

## 1. EINLEITUNG

In der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie spielen Gewebe und Wundheilung eine zentrale Rolle. Durch die Entwicklung von mikrochirurgischem Nahtmaterial und speziellen Instrumenten sowie dem Operationsmikroskop wurde die erste mikrochirurgische Replantation eines Daumens 1965 (57) ermöglicht. Dies eröffnete in der plastischen Chirurgie neue Möglichkeiten. Seit Anfang der 70er Jahre konnten so Rekonstruktionen durch mikrochirurgisch frei transplantiertes Gewebe („Lappenplastiken“) durchgeführt werden. Diese Fortschritte haben die Möglichkeiten in der plastischen Chirurgie dramatisch verändert und erweitert. Mit diesen frei transplantierten Lappenplastiken konnten schwierige Defekte gedeckt, Infektionen bekämpft und Weichteile rekonstruiert werden. Die Erforschung der Blutgefäßanatomie bildete die Grundlage für die Weiterentwicklung einer Vielzahl von Lappenplastiken in allen Körperregionen. Muskulokutane, fasziokutane und össare Lappenplastiken ermöglichten es, die bisher etablierten langwierigen und verlustreichen Techniken mit Rundstiellappen zur Defektdeckung oder Weichteilrekonstruktionen zu ersetzen. Aus anatomischer Sicht sind heute die Grenzen der rekonstruktiven Chirurgie erreicht, ein weiterer Innovationschub ist auf diesem Gebiet nicht zu erwarten. Zwar werden damit viele Probleme in der plastischen Chirurgie gelöst, dennoch können sehr große Defekte, wie zum Beispiel nach schweren Verbrennungen, nicht rechtzeitig rekonstruiert werden. Auch bei Problempatienten mit Gefäßerkrankungen oder belastenden Nebendiagnosen kommen manchmal mikrochirurgische Techniken nicht in Frage. Durch wiederholten Verlust von transplantiertem Gewebe aufgrund von Thrombosen kann irgendwann keine Rekonstruktion mehr erreicht werden. Je nach Gewebetyp und Größe der Lappen bleiben an der Hebestelle Schäden zurück, welche sowohl die Funktion als auch die Ästhetik beeinträchtigen. Deshalb ist die Entwicklung von neuen Techniken, insbesondere in der Revaskularisation und Gewebezüchtung, zur Lösung dieser Probleme notwendig. Dem anatomischen Innovationsschub der 70er Jahre steht heute das Entwicklungspotenzial der molekularbiologischen Methoden gegenüber. Die Erforschung und Kenntnis der Angiogenese und der Reparationsprozesse des Gewebes ist in der plastischen Chirurgie von zentralem Interesse.

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein wichtiger spezifischer endothelialer Mediator und angiogenetischer Induktor *in vivo* und *in vitro*. Er induziert nicht nur die Angiogenese, sondern auch in der Permeabilitätserhöhung der Gefäße. Für den plastischen Chirurgen bietet VEGF völlig neue Perspektiven und viel versprechende Therapieansätze in der rekonstruktiven und regenerativen Chirurgie. Dies gilt nicht nur für Traumen mit schweren Gewebedefekten, sondern auch für die rekonstruktive Chirurgie, sowie für die ästhetisch-plastische Chirurgie. Bei Induktion der angiogenetischen Kaskade würden alle Arten von Lappenplastiken von einer verbesserten Blutversorgung profitieren. Die Nekroseentstehung in kritisch durchblutetem Gewebe könnte reduziert oder gar verhindert werden. Auch bei Wundheilungsstörungen könnte durch eine Verbesserung der Gefäßversorgung die Heilungszeit verkürzt und die Notwendigkeit chirurgischer Interventionen mit Risiken und möglichen Sekundärdefekten reduziert werden. In der Tumorchirurgie könnten Gewebedefekte durch kultiviertes Eigengewebe ersetzt werden.

Diese spezifischen Fragestellungen führen zur Entwicklung neuer Konzepte und einer Erweiterung des Therapiespektrums, welche nachfolgend in Bezug auf VEGF und auf die experimentelle plastisch-rekonstruktive Chirurgie dargestellt werden sollen.

## 1.1 FRAGESTELLUNG IN DER PLASTISCHEN CHIRURGIE

### 1.1.1 Replantations- und Transplantationschirurgie

Die erste erfolgreiche dokumentierte Replantation (1965 durch Komatsu) erfolgte nach einer Daumenamputation. Im August 1975 erfolgte die erste Replantation in Europa. Trotz euphorischer Anfänge bleiben die Probleme bei mikrochirurgischen Eingriffen, wie beispielsweise bei einer Replantation, bestehen. Insbesondere die Gefäßanastomosen bereiten die häufigsten Komplikationen, welche mit einer Inzidenz von 18% bis 43% (2) zu einem Verlust des Replantates führen können. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Technische Mängel der Anastomose, traumatische oder degenerative Gefäßwandschäden abseits der Anastomose, Zirkulationsstörungen, Postischämieschäden, Kompression der Gefäße von außen, Intimaödeme und die daraus resultierenden rheologischen Ver-

änderungen können über die Virchow'sche Trias Thrombosen, insbesondere der kleinen Gefäße, induzieren (1). Aus der klinischen Erfahrung ist bekannt, dass die Reendothelialisierung der Arterie 5 Tage und die der Vene 10 Tage dauert. Aus diesem Grund wird in den ersten 10 Tagen nach einer Replantation die rheologische Therapie mit Heparin und Kolloiden, z.B. HAES, durchgeführt. Dies gilt sowohl für die Mikroreplantation (distal des Handgelenkes) als auch für die Makroreplantation (proximal des Handgelenkes). In diesen 10 Tagen ist der Erfolg der Replantation durch Versagen der Funktionalität der Anastomosen jederzeit gefährdet.

Die Fortschritte in der Wiederherstellungschirurgie haben dazu geführt, dass freie mikrovaskuläre Lappen-Transplantationen standardmäßig zur Deckung von Hautweichteildefekten und somit z.B. zum Erhalt einer verletzten Extremität eingesetzt werden. Der Erhalt der Extremität wird durch Hebedefekte am Körper erkaufte. Sowohl der Hebedefekt als auch die Transplantat-Empfängerstelle haben Morbiditätsrisiken (Nachblutung, Serom, Wundinfektion, Wundheilungsstörung, Narbenbildung, Hautnekrose, Lappennekrose).

Die Angiogenese und Neovaskularisation wird maßgeblich durch VEGF gesteuert. VEGF ist ein potentes Zellmitogen der Angiogenese, erhöht aber auch die Gefäßpermeabilität. Untersuchungen von geschädigtem Endothel nach Ballondilatation im Tierversuch haben gezeigt, dass durch lokale Applikation von VEGF die Endothelzellproliferation stark erhöht werden kann. Dies führt zu einer schnelleren Regeneration des Gefäßendothels und vermindert eine Hyperplasie der Neointima, was zu einer verbesserten Durchgängigkeit der Gefäße und verminderter Thrombosegefahr führt. Inwieweit VEGF bei der Endothelzellregeneration des Gefäßtraumas und der Reanastomose eine Rolle spielt, ist bisher unbekannt, und wurde noch nicht untersucht. Sollte die lokale VEGF-Applikation an der Gefäßanastomose auch zu einer schnelleren Regeneration der Endothelzellen führen, könnte damit eine raschere Gefäßheilung und somit eine reduzierte Gefäßthrombosegefahr nach einem chirurgischen Eingriff erreicht werden.

