

Targeted Viral Gene Transfer of Ceruloplasmin – Developing a Strategy for the Treatment of Aceruloplasminemia

Hintergrund: Die Acoeruloplasminämie (ACP) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Eisenstoffwechsels, welche auf Mutationen im für Coeruloplasmin (CP) codierenden Gen beruht die sich typischerweise mit einer Trias aus Diabetes mellitus, retinaler Degeneration und neurologischen Symptomen präsentieren. Diagnostisch sind dabei das Fehlen von CP im Plasma in Kombination mit milder Anämie, Hypoferritinämie und Hyperferritinämie. Bei der ACP handelt es sich um eine seltene Erkrankung, deren geschätzte Prävalenz bei ein bis zwei Fällen auf eine Million Menschen liegt. Trotz dieser Seltenheit gibt es auch in Österreich betroffene Familien.

CP wird hauptsächlich von Hepatozyten und Gliazellen exprimiert. Während Hepatozyten eine lösliche Variante von CP exprimieren, entsteht in Astrozyten durch alternatives Splicing eine membrangebundene Form. CP ist eine kupferenthaltende Ferroxidase, welche die Bindung von Eisen an Transferrin und den Export von Eisen aus Hepatozyten, Makrophagen und Gliazellen unterstützt. Bei der ACP kommt es zu einer Akkumulation von Eisen, unter anderem in der Leber, im Pankreas und dem zentralen Nervensystem. Letzteres führt zu einer neurodegenerativen Erkrankung, an deren Folgen die Betroffenen meist in der sechsten Lebensdekade versterben.

Zur Behandlung der Erkrankung stehen bisher nur Eisenchelatoren zur Verfügung. Diese können zwar die Eisenkonzentration in peripheren Geweben normalisieren, haben aber auf Grund der fehlenden Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke keinen Einfluss auf die zentralnervöse Eisenüberladung und verbessern nicht die neurologischen Symptome.

Die Expression von intaktem CP durch viralen Gentransfer in das Gehirn von ACP-Patienten könnte die Ferroxidaseaktivität von Astrozyten wiederherstellen und damit die Neurodegeneration verhindern. Eine Gentherapie könnte einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung dieser Erkrankung darstellen. Experimente mit löslichem und membrangebundenem CP könnten auch neue Erkenntnisse über die Interaktionen zwischen CP, dem „Eisenhormon“ Hpcidin und dem Eisenexporter Ferroportin bringen.

Ziele des Projekts:

1. Erstellung von viralen Vektoren für lösliches und membrangebundenes CP
2. Funktionale Evaluation des Gentransfers im Zellkulturmodell
3. Charakterisierung von Knockoutmäusen und Evaluation des Gentransfers im Mausmodell

Workpackages (WP): Im ersten WP geht es primär um die Erstellung und Testung verschiedener Klonierungsstrategien für lösliches und membrangebundenes CP zur Schaffung eines effizienten Expressionsvektors. So konnte durch Klonierung der cDNA von löslichem CP in ein provirales Plasmid ein Expressionsvektor für lösliches CP geschaffen werden. Abbildung 1 zeigt den Aufbau des auf einem adeno-assoziierten Virus 8 (AAV8) Vektors beruhenden Konstrukts.

Das zweite WP beschäftigt sich mit der Evaluation der erstellten Vektoren im Zellkulturmodell. Abbildung 2 zeigt, dass mit diesem Konstrukt transfizierte HepG2 Zellen mehr CP in den Überstand sezernieren als Kontrollen, der Gentransfer somit prinzipiell erfolgreich war.

Ziel des dritten WP ist die Etablierung einer Kolonie von CP-Knockout Mäusen, deren phänotypische Charakterisierung und erste Versuche mit viralem Gentransfer im Mausmodell. Jackson CP^{tm1Hrs}/J CP Knockoutmäuse und Wildtypmäuse wurden dazu bis zum Alter von 18 Monaten gezüchtet. Wie in Abbildung

3 zu sehen ist, entwickeln Cp^{-/-} Knockoutmäuse, nicht aber die Wildtypmäuse bereits nach acht Monaten eine nachweisbare hepatische Eisenüberladung

