

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Gentherapie

Die somatische Gentherapie kongenitaler und erworbener genetischer Erkrankungen stellt seit mehr als zehn Jahren einen der innovativsten biowissenschaftlichen Bereiche dar. Anfangs diente der Transfer fremder genetischer Information in eukaryotische Zellen dazu, Genfunktionen zu untersuchen [SR81]. Seitdem zahlreiche dieser Funktionen und die dazugehörigen Funktionsstörungen auf der Ebene der Gene und Proteine charakterisiert sind, rückte das Interesse, Defekte beim Menschen auf der molekularen Ebene gezielt zu heilen, verstärkt in den Vordergrund.

1990 erfolgte die erste gentherapeutische Behandlung eines Menschen [Tho95]. Das defekte Gen für die Adenosindeaminase, ein für die korrekte Funktion des Immunsystems notwendiges Enzym, konnte erfolgreich durch gesunde Exemplare des Gens ersetzt werden [And92]. Der betroffenen Patientin, einem knapp vierjährigen Mädchen, wurden Immunzellen des Blutes entnommen, mit Hilfe eines retroviralen Vektors das gesunde Adenosindeaminasegen in diese eingebracht und anschließend die genetisch veränderten Zellen wieder in das Blut der Patientin infundiert [BCM95]. Mit Hilfe weiterer gelegentlicher Auffrischungsbehandlungen führt die Patientin seitdem ein normales Leben [And95].

Grundsätzlich werden derzeit für die Therapie genetisch bedingter Erkrankungen zwei unterschiedliche Wege verfolgt. Zum einen will man, wie bei der Behandlung der

Adenosindeaminasedefizienz, Kopien eines gesunden Gens in Zellen einschleusen, um einen Defekt zu kompensieren. Zum anderen will man ein fremdes oder ein künstlich verändertes Gen in Zellen einbringen, um sie mit einer neuen Eigenschaft auszustatten. Die meisten Gentherapieansätze gegen Tumorerkrankungen basieren auf der letzteren Methode.

Neben der Entwicklung von Gentherapieverfahren für die Behandlung von AIDS, Zystischer Fibrose, anderen monogenetisch bedingten Erkrankungen sowie Arterienerkrankungen und rheumatischen Erkrankungen ist die Behandlung von Krebserkrankungen das Ziel der meisten auf dem Gebiet der Gentherapie tätigen Forschergruppen [MG96, Her96]. Abbildung 1.1 veranschaulicht die relative Häufigkeit verschiedener gentherapeutischer Zielstellungen, bei vom „National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee“ (RAC) genehmigten klinischen Studien.

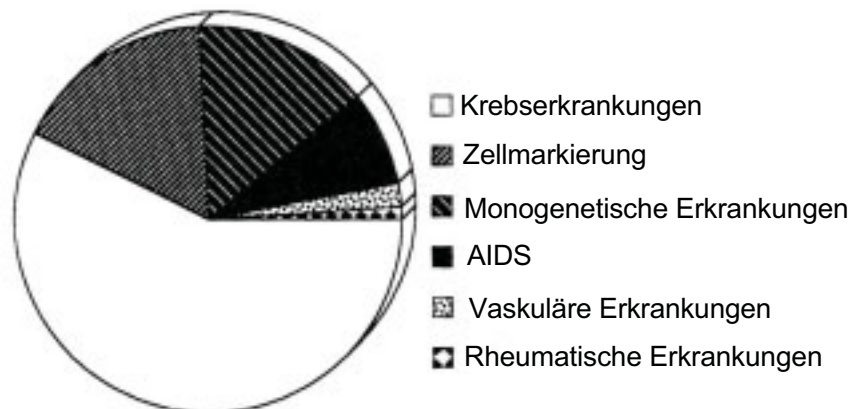


Abbildung 1.1: *Relative Verteilung verschiedener Typen klinischer Gentransferstudien in den Jahren 1988 bis 1995 (genehmigt vom „National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee“ (RAC) aus [Her96]. Zellmarkierungsstudien dienen dabei nicht unmittelbar der Therapie des Patienten, sondern geben indirekt Auskunft über zukünftige Therapiemöglichkeiten unter Beteiligung von z.B. Hämatopoetischen Stammzellen oder Immunzellen.*

Die Konzentration auf die Behandlung von malignen Tumoren und die damit verbundenen Hoffnungen werden verständlich, wenn man bedenkt, dass sich trotz einiger Fortschritte bei den herkömmlichen Methoden der Krebsbehandlung, wie der chirurgischen Resektion, Chemotherapie oder Bestrahlung, die Gesamtüberlebensdauer von Krebspatienten in den letzten 40 Jahren nicht wesentlich verlängert hat [HKB98].

