

Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)

Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. E. Biemer)

**Adenoviraler Gentransfer von VEGF<sub>165</sub> –  
Induktion von Angiogenese und Reduzierung von Nekrose  
in kritisch durchbluteten Hautlappenplastiken**

Thomas Holzbach

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. R. E. Giunta
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher
3. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 16. 03. 2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27. 09. 2006 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	6
1.1	Übersicht .....	6
1.2	Angiogenese .....	8
1.3	Der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF).....	9
1.4	Vektoren zur Gentherapie .....	13
1.4.1	Nicht-virale Genektoren.....	13
1.4.2	Virale Genektoren .....	15
1.5	AdVEGF in klinischen Studien .....	19
1.6	Experimenteller Einsatz von VEGF zur Induktion von Angiogenese in der Plastischen Chirurgie .....	20
1.7	Das Modell des „Random-pattern-Flap“ .....	22
1.8	Zielsetzung.....	24
2.	Material und Methoden .....	25
2.1	Zellkultur und Zellsplitting.....	25
2.2	Virenstämme .....	26
2.3	Amplifikation von AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	27
2.3.1	Infektion der HEK 293-Zellen .....	27
2.3.2	Virusgewinn.....	27
2.3.3	Ultrazentrifugation und Dialyse zur Aufreinigung des Virus .....	28
2.3.4	Titerbestimmung AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	28
2.3.5	Titerbestimmung Ad312 .....	29
2.4	Nachweis der Replikationsdefizienz von AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	30
2.4.1	Fällung der DNA.....	31
2.4.2	Durchführung der PCR.....	31
2.4.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	32
2.5	Kontrolle des VEGF <sub>165</sub> -Transgens.....	33
2.6	Zeitlicher Verlauf der VEGF-Expression nach Transduktion in vitro.....	33
2.6.1	Versuchsplan .....	33
2.6.2	Infektion der IEC-6 Zellen .....	34
2.6.3	Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA).....	34
2.6.4	Messung der optischen Dichte .....	35

---

2.7	Tiere und Tierhaltung .....	36
2.8	Quantifizierung der VEGF-Expression nach Transduktion an der Ratte .....	37
2.8.1	Injektionsmodell .....	37
2.8.2	Versuchsplan .....	38
2.8.3	Gewebegewinnung .....	38
2.8.4	Radioimmunoassay .....	39
2.9	Bestimmung der Mikrogefäßdichte an der Ratte .....	40
2.9.1	Injektionsmodell .....	40
2.9.2	Versuchsplan .....	40
2.9.3	Gewebegewinnung .....	41
2.9.4	Immunhistochemie .....	41
2.9.5	Gefäßdichtebestimmung mit der Chalkley-Methode .....	42
2.10	Untersuchung des Therapieeffektes am Modell des überdimensionierten „Random-pattern-Flap“ an der Ratte .....	43
2.10.1	Lappenmodell und Operationstechniken .....	43
2.10.2	Versuchsplan .....	45
2.10.3	Bestimmung der Lappenfläche .....	47
2.11	Perfusionsmessung mittels Indocyaningrün-Laser-Fluoroskopie .....	47
2.11.1	Farbstoff Indocyaningrün .....	47
2.11.2	Messaufbau .....	48
2.11.3	Auswertung der Fluoreszenzmessung .....	48
2.12	Statistische Auswertung .....	50
3.	Ergebnisse .....	51
3.1	Titerbestimmung AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	51
3.2	Titerbestimmung Ad312 .....	51
3.3	Verifizierung von AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	52
3.4	Zeitlicher Verlauf der VEGF-Expression nach Transduktion in vitro .....	53
3.5	Quantifizierung der VEGF-Expression nach Transduktion an der Ratte .....	55
3.5.1	VEGF-Konzentration in der Haut .....	55
3.5.2	VEGF-Konzentration in der Muskulatur .....	58
3.6	Bestimmung der Mikrogefäßdichte an der Ratte .....	61
3.6.1	Mikrogefäßdichte in der Haut .....	61
3.6.2	Mikrogefäßdichte in der Muskulatur .....	63

---

3.7	Flächenauswertung des überdimensionierten „Random-pattern-Flap“-Modells an der Ratte .....	64
3.7.1	Lappengröße postoperativ .....	64
3.7.2	Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen .....	65
3.7.3	Nekrosefläche nach 7 Tagen .....	66
3.7.4	Prozentuale Auswertung .....	67
3.8	Perfusionsbestimmung postoperativ .....	68
3.8.1	Perfusionsindex distale Lappenhälfte.....	68
3.8.2	Perfusionsindex proximale Lappenhälfte .....	70
3.9	Vergleich AdCMV.VEGF <sub>165</sub> und Vascular Delay .....	70
3.9.1	Lappengröße postoperativ .....	71
3.9.2	Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen .....	72
3.9.3	Nekrosefläche nach 7 Tagen .....	73
3.9.4	Prozentuale Auswertung .....	73
3.9.5	Perfusionsindex distale Lappenhälfte.....	75
3.9.6	Perfusionsindex proximale Lappenhälfte .....	76
4.	Diskussion .....	77
4.1	VEGF-Gewebskonzentration und Mikrogefäßdichte .....	77
4.2	Applikationszeitpunkt.....	78
4.3	Vasorelaxation durch VEGF .....	79
4.4	Das Phänomen der „leaky vessels“ .....	81
4.5	AdVEGF <sub>165</sub> Gentherapie – eine Art „Delay“?.....	82
4.6	Der klinische Einsatz von Adenoviren .....	84
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	88
5.	Zusammenfassung.....	90
6.	Summary.....	92
7.	Literaturverzeichnis .....	94

---

8. Anhang.....	107
8.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	107
8.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel .....	109
8.3 Pharmaka und Tiernahrung .....	111
8.4 Software .....	111
9. Abbildungsverzeichnis .....	112
10. Abkürzungsverzeichnis .....	116
11. Danksagung .....	121
12. Lebenslauf.....	122
13. Veröffentlichungen .....	124

# 1. Einleitung

## 1.1 Übersicht

Eine normale Gewebefunktion ist auf die adäquate Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Blutgefäße angewiesen und die Bildung neuer Gefäße ist essentiell für Wundheilung, Entwicklung und Reproduktion.<sup>52</sup> Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind komplex und noch nicht vollständig entschlüsselt. Eine Fehlregulation dieser Prozesse führt zu einer Vielzahl von Erkrankungen. Die therapeutische Beeinflussung der Gefäßneu- und umbildung ist Gegenstand verschiedener Forschungsansätze. So kann in Abhängigkeit vom Therapieziel nicht nur eine therapeutische Induktion der Angiogenese, sondern auch die therapeutische Blockade der angiogenetischen Kaskade angestrebt werden.

Die ungezielte okuläre Neovaskularisation bei Diabetes ist die häufigste Ursache der Erblindung bei Erwachsenen. Arthritiden sind charakterisiert durch die Zerstörung des Gelenkknorpels, unter anderem durch das Einwachsen neuer Gefäße. In Tumoren ist eine kontinuierliche und unkontrollierte Stimulation der Gefäßneubildung zu beobachten. Auf diesem Weg wird ein weiteres Wachstum des Tumors ermöglicht, und gleichzeitig stellen die neuen Gefäße potentielle Metastasierungswege dar.<sup>50</sup> In diesen Fällen wäre therapeutisch eine Blockade der Angiogenese erstrebenswert.

In anderen Fällen ist jedoch gerade eine gezielte Induktion derselben Prozesse therapeutisch wünschenswert. Eine insuffiziente Gefäßversorgung kann zur Ischämie in Herz oder Gehirn führen und den Boden für neurodegenerative Prozesse, Hypertension, Prä-Eklampsie, Osteoporose und andere Erkrankungen bilden. Die Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der diabetischen Mikroangiopathie stellt ebenfalls ein Einsatzgebiet für eine angiogenetische Therapie dar.

Auch die plastische Chirurgie bietet Einsatzmöglichkeiten für eine therapeutische Induktion der angiogenetischen Kaskade. Alle Arten von Lappenplastiken profitierten von einer verbesserten Gefäßversorgung, die Nekroseentstehung in kritisch durchblutetem Gewebe könnte reduziert oder gar verhindert werden und in der

Operationsplanung entstünden durch gezielte Schaffung eines funktionsfähigen Gefäßnetzwerks neue Freiheiten.<sup>59</sup>

Wundheilungsstörungen stellen eine häufige postoperative Komplikation dar. Eine Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen verhindert die korrekte Abfolge der physiologischen Phasen der Wundheilung - Exsudation, Granulation und Epithelialisierung - und es resultiert ein Verlust von Flüssigkeit und Proteinen. Die Entstehung von Nekrose verschlechtert zusätzlich die insuffiziente Nährstoffversorgung des Gewebes, verhindert die Bildung von Granulationsgewebe und fördert die Besiedlung mit Keimen. Therapeutisch sind eine anabole Stoffwechsellage des Organismus und ein optimales Wundmilieu prognosebestimmend. Häufig werden schlecht heilende Wunden mehrmals einem chirurgischen Debridement mit Entfernung von nekrotischem Gewebe und Fibrinbelägen unterzogen und es erfolgt letztendlich die Defektdeckung mit körpereigenem Gewebe. Eine verbesserte Gefäßversorgung könnte nicht nur die Heilungszeit verkürzen und die Notwendigkeit chirurgischer Intervention mit Risiken und möglichen Sekundärdefekten reduzieren, sondern schon die Entstehung von Wundheilungsstörungen verhindern.

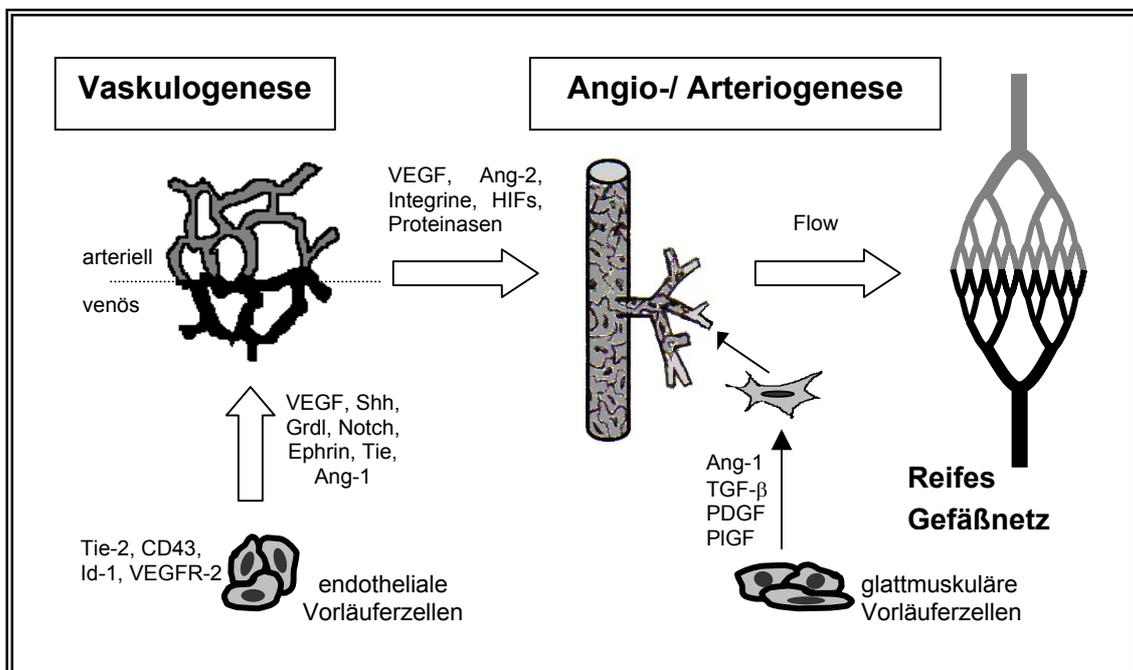
Auch bei der Versorgung von Gewebedefekten ist eine therapeutische Angiogenese anzustreben. Lokale Hautlappenplastiken vom „random-pattern“-Typ werden in der Plastischen Chirurgie häufig zur Defektdeckung verwendet. Ein Nachteil dieses einfachen Verfahrens ist jedoch eine eingeschränkte Freiheit bei der Dimensionierung dieser Lappenplastiken. Um die adäquate Blutversorgung zu gewährleisten, sollte ein Länge-zu-Breite Verhältnis von 2:1 nicht überschritten werden.<sup>128</sup> Daher muss in vielen Fällen auf aufwändigere Verfahren wie die freie Gewebstransplantation zurückgegriffen werden. Daraus resultieren Sekundärdefekte, ein größerer Zeitaufwand der Rekonstruktion, höhere Kosten und nicht zuletzt ein größeres Risiko für den Patienten. Durch die Schaffung eines verbesserten Gefäßnetzwerks könnte ein flexibleres Länge-zu-Breite Verhältnis der Lappenplastiken vom „random-pattern“-Typ ermöglicht und die Indikationsstellung für diese Technik erweitert werden.

## 1.2 Angiogenese

Angiogenese wird von den meisten Autoren als Oberbegriff für alle an der Gefäßneubildung beteiligten Prozesse gebraucht. Tatsächlich aber ist Angiogenese nur die Sprossung neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen.<sup>24</sup> Die Formation neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen nennt man Vaskulogenese,<sup>25</sup> und der Begriff Arteriogenese beschreibt die kontinuierliche Stabilisation der noch unreifen Gefäße durch murale Zellen.<sup>24</sup>

Die Entwicklung eines Gefäßsystems erfolgt in verschiedenen Schritten: Bildung, Stabilisierung, Aussprossung, Umbildung, Spezialisierung und Regression.<sup>86</sup> Diese Prozesse überlappen oder laufen an unterschiedlichen Stellen zeitgleich ab und führen so zu einer an die Bedürfnisse und Gegebenheiten angepassten Gefäßstruktur.

Die verschiedenen Abläufe werden initiiert und aufrechterhalten durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren, deren Eigenschaften meist vielgestaltig und zum Teil noch nicht vollständig aufgeklärt sind.



**Abb. 1** Schematische Darstellung von Prozessen der Gefäßbildung und Reifung mit beteiligten Faktoren und Rezeptoren (mod. n. Carmeliet 2003 und Holzbach und Mitarb. 2005)

Der erste isolierte und sequenzierte Wachstumsfaktor war der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF).<sup>2, 51, 127, 139</sup> Die Familie der FGF's besteht bis heute aus mehr als zwanzig bekannten Faktoren,<sup>204</sup> welche die Proliferation von mesodermalen und neuroektodermalen Zellen stimulieren - eingeschlossen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Myoblasten.<sup>52, 168</sup>

Peptide der Familie der Transforming Growth Factors- $\beta$  (TGF  $\beta$ ) werden in wachsenden Kollateralarterien exprimiert und in Gefäßen während ihrer Umwandlung und Differenzierung hochreguliert.<sup>24, 138, 168, 195</sup>

Die Platelet-derived Growth Factors (PDGF), hier besonders PDGF-BB, rekrutieren Perizyten um wachsende Gefäße und spielen somit eine wichtige Rolle in der Arteriogenese.<sup>3, 23, 35, 86, 204</sup>

Einen ebenfalls gefäßstabilisierenden Effekt hat das Angiopoetin 1. Ang-1 aktiviert den Tie-2 Rezeptor<sup>31, 61, 167, 202</sup> und fördert einen engeren Kontakt der Endothelzellen durch einen Effekt auf Kontaktmoleküle.<sup>87, 177, 184, 192</sup>

Angiopoetin 2 hingegen scheint in der Lage, den Tie-2 Rezeptor gleichermaßen zu aktivieren und zu blockieren,<sup>61, 120</sup> das Endothel zu destabilisieren und somit in der Frühphase der Angiogenese seine Bedeutung zu besitzen.<sup>75, 76, 86</sup> Zugleich konnte gezeigt werden, dass Ang-2 die Sensitivität für VEGF, den Vascular Endothelial Growth Factor, erhöht.<sup>149</sup>

### **1.3 Der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF)**

Zur Familie der Vascular Endothelial Growth Factors gehören neben VEGF (auch= VEGF-A) ebenfalls VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und der Placental Growth Factor (PlGF).

VEGF (VEGF-A) ist ein Schlüsselprotein im Prozess der Angiogenese und besitzt bedeutsame angiogenetische, mitogene, permeabilitätssteigernde und vasodilatative Eigenschaften.<sup>39, 44, 45, 47, 48, 85, 174</sup> VEGF lockt Monozyten und Makrophagen an,<sup>155</sup> die wiederum selbst eine Quelle für angiogenetische Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen darstellen.<sup>4</sup> In der Frühphase der Angiogenese erhöht VEGF die Permeabilität des Endothelverbandes und ermöglicht die Extravasation von

Plasmaproteinen, die eine provisorische Matrix für die Migration von Endothelzellen darstellen und somit die Aussprossung erleichtern.<sup>24</sup>

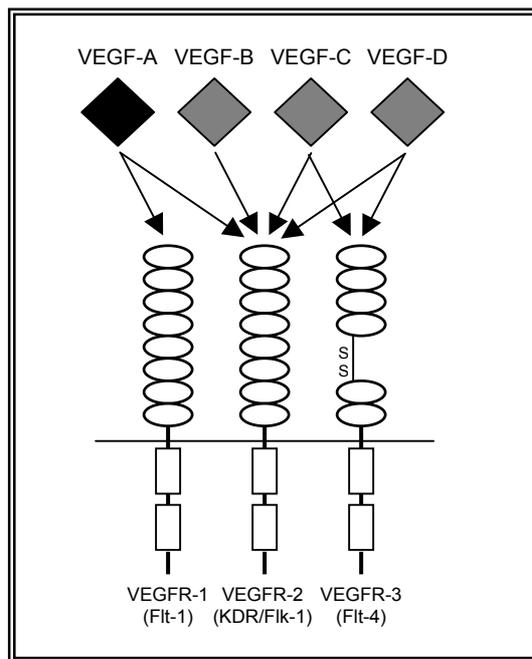
VEGF (VEGF A), auch bekannt als Vaskulotropin<sup>81</sup> oder Vascular Permeability Factor<sup>174</sup> ist ein homodimeres Glykoprotein von 34-42 kDa. Das menschliche Gen für VEGF befindet sich auf Chromosom 6 und besteht aus acht Exons, getrennt durch sieben Introns.<sup>79, 193</sup> Alternatives Splicing führt zu vier verschiedenen Isoformen mit jeweils 121, 165, 189 oder 206 Aminosäuren (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>). Seltener Splice-Varianten wie VEGF<sub>145</sub> und VEGF<sub>183</sub> wurden ebenfalls beschrieben.<sup>140</sup>

Im Gewebe wird VEGF von aktivierten Makrophagen,<sup>40</sup> Keratinozyten,<sup>18</sup> renalen Glomerulum-Epithelien und Mesangiumzellen,<sup>17, 81</sup> Hepatozyten,<sup>129</sup> glatten Muskelzellen,<sup>48</sup> Leydig Zellen,<sup>178</sup> embryonalen Fibroblasten und bronchialen und choroidalen Plexus-Epithelzellen exprimiert.<sup>15, 154</sup>

Die Isoformen VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> sind basisch, binden an Heparin und sind hauptsächlich an heparinhaltige Proteoglycane der extrazellulären Matrix gebunden.<sup>153</sup> Die Isoform VEGF<sub>121</sub> hat saure Eigenschaften und bindet nicht an Heparin.

Der Isoform VEGF<sub>165</sub> kommt eine Intermediärstellung zu. Sie wird sezerniert, ein signifikanter Anteil ist jedoch auch an Zelloberfläche und extrazelluläre Matrix gebunden.<sup>153</sup> Diese Isoform scheint bezüglich Bioverfügbarkeit und biologischer Wirksamkeit optimale Eigenschaften zu besitzen.<sup>47</sup>

Die Genexpression von VEGF wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Eine wichtige Rolle spielt der Sauerstoff-Partialdruck im Gewebe. Bei niedriger Sauerstoffspannung wird die Expression von VEGF mRNA induziert.<sup>36</sup> Der Hypoxia-inducible Factor HIF-1 ist ein wichtiger Mediator der hypoxischen Antwort.<sup>173</sup> Auch mehrere Wachstumsfaktoren können die Expression der VEGF mRNA hochregulieren. Durch parakrine und autokrine Sekretion von Faktoren wie dem Epidermal Growth Factor, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , dem Keratinocyte Growth Factor, FGF und PDGF im Rahmen von lokaler Hypoxie wird die VEGF Sekretion reguliert.<sup>46, 140</sup> Zusätzlich induzieren inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha$  und IL-6 die VEGF Expression.<sup>47</sup> Diesen Effekt hat auch die Mutation von Onkogenen oder die Amplifikation von Ras.<sup>64, 146</sup>



**Abb. 2** Rezeptorinteraktionen der VEGF - Familie (mod. n. Yancopoulos und Mitarb. 2000)

VEGF bindet an mehrere Tyrosinkinase-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Endothelzellen und bone-marrow derived cells. Die zwei bedeutsamsten sind VEGFR-1 (auch= Flt-1) und VEGFR-2 (auch= KDR oder Flk-1).<sup>46</sup> Die genaue Funktion von VEGFR-1 (Flt-1) wird noch diskutiert. So soll die Funktion und die Signaleigenschaft dieses Rezeptors auch vom Differenzierungsgrad der jeweiligen Zelle abhängen. Durch einen HIF-1 abhängigen Hypoxie-induzierten Mechanismus wird die VEGFR-1 Expression hochreguliert.<sup>55</sup> Durch die Bindung von VEGF, aber auch von Placenta Growth Factor (PlGF),<sup>152</sup> findet eine Autophosphorylierung

des Rezeptors statt.<sup>197</sup> Der Rezeptor könnte als „Lockvogel“ für freies VEGF fungieren und so die Bindung an VEGFR-2 reduzieren.<sup>152</sup> Gleichzeitig generiert der Rezeptor selbst jedoch auch ein mitogenes Signal.<sup>125</sup> Die Induktion von Metalloproteinase-9 in Endothelzellen der Lunge und die Rekrutierung von Endothelialen Vorläufern werden mit VEGFR-1 in Verbindung gebracht.<sup>70, 73</sup> Die Rolle von VEGFR-2 (KDR oder Flk-1) im Prozess der Angiogenese und Hämatopoese ist durch das Ausbleiben von Vaskulogenese und das Fehlen von Blutinseln in entsprechenden VEGFR-2-Null-Mäusen gesichert.<sup>175</sup> Dieser Rezeptor ist der entscheidende Mediator des angiogenetischen, mitogenen, und permeabilitätssteigernden Effektes von VEGF. Chemotaktische, anti-apoptotische und mitogene Signale folgen der Dimerisierung und Phosphorylierung dieses Rezeptors.<sup>47, 155</sup>

Zusätzlich konnten weitere VEGF Bindungsstellen auf Tumorzellen und Endothelzellen gezeigt werden: die Neuropiline (NRP1 und NRP2). Die Tatsache, dass die Isoform 121 nicht gebunden wird, legt in diesem Zusammenhang eine Bedeutung der von Exon 7 kodierten Region nahe, dessen Genprodukt in dieser Isoform nicht enthalten ist. Das Genprodukt von Exon 7 besitzt basische Eigenschaften, die für die Bindung an diese Rezeptoren entscheidend zu sein scheinen.<sup>180</sup> NRP1 verstärkt bei einer Koexpression mit VEGFR-2 die Bindung von

VEGF<sub>165</sub> an VEGFR-2.<sup>181</sup> Dabei wird VEGF von NRP1 dem Rezeptor VEGFR-2 präsentiert. Ein Signal von VEGF allein durch Bindung an NRP1 und NRP2 konnte nicht gezeigt werden.<sup>141</sup> Die Bedeutung von NRP1 im Prozess der Angiogenese konnte in NRP1-Null-Mäusen gezeigt werden.<sup>90</sup>

In neueren Untersuchungen konnte für VEGF-A ebenfalls ein direkter Effekt auf das Nervensystem gezeigt werden.<sup>183</sup> So wurde in der Zellkultur eine Stimulation der Aussprossung von Axonen und ein verbessertes Überleben von Neuronen und Satellitenzellen beobachtet.<sup>182</sup> Ebenso konnte ein mitogener Effekt auf Astrozyten sowohl in Kultur, als auch nach intrazerebraler VEGF-Applikation in vivo dargestellt werden.<sup>96, 179</sup> Untersuchungen an Motoneuronen zeigten unter VEGF eine geringere Empfindlichkeit gegen Ischämien und so einen neuroprotektiven Effekt.<sup>105</sup>

Das Gen für VEGF-B befindet sich auf Chromosom 11. Alternatives Splicing führt zu 2 Isoformen, bestehend aus 167 respektive 186 Aminosäuren. VEGF-B wird nur vom VEGFR-2 Rezeptor gebunden und besitzt eine Bedeutung bei der koronaren Vaskularisation und dem kardialen Wachstum. Mäuse ohne das Gen für VEGF-B erschienen normal und fruchtbar, zeigten aber eine reduzierte Herzgröße und eine erhöhte Empfindlichkeit gegen kardiale Ischämien.<sup>10</sup>

Das Gen für VEGF-C befindet sich auf Chromosom 4. Die Bedeutung von VEGF-C liegt in der Bindung an den spezifisch lymphatischen Rezeptor VEGFR-3 (Flt-4).<sup>186</sup> Eine Überexpression von VEGF-C führt zu einer Hyperplasie von Lymphgefäßen.<sup>148</sup> Die zusätzliche Bindung an VEGFR-2 resultiert in einem angiogenetischen Effekt von VEGF-C.<sup>200</sup>

Das Gen für VEGF-D befindet sich auf dem X-Chromosom. VEGF-D bindet ebenfalls an den VEGFR-2 Rezeptor und den VEGFR-3 Rezeptor. Die Induktion von Angiogenese und Lymphangiogenese konnte für VEGF-D experimentell belegt werden.<sup>21</sup>

## 1.4 Vektoren zur Gentherapie

Die therapeutische Applikation eines Wachstumsfaktors als Protein ist nicht zuverlässig erfolgreich.<sup>71, 83</sup> Vielversprechender ist der Versuch, mit Hilfe gentechnischer Verfahren eine hohe Gewebekonzentration des Proteins zu erreichen. Gentherapie beschreibt die Modifikation der Erbinformation durch das Einbringen von genetischem Material in die Zelle. So sollen die Zellen des Zielgewebes in die Lage versetzt werden, die zugeführte Erbinformation zu replizieren und den Wachstumsfaktor in hoher Konzentration für einen bestimmten Zeitraum zu exprimieren.

Generell unterscheidet man die in-vivo Gentherapie und die ex-vivo Gentherapie. Bei der in-vivo Therapie wird das genetische Material direkt in das zu therapierende Gewebe eingebracht. Bei der ex-vivo Therapie jedoch werden dem Organismus zuerst Zellen entnommen, der Gentransfer erfolgt außerhalb des Körpers, danach werden die Zellen reimplantiert.

Die zu übertragende Erbinformation liegt zumeist in Form von komplementärer DNA, der sogenannten cDNA vor. Bei dieser liegen nur noch die kodierenden Exons vor. Dies wird ermöglicht, indem mit Hilfe der reversen Transkriptase in zwei Arbeitsschritten DNA-Kopien der mRNA angefertigt werden.

Um die Aufnahme der cDNA in die Empfängerzelle zu ermöglichen, muss sie mit einem entsprechenden Träger verknüpft werden. In diesem Zusammenhang spricht man von Genvektoren. Man unterscheidet nicht-virale und virale Vektoren. Bei nicht-viralem Gentransfer spricht man von Transfektion, bei viralem hingegen von Transduktion.

