

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Angiogenese

#### 2.1.1 Endothelzellen

Das vaskuläre Endothel kleidet als einschichtige Zellschicht luminal das gesamte Blutgefäßsystem aus und gehört zusammen mit der Basalmembran zur Tunica intima der Blutgefäße. Während Kapillaren nur aus Endothelzellen und der Basalmembran sowie meist den außen anliegenden Perizyten bestehen, weisen Arteriolen und Venulen sowie Arterien und Venen zwei weitere Schichten auf, nämlich die Tunica media, die aus glatten Muskelzellen besteht und unterschiedliche Mengen elastische sowie kollagene Fasern enthält, und die Tunica adventitia (externa) aus überwiegend lockerem Bindegewebe, die als Verschiebeschicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung steht (Junqueira et al., 2002).

Das vaskuläre Endothel bildet eine Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und umgebendem Gewebe und reguliert den Stoff- und Zellaustausch zwischen diesen beiden Kompartimenten (Fishman, 1982). Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an das Endothel im Körper, bilden die Endothelzellen unterschiedliche Verbindungen aus. Ein sogenanntes Schrankenendothel, charakterisiert durch ein zusammenhängendes Endothel und umgebende kontinuierliche Basalmembran, findet man beispielsweise in Gehirn, Lunge und Retina. In Geweben mit einem hohen Stoffaustausch (z.B. Darm, endokrine Drüsen, Niere) dagegen sind Kapillaren mit Endothelzellen, die Fenestrations mit Durchmessern zwischen 60 und 80 nm aufweisen, ausgebildet. Im Gegensatz zu den Kapillaren der Nierenglomerula sind die Fenestrations der übrigen Endothelien dieses Kapillartyps von einem Diaphragma von 4-6 nm Dicke verschlossen. Die Wand von diskontinuierlichen Kapillaren, wie man sie in Leber, Milz und Knochenmark vorfindet, ist gekennzeichnet durch Lücken (> 100 nm) zwischen den Endothelzellen sowie, je nach Intensität des Stoffaustausches, durch eine diskontinuierliche oder fehlende Basalmembran (Junqueira et al., 2002).

Zu den synthetischen Fähigkeiten der Endothelzellen gehört die Produktion von Bestandteilen der Basalmembran (z.B. Kollagen IV, Laminin, Fibronectin). Als spezifische Zellorganellen besitzen die Endothelzellen zahlreicher Spezies Weibel-Palade-Körperchen, in denen u.a. der für die Adhäsion von Blutplättchen an Gefäßwandverletzungen notwendige von Wilbrand Faktor (vWF) sowie P-Selektin, welches die Adhäsion von Leukozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse vermittelt, nach ihrer Synthese gespeichert werden (Junqueira et al., 2002; Wagner, 1993).

Des Weiteren ist das Endothel durch Bildung biologisch aktiver Substanzen an der Regulation des Gefäßtonus sowie der Koagulation und Fibrinolyse beteiligt (Cines et al., 1998; Griendling und Alexander, 1996) und kontrolliert durch Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle die selektive Verteilung von zirkulierenden Zellen, wie Leukozyten aber auch Tumorzellen in bestimmte Organe und Gewebe.

Insgesamt stellt das vaskuläre Endothel eine sehr heterogene Zellpopulation dar, wobei Entwicklungsphasen-, Organ-, Spezies- und auch Geschlechts-spezifische Unterschiede bestehen (Plendl et al., 1992). Endothelzellen sind somit dynamische, systemisch disseminierte, heterogene Zellen mit synthetischen, sekretorischen, metabolischen und immunologischen Funktionen (Cines et al., 1998).

### **2.1.2 Extrazelluläre Matrix**

Die extrazelluläre Matrix umgibt reife Endothelzellen und tritt als interstitielle Matrix sowie in spezialisierter Form als vaskuläre Basalmembran zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen oder Perizyten auf (Iivanainen et al., 2003; Paulsson, 1992).

Basalmembranen sind 60-100 nm dick und können transmissionselektronenmikroskopisch in drei Schichten unterteilt werden (Kefalides et al., 1979): Lamina rara, der die Endothelzellen anliegen, Lamina densa, zusammenfassend auch als Basallamina bezeichnet und Lamina reticularis. Hauptbestandteile der Basalmembran sind Kollagen IV, Laminin, Entactin/Nidogen und Glykosaminoglycane wie Perlecan (Deckwer et al., 1999; Paulsson, 1992; Timpl, 1996), während in der interstitiellen Matrix fibrilläres Kollagen und Glykoproteine wie Fibronectin vorherrschen (Iivanainen et al., 2003). An der Bildung der Basalmembran sind neben Endothelzellen auch Perizyten beteiligt (Amselgruber et al., 1999; Hirschi und D'Amore, 1996). *In vitro*-Versuche zeigen, dass Endothelzellen in Kultur verschiedene Bestandteile der Basalmembran, unter anderem Laminin (Kramer et al., 1984; Schuster, 2002; Tilling et al., 2002), Fibronectin (Feder et al., 1983; Tilling et al., 2002), Kollagen I und III

(Sage et al., 1981) sowie Kollagen IV (Kramer et al., 1984; Tilling et al., 2002) synthetisieren und sezernieren.

Die Verankerung der Endothelzellen an der extrazellulären Matrix erfolgt durch Integrine, die durch die Zellmembran die Verbindung von der extrazellulären Matrix ins Zellinnere herstellen (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Bei Kontaktverlust mit der extrazellulären Matrix kann Apoptose eingeleitet werden (Peters et al., 2002). Die extrazelluläre Matrix besitzt aber nicht nur eine mechanische Funktion zur Unterstützung und Aufrechterhaltung der Gewebestrukturen, sondern ist auch in wichtige zelluläre Funktionen wie Migration, Proliferation und Differenzierung involviert (Deckwer et al., 1999; Ekblom et al., 1986; Sternlicht und Werb, 2001). Auch bei der Bindung und Speicherung von Wachstumsfaktoren oder Proteinen, die Wachstumsfaktoren binden, spielt die extrazelluläre Matrix eine aktive Rolle (Streuli, 1999).

### **2.1.3 Entstehung der Blutgefäße: Vaskulogenese, Angiogenese und Intussuszeption**

Während der Embryonalentwicklung differenzieren sich extraembryonal im Dottersack aus mesenchymalen Blutinseln die Vorläuferzellen von Blutzellen (hämatopoetische Vorläuferzellen) und Endothelzellen (Angioblasten). Die Bildung von Blutgefäßen durch die Differenzierung von Angioblasten sowie ihre Organisation in ein primäres, vaskuläres Netzwerk bezeichnet man als Vaskulogenese (Risau und Flamme, 1995). Die enge räumliche und zeitliche Assoziation von hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen indiziert die Existenz einer gemeinsamen Vorläuferzelle, des Hämangioblasten (Choi et al., 1998; Eichmann et al., 1997). Unterstützt wird diese Hypothese durch Übereinstimmungen beider Zelllinien in der Expression von verschiedenen Genen (Asahara et al., 1997; Hamaguchi et al., 1999; Kallianpur et al., 1994; Yamaguchi et al., 1993; Young et al., 1995).

Obwohl die Vaskulogenese ausschließlich auf die frühe Phase der Embryonalentwicklung beschränkt ist, zeigen neuere Untersuchungen Hinweise auf Gefäßneubildung durch vaskulogeneseartige Prozesse im adulten Organismus (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999; Lin et al., 2000; Lutun et al., 2002; Ribatti et al., 2001; Shi et al., 1998).

Der weitere Umbau des primären Gefäßsystems erfolgt durch Angiogenese, die Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen (Carmeliet, 2000; Risau, 1997). Neben der Sprossung gibt es noch eine zweite Form der Angiogenese, die in der Lunge, im Herzen sowie in der Chorioallantoismembran (CAM) beschrieben wurde, die Intussuszeption (Burri

und Tarek, 1990; Caduff et al., 1986; Patan et al., 1992; Patan et al., 1993; Risau, 1997; van Groningen et al., 1991). Hierbei werden bereits vorhandene Gefäße durch Einschnürung oder Kompartimentierung via luminal einwachsender Endothelzelle geteilt.

Der primäre Gefäßplexus wird während der Embryonalentwicklung den sich verändernden Anforderungen entsprechend umgebaut bis ein reifes vaskuläres System, bestehend aus Gefäßen mit unterschiedlichen Durchmessern und Funktionen, gebildet ist.

Angiogenese kommt neben der Embryonalentwicklung auch physiologisch im adulten Organismus in den weiblichen Reproduktionsorganen vor (Modlich et al., 1996), nämlich während der Follikelreifung, der Bildung des Corpus luteum, der Entwicklung der Plazenta sowie in der Milchdrüse im Verlaufe der Gravidität (Matsumoto et al., 1992). Daneben ist die Angiogenese aber auch entscheidend bei regenerativen Vorgängen wie der Wundheilung (Folkman und Shing, 1992; Knighton et al., 1982). Bei diesen Prozessen ist die Angiogenese streng reguliert, sie wird für kurze Zeit initiiert und anschließend komplett inhibiert. Unkontrollierte Blutgefäßbildung dagegen spielt bei verschiedenen Erkrankungen, wie der diabetischen Retinopathie oder der rheumatoiden Arthritis, vor allem aber bei Tumorwachstum und Metastasierung eine maßgebliche Rolle (Folkman 1971; Folkman, 1995). Ein wachsender Tumor benötigt für die Sicherstellung seiner Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ein ausgedehntes kapilläres Netzwerk. Zusätzlich eröffnen die neu gebildeten Blutgefäße den Tumorzellen einen Weg, in den Kreislauf zu gelangen und somit in anderen Organen und Geweben Metastasen zu bilden.

#### **2.1.4 Apoptose**

Der programmierte Zelltod (Apoptose) von Endothelzellen findet sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus statt. Im Gegensatz zur Nekrose versteht man unter Apoptose einen aktiven, biochemisch regulierten Prozess, welcher keinen Zelltod von Nachbarzellen und keine Entzündungsreaktionen auslöst (Stefanec, 2000). Verschiedene Stimuli aktivieren über eine Vielzahl von Rezeptoren und Signaltransduktionswegen eine Kaskade von Proteasen (Caspasen), welche das Programm der zellulären Selbstzerstörung einleiten (Stefanec, 2000). Mitochondrien spielen hierbei eine Schlüsselrolle durch Freisetzung von Caspase-Aktivatoren (z.B. Cytochrom C), Veränderungen im Elektronentransport, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie veränderte zelluläre Redox-Reaktionen (Green und Reed, 1998). Eine Fehlregulierung der Apoptose kann sowohl zu Tumoren und Autoimmunerkrankungen als auch zu Gewebeerstörungen führen (Nagata et al., 2003).

Apoptose ist charakterisiert durch morphologische Veränderungen der Zelle. Die Zelle schrumpft, löst sich aus ihrem Zellverband und es kommt zur Bildung apoptotischer Bläschen an der Zelloberfläche. Gleichzeitig erfolgt eine Kondensation des Chromatins in der Nähe der inneren Kernmembran (Kernwandhyperchromatose). Der Kern zerfällt in Fragmente und schließlich auch die Zelle in zahlreiche membranumschlossene, organellenreiche Teile, die so genannten apoptotischen Körperchen (Duke et al., 1997). Apoptotische Körperchen werden von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert.

Im adulten Organismus ist die Apoptose von Endothelzellen quasi der Gegenspieler zur Neovaskularisierung (Dimmeler und Zeiher, 2000). Pro-angiogene Faktoren wie beispielsweise der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und der Fibroblast Growth Factor (FGF) verhindern eine endotheliale Apoptose (Araki et al., 1990; Gerber et al., 1998). Apoptotische Endothelzellen setzen Interleukin-1 (IL-1) frei (Hébert et al., 1998; Lemaire et al., 1998), welches auf der einen Seite die Apoptose von Endothelzellen induzieren (López-Collazo et al., 1997), auf der anderen Seite aber beispielsweise die Endozytose von apoptotischen Körperchen durch benachbarte Endothelzellen steigern kann (Dini et al., 1995). Zoellner und Mitarbeiter (1996) zeigten, dass die Apoptose von kultivierten humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) durch Serumentzug und Verlust der Adhäsion induziert wird.

Verschiedene Studien berichten von einer Beteiligung der Apoptose im Rahmen der angiogenen Kaskade *in vivo* und *in vitro* (Meyer et al., 1997; Peters et al., 2002; Segura et al., 2002).

### **2.1.5 Angiogene Kaskade**

Angiogenese stellt einen komplexen, kaskadenartig ablaufenden Vorgang dar, welcher aus dem intensiven Zusammenspiel von Zellen, löslichen Faktoren und extrazellulären Matrixkomponenten resultiert. Die angiogene Kaskade beinhaltet Wachstum und Stabilisierung des neuen Gefäßes (Vailhé et al., 2001).

#### **2.1.5.1 Wachstum des Gefäßes**

Endothelzellen, aktiviert durch einen angiogenen Stimulus, müssen sich zur Initiation der angiogenen Kaskade von ihren Nachbarzellen lösen, bevor sie in das umgebende Gewebe invadieren können. Maßgeblich beteiligt sind hierbei Zelladhäsionsmoleküle (Bischoff, 1997). Lokal werden die Basalmembran und die umgebende interstitielle Matrix aufgelöst (Mignatti und Rifkin, 1996). Die hierfür notwendigen proteolytischen Enzyme, die zum Plasminogen-Aktivator (PA)- und Matrix-Metalloproteinase (MMP)-System gehören (Mignatti und Rifkin, 1996), werden unter anderem von Endothelzellen und Perizyten gebildet (Nicosia und Villasischi, 1999). Im Anschluss an die lokale Degradation der extrazellulären Matrix beginnen die

ersten Endothelzellen an dieser Stelle in Richtung des angiogenen Stimulus zu migrieren. Hinter der Front der migrierenden Zellen erfolgt eine Proliferation von Endothelzellen, die zur Verlängerung des endothelialen Stranges führt. Die Stimulation der Zellen erfolgt durch eine Reihe von pro-angiogenen Faktoren, die zum Teil aus der degradierten Matrix freigesetzt werden (Slevin et al., 1998).

Ist ein Kapillarspross aus mehreren Endothelzellen gebildet, erfolgt an der Spitze des Sprosses erneut eine Degradation der extrazellulären Matrix, was eine weitere Invasion der Zellen erlaubt. Die offenen Enden der gebildeten kapillären Sprosse fusionieren durch Anastomose und es kommt zur Schlingenbildung („loops“). Ausgehend von den neu gebildeten Schlingen entsteht durch weitere Migration und Proliferation von Endothelzellen schließlich ein Netzwerk kapillarähnlicher Strukturen (Gimbrone et al., 1974).

Der Prozess der **Lumenbildung** innerhalb des endothelialen Kapillarsprosses ist noch weitgehend unbekannt. Anhand von *in vitro*-Untersuchungen wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Das Auftreten von Vakuolen in kultivierten Endothelzellen des kapillären Sprosses wurde 1980 von Folkman und Haudenschild beschrieben (1980a). Hierbei entstehen in den Endothelzellen kleine Vakuolen, die zu einer großen Vakuole zusammenfließen. Die Vakuolen enthalten ein nicht näher charakterisiertes Material, welches nach Abschluss der Lumenbildung resorbiert wird (Ingber und Folkman, 1989a). Durch Vereinigung der Vakuolen benachbarter Endothelzellen entsteht schließlich ein kontinuierliches Lumen, welches im Durchmesser nur von einer Endothelzelle begrenzt sein kann. Die Entstehung von Vakuolen in den Endothelzellen im Zuge der Lumenbildung wurde nachfolgend von mehreren Autoren beschrieben (Bayless et al., 2000; Bayless und Davis, 2002; Davis und Camarillo, 1996; Iruela-Arispe et al., 1991; Kubota et al., 1988; Meyer et al., 1997; Montesano et al., 1983). Nach der Theorie von Meyer et al. (1997) konfluieren kleinere, intrazelluläre Vakuolen zu größeren, die schließlich mit einem entstehenden interzellulären Spaltraum, der zum Lumen wird, fusionieren und diesen dadurch erweitern. Die weitere Ausdehnung erfolgt durch Apoptose der Zellen im Zentrum des Sprosses sowie durch das Einschleiben weiterer Endothelzellen zwischen diejenigen, die das Lumen bereits auskleiden.

