

# Systembiologie als Ansatz zur Erforschung und Therapie von Ciliopathien

PROF. DR. RER. NAT. MARIUS UEFFING<sup>1</sup>, YVES TEXIER<sup>1</sup>,  
DR. RER. NAT. ANDREAS VOGT<sup>1</sup>, SYLVIA BOLZ<sup>1</sup>, NICOLA HORN<sup>1</sup>,  
YASMIN WISSINGER<sup>1</sup>, DR. RER. NAT. MATTHIAS GERBERDING<sup>1</sup>,  
PROF. DR. MED. KARL ULRICH BARTZ-SCHMIDT<sup>1,2</sup>,  
DR. RER. NAT. KARSTEN BOLDT<sup>1</sup>

**1 Forschungsinstitut  
für Augenheilkunde**

**2 Universitäts-  
Augenklinik,**  
Department für  
Augenheilkunde,  
Universitätsklinikum  
Tübingen

## CILIOPATHIEN ALS URSACHE FÜR NETZHAUTERKRANKUNGEN

Die Aufklärung der Pathomechanismen von Ciliopathien der Netzhaut ist ein Schwerpunkt unserer Forschung. Ciliopathien sind ein junges Forschungsgebiet, das für die Ophthalmologie mehr und mehr Bedeutung gewinnt. Cilien als Organelle der Zelle sind bekannt, seit es Mikroskope gibt. Dabei gibt es bewegliche Cilien wie die des Spermiums, der Nasenschleimhaut und des Lungenepithels und unbewegliche Cilien wie die des Photorezeptors. Ein Zusammenhang zwischen defekten Cilien und einer syndromalen Erkrankung wurde erstmals für das Karthagener-Syndrom hergestellt, bei dem bewegliche Cilien fehlen [1]. Später wurden auch Funktionen der unbeweglichen Cilien erkannt, allem voran beim gerichteten zellulären Transport und der Steuerung zellulärer Signalwege [2]. In der Folge wurde der Begriff Ciliopathie geprägt. Er steht für syndromale und nicht-syndromale Erkrankungen, deren Ursachen in Defekten der Cilien liegen [3, 4]. Inzwischen ist klar, dass mehrere Formen erblicher Netzhautdegenerationen Ciliopathien sind, die ihre Ursache in Defekten der Cilien in den Photorezeptoren haben. Dabei kann es sich um syndromale Erkrankungen handeln wie beim Bardet-Biedl-Syndrom oder Joubert-Syndrom und um nicht-syndromale Erkrankungen wie die Lebersche Kongenitale Amaurose oder Formen von Retinitis Pigmentosa.

## WAS LEISTEN CILIE UND WARUM IST IHRE LEISTUNG WICHTIG FÜR PHOTOREZEPTOREN?

Neben Funktionen in der Signalübertragung und Signalverarbeitung leisten Cilien dort, wo sie im Organismus vorkommen, den sogenannten intraflagellären Transport (IFT). Dieser Transportmechanismus wurde zuerst im Flagellum einzel-

liger Organismen beobachtet und wird unter ATP Verbrauch angetrieben von einem molekularen Motor aus Proteinen. Der IFT läuft wie auch andere zelluläre Transportprozesse über molekulare Transportbänder (Tubulin), auf denen Richtung und Geschwindigkeit vorgegeben sind.

Im Photorezeptor verbindet ein sogenanntes connecting cilium inneres und äußeres Segment. Der IFT durch das connecting cilium ist zentral für die Funktion des Photorezeptors, weil über ihn die Proteine, die für das Sehen gebraucht werden, in das lichtempfindliche äußere Segment gebracht werden. Schätzungen beziffern die Transportleistung der intraflagellären Transport-Maschinerie auf 2000 Opsin-Moleküle pro Minute, um den Verlust an Rhodopsin auszugleichen [5].

