

## Kapitel 31

# Die somatische Gentherapie von Stammzellen bei Fanconi-Anämie

**Helmut Hanenberg**

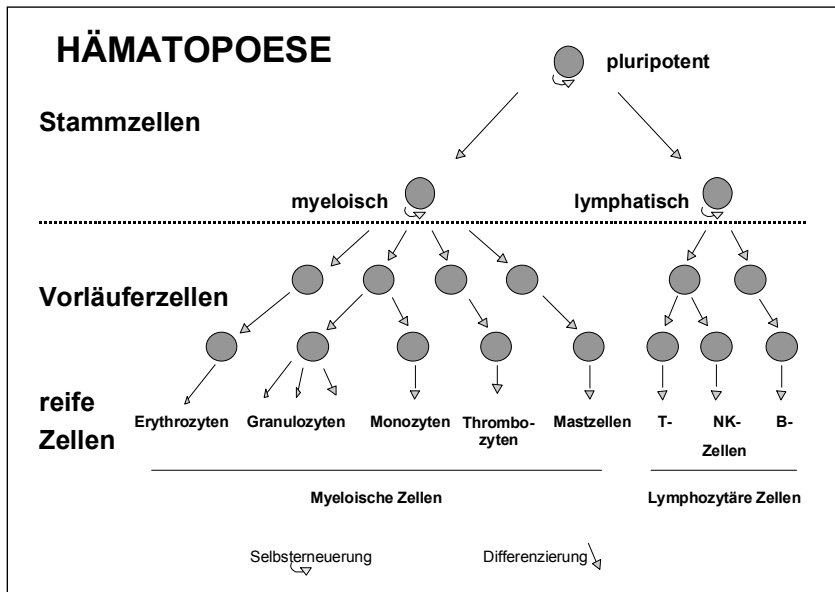
Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

### *Aufbau des blutbildenden Systems und Stammzelltransplantation*

Die Zielzellen der Gentherapie bei erblichen Erkrankungen des Blut- und Immunsystems sind die sogenannten blutbildenden (= hämatopoetischen) *Stammzellen*. Diese Stammzellen kommen nur im Knochenmark vor und sind durch zwei besondere Eigenschaften charakterisiert.

Zum einen vermehren/teilen sie sich, ohne sich dabei zu verändern oder zu altern. Bei jeder Zellteilung sind die beiden Tochterzellen identisch mit der Ausgangszelle (= Selbsterneuerung), d. h. die Stammzellen sind praktisch gesehen unsterblich. Alle anderen Zellen der Hämatopoese haben dagegen eine begrenzte Lebensdauer von Tagen bis Jahren und sterben danach ab.

Zum anderen kann aus den pluripotenten Stammzellen jede Zelle des Blut- und Immunsystems durch eine geordnete Abfolge von Veränderungen (= Differenzierungen) entstehen. Diese Veränderungen sind nicht umkehrbar, so dass selbst aus den myeloischen und lymphatischen Stammzellen (vermutlich auch noch mit Selbstvermehrungspotential) nur Zellen der myeloischen bzw. lymphatischen Reihe entstehen können. Auf jeder Differenzierungsstufe findet eine zigfache Vermehrung statt, so dass aus wenigen Stammzellen - in Mausexperimenten minimal drei bis fünf Zellen - die gesamte Hämatopoese wieder gebildet werden kann.



**Die Hierarchie in der Hämatopoese.** *Selbsterneuerung und Differenzierung sind durch entsprechende Pfeile kenntlich gemacht.*

Bei einer *Stammzelltransplantation* werden die körpereigenen (= autologen) Stammzellen durch die Konditionierung (= Chemotherapie ± Bestrahlung) abgetötet, wodurch das gesamte hämatopoetische System dauerhaft vernichtet wird. Nach Elimination der Chemotherapie aus dem Körper wird dann eine geringe Anzahl an Stammzellen eines gesunden Spenders transplantiert (vermutlich bis zu 20 Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers). Das Anwachsen dieser Stammzellen führt zu einem Wiederauffüllen des Stammzellpools sowie einer kontinuierlichen Produktion aller Blut- und Immunzellen und ersetzt somit dauerhaft die gesamte Hämatopoese des Empfängers. Dieser hierarchische Aufbau des hämatopoetischen Systems ist der Grund dafür, dass angeborene Erkrankungen des Blut- und Immunsystems durch die einmalige Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen eines gesunden Spenders langfristig geheilt werden können.