### 1.1.2 Verbrennungschirurgie

Bei einer Verbrennungsverletzung wird eine Kaskade verschiedener pathophysiologischer komplexer Prozesse ausgelöst. Freigesetzte proinflammatorische Mediatoren führen direkt und indirekt zu einer ausgedehnten Gewebedestruktion in Abhängigkeit von Ausdehnung und Tiefe der Verbrennung.

In der Schockphase der Verbrennung, das heißt innerhalb der ersten 24 Stunden, entsteht ein ausgedehntes lokales und generalisiertes Ödem, dessen Ätiologie nur zum Teil bekannt ist.

Dieses lokale und generalisierte Ödem stellt ein schwerwiegendes Problem in der Therapie des Verbrennungspatienten dar. Volumenersatztherapie, eine frühzeitige Exzision tief verbrannter Gewebeareale, neue Transplantationstechniken und eine frühzeitige enterale Ernährung haben die Überlebensrate schwer brandverletzter Patienten erheblich verbessert. Gerade aber die durch das Ödem konsekutiv auftretenden Minderdurchblutungen innerer Organe, sowie des lokal geschädigten Gewebes können bisher nicht beeinflusst werden. Im weiteren Verlauf stellen sich Komplikationen wie eine zusätzliche Schädigung des Gewebes durch Ischämie, Organversagen durch Minderperfusion, und schließlich MODS und SIRS als letale Komplikationen ein.

Verschiedene Mediatoren sind als pathogene Ursachen des Ödems bekannt. Initial spielen Histamine, Sauerstoffradikale und andere Mediatoren eine wichtige Rolle, unter anderem Arachidonsäureprodukte, NO, Serotonin, Bradykinin, Angiotensin-II und Vasopressin. Alle Therapieansätze diesbezüglich sind bisher jedoch gescheitert. So konnte das lokale Ödem bisweilen vermindert, das generalisierte Ödem jedoch nicht beeinflusst werden. Inwieweit der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) am Ödem ursächlich mitbeteiligt ist, wurde bisher nicht untersucht und ist daher nicht bekannt.

### 1.1.3 Rekonstruktive Chirurgie

Gewebedefekte nach Tumorexzisionen, zum Beispiel nach Mammaamputation oder nach Tumoren an den Extremitäten, führen zur Entstellung oder zum Verlust der Integrität. Die normale Regeneration führt zu keinem Ersatz des verlorenen Volumens oder zu Gewebedefekten. Die herkömmlichen Gewebezüchtungen scheitern an der Stabilität des

gezüchteten Gewebes, und vor allem an dessen zweidimensionaler Wachstumsrichtung. Damit aber ein gezüchtetes Gewebe Volumen erhält, muss dieses dreidimensional wachsen können.

Durch die Gewebezüchtung in der Schwerelosigkeit versuchen wir ein dreidimensionales Wachstum zu induzieren. Die Untersuchung der Effekte von Schwerelosigkeit (0g) auf verschiedene Zelltypen im Weltraum ist sehr aktuell. Veränderungen am Zytoskelett (Intermediärfilamente, Tubulin), der Proliferation der Zellen und der Genexpression sind gut untersucht und beschrieben (3, 51, 68, 108).

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass in der Schwerelosigkeit Tumorzellen dreidimensional wachsen können, und sich Veränderungen in den Mikrotubuli, den Mitochondrien und der Extrazellulären Matrix einstellen. Des Weiteren wird Apoptose induziert (41, 51, 60, 89). Diverse Mechanismen führen zur Apoptose der Zellen, jedoch spielen verschiedene Faktoren eine Rolle für die Induktion der Apoptose. Um Gewebe unter Schwerelosigkeit züchten zu können, muss die Apoptose reduziert oder verhindert werden. Weiter ist zu untersuchen, wie dreidimensionale Gebilde gezüchtet werden können.

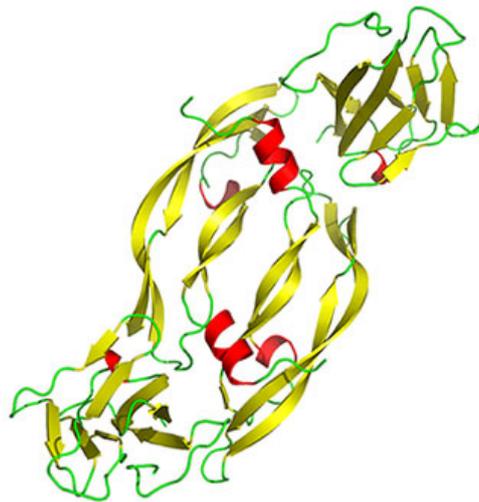
Die neu gewonnenen Erkenntnisse der pathophysiologischen Vorgänge der Vaskularisation, mit speziellem Bezug auf die posttraumatische Endothelzellproliferation nach Gefäßtrauma und Gefäßanastomosen, sollen neue therapeutische Ansätze zur Behandlung bei Replantationen, Transplantationen und Tissue Engineering ermöglichen, um einerseits die Erfolgsrate nach Anastomosen und rekonstruktiven Eingriffen zu verbessern, und andererseits die Möglichkeit neuer Techniken beim Tissue Engineering weiter entwickeln zu können.

## **1.2 VASKULÄRER ENDOTHELIALER WACHSTUMSFAKTOR (VEGF)**

### 1.2.1 VEGF Einleitung

1983 fanden Senger *et al.* (93) im Medium einer Tumorzelllinie von Meerschweinchen ein Protein, welches durch Injektion in die Haut die vaskuläre Permeabilität erhöhte. Bezeichnet wurde dieser neue Faktor aufgrund seiner spezifischen Regulation der

Permeabilität von Blutgefäßen in Tumoren als Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF). 1989 fanden Ferrara *et al.* (22) und Ploüet *et al.* (85) unabhängig voneinander ein Endothelzell-spezifisches Mitogen, welches sie als „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und Vaskulotropin (VPF) bezeichneten. Die Isolierung, Klonierung und Expression von VEGF und VPF zeigten, dass es sich dabei um ein und dasselbe Protein handelte. Weitere Untersuchungen ergaben, dass VEGF hochwirksam und spezifisch an Endothelzellen wirkt. Dies führte zur Hypothese, dass dieses Molekül eine zentrale Rolle in der Regulation des physiologischen und pathophysiologischen Wachstums von Blutgefäßen spielt (67).



**Abb. 1:** VEGF-Molekül (Quelle: [www.3Dchem.com](http://www.3Dchem.com))

### 1.2.2 VEGF-Subtypen

In den vergangenen Jahren wurde VEGF intensiv untersucht und weitere verschiedene VEGF Proteine (A,B,C,D,E) identifiziert. Die VEGF Ligandenfamilie umfasst zur Zeit 6 verwandte Proteine (22): VEGF-A, PlGF, VEGF-B und VEGF-E wirken vor allem, aber nicht nur, an vaskulären Endothelzellen, während VEGF-C und VEGF-D an lymphatischen Endothelzellen agieren. Das menschliche VEGF-Gen ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert (106) und in acht Exone organisiert, separiert von sieben Introns. Die Kodierungsregion umspannt ungefähr 14 kb. Die Exone 1 bis 5 sind in jeder VEGF-mRNA vorhanden. Durch alternatives Splicing der Exone 6 bis 8 eines einzelnen

VEGF-Gens resultieren zur Zeit 6 verschiedene VEGF Isoformen, welche 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren beinhalten. Diese Isoformen unterscheiden sich nur in der Länge der Polypeptidketten.

