Schwerhörigkeit (AR)	<i>OTOF</i>	Innenohr/Haarzellen	AAV1-hOTOF	

2. Gentransfer – neue Funktion

Beispiel: CAR-T-Zell-Therapien bei Malignomen (z.B. Leukämien, Lymphomen)



3. Gezielte Genom-Editierung – CRISPR/Cas9



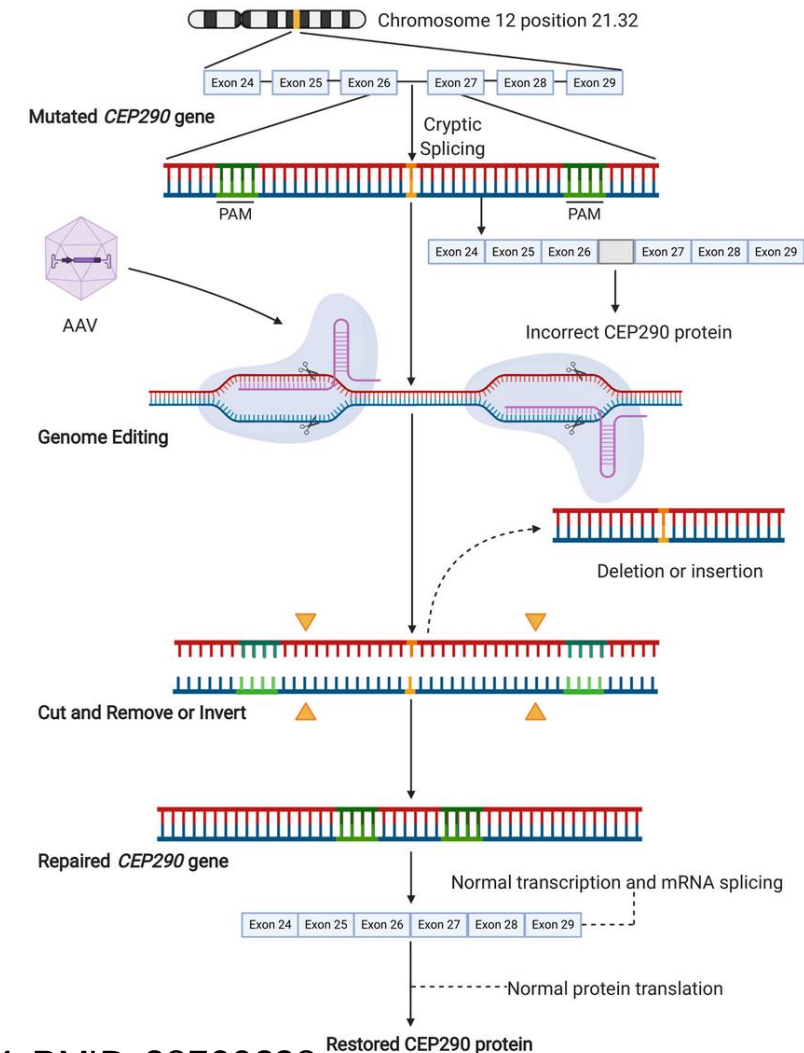
Risiken/Limitationen

- (virale) Vektoren
- Immunität gegen Cas9
- Off target Effekte
- Effizienz HDR << NHEJ
- HDR v.a. in proliferierenden Zellen

Genom-Editierung – Beispiel Varianten-spezifische Editierung

CEP290 assoziierte Retinadystrophie:

- 77% der Fälle: Variante in Intron 26
- Kryptische Splice-Site: Einschluss kryptisches Exon
- Leserasterverschiebung → nonsense-mediated mRNA decay
- **EDIT-101**: Entfernt Bereich mit intronischer Variante
- → korrektes Spleissen → intaktes Protein