### 1.4.1 Nicht-virale Genvektoren

Grundlage des nicht-viralen Gentransfers ist die Plasmid-DNA. Plasmide, die Satelliten-DNA mancher Bakterien, tragen zumeist Gene für die Konjugation von Bakterienzellen und häufig auch für Antibiotika-Resistenzen. In diese Plasmide werden die gewünschte Erbinformation und ein Promotor zum

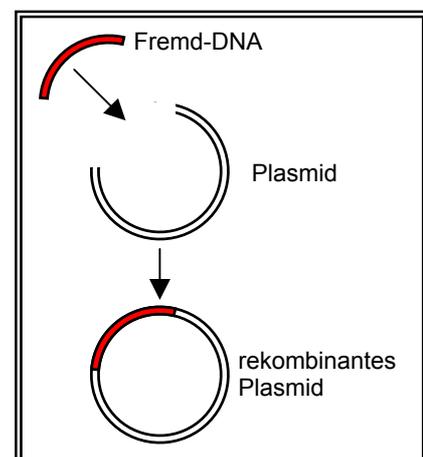


Abb. 3 rekombinantes Plasmid

Erreichen einer hohen Genexpression kloniert. Man spricht nun von einem rekombinanten Plasmid.

Bei nicht-viralen Genvektoren unterscheidet man chemische Vektoren, biochemische Vektoren und physikalische Vektoren. Neuere Techniken überschreiten jedoch die Grenzen dieser Einteilung.

Chemische Verfahren wurden bereits vor mehr als 35 Jahren angewandt. Die DNA wurde mit DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran) und Kalziumphosphat präzipitiert, um eine Anheftung an Zellwände zu erreichen und den Komplex durch Endozytose in die Zelle einzubringen. Die verwendeten Substanzen weisen jedoch eine Toxizität auf, und nicht alle Zellen lassen sich auf diese Weise transfizieren.<sup>114</sup>

Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung von Liposomen als Vektoren dar.<sup>16</sup> Liposomen bestehen aus einer oder mehreren konzentrischen Lipid-Doppelschichten. Die amphiphilen Lipide bilden im wässrigen Milieu eine Doppelschicht aus, wobei die hydrophilen Köpfe der Moleküle jeweils nach außen weisen und sich die hydrophoben Enden nach innen gegeneinander richten. Eine Reduktion der Oberflächenspannung wird durch den Zusammenschluss zu sphärischen Gebilden, den Liposomen, erreicht. Diese zwischen 20nm und 100µm großen Vesikel können mit dem Transgen „gefüllt“ werden. Der Einbau der polyanionischen DNA in den wässrigen Innenraum der Liposomen gelang jedoch nicht effizient.<sup>144</sup> Die Komplexierung der negativ-geladenen DNA mit kationischen Lipiden<sup>42</sup> unter Bildung von Lipoplexen ist jedoch ein effektives und häufig angewandtes nicht-virales Vektorsystem, das experimentell auch in Fragestellungen der Plastischen Chirurgie Verwendung findet. So konnten Taub et al. bei Einsatz eines solchen Vektorsystems für die Transfektion von für VEGF kodierender cDNA ein verbessertes Überleben von ischämischen Hautlappenplastiken zeigen.<sup>187</sup> Eine Kompaktierung der DNA mit synthetischen Polykationen wie Polylysin stellt ein Vektorsystem dar, das die Endozytose erleichtert und gleichzeitig einen Schutz vor dem Abbau durch Nukleasen bietet.<sup>41</sup>

Als biochemische Modifikation ist die Kopplung dieser Polykationen an Rezeptorliganden oder Transferrin aufzufassen. So wird durch eine rezeptorvermittelte Internalisation eine zellspezifischere Transfektion erreicht.<sup>92, 93</sup>

Physikalische Verfahren beinhalten:

- die direkte Inokulation durch Mikroinjektion mit Glaskapillaren unter mikroskopischer Kontrolle,<sup>32</sup>
- das „Biolistic Bombardement“, bei dem plasmidbeladene Mikropartikel (zumeist Gold) mit hoher Geschwindigkeit in das Zielgewebe eingebracht (geschossen) werden,<sup>19</sup>
- den Gentransfer durch Anbringung eines elektrischen Feldes, wodurch Poren in der Zellmembran erzeugt werden, welche die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtern,<sup>13</sup> und den
- Gentransfer durch hydrodynamischen Druck.<sup>207</sup>

Ein neueres Verfahren ist die Magnetofektion. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Assoziation eines nicht-viralen Genvektors mit paramagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, z.B. durch eine Hülle aus Polyethylenimin.<sup>157, 158</sup> Unter dem Einfluss von Eisen-Bor-Neodym-Permanentmagneten kann im Zielgebiet eine hohe Genexpression erreicht werden.<sup>56, 80, 169</sup>

#### 1.4.2 Virale Genvektoren

Der Einsatz viraler Vektorsysteme ermöglicht eine Effizienz, die mit nicht-viralen Vektoren kaum zu erreichen ist.

Viren bestehen vorwiegend aus Nukleinsäuren und Proteinen. Diese „vagabundierenden Gene“ verfügen über keinen eigenen Stoffwechsel, stellen für ihre Fortpflanzung nur ihre Erbinformation bereit und sind auf den Syntheseapparat der Wirtszelle angewiesen. Diese Charakteristika machen sie als Vektorsysteme für die Gentherapie interessant. Jedoch muss für den therapeutischen Einsatz die Vermehrungsfähigkeit der Viren aufgehoben werden. Die einmalige Infektion der Zellen ist Voraussetzung, die Vermehrung des Virus in der Wirtszelle, die Zerstörung dieser mit Freisetzung der neugebildeten Viren und nachfolgender Infektion weiterer Zellen des Organismus ist unerwünscht. Dies gelingt durch Deletion der für die Replikation notwendigen Abschnitte im Virusgenom.<sup>28</sup> Die Vermehrung ist dann nur noch in eigens zu diesem Zweck bereitgestellten Zellen möglich, die selbst eben diese notwendigen Replikationsproteine exprimieren.

Eine Reihe von Viren eignet sich für den Einsatz in der Gentherapie:

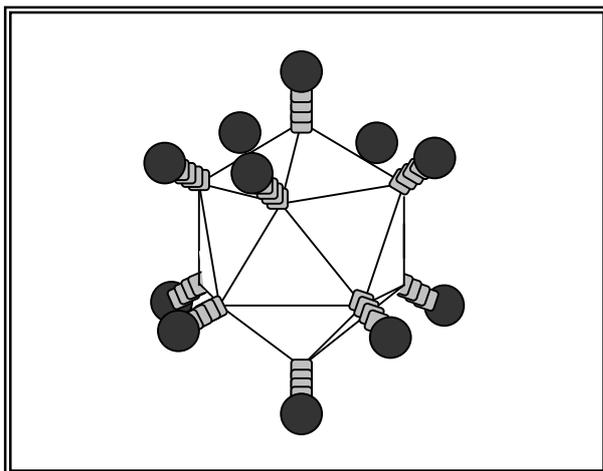
In den Anfängen der Gentherapie mit viralen Vektoren Ende der 80er Jahre wurden hauptsächlich Retroviren verwendet. Die **Reverse Transkriptase** **Onkogene** sind 80-100 nm große behüllte ikosaedrisch oder konisch geformte RNA Viren, die über 2 identische Einzelstrang RNA Moleküle positiver Polarität verfügen. Mittels der reversen Transkriptase werden doppelsträngige DNA-Kopien der einzelsträngigen Virus-RNA angefertigt. Im Zellkern wird die Virus-DNA dann mit Hilfe des als Endonuklease fungierenden Enzyms Integrase in das Wirtsgenom integriert. Jedoch scheint nur die Untergruppe der Lentiviren (z.B. HIV) in der Lage, in den Kern von sich nicht teilenden Zellen einzudringen. Bei der Verwendung als Vektoren sind die Abschnitte des Virusgenoms, die zur Bildung von gruppenspezifischen Antigenen (Gag-Proteine), Enzymen wie der Polymerase und Membranproteinen (Env-Gene) durch das therapeutisch gewünschte Gen ersetzt. Obwohl die Retroviren durch eine gute Transduktionsrate und stabile Expression sich teilender Zellen durch Integration in das Genom der Wirtszelle gute Vektoreigenschaften besitzen, so ist die Effizienz des retroviralen Gentransfers in vivo doch gering.<sup>103</sup> Ebenso limitiert die Gefahr der Entstehung von replikationskompetenten Viren und die Gefahr der malignen Entartung des Gewebes ihren Einsatz.<sup>66, 67, 196</sup>

Herpesviren sind 150-200 nm große behüllte ikosaedrische Doppelstrang-DNA Viren. Sie infizieren auch sich nicht teilende Zellen und bieten in ihrem 124-235 kBp großen Genom viel Platz für Transgene. Ihr Neurotropismus und die Zytotoxizität begrenzen jedoch Ihren Einsatz in der Gentherapie.<sup>68</sup>

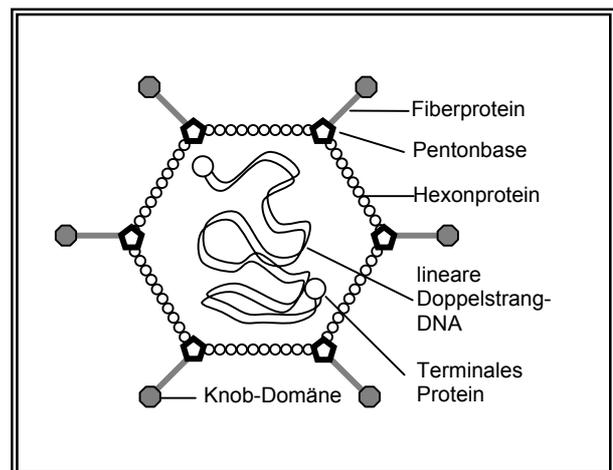
Vaccinaviren sind behüllte bikonkave oder zylindrische Doppelstrang-DNA Viren. Sie gehören zur Gruppe der Poxviridae, den mit einer Größe von 170-450 nm größten bekannten Viren. Das Vaccinavirus wurde bereits Ende des 18. Jahrhunderts von E. Jenner in England als Impfvirus gegen Pocken verwendet. Als Vektor bietet es eine hohe Expressivität und eine transiente Expression durch fehlende Integration in das Wirtsgenom.<sup>145</sup> Als Hybridvirus mit Determinanten von anderen Viren findet es in experimentellen Impfstoffen Verwendung.<sup>133</sup>

Adenovirusassoziierte Viren (AAV) gehören zur Gruppe der Parvoviren, einer Gruppe von unbehüllten, ikosaedrisch geformten, 18-26 nm kleinen Einzelstrang-DNA Viren. Adenovirusassoziierte Viren werden auch als defekte oder abhängige Viren bezeichnet, da sie zur Replikation auf Helferproteine angewiesen sind, die in der Regel von Adenoviren oder Herpesviren zur Verfügung gestellt werden. In Abwesenheit dieser Kofaktoren liegt eine latente Infektion vor; eine Infektion ist erfolgt, aber das Virus liegt ruhend als integriertes Genom in der Wirtszelle. Die Fähigkeit des Virusgenoms zur Integration in die Wirts-DNA bietet bei der Verwendung als Vektor in der Gentherapie den Vorteil der stabilen Expression. Die niedrige Immunogenität und hohe Transduktionsraten sind weitere Vorteile. Die geringe maximale Größe des Transgens von nur bis zu 5 kBb ist hingegen nachteilig zu bewerten.<sup>69</sup>

Adenoviren sind unbehüllte, ikosaedrische 70-90 nm große Doppelstrang-DNA Viren. Zusätzlich sind Pentonbasen des adenoviralen Kapsids mit Fiberproteine assoziiert, denen eine wichtige Bedeutung bei der Bindung an die Zielzelle zukommt. Adenoviren konnten 1953 von W. Rowe zum ersten Mal aus Tonsillen und Adenoidgewebe isoliert werden.<sup>165</sup>

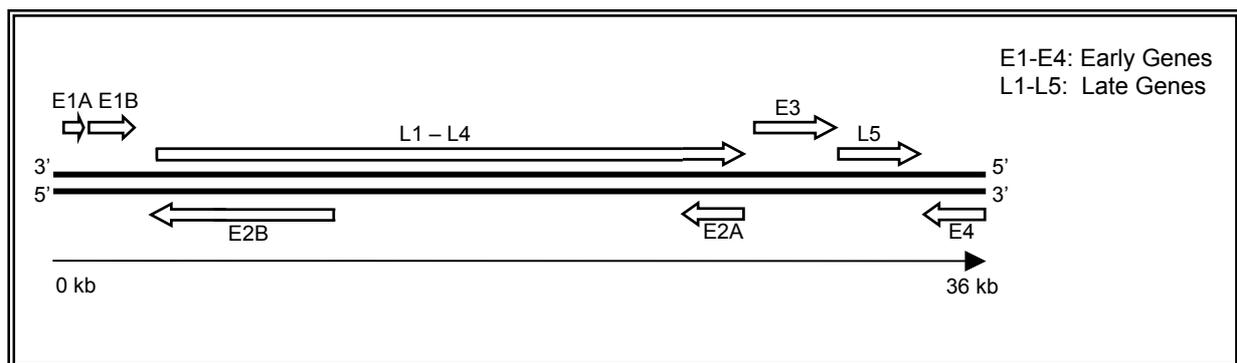


**Abb. 4** Adenovirus



**Abb. 5** Adenovirales Kapsid

In der Gentherapie besitzt der Serotyp 5 die größte Bedeutung. Seine Genexpression kann in mehrere Phasen unterteilt werden. Jede Phase umfasst die aufeinanderfolgende Expression viraler Gene, von denen einige für Transkriptionsregulatoren kodieren, welche den korrekten Ablauf des Replikationszyklus des Virus regulieren. Man unterscheidet die sehr frühe Genexpression (immediate early expression), spätere frühe Genexpression (delayed early expression) und die späte Genexpression (late expression).



**Abb. 6** Genom des Adenovirus vom Serotyp 5

E1A ist als immediate early gene das erste exprimierte adenovirale Gen. Die entsprechenden Proteine (243RE1A und 289RE1A) aktivieren die delayed early genes E1B, E2A, E2B, E3 sowie E4, denen entscheidende regulatorische Funktionen zukommen. So komplexiert das von E1B kodierte Protein 19KE1B mit E1A und unterbricht dadurch die Kaskade, die sonst ungehindert weiterlaufen würde.<sup>6, 137</sup> Gleichzeitig schützt es die virale DNA vor dem Abbau. Die E2 Region kodiert für Proteine, die an der Replikation des Virus beteiligt sind. Sechs bis acht Stunden nach Infektion beginnt die Replikation des Genoms und ist nach etwa 24 Stunden beendet. Der Höhepunkt liegt hierbei zwischen Stunde 18 und Stunde 20.<sup>137</sup> Die E3 Region spielt eine Rolle bei der Immunabwehr des Virus. Das E3 Genprodukt Gp19KE3 verhindert die Lyse der infizierten Zelle durch zytotoxische T-Lymphozyten, indem es im endoplasmatischen Retikulum mit den HLA-Klasse-I Histokompatibilitäts Proteinen Komplexe bildet. Ebenfalls wird die E1A-vermittelte erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Tumornekrosefaktor und aktivierten Makrophagen durch E3-Proteine wieder gesenkt.<sup>201</sup>

Beim Einsatz als Vektor sind die für die Replikation notwendigen Regionen E1 und E3, in neueren Vektorgenerationen ebenfalls die Regionen E2 und E4 deletiert. Die Replikation des Virus erfolgt in Zelllinien, deren Genom die essentielle E1 Region enthält (wie HEK 293 Zellen).

Adenovirale Vektoren bieten viele Vorteile, die sie zum bevorzugten Vektor machen. Sie ermöglichen einen hocheffizienten Gentransfer, sowohl von sich teilenden als auch von ruhenden Zellen und verfügen über eine hohe in-vivo Stabilität. Gleichfalls ist die Pathogenität gering. Da die Virus-DNA zwar in den Zellkern gelangt, dort aber nicht in das Wirtsgenom integriert wird, ist nur eine transiente Expression zu erzielen. Der Einsatz von „gutless“ Adenoviren, denen sämtliche virale Gene fehlen, scheint eine längere Verweildauer des Transgens zu ermöglichen. Ebenso verfügen diese „leeren“ Viren über eine geringere Zytotoxizität und Immunogenität.<sup>20, 95</sup>

## 1.5 AdVEGF in klinischen Studien

In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde ein adenoviraler Vektor, in den Versuchsgruppen kodierend für die VEGF-Isoform 165 verwendet. Dieses Vektorsystem wird bereits in verschiedenen klinischen Studien erprobt. Am Menschen haben adenovirale Genvektoren Entzündungsreaktionen, Antikörperbildung, zeitweilig Fieber und eine Erhöhung der Lebertransaminasen auslösen können, die Entstehung von Malignomen konnte jedoch nicht beobachtet werden.<sup>204</sup>

Der Einsatz von AdVEGF in klinischen Phase I und Phase II Studien beschränkt sich momentan auf die Therapien in den Bereichen der koronaren Herzerkrankungen und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten.<sup>63, 100-102, 121, 122, 164, 185</sup>

In der KAT II-Studie (Kuopio Angiogenesis Trial II), einer kontrollierten, doppelblinden Phase II Studie, wurde an Patienten mit Angina pectoris Grad II-III ein Katheter-gesteuerter intrakoronarer VEGF-Gentransfer nach PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie) durchgeführt und die Auswirkung auf die Restenose-Rate und die myokardiale Durchblutung untersucht.<sup>72</sup> In der AdVEGF Versuchsgruppe zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte myokardiale Durchblutung.

Die REVASC-Studie (Randomized Evaluation of VEGF for Angiogenesis in Severe Coronary Disease), bei der die Infektion intramyokardial erfolgte, zeigte funktionell wie auch in der Elektrophysiologie des Herzens signifikante Verbesserungen.<sup>161</sup>

Die RAVE-Studie (Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor), ebenfalls eine randomisierte, doppel-blinde Phase II Studie, untersuchte den Effekt einer einmaligen Administration von AdVEGF bei Patienten mit einseitiger Claudicatio intermittens.<sup>160</sup> Die Auswertung der möglichen Wegstrecke 12 und 26 Wochen nach intramuskulärer Injektion erbrachte keinen Unterschied zwischen Versuchsgruppen und Kontrollen. Ein von den Autoren selbst geäußelter Kritikpunkt dieser Studie stellt die Therapie nur einer Seite wie auch die Auswahl des Patientenguts mit vordringlich einseitiger pAVK dar, einer Erkrankung, die im Regelfall beidseitig ausgeprägt ist.

Makinen et al. konnten einen positiven Effekt einer intraarteriellen Applikation von AdVEGF bei peripheren Ischämien zeigen.<sup>121</sup> Patienten mit arteriosklerotischen infrainguinalen Stenosen oder Verschlüssen wurden im Anschluss an eine PTA (perkutane transluminale Angioplastie) mit AdVEGF therapiert und die Veränderungen mittels digitaler Subtraktionsangiographie dokumentiert.

Ein klinischer Einsatz von AdVEGF im Bereich der Plastischen Chirurgie, die für Methoden zur Induktion von Angiogenese und Verbesserung der Durchblutung ein breites Anwendungsgebiet darstellt, ist bis dato klinisch nicht erprobt.

## **1.6 Experimenteller Einsatz von VEGF zur Induktion von Angiogenese in der Plastischen Chirurgie**

Erste experimentelle Studien zur VEGF- vermittelten Induktion von Angiogenese untersuchten die lokale Injektion des Proteins in axial gestielte Muskel- und Hautlappenplastiken.<sup>97, 109, 171, 205, 206</sup> Bei intramuskulärer Injektion konnte im Modell einer M. gracilis-Lappenplastik<sup>97</sup> und einer TRAM-Lappenplastik (transverse Rectus abdominis Myokutanlappenplastik)<sup>171</sup> eine verbesserte Überlebensrate gezeigt werden. Zur Verbesserung des biologischen Effektes einer Therapie mit VEGF wurden mit dem Ziel einer erhöhten VEGF-Produktion im Gewebe und einer

verbesserten Überlebensrate der Lappenplastiken verschiedene Methoden des Gentransfers untersucht.

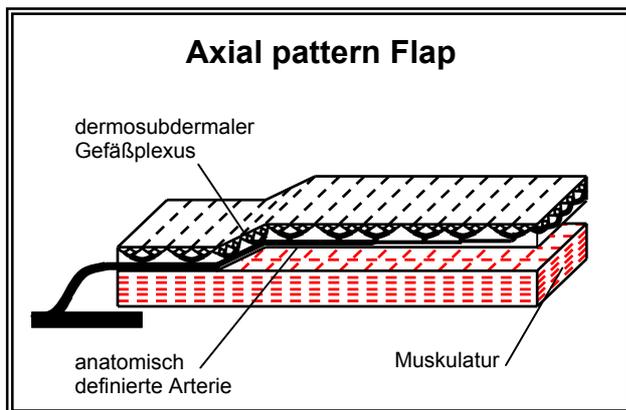
Bei lokaler Injektion der für das Protein kodierenden cDNA konnten in den Versuchsgruppen verbesserte Überlebensraten für ischämische Hautlappenplastiken gezeigt werden.<sup>150, 187, 198</sup>

Ebenfalls wurde der Einsatz von Liposomen als Vektoren untersucht. Bei intramuskulärer Injektion konnte in einer *M. gracilis* Lappenplastik 7 Tage nach Therapie eine erhöhte Kapillardichte und eine verbesserte Überlebensrate nachgewiesen werden,<sup>142</sup> und nach Injektion in die Haut zeigte sich im Modell einer Lappenplastik vom „random-pattern“-Typ ebenfalls eine vergrößerte überlebende Fläche.<sup>113</sup>

Der Einsatz von adenoviralen Vektorsystemen erscheint aufgrund des hocheffizienten Gentransfers, der in-vivo Stabilität und der transienten Expression gegenwärtig als erfolgversprechendster Ansatz. Bei Untersuchungen an ischämischen Hautlappenplastiken zeigte sich sowohl für Lappenplastiken vom „random-pattern“-Typ,<sup>30</sup> als auch vom „axial-pattern“-Typ<sup>65</sup> in den therapierten Gruppen eine signifikante Vergrößerung der überlebenden Fläche. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der VEGF-Produktion zeigten im retroperitonealen Fettgewebe der Ratte eine 48 Stunden nach Transduktion erhöhte VEGF-Expression und ein Expressionsmaximum 5 Tage nach Transduktion.<sup>119</sup> Ein messbarer angiogenetischer Effekt der erhöhten Proteinkonzentration im Gewebe wäre mit einer weiteren zeitlichen Latenz zu erwarten. Inwieweit jedoch die VEGF-Expression im Fettgewebe vom zeitlichen Verlauf her der Expression in therapierter Haut oder Muskulatur entspricht, ist zu klären. Der Einfluss des Transduktionszeitpunktes auf das Überleben von Hautlappenplastiken wurde durch Injektion des Vektorsystems 12 Stunden, 3 Tage, 7 Tage oder 14 Tage vor Lappenhebung untersucht.<sup>65</sup> Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Transduktionszeitpunkten konnte nicht gefunden werden. Die untersuchte Hautlappenplastik vom „axial-pattern“-Typ zeigte jedoch in Kontrollgruppen eine inkonstante Nekroseentwicklung zwischen 21% und 36%. Daher scheint die Untersuchung an einer überdimensionierten Lappenplastik vom „random-pattern“-Typ aufgrund des etablierten Länge-zu-Breite Verhältnisses von 2:1 und einer verlässlich zu erwartenden Ischämie im überdimensionierten Bereich geeigneter zu sein.

## 1.7 Das Modell des „Random-pattern-Flap“

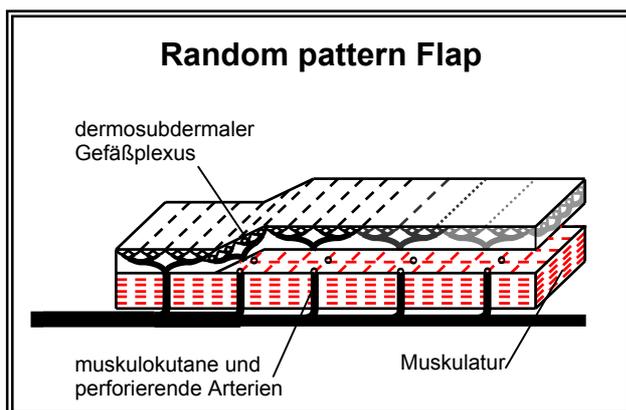
Lokale Hautlappenplastiken können entweder nach ihrer Blutversorgung oder nach der Verlagerung des Lappens eingeteilt werden. Die Verlagerung kann zum Beispiel in Form von Rotation (Rotationslappenplastik), Vorschub (Advancement-Flap) oder Transposition (Transpositions-lappenplastik) erfolgen. Hinsichtlich ihrer Blutversorgung unterscheidet man Hautlappen vom „axial-pattern“-Typ und vom „random-pattern“-Typ.



**Abb. 7** Der Axial-pattern-Flap

Die Blutversorgung der oberen Hautschichten erfolgt aus dem dermosubdermalen Gefäßplexus. Beim „Axial pattern-Flap“ wird dieser direkt von einem anatomisch genau definierten Gefäßbaum versorgt. Beispiele hierfür sind die von der A. temporalis superficialis versorgte laterale Stirnlappenplastik, die von der A. circumflexa ilium superficialis

versorgte inguinale, oder die hypogastrische Hautlappenplastik, deren zuführendes Gefäß die A. epigastrica superficialis ist. Eine Sonderform der axialen Lappenplastiken sind die Insellappen, bei denen der versorgende Gefäßstiel über eine längere Strecke freipräpariert wird. Die anhängende Hautinsel kann nun verlagert werden. Verwendung findet diese Art der Defektdeckung unter anderem an der Hand (Lappenplastik n. Foucher und Braun) oder in Form der Sternallappenplastik.



**Abb. 8** Der Random-pattern-Flap

Bei den Lappenplastiken vom „random-pattern“-Typ liegt zur Versorgung des dermosubdermalen Plexus kein definiertes Gefäß vor. Der Plexus wird von muskulokutan und faszio kutan perforierenden Gefäßen gespeist. Die Blutversorgung der

Lappenplastik erfolgt ausschließlich über die verbleibende Gewebsbrücke, den Lappenstiel. So sind „Random-pattern-Flaps“ praktisch an der gesamten Körperoberfläche verfügbar. Ein Nachteil dieser sehr einfachen Technik der Defektdeckung ist jedoch die durch die Breite der verbleibenden Gewebsbrücke vorgegebene mögliche Länge der Hautlappenplastik: nur bis zu einem Länge-zu-Breite Verhältnis von 2:1 ist eine ausreichende Blutversorgung des Lappens gewährleistet.<sup>126, 128</sup>

Aufgrund seiner undefinierten Gefäßversorgung ist die Lappenplastik vom „random-pattern“- Typ als Lappenmodell im Rahmen der Studie zur Induktion von Angiogenese gut geeignet. Größe und Lokalisation von anatomisch definierten Gefäßen sind interindividuell stark variabel. Dieses Problem kann durch die Wahl des „Random-pattern-Flap“ umgangen werden, die Resultate sind untereinander so besser vergleichbar. Ein weiterer Vorteil ist das etablierte Länge-zu-Breite Verhältnis. Bei einer Überdimensionierung der Lappenplastik ist verlässlich mit der Entstehung von Nekrose zu rechnen. Die Auswirkung der gentherapeutisch induzierten Angiogenese im Hinblick auf eine optimierte Blutversorgung des Hautlappens kann anhand der Größe der überlebenden Fläche evaluiert werden.

## 1.8 Zielsetzung

Die plastische Chirurgie bietet viele Einsatzmöglichkeiten, durch therapeutisch induzierte Angiogenese eine verbesserte Blutversorgung von Geweben zu schaffen und so die Entstehung von Nekrose zu reduzieren.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe dieser Arbeit, im Tiermodell an der Ratte die Wirksamkeit des adenoviralen Gentransfers des Wachstumsfaktors VEGF im Hinblick auf die Bildung neuer Gefäße mit dem Ziel einer verbesserten Durchblutung zu untersuchen:

1. Zunächst soll in der Zellkultur die Fähigkeit des Vektors sichergestellt werden, in infizierten Zellen die Produktion von VEGF zu stimulieren.
2. Der zeitliche Verlauf der Expression ist dabei zu untersuchen.
3. Danach ist zu klären, ob die Transduktion des Wachstumsfaktors in der Haut der Ratte in einer erhöhten Konzentration von VEGF resultiert und
4. ob bei therapierten Tieren eine erhöhte Gefäßdichte vorliegt.
5. Am Modell der überdimensionierten Hautlappenplastik vom random-pattern Typ ist dann zu untersuchen, ob bei therapierten Tieren im kritischen Areal eine erhöhte Durchblutung vorliegt und
6. ob eine Vergrößerung der überlebenden Fläche beobachtet werden kann.
7. Zusätzlich soll der optimale Zeitpunkt der Transduktion ermittelt werden.
8. Ein angiogenetischer Effekt allein durch die Infektion mit einem Adenovirus ist durch zusätzliche Verwendung eines Kontrollvirus auszuschließen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur und Zellsplitting

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Brutschränken der Firma Life Sciences International, Frankfurt bei einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

IEC-6 Zellen:

Die IEC-6 Zellen zur in-vitro Quantifizierung der VEGF-Produktion wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland (DSMZ Nr. ACC 111) bezogen. Es handelt sich hierbei um intestinale Epithelzellen der Ratte mit einer Verdoppelungszeit von ca. 50 Stunden und einer maximalen Passagezahl von 15 Verdoppelungen.