Bei einer *Stammzelltransplantation* werden durch die Konditionierung viele Organe wie z. B. Lungen, Nieren, Herz, Knochen

oder auch Drüsen dauerhaft geschädigt, so dass in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung besondere Maßnahmen nach einer erfolgreichen Transplantation getroffen werden müssen. Je nach zugrunde liegender Erkrankung und Vorbehandlung sterben bis zu 30% der Patienten unmittelbar an Therapie-assoziierten Komplikationen wie der akuten Schädigung des Körpers durch die Konditionierung (= Toxizität), dem Nichtanwachsen der transplantierten Stammzellen (Transplantatversagen = *graft failure*), immunologischen Unverträglichkeitsreaktionen (Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung = *Graft-versus-Host Disease*) sowie durch Infektionen oder Blutungen. Langfristig kommt es durch die Konditionierung bei einem Teil der Patienten zur Entstehung von Tumoren, die dann aufgrund der Vorschädigung des Körpers durch die Konditionierung nur unzureichend chemo- und/oder radiotherapeutisch behandelt werden können.

Vor diesem Hintergrund erscheint die *somatische Gentherapie* (= an Körperzellen, nicht an Samen- oder Eizellen) von autologen hämatopoetischen Stammzellen als besonders sinnvolle Alternative. Hierbei wird eine gesunde Kopie des defekten Gens stabil in die Stammzellen eingebracht und die korrigierten Zellen werden *ohne Konditionierung* infundiert. Nach erfolgreicher Gentherapie bildet sich dann ein Blut- und Immunsystem mit normalen (= korrigierten) Zellen aus, so dass die mannigfaltigen Probleme einer klassischen Stammzelltransplantation vermieden werden können.

### ***Grundlagen und Ablauf der Gentherapie***

Um ein gesundes Gen dauerhaft in hämatopoetische Stammzellen einzubringen, muss es in deren genetischer Information verankert werden. Nur dann wird diese gesunde Kopie des Gens bei allen Teilungen der Zelle als Teil der genetischen Information an die Tochterzellen und deren Nachkommenschaft weitergereicht und ist somit dauerhaft in jeder Zelle des Blut- und Immunsystems vorhanden.

Im Laufe der Evolution sind zahlreiche Schutzmechanismen in den Zellen höherer Organismen entstanden, um die eigene Erb-

information vor äußeren Einflüssen zu schützen und somit das Überleben als Spezie zu sichern. Deshalb ist es auch heutzutage noch außerordentlich schwierig, mit chemischen oder physikalischen Methoden genetische Informationen wie z. B. eine gesunde Kopie eines Gens dauerhaft in menschliche Stammzellen einzubringen.

Bei der Gentherapie von Stammzellen werden Retroviren als Transportsystem benutzt, weil diese im Rahmen der Evolution besondere Mechanismen entwickelt haben, um ihre eigene Erbinformation dauerhaft in fremde Zellen einzubringen.

Da alle natürlich vorkommenden Retroviren - bis auf eine Ausnahme (= Foamyviren) - mit spezifischen Erkrankungen einhergehen, werden sie für den Einsatz beim Menschen mit molekular-genetischen Methoden so verändert, dass sie als sogenannte retrovirale Vektoren keine eigenen Gene mehr tragen und praktisch kein Gefahrenpotential mehr haben.

Die bei Menschen bisher eingesetzten *retroviralen Vektoren* stammen fast alle von einfachen Maus-Leukämie-Retroviren und nur in zwei Studien vom humanen Immundefizienz-Virus (HIV) ab. Die Erbinformation dieser Viren wird weitgehend durch die normale Kopie eines menschlichen Gens ersetzt und das Konstrukt Baustein für Baustein analysiert (= sequenziert). Für eine klinische Anwendung erfolgt dann die Herstellung von künstlichen Retroviren, die zum einen die menschlichen Zellen nur einmal befallen und sich somit nicht ausbreiten können (= replikationsdefekte Viren) und die zum anderen die genetische Information für das gewünschte Gen tragen. Die Produktion findet unter den Herstellungsbedingungen für Arzneimittel in speziellen Labors (*Good Manufacturing Practise = GMP*) statt.

