

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Angiogenese und Vasculogenese

#### 2.1.1. Definition

Der Begriff der *Angiogenese* wurde von HERTIG (1935) geprägt. Er beschrieb damals mit diesem Terminus die Bildung neuer Blutgefäße in der Plazenta. Heutzutage ist dieser Ausdruck nicht mehr nur auf die Plazenta beschränkt, sondern beschreibt vielmehr die gesamte Gefäßbildung, bei der das schon bestehende Gefäßssystem als Basis für sich neu bildende Gefäße dient.

Die Entwicklung des Gefäßsystems aus sogenannten Vorstufenzellen (Angioblasten) während der Embryogenese grenzte NODEN (1989) vom Begriff der Angiogenese ab; dieser embryonale Vorgang wird als *Vasculogenese* definiert.

#### 2.1.2. Prozeß der Angiogenese

Ihren Ausgangspunkt nimmt die Angiogenese von postkapillären Venulen und Kapillaren (FOLKMAN, 1985). Die Wände dieser beiden Gefäßtypen bestehen nur aus Endothel, Basallamina und einigen Perizyten, die sich an der Außenseite anlagern. Die glatte Muskulatur in der Tunica media fehlt, sowohl den postkapillären Venulen als auch den Kapillaren (MOSIMANN u. KOHLER, 1990).

Die Endothelzellen (EC) sind normalerweise ruhende Zellen. Sie befinden sich meistens im G1-Stadium des Zellzyklusses und nur weniger als 0,01% der Zellen sind mitotisch aktiv (AUERBACH u. AUERBACH, 1994). Ihre Turn-over-Rate beträgt somit mehrere Jahre (FOLKMAN u. SHING, 1992). Endothelzellen können aber auch zum Wachstum stimuliert werden. Bei der Induktion der Angiogenese erreichen sie eine Verdopplungszeit von 24 bis 48 h.

Der Prozeß der Angiogenese ist komplex und läuft in mehreren Schritten ab, die FOLKMAN (1985, 1986) übersichtlich beschrieb:

Am Anfang steht ein Angiogenese-stimulierendes Signal, welches auf das Gefäßendothel einwirkt. Dabei ist es unerheblich, ob dieser Stimulus von einer mechanischen Verlet-

zung, einer immunologischen Reaktion oder einer Gewebshypoxie herrührt. Die Angiogenese-Kaskade, die daraufhin einsetzt, besitzt eine hohe Redundanz (FOLKMAN, 1985).

Der Prozeß der Angiogenese läßt sich in 5 Phasen untergliedern (AUERBACH u. AUERBACH, 1994):

1. Freisetzung angiogener Faktoren:

Angiogenese-Stimulatoren werden freigesetzt und wirken auf das Gefäßendothel ein (s. 2.2.1, S.13 ff).

2. Erreichen einer Gefäßdiskontinuität durch den Abbau der Basallamina:

Der Abbau der Basallamina des Elterngefäßes findet an der Seite statt, die dem Angiogenese-Stimulus am nächsten ist (AUSPRUNK u. FOLKMAN, 1977).

Endothelzellen, die einem Angiogenese-Stimulus in vitro ausgesetzt sind, sezernieren Proteasen wie Plasminogen-Aktivatoren und Metalloproteinasen (wie z. B. Kollagenase) in hohen Konzentrationen (MOSCATELLI et al., 1981; GROSS et al., 1983; KALEBIC et al., 1983). Man kann daher davon ausgehen, daß der enzymatische Abbau der Basallamina in vivo direkt von den EC selber übernommen wird.

3. Migration von EC:

Durch dieses entstandene Leck in der Basallamina beginnen die EC in Richtung des Angiogenese-Stimulus, in das perivaskuläre Stroma auszuwandern. Dabei bilden sie einen linearen Sproß. Desweiteren bildet sich zu diesem Zeitpunkt ein Lumen aus, das durch zwei Endothelzellen begrenzt wird (AUSPRUNK u. FOLKMAN, 1977).

4. Proliferation von EC:

Die EC in dem mittleren Abschnitt des sich neubildenden Gefäßsprosses sind mitotisch stark aktiv, so daß gewöhnlicherweise die EC-Proliferation in dieser Region stattfindet. Im Gegensatz dazu teilen sich die EC an der Spitze des Sprosses nicht; sie führen die Migration in das umliegende Gewebe fort.

5. Strukturelle Reorganisation:

Durch das Zusammenwachsen von zwei Sproßspitzen bildet sich eine Kapillarschleife aus, durch die Blut zu fließen beginnt. Diese Schleifen dehnen sich aus und können als Ursprung für neue Kapillaraussprossungen dienen. Abschließend wird eine neue Basallamina gebildet und Perizyten lagern sich an.

### 2.1.3. Physiologische Angiogenese

Auf Grund der extrem niedrigen Turn-over-Rate der EC, ist der Prozeß der Angiogenese im gesunden adulten Organismus normalerweise nicht nachweisbar (SHWEIKI et al., 1993).

Es gibt allerdings Ausnahmen, bei denen die Bildung neuer Gefäße essentiell ist. Dazu zählen der Prozeß der Wundheilung (FROMER u. KLINTWORTH, 1975), die Geweberegeneration und die Umbauprozesse während des weiblichen Reproduktionszyklusses (FOLKMAN u. SHING, 1992; GOSPODAROWICZ u. THAKRAL, 1978). Zu den physiologischen Prozessen der Angiogenese gehört i.w.S. auch die Bildung der Gefäße im Embryo, welche als Vasculogenese definiert ist.

Die Angiogenese unterliegt während dieser Vorgänge einer genauen Regulation durch ihre Stimulatoren und Inhibitoren (s.2.2, S.13 ff). Sie unterscheidet sich v.a. im zeitlichen Verlauf von der Angiogenese, die während pathologischer Prozesse abläuft. In den genannten physiologischen Situationen kommt die Angiogenese, nach Abschluß der Kaskade, wieder zum Erliegen (FOLKMAN, 1985). Eine wesentliche Rolle übernehmen dabei die Perizyten (ORLIDGE u. D'AMORE, 1986 u. 1987). Durch die Anlagerung der Perizyten an die EC zum Abschluß der Angiogenese-Kaskade, wird ein Fortschreiten des EC-Wachstum inhibiert. Eine weitere regulierende Funktion übernimmt z.B. der Plasminogen-Aktivator. Dieser wird von Angiogenese-Stimulatoren, wie z.B. bFGF, freigesetzt und fördert die Bildung von Plasmin aus der Vorstufe Plasminogen. RIFKIN et al. (1990) zeigten, daß das entstandene Plasmin nicht nur verantwortlich für eine gesteigerte Freisetzung von aktivierten bFGF ist, sondern es aktiviert auch den Angiogenese-Inhibitor TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  besitzt einen anti-proteolytischen Effekt. Der aktivierte Prozeß der Angiogenese ist somit selbstregulierend.

### 2.1.4. Pathologische Angiogenese

Die Induktion der Angiogenese ist bei verschiedenen Krankheitsbildern charakteristisch, so z.B. bei Neoplasien und ihren Metastasen (FOLKMAN, 1986 u. 1990), Psoriasis (DETMAR et al., 1994) und diabetisch bedingten Retinopathien (PIERCE et al., 1995).

Im Gegensatz zu der Angiogenese in physiologischen Situationen ist die Bildung der Gefäße hier nicht zeitlich begrenzt.