Meyer und Mitarbeiter (1997) zeigten damit erstmalig, dass der lumenständige Zelldetritus Resultat der Apoptose von Endothelzellen ist. Nach Peters und Mitarbeitern (2002) ist Apoptose möglicherweise der Hauptmechanismus bei der Lumenbildung. Die Apoptose der Endothelzellen wird bei Kontaktverlust mit der extrazellulären Matrix während der Bildung kapillarähnlicher Strukturen eingeleitet. Infolge einer Substrat-Unterversorgung der Endothelzellen im Zentrum solider kapillarähnlicher Strukturen lösen sich diese und werden apoptotisch. Dies führt zur Lumenbildung innerhalb der kapillarähnlichen Strukturen (Peters et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit der Lumenbildung ist die kreisförmige Umbiegung der Zellkörper von Endothelzellen und anschließende Vereinigung der Zellenden, wodurch zentral ein Lumen eingeschlossen wird, welches im Durchmesser nur von einer Zelle begrenzt sein kann (Paku, 1998).

### **2.1.5.2 Stabilisierung des Gefäßes**

Zur Stabilisierung des neu gebildeten Gefäßes müssen zunächst Migration und Proliferation der Endothelzellen sowie die extrazelluläre Proteolyse eingestellt werden. Es erfolgt dann die Rekonstruktion der Basalmembran und der interstitiellen Matrix (Ausprunk und Folkman, 1977) sowie bei den meisten Gefäßen zusätzlich die Anlagerung von Perizyten (Hirschi und D'Amore, 1996; Hirschi und D'Amore, 1997).

Die Stabilisierungsphase ist entscheidend für das Fortbestehen der neu gebildeten Gefäße, da unreife Gefäße bei Wegfall des angiogenen Stimulus schnell der Apoptose und Regression unterliegen können (Benjamin et al., 1998).

### **2.1.6 Vaskuläres Remodeling**

Vaskuläres Remodeling bezeichnet strukturelle Veränderungen bereits existierender Gefäße. Hierzu gehören alle Veränderungen der Gefäßwand, aber auch die Proliferation und Regression von Gefäßen (Skalak und Price, 1996). Durch Zellhypertrophie, Zellproliferation, Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix sowie Zelltod wird das Gefäßsystem an den jeweiligen Bedarf adaptiert.

### **2.1.7 Regulierung der Angiogenese**

Die Aufrechterhaltung des endothelialen Ruhezustandes erfolgt wahrscheinlich durch die Anwesenheit von endogenen anti-angiogenen Faktoren. Darüber hinaus kommen in Geweben mit physiologischer Angiogenese oft pro- und anti-angiogene Faktoren nebeneinander vor. Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass die Aktivierung des Endothels von der Balance zwischen den gegensätzlichen Regulatoren abhängt (Iruela-Arispe und Dvorak, 1997). Die Dominanz pro-angiogener Faktoren führt zur Aktivierung des Endothels, während der endotheliale Ruhezustand Resultat des Vorherrschens von endogenen Inhibitoren bzw. der Erschöpfung pro-angiogener Faktoren ist. In den vergangenen Jahren wurden viele pro- und anti-angiogene Faktoren identifiziert und in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen der Angiogenese auf ihre Wirkung und Wirkungsweise untersucht.

### 2.1.7.1 Angiogenese-Stimulatoren

Angiogenese-Stimulatoren können in 3 Gruppen eingeteilt werden (Klagsbrun und Moses, 1999). Die erste Gruppe besteht aus der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Familie und den Angiopoietinen, welche spezifisch auf Endothelzellen wirken. Die zweite Gruppe umfasst meist direkt wirkende Moleküle, einschließlich verschiedener Zytokine, Chemokine (Moore et al., 1998) und angiogener Enzyme (Brown und Bicknell, 1998), welche eine Reihe von Zielzellen neben Endothelzellen aktivieren. Prototyp dieser Gruppe ist der Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), eines der ersten angiogenen Peptide, welches charakterisiert wurde. Die dritte Gruppe besteht aus indirekt wirkenden Substanzen, deren angiogener Effekt auf der Freisetzung von direkt wirkenden Faktoren durch Makrophagen, Endothel- oder Tumorzellen basiert. Am besten charakterisiert sind der Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), die die Endothelzellproliferation *in vitro* verhindern. *In vivo* dagegen induziert TGF- $\beta$  die Angiogenese und stimuliert die Expression von TNF- $\alpha$ , FGF-2, Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und VEGF (Falcone et al., 1993; Pintavorn und Ballermann, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren, von Interleukin-8 (IL-8) und FGF-2 erhöht, was seine angiogene Wirkung *in vivo* erklärt (Giraud et al., 1998; Yoshida et al., 1997).

Im Folgenden wird der wichtigste pro-angiogene Faktor VEGF vorgestellt.

**VEGF** gehört zur VEGF-Familie, die aus 6 Vertretern besteht: VEGF-A (oder VEGF), Placenta Growth Factor (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E (Veikkola und Alitalo, 1999). Zusätzlich gibt es durch alternatives Exon-Spleißen des VEGF-Gens verschiedene Isoformen von VEGF (VEGF-A), die aus 121, 145, 165, 189 bzw. 206 Aminosäureresten bestehen, wobei VEGF<sub>165</sub> die vorherrschende Form ist (Houck et al., 1991; Shima et al., 1996). VEGF wird in verschiedenen Geweben, einschließlich Gehirn, Niere, Leber und Lunge von vielen Zelltypen exprimiert (Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen). Neben seiner zentralen Funktion während der embryonalen Blutgefäßbildung spielt VEGF auch eine entscheidende Rolle im Rahmen der Angiogenese im adulten Organismus. VEGF wurde u.a. im Ovar während der Bildung des Corpus luteum dokumentiert (Ferrara et al., 1998) sowie während der Wundheilung (Nissen et al., 1998). Gleichmaßen konnte VEGF aber auch im ruhenden Endothel, u.a. in Herz, Lunge und Gehirn nachgewiesen werden. VEGF scheint also auch eine Rolle für das Bestehen differenzierter Gefäße zu haben (Ferrara et al., 1992). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von Apoptose alveolärer Zellen infolge einer Blockade der VEGF-Rezeptoren unterstützt (Kasahara et al., 2000).

*In vitro* stimuliert VEGF die Degradation der extrazellulären Matrix, die Proliferation und Migration der Endothelzellen, die Bildung kapillarähnlicher Strukturen und führt zu einer Expression von Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren (uPA), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptoren (uPAR) und Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) (Mandriota et al., 1995; Pepper et al., 1991; Pepper et al., 1992; Unemori et al., 1992). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass VEGF Einfluss auf die Gefäßpermeabilität hat, welches für die Initiation der Angiogenese wichtig ist (Dvorak et al., 1995). Die Tatsache, dass der Verlust von nur einem VEGF-Allel zur embryonalen Letalität führt, impliziert die unersetzbare Rolle dieses Faktors in der Entwicklung des Gefäßsystems (Ferrara et al., 1996). Die Transkription von VEGF-mRNA wird durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, einschließlich Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induziert (Akagi et al., 1999; Enholm et al., 1997; Veikkola und Alitalo, 1999). Somit erfüllt VEGF auch Funktionen als Mediator von indirekt wirkenden Angiogenese-Stimulatoren wie TGF- $\beta$ . Auch Hypoxie führt zur VEGF-Expression (Detmar et al., 1997; Ikeda et al., 1995; Mukhopadhyay et al., 1995).

Auf vaskulärem Endothel wurden zwei hochaffine Tyrosin-Kinase-Rezeptoren für VEGF identifiziert: VEGFR-1 und VEGFR-2 (De Vries et al., 1992; Matthews et al., 1991; Terman et al., 1991; Terman et al., 1992). Ähnlich wie bei VEGF wird auch die Expression seiner Rezeptoren durch Hypoxie reguliert (Detmar et al., 1997; Waltenberger et al., 1996). VEGFR-3 ist kein Rezeptor für VEGF, bindet aber VEGF-C und VEGF-D (Veikkola und Alitalo, 1999). Versuche mit Knockout-Mäusen konnten zeigen, dass für die normale Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems beide VEGF-Rezeptoren notwendig sind (Fong et al., 1999; Shalaby et al., 1995).

In adultem Gewebe werden beide VEGF-Rezeptoren hauptsächlich von vaskulären Endothelzellen exprimiert (Jakeman et al., 1992; Peters et al., 1993), während VEGFR-3 überwiegend auf lymphatischem Endothel lokalisiert ist (Kaipainen et al., 1995).

Obwohl beide VEGF-Rezeptoren zur selben Familie gehören, haben verschiedene Studien gezeigt, dass sich VEGFR-1 und VEGFR-2 hinsichtlich ihrer Signalübertragung unterscheiden (Ferrara, 1999; Seetharam et al., 1995; Waltenberger et al., 1994). Für eine VEGF-induzierte angiogene Antwort ist die Interaktion von VEGF mit dem VEGFR-2 entscheidend (Dougher-Vermazen et al., 1994), während die Funktion von VEGFR-1 in der VEGF-vermittelten Angiogenese noch weitgehend unklar ist (Waltenberger et al., 1994). Park und Mitarbeiter (1994) berichteten von einer Induktion der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* durch den Placenta Growth Factor (PIGF), welcher mit hoher Affinität an den VEGFR-1 bindet und diesen besetzt. Da der VEGFR-1 VEGF ca. 10mal stärker bindet als der VEGFR-2, könnte

dieser als negativer Regulator fungieren, der frei verfügbares VEGF bindet und somit dessen Bindung an den VEGFR-2 verhindert (Kendall und Thomas, 1993; Park et al., 1994).

### **2.1.7.2 Angiogenese-Inhibitoren (Anti-Angiogenese)**

In den vergangenen Jahren wurden viele Angiogenese-Inhibitoren beschrieben (Iruela-Arispe und Dvorak, 1997; Klagsbrun und Moses, 1999), die anti-angiogene Aktivität in verschiedenen Angiogenese-Modellen, wie der Chorioallantoismembran (CAM) zeigten. Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung von Migration, Proliferation, Proteaseaktivität der Endothelzellen und/oder der Ausbildung funktionsfähiger Kapillaren oder der Induktion von Apoptose (Cao, 2001; Carmeliet und Jain, 2000). Zu den endogenen Angiogenese-Inhibitoren gehören u.a. Proteine wie Angiostatin (Fragment des Plasminogen) oder Endostatin (Fragment des Kollagen XVIII), Platelet Factor-4 (PF-4), Thrombospondin-1 (TSP-1), Thrombospondin-2 (TSP-2), Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) sowie Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAIs).

Der potentiell therapeutische Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren fokussiert sich hauptsächlich auf den Bereich der Tumorforschung. Die Anti-Angiogenesetherapie könnte dabei insbesondere die anerkannten Behandlungsmethoden Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie ergänzen (Beecken und Shing, 2000). Auch in der Gentherapie maligner Tumoren werden bereits Angiogenese-Inhibitoren eingesetzt. Die Gentherapie bietet u.a. den Vorteil, ausreichend hohe therapeutische Konzentrationen aktiver Substanzen am Wirkungsort zu erlangen (siehe Kapitel 2.3.6). Zur Steigerung der Effektivität einer Anti-Angiogenesetherapie ist eine Kombination von Angiogenese-Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen denkbar. Dies setzt allerdings die Aufklärung der genauen Wirkungsmechanismen der einzelnen Angiogenese-Inhibitoren voraus (Beecken und Shing, 2000).

## **2.1.8 *In vitro*-Modelle der Angiogenese**

### **2.1.8.1 Explantat-Kulturen**

Vaskuläre Explantate, d.h. kleine Stücke oder Ringe von Gefäßen, können in Kulturschalen, beschichtet mit Matrigel<sup>®</sup> (lamininreiches Extrakt, gewonnen aus einem murinen Sarkom), Fibrin- oder Kollagengelen, eingebettet und kultiviert werden. Eingesetzt werden beispielsweise Explantate der Aorta (Nicosia et al., 1982; Nicosia und Ottinetti, 1990a, b; Nissanov et al., 1995; Zhu et al., 2000) oder der Nabelschnur (Brown et al., 1996). Explantate können zur Beobachtung aussprossender Gefäße über einen Zeitraum von 2-3 Wochen in Kultur gehalten werden. Sie erfüllen optimale Bedingungen für ein *in vitro*-Modell, da die Gefäßarchitektur erhalten bleibt und somit beispielsweise das Studium heterotypischer zellulärer Interak-

tionen möglich ist. Nachteilig ist jedoch, dass die individuellen Rollen der einzelnen Zelltypen (z.B. Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) in den verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade nicht voneinander zu unterscheiden sind (Vailhé et al., 2001).

### 2.1.8.2 Zellkulturen

Die erste Studie zur *in vitro*-Angiogenese wurde 1980 von Folkman und Haudenschild in *Nature* publiziert (1980b), die nach einer Langzeitkultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen deren Organisation in kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen beobachteten. Inzwischen wurden viele *in vitro*-Modelle mit Endothelzellen aus unterschiedlichen Geweben, Organen und Gefäßen entwickelt, welche zum genauen Verständnis der Molekular- und Zellbiologie der Angiogenese beigetragen haben (Auerbach et al., 2000; Jain et al., 1997; Vailhé et al., 2001). In diesen *in vitro*-Assays können die meisten Stadien der angiogenen Kaskade, einschließlich Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen, auch unabhängig voneinander, analysiert werden (Montesano et al., 1992).

Die **Migration** von Endothelzellen kann beispielsweise mithilfe der Boyden-Kammer untersucht werden. Diese Kammer besteht aus zwei übereinander liegenden Teilen, die durch einen Membranfilter getrennt sind. Chemotaktische Lösungen werden im unteren Teil der Kammer platziert, während die Zellen in die obere Hälfte eingesät werden. Nach Inkubation kann dann eine Migration der Endothelzellen durch den Filter in den unteren Teil der Kammer beobachtet werden, wo diese ausgezählt werden können (Goligorsky et al., 1999; Malinda et al., 1999; Sala et al., 2002). Die endotheliale Migration kann auch durch „Scratching“ (Verletzen, Ankratzen) eines konfluenten Zelllayers und anschließende Kalkulation der Zellen, die in den nun freien Bereich migrieren, studiert werden (Bussolino et al., 1992; Imaizumi et al., 2000b).

**Proliferationsstudien** basieren auf Zellzählung (Amann et al., 2001; Rymaszewski et al., 1991; Trochon et al., 1998; Ulrich-Merzenich et al., 2002), Thymidin-Inkorporation (Pedram et al., 1997; Rymaszewski et al., 1991; Ulrich-Merzenich et al., 2002; Zhang und Harder, 2002) oder immunhistochemischer Färbung proliferierender Zellen mit Antikörpern gegen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und anschließender Zählung immunopositiver Zellen (Ahmad et al., 2001; Stoeltzing et al., 2002).

Schließlich kann auch die **Differenzierung** der Endothelzellen in kapillarähnliche Strukturen *in vitro* studiert werden. Grundsätzlich unterscheidet man zweidimensionale und dreidimen-

sionale Modelle (Vailhé et al., 2001). Eine andere Form zum Studieren der Bildung kapillarähnlicher Strukturen sind Kokulturmodelle von Endothelzellen mit stromalen Zellen.

### 2.1.8.2.1 Zweidimensionale Modelle der *in vitro*-Angiogenese

In zweidimensionalen Modellen werden Endothelzellen in Kulturschalen ausgesät, welche mit adhäsiven Proteinen (Feder et al., 1983; Ingber und Folkman, 1989b; Madri und Williams, 1983; Pelletier et al., 2000) oder auch Gelen aus Kollagen, Fibrin oder Matrigel® (Kubota et al., 1988; Lawley und Kubota, 1989; Vailhé et al., 1997; Vernon et al., 1995) beschichtet sein können. In zweidimensionalen Modellen bilden sich kapillarähnliche Strukturen planar zur Kulturschalenoberfläche, also nur in einer Ebene.

Zweidimensionale Modelle wurden vielfach eingesetzt zur Untersuchung der Rolle der extrazellulären Matrix in der endothelialen Differenzierung. Madri und Williams (1983) beobachteten einen Einfluss des Kollagentyps der Matrix auf die Entwicklung der Endothelzellen. Wurden Endothelzellen auf Kollagen Typ I oder III ausgesät, konnte nur eine Proliferation beobachtet werden, während Endothelzellen auf Kollagen Typ IV oder V die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen mit Lumina zeigten. Die Beschichtung mit Matrigel® führt zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen innerhalb von 4-12 Stunden (Kubota et al., 1988, Lawley und Kubota, 1989). Aufgrund von Problemen durch eine Überstimulierung der Zellen mit den in Matrigel® enthaltenden pro-angiogenen Faktoren, wurde eine Wachstumsfaktor-reduzierte Form, das GFR Matrigel® („growth factor reduced“) entwickelt (Donovan et al., 2001).

