

Journal für Kardiologie

Austrian Journal of Cardiology

Österreichische Zeitschrift für Herz-Kreislauserkrankungen

Gentechnologie und Molekularbiologie in der Kardiologie: Update 2000

Waltenberger J

Journal für Kardiologie - Austrian

Journal of Cardiology 2000; 7 (6)

246-251

Homepage:

www.kup.at/kardiologie

Online-Datenbank
mit Autoren-
und Stichwortsuche



Offizielles
Partnerjournal der ÖKG



Member of the ESC-Editor's Club



Offizielles Organ des
Österreichischen Herzfonds



ACVC
Association for
Acute CardioVascular Care

In Kooperation
mit der ACVC

Indexed in ESCI
part of Web of Science

Indexed in EMBASE

Krause & Pacherneegg GmbH • Verlag für Medizin und Wirtschaft • A-3003 Gablitz

P.b.b. 02Z031105M,

Verlagsort: 3003 Gablitz, Linzerstraße 177A/21

Preis: EUR 10,-

Datenschutz:

Ihre Daten unterliegen dem Datenschutzgesetz und werden nicht an Dritte weitergegeben. Die Daten werden vom Verlag ausschließlich für den Versand der PDF-Files des Journals für Kardiologie und eventueller weiterer Informationen das Journal betreffend genutzt.

Lieferung:

Die Lieferung umfasst die jeweils aktuelle Ausgabe des Journals für Kardiologie. Sie werden per E-Mail informiert, durch Klick auf den gesendeten Link erhalten Sie die komplette Ausgabe als PDF (Umfang ca. 5–10 MB). Außerhalb dieses Angebots ist keine Lieferung möglich.

Abbestellen:

Das Gratis-Online-Abonnement kann jederzeit per Mausklick wieder abbestellt werden. In jeder Benachrichtigung finden Sie die Information, wie das Abo abbestellt werden kann.

Das e-Journal

Journal für Kardiologie

- ✓ steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) stets internetunabhängig zur Verfügung
- ✓ kann bei geringem Platzaufwand gespeichert werden
- ✓ ist jederzeit abrufbar
- ✓ bietet einen direkten, ortsunabhängigen Zugriff
- ✓ ist funktionsfähig auf Tablets, iPads und den meisten marktüblichen e-Book-Readern
- ✓ ist leicht im Volltext durchsuchbar
- ✓ umfasst neben Texten und Bildern ggf. auch eingebettete Videosequenzen.

Gentechnologie und Molekularbiologie in der Kardiologie: Update 2000

J. Waltenberger

In den vergangenen Jahren konnten mit Hilfe der Methoden der Molekularbiologie und Gentechnologie wesentliche Erkenntnisse über die Funktionsweise des kardiovaskulären Systems gewonnen werden. Die Aufschlüsselung des humanen Genoms, die Identifikation und Charakterisierung von Gendefekten und Polymorphismen sowie die gezielte Anwendung der Mausgenetik in Kombination mit Strategien der molekularen Zellbiologie und der klassischen (Patho-)Physiologie liefern bereits heute beste Voraussetzungen dafür, unser Wissen über kardiovaskuläre Erkrankungen gezielt zu erweitern. Weiterhin konnten mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse bereits zahlreiche neue Therapieansätze geschaffen werden. Während einzelne dieser neuen Technologien, wie die Herstellung und Applikation rekombinanter humaner Proteine, ihren Siegeszug in der Medizin bereits begonnen haben (z. B. rekombinante Thrombolytika) und mit fortlaufenden Entdeckungen über die Funktionsweise einzelner Moleküle auch weiter fortsetzen werden (z. B. angiogene Faktoren), steht die Gentherapie erst an der Schwelle zur klinischen Umsetzung. Die wesentlichen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Anwendung beim Patienten werden neben der notwendigen Weiterentwicklung geeigneter Applikationssysteme vor allem in einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bestehen.

During recent years the methods of biology and biotechnology have helped to generate substantial insight into the function of the cardiovascular system. The sequencing of the human genome, the identification and characterization of gene defects and gene polymorphisms as well as the consequent use of mouse genetics in combination with strategies of molecular cell biology and classical (patho)physiology have broadened our knowledge about cardiovascular diseases. A number of novel therapeutic approaches are currently being investigated on the basis of this knowledge. While some of these novel technologies including the production and application of recombinant human proteins are already part of our current therapeutic repertoire (e.g. recombinant thrombolytic agents) or may be of relevance in the future (e.g., recombinant angiogenic factors), gene therapy has not yet reached the level of broad clinical use. Besides additional innovation necessary for the development of suitable systems for precise and selective local delivery into the target cells, a better understanding of the underlying mechanisms of gene transfer are required until cardiovascular gene therapy can be successfully used in patients. *J Kardiolog* 2000; 7: 246–251

Unsere Kenntnis über die Funktion und Regulation des Herz-Kreislauf-Systems wurde in den vergangenen Jahren durch eine Reihe grundlegender Erkenntnisse und Fortschritte ganz wesentlich erweitert. Viele dieser Fortschritte sind auf die stürmische Entwicklung der Molekularbiologie und Gentechnologie zurückzuführen. Hierdurch konnte unser Wissen über zahlreiche pathogenetische Mechanismen sowie molekulare, zelluläre und damit kausale Zusammenhänge sprunghaft vermehrt werden. Darüber hinaus – und hiervon profitiert die Kardiologie in ganz besonderem Maße – konnte damit begonnen werden, neue diagnostische und therapeutische Strategien zu entwickeln. Einige dieser Entwicklungen befinden sich heute bereits in der klinischen Erprobung, bei anderen erscheint dieser Schritt im Lauf der nächsten Jahre realistisch.