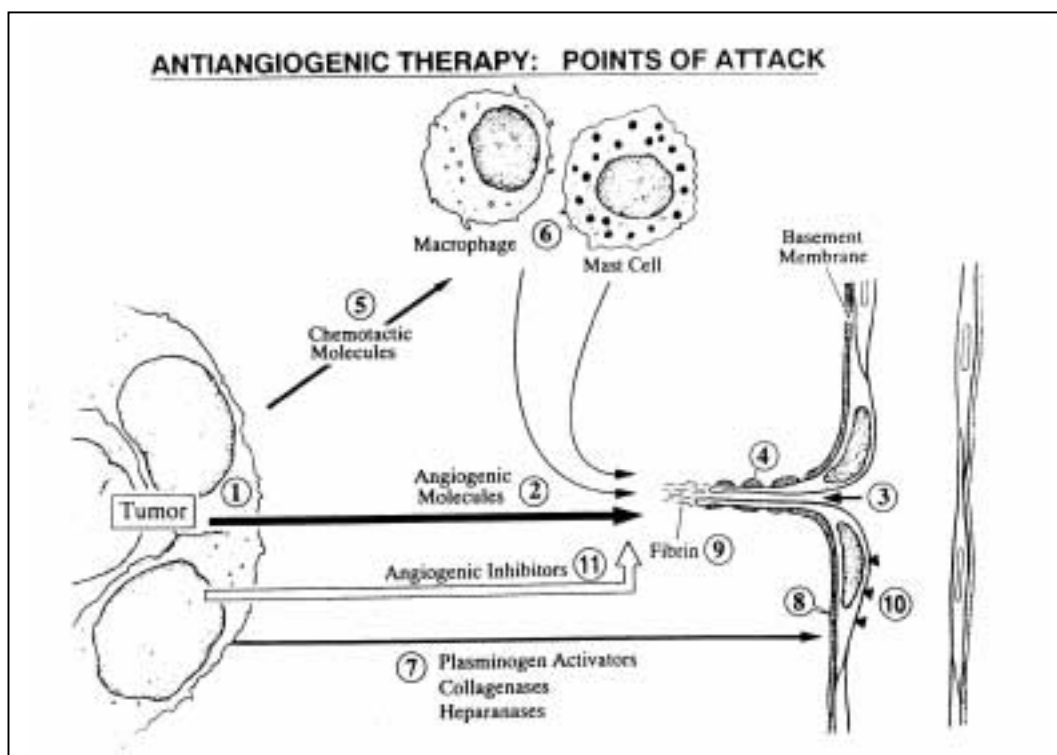
Die neugebildeten Tumorgefäße sind den physiologischen Gefäßen nicht identisch. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung, Permeabilität, Stabilität, Wachstumsregulation und Morphologie (FOLKMAN u. COTRAN, 1976).

FOLKMAN (1971) stellte die Hypothese auf, daß das Tumorwachstum von der Angiogenese abhängig ist. Die Beweise dafür stellte FOLKMAN (1990) in einer Veröffentlichung zusammen:

Bleibt eine Vascularisierung der Tumore aus, so stagniert ihr Wachstum. Die Ernährung des Tumors erfolgt dann ausschließlich durch Diffusion und der Tumor kann unter diesen Bedingungen maximal einen Durchmesser von 2-3 mm erreichen. Erst wenn dieser avasculäre Tumor die Ausbildung neuer Blutgefäße induzieren kann, wird sein Wachstum fortgesetzt. Dabei steht die Entfernung des Tumors vom Gefäß und die Schnelligkeit, mit der der Tumor wächst, in einer reziproken Beziehung. Diese Abhängigkeit wurde von TANNOCK (1968 u. 1970) beschrieben.

Eine adäquate Blutversorgung ist erforderlich, um den Tumor ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen (FOLKMAN, 1985 u. 1986 u. 1990). Durch die Vascularisierung besitzt der Tumor außerdem die Möglichkeit zu metastasieren. Allerdings korreliert nicht in jedem Tumor das angiogenetische Potential mit seiner Malignität. Ein Beispiel dafür sind Adenome der Nebenniere. Sie besitzen eine starke Fähigkeit, die Angiogenese im Gewebe zu induzieren, gelten jedoch als benigne Tumoren (FOLKMAN, 1990).

Es gibt mehrere Mechanismen, die einem Tumor ermöglichen, den Prozeß der Angiogenese zu induzieren (STEINER et al., 1992; BICKNELL u. HARRIS, 1991):



Legende  
s.S.12

Abb.1:  
Darstellung der verschiedenen Mechanismen, mit

der ein Tumor die Angiogenese induziert (diese Mechanismen können auch Angriffspunkte in der antiangiogenetischen Therapie sein; STEINER et al., 1992)

1 Einige Angiogenesefaktoren werden von Tumorzellen freigesetzt., 2 Die Angiogenesefaktoren müssen durch das Gewebe diffundieren, um das Gefäßbett zu erreichen., 3 Einige Faktoren stimulieren EC-Migration und -Chemotaxis stärker als die DNA-Synthese (z.B. bFGF)., 4 Angiogenesefaktoren können die Proteasenproduktion der EC stimulieren, welche zum Abbau der Basallamina führen., 5 Tumore können Makrophagen und Mastzellen rekrutieren, welche die Tumorangio-genese fördern., 6 Makrophagen können spezifische Angiogenesefaktoren freisetzen, welche weitere Makrophagen anlocken., 7 Tumore können auch Proteasen freisetzen, welche zum Abbau der Basallamina führen., 8 bFGF, welcher in dem Extrazellularraum gespeichert ist, kann durch Proteasen freigesetzt werden (s.7)., 9 VEGF erhöht die Permeabilität des Gefäßes, so daß Fibrin-Vorstufen in den Extrazellularraum gelangen., 10 In einigen Tumoren wurden EC gefunden, die mehr bFGF enthalten als die Tumorzellen; der Mechanismus dieses Phänomens ist unbekannt., 11 Inhibitoren der Angiogenese, die vom Tumor freigesetzt werden, müssen erst gedrosselt werden, damit die Gefäßbildung starten kann.

#### a) Direkte Stimulation der Angiogenese:

Die Tumorzelle setzt Angiogenesefaktoren, wie z.B. VEGF, frei, die durch das umliegende Gewebe diffundieren und nach Bindung an die endothelialen VEGF-Rezeptoren die Angiogenese starten. Außerdem können Tumore ihre eigenen Angiogenesefaktoren synthetisieren. So beschrieben KLAGSBRUN et al. (1986) einen EC-Wachstumsfaktor, der von einer Hepatomzelllinie des Menschen freigesetzt wird und in seiner Struktur der von bFGF ähnelt (hepatoma-derived growth factor).

#### b) Indirekte Stimulation der Angiogenese:

Stimulatorische Faktoren des Tumors veranlassen Wirtszellen, Angiogenesefaktoren auszuschütten. Hierbei kann man noch einmal zwei verschiedene Stimuli voneinander unterscheiden: Einerseits können die Tumorzellen Botenstoffe aussenden, die die Wirtszellen zur Sekretion von Angiogenesestoffen veranlassen und somit den Prozeß der Angiogenese starten. So rekrutiert der Tumor z.B. Makrophagen, die dann Angiogenese-Stimulatoren, wie  $TNF\alpha$  sezernieren können (POLVERINI u. LEIBOVICH, 1984; LEIBOVICH et al., 1987). Andererseits stellen sich Tumore dem Wirtsorganismus als „Wunde“ dar. Eine lokale Verletzung wie auch der Tumor bilden um sich ein Fibrin-Fibronectin-Gel, welches dem Wirt eine Wunde signalisiert. Der Wirtsorganismus beginnt daraufhin neue Blutgefäße zu bilden und somit den physiologischen Prozeß der Wundheilung, der die Angiogenese beinhaltet, einzuleiten (DVORAK, 1986).

#### c) Herabsetzung der endogenen Angiogenese-Inhibitoren:

STETLER-STEVENSON et al. (1990) zeigten in einer Untersuchung die Drosselung der TIMP-2-Konzentration durch TGF- $\beta$ 1. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) stellt einen Gegenspieler der Metalloproteinasen dar, welche u.a. die Basallamina der Gefäße während der Angiogenese degradieren. Aus diesem Grund kann man TIMP als einen Angiogenese-Inhibitor betrachten. Durch Herabsetzen seiner Konzentration durch den Angiogenese-Modulator TGF- $\beta$ 1 (s.2.2.3., S.15), welcher gleichzeitig auch die Kollagenase-Konzentration erhöht, kommt es zur Stimulation des Angiogenese-Prozesses.

#### d) Freisetzung von proteolytischen Enzymen:

Zu den Proteasen, die die Basallamina abbauen, gehören u.a. Kollagenase und Serinproteasen wie der Plasminogen-Aktivator. Diese können von den Tumorzellen selber oder von den EC des Wirtsorganismus freigesetzt werden. Die EC werden dabei von Angiogenesefaktoren stimuliert. So stimuliert z.B. der Wachstumsfaktor bFGF die Synthese von Plasminogen-Aktivator und Kollagenase in den EC (RIFKIN et al., 1990). Außerdem erhöht er auch die Rezeptordichte für Plasminogen-Aktivatoren auf der EC.

Die Proteasenfreesetzung führt zum Abbau der Basallamina der Gefäße, und der Prozeß der Angiogenese beginnt.