Die Kultivierung erfolgte in 45% DMEM, 45% RPMI und 10% FKS sowie 0,1 IU/ml Insulin.

HEK 293-Zellen:

Die HEK 293 Zellen zur Amplifikation des Virus stammen von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (CRL 1573). Es handelt sich um eine kontinuierliche primäre humane embryonale Nierenzelllinie, die mit Fragmenten des humanen Adenovirus Typ 5 transformiert wurde und entsprechend E1-Proteine exprimiert.<sup>62</sup> Die Verdoppelungszeit dieser Zelllinie beträgt ca. 36 Stunden.

Die Kultivierung erfolgte in 90% DMEM, 10% FKS sowie 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 4mmol/l Glutamin.

Um eine Überkonfluenz der sich teilenden Zellen zu vermeiden, wurden die Zelllinien bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80%-90% regelmäßig expandiert:

Der Zellrasen in den Kulturflaschen wurde mit PBS gespült und mit ca. 37°C warmer Trypsin-EDTA-Lösung (je 2ml bei Flaschen mit einem Volumen von 150cm<sup>3</sup> und 1ml bei Flaschen mit einem Volumen von 75cm<sup>3</sup>) behandelt und für 2 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die noch haftenden Zellen durch vorsichtiges Klopfen abgelöst, die Flaschen mit 24ml des entsprechenden auf 37°C erwärmten Mediums bei 150cm<sup>3</sup>-

Flaschen und 12ml bei 75cm<sup>3</sup>-Flaschen aufgefüllt, gespült und in neue Kulturflaschen überführt. Diese wurden anschließend entsprechend ihrer Größe und dem Volumen des zugegebenen Gemisches mit dem jeweiligen auf 37°C erwärmten Kulturmedium auf ein Volumen von 24ml (150cm<sup>3</sup>-Flaschen) bzw. 12ml (75cm<sup>3</sup>-Flaschen) aufgefüllt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.2 Virenstämme

Ad312:

Ad312 ist ein replikationsdefizientes Adenovirus vom Serotyp 5. Die Replikationsdefizienz wurde durch Deletion von E1A erreicht.<sup>143</sup> Ad312 diente als Kontrollvirus.

AdCMV.VEGF<sub>165</sub>:

AdCMV.VEGF<sub>165</sub> ist ein replikationsdefizientes Adenovirus vom Serotyp 5 mit der cDNA der humanen VEGF-Isoform 165 als Reporter gen und einem konstitutiven Zytomegalievirus (CMV)-immediate-early Promotor.<sup>118, 135</sup> Die Replikationsdefizienz durch E1A Deletion wurde auch nach Vermehrung des Vektors in HEK 293 Zellen sichergestellt. AdCMV.VEGF<sub>165</sub> diente als Vektor für die Versuchsgruppen.

WildtypAd5:

WildtypAd5 ist ein replikationskompetentes Adenovirus vom Serotyp 5.<sup>60</sup> Die DNA dieses Virus diente als Positivkontrolle für die Regionen E1A und E2A in der Polymerase-Kettenreaktion beim Nachweis der Replikationsdefizienz von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>. Eine sonstige Verwendung im Rahmen der Versuche fand nicht statt.

## 2.3 Amplifikation von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Die Vervielfältigung des replikationsdefizienten Virus erfolgte in HEK 293-Zellen, da diese das Genprodukt der im Virusgenom deletierten Region exprimieren.

### 2.3.1 Infektion der HEK 293-Zellen

Die HEK 293 Zellen wurden auf 10 150cm<sup>3</sup>-Kulturflaschen expandiert, bis diese eine Konfluenz von ca. 90% zeigten.

In einem 50ml Falcon-tube wurden 40ml Optimem-Medium und 2ml AdCMV.VEGF<sub>165</sub> G2 stock-solution gemischt. Nach Absaugen des Nährmediums in den Kulturflaschen erfolgte dann die Infektion der Zellen mit je 4ml dieses Gemisches pro Flasche. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für 1 Stunde, wobei alle 10 Minuten die Kulturflaschen leicht geschwenkt wurden. Danach wurde das Infektionsmedium wieder durch Erhaltungsmedium ersetzt und die Zellen anschließend für ca. 36h im Brutschrank inkubiert.

### 2.3.2 Virusgewinn

Etwa 36 Stunden nach Infektion war der Zellrasen zum Großteil abgelöst. Die Zellen stellten sich lichtmikroskopisch als Zeichen der Infektion kugelig und stärker lichtbrechend dar. Durch vorsichtiges Klopfen konnten die letzten noch am Flaschenboden verbleibenden Zellen abgelöst werden. Der Inhalt der Flaschen wurde auf 6 50ml Falcon-tubes überführt, bei 4000rpm für 15 Minuten zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 8ml viral preservation medium vereint und viermal schockgefroren, um die intrazellulär liegenden Virionen freizusetzen. Der Zelldetritus wurde für 10 Minuten bei 4000rpm herunterzentrifugiert und der den Virus enthaltende Überstand bis zur Aufreinigung bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Ultrazentrifugation und Dialyse zur Aufreinigung des Virus

Reife Viruspartikel müssen von Zellbestandteilen, anderen Proteinen und Salzen gereinigt werden. Zu diesem Zweck erfolgte die zweimalige Ultrazentrifugation mit unterschiedlichen Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten und die anschließende Dialyse. Durch Zentrifugation einer Cäsiumchloridlösung entsteht ein kontinuierlicher Dichtegradient des Salzes. Reife Viruspartikel (mit einer Dichte von 1,34g/ml) bilden innerhalb dieses Gradienten eine eigene Bande, die abgesaugt werden kann. Die anschließende Dialyse entfernt verbliebene Salze und andere kleine Moleküle. In ein SW28-Zentrifugenröhrchen (für Beckman Optima-LE-80-K Ultrazentrifuge, Beckman, Krefeld) wurden zur Herstellung des ersten Dichtegradienten 17ml 1,33 molares CsCl und 9ml 1,45 molares CsCl pipettiert und anschließend 10µl des Viruslysates zugegeben. Nach Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Optima-LE-80-K<sup>®</sup>, Beckman, Krefeld) für 2 Stunden bei 14°C und 18000rpm wurde die den Virus enthaltende Bande vorsichtig abgesaugt (5ml Spritze mit 20G Nadel).

Für den zweiten Zentrifugationsschritt wurden 4ml 1,33 M CsCl und 4ml 1,45 M CsCl in ein SW41 Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und für 12 Stunden bei 20°C und 25000rpm zentrifugiert.

Die anschließende Dialyse erfolgte in Slide-A-Lyzer<sup>®</sup>-10K Dialysekassetten der Firma Pierce Chemical Company, Rockford, USA. Die Virussuspension wurde in eine Dialysekassette injiziert und die sich in der Kassette befindende Luft abgesaugt. Die Dialyse erfolgte für 18 Stunden bei Raumtemperatur in 1l 10 mM Trispuffer pH 7,6-7,8 unter Durchmischung mit einem Magnetrührer (Variomag<sup>®</sup>, H+P Labortechnik, München). Der Puffer wurde jeweils nach 2 Stunden und nach 4 Stunden gewechselt. Danach wurde das Virusdialysat aus der Kammer entfernt (5ml Spritze mit 20G Nadel), in Portionen zu je 100µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.3.4 Titerbestimmung AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Der Virustiter ist die quantitative Messung der biologischen Aktivität des Virus und wird in plaque-forming Units (pfU) pro ml ausgedrückt. Zur Bestimmung des Virustiters wurde ein Plaque-Test durchgeführt. Hierbei werden subkonfluente HEK 293 Zellen mit dem Virus in verschiedenen Verdünnungsstufen infiziert und die Zahl

der entstehenden Zellysate (Plaques) beobachtet. Die Zahl der klar voneinander getrennten Plaques in einer Petrischale wird gezählt. Mit der Formel:

$$\frac{\# \text{ Plaques}}{d \times V} = \text{pfU/ml}$$

d = Verdünnungsfaktor  
V = Volumen des verdünnten Virus in ml pro Petrischale

kann dann der Titer bestimmt werden.

Der Virus wurde in einer Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von  $10^{-11}$  titriert. Beim ersten Verdünnungsschritt wurden  $10\mu\text{l}$  des gereinigten Virus mit  $90\mu\text{l}$  Optimem verdünnt und bei den folgenden Schritten jeweils  $50\mu\text{l}$  der vorherigen Verdünnungsstufe in  $450\mu\text{l}$  Optimem überführt.

HEK 293 Zellen wurden auf 24 Petrischalen mit einem Durchmesser von 6cm ausplattiert und mit je 8ml DMEM-Medium bis zu einer Konfluenz von etwa 90% kultiviert. Dann erfolgte die Infektion mit  $250\mu\text{l}$  der jeweiligen Verdünnungsstufe pro Schale, wobei pro Verdünnungsstufe 2 Schalen infiziert wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 1 Stunde wurden die Zellen mit einer im Wasserbad auf  $44^{\circ}\text{C}$  angewärmten 1:1 Lösung aus DMEM und 1%iger Agarose bedeckt. Nach Aushärten der Agarose erfolgte die Kultivierung im Brutschrank. Nach 7 Tagen und nach 10 Tagen wurden die klar voneinander zu trennenden Einzelplaques der entsprechenden Verdünnungsstufe ausgezählt.

### 2.3.5 Titerbestimmung Ad312

Nach demselben Protokoll wurde eine Titerbestimmung des Kontrollvirus Ad312 durchgeführt.

## 2.4 Nachweis der Replikationsdefizienz von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Zur Sicherstellung der Replikationsdefizienz des verwendeten Adenovirus AdCMV.VEGF<sub>165</sub> wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Nach der Amplifikation in den HEK 293-Zellen ist eine Rekombination des Virus mit der E1A-Region auszuschließen.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Sie kommt ohne die Verwendung von Zellen aus und kann einfach durchgeführt werden. 1984 wurde die Methode von Kary Mullis entwickelt und hat sich schnell als eine Standardmethode in der Molekularbiologie etabliert.<sup>136</sup>

Die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf ca. 90°C denaturiert, und nach schnellem Herunterkühlen auf ca. 50°C werden zwei aus 15-25 bp bestehenden synthetische Oligonukleotid-Primer zugegeben. Diese Primer sind der Sequenz an den 5'-Enden der zu amplifizierenden Region der beiden Einzelstränge komplementär. Durch Zugabe einer DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge vom Primer aus in 5'-3' Richtung zum jeweiligen Doppelstrang synthetisiert. Durch Wiederholung dieses Zyklus aus Denaturierung, Anheftung der Primer und Amplifikation zum Doppelstrang ergibt sich eine exponentielle Zunahme der Zielsequenz, nach 25 Zyklen beispielsweise auf das 10<sup>6</sup>-fache. Hilfreich ist die Verwendung einer thermostabilen Polymerase, da sonst nach jedem Zyklus erneut Polymerase hinzugegeben werden muss. Am häufigsten wird daher die Taq-Polymerase verwendet, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, welches in heißen Quellen vorkommt.

Die DNA des Adenovirus AdCMV.VEGF<sub>165</sub> musste extrahiert und auf eine mögliche Verunreinigung mit E1A hin überprüft werden. Als Positivkontrolle diente ein Wildtyp Adenovirus Typ 5 (Wildtyp Ad5). Die E2A Region muss in beiden Viren vorhanden sein und wurde ebenfalls untersucht.

Die Virushülle wurde enzymatisch durch 90-minütige Inkubation von 2µl Virus mit 100µl Proteinase-K-Mix bei 55 °C gespalten. Nach Zugabe von 600µl eines Phenol-Chloroform-Amylalkohol-Gemisches im Verhältnis 25/25/1 wurden die Phasen durch 5-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm bei Raumtemperatur getrennt. Die oberste

Phase, welche die DNA enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 600µl Chloroform nochmals zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde daraufhin die DNA gefällt.

### 2.4.1 Fällung der DNA

Die Fällung von DNA ist eine Methode zur Reinigung und Konzentrierung. Auf 200µl DNA-Lösung wurden 50µl Ammoniumazetat und 800µl Ethanol (100%) gegeben und 30 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands folgte mehrmaliges Waschen mit Ethanol (70%) und Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 14000 rpm für je 5 Minuten. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet getrocknet, dann in TBE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.4.2 Durchführung der PCR

Polymerase-Kettenreaktionen wurden als Negativkontrolle von E1A und als Positivkontrolle für E2A durchgeführt.

In 0,5 ml Eppendorfgefäßen wurden zunächst die PCR-Ansätze (je 50µl) hergestellt:

<u>PCR-Ansatz:</u>	10x Puffer	5 µl
(50µl)	Glyzerin	6 µl
	H <sub>2</sub> O	20 µl
	Kresolrot	3 µl
	MgCl <sub>2</sub>	3 µl
	DNTP <sub>3</sub> (10mM)	1 µl
	Vorwärtsprimer (1:10)	5 µl
	Rückwärtsprimer (1:10)	5 µl
	Template	1 µl
	Taq Polymerase	1 µl

Zur Amplifikation von E1A respektive E2A wurden Primer mit folgender Sequenz verwendet:

E1A-forward: 5'-GAG ACA TAT TAT CTG CCA CGG AGG-3'  
E1A-reverse: 5'-TTG GCA TAG AAA CCG GAC CCA AGG-3'

E2A-forward: 5'-GTC GGA GAT CAG ATC CGC GT-3'

E2A-reverse: 5'-GGT CCT CGT CGT CTT CGC TT-3'

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden durchgeführt im „Robocycler Gradient 40“ (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Insgesamt wurden jeweils 30 Zyklen durchlaufen. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C je 1 Minute, die Anheftung erfolgte bei 45°C für je 1 Minute, die Synthesephase dauerte je 1 Minute bei 72°C. Bis zur Analyse mittels Agarosegel-Elektrophorese wurden die Proben bei 6°C aufbewahrt.

### 2.4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die durch die PCR amplifizierte Sequenzen können mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese identifiziert werden. Hierbei werden die geladenen Moleküle im elektrischen Feld nach Größe und Ladung aufgetrennt, die anionische DNA wandert von der Anode zur Kathode, wobei die Größe der Fragmente die Passagerate im Gel bestimmt. Durch die parallele Verwendung bekannter Marker kann die Größe der DNA-Fragmente ermittelt werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid zum Agarosegel ermöglicht durch Interkalation des Farbstoffs mit den Nukleinsäurebasen eine Fluoreszenz der DNA-Banden unter UV-Licht.

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurden 600 mg Agarose abgewogen und mit 60 ml TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) für 1:30 Minuten aufgekocht. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurden 2,5µl Ethidiumbromid zugegeben und die den Gelträger enthaltene Gießform mit dem flüssigen Gel gefüllt. Zur Formung der Geltaschen wurde ein Kamm platziert. Nach Aushärtung wurde das Gel in die Elektrophoresekammer (HE 33, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) überführt und dies mit TBE-Puffer aufgefüllt. Die erste Tasche wurde jeweils mit 10µl des Größenstandards 1kb Ladder (PEQ Lab Biotechnologie, Frankfurt) befüllt, die folgenden mit je 25µl der zu untersuchenden Probe.

Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte unter einer Spannung von 80V über einen Zeitraum von 3 Stunden.

Die photographische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte im Anschluss unter UV-Licht (UV-Transilluminator, Biotech Fischer, Reiskirchen).

## 2.5 Kontrolle des VEGF<sub>165</sub>-Transgens

Die Kontrolle des VEGF<sub>165</sub>-Transgens im Vektor erfolgte mittels PCR. Durchführung der PCR und Agarosegel-Elektrophorese entsprachen dem Protokoll wie in 2.4.2-2.4.3 beschrieben. Als Primer zur Amplifikation von VEGF<sub>165</sub> wurden verwendet:

VEGF-forward : 5'-CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT CAA GC-3'

VEGF-reverse: 5'-AGC AAG GCC CAC AGG GAT TT-3'

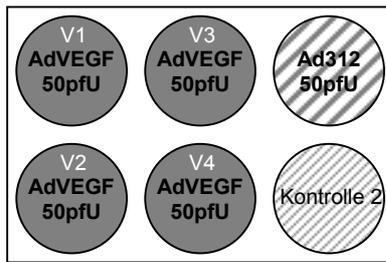
Der Reverse-Primer war dabei spezifisch für die Isoform 165.

## 2.6 Zeitlicher Verlauf der VEGF-Expression nach Transduktion in vitro

Zunächst musste gezeigt werden, dass AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-transduzierte Zellen eine erhöhte Expression von VEGF aufweisen. Der zeitliche Verlauf dieser Expression wurde im Hinblick auf einen optimalen Transduktionszeitpunkt des Vektorsystems untersucht.

### 2.6.1 Versuchsplan

Die VEGF-Expression wurde in IEC-6 Zellen nachgewiesen und zur Quantifizierung wurde ein Enzyme-linked immunosorbant Assay (Quantikine<sup>®</sup>, R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet.



**Abb. 9** Versuchsaufbau 2.6.1

IEC-6 Zellen wurden auf eine 6-Schalen Platte (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) ausplattiert.

4 Schalen wurden mit je 50pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> infiziert (V1-V4), eine Schale zur Kontrolle mit 50pfU Ad312, und eine weitere Kontrollschale (Kontrolle 2) wurde nicht infiziert. Der Zellüberstand wurde in den nächsten 10 Tagen alle 24 Stunden abpipettiert,

asserviert, bei -80°C gelagert und durch neues Kulturmedium ersetzt. Im Anschluss wurde in den so gewonnenen Proben die VEGF-Konzentration mittels Enzyme-linked immunosorbant Assay bestimmt.

### 2.6.2 Infektion der IEC-6 Zellen

IEC-6 Zellen in der 3. Passage wurden in ein Falcon-tube überführt, die Zellzahl pro ml bestimmt (Neubauer-Zählkammer, Fa. Schubert & Weiß, Schwandorf) und mit Medium auf eine Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml verdünnt. Dann wurden je 2 ml in eine Schale der 6-Schalen Platte überführt (Zellzahl je Schale:  $10^5$ ).

Nach Erreichen von Konfluenz (etwa 48 Stunden später bei einer Zellzahl von ca.  $2 \times 10^5$  je Schale) wurden 4 der 6 Schalen mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> und 1 Schale mit Ad312 infiziert. Dazu wurde die für 50pfU pro Schale notwendige Virusmenge AdCMV.VEGF<sub>165</sub> resp. Ad312 mit Optimem-Medium und 2% FKS auf ein Gesamtvolumen von 300µl je Schale verdünnt und 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Infektionsmedium durch 2ml Kulturmedium pro Schale ersetzt.

### 2.6.3 Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Die alle 48 Stunden asservierten Zellüberstände (n=60) wurden mit Hilfe eines quantitativen Sandwich Immunoassays (Quantikine<sup>®</sup>, R&D Systems, Minneapolis, USA) auf ihren VEGF-Gehalt untersucht. Bei diesem ist ein VEGF-spezifischer monoklonaler Antikörper auf dem Boden jeder Schale der Mikroplatte gebunden. Das in den Proben enthaltene VEGF wird an diesen fixierten Antikörper gebunden.

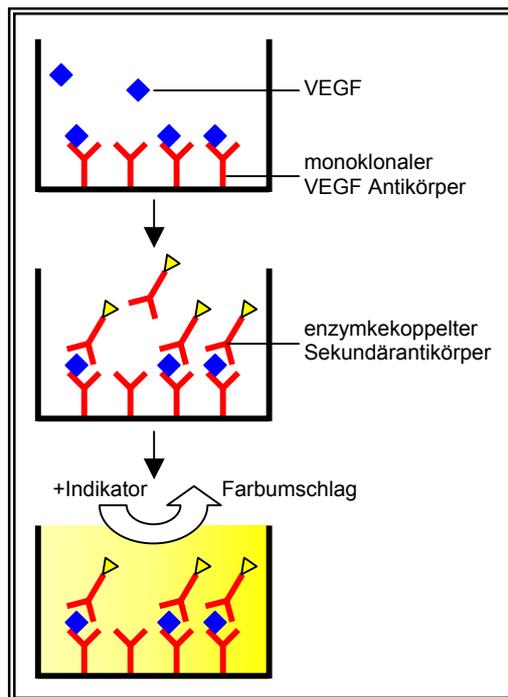


Abb. 10 ELISA

Nachdem ungebundene Anteile durch Waschen entfernt wurden, wird ein enzymgebundener Sekundärantikörper hinzugegeben. Ungebundene Anteile werden wiederum durch Waschen entfernt, und eine Substratlösung wird als Indikator hinzugegeben. Die Intensität des Farbumschlags ist der Menge an gebundenem VEGF proportional. Die Farbumschlagintensität kann nun gemessen werden und mit der Intensität einer parallel untersuchten Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter VEGF-Konzentration verglichen werden.

Die aufgetauten Proben wurden zunächst bei 4000rpm unter Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und weiterverwendet. Die Proben der AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-Versuchsgruppe wurden anschließend in 4 Schritten auf 1:500 verdünnt. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass die Proben der beiden Kontrollgruppen nicht verdünnt werden mussten.

Die Herstellung der Verdünnungsreihe als Standard und die Präparation der Proben erfolgte wie auch die verschiedenen Inkubations- und Waschschrte streng nach Protokoll des Kit-Herstellers.

#### 2.6.4 Messung der optischen Dichte

Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte im Biolumin 960 Microplate Reader (Fa. Molecular Dynamics, Tokyo, Japan). Die Ablesung wurde durchgeführt bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Wellenlängenkorrektur von 550nm, um optische Fehler durch die verwendete Mikroplatte auszugleichen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Molecular Dynamics Xperiments Software Version 1.1.0 (Fa. Molecular Dynamics, Tokyo, Japan).

## 2.7 Tiere und Tierhaltung

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 Abs. 1 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 17.02.1998 bei der Regierung von Oberbayern angemeldet und gemäß Bescheid der Regierung von Oberbayern vom 22.8.2002 (Az 209.1/211-2531-68/02) genehmigt.

In dieser Studie wurden männliche Crl:CD(SD)-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 350g verwendet. Alle Tiere stammten aus den Charles River Laboratorien, Sulzfeld. Die Tiere wurden präoperativ zu zweit und postoperativ einzeln in Makrolon-Standardkäfigen Typ III gehalten. Futter (Rattenpellets 1320, Altromin GmbH, Lage) und Wasser (Trinkwasser aus Nippeltränken bei täglichem Wechsel) erhielten die Tiere ad libitum. Gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung wurden die Tiere in speziellen Tierhaltungsräumen gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus mit jeweils 12-stündigen Hell- und Dunkelphasen wurde durch eine automatische Beleuchtungssteuerung mit einer Lichtintensität bis 100lx simuliert. Die Raumtemperatur betrug 20-25°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60-70%.

Die Narkose der Tiere wurde eingeleitet durch Spontanatmung von 3,5% Isofluran ( $C_3H_2ClF_5O$ ; Attane™ Isoflurane, Provet AG, Lyssach, Schweiz) und medizinischem Sauerstoff bei einem Flow von 1,5l/min und aufrechterhalten durch Spontanatmung von 2-2,5% Isofluran und Sauerstoff bei einem Flow von 0,8l/min. Die Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Postoperative Analgesie wurde durch subkutane Injektion von 0,02mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München) alle 12 Stunden über einen Zeitraum von 3 Tagen gesichert.

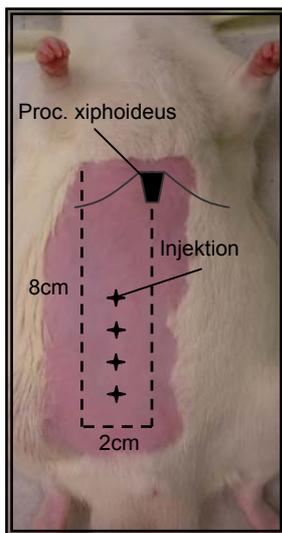
Zur Verhinderung möglicher Automutilation wurde Perphenazin-Enanthat (Decentan-Depot®, Merck, Darmstadt) in einer Dosis von 5mg/kg KG in 1%iger Lösung in mittelkettigen Triglyceriden (Miglyol 812®, Caesar & Loretz, Hilden) intramuskulär injiziert. Die erste Injektion erfolgte einen Tag präoperativ, die weiteren Injektionen im Abstand von jeweils 3 Tagen über den gesamten Versuchszeitraum.

Die Euthanasie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 150mg/kg KG Pentobarbital (Narcofen®, Fa. Merial, Hallbergmoos).

## 2.8 Quantifizierung der VEGF-Expression nach Transduktion an der Ratte

### 2.8.1 Injektionsmodell

Das Injektionsmodell für die Quantifizierung der VEGF-Produktion an der Ratte orientierte sich am geplanten Random-pattern Flap Modell (2.10.1). Die Narkose erfolgte wie in 2.7 beschrieben.



**Abb. 11** Injektionsmodell

Nach Rasur und Desinfektion der vorderen rechten Bauchwand wurde zur besseren Orientierung zunächst ein 8cm langes und 2cm breites Rechteck angezeichnet (Securline<sup>®</sup> Surgical Skin Marker, Fa. Precision Dynamics, San Fernando, USA). Den medialen Rand des Rechtecks bildete eine Linie, die von der Symphysis xiphosternalis in der Medianlinie 8cm in Richtung der Symphysis pubica verlief. Eine parallel zu dieser verlaufende und 2cm nach rechts-lateral versetzte Linie bildete den lateralen Rand des Rechtecks. Die Ecken des Rechtecks wurden vorsichtig unter Verwendung einer 20G-Kanüle tätowiert. Die Injektionsstellen wurden ebenfalls markiert. Die 4

Injektionsstellen wiesen einen Abstand von jeweils 1cm zum medialen und zum lateralen Rand des Rechtecks auf. Der Abstand zwischen den Injektionsstellen betrug ebenfalls 1cm, wobei die kaudale Injektionsstelle 1cm vom kaudalen Rand des Rechtecks lokalisiert war. Die Injektion erfolgte subdermal (Microlance<sup>™</sup> 36G Nadel, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden; 1ml Spritze Fa. Codan Medical, Rødby, Dänemark) mit 50µl Verum oder Kontrolle einmalig pro Injektionsstelle. Zur Auswertung wurden nach Versuchsende die Cutis der kaudalen Hälfte des angezeichneten Rechtecks (4x2cm) und der direkt darunterliegende Part des M. rectus abdominis (4x2cm) entnommen. Anschließend erfolgte die Euthanasie der Tiere in beschriebener Weise.

### 2.8.2 Versuchsplan

Den Tieren der Kontrollgruppe I1 (n=7) wurden jeweils 200µl NaCl 0,9% (Merck, Schwalbach) in 4 Fraktionen zu je 50µl an den 4 angezeichneten Stellen subdermal injiziert. Die Gewebeentnahme erfolgte 7 Tage nach Transduktion.

Den Tieren der Versuchsgruppe I2 (n=7) wurden jeweils  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in einem Volumen von 200µl in 4 Fraktionen zu je 50µl an den 4 angezeichneten Stellen subdermal injiziert. Die Gewebeentnahme erfolgte 7 Tage nach Transduktion.