Die künstlichen Retroviren werden abschließend hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Effizienz, das gewünschte Gen zu übertragen, überprüft und zahlreichen Sicherheitstests unterzogen. Bis zur klinischen Anwendung werden sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Hämatopoetische *Stammzellen als Zielzellen* für die Gentherapie findet man unter normalen Bedingungen nur im Knochen-

mark. Nur bei Anwendung von Wachstumsfaktoren wie dem „Granulozyten-Kolonien stimulierenden Faktor“ (G-CSF) oder nach Chemotherapie werden hämatopoetische Stammzellen vorübergehend ins periphere Blut ausgeschwemmt.

Stammzellen können somit durch eine Knochenmarkentnahme oder auch nach Gabe von G-CSF im Rahmen einer Filterung (= Apherese) aus dem *peripheren Blut* gewonnen werden. Anhand eines speziellen Rezeptors auf der Oberfläche der Stammzellen, CD34 genannt, lassen sie sich von den übrigen gefilterten Zellen abtrennen.

Für die *Gentherapie* werden diese Zellen für ein bis zwei Tage mit rekombinanten (= künstlich hergestellten) menschlichen Wachstumsfaktoren (z. B. mit Stammzellfaktor, Thrombopoetin, G-CSF) zur Teilung angeregt und dann auf einem künstlichen Eiweißmolekül (Fibronektin) mit den retroviralen Vektoren bei 37° C für zwei bis drei Tage in Kultur gehalten (= transduziert). Auf Fibronektin binden die künstlichen Retroviren effektiv an die Stammzellen und werden in die Zellen aufgenommen. Schließlich erfolgt der weitgehend zufällige Einbau (= Integration) ihrer genetischen Information in das menschliche Genom der Zelle. Am fünften Tag werden die Gen-korrigierten Stammzellen aus der Kultur geerntet, gewaschen und als Infusion über eine Vene dem Patienten zurückgegeben.

Da es sich hierbei um körpereigene Zellen handelt, die vom Immunsystem des Patienten nicht als fremd erkannt werden, kann die Infusion ohne eine Vorbehandlung des Patienten, d. h. ohne Unterdrückung (= Immunsuppression) oder Vernichtung (= Konditionierung) des Immunsystems des Empfängers erfolgen. Die Stammzellen finden von allein ihren Weg ins Knochenmark, wachsen dort an und nehmen ihre normalen Funktionen auf.

Die korrigierten Stammzellen und alle aus ihnen entstehenden Zellen geben dann bei jeder Zellteilung die gesunde Kopie des defekten Gens an ihre Nachkommenschaft weiter. Sollte diese Nachkommenschaft aufgrund der gesunden Kopie ein besseres Wachstum und somit eine bessere Überlebenschancen-

keit haben, so ist zu erwarten, dass allmählich das gesamte defekte Blut- und Immunsystem durch normale (= korrigierte) Zellen ersetzt und der Patient im hämatopoetischen System von seiner erblichen Erkrankung geheilt wird.

### ***Klinische Anwendungen von retroviralen Vektoren beim Menschen***

Bis 2002 wurden weltweit 217 klinische *Gentherapieprotokolle* veröffentlicht, in denen insgesamt 1757 Patienten mit retroviralen Vektoren transduzierte Zellen erhielten. Bis zum Frühjahr 2003 erhielten mindestens 232 Patienten in 40 klinischen Studien durch retrovirale Vektoren genetisch veränderte Stammzellen. Achtzehn klinische Studien wurden bei Patienten mit monogenetischen Erkrankungen (= Erkrankungen, die durch Mutationen in einem einzigen Gen bedingt sind) durchgeführt, zwei davon bei Patienten mit Fanconi-Anämie mit Defekten im *FANCA*- und *FANCC*-Gen.