Zweidimensionale Modelle der *in vitro*-Angiogenese können in Kurzzeit- (Ingber und Folkman, 1989b; Kubota et al., 1988; Madri und Williams, 1983; Vailhé et al., 1997) und Langzeitmodelle (Feder et al., 1983; Folkman und Haudenschild, 1980a; Maciag et al., 1982; Pelletier et al., 2000; Vernon et al., 1995) eingeteilt werden (Vailhé et al., 2001).

In **Kurzzeitmodellen** kann die Bildung kapillarähnlicher Strukturen innerhalb von 1-3 Tagen beobachtet werden, wobei die Endothelzellen im subkonfluenten Zustand vorliegen müssen (Vailhé et al., 1997). Entscheidende Parameter für die Differenzierung der Endothelzellen sind Aussaatdichte der Zellen, Proliferation sowie Konzentration und biochemische Zusammensetzung des Substrates (Vailhé et al., 2001). Die endotheliale Differenzierung ist abhängig von der proteolytischen Degradation der Matrix (Dubois-Stringfellow et al., 1994) sowie von der spannungsabhängigen, biomechanischen Interaktion zwischen Endothelzellen und Matrixproteinen (Davis und Camarillo, 1995; Ingber und Folkman, 1989b). Kurzzeitmodelle berücksichtigen weder die Proliferation noch die Migration der Endothelzellen und sind nicht geeignet für längere Beobachtungen kapillarähnlicher Strukturen, da sich diese oft schnell

vom Substrat aufgrund der Gelzerstörung durch zelluläre Proteasen ablösen (Vailhé et al., 1998/1999).

In **Langzeitmodellen** entwickeln sich kapillarähnliche Strukturen auf der Oberfläche eines konfluenten Zelllayers (Vernon et al., 1995), folglich beteiligen sich nicht alle Endothelzellen an der Bildung kapillarähnlicher Strukturen. Für die Differenzierung der Endothelzellen ist wahrscheinlich die zelluläre Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten entscheidend (Sage und Vernon, 1994). In diesen Modellen können kapillarähnliche Strukturen im Vergleich zu Kurzzeitmodellen über einen längeren Zeitraum studiert werden (Vailhé et al., 2001).

#### **2.1.8.2.2 Dreidimensionale Modelle der *in vitro*-Angiogenese**

Dreidimensionale Modelle basieren auf der Invasion aktivierter Endothelzellen in ein dreidimensionales Substrat aus extrazellulären Matrixkomponenten, wie Kollagen oder Fibrin. Die Endothelzellen können dabei von einem Gel überschichtet werden (Peters et al., 2002; Schor et al., 1983), auf einem Gel (Montesano und Orci, 1985; Montesano et al., 1986) oder zwischen zwei Gelschichten („Sandwich“) kultiviert werden (Chalupowicz et al., 1995; Montesano et al., 1983). Das Kulturmedium wird entweder vor der Polymerisation des Gels oder im Anschluss hinzugefügt. Entscheidend bei der Verwendung von Polymeren ist die genaue Bestimmung der Konzentration und biochemischen Parameter der Matrix, da diese die Dichte und mechanischen Eigenschaften des Substrates beeinflussen (Ferrenq et al., 1997) und zu unterschiedlichen endothelialen Phänotypen führen können (Nehls und Herrmann, 1996). Darüber hinaus ist auch die Proteolyse der Matrix ein kritischer Faktor (Montesano et al., 1987), der unter Umständen den Einsatz exogener Antiproteasen zur Limitierung der Geldegradation erforderlich macht (Zhu et al., 2000).

Dreidimensionale Modelle der *in vitro*-Angiogenese berücksichtigen die dritte Dimension und stellen daher realitätsnahe *in vitro*-Systeme dar. Sie sind u.a. geeignet zur Untersuchung der Wirkung von pro-angiogenen (Bouloumié et al., 1998; Koblizek et al., 1998; Papapetropoulos et al., 1997) und anti-angiogenen Substanzen (Clapp et al., 1993), der Rolle von Metalloproteinasen (Trochon et al., 1998) und Zelladhäsionsmolekülen (Bach et al., 1998; Bayless et al., 2000; Yang et al., 1999), sowie der Fibrinolyse während der Bildung kapillarähnlicher Strukturen (Dubois-Stringfellow et al., 1994; Kroon et al., 1999; van Hinsbergh et al., 1997). Darüber hinaus eignen sie sich auch für Untersuchungen von Apoptose (Korff und Augustin, 1998; Kuzuya et al., 1999; Schönherr et al., 1999). Auch die Bioverfügbarkeit pro-angiogener Faktoren durch Erzeugung eines Gradienten kann in diesen dreidimensionalen Modellen nachgeahmt werden. Dies ist möglich, wenn die Zellen in ein Gel oder zwischen zwei Gel-

schichten eingesät werden und das Kulturmedium erst nach der Polymerisation der Gele hinzugegeben wird (Helmlinger et al., 2000).

### 2.1.8.2.3 Kokulturmodelle der *in vitro*-Angiogenese

Kokulturmodelle erlauben die Untersuchung heterotypischer zellulärer Interaktionen während der Bildung kapillarähnlicher Strukturen *in vitro*. Endothelzellen werden mit stromalen Zellen mit oder ohne Zusatz komplexer Matrices kultiviert. Als stromale Zellen werden Fibroblasten (Bishop et al., 1999; Black et al., 1998; Montesano et al., 1993; Velázquez et al., 2002), Perizyten (Pelletier et al., 2000), glatte Muskelzellen (Sakuda et al., 1992) oder Granulosazellen (Fuchs-Schoenleber, 1999; Plendl et al., 2002 a, b) eingesetzt.

Donovan et al. (2001) verglichen die Morphologie gebildeter kapillarähnlicher Strukturen in drei *in vitro*-Assays mit den morphologischen Eigenschaften von *in vivo* gebildeten Kapillaren. Sie kultivierten HUVEC auf Matrigel<sup>®</sup>, GFR Matrigel<sup>®</sup> sowie als Kokultur mit Fibroblasten. Während sich in den Matrigel-Assays die kapillarähnlichen Strukturen schnell (innerhalb von 24 Stunden) ausbildeten, zeigten diese jedoch nur geringe morphologische Ähnlichkeiten zu Kapillaren *in vivo*. Es wurden nur kurze (< 20 µm), relativ homogene kapillarähnliche Strukturen beobachtet. Im Gegensatz dazu entstand im Langzeit-Kokulturmodell ein eher heterogenes Muster kapillarähnlicher Strukturen unterschiedlicher Länge, welches eine höhere endotheliale Aktivität reflektiert und eine größere Ähnlichkeit zu Kapillaren *in vivo* aufweist.

Fuchs-Schoenleber (1999) entwickelte in ihrer Dissertationsarbeit ein *in vitro*-Modell des bovinen Corpus luteum durch direkte Kokultur von Endothelzellen und Granulosaluteinzellen. Im Unterschied zu den endothelialen Reinkulturen konnte bei den Endothelzellen der Kokulturen eine besonders intensive Bildung dreidimensionaler, netzartig weit verzweigter kapillarähnlicher Strukturen beobachtet werden.

### 2.1.9 Tumorangiogenese

Beim Tumorwachstum spielt Angiogenese eine entscheidende Rolle (Folkman, 1971; Folkman, 1974). Es können zwei Phasen unterschieden werden, die prävasculäre und die vaskuläre Phase (Pepper, 1997). In der **prävasculären Phase** besitzt der Tumor noch keine angiogenen Eigenschaften. Tumorzellen proliferieren angiogeneseunabhängig und der Tumor wächst bis zum Erreichen einer kritischen Größe von ca. 2-3 mm im Durchmesser (Folkman, 1995), bis zu der eine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff durch Diffusion noch ausreicht. Ein *in situ*-Tumor kann über Monate oder Jahre lokal begrenzt bleiben. Es herrscht ein

Gleichgewicht zwischen der Anzahl proliferierender und apoptotischer Zellen (Folkman, 1995; Holmgren et al., 1995). Eine weitere Größenzunahme des Tumors ist erst nach Induktion der Angiogenese möglich. Der Übergang in die **vaskuläre Phase** wird als „angiogener Switch“ (Umschaltung) bezeichnet. Dieser wird durch eine lokale Imbalance zwischen positiven und negativen Regulatoren der Angiogenese im Tumor eingeleitet als Resultat der Bildung pro-angiogener Faktoren wie VEGF, FGF oder Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  durch die Tumorzellen bzw. einer Herunterregulierung anti-angiogener Faktoren wie Thrombospondin-1 (Bouck et al., 1996; Pepper, 1997). Die vaskuläre Phase ist charakterisiert durch exponentielles Wachstum und Gewebeinvasion der Tumorzellen. Der Anschluss an das vaskuläre System eröffnet dem Tumor zusätzlich die Möglichkeit der hämatogenen Metastasierung (Folkman, 1995).

Tumorgefäße entwickeln sich via Angiogenese und Intussuszeption aus den umliegenden, bereits bestehenden Gefäßen. Auch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen aus der Gefäßwand oder aus dem Knochenmark scheinen in die Tumorangio-genese involviert zu sein (Vaskulogenese) (Rafii, 2000). Die im Verlaufe des Tumorstwachstums neu gebildeten Gefäße zeigen in struktureller und funktioneller Hinsicht Besonderheiten (Gasparini, 1999). Beispielsweise erfolgt eine Stabilisierung der Tumorgefäße durch Rekonstruktion einer Basalmembran sowie durch Anlagerung perivaskulärer Zellen nur unvollständig (Benjamin et al., 1999; Carmeliet und Jain, 2000). Des Weiteren werden die Tumorgefäße nicht immer von einer homogenen Endothelzellschicht ausgekleidet, sondern können auch Tumorzellen enthalten (Jain, 1988). Das Tumorgefäßsystem besteht folglich in der Regel aus gering differenzierten, stark desorganisierten, fragilen, dilatierten und undichten Gefäßen (Dvorak et al., 1999; Hashizume et al., 2000; Hobbs et al., 1998). Verbunden hiermit ist ein chaotischer und variabler Blutfluss (Baish und Jain, 2000), der zu lokaler Hypoxie und Nekrose führt (Helmlinger et al., 1997).

Darüber hinaus exprimieren Tumorendothelien spezifische Marker wie Endoglin (CD105), ein Transmembranprotein, welches den Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) bindet. Antikörper gegen CD105 binden vorzugsweise an aktivierte Endothelien (Wang et al., 1994; Wang et al., 1995; Westphal et al., 1993) und sind demnach als Marker für Tumorendothelien geeignet (Kumar et al., 1999).

## 2.2 Grundlagen der Genexpression

Unter Genexpression versteht man die Umsetzung der in der DNA kodierten genetischen Information in ein Genprodukt (Deckwer et al., 1999). Bei Eukaryonten umfasst die Expression von Strukturgenen, also Genen, deren Genprodukte keine regulatorischen Funktionen bei der Genexpression besitzen, folgende Schritte (Deckwer et al., 1999):

- Transkription zur Bildung der Prä-messenger-RNA (Prä-mRNA, auch als heterogene nukleäre RNA, hnRNA, bezeichnet) im Kern
- Prozessierung der Prä-mRNA zur reifen mRNA
- Transport der mRNA ins Zytoplasma
- Translation zur Bildung eines Proteins an den Ribosomen

Die stärkste Kontrolle der Expression der meisten Gene liegt auf der Ebene der Transkription (Voet und Voet, 1994), welche nachfolgend näher erläutert wird.

### 2.2.1 Regulation der Transkription

Bei der Transkription erfolgt die Umsetzung der codierenden Nukleotidsequenz der DNA in die Basenfolge der RNA mithilfe einer RNA-Polymerase (Deckwer et al., 1999). Während die RNA-Polymerase I eine RNA mit einem Sedimentationskoeffizienten von 45S als Vorstufe für mehrere ribosomale RNAs (rRNAs) transkribiert und die RNA-Polymerase III die Gene, die für transfer-RNAs (tRNAs), die 5S RNA und andere kleine nukleäre RNAs (snRNAs) codieren (Koolman et al., 1998), transkribiert die RNA-Polymerase II diejenigen Gene, die für Proteine kodieren (Voet und Voet, 1994). In die Regulation der korrekten Expression der Gene sind cis- und trans-Elemente involviert. Cis-Elemente sind kurze regulatorische DNA-Sequenzen (z.B. Promotoren, einzelne Promotormotive, Enhancer), die die Regulation von Genen, aber auch Replikationsursprüngen auf dem gleichen DNA-Molekül beeinflussen (Deckwer et al., 1999). Trans-Elemente sind diffusible Faktoren (z.B. Transkriptionsfaktoren), die durch Interaktion mit den cis-Elementen die Transkription regulieren (Montgomery et al., 1996).

#### 2.2.1.1 Promotor

Der Promotor eines Gens ist eine im Allgemeinen flussaufwärts („upstream“) des Startcodons gelegene Bindungsstelle für RNA-Polymerasen zur Initiation der Transkription (Deckwer et al., 1999). Durch Sequenzanalysen konnten zwei für eukaryontische Strukturgen-Promotoren typische Konsensussequenzen nachgewiesen werden, die TATA-Box (eine AT-reiche Region) und ein Initiatorelement InR (Kollmar und Farnham, 1993). Eukaryontische Promotoren bestehen aus unterschiedlichen Kombinationen dieser Konsensussequenzen.

Sie können entweder beide, nur eine oder keine der beiden Konsensussequenzen enthalten (Novina und Roy, 1996). Je größer die Effizienz eines Promotors, umso mehr ähnelt seine Sequenz der Konsensussequenz (Kollmar und Farnham, 1993; Voet und Voet, 1994). TATA-lose Promotoren findet man zum Beispiel häufig bei Genen, deren Expression auf bestimmte Entwicklungsstadien begrenzt ist und Zell-spezifisch erfolgt (Novina und Roy, 1996).

### 2.2.1.2 Proximale und distale Regulationselemente

Es gibt weitere cis-aktive Elemente neben der TATA-Box und dem InR-Element, die die Effizienz der Transkriptionsinitiation erhöhen (Maniatis et al., 1987). Proximale Regulationselemente befinden sich in der Regel nicht weiter als 100 Basenpaare von der Startstelle entfernt und dienen als Bindungsstellen für Sequenz-spezifische, regulatorische Transkriptionsfaktoren (Mitchell und Tjian, 1989).

Distale Regulationselemente befinden sich in großer Entfernung (bis zu mehrere 10.000 Basenpaare) von den basalen Promotorelementen wie der TATA-Box und dem InR-Element, sowohl flussaufwärts („upstream“) als auch flussabwärts („downstream“) und werden auch als **Enhancer** (Verstärker) bezeichnet (Deckwer et al., 1999; Montgomery et al., 1996). Die relative Orientierung des Enhancers zu dem von ihm kontrollierten Gen ist dabei beliebig (Deckwer et al., 1999). An Enhancer können verschiedene trans-aktive Faktoren wie Transkriptionsfaktoren binden (Montgomery et al., 1996). Die Wirkung eines Enhancers erfolgt analog zur Funktionsweise der proximalen Regulationselemente durch Interaktion der an ihn gebundenen Proteine mit generellen Transkriptionsfaktoren (siehe Kapitel 2.2.1.3) oder der RNA-Polymerase. Entscheidend für diese Interaktion ist die räumliche Annäherung von Promotor und Enhancer (Ptashne, 1986). Nach dem Looping-Modell bildet die DNA eine Schlaufe und ermöglicht somit die räumliche Annäherung von Enhancer und Promotor (Schleif, 1992). Ein alternativer Mechanismus ist das DNA-Scanning, bei dem die RNA-Polymerase II oder ein Transkriptionsfaktor an den Enhancer binden und dann entlang der DNA zum Promotor wandern (Mueller-Storm et al., 1989).