## DIE SYSTEMBIOLOGISCHE AUFKLÄRUNG CILIÄRER FUNKTIONEN UND PATHOMECHANISMEN

Systembiologie ist der Ansatz, über eine Verknüpfung und Iteration von Hypothesenbildung, experimenteller Arbeit und mathematische Modellbildung Grundprinzipien biologischer Funktionen zu verstehen. In der systemmedizinischen Anwendung systembiologischer Herangehensweisen wird der Versuch gemacht, durch eine Kombination aus datengetriebenen analytischen Ansätzen (z. B. aus der Epidemiologie, Klinischen Chemie oder Humangenetik) mit experimentellen und modellgetriebenen Ansätzen (Systembiologie) Krankheitsursachen auf systemischer Ebene zu verstehen aber auch die Entwicklung von Diagnostik und Therapie rationaler zu entwickeln. Im EU-Projekt SYSCILIA ([www.syscilia.org](http://www.syscilia.org)), an dem das Tübinger Department für Augenheilkunde als Partner und Ko-Koordinator partizipiert, steht die systemische Analyse der Pathomechanismen ciliärer Erkrankungen im Fokus mit dem Ziel, über ein molekulares Verständnis der Ursachen und

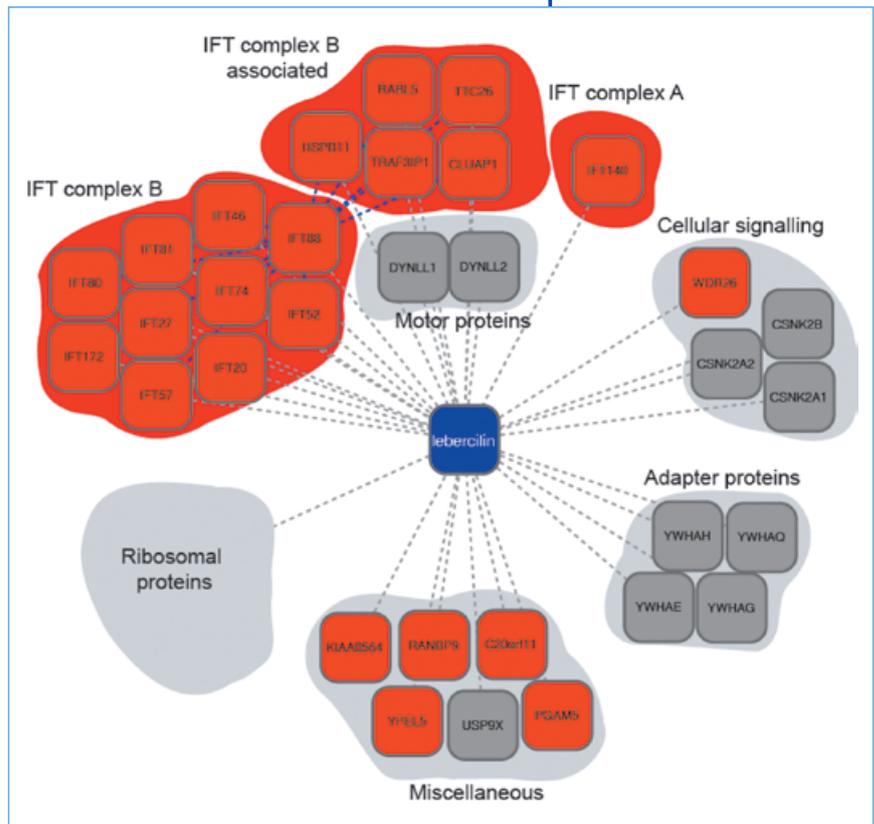
Pathomechanismen die Grundlagen für Diagnostik und rationale Therapieentwicklung zu verbessern. Die EU fördert SYSCILIA im 7. Rahmenprogramm von 2010 bis 2015.

