

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der VEGF-Rezeptor *KDR* in verschiedenen Normalgeweben von Primaten unter Verwendung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (mab 2-10-1) nachgewiesen. Die immunhistochemisch erzielten Färbeergebnisse wurden anschließend mit einer endothelspezifischen Färbung (Ak gegen den Rezeptor CD31) der Gewebe verglichen.

Seit der Entdeckung des *KDR* durch TERMAN et al. (1991) stand dieser im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Nachdem man ihn 1992 als einen VEGF-Rezeptor identifizierte (TERMAN et al., 1992), konzentrierten sich nachfolgende Untersuchungen v.a. auf seine Funktion in der Angiogenese und Tumorangioenese.

Das Hauptcharakteristikum von *KDR* ist seine Endothelspezifität. Der VEGF-Rezeptor konnte seit seiner Entdeckung v.a. EC-gebunden nachgewiesen werden, und auch in heutigen Veröffentlichungen wird der Rezeptor als „spezifisch für EC“ beschrieben. Dabei wurde schon 1995 von GUERRIN et al. (1995) ein Versuchsergebnis veröffentlicht, welches den *KDR* in Retinaepithelzellen *in vitro* nachwies und somit zu der Vermutung führte, daß VEGF seine Funktionen nicht nur über EC ausübt. 1997 folgten zwei voneinander unabhängig durchgeführte Studien, in denen der Rezeptor in nicht-endothelialen Zellen nachgewiesen werden konnte: BROWN et al. (1997) wiesen die mRNA des *KDR* in den glatten Muskelzellen des menschlichen Uterus nach, während ERGÜN et al. (1997) den Rezeptor immunhistochemisch in den Drüsenzellen des Hodens darstellen konnten. Auf Grund dieser Ergebnisse stellten beide Forscherteams die Behauptung auf, daß VEGF noch weitere, bisher unbekannte Funktionen besitzt, die der Wachstumsfaktor über nicht-endotheliale Zellen ausübt. Diese These stützen die 1998 veröffentlichten Ergebnisse von ERGÜN et al. (1998), die den Rezeptor auch in nicht-endothelialen Zellen des Nebenhodens nachweisen konnten.

Es wurde bis jetzt nur wenig über das Vorkommen des *KDR* in den verschiedenen Geweben des Menschen publiziert. Die mir vorliegenden Daten betreffen die Bauchspeicheldrüse, Haut, Netzhaut, Nieren, Geschlechtsorgane wie Hoden, Nebenhoden und Uterus sowie die Megakaryozyten und Thrombozyten. In diesen Studien erfolgte überwiegend ein biochemischer Nachweis der mRNA des *KDR*. Nur in den Geschlechtsorganen und der Bauchspeicheldrüse wurde der *KDR* mittels Immunhistochemie lokalisiert. Bis auf die Ergebnisse betreffend der Augen, Geschlechtsorgane, Megakaryozyten und Thrombozyten, welche mir in meinen Untersuchungen nicht zur Verfügung standen, stimmen meine Untersuchungsergebnisse mit denen, die veröffentlicht wurden, überein.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen neue Lokalisationen des KDR auf und stellen somit seine Endothelspezifität weiter in Frage. Der KDR konnte in allen untersuchten Geweben in den Gefäßendothelien nachgewiesen werden. Aber auch andere Zelltypen zeigten eine deutliche Expression des KDR.

Wie aus der zusammenfassenden Darstellung im Kapitel 3.2.2. (s.S.52) hervorgeht, war das immunhistochemische Färbeverhalten der **Endothelzellen** nicht einheitlich, wobei gerade der Vergleich mit dem als „Endothelmarker“ bezeichneten Ak gegen den Rezeptor CD31 interessant ist. So kommen beide Rezeptoren, CD31 und KDR, auf Endothelien vor und dennoch unterscheiden sich die immunhistochemisch erzielten Färbeergebnisse in den meisten Organen erheblich.