### 2.2.1.3 Transkriptionsfaktoren

Für die Initiation der Transkription sind neben der RNA-Polymerase II zusätzlich trans-aktive, sequenzspezifische DNA-bindende Proteine, die so genannten Transkriptionsfaktoren, notwendig (Mitchell und Tjian, 1989). Transkriptionsfaktoren verfügen über eine DNA-bindende Domäne, welche sich an die vom Protein erkannte DNA-Sequenz heftet sowie über eine die Transkription aktivierende Domäne, welche Wechselwirkungen mit Proteinen (z.B. anderen Transkriptionsfaktoren) eingeht (Deckwer et al., 1999). Transkriptionsfaktoren können in generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren eingeteilt werden (Deckwer et al., 1999).

**Generelle Transkriptionsfaktoren** sind an allen Promotoren zur Initiation der Transkription notwendig (Roeder, 1991). Die Transkriptionsfaktoren binden entweder an eine Promotorsequenz, wie z.B. an die TATA-Box, an die RNA-Polymerase II oder an bereits gebundene andere Transkriptionsfaktoren. Meist erfordert die Transkriptionsinitiation eines Gens die Bindung mehrerer Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion, welche koordiniert miteinander agieren (Deckwer et al., 1999).

**Spezifische Transkriptionsfaktoren** werden nur für die Expression bestimmter Gene benötigt und können zusammen mit den generellen Transkriptionsfaktoren die basale Transkription von Genen verstärken bzw. vermindern (Deckwer et al., 1999; Roeder, 1998).

### 2.2.2 Prozessierung der Prä-mRNA

Das primäre Transkript der RNA-Polymerase II ist die Prä-mRNA, auch als heterogene nukleäre RNA (hnRNA) bezeichnet (Dreyfuss et al., 1993). Im Rahmen verschiedener Modifikationen (RNA-Prozessierung), die noch im Zellkern stattfinden, entsteht schließlich die reife mRNA (Lamond, 1991), die durch die Kernporen ins Zytoplasma der Zelle transportiert wird (Krug, 1993), wo sie an Ribosomen gebunden und translatiert wird. Zu den posttranskriptionalen Modifikationen der Prä-mRNA gehören das Anfügen einer 7-Methylguanosin-„Kappe“ (Cap-Sequenz) am 5'-Ende, welche die mRNA vor dem Abbau vom 5'-Ende her schützt, den Transport ins Zytoplasma erleichtert und eine Rolle bei der Einleitung der Translation spielt, die Polyadenylierung am 3'-Ende, welche Einfluss auf die mRNA-Stabilität und die Stärke der Expression haben kann sowie das Spleißen (Deckwer et al., 1999). Beim Spleißen werden die nicht-codierenden Abschnitte (Introns) aus der Prä-mRNA exidiert und benachbarte Abschnitte (Exons) miteinander verknüpft (Voet und Voet, 1994). Beim alternativen Spleißen werden noch zusätzlich Exons aus der Prä-mRNA entfernt, so dass verschiedene reife mRNA-Moleküle entstehen, die für unterschiedliche Proteine kodieren (Breitbart et al., 1987).

## 2.3 Gentransfer

Unter Gentransfer versteht man die Übertragung von DNA-Sequenzen, die Funktionen eines Gens beinhalten (Deckwer et al., 1999). Hierfür benötigt man Kloniervektoren, spezifische DNA-Moleküle, in welche man fremde DNA, das **Transgen**, einfügen kann. Die am häufigsten verwendeten Vektoren sind Derivate von Plasmiden und Virus-Genomen. Daneben gibt es beispielsweise noch künstlich hergestellte Chromosomen, z.B. YAC (yeast artificial chromosome) und Phagen-Vektoren, z.B. Lambda-Phagen (Deckwer et al., 1999).

### 2.3.1 Vektoren

#### 2.3.1.1 Plasmid-Vektoren

Plasmid-Vektoren sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle. Sie stammen von größeren Plasmiden ab, die natürlicherweise in Bakterien- und Hefezellen vorkommen (Cohen et al., 1973). Die rekombinierten DNA-Ringe (**Plasmidkonstrukte**) werden gewöhnlich in Bakterien- oder Hefezellen vermehrt.<sup>1</sup>

#### 2.3.1.2 Virale Vektoren

Bei der Herstellung viraler Vektoren wird in der Regel ein für die Replikation essentieller Bereich aus dem Virusgenom deletiert und durch die rekombinante DNA- bzw. RNA-Sequenz ersetzt. Die Vermehrung der Viren erfolgt in einer Verpackungszelllinie, welche Helferviren als Proviren im Genom trägt bzw. durch Koinfektion erlangt, die die im viralen Vektor deletierten Sequenzen komplementieren (Lehn, 1993). Die auf diese Weise hergestellten rekombinanten Viren sind in normalen Zellen replikationsinkompetent und können zur Infektion von Zielzellen verwendet werden (zur Übersicht s. Brand und Strauss, 1998).

### 2.3.2 Effizienz des Gentransfers

Ein erfolgreicher Gentransfer muss verschiedene Barrieren überwinden (s. Abb. 1 und 2). Die erste Barriere für das negativ geladene DNA-Molekül ist die ebenfalls negativ geladene Zellmembran der Zielzelle. Durch Komplexierung der polyanionischen DNA mit Kationen wird beispielsweise ein Membrantransfer ermöglicht. Auch eine zu geringe DNA-Konzentration an der Zelloberfläche kann an dieser Stelle die Effizienz des Gentransfers limitieren (Luo und Saltzman, 2000a). Die Aufnahme der DNA durch die Zielzelle erfolgt meist durch Endozytose. Eingeschlossen in Endosomen, die mit primären Lysosomen zu sekundären Lysosomen

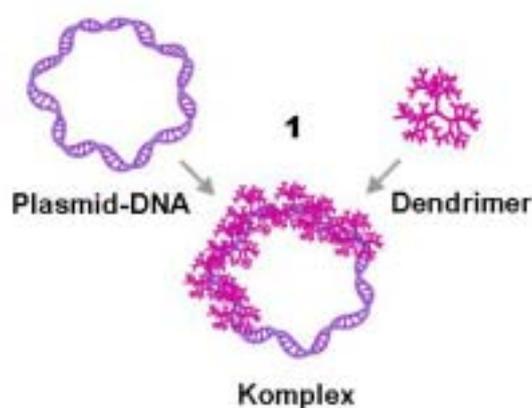
---

<sup>1</sup> zur Übersicht siehe <http://www.biokurs.de/skripten/13/bs13-10.htm>

fusionieren, begrenzen lysosomale Nukleasen die weitere Lebensdauer der DNA. Liegt die DNA nach dem „Escape“ (Entkommen) aus den Endosomen bzw. Lysosomen schließlich zyttoplasmatisch vor, muss sie zur Transkription in den Zellkern gelangen (Kern-Targeting). Dies erfolgt wahrscheinlich durch Diffusion, einen relativ langsamen Prozess, während dessen die DNA weiterhin von Nukleasen inaktiviert werden kann (Luo und Saltzman, 2000b). Die Dissoziation der DNA aus dem Komplex erfolgt dabei vor oder nach Eintritt in den Zellkern, welcher wahrscheinlich über die Kernporen oder während der Zellteilung, wenn die Kernmembran teilweise aufgelöst ist, erfolgt. Einige Transfersysteme (insbesondere virale) verfügen über besondere Mechanismen der Zielsteuerung und Überwindung der Kernmembran. Im Kern kann die transferierte DNA entweder als Episom verbleiben, womit in der Regel nur eine zeitlich begrenzte, **transiente Genexpression** verbunden ist oder aber in das zelluläre Genom integrieren und unbegrenzt lange, stabil exprimiert werden.

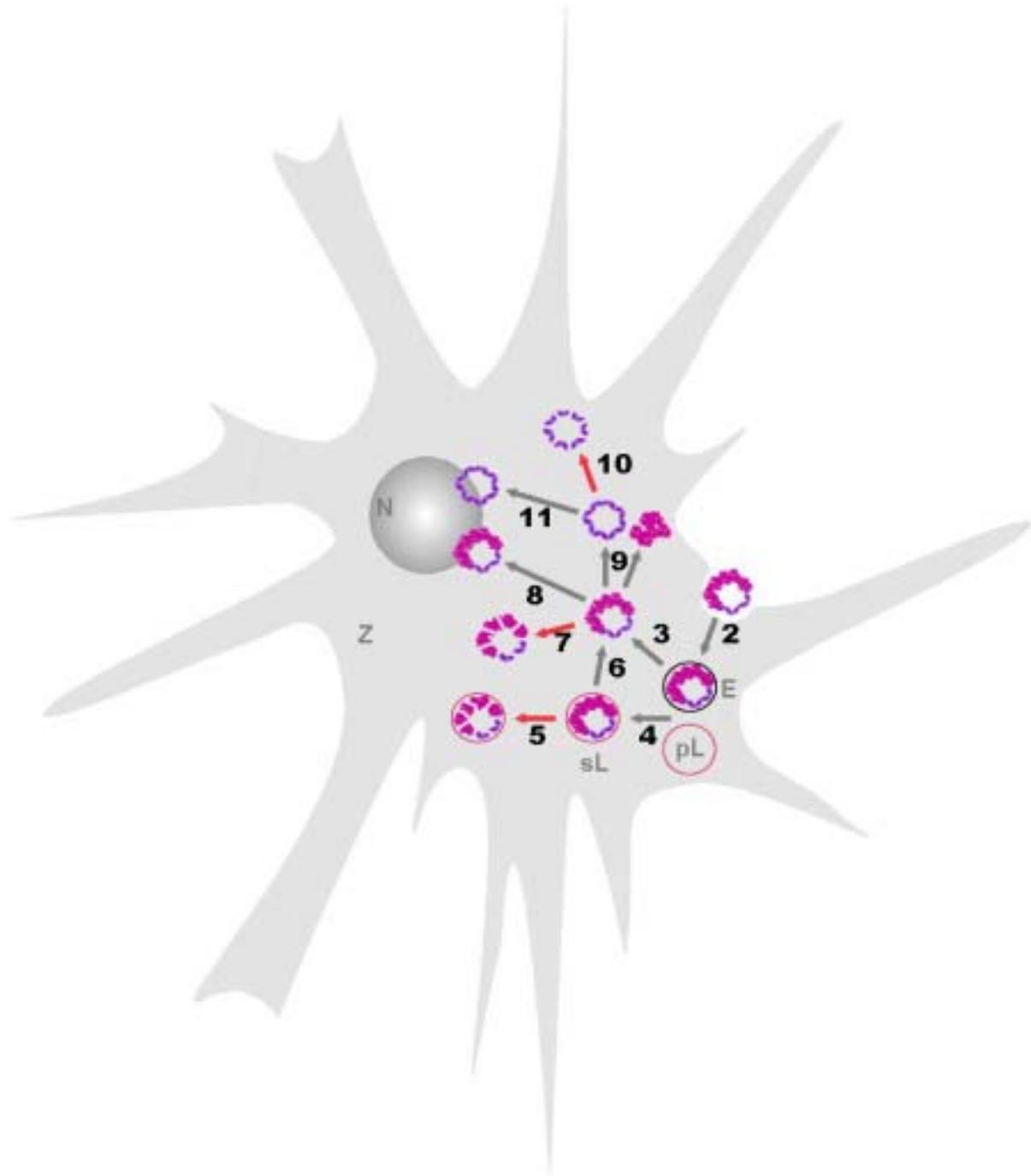
Beim *in vivo*-Gentransfer muss zusätzlich die Strecke vom Applikations- bis zum Wirkungsort überwunden werden, wobei die Gefahr einer Inaktivierung und Eliminierung durch das Immunsystem besteht.

Die Effizienz eines Gentransfers hängt also von der Effizienz des DNA-Transfers in den Zielzellkern und der Effizienz der Genexpression ab. Während die Effizienz auf Ebene der Transkription beispielsweise durch starke Promotoren und Enhancer gesteigert werden kann (Rolland, 1998), ist eine Erhöhung der Effizienz des DNA-Transfers in den Kern der Zielzelle schwieriger zu erzielen. Die Anzahl der DNA-Moleküle, die nach einem Gentransfer den Zellkern erreichen, ist daher gewöhnlich gering (Luo und Saltzman, 2000b).



**Abb. 1: Schema I des DNA-Transfers in den Nucleus der Zielzelle**

(1) Komplexbildung (z.B. von Plasmid-DNA und Dendrimer)



**Abb. 2: Schema II des DNA-Transfers in den Nucleus der Zielzelle**

- (2) Endozytose des Komplexes
- (3) Freisetzung des Komplexes aus Endosom (E)
- (4) Fusion von Endosom mit primärem Lysosom (pL) zu sekundärem Lysosom (sL)
- (5) Degradation der DNA im Lysosom
- (6) Freisetzung des Komplexes aus sekundärem Lysosom
- (7) Fehlende Dissoziation der DNA aus dem Komplex und Degradation im Zytoplasma (Z)
- (8) Eintritt des Komplexes in den Nucleus (N) und anschließende Dissoziation der DNA
- (9) Dissoziation der DNA aus dem Komplex vor Eintritt in den Nucleus
- (10) Degradation der DNA im Zytoplasma
- (11) Eintritt der DNA in den Nucleus

### 2.3.3 Methoden des Gentransfers

In den letzten 30-40 Jahren wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden des Gentransfers entwickelt. Viele finden sowohl in der Grundlagenforschung als auch in Therapiestudien *in vivo* Anwendung. Effizienz und zugrunde liegende zelluläre Mechanismen unterscheiden sich jedoch teilweise beträchtlich in Abhängigkeit von der Applikationsform. So ist beispielsweise der Gentransfer mit nackter DNA *in vivo* sehr effizient, *in vitro* dagegen weniger. Die einzelnen Methoden des Gentransfers werden in virale und nicht-virale Methoden unterteilt (Friedmann und Roblin, 1972), wobei die nicht-viralen Methoden sehr unterschiedliche Techniken beinhalten.

#### 2.3.3.1 Viraler Gentransfer (Virusinfektion)

Die Virusinfektion ist die älteste Methode des Gentransfers. 1952 wurde erstmals an *Salmonella* gezeigt, dass Viren Gene übertragen können (Zinder und Lederberg, 1952). 1956 beschrieb Lederberg eine Integration des viralen Genoms ins zelluläre Genom von Bakteriophagen. In den folgenden Jahren wurde dies auch für Säugerviren bestätigt (Rogers, 1959; Temin, 1971). Der virale Gentransfer wurde zunächst ausschließlich zur Untersuchung viraler Infektionen und zur Transformation von Säugerzellen mit Tumoviren eingesetzt. Später erfolgte die Entwicklung viraler Vektoren zum gezielten Gentransfer in Zellen. Zu den klassischen Virusvektoren gehören Retroviren (Kahn et al., 1992), Adenoviren (Qian et al., 2001; Zhou et al., 1995) und Adeno-assoziierte Viren (Ma et al., 2002). Die zelluläre Aufnahme der Viren erfolgt über eine rezeptorvermittelte Endozytose, wobei die viralen Partikel in Endosomen eingeschlossen werden. Voraussetzung für eine effiziente virale Infektion ist also das Vorhandensein virusspezifischer Rezeptoren (Zabner et al., 1997). Durch Interaktion viraler Hüllproteine mit der Endosomenmembran erfolgt die Freisetzung der Viruspartikel ins Zytoplasma (Greber et al., 1993) und im Anschluss, je nach Art des viralen Vektors und der infizierten Zelllinie, eine transiente Expression des eingeschleusten Gens oder eine Integration ins Wirtsgenom. Die Effizienz der Virusinfektion ist sehr variabel und vom verwendeten viralen System abhängig (Kahn et al., 1992; McLachlin et al., 1990).

Retroviren besitzen die Eigenschaft zur Integration ihres viralen Genoms in das Genom der Zelle. Allerdings ist nur eine Infektion proliferierender Zellen möglich (Deckwer et al., 1999). Diese Eigenschaft kann aber auch von Vorteil sein, beispielsweise beim Einsatz in der Tumor-Gentherapie, wo sie eine Schutzfunktion für das den proliferierenden Tumor umgebende, nicht transformierte Gewebe bietet (Brand und Strauss, 1998).

Adenovirale Vektoren zeichnen sich durch ein deutlich verringertes pathogenes Potential sowie eine relativ große Aufnahmekapazität für Fremd-DNA aus (Tsai et al., 2000). Im Ge-

gensatz zu Retroviren können sie auch ruhende Zellen infizieren (Deckwer et al., 1999). Aufgrund ihrer hohen Gentransfereffizienz *in vivo* in unterschiedlichen Geweben besteht großes Interesse an adenoviralen Vektoren.

