

## ***Insertionsmutagenese – Implikationen & Möglichkeiten der Vermeidung***

Prof. Dr. rer. nat. Boris Fehse

Experimentelle Pädiatrische Onkologie und Hämatologie  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik III,  
Universitätsklinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main

Die meisten Strategien zur Behandlung von Erbkrankheiten beruhen auf der Nutzung von Vektoren, die permanent in das Zielzellgenom integrieren (Kay et al., 2001). Nur so kann gewährleistet werden, dass im Falle einer Zellteilung auch die Tochterzellen über die korrigierte Version des betroffenen Gens verfügen. Um eine stabile Integration in das Zielgenom zu erreichen, werden in der Regel retrovirale Vektoren benutzt, da die Integration in das Zellgenom einen natürlichen, Enzym- (Integrase-) vermittelten Schritt im Lebenszyklus eines Retrovirus darstellt (Coffin, 1996). Die heute gebräuchlichsten retroviralen Vektoren stammen von einfachen, sog.  $\gamma$ -Retroviren wie dem *Murine leukaemia virus* (MLV) oder von komplexen Retroviren, sog. Lentiviren wie dem *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) ab.

Jede Integration in ein zelluläres Genom stellt eine Zerstörung des natürlichen Kontexts und mithin per Definition eine Mutagenese dar. Allerdings wird eine solche Integration in der großen Mehrzahl der Fälle ohne messbare Auswirkungen auf den Phänotyp der Zelle bleiben. Daher ist es heute Konsens, nur dann von Insertionsmutagenese (bzw. Genotoxizität) zu sprechen, wenn die Vektorintegration zu einem nachweisbaren Effekt auf die betroffene Zielzelle geführt hat (Baum et al., 2003; 2006a).

Obwohl das theoretische Risiko der Insertionsmutagenese auf der Basis der Arbeiten mit replikationskompetenten Retroviren seit Jahrzehnten bekannt war, ging man bis Anfang 2000 davon aus, dass es im Kontext der Gentherapie praktisch zu vernachlässigen sei, da die Wahrscheinlichkeit, in einer suszeptiblen (Stamm-) Zelle ein relevantes (Onko-) Gen zu treffen, nur äußerst gering wäre (Baum et al., 2003). In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Christopher Baum (MH Hannover) zeigte unsere Gruppe im Jahr 2002 erstmals, dass auch der Gentransfer mit replikationsin kompetenten retroviralen Vektoren in Blutstammzellen der Maus zu einer Leukämie führen kann, die sich auf die insertionelle Aktivierung eines Protoonkogens (Evi-1) zurückführen ließ (Li et al., 2002). Die Relevanz dieser Ergebnisse für die humane Gentherapie wurde kurze Zeit später durch das Auftreten des 1. Leukämiefalls in der initial sehr erfolgreichen SCID-X1 Studie in Paris bestätigt (Hacein-Bey-Abina et al. 2002; 2003). In der Folge machte sich vor allem die Gruppe um Prof. Christof von Kalle (Heidelberg) um die Aufklärung der molekularen Ursachen der in Paris beobachteten Leukämien verdient (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Deichmann et al., 2007; Schwarzwaelder et al., 2007). In enger Zusammenarbeit mit C. Baum konnte unsere Gruppe auch weitere Nebenwirkungen der Gentherapie (induzierte klonale Dominanz durch Aktivierung wachstumsfördernder Gene, kombinatorische Onkogenese,) im Mausmodell beschreiben, deren Bedeutung für die klinische Gentherapie inzwischen unumstritten ist (Kustikova, et al. 2005; Modlich, et al. 2005).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Arbeiten einer Reihe von Gruppen im Bereich der Gentransfertoxizität dazu geführt haben, dass Deutschland inzwischen international als führendes Kompetenzzentrum in diesem Bereich gilt. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat diesem Umstand u.a. durch die Einrichtung des

Schwerpunktprogramms SPP1230 „Mechanisms of gene vector entry and persistence“ Rechnung getragen.<sup>1</sup>

Zurzeit arbeiten international viele Gruppen daran, neue, sicherere Vektoren für den stabilen Gentransfer zu entwickeln. Solange es nicht möglich ist, die Integration von Vektoren in sichere Orte im Genom zu steuern, müssen die Vektoren so konfiguriert werden, dass sie nur möglichst minimale Effekte auf benachbarte Genloci ausüben. Ein Schritt in diese Richtung stellt die Benutzung sog. „*Self Inactivating*“ (SIN-) Vektoren dar, bei denen die starken Enhancer-/Promotorelemente in den endständigen Wiederholungen („*Long Terminal Repeats*“, LTR) der retroviralen Vektoren deletiert werden (Baum et al., 2006b). Die Genexpression wird in den SIN-Vektoren stattdessen durch interne Promotoren angetrieben. In *in vitro* Systemen sowie Mausmodellen haben sich die SIN-Vektoren bereits als weniger genotoxisch im Vergleich zu den LTR-Vektoren erwiesen (Modlich et al., 2006). Allerdings können auch retrovirale SIN-Vektoren mit starken (viralen) Promotoren noch immer Leukämien im Mausmodell auslösen (Modlich et al. 2008). Daher wird zusätzlich versucht, die Vektoren durch spezielle genomische Elemente (z.B. sog. *Isolatoren*) besser von ihrer Umgebung abzuschirmen, um ihre Mutagenität herabzusetzen (Übersicht: Baum et al., 2006b).

