

2 Stand der Forschung

2.1 Vasa vasorum

Arterielle Vasa vasorum (Vv) sind kleine, der Ernährung der Arterienwand dienende Mikrogefäße. Vasa vasorum erster Ordnung entspringen direkt aus einer Arterie und verlaufen in deren Längsrichtung; aus ihnen wiederum oder aus kleineren Seitenästen der Arterie entspringen die Vasa vasorum zweiter Ordnung und verlaufen zirkulär zu ihrem Ursprungsgefäß. Da sie nicht über einen Plexus mit anderen Gefäßen verbunden sind, können sie als funktionelle Endarterien bezeichnet werden (Gossel et al. 2003). Gesunde Koronararterien besitzen normalerweise nur ein kleines Netz von Vasa vasorum in der Adventitia und äußeren Media zur Versorgung der äußeren Schichten der Arterienwand mit Sauerstoff und Nährstoffen, ihr Verschluss oder ihre Entfernung führt zur Entstehung arteriosklerotischer Läsionen (Barker et al. 1993). Andererseits kann in arteriosklerotisch veränderten Koronarien ein dichtes Vv-Geflecht beobachtet werden (Barger et al. 1984). Ob diese Neovaskularisation der Plaquebildung vorausgeht oder folgt, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass sie ihr folgt (Kahlon et al. 1992), möglicherweise ausgelöst durch die unter dem Plaque herrschenden hypoxischen Verhältnisse, welche Makrophagen zur Produktion angiogener Faktoren veranlassen (Knighton et al. 1983). Ebenso tritt die Neovaskularisation als Folge einer Gefäßwandverletzung auf. Kwon et al. beobachteten 28 Tage nach PTCA von Schweinekoronarien ein dichtes Gefäßnetz von Vasa vasorum zweiter Ordnung in der Adventitia, das in dieser Form beim unverletzten Gefäß nicht auftrat (Kwon et al. 1998). Da bei dieser Studie nur Tag 28 nach PTCA untersucht wurde, konnte keine Aussage über frühere Zeitpunkte getroffen werden. Pels et al. konnten dieses Zeitfenster mit einem Angioplastiemodell an gesunden Schweinekoronarien schließen: die Mikrogefäßanzahl in der Adventitia war drei und sieben Tage nach Intervention im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgefäßen signifikant erhöht, und war zu späteren Untersuchungszeitpunkten bereits wieder abgesunken. Zeitgleich mit dieser erhöhten Mikrogefäßanzahl war auch der proliferierende Anteil der Endothelzellen erhöht. Da die ab Tag 7 beobachtete Regression der Mikrogefäße zeitlich mit einer Abnahme der LEE-Fläche korrelierte, stellten die Autoren die Hypothese auf, dass die Regression adventitieller

Mikrogefäße ein Schlüsselereignis in der Entwicklung des negativen Remodelings darstellt (Pels et al. 1999).

2.2 Angiogenese und Vascular Endothelial Growth Factor

Angiogenese ist ein komplexer Prozess und bedarf einer Kaskade von Abläufen, die letztlich zur Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen führt. Diese Neuformation von Blutgefäßen findet sowohl unter physiologischen Bedingungen statt, wie z.B. bei der Embryogenese, der Wundheilung oder der Ovulation (Phillips et al. 1990), als auch unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei der Tumor- und Metastasenbildung (Folkman et al. 1971), der rheumatoiden Arthritis (Koch et al. 1994), der Retinopathie oder bei Psoriasis. Zu dieser Kaskade gehören Prozesse wie die kontrollierte Exprimierung proteolytischer Enzyme zur Auflösung der Basalmembranen und Degradation der extrazellulären Matrix, die anschließende Neuorganisation der extrazellulären Matrix, die Endothelzellproliferation und -migration, die Formation eines Endothelrohrs und schließlich die Anordnung von Perizyten/glaten Muskelzellen um das Endothelrohr herum. Endothelzellen sind bei diesen Abläufen beteiligt an der Degradation der extrazellulären Matrix und stellen die Hauptakteure der Endothelrohr-Formation dar (Ausprunk & Folkman 1977).