Aufgrund zahlreicher technischer Probleme beim Einsatz von künstlichen Retroviren sowie ungenügenden Kenntnissen über die Kultivierung menschlicher Stammzellen *in vitro* führte die Gentherapie von Stammzellen in den ersten 10 Jahren bei keinem der Patienten zu einer Besserung der klinischen Symptome oder gar zur Heilung der Erkrankungen. Trotz sehr erfolgreicher Studien in verschiedenen Tiermodellen für menschliche Erkrankungen war der Einsatz beim Menschen daher kritisch zu sehen.

Der eigentliche Beweis dafür, dass eine Stammzell-Gentherapie Erkrankungen beim Menschen heilen kann, gelang erst im Jahr 2000 - mehr als ein Jahrzehnt nach der ersten klinischen Gentherapiestudie im Jahr 1989 - bei Patienten mit einem normalerweise im ersten Lebensjahr tödlich verlaufenden schweren kombinierten Immundefekt (SCID). Dieser Immundefekt ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung (X-SCID), bei der aufgrund eines defekten Interleukin-2 (IL2)-Rezeptor-Gens die T- und NK-Zellen bei den betroffenen Jungen fehlen und das lymphati-

sche System nicht funktionell ist. Die einzige Heilung dieser Patienten lag bis dahin in einer Transplantation von fremden (= allogenen) Stammzellen eines gesunden Spenders.

Aus Paris berichteten Marina Cavazzano-Calvo und Alain Fischer vom „Hôpital Necker Infants Malade“ im Jahr 2000 von der Heilung zweier betroffener Kinder, die durch den Transfer einer gesunden Kopie des IL2-Rezeptor-Gens in autologe Stammzellen mittels eines retroviralen Vektors erreicht wurde. Dazu wurden die aus dem Knochenmark der Kinder isolierten CD34+ Stammzellen für einen Tag mit Wachstumsfaktoren in Kultur vorstimuliert. Darauf folgte eine dreitägige Inkubation der Zellen auf Fibronectin mit den entsprechenden künstlichen Retroviren.

Am fünften Tag wurden die autologen Stammzellen ohne jegliche Vorbehandlung des Patienten in eine Vene als Infusion zurückgegeben. Trotz einer niedrigen Gentransfer-Effizienz ließen sich bereits nach 15 Tagen korrigierte T-Zellen im peripheren Blut nachweisen. Drei Monate nach der Gentherapie konnten die Patienten nach Hause entlassen werden, da sich aus den Gen-korrigierten Zellen ein gesundes Immunsystem entwickelt hatte. Bis 2003 sind zehn X-SCID-Patienten in Paris mit dieser Stammzell-Gentherapie behandelt worden. Nur ein Patient wurde durch die Gentherapie nicht geheilt und erhielt eine klassische allogene Stammzelltransplantation.

Zwei Jahre nach dieser Veröffentlichung aus Paris berichtete die Arbeitsgruppe um Claudio Bordignon aus Italien von der Heilung zweier Patienten mit einem anderen (unbehandelt tödlich verlaufenden) Immundefekt, dem Adenosindeaminase-Mangel („ADA-SCID“). Sie erhielten eine Stammzell-Gentherapie mit praktisch gleichem Transduktionsprotokoll, aber zusätzlicher milder Chemotherapie vor Transfusion der Gen-korrigierten Zellen.

Bei beiden SCID-Erkrankungen handelt es sich um Immundefekte, die unbehandelt im ersten Lebensjahr tödlich verlaufen. Von dem genetischen Defekt sind funktionell nur Zellen des lymphatischen Systems betroffen (T- und NK-Zellen fehlen, bei ADA-SCID auch B-Zellen), während die Zellen der anderen häma-

topoetischen Reihen (Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten) in normaler Zahl vorhanden und funktionsfähig sind.