Die meisten frühen Befunde mit lentiviralen SIN-Vektoren legten ein geringeres Risiko der malignen Transformation transduzierter Zellen bei Verwendung dieses Vektortyps nahe. Allerdings wurde kürzlich in einem speziellen Mausmodell gezeigt, dass auch lentivirale Vektoren, die starke (retro-)virale Promotoren enthalten, eine insertionelle Onkogenese verursachen können (Montini et al. 2008). Mit dem Ziel, die Mutagenität der verwendeten SIN-Vektoren zu verringern, werden daher physiologische (zelluläre) Promotoren getestet. Tatsächlich kann dadurch das mutagene Potential erheblich gesenkt werden (Zychlinski et al. 2008). Jedoch legen neue Befunde für lentivirale Vektoren nahe, dass auch interne, physiologische Promotoren über sehr große Distanzen (600 kb) dazu in der Lage sind, die Expression benachbarter Gene nachhaltig zu beeinflussen (Hargrove et al. 2008). Es bleibt zu hoffen, dass die ersten laufenden klinischen Studien mit SIN-Vektoren die erwartete Verringerung der Häufigkeit schwerer Nebenwirkungen zeigen werden.

Die Arbeiten einer Reihe internationaler Gruppen haben gezeigt, dass verschiedene Familien von Retroviren unterschiedliche Integrationspräferenzen aufweisen. So integrieren  $\gamma$ -retrovirale Vektoren häufig im Bereich der Genpromotoren, während lentivirale Vektoren zwar häufiger innerhalb von Genloci integrieren, dabei aber über den gesamten Genbereich verteilt (Schröder et al., 2002; Wu et al., 2003). Angesichts der Tatsache, dass die Genaktivierung durch starke Enhancer auch über große Distanzen möglich ist (Bartholomew & Ihle, 1991), ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen im Hinblick auf die Vektorsicherheit allerdings umstritten.

In der klinischen Gentherapie wurde die Insertionsmutagenese bisher nur in sehr spezifischen Situationen beobachtet. Eine der betroffenen Gruppen sind Patienten mit SCID-X1. Hier scheint die permanente Überexpression der  $\gamma$ -Kette des IL-2-Rezeptors im Kontext der Aktivierung definierter Onkogene ein besonderes Risiko mit sich zu bringen. So war in der Pariser SCID-X1 Studie in drei von vier Fällen die insertionelle Aktivierung ein und desselben Gens (*LMO2*) für die klonale Proliferation verantwortlich (Cavazzana-Calvo, et al. 2007). Der kürzlich in der analogen Londoner Studie beobachtete Leukämiefall ließ sich ebenfalls auf eine Insertion im *LMO2*-Gen zurückführen (Thrasher & Gaspar 2008). Zunächst hatte es überrascht, dass bei vergleichbaren Patientenzahlen in Paris und London (jeweils ca. 10) nur Leukämien

<sup>1</sup> <http://www.schwerpunktprogramm1230.de/> (19.11.2007)

in Paris (n=4) beobachtet worden waren, nicht aber in London. Es wurde daher spekuliert, ob die vergleichsweise geringen Unterschiede der Londoner zur Pariser Studie dabei eine Rolle gespielt haben könnten (Benutzung eines anderen Hüllproteins und einer anderen Verpackungszelllinie bei der Virusproduktion, Abwesenheit von fötalem Kälberserum [FCS] im Medium, geringere Konzentration des Wachstumsfaktors IL-3, keine Verwendung von Protaminsulfat während der Zelltransduktion *ex vivo* in London). Inzwischen muss man aber wohl davon ausgehen, dass es sich nur um statistisch bedingte Differenzen handelte, insbesondere auch da die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit in London um einiges kürzer ist als in Paris.

