

## Therapeutische Angiogenese

*Das folgende Handout fasst die wesentlichen Punkte des Pro-Scientia-Vortrages vom 05.05.15 für fachfremde Stipendiaten einfach zusammen und soll bei Interesse zum weiteren Verständnis beitragen - stellt aber keine wissenschaftliche Arbeit dar. Auf ein in der angiologischen Forschung etabliertes Versuchsmodell wurde am Ende in Hinblick auf den diesjährigen Pro-Scientia-Schwerpunkt „Modelle“ beispielhaft eingegangen.*

### 1. Was ist Angiogenese?

Unter Angiogenese versteht man das Aussprossen neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen. Davon abzugrenzen ist die Vaskulogenese, welche die Neubildung von Gefäßen aus sog. endothelialen Vorläuferzellen (Stammzellen) umfasst und mit Ausnahmen hauptsächlich in der embryologischen Entwicklung stattfindet.

### 2. Wie entsteht Angiogenese?

Unser Körper kann Gefäßwachstum über verschiedene Signalwege induzieren. Typischerweise bindet und aktiviert ein sog. angiogenetischer Faktor – ein extrazelluläres Protein oder Peptid – einen Rezeptor, der sich an der Zellmembran befindet. Der aktivierte Rezeptor leitet das Signal dann von der Membran über Sekundärbotenstoffe (Second Messenger) ins Zytoplasma und schließlich in den Zellkern weiter, wo auf Gen-Ebene entsprechende Gene hochreguliert werden, die Gefäßwachstum induzieren. Als Ausnahme zu diesem Modell gibt es auch einen Signalweg, der im Zusammenspiel mit anderen angiogenetischen Faktoren über das gewebelösliche Stickstoffmonoxid (NO) führt. Hemmung von NO führt zu einer deutlichen Abschwächung der angiogenetischen Effekte.[1]

Einige dieser angiogenetischen Faktoren sind beispielsweise acidic Fibroblast Growth Factor (FGF-1), basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Neben diesen altbekannten angiogenetischen Faktoren gibt es auch neuere entdeckte Peptide wie Sekretoneurin und Cathepsin, die ebenfalls potente Angiogenese-Induktoren sind und zu deren Erforschung die Innsbrucker Forschungsgruppe um Prof. Rudolf Kirchmair (Innere Medizin III - Kardiologie und Angiologie) bedeutend beigetragen hat.[2],[3]

### 3. Kann man Angiogenese beeinflussen?

Angiogenese lässt sich durch unterschiedliche Wege sowohl hemmen als auch fördern.

### **3.1 Angiogenese-Hemmung**

Eine Hemmung macht beispielsweise dann Sinn, wenn man das Wachstum eines Tumors verlangsamen möchte. Solide Tumore können nämlich nur dann eine gewisse Größe überschreiten, wenn sie sich durch Angiogenese eine funktionierende Blutzufuhr schaffen können. Weitere Indikationen lassen sich in der Augenheilkunde finden, wo die feuchte Makuladegeneration durch Gefäßmembranbildung unter der Netzhaut häufig zu Leseblindheit führt.

Ein Beispiel für einen bereits zugelassenen Angiogenesehemmer ist Bevacizumab (Handelsname Avastin®), ein VEGF-Antikörper, der 2004 als erster Angiogenese-Inhibitor in den USA zugelassen wurde. Es bindet zirkulierendes VEGF und verhindert so die von VEGF getriggerten Einflüsse auf die Gefäßbildung. Eingesetzt wird es in Kombination mit anderen Chemotherapeutika bei verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren sowie Off-label bei feuchter Makuladegeneration und anderen proliferativen Augenerkrankungen.[4]

### **3.2 Angiogenese-Förderung**

Eine Förderung der Angiogenese ist hingegen dann erstrebenswert, wenn die Versorgung von schlecht durchbluteten (ischämischen) Geweben erhöht werden soll. Indikationsmöglichkeiten sind beispielsweise koronare Herzkrankheit (KHK) und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).

Um das Gefäßwachstum zu fördern, kommen 3 verschiedene Wirkungsansätze in Frage: Therapie mittels rekombinanten Proteinen, Stammzelltransplantation und Gentherapie.

Da sich die Innsbrucker Forschungsgruppe um Prof. Rudolf Kirchmair (Innere Medizin III - Kardiologie und Angiologie), an der ich zurzeit als Diplomand beteiligt bin, intensiv mit einem gentherapeutischen Ansatz beschäftigt, werde ich hier vor allem auf diesen Punkt näher eingehen.