In der vorliegenden Übersichtsarbeit werden einige Aspekte der „molekularen Kardiologie“ diskutiert, wobei die gewählten Beispiele überwiegend im Zusammenhang mit der koronaren Herzerkrankung stehen und neue Möglichkeiten der Therapie dieser Erkrankung aufzeigen. Hierbei wird ein besonderer Schwerpunkt auf neue Ansätze zur Prävention der Restenose und zur therapeutischen Induktion des Kollateralenwachstums (therapeutische Angiogenese und therapeutische Arteriogenese) gelegt. Die zahlreichen revolutionären Möglichkeiten einer molekularen Diagnostik bei genetischen Erkrankungen (Kardiomyopathien, Long-QT-Syndrom etc.) sind an anderer Stelle diskutiert [1].

Die rasanten Entwicklungen im Bereich der molekularen Kardiologie wurden durch analytische Methoden der modernen Biochemie und Molekularbiologie erst möglich gemacht. Dank ihrer weiten Verbreitung sind sie mittlerweile zum grundlegenden Werkzeug der meisten medizinischen Disziplinen geworden. Der Übersicht halber seien die wichtigsten dieser Methoden in Tabelle 1 aufgelistet und nach ihrem Einsatzgebiet geordnet.

Molekulare Analyse kardiovaskulärer Krankheitsprozesse

Die molekularen Grundlagen von Krankheitsprozessen lassen sich in vielfältiger Hinsicht und unter Einsatz sehr verschiedener Methoden und Strategien erforschen. Nachfolgend seien anhand aktueller Beispiele einige solcher Zugangswege exemplarisch dargestellt.

Molekulare Zellbiologie

Molekulare Regulationsprozesse in definierten Zellsystemen verlaufen spezifisch und oft nach klaren regulatorischen Mustern ab; dies gilt sowohl für die Zelle im natürlichen Zellverband *in vivo* wie auch für Zellen unter kultivierten Bedingungen *in vitro*. Zahlreiche Zellarten lassen sich heute isolieren und *in vitro* kultivieren, wobei für die vaskuläre Biologie vor allem Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Monozyten von Interesse sind. An diesen Zellen lassen sich Prozesse der Proliferation und Migration [2, 3] ebenso analysieren wie Prozesse der Genregulation [4, 5], der Signaltransduktion [6, 7] und molekularen Regulation [8, 9]. Die Spezifität derartiger Analysen kann mit Hilfe spezifischer Antikörper, Liganden oder Gensonden gewährleistet werden.

Molekulare Analyse von pathologischem Material

Humanes Material (Serum und andere Blutbestandteile, Gewebe, Biopsien etc.) eignet sich ebenso wie Material aus dem Tierversuch, um die Natur und die Mechanismen molekularer Prozesse aufzuklären. Es existieren zahlreiche Beispiele dafür, daß die Entdeckung der Beteiligung bestimmter Moleküle an einem pathologischen Geschehen zur Aufklärung der zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen verwendet werden konnte [10–13].

Molekulares Medikamenten-Screening

Die Einführung moderner Methoden der Molekularbiologie und Biotechnologie hat dem Gebiet der molekular-

Von der Abteilung für Innere Medizin II, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Ulm.

Korrespondenzadresse: Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Waltenberger, F.E.S.C., Abteilung für Innere Medizin II, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Ulm, Robert-Koch-Straße 8, D-89081 Ulm, E-mail: johannes.waltenberger@medizin.uni-ulm.de

laren Pharmakologie großen Vorschub geleistet. Auf der Grundlage bekannter molekularer Angriffspunkte (also Gene und Genprodukte, die kausal an einem Krankheitsgeschehen beteiligt sind) wurden neue Therapiekonzepte begründet, die nun unter Verwendung der entsprechenden Technologie realisiert werden können. Konkret werden hierbei Screening-Verfahren etabliert, die auf der Nutzung biologischer oder biochemischer Assays beruhen. Mit Hilfe dieses Prinzips lassen sich im Labormaßstab oder auch im industriellen Maßstab gezielt einzelne Substanzen oder ganze Banken chemischer, niedermolekularer Substanzen screenen. Als Screening-Parameter eignen sich beispielsweise die Proliferation definierter Zellsysteme, die Bindung spezifischer Liganden (Suche nach Bindungsinhibitoren [2]) oder die Aktivierung spezifischer Rezeptoren (Suche nach spezifischen Aktivatoren).