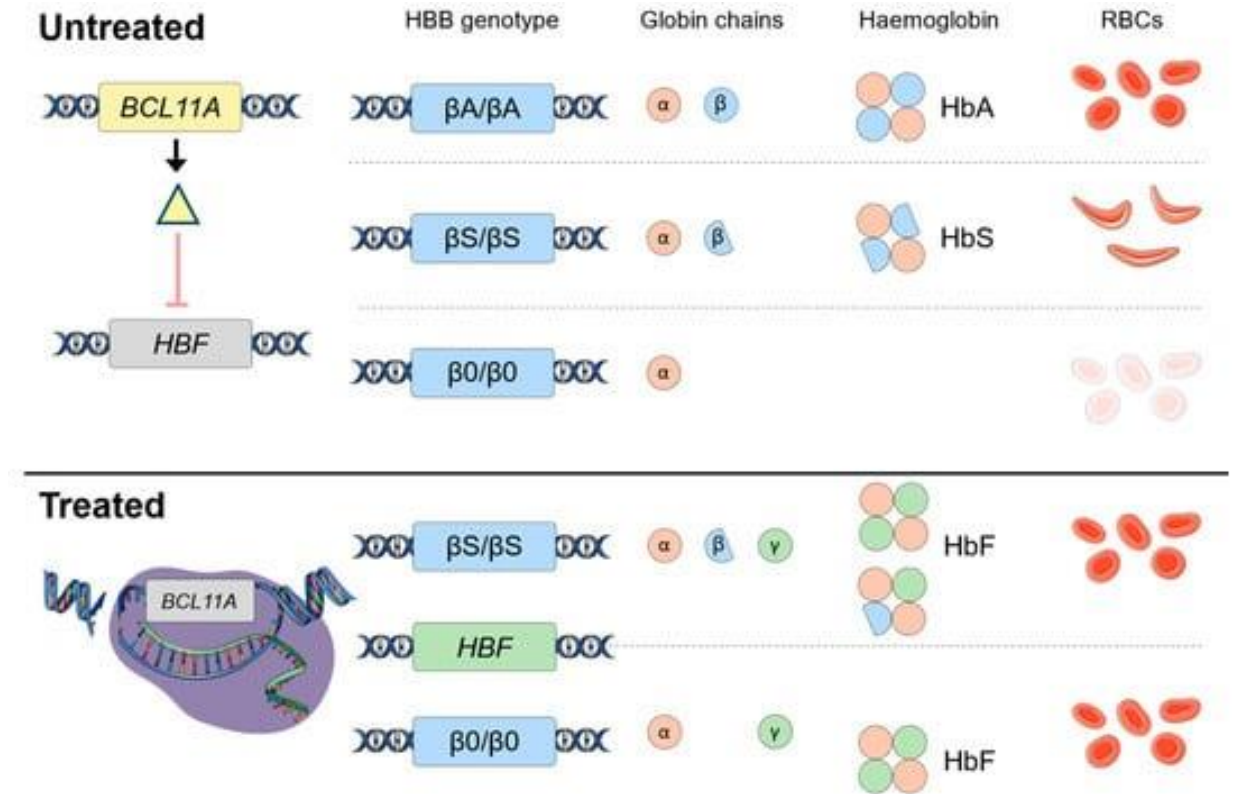


Pierce et al., NEJM, 2024, PMID: 38709228

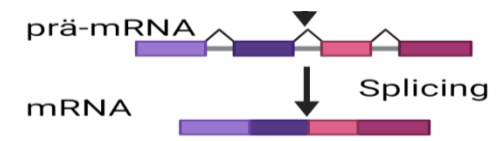
Genom-Editierung – Beispiel Gen-Inaktivierung

Sichelzellanämie, beta-Thalassämie

- Defektes oder fehlendes beta-Globin
- **Casgevy® (Exagamglogene Atotemcel):**
- Inaktiviert BCL11A: Repressor fetales Hb
- Fetales Hb bleibt erhalten