Natives VEGF ist ein Heparin-bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einer Größe von 45 kDa (21). Diese Eigenschaften sind mit der häufigsten VEGF Isoform, dem VEGF<sub>165</sub>, vergleichbar. VEGF<sub>165</sub> ist das prädominante Protein, welches durch verschiedene normale oder transformierte Zellen produziert wird. Auch VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>189</sub> finden sich in den meisten Zellen und Geweben, welche das VEGF-Gen exprimieren. Im Gegensatz dazu ist VEGF<sub>206</sub> sehr selten (44). Diese Isoformen unterscheiden sich weiter in ihrer Heparinbindungsfähigkeit. Während VEGF<sub>121</sub> als saures Polypeptid Heparin nicht binden kann, haben die basischen VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> noch eine größere Affinität zu Heparin als das basische VEGF<sub>165</sub>.

VEGF<sub>121</sub> ist ein frei diffundierendes Protein. VEGF<sub>165</sub> zirkuliert auch frei, obwohl ein signifikanter Anteil an die Zelloberfläche und an die Extrazelluläre Matrix gebunden wird. Die basischen VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> werden in der Extrazellulärmatrix vollständig gebunden.

### 1.2.3 VEGF-Rezeptoren

Zwei VEGF-Rezeptoren gehören der Tyrosin-Kinase Rezeptorfamilie an, und konnten bereits identifiziert und geklont werden: VEGFR-1 und VEGFR-2 (17, 99). Diese Rezeptoren sind charakterisiert durch das Vorhandensein von sieben immunglobulin-ähnlichen Domänen im extrazellulären Anteil, und einer intrazellulären Split-Tyrosin-Kinase Domäne. Ein weiterer VEGF Rezeptor, VEGFR-3 (fms-like-Tyrosinkinase 4 (Flt-4)), wird im lymphatischen System exprimiert. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert, wohingegen VEGFR-1 in Throphoblasten, Monozyten (4), und renalen mesangialen Zellen (100) exprimiert wird. VEGFR-2 wird andererseits in den hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten und Retinazellen exprimiert. Daneben werden VEGFR-1 und VEGFR-2 in Tumorzellen exprimiert (24). Zusätzlich zu diesen Tyrosinkinase-Rezeptoren interagiert VEGF mit Korezeptoren der Neuropilin 1 und 2 Rezeptorfamilie (NRP1 und NRP2) (21).

**VEGFR-1 (Flt-1)**

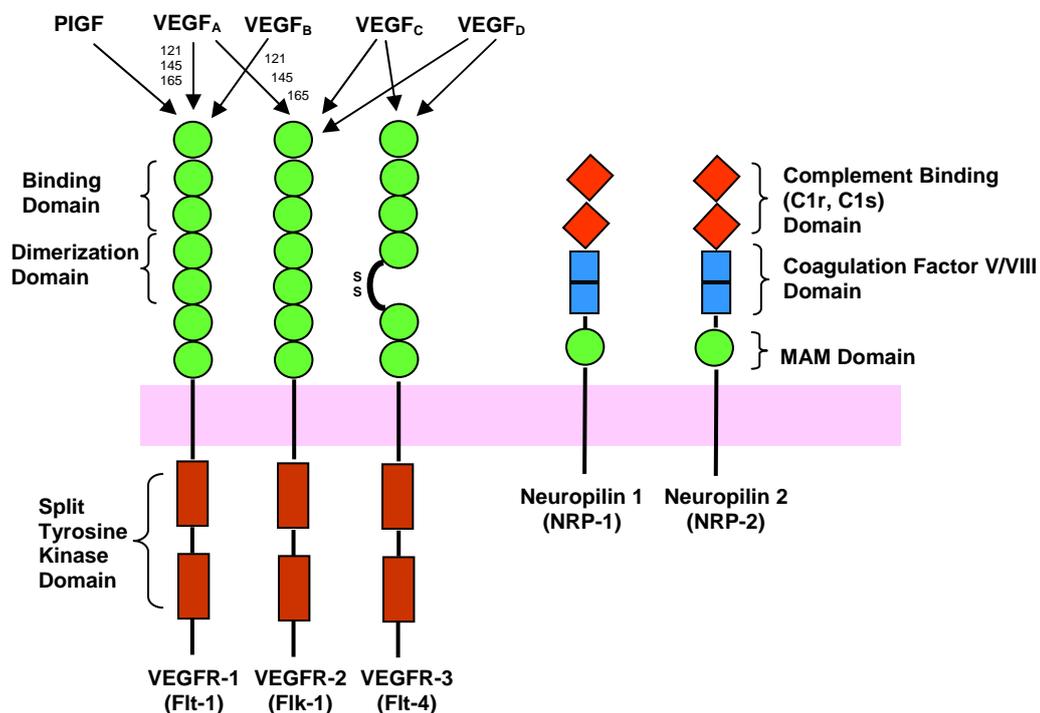
Die genaue Funktion des VEGFR-1 ist noch nicht bekannt. Die Signaltransduktionswege sind zudem abhängig vom Zelltyp (Endothelzellen, hämatopoetische Zellen) und der Art der Reizauslösung. VEGFR-1 wird exprimiert durch Hypoxie via HIF-1 (30). VEGFR-1 bindet nicht nur VEGF-A, sondern auch PlGF (83) und VEGF-B (81), welches nicht an VEGFR-2 bindet. Es existiert eine lösliche Form des VEGFR-1 (sFlt-1), die VEGF inhibiert (56). Es konnte gezeigt werden (4), dass der VEGFR-1 für die Migration von Monozyten verantwortlich ist. VEGFR-1 induziert Matrix Metalloproteinasen (wie MMP-9), ebenso wie endotheliale Progenitorzellen (45, 46). Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die VEGFR-1-Schlüsselfunktion nicht in der Regulation der Angiogenese, sondern in der Induktion der parakrinen Freisetzung von gewebe-spezifischem Wachstums- und Überlebensmediatoren liegt, was für die Organogenese von fundamentaler Bedeutung ist (73).

**VEGFR-2 (Flk-1 Maus, KDR Mensch)**

Die Schlüsselrolle des VEGFR-2 in Bezug auf Angiogenese und Hämatopoese ist durch das intrauterine Sterben von Flk-1-negativen Mäusen (94) bewiesen. VEGFR-2 ist der wichtigste Mediator für die Mitogenese, Angiogenese und den Permeabilitätseffekt von VEGF. Y1175 und Y1214 sind die wichtigsten Stationen für die VEGF-A-abhängige Autophosphorylation. Dabei ist allein Y1175 für die endotheliale Zellproliferation wichtig (45). Durch VEGF-A werden über VEGFR-2 die Phospholipase C $\gamma$ , PI3-Kinase, ras-GTPase, src-Familie und verschiedene andere Signaltransduktionsmoleküle aktiviert (75). VEGFR-2-Aktivierung erhöht die Endothelzellproliferation durch den Raf-Mek-Erk Pathway. VEGFR-2 (nicht aber VEGFR-1) hat einen antiapoptotischen Effekt am humanen Nabelschnurendothel (31) über den PI3 Kinase /Akt Pathway. Dieser Mechanismus ist auch für die VEGF-abhängige endotheliale Chemotaxis von Bedeutung (77).