Ein solches Screening erwies sich beispielsweise bei der Suche nach spezifischen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Inhibitoren als potent, spezifisch und erfolgreich. Hier-

Tabelle 1: Verbreitete molekulare Methoden zur *In-vitro*-Analyse in der Medizin

Genanalyse

PCR

- Amplifikation spezifischer DNA-Segmente

Southern-Blot

- Detektion spezifischer DNA mittels DNA-DNA-Hybridisierung im Anschluß an eine Agarose-Gel-Elektrophorese und einen DNA-Transfer auf eine Trägermembran

SSCP

- Nachweis von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen

RFLP

- Nachweis von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen

Expressionsanalyse

Northern Blot

- Detektion spezifischer RNA mittels DNA-RNA-Hybridisierung im Anschluß an eine Agarose-Gel-Elektrophorese und einen RNA-Transfer auf eine Trägermembran

RNAse Protection Assay

- Hochsensitiver Nachweis spezifischer RNA-Spezies mittels DNA-RNA-Hybridisierung

RT-PCR

- Hochsensitiver Nachweis spezifischer RNA-Spezies durch reverse Transkription in cDNA, gefolgt von einer PCR (s. o.)

Gene-Array

- Gleichzeitige Detektion einer Vielzahl spezifischer DNA- oder RNA-Sequenzen (Transkripte) mittels DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybridisierung, wobei cDNA oder Oligonukleotide auf kleinsten Arealen auf einer Matrix angeordnet sind

Nuclear Run-on Assay

- Analyse der Promotoraktivität

In-situ-Hybridisierung

- Detektion spezifischer mRNA mittels DNA-RNA-Hybridisierung im Gewebeschnitt, somit Zuordnung eines Transkripts zur exprimierenden Zelle möglich

Proteinanalyse

Western Blot/Immunoblot

- Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper-Protein-Bindung im Anschluß an eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einen Protein-Transfer auf eine Trägermembran

ELISA, RIA

- Sensitive Detektion spezifischer Proteine in Flüssigkeiten einschl. Plasma oder Serum

Immunhistochemie

- Detektion spezifischer Proteine bzw. immunogener Epitope mittels Bindung spezifischer Antikörper im Gewebeschnitt

mit gelang die Identifikation und Charakterisierung neuer Tyrophostine (Tyrosin-Phosphorylierungs-Inhibitoren) wie AG1295 bzw. AG1296, die eine Aktivierung der Rezeptoren des Platelet-derived Growth Factor (PDGF) unterdrücken können [14]. Da PDGF kausal am Prozeß der Atherogenese und der Restenosierung beteiligt ist, sind PDGF-Antagonisten von großem Interesse für eine klinische Entwicklung. Zahlreiche präklinische Studien mit dieser Fragestellung wurden bereits durchgeführt (s. u.).

Genetisch modifizierte Tiermodelle

Seit der ersten erfolgreichen Etablierung genetisch modifizierter Tiere in den 80er Jahren spielen derartige Modelle eine zunehmend wichtige Rolle in der biomedizinischen Forschung im allgemeinen und in der Herz-Kreislauf-Forschung im besonderen. Hierbei gibt es mittlerweile zahlreiche Möglichkeiten, die genetische Basis derartiger Tiere – in den meisten Fällen Mäuse, gelegentlich auch Ratten – zu verändern. Der älteste Ansatz ist das Einbringen zusätzlicher Gene („Transgen“) in die Erbsubstanz bzw. in den Embryoidkörper. Von noch größerer Relevanz sind heute Tiermodelle, denen ein spezifisches Genprodukt fehlt („Knock-out-Tiere“). Eine Liste wichtiger Beispiele solcher Knock-outs aus der kardiovaskulären Forschung ist in Tabelle 2 gegeben. Diese Tiere können in zweierlei Hinsicht sehr bedeutsam sein:

1. Im Falle des Vorliegens morphologischer oder funktioneller Defekte sind wichtige Rückschlüsse auf die Funktion des entsprechenden Genprodukts im komplexen *In-vivo*-Zusammenhang möglich.
2. Ein morphologisch oder funktionell relevanter Phänotyp kann sich als Modell für einzelne Erkrankungen eignen. Als Beispiel sei die ApoE^{-/-}-Maus genannt, die als Arteriosklerose-Modell weithin Verbreitung gefunden hat.

Neuere Entwicklungen resultieren in der Herstellung von Tieren mit gewebsspezifischem Knock-out, d. h., ein zu untersuchendes Gen wird nur in ausgewählten Organen bzw. Geweben ausgeschaltet, sodaß die Folgen eines solchen Defizits auf die Organfunktion und auf den Gesamtorganismus erfaßt werden können. Die Steuerung einer gewebsspezifischen Genexpression erfolgt über die Auswahl der Promotoren, also jener DNA-Abschnitte, die einem Gen vorgeschaltet sind und durch Transkriptionsfaktoren aktiviert oder supprimiert werden können. Weiterhin besteht derzeit ein großes Interesse, *konditionierte Knock-out-Modelle* herzustellen, bei denen unter Verwendung abschaltbarer Promotoren Gene zu einem beliebigen Zeitpunkt ab- und wieder angeschaltet werden können. Da sich diese Entwicklung erst in den Anfängen befindet,

Tabelle 2: Genetisch modifizierte Tiermodelle. Beispiele wichtiger Gen-Knock-Out Mausmodelle in der kardiovaskulären Forschung