Bei der Gentherapie von Tumoren werden hauptsächlich zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Beim ersten Ansatz soll die Expression fremder Gene in Tumorzellen diese empfindlicher gegenüber ansonsten nicht toxischen Substanzen („Prodrugs“) machen. Culver et al. entwickelten 1992 ein System, bei dem das Thymidinkinasegen des *Herpes simplex virus* (HSV-tk) mittels eines retroviralen Vektors in Tumorzellen transferiert wurde. HSV-tk-transfizierte und exprimierende Zellen werden für die Antitherpetika Ganciclovir und Aciclovir sensitiv. Die HSV-Thymidinkinase setzt Ganciclovir und Aciclovir letztendlich zu Ganciclovirtriphosphat bzw. Aciclovirtriphosphat um. Diese nukleotidanalogen Moleküle inkorporieren in den DNA-Strang und führen zu einem Abbruch der DNA-Synthese und in Folge davon zum Tod der transfizierten Zelle. Diese als Suizidgentherapie bezeichnete Methode wurde erstmals bei der Behandlung von cerebralen Glioma der Ratte mit Erfolg eingesetzt [CRW92]. Die intratumorale Applikation von retrovirusvektorproduzierenden Fibroblasten führte hier zu einer vollständigen makroskopischen sowie mikroskopischen Tumorregression. Caruso et al. übertrugen 1993 die Culver-Suizidstrategie auf ein Lebermetastasenmodell bei Ratten. Etablierte makroskopisch sichtbare Lebermetastasen wurden nach Injektion HSV-tk-vektorproduzierender Zellen und anschließender Ganciclovirbehandlung nahezu vollkommen zerstört [CPG93]. Seitdem verfolgen zahlreiche Forschergruppen auf der Suche nach einer wirkungsvollen Heilung von Tumorerkrankungen die Suizidgentherapie [NSM98]. Tabelle 1.1 führt einige „Prodrug“-aktivierende Enzyme, die zur Zeit untersucht werden, auf [Bou98]. Die entstehenden toxischen Produkte blockieren, da es sich oftmals um Nukleotidanaloga handelt, überwiegend die DNA-Synthese der transfizierten Zellen.

Der zweite gentherapeutische Ansatz zur Behandlung von Tumoren umfaßt den Transfer von Genen, die für Zytokine oder „Major-Histocompatibility-Complex“-Antigene kodieren, mittels viraler Vektoren, um eine immunvermittelte Tumorregression zu bewirken [FPI90]. Wolff und Mitarbeiter berichteten 1990 über die Markergenexpression von Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), Luciferase und β -Galaktosidase in Mausmuskelzellen nach Injektion „nackter“ Plasmid-DNA *in vivo* [WMW90]. Ohne einen Vektor für den Transfer der DNA benutzt zu haben, konnte die Expression aller drei Markergene in den Muskelzellen nachgewiesen werden. Es entstand daraufhin das Konzept der Immunisierung mit Hilfe von Genen. Gewöhnlich ist die Vakzine eine DNA (gelegentlich auch RNA), die für das interessierende Protein (Immunogen)

Aktivierendes Enzym	„Prodrug“	Toxisches Produkt
HSV-Thymidinkinase	Ganciclovir Aciclovir	Ganciclovirtriphosphat Aciclovirtriphosphat
<i>E. coli</i> Cytosindesaminase	5-Fluorocytosin	5-Fluorouracil
<i>E. coli</i> Purinnukleosidphosphorylase	6-Methylpurin-2-desoxyribose Arabinofuranosyl-2-fluoroadeninmonophosphat	6-Methylpurin sehr toxisches Adenosin-analogon
humane Desoxycytidinkinase	Cytosinarabinose	Produkt verursacht letale DNA-Strangbrüche
<i>E. coli</i> Nitroreduktase	5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid	alkylierendes Agenz „crosslinkt“ DNA

Tabelle 1.1: „Prodrug“-aktivierende Enzyme für die Suizidgentherapie [Bou98]

kodiert. Dieses wird von den genmodifizierten Zellen exprimiert und führt zu einer spezifischen Immunreaktion. So konnten z.B. Fuji und Mitarbeiter in einem Experiment an Mäusen die Antitumorimmunität in der Leber nach „Impfung“ mit einer Interleukin-12 exprimierenden Vakzine demonstrieren [FFU99].

Weitere Chancen zur Behandlung maligner Tumore werden in der Aktivierung von Apoptosewegen, z.B. durch den Transfer von Genen, die für Apoptin, P53 oder P16 kodieren, gesehen.

1.2 Gentransfer

Eines der größten Probleme bei der Gentherapie ist ein effizienter und sicherer Transfer des genetischen Materials in die entsprechenden Zielzellen. Eine Reihe unterschiedlich effizienter Techniken wurde bisher entwickelt, um Gene in Zellen einzuschleusen (Tab. 1.2). Physikalische Transfermethoden, wie z.B. Elektroporation, Genkanone, Mikroinjektion und auch die kalziumphosphatvermittelte Transfektion, sind im allgemeinen nicht sehr effizient und zum Teil nicht für *in vivo* Anwendungen geeignet. Der

Methode	Stabilität	Anwendung	
		ex vivo	in vivo
<i>Physikalisch</i>			
Elektroporation	S	++	-
Mikroinjektion	S	+++	-
Genkanone	T	++	+
Jet Injektion	T	++	+
Direkte Injektion	T	-	+
<i>Chemisch</i>			
Kalziumphosphat	S	+	-
Anionische Liposomen	T/S	+	+
Kationische Liposomen	T/S	++	++
Rezeptorvermittelt	T/S	+++	+?
<i>Biologisch (viral)</i>			
Retroviren	S	+++	+
Adenoviren	T	+++	+++
Adenoassoziierte Viren	S	++	+
Andere Viren (z.B. Baculo-, Lenti- und Herpesviren)	T	+++	+?