Gruppe	n	Substanz	Volumen	Versuchsdauer
I1	7	NaCl 0,9%	200µl (4x50µl)	7 Tage
I2	7	AdCMV.VEGF <sub>165</sub> ( $5 \times 10^8$ pfU)	200µl (4x50µl)	7 Tage

**Tab. 1** Versuchsplan - Quantifizierung der VEGF Produktion an der Ratte

### 2.8.3 Gewebegewinnung

Die Gewebeentnahme erfolgte unter Narkose wie beschrieben. Nach Rasur und Desinfektion der vorderen rechten Bauchwand wurden zunächst die tätowierten Eckpunkte des zur Injektion angezeichneten Rechtecks aufgesucht und die Markierungen reproduziert. Die kaudale Hälfte (4x2cm) des Rechtecks wurde umschnitten, die Cutis vorsichtig abpräpariert und entnommen. Das entnommene Präparat wurde sofort in doppelschichtige Aluminiumfolie eingeschlagen und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80°C. Der Teil des M. rectus abdominis, dem das entnommene Kutis-Präparat auflag, wurde ebenfalls markiert, umschnitten und entnommen. Die Schockgefrierung und Lagerung erfolgte in analoger Weise.

Anschließend erfolgte die Euthanasie der Tiere in beschriebener Weise.

## 2.8.4 Radioimmunoassay

Die Untersuchung der Präparate auf ihren Gehalt an VEGF-Protein erfolgte mittels Radioimmunoassay. Bei dieser immunochemischen Methode konkurriert das zu bestimmende Antigen mit einer bekannten Menge radioaktivmarkiertem Antigen um die Bindungsstelle an einem Antikörper. Nach Entfernung ungebundener Substanz gibt die Restaktivität Aufschluss über die in der Probe enthaltene Menge an zu bestimmendem Antigen. Voraussetzung ist das Erstellen einer Standardkurve. Einem Gemisch aus radioaktivmarkiertem Antigen und Antikörper wird in bekannter Menge unmarkiertes Antigen hinzugefügt und der Aktivitätsabfall gemessen. Der in Messproben nach Zugabe von Probenmaterial registrierte Aktivitätsverlust kann nun einer bestimmten Menge Antigen in der Probe zugeordnet werden. Die Trennung von gebundener und ungebundener Substanz vor der Aktivitätsmessung erfolgte in diesem Fall mithilfe eines zweiten Antikörpers. Die Verwendung eines Kaninchenantikörpers im 1. Schritt ermöglicht die Bindung eines Anti-Kaninchenantikörpers z.B. von der Ziege an den ersten. Die Doppelantikörperkomplexe sind so schwer, dass sie problemlos abzentrifugiert oder weiter aggregiert werden können.

Ein spezifischer Antikörper vom Kaninchen wurde im Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) des Instituts für Physiologie der Technischen Universität München, Campus Weihenstephan (Prof. D. Schams) hergestellt.<sup>12</sup> Die Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit diesem Institut. Die Gewebeproben wurden zunächst in eiskalten PBS-Puffer überführt und eine Complete<sup>TM</sup>-Mini tablet (Boehringer, Mannheim) je 10ml PBS zur reversiblen und irreversiblen Hemmung eines breiten Spektrums von Metalloproteasen, Zysteinen, Serinen und Calpainen hinzugegeben. Danach erfolgte die Homogenisierung für 40 Sekunden (6m/Sek.) im Fast Prep<sup>®</sup> FP 120 cell disrupter (Fa. Qbiogene, Carlsbad, USA). Nach 30 Minuten Lagerung bei 4°C erfolgte die Zentrifugation bei 10000rpm und 4°C für 15 Minuten. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Untersuchung erfolgte unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum gegen bovines VEGF der Isoform 164. Dieser Antikörper reagiert mit den humanen Isoformen 121, 165, 189, 206 und weist gegenüber anderen Wachstumsfaktoren wie PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGF1, FGF2 eine Kreuzreaktivität von unter 0,1%

auf. Das markierte Antigen wurde von freiem  $^{125}$ Jod mittels einer Sephadex G25 Medium enthaltender vorgefertigter NAP-1-Säule (Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg) getrennt. Glycerin wurde bis zu einem Anteil von 50% hinzugegeben und die Verdünnungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Untersuchung gelagert. Dieser Marker besitzt eine Stabilität für 3-4 Monate. Die Radioimmunoassay wurde unter Verwendung eines 3M NaCl Puffers mit 1%BSA, 0,1% Triton X-100 und einem pH von 7,5 durchgeführt. Die VEGF-Konzentration der homogenisierten Probenüberstände wurde in Proben mit einem Volumen von je  $200\mu\text{l}$  bestimmt. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von  $1/400000$  verwendet. Gebundenes VEGF wurde von nicht gebundenem Antigen mittels zweitem Antikörper und 6% Polyethylenglycol (Fa. Serva, Heidelberg) getrennt. Die  $\text{ED}_{50}$  dieses Essays betrug  $0,6\text{ng/ml}$ .

## **2.9 Bestimmung der Mikrogefäßdichte an der Ratte**

### **2.9.1 Injektionsmodell**

Die Narkose erfolgte wie in 2.7 beschrieben. Das Injektionsmodell entspricht dem in 2.8.1 beschriebenen Modell. Nach Rasur und Desinfektion der vorderen rechten Bauchwand wurde das beschriebene Rechteck markiert. Die Injektion von Verum oder Kontrolle erfolgte in die 4 Injektionsstellen beschriebener Lokalisation (s. 2.8.1).

### **2.9.2 Versuchsplan**

Den Tieren der Kontrollgruppe G1 ( $n=3$ ) wurden jeweils  $200\mu\text{l}$  NaCl 0,9% (Merck, Darmstadt) in 4 Fraktionen zu je  $50\mu\text{l}$  an den 4 angezeichneten Stellen subdermal injiziert. Die Gewebeentnahme erfolgte 7 Tage nach Transduktion.

Den Tieren der Versuchsgruppe G2 ( $n=3$ ) wurden jeweils  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in einem Volumen von  $200\mu\text{l}$  in 4 Fraktionen zu je  $50\mu\text{l}$  an den 4 angezeichneten Stellen subdermal injiziert. Die Gewebeentnahme erfolgte 7 Tage nach Transduktion.

Gruppe	n	Substanz	Volumen	Versuchsdauer
G1	3	NaCl 0,9%	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	7 Tage
G2	3	AdCMV.VEGF <sub>165</sub> (5x10 <sup>8</sup> pfU)	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	7 Tage

**Tab. 2** Versuchsplan - Bestimmung der Mikrogefäßdichte an der Ratte

### 2.9.3 Gewebegewinnung

Die Gewebeentnahme erfolgte unter Narkose wie beschrieben. Nach Rasur und Desinfektion der vorderen rechten Bauchwand wurden zunächst die tätowierten Eckpunkte des zur Injektion angezeichneten Rechtecks aufgesucht und die Markierungen reproduziert. Die kaudale Hälfte (4x2cm) des Rechtecks wurde umschnitten, die Kutis vorsichtig abpräpariert und entnommen. Der Teil des M. rectus abdominis, dem das entnommene Kutis-Präparat auflag, wurde ebenfalls markiert, umschnitten und entnommen. Anschließend erfolgte die Euthanasie der Tiere in beschriebener Weise.

Von jedem der entnommenen Kutis- und Muskelpräparate wurden 3 Proben zur immunhistochemischen Aufarbeitung genommen, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

### 2.9.4 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Analyse wurde ein Antikörper gegen CD31 (MCA 1334G mouse anti rat, Serotec Ltd, Kidlington, UK) verwendet. CD31 (PECAM-1, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) ist ein transmembranöses Glykoprotein, das mit Ausnahme von bestimmten Zellkontakten auf der gesamten Oberfläche von Endothelzellen zu finden ist.<sup>43</sup> Der verwendete monoklonale Antikörper gegen CD31 fungiert daher als ein spezifischer und sensitiver Endothelzellmarker. Der CD31 Antikörper reagiert außerdem mit Megakaryozyten, Thrombozyten und gelegentlich Plasmazellen. Er zeigt eine schwache Reaktion gegen Mantelzonen-B-Lymphozyten, periphere T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Die immunhistochemische Aufarbeitung und die nachfolgende Gefäßdichtebestimmung wurden in

Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Johannes Gutenberg Universität Mainz durchgeführt (Prof. M. A. Konderding).

Von den Proben wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese nach Inkubation mit dem CD31-Antikörper mit Haematoxin gegengefärbt. Von jeder Probe wurden drei repräsentative Bilder bei einer Vergrößerung von x100 mit einem Axiophot Photomikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) angefertigt und in ein Programm zur morphometrischen Analyse (Diskus<sup>®</sup> v4.50.20, Hilgers, Königswinter) übertragen.

### **2.9.5 Gefäßdichtebestimmung mit der Chalkley-Methode**

Die Mikrogefäßdichte wurde mittels eines modifizierten 25-Punkte Chalkley-Rasters analysiert.<sup>27, 108</sup> Bei der klassischen Chalkley-Methode wird ein Okular verwendet, das ein Raster von 25 über das Gesichtsfeld verteilte Punkte besitzt. Durch Drehung des Okulars wird versucht, möglichst viele dieser Punkte über Gefäßen zu platzieren. So wird semiquantitativ eine relative Gefäßdichte von 0-25 Punkten im Präparat ermittelt, ohne alle Gefäße zu zählen. Die Ergebnisse dieser Methode weisen eine starke Korrelation mit den Resultaten der manuellen Gefäßzählung und der Bildanalyse mittels Computer auf.<sup>53</sup>

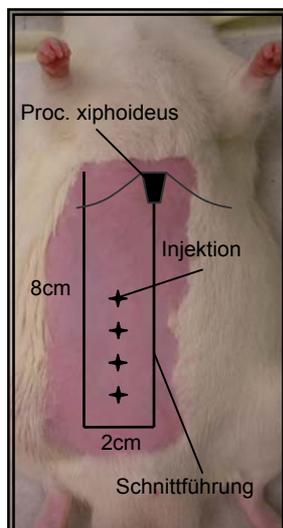
Das Chalkley-Raster wurde auf dem Bildschirm unter Verwendung des Bildanalyse-Programms (Diskus 4.50.20, Hilgers, Königswinter) angelegt. Bei einer Vergrößerung von x345 hatte das Raster einen Durchmesser von 350µm. Das Raster wurde so ausgerichtet, dass die maximale Anzahl von Punkten auf oder in der Nähe von markierten Gefäßen lag.

## 2.10 Untersuchung des Therapieeffektes am Modell des überdimensionierten „Random-pattern-Flap“ an der Ratte

### 2.10.1 Lappenmodell und Operationstechniken

#### Modell des überdimensionierten „Random-pattern-Flap“:

Bei einer Lappenplastik vom random-pattern Typ sollte ein Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1 nicht überschritten werden, da sonst eine suffiziente Durchblutung des distalen Lappenteils nicht gewährleistet ist.<sup>126, 128</sup> Durch eine Überdimensionierung auf ein Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1 ist eine Nekroseentwicklung in der distalen Lappenhälfte zu erwarten. Dieses Modell wurde gewählt, um den Effekt einer Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> anhand einer möglichen Vergrößerung der überlebenden Fläche und einer Reduktion der Nekrose darstellen zu können.



**Abb. 12** Schnittführung



**Abb. 13** Präparation des Hautlappens von der Rektusscheide



**Abb. 14** Fixierung des Hautlappens in ursprünglicher Position

Die Narkose der Tiere erfolgte wie in 2.7 beschrieben.

Nach Rasur und Desinfektion der vorderen rechten Bauchwand wurde zunächst das in 2.8.1 beschriebene Rechteck mit einer Länge von 8cm und einer Breite von 2cm angezeichnet (Securline<sup>®</sup> Surgical Skin Marker, Precision Dynamics, San Fernando,

USA). Den medialen Rand des Rechtecks bildete eine Linie, die von der Symphysis xiphosternalis in der Sagital-Medianlinie 8cm in Richtung der Symphysis pubica verlief. Eine parallel zu dieser verlaufende und 2cm nach rechts-lateral versetzte Linie bildete den lateralen Rand des Rechtecks.

Die Schnittführung erfolgte entlang des medialen, kaudalen und lateralen Randes des angezeichneten Rechtecks (Abb. 12). Die kraniale Begrenzung wurde nicht durchtrennt und bildete den Lappenstiel. Nach Umschneidung wurde der Hautlappen vorsichtig präpariert, wobei Kutis und Subkutis gemeinsam von kaudal nach kranial von der vorderen Rektusscheide abgelöst und alle versorgenden Perforans-Gefäße durchtrennt wurden (Abb. 13). Nach Blutstillung wurde der Lappen wieder in sein Bett zurückverlagert und ein kompletter Wundverschluss mittels Einzelknopfnähten (Ethilon® 4-0, Ethicon Products, Norderstedt) erreicht (Abb. 14).

Die Perfusionsmessung mittels Indocyaningrün-Laser-Fluorskopie (ICG-Pulsion®, Pulsion Medical Systems AG, München) wurde im Anschluss durchgeführt.

Die Injektion von Verum oder Kontrolle erfolgte in die 4 Injektionsstellen beschriebener Lokalisation (s. 2.8.1). Die Injektion erfolgte entweder intraoperativ, 3 Tage oder 7 Tage präoperativ. Bei präoperativer Injektion erfolgte die Vorbereitung der narkotisierten Tiere wie in 2.8.1 beschrieben.

Postoperative Analgesie wurde durch subkutane Injektion von 0,02mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München) alle 12 Stunden über einen Zeitraum von 3 Tagen gesichert.

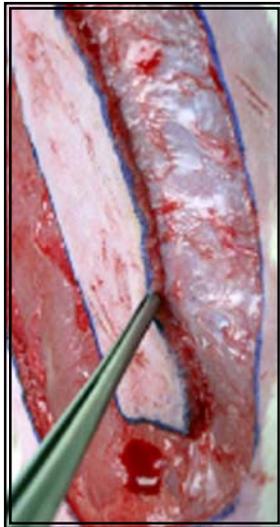
Zur Verhinderung möglicher Automutilation wurde Perphenazin-Enanthat (Decentan-Depot®, Merck, Darmstadt) in einer Dosis von 5mg/kg KG in 1%iger Lösung in mittelkettigen Triglyceriden (Miglyol 812®, Caesar & Loretz, Hilden) intramuskulär injiziert. Die erste Injektion erfolgte einen Tag präoperativ, die weiteren Injektionen im Abstand von jeweils 3 Tagen über den gesamten Versuchszeitraum.

Am 7. Tag postoperativ erfolgte die Euthanasie der Tiere durch intraperitoneale Injektion von 150mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren®, Fa. Merial, Hallbergmoos).

#### Präformierung des Hautlappens durch „Vascular Delay“:

Das Vascular Delay ist ein etabliertes Verfahren zur Verbesserung der Durchblutung und Reduzierung von Nekrose in Lappenplastiken.<sup>7, 29, 84, 104, 203</sup> Durch präoperative

Reduzierung der Lappenperfusion soll ein Angiogenesereiz gesetzt werden, ohne jedoch den Lappen dauerhaft zu schädigen. Zum Operationszeitpunkt erwartet man eine verbesserte Gefäßstruktur im Lappen und damit eine verbesserte Überlebensrate.



**Abb. 15** Delay – Tag 1: Umschneidung des Lappens ohne Durchtrennung der Perforatoren

Die Effektivität dieses Prinzips wurde in der Kontrollgruppe D1 untersucht, um das experimentelle Verfahren der Gentherapie zur Angiogeneseinduktion bezüglich seiner Wirksamkeit mit diesem etablierten Verfahren vergleichen zu können.

Die Tiere wurden vorbereitet und angezeichnet wie in 2.10.1, wobei die Markierung von Injektionsstellen nicht nötig war. Der Hautlappen wurde nur umschnitten wie beschrieben, jedoch nicht von der Rektusscheide gelöst. (Abb. 15) Der Wundverschluss erfolgte nach

Umschneidung in beschriebener Weise. Nach 7 Tagen wurde dann der Lappen, wie beschrieben in 2.10.1., gehoben, präpariert und eingenäht. Die weitere Behandlung der Tiere erfolgte ebenfalls wie beschrieben.

## 2.10.2 Versuchsplan

Den Tieren der Kontrollgruppe K1 (n=6) wurde 7 Tage präoperativ NaCl 0,9% (Merck, Schwalbach) in einem Volumen von 200 $\mu$ l in 4 Fraktionen zu je 50 $\mu$ l subdermal injiziert. Die Perfusionsmessung erfolgte unmittelbar postoperativ. Am 7. postoperativen Tag wurden die Tiere euthanasiert.

Den Tieren der Kontrollgruppe K2 (n=6) wurden 7 Tage präoperativ  $5 \times 10^8$  pfU Ad312 in einem Volumen von 200 $\mu$ l in 4 Fraktionen zu je 50 $\mu$ l subdermal injiziert. Die Perfusionsmessung erfolgte unmittelbar postoperativ. Am 7. postoperativen Tag wurden die Tiere euthanasiert.

Den Tieren der Versuchsgruppe V1 (n=6) wurden intraoperativ  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in einem Volumen von 200 $\mu$ l in 4 Fraktionen zu je 50 $\mu$ l subdermal injiziert. Die Perfusionsmessung erfolgte unmittelbar postoperativ. Am 7. postoperativen Tag wurden die Tiere euthanasiert.

Den Tieren der Versuchsgruppe V2 (n=6) wurden 3 Tage präoperativ  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in einem Volumen von 200 $\mu$ l in 4 Fraktionen zu je 50 $\mu$ l subdermal injiziert. Die Perfusionsmessung erfolgte unmittelbar postoperativ. Am 7.

postoperativen Tag wurden die Tiere euthanasiert.

Den Tieren der Versuchsgruppe V3 (n=6) wurden 7 Tage präoperativ  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in einem Volumen von 200 $\mu$ l in 4 Fraktionen zu je 50 $\mu$ l subdermal injiziert. Die Perfusionsmessung erfolgte unmittelbar postoperativ. Am 7.

postoperativen Tag wurden die Tiere euthanasiert.

Den Tieren der Versuchsgruppe V4 (n=6) wurden 7 Tage präoperativ  $1 \times 10^9$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in einem Volumen von 200 $\mu$ l in 4 Fraktionen zu je 50 $\mu$ l subdermal injiziert. Die Perfusionsmessung erfolgte unmittelbar postoperativ. Am 7.

postoperativen Tag wurden die Tiere euthanasiert.

Bei Tieren der Kontrollgruppe D1 (n=6) wurde 7 Tage präoperativ das Vascular Delay Verfahren durchgeführt. Die Perfusionsmessung erfolgte unmittelbar postoperativ. Am 7. postoperativen Tag wurden die Tiere euthanasiert.

Gruppe	n	Behandlung	Volumen	Zeitpunkt	Versuchsende
K1	6	NaCl 0,9%	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	7 Tage präoperativ	7 Tage postoperativ
K2	6	Ad312 $5 \times 10^8$ pfU	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	7 Tage präoperativ	7 Tage postoperativ
V1	6	AdCMV.VEGF <sub>165</sub> $5 \times 10^8$ pfU	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	intraoperativ	7 Tage postoperativ
V2	6	AdCMV.VEGF <sub>165</sub> $5 \times 10^8$ pfU	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	3 Tage präoperativ	7 Tage postoperativ
V3	6	AdCMV.VEGF <sub>165</sub> $5 \times 10^8$ pfU	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	7 Tage präoperativ	7 Tage postoperativ
V4	6	AdCMV.VEGF <sub>165</sub> $1 \times 10^9$ pfU	200 $\mu$ l (4x50 $\mu$ l)	7 Tage präoperativ	7 Tage postoperativ
D1	6	Vascular Delay		7 Tage präoperativ	7 Tage postoperativ

**Tab. 3** Versuchsplan - Random-pattern-Flap Modell

### 2.10.3 Bestimmung der Lappenfläche

Direkt postoperativ und am Versuchsende wurden digitale Photographien der Tiere angefertigt (Pentax Corp., Tokyo, Japan) Die Aufnahmen erfolgten senkrecht zur Lappenfläche. In der Ebene des Hautlappens wurde ein Größenstandard platziert. Zur Auswertung wurde das Programm Image-J<sup>®</sup> v1.29 (NIH, Rodville Pike, USA) verwendet.

Postoperativ wurde die Gesamtfläche des Hautlappens als Anfangswert bestimmt. Am Versuchsende wurde die Größe der überlebenden Fläche und der Nekrosefläche berechnet und prozentual auf den Anfangswert bezogen.

## 2.11 Perfusionsmessung mittels Indocyaningrün-Laser-Fluoroskopie

Um zu überprüfen, ob in einer der Gruppen K1-2, V1-4 und D1 zum Operationszeitpunkt unter Therapie eine verbesserte Durchblutung der überdimensionierten Hautlappenplastik bestand, wurde die Perfusion nach Rückverlagerung des Lappens sowohl in der distalen, von der Planung her kritisch durchbluteten Lappenhälfte, als auch in der proximalen Lappenhälfte mittels Indocyaningrün-Laser-Fluoroskopie untersucht.

### 2.11.1 Farbstoff Indocyaningrün

Indocyaningrün (ICG-Pulsion<sup>®</sup>, Pulsion Medical Systems AG, München) ist ein in Deutschland zugelassenes intravenös zu applizierendes Diagnostikum, das in der Herz-Kreislauf-, Mikrozirkulations- und Leberdiagnostik klinisch eingesetzt wird.<sup>49, 82, 147</sup> Indocyaningrün wird nach Injektion innerhalb von wenigen Sekunden nahezu vollständig an Globuline, vornehmlich an  $\alpha$ 1-Lipoproteine gebunden. Eine extravasale Diffusion wird nicht beobachtet.<sup>134</sup> Die Plasmahalbwertszeit beträgt 3-4 Minuten. Die Ausscheidung erfolgt über die Leber in die Galle. Eine Reabsorption findet nicht statt, ein enterohepatischer Kreislauf wird nicht beobachtet. Die

Absorptions- und Emissions-Peaks, mit einer Wellenlänge von 805nm respektive 835nm im nahinfraroten Bereich, liegen im „optischen Fenster“ der Haut. Die Haut ist in diesem Wellenlängenbereich durchlässig und ermöglicht eine Eindringtiefe von mindestens 3mm, und die induzierte Fluoreszenz wird nicht in der Haut zurückgehalten.

### 2.11.2 Messaufbau

Die Fluoreszenz von Indocyaningrün wurde induziert und aufgezeichnet mit Hilfe des IC-View<sup>®</sup>-Systems (Pulsion Medical Systems AG, München). Dieses System besteht aus einem 0,16W Nahinfrarot-Laser mit einer Wellenlänge( $\lambda$ ) von 780nm und einer digitalen Videokamera mit entsprechendem Filter.



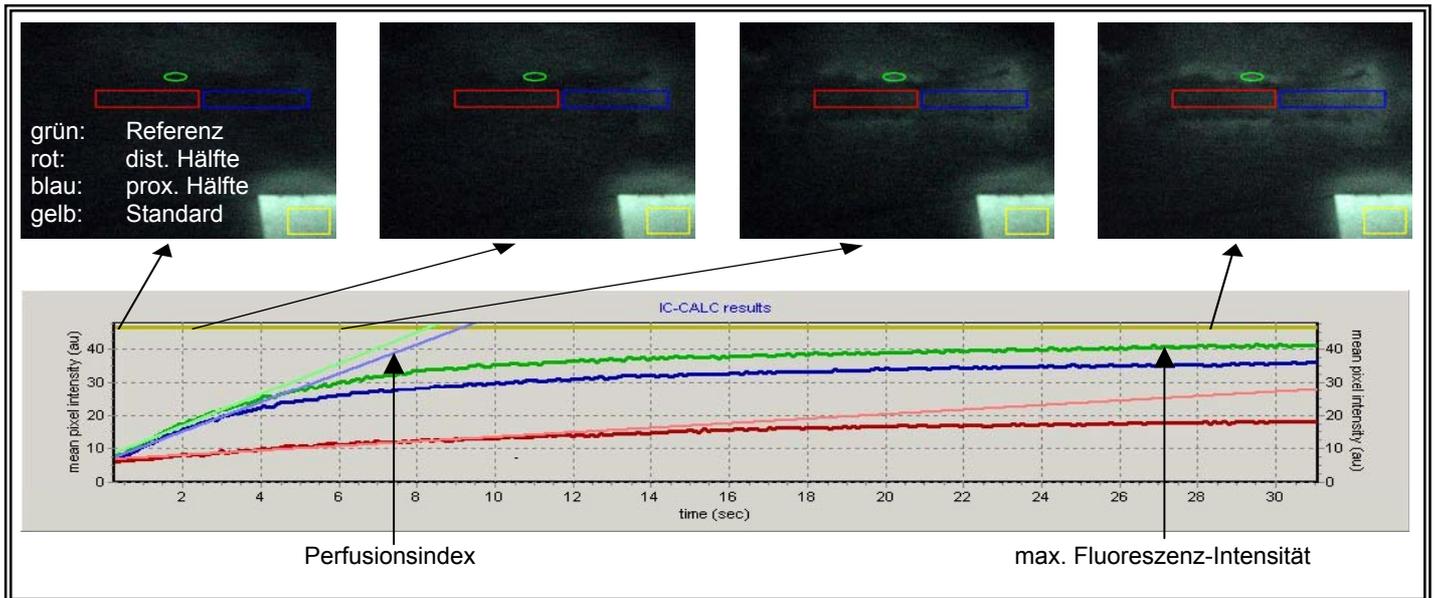
Abb. 16 Messaufbau ICG-Messung

Bei allen Tieren der Gruppen K1-2, V1-4 und D1 wurde zunächst in Narkose mit einer 24G Braunüle (Ventoflon<sup>™</sup> Pro, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) eine Schwanzvene punktiert. Bei Dunkelheit wurde unter Anregung des Nahinfrarot-Lasers eine Menge von 1mg/kg KG Indocyaningrün im Bolus injiziert und die Anflutung des Farbstoffs in Echtzeit aufgezeichnet. Ein mit Globulin gebundenem Indocyaningrün präparierter Schwamm diente in allen Messungen als Fluoreszenz-Standard

### 2.11.3 Auswertung der Fluoreszenzmessung

Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen erfolgte mittels IC-Calc<sup>®</sup>-Software (Pulsion Medical Systems AG, München). Die distale und die proximale Hälfte der Hautlappenplastik wurden jeweils als Region of Interest (ROI) markiert. Die Analyse erfolgte als Verhältnis der zu untersuchenden Regionen zu einer markierten Region der regulär perfundierten Bauchhaut als Referenz in Prozent und nach Abgleich mit

dem Fluoreszenz-Standard. Es wurde sowohl die maximale Intensität der Fluoreszenz in den markierten Regionen als auch der Perfusionsindex der Regionen ermittelt. Die Zunahme der Fluoreszenz wird als Kurve dargestellt, und der Perfusionsindex ist die Steigung dieser Kurve. Er dient damit als Parameter für die arterielle Durchblutung der Region. Eigene Voruntersuchungen hatten den Perfusionsindex als geeigneten Parameter zur Vorhersage von Nekrose erbracht.<sup>58</sup>



**Abb. 17** Auswertung der Fluoreszenzmessung: Bestimmung des Perfusionsindex (Steigung der Kurve) und der maximalen Fluoreszenzintensität in definierten „Regions of Interest“ (ROI's), grün: Referenz, rot: distale Hälfte, blau: proximale Hälfte, gelb: Standard; Darstellung der Perfusion in Grauwerten (hell: gute Perfusion, dunkel: schlechte Perfusion); Darstellung über die Zeit nach Injektion von ICG

## 2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München (Dipl. math. R. Busch) durchgeführt.

Da keine Normalverteilung vorlag, wurden die Daten mittels Mann-Whitney Test für unverbundene Stichproben gegeneinander getestet. Beim Vergleich von mehr als zwei Stichproben erfolgte die Berechnung via einer nichtparametrischen Varianzanalyse unter Verwendung des Kruskal-Wallis Tests.

Die p-Werte wurden mit dem Statistical Package for the Social Science SPSS® v 11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet, wobei das Signifikanzniveau für  $\alpha=0,05$  festgelegt. Bei  $p<0,05$  wird das Ergebnis signifikant bezeichnet.