Eine Reihe von angiogenesefördernden Wachstumsfaktoren sind bisher identifiziert worden. Dazu gehören Angiogenin, transforming growth factor- α (TGF α), transforming growth factor- β (TGF β) und tumor necrosis factor (TNF) (Houck et al. 1991), allerdings kann keiner dieser Faktoren direkt die Endothelzellproliferation induzieren. Basic und acidic fibroblast growth factor (bFGF bzw. aFGF) und platelet derived growth factor (PDGF) sind dazu zwar in der Lage, zumindest *in vitro*, doch ist ihre Wirkung nicht beschränkt auf Endothelzellen, sondern diese Faktoren wirken auf eine ganze Reihe von Zelltypen (Tischer et al. 1991) und sind von Gegebenheiten abhängig, die mit Zelltod oder -verletzung einhergehen, da sie aufgrund ihres Mangels an einer hydrophoben Signalsequenz nicht von den Zellen sezerniert werden können (Houck et al. 1991). Es ist jedoch anzunehmen, dass physiologische Angiogenese von Wachstumsfaktoren geregelt wird, die von der intakten Zelle sezerniert werden (Ferrara et al. 1991).

1971 wurde erstmals von Folkman et al. ein Faktor aus Tumorgewebe isoliert, den sie für die

Angiogenese in Tumoren verantwortlich hielten (Folkman et al. 1971), und 1983 beschrieben Senger et al. diesen Faktor als vascular permeability factor (VPF) (Senger et al. 1983). 1989 wurde dieser Faktor von Keck et al. und im selben Jahr auch von Leung et al. als endothelspezifischer Angiogenesefaktor identifiziert und in vascular endothelial growth factor (VEGF) umbenannt (Keck et al. 1989) (Leung et al. 1989). Zur VEGF-Familie gehören neben VEGF-A auch VEGF-B, -C, -D und -E sowie der placenta derived growth factor (PlGF). VEGF-A ist ein dimeres Glycopeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 46 kDa, dessen Monomere über Disulfidbrücken zwischen Cystein 51 des einen, und Cystein 60 des anderen Monomers in „Kopf-Schwanz“-Anordnung miteinander verknüpft sind. Bislang sind 5 Isoforme identifiziert worden, die durch posttranskriptionelles alternatives Exon-Spleißen entstehen und nach der Länge der resultierenden Aminosäureketten benannt werden. Alle Isoforme besitzen ein Signalpeptid, um die Sezernierung von intakten Zellen zu ermöglichen. Trotz dieses Signalpeptids können nur die kürzeren Formen wie VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ effizient von der Zelle exportiert werden, während die längeren Formen VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ primär zellgebunden vorliegen (Houck et al. 1991). Die kürzeren Formen haben daher ein hohes angiogenetisches Potential, die längeren Formen ein niedrigeres angiogenetisches Potential. Mit Ausnahme von VEGF₁₂₁ können alle Isoforme Heparin oder das zellgebundene Proteoglykan Heparinsulfat binden, was daran liegt, dass die Heparinbindungsstelle aus den Exons 6a, 6b und 7 besteht, und VEGF₁₂₁ keines der drei Exons besitzt. Die häufigste Form ist VEGF₁₆₅, am seltensten kommt VEGF₂₀₆ vor. VEGF wird von einer ganzen Reihe von Zellen produziert, unter ihnen Endothelzellen, Myofibroblasten, neutrophile Granulozyten, T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Aus *in vitro*-Versuchen mit Monozyten weiß man auch, dass die Regulation dieses Wachstumsfaktors von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappaB (NFκB) abhängt (Kiriakidis et al. 2003). Dies ist auch ein typischer Signalweg für Interleukine (IL-1/-6/-8), Matrixmetalloproteinasen (MMP-2/-9), und Adhäsionsmoleküle wie vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). NFκB selbst wird wiederum durch ein Vielzahl von Faktoren aktiviert, unter anderem durch IL-1, tumor necrosis factor α (TNF α), Lektine, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), physikalische Noxen wie Ultraviolett- oder γ -Strahlung, Hitze oder Kälte, außerdem noch vom Komplementsystem, durch Hypoxie, oxidiertes Low-density-Lipoprotein (ox-LDL) und Schwermetalle (De Martin et al. 2000).

