

M. Heikenwälder, Institut für Neuropathologie, Universitätsspital Zürich (USZ)

Gentherapie zur Beschleunigung der Wundheilung und der Regeneration von Gewebe: eine Applikation mit Zukunft?

Einleitung

Regeneration und Reparatur von Gewebe sind die natürliche, hoch organisierte, biologische Antwort des Organismus auf Verletzungen verschiedenster Art. Während des reparativen Heilungsprozesses, der als sequenzielles Geschehen charakterisiert ist, entstehen fundamentale Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellstruktur, der Expression von Wachstumsfaktoren und Cytokinen sowie der Organisation der extrazellulären Matrix (ECM). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen dominieren dabei die Entzündungsphase. Dann wandern Fibroblasten und andere gleichwertige Zellen mit reparativer Funktion in die verwundeten Areale ein, wo diese zur Proliferation und damit zur Bildung von Granulationsgewebe angeregt werden. Die Steuerung dieser Abläufe und zellulären Interaktionen erfolgt durch Botenstoffe (Mediatoren) wie Wachstumsfaktoren und Cytokine, die von den verschiedensten Zelltypen selbst produziert werden. So stimuliert beispielsweise der transforming growth factor-beta (TGF- β), der u. a. von Thrombozyten und Makrophagen produziert wird, Fibroblasten und Muskelzellen der glatten Muskulatur zur Proliferation und zur Synthese von Proteinen der ECM. Dabei geht man heute davon aus, dass die ECM nicht nur als gewebespezifische Füllsubstanz zwischen Einzelzellen, Geweben und Organen dient, sondern auch vielfältige Aufgaben im Rahmen der Informationsübermittlung zwischen den in sie eingebetteten Zellen erfüllt.

Dieser erste Reparaturprozess ist normalerweise gefolgt von der zunehmenden Um- und Rückbildung (Involution) des Granulationsgewebes zu Narbengewebe, was die Produktion und Aktivierung von Proteasen benötigt, und schließlich der Ausreifung (Maturation) und Restrukturierung des neuen Gewebes.

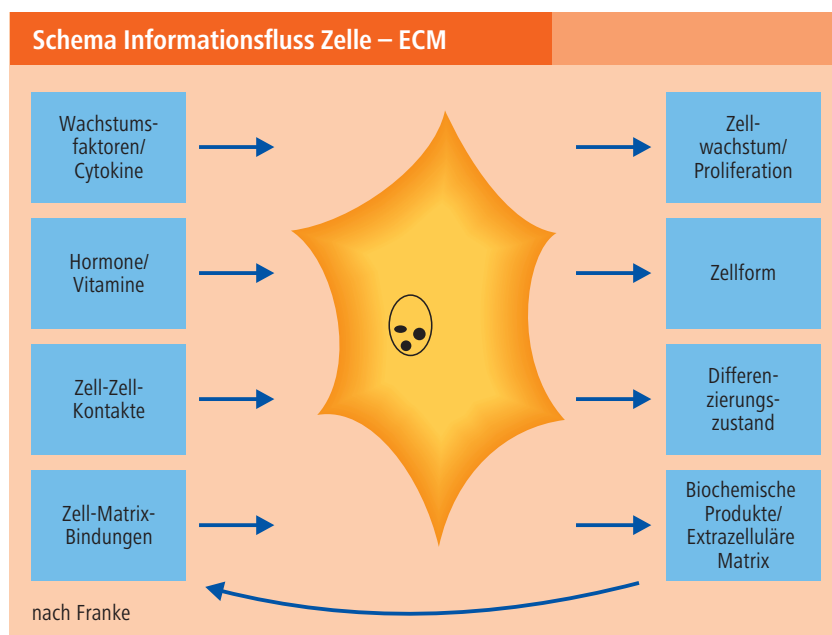
Trotz vieler Forschungsansätze, wobei vor allem die Rolle von Wachstumsfaktoren in der Reparatur von verletztem Gewebe untersucht wurde, ist es bis heute nicht gelungen, die Abläufe der physiologischen Wundheilung zeitlich zu beschleunigen bzw. über die Kontrolle potenzieller Störungen die Qualität der Gewebereparatur zu verbessern. Beispielsweise resultiert das fehlerhafte Ersetzen essenzieller Komponenten des