## Neuropilin (NRP1, NRP2)

Neuropilin 1, welches an die Collapsin/Semaphorin Familie bindet und verantwortlich für die neuronale Entwicklung zu sein scheint, erhöht die Bindung von VEGF<sub>165</sub> an VEGFR-2 und die VEGF<sub>165</sub> vermittelte Chemotaxis (98). Das bedeutet, dass hierdurch die durch VEGFR-2 vermittelte Signaltransduktion verstärkt wird. Andererseits bindet NP1 auch an VEGFR-1, womit eine negative Regulation der VEGF-Wirkung kompetitiv zustande kommt. NP2 scheint in neueren Untersuchungen für die Entwicklung von lymphatischen Gefäßen verantwortlich zu sein (111).



**Abb. 2:** Die VEGF-Rezeptorenfamilie und ihre Liganden (Quelle: [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com))

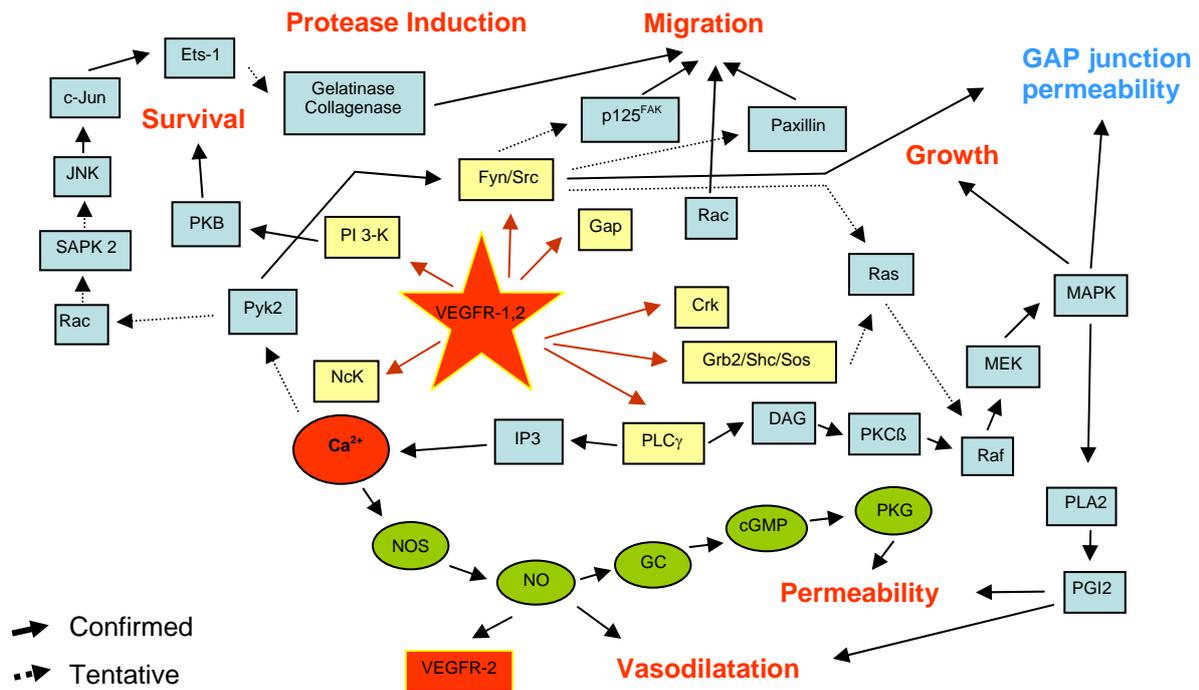
### 1.2.4 Regulation der VEGF-Genexpression

VEGF ist ein zentraler Regulator der Angiogenese. Die VEGF-exprimierenden Zellen werden durch eine Vielzahl von äußeren Faktoren beeinflusst. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Gonadotropine können indirekt durch Modulierung der VEGF-Expression in spezifischen Zellen die Angiogenese beeinflussen. Faktoren, welche die VEGF-

Expression stimulieren, sind der Fibroblast Growth Factor (FGF-4) (16), PDGF (23), Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) (88), Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) (84), Keratinocyte Growth Factor (KGF) (25), IGF-I (33), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (69), und IL-6 (13). Andere Zytokine wie IL-10 und IL-13 hemmen die Freisetzung von VEGF (75). Ein interessantes Beispiel, welches die Komplexität der VEGF-Regulation widerspiegelt, ist die Wundheilung. Die Expression von KGF ist während der Wundheilung stark erhöht (107). KGF wiederum induziert die VEGF-Produktion in Keratinozyten. Neutrophile Granulozyten, welche die Wunde als Teil des Heilungsprozesses besiedeln, und so die VEGF-Produktion in den Keratinozyten fördern (8), produzieren Wasserstoffperoxid, ein VEGF inaktivierendes Oxidans (32). Ebenso stimuliert die UV-B Strahlung die Produktion von VEGF in Keratinozyten (8). NO fördert den Effekt der Vasodilatation und die Permeabilitätssteigerung der Blutgefäße durch VEGF (78). Als positives Feedback wird NO durch VEGF stimuliert (78). Hypoxie ist ein maßgeblicher Stimulator der VEGF-Expression (96).

#### 1.2.5 Biologische Aktivität von VEGF

VEGF wurde als ein zentraler Mediator der Endothelzellen von Arterien, Venen und Lymphbahnen charakterisiert (85). Weitere Studien zeigten, dass der mitogene Effekt auch von einigen nicht endothelialen Zellen ausgehen kann, wie etwa den Pigmentzellen der Retina (39), dukalen Pankreaszellen (80) und Schwannzellen (98). Übereinstimmend mit der anti-apoptotischen Aktivität induziert VEGF die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und A1 in humanen Endothelzellen (29). Dieser Mechanismus wird durch einen Phosphatidyl-Inositol (PI)-3-Kinaseweg vermittelt (30). Der Mangel an VE-Cadherin induziert endotheliale Apoptose und verhindert die Übermittlung des endothelialen Überlebenssignals mittels VEGF-A an Akt-Kinase und Bcl-2 durch eine verminderte Komplexbildung mit VEGFR-2, beta-Catenin und der PI3-Kinase (11).



**Abb. 3:** Durch VEGF-Rezeptoren aktivierte Signaltransduktionswege (modifiziert nach Vorlage von Paul Scherrer Institut, Villingen, Schweiz)

### Physiologische Vaskulogenese und Angiogenese

Die postnatale Angiogenese ist von der pränatalen Vaskulogenese abzugrenzen.

**Pränatale Vaskulogenese:** Im zunächst avaskulären Embryo bilden sich Blutinseln in der Wand des Dottersackes mit Endothelzellen, woraus sich durch Vaskulogenese aus bipotenten Vorläuferzellen, den Hämangioblasten, Endothelschläuche zu Blutgefäßen entwickeln. Unter dem Einfluss des basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) exprimieren Hämangioblasten dann den VEGF-Rezeptor-2, der ihre Differenzierung in Angioblasten induziert. Die weiter ausdifferenzierten Endothelzellen organisieren sich dann unter Beteiligung ihres eigenen VEGFR-1 in röhrenförmige Strukturen.