Bei beiden Erkrankungen wurde erstmals Mitte der 90er Jahre jeweils ein Patient beschrieben, bei dem eine spontane Rückmutation der von der Mutter geerbten Mutation in lymphatischen Stammzellen aufgetreten war. Bei beiden Patienten ersetzen diese im Sinne einer *natürlichen Gentherapie* (= *Mosaik-Bildung*) entstandenen normalen (= korrigierten) Zellen die fehlenden T- und NK-Zellen, wodurch die Patienten klinisch geheilt wurden. In Zellen der myeloischen Reihe war dagegen die Korrektur der vererbten Mutation nicht nachweisbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das IL-2-Rezeptor-Gen in Stammzellen und myeloischen Zellen nicht abgelesen wird. Somit brachte die spontane Korrektur den genetisch *normalen* Stamm- und myeloischen Zellen keinen Selektionsvorteil, so dass die wenigen Zellen unter der Nachweisgrenze bei den Analysen blieben.

### ***Tumorentstehung durch die Integration von Retroviren ins Genom***

Normale (= Wildtyp-) Retroviren integrieren größtenteils zufällig in die genomische DNA der Wirtszelle. Dabei können sie durch ihren Integrationsort zu Störungen in der Kontrolle von einzelnen Genen führen.

Durch die in der Gentherapie angewandten Wildtyp-Maus-Leukämie-Retroviren können in Mäusen Leukämien induziert werden. Aus Affenversuchen ist bekannt, dass nach intravenöser Gabe dieser Wildtyp-Retroviren bei ca. der Hälfte der Tiere Lymphome auftreten. Die Häufigkeit, mit der durch die Integration von Wildtyp-Retroviren ins Genom messbare Veränderungen des Verhaltens in einer Zelle induziert werden, wurde im Labor in menschlichen Tumor-Zelllinien mit einer Wahrscheinlichkeit von kleiner als  $1:10^7$  bestimmt. Da für die Entstehung von Tumoren aber mehrere bestimmte Ereignisse in einer Zelle nötig sind, wird die Wahrscheinlichkeit einer Entartung von Zellen durch die Integration von Wildtyp-Retroviren als noch viel geringer angenommen.

Bis September 2002 wurde davon ausgegangen, dass die retroviralen Vektoren sicher in der Anwendung beim Menschen sind. Auch in tierexperimentellen Studien war im Frühjahr 2002 nur ein Tier - eine Maus - publiziert worden, bei der es durch die Integration eines retroviralen Vektors im Rahmen einer Stammzell-Gentherapie zu einer akuten myeloischen Leukämie (= AML) gekommen ist.

Im September und im Dezember 2002 wurde von der Pariser Arbeitsgruppe berichtet, dass bei zwei ihrer durch die Genkorrigierten Zellen geheilten X-SCID-Patienten ca. 30 Monate nach der Gentherapie T-Zell-Leukämien aufgetreten waren. Molekulargenetische Untersuchungen zeigten, dass überraschenderweise bei beiden Patienten eine einzelne Kopie des retroviralen Vektors in den Leukämieblasten in das gleiche Gen (LMO2 genannt) an fast der gleichen Stelle integriert hatte.

LMO2 ist ein Gen, welches normalerweise nur in Stammzellen und in Vorläufern roter Blutzellen aktiv ist. Allerdings ist das LMO2-Gen auch bei spontan auftretenden T-Zell-Leukämien unkontrolliert angeschaltet, so dass es als ein Onkogen (= Tumorförderndes Gen) gilt.

In den Leukämiezellen beider Patienten ließen sich noch weitere genetische Veränderungen feststellen, von denen nicht klar ist, ob sie erst nach Integration des Vektors in eine Stammzelle entstanden sind oder ob der Vektor erst als zweites Ereignis eine bereits teilweise veränderte Zelle endgültig hat entarten lassen.

Bei den Ursachenanalysen zur Leukämieentstehung kristallisierte sich immer mehr heraus, dass es bei beiden Patienten zu einer unglücklichen Kombination von mindestens *vier Faktoren* gekommen zu sein scheint, von denen jeder für sich allein (oder auch zwei in Kombination) keine hinreichende Bedingung für die Entstehung einer Leukämie darstellt/en. Dies sind a) der starke retrovirale Vektor MFG mit dem IL-2-Rezeptor-Gen, b) die Integration in das LMO2-Gen, c) das Alter der Kinder (beide Jungen waren zum Zeitpunkt der Gentherapie noch jünger als 6 Monate) und d) die hohe Zahl transduzierter CD34+ Stammzellen pro kg Körpergewicht.