Zur Analyse des Perfusionsindex wurde der nonparametrische Wilcoxon-Test verwendet. „Receiver Operating Characteristics“ (ROC) Kurven dienten zur Findung eines aussagekräftigen Schwellenwertes. Der höchste Youden-Index diente zur Findung des besten „cut-off“ Wertes. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Statistischen Tabellen der Documenta Geigy in der 7. Auflage (1968) und der Methode von Marcus et al.<sup>123</sup>

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Titerbestimmung AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Nach der Amplifikation von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> musste der Virustiter bestimmt werden.

Der Plaquetest zur Titerbestimmung erbrachte einen Virustiter von  $6 \times 10^9$  pfU/ml.

Bei einer Verdünnung von  $1 \times 10^{-8}$  konnten bei einem eingesetzten Volumen der Verdünnung von 250  $\mu$ l 15 eindeutig voneinander getrennte Plaques gezählt werden.

Bei Anwendung der Formel:

$$\frac{\# \text{ Plaques}}{d \times V} = \text{pfU/ml} \quad \begin{array}{l} d = \text{Verdünnungsfaktor} \\ V = \text{Volumen des verdünnten Virus in ml pro Petrischale} \end{array}$$

errechnete sich ein Titer von:

$$\frac{15}{1 \times 10^{-8} \times 0,25 \text{ml}} = 6 \times 10^9 \text{pfU/ml}$$

#### 3.2 Titerbestimmung Ad312

Vor dem Einsatz von Ad312 als Kontrollvektor musste der Virustiter bestimmt werden. Der Plaquetest zur Titerbestimmung erbrachte einen Virustiter von  $1,4 \times 10^{12}$  pfU/ml.

Bei einer Verdünnung von  $1 \times 10^{-10}$  konnten bei einem eingesetzten Volumen der Verdünnung von 250  $\mu$ l 35 eindeutig voneinander getrennte Plaques gezählt werden.

Bei Anwendung der Formel:

$$\frac{\# \text{ Plaques}}{d \times V} = \text{pfU/ml} \quad \begin{array}{l} d = \text{Verdünnungsfaktor} \\ V = \text{Volumen des verdünnten Virus in ml pro Petrischale} \end{array}$$

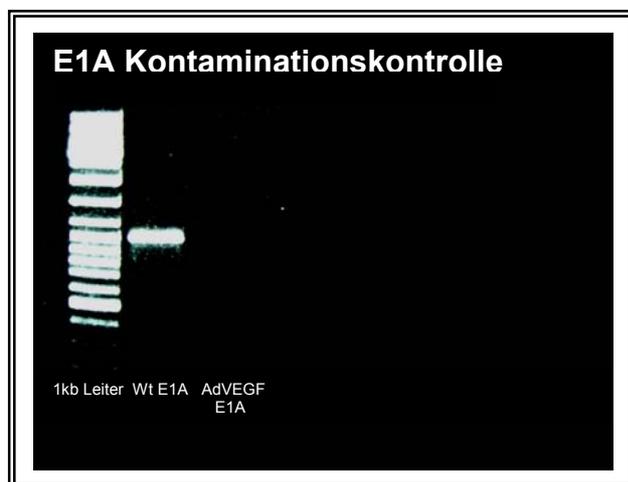
errechnete sich ein Titer von:

$$\frac{35}{1 \times 10^{-10} \times 0,25 \text{ml}} = 1,4 \times 10^{12} \text{pfU/ml}$$

### 3.3 Verifizierung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

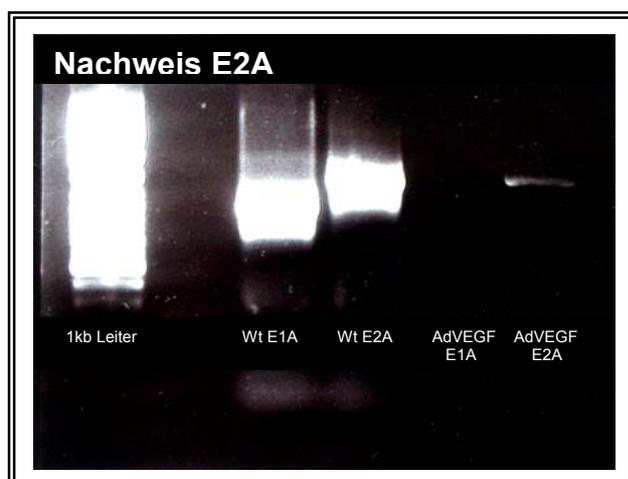
Nach Amplifikation von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in HEK 293 Zellen kann es selten zu einer Rekombination des replikationsinkompetenten Virus mit stabil in der Zelllinie exprimierten Anteilen des Virusgenoms kommen und der in seiner E1A-Region das Transgen beinhaltende Vektor zu einer Replikationskompetenz gelangen. Durch die Untersuchung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> auf E1A war die Replikationskompetenz auszuschließen. Als Positivkontrolle wurde auf E2A untersucht. Ebenso musste in Vektor AdCMV.VEGF<sub>165</sub> das Transgen nachgewiesen werden.

Der Nachweis erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion und Agarosegel-Elektrophorese.



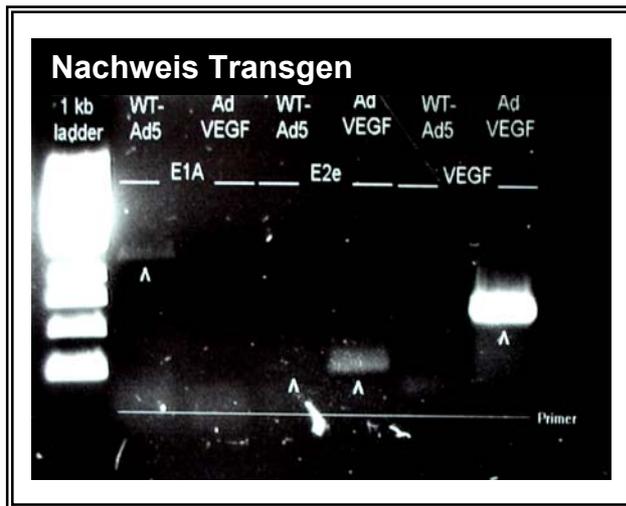
**Abb. 18** Kontaminationskontrolle AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Die Untersuchung des Virusgenoms von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> auf E1A war negativ. Es konnten keine E1A Amplifikate nachgewiesen werden. Im Genom des WildtypAd5 konnte E1A nachgewiesen werden.



**Abb. 19** Nachweis E2A

Der Nachweis von E2A gelang sowohl für den Virus AdCMV.VEGF<sub>165</sub>, als auch für den Virus WildtypAd5. Amplifikate von E2A konnten jeweils erzeugt und in der Agarosegel-Elektrophorese dargestellt werden.



**Abb. 20** Nachweis VEGF-Transgen in AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Der Nachweis des VEGF<sub>165</sub>-Transgens gelang für AdCMV.VEGF<sub>165</sub>. Die erzeugten Amplifikate konnten in der Agarosegel - Elektroforese dargestellt werden.

### 3.4 Zeitlicher Verlauf der VEGF-Expression nach Transduktion in vitro

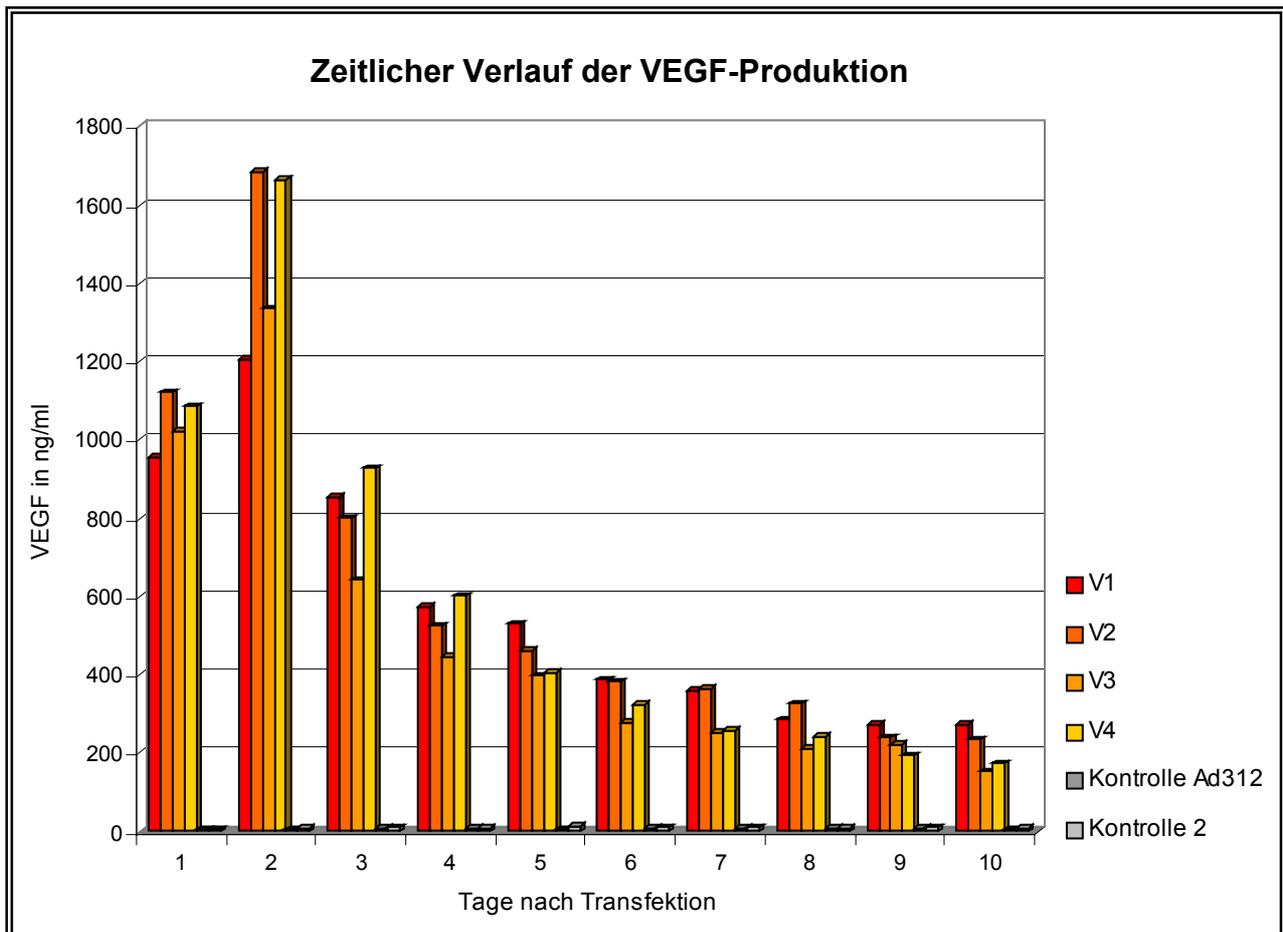
Eine erhöhte VEGF-Expression in AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-transduzierten IEC-6 Zellen musste nachgewiesen werden, und der zeitliche Verlauf der Expression wurde untersucht.

Die VEGF-Konzentration wurde jeweils im Zellüberstand bestimmt.

AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-transduzierte Zellen zeigten eine statistisch signifikant erhöhte VEGF-Expression im Vergleich mit den Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Eine maximale Produktion von VEGF konnte 48 Stunden nach Transduktion gezeigt werden. In Folge sank die VEGF-Produktion konsekutiv ab. Die Kontrollen zeigten über die Zeit keine erhöhte Produktion und unterschieden sich untereinander nicht.

Durchschnittlicher VEGF-Gehalt der Zellüberstände				
Zeit nach Transduktion	Verum (V1-V4) in ng/ml	StdAbw in ng	Kontrollen (K1-K2) in ng/ml	StdAbw in ng
24h	1046,61	72,79	5,80	1,11
48h	1473,37	239,59	7,36	1,88
72h	806,24	121,32	9,81	0,62
96h	536,99	67,51	7,23	0,64
5 Tage	448,78	61,16	9,52	4,39
6 Tage	343,12	51,64	9,54	0,24
7 Tage	308,98	61,77	9,18	1,32
8 Tage	267,12	49,82	7,95	0,66
9 Tage	232,61	33,19	8,61	1,77
10 Tage	208,41	54,43	7,29	1,23

**Tab. 4** Zeitlicher Verlauf der VEGF-Expression in vitro, durchschnittliche Menge VEGF in ng/ml gemessen im Zellüberstand (Gruppen V1-V4 und K1-K2)



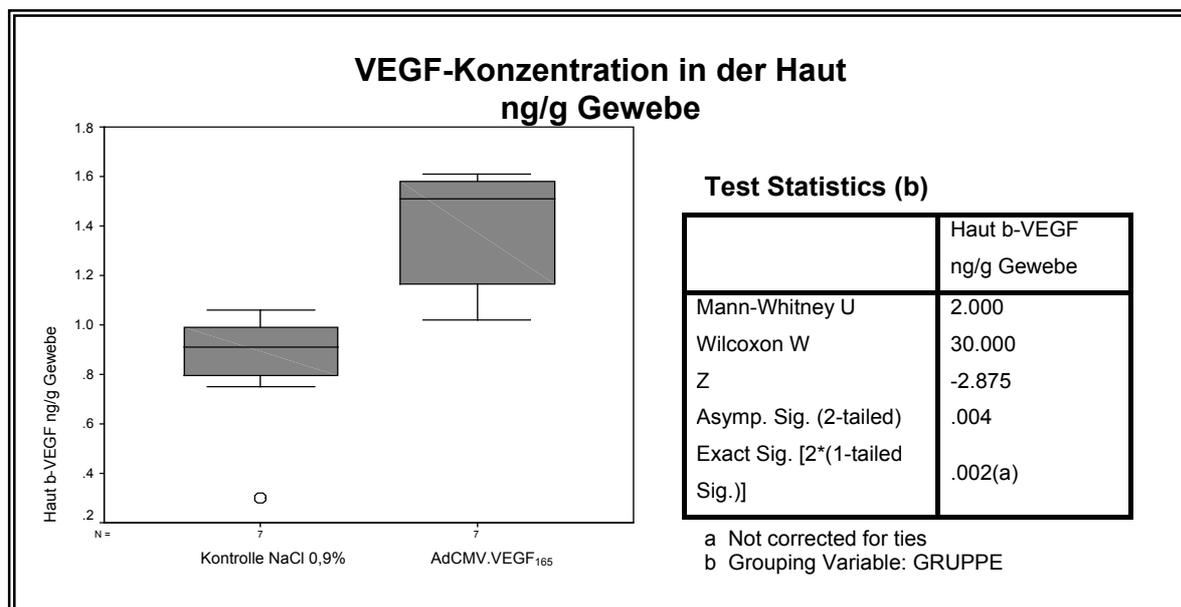
**Abb. 21** zeitlicher Verlauf der VEGF-Produktion

### 3.5 Quantifizierung der VEGF-Expression nach Transduktion an der Ratte

Nach 7 Tage nach subdermaler Injektion von  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in der Versuchsgruppe I2 und nach Injektion von NaCl 0,9% in der Kontrollgruppe I1 wurden Teile der Bauchhaut der Tiere und des darunterliegenden Musculus rectus abdominis entnommen. Die Proteinbestimmung wurde für Haut und Muskel getrennt mittels Radioimmunoassay durchgeführt.

#### 3.5.1 VEGF-Konzentration in der Haut

In den entnommenen Präparaten der Bauchhaut der AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-therapierten Tiere (Gruppe I2) konnte gegenüber den Kontrollen (Gruppe I1) eine statistisch signifikant erhöhte VEGF-Konzentration pro g Gewebe nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ).



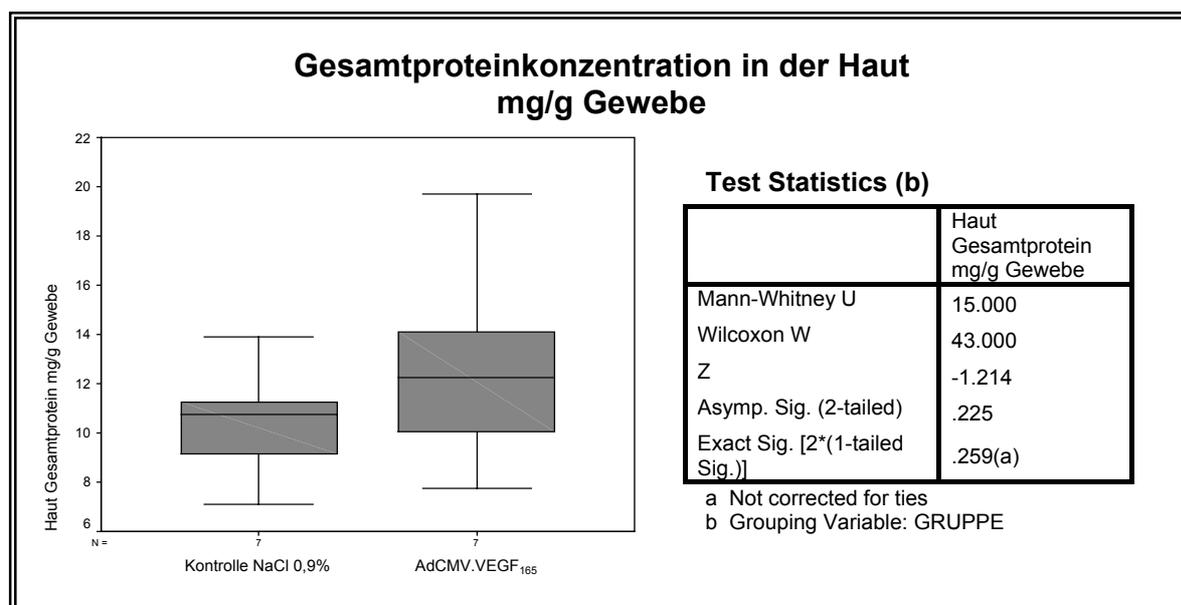
**Abb. 22** VEGF-Konzentration in der Haut pro g Gewebe

Haut b-VEGF ng/g Gewebe

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
I1 NaCl	.9100	.30	1.06	.8343	.25909	7
I2 AdVEGF	1.5100	1.02	1.61	1.3757	.25178	7
Total	1.0500	.30	1.61	1.1050	.37305	14

**Tab. 5** VEGF-Konzentration in der Haut pro g Gewebe

Die Messung der Gesamtproteinkonzentration der entnommenen Haut erbrachte zwischen Kontrollgruppe I1 und Versuchsgruppe I2 keinen statistisch signifikanten Unterschied.



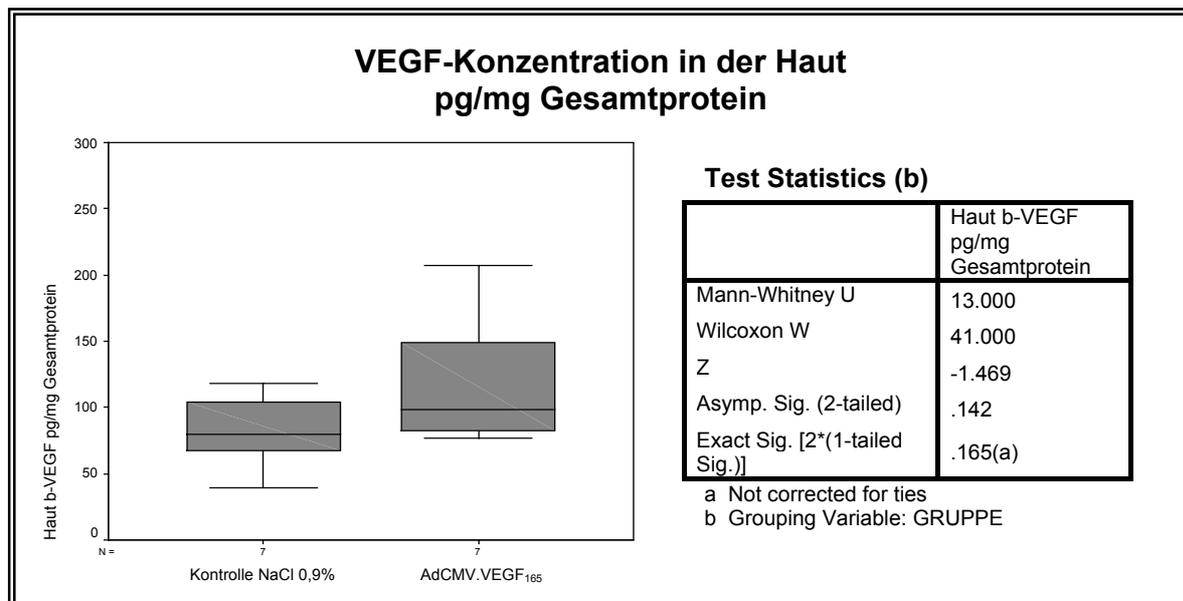
**Abb. 23** Gesamtproteinkonzentration in der Haut pro g Gewebe

Gesamtprotein mg/g Gewebe

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
I1 NaCl	10.7500	7.10	13.90	10.3714	2.16003	7
I2 AdVEGF	12.2600	7.76	19.70	12.5771	4.00472	7
Total	11.1100	7.10	19.70	11.4743	3.29626	14

**Tab. 6** Gesamtproteinkonzentration in der Haut pro g Gewebe

Die VEGF-Konzentration pro mg Gesamtprotein in der entnommenen Haut der AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-therapierten Tiere (Gruppe I2) war tendentiell erhöht, zeigte aber gegenüber der Kontrollgruppe (Gruppe I1) keine statistische Signifikanz.



**Abb. 24** VEGF-Konzentration in der Haut pro mg Gesamtprotein

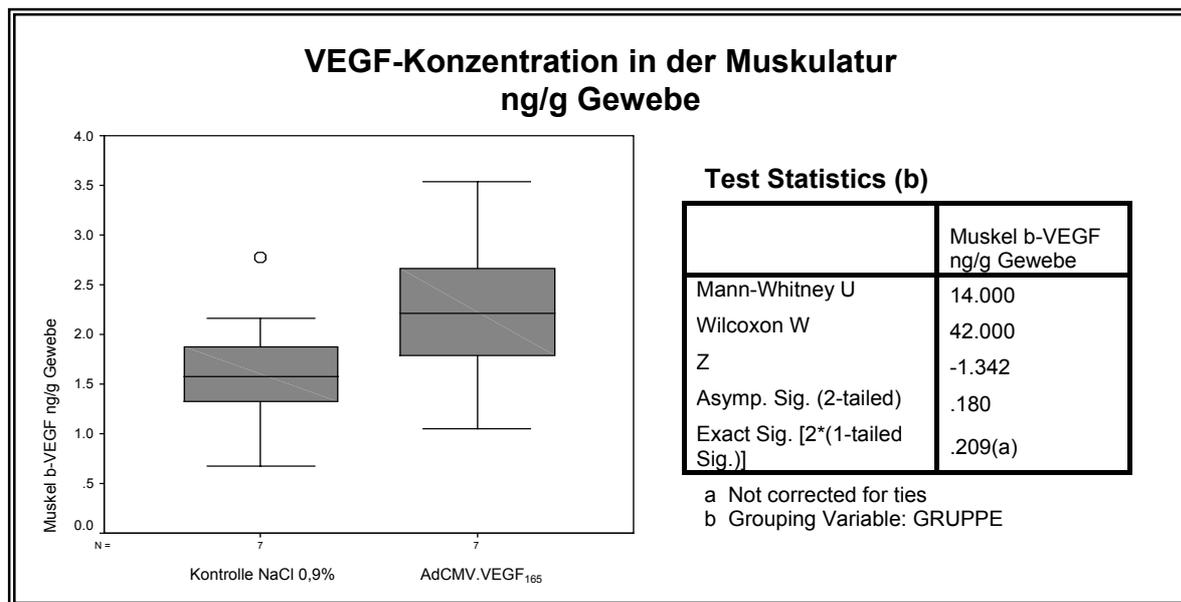
Haut b-VEGF pg/mg Gesamtprotein

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
I1 NaCl	79.500	39.0	118.3	82.900	27.6880	7
I2 AdVEGF	98.500	76.6	207.4	120.729	52.0247	7
Total	90.850	39.0	207.4	101.814	44.5902	14

**Tab. 7** VEGF-Konzentration in der Haut pro mg Gesamtprotein

### 3.5.2 VEGF-Konzentration in der Muskulatur

In der entnommenen Muskulatur der AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-therapierten Tiere (Gruppe I2) konnte gegenüber den Kontrollen (Gruppe I1) keine statistisch signifikant erhöhte VEGF-Konzentration pro g Gewebe nachgewiesen werden.



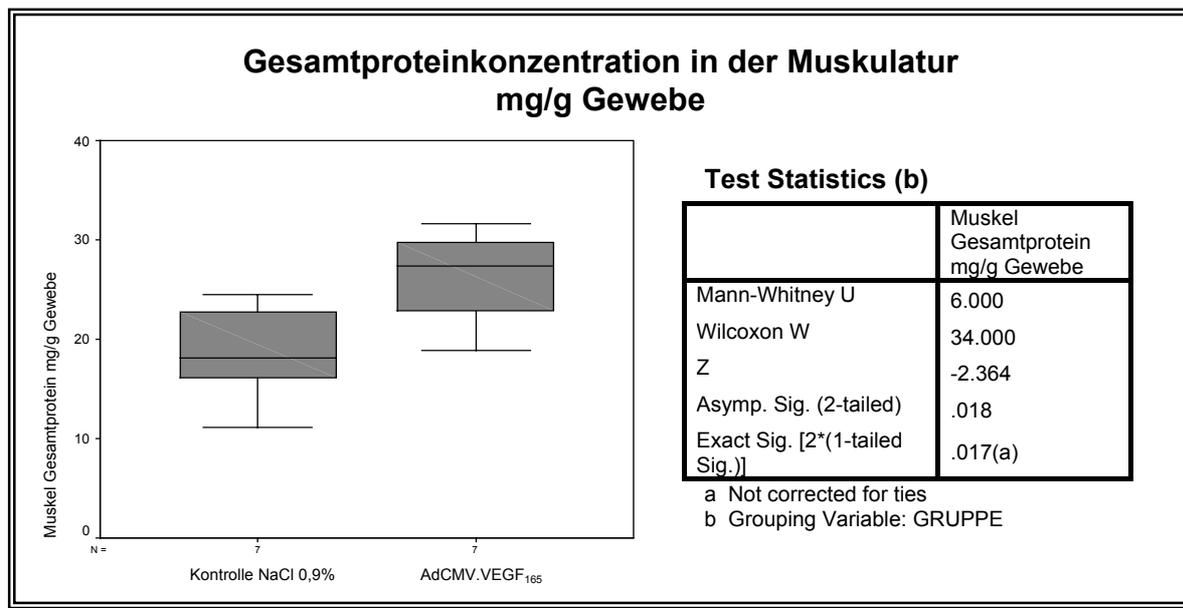
**Abb. 25** VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro g Gewebe

Muskel b-VEGF ng/g Gewebe

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
I1 NaCl	1.5700	0.67	2.77	1.6314	0.67930	7
I2 AdVEGF	2.2100	1.05	3.54	2.2429	0.83837	7
Total	1.8100	0.67	3.54	1.9371	0.79876	14

**Tab. 8** VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro g Gewebe

Die Messung der Gesamtproteinkonzentration der entnommenen Muskulatur erbrachte zwischen Kontrollgruppe I1 und Versuchsgruppe I2 keinen statistisch signifikanten Unterschied.