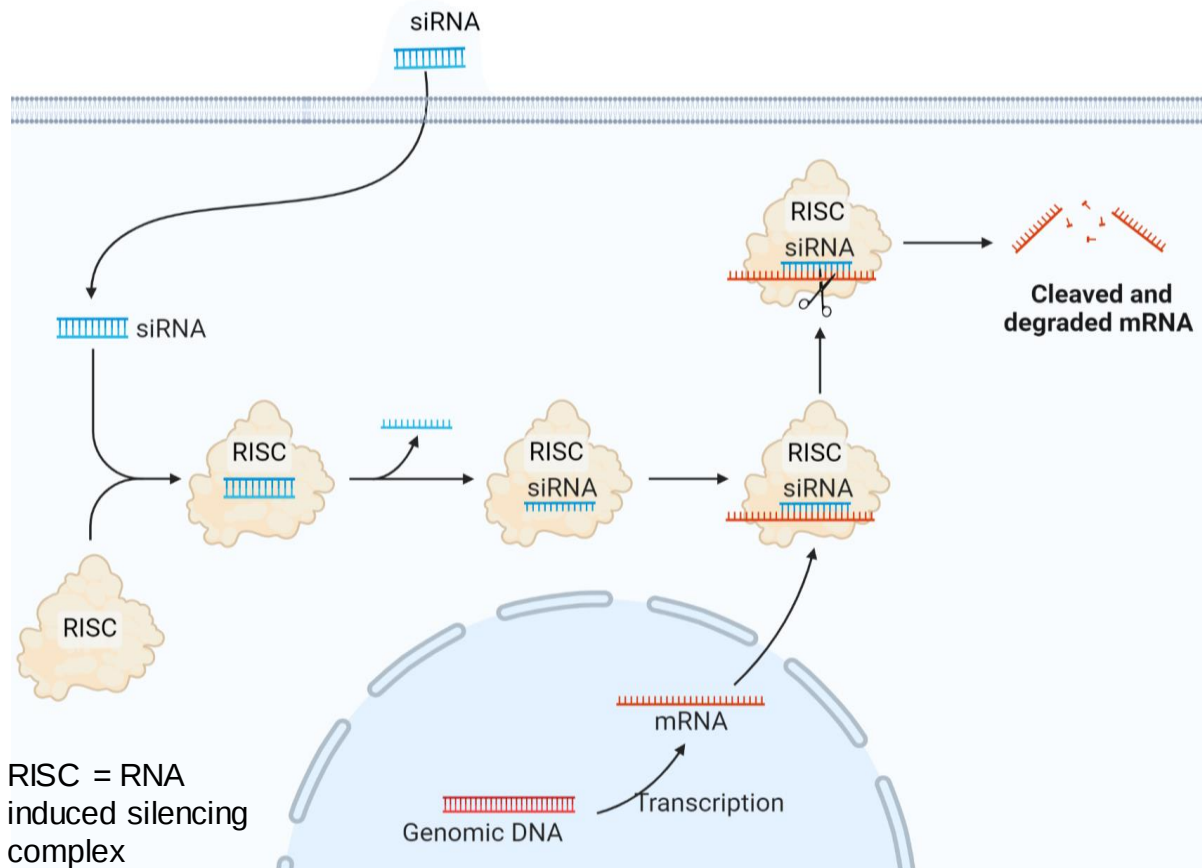


Kerwash et al., Curr. Issues Mol.Biol, 2024, PMID: 39194702



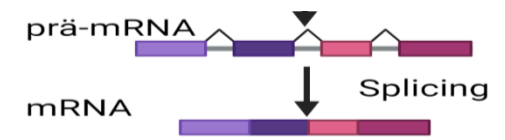
4. RNA basiertes Gen-Silencing

Short interference RNA (siRNA)