Auch die in der Frankfurter Gentherapie-Studie zur Behandlung der chronischen Granulomatose (CGD) beobachtete induzierte klonale Dominanz durch retrovirale Aktivierung wachstumsfördernder Gene (Ott et al., 2006) wurde bisher in keiner anderen Studie notiert. Eine mögliche Rolle des Transgens (gp91phox) wird noch untersucht. Wie beim Auftreten dieser Nebenwirkung befürchtet, hat sich auf der Basis der induzierten Oligoklonalität im Laufe der Zeit bei beiden Patienten ein Myelodysplastisches Syndrom entwickelt (Ott et al. 2008). Während der erste behandelte Patient an einem Therapieversagen (durch Verdrängung der funktionell rekonstituierten Klone durch infunktionelle Klone) verstorben ist, wurde der 2. Patient kürzlich allogenen transplantiert.

Die Assoziation schwerer Nebenwirkungen mit klar definierten Krankheitsbildern (SCID-X1, CGD) und ihre Abwesenheit bei anderen Gentherapiestudien (ADA-SCID) nähren die Hoffnung, dass bestimmte unerwünschte Effekte nur in einem sehr definierten Kontext auftreten können, den es noch klar zu definieren gilt. Letzteres würde es eventuell ermöglichen, Gentransfervektoren und –bedingungen an die jeweiligen zugrundeliegenden Krankheiten zu adaptieren.

Wie oben angedeutet spielt die Insertionsmutagenese als Risikofaktor vor allem dann eine Rolle, wenn zur Erreichung des therapeutischen Effekts eine Langzeitexpression des eingebrachten Transgens und sein Übergang auch auf die Tochterzellen der transduzierten Zellen notwendig sind. Ausgehend vom Ideal der Gentherapie stellt die Verwendung integrierender Vektoren für den stabilen Gentransfer gewissermaßen eine Notlösung dar, solange es nicht möglich ist, genetische Defekte direkt zu korrigieren. Allerdings lässt sich sagen, dass in den letzten Jahren einige Fortschritte auf dem Weg zur gezielten „genomischen Chirurgie“ gemacht wurden. Besagte Strategien zielen meist darauf ab, einen defekten Genabschnitt unter Nutzung zellulärer Reparaturmechanismen (z.B. homologe Rekombination) gegen einen normalen Abschnitt auszutauschen. Dazu muss zunächst eine normale Genkopie in die Zelle gebracht werden (mit Hilfe eines nicht-integrierenden Vektors). Unter normalen Umständen wäre der Prozess der homologen Rekombination in Körperzellen so ineffizient, dass ein therapeutischer Nutzen nicht erreichbar wäre. Jedoch kann die Effizienz der homologen Rekombination z.B. durch das gezielte Einbringen von Doppelstrangbrüchen in die Zielsequenz dramatisch gesteigert werden. Hierzu werden sogenannte *Zinc finger nucleases* (ZFN) [„Designer-Nukleasen“] benutzt, die spezifische Sequenzabschnitte erkennen und dort den Doppelstrang zerschneiden. Führende Arbeiten zur Entwicklung und insbesondere Begrenzung der potentiellen Toxizität der ZFN (durch die unerwünschte Erkennung falscher Zielsequenzen) kommen von Mitgliedern der DG-GT wie Prof. Toni Cathomen (Charité Berlin) (Szczepek, et al. 2007).

Ein anderer Ansatz, die Genotoxizität integrierender Vektoren zu verringern, besteht darin, durch *Targeting* die Transduktion auf die gewünschten Zielzellen zu

beschränken. So werden bei verschiedenen Vektoren die Hüllproteine modifiziert, um nur die Transduktion von Zellen zu erlauben, die ganz bestimmte Oberflächenmoleküle tragen. Umgekehrt kann das Hüllprotein auch so modifiziert werden, dass bestimmte Zellen nicht infiziert werden können. *Targeting*-Ansätze gibt es für verschiedene Vektoren, u.a. für die am häufigsten benutzten  $\gamma$ -Retro- bzw. Lenti-, Adeno- und Adeno-assoziierten Viren (Waehler et al., 2007).