Tabelle 1.2: Verschiedene Gentransfermethoden [Str96]. *S* = stabile Integration des transferierten Gens ins Genom; *T* = transiente Expression; *T/S* = stabil unter bestimmten Umständen, transient unter anderen; (z.B. stabil ex vivo, transient in vivo). - = Transfer nicht möglich; + = geringe, ++ = moderate und +++ = hohe Effizienz

relativ geringe Wirkungsgrad ist unter anderem dadurch bedingt, dass Makromoleküle wie DNA in der Zelle von endosomalen und lysosomalen Vesikeln aufgenommen und dort abgebaut werden [GS97].

1.2.1 Virale Gentransfersysteme

Seit etwa 15 Jahren werden immer neue virale Transportvehikel, wie z.B. adenovirale und retrovirale Vektoren, entwickelt. Virale Vektoren eignen sich zum Transfer genetischen Materials, weil sie per se in der Lage sind, dieses über spezifische Mechanismen aktiv in Wirtszellen einzuschleusen. Auf diesem Weg sind relativ hohe Transferef-

fizienzen zu erreichen, weil ein endosomaler Abbau des genetischen Materials durch spezifische Virusproteine verhindert wird. Die Anwendung retroviraler Vektoren beschränkt sich auf proliferierende Zellen, was sie für Tumorthérapien attraktiv macht. Viele Tumore zeichnen sich im Vergleich zu den meisten gesunden Zellen im Organismus durch eine erhöhte Proliferationsrate aus. Allerdings wird beim retroviralen Transfer das genetische Material stabil in das Genom der transfizierten Zelle integriert. Daher eignen sich retrovirale Vektoren besonders für Langzeitkorrekturen von stoffwechselbedingten Erkrankungen, wie z.B. Diabetes [GS97]. Krebsbehandlungen erfordern zumeist nur eine kurzzeitige Expression der therapeutischen Gene, da oftmals Gene, die für toxische Genprodukte kodieren, transferiert werden. Ist dies der Fall, ist möglicherweise ein Gentransfer mit adenoviralen Vektoren geeigneter. Nach einer adenoviralen Transfektion liegt das therapeutische Gen effizient transkribiert, aber nicht in das Wirtsgenom integriert (extrachromosomal), in der Zielzelle vor und geht im Laufe der Zellteilung allmählich verloren [GS97]. Adenovirale Transportsysteme eignen sich besonders aufgrund eines hohen erreichbaren Titers und einer breiten Masse an möglichen Zielzellen, die sie infizieren können. So können sowohl sich teilende Zellen als auch ruhende und ausdifferenzierte Zellen, wie z.B. Neuronen oder Hepatozyten, transfiziert werden [KHK95, CSG94]. Nachteile ergeben sich aus der Rekombinationsfähigkeit der auf humanen Adenoviren basierenden Vektoren. Das Virus kann z.B. in Patienten bereits latent vorhanden sein und nach Rekombination mit dem viralen Vektor pathogen werden [GS97]. Des Weiteren können selbst inaktivierte Viruspartikel der 2. und 3. Generation noch eine Immunreaktion stimulieren. In diesem Fall ist die Expression des transferierten Gens nicht mehr möglich, da die virusinfizierten Zellen durch das Immunsystem eliminiert werden. 1999 verstarb im Rahmen einer adenoviralen Gentherapiestudie ein OTC¹-Patient vermutlich an den Folgen einer solchen Entzündungsreaktion nach Applikation einer sehr hohen Adenovirusmenge [Mar99]. Dieser und einige weitere Todesfälle im Rahmen viraler Gentherapien zeigen, dass die klinische Verwendung adenoviraler Vektorsysteme noch nicht kalkulierbare Risiken birgt und neu beurteilt werden muss. Außer retro- und adenoviralen Vektoren werden auch Transfersysteme aus adenoassoziierten Viren (AAV), Lenti- und Herpesviren untersucht. Allerdings sind bisher weder die Biologie noch mögliche Pathoge-

¹OTC = Ornithintranscarbamylase-Mangel. Bei OTC-Defizienz-Patienten (X-chromosomal vererbte Störung der Harnstoffsynthese) kommt es aufgrund der funktionsunfähigen Ornithincarbamyltransferase zu einer Anreicherung von Ammoniak, Glutamin und Alanin im Blut [Hil94].