Abbildung 1. Aufbau des viralen Vektors für lösliches Coeruloplasmin

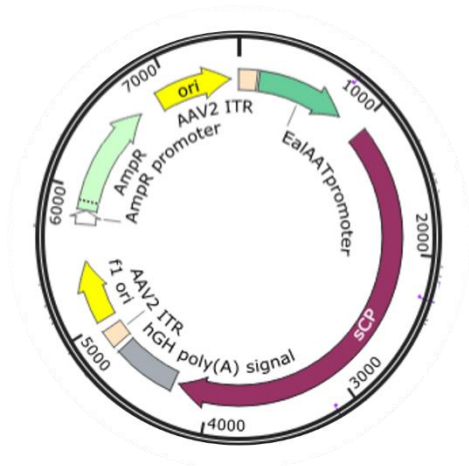


Abbildung 2: Erste Daten zeigen eine Expression von löslichem CP in transfizierten Zellen

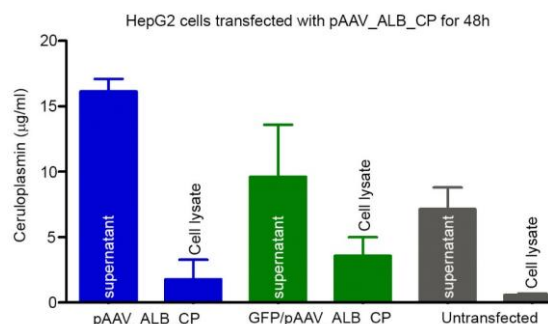
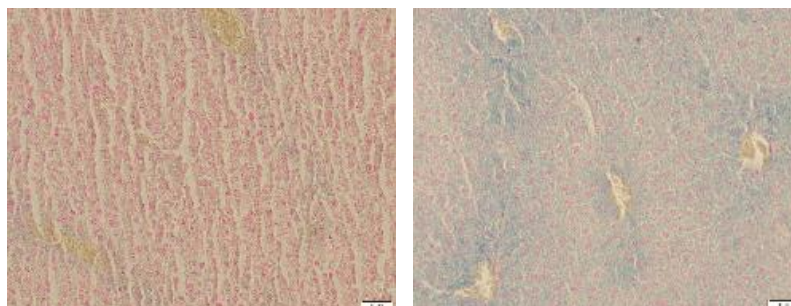
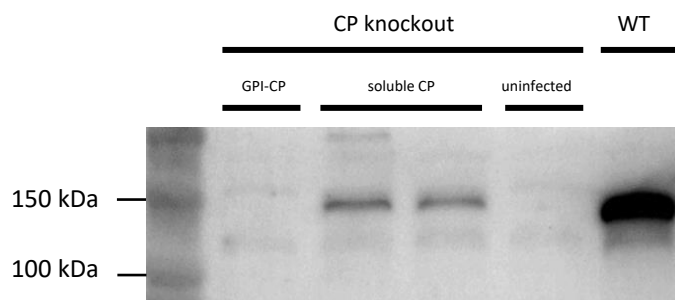


Abbildung 3: Eisenfärbung einer Leberhistologie einer acht Monate alten Wildtypmaus (links) und einer Knockoutmaus (rechts). Bei der Knockoutmaus zeigt sich deutlich eine Eisenakkumulation.



Der virale Vektor für lösliches CP wurde bereits in Versuchen im Mausmodell getestet. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, kam es nach Applikation des Vektors zu einer Wiederherstellung der Expression von löslichem CP, welches im Plasma der behandelten Knockoutmäuse nachgewiesen werden konnte.

Abbildung 4: Fehlende Expression von löslichem CP in der Knockoutmaus und wiederhergestellte Expression nach Behandlung mit dem AAV8-Vektor. Als Positivkontrolle Plasma einer Wildtypmaus.



Vorläufiges Zwischenergebnis und weitere geplante Forschungen: Die im Rahmen des initialen Projekts durchgeführten Experimente konnten bestätigen, dass der Phänotyp des transgenen Mausstamms in Teilaspekten dem humanen Phänotyp einer ACP entspricht. Der virale Gentransfer ist prinzipiell erfolgreich und es gelingt die Expression von CP im Plasma wobei der Effekt nur transient ist. Basierend auf den Ergebnissen dieser ersten Förderungsperiode wurden weitere Experimente geplant. Zusätzlich ist es gelungen, das Tiermodell für die Erkrankung durch eine Kreuzung der CP^{-/-} Mäuse mit zellspezifischen Knockoutmäusen, die den Eisenexporter Ferroportin entweder in Makrophagen oder in Astrozyten nicht exprimieren, weiter zu verfeinern. Diese Experimente stellen die Grundlage für die Weiterentwicklung einer möglichen Therapie der ACP dar und haben präliminäre Daten generiert, um einen EU Antrages im Rahmen eines Europäischen Konsortiums (ERN) einzureichen.