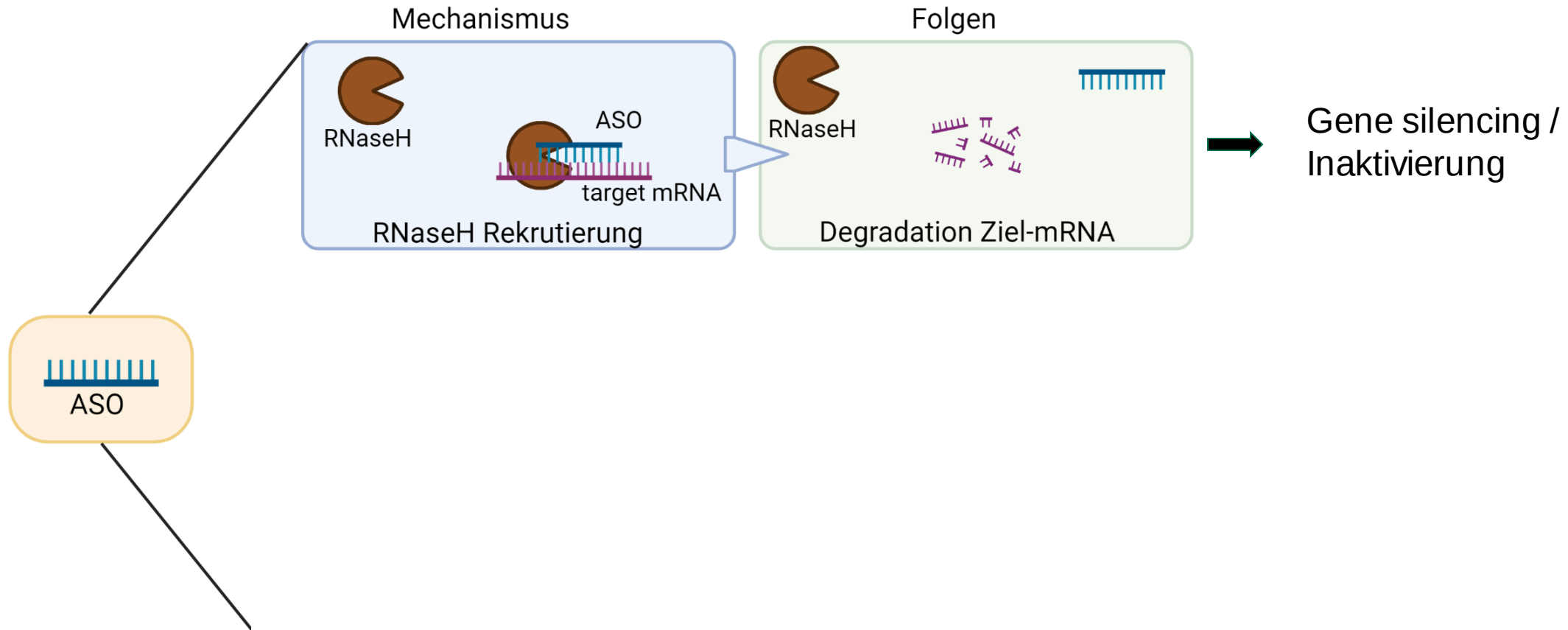


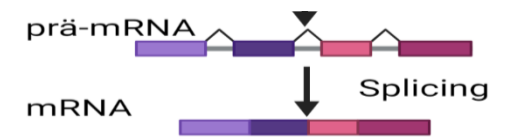
Beispiele siRNA Therapie:

Indikation	Gen	Name
Hereditäre Transthyretin-Amyloidose	<i>TTR</i>	Patisiran (Onpattro®), Vutrisiran (Amvuttra®)
Akute hepatische Porphyrie	<i>ALAS1</i>	Givosiran (Givlaari®)
Primäre Hyperoxalurie Typ I	<i>HAO1</i>	Lumasiran (Oxlumo®)
Fam. Hypercholesterinämie	<i>PCSK9</i>	Inclisiran (Leqvio®)