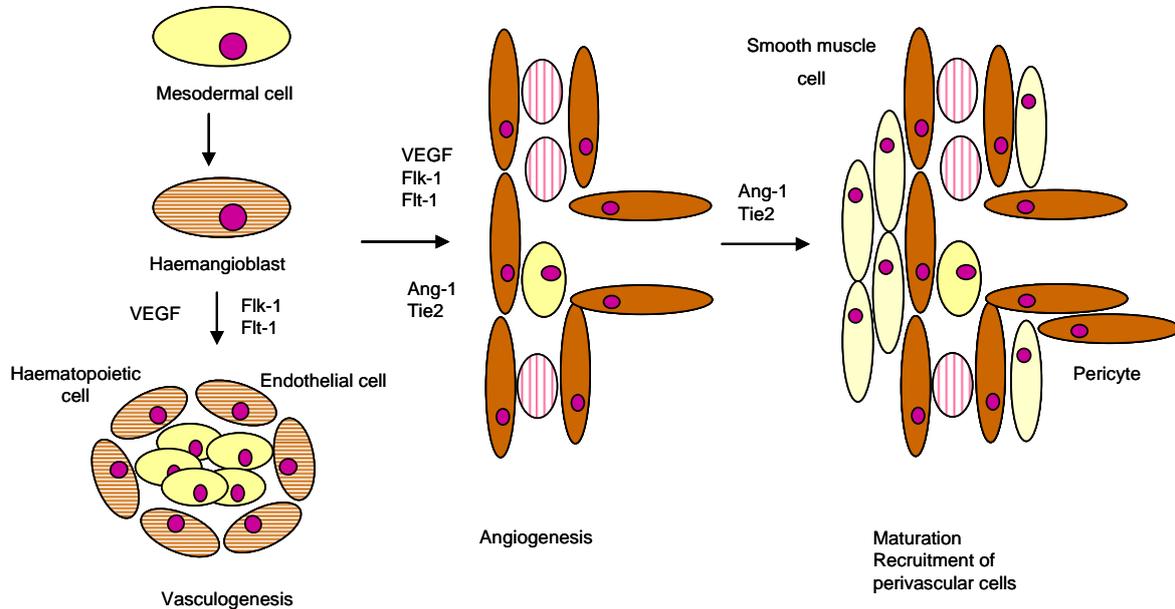
Der durch Vaskulogenese gebildete primäre Gefäßplexus ist ein homogenes Maschenwerk von Gefäßen, seine weitere Ausbildung und Organisation, das Remodelling, erfolgt zunächst durch Untergang überschüssiger Gefäßstücke. Dies geschieht wenn die entsprechenden Gefäße nicht durch VEGF unterstützt werden. Da die Expression von

VEGF bei hohem Sauerstoffgehalt gehemmt wird, erfolgt bereits auf dieser Stufe eine erste Anpassung der Gefäßarchitektur an den Stoffwechselbedarf des Gewebes.

Nach Abschluss der Vaskulogenese können zusätzlich benötigte Blutgefäße durch Angiogenese, d.h. durch die Gefäßteilung, der „Intussuszeption“ oder durch Sprossung gebildet werden. Bei der Gefäßteilung wird das Kapillarlumen durch Endothelpfeiler geteilt, die von beiden Seiten des Gefäßes aufeinander zuwachsen, miteinander verschmelzen und sich anschließend so verlängern, dass zwei Mikrogefäße entstehen. Die besser bekannte Kapillarsprossung läuft in mehreren Schritten ab: zuerst kommt es zur proteolytischen Auflösung der extrazellulären Matrix der vorbestehenden Gefäßwand und anschließend bilden Endothelzellen durch Proliferation und Migration solide Aussprossungen mit anschließender Röhrenbildung. Nach Abschluss dieser bereits offenen Kapillarsprosse an ein vorbestehendes Gefäß werden glatte Muskelzellen sowie Perizyten rekrutiert und verstärken so die neue Gefäßwand.

***Postnatale Angiogenese:*** Grundsätzlich gibt es in der Angiogenese zwei Mechanismen, durch die sich das Kapillarnetz vergrößern kann. Beim ersten Mechanismus wird die Basalmembran um eine vorhandene Kapillare proteolytisch aufgelöst, sodass die so befreiten Endothelzellen proliferieren können, was zu einer Aussprossung neuer Gefäße führt. Der zweite Mechanismus beruht auf dem Einwachsen extrazellulären Materials in bereits vorhandene Kapillaren, was schließlich zu einer Zweiteilung führt und somit zu einer Gefäßverdopplung. Diese Mechanismen bedürfen der geordneten Abfolge von proteolytischen Degenerations-, Zell-Zell-, Adhäsions-, Proliferations- und Migrationsprozessen, deren Zusammenspiel von über 20 Angiogenesefaktoren und ebenso vielen Inhibitoren koordiniert wird (15). Die Angiogenese ist als regulierender Anpassungsmechanismus an eine veränderte Bedarfslage des jeweiligen Gewebes zu beobachten. Entsprechend tritt sie in ganz bestimmten physiologischen oder eben pathophysiologischen Situationen auf. Hierzu gehören z.B. Wachstum, Funktionsanpassungen, der hormonelle Zyklus, Wundheilung, Entzündung und die Vaskularisation von Tumoren, sowie nach Infarkt und Retinopathien. Diese Vorgänge können schnell und dramatisch verlaufen, oder aber den langsamen Funktions- und Strukturwandel der Gewebe kontinuierlich und fast unmerklich begleiten. In beiden Fällen kann eine effektive Anpassung des Gefäßnetzwerks an die Versorgungsbedürfnisse nicht allein

durch Angio-genese erreicht werden. Es ist zusätzlich in vor und nachgeschalteten Gefäßen eine kontinuierliche Anpassung von Durchmesser und Wandstruktur notwendig. Am auffälligsten ist dieser Zusammenhang bei der Arteriogenese im Rahmen der Kollateralbildung beim progredienten Verschluss von Koronararterien (103).



**Abb. 4:** Angiogenese und Vaskulogenese; modifiziert nach Breier 1999

### Vaskuläre Permeabilität

VEGF induziert die Hyperpermeabilität von Gefäßen über einen direkten Signaltransduktionsweg durch die VEGF-Rezeptoren der Endothelzellen (43, 87). Der VEGF Rezeptor ist verantwortlich für die erhöhte Gefäßpermeabilität (5). Es sind 5 verschiedene Rezeptoren für die VEGF Familie bekannt. VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Neuropilin-1 und Neuropilin-2. VEGFR-3 Rezeptoren sind hauptsächlich im lymphatischen System exprimiert. VEGF stimuliert die Hyperpermeabilität mehr über den VEGFR-1 als über den VEGFR-2 Rezeptor. Dies konnte durch spezifische Inhibition von VEGFR-2 Rezeptoren mit ZM323881 nachgewiesen werden (109).

#### 1.2.6 VEGF-Serumspiegel

Bei verschiedenen Studien wurde der normale und pathologische VEGF-Serumspiegel gemessen. Der Referenzwert liegt bei 60-100 mg/ml (34, 49). Die höchsten Werte werden beim Verbrennungstrauma (bis 2800) gefunden (49). Beim polytraumatisierten Patienten werden beispielsweise nur etwa 20-fach kleinere Werte gefunden (34).