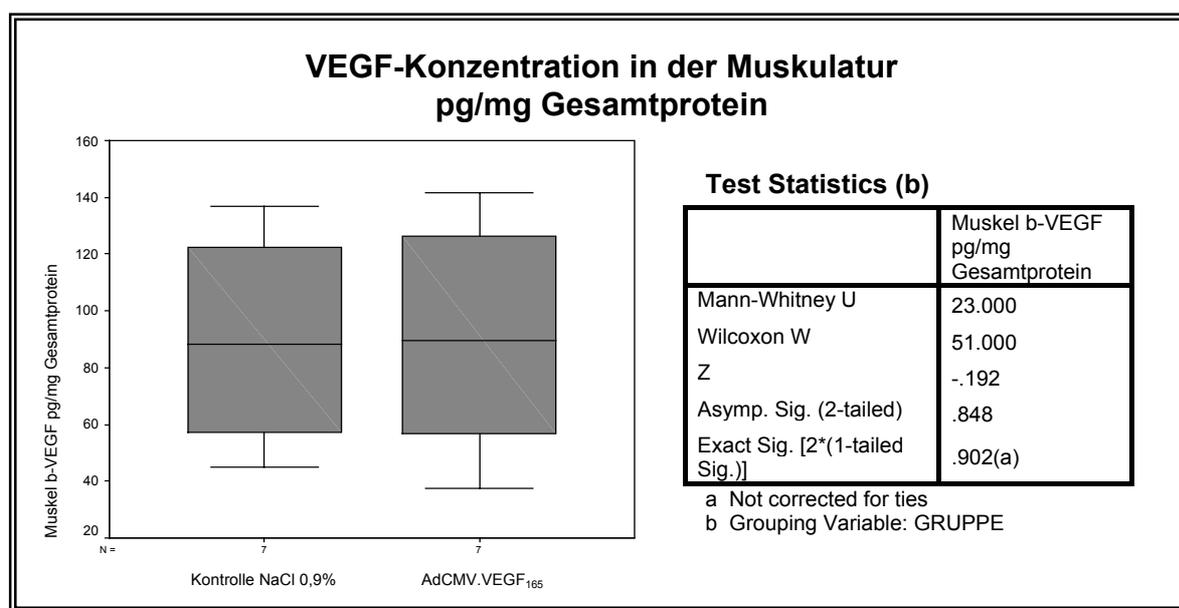
**Abb. 26** Gesamtproteinkonzentration in der Muskulatur pro g Gewebe

Muskel Gesamtprotein mg/g Gewebe

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
I1 NaCl	18.1000	11.15	24.45	18.7771	4.83167	7
I2 AdVEGF	27.3500	18.85	31.65	26.1786	4.90432	7
Total	22.7750	11.15	31.65	22.4779	6.05182	14

**Tab. 9** Gesamtproteinkonzentration in der Muskulatur pro g Gewebe

Die VEGF-Konzentration pro mg Gesamtprotein in der entnommenen Muskulatur der AdCMV.VEGF<sub>165</sub>-therapierten (Gruppe I2) Tiere zeigte gegenüber der Kontrollgruppe I1 keinen statistisch signifikanten Unterschied.



**Abb. 27** VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro mg Gesamtprotein

Muskel b-VEGF pg/mg Gesamtprotein

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
I1 NaCl	88.400	44.8	136.6	89.843	38.1925	7
I2 AdVEGF	89.700	37.3	141.8	90.700	41.7960	7
Total	89.050	37.3	141.8	90.271	38.4668	14

**Tab. 10** VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro mg Gesamtprotein

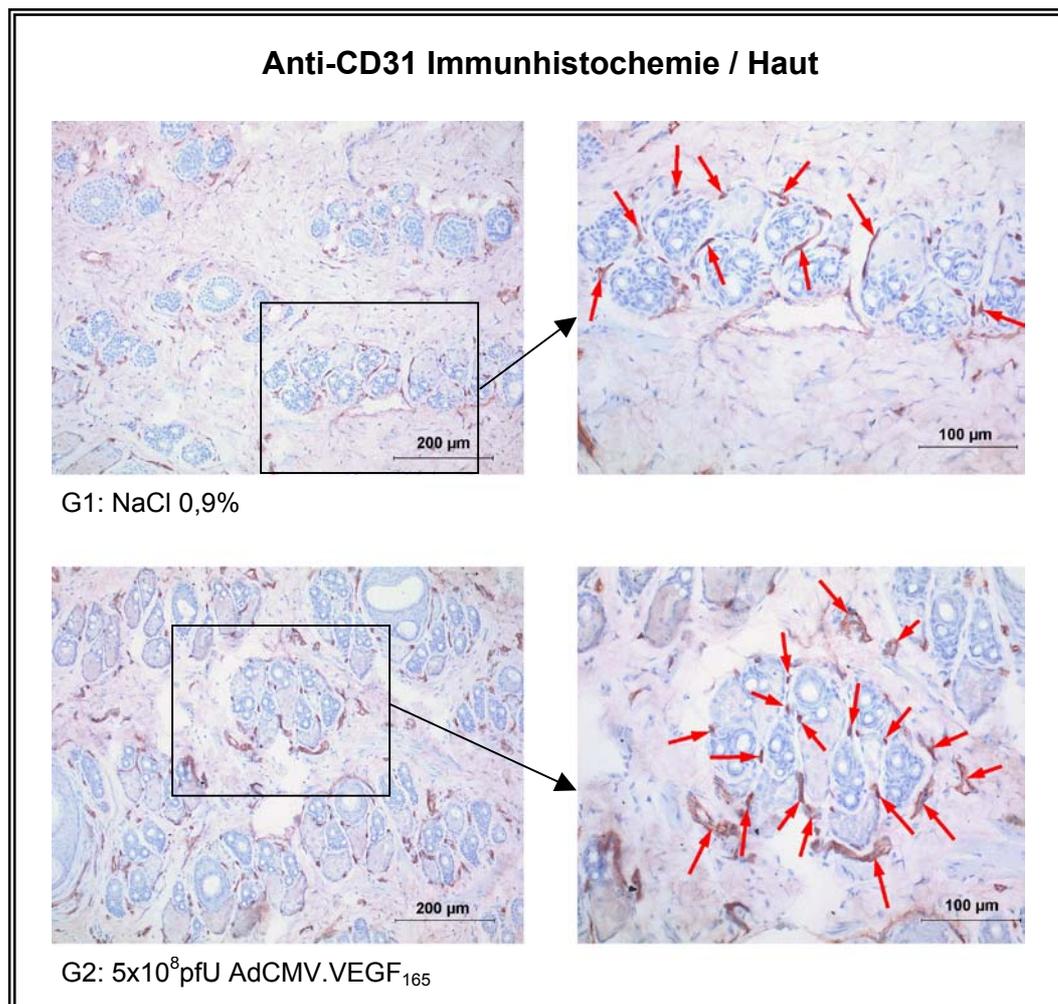
### 3.6 Bestimmung der Mikrogefäßdichte an der Ratte

Zur immunhistochemischen Analyse wurde ein Antikörper gegen CD31 (MCA 1334G mouse anti rat, Serotec Ltd, Kidlington, UK) verwendet. Der verwendete monoklonale Antikörper fungierte als spezifischer und sensitiver Endothelzellmarker.

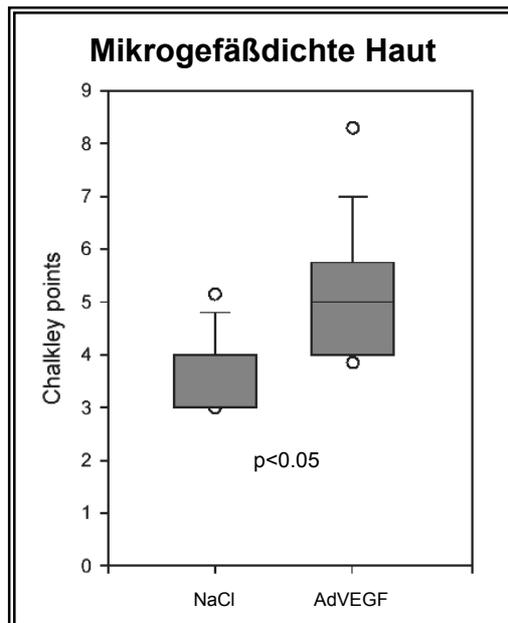
Die Mikrogefäßdichte wurde in Haut und Muskulatur der Tiere mit Hilfe der Chalkley-Methode bestimmt.

#### 3.6.1 Mikrogefäßdichte in der Haut

In der entnommenen Haut der Tiere der Gruppe G2 ( $5 \times 10^8$  pfU Ad.CMV.VEGF<sub>165</sub>) konnte 7 Tage nach Therapie eine erhöhte Mikrogefäßdichte gezeigt werden. Insbesondere in den perifollikulären Arealen konnte eine vermehrte Anfärbung gezeigt werden (Pfeile).



**Abb. 28** Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD31, Nachweis einer erhöhten Gefäßdichte in Gruppe G2 (Pfeile), links jeweils Übersichts-, rechts Detailvergrößerung



**Abb. 29** Mikrogefäßdichte in der Haut als Chalkley points

Die semiquantitative Gefäßdichtebestimmung mit der Chalkley-Methode erbrachte in der Kontrollgruppe G1 einen durchschnittlichen Punktwert von 3,63 bei einer

Standardabweichung von 0,79.

In der Versuchsgruppe G2 konnte ein durchschnittlicher Punktwert von 5,22 bei einer Standardabweichung von 1,5 gemessen

werden. Die Erhöhung war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

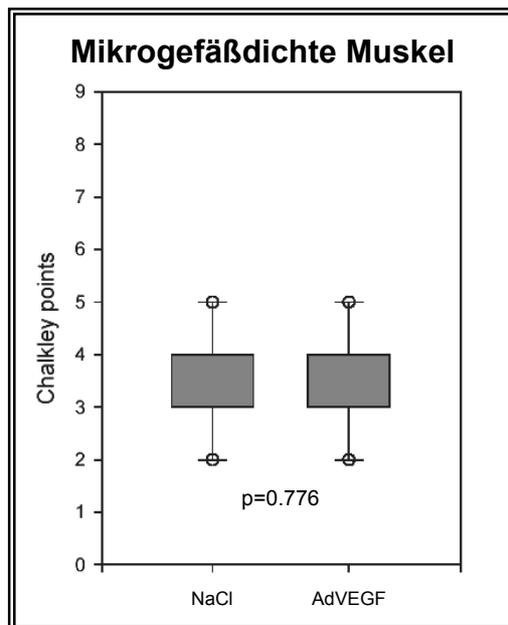
Mikrogefäßdichte Haut

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
G1 NaCl	3	3	6	3.630	0.792	9
G2 AdVEGF	5	3	10	5.222	1.502	9
Total	4	3	10	4.426	1.442	18

**Tab. 11** Mikrogefäßdichte in der Haut als Chalkley points

### 3.6.2 Mikrogefäßdichte in der Muskulatur

In den entnommenen M. rectus abdominis Präparaten, dem die entnommenen Cutis-Präparate auflagen, konnte keine erhöhte Gefäßdichte nachgewiesen werden. Das spricht für einen lokal begrenzten Effekt der subdermal applizierten Therapie.



**Abb. 30** Mikrogefäßdichte in der Muskulatur als Chalkley points

Die semiquantitative Gefäßdichtebestimmung mit der Chalkley-Methode erbrachte in der Kontrollgruppe G1 einen durchschnittlichen Punktwert von 3,33 bei einer Standardabweichung von 0,91.

In der Versuchsgruppe G2 konnte ein durchschnittlicher Punktwert von 3,39 bei einer Standardabweichung von 0,93 gemessen werden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Gefäßdichte Muskel

GRUPPE	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
G1 NaCl	3	2	5	3.333	0.911	9
G2 AdVEGF	3	2	5	3.389	0.934	9
Total	3	2	5	3.361	0.925	18

**Tab. 12** Gefäßdichte in der Muskulatur als Chalkley points

### 3.7 Flächenauswertung des überdimensionierten „Random-pattern-Flap“-Modells an der Ratte

#### 3.7.1 Lappengröße postoperativ

Die Größe der Lappenfläche unmittelbar nach Wundverschluss wurde als Ausgangswert bestimmt. Sie zeigte zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

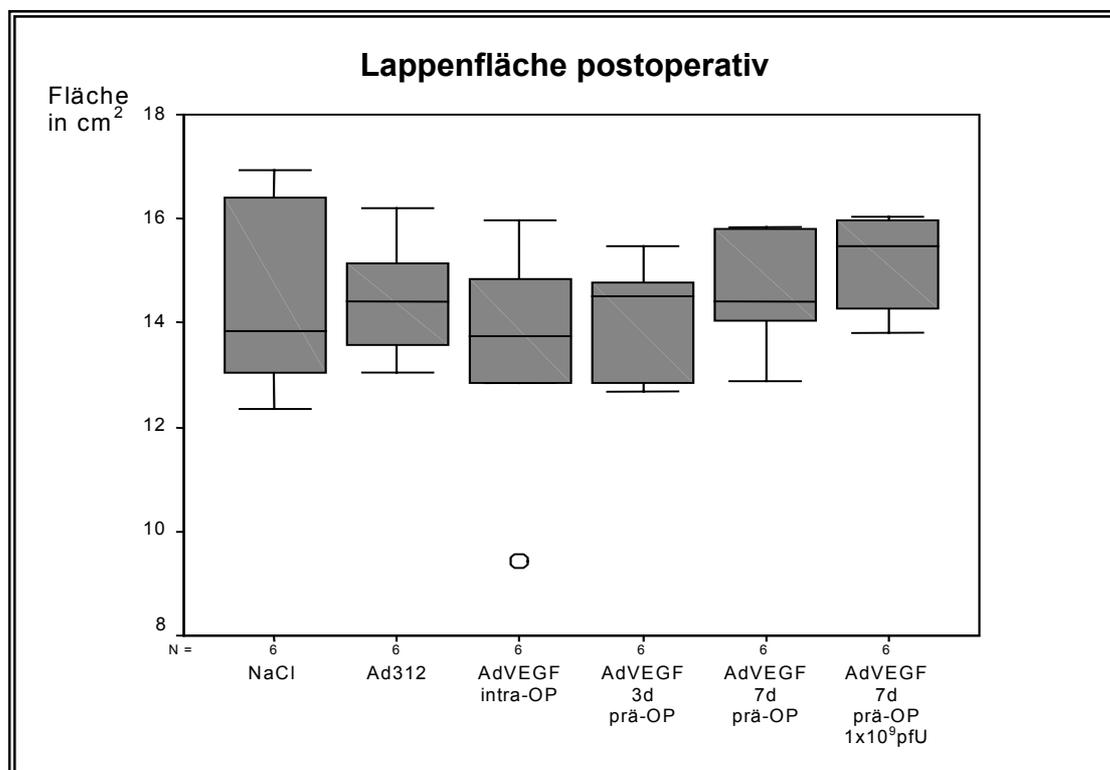


Abb. 31 Lappenfläche unmittelbar postoperativ in cm<sup>2</sup>

#### Fläche postoperativ

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	13.86300	12.341	16.925	14.40950	1.853198	6
K2 Ad 312 7 Tage präoperativ	14.39700	13.035	16.210	14.46150	1.142175	6
V1 AdVEGF intraoperativ	13.74450	9.421	15.989	13.42933	2.248339	6
V2 AdVEGF 3 Tage präoperativ	14.50800	12.698	15.463	14.13550	1.120333	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	14.42050	12.885	15.839	14.57217	1.121162	6
V4 AdVEGF 7 Tage präoperativ 1x10 <sup>9</sup> pfU	15.48800	13.798	16.050	15.18067	.929292	6
Total	14.33500	9.421	16.925	14.36478	1.470999	36

Tab. 13 Lappenfläche postoperativ in cm<sup>2</sup>

### 3.7.2 Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen

Die Auswertung der überlebenden Lappenfläche 7 Tage postoperativ zeigte in den Versuchsgruppen V2-V4 eine signifikante Vergrößerung der überlebenden Lappenfläche gegenüber den Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Die Kontrollgruppen untereinander unterschieden sich nicht. Eine intraoperative Applikation von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> erbrachte ebenfalls keine signifikante Vergrößerung der überlebenden Lappenfläche. Die Vergrößerung der überlebenden Fläche in Gruppe V4 ( $1 \times 10^9$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) gegenüber V3 ( $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) war statistisch nicht signifikant.

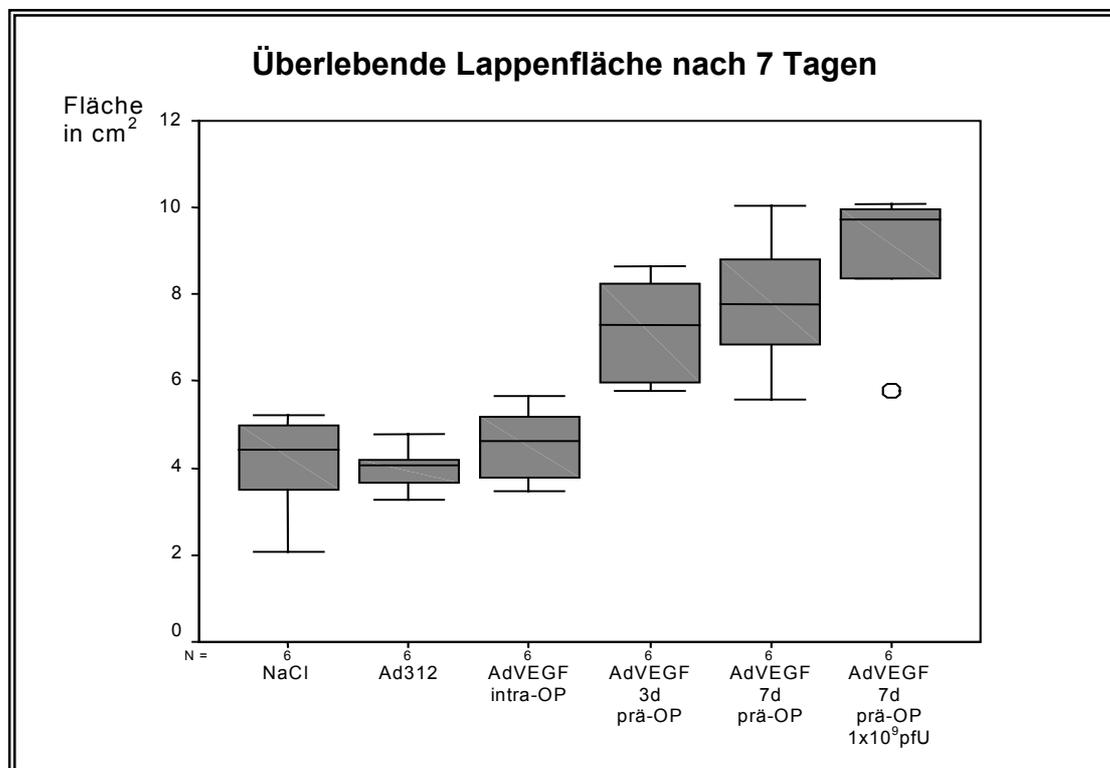


Abb. 32 Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

#### Überlebende Fläche nach 7 Tagen

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	4.42300	2.054	5.206	4.09667	1.196662	6
K2 Ad 312 7 Tage präoperativ	4.04700	3.279	4.789	4.00533	.508788	6
V1 AdVEGF intraoperativ	4.63250	3.451	5.642	4.55433	.824354	6
V2 AdVEGF 3 Tage präoperativ	7.28150	5.799	8.659	7.21300	1.200399	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	7.77950	5.593	10.035	7.81117	1.569495	6
V4 AdVEGF 7 Tage präoperativ $1 \times 10^9$ pfU	9.70950	5.763	10.083	8.93433	1.675190	6
Total	5.61750	2.054	10.083	6.10247	2.288772	36

Tab. 14 Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

### 3.7.3 Nekrosefläche nach 7 Tagen

Die Auswertung der entstandenen Nekrosefläche erbrachte analoge Resultate. Ab einem Injektionszeitpunkt von 3 Tagen vor Lappenhebung resultierte eine statistisch signifikante Reduzierung der Nekrose ( $p < 0,05$ ). Die geringere Nekrosefläche in der Gruppe V4 ( $1 \times 10^9$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) gegenüber V3 ( $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) war statistisch nicht signifikant. Zwischen den Kontrollgruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Eine intraoperative Applikation von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> erbrachte ebenfalls keine signifikante Reduzierung der Nekrose.

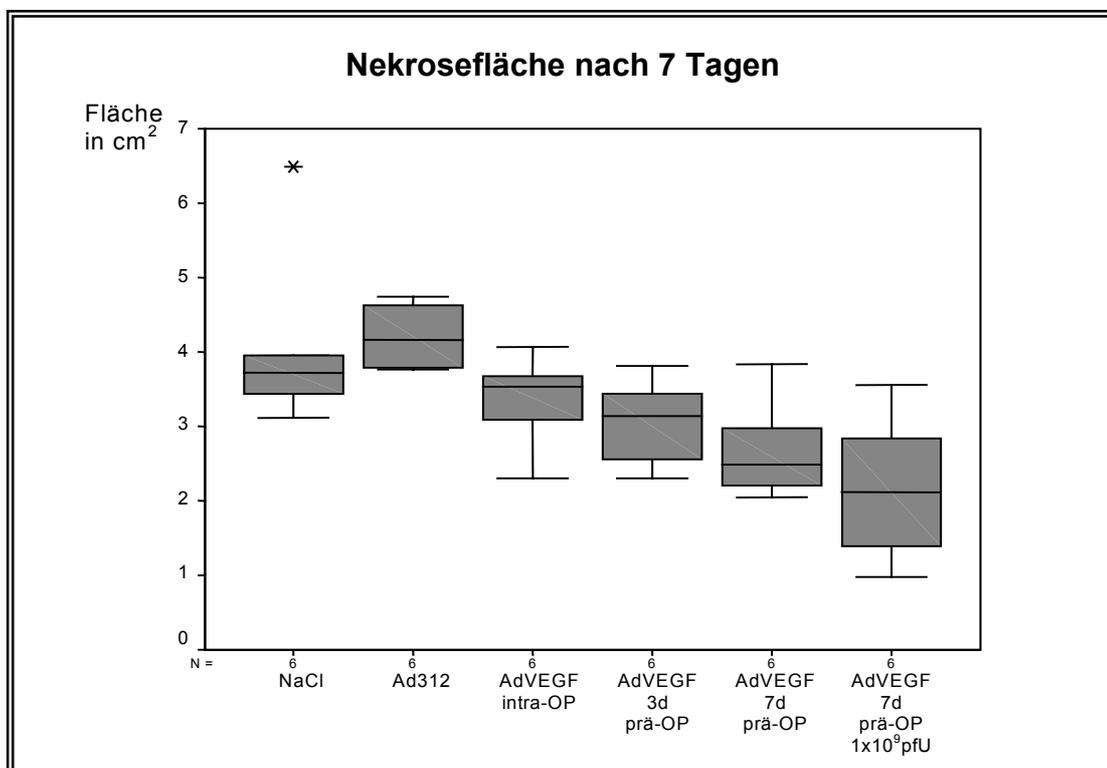


Abb. 33 Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

Nekrosefläche nach 7 Tagen

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	3.72850	3.127	6.483	4.07800	1.214850	6
K2 Ad 312 7 Tage präoperativ	4.16250	3.778	4.733	4.21017	.406920	6
V1 AdVEGF intraoperativ	3.52800	2.311	4.075	3.37000	.605755	6
V2 AdVEGF 3 Tage präoperativ	3.15050	2.309	3.821	3.07183	.565015	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	2.48050	2.050	3.836	2.67100	.667943	6
V4 AdVEGF 7 Tage präoperativ $1 \times 10^9$ pfU	2.12750	.967	3.560	2.17050	1.027307	6
Total	3.44800	.967	6.483	3.26192	1.042878	36

Tab. 15 Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

### 3.7.4 Prozentuale Auswertung

Die prozentuale Auswertung der überlebenden Fläche und Nekrose bezogen auf die Lappengröße postoperativ zeigte ebenfalls eine signifikante Vergrößerung der Lappenfläche und Verringerung der Nekrose ab einem Applikationszeitpunkt von 3 Tagen präoperativ ( $p < 0,05$ ). Auch hier zeigten die Kontrollgruppen untereinander keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die intraoperative Applikation verbesserte die Resultate ebenfalls nicht signifikant. Die Applikation der doppelten Viruskonzentration 7 Tage präoperativ zeigte gegenüber der einfachen Konzentration keine signifikante Vergrößerung der überlebenden Fläche oder Reduzierung von Nekrose.

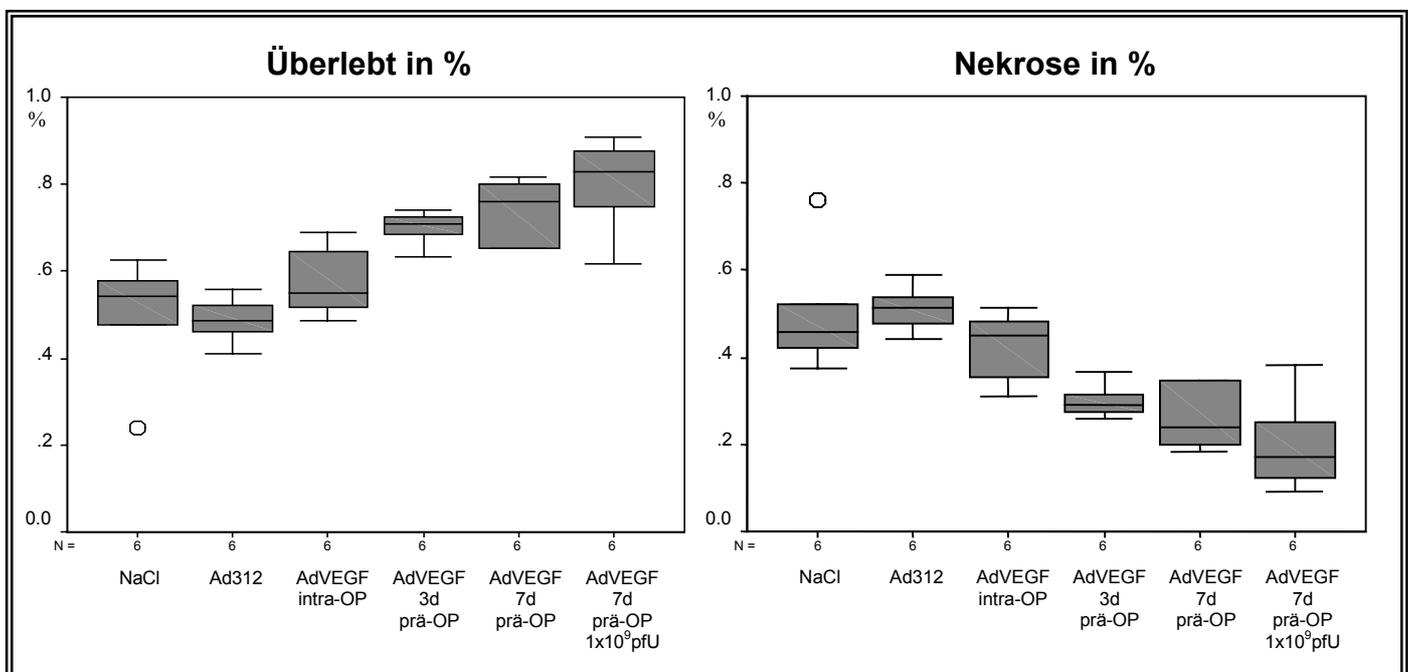


Abb. 34 Überlebende Lappenfläche und Nekrosefläche nach 7 Tagen in %

Überlebende Fläche nach 7 Tagen in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	.5436	.24	.62	.5014	.13686	6
K2 Ad 312 7 Tage präoperativ	.4856	.41	.56	.4870	.05269	6
V1 AdVEGF intraoperativ	.5504	.48	.69	.5730	.08067	6
V2 AdVEGF 3 Tage präoperativ	.7101	.63	.74	.7009	.03773	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	.7621	.65	.82	.7413	.07158	6
V4 AdVEGF 7 Tage präoperativ $1 \times 10^9$ pfU	.8274	.62	.91	.8006	.10824	6
Total	.6399	.24	.91	.6340	.14652	36

Tab. 16 Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in %

## Nekrosefläche nach 7 Tagen in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	3.72850	3.127	6.483	4.07800	1.214850	6
K2 Ad 312 7 Tage präoperativ	4.16250	3.778	4.733	4.21017	.406920	6
V1 AdVEGF intraoperativ	3.52800	2.311	4.075	3.37000	.605755	6
V2 AdVEGF 3 Tage präoperativ	3.15050	2.309	3.821	3.07183	.565015	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	2.48050	2.050	3.836	2.67100	.667943	6
V4 AdVEGF 7 Tage präoperativ $1 \times 10^9$ pfU	2.12750	.967	3.560	2.17050	1.027307	6
Total	3.44800	.967	6.483	3.26192	1.042878	36

Tab. 17 Nekrosefläche nach 7 Tagen in %

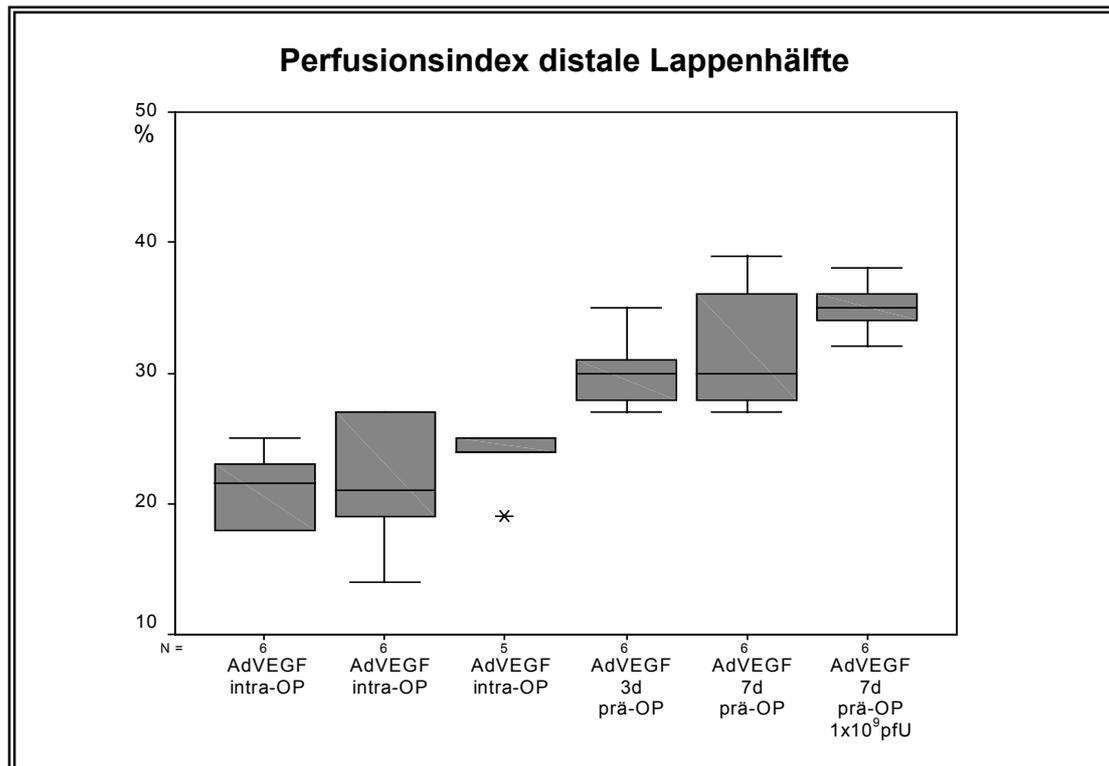
### 3.8 Perfusionsbestimmung postoperativ

Mittels Indocyaningrün-Laser-Fluoreszenzmessung wurde überprüft, ob in einer der Gruppen K1-2 und V1-4 zum Operationszeitpunkt unter Therapie eine verbesserte Durchblutung der überdimensionierten Hautlappenplastik bestand. Die Perfusion wurde nach Rückverlagerung des Lappens sowohl in der distalen, von der Planung her kritisch durchbluteten Lappenhälfte, als auch in der proximalen Lappenhälfte mittels Indocyaningrün-Laser-Fluoroskopie untersucht. Eigene Voruntersuchungen hatten den Perfusionsindex als geeigneten Parameter zur Vorhersage von Nekrose erbracht. Bei einem standardbereinigten Perfusionsindex von <25% im Vergleich zur normalperfundierten Bauchhaut als Referenz war in Untersuchungen ebenfalls am Modell des überdimensionierten Random-pattern-Flap an der Ratte in der untersuchten Region die Entstehung von Nekrose mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% vorherzusagen.