Name	Fehlendes Genprodukt/biologische Effekte
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E/arteriosklerotische Veränderungen
eNOS ^{-/-}	Endotheliale NO-Synthase/arterielle Hypertonie, gestörte Angiogenese
TGF-β1 ^{-/-}	TGF-β1/embryonal letal, Myokarditis bzw. generalisierte Inflammation
VEGF-A ^{-/-}	VEGF-A/embryonal letal bereits in heterozygoter Form
Flt-1 ^{-/-}	VEGF-Rezeptor 1/embryonal letal
Flt-1 (TK) ^{-/-}	kinasedefizienter VEGF-Rezeptor 1/entwicklungsfähig, gestörte Angiogenese bei Wundheilung
Flk-1 ^{-/-}	VEGF-Rezeptor 2/embryonal letal

gibt es noch wenig verfügbare Daten. Es darf aber erwartet werden, daß die beiden letztgenannten Technologien in den kommenden Jahren wichtige Informationen über die Rolle verschiedener Gene bei einzelnen Krankheitsprozessen wie der Arteriosklerose liefern werden.

Gentechnologie und Molekularbiologie bei koronarer Herzerkrankung: molekulare Therapieansätze und klinische Anwendungen

Im Jahr 2000 stehen eine Reihe gentechnologischer Entwicklungen an der Schwelle zur klinischen Umsetzung. Dies gilt auch für die Herz-Kreislauf-Medizin. Im nachfolgenden seien die Grundlagen der verschiedenen Konzepte ebenso skizziert wie der aktuelle Stand dieser Entwicklungen. Die Frage, ob Gentherapie eine praktikable therapeutische Alternative zu unseren konventionellen Behandlungsformen werden kann, ist derzeit noch nicht sicher zu beantworten.

Therapie mit rekombinanten Proteinen

Die sicherste Strategie, die therapeutische Wirkung eines definierten Genprodukts zu nutzen, ist die Applikation des rekombinanten Proteins. Die moderne Biotechnologie verfügt über sehr effiziente Methoden zur Herstellung großer Quantitäten qualitativ hochwertiger rekombinanter Proteine. Ihren Siegeszug hat diese Entwicklung mit der Herstellung von rekombinantem Human-Insulin in den 80er Jahren genommen. Das erste „Großserienprodukt“ in der Kardiologie war das rt-PA vor gut 10 Jahren. Mittlerweile gibt es zahlreiche, nach den entsprechenden Qualitätskriterien (GMP, good medical practice) hergestellte rekombinante Proteine. Hierzu zählen auch mehrere rekombinante Angiogenesefaktoren wie bFGF und VEGF-A, die gegenwärtig in Studien zur Stimulation der therapeutischen Angiogenese eingesetzt werden. Da in den ersten klinischen Studien zur therapeutischen Angiogenese aber der Gentransfer eingesetzt wurde, wird dieses Konzept weiter unten in allen seinen Aspekten dargestellt (s. u.).

Therapie mit spezifischen niedermolekularen Komponenten

Eine unter therapeutischen Aspekten interessante Gruppe niedermolekularer Substanzen stellen die bereits erwähnten Tyrophostine dar. Es handelt sich hierbei um *tyrosin-phosphorylation inhibitors*, die sich als ATP-Analoga zur Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung einzelner Tyrosin-Kinasen (z. B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren) eignen können. Beispiele erfolgreicher Screening-Prozesse sind Inhibitoren für den VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1/KDR) [15] und für die PDGF-Rezeptoren [14]. Diese Substanzen befinden sich momentan in einer frühen klinischen Erprobung oder stehen kurz davor [16, 17]. Mögliche Indikationsgebiete sind die Hemmung der Tumorangiogenese im Fall des VEGF-Antagonisten [18] sowie die Hemmung der Restenose im Fall des PDGF-Antagonisten.

PDGF-Antagonismus zur Prävention der Restenose

Die Prävention der Restenose stellt trotz bemerkenswerter wissenschaftlicher und industrieller Innovationen nach wie vor ein ungelöstes Problem und damit eine der großen Herausforderungen in der Kardiologie dar. Eine Vielzahl von Strategien wurde hierzu entwickelt und teilweise auch schon erprobt, wobei sich einige davon derzeit in einer späten präklinischen Phase befinden. Wichtige Voraussetzungen für eine klinische Erprobung sind schon erfüllt. Die Strategie des bereits erwähnten PDGF-Antago-

nismus mittels Tyrophostinen sei hier exemplarisch vorgestellt. Alternative Strategien mit E2F-Antisense-Oligonukleotiden und mit dem Gentransfer der endothelialen NO-Synthase folgen in den nächsten Kapiteln.

PDGF ist kausal an vaskulären Umbauprozessen beteiligt [19]. Im Rahmen einer präklinischen Entwicklung wurden bereits zahlreiche Ansätze zur Antagonisierung von PDGF erprobt, die allesamt eine signifikante Reduktion der Neointimabildung nach Gefäßläsion zur Folge hatten (Tab. 3). Eine vielversprechende Entwicklung stellen PDGF-Rezeptor-spezifische Tyrophostine dar, die zwar eine Bildung von PDGF erlauben, eine Aktivierung seiner Rezeptoren aber unterbinden [14]. Die lokale Applikation des Tyrophostins führte sowohl im Schweinemodell [16] wie auch bei der Ratte [17] zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung. Im letzteren Fall erfolgte die Applikation über AG1296-beladene Nanopartikel, die mit einem Katheter von luminal in die Gefäßwand eingebracht wurden, um das Tyrophostin über Wochen freizusetzen. Neueste Entwicklungen gehen dahin, Hemmsubstanzen zu identifizieren, die noch potenter sind als ein reiner PDGF-Rezeptor-Blocker. Eine solche Substanz wurde mit dem Src/PDGF-Rezeptor-Blocker PP1/AG1872 gefunden [3].