Adeno-assoziierte Viren vereinigen den Vorteil von Retroviren, also die langandauernde Expression des Transgens, und den von Adenoviren, die hohe *in vivo* Gentransfereffizienz (Brand und Strauss, 1998). Adeno-assoziierte Viren gelten als apathogen für den Menschen und können auch ruhende Zellen infizieren. Eine Limitierung besteht allerdings in der geringen Klonierungskapazität (Deckwer et al., 1999).

Virale Gentransfersysteme resultieren in einer sehr hohen Transfereffizienz, meist von über 90% (Luo und Saltzman, 2000b). Aus diesem Grunde basieren über 70% der gegenwärtigen klinischen Versuche auf virus-vermitteltem Gentransfer.<sup>2</sup> Virale Gentransfersysteme sind aber in ihrer Anwendung limitiert (Luo und Saltzman, 2000b). Im Vergleich zu nicht-viralen Transfermethoden ist der virale Gentransfer in der Handhabung wesentlich komplexer und mit höheren Kosten durch die aufwendige Produktion viraler Vektoren verbunden. Darüber hinaus besteht, abhängig vom viralen Vektor, in der Regel eine begrenzte DNA-Aufnahmekapazität. Weitere Risiken beim *in vivo*-Gentransfer entstehen durch die mögliche Kontamination mit replikationskompetenten Viren (z.B. durch Rekombination mit den in der Verpackungszelllinie vorhandenen Gensequenzen) sowie durch die mögliche Induktion einer Immunantwort (Verma und Somia, 1997), insbesondere bei wiederholter Applikation. Ein schwerer Rückschlag für die Gentherapie wurde durch den Tod des ersten Probanden verzeichnet, der eindeutig an den Folgen einer Gentherapie verstarb. Eine Überreaktion seines eigenen Immunsystems führte nach adenoviralem Gentransfer zum Tod (Lehrmann, 1999).

### 2.3.3.2 Nicht-virale Methoden des Gentransfers (Transfektion)

Aufgrund des mit erheblichen Risiken behafteten viralen Gentransfers wurden verschiedene nicht-virale Methoden entwickelt. Die erste Veröffentlichung über den Transfer von Polynukleotiden in Zellen ohne Zuhilfenahme intakter Viren erfolgte im Jahre 1958 (Alexander et al., 1958 a, b). Ein Jahr später wurde die Absorption radioaktiv markierter DNA durch murine Lymphomzellen beschrieben (Sirotnak und Hutchison, 1959). Der gezielte Gentransfer in eukaryontische Zellen begann kurze Zeit später mit der Entdeckung, dass sich virale DNA bzw. RNA mithilfe von Diethylaminoether (DEAE)-Dextran oder Calciumphosphat in Zellen ein-

---

<sup>2</sup> siehe „Charts and Statistics“/“Vectors used“ auf <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

schleusen lässt (Graham und van der Eb, 1973; McCutchan und Pagano, 1968; Pagano und Vaheri, 1965; Warden und Thorne, 1968). Später wurden diese Methoden auch zur Transfektion von Plasmid-DNA verwendet (Calos et al., 1983; Chen und Okayama, 1987; Holter et al., 1989; Sussman und Milman, 1984). Beide Chemikalien interagieren mit der DNA und bilden DEAE-Dextran- bzw. Calciumphosphat-DNA-Komplexe, die mittels Endozytose von der Zelle internalisiert werden. Beide Methoden sind einfach und effektiv in der Anwendung, jedoch auch mit einer hohen Zytotoxizität behaftet und nicht für *in vivo*-Studien geeignet (Luo und Saltzman, 2000b). Die Calciumphosphatmethode wird jedoch nicht zuletzt aufgrund ihrer Einfachheit in der Ausführung auch heute noch zur Transfektion von Zellen *in vitro* verwendet (Jordan et al., 1996; O'Mahoney und Adams, 1994; Wilson et al., 1995).

Mit dem Ziel der Steigerung von Aufnahme und Expression der transfizierten DNA sowie Reduktion der Toxizität wurden verschiedene Transfektionstechniken für Säugerzellen entwickelt und damit die Möglichkeit geschaffen, verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Spezies gentechnisch zu verändern (s. Tab. 1). Zu den **chemischen Transfektionsmethoden** gehören neben DEAE-Dextran und Calciumphosphat Substanzen wie die Polykatione Polyethylenimin (Boussif et al., 1995) und Polybren (Kawai und Nishizawa, 1984), Lipidgemische (Behr et al., 1989; Felgner et al., 1987; Felgner et al., 1994; Gao und Huang, 1991; Malone et al., 1989; Stamatatos et al., 1988; Zhou und Huang, 1994) und Dendrimere (Bielinska et al., 1996; Haensler und Szoka, 1993; Hudde et al., 1999; Imaizumi et al., 2000a; Kukowska-Latallo et al., 1996; Maruyama-Tabata et al., 2000; Sato et al., 2001; Tang et al., 1996).

Auch **physikalische Methoden** wie die Mikroinjektion von DNA in den Zellkern (Capecchi, 1980; Diacumakos et al., 1970; Graessmann, 1970; Graessmann und Graessmann, 1983) und die Elektroporation (Chu et al., 1987; Neumann et al., 1982; Potter, 1988; Schwachtgen et al., 1994; Wong und Neumann, 1982), bei der die Zellmembran vorübergehend durch einen starken elektrischen Puls permeabilisiert wird, sowie der Beschuss der Zellen mit DNA-beladenen Partikeln (Cheng et al., 1993; Fitzpatrick-McElligott, 1992; Klein et al., 1987; Yang et al., 1990) werden zum Einschleusen von Fremdgenen in Zielzellen eingesetzt.

Der rezeptorvermittelte Gentransfer gehört zu den **biologischen Methoden** des Gentransfers und basiert auf Erkennung und Bindung an einen zellulären Rezeptor mit anschließender Aufnahme des Komplexes. Die zu transfizierende DNA wird dabei mit einem Liganden gekoppelt, welcher an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle bindet und so eine Internalisierung ermöglicht. Diese Methode bietet die Möglichkeit eines zielgerichteten Gentransfers. Im Laufe der Jahre wurden Zielzellen-spezifisch verschiedene Liganden eingesetzt, u.a. Asialoglykoprotein (Wu und Wu, 1987; Wu und Wu, 1988), Transferrin (Tan et al., 2001; Tros de

llarduya et al., 2002; Wagner et al., 1990), Integrin (Hart et al., 1995), Epidermal Growth Factor (Kikuchi et al., 1996) sowie Rezeptor-spezifische Antikörper (Buschle et al., 1995; Trubitskoy et al., 1992). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde diese Methode zusätzlich mit viralen Komponenten, die eine endosomolytische Aktivität aufweisen (z.B. defekte adenovirale Partikel oder fusogenes Influenzamembranglykoprotein Hämagglutinin HA-2) kombiniert (Cotten et al., 1992; Plank et al., 1994; Wagner et al., 1992).

Eine weitere biologische Methode des Gentransfers ist die Zellfusion, bei der unterschiedliche Zellen durch inaktiviertes Sendaivirus (Okada und Murayama, 1965), Polyethylenglykol (Köhler und Milstein, 1975) oder mittels Elektrofusion (Vienken und Zimmermann, 1985) miteinander verschmolzen werden.

Ansatz	Methode
chemisch	DEAE-Dextran
	Calciumphosphat
	Polyethylenimin
	Polybren
	Lipidgemische
	Dendrimere
physikalisch	Mikroinjektion
	Elektroporation
	Partikelbeschuss
biologisch	rezeptorvermittelter Gentransfer
	Zellfusion

**Tab. 1: Übersicht über nicht-virale Methoden des Gentransfers**

Mit nicht-viralen Methoden werden *in vitro* zum Teil sehr hohe Transfektionseffizienzen erzielt, jedoch ist nur ein geringer Teil dieser Methoden auch für den *in vivo*-Gentransfer geeignet. Weiterhin findet bei den meisten nicht-viralen Methoden in der Regel keine stabile Integration der eingebrachten Gene ins Wirtszellgenom statt, so dass nur eine transiente Expression erfolgt. Eine stabile Expression wird durch geeignete Selektionsverfahren erreicht, wobei nur ein Bruchteil der ursprünglich transfizierten Zellen dann die gewünschte stabile Genexpression zeigt. Darüber hinaus sind solche Selektionsverfahren *in vivo* nur begrenzt einsetzbar.

In der nicht-therapeutischen Anwendung des Gentransfers zu Forschungszwecken werden fast ausschließlich nicht-virale Gentransfermethoden verwendet. Aber auch im therapeutischen Bereich gewinnen die nicht-viralen Methoden an Bedeutung. Unter den nicht-viralen Gentransfersystemen in klinischen Versuchen wird der liposomale Gentransfer am häufig-

sten eingesetzt. Die Vorteile liegen in der geringen Toxizität der Substanzen und den geringen Herstellungskosten. Limitierend beim Einsatz synthetischer Gentransfer-Systeme mit therapeutischer Zielstellung ist jedoch die relativ geringe Transfektionseffizienz (Luo und Saltzman, 2000b). Zusätzlich wird die Übertragung positiver Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten auf Tiermodelle dadurch erschwert, dass die Transfektionseffizienz *in vitro* und *in vivo* nicht notwendigerweise korreliert (Fasbender et al., 1997; Matsui et al., 1997).

Nachfolgend werden die Lipofektion sowie die Polyfektion mittels Dendrimeren näher vorgestellt.

### 2.3.3.2.1 Lipofektion

Gentransfersysteme auf Basis von Lipiden wurden Anfang der achtziger Jahre entwickelt (Fraleley et al., 1980). Bei der Liposomenfusion wird die DNA in große unilamellare Lipidvesikel eingeschlossen und diese mit den Zellen fusioniert. Die Effizienz dieser Methode ist jedoch im Vergleich zur DEAE-Dextran-Methode deutlich niedriger (Felgner, 1993; Fraley und Papahadjopoulos, 1982). Erste Effizienzsteigerungen konnten durch Einsatz von Zelltyp-optimierten Liposomenzusammensetzungen erzielt werden (Fraleley und Papahadjopoulos, 1982; Mannino und Gould-Fogerite, 1988). Eine deutliche Verbesserung der Transfektionseffizienz konnte durch den Einsatz kationischer Lipide erreicht werden. Felgner und Mitarbeiter beschrieben 1987 erstmals die Methode der Lipofektion, bei der die DNA nicht in die Liposomen eingeschlossen, sondern nach späterer Zugabe ionisch auf der Oberfläche bindet. Die DNA-Lösung wird dabei mit den Liposomen in einem solchen Verhältnis vermischt, dass eine positive Nettoladung resultiert (Felgner et al., 1987; Felgner und Ringold, 1989), die zu einer Anreicherung der Komplexe auf der Zelloberfläche führt. Der genaue Mechanismus der zellulären Aufnahme der Komplexe ist noch unklar. Ursprünglich wurde eine Membranfusion postuliert (Felgner et al., 1987). Basierend auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist jedoch die Endozytose als Hauptmechanismus anzusehen (Friend et al., 1996). Das Entkommen der DNA aus dem Endosom erfolgt vermutlich durch Destabilisierung der endosomal-malen Membran mit nachfolgender Freisetzung der DNA aus dem Komplex (Xu und Szoka, 1996).

Der Gentransfer mittels kationischer Liposomen besitzt gegenüber anderen Methoden einige Vorteile. Hierzu gehören eine höhere Transfektionseffizienz und die Eignung für die Transfektion vieler verschiedener Zelllinien, darunter auch solcher, die sich im Allgemeinen refraktär gegenüber anderen Methoden verhalten. Ein anderer entscheidender Vorteil ist, dass neben dem DNA-Transfer auch ein Transfer von RNA, synthetischen Oligonukleotiden, Proteinen und Viren möglich ist. Nachteilig sind jedoch die großen Chargenunterschiede während

der Herstellung sowie das geringe Wissen um die Struktur der DNA-Liposomen-Komplexe (Luo und Saltzman, 2000b). Die Lipofektion wird häufig für die Transfektion von Zellen *in vitro* eingesetzt (Felgner und Ringold, 1989; Gao et al., 1994; Hein et al., 1998). Das größere Potential eines Liposomen-vermittelten Gentransfers liegt aber beim Einsatz in *in vivo*-Studien (Barron et al., 1999; Blezinger et al., 1999; Kim et al., 2000; Mahato et al., 1995; McLean et al., 1997; Raghavachari und Fahl, 2002; Seol et al., 2000; Tagawa et al., 1996; Thorsell et al., 1996; Thurston et al., 1998).

#### **2.3.3.2 Polyfektion mittels Dendrimeren**

Bei der Polyfektion werden nicht-lipidische, polykationische Substanzen zur Komplexierung mit der DNA eingesetzt. Es entstehen so genannte Polyplexe. Zu den wohl effizientesten Systemen zählen die Dendrimere und ihre Derivate. Dendrimere sind spheroidale, baumartig verzweigte, dreidimensionale Polymere, die ausgehend von einem zentralen Kernmolekül (Ammoniak oder Ethylendiamin) schrittweise durch zwei sich wiederholende Reaktionen (A und B) schalenweise aufgebaut werden (Tomalia et al., 1986). Durch Addition von Methylacrylat an das Kernmolekül entsteht ein Triester (Reaktion A), zu dem im zweiten Reaktionsschritt (Reaktion B) ein Amin (z.B. Ethylendiamin) zugegeben wird, wobei sich das entsprechende Triamid bildet, welches an den Enden wieder Aminogruppen trägt. Diese Verbindung wird als Generation 0 des Dendrimers bezeichnet. Durch Wiederholung der Reaktionen A und B erhält man immer größere Moleküle bzw. höhere Dendrimer-Generationen. Diese schalenweise Synthese ist jedoch nicht beliebig fortsetzbar, da die Zahl der Monomere und damit der Platzbedarf pro Schale exponentiell mit der Generation ansteigt, der zur Verfügung stehende Platz jedoch nur geometrisch, so dass ab einer bestimmten Generation aus sterischen Gründen keine vollständige Schale mehr hinzugefügt werden kann. Je nach zentralem Kernmolekül ist diese Grenze bei Generation 10 erreicht. Aufgrund dieser schrittweisen Synthese werden Dendrimere auch „Cascade Molecules“ genannt. Sie stellen synthetische Makromoleküle mit einer nahezu exakt definierten Struktur dar (Bosman et al., 1999). Dies sichert eine stabile Komplexbildung mit der DNA sowie reproduzierbare Transfektionsergebnisse. Eine partielle Degradation der Dendrimere an den Amid-Bindungen durch Hitzebehandlung in verschiedenen solvolytischen Lösungsmitteln (z.B. Wasser, Butanol) verbessert die Transfektionseigenschaften um das 50-fache durch Erhöhung der Flexibilität der Moleküle im Vergleich zu intakten Molekülen. Man spricht dann von degradierten oder aktivierten Dendrimeren (Tang et al., 1996).

Dendrimere können, ähnlich wie Histone, DNA effizient kondensieren (Haensler und Szoka, 1993), um eine schnelle Passage durch biologische Membranen zu gewährleisten. Die zellu-

läre Aufnahme erfolgt wahrscheinlich durch Endozytose (Haensler und Szoka, 1993), wobei noch unklar ist, ob die Komplexe erst an einen Zelloberflächenrezeptor binden oder einfach nur von der Membran umschlossen und internalisiert werden. Wie die Komplexe aus den Endosomen entkommen, ist ebenfalls noch nicht genau geklärt. Es wird vermutet, dass Dendrimere durch Protonenaddition ihrer tertiären Amine den pH-Abfall in den Endosomen stabilisieren und die daraus resultierende osmotische Imbalance zu einer Ruptur der Endosomen mit Freisetzung der Komplexe führt (Haensler und Szoka, 1993). Aufgrund der Eigenschaft von degradierten Dendrimern, je nach pH-Wert und Komplexbildung unterschiedliche Konformationen anzunehmen (Flexibilität), kommt hier noch ein zweiter Mechanismus in Betracht (Tang et al., 1996). Nicht-komplexierte degradierte Dendrimere besitzen am neutralen pH eine gedehnte, gestreckte Konformation aufgrund der elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den protonierten primären Aminen. Bei der Komplexbildung mit negativ geladener DNA erfolgt eine Neutralisierung der geladenen Endgruppen, die Polymere „kollabieren“ und nehmen eine kompakte Konformation an. Fällt der pH-Wert im Endosom, wirken die tertiären Amine als schwache Basen. Durch den durch die Protonierung bedingten Ladungsüberschuss der Polymere im Komplex mit der DNA, können einige Moleküle aus dem Komplex dissoziieren. Diese freien Polymere, die am neutralen pH eine gestreckte Konformation aufweisen, „schwellen“ nun aufgrund der überschüssigen positiven Ladung an, da die Neutralisierung durch die DNA wegfällt. Diese Polymerausdehnung hat, wie die Induktion der osmotischen Imbalance, welche auch durch intakte Dendrimere ausgelöst wird, eine endosomale Schwellung mit Ruptur zur Folge (Tang et al., 1996).