VEGF entfaltet seine Wirkung über drei verschiedene Transmembranrezeptoren, von denen jeder eine unterschiedlich hohe Affinität zu den verschiedenen VEGF-Subtypen hat. Nach Bindung ihres Liganden dimerisieren diese Rezeptoren (es können Homo- und auch Heterodimere entstehen), dadurch wird die Aktivität der rezeptoreigenen Tyrosinkinase gesteigert, und diese wiederum löst durch Phosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste die eigentliche Signalkaskade aus. Der VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2, KDR oder auch flk-1) hat eine hohe Affinität zu VEGF-A und kommt auf Endothelzellen der Blut- und Lymphgefäße, auf hämatopoetischen Stammzellen und auf Megakaryozyten vor. Ihm wird die wichtigste Rolle bei der

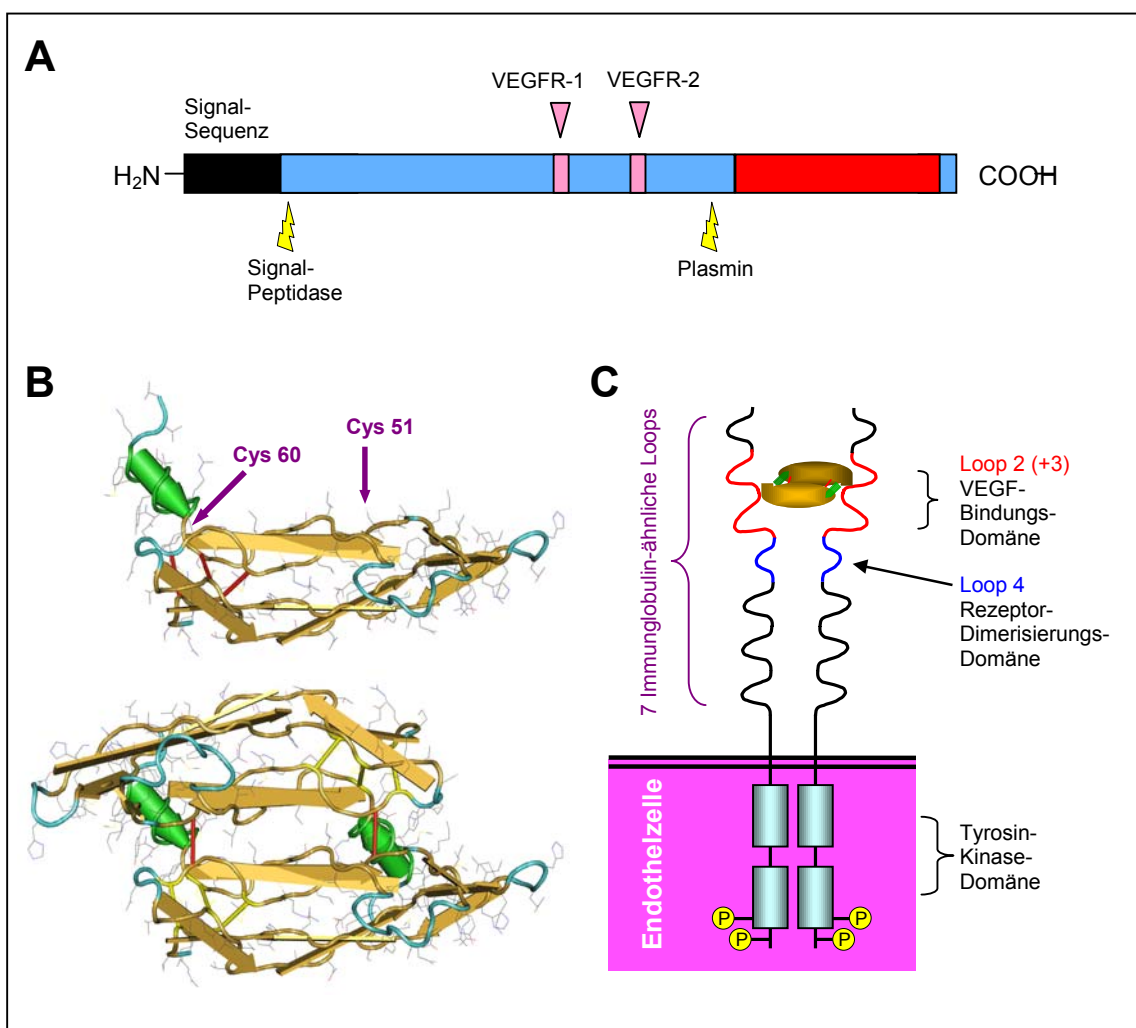


Abb. 3: VEGF. A) Struktur von VEGF₁₆₅ (ohne die Exons 6a und 6b), Exon 7 (rot) ist für die Bindung an Heparinsulfat notwendig. B) oben: VEGF-Monomer, die intramolekularen Disulfidbrücken sind rot markiert, Pfeile zeigen die Position der für die Dimerisierung verantwortlichen Cystein-Reste; unten: VEGF-Dimer, über intermolekulare Disulfidbrücken (rot) in „Kopf-Schwanz“-Orientierung verknüpft. C) Dimer eines aktivierten (phosphorylierten) VEGFR-1. Von den sieben Immunglobulin-ähnlichen Loops ist Loop 2 (unter Mitwirkung von Loop 3) für die Bindung des VEGF-Dimers zuständig. Loop 4 als Dimerisierungs-Domäne stabilisiert das Rezeptor-Dimer.

Gefäßentwicklung zugesprochen. Embryonen von VEGFR-2-knockout-Mäusen sterben an einer Entwicklungsstörung endothelialer und hämatopoetischer Vorläuferzellen (Shalaby et al. 1995). VEGFR-2 wird als Hauptmediator der Endothelproliferation, -migration und -permeabilität angesehen, und auch die Aktivierung der antiapoptotischen Serin-Threonin-Proteinkinase Akt scheint über diesen Rezeptor vermittelt zu sein (Gerber