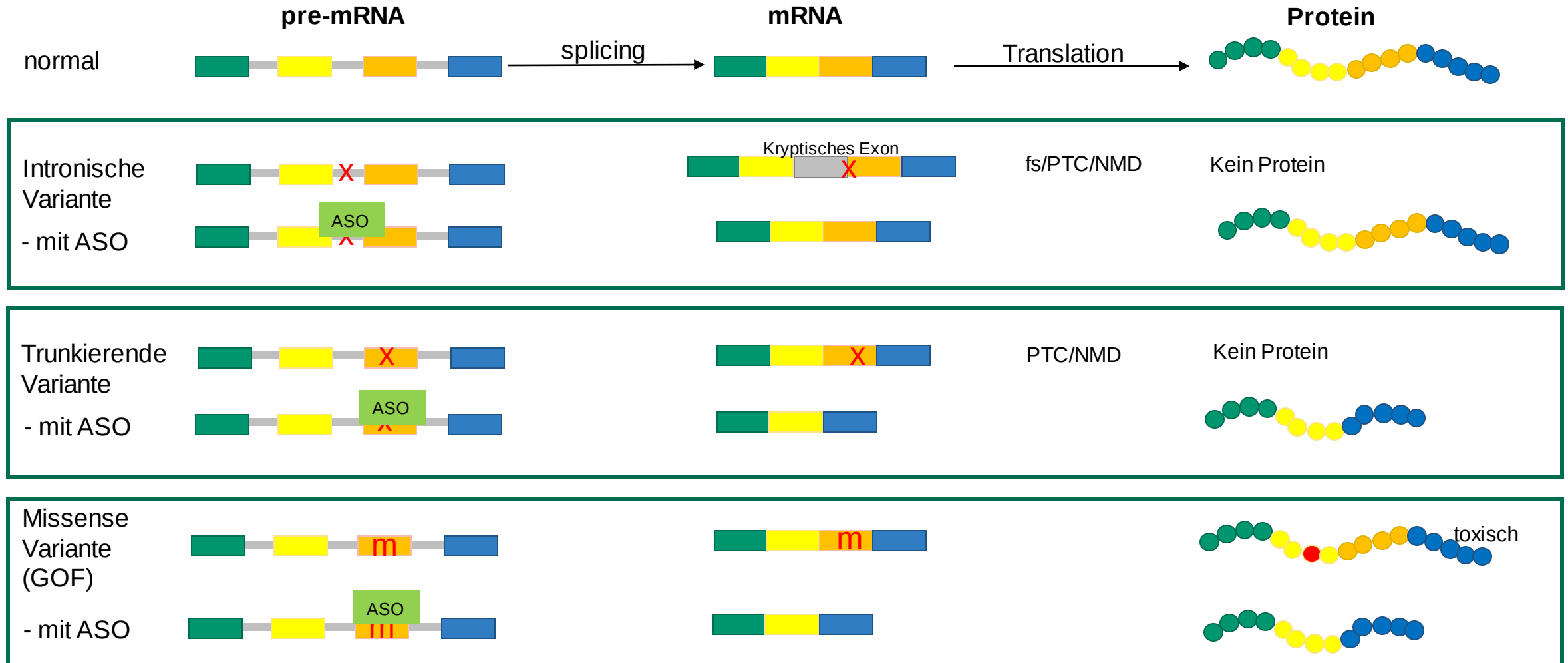


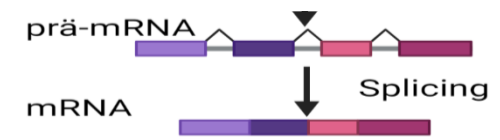
5. RNA-basierte Modulation mittels Antisense-Oligonukleotiden





Beispiele Spleiss-Modulations-Effekte



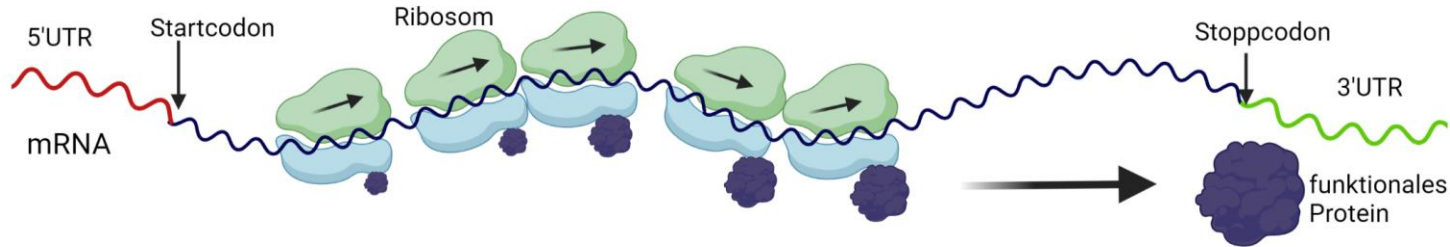


Beispiele ASO-Therapien und Therapie-Ansätze

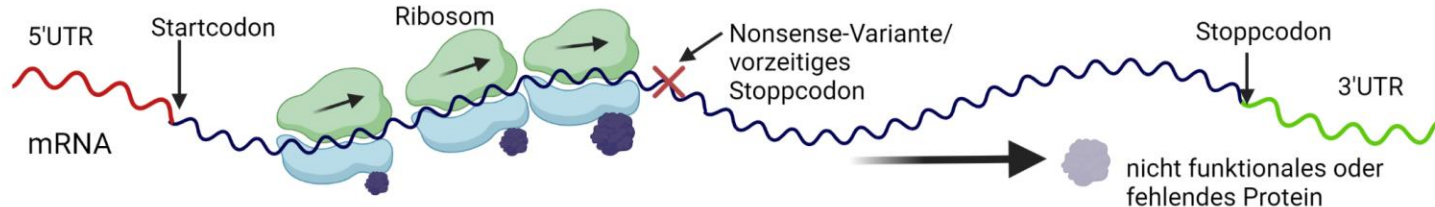
Krankheit	Ursache	ASO-Mechanismus	Medikament
Spinale Muskelatrophie	Bi-allelische Deletion Exon 7 (+8) <i>SMN1</i>	Exon-Einschluss in SMN2 → Aktivierung Pseudogen	Nusinersen (Spinraza®)
Muskeldystrophie Duchenne	v.a. frameshift Deletionen <i>DMD</i>	Exon-Skipping → Umwandlung frameshift in in-frame Deletionen	z.B. Eteplirsen (Exon 51), Golodirsen (Exon 53)
Dravet-Syndrom	<i>SCN1A</i> Haploinsuffizienz	Skipping nicht-produktives, alternatives Exon → mehr produktive wt mRNA und Protein	STK-001 (Phase I)
Spinocerebelläre Ataxie 3	Repeatexpansion in <i>ATXN3</i>	Skipping Exon 10 mit toxischem Repeat	präklinisch
Ceroidlipofuszinose	N=1: <i>CLN7</i> cryptic splice-site	Blockieren einer kryptischen Splice-Site	Milasen (n=1)
Angelman-Syndrom	Verlust maternales aktives <i>UBE3A</i> -Allel (paternales Allel durch <i>UBE3A</i> antisense transcript gesilencet)	Aktivierung paternales Allel durch Inhibierung der <i>UBE3A</i> -ATS-Expression	GTX-102, Phase I/II Studien