#### 3.8.1 Perfusionsindex distale Lappenhälfte

Die distale Lappenhälfte ist gemäß der Planung der überdimensionierten Lappenplastik die kritisch perfundierte Region. Zwischen den Kontrollgruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Perfusionsindex bei intraoperativer Applikation von  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> (V1) war gegenüber den

Kontrollen ebenfalls nicht signifikant erhöht. Eine statistisch signifikante Erhöhung des Perfusionsindex ( $p < 0,05$ ) bestand bei einer Applikation 3 Tage (Gruppe V2) und 7 Tage präoperativ (Gruppe V3), sowie bei Applikation von  $1 \times 10^9$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ (V4). Die Gruppen V2 bis V4 waren ebenfalls gegenüber V1 signifikant erhöht, eine signifikante Erhöhung untereinander bestand jeweils nicht.



**Abb. 35** Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

Perfusionsindex dist. Hälfte in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	21.5%	18%	25%	21.17%	2.93%	6
K2 Ad 312 7 Tage präoperativ	21%	14%	27%	21.5%	4.97%	6
V1 AdVEGF intraoperativ	24%	19%	25%	23.4%	2.51%	6
V2 AdVEGF 3 Tage präoperativ	30%	27%	35%	30.17%	2.86%	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	30%	27%	39%	31.67%	4.8%	6
V4 AdVEGF 7 Tage präoperativ $1 \times 10^9$ pfU	35%	32%	38%	35%	2%	6
Total	27%	14%	39%	27.26%	6.4%	36

**Tab. 18** Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

### 3.8.2 Perfusionsindex proximale Lappenhälfte

Die proximale Hälfte der Hautlappenplastik ist gemäß der Lappenplanung nicht kritisch durchblutet. Es sollte hier untersucht werden, ob auch an der Durchblutung der proximalen Hälfte ein positiver Therapieeffekt zu beobachten war.

Zwischen den Kontrollgruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Perfusionsindex bei intraoperativer Applikation von  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> (V1) war gegenüber den Kontrollen ebenfalls nicht signifikant erhöht. Eine statistisch signifikante Erhöhung des Perfusionsindex ( $p < 0,05$ ) bestand bei einer Applikation 3 Tage (Gruppe V2) und 7 Tage präoperativ (Gruppe V3), sowie bei Applikation von  $1 \times 10^9$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ (V4). Die Indizes der Gruppen V2 bis V4 waren ebenfalls gegenüber V1 signifikant erhöht, eine signifikante Erhöhung untereinander bestand jeweils nicht.

Perfusionsindex prox. Hälfte in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	57%	53%	65%	58%	5.12%	6
K2 Ad 312 7 Tage präoperativ	50%	44%	71%	53%	11.74%	6
V1 AdVEGF intraoperativ	60%	40%	70%	57%	11.49%	6
V2 AdVEGF 3 Tage präoperativ	76%	59%	99%	76%	15%	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	74%	51%	96%	74%	18.45%	6
V4 AdVEGF 7 Tage präoperativ $1 \times 10^9$ pfU	79%	46%	89%	73%	19.52%	6
Total	63%	40%	99%	65,49%	16,34%	36

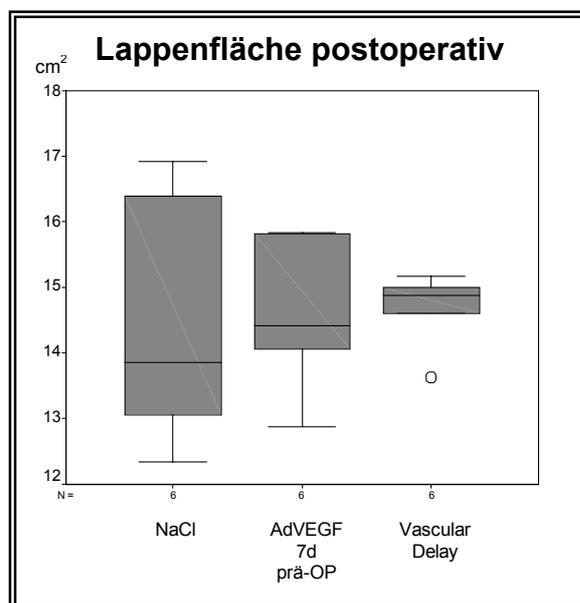
**Tab. 19** Perfusionsindex proximale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

### 3.9 Vergleich AdCMV.VEGF<sub>165</sub> und Vascular Delay

Um den Effekt einer Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> besser einschätzen zu können, wurde ein etabliertes Therapieverfahren vergleichend untersucht und mit der Kontrollgruppe K1 (NaCl 0,9% 7 Tage präoperativ) verglichen. Beim Vascular Delay soll durch präoperative Reduzierung der Lappenperfusion ein Angiogenesereiz gesetzt werden, ohne jedoch den Lappen dauerhaft zu schädigen. Zum Operationszeitpunkt erwartet man eine verbesserte Gefäßstruktur im Lappen und

damit eine verbesserte Überlebensrate. Hinsichtlich der Vergrößerung der überlebenden Fläche und Reduzierung der Nekrosefläche wurde es statistisch mit der Applikation von  $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ und der Applikation von NaCl 0,9% 7 Tage präoperativ verglichen. Die Umschneidung des Hautlappens beim Vascular Delay erfolgte ebenfalls 7 Tage präoperativ.

### 3.9.1 Lappengröße postoperativ



**Abb. 36** Lappenfläche unmittelbar postoperativ in cm<sup>2</sup>

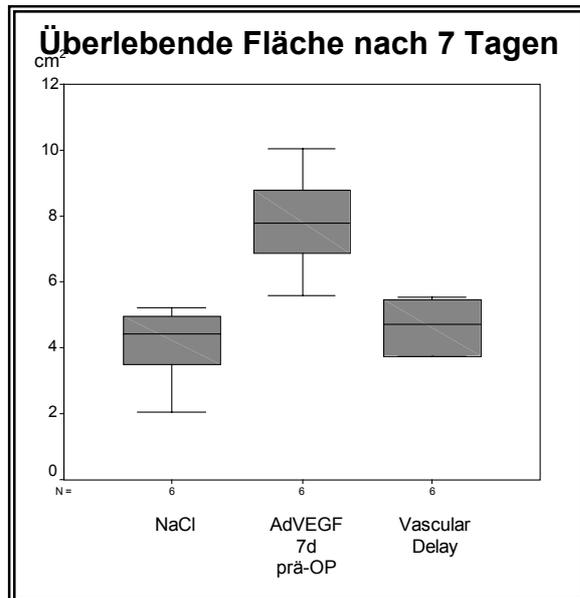
Die Größe der Lappenfläche unmittelbar nach Wundverschluss wurde als Ausgangswert bestimmt. Sie zeigte zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Fläche postoperativ

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	13.86300	12.341	16.925	14.40950	1.853198	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	14.42050	12.885	15.839	14.57217	1.121162	6
D1 Vascular Delay 7 Tage präoperativ	14.88000	13.615	15.158	14.68933	0.560143	6
Total	14.52250	12.341	16.925	14.55700	1.219028	18

**Tab. 20** Lappenfläche postoperativ in cm<sup>2</sup>

### 3.9.2 Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen



**Abb. 37** Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

Die Auswertung der überlebenden Lappenfläche 7 Tage postoperativ zeigte in der Vascular Delay Versuchsgruppe (D1) keine signifikante Vergrößerung der überlebenden Fläche. Die Versuchsgruppe V3 ( $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) wies demgegenüber eine signifikante Vergrößerung der überlebenden Fläche sowohl gegenüber K1 als auch gegenüber D1 auf ( $p < 0,05$ ).

Überlebende Fläche nach 7 Tagen

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	4.42300	2.054	5.206	4.09667	1.196662	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	7.77950	5.593	10.035	7.81117	1.569495	6
D1 Vascular Delay 7 Tage präoperativ	4.72050	3.736	5.549	4.65850	.797105	6
Total	5.08500	2.054	10.035	5.52211	2.040161	18

**Tab. 21** Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

### 3.9.3 Nekrosefläche nach 7 Tagen

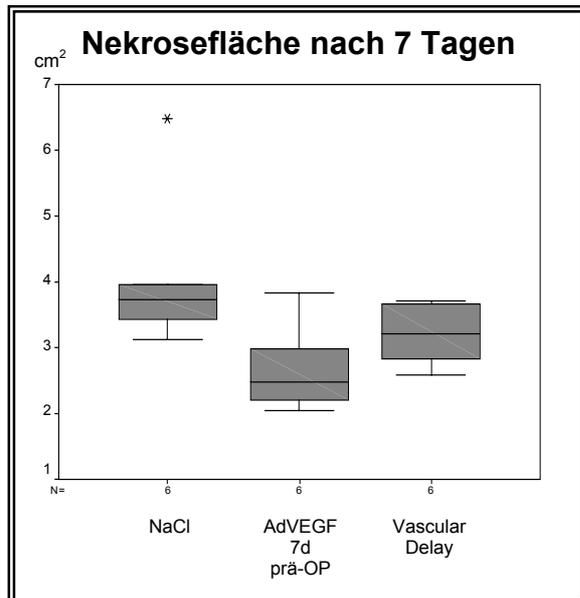


Abb. 38 Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

Die Auswertung der entstandenen Nekrosefläche erbrachte analoge Resultate. Die Vascular Delay Versuchsgruppe konnte im Gegensatz zur Versuchsgruppe V3 keine im Vergleich zur Kontrollgruppe K1 signifikante Reduzierung der Nekrosefläche zeigen.

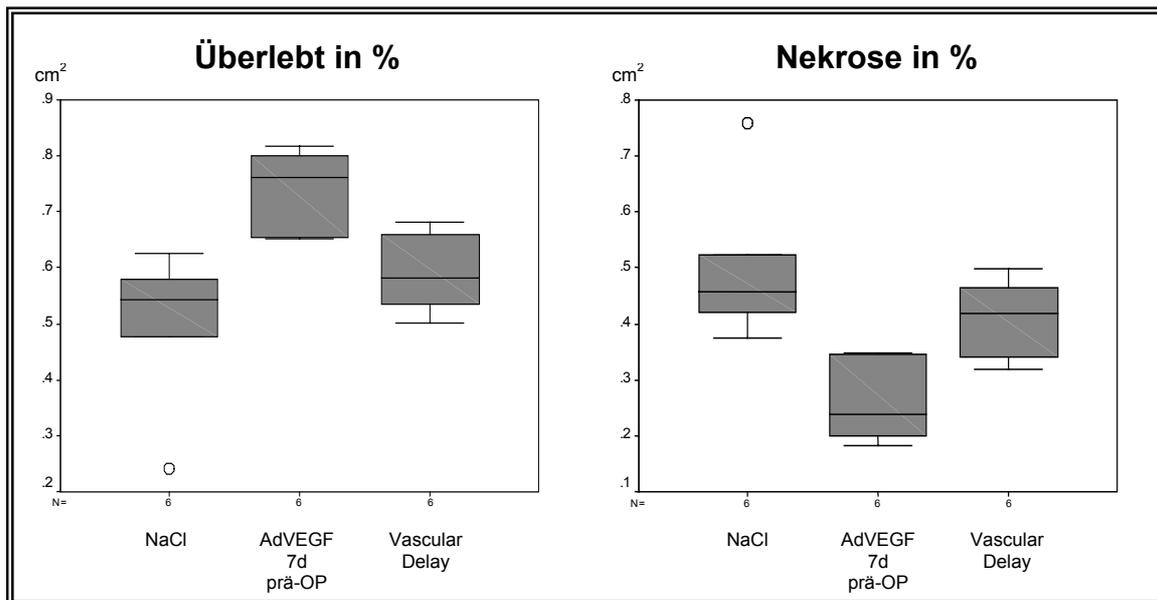
Nekrosefläche nach 7 Tagen

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	3.72850	3.127	6.483	4.07800	1.214850	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	2.48050	2.050	3.836	2.67100	.667943	6
D1 Vascular Delay 7 Tage präoperativ	3.20600	2.593	3.718	3.20318	.447076	6
Total	3.20600	2.050	6.483	3.31739	.990121	18

Tab. 22 Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

### 3.9.4 Prozentuale Auswertung

Die prozentuale Auswertung der überlebenden Fläche und Nekrose bezogen auf die Lappengröße postoperativ zeigte ebenfalls nur in der Versuchsgruppe V3 (5x10<sup>8</sup>pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) eine signifikante Vergrößerung der Lappenfläche und Verringerung der Nekrose gegenüber der Kontrollgruppe K1. V3 wies gleichsam eine signifikant vergrößerte überlebende Fläche und signifikant reduzierte Nekrosefläche gegenüber D1 (Vascular Delay 7 Tage präoperativ) auf.



**Abb. 39** Überlebende Lappenfläche und Nekrosefläche nach 7 Tagen in %

#### Überlebende Fläche nach 7 Tagen in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	.54362	.241	.625	.50144	.136868	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	.76214	.653	.817	.74127	.071590	6
D1 Vascular Delay 7 Tage präoperativ	.58144	.501	.682	.58984	.071638	6
Total	.61613	.241	.817	.61085	.137514	18

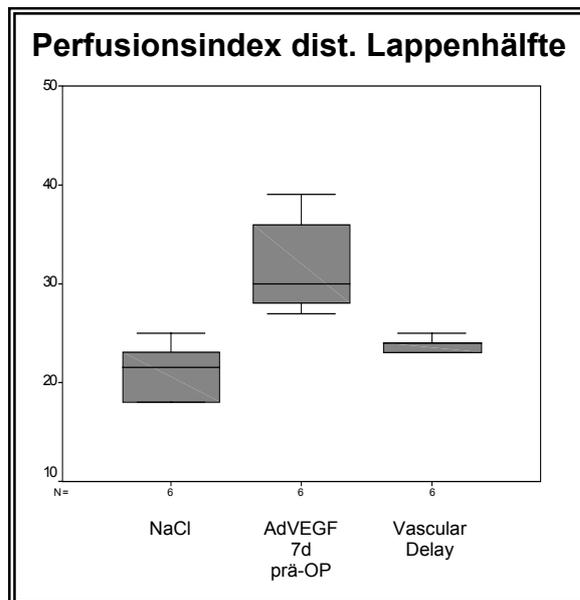
**Tab. 23** Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in %

#### Nekrosefläche nach 7 Tagen in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	.45638	.375	.759	.49856	.136868	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	.23786	.183	.347	.25873	.071590	6
D1 Vascular Delay 7 Tage präoperativ	.41856	.318	.499	.41016	.071638	6
Total	.38387	.183	.759	.38915	.137514	18

**Tab. 24** Nekrosefläche nach 7 Tagen in %

### 3.9.5 Perfusionsindex distale Lappenhälfte



**Abb. 40** Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

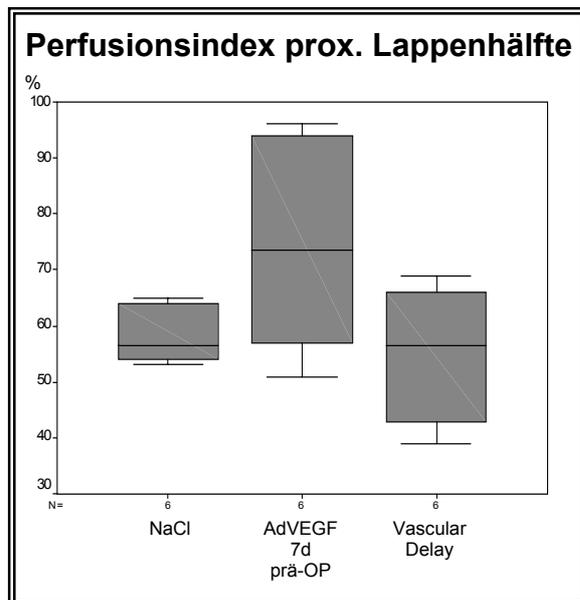
Auch bei der Perfusionsmessung konnte die Vascular Delay Versuchsgruppe (D1), anders als die Versuchsgruppe V3 ( $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ), gegenüber der Kontrolle K1 keine signifikante Erhöhung zeigen. Der Perfusionsindex in V3 war sowohl gegenüber K1, als auch gegenüber D1 signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Perfusionsindex dist. Hälfte in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	21.5%	18%	25%	21.17%	2.93%	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	30%	27%	39%	31.67%	4.8%	6
D1 Vascular Delay 7 Tage präoperativ	24%	23%	25%	23.83%	7.53%	6
Total	24%	18%	39%	25.56%	5.52%	18

**Tab. 25** Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

### 3.9.6 Perfusionsindex proximale Lappenhälfte



**Abb. 41** Perfusionsindex proximale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

Die Auswertung der Perfusionsindizes in der proximalen Lappenhälfte konnte zwischen den 3 in diesem Setting untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede zeigen. Beim Vergleich der Gruppen V3 ( $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) und D1 (Vascular Delay 7 Tage präoperativ) zeigte sich ein p-Wert von  $p=0,055$ .

Perfusionsindex prox. Hälfte in %

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
K1 NaCl 7 Tage präoperativ	57%	53%	65%	58%	5.12%	6
V3 AdVEGF 7 Tage präoperativ	74%	51%	96%	74%	18.45%	6
D1 Vascular Delay 7 Tage präoperativ	57%	39%	69%	55%	12.92%	6
Total	61%	39%	96%	62.44	15.21%	18

**Tab. 26** Perfusionsindex proximale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

## 4. Diskussion

Als Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit bleiben festzuhalten:

- Der Vektor AdCMV.VEGF<sub>165</sub> steigert in transduzierten Zellen die VEGF-Produktion.
- Nach Transduktion sind in der Bauchhaut der Ratte eine signifikant erhöhte VEGF-Konzentration und
- eine signifikant erhöhte Gefäßdichte festzustellen.
- Die Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> resultierte am Modell der überdimensionierten Hautlappenplastik vom random-pattern Typ sowohl in einer signifikant gesteigerten Durchblutung als auch
- in einer signifikanten Vergrößerung der überlebenden Fläche.
- Das Zeitfenster für eine erfolgreiche Gentherapie konnte näher bestimmt werden.
- Die Resultate der Versuche mit dem Kontrollvirus Ad312 schließen einen Effekt allein durch die virale Infektion aus.

Zu diskutieren sind die Lokalisierung des Therapieeffektes, der optimale Applikationszeitpunkt und besondere Charakteristika des Wachstumsfaktors VEGF im Hinblick auf eine Vasorelaxation und die Bildung unreifer Gefäße. Ebenfalls soll ein Zusammenhang mit dem „Delay“ Phänomen hergestellt und der Einsatz des adenoviralen Vektorsystems kritisch erörtert werden.

### 4.1 VEGF-Gewebskonzentration und Mikrogefäßdichte

Nach Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> zeigte sich in der Haut der behandelten Tiere 7 Tage nach Transduktion eine signifikant erhöhte VEGF-Konzentration pro ng Gewebe (Gruppe G2). Die subkutane Injektion des Vektors resultierte in keiner signifikanten Erhöhung der VEGF-Konzentration im darunterliegenden Anteil des M. rectus abdominis.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten in immunohistochemischen Untersuchungen ebenfalls eine erhöhte VEGF-Konzentration im Gewebe zeigen,<sup>187</sup> in lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte in anderen Versuchen jedoch trotz guter Resultate hinsichtlich Überlebensrate kein Hinweis auf eine Gefäßneubildung gefunden werden.<sup>116</sup> Auch die Zählung von Mikrogefäßen zeigte keinen eindeutigen Anhaltspunkt für eine Angiogenese.<sup>150</sup> Andere Arbeitsgruppen fanden vermehrt Granulationsgewebe und Hinweise auf eine Neovaskularisation nach subdermaler Applikation von VEGF als Protein<sup>98</sup> oder adenoviralem Gentransfer.<sup>30</sup>

In der vorliegenden Arbeit konnte in der immunhistochemischen Analyse 7 Tage nach Transduktion in der Haut der behandelten Tiere nun eine im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöhte Mikrogefäßdichte nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich in der darunterliegenden Muskulatur nach subkutaner Injektion keine Erhöhung der Gefäßdichte.

Diese Erkenntnis und die Ergebnisse der Messung der VEGF-Konzentration legen einen lokalisierten Effekt der Therapie nahe, ohne eine systemische Wirkung ausschließen zu können.

## 4.2 Applikationszeitpunkt

Die in vitro Messungen der Expression von VEGF<sub>165</sub> nach Transduktion von IEC-6 Zellen durch AdCMV.VEGF<sub>165</sub> zeigten eine maximale Produktion nach 48 Stunden. Dieses Ergebnis bietet eine Erklärung für die mangelnde Effektivität der intraoperativen Applikation (Gruppe V1) hinsichtlich einer gesteigerten Durchblutung und Vergrößerung der überlebenden Fläche. Die Gentherapie im Sinne einer Präkonditionierung der Lappenplastik stellte sich in der vorliegenden Arbeit als aussichtsreicher dar. Bei der Behandlung drei Tage vor Lappenhebung (Gruppe V2) zeigte sich bereits intraoperativ eine signifikant gesteigerte Durchblutung und am Versuchsende konnte eine signifikante Vergrößerung der überlebenden Fläche gemessen werden. Die Applikation des Virus sieben Tage präoperativ (Gruppe V3, V4) resultierte demgegenüber in einer nochmals signifikant gesteigerten Durchblutung und vergrößerten überlebenden Lappenfläche. Diese Erkenntnis legt einen notwendigen Zeitraum von einigen Tagen zwischen dem Erreichen der

maximalen Konzentration des Proteins und einer nutzbaren, verbesserten Gefäßstruktur nahe. Es erscheint einleuchtend, dass eine effektive Angiogenese nach Induktion durch eine hohe VEGF-Konzentration eine Dauer von mindestens zwei bis drei Tagen benötigt.<sup>96</sup> Ein Applikationszeitpunkt sieben Tage vor Operation lieferte in den vorliegenden Versuchen die besten Resultate. Die überlebende Fläche konnte gegenüber den Kontrollen K1 und K2 um etwa 50% gesteigert werden. Daraus ergibt sich ein mögliches Länge-zu-Breite-Verhältnis von 3:1. Dennoch widersprechen diese Ergebnisse den Versuchen von Gurunluoglu und Mitarb.,<sup>65</sup> die eine signifikante Reduktion der Lappennekrose bei der Applikation eines für VEGF kodierenden Adenovirus bereits 12 Stunden vor Lappenhebung zeigten. In ihren Versuchen konnten sie keine signifikanten Unterschiede zu weiteren Applikationszeitpunkten 3, 7 und 14 Tage präoperativ feststellen. Eine mögliche Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse könnte die Tatsache sein, dass diese Autoren keine absoluten Werte für die überlebende Fläche verwendeten, sondern lediglich die Ausdehnung des nekrotischen Areals in Relation zur Gesamtfläche der Lappen gesetzt haben. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass die Elastizität der Haut und der Wundverschluss bereits unmittelbar postoperativ zu einer reduzierten Lappenfläche führen und die Narbenkontraktur in Abhängigkeit vom Ausmaß der Nekrose eine weitere Reduktion der Lappenfläche zur Folge hat. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Analyse der absoluten Werte der überlebenden Fläche aussagekräftigere Ergebnisse zu liefern. Eine weitere mögliche Erklärung für einen Effekt der Therapie bereits 12 Stunden nach Applikation, wie von Gurunluoglu und Mitarbeitern beobachtet, bieten die vasorelaxierenden Eigenschaften von VEGF.<sup>5</sup>

### **4.3 Vasorelaxation durch VEGF**

In der vorliegenden Arbeit konnte nach intraoperativer Applikation des Vektors AdCMV.VEGF<sub>165</sub> (Gruppe V1) keine erhöhte Perfusion und am Versuchsende keine Vergrößerung der überlebenden Fläche beobachtet werden. Andere Studien hatten bei intraoperativer Applikation von VEGF<sub>165</sub> als Protein einen therapeutischen Effekt demonstrieren können<sup>98, 151, 159</sup> und dafür einen Angiogenese-Effekt als mögliche

Erklärung vermutet. Ein Akuteffekt durch Gefäßneubildung erscheint jedoch nach heutigem Verständnis eher unwahrscheinlich.<sup>5, 96</sup> Die Entdeckung des vasorelaxierenden Effekts von VEGF bietet einen neuen Ansatz für Erklärungen der beobachteten Phänomene.