Nach diesen beiden Zwischenfällen wurden weltweit alle Genthapiestudien mit Retroviren gestoppt. Nach weitgehender Klärung der Ursachen der Leukämieentstehung und angesichts der Tatsache, dass diese zwei Kinder weltweit - auch in vergleichbaren Genthherapie-Protokollen für X-SCID in London und Sydney - die beiden einzigen Fälle geblieben sind, wurden inzwischen alle klinischen Studien wieder geöffnet. Für die X-SCID Patienten wurden neue Richtlinien zur Durchführung der Genthherapie erarbeitet; die Pariser Gruppe testet zurzeit „sicherere“ Vektoren mit einem veränderten Aufbau.

Insgesamt wird die somatische Genthherapie von Stammzellen bei Einhaltung bestimmter Sicherheitsregeln als relativ sicher angesehen, auch wenn das Risiko einer Leukämieinduktion deutlich höher ist, als es nach 12 Jahren Genthherapie (vor den Erfahrungen in Paris) angenommen wurde.

### ***Bisherige Studien zur Genthherapie bei Fanconi-Anämie (FA)***

Bisher wurden zwei *Studien zur Genthherapie* bei Patienten mit FA durchgeführt. Die erste Studie fand Anfang der 90er Jahre am National Institute of Health (NIH), Washington, an vier Patienten statt, die Mutationen im *FANCC*-Gen aufwiesen. Die vier Patienten erhielten mehrfach autologe CD34+ Stammzellen aus dem peripheren Blut, die mittels Vektor mit einer gesunden Kopie des *FANCC*-Gens ausgestattet worden waren. Bei allen Patienten waren nach jedem Zyklus korrigierte Zellen im Blut für Wochen bis wenige Monate nachweisbar, und die Blutwerte stiegen teilweise geringgradig an. Insgesamt waren diese Effekte aber nur vorübergehend nachweisbar und beeinflussten den natürlichen Verlauf der Erkrankung nicht.

Die Ergebnisse einer zweiten Studie von Christopher Walsh, durchgeführt in Chappel Hill, North Carolina, an FA-Patienten mit Mutationen im *FANCA*-Gen, wurden bisher nicht veröffentlicht. Aus persönlichen Mitteilungen ist allerdings erkennbar, dass die vier Patienten bisher klinisch ebenfalls

nicht von der Transfusion der korrigierten autologen Zellen profitiert haben.

Rückblickend muss man zu beiden Studien sagen, dass zum Zeitpunkt der Durchführung die technischen Voraussetzungen für einen effektiven retroviralen Gentransfer in Stammzellen noch nicht gegeben waren, so dass in beiden Studien wahrscheinlich keine Stammzellen, sondern CD34+ Vorläuferzellen die gesunde Kopie des FA-Gens bekommen hatten. Aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer starben die korrigierten Vorläuferzellen und deren Nachkommenschaft aber Wochen bis Monate nach der Gentherapie ab, so dass keine langfristigen Effekte zu erreichen waren und die Patienten keinen klinischen Nutzen von der Gentherapie hatten. Endgültige Aussagen zur Wirksamkeit einer Stammzell-Gentherapie bei Patienten mit FA lassen sich deshalb aus diesen beiden Studien nicht ableiten.

### ***Prinzipielle Überlegungen zur Gentherapie bei Fanconi-Anämie***

Im Gegensatz zu den beiden Immundefekt-Erkrankungen X-SCID und ADA-SCID sind bei Patienten mit Fanconi-Anämie alle Reihen des Blut- und Immunsystems von dem genetischen Defekt betroffen. Aufgrund der unterschiedlichen Lebensdauer der einzelnen Zellen im Blut manifestiert sich die FA besonders in den Zellreihen mit hohem Umsatz bzw. einer kurzen Lebensdauer, also bei den Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Klinisch imponiert dieser Ausfall als Anämie mit Leistungsschwäche, Thrombozytopenie mit Blutungsneigung und Neutropenie mit besonderer Anfälligkeit für bakterielle Infektionen. Ausfälle im lymphozytären System bei T-, B- oder NK-Zellen spielen dagegen klinisch keine Rolle, da die Lebensdauer dieser Zellen Jahre bis Jahrzehnte beträgt.