Auch bei der Freisetzung der DNA aus dem Komplex wird Dendrimern eine mögliche funktionelle Rolle zugeschrieben. Da Membranen anionisch geladen sind, könnte eine Konkurrenz mit der DNA um die Dendrimer-Bindung stattfinden, welche in partieller oder totaler DNA-Freisetzung aus dem Komplex resultieren würde.<sup>3</sup>

Dendrimere sind aufgrund ihrer polykationischen Ladung und genau definierten, unter besonderen Bedingungen sogar flexiblen Struktur (aktivierte Dendrimere) geeignet für einen reproduzierbaren Transfer von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen *in vitro*. Dendrimere vermitteln hohe Transfektionseffizienzen in einem breiten Spektrum an Zellen *in vitro* (Bielinska et al., 1996; Haensler und Szoka, 1993; Hudde et al., 1999; Kukowska-Latallo et al., 1996; Tang et al., 1996) und weisen im Vergleich zu effektiven, lipid-basierten Systemen eine deutlich geringere Toxizität auf (Tang et al., 1996), weshalb sie auch zur Transfektion von Zelllinien, die normalerweise schwierig zu transfizieren sind, geeignet sind (Haensler und Szoka, 1993). Auch in *in vivo*-Studien werden Dendrimere bereits für einen effizienten, nicht-

---

<sup>3</sup> <http://www.columbia.edu/~jlt32/Dendrimer.pdf>

viralen Gentransfer eingesetzt. Im Bereich der Tumorforschung finden sie beispielsweise zur Einschleusung von Antisense-Oligonukleotiden oder sogenannten Suizidgenen (s. Kap. 2.3.5.2) in Tumorzellen mittels intratumoraler Injektion der Komplexe Anwendung (Maruyama-Tabata et al., 2000; Sato et al., 2001).

### **2.3.4 Nachweis der Genexpression mittels Reporter-Assays**

Der Einsatz von Reportergenen bietet die Möglichkeit der Untersuchung der Genexpression. Als Reportergene bezeichnet man Gene oder Genfragmente, die mit anderen Genen oder regulatorischen Sequenzen gekoppelt werden, um die Aktivität dieser Sequenzen nachweisbar zu machen (Alam und Cook, 1990; Deckwer et al., 1999; Wood, 1995).

Reportergene müssen Genprodukte erzeugen, die sich leicht mithilfe biochemischer oder histochemischer Methoden nachweisen lassen und die für den Organismus oder die Zellen, in denen sie exprimiert werden, nicht toxisch sind (Deckwer et al., 1999). Im Idealfall sollten die Genprodukte nicht in endogener Form vorkommen. Ein Reporterassay sollte sensitiv, quantitativ, schnell, einfach durchführbar, reproduzierbar und möglichst kostengünstig sein.

Häufig verwendete Reportergene sind das CAT-Gen (Gorman et al., 1982; Luckow und Schütz, 1987; Pothier et al., 1992), das LacZ-Gen (Eustice et al., 1991; Lal et al., 1994; Lojda, 1970; Meng, 2002; Sanes et al., 1986; Weiss et al., 1997; Weiss et al., 1999), das GFP-Gen (Chalfie et al., 1994; Cubitt et al., 1995; Misteli und Spector, 1997; Stearns, 1995) sowie das Luc-Gen (Brasier et al., 1989; Brasier und Ron, 1992; Contag et al., 1997; De Wet et al., 1987; DiLella et al., 1988; Gould und Subramani, 1988; Nguyen et al., 1988; Wood et al., 1989).

#### **2.3.4.1 CAT-Gen**

Das bakterielle CAT-Gen ist ein Resistenzgen. Es kodiert die Chloramphenicol-Acetyltransferase, welche das Antibiotikum Chloramphenicol durch Überführung in das Mono- oder Diacetat inaktiviert (Deckwer et al., 1999). Das CAT-Gen ist zum Nachweis der Genexpression besonders geeignet, da in Eukaryonten natürlicherweise keine endogene Enzymaktivität vorhanden und es leicht nachweisbar ist (Luckow und Schütz, 1987). Nachteilig bei der Anwendung ist, dass zur Analyse der Genexpression Zellextrakte hergestellt werden müssen, so dass keine *in situ*-Detektion erfolgen kann und damit keine Aussage über eine Zelltyp-spezifische Expression möglich ist. Das CAT-Protein ist relativ stabil in Säugerzellen, obwohl die mRNA eine vergleichsweise kurze Halbwertszeit von 50 Stunden hat. Daher ist

das CAT-Gen speziell für transiente Assays durch Nachweis des akkumulierten exprimierten Enzyms geeignet (Thompson et al., 1991).

#### 2.3.4.2 LacZ-Gen

Das bakterielle LacZ-Gen aus *Escherichia coli* kodiert die  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal). Das physiologisch wichtigste Substrat dieses Enzyms ist Lactose, welche in Glucose und Galactose gespalten wird (Deckwer et al., 1999). Als andere Substrate dienen z.B. die chromogenen Substanzen Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) oder 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal), deren Hydrolyse zu farbigen Reaktionsprodukten führt, die spektralphotometrisch bzw. histochemisch nachgewiesen werden können (Deckwer et al., 1999). Der Einsatz von LacZ als Reporter gen erlaubt eine *in situ*-Detektion der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität mittels histochemischer Techniken (Cohen et al., 1952; Hein et al., 1998; Sanes et al., 1986).

Nachteilig ist jedoch, dass viele Säugerzellen und Gewebe endogene, lysosomale  $\beta$ -Galactosidase enthalten. Ein hoher Gehalt an endogener  $\beta$ -Galactosidase wurde beispielsweise in Darm, Niere, Nebenhoden und Lunge nachgewiesen, wobei Speziesunterschiede bestehen (Conchie et al., 1959). Dies erschwert die Differenzierung zwischen Reporter genaktivität und endogener Enzymaktivität. Ein mögliches Unterscheidungskriterium ist das pH-Optimum des Enzyms. Während das pH-Optimum der  $\beta$ -Galactosidase im Säugerorganismus im sauren Bereich liegt (Cohen et al., 1952; Lojda, 1970), weist das bakterielle Enzym ein neutrales pH-Optimum auf. Dies nutzten Weiss und Mitarbeiter und modifizierten die histochemische Färbung mit X-Gal durch eine Verschiebung des pH-Wertes in den neutralen bzw. alkalischen Bereich. Während die Inkubation mit dem Substrat am neutralen pH-Wert noch zur Detektion endogener Aktivität in der murinen Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere, Gehirn und Skelettmuskulatur führte, konnte eine Reduktion der endogenen Enzymaktivität bei Erhalt der Reporter genaktivität durch Inkubation an einem alkalischen pH beobachtet werden (Weiss et al., 1997; Weiss et al., 1999). Dies setzt allerdings den Einsatz eines geeigneten Puffers voraus, der den pH-Wert während der gesamten Inkubationszeit stabil hält. Auch eine Verkürzung der Inkubationsdauer mit dem X-Gal-Substrat in Rattengehirn führt zu einer Eliminierung der endogenen Enzymaktivität bei Erhalt der exogenen (Lal et al., 1994). Ein weiteres mögliches Unterscheidungskriterium zwischen endogenem und bakteriellem Enzym ist die Hitzestabilität. Young und Mitarbeiter (1993) konnten durch eine einstündige Hitzebehandlung bei 50°C die endogene Enzymaktivität um den Faktor 40 in verschiedenen eukaryontischen Zelllinien bei Erhalt der bakteriellen Enzymaktivität reduzieren. Meng (2002) dagegen konnte in ihrer Dissertationsarbeit nach Transfektion boviner Endothel- und Granulozellen mit  $\beta$ -Gal-Vektoren und anschließender verkürzter X-Gal-Inkubation an einem alka-

lischen pH die endogene Enzymaktivität nicht eliminieren. Eine eindeutige, Zelltyp-unabhängige Unterscheidung zwischen endogener  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität und Reporter-genaktivität ist nur durch Einsatz eines Antikörpers gegen *E.coli*  $\beta$ -Galactosidase möglich (Meng, 2002).

#### 2.3.4.3 GFP-Gen

Das GFP-Gen aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* kodiert das autofluoreszierende Green Fluorescent Protein (GFP). Bei der Qualle erfolgt die Aktivierung des GFP durch Bindung von Calcium an ein blau leuchtendes Protein, das Aequorin, welches die Energie indirekt auf GFP überträgt und auf diese Weise die Aussendung des grünen Lichts veranlasst (Cubitt et al., 1995; Misteli und Spector, 1997). Experimentell kann dieser Energietransfer durch Anregung mit blauem Licht induziert werden (Stearns, 1995). Im Gegensatz zu vielen anderen lichtemittierenden Proteinen erfordert das GFP nicht die Anwesenheit von Kofaktoren oder Substraten zur Aussendung des grünen Lichts. Der Einsatz des GFP-Gens als Reporter-gen ermöglicht durch einfache Lichtanregung eine *in situ*-Detektion des Proteins. Nachteilig ist, dass die GFP-Aktivität Zelltyp-spezifisch zu sein scheint, da das Protein in verschiedenen Säugerzellen nur schwach bzw. nicht detektiert werden konnte (Stearns, 1995).

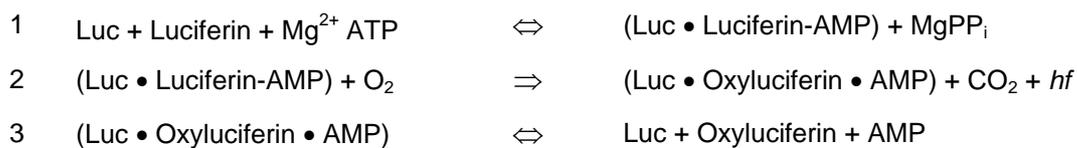
#### 2.3.4.4 Luc-Gen

Das Luc-Gen aus dem in den USA vorkommenden Leuchtkäfer („firefly“) *Photinus pyralis* kodiert die Luciferase (Luc) und wurde 1985 durch De Wet und Mitarbeiter geklont. 1986 gelang erstmals die Transfektion und anschließende Expression der Firefly Luciferase in Tabakpflanzen (Ow et al., 1986). Mittlerweile findet das Luc-Gen Einsatz als Reporter-gen auch in Zebrafischen (Mayerhofer et al., 1995), Drosophila (Brandes et al., 1996) und Säugerzellen (Cheng et al., 1997; De Wet et al., 1987; Zhang et al., 1994). Die Firefly Luciferase katalysiert die oxidative Decarboxylierung des Substrates Luciferin in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen, ATP und Sauerstoff (DeLuca, 1976). Die Quantenausbeute von ca. 90%, also die Freisetzung eines Photons bei 562 nm in ca. 90% der katalytischen Zyklen, ist die höchste der bekannten Biolumineszenzreaktionen (Aflalo, 1991; DeLuca und McElroy, 1974).

Im ersten Teil der Reaktion (Abb. 3) bildet sich der Adenyl-Luciferin-Luciferase-Komplex. In Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt dann die oxidative Decarboxylierung und es entsteht das Endprodukt Oxyluciferin, welches am Enzym gebunden bleibt. Hierbei erfolgt die Emission eines Photons bei 562 nm. Die Regeneration des Enzyms erfolgt aufgrund der nur langsamen Freisetzung des Endproduktes Oxyluciferin aus dem Komplex verzögert (Denburg et al., 1969). Diese langsame Regeneration in Verbindung mit der kurzen Halbwertszeit des En-

zyms (3 Stunden) in Säugerzellen (Nguyen et al., 1989; Thompson et al., 1991) impliziert, dass in Anwesenheit von allen Substraten jedes Luciferase-Molekül nur einmal reagieren kann und nur ein Photon emittiert. Dies schließt eine Akkumulation der Luciferase *in vivo* aus (van Leeuwen et al., 2000). Im Gegensatz zu anderen Reportern, die lediglich durch Akkumulation die Gesamtmenge von Proteinmolekülen in der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt als Indikator für die Genexpression zeigen, repräsentiert die Luciferase als Reporter einen „Fluss“ von Proteinmolekülen, die innerhalb einer bestimmten Zeit in der Zelle entstanden sind (Luciferase pro Sekunde). Durch Einsatz der Luciferase als Reporter ist somit ein nicht-invasives Studium von Veränderungen der Genexpression *in vivo* möglich (Contag et al., 1997; Nakamura et al., 1998).

*In vitro* kann die Lichtproduktion durch Beteiligung von Coenzym A in der Anwesenheit hoher ATP-Konzentrationen gesteigert werden. Coenzym A führt zur Freisetzung von Oxyluciferin vom Enzym, welches in einer nahezu konstanten Lichtproduktion resultiert (Ford et al., 1995).



**Abb. 3: Luciferase-Reaktion (modifiziert nach Aflalo, 1991)**

Schritt 1 ist die Bildung des Adenyl-Luciferin-Luciferase-Komplexes. Schritt 2 ist die oxidative Decarboxylierung, in welcher das Endprodukt Oxyluciferin, gebunden am Enzym, entsteht und ein Photon bei 562 nm emittiert wird (*hf* ist die Energie des Photons). Schritt 3 ist die langsame Freisetzung von Oxyluciferin von der Bindungsstelle am Enzym. Die Klammern und Punkte indizieren die gebildeten Komplexe.

---

Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgt in Zellextrakten oder *in vivo* mittels eines Photonenzählers (z.B. Luminometer oder Szintillationszähler), welcher die emittierten Lichtquanten misst. Die Gesamtmenge an Licht, die innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls gemessen wird, ist proportional zur Menge der Luciferasereporteraktivität in der Probe. Aufgrund der fehlenden Autolumineszenz erfordert der Nachweis immer die Zugabe der Substrate.

Im Vergleich zum CAT-Assay bietet der Luciferase-Assay schnellere Ergebnisse, ist kostengünstiger und besitzt eine ca. 30- bis 1000-fach höhere Sensitivität (Gould und Subramani, 1988; Pazzagli et al., 1992). Es lassen sich bereits wenige Pikogramm Enzym nachweisen.

Zur internen Kontrolle und Standardisierung der Transfektionseffizienz kann ein zweites Reporter-gen verwendet werden (Hollon und Yoshimura, 1989), beispielsweise das Luc-Gen aus

der Seefeder (einer Polypeptidart) *Renilla reniformis* (Lorenz et al., 1991; Pedram et al., 1997). Da beide Luciferasen Unterschiede in ihren Enzymstrukturen sowie Substratansprüchen aufgrund verschiedenen evolutionären Ursprungs aufweisen, ist eine selektive Differenzierung zwischen ihren jeweiligen biolumineszenten Reaktionen möglich.

## 2.3.5 Anwendungsmöglichkeiten des Gentransfers

### 2.3.5.1 Gentransfer in der Grundlagenforschung und Biotechnologie

Die häufigste Anwendung des Gentransfers in der Grundlagenforschung ist der Einsatz zur Untersuchung der Organisation und Funktion von Genen und zugehörigen Genprodukten (Fadel et al., 1998; Kappel et al., 2000). So konnten viele Promotor- und Regulatorsequenzen identifiziert und charakterisiert sowie transgene Tiermodelle entwickelt werden. Daneben werden verschiedene Methoden des Gentransfers zur Immortalisierung von Säugerzellen bei der Herstellung permanenter Zelllinien eingesetzt, z.B. die Infektion mit Tumoviren (Sasaguri et al., 1991), der Transfer einzelner viraler Gene (Ades et al., 1992; Hohenwarter et al., 1992; Lassalle et al., 1992; Schütz et al., 1997) oder die Zellfusion zur Herstellung von Hybridzellen (Edgell et al., 1983). In der Biotechnologie findet der Gentransfer Anwendung zur Herstellung von Proteinen für Forschung und Medizin. Von besonders großem Interesse ist die Herstellung biologisch aktiver, rekombinanter Proteine. Diese lassen sich jedoch in einigen Fällen in ausreichenden Mengen und mit korrekten posttranslationalen Modifikationen nur in Säugerzellen herstellen (MacDonald, 1990).