- Die Mehrheit der EC in den untersuchten Organen fällt unter Punkt 1, d.h. die Endothelien exprimierten sowohl den KDR als auch den CD31. Auffällig war dabei die starke immunhistochemische Anfärbung der Kapillaren in den Nierenkörperchen (s. Abb.6, S.39) bei dem Nachweis des VEGF-Rezeptors. Desweiteren zeigten in der Übersicht mehrere Glomerula einen Bezirk, der sich nicht oder nur schwach angefärbt hatte. Hierbei handelte es sich um einen der Pole, wobei eine Differenzierung zwischen Gefäß- und Harnpol, mittels der vorliegenden Methode, nicht eindeutig getroffen werden konnte. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß es sich hierbei, aufgrund der eindeutigen Positivität der Gefäße im Glomerulum und damit auch des Gefäßpoles, um den Harnpol handelt. Auch die Kapillaren in den Langerhans'schen Inseln (s. Abb.20, S.45) und im interfollikulären Gewebe der Schilddrüse (s. Abb.22, 23, S.46) wiesen eine intensive Färbung bei dem KDR-Nachweis auf.
- Die unter Punkt 2 angeführten EC gehören nicht zu Kapillaren. Es handelt sich hierbei um die Zellen der Lamina endothelialis der Intima von größeren Gefäßen. Sie stellten sich, wie z.B. in dem Lebertrias (s. Abb.16, 17, S.43), KDR negativ und CD31 positiv dar.
- Aber auch der CD31 scheint nicht auf allen Endothelien vorzukommen. So zeigten offene Kapillaren mit diskontinuierlichem Endothel (s. Punkt 3), wie z.B. die Sinusräume der Milz und Leber, keine CD31-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die gleichen Kapillaren erwiesen sich aber als KDR positive Strukturen. Eindeutig war dies in der Leber zu erkennen (s. Abb.16, 17, S.43). Das Ergebnis, welches die Milzsinusoide betrifft, war schwieriger auszuwerten, da in diesem Bereich auch Lymphozyten gefärbt waren (s. Abb.10, 11, S.40).

Auf Grund der hier gewonnenen Ergebnisse über das Vorkommen von KDR-Rezeptoren in Gefäßstrukturen, läßt sich die Behauptung aufstellen, daß die KDR-Expression vom Endotheltyp abhängig sein könnte. So zeigten sich VEGF-Rezeptoren in großer Menge v.a. in Kapillaren mit fenestriertem Endothel, wie es z.B. in den Glomerula der Nieren, den Kapillaren der Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse und den Kapillaren um die Schilddrüsenfollikel vorkommt. Bestätigt wird das Ergebnis in der Bauchspeicheldrüse

durch die Studien von ITAKURA et al. (2000) und ROOMAN et al. (1997), die den KDR/Flk-1 in den EC der Langerhans'schen Inseln im Pankreas des Menschen bzw. dem von Ratten nachwies. Auch in den sinusoiden Kapillaren der Milz und der Leber ließ sich der KDR nachweisen. In diesem Kapillartyp liegt ein diskontinuierliches Endothel vor. Das Ergebnis in der Leber wird unterstützt durch die von YAMANE et al. (1994) durchgeführten Untersuchungen an Lebern von Ratten. Sie zeigten, daß der VEGF-Rezeptor KDR/Flk-1 von sinusoidalen EC exprimiert wird. Nachfolgende Studien von MOCHIDA et al. (1996 u. 1998) bestätigen dieses Ergebnis. Eine Funktion von VEGF bei der Permeabilisierung der Kapillarendothelien scheint somit wahrscheinlich zu sein. SIMON et al. (1995) beschrieben bei ihren Untersuchungen der Nieren einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des VEGF-Rezeptors KDR und der Permeabilität der Kapillaren. Zu der gleichen Schlußfolgerung kamen CHRISTOFERI et al. (1995) bei ihrer Studie über das Vorkommen von KDR in der Bauchspeicheldrüse von Mäusen. Für die von ihnen 1995 unabhängig voneinander aufgestellte Vermutung lieferten ESSER et al. (1998) drei Jahre später den Beweis. Sie zeigten, daß VEGF die Fenestration von Endothelien der Nebennierenrinde in vitro induziert. Bei den Kapillaren der Nebennierenrinde handelt es sich, wie bei der Leber und der Milz, um sinusoidale Kapillaren.

In diese Behauptung läßt sich das Ergebnis, das in den Sinus des hier untersuchten Lymphknoten beobachtet werden konnte, einfügen. Der KDR schien auch hier vermehrt exprimiert zu werden, da sowohl die Zellen im Sinus als auch die Sinusendothelien bei der immunhistochemischen Färbung reagiert haben (s. Abb.14, S.42). Die gefenesterten Sinusendothelien würden mit ihrer KDR-Expression die These untermauern, daß der VEGF für die Fenestration verantwortlich ist.

Diese These stützen die Ergebnisse, die das Großhirn betreffen (s.S.51). Hier wurde in den Kapillaren, welche ein zusammenhängendes Endothel besitzen, nur eine geringe KDR-Expression nachgewiesen. Desweiteren schien der KDR nicht von größeren Gefäßen, wie z.B. dem Trias der Leber (s. Abb.16, 17, S.43), exprimiert zu werden. Die Innenauskleidung der Gefäße wird von der Lamina endothelialis der Intima gebildet und stellt eine ununterbrochene EC-Schicht dar.

Verschiedene **Epithelzellen** konnten in mehreren Organen als KDR positiv bewertet werden (s. Punkt 3, S.52).

Eine Schlußfolgerung, die aus diesen Untersuchungsergebnissen hervorgeht, ist die Möglichkeit, daß der KDR von den verschiedenen Drüsenzellen exprimiert wird.