## **2.2. Regulatorstoffe im Prozeß der Angiogenese**

Die Regulation der Angiogenese unterliegt einem weiten Spektrum biologischer Prozesse und ist v.a. abhängig von dem Verhältnis ihrer Stimulatoren und Inhibitoren. Im gesunden Organismus scheint eine Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Faktoren zu existieren (FOLKMAN u. SHING, 1992).

Die Angiogenesefaktoren werden von gesunden Zellen sowie von Tumorzellen freigesetzt. Zu den Wirtszellen, die solche Moleküle sezernieren, gehören EC, Epithelzellen, Mesothelzellen, Leukozyten sowie Makrophagen (FOLKMAN, 1986 u. 1995; ELLIS u. FIEDLER, 1996).

### 2.2.1. Angiogenese-Stimulatoren

Bei den Stimulatoren der Angiogenese unterscheidet man zwischen direkten und indirekten Stimulatoren (FOLKMAN u. SHING, 1992; KLAGSBRUN u. D'AMORE, 1991). Die Einteilung erfolgt dabei anhand der Zielzellen, auf die die einzelnen Stoffe wirken. Diese Zielzellspezifität kann durch in vitro-Versuche bestimmt werden.

**Direkte Faktoren** stimulieren das Wachstum von EC, sowohl in vivo, als auch in vitro. Sie wirken somit direkt an der EC.

Zu dieser Gruppe gehören: Angiopoietin, aFGF, bFGF, PD-ECGF, TGF $\alpha$ , VEGF

Der Wachstumsfaktor *bFGF* gehört zu den am besten untersuchten Stimulatoren. Er fördert nicht nur die EC-Proliferation wie -Migration, er induziert auch die Freisetzung von Plasminogen-Aktivator aus der EC (MONTESANO, 1986). Seine wachstumsstimulierende Wirkung ist dabei nicht nur auf EC beschränkt.

Fehlt einem in vivo aktiven Angiogenese-Stimulator die Fähigkeit, EC in vitro zum Wachstum anzuregen, so bezeichnet man ihn als **indirekten Faktor**. Die EC-Proliferation, die man in vivo beobachtet, scheint demnach durch andere Zellen/Faktoren induziert zu sein. Der indirekte Angiogenesefaktor wirkt z.B. auf Makrophagen und veranlaßt diese zur Freisetzung von direkten Faktoren. Diese wiederum können die EC dann direkt zum Wachstum stimulieren.

Zu dieser Gruppe gehören: TNF $\alpha$ , EGF, Angiogenin

### 2.2.2. Angiogenese-Inhibitoren

Bei den Inhibitoren der Angiogenese sind mehrere Wirkungsmechanismen zu unterscheiden. Die einzelnen Angiogenese-Inhibitoren verfügen nicht nur über einen Mechanismus um die Gefäßbildung zu unterbinden, sondern ihr Wirken ist oftmals sehr komplex gestaltet (AUERBACH u. AUERBACH, 1994). Sie können direkt an der EC wirken und somit die Aktivierung, Migration und Proliferation von EC verhindern. Desweiteren sind sie auch in der Lage die Freisetzung von Proteasen, welche die Basallamina abbauen und somit die Angiogenesekaskade starten, sowie die Freisetzung von Wachstumsstimulatoren zu inhibieren.

So inhibiert *Thrombospondin* nicht nur den Abbau der Basallamina durch Freisetzung von Plasminogenaktivator-Inhibitoren, welche die Protease-Aktivität blocken, sondern hemmt auch die FGF-induzierte EC-Proliferation (BAGAVANDOSS u. WILKS, 1990; BAGAVANDOSS et al., 1993; TARABOLETTI et al., 1990). Desweiteren stellten GOOD et al. (1990) die Hypothese auf, daß Tumorsuppressorgene ihre Wirkung u.a. über Thrombospondin ausüben.

Der *cartilage-derived inhibitor* wurde von MOSES et al. (1990) als ein Angiogenese-Hemmstoff in vivo identifiziert. Auch er übt seine Wirkung einerseits direkt an der EC aus und hemmt somit deren Proliferation und Migration, andererseits wirkt er indirekt als Kollagenase-Inhibitor einem Abbau der Basallamina und somit dem Beginn der Angiogenese entgegen (MOSES et al., 1990; TAKIGAWA et al., 1990).

Einen anderen Wirkmechanismus besitzen *Interferone*. Ihre Inhibition der tumor-induzierten Angiogenese ist speziesspezifisch, was SIDKY u. BORDEN (1987) zu der Hypothese veranlaßte, daß Interferone die angiogenesestimulierenden Signale, die von einem Tumor ausgehen, modulieren, in dem sie die Wachstumsfaktorsynthese unterdrücken.

Zu den Inhibitoren gehören weiterhin: Angiostatin, Plättchenfaktor 4

### 2.2.3. Bifunktionale vaskuläre Wachstumsfaktoren

Verschiedene Wachstumsfaktoren modulieren die Angiogenese positiv wie auch negativ. Dazu zählen TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$ .

Der Wachstumsfaktor *TGF- $\beta$*  stimuliert die Angiogenese in vivo und induziert die tube formation der Kapillaren in vitro (MADRI et al., 1988). Bei anderen Untersuchungen stellte sich aber auch eine inhibierende Wirkung von TGF- $\beta$  auf die EC-Proliferation und EC-Migration in vitro heraus, so daß ein Angiogenese-Stop in vitro resultiert (MÜLLER et al., 1987). Ein Erklärungsansatz dieses paradoxen Effektes ist der Vorgang der Angiogenese selber. So läßt sich dieser Prozeß grob in zwei Phasen einteilen: die EC-Proliferation und die EC-Differenzierung. Es wird vermutet, daß TGF- $\beta$  die Differenzierung der EC durch Inhibition der Proliferation und Migration erleichtert (MADRI et al., 1988; KLAGSBRUN u. D'AMORE, 1991).

*TNF- $\alpha$*  stellt sich ebenso als ein Inhibitor der EC-Proliferation in vitro, aber auch als ein Stimulator der Angiogenese in vivo dar (FRÄTER-SCHRÖDER et al., 1987). Die angiogenetische Eigenschaft scheint im Zusammenhang mit der Leukozyteninfiltration (z.B. bei Entzündungen) zu stehen (s.2.2.1., S.13 ff).

## 2.3. Klinische Bedeutung der Angiogenese

Die Vorgänge während der Angiogenese haben Bedeutung in der Klinik gewonnen. Dabei kann man zwischen drei Anwendungsbereichen unterscheiden (FOLKMAN u. SHING, 1992):

### 1. Die Beurteilung der Angiogenese in der Diagnostik

Die Bestimmungen von angiogenetischen Peptiden im Serum, Urin und der Cerebrospinalflüssigkeit könnten als prognostische Tumormarker bedeutsam werden.



In einer klinischen Studie wurde im Urin gesunder Personen eine bFGF-Konzentration von 197 pg/g nachgewiesen. Dieser bFGF-Wert steigt bei Patienten, die an verschiedenen Tumorerkrankungen leiden, über das Doppelte an (NGUYEN et al., 1992). Im Blutserum und der Cerebrospinalflüssigkeit sind bei gesunden Personen keine bFGF-Konzentrationen meßbar. Eine nachweisbare Menge an bFGF im Serum zeigt sich bei 6% der in der Studie von WATANABE et al. (1992) untersuchten Patienten mit Brustkrebs. In einer Untersuchung von Gehirntumorpatienten zeigt sich bei 62% der erkrankten Personen eine detektierbare Menge an bFGF in der Cerebrospinalflüssigkeit (LI et al., 1994).

Eine weitere Methode stellt die Auszählung von Mikrogefäßen in histologischen Schnitten von Tumorgewebe dar. Bei der Mehrzahl der untersuchten Tumorentitäten zeigte sich eine proportionale Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Mikrogefäße und dem Metastasenrisiko (WEIDNER et al., 1991 u. 1993).

## 2. Die Beschleunigung der Angiogenese im Prozeß der Wundheilung

Unabhängige klinische Studien am Menschen zeigten eine Verkleinerung bis Heilung von Ulzerationen im Magen und Duodenum durch die Verabreichung einer säurestabilen Variante des bFGF (HULL et al., 1994; WOLFE et al., 1994).

## 3. Die Inhibition der Angiogenese in der Tumortherapie

Verschiedene, oben beschriebene Forschungsergebnisse zeigen die enge Verknüpfung zwischen dem Tumor sowie seinen Metastasen und dem Prozeß der Angiogenese.