### 1.3 APOPTOSE

Apoptose und Nekrose sind Formen des Zelltodes, wobei die Apoptose dem programmierten Zelltod entspricht. Ausgelöst wird die Apoptose entweder von außen (z.B. durch Immunzellen) oder von zellinternen Prozessen (beispielsweise nach Schädigung der Erbinformation). Da diese Form des programmierten Zelltodes einem Selbstmord der Zelle gleichkommt, und unter strengen Regelmechanismen abläuft, werden umliegende Zellen, im Unterschied zur Nekrose, nicht geschädigt. Die Apoptose unterscheidet von den anderen Formen des programmierten Zelltods, dass bei ihr eine Gruppe von Enzymen, die proteolytische Aktivität aufweisen, so genannte Caspasen, eine zentrale Rolle spielen.

Ist der Prozess der Apoptose in Gang gesetzt, so kommt es zum Schrumpfen der betreffenden Zelle, und es findet ein Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke statt.

Während der Entwicklung eines Organismus ist die Apoptose essenziell, so wird beispielsweise die Lichtdurchlässigkeit der Augenlinse durch den apoptotischen Zelltod der Zellen von Glaskörper und Linse erreicht (14). Aber auch im adulten Organismus ist sie unerlässlich, sie kontrolliert die Zellzahl und Größe von Geweben, beeinflusst die Verjüngung von Geweben, selektiert und baut unnötige oder potenziell schädliche Zellen des Immunsystems ab, eliminiert entartete Zellen, gewährleistet die Plastizität im zentralen Nervensystem und selektiert Keimzellen.

Gegenwärtig wird die Apoptose besonders im Zusammenhang mit der Krebsentstehung und verschiedenen Autoimmunerkrankungen erforscht. Ein Ziel der Krebsforschung ist es, kontrollierte Apoptose bei entarteten Zellen auszulösen. Doch auch die Krebszellen nutzen den Apoptosemechanismus, um menschliche Abwehrzellen, sogenannte tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) auszuschalten. So findet man an der Oberfläche verschiedener Tumorzelllinien ein Apoptose-auslösendes Protein, den CD95-Liganden (Fas-Ligand).

Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Initiations- und Effektorphase.

## Initiationsphase

Hier werden zwei Vorgänge voneinander unterschieden, zum einen der extrinsische, zum anderen der intrinsische Weg.

### - extrinsischer Weg

Bindet ein Ligand (z.B. Tumor Nekrose Faktor, TNF) an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie (z.B. Fas), so kommt es zur Induktion des extrinsischen Wegs. Fas besitzt als Typ-I-Transmembranprotein eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne, was zur Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor erforderlich ist (82). Die so genannten Todesrezeptoren besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne (DD, „death domain“). Durch die so induzierte Trimerisierung des Rezeptors bilden die Todesdomänen eine Struktur, an welche nun Adaptormoleküle mit eigener Todesdomäne durch homotypische Interaktionen binden können. In einem ersten Schritt wird das „TNF-Rezeptor assoziierte Protein“ (TRADD) rekrutiert, anschließend bindet an die DD des TRADD das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD). FADD besitzt neben der DD eine Todeseffektordomäne (DED, „death effector domain“), über welche die proCaspase-8 mit ihrer DED an den Komplex binden kann. Diese kann sich nun durch die entstandene hohe lokale Konzentration autokatalytisch aktivieren. Den Komplex aus Rezeptor-Trimer, FADD und Procaspase-8 und -10 bezeichnet man als „Todesinduzierten Signalkomplex“ (death including signal complex, DISC) (95, 79). Die aktivierte Caspase-8 löst ihrerseits die sogenannte Caspase-Kaskade aus, wodurch in einer Signalverstärkten Rückkopplung weitere Caspase-8 Moleküle aktiviert werden.

### - intrinsischer Weg

Die Mechanismen des intrinsischen Wegs sind noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist bislang, dass es zur Freisetzung von Cytochrom c und weiteren pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma kommt. Auslöser dieses Wegs können Tumor-Suppressoren wie beispielsweise p53, ein Transkriptionsfaktor, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird, sein. p53 stimuliert die Expression pro-apoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie (unter anderem Bax und Bad), welche anschließend zur Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien führen.

Durch die Bindung von Cytochrom c und dATP an Apaf1 (apoptotischer Aktivierungsfaktor 1) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht. Durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungsdomäne) von Apaf-1 zugänglich, sodass sie an die CAD Domäne der ProCaspase 9 binden kann. Die Bildung dieses Heterodimers ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase-9. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase-9 dar. Analog zu Caspase-8 initiiert aktive Caspase-9 die Caspase-Kaskade. Eine Signalverstärkung dieses Weges wird innerhalb der Caspase-Kaskade durch Caspase-7 vermittelt, welche nicht nur Substrate spaltet, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind, sondern ihrerseits auch die Caspase-9 aktiviert. Durch die Aktivierung der Caspasen werden lebensnotwendige Proteine verdaut und die apoptotische Zelle auf die Phagozytose vorbereitet (64). Unter Schwerelosigkeit wird Apoptose bei Schilddrüsenzellen durch extrinsische und intrinsische Pathways induziert (60).

### **Effektorphase und Caspase-Kaskade**

Sogenannte Effektorcaspasen (vor allem die Caspasen-3, -6 und -7) führen durch Aktivierung sekundärer Zielproteine mittels limitierter Proteolyse zur Apoptose und sind aktiv am Abbau von Laminin in der Zellkernmembran und Aktin im Zytoskelett beteiligt. Des Weiteren kommt es zu einer caspase-vermittelten Unterdrückung der DNA-Reparatur.

Bei der Unterdrückung der Apoptose sind anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>), sowie IAPs (Apoptose-inhibitorische Proteine) beteiligt. Desweiteren gibt es hier einen Zusammenhang mit der Proteinkinase B, z.B. im Zusammenhang mit Rezeptoren der Trk-Familie und Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie, sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.