So stellten sich sowohl exokrine Drüsenepithelien, wie die im MDT (s. Abb.32 u. 35, S.50 u. 51), im Pankreas (s. Abb.18, S.44) sowie das Luftröhrenepithel mit seinen sezernierenden Becherzellen (s. Abb.28, S.48), als auch endokrine Drüsen, wie die Langerhans'schen Inseln des Pankreas (s. Abb.20, S.45), KDR positiv dar.

Die erzielten Ergebnisse in der Bauchspeicheldrüse bestätigen zwei frühere Studien: So entdeckten ROOMAN et al. (1997) bei ihrer Untersuchung des Pankreas von Ratten so-

wohl EC als auch Gangepithelien als Flk-1-positive Strukturen. Im Gegensatz zu den EC, die auf ihrer Basalseite die VEGF-Rezeptoren tragen, exprimieren die Epithelzellen der exokrinen Pankreasgänge den Flk-1 auf ihrer apikalen Oberfläche. Auch bei der von ITAKURA et al. (2000) durchgeführten Studie wurde der KDR in den EC wie auch in den Gangepithelien und vielen Zellen der Langerhans'schen Inseln in der Bauchspeicheldrüse des Menschen nachgewiesen. Dabei war der immunhistochemische Nachweis von KDR im Ductusepithel schwächer als in den EC.

Die Hypothese, daß der KDR von Drüsenzellen exprimiert wird, bestätigt die von ERGÜN et al. (1997) sowie WINTHER et al. (1999) publizierten Versuchsergebnisse. So beschrieben ERGÜN et al. (1997) eine KDR-Positivität der Leydig'schen Zwischenzellen sowie der Sertoli-Zellen im Hoden des Menschen. Beide Zelltypen übernehmen im Hoden auch endokrine Drüsenfunktionen und sezernieren verschiedene Substanzen. WINTHER et al. (1999) untersuchten den Uterus von Schweinen und lokalisierten immunhistochemisch den KDR u.a. auch in den Drüsenepithelien des Endometriums während der frühen Lutealphase sowie während der Gravidität.

Desweiteren könnte man in diese Behauptung im weiteren Sinne auch das Mesothel (z.B. in der Milz, s. Abb.10, S.40) mit einbeziehen, da es auch zur Sekretion befähigt ist. Es ist als einschichtiges mesenchymales Plattenepithel seröser Häute an der Bildung von serösen Flüssigkeiten beteiligt.

Die Versuchsergebnisse der immunhistochemische Färbung der Tubuluszellen der Hauptstücke in der Niere (s. Abb.8, S.39) könnte man auch in diese Hypothese eingliedern, da das einschichtige, isoprismatische Epithel dieser Zellen u.a. auch exkretorische Funktionen ausübt.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wiesen verschiedene Zellen des **Binde- und Stützgewebes** in mehreren Geweben eine KDR-Positivität auf (s. Punkt 3, S.52).

Die KDR-Expression von Lymphozyten bestätigt die von GABRILOVICH et al. (1996) aufgestellte These, daß der Wachstumsfaktor VEGF auch eine Funktion in der Immunologie besitzt. VEGF inhibiert hierbei die Reifung von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aus Vorläuferzellen. Ein Tumor kann somit mittels VEGF nicht nur das Einsprossen von Gefäßen in das Tumorgewebe fördern, sondern auch die Immunreaktion des Organismus unterdrücken. Der VEGF-Rezeptor *KDR* wurde von Katoh et al. (1995) auf CD34⁺-Zellen beschrieben. Ebenso konnte der KDR auf APC's nachgewiesen werden, nachdem diese einige Zeit einem VEGF-haltigen Medium ausgesetzt waren (PUJOL et al., 2001).

Von den weiteren genannten KDR-positiven Zellen des Binde- und Stützgewebes (Fibroblasten/-zyten und Chondrozyten) existieren keine mir bekannten Veröffentlichungen bezüglich ihrer KDR-Expression.

Die Vermutung liegt nahe, daß die Expression des KDR von Fibroblasten/-zyten in den verschiedenen Organen (z.B. in der Trachea, s. Abb.24, S.47) im Zusammenhang mit der physiologischen Angiogenese während des Prozesses der Wundheilung stehen könnte.

WALTENBERGER et al. (1994) zeigten, daß Zellen, die den KDR exprimieren, chemoaktiv sind, d.h. sich auf das VEGF hinzu bewegen können. Wird nun der Wachstumsfaktor VEGF während des Wundheilungsprozesses freigesetzt, so lockt er die oben genannten Zellen an. Die Fibroblasten beteiligen sich im Abschluß der Wundheilung an der Bildung von Narbengewebe.

Bei den KDR-positiven Chondrozyten der Luftröhre (s. Abb.27, S.48) liegt augenscheinlich kein Bezug zur Angiogenese vor. In dem nicht-vaskularisierten Knorpelgewebe ist die Expression von KDR als einen Rezeptor für den Angiogenese-Stimulator VEGF zunächst einmal nicht erklärbar.

Die unter Punkt 3 (s.S.52) aufgeführten, KDR positiven **Muskelzellen** lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die Herzmuskelzellen und die Myozyten der glatten Muskulatur. Die Skelettmuskulatur stand mir in dieser Untersuchung leider nicht zur Verfügung.

Die hier vorliegenden Beobachtungen für die glatte Muskulatur des MDT (s. Abb.32, S.50) bestätigen indirekt die von BROWN et al. (1997) und WINTHER et al. (1999) erzielten Ergebnisse im Uterus. So beschrieben BROWN et al. (1997) die Expression der mRNA des KDR in den glatten Muskelzellen der Gebärmutter des Menschen. WINTHER et al. (1999) wiesen den KDR immunohistochemisch in den glatten Muskelzellen des Myometriums von Schweinen nach. Auch wenn mir in diesen Untersuchungen keine Geschlechtsorgane zur Verfügung standen, so kann man doch die glatten Muskelzellen des Uterus mit den glatten Muskelzellen im MDT vergleichen.

Zu den in dem Herzen erzielten Ergebnis (s. Abb.30, S.49) liegen mir keine Publikationen vor, so daß ein Vergleich fehlt. Die Herzmuskelzellen weisen Strukturmerkmale von denen der glatten Muskulatur, als auch von der Skelettmuskulatur auf. So könnte man zwei Vermutungen äußern: 1.) Alle drei Muskeltypen exprimieren den KDR. Für diese These fehlt die Untersuchung der Skelettmuskulatur. 2.) Die KDR-Expression erfolgt nur auf Myozyten der glatten Muskulatur. Das Herz könnte dann, als Träger histologischer Merkmale der glatten Muskulatur, in diese Gruppe mit einbezogen werden. Allerdings fehlen zur Untermauerung dieser Behauptung auch die Ergebnisse der Skelettmuskulatur.

Wie aus den Versuchsergebnissen hervorgeht, sind neben Gefäßendothelzellen noch weitere Zelltypen an der KDR-Expression beteiligt. Seit 1995 sind nur wenige Publikationen erschienen, in denen der KDR auf nicht-endothelialen Zellen in menschlichen Geweben beschrieben wird. Es existieren auch Veröffentlichungen, die andere Spezies betreffen; so erbrachten KORPELAINEN et al. (1998) den Beweis für nicht-endotheliale Zielzellen von VEGF in der Maus. Dennoch wird der KDR bzw. sein Ligand, der Wachstumsfaktor VEGF, immernoch als endothelzellspezifisch deklariert. Mit den Untersuchungsergebnissen der hier vorliegenden Studie wird die Endothelzellspezifität von VEGF und seines Rezeptors weiterhin in Frage gestellt, da eine KDR-Expression auch von nicht-endothelialen Zellen nachgewiesen werden konnte. Daraus ergibt sich die

schon erwähnte Behauptung von BROWN et al. (1997), daß der Wachstumsfaktor VEGF auch noch weitere, bisher unbekannte Funktionen wahrnimmt.

Die Behauptungen, die sich aus den hier vorliegenden Versuchsergebnissen aufstellen lassen, sollen aufgrund einer besseren Übersicht noch einmal aufgezählt werden:

- Die KDR-Expression auf Gefäßendothelien ist abhängig vom Endotheltyp.
- Der KDR wird auch von Drüsenzellen exprimiert.
- Lymphozyten und Fibroblasten/-zyten tragen den KDR auf ihrer Oberfläche.
- Der KDR wird auch von glatten Muskelzellen sowie Herzmuskelzellen exprimiert.
- Die Chondrozyten in der Trachea weisen eine KDR-Positivität auf.

An dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben zu gering ist, um exakte statistische Werte über eine quantitative Verteilung des KDR in den verschiedenen Geweben zu erheben. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Aussagen über das qualitative Expressionsmuster des VEGF-Rezeptors *KDR* dienen v.a. dem Anreiz, weitere Organe in die Untersuchungen auf diesem Gebiet miteinzubeziehen. So könnten die Organe, welche mir aus versuchstechnisch bedingten Gründen nicht zur Verfügung standen, Gegenstand weiterer Forschung sein. Die Hypophyse und die Nebennieren könnten als endokrine Organe die aufgestellten Behauptungen untermauern, ebenso wie das Knochenmark, Blutasstriche, Gelenke und die Geschlechtsorgane. Zudem könnten durch geeignete Tierversuchsmodele die Funktionen des Wachstumsfaktors *VEGF* weiter untersucht werden.