Auf diesen Grundlagen prägte FOLKMAN (1971) den Begriff der „Anti-Angiogenese“. Mit diesem Begriff beschreibt er die Verhütung der Einsproßung neuer Blutgefäße in Tumore. Sollte der Tumor in einem nichtvascularisierten Stadium persistieren, so ergeben sich daraus verschiedene theoretische Vorteile:

- Dem Tumor fehlt die Möglichkeit zu metastasieren.
- Der Tumor scheint einer Chemotherapie besser zugänglich zu sein.
- Ein nicht-vascularisierter Tumor ist stärker den zellulären Immunmechanismen ausgesetzt. Lymphozyten können den Tumor durch ihre Migrationsfähigkeit erreichen und attackieren. Der Tumor kann durch das Fehlen von Blutgefäßen die Immunüberwachung durch den Wirt nur schwer umgehen. So kann er z.B. keine löslichen Tumorantigene abgeben, die ihn schützen würden.

Die Anti-Angiogenese kann somit eine wichtige Ergänzung in der Tumortherapie darstellen.

Ein Beispiel der effektiven Anwendung eines Angiogenese-Inhibitors zeigten EZEKOWITZ et al. (1992). Unter der Applikation von Interferon  $\alpha$ -2a bildeten sich Hae-

mangiome bei Kindern zurück. Die anti-angiogenetische Therapie wies dabei nur eine schwache Toxizität auf.

## **2.4. VEGF und seine Rezeptoren**

### 2.4.1. Historischer Überblick

SENGER et al. (1983) beschrieben ein Protein, welches die Gefäßpermeabilität in der Haut von Meerschweinchen steigert. Das Protein erhielt, auf Grund dieser Eigenschaft, den Namen VPF, vascular permeability factor.

VPF konnte aus den Kulturmedien verschiedener Tumorzelllinien, sowie aus der Flüssigkeit einer tumorbedingten Ascites (Hepatocarcinom-Zelllinie 10 beim Meerschweinchen) gewonnen werden. Die Reinigung des Proteins erfolgte dabei säulenchromatographisch, sowie elektrophoretisch (SDS-Page) und ergab ein Molekulargewicht von 34.000-42.000 D.

Mit Hilfe des Miles-Test (Test, mit dem die Extravasation eines zirkulierenden Farbstoffes in der Haut eines Versuchstieres visualisiert wird) wurde die Steigerung der Gefäßpermeabilität in der Meerschweinchenhaut untersucht. Dabei zeigte sich schon nach einer Minute eine deutliche Steigerung der Permeabilität dermalen Gefäße, die ihr Maximum innerhalb von 5-10 min. nach der Injektion von Tumorascitesflüssigkeit erreichte.

SENGER et al. (1983) beschrieben auch einen Ak gegen VPF, für dessen Entwicklung Kaninchen mit dem gereinigten VPF immunisiert wurden. Das aus dem Kaninchen gewonnene IgG bindet und neutralisiert VPF.

FERRARA u. HENZEL (1989) und PLOUET et al. (1989) berichteten unabhängig voneinander über die Reinigung und Sequenzierung eines endothelspezifischen Mitogens, welches den Namen VEGF bzw. Vasculotropin erhielt.

Bei weiterführenden Untersuchungen von VEGF und VPF zeigte sich, daß es sich bei diesen Proteinen um das gleiche Molekül handelte (LEUNG et al., 1989; KECK et al., 1989).

### 2.4.2. Molekularbiologie von VEGF

KECK et al. (1989) beschrieben VEGF aufgrund molekularer Übereinstimmungen als ein neues Mitglied der PDGF-Familie. So besteht eine 18%-ige Homologie zwischen VEGF

und PDGF-B. Desweiteren finden sich alle acht Cysteine, sowie die lysin- und argininreichen Regionen im C-terminalen Ende der Polypeptidkette von PDGF-B in der von VEGF wieder. Bei beiden Wachstumsfaktoren handelt es sich um basische Dimere. So definierten FERRARA u. HENZEL (1989) und PLOUET et al. (1989) VEGF als ein Homodimer, welches aus zwei Untereinheiten mit je einem Molekulargewicht von 23 kD besteht. Die Dimere weisen in beiden Fällen eine Hitze- und Säurestabilität auf, lassen sich aber mit Hilfe von reduzierenden Agenzien (z.B.  $\beta$ -Dimerkaptoethanol) inaktivieren, was beweist, daß die Untereinheiten durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und nur als Dimere aktiv sind (FERRARA u. HENZEL, 1989; PLOUET et al., 1989; RAINES u. ROSS, 1982; FERRARA et al., 1991 b; STILES, 1983).

Das VEGF-Molekül besitzt weiterhin eine N-terminale Sequenz, eine Affinität zu Thiolen (PLOUET et al., 1989) und verfügt über die Eigenschaft, Heparin zu binden (FERRARA u. HENZEL, 1989).

VEGF gehört in die Gruppe der Glykoproteine, wobei die Anzahl an Aminosäuren variieren kann (LEUNG et al., 1989; FERRARA et al., 1991 b). Bei der Transkription von einem einzelnen VEGF-Gen des Menschen, welches acht Exone enthält, können fünf verschiedene Isoformen der mRNA auftreten. Die durch alternatives Splicen entstandenen Isoformen codieren fünf VEGF-Moleküle, die sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren unterscheiden. TISCHER et al. (1991) beschrieben die Charakterisierung von drei VEGF-Isoformen, deren Proteine aus 165, 189 bzw. 121 Aminosäuren bestehen. Eine vierte Form wurde von HOUCK et al. (1991) identifiziert. Sie setzt sich aus 206 Aminosäuren zusammen. Die fünfte VEGF-Form wurde von POLTORAK et al. (1997) entdeckt und besteht aus 145 Aminosäuren.

Die obengenannten Eigenschaften treffen v.a. auf die VEGF-Splicevariante mit 165 Aminosäuren zu, welches die vorrangige Form im Organismus des Menschen ist (FERRARA et al., 1991 b).

Die Isoform mit 121 Aminosäuren kommt vorrangig in der Plazenta vor. Diese Variante ist schwach sauer und bindet nicht an Heparin (HOUCK et al., 1991 u. 1992).

Die aus 206 Aminosäuren bestehende Form wurde bisher nur in fetaler Leber des Menschen nachgewiesen (HOUCK et al., 1991).

Die VEGF-Splicevarianten mit 206 und 189 Aminosäuren sind beide stärker basisch als die Form mit 165 Aminosäuren und binden beide Heparin mit einer größeren Affinität (HOUCK et al., 1992).

Die beiden kürzeren Varianten, mit 121 und 165 Aminosäuren, werden sezerniert, während die beiden längeren Isoformen, mit 189 und 206 Aminosäuren, zellassoziert vorliegen (HOUCK et al., 1991).

Das zuletzt entdeckte Splicevariante mit 145 Aminosäuren wird sezerniert, bindet an Heparin und kann, im Gegensatz zu den anderen Formen, auch an extrazellulärer Matrix

binden (POLTORAK et al., 1997).

Die Glykosylierung des Moleküls hat keinen Einfluß auf seine Funktion als EC-spezifisches Mitogen (PERETZ et al., 1992). Sowohl in der N-glykosylierten Form wie auch deglykosyliert bindet VEGF an EC und erhöht deren Permeabilität.

Die Aminosäuren Arg<sub>82</sub>, Lys<sub>84</sub> und His<sub>86</sub> sind entscheidend für die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren (KEYT et al., 1996). Diese AS liegen in einer Haarnadelkrümmung in jedem der beiden Monomere vor. VEGF besitzt demnach zwei Bindungsstellen für seine Rezeptoren.

#### 2.4.3. Biologische Aktivität von VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF übt einen entscheidenden Einfluß auf EC aus. Er ist in der Lage, sowohl die Proliferation, als auch die Migration von EC zu stimulieren (SENGER et al., 1983; FERRARA et al., 1991 b). Dabei agiert er als „survival factor“ für die EC (ALON et al., 1995; BENJAMIN u. KESHET, 1997). Bei fehlendem VEGF kommt es zur Apoptose der EC.

In Kombination mit anderen Angiogenesefaktoren, wie bFGF, wirkt VEGF synergistisch (PEPPER et al., 1992; GOTO et al., 1993). In dreidimensionalen Zellkulturen (z.B. Kollagen) kann er außerdem die Gefäßsprossung induzieren (PEPPER et al., 1992).

Im Gegensatz zu anderen Angiogenesefaktoren, wie z.B. bFGF, besitzt VEGF eine hohe Zellspezifität. Er stimuliert die Proliferation von EC aus verschiedenen Organen, so z.B. von EC der Kapillaren im cerebralen Cortex, von EC in der Aorta vom Fötus/Adulten und von EC in der Umbilicalvene. Eine Stimulation unterbleibt jedoch bei anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, Nebennierenrindenzellen und Sarcomzellen (FERRARA u. HENZEL, 1989; FERRARA et al., 1991 b). Diese Untersuchungen beweisen die Spezifität von VEGF für EC.

Die Wirkung von VEGF in vivo wurde erstmals von LEUNG et al. (1989) bewiesen. Nach Applikation von VEGF auf die Chorionallantoismembran eines acht Tage alten Hühnerembryonens kam es zu einer merklichen Steigerung der Angiogenese.

Bei VEGF handelt es sich, im Gegensatz zu anderen Angiogenesefaktoren wie z.B. FGF oder PD-ECGF, um ein Protein, welches sezerniert wird (LEUNG et al., 1989).

Dabei kann die Sekretion von verschiedenen normalen Zellen, sowie Tumorzellen ausgehen (SENGER et al., 1983; KECK et al., 1989; DVORAK et al., 1991). Zu den VEGF-produzierenden Zellen im gesunden Organismus gehören: Keratinozyten in der Haut (BROWN et al., 1992 b), glatte Muskelzellen in Gefäßen (TISCHER et al., 1991), Astrozyten im Gehirn (IJICHI et al., 1995), T-Lymphozyten (FREEMAN et al., 1995), Mesangiumzellen in der Niere (BROWN et al., 1992 a; IJIMA et al., 1993) und Makrophagen als Zellen des peripheren, mononukleären Phagozytensystems (IJIMA et al., 1993).

An der Regulation der Expression von VEGF-Genen, sowie der Sekretion von VEGF sind mehrere Mechanismen beteiligt:

Die Hauptrolle dabei übernimmt **Sauerstoff**. SHWEIKI et al. (1992) zeigten, daß die Sauerstoffkonzentration einen reversiblen Regulator darstellt. In verschiedenen Zellkulturen stieg die mRNA-Konzentration von VEGF merklich an, nachdem die Zellen eine zeitlang hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren. Die Expression der mRNA ging, nach Erhöhen der Sauerstoffkonzentration, wieder auf ihren ursprünglichen Level zurück. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß die erhöhte VEGFmRNA-Konzentration durch zwei Mechanismen verursacht wird: Erstens steigt die Transkriptionsrate und zweitens, und dies scheint der bedeutsamere Faktor zu sein, erhöht sich die Stabilität der mRNA, d.h. ihre Halbwertszeit wird länger (IKEDA et al., 1995; STEIN et al., 1995; LIU et al., 1995).

Einen weiteren Regulationsmechanismus besitzen **Cytokine und andere Wachstumsfaktoren**. So zeigt sich eine Induktion der VEGFmRNA-Expression durch TGF- $\alpha$  (DETMAR et al., 1994 u. 1995), EGF (GOLDMAN et al., 1993; FRANK et al., 1995; DETMAR et al., 1995), TGF $\beta$  (BROGI et al., 1994; FRANK et al., 1995), IL-1b (LI et al., 1995), IL-6 (COHEN et al., 1996), PDGF (BROGI et al., 1994) und TNF $\alpha$  (FRANK et al., 1995). Von diesen genannten Faktoren steigern aber nur TGF $\alpha$  und EGF die Sekretion von VEGF (DETMAR et al., 1995), sowie IL-1b (LI et al., 1995). Desweiteren können Entzündungsmediatoren die Angiogenese induzieren. PGE2 und IL-1 sind in der Lage, die VEGF-Expression zu stimulieren (BEN-AV et al., 1995).

Eine Steigerung der VEGFmRNA-Expression zeigt sich ebenfalls durch **Östrogen**, einem Steroidhormon. So wurde in einer in vitro-Studie die VEGF-Expression von Endometriumzellen durch Östrogen induziert (SHWEIKI et al., 1993).

Auch auf **molekulargenetischer Ebene** findet eine Kontrolle der VEGF-Expression statt. So zeigt sich bei zellulärer Transformation durch aktivierte Oncogene (ras, raf, v-Src) oder SV40 Transformation eine gesteigerte VEGF-Expression (ZHANG et al., 1994; GRUGEL et al., 1995; RAK et al., 1995; MUKHOPADHYAY et al., 1995). Ebenso führt der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53) zu einer Induktion der Expression von VEGF mRNA (KIESER et al., 1994).

Die **Zelldifferenzierung** scheint eine weitere wichtige Rolle in der Regulation der VEGF-Expression zu spielen. CLAFFEY et al. (1992) zeigten dies anhand der Differenzierung von Adipozyten. Während diesen Prozesses steigt die VEGFmRNA-Expression merklich an.

#### 2.4.4. Vorkommen

Der Wachstumsfaktor VEGF wurde in den verschiedensten Geweben nachgewiesen (s.Tabelle 1, S.21 u. 22). Dabei kamen die unterschiedlichsten Nachweismethoden zur Anwendung. Oft wurden dabei polyklonale Ak verwendet, welche nicht von hoher Spezifität sind.

**Tabelle 1:** Expression der mRNA und des Proteins von VEGF in verschiedenen Geweben des Menschen (Legende s.S.22)

Organ	Nachweis der mRNA mit ISH/ NB/ RT-PCR & Nachweis des VEGF-Proteins mit IP/ IFA/ IHC/ ICC	mRNA	Protein
Bauchspeicheldrüse	in den Langerhans'schen Inselzellen sowie in den Gangepithelien (ITAKURA et al., 2000)	x	x
Enddarm	in den glatten Muskelzellen (BROWN et al., 1997)	x	x
Gebärmutter	in den glatten Muskelzellen des Myometriums (BROWN et al., 1997)	x	x
Gehirn	in den Astrozyten (IJICHI et al., 1995)	x	
Haut	in den Keratinozyten (BROWN et al., 1992 b)	x	x
Herz	in den Myozyten (BERSE et al., 1992)	x	
Hoden	in den Leydig'schen Zellen u. den Sertolizellen (ERGÜN et al., 1997)	x	x
Leber	in den Hepatozyten (BERSE et al., 1992)	x	
Lungen	in den Alveolen (BERSE et al., 1992)	x	
Magen	in der Mukosa (BERSE et al., 1992)	x	
Makrophagen	positiv (IJIMA et al., 1993)	x	x
Mastzellen	positiv (YAMADA et al., 1998)		x
Megakaryozyten	positiv (KATOH et al., 1995)	x	
Milz	positiv (BERSE et al., 1992)	x	

Organ	Nachweis der mRNA mit ISH/ NB/ RT-PCR & Nachweis des VEGF-Proteins mit IP/ IFA/ ICH/ ICC	mRNA	Protein
Nebenhoden	in den Zellen d. Ausführungs- und d. Nebenhodenganges (ERGÜN et al., 1998)	x	x
Nebennieren	in dem Kortex (BERSE et al., 1992)	x	
Netzhaut	in den Zellen des Pigmentepithels (GUERRIN et al., 1995)	x	x
Nieren	in den Glomeruli (BERSE et al., 1992; SIMON et al., 1995), den Mesangiumzellen (IJIMA et al., 1993; BROWN et al., 1992 a) u. den Zellen des Sammelrohres (SIMON et al., 1995)	x	x
Prostata	in den Epithelzellen (BROWN et al., 1995)	x	x
Samen	alle Fraktionen positiv, v.a. Prostata- u. Samenblasendrüsensekrete (BROWN et al., 1995)	x	x
Samenblasendrüse	in den Epithelzellen (BROWN et al., 1995)	x	x
Speichel	positiv (TAICHMAN et al., 1998)	x	
Speicheldrüsen	in den serösen Azinuszellen u. den Zellen der Schalt- u. Streifenstücke (TAICHMAN et al., 1998)	x	x
Thrombozyten	positiv (KATOH et al., 1995)	x	
T- Lymphozyten	positiv (FREEMAN et al., 1995)	x	x
VSM	positiv (TISCHER et al., 1991)	x	x

Abk.:

ICC	=	Immuncytochemie
IFA	=	Immunfluoreszenzassay
ICH	=	Immunhistochemie
IP	=	Immunopräzipitation
ISH	=	in situ-Hybridisierung
NB	=	Northern Blot
RT-PCR	=	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
VSM	=	vasculäre glatte Muskelzellen

#### 2.4.5. VEGF-verwandte Moleküle

Seit 1991 wurden weitere Moleküle entdeckt, die eine starke Homologie zu VEGF aufweisen.