et al. 1998b). Der VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1 oder flt-1) hat auch eine hohe Affinität zu VEGF-A und kommt ebenfalls auf Endothelzellen der Blutgefäße, auf hämatopoetischen Stammzellen und auf Monozyten/Makrophagen vor. Da er überwiegend auf quieszenten Endothelzellen anzutreffen ist, wird er für die Aufrechterhaltung der Gefäße verantwortlich gemacht. Versuche mit dem VEGFR-1-Liganden PIGF deuten außerdem darauf hin, dass VEGFR-1 mehr an der Arteriogenese beteiligt ist als VEGFR-2 (Pipp et al. 2003). Embryonen von VEGFR-1-deletierten Mäusen sterben an übermäßigem, gefäßverlegendem Endothelzellwachstum (Fong et al. 1995), was dazu geführt hat, dass VEGFR-1 als Negativregulator der Gefäßentwicklung angesehen wird. Von ihm existiert auch eine lösliche Form (sVEGFR-1), der der transmembrane und intrazelluläre Teil fehlt, und man vermutet, dass diese Form dazu dient, überschüssiges VEGF abzufangen, damit es nicht an funktionelle VEGF-Rezeptoren binden kann. Neben der angiogenen Aktivität mit Steigerung der endothelialen Proliferation, Migration und Permeabilität hat VEGF jedoch auch vaskuloprotektive Eigenschaften: VEGF reduziert die Neointimabildung nach Stentimplantation in peripheren Arterien und hat dadurch einen positiven Effekt auf das resultierende Lumen (Van Belle et al. 1997), und neu gebildete Gefäße werden durch den antiapoptotischen Effekt von VEGF auf Endothelzellen vor der Regression geschützt (Alon et al. 1995), möglicherweise über eine Expressionssteigerung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Gerber et al. 1998a). Auch ein indirekt antithrombotischer Effekt wurde beschrieben (Van Belle et al. 1997), der vermutlich dadurch zustande kommt, dass die Endothelialisierung einer verletzten Gefäßwand durch VEGF beschleunigt und dadurch ihre Thrombogenität reduziert wird.