In SYSCILIA arbeiten Partner an 16 Universitäten in 5 europäischen Ländern und den USA interdisziplinär zusammen. Neu am Vorgehen in SYSCILIA ist, dass klinische und experimentelle Daten hier nicht nur kompiliert und interpretiert werden, sondern dass aus den Daten mit Hilfe computerbasierter Modellierungen und avancierter Datenintegrationstools räumliche, zeitliche und letztlich logische Modelle ciliärer Funktionen und ihrer krankheitsassoziierten Störungen erstellt werden. Dabei werden verschiedene Datenqualitäten genutzt: klinische und klinisch-chemische Daten genauso wie die DNA Sequenzierung von Patienten-Kohorten, Protein-Protein-Interaktionen ciliärer Proteine, in vitro und in vivo Assays mit Knock-downs ciliärer Gene und funktionelle Assays in Zell- und Tiermodellen. Mehr als 20 High Impact Publikationen ([www.syscilia.org/results.shtml](http://www.syscilia.org/results.shtml)) seit Start des Projekts zeugen von der Produktivität und Machbarkeit dieses Ansatzes (z. B. [6, 7, 8]).

### LEBERSCHE KONGENITALE AMAUROSE ALS CILIOPATHIE UND IHRE MOLEKULAREN URSACHEN

Lebersche Kongenitale Amaurose, LCA, ist eine der schwersten, aber glücklicherweise seltenen erblichen Netzhauterkrankungen. Mutationen in mindestens 15 verschiedenen Genen sind für das Erblinden im Kindesalter verantwortlich. Die betroffenen Gene kodieren Proteine, die vielfältige und sehr spezielle Funktionen in der Netzhaut übernehmen. Da die klinische Ausprägung dieser Gendefekte jedoch sehr ähnlich ist, geht man davon aus, dass verschiedene, sich überschneidende, krankhafte Veränderungen in der Sehzelle zu einer Funktionsstörung der gesamten Zelle führen.