Als erstes wurde die cDNA von **PIGF, Placenta growth factor**, von MAGLIONE et al. (1991) aus einer Plazenta vom Menschen isoliert. Das Protein weist eine 53%ige Homologie zu VEGF auf und liegt wie dieses als Dimer vor. PIGF ist ein Glykoprotein und wird sezerniert. Außerdem besitzt PIGF einen wachstumsstimulierenden Effekt auf EC in vitro. PARK et al. (1994) zeigten drei Jahre später, daß PIGF durch alternatives Splicen seiner mRNA in zwei Isoformen vorliegen kann. PIGF-1 und PIGF-2 bestehen aus 131 bzw. 152 Aminosäuren und stellen Liganden für Flt-1 dar (s.2.4.6., S.24). Es existiert keine Bindung an KDR. Die Isoformen besitzen kaum mitogene oder permeabilitätssteigernde Aktivität. Die Effekte von VEGF werden allerdings von PIGF potenziert. Desweiteren können PIGF und VEGF als Heterodimere vorliegen (DI SALVO et al., 1995). Die mitogene Wirkung dieser Formen ist annähernd so stark wie die von VEGF-Homodimeren.

Fünf Jahre später entdeckten LEE et al. (1996) und JOUKOV et al. (1996) unabhängig voneinander einen neuen Liganden für Flt-4, einem Tyrosinkinase-rezeptor mit hoher Strukturähnlichkeit zu den Rezeptoren von VEGF. Der als **VEGF-related Protein (VRP) bzw. VEGF-C** bezeichnete Wachstumsfaktor wurde aus Gliomzellen des Menschen bzw. Prostatakarzinomzellen des Menschen isoliert und weist eine 30%-ige Homologie zu VEGF auf. Wie auch VEGF wird VEGF-C sezerniert und besitzt mitogene Aktivität. Er stimuliert das Wachstum von EC, sowie deren Migration. In mehreren Geweben des Menschen konnte die Expression der mRNA von VEGF-C nachgewiesen werden. Deutlich war der Nachweis in Herz, Plazenta, Ovarien und Dünndarm. Es wurde vermutet, daß VEGF-C eine Rolle bei der Entwicklung des venösen und lymphatischen Gefäßsystems spielt. Den Beweis lieferten SKOBE et al. (2001). Sie zeigten, daß VEGF-C die Lymphangiogenese im Brusttumorgewebe induziert, was eine verstärkte Metastasierung zur Folge hat. VEGF-C bindet auch an KDR, wobei die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion in vivo noch unbekannt ist.

Ein dritter neuer Wachstumsfaktor für EC wurde von OLOFSSON et al. (1996) entdeckt. Der als **VEGF-B** bezeichnete Faktor liegt zellassoziiert vor und besitzt in seiner Struktur Ähnlichkeiten zu VEGF. Er kommt v.a. im Herzen, Skelettmuskel, Pankreas und in der Prostata vor. In diesen und anderen Geweben liegen VEGF und VEGF-B koexprimiert vor. VEGF-B bildet durch Disulfidbrücken stabilisierte Homodimere, sowie auch Heterodimere mit VEGF. Die Untersuchungsergebnisse lassen auf eine Funktion in der Angiogenese und der EC-Proliferation schließen.

Ein weiteres Mitglied der VEGF-Familie wurde 1998 entdeckt. ACHEN et al. (1998) identifizierten durch Computeranalyse **VEGF-D**, ein EC-Mitogen, welches eine hohe Strukturähnlichkeit zu VEGF-C besitzt. Wie VEGF-C induziert auch VEGF-D die Bildung von Lymphgefäßen innerhalb des Tumorgewebes und fördert weiterhin die Ausbreitung der Tumorzellen über die Lymphgefäße in die Lymphknoten (STACKER et al., 2001). VEGF-



D bindet sowohl an Flt-4 als auch an KDR und induziert die Tyrosinphosphorylierung in und über diese EC-Rezeptoren (ACHEN et al, 1998).

Zu VEGF-D existiert ein Maushomolog, welches als **c-fos-induced growth factor (FIGF)** bezeichnet wird (ORLANDINI et al., 1996).

Das neueste Familienmitglied wird als **VEGF-E** bezeichnet. Dieser Wachstumsfaktor wurde von zwei Teams unabhängig voneinander charakterisiert. So beschrieben sowohl OGAWA et al. (1998) als auch MEYER et al. (1999) VEGF-E als ein Dimer, welches, trotz fehlender Heparinaffinität, einen hohen Mitoseindex besitzt. Somit stimuliert VEGF-E die Proliferation von EC und die Angiogenese. Im Unterschied zu VEGF bindet VEGF-E selektiv an KDR und löst nur hier die Signalkaskade aus.

#### 2.4.6. VEGF-Rezeptoren

TISCHER et al. (1989) stellten die Hypothese auf, daß VEGF auf Grund seiner hohen Zellspezifität seine Wirkung durch spezielle Rezeptoren ausübt.

Erstmalig wurde über die Existenz solcher Rezeptoren 1990 berichtet (PLOUET u. MOUKADIRI, 1990; VAISMAN et al., 1990).

Heute steht fest, daß es zwei Rezeptoren für VEGF gibt: Flt-1 (VEGF-Rezeptor-1, VEGFR-1) und KDR (VEGF-Rezeptor-2, VEGFR-2). Desweiteren existiert ein Co-Rezeptor (Neuropilin-1) für die VEGF-Splicevariante mit 165 AS.

1990 wurde von SHIBUYA et al. (1990) durch Cross-Hybridisierung mit dem v-ros-Onkogen ein neues menschliches Gen, welches einen Tyrosinkinase-Rezeptor kodiert, isoliert. Als **Flt-Rezeptor-Gen** bezeichnet, wurde es aus Plazentazellen des Menschen gewonnen und seine Primärstruktur bestimmt.

Erst zwei Jahre später konnten De VRIES et al. (1992) beweisen, daß es sich bei **Flt** (fms-like tyrosine kinase) um einen Rezeptor für VEGF handelt. Zum Nachweis dienten Flt-transfizierte COS-Zellen, an denen, im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen, radioaktivmarkiertes VEGF mit hoher Affinität band.

Das **KDR-Gen** (kinase-insert-domain-containing-receptor) wurde von TERMAN et al. (1991) mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion aus Endothelzellen des Menschen gewonnen und identifiziert.

Seine Funktion als VEGF spezifischer Rezeptor stellte sich in einem Versuch mit KDR-transfizierten CMT-3-Zellen ein Jahr später heraus (TERMAN et al., 1992). Auch hier konnte die Fähigkeit zur Bindung von radioaktivmarkierten VEGF nachgewiesen werden, welche den nicht-transfizierten Zellen fehlt.

Desweiteren existiert ein Maushomolog zu KDR. Der als **Fik-1** (fetal-liver kinase) bezeichnete Rezeptor wurde aus einem fetalen murinen Leberzellstamm geklont (MATTHEWS et al., 1991) und besitzt eine starke Übereinstimmung mit dem KDR. Auch Fik-1 besitzt eine große Affinität zu VEGF (MILLAUER et al., 1993).

Die VEGF-Rezeptoren gehören in die Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (SHIBUYA et al., 1990; MATTHEWS et al., 1991; TERMAN et al., 1991). Nach einer Klassifikation der Rezeptoren von FANTL et al. (1993) kann man diese in neun Subfamilien einteilen. Die Einteilung erfolgt dabei anhand von strukturellen Unterschieden im Rezeptoraufbau. Die VEGF-Rezeptoren gehören der Subklasse V an. In diese Kategorie gehört weiterhin der **Flt-4**-Rezeptor (VEGF-Rezeptor 3, VEGFR 3). Er weist große Ähnlichkeiten in der Struktur zu den anderen beiden VEGF-Rezeptoren auf. VEGF stellt jedoch im Gegensatz zu KDR und Flt-1 keinen Liganden für Flt-4 dar. Dieser dritte Rezeptor der Subklasse V besitzt andere, dem VEGF ähnliche Bindungspartner (s.2.4.5., S.22 ff; KAIPAINEN et al., 1995).