Prävention des Bypass-Versagens mittels E2F-Antisense

Es existieren mehrere Möglichkeiten, die Wirkung eines Genprodukts auszuschalten. Eine der ersten hierzu praktizierten Strategien war die Verwendung von Antisense-Oligodeoxynukleotiden (AS-ODN). Deren Wirkung beruht darauf, daß die AS-ODN ins Zellinnere gelangen, dort selektiv an spezifische mRNA binden und dadurch deren Translation in funktionell aktive Proteine unterbinden. Somit wird die Bildung des spezifischen Genprodukts unterdrückt, sodaß in der Folge auch dessen Wirkung unterbleibt. Eine Vielzahl von Detailfragen und konzeptionellen Fragen muß noch beantwortet werden, bevor diese Technologie Einzug in die routinemäßige klinische Anwendung finden kann. Hierzu gehört insbesondere die Frage der effizienten und selektiven lokalen Applikation. Prinzipiell zu unterscheiden ist der *In-vivo*-Gentransfer, bei dem das therapeutische Gen bzw. die zu übertragende DNA in den Organismus eingebracht wird, vom *Ex-vivo*-Gentransfer, bei dem isolierte Zellen, isolierte Gewebe oder isolierte Organe außerhalb des Körpers transfiziert und nachfolgend in den Gesamtorganismus eingebracht werden (Abb. 1).

Vor wenigen Monaten wurde die erste klinische Studie publiziert, in der die erfolgreiche Verwendung eines Antisense-Oligonukleotids zur Therapie einer Herz-Kreislauf-Erkrankung bzw. zur Prävention des Bypass-Versagens eingesetzt wurde. Die Arbeitsgruppe um Victor Dzau in Boston, MA, hat im Rahmen einer kontrollierten und randomisierten Studie (PREVENT) gezeigt, daß eine *Ex-vivo*-Gen-

Tabelle 3: Antagonisierung von PDGF in der Gefäßwand

Ferns et al., 1991	PDGF-Antiserum
Hert et al., 1997	PDGF-Antikörper
Sirois et al., 1997	PDGF β -Rezeptor-Antisense ODN
Marijjanowski et al., 1997	PDGF β -Rezeptor-Antikörper
Banai et al., 1998	PDGF β -Rezeptor-spezifisches Tyrophostin
Fishbein et al., 2000	PDGF β -Rezeptor-spezifisches Tyrophostin
Waltenberger et al., 1999	PDGF β -Rezeptor/Src-spezifisches Tyrophostin, duale Signal-Transduktions-Hemmung ¹

¹ bisher nur in glatten Gefäßmuskeln *in vitro* gezeigt

therapie (d. h. das Einbringen der Oligonukleotide in das Gefäßsegment vor Implantation desselbigen) zu einer Reduktion des Bypass-Versagens führte [20]. Langjährige Vorarbeiten sind dieser Studie vorausgegangen [21].

Gentransfer im kardiovaskulären System

Für eine Reihe pathophysiologischer Konstellationen konnte festgestellt werden, daß eine gesteigerte Verfügbarkeit bestimmter Genprodukte einen kausalen Therapieansatz darstellt. Eine überaus attraktive Methode zur Erzeugung spezifischer Genprodukte *in vivo* bzw. *in situ* stellt der Gentransfer dar. Obwohl zahlreiche grundlegende Fragen zum Gentransfer bislang noch ungeklärt geblieben sind [22], gibt es mittlerweile doch mehrere Berichte über einen erfolgreichen Gentransfer im kardiovaskulären System (Tab. 4) [23, 24]. Andererseits ist die anfängliche Euphorie über diese Methode einer eher kritischen Analyse gewichen, was nicht zuletzt durch kürzlich bekannt gewordene, ungeklärte Todesfälle im Zusammenhang mit dem Gentransfer gefördert wurde. An dieser Stelle sollen nur die grundlegenden Aspekte des Gentransfers skizziert werden, um ein Verständnis der nachfolgend aufgeführten Strategien zu ermöglichen. Wesentlich ausführlichere Übersichtsarbeiten zur kardiovaskulären Gentherapie wurden unlängst publiziert [25, 26].

Beim Gentransfer wird die cDNA des betreffenden Gens in eine Zielzelle übertragen, was unter Verwendung verschiedener Vektoren erfolgen kann. Hierzu kommt entweder der Transfer transkriptionsfähiger Plasmide („nackte DNA“) oder die Einbindung der Fremd-DNA in virale Vektoren (z. B. Adenoviren, Adenoassoziierte Viren, Lentiviren etc.) in Frage. Die Effizienzen der verschiedenen Strategien sind unter therapeutischen Aspekten teilweise nicht ausreichend und unterscheiden sich ebenso wie die möglichen Nebenwirkungen. Die meisten der bislang getesteten viralen Vektorsysteme haben ihren Nachteil in einem häufig fehlenden Zelltropismus, einer fehlenden Steuerbarkeit des Expressionsniveaus des Fremdgens und in einer inflammatorischen Begleitreaktion, was neben einer reduzierten Wirksamkeit auch eine limitierte Expressionsdauer zur Folge haben kann. Letzteres kann allerdings in manchen Situationen (z. B. Hemmung der Restenose, Stimulation des Kollateralenwachstums) durchaus auch erwünscht sein.