#### **3.2.1 Wie funktioniert eine Therapie mit rekombinanten Proteinen?**

Bei der Proteintherapie werden die benötigten Wachstumsfaktoren (Proteine oder Peptide) durch ein biotechnologisches Verfahren hergestellt und dann intravenös (i.v.), intraarteriell (i.a.) oder intramuskulär (i.m.) zugeführt. Vorteil dieses Wirkungsansatzes ist die gute Dosierungsmöglichkeit verbunden mit einer im Vergleich zu Gentherapie und Stammzelltherapie relativ guten Kalkulierbarkeit von Wirkung und Nebenwirkung. Nachteile sind v.a. die geringe Halbwertszeit und die geringe Spezifität zum Zielgewebe.

#### **3.2.2 Was ist Stammzelltransplantation?**

Bei der Stammzelltransplantation werden Zellen, welche sich in einem sehr jungen Entwicklungsstadium befinden und noch die Fähigkeit besitzen, sich zu verschiedenen anderen Zellen zu differenzieren, dazu verwendet, neues Gewebe bzw. Zellen herzustellen, um einen etwaigen Gewebeschaden auszugleichen. Möglich sind Einsätze mit embryonalen Stammzellen (ESC), adulten Stammzellen (ASC) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC). Ein bereits etabliertes Verfahren ist beispielsweise die bei Chemotherapie von Leukämien zur Blutbildung eingesetzte Knochenmarkstransplantation. Eine Zulassung zur therapeutischen Angiogenese außerhalb von klinischen Studien bedarf allerdings noch weiterer Erkenntnisse im Bereich der Differenzierungsmechanismen sowie Langzeitstudien, um das nicht zu unterschätzende Entartungspotential dieser Zellen zu minimieren.[5]

### **3.2.3 Wie funktioniert angiogenetische Gentherapie?**

Unter Gentherapie versteht man das Einbringen eines Gens in eine Zelle, um das gewünschte Genprodukt verstärkt zu exprimieren oder ein nicht funktionierendes Gen zu ersetzen.

Zum Einschleusen der DNA kann man entweder Plasmidvektoren lokal injizieren oder zum Zielgewebe spezifische (organotrope) virale Vektoren systemisch i.a. oder i.v. applizieren. Gerade beim Organotropismus konnten mit der Entdeckung des Kardiotropismus der AAV9-Viren und Verwendung gewebespezifischer Promotoren (Herzmuskel: Troponin-T-Promoter, Skelettmuskel: Creatin-Kinase-6-Promoter) bedeutende Fortschritte erzielt werden, sodass eine systemische und damit weniger invasive Therapie ermöglicht wird.[6],[7]

Um durch diesen Wirkungsansatz Angiogenese anzuregen, kann man beispielsweise die für die weiter oben besprochenen angiogenetischen Faktoren kodierende Gene in Zellen von ischämischen Geweben einschleusen und so die Blutzufuhr erhöhen.

Im Mausmodell konnte mit mehreren dieser angiogenetischen Faktoren eine signifikante Angiogenese-Induktion, Verkleinerung von Gewebeschäden, sowie Verbesserung von Organfunktion beobachtet werden. Dies gilt auch für die in Innsbruck eingesetzten Sekretoneurin- und Catestatin-Plasmidvektoren. Untersuchungen bei der Sekretoneurin-Gentherapie in der Maus zeigten darüber hinaus, dass die systemische Wachstumshormonkonzentration durch die lokale Therapie nicht gesteigert und die Tumorzinzidenz nicht erhöht wurde.[2],[3] Neben der möglichen Tumorzinduktion ist die Gentherapie im Allgemeinen durch das moderne Vektordesign auch in Hinsicht auf mögliche immunologische Reaktionen sehr viel sicherer geworden als noch zu Anfangszeiten, als u.a. der Tod von Jesse Gelsinger 1999 traurige Bekanntheit erlangte.[8],[9]

Klinische Studien am Menschen konnten bei angiologischen und kardiologischen Gentherapieansätzen bis dato leider nicht ihre harten Endpunkte erreichen und nur vereinzelt und geringfügig Beschwerdelinderung und Funktionsverbesserung erzielen.[10] Aktuellstes Beispiel ist die Pressemitteilung der Firma Celladon vom 26. April 2015, welche in ihrer CUPID Phase IIb-Studie bei Herzinsuffizienz weder ihre primären, noch ihre sekundären Endpunkte erreichen konnte.[11] Die Gründe für die nicht zufriedenstellende Effizienz beim Menschen sind vielschichtig. Einerseits waren die meisten Patienten, welche in den bisherigen klinischen Studien eingeschlossen wurden, bereits in einem sehr fortgeschrittenen Stadium, was eine klinische Verbesserung im Vergleich zum Mausmodell erschwert. Andererseits könnte ein derart komplexer Prozess wie Angiogenese im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen nicht so leicht durch ein einzelnes Gen beherrschbar sein. In der Tat wurden die meisten Studien nur mit einem bzw. zwei angiogenetischen Faktoren durchgeführt. Eine Kombination mehrerer solcher Faktoren könnte auf diesen Punkt abzielen. Ein weiteres Problem, das bei vielen Studien unberücksichtigt bleibt, könnte methodischer Natur sein. Die Zielgewebe von Mäusen und Ratten lassen sich nämlich leicht durch eine einzelne lokale Injektion erreichen, während menschliche Zielgewebe meistens mehrerer Injektionen bedürfen. Auch bei systemischer Applikation (i.v. oder i.a. Gabe eines organotropen viralen Vektors) ist mit steigender Gewebemasse eine schlechtere Zugänglichkeit des Zielgewebes anzunehmen.

#### 4. Wie kann man Angiogenese in einem Modell simulieren und untersuchen?

In der Maus als gängigstem medizinischem Versuchstier gibt es verschiedene Modelle, um eine bestimmte menschliche Pathologie zu simulieren.

Für die periphere arterielle Verschlusskrankheit beispielsweise existiert das in der angiologischen Forschung etablierte Hindlimb Ischemia-Modell, bei dem nach chirurgischer Ligation einer der beiden Femoralarterien eine Durchblutungsstörung eines Hinterbeines induziert wird. Therapeutische Angiogenese lässt sich dann durch direkten Vergleich von mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Kontrollgruppe und Therapiegruppe nachweisen. Objektivierbare Parameter zum Nachweis von Durchblutungssteigerung und verbesserter Organfunktion in diesem Modell sind: Messung der Durchblutung durch Laser Doppler Perfusion Imaging, Beurteilung der Hinterbeinfunktion auf einer Skala von 1-4, makroskopische Beurteilung des Gewebeschadens sowie mikroskopische Beurteilung der Gefäßdichte und des Gewebeschadens im histologischen Schnitt.

#### Literatur

1. Cooke, J.P. and D.W. Losordo, *Nitric Oxide and Angiogenesis*. Circulation, 2002. **105**(18): p. 2133-2135.
2. Schgoer, W., et al., *Gene therapy with the angiogenic cytokine secretoneurin induces therapeutic angiogenesis by a nitric oxide-dependent mechanism*. Circ Res, 2009. **105**(10): p. 994-1002.
3. Theurl, M., et al., *The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism*. Circ Res, 2010. **107**(11): p. 1326-35.
4. Austria Codex Online. *Avastin 25 mg/ml-Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung* [Internet]. Quoted 04/05/2015. URL: <http://msweb1.uibk.ac.at/acfi/PDF/70/0-90870.pdf>
5. Leeper, N.J., A.L. Hunter, and J.P. Cooke, *Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2010. **122**(5): p. 517-26.
6. Katwal, A.B., et al., *Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery*. Gene Ther, 2013. **20**(9): p. 930-8.
7. Prasad, K.M., et al., *Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution*. Gene Ther, 2011. **18**(1): p. 43-52.
8. Wang, D. and G. Gao, *State-of-the-art human gene therapy: part I. Gene delivery technologies*. Discov Med, 2014. **18**(97): p. 67-77.
9. Wang, D. and G. Gao, *State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications*. Discov Med, 2014. **18**(98): p. 151-61.
10. Hammer, A. and S. Steiner, *Gene therapy for therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease - a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials*. Vasa, 2013. **42**(5): p. 331-9.
11. Celladon Corporation©. *Celladon Reports Negative Results for CUPID2 Trial of MYDICAL(R) in Advanced Heart Failure* [Internet]. Last updated 26/04/2015. Quoted 04/05/2015. URL: <http://ir.celladon.com/releasedetail.cfm?releaseid=908592>