Der sicherste Weg für die Verwendung von integrierenden Vektoren bestünde darin, ihre Integration in ungefährliche Genloci zu steuern. Dazu wird z.B. versucht, die inhärente Präferenz von Adenoassoziierten Viren (AAV) für eine Zielsequenz auf Chromosom 19 auch auf AAV-abgeleitete Vektoren zu übertragen (z.B. PD Dr. Hildegard Büning, Köln) (Huttner et al., 2003). Andere Gruppen versuchen, Transposone als Gentransfervehikel zu benutzen und diese so zu designen, dass sie nur an bestimmten Stellen im Genom integrieren. Mit Dr. Zsuzsanna Izsvák und Dr. Zoltan Ivics arbeiten die Entwickler des am meisten benutzten Transposons („*Sleeping Beauty*“) am MDC in Berlin (Ivics et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit, Insertionsmutagenese zu verhindern, besteht darin, stabil episomal vorliegende Vektoren, die bei einer Zellteilung auf beide Tochterzellen übergehen, zu entwickeln. Solche Vektoren können z.B. auf Herpesviren, aber auch auf nicht-viralen Konstrukten basieren (Jenke et al. 2004; Pich et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass integrierende Vektoren (unabhängig vom Vektortyp) mit dem Risiko einer Insertionsmutagenese assoziiert sind. Zum heutigen Zeitpunkt stellt die (dominante) Transaktivierung von Genen durch starke Promotor/Enhancerelemente des Vektors die wichtigste und klinisch am ehesten relevante Form der Insertionsmutagenese dar. Daher sind viele Forschungsaktivitäten darauf gerichtet, neue Vektoren mit geringerem Transaktivierungspotential zu entwickeln. Es bleibt jedoch zu klären, ob auch andere Formen der Mutagenese (z.B. Zerstörung offener Leserahmen oder regulatorischer Bereiche infolge der Insertion) eine klinisch relevante Rolle spielen können. Solche Nebenwirkungen könnten durch eine gerichtete Integration in „ungefährliche“ Regionen des Genoms verhindert werden. Der vom theoretischen Standpunkt letztlich einzig mögliche Weg zur vollständigen Vermeidung der Insertionsmutagenese bestünde jedoch darin, effiziente und hoch-spezifische Methoden der Genreparatur zu entwickeln, bei denen unerwünschte Integrationsereignisse von vornherein ausgeschlossen werden können.

## Literaturverzeichnis

- Bartholomew, C., Ihle, J.N. (1991): Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter. *Mol Cell Biol.* 11:1820-1828.
- Baum, C. et al. (2003): Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101: 2099-2114.
- Baum, C. et al. (2006a): Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 17: 253-63.
- Baum, C. et al. (2006b): Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther.* 13(6):1050-1063.
- Cavazzana-Calvo, M. et al. (2007): Gene Therapy for SCID-X1. *Human Gene Ther* 18(10):944 (Abstract)
- Coffin, J.M. (1996): Retroviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.) *Fundamental Virology*. Lippincott Raven, Philadelphia:763-844.
- Deichmann, A. (2007): Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest.* 117(8):2225-2232.

- Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2002): Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med.* 346:1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302: 415-419.
- Hargrove PW, Kepes S, Hanawa H, et al. Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cells. *Mol Ther.* 2008;16:525-533.
- Huttner, N.A. et al. (2003): Analysis of site-specific transgene integration following cotransduction with recombinant adeno-associated virus and a rep encoding plasmid. *J Gene Med.* 5(2):120-129.
- Ivics, Z. et al. (2007): Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells. *Mol Ther.* 15(6):1137-44.
- Jenke, A.W., Stehle, I.M., Eisenberger, T., Baiker, A., Bode, J., Fackelmayer, F.O., and Lipps, H.J. (2004). A minimal S/MAR linked to a transcription unit is sufficient for episomal replication and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11322-11327.
- Kay, M.A. et al. (2001): Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 7:33-40.
- Kustikova, O. et al. (2005): Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 308: 1171-1174.
- Li, Z., et al. (2002): Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296: 497.
- Modlich, U. et al. (2005): Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 105, 4235-4246.
- Modlich, U. et al. (2006): Cell culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108: 2545-2453.
- Modlich U, et al. Leukemia induction after a single retroviral vector insertion in Evi1 or Prdm16. *Leukemia* 2008 May 22. [Epub ahead of print].
- Montini E, et al. The Genotoxic Potential of Integrative Vectors Is Strongly Modulated by Vector Design and the Profile of Integration Site Selection. *Mol Ther* 2008;16 (Suppl. 1):S362.
- Ott, M.G. et al. (2006): Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12: 401-409.
- Ott et al. (2008) Gene Therapy for Chronic Granulomatous Disease: Update after 4 Years Follow-Up. *Molecular Therapy* 16, Supplement 1, S82.
- Pich D, et al. (2008): Conditional gene vectors regulated in cis. *Nucleic Acids Res* 36:e83.
- Schröder, A.R. et al. (2002): HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110: 521-529.
- Schwarzwaelder, K. (2007): Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest.* 117(8):2241-9.
- Szcepek, M. et al. (2007): Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 25(7):786-793.
- Thrasher A., Gaspar B. (2008) Severe Adverse Event in Clinical Trial of Gene Therapy for X-SCID leukemia (Press release). [http://www.esgct.org/upload/X-SCID\\_statement\\_AT.pdf](http://www.esgct.org/upload/X-SCID_statement_AT.pdf) (09 July 2008)
- Waehler, R., Russell, S.J., Curiel, D.T. (2007): Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 8:573-587.
- Wu, X. et al. (2003): Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300: 1749-1751.
- Zychlinski D, et al. (2008): Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Mol Ther* 16:718-725.