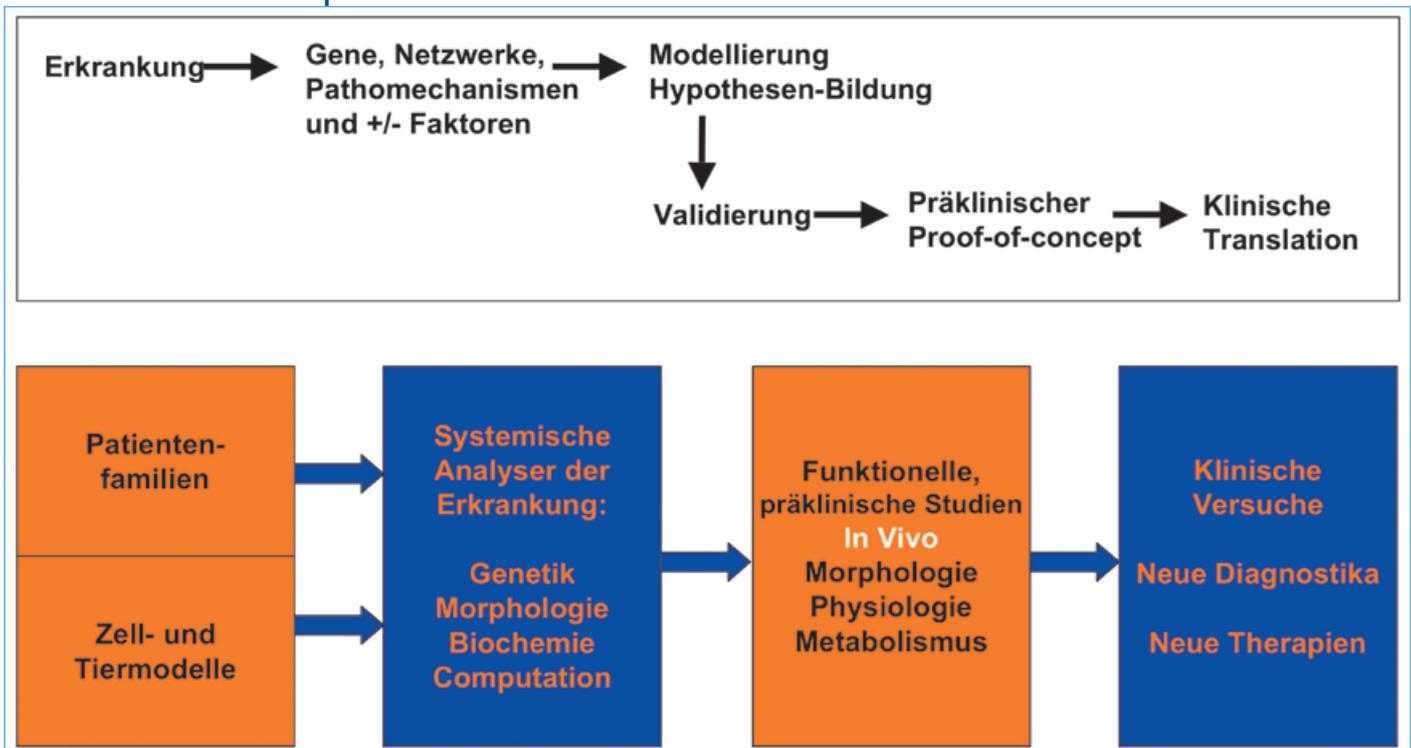
Wir konnten in einem ersten Schritt das bei LCA von Mutationen betroffene Gen identifizieren. Das in Zusammenarbeit und unter Federführung von Ronald Ropeman, Nijmegen, gefundene Gen trägt die Bezeichnung LCA5 und kodiert für das neu entdeckte Protein Lebercilin [9]. Das Protein Lebercilin lässt sich hauptsächlich im Bereich des Ciliums nachweisen. Wir konnten in einem zweiten Schritt die Interaktion von Lebercilin mit den Transportprozessen im IFT und seine Rolle bei der Entstehung der LCA aufklären [10]. Dies war möglich durch eine Kombination quantitativer Bindungsstudien des Proteoms und der Analyse transgener, homozygoter LCA-5 knock-out Mauslinien. Über quantitative proteomische Analysen konnten die Bindungspartner von normalem



Lebercilin identifiziert und die Störungen im Bindungsmuster bei mutiertem Lebercilin ausgemacht werden. Normales Lebercilin bindet an zwei verschiedene Teilkomplexe des IFT (Protein-Komplexe in Grau und Rot in **Abbildung 1**). Die Bindungsfähigkeit des defekten Lebercilins an diese beiden Komplexe geht durch die Mutation verloren (Protein-Komplexe in Rot in **Abbildung 1**). Als Konsequenz der herabgesetzten Bindungsfähigkeit des defekten Lebercilins an die IFT-Maschinerie wird das ciliäre Transportsystem nicht beladen und der Transport von Sehpigment und anderer essentieller Proteine, die für Ausbildung und Funktionsfähigkeit des äußeren Segments notwendig sind, unterbleibt. Schließlich degeneriert das äußere Segment des Photorezeptors und die Sehfähigkeit geht damit verloren. Mit der differentiellen Analyse von Lebercilin aus LCA5-Patienten konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Mutationen dieser rezessiv mendelisch vererbten Erkrankung um einen Pathomechanismus handelt, der mit einem Funktionsverlust des Proteins Lebercilins einhergeht. Damit konnten wir vorschlagen, dass rekonstitutive Gentherapie mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Erfolg führen wird. Ein internationales Team aus Wissenschaftlern und Klinikern, die an den 2011 zu LCA5 publizierten Arbeiten mitbeteiligt war, hat bereits begonnen, klinisch einsetzbare Gentherapie für LCA2 zu entwickeln [11].

### Abbildung 1

■ Massenspektroskopische Analyse der Bindungspartner für normales und defektes Protein Lebercilin (Blau, Mitte) Normales Lebercilin bindet an die Protein-Komplexe des intraflagellären Transports IFT sowie an Komplexe des signalings und Ribosomes (Grau + Rot). Die zwei Mutationen im LCA5 Gen für Lebercilin, die Lebersche Kongenitale Amaurose verursachen, verändern Lebercilin so, dass es nicht mehr an die Protein-Komplexe des IFTs bindet (Rot).



**Abbildung 2**

■ **Wertschöpfungskette in einem systembiologischen Forschungsverbund:** Das FP7 Projekt SYSCILIA bearbeitet die folgenden Schritte: – Untersuchung der Gene, Netzwerke, Pathomechanismen und Risiko-Faktoren, – Modellierung, – Hypothesen-Bildung, – Validierung (iterative). Nachfolgende präklinische und klinische Studien werden in eigenen Modulen oder Projekten bearbeitet.

#### **DIE AKTEURE VON PROJEKTEN DER SYSTEMBIOLOGIE VERTEILEN SICH AUF MEHRERE DISZIPLINEN UND LABORE**

Bevor wir uns im Folgenden möglichen Therapieoptionen für Ciliopathien zuwenden, möchten wir noch einen Aspekt hervorheben, der den von uns gewählten systembiologischen Ansatz grundsätzlich von der klassisch reduktionistischen Erforschung von Pathomechanismen unterscheidet. Die Aufklärung von Krankheitsmechanismen, die in der Augenheilkunde mithilfe der Systembiologie erzielt wird, beruht auf einer Zusammenarbeit unterschiedlicher Disziplinen und Standorte und erfordert ein hohes Maß an Kooperation und Koordination. Datenerhebung und deren in silico Verarbeitung für die Modellbildung aber auch die Modellvalidierung werden mangels Verfügbarkeit passgenauer Lösungen zwischen Laboren in intensivem Diskurs auf die zu lösende Aufgabe zugeschnitten. Auch Wertschöpfungsketten, die die erarbeiteten Ergebnisse einem medizinisch klinischen Nutzen zuführen sollen und in **Abbildung 2** verdeutlicht werden, müssen entwickelt werden.

#### **SYSTEMBIOLOGIE ALS BASIS EINER RATIONALEN THERAPIENTWICKLUNG FÜR CILIOPATHIEN**

Die Erforschung der durch Mutationen verursachten zellulären Defekte ist eine Voraussetzung dafür, rationale Therapieansätze für zurzeit unheil-

bare Ciliopathien zu entwickeln. Eine bereits durch mehrere proof-of-principles belegte Möglichkeit zur Therapie von Ciliopathien ist Gentherapie. Bei Gentherapien werden korrigierte DNA-Abschnitte über Viren in Zellen geschleust. So gelang es kürzlich bei Mäusen, die durch einen Gendefekt, der die Funktionalität des IFT einschränkt, den Geruchssinn verloren haben, durch Einschleusen von DNA für das Gen IFT88 die IFT Funktion und damit den Geruchssinn wiederherzustellen [12].

In Tübingen schaffen wir zurzeit in einem mehrere Zentren umfassenden Verbund, RD-Cure, die Voraussetzungen dafür, Gentherapie für Netzhauterkrankungen als klinische Therapieoption einzuführen.