Eine Besonderheit stellt **Neuropilin-1**, ein Rezeptor für die Semaphorin/Collapsin-Familie, dar (LUO et al., 1993). SOKER et al. (1998) identifizierten Neuropilin-1 als einen weiteren VEGF-Rezeptor, wobei dieser ausschließlich die VEGF-Isoform mit 165 Aminosäuren bindet. Eine Co-Expression von Neuropilin-1 und KDR auf EC steigert die Bindung von VEGF an KDR um das 4-fache.

#### *2.4.6.1. Struktur und Molekularbiologie von KDR*

Der KDR besteht aus drei Untereinheiten: einem extrazellulären Teil, einem transmembranären Teil und einem intrazellulären Teil (TERMAN et al., 1991 u. 1992; s. Abb.2, S.26). Der extrazelluläre Teil besteht aus sieben Ig-ähnlichen Schleifen, wobei die Domänen 2 und 3 für die VEGF-Bindung an den Rezeptor verantwortlich sind (FUH et al., 1998). Die intrazelluläre Rezeptordomäne besitzt die Tyrosinkinase, welche durch einen Kinase-Einfügungsteil unterbrochen ist.

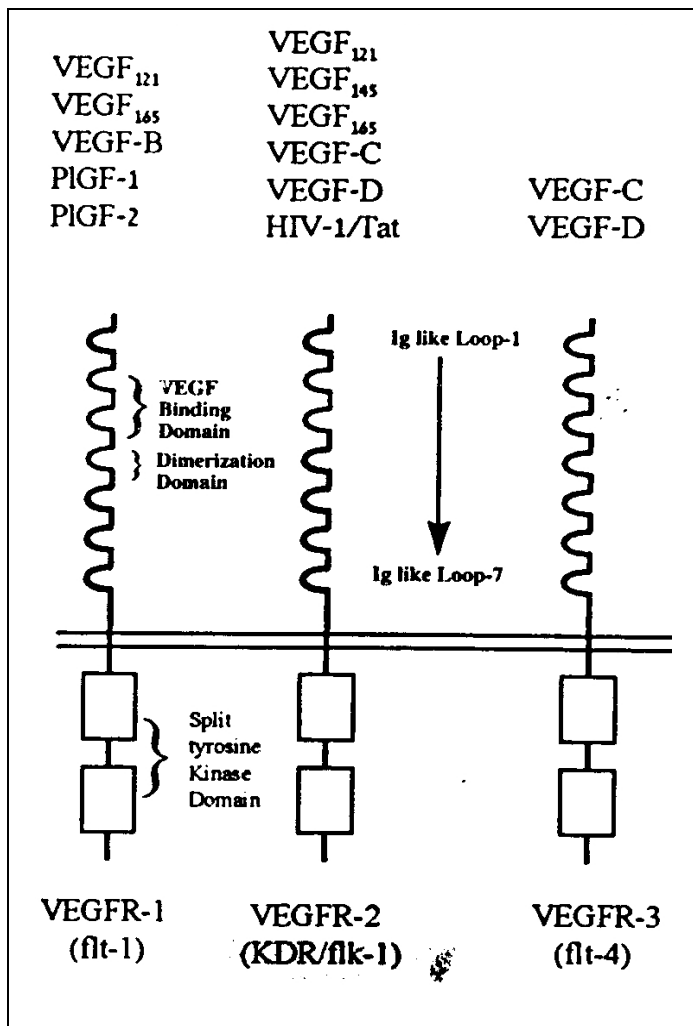


Abb.2: Darstellung der Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie und ihrer drei Tyrosinkinase-Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3) mit ihren strukturellen Hauptcharakteristika (NEUFELD et al., 1999)

#### 2.4.6.2. Signalkaskade

Damit VEGF seine Funktion als Wachstumsfaktor an der EC ausüben kann, müssen die extrazellulären Signale in intrazelluläre Signale umgewandelt werden. Dies wird durch die Rezeptoren vermittelt. Bei Untersuchungen von OLANDER et al. (1991) zeigten sich 900-4600 Rezeptoren für VEGF auf einer Zelle. Die Dissoziationskonstante  $K_d$ , ein Affinitätsmerkmal, beträgt dabei 4-41 pM. Somit besitzt diese Bindung eine sehr hohe Affinität (bei einer  $K_d < 10$  nmol liegt eine hohe Affinität vor; REHM, 1997).

VEGF besitzt zwei Bindungsstellen für KDR. Erst wenn ein VEGF-Dimer zwei Rezeptoren bindet, werden diese aktiviert (KEYT et al., 1996).

Durch die Bindung von VEGF an den Rezeptor kommt es zu verschiedenen Interaktionen mit der Endothelzelle (s. Abb. 3; CONNOLLY, 1991):

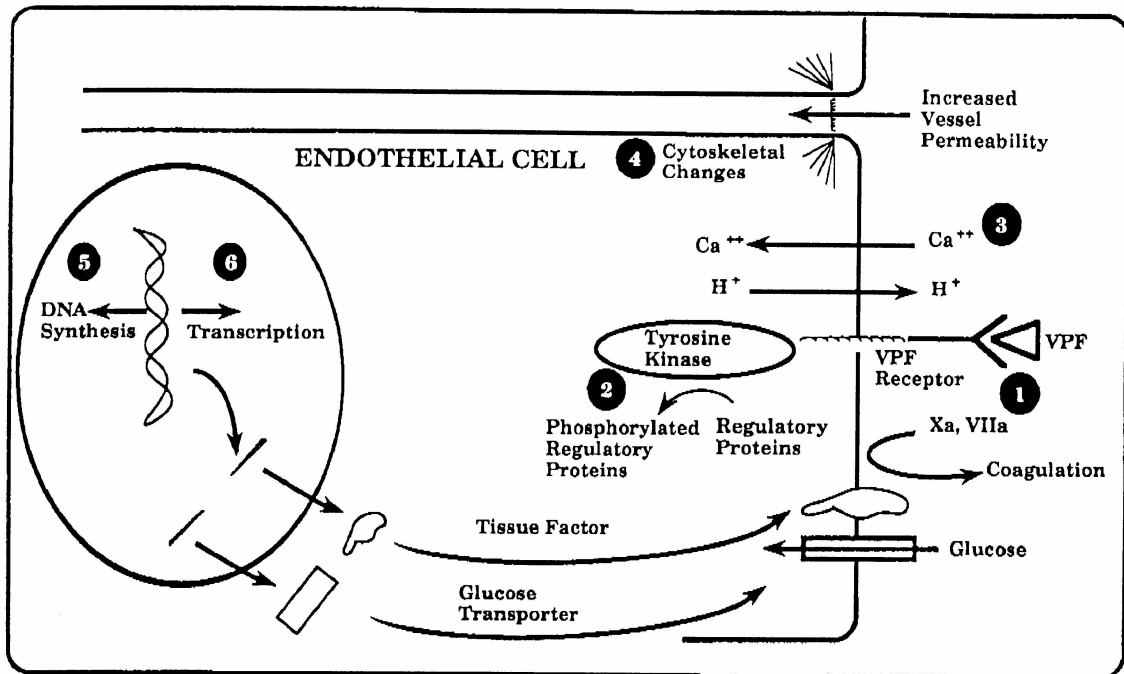


Abb.3: Interaktionen zwischen VEGF und EC

1 VEGF bindet an Rezeptoren., 2 Die Rezeptorbindung aktiviert die Tyrosinkinase und Proteine werden phosphoryliert., 3 Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der pH und die Inositoltriphosphate steigen an., 4 Die Gefäßpermeabilität wird durch Veränderungen im Cytoskelett erhöht., 5 DNA-Synthese und Mitose beginnen., 6 Die Transkriptionsrate der Gene für die Gewebefaktoren und den Glucosetransporter ist erhöht und somit steigt die intrazelluläre Glucosekonzentration. Außerdem wird die Koagulation initiiert.

- Durch die Ligand-Rezeptor-Bindung kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors (WALTENBERGER et al., 1994). So konnten DOUGHER-VERMAZEN et al. (1994) verschiedene Tyrosine in dem zytosolischem Rezeptorteil nachweisen, welche einer Autophosphorylierung unterliegen.
- Desweiteren wird die Phosphoinositidkaskade aktiviert. So bewiesen GUO et al. (1995) die Induktion der Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase durch VEGF. Das somit aktivierte Enzym phosphoryliert Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, welches das Substrat für die Phospholipase C darstellt. Auch dieses Enzym wird durch VEGF stimuliert (FERRARA et al., 1991 a; BROCK et al., 1991) und hydrolysiert Inositolphospholipide der Zellmembran, in deren Folge es zur Öffnung von Calciumkanälen kommt. BROCK et al. (1991) beschrieben einen parallelen intrazellulären Anstieg der Inositoltrisphosphat- und Calciumionenkonzentration, wobei letztere

von einer verstärkten Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wie auch durch einen vermehrten Influx in die Zelle herrühren. Die sich an den Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -konzentration anschließende Kontraktion glatter Muskelzellen führt zu einer Veränderung des Cytoskeletts und daraus resultierend zu einer erhöhten Zellpermeabilität (WALTENBERGER et al., 1994; CONNOLLY, 1991).