2.3 Lokale Gentherapie

Wann immer möglich und sinnvoll, sollten Medikamente eher lokal als systemisch verabreicht werden, da man so sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen am Zielort erhält und Nebenwirkungen von eventuell toxischen Substanzen reduziert werden können (Lehmann et al.

2000). Die systemische Applikation von angiogenen Faktoren ist mit ganz besonders hohen Risiken behaftet, da Erkrankungen, die mit Angiogenese einhergehen (wie z.B. Tumorerkrankungen oder Retinopathie) und zum Zeitpunkt der Applikation bereits bestehen, evtl. auch unerkannt, verschlimmert werden können (Epstein et al. 2001). Diese schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen zwar im Tiermodell kaum zum Tragen, klinisch relevante Blutdruckabfälle konnten jedoch bei systemischer Applikation von VEGF beobachtet werden (Hariawala et al. 1996). Daher ist bei induzierter therapeutischer Angiogenese eine lokale Applikation, bei der die angiogenen Faktoren direkt an ihren Zielort verbracht werden, der systemischen Anwendung vorzuziehen.

Die Verwendung von Proteinen in der Therapie verschiedener Krankheiten hat sowohl Vor- als auch Nachteile. Ein Vorteil liegt in der besseren Steuerbarkeit der Dosis und somit in der leichteren Dosisfindung zur Bestimmung des therapeutischen Fensters zwischen Effizienz und Toxizität. Ein entscheidender Nachteil liegt jedoch in der Notwendigkeit mehrmaliger Gaben zur Erhaltung ausreichender Substanzkonzentrationen. Mehrmalige lokale Verabreichung mag in manchen Fällen leicht gelingen, beispielsweise bei Anwendung auf der Haut, ist jedoch absolut impraktikabel bei allen Organsystemen, die schlechter zugänglich sind. Der Gentransfer hat den Vorteil, dass das Protein über längere Zeit (transient) oder sogar dauerhaft (stabil) von der Zielzelle exprimiert wird (je nach Vektor), und daher eine einmalige Gabe ausreicht. Allerdings gestaltet sich die Dosisfindung schwierig und muss aus empirischen Studien hergeleitet werden. Entscheidenden Einfluss auf die Transfereffizienz haben die gewählten Transfervehikel: virale Vektoren oder nicht-virale Vektoren (wie z.B. Plasmidkonstrukte). Virale Vektoren haben sich in der Vergangenheit zwar durch ihre hohe Transfereffizienz ausgezeichnet, provozieren jedoch entweder eine inflammatorische Immunantwort durch ihre Gewebstoxizität (Adenovirus und Adenovirus-associated Virus (AAV)), integrieren sich nur in sich teilende Zellen (Retrovirus), oder stehen im Verdacht, mutagene Nebenwirkungen zu haben (Retrovirus und Lentivirus) (Verma & Somia 1997). Manche Viren (Lentivirus und AAV) führen auch zu dauerhafter Genexpression, die nicht bei jeder Therapie erwünscht ist. Der Umgang mit Viren ist außerdem nicht ungefährlich und darf nur unter Einhaltung strenger Sicherheitsvorschriften erfolgen. Sicherer, wenn auch weniger effizient, sind die nicht-viralen Vektoren, unter ihnen im wesentlichen die chemischen Transfektionsmethoden wie Lipid- oder Dendrimer-Plasmid-Formulierungen (Felgner et al. 1987; Haensler & Szoka, Jr. 1993), oder die

biologischen, rezeptorvermittelten Transfektionsmethoden, die die Möglichkeit eines Zielzell-spezifischen Gentransfers bieten (Wu & Wu 1988; Zenke et al. 1990).

Im Falle eines Gentransfers mit VEGF ist eine geringe Transfereffizienz jedoch kein Nachteil, da bereits geringe lokale VEGF-Konzentrationen eine hohe biologische Wirksamkeit besitzen (Isner et al. 1995).

Laitinen et al. zeigten, dass VEGF-DNA auch bei ganz geringer Transfereffizienz mittels Plasmid/Liposomen-Komplex (ca. 0.05 % der Zellen) Angiogenese zu induzieren vermag (Laitinen et al. 1997a).