ECM, wie z. B. des Elastin und der Basalmembran, in einer abnormen Regeneration des Epithels. Obwohl während des „normalen“ Heilungsprozesses eine Neustrukturierung des Gewebes passieren sollte, kann es aus unterschiedlichen Gründen nach provisorischer Reparatur zu einer starken Synthese und Ablagerung von Kollagen kommen. Dieser Vorgang resultiert in einer irreversiblen Fibrose und Wucherung von Narben. Eine starke Fibrose im Zuge eines anormalen Heilungsprozesses kann aber auch Folge einer fortdauernden Synthese von Wachstumsfaktoren, z. B. TGF- β , sein.

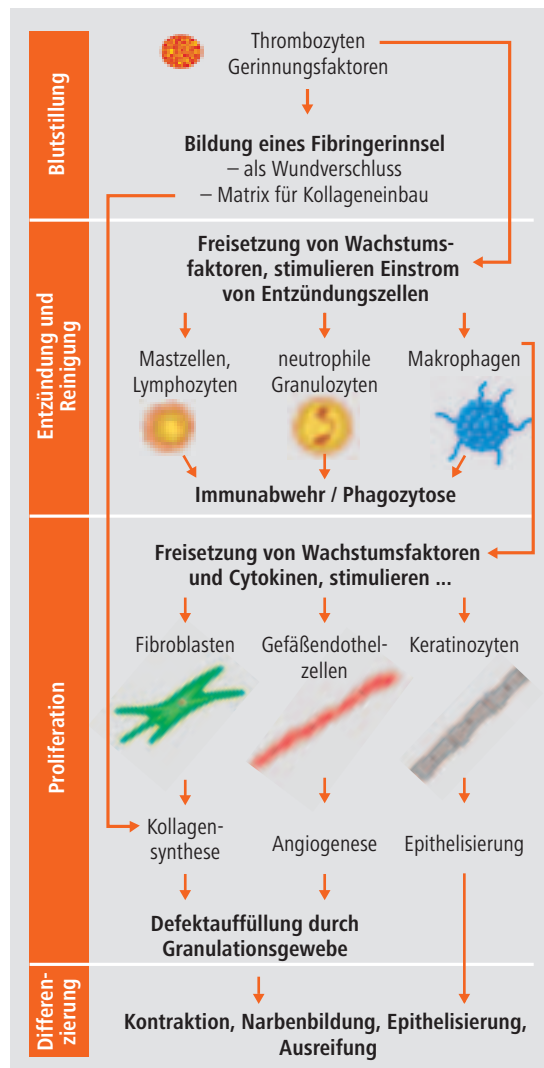
Da auch Kollagen während der Wundheilung eine zentrale Rolle spielt, ist jedoch nicht nur die Kontrolle der Expression von Wachstumsfaktoren und Cytokinen wichtig, sondern auch die pharmakologische Kontrolle der Synthese von Kollagen, um anormale Heilungsprozesse und irreversible Fibrose zu verhindern.

Gentherapie zur Beschleunigung der Reparatur von Gewebe

Der rasante Fortschritt in der Molekularbiologie und Genetik ermöglicht es mittlerweile, Techniken mit teilweise großer Effizienz anzuwenden, um Proteine wie z. B. Wachstumsfaktoren mithilfe von Vektoren gezielt



Schema der physiologischen reparativen Wundheilung: Im Idealfall wird in einer Wunde über verschiedene voneinander abhängige Prozesse wie Blutgerinnung, Entzündung und Abbau devitalisierten Gewebes, Gefäßneubildung, Aufbau von Granulationsgewebe, Epithelisierung und Ausreifung das fehlende Gewebe durch ein funktionelles Narbengewebe ersetzt. Damit die Wundheilungskaskade regulär ablaufen kann, ist das chronologisch korrekte Auftreten der beteiligten Zellen und der für die zellulären Interaktionen erforderlichen Mediatoren wie Wachstumsfaktoren und Cytokine Voraussetzung. Kommt es zur Störung nur eines Teilschrittes, kann dies die gesamte Wundheilung beeinflussen.



in somatischen Zellen zu synthetisieren. Gentherapie wird heute definiert als Transfer genetischen Materials mithilfe eines Vektors in eine Zielzelle oder ein Zielgewebe. Dies führt zur Expression und Proteinsynthese des transferierten Gens und zu einer genetischen Veränderung in der Zielzelle.

Im Zusammenhang mit der Wundheilung ist es ein Hauptziel der Forschung, therapeutische Substanzen (z. B. Wachstumsfaktoren und Cytokine) gezielt an die Stelle der Verletzung zu platzieren. Das Syntheseniveau des eingeführten Genproduktes (Proteins) sollte auf der einen Seite den therapeutischen Effekt ermöglichen, auf der anderen Seite sollten das neu eingeführte Gen und dessen Proteinsynthese jedoch so dosiert sein, dass mögliche toxische Nebeneffekte nicht auftreten können.

In den letzten Jahren wurde vor allem die Verwendung von Wachstumsfaktoren in der Gentherapie untersucht. Wachstumsfaktoren regulieren die Proliferation und Migration von Zellen und tragen zur Akkumulation von Komponenten der ECM bei. In Zukunft soll mithilfe gewebsspezifischer Promotoren eine spezifische Expression der Genprodukte in den gewünschten Zielzellen oder dem Zielgewebe erreicht werden.

Zur Beschleunigung der Wundheilung und der Regeneration von Gewebe wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Modelle untersucht, um die Effekte der Gentherapie in vitro und in vivo zu evaluieren. Dabei wurden vor allem Liposomen oder modifizierte Adenoviren als Vektoren zum Einschleusen der cDNS (codierende Desoxyribonukleinsäure) des gewünschten Gens in die Zielzelle oder das Zielgewebe verwendet. Unter anderem wurden Liposomen des „hemagglutinating Virus of Japan“ (HVJ-Liposom) als Vektoren appliziert: Liposomen, welche die cDNS des platelet derived growth factors- β (PDGF- β) enthielten, wurden direkt auf das verletzte Ligament einer Ratte injiziert („medial collateral ligament injury“-Mausmodell). Dies resultierte in einer erhöhten Ablagerung von Kollagen und vermehrter Angiogenese (Nakamura et al., 1998).

Mäuse, welche defizient für Plasminogen sind, zeigen keine Wundheilung und eine fehlende arterielle Neointimaprolieration nach arterieller Verletzung. Aus diesem Grund können diese Mäuse als ideales in vivo-Modell für spezifische Fragestellungen der Wundheilung und Geweberegeneration verwendet werden. Intravenöse Injektion eines Adenovirus, der den menschlichen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) codierte, produzierte einen Anstieg an Plasma PAI-1-Protein und eine starke Verminderung der luminalen Stenose (Carmeliet et al., 1997).

Weitere Erfolge mit der Technik des adenoviralen Gentransfers, wobei hier das Virus über rezeptorvermittelte Endocytose von der Zielzelle aufgenommen wird, konnten mit TGF- β sowohl in vitro in Osteoblasten als auch in vivo in Knochengewebe erzielt werden (Mehara et al., 1999). Direkter Gentransfer eines TGF- β -Transgens in das Knochengewebe resultierte in signifikanten Veränderungen der Epiphysenplatte. Zusätzlich konnte die Technik des adenoviralen Gentransfers auch für das Heilen chronischer Wunden verwendet werden (Liechty et al., 1999).

In einer weiteren Arbeit wurde dokumentiert, dass die Kollagenmatrix nicht nur den PDGF- β codierenden Adenovirus, sondern auch das PDGF- β -Genprodukt an der gewünschten Zielstelle enthielt. Als Folge dessen wurde die Transduktion und Infiltration von reparativen Zellen ermöglicht (Doukas et al., 2001).

Adenovirale Vektoren können auch erfolgreich in einen synthetischen Kalzium-Phosphat-Mineralknochen-Ersatz inkorporiert werden und ermöglichen somit den effektiven und gezielten Gentransfer in diesem Modell (Kirschner et al., 2001). Ischämische Exzisionswunden, die mit einem Adenovirus behandelt wurden, der das PDGF- β -Gen enthielt, heilten schneller als ischämische Exzisionswunden, die mit einem Vektor ohne Genprodukt behandelt wurden. Jedoch können Applikationen mit einem Adenovirus auch Nebeneffekte zeigen, wie z. B. akute Entzündungen. Deshalb wird das Augen-

merk besonders darauf gelegt, dass die Vektorsysteme in der Art modifiziert werden, dass Nebeneffekte durch den Vektor selbst nicht entstehen können oder minimiert werden.

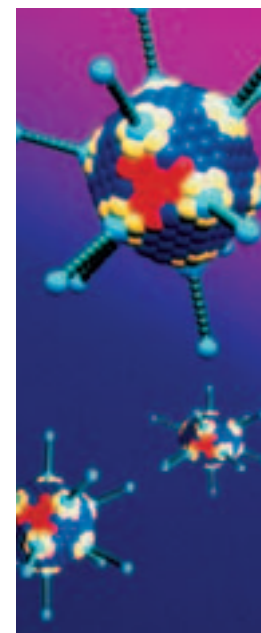
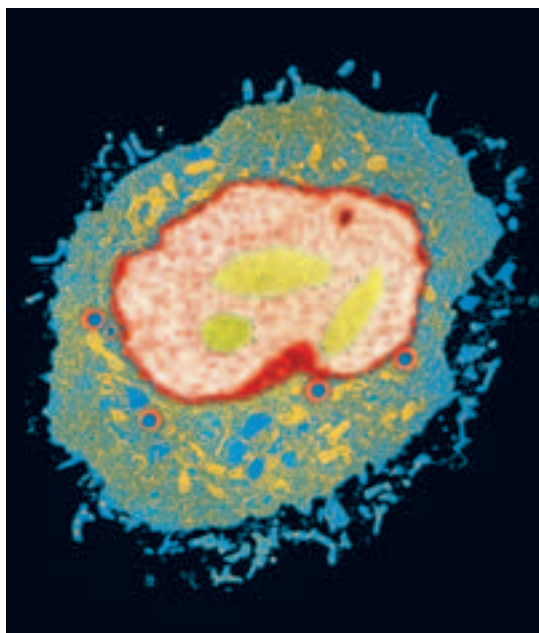
Der Erfolg der Gentherapie zur Beschleunigung der normalen Wundheilung hängt von der Synthesestärke des gewünschten Gens und dessen Expression auf Proteinniveau an der Zielstelle ab. Vor allem bei Wachstumsfaktoren können unterschiedliche Proteinkonzentrationen auch unterschiedliche Effekte haben. Eine Überexpression von TGF- β kann z. B. zu einer starken Akkumulation von Komponenten der ECM führen, was einen fehlerhaften Heilungsprozess zur Folge hat. Deshalb ist es auch ein Hauptziel der Zukunft, das Proteinniveau der verschiedenen Wachstumsfaktoren, die unter Regulation von gewebespezifischen Promotoren stehen, genau zu untersuchen. Denn nicht nur die Stärke der Synthese des gewünschten Proteins, sondern auch die Stabilität des Proteins in dem zu untersuchenden Gewebe beeinflusst die endgültige Proteinkonzentration. Aus diesem Grund haben die meisten Studien bisher einmalige Behandlungen mit Adenoviren oder Liposomen verwendet. Was würde jedoch passieren, wenn Liposomen oder Adenoviren, die für die cDNS eines bestimmten Gens codieren, wiederholt appliziert werden? Würde diese Art der Behandlung positive Effekte auf die Regeneration und Heilung von Gewebe haben oder würden toxische Nebeneffekte entstehen?

Antisense-Therapie

Eine zusätzliche Möglichkeit, die Expression eines Proteins zu kontrollieren, ist die Antisense-Therapie. Die Antisense-Therapie basiert auf der Grundlage der selektiven Unterdrückung der Proteinsynthese im Cytoplasma einer Zelle. Hierbei wird unter Verwendung einer spezifischen Antisense-Oligodesoxynukleotid-Sequenz (ODN) die Proteinsynthese blockiert. Dieser meist relativ kurze Antisense-ODN-Strang entspricht der komplementären, nicht codierenden Sequenz des respektiven Zielgens.

Das Umschreiben eines Gens in ein Protein passiert in einer Folge hoch organisierter, fein aufeinander abgestimmter Prozesse. Nachdem ein Gen im Kern einer eukaryontischen Zelle von der DNS in mRNA (messenger Ribonukleinsäure) umgeschrieben (Transkription) und modifiziert wird (post-transkriptionale Modifikation), wird die mRNA aus dem Zellkern transportiert. Im Cytoplasma der Zelle wird die mRNA durch das Ribosom, die „Proteinfabrik“ der Zelle, in ein Protein umgeschrieben (Translation; siehe auch Abbildung Seite 18, linker Abschnitt).

Hybridisiert ein kleiner Antisense-ODN-Strang eines Gens mit der modifizierten mRNA (messenger RNA) des Zielgens (annealing), bevor das Ribosom die mRNA translatiert, kann das Ribosom die mRNA nicht mehr in



ein Protein umschreiben, und die Proteinsynthese des Zielgens wird somit blockiert (siehe auch Abbildung Seite 18, rechter Abschnitt).

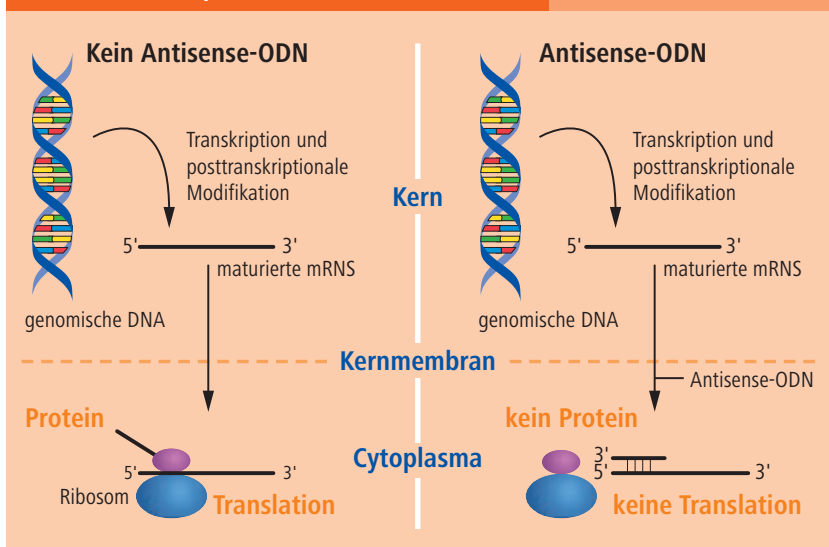
Die therapeutische Applikation der Antisense-Technologie brachte Fortschritte in der Medizin und der Grundlagenforschung. Jedoch gibt es bei so einer Behandlungsmethode viele Variablen, welche die Wirkung dieser Technik stark beeinflussen können:

- Die Stabilität des Antisense-ODN-Moleküls in der Zielzelle,
- die Effizienz, mit welcher das Antisense-ODN-Molekül von der Zielzelle aufgenommen wird,
- der Grad der Spezifität, mit welcher die mRNA des Zielgens durch den Antisense-ODN-Strang erkannt wird,
- mögliche toxische Effekte des Antisense-ODN-Moleküls für die Zielzelle,
- die Länge oder die dreidimensionale Struktur des Antisense-ODN-Moleküls und
- die Dauer der Behandlung mit dem Antisense-ODN-Molekül. Antisense-ODN-Moleküle könnten in Liposomen, in Matrices oder in Gele inkorporiert werden, um den Transport und die Freisetzung über einen verlängerten Zeitraum in die Zielzelle zu gewährleisten.

Es wurden unterschiedliche Modelle verwendet, um die Effekte der Antisense-Therapie zu überprüfen. Um Verletzungen eines Ligamentgewebes („rabbit medial collateral ligament injury“-Mausmodell) zu behandeln, wurden fluoreszierende HVJ-Liposomen verwendet und diese entweder direkt oder in die Arteria femoralis (Nakamura et al., 1998b) injiziert. Es stellte sich heraus, dass diskontinuierliche systematische, direkte Injektion die effizienteste Art der Applikation war. Zum Beispiel wurde diese Art von Technik dazu angewandt, Antisense-ODN-Moleküle des Decorin-Proteins der Ratte

Von den Adenoviren sind zurzeit über 30 Serotypen beim Menschen differenzierbar. Sie sind u. a. Erreger von Krankheiten der Atemwege. Mithilfe bestimmter Serotypen können aber auch Gene in Gastzellen eingeschleust werden, weshalb Adenoviren in der Gentherapie als potenzielle Vektoren genutzt werden. Die Abbildungen zeigen: links eine von Adenoviren infizierte Zelle (die roten Punkte im Zellkern, eingefasst durch eine rote Linie, sind von der Zelle neu produzierte Viren); Vergrößerung x2000 auf 6x6 cm; rechts Computergraphik von Adenoviren.

Antisense-Therapie



Blockierung der Translation eines spezifischen Genproduktes nach Antisense-ODN Behandlung.

in Narben des Ligamentgewebes zu applizieren, was zu einer Reduktion der Expression des Decorin-Proteins im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

Während in einer anderen Studie die Reduktion des Decorin-Proteins mittels Antisense-ODN-Moleküls gezeigt werden konnte, konnte jedoch auch gezeigt werden, dass das Expressionsniveau anderer Gene verändert wurde. Das lässt den Schluss zu, dass die Verbesserungen des vernarbten Ligamentgewebes nicht unbedingt direkt auf die Reduktion des Decorin Proteins zurückzuführen sind und dass in gegebenen Fällen auch die Genexpression anderer Gene der Zielzelle beeinflusst werden kann (Hart et al., 2000). Die Behandlung von menschlichen Nabelschnur-Endothelzellen („umbilical vein endothelial cells“) mit Antisense-ODN-Molekülen der Nitric-Oxid-Synthetase zeigte die Wichtigkeit dieses Enzyms in der durch Endothelin induzierten Migration von Endothelzellen (Noir et al., 1997).

Thrombospondin 1 ist ein Glycoprotein, das an der Reparatur und Regeneration des Gewebes beteiligt ist. Wunden, die mit Antisense-ODN-Molekülen des Thrombospondin 1-Gens behandelt wurden, zeigten eine starke Reduktion der Thrombospondin 1-positiven Makrophagen im Zielgewebe. Durch die verminderte Rate der Reepithelialisierung und dermalen Reorganisation konnte eine Verzögerung der Wundheilung gezeigt werden (DiPietro et al., 1996).

Mithilfe der Antisense-Technik konnte auch dokumentiert werden, dass die Proteinkinase C α eine Schlüsselfunktion bei der Regeneration des cornealen Gewebes hat (Chandrasekher et al., 1998). Gezielte Reduktion der Expression von TGF- β mRNA durch Antisense-Therapie in Wunden der Haut im Mausmodell resultierten in einer Verminderung der Fibrose (Choi et al., 1996). C-myc Antisense-ODN-Behandlung reduzierte die Formation der Neointima (Mannion et al.,

1998). Eine einzelne Injektion mit Antisense-ODN des platelet-derived growth factor receptor-B (PDGFR-B) in das Gefäßlumen der verletzten Halsschlagader bei Ratten reduzierte die intimale Hyperplasie, verbesserte den Prozess der Reendothelialisierung und führte zu einer Wiederherstellung des vaskulären Tonus, dessen Regulation vom Endothel abhängig ist (Noiseux et al., 2000).

Zusammenfassung

Die Fortschritte in der Molekularbiologie, Genetik und Biochemie machen es heute zum Teil möglich, Wachstumsfaktoren spezifisch zu synthetisieren und somit den Reparatur- und Heilungsprozess des Gewebes zu beschleunigen. Ziel der Gentherapie mit Wachstumsfaktoren ist es, die Proteinsynthese des Zielgens so zu dosieren, dass das jeweilig synthetisierte Protein effektiv zur Beschleunigung der Wundheilung beiträgt, jedoch nicht toxisch auf das umliegende Gewebe wirkt.

Genau in diesem Punkt liegt auch nach heutigem Wissensstand der größte Nachteil dieser Therapie: Da bei Einführung von Genen die genaue Stelle der Integration der cDNS im Genom der Zielzelle nicht bekannt ist, ist dieser Prozess zufällig und nicht reproduzierbar. Es kann daher in den meisten Fällen nicht gesagt werden, mit welcher Stärke das gewünschte Genprodukt schlussendlich im Zielgewebe expremiert wird. Jedoch gibt es heute unterschiedliche Möglichkeiten, ein Transgen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit an einem Ort des Genoms integrieren zu lassen.

Eine Möglichkeit der Gentherapie ist auch der Gebrauch von Antisense-Molekülen. Diese hybridisieren an das 5'-Ende einer mRNS und führen zur Arretierung der Translation. Diese Methode konnte auch verwendet werden, um Gene und deren codierte Proteine zu entdecken, die in die Wundheilung involviert sind. Jedoch unterliegt diese Technik einigen Variablen, die kurz aufgelistet wurden.

Da Kollagen eine Schlüsselrolle in der reaktiven Fibrosierung spielt, könnte eine Therapie mit Antisense-ODN-Molekülen mehrere Applikationen haben, um anormale Regeneration von Gewebe zu regulieren.

Versuche im Tiermodell werden in naher Zukunft zeigen, wie optimierbar und effizient die Methoden der Gentherapie sind. Es scheint auf jeden Fall nicht mehr utopisch, molekular-biologische Prozesse am Ort einer Verletzung durch Gentransfer so zu beeinflussen, dass die Regeneration von Narben ermöglicht bzw. die Wundheilung von verletztem Gewebe beschleunigt wird. Zusätzlich werden Forschungsergebnisse in der Zukunft jedoch auch zeigen müssen, in welchem Maße positive Ergebnisse des Tiermodells auf den Menschen übertragbar sind und ob es möglich ist, Therapieformen mit breitem Anwendungsspektrum und geringen Nebeneffekten für den Patienten zu entwickeln. ■

Mag. Mathias Heikenwälder,
Molekularbiologe,
Universitätsspital Zürich
(USZ), Institut für
Neuropathologie,
Schmelzbergstraße 12,
CH-8091 Zürich

Literatur im Internet unter
www.hartmann.info