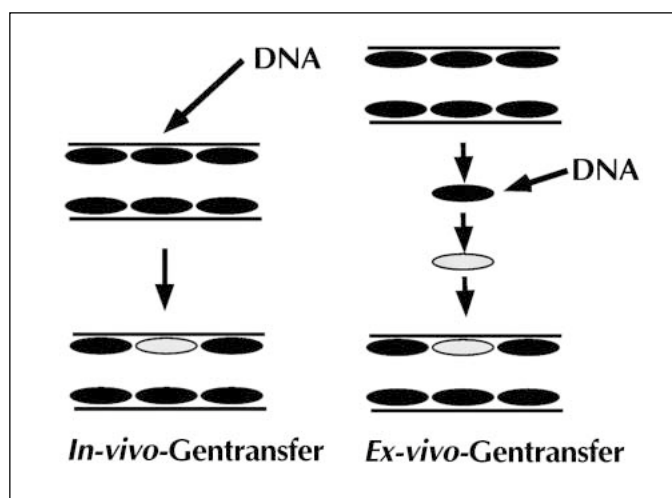


Abbildung 1: Prinzipien des Gentransfers. Der *In-vivo*-Gentransfer beschreibt das Einbringen eines Gens in eine Zielzelle innerhalb des Gesamtorganismus, während der *Ex-vivo*-Gentransfer die Übertragung von genetischem Material in ein Gewebe außerhalb des Körpers beschreibt, bevor das modifizierte Gewebe/Organ nachfolgend implantiert wird.

Prävention der Restenose durch Gentransfer der NO-Synthase

Vor etwa 2 Jahrzehnten wurden bahnbrechende Arbeiten zur Regulation des Gefäßtonus publiziert, wobei das entscheidende vasodilatierende Molekül nach langer Suche als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden konnte. Diese Arbeiten wurden dann Ende 1998 mit der Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin an Ferid Murad, Robert Furchgott und Louis Ignarro ausgezeichnet. Neben einer vasodilatierenden Wirkung besitzt NO auch eine antiproliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskulzellen, weshalb erprobt wird, dieses Prinzip zur Prävention der Restenose einzusetzen. Hierbei erscheint der Gentransfer der endothelialen NO-Synthase (eNOS) prinzipiell machbar [27] und vielversprechend [28, 29]. Auch im Großtiermodell ließ sich bereits zeigen, daß die Überexpression der eNOS nach koronarer Angioplastie zur Reduktion sekundärer Umbauprozesse führte. Erste Therapieversuche nach koronarer Angioplastie beim Menschen sind bereits für dieses Jahr geplant.

Induktion des Kollateralenwachstums/Gefäßwachstums; therapeutische Angiogenese/therapeutische Arteriogenese

Eine neue therapeutische Perspektive bei fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung stellt die Induktion des Kollateralenwachstums dar. Zahlreiche klinische und präklinische Untersuchungen der vergangenen Jahrzehnte haben eindeutig gezeigt, daß die Entwicklung von Kollateralen bei regionaler Myokardischämie sowohl zur Verbesserung der regionalen Myokardperfusion als auch zur Verbesserung der Prognose bei diesen Patienten führt (zusammengefaßt in: Waltenberger & Hombach, 2000 [30]). Deshalb erscheint es als konsequent, dann zumindest eine therapeutische Induktion von Kollateralen anzustreben, wenn andere Optionen der Revaskularisation aufgrund fortgeschrittener und diffuser Koronarstenosen nicht mehr praktikabel sind.

Der Prozeß der Kollateralisierung beruht neben der Neubildung von Kapillaren (Angiogenese) auf dem Dickenwachstum präformierter Kollateralen (Arteriogenese). Die molekularen Mechanismen der Arteriogenese sind bislang nur partiell verstanden. Es gibt aber klare Hinweise dafür, daß Monozyten als Wachstumsfaktor-Reservoir an der Arteriogenese beteiligt sind [31]. Die Monozyten-Rekrutierung

Tabelle 4: Gentherapie bei Arteriosklerose; Stand des kardiovaskulären Gentransfers beim Menschen (Januar 2000)