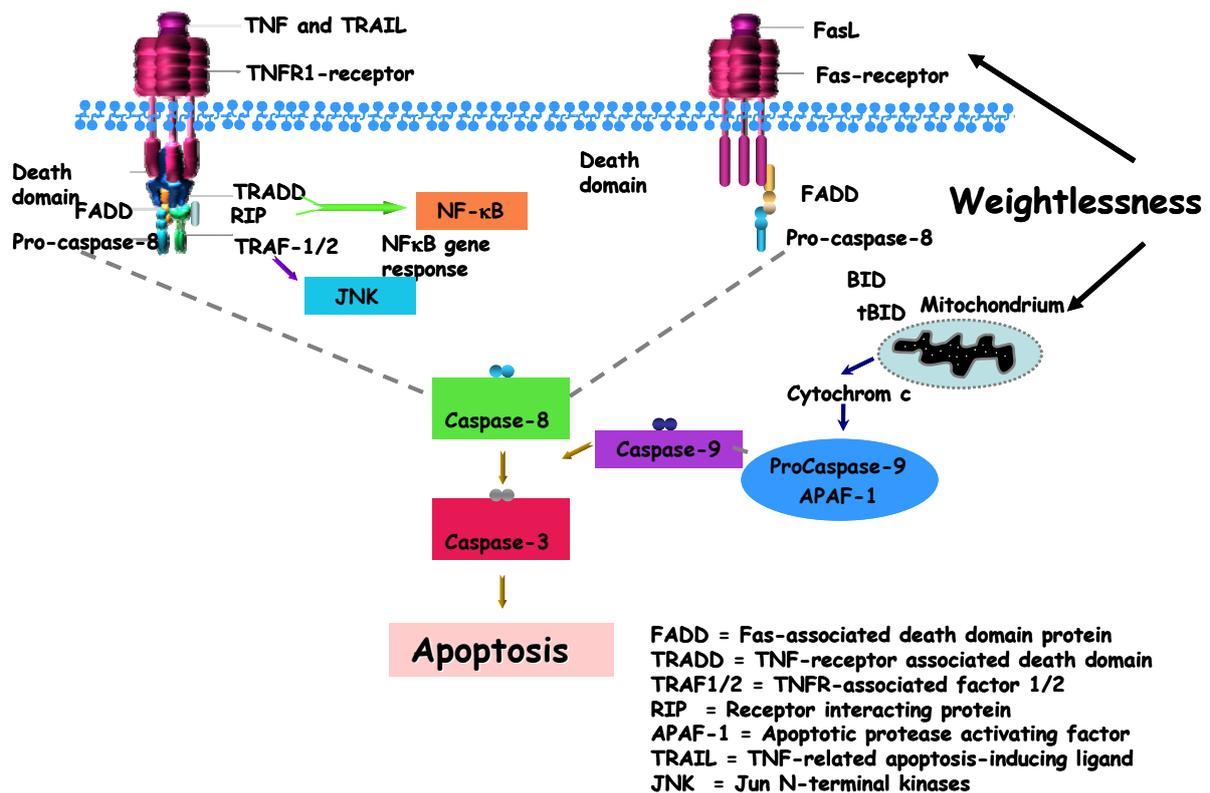


Abb. 5: Apoptosemechanismen (Grimm *et al.* Review in Signal transduction 2006)

## 1.4 EXTRAZELLULÄRE MATRIX

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) wird von den Zellen in den Interzellularraum sezerniert und kommt in allen vier Grundgewebetypen (Epithel-, Muskel-, Nerven-, sowie Binde- und Stützgewebe) vor.

Die EZM ist definiert als Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden. Sie dient primär als Fixierungsmöglichkeit der Zellen, die sich in ihr befinden, wobei beide Komponenten sich wechselseitig beeinflussen. Somit ist ein Fließgleichgewicht der EZM eine Grundvoraussetzung für deren Funktion. Die Komponenten der EZM entstehen hauptsächlich durch Synthetisierung und Sekretion der Zellen, aber auch durch intrazelluläre Endozytose.

Durch Bindung an bestimmte Komponenten der EZM wird über Zellrezeptoren die Genexpression von Zellen reguliert. Desweiteren resultieren Zelladhäsion, Zellmigration,

Zellproliferation sowie der Aufbau, Umbau und Abbau von Geweben aus der oben genannten wechselseitigen Beeinflussung. Eine wichtige Rolle spielt die EZM unter anderem bei der Angiogenese (70).

Sichtbare Beispiele der EZM sind die mineralisierte Matrix des Knochens, die druckelastische Substanz des Knorpels oder die straffen Fasern der Sehnen. Mikroskopisch betrachtet ist beispielsweise jede Muskelfaser und jede Fettzelle von retikulären Fasern umspinnen.

Die Funktionen und Wechselwirkungen der EZM mit verschiedenen Geweben und Organen sind vielfältig:

- Die Formgebung von Geweben und Organen
- Der Wassergehalt der Gewebe
- Die Elastizität der Gewebe
- Die Zugfestigkeit und Stabilität der Knochen, Sehnen und Bänder
- als Zytokinreservoir
- für die Signaltransduktion in Geweben
- zur Verankerung und Polaritätsvorgabe für Zellen
- für die Beeinflussung von Wundheilungsprozessen
- für die Filterleistung der Niere

Der Ab- und Umbau der EZM erfolgt vor allem durch sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMP), von denen bislang 20 identifiziert werden konnten. Diese Zinkhaltigen Enzyme befinden sich an der Zellmembran (MT-MMP, „membrane type MMP) und ragen mit ihrem katalytischen Zentrum in den extrazellulären Raum. Außerdem werden sie von entsprechenden Zellen direkt in die EZM sezerniert.

Inhibitoren der MMPs sind die sogenannten Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMP). Diese Proteine binden sich an die katalytischen Zentren der MMPs und hemmen dadurch deren Wirkung.

Hauptbestandteil der EZM sind Proteine und Glykoproteine, bzw. Polysaccharide (42). Unter den Proteinen sticht besonders die Familie der Kollagene hervor, die verschiedene Arten von Fasern bildet und in fast jedem Gewebe vorhanden ist.

Derzeit sind 27 Proteine der Kollagenfamilie bekannt, die sich in ihrer Art unterscheiden, wie sie miteinander oder mit anderen Komponenten assoziieren. Am bekanntesten sind

Kollagen Typ I, II, III und IV. Kollagen Typ IV bildet beispielsweise zusammen mit den Lamininen Entactin und zusammen mit dem Proteoglykan Perlecan Basalmembranen.

Die Kollagenfasern (beinhalten nur Kollagen Typ I) verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit, sodass jedes auf Zug beanspruchte Gewebe Kollagenfasern enthält. Die Anordnung der Fasern ist hierbei in jedem Gewebe nach der Richtung der Beanspruchung gegeben, so kommen geflechtartige Anordnungen (Dermis, Kornea, Dura mater) und parallele Anordnungen (Sehnen, Bänder) vor. Im Interstitium des Herzens findet sich z.B. überwiegend Kollagen Typ I. Dieses wird bei verschiedenen kardiologischen Erkrankungen hochreguliert (36, 37).

Retikuläre Fasern hingegen beinhalten Kollagen III und bilden Netze unter vielen Basallamina, z.B. um alle Kapillaren, aus.

Eine Besonderheit stellen die elastischen Fasern dar, sie sind eine Kombination aus Kollagenfasern sowie den Proteinen Fibrillin und Elastin, und besitzen dadurch eine reversible Dehnbarkeit. Sie kommen vor allem im elastischen Knorpel vor.

Ebenfalls prominent sind Kohlenhydrate, insbesondere Glykosaminoglykane, welche mit Proteinen assoziieren und dadurch Proteoglykane bilden.

Die am häufigsten anzutreffenden Glykosaminoglykane sind Hyaluronsäure, Heparansulfat, Dermatansulfat, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Bis auf Hyaluronsäure liegen alle Glykosaminoglykane als Proteoglykane vor. Die wichtigste Bedeutung haben sie im Knorpel, wo sie aufgrund ihres Wasserbindungsvermögens vorliegen. Des Weiteren vermitteln sie oft die Wechselwirkung zwischen anderen Matrixproteinen und können Botenstoffe sowie Proteine verschiedener Funktionalität (z.B. TGF- $\beta$ , TIMP-3) binden. Hieraus resultiert ihr Einfluß auf das Verhalten von Zellen. Sie sind somit in Aufbau, Abbau und Umbau von Geweben (Wundheilung, Angiogenese, Arteriosklerose, Fibrose etc.) involviert. TGF $\beta$ <sub>1</sub> wird beispielsweise unter Schwerelosigkeit bei Schilddrüsentumorzellen erhöht (51).