Bei mehreren FA-Patienten konnten wir eine klinische Besserung bis dauerhafte Heilung der Verminderung aller hämatopoetischen Zellreihen (= Panzytopenie) beobachten. Molekulargenetische Untersuchungen zeigten, dass diese Blutbildveränderungen durch

spontan entstandene Korrekturen einer der beiden vererbten Mutationen in dem jeweiligen FA-Gen zu erklären waren (= Mosaik-Bildung). Da diese Rückmutationen sowohl in myeloiden als auch in lymphatischen Zellen vorhanden waren und das Blutbild über Jahre hinweg stabil blieb, gehen wir davon aus, dass die Rückmutation initial in einer einzelnen Stammzelle stattgefunden hat. Deshalb sind wir sicher, dass die Fanconi-Anämie *prinzipiell* eine besonders gut für *gentherapeutische Anwendungen* geeignete Erkrankung ist, bei der aufgrund des Überlebensvorteils der korrigierten Stammzellen und ihrer Nachkommenschaft alle Defekte in der Hämatopoese dauerhaft und vollständig geheilt werden können.

Idealerweise muss die Gentherapie möglichst früh nach Manifestation der Erkrankung durchgeführt werden, da der kontinuierliche Verlust an Stammzellen als Zielzellen sowie die Anhäufung von strukturellen Veränderungen im Erbgut die Wahrscheinlichkeit, dass die Gentherapie dem Patienten klinischen Nutzen bringt, zunehmend verringert. Auch brauchen die wenigen korrigierten Stammzellen nach der Gentherapie ausreichend Zeit, um den Stammzellpool und gleichzeitig alle Zellreihen der Hämatopoese mit korrigierten Zellen aufzufüllen.

In den letzten Jahren ist allerdings auch klar geworden, dass die Durchführung der Gentherapie an CD34+ Stammzellen von FA-Patienten wesentlich schwieriger als bei Patienten mit anderen genetischen Erkrankungen ist. Dies ist zum einen auf die großen Schwierigkeiten zurückzuführen, Stammzellen von FA-Patienten aus dem häufig bereits zellarmen (= aplastischen) Knochenmark zu gewinnen, sie mehrere Tage in Kultur zu halten und dabei mit retroviralen Vektoren mit dem jeweiligen FA-Gen zu transduzieren. Zum anderen scheinen - zumindest in Mausmodellen mit defekten FA-Genen - notwendige Kulturbedingungen selbst Veränderungen (= Transformationen) hervorzurufen, die als Vorstufen von Leukämien gelten. In diesen tierexperimentellen Studien konnte aber auch herausgearbeitet werden, dass solche Veränderungen durch die Zugabe des fehlenden FA-Proteins vermieden werden können.

Seit Oktober 2004 wird von Patrick Kelly und David Williams in Cincinnati, Ohio, eine *Gentherapiestudie* durchgeführt, bei der

ein in Düsseldorf hergestellter retroviraler Vektor in einem modernen Protokoll für Patienten mit Mutationen im *FANCA*-Gen eingesetzt wird. Das primäre Ziel dieses Protokolls ist es, Aspekte der Verträglichkeit und Sicherheit (insbesondere auch der Induktion bzw. der Vermeidung von Leukämien durch die Gentherapie) und erst in zweiter Linie Aspekte der Wirksamkeit der Stammzell-Gentherapie als Alternative zur Stammzell-Transplantation zu berücksichtigen. Im gleichen Protokoll wird demnächst auch für Patienten mit Mutationen im *FANCG*-Gen ein ebenfalls in Düsseldorf konstruierter Vektor eingesetzt werden können. Sollten die initialen Ergebnisse vielversprechend sein, werden sicherlich andere Komplementationsgruppen folgen. Allerdings wird dies noch Jahre dauern.