- Erfolgreicher Gentransfer in arteriosklerotisch veränderte Arterien
Laitinen M et al. Human Gene Therapy 1998; 9: 1481–6
- Studie zur Hemmung der Neointimabildung in Venenbypass-Segmenten mittels *Ex-vivo*-Gentransfer eines E2F-Antisense-Oligonukleotids (Decoy)
Mann MJ et al. Lancet 1999; 354: 1493–8
- Studie zur Prävention der Restenose durch VEGF-Gentransfer i. a. bei KHK Ad.VEGF-A₁₆₅ versus VEGF-A₁₆₅-Plasmid
Laitinen M et al. Human Gene Therapy 2000; 22: 263–70
- Studien zur Stimulation der therapeutischen Angiogenese mittels
 - VEGF-Gentransfer VEGF-A₁₆₅-Plasmid bei pAVK intraarteriell
Isner JM et al., Lancet 1996; 348: 370–4
 - VEGF-A₁₆₅-Plasmid bei pAVK intramuskulär
Baumgartner I et al. Circulation 1998; 97: 1114–23
 - VEGF-A₁₆₅-Plasmid bei KHK intramyokardial
Losordo DW et al. Circulation 1998; 98: 2800–4
 - Adenovirales Konstrukt (Ad(GV)VEGF121.10) bei KHK intramyokardial
Rosengart TK et al. Circulation 1999; 100: 468–74

nung kann hierbei durch MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) erfolgen [32]. Andererseits gibt es auch Hinweise dafür, daß der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-A (VEGF-A) als monozytenchemotaktisches Agens bei der Kollateralisierung [33] und bei der Arteriogenese beteiligt ist (eigene, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ungeachtet dieser neuen Erkenntnisse und basierend auf der Annahme, daß die Kollateralisierung ausschließlich auf dem Prozeß der Angiogenese beruht, wurde bereits Mitte der 90er Jahre die Hypothese getestet und verifiziert, daß sich durch regionale Applikation des Angiogenesefaktors VEGF-A eine Verbesserung der Perfusion bei regionaler Ischämie erreichen läßt. Dies wurde im Tiermodell sowohl bei peripherer Ischämie [34] als auch bei regionaler Myokardischämie [35] gezeigt. Es folgte rasch die Phase der klinischen Erprobung dieses Konzeptes, wobei hier aufgrund der limitierten Verfügbarkeit des rekombinanten Proteins und aus einer Reihe weiterer Überlegungen heraus auch zahlreiche Gentransfer-Studien zur Induktion der therapeutischen Angiogenese/therapeutischen Arteriogenese begonnen wurden (Tab. 5). Derzeit liegen die Ergebnisse mehrerer Phase I/II-Studien vor [36, 37]. Da viele dieser Studien nicht kontrolliert waren, sind die Aussagen zur therapeutischen Wirksamkeit limitiert. Es kann jedoch festgehalten werden, daß die durchgeführten Gentransfer-Studien machbar und auf der Basis der publizierten Daten ohne nennenswerte Nebenwirkungen waren. Bei einzelnen Patienten verbesserte sich die Myokardperfusion wie auch die Symptomatik deutlich. Allerdings muß auch festgehalten werden, daß die erste große Studie zur VEGF-Proteintherapie (rhVEGF-A₁₆₅ i. c.) bei myokardialer Ischämie (VIVA-Studie) zwar eine deutliche Verbesserung bei den therapierten Patienten zeigte, andererseits aber auch eine vergleichbare Verbesserung bei den Patienten der Placebo-Gruppe [38] beobachtet werden konnte. Somit muß man zum gegenwärtigen Zeitpunkt zwei Schlußfolgerungen aus der VIVA-Studie ziehen: Zum einen darf der Placebo-Effekt beim therapierten Patientenkollektiv nicht unterschätzt werden, zum anderen führte eine kurzfristige intrakoronare VEGF-A-Proteintherapie

nicht zum Erreichen des vorgegebenen Endpunktes der Studie, nämlich einer Verbesserung der Belastbarkeit gegenüber der Kontrollgruppe.

Die kommenden Monate und Jahre werden zeigen, ob eine therapeutische Induktion der Kollateralisierung Einzug in die klinische Routine halten wird und welches hierfür die optimalen Faktoren und die optimalen Applikationsstrategien sein werden.

Danksagung

Die Arbeiten des Autors werden derzeit unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB451/A2, SFB451/B1, SFB497/C1, SPP1069, WA734/4-1), durch die Fritz-Thyssen-Stiftung, die Deutsch-Israelische Stiftung und durch das Land Baden-Württemberg.

Literatur:

1. Waltenberger J. Molekularbiologische Techniken und Gentherapie. In: Hombach V (ed). Lehrbuch der interventionellen Kardiologie und Kardiovaskularchirurgie. Schattauer, Stuttgart, New York, 2000.
2. Waltenberger J, Mayr U, Frank H, Hombach V. Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. Interaction with KDR as a potential molecular basis for its antiangiogenic action. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1523–9.
3. Waltenberger J, Uecker A, Kroll J, Frank H, Mayr U, Fujita D, Gazit A, Hombach V, Levitzki A, Böhmer F-D. A dual inhibitor of PDGF β -receptor and Src kinase activity potentially interferes with mitogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cells. A novel candidate for prevention of vascular remodelling. *Circ Res* 1999; 85: 12–22.
4. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 743–6.
5. Kranz A, Mayr U, Frank H, Waltenberger J. The coronary endothelium – a target for VEGF. Human coronary artery endothelial cells express functional receptors for VEGF in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1999; 79: 985–91.
6. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C-H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988–95.
7. Kroll J, Waltenberger J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 274: 32521–7.
8. Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 1996; 94: 1647–54.
9. Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF-receptor-2/KDR: Rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 636–9.
10. Waltenberger J. Transforming growth factor- β induction in carcinoid heart disease. In: Cummins P (ed). Growth factors and the cardiovascular system. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA 1993; 311–20.
11. Waltenberger J, Wanders A, Fellström B, Miyazono K, Heldin C-H, Funa K. Induction of transforming growth factor- β during cardiac allograft rejection. *J Immunol* 1993; 151: 1147–57.
12. Waltenberger J, Akyürek ML, Aurivillius M, Wanders A, Larsson E, Fellström B, Funa K. Ischemia-induced transplant arteriosclerosis in the rat. Induction of peptide growth factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1516–23.
13. Kranz A, Mattfeldt T, Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis: Enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 84: 293–8.
14. Kovalenko M, Gazit A, Böhmer A, Rorsman C, Heldin C-H, Waltenberger J, Böhmer F-D, Levitzki A. Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation. *Cancer Res* 1994; 54: 6106–14.
15. Strawn LM, McMahon G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, Hui TH, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri G, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KP, Shawver LK. Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res* 1996; 56: 3540–5.
16. Banai S, Wolf Y, Golomb G, Pearle A, Waltenberger J, Fishbein I, Schneider A, Gazit A, Perez LS, Huber R, Lazarovich G, Rabinovich L, Levitzki A, Gertz SD. PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro

Tabelle 5: Therapeutische Angiogenese/therapeutische Arteriogenese mittels VEGF-A bei kardiovaskulären Erkrankungen (modifiziert nach: Kroll und Waltenberger, *Z Kardiologie* 2000; 89: 206–18)

Konstrukt/ Applikation	Indi- kation	Therapieziel/ Bemerkung	Untersucher
phVEGF-A ₁₆₅	pAVK	Gefäßwachstum/ Pilotstudie	Isner JM
phVEGF-A ₁₆₅ i. m. ¹	pAVK	Periphere Durch- blutung	Isner JM
phVEGF-A ₁₆₅ i. m. ²	KHK	Myokarddurchblutung	Isner JM
rhVEGF-A ₁₆₅ i. c.	KHK	Myokarddurchblutung, keine Zunahme der Belastbarkeit nach 60 Tagen, bisher keine angiographischen Daten verfügbar	McCluskey T
Ad(GV) VEGF121.10 i. m. ²	KHK	Myokarddurchblutung, Senkung der Angina pectoris- Schwelle	Crystal RG
phVEGF-A ₁₆₅	– Plasmid mit humanem VEGF-A ₁₆₅ -Gen		
rhVEGF-A ₁₆₅	– rekombinantes humanes VEGF-A ₁₆₅ -Protein		
Ad(GV)VEGF121.10	– adenovirale Konstrukt mit dem humanen VEGF-A ₁₂₁ -Gen		

¹ intramuskulär; ² intramyokardial

- and reduces neointima formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation* 1998; 97: 1960–9.
17. Fishbein I, Waltenberger J, Banai S, Rabinovich L, Chorny M, Levitzki A, Gazit A, Huber R, Mayr U, Gertz DS, Golomb G. Local delivery of PDGF receptor-specific tyrphostin inhibits neointimal formation in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 667–76.
 18. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; 59: 99–106.
 19. Waltenberger J. Modulation of growth factor action. Implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 1997; 96: 4083–95.
 20. Mann MJ, Whittlemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomized, controlled trial. *Lancet* 1999; 354: 1493–8.
 21. Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5855–9.
 22. Kroll J, Waltenberger J. Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Z Kardiol* 2000; 89: 206–18.
 23. Laitinen M, Makinen K, Manninen H, Matsi P, Kossila M, Agrawal RS, Pakkanen T, Luoma JS, Viita H, Hartikainen J, Alhava E, Laakso M, Yla-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1481–6.
 24. Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, Eranen J, Kiviniemi M, Narvanen O, Makinen K, Manninen H, Syvanne M, Martin JF, Laakso M, Yla-Herttuala S. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther* 2000; 22: 263–270.
 25. Verma IM, Somia N. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389: 239–42.
 26. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation* 2000; 101: 454–458.
 27. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1137–41.
 28. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, Collen D. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 1998; 97: 1274–81.
 29. Varenne O, Pislaru S, Gillijns H, Van Pelt N, Gerard RD, Zoldhelyi P, Van de Werf F, Collen D, Janssens SP. Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. *Circulation* 1998; 98: 919–26.
 30. Waltenberger J, Hombach V. Therapeutic angiogenesis for the heart. In: Fan T-PD, Auerbach R (eds). *The new angiotherapy*. The Humana Press Inc, Totowa, NJ 2000.
 31. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997; 80: 829–37.
 32. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998; 101: 40–50.
 33. Waltenberger J, Lange J, Kranz A. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus. A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. (in Druck)
 34. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu L-Q, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662–70.
 35. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; 89: 2183–9.
 36. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis - Initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF(165) as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800–4.
 37. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100: 468–74.
 38. Henry TD, Annex BH, Azrin MA, McKendall G, Willerson JT, Giordano FJ, Klein R, Gibson M, Berman DS, Luce CA, McCluskey ER. Final results of the VIVA trial of rhVEGF for human therapeutic angiogenesis. *Circulation* 1999; 101: 1–476.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

Impressum

Disclaimers & Copyright

Datenschutzerklärung