### 2.3.5.2 Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man das gezielte Einbringen genetischer Information in Zellen zu therapeutischen Zwecken, entweder zur Wiederherstellung einer defekten Zellfunktion oder zur Vermittlung einer zusätzlichen Funktion. Man differenziert zwischen somatischer Gentherapie und Keimbahn-Gentherapie. Bei der **somatischen Gentherapie** werden fremde Gene in bestimmte Körperzellen eingeschleust, wobei die Therapie ausschließlich auf das behandelte Individuum beschränkt ist; das eingeschleuste Gen wird nicht an die Nachkommen weitervererbt. Die **Keimbahn-Gentherapie** dagegen führt durch Einschleusen von Fremd-Genen in embryonale Zellen eines frühen Entwicklungsstadiums zu stabilen, transgenen Organismen, deren genetische Veränderung weitervererbt wird (Deckwer et al., 1999).

Je nach dem, ob der eigentliche Gentransfer außerhalb oder innerhalb des Körpers stattfindet, unterscheidet man die *ex vivo*-Therapie von der *in vivo*-Therapie (auch *in situ*-Therapie genannt). Bei der **ex vivo-Therapie** werden aus dem Körper Zellen entnommen, diese

genterapeutisch verändert und anschließend wieder in den Körper verbracht (Deckwer et al., 1999). Dieses Verfahren wird beispielsweise bei der ADA-Immunschwäche an T-Lymphozyten, die das für eine korrekte Funktion des Immunsystems unentbehrliche Enzym Adenosin-Desaminase (ADA) nur fehlerhaft produzieren, angewendet. Den Patienten werden T-Lymphozyten entnommen und diese nach retroviralem *ex vivo*-Transfer des intakten ADA-Gens reinjiziert (Blaese et al., 1995; Mullen et al., 1996). Die Krankheitssymptome konnten bei den Patienten deutlich gelindert werden. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer der Immunzellen erfordert diese Behandlung allerdings eine Wiederholung in regelmäßigen Abständen. Nur eine Korrektur des Defektes auf der Ebene hämatopoetischer Stammzellen könnte den Gendefekt permanent korrigieren.

Bei der ***in vivo*-Therapie** erfolgt eine direkte intravenöse, intramuskuläre oder Gewebespezifische Applikation nackter, komplexierter oder virusverpackter DNA (Deckwer et al., 1999). Dieses Vorgehen ist nur sinnvoll, wenn sich die Gendefekte an einem definierten Ort äußern, z.B. in einem Tumor oder in einem Organ. Bei der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose) beispielsweise, einer Erbkrankheit, bei der durch veränderte Schleimproduktion u.a. die Lungenfunktion beeinträchtigt ist, werden intakte Gene mittels adenoviraler Vektoren in die Bronchialschleimhaut eingebracht (Conrad et al., 1996; Flotte et al., 1996; Reix et al., 2002).

Die ersten Ansätze zur Gentherapie zielten auf die kausale Behandlung genetisch bedingter Erkrankungen durch Komplementation des defekten Genprodukts über das Einbringen und die Expression eines intakten Gens in einen Organismus (Deckwer et al., 1999). Inzwischen spielen jedoch Tumorerkrankungen eine weit größere Rolle beim Einsatz der Gentherapie in klinischen Studien. Aus diesem Grunde wird an dieser Stelle nur die **Gentherapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen** vorgestellt.

Im Bereich der Tumorforschung wurden verschiedene Genterapiestrategien entwickelt (s. Tab. 2).

Ziel der **Immungentherapie** ist die Zerstörung von Tumorzellen mithilfe des eigenen Immunsystems, entweder durch Steigerung der Effektivität von Immunzellen oder durch Erhöhung der Immunogenität von Tumorzellen. Um die Effektivität von Immunzellen zu steigern, verwendet man beispielsweise Zytokine. Hierfür entnimmt man aus entferntem Tumorgewebe Zellen (Immunzellen oder Tumorzellen) und stattet diese *ex vivo* mit zusätzlichen Genen, z.B. für Interleukin-2 (Wachstumsfaktor für T-Zellen) aus. Die anschließende Injektion dieser veränderten Tumorzellen in beispielsweise Haut, Muskel- oder Tumorgewebe führt über die Zytokin-Bildung zur Mobilisierung von Immunzellen (Blaese, 1999; Roth und Cristiano, 1997). Ansätze zur Erhöhung der Immunogenität von Tumorzellen basieren u.a. auf dem *in*

*vivo*-Transfer von Genen in Tumorzellen, die für Antigene kodieren. Nabel und Mitarbeiter (1993) beispielsweise injizierten DNA-Liposomen-Komplexe, die das Gen für ein Haupthistokompatibilitätsantigen (HLA-B7) enthielten, direkt in subkutane Melanome HLA-B7-negativer Patienten. Die Expression der körperfremden Proteine führte zu einer lokalen Immunabwehr, die bei einigen Patienten zur Rückbildung der Melanome führte.

Therapie	Prinzip
Immungentherapie	Steigerung der Effektivität von Immunzellen bzw. Erhöhung der Immunogenität von Tumorzellen
Suizidgentherapie	Expression eines direkt oder indirekt toxischen Genproduktes in der Tumorzelle
Tumorsuppressorgen-Therapie	Substitution verlorengegangener oder geschädigter Suppressorgene
Antionkogen-Therapie	Ausschaltung überexprimierter Onkogene
Replikationsselektive, onkolytische Viren	Zellyse durch virale Replikation (nur in Zellen mit gestörter Zellteilung)
Chemoschutz	Proteine eingeschleuster Gene sollen normale Zellen vor den Auswirkungen einer Chemotherapie schützen
Antikörper-Gene	Eingeschleuste Gene sollen Antikörper produzieren, die in den Tumorzellen verbleiben und Proteine abfangen, die zum Krebsgeschehen gehören
Anti-Angiogenese	Aushungern des Tumors durch Hemmung der Blutgefäßbildung

**Tab. 2: Übersicht über genterapeutische Behandlungsstrategien im Bereich der Tumorforschung (modifiziert nach Blaese, 1999)**

Die Immungentherapie, bei der körpereigene Abwehrkräfte gegen Krebs verstärkt werden sollen, könnte theoretisch alle Tumorzellen eines Patienten vernichten. Ein großes Problem klinischer Studien ist jedoch, dass die Erprobung zuerst an schwerstkranken Patienten erfolgt, deren Immunsystem enorm durch Strahlen oder Chemotherapie geschwächt ist, so dass die Erfolgsaussichten sicherlich geringer sind als bei Patienten mit geringerer Tumormasse und guten Abwehrkräften (Blaese, 1999).

Die **Suizidgentherapie** basiert auf der Expression eines direkt oder indirekt toxisch wirkenden Genproduktes in der Tumorzelle. Zu den direkt toxischen Genprodukten gehören z.B. bakterielle Toxine wie das Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* (Falnes und

Sandvig, 2000), welche die Proteinsynthese der Zelle hemmen und diese dadurch abtöten. Indirekt toxische Genprodukte sind so genannte Prodrug-aktivierende Enzyme, in der Regel bakteriellen (z.B. *E.coli* Cytosindeaminase) oder viralen Ursprungs (z.B. *Herpes simplex Virus* Thymidinkinase), die applizierte, nicht-toxische Medikamente (Prodrugs) in für die Zelle toxische Substanzen umbauen, die dann zum Zelltod führen (Springer und Niculescu-Duvaz, 2000). Die Wirksamkeit von Suizidgenen in der gentherapeutischen Behandlung von Tumoren wurde in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen bestätigt (Calvez et al., 1996; Hanna et al., 1997; Klatzmann et al., 1998; Kunitomie et al., 2000; Trinh et al., 1995). Klinische Erfolge wurden allerdings bisher nur partiell nachgewiesen, vermutlich aufgrund der geringen Effizienz des Gentransfers (Klatzmann et al., 1998).

Zur Reparatur der gestörten Zellteilung von Tumorzellen werden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Eine **Inaktivierung von Onkogenen** (z.B. ras) kann zur Zerstörung eines Tumors durch Hemmung der Expression auf RNA- (z.B. durch Antisense-Oligonukleotide) oder Protein-Ebene führen (Barrington et al., 1998; Chin et al., 1999). Eine wohl wichtigere Strategie zur Behandlung von Tumoren durch die Gentherapie ist die Einschleusung von **Tumorsuppressorgenen** in Tumorzellen (Clayman et al., 1999; Cristiano et al., 1998; Nemunaitis et al., 2000) als Ersatz für ein den Tumor unterdrückendes Gen, welches verloren gegangen oder geschädigt ist (Blaese, 1999). Das Tumorsuppressorgen p53, dessen Proteinprodukt während der Zellteilung normalerweise den Zustand der Erbsubstanz überwacht und bei Schäden zu Wachstumsstillstand und Apoptose führt (McCormick, 2001), ist bei Tumorerkrankungen des Menschen sehr oft mutiert. Das p53-Tumorsuppressorgen führt *in vitro* zu einem Proliferationsarrest und induziert im Mausmodell eine Tumorsuppression und verringerte Metastasenbildung (McCormick, 2001). Da die Expression von Tumorsuppressorgen in gesunden Zellen hochreguliert ist (McCormick, 2001), ist die Wahrscheinlichkeit von kollateralen Schäden in gesunden Zellen sehr gering (Zhang et al., 1994). Darüber hinaus zeigt p53 erstaunlicherweise einen so genannten Bystander-Effekt auf benachbarte, nicht gentherapeutisch veränderte Tumorzellen, wahrscheinlich partiell durch Hemmung der Angiogenese via Induktion der Herunterregulierung der VEGF-Expression (Bouvet et al., 1998; Nishizaki et al., 1999) und Stimulierung der Expression von Thrombospondin (Dameron et al., 1994).

Aufgrund des Tumorzell-spezifischen Angriffspunktes ist die Spezifität beider Ansätze höher als bei der Suizidgentherapie (Brand und Strauss, 1998).

Eine andere Strategie basiert auf dem **Einsatz replikationsselektiver, onkolytischer Viren** (z.B. *Herpes simplex Virus 1*, Adenoviren), welche sich aufgrund einer Genmutation nur in Zellen mit gestörter Zellteilung vermehren können. Während in gesunden Zellen keine Vi-

rusreplikation erfolgt, stellen Tumorzellen potentielle Wirtszellen für die Replikation dar (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000; Heise und Kirn, 2000; Markert et al., 2000). Die durch die virale Replikation induzierte Tumorzelllyse mit anschließender Freisetzung der Viren kann beispielsweise durch Einsatz von Adenoviren, welche das Adenovirus Death Protein (ADP) überexprimieren, noch gesteigert werden (Doronin et al., 2000; Doronin et al., 2001).

Eine hoffnungsvolle und Erfolg versprechende Alternative zu den bisherigen Strategien der Tumorthherapie ist die gentherapeutische Anti-Angiogenese, die im nachfolgenden Kapitel erläutert wird.

### **2.3.6 Therapeutische Anti-Angiogenese zur Behandlung von Tumorerkrankungen**

1971 postulierte Folkman, dass Wachstum und Metastasierung von Tumoren Angiogenese-abhängige Prozesse seien und dass die therapeutische Anti-Angiogenese eine neue Alternative zur Behandlung von soliden Tumoren darstellen könnte (Folkman, 1971). Inzwischen wurden zahlreiche spezifische und unspezifische Inhibitoren der Endothelzellproliferation und Angiogenese isoliert und charakterisiert. Eine anti-angiogene Therapie bietet verschiedene Vorteile, da aktivierte Endothelzellen und nicht die Tumorzellen im Mittelpunkt stehen (Liekens et al., 2001). Endothelzellen sind genetisch stabile, diploide und homogene Zielzellen und zeigen nur selten Spontanmutationen. Darüber hinaus ist die Proliferationsrate von Tumorendothelzellen im Vergleich zum normalen, ruhenden Endothel ca. 50-fach höher, was eine spezifische und damit wenig toxische Therapie ermöglicht. Aktivierte Endothelzellen exprimieren spezifische Marker wie E-Selektin oder VEGF-Rezeptoren (Liekens et al., 2001). Aufgrund ihrer exponierten Lage zum Blut sind sie via systemischer Administration direkt zugänglich. Das aktivierte Endothel stellt also ein spezifischeres Ziel als die Tumorzellen selbst dar. Darüber hinaus führt die Zerstörung einer geringen Anzahl an Tumorgefäßen zur Hemmung des Wachstums vieler Tumorzellen (Kerbel, 1997).

Die Wirkung von anti-angiogenen Faktoren beruht auf der Hemmung der endothelialen Migration, Proliferation, Proteaseaktivität, Ausbildung funktionsfähiger Kapillaren oder auf der Induktion von Apoptose (Cao, 2001; Carmeliet und Jain, 2000). Da die Regression eines stark wachsenden Kapillarnetzes ein viel langsamerer Prozess als die Zerstörung der Tumorzellen selbst ist, müssen anti-angiogene Moleküle im Gegensatz zu zytotoxischen über einen längeren Zeitraum permanent appliziert werden. Hauptprobleme sind also Verfügbarkeit und Stabilität der anti-angiogenen Moleküle.

Die Gentherapie stellt eine gute Alternative dar, um ausreichend hohe therapeutische Konzentrationen von aktiven Substanzen am Wirkungsort zu erreichen. Durch den Einsatz von Endothelzell-spezifischen, genregulatorischen Elementen (z.B. Promotoren, Enhancer) kann eine Zelltyp-spezifische Expression erzielt werden. Verschiedene Zelltyp-spezifische Promotor- und Enhancerelemente, die zur selektiven Genexpression in Endothelzellen eingesetzt werden können, wurden bereits identifiziert und zum Teil gut charakterisiert. Hierzu gehören zum Beispiel die genregulatorischen Sequenzen des murinen VEGFR-2 (Flk-1)-Gens (Kappel et al., 1999; Röncke et al., 1996) und des murinen Tie-Gens (Iljin et al., 1999; Schlaeger et al., 1997).

Der Transfer von anti-angiogenen Genen zu therapeutischen Zwecken hat sich bisher in präklinischen Studien als sehr erfolgreich erwiesen. Viele Autoren berichteten von einer effizienten Hemmung des Tumorwachstums in verschiedenen Tiermodellen durch virusvermittelte gentherapeutische Anti-Angiogenese, z.B. durch retroviralen (Feldman et al., 2001) oder adenoviralen Transfer des Endostatin-Gens (Chen et al., 2000; Régulier et al., 2001; Sauter et al., 2000), durch adeno-assoziierten viralen Transfer des Angiostatin- (Ma et al., 2002; Nguyen et al., 1998) oder Endostatin-Gens (Nguyen et al., 1998), durch retro- oder adenoviralen Transfer eines modifizierten Platelet Factor-4-Gens (Tanaka et al., 1997) oder durch adenoviralen bzw. adeno-assoziierten viralen Transfer von Antisense-VEGF (Im et al., 1999; Nguyen et al., 1998). Auch nicht-virale Methoden erwiesen sich als effizient zum Transfer von anti-angiogenen Genen im Tiermodell, z.B. der liposomale Transfer des Angiostatin- (Chen et al., 1999; Sacco et al., 2000) oder Endostatin-Gens (Blezinger et al., 1999; Chen et al., 1999) sowie die intratumorale Injektion nackter Plasmid-DNA, die für Endostatin kodiert (Ding et al., 2001; Szary und Szala, 2001).

Einen weiteren, vielversprechenden Ansatz der therapeutischen Anti-Angiogenese stellt die zellbasierte Gentherapie dar. Hierbei wird das Gen des anti-angiogenen Moleküls *in vitro* stabil in Zellen eingeschleust, diese in „Kapseln“ (z.B. aus Natrium-Alginat) eingeschlossen und dann in den Körper implantiert, um eine systemische anti-angiogene Behandlung von Primärtumoren und Metastasen zu gewährleisten (Bergers und Hanahan, 2001). Die „Kapseln“ ermöglichen den freien Austausch von Proteinen, Nährstoffen und Sauerstoff und bieten den eingekapselten Zellen zusätzlich Schutz vor enzymatischer Verdauung sowie Inaktivierung durch das Immunsystem (Bergers und Hanahan, 2001).