Die Ergebnisse dieser Studie werden entscheidende Hinweise geben, ob *eine moderne Stammzell-Gentherapie bei Patienten mit FA* zurzeit durchführbar und sicher ist und ob auch ein klinischer Nutzen für die Patienten dabei entsteht. Wichtig ist, dass die Teilnahme an einer derartigen Gentherapiestudie ohne erkennbare Nachteile für die Patienten sein muss. Wenn, was als wahrscheinlich angenommen werden kann/muss, die Gentherapie nicht zu einer klinischen Heilung des Ausfalls im hämatopoetischen System führt, kann trotzdem ohne Nachteile für den einzelnen Patienten eine Stammzelltransplantation als etablierte Therapie durchgeführt werden.

Die Gefahr, dass durch die Gentherapie der Stammzellen eine Leukämie induziert wird, ist zwar als gering einzustufen, aber aufgrund der Ergebnisse in Mausmodellen mit defekten *FA*-Genen durchaus vorhanden. Allerdings muss dieses unbekanntes Risiko der Leukämieinduktion angesichts der Tatsache, dass bei knapp 20% der *FA*-Patienten im Alter von 20 Jahren *eine AML spontan entsteht*, mit den Patienten und Angehörigen diskutiert und gegenüber den möglichen Vorteilen durch die Teilnahme an einer derartigen Studie sorgfältig abgewogen werden.

Wie immer die Entscheidung zur Teilnahme an einer derartigen Studie von Seiten der Patienten und Familien oder der Ärzte und Wissenschaftler auch ausfällt, ist sie zu respektieren und zu unterstützen. Gerade bei sehr seltenen Erkrankungen wie bei

der FA ist ein Erkenntnisgewinn ganz wesentlich vom Engagement der einzelnen Beteiligten abhängig.

Alternative Ansätze zur Genterapie bei FA wie z. B. der Einsatz von Vektorsystemen, die nur eine Transduktion der Stammzellen für weniger als 24 Stunden erfordern, wurden von uns und anderen in Mausmodellen mit Defekten in FA-Genen erfolgreich getestet. Ob aber eine Umsetzung derartiger Ergebnisse in klinische Anwendungen in einigen Jahren sinnvoll und nötig ist, kann nur durch die Durchführung und Teilnahme an aktuellen klinischen Studien geklärt werden.

### ***Danksagung***

Danken möchte ich allen Patienten und deren Familien für das Vertrauen und die Bereitschaft, an wissenschaftlichen Fragestellungen und Untersuchungen teilzunehmen. Detlev Schindler, David Williams, Arleen Auerbach, Wade Clapp, Juan Bueren und Axel Rethwilm danke ich für die intensiven wissenschaftlichen Kontakte und Kooperationen und Ulrich Göbel für die außerordentliche Unterstützung in den letzten Jahren. Eunike Velleuer, Yvonne Linka, Sonja Gudowius und Kirsten Huck danke ich für das kritische Lesen des Manuskriptes und der Elterninitiative Kinderkrebsklinik e.V. sowie dem Fanconi Anemia Research Fund (FARF) für die finanzielle Unterstützung.

### ***Literatur zur weiteren Vertiefung***

1. Leurs C, Hanenberg H (2002) Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen. **Med Genetik** 344, suppl 2:1-11
2. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA (1996) Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. **Nat Med** 2:876-82
3. Liu JM, Kim S, Read EJ, Futaki M, Dokal I, Carter CS, Leitman SF, Pensiero, M, Young NS, Walsh CE. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (*FANCC*). **Hum Gene Ther** 1999; 10:2337-46.

4. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. **Science** 288:669-72
5. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. **Science** 296:2410-3
6. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. (2002) Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. **Cytogenet Genome Res** 98:126-35.
7. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD (2003) A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood** 101:1249-56
8. Leurs C, Jansen M, Pollok KE, Heinkelein M, Schmidt M, Wissler M, Lindemann D, Von Kalle C, Rethwilm A, Williams DA, Hanenberg H (2003) Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34(+) cord blood cells. **Hum Gene Ther** 14:509-19
9. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. **Science** 302:415-9