6. Read-through Therapie bei Nonsense-Varianten

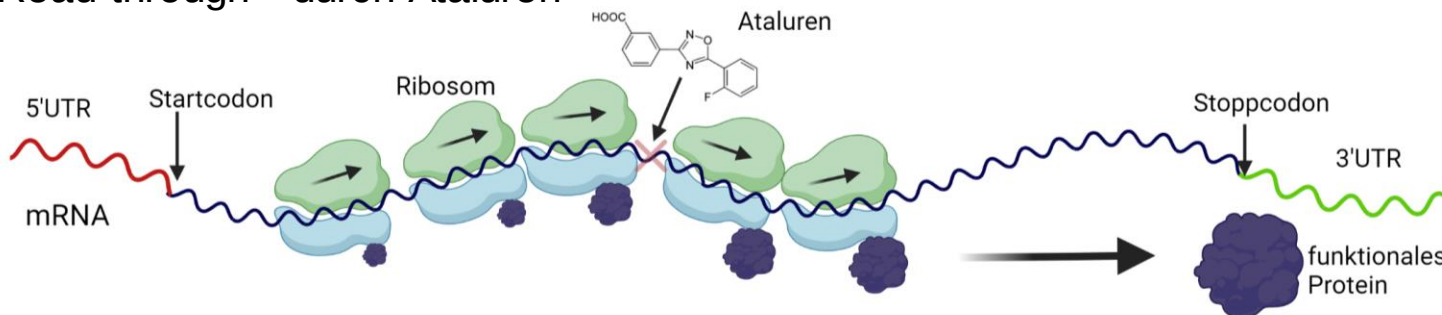
Normale Translation



Translationsabbruch durch Nonsense-Variante



«Read-through» durch Ataluren



Ataluren (Translarna™)

- «maskiert» Nonsense-Varianten
- Anwendungsbeispiel: Duchenne Muskeldystrophie
- Limitation: <10% Nonsense-Varianten

Weitere experimentelle/präklinische Gentherapie-Ansätze

Beispiele:

- CRISPR vermitteltes Prime-editing: nCas9 + reverse Transkriptase + prime-editing guide RNA: gezielte Korrektur aller Arten von Varianten ohne vorherige Doppelstrangbrüche oder template DNA
- CRISPR-vermittelte Aktivierung (CRISPRa) von endogenen Promotoren oder Enhancern → Hochregulation Wildtyp-Allel bei Haploinsuffizienz (halbierte Dosis)
- Suppression-replacement (SupRep) Therapie: gemeinsames Konstrukt mit Gen-shRNA (sup) und shRNA immune Gen-cDNA (rep)

Zusammenfassung und Ausblick

- Grosse Fortschritte durch Neuentwicklungen und Optimierungen
- Vielzahl verschiedener Ansätze

Limitationen und Herausforderungen:

- Bisherige Therapien sehr spezifisch für bestimmte Gene und/oder Varianten
 - limitierte Ansatzpunkte bei genetisch heterogenen Krankheiten
 - limitierte Ansatzpunkte bei multifaktoriellen Krankheiten
- Delivery, Zell- und Gewebespezifität
- Wichtige Voraussetzung: Verständnis der Variantenkonsequenzen und der Pathomechanismen