Eine weitere große Gruppe stellen die Adhäsionsproteine dar, mittels derer die Zellen mit der EZM in Kontakt treten. Es handelt sich hier um eine Vielzahl von Glykoproteinen, unter anderem Laminin und Fibronectin.

Von großer Bedeutung für die Zelladhäsion sind die Rezeptoren, in diesem Fall die Integrine. Sie sind unterteilt in alpha- und beta-Untereinheiten, extrazellulär verbunden durch Calcium-Ionen, welche jeweils gemeinsam eine entsprechende Aminosäure-

Bindungssequenz im Proteinanteil der EZM-Komponenten erkennen. Integrine sind spezifisch für bestimmte Proteine der EZM, wobei jedoch ein Integrin in der Lage ist, verschiedene Arten von EZM-Proteinen zu binden. Die Wirkungsweise der Integrine beruht zum einen auf ihrer Interaktion mit Wachstumsfaktoren, zum anderen aber auch auf der Aktivierung verschiedener Kinasen und des PI3-Weges (7, 91).

## 1.5 PROJEKTE UND SPEZIFISCHE ZIELE

### 1.5.1 Wirkung von VEGF auf die Regeneration von Gefäßen

Die Wirkung von lokal appliziertem VEGF an der mikrochirurgischen Gefäßanastomose zur Revaskularisation ist nicht bekannt. Die Untersuchung der letzten Jahre haben die Bedeutung des VEGF im Zusammenhang mit der Angiogenese nachgewiesen. VEGF ist ein potentes Zellmitogen, das Angiogenese induziert und die Gefäßpermeabilität erhöht. VEGF wird in Monozyten und Makrophagen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen wie Hypoxie, Ischämie, in peritumoralem Gewebe, bei Trauma und bei Verbrennung synthetisiert und freigesetzt.

Der Verlust des Endothels durch Gefäßtrauma, z.B. bei Amputation, ist verbunden mit einer erhöhten Zellproliferation der glatten Gefäßmuskulatur und einer Verdickung der Neointima. Fehlendes Endothel ist die Grundlage für Gefäßthrombosierungen. Diese Prozesse führen im postoperativen Verlauf oft zu Stenosen oder Thrombosierung der Gefäße nach chirurgischer Revaskularisation. Die schnelle Regeneration der endothelialen Zellschicht ist einerseits wichtig, um Thrombosierungen des Gefäßes zu vermeiden und um andererseits ein überschießendes Wachstums der Neointima und der glatten Muskelzellen nach vaskulärem Trauma zu verhindern.

#### **Projekt**

Untersuchung der Endothelzellregeneration an mikrochirurgischen Gefäßanastomosen nach lokaler Medikation mit dem vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF).

#### **Ziel**

Wie die Reendothelialisierung von Mikrogefäßen nach Gefäßtrauma qualitativ und quantitativ verbessert werden kann, ist bisher unbekannt. Wir wollen einerseits prüfen, ob VEGF lokal eine wichtige Rolle in der Regeneration der Endothelzellen (EC) spielt, und wenn ja, ob die Regeneration der EC speziell durch lokale Gabe von VEGF qualitativ die Morphologie der EC und der Gefäßwand verbessern und beschleunigen kann. Spezielle Fragestellungen hierbei sind:

- Beeinflusst die lokale intraluminale Applikation von VEGF die Re-Endothelialisierung nach mikrochirurgischer Gefäßnaht?
- Wird die Re-Endothelialisierung nach mikrochirurgischer Arteriennaht durch die lokale Gabe von VEGF beschleunigt?
- Sinkt die Thromboseneigung der Mikroanastomosennaht nach lokaler Behandlung durch VEGF?
- Reduziert VEGF die Intimahyperplasie nach mikrochirurgischer Naht?
- Reduziert VEGF die Adventitiahyperplasie nach mikrochirurgischer Naht?

### 1.5.2 Wirkung von VEGF auf die Permeabilität

Das lokale und generalisierte Ödem nach Verbrennungstrauma stellt ein schwerwiegendes Problem in der Therapie des Verbrennungspatienten dar. Inwieweit der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) am Ödem ursächlich mitbeteiligt ist, wurde bisher nicht untersucht und ist daher noch nicht bekannt.

#### **Projekt**

- Messung der humanen VEGF-Serumspiegel nach schweren Verbrennungen in Abhängigkeit des lokalen und generalisierten Gewebeödems.
- Untersuchung der Wirkung von VEGF am humanen *ex vivo* Nabelschnurmodell (siehe 1.5.4).

#### **Ziel**

Die Kenntnis des exakten Mechanismus der Mediatoren-induzierten Schädigung der Gefäßwand ist von herausragender klinischer Bedeutung. Das Verständnis dieser Prozesse erlaubt mögliche therapeutische Ansätze zur Modulation der Mediatoren, um ein posttraumatisches Ödem reduzieren zu können.

### 1.5.3 Wirkung von VEGF beim Tissue Engineering in der Schwerelosigkeit

Der Effekt der Schwerelosigkeit (0 g) auf verschiedene Zelltypen im Weltraum ist ein sehr aktuelles Thema. Schädigung des Zytoskelettes, Veränderungen der Zellproliferationseigenschaften und der Genexpression sind zum Teil gut untersucht (3, 108). Verschiedene Forschergruppen zeigten unter simulierter Schwerelosigkeit, dass Tumorzellen einen dreidimensionalen Zellverband (Sphäroid) bilden können. Es treten Veränderungen an den Mikrotubuli und Mitochondrien, sowie eine Modifizierung der Produktion der Extrazellulären Matrix auf (35, 37). Außerdem wird Apoptose induziert (27).

#### **Projekt**

Verschiedene Mechanismen führen zur Apoptose unter Schwerelosigkeit. Es werden die molekularen Mechanismen, die zur Induktion der Apoptose unter Schwerelosigkeit führen, untersucht. Dies geschieht anhand von Schilddrüsenzellen. Darüber hinaus werden Endothelzellen unter simulierter Schwerelosigkeit mit Hilfe eines dreidimensionalen Klinostaten (Random Positioning Machine) untersucht und der Effekt von VEGF geprüft

#### **Ziel**

Wie kann Apoptose unter Schwerelosigkeit reduziert werden? Können in der Schwerelosigkeit stabile dreidimensionale Gewebeaggregate gezüchtet werden? Welche Rolle spielt VEGF?

#### 1.5.4 Etablierung eines humanen Perfusionsmodelles

Außer Tierversuchen gibt es bislang kein *ex vivo* Modell, um die VEGF-Wirkung und Druckveränderungen durch VEGF an isolierten Gefäßen zu untersuchen. Mit dem dazu neu etablierten humanen Perfusionsmodell mittels einer Nabelschnur, angeschlossen an einen externen Kreislauf, können Effekte von pharmakologischen oder biologischen Substanzen unter realen physiologischen Bedingungen über längere Zeit untersucht werden.

##### **Ziel**

Ziel dieser Studie war es, ein neues Perfusionsmodell für die Arteria umbilicalis zu entwickeln, um die Gefäßbiologie und pharmakologische Themen zu untersuchen. Des Weiteren haben wir den Einfluss von VEGF auf die Permeabilität und das daraus folgende Gewebeödem unter kontrollierten Bedingungen untersucht.