#### **LITERATUR**

1. Afzelius B.A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976; 193: 317–319.
2. Taulman P.D., Haycraft C.J., Balkovetz D.F., Yoder B.K.: Polarix, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 589–599.
3. Ansley S.J., Badano J.L., Blacque O.E., Hill J., Hoskins B.E., Leitch C.C., Kim J.C., Ross A.J., Eichers E.R., Teslovich T.M., Mah A.K., Johnsen R.C., Cavender J.C., Lewis R.A., Leroux M.R., Beales P.L., Katsanis N. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 2003; 425: 628–633.
4. Kim J.C., Badano J.L., Sibold S., Esmail M.A., Hill J., Hoskins B.E., Leitch C.C., Venner K., Ansley S.J., Ross

- A. J., Leroux M. R., Katsanis N., Beales P. L. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 2004; 36: 462–470.
5. Sahel J. A. Spotlight on childhood blindness. *J Clin Invest* 2011; 121: 2145–2149.
  6. Hoff S., Halbritter J., Epting D., Frank V., Nguyen T. M., van Reeuwijk J., Boehlke C., Schell C., Yasunaga T., Helmstädter M., Mergen M., Filhol E., Boldt K., Horn N., Ueffing M., Otto E. A., Eisenberger T., Elting M. W., van Wijk J. A., Bockenhauer D., Sebire N. J., Rittig S., Vyberg M., Ring T., Pohl M., Pape L., Neuhaus T. J., Elshakhs N. A., Koon S. J., Harris P. C., Grahammer F., Huber T. B., Kuehn E. W., Kramer-Zucker A., Bolz H. J., Roepman R., Saunier S., Walz G., Hildebrandt F., Bergmann C., Lienkamp S. S. ANKS6 is a central component of a nephrophtisis module linking NEK8 to INVS and NPHP3. *Nat Genet* 2013; Jun 23. doi: 10.1038/ng.2681. [Epub ahead of print].
  7. Texier Y., Kinkl N., Boldt K., Ueffing M. From quantitative protein complex analysis to disease mechanism. *Vision Res* 2012; 75: 108–111.
  8. Vogt A., Fuerholzner B., Kinkl N., Boldt K., Ueffing M. Isotope coded protein labeling coupled immunoprecipitation (ICPL-IP): a novel approach for quantitative protein complex analysis from native tissue. *Mol Cell Proteomics* 2013 12: 1395–1406.
  9. den Hollander A. I., Koenekoop R. K., Mohamed M. D., Arts H. H., Boldt K., Towns K. V., Sedmak T., Beer M., Nagel-Wolfrum K., McKibbin M., Dharmaraj S., Lopez I., Ivings L., Williams G. A., Springell K., Woods C. G., Jafri H., Rashid Y., Strom T. M., van der Zwaag B., Gosens I., Kersten F. F., van Wijk E., Veltman J. A., Zonneveld M. N., van Beersum S. E., Maumenee I. H., Wolfrum U., Cheetham M. E., Ueffing M., Cremers F. P., Inglehearn C. F., Roepman R. Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2007; 39: 889–895.
  10. Boldt K., Mans D. A., Won J., van Reeuwijk J., Vogt A., Kinkl N., Letteboer S. J., Hicks W. L., Hurd R. E., Naggert J. K., Texier Y., den Hollander A. I., Koenekoop R. K., Bennett J., Cremers F. P., Gloeckner C. J., Nishina P. M., Roepman R., Ueffing M. Disruption of intraflagellar protein transport in photoreceptor cilia causes Leber congenital amaurosis in humans and mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 2169–2180.
  11. Ashtari M., Cyckowski L. L., Monroe J. F., Marshall K. A., Chung D. C., Auricchio A., Simonelli F., Leroy B. P., Maguire A. M., Shindler K. S., Bennett J. The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. *J Clin Invest* 2011; 121: 2160–2168.
  12. McIntyre J. C., Davis E. E., Joiner A., Williams C. L., Tsai I. C., Jenkins P. M., McEwen D. P., Zhang L., Escobado J., Thomas S., Szymanska K., Johnson C. A., Beales P. L., Green E. D., Mullikin J. C.; NISC Comparative Sequencing Program, Sabo A., Muzny D. M., Gibbs R. A., Attié-Bitach T., Yoder B. K., Reed R. R., Katsanis N., Martens J. R. Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model. *Nat Med* 2012; 18: 1423–1428.