Streit und Mitarbeiter (2002) entwickelten einen systemischen, zellbasierten gentherapeutischen Ansatz zur *in vivo*-Produktion von Thrombospondin-2 (TSP-2) im Tumorgewebe durch Implantation von mit gentechnisch veränderten Fibroblasten bewachsenen Biopolymeren. Es wurde eine TSP-2 Sekretion über den gesamten Untersuchungszeitraum von 5 Wochen be-

obachtet, die zur Hemmung von Tumorwachstum und Angiogenese in verschiedenen hochmalignen Tumoren führte.

### 2.3.7 Endothelzell-spezifischer Gentransfer

Die selektive Expression des Transgens von Endothelzellen kann durch Einsatz von Endothelzell-spezifischen, genregulatorischen Elementen (z.B. Promotoren oder Enhancer) erzielt werden. Durch Verwendung von beispielsweise Promotoren, die im aktivierten Endothel besonders stark exprimieren, ist eine sehr spezifische Expression, z.B. im Tumorendothel möglich. Dies ist beispielsweise bei der Verwendung zytotoxischer Proteine (Suizidgentherapie), die nur die aktivierten Endothelzellen abtöten sollen, von Bedeutung, während nicht aktivierte Endothelzellen aufgrund fehlender oder nur geringer Expression dieser Proteine weitestgehend vor den Auswirkungen des Gentransfers geschützt sind. Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Endothelzell-spezifischen Promotoren Ets-1 und E-Selektin sowie der Flk-1-Enhancer vorgestellt.

#### 2.3.7.1 Ets-1-Promotor

Der erste Transkriptionsfaktor, der in vaskulären Endothelzellen während der Angiogenese im Embryo (Vandenbunder et al., 1989) sowie in Tumoren (Wernert et al., 1992) identifiziert wurde, ist Ets-1, der bei der Regulation der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt (Dittmer und Nordheim, 1998; Wernert et al., 1992; Wernert, 1997). Das Gen, welches für den Ets-1-Transkriptionsfaktor codiert, ist das c-Ets-1-Protoonkogen, das zelluläre Gegenstück zum viralen Onkogen v-Ets aus dem Genom des *Aviären Leukämie-Retrovirus E26* (Leprince et al., 1983; Watson et al., 1988).

Ets-1-Bindungsstellen wurden in verschiedenen zellulären Promotoren identifiziert, einschließlich der Gene für Wachstumsfaktorrezeptoren wie VEGFR-1 (Wakiya et al., 1996), VEGFR-2 (Kappel et al., 2000), Tie-1 und Tie-2 (Dube et al., 1999; Iljin et al., 1999), für Matrix-degradierende Proteasen wie Matrix-Metalloproteinasen (Oda et al., 1999; Sato et al., 2000) und ihre Inhibitoren (Logan et al., 1996) sowie für Adhäsionsmoleküle wie Integrin  $\beta 3$  (Oda et al., 1999; Sato et al., 2000).

Eine Stimulation von Endothelzellen mit angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF-2 induziert die Ets-1-Expression (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996; Sato, 1998; Sato et al., 2000; Wernert et al., 1992).

Die durch Antisense-Oligodesoxynucleotide (ODN) induzierte Ets-1-Expressionshemmung führt *in vitro* zu einer Erniedrigung der Proliferationsrate und Migrationsfähigkeit von Endothelzellen (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996). Gleichzeitig erfolgt eine Herabsetzung

der Biosynthese des Plasminogen-Aktivators vom Urokinase-Typ (uPA) und der Kollagenase I, beides Enzyme, die während der Angiogenese für die Remodelierung der extrazellulären Matrix notwendig sind (Edwards und Murphy, 1998).

Die Expression von Ets-1 ist während der Angiogenese *in vivo* im Rahmen physiologischer und pathologischer Vorgänge deutlich erhöht (Wernert et al., 1992) und wird nach Abschluss der Angiogenese herunterreguliert (Bolon et al., 1995; Kola et al., 1993; Maroulakou et al., 1994). In Übereinstimmung wurde eine hohe Ets-1 mRNA-Expression in proliferierenden Endothelzellen *in vitro* nachgewiesen, jedoch nicht in ruhenden Endothelzellen (Wernert et al., 1992).

Wernert et al. (1999) berichteten von einer drastischen Reduktion der Bildung neuer Blutgefäße auf der Chorioallantoismembran von Hühnerembryonen (CAM-Assay) durch Ets-1-Antisense-Oligodesoxynucleotide (ODN). Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass der Angiogenese-Inhibitor Fumagillin die Ets-1-Expression stark inhibiert (Wernert et al., 1999). Die Ergebnisse wurden durch frühere Experimente mit kultivierten Endothelzellen untermauert (Iwasaka et al., 1996). Eine Stimulation der Ets-1-Expression erfolgt auch bei der tumorinduzierten Angiogenese (Wernert et al., 1992; Wernert et al., 1994). Fujimoto und Mitarbeiter untersuchten die Ets-1-Expression in Patienten mit endometrialen Karzinomen (2000a) sowie cervikalen Karzinomen (2000b). Dabei ergab sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Grad der Ets-1 mRNA-Expression und der Anzahl der neu gebildeten Gefäße sowie dem Grad des Krankheitsstadiums. Ets-1 könnte demnach als prognostischer Indikator für diese Krankheitsbilder geeignet sein. Takai und Mitarbeiter (2000) berichteten von einer Korrelation der Ets-1-Expression in endometrialen Karzinomen mit der Malignität des Tumors. Diese Ergebnisse spiegeln die Beteiligung von Ets-1 in der Regulation der Angiogenese im Rahmen physiologischer und pathologischer Vorgänge (Tumorangiogenese) wider.

Geninaktivierungsstudien zeigen, dass der Transkriptionsfaktor nicht essentiell für die embryonale Blutgefäßbildung ist. Murine Ets-1-Nullmutanten zeigen einen lebensfähigen, fertilen Phänotyp (Barton et al., 1998; Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995).

Der Ets-1-Transkriptionsfaktor stellt ein interessantes Target für die experimentelle Tumorthherapie dar (Dittmer und Nordheim, 1998) aufgrund seiner spezifischen Expression von aktivierten Endothelzellen während der Angiogenese (Wernert et al., 1992). Neben Antisensestrategien erscheint der Einsatz niedermolekularer, die Ets-1-Expression hemmender Verbindungen besonders Erfolg versprechend (Wernert et al., 1999). Da die Ets-1-Expression während der Angiogenese *in vivo* deutlich erhöht ist (Wernert et al., 1992), hat das Ets-1-Gen Potential für den Einsatz in Vektoren im Rahmen eines Endothelzell-spezifischen Gen-

transfers (Iljin et al., 1999). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten murinen 5x3bs-Enhancer handelt es sich um eine Bindungsstelle für den Ets Transkriptionsfaktor, die vor dem Promotor als Pentamer kloniert wurde.

### 2.3.7.2 E-Selektin-Promotor

Selektine sind Adhäsionsmoleküle, die heterotypische Zell-Zell-Interaktionen zwischen Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten vermitteln. Sie werden entsprechend ihrer Expression in E- (Endothel), L- (Leukozyten) und P-Selektin (Thrombozyten und Endothel) eingeteilt. Alle drei Typen führen im Prozess der Immunabwehr zu einer gesteigerten Adhäsion von Leukozyten ans Gefäßendothel des entzündeten Gewebes, als Voraussetzung für die Extravasation von Leukozyten (Ley, 1996; Springer, 1990; Springer, 1995).

E-Selektin wird im Gegensatz zu anderen Adhäsionsmolekülen nur von zytokinaktivierten Endothelzellen exprimiert (Bevilacqua et al., 1989; Erbe et al., 1992). Da E-Selektin im Gegensatz zu P-Selektin nicht in gespeicherter Form intrazellulär in Weibel-Palade-Körperchen vorliegt, muss eine *de novo*-Synthese erfolgen. Das Maximum der E-Selektin-Expression wird erst zwei bis vier Stunden nach der Induktion erreicht und die Expression ist innerhalb von 24 Stunden bereits wieder abgeklungen (Bevilacqua et al., 1989). E-Selektin spielt neben seiner Vermittlung der Leukozytenadhäsion auch eine Rolle in der Interaktion zwischen Endothelzellen und disseminierten Tumorzellen (Bianconce et al., 1996; Mayer et al., 1998; Tei et al., 2002).

Darüber hinaus wird E-Selektin eine Rolle in der Vaskularisation zugesprochen, wobei die Mechanismen der Induktion noch unklar sind. Nguyen und Mitarbeiter (1993) berichteten, dass Antikörper gegen E-Selektin die Bildung gefäßähnlicher Strukturen in einem bovinen *in vitro*-Modell der Angiogenese verhindern. Koch und Mitarbeiter (1995) postulierten eine chemotaktische Wirkung von rekombinantem, löslichem, humanen E-Selektin auf humane Endothelzellen *in vitro* sowie eine Stimulation der Angiogenese im Rattencornea-Modell. *In vivo*-Versuche mit murinen homozygoten E-Selektin-Nullmutanten dagegen demonstrieren einen gesunden und fertilen Phänotyp, der weder während der Entwicklung des Gefäßsystems noch im reifen Gefäßsystem des adulten Organismus Defizite aufweist (Labow et al., 1994). Aufgrund dieser divergierenden Ergebnisse bezüglich der Rolle von E-Selektin im Rahmen der vaskulären Morphogenese kultivierten Gerritsen und Mitarbeiter (1996) mikrovasculäre Endothelzellen aus der Lunge von Wildtypmäusen und homozygoten E-Selektin-Nullmutanten auf einer Vielzahl von extrazellulären Matrices in standardisierten Assays. In allen entwickelten Zellkulturmodellen konnte die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass E-Selektin keine obligatorische Rolle bei der

Bildung dreidimensionaler gefäßähnlicher Strukturen *in vitro* spielt. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse, gerade in Bezug auf die Studie von Nguyen und Mitarbeitern (1993) sind unterschiedliche Zellspezies, Organe sowie ein anderer Mechanismus in der „Ausschaltung“ der E-Selektin-Expression (Gerritsen et al., 1996).

Kräling und Mitarbeiter (1996) konnten *in vivo* einen Zusammenhang zwischen der E-Selektin-Expression und der Zellproliferation feststellen. Diese Aussage wurde von Bischoff und Mitarbeitern (1997) für *in vitro* kultivierte Endothelzellen bestätigt.

Luo und Mitarbeiter (1998) berichteten von einer Hochregulierung der E-Selektin-Expression von proliferierenden Endothelzellen durch Angiostatin. Auch VEGF führt zu einer verstärkten Expression von E-Selektin in kultivierten Endothelzellen (Aoki et al., 2001).

Eine lösliche Form von E-Selektin (sE-Selektin) wurde im Blut gesunder Patienten nachgewiesen. Die Konzentration von sE-Selektin ist im Blut von Patienten mit verschiedenen inflammatorischen oder bösartigen Erkrankungen sowie bei Diabetes deutlich erhöht (Albertini et al., 1998). Lösliches E-Selektin könnte demnach als Indikator für aktiviertes Endothel fungieren (Albertini et al., 1998; Gearing und Newman, 1993).

Aufgrund der selektiven Expression des E-Selektin von zytokinaktivierten Endothelzellen ist das E-Selektin-Gen geeignet für den Einsatz in Vektoren im Rahmen eines Endothelzell-spezifischen Gentransfers. *In vitro* konnte eine Endothelzell-spezifische Expression des Transgens, vermittelt durch den E-Selektin-Promotor, nach retro- bzw. adenoviralem Transfer beobachtet werden (Jaggar et al., 1997; Walton et al., 1998).

### 2.3.7.3 Flk-1-Enhancer

Flk-1 gehört zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und vermittelt die VEGF-induzierte angiogene Wirkung (Dougher-Vermazen et al., 1994). Während der embryonalen Entwicklung wird Flk-1 erst von mesodermalen Vorläuferzellen (Kataoka et al., 1997) und dann von Angioblasten und sich differenzierenden Endothelzellen während der Vaskulogenese und Angiogenese exprimiert (Millauer et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993). Eine Inaktivierung des Flk-1 Gens während der embryonalen Entwicklung führt sowohl zu Defekten in der Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems als auch zu unreifen hämatopoetischen Zellen (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997).

Nach Abschluss der Gefäßentwicklung wird die Flk-1-Expression in den meisten Endothelien herunterreguliert. Eine Hochregulierung im Adulten erfolgt nur im Rahmen physiologischer und pathologischer Blutgefäßbildung wie der vaskulären Phase des Tumorwachstums (Ferrara, 1999; Heidenreich et al., 2000; Vajkoczy et al., 2002).

Das murine Flk-1 („fetal liver kinase 1“)-Gen und sein humanes Homolog KDR („kinase insert domain-containing receptor“) wurden geklont (Matthews et al., 1991; Terman et al., 1991) und die transkriptionalen regulatorischen Elemente des Flk-1/KDR-Gens *in vitro* (Patterson et al., 1995; Rönicke et al., 1996) und *in vivo* (Kappel et al., 1999) charakterisiert. In *in vitro*-Studien wurden die Transkriptionsfaktoren Sp1 und HIF-2 $\alpha$  (Hypoxia-inducible Factor 2 $\alpha$ ) als Regulatoren des Flk-1/KDR Promotors identifiziert (Hata et al., 1998; Kappel et al., 1999; Patterson et al., 1997). Elvert et al. (2003) konnten zeigen, dass die endothelial exprimierten Transkriptionsfaktoren HIF-2 $\alpha$  und Ets-1 bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors kooperieren. Weitere, für eine Endothelzell-spezifische Flk-1-Expression in transgenen Mäusen entscheidende Sequenzen wurden im Flk-1-Enhancer, welcher im ersten Intron des Flk-1-Gens lokalisiert ist, identifiziert. Hierbei handelt es sich um Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SCL/Tal-1, GATA und Ets (Kappel et al., 2000).

Für eine Endothelzell-spezifische Reporterexpression *in vivo* ist also diese minimale Sequenz im ersten Intron des Flk-1-Gens (der Flk-1-Enhancer) in Kombination mit dem Promotor ausreichend (Kappel et al., 2000). Diese regulatorischen Sequenzen können *in vitro* und *in vivo* als Marker für die Endothelzellreifung dienen, da sich nur Flk-1-exprimierende Vorläuferzellen, bei denen diese Sequenzen noch nicht aktiv sind, in hämatopoetische Zellen entwickeln können (Hirai et al., 2003).

Aufgrund der spezifischen, Angiogenese-abhängigen Flk-1-Expression in adultem Gewebe, sind die genregulatorischen Sequenzen des Flk-1-Gens besonders zur Zelltyp-spezifischen Expression in Endothelzellen geeignet. Sowohl *in vitro* (Jaggar et al., 1997) als auch *in vivo* (Heidenreich et al., 2000) konnte eine Endothelzell-spezifische Expression des Transgens, vermittelt durch regulatorische Sequenzen des Flk-1-Gens, beobachtet werden.

### **2.3.8 Verwendete Zelltyp-unspezifische, konstitutive, regulatorische Gensequenzen**

#### **2.3.8.1 CMV-Promotor**

Das humane Cytomegalievirus gehört zur Familie der Herpesviren und ist der Erreger der Cytomegalie (Speicheldrüsenviruserkrankung). Der humane CMV-Promotor ist einer der am häufigsten eingesetzten Promotoren in der Genterapie aufgrund seiner starken Enhancerfunktion und seiner relativ geringen Größe von 380 Basenpaaren (Russel, 2000). Ferner ist der CMV-Promotor durch den weitgehend unspezifischen Zelltropismus ubiquitär einsetzbar (Russel, 2000) und ermöglicht so hohe Expressionsraten des Transgenprodukts in vielen Säugerzellen und -geweben.

### **2.3.8.2 HLA-Intron**

HLA-Antigene („human leukocyte antigens“) sind die wichtigsten Histokompatibilitätsantigene des Menschen (Deckwer et al., 1999). Sie kommen auf der Oberfläche von Zellen fast aller Gewebe mit quantitativen Unterschieden vor und spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Abwehrmechanismen. Das HLA-Intron ermöglicht eine konstitutive, Zelltyp-unspezifische Expression des Transgens und führt zu einer Steigerung der Expression unabhängig von verwendeten Promotoren und Enhancern.