- VEGF steigert die Tyrosinkinase-Aktivität in der Zelle, so daß es zur Phosphorylierung der Tyrosinreste verschiedener Cytoplasmaproteine kommt (GUO et al., 1995).
- PEKALA et al. (1990) bewiesen eine Stimulation des Glucosetransportes in die Zelle durch VEGF. Auch die Gene, die die Glucosetransporter codieren, werden aktiviert, so daß es zu einer Steigerung der DNA-Synthese und zu einem nachweislichen Anstieg der mRNA für die Glucosetransporter kommt.
- Einige Zellantworten unter VEGF-Einfluß entsprechen denen im Entzündungsverlauf. So zeigt sich z.B. eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität unter VEGF wie auch im frühen Stadium einer Entzündung. Desweiteren stimuliert VEGF die Expression von Gewebefaktor (tissue factor), welcher mit Gerinnungsfaktoren interagieren oder die Koagulation initiieren kann. Auf Monozyten wirkt VEGF chemotaktisch und aktivierend. Die Aktivität von VEGF wird von TNF gesteigert; beide Mediatoren wirken synergistisch und potenzieren ihre Auswirkungen auf die Zelle, wie die Induktion von Gewebefaktor und Steigerung der Koagulation (CLAUSS et al., 1990). Durch die Aktivierung von Phospholipase  $A_2$  kann VEGF auch die Synthese von Prostacyclin stimulieren (WHEELER-JONES, 1997).
- Im Verlauf des Calciumeinstromes kommt es zu einem Efflux von Wasserstoffionen und somit zu einem Anstieg des intrazellulären pH (CONNOLLY, 1991).
- Es wird ferner von-Willebrand-Faktor freigesetzt (BROCK et al., 1991). Dieser Faktor besitzt zwei Funktionen in der Hämostase: So ist er erstens erforderlich für die Adhäsion von Thrombozyten an verletzten Gefäßwänden und zweitens stellt er einen Carrier für den Gerinnungsfaktor VIII dar, welchen er auch stabilisiert.

#### 2.4.6.3. Vorkommen von KDR

In einer 1992 veröffentlichten Studie wurden VEGF-Bindungsstellen nur in den Endothelien nachgewiesen (JAKEMAN et al., 1992). Erst 1997 zeigten BROWN et al. (1997) auch eine Expression der KDR mRNA in glatten Muskelzellen der Gebärmutter und stellten mit diesem Ergebnis die begrenzte Lokalisation von KDR in Endothelien in Frage.

Es existieren bisher nur wenige Untersuchungsergebnisse über das Vorkommen des VEGF-Rezeptors *KDR* in den verschiedenen Geweben (s. Tabelle 2). In den meisten vorliegenden Studien wurde der *KDR* über seine mRNA nachgewiesen. Es liegen einzelne Veröffentlichungen über den Nachweis des *KDR*-Proteins mit Hilfe polyklonaler Ak vor.

**Tabelle 2:** Expression der mRNA und des Proteins von *KDR* in verschiedenen Geweben des Menschen

Organ	Nachweis der mRNA von <i>KDR</i> mit ISH/ NB/ RT-PCR & Nachweis des <i>KDR</i> -Proteins mit IHC	mRNA	Protein
Bauchspeicheldrüse	in den Langerhans'schen Inseln und den Gang-epithelien (ITAKURA et al., 2000)	x	x
Gebärmutter	in den glatten Muskelzellen des Myometriums (BROWN et al., 1997)	x	
	in dem proliferierenden Endometrium (MENRAD et al., 1997)		x
Haut	in den dermalen Gefäßen (DETMAR et al., 1997)	x	
Hoden	in den EC, den perivaskulären Zellen der Lamina propria der Tubuli seminiferi, den Leydig'schen Zellen u. den Sertolizellen (ERGÜN et al., 1997)	x	x
Megakaryozyten	positiv (KATOH et al., 1995)	x	
Nebenhoden	in den EC, den Epithelzellen der Ausführungsgänge u. den Basalzellen des Nebenhodenganges (ERGÜN et al., 1998)	x	x
Netzhaut	in den Zellen des Pigmentepithels (GUERRIN et al., 1995)	x	
Nieren	in den Glomerulumentothelien u. den peritub. Kapillaren (SIMON et al., 1995)	x	
Thrombozyten	positiv (KATOH et al., 1995)	x	

Abk.:

- IHC = Immunhistochemie  
 ISH = in situ-Hybridisierung  
 NB = Northern Blot  
 RT-PCR = reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

#### 2.4.7. Bedeutung von VEGF für neue Therapiestrategien

- **Induktion der Angiogenese**

Bei einer Patientin, die unter einer arteriellen Verschlusskrankheit litt, wurde ein VEGF-Genstransfer zur Therapie genutzt. Dabei wurde die VEGF-cDNA mit Hilfe eines Ballonkatheters an den stenosierten Gefäßabschnitt gebracht und bewirkte dort innerhalb von vier Wochen eine verstärkte Kollateralbildung (ISNER et al., 1996).

- **Hemmung der Angiogenese**

- Tumortherapie:

Wie oben beschrieben spielt der Wachstumsfaktor VEGF eine Hauptrolle in der Angiogenese. Da er von Tumoren freigesetzt wird, kann er als ein Tumormarker angesehen werden (BREKKEN et al., 1998). Sowohl die VEGF-Bildung als auch die Rezeptordichte von KDR werden in Neoplasien gesteigert (WALTENBERGER et al., 1996). Sie können somit als ein Ziel in der Tumorangiogenese angesehen werden.

1998 berichteten unabhängige Forschungsgruppen über die Wachstumsinhibition von EC durch Blocken der VEGF-Interaktion mit der Zelle:

So beschrieben SIEMEISTER et al. (1998) die Konstruktion eines VEGF-Antagonisten, der die EC-Proliferation inhibiert. Der entwickelte Antagonist besitzt hohe Affinität zu den VEGF-Rezeptoren KDR und Flt-1, aber aktiviert diese nicht. Durch die fehlende Rezeptoraktivierung bzw. -Autophosphorylierung wird die Signalkaskade in der Zelle nicht ausgelöst und die proliferierende Wirkung von VEGF entfällt.

Verschiedene Antikörper wurden von BREKKEN et al. (1998) identifiziert. Dabei wurden sowohl Ak gegen den VEGF-Rezeptor-Komplex als auch gegen das VEGF-Molekül beschrieben. Auch hier konnte das VEGF-induzierte EC-Wachstum in vitro gestoppt werden.

Schon 1993 berichteten unabhängig voneinander zwei Forschungsgruppen über die Wachstumshemmung von Primärtumoren im Tierexperiment durch anti-VEGF-Ak (KIM et al., 1993; KONDO et al., 1993). Seitdem sind weitere monoklonale anti-VEGF-Ak beschrieben worden, die das Wachstum von Tumoren des Menschen im Tiermodell inhibieren (ASANO et al, 1998; BORGSTRÖM et al., 1998; BREKKEN et al., 2000).

WOOD et al. (2000) beschrieben einen neuen Inhibitor des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems, welcher die Aktivität der Tyrosinkinase blockiert und dadurch die EC-Proliferation und -Migration hemmt. Dieser Inhibitor unterdrückt den Prozeß der VEGF-induzierten Tumorangiogenese bei Mäusen nach oraler Applikation.

- Psoriasis-Therapie:

Wie schon im Kapitel 2.1.4. (s.S.10) erwähnt, kommt es im Verlauf der Psoriasis zu einer gesteigerten Angiogenese (DETMAR et al., 1994).

SMYTH et al. (1997) zeigten, daß antisense Oligonucleotide die Expression von VEGF in Zellkulturen aus dermalen Keratinozyten des Menschen unterdrücken und somit die Angiogenese inhibieren. Dies stellt einen neuen möglichen Ansatzpunkt in der Therapie der Psoriasis dar.