Die Infusion von VEGF<sub>165</sub> in Koronararterien resultierte in einer Vasorelaxation<sup>99, 172</sup> und einem gesteigerten Blutfluss.<sup>115</sup> Auch in der menschlichen A. thoracica interna konnte nach Applikation von VEGF eine Vasorelaxation gezeigt werden.<sup>112</sup> Ein Zusammenhang mit dem Rezeptor VEGFR-2 (auch KDR oder Flk-1) wurde dargestellt.<sup>107, 176</sup> An einer Hautlappenplastik am Schwein konnte von Ashrafpour und Mitarbeitern ein konzentrationsabhängiger vasorelaxierender Effekt gezeigt und ebenfalls der Signaltransduktionsweg dieses Phänomens beschrieben werden.<sup>5</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde ein für VEGF<sub>165</sub> kodierender Adenovirus appliziert. Die Analyse der direkt postoperativ durchgeführten Perfusionsmessung zeigte bei intraoperativer Applikation keinen Akuteffekt der Therapie, in der distalen Hälfte der Lappenplastiken konnte kein erhöhter Perfusionsindex gemessen werden. In den Versuchsgruppen, die drei oder sieben Tage präoperativ mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelt wurden (Gruppen V2-V4), war in der distalen Lappenhälfte ein im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhter Perfusionsindex von 30-35% der normal perfundierten Bauchhaut als Referenz zu messen. Der Perfusionsindex nach intraoperativer Applikation hingegen blieb unter dem Schwellenwert von 25%. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass bei einem Index von <25% die Nekrose des Lappenanteils mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% eintritt.<sup>58</sup> Dieser Schwellenwert bestätigte sich auch in klinischen Untersuchungen.<sup>77</sup> Bei einer angenommen maximalen Tolerierung der durch die Hebung des überdimensionierten Lappens erzeugten Ischämie von 8-13 Stunden<sup>91</sup> konnte in diesem Versuchsaufbau die in diesem Zeitraum durch den Gentransfer induzierte Expression von VEGF noch keinen vasorelaxierenden Effekt erzeugen, der die Ergebnisse am Versuchsende beeinflussen konnte. Ein angiogenetischer Effekt in diesem kurzen Zeitraum war ohnehin nicht zu erwarten.<sup>96</sup>

Die Präformierung der Lappenplastiken 7 Tage präoperativ hingegen resultierte in einer echten Gefäßneubildung, die in der immunhistochemischen Aufarbeitung mit dem Antikörper gegen CD31 und der Gefäßdichtebestimmung mit der Chalkley-Methode nachzuweisen war.

#### 4.4 Das Phänomen der „leaky vessels“

Blutbestandteile können das Gefäßsystem auf zumindest 5 verschiedenen Wegen verlassen:<sup>87</sup> durch Diffusion durch Endothelzellen hindurch, durch Diffusion entlang der endothelialen Membranen, durch vesikulären Transport, durch Endothel-Fenestrationsen und durch Interzellularspalten hindurch. Studien konnten zeigen, dass VEGF in vivo die letzten drei dieser fünf genannten Mechanismen fördert oder induziert.<sup>38, 74, 87, 130, 163</sup> Die durch VEGF induzierte Hyperpermeabilität der Gefäße wird als Voraussetzung für die Angiogenese durch Gefäßsprossung betrachtet.<sup>38</sup> Es findet eine Extravasation von Plasmaproteinen statt, die zunächst eine provisorische Matrix bilden. Durch Interaktionen von Integrinen und der Matrix kommt es zur Migration von Endothelzellen und deren Proliferation, die durch VEGF und andere Mitogene vermittelt wird.<sup>86</sup>

In verschiedenen Studien, in denen eine Angiogenese ausschließlich durch den Faktor VEGF induziert wurde, konnte die Entstehung unreifer und hyperpermeabler Gefäße, sogenannter „leaky vessels“ nachgewiesen werden. So zeigten transgene, VEGF überexprimierende Mäuse hyperpermeable Hautgefäße und Zeichen einer erhöhten Adhäsion von Leukozyten an den Gefäßwänden.<sup>33</sup>

Mit dem Farbstoff Fluoreszein konnte an mesenterialen Mikrogefäßen von Fröschen eine schnell einsetzende und transiente Permeabilitätserhöhung nachgewiesen werden.<sup>54</sup>

Auch konnten bei Patienten, die bei Ischämie der unteren Extremität mit VEGF therapiert wurden, transiente Ödeme beobachtet werden, die mit einer Hyperpermeabilität der Gefäße in Verbindung gebracht wurden.<sup>9</sup>

Neugebildete Gefäße können entweder ausreifen, oder sich bei Wegfall der angiogenen und Ausbleiben entsprechender arteriogener Stimuli wieder zurückbilden. Die Hyperpermeabilität der neugebildeten Gefäße ist bei deren Reifung regredient.<sup>87</sup> Die Ausreifung von Gefäßen, die Arteriogenese, erfolgt durch ein kompliziertes Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren, das noch nicht völlig entschlüsselt ist. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen der Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und der B-PDGF Rezeptor,<sup>3, 23, 35, 86, 204</sup> Angiopoetin 1 (Ang-1) und der Tie-2 Rezeptor<sup>87, 177, 184, 192</sup> und der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).<sup>24, 86, 138, 168, 195</sup>

In transgenen Mäusen, die sowohl VEGF als auch Ang-1 überexprimierten, wurde eine erhöhte Zahl von Gefäßen mit vergrößertem Durchmesser gefunden, die jedoch im Vergleich zur Überexpression von VEGF allein keine Hyperpermeabilität zeigten.<sup>192</sup> Auch die experimentelle Kombination von VEGF und PDGF brachte Gefäße hervor, die sich im Gegensatz zu den ausschließlich durch VEGF erzeugten, reifer darstellten.<sup>162</sup>

Ein dauerhaftes Gefäßnetz bedingt also die Ausreifung von unreifen Gefäßen. Die Ischämie eines Hautlappens, wie in der vorliegenden Arbeit experimentell erzeugt, ist jedoch ein akutes Ereignis, bei dem ein kurzfristiger und zeitlich begrenzter, protektiv wirkender Anstoß der angiogenetischen Kaskade wünschenswert erscheint. Die Schaffung von präformierten dauerhaften Gefäßen ist bei dieser Problemstellung nicht erstrebenswert. Vielmehr sollte eine „bedarfsgerechte“ Ausreifung der primär unreifen Gefäße das Ziel sein. So wirken metabolische und mechanische Veränderungen der Mikroumgebung wie etwa Hypoxie, ein abnormaler hydrostatischer Druck oder Scherkräfte ebenfalls modellierend auf die Reifung von Gefäßen.<sup>86</sup> Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass in der vorliegenden Arbeit die aus der Überdimensionierung der Hautlappen resultierende Gewebshypoxie und die Umschneidung der Lappenplastik selbst adäquate Reize für eine physiologische Reifung der neugebildeten Gefäße darstellen konnten.

#### **4.5 AdVEGF<sub>165</sub> Gentherapie – eine Art „Delay“?**

Die Veränderung der Perfusion von Lappenplastiken durch partielle Präparation des Lappens und zweizeitiger Transposition mit dem erhofften Resultat der Induktion von Angiogenese durch die Erzeugung einer „subletalen Ischämie“<sup>111</sup> ist in der plastischen Chirurgie ein etabliertes Verfahren und wird mit dem Begriff „Vascular Delay“ beschrieben.<sup>7, 29, 84, 104, 203</sup> Durch die präoperative Reduzierung der Lappenperfusion durch Umschneiden oder Heben eines Anteils des Lappens soll ein Ischämieereiz gesetzt werden, ohne jedoch den Lappen dauerhaft zu schädigen. Nach einigen Tagen erwartet man eine verbesserte Perfusion des Lappens und damit eine verbesserte Überlebensrate nach Transposition in den Defekt. Es wird vermutet, dass dieser Effekt eher auf einer Dilatation der bestehenden Gefäße im

Bereich der sogenannten kleinkalibrigen „Choke Vessels“ beruht, als dass eine tatsächliche Angiogenese stattfindet.<sup>22, 34, 132, 188</sup>

Die zu Grunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen dieses Phänomens blieben bislang jedoch weitgehend unbekannt. Die Entdeckung der verschiedenen Wachstumsfaktoren, deren Bedeutung für den Prozess der Angiogenese und vor allem deren Regulation bietet eine neue Grundlage für Erklärungsversuche. Besonders die herausragende Bedeutung von VEGF und deren Regulation in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdruckes legen einen engen Zusammenhang zwischen diesem Wachstumsfaktor und dem Delay-Phänomen nahe. Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression von VEGF spielt der Sauerstoff-Partialdruck im Gewebe. Bei niedriger Sauerstoffspannung wird die Expression von VEGF mRNA induziert.<sup>36</sup> Der Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 ist dabei ein wichtiger Mediator der hypoxischen Antwort.<sup>173</sup>

Lineweaver und Mitarb.<sup>111</sup> untersuchten an einem Modell der TRAM – Lappenplastik (transverse Rectus abdominis Myokutanlappenplastik) an der Ratte den Effekt des Delay-Phänomens auf verschiedene Wachstumsfaktoren und deren zeitlichen Verlauf in den 4 Zonen dieser Lappenplastik. Sie konnten dabei für VEGF und bFGF eine signifikante Erhöhung der Gewebeskonzentration zeigen. Durch Delay konnte in dieser Studie eine Erhöhung der überlebenden Fläche gezeigt werden. Eine direkte Messung der Lappenperfusion erfolgte jedoch nicht. Es wurde die Hypothese aufgestellt, durch die Therapie mit VEGF eine Art nicht invasives Delay simulieren zu können.

Eigene Untersuchungen an überdimensionierten Hautlappenplastiken an der Ratte konnten nach Delay eine gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte VEGF-Konzentration in der Haut zeigen und einen engen Zusammenhang zwischen diesem Wachstumsfaktor und dem Delay-Phänomen nahe legen.<sup>78</sup> Die Ergebnisse dieser Studie sprachen gegen eine reine Gefäßdilataion als Grundlage für den Erfolg des Delay.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Effektivität einer Angiogenese Gentherapie mit VEGF<sub>165</sub> diesem etablierten Verfahren bezüglich Verbesserung der Perfusion und Vergrößerung der überlebenden Lappenfläche gegenübergestellt werden.

Die Bestimmung des Perfusionsindex in der distalen Lappenhälfte zeigte in der Delay-Versuchsgruppe (D1) gegenüber den Kontrollen (K1) eine Erhöhung, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. Der Perfusionsindex in der

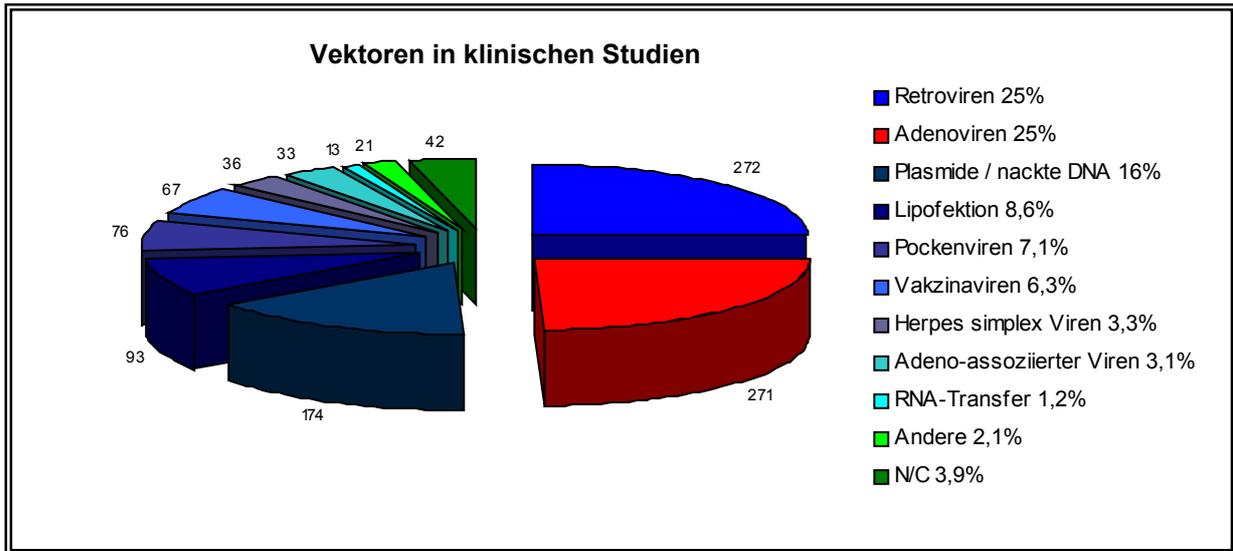
Versuchsgruppe V3 ( $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) war jedoch gegenüber Kontrollen und Delay signifikant erhöht. Auch die Auswertung der überlebenden Lappenfläche 7 Tage postoperativ zeigte in der Vascular Delay Versuchsgruppe (D1) keine signifikante Vergrößerung der überlebenden Fläche. Die Versuchsgruppe V3 ( $5 \times 10^8$  pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> 7 Tage präoperativ) wies jedoch eine signifikante Vergrößerung der überlebenden Fläche sowohl gegenüber K1 als auch gegenüber D1 auf.

Damit war in diesem Versuchsaufbau die VEGF-Gentherapie das überlegene Verfahren. Die überlebende Lappenfläche konnte um etwa 50% auf ein mögliches Länge-zu-Breite-Verhältnis von 3:1 gesteigert werden.

#### **4.6 Der klinische Einsatz von Adenoviren**

In dieser Studie wurde in den Versuchsgruppen ein replikationsdefizientes Adenovirus vom Serotyp 5 mit der cDNA der humanen VEGF-Isoform 165 als Reporter gen und einem konstitutiven Zytomegalievirus (CMV)-immediate-early Promotor verwendet.<sup>118, 135</sup> Die Replikationsdefizienz durch E1A Deletion wurde auch nach Vermehrung des Vektors in HEK 293 Zellen sichergestellt.

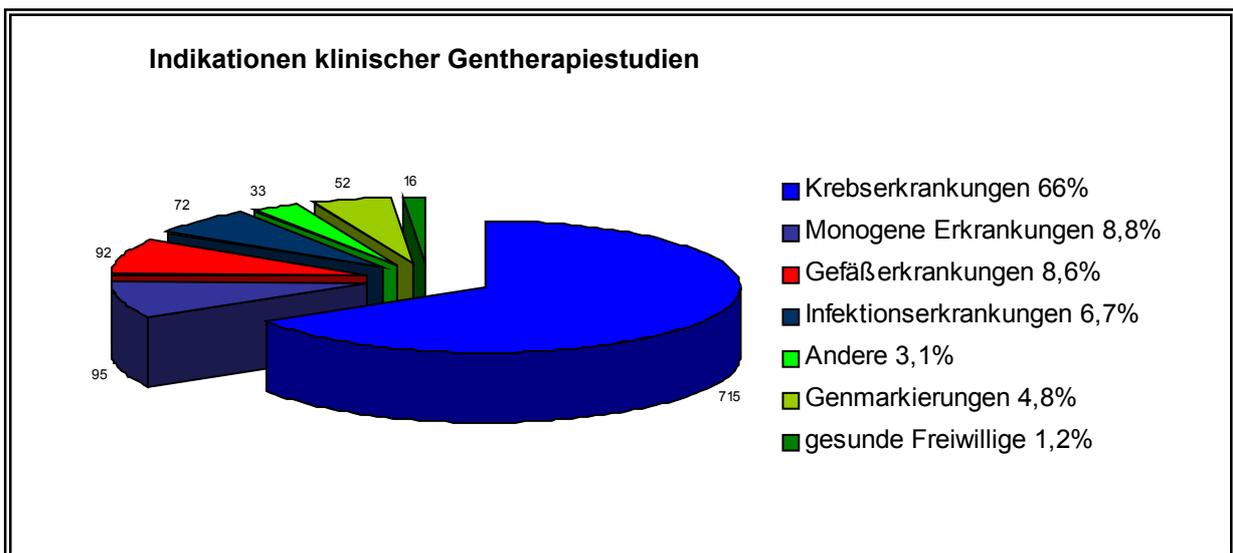
Die Verwendung viraler Genvektoren stellt heute immer noch die einfachste und effektivste Möglichkeit dar, gewünschte Gensequenzen in eukaryonte Zellen einzuschleusen.<sup>194</sup> In etwa 70% der klinischen Gentherapiestudien werden virale Vektorsysteme eingesetzt. Hierbei sind Adenoviren und Retroviren mit je 25% die meistverwendeten Vektoren.



**Abb. 42** in klinischen Gentherapiestudien verwendete Vektoren (mod. aus The Journal of Gene Medicine, Database 2005)

Im Jahr 2005 wurden 66% der klinischen Gentherapiestudien in den Vereinigten Staaten durchgeführt. Deutschland rangiert mit einem Anteil von knapp 7% hinter den USA und dem Vereinigten Königreich (11%) und vor der Schweiz (knapp 4%) auf Platz 3 im internationalen Vergleich.

Die Hauptindikation für eine Gentherapie im Rahmen klinischer Studien ist nach wie vor die Therapie von Krebserkrankungen, gefolgt von der Therapie monogener und vaskulärer Erkrankungen.



**Abb. 43** Indikationen klinischer Gentherapiestudien (mod. aus The Journal of Gene Medicine, Database 2005)

Klinische Phase I und Phase II Studien zur gentherapeutischen Angiogeneseinduktion beschränken sich momentan auf die Therapien in den Bereichen der koronaren Herzerkrankungen und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten.<sup>63, 100-102, 121, 122, 185</sup>

Da bei dieser Indikation die Genexpression in der Regel nicht über einen langen Zeitraum hinweg erforderlich ist und die transiente Expression von Wachstumsfaktoren einen therapeutischen Effekt erzielt,<sup>204</sup> erscheinen Adenoviren als Vektoren für diesen Einsatz geeignet.

Das Jahr 1999 brachte jedoch die Risiken eines adenoviralen Gentransfers wieder in das Bewusstsein einer breiteren Öffentlichkeit. Im September 1999 starb der 18-jährige Jesse Gelsinger im Rahmen einer klinischen Phase-I Studie der Universität von Pennsylvania, bei der ein E1 und E4 deletierter Adenovirus eingesetzt wurde.<sup>106,124</sup> Gelsinger litt unter einem Defekt der Ornithin-Transcarbamylase. Eine Unterfunktion dieses Enzyms führt zu einer Akkumulation von Ammoniak und diese konzentrationsabhängig zu einer Enzephalopathie. Bei dem Patienten lag nur eine milde Unterfunktion des Enzyms vor, die Studie sollte einen möglichen Einsatz der Therapie bei Neugeborenen klären, die unter einer ausgeprägteren Form der Erkrankung litten. Bei Gelsinger wurde mit  $3,8 \times 10^{13}$  Viruspartikeln die höchste Virusmenge aller Studienteilnehmer in die A. hepatica injiziert. Bereits 4 Stunden nach Injektion entwickelte Gelsinger hohes Fieber, am darauffolgenden Morgen zeigten sich Symptome eines Leberversagens und einer disseminierte intravasalen Gerinnung (DIG). Am 4. Tag starb Gelsinger an Multiorganversagen. Die Obduktion konnte eine systemische Verteilung des Vektors unter anderem in der Milz und mehreren Lymphknoten nachweisen, die eine massive Entzündungsreaktion und die disseminierte intravasale Gerinnung triggerte.<sup>1, 124</sup> Eine vorangegangene Exposition gegenüber einem Wildtyp-Adenovirus, der sein Immunsystem sensitivierte, wurde diskutiert.<sup>14</sup>

Nach einer Infektion mit einem Adenovirus erfolgt eine rasche Immunantwort. Zuerst wird die Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beobachtet, die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-II Moleküle aktiviert Th1 und Th2 CD 4 Lymphozyten.<sup>88</sup> Die MHC-Klasse-I vermittelte Aktivierung zytotoxischer CD8 T-Lymphozyten triggert die spezifische Immunantwort.<sup>11, 94</sup> Als Konsequenz der Infektion persistieren geringe IgG Konzentrationen gegen die adenoviralen Antigene,

die bei einem erneuten Kontakt mit entsprechenden Viruspartikeln die Immunantwort deutlich verstärken.<sup>89</sup>

Studien zur Untersuchung der Korrelation zwischen Vektordosis und Zellschädigung legen nahe, dass bei Applikation von Adenoviren ein Schwellenwert existiert.

Unterhalb dieses Wertes werden keine oder nur leichte Symptome beobachtet, bei einer geringen Dosissteigerung über diesen Wert hinweg tritt jedoch eine schwere Zellschädigung auf.<sup>131, 189</sup> Der tragische Tod von Jesse Gelsinger und die Tatsache, dass eine nur unwesentlich geringere Virusmenge einer anderen Teilnehmerin dieser Studie appliziert wurde, ohne dass schwere Infektionszeichen auftraten, verdeutlichen eine individuelle unterschiedliche Reaktion auf den Vektor und einen interindividuell inkonsistenten möglichen Schwellenwert.

Adenoviren sind die immunogensten viralen Vektoren,<sup>190</sup> die Entstehung von Malignomen konnte nach ihrer Applikation jedoch nicht beobachtet werden.<sup>204</sup> Bei der Verwendung von retroviralen Vektoren ist diese Gefahr jedoch gegeben. Nach Expansion und Transplantation eines Klons von retroviral transduzierten Knochenmarkstammzellen an Mäusen wurden Fälle von Leukämie beobachtet.<sup>110</sup> Hierbei scheint die Integration des Transgens in das Wirtsgenom entscheidend gewesen zu sein. Sie erfolgte in diesem Fall in das Gen eines Transkriptionsfaktors, der im Zusammenhang mit der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie steht.<sup>8</sup> Eine maligne Entartung nach Transfer von ex vivo retroviral transduzierten Stammzellen trat auch in der SCID-X1 Studie auf.<sup>26</sup> Nach erfolgreicher Behandlung der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID) traten bei 2 von 11 Patienten leukämieähnliche Entartungen auf. Ausgelöst wurden diese wohl durch die Integration des retroviralen Vektors in oder in die Nähe der Sequenz des Onkogens LMO2.<sup>66, 67</sup> Eine weitere Studie bestätigte Befürchtungen, die Integration des retroviralen Genoms geschehe nicht so zufällig wie angenommen. Die Untersuchung der Integrationsstellen des HI-Virus in der Zellkultur zeigte eine Präferenz von transkriptionsaktiven Genen gegenüber nicht-kodierenden Regionen.<sup>170</sup>

Vor diesem Hintergrund ist die fehlende Integration des adenoviralen Genoms als Vorteil zu sehen. Auch die transiente Genexpression ist bei der in der vorliegenden Arbeit formulierten Fragestellung positiv zu bewerten. Ein dauerhafter Angiogenesereiz durch persistierende Überexpression des Wachstumsfaktors VEGF ist nicht wünschenswert. Ein gezielter Anstoß der angiogenetischen Kaskade und ein zum Ischämiezeitpunkt optimiertes Gefäßsystem sprechen, als Zielvorgaben

formuliert, für die Verwendung des für VEGF kodierenden Adenovirus als Vektor. Obwohl in den meisten klinischen Studien mit adenoviralen Vektoren nur milde Allgemeinsymptome nach Applikation auftraten,<sup>37, 190, 191, 204</sup> so bleibt die Immunantwort des Organismus noch immer die „Achilles' Ferse“. Die Pharmakokinetik der viralen Vektorsysteme ist nicht geklärt<sup>156</sup> und eine bessere medikamentöse Kontrolle möglicher Reaktionen auf einen viralen Vektor bleibt wünschenswert.<sup>194</sup> Durch die Entwicklung sogenannter „gutless“ (oder: „helper-dependent“) Adenoviren, denen sämtliche virale Gene fehlen, konnte eine geringere Toxizität des Vektorsystems und eine längere Verweildauer des Transgens erreicht werden.<sup>20, 95</sup> Die Herstellung mit Hilfsviren ist jedoch aufwändig, und die initiale Immunantwort auf die antigenen Proteine des viralen Kapsids nach Injektion ist nach wie vor zu fürchten.

#### **4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Plastische Chirurgie bietet ein breites Anwendungsgebiet für eine therapeutische Induktion der angiogenetischen Kaskade. Bei der Rekonstruktion mit körpereigenem Gewebe besitzt die Anatomie der Blutversorgung verschiedener Körperregionen und unterschiedlicher Gewebetypen eine herausragende Bedeutung, und eine genaue Kenntnis der Gewebedurchblutung ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Defektdeckung. Die Größe von Lappenplastiken wird nicht zuletzt durch die Grenzen der Blutversorgung bestimmt und ihre Verfügbarkeit durch die Anatomie des Gefäßsystems limitiert. Die Entwicklung der Perforans-Lappenplastiken war die letzte bedeutende Entwicklung im Bereich der Lappenplastiken, die Einzug in die Klinik gehalten hat; derzeit scheinen aus anatomischer Sicht die Grenzen erreicht.<sup>57</sup> Die Entdeckung der verschiedenen Wachstumsfaktoren und die Entschlüsselung ihrer Bedeutung im Prozess der Angiogenese besitzt jedoch ein großes Potential, zukünftig - nicht zuletzt unter Verwendung gentherapeutischer Methoden - diese Grenzen der Anatomie zu durchbrechen.<sup>166</sup> Durch die Schaffung eines optimierten Gefäßsystems könnten neue Grundlagen für die Planung von Lappenplastiken geschaffen werden.

Vor diesem Hintergrund bestätigt die vorliegende Arbeit das Potential einer Angiogenese-Gentherapie mit dem Faktor VEGF<sub>165</sub> unter experimentellen

Bedingungen. Durch die VEGF-Gentherapie konnte in den verwendeten Hautlappenplastiken vom random-pattern Typ nicht nur die Durchblutung der überdimensionierten Lappenplastiken signifikant gesteigert, sondern auch die überlebende Fläche von 50% auf 75% vergrößert werden. Die gentherapeutische Präkonditionierung der Hautlappen war in dieser Studie im Vergleich mit dem etablierten Delay-Verfahren überlegen.

Die klinische Bedeutung dieser Erkenntnis liegt nicht zuletzt in einer erweiterten Indikationsstellung für diese chirurgisch einfach durchzuführende und gut verfügbare Methode der Defektdeckung. Aufwändigere, kostenintensivere und für den Patienten belastendere Verfahren wie etwa der freie Gewebetransfer könnten so in vielen Fällen vermieden werden. Ebenso scheint es vertretbar, die grundlegenden Erkenntnisse dieser Studie zur Kinetik von Vektor und Protein und zur Steigerung der Durchblutung und Induktion von Angiogenese in Folge der Behandlung auch auf andere Lappenmodelle übertragen zu können.

Bei einer akut postoperativ auftretenden Ischämie ist die notfallmäßige Anwendung des hier verwendeten Verfahrens, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, nicht erfolgsversprechend. In der Plastischen Chirurgie werden viele Lappenplastiken jedoch elektiv durchgeführt, und eine Präkonditionierung durch Injektion sieben Tage vor Operation erscheint im klinischen Alltag praktikabel.

Ein klinischer Einsatz von AdVEGF im Bereich der Plastischen Chirurgie ist bis dato jedoch nicht erprobt. Einer routinemäßigen Verwendung des Verfahrens steht primär das eingesetzte Vektorsystem entgegen. Die Entwicklung sicherer und nicht-toxischer Vektoren ist Gegenstand aktueller Forschung und bleibt abzuwarten. Bei einer therapeutischen Angiogenese muss grundsätzlich berücksichtigt werden, dass in der Onkologie genau entgegengesetzte Therapiestrategien verfolgt werden und dort eine Blockade der angiogenetischen Kaskade angestrebt wird. So wird eine zukunftsfähige Angiogeneseforschung auch die Steuerbarkeit der induzierten Prozesse im Auge behalten müssen, um die Chance auf einen klinischen Einsatz wahren zu können.<sup>117</sup> Eine ungezielte und zeitlich unbegrenzte Stimulation ist unbedingt zu vermeiden. Die nach Expression von VEGF im Gewebe ablaufenden Prozesse müssen im Detail genauer geklärt und eine mögliche systemische Wirkung in weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden, bevor eine klinische Studie mit strenger Indikationsstellung in Erwägung gezogen werden kann.

## 5. Zusammenfassung

Der Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) hat eine Schlüsselstellung im Prozess der Angiogenese inne und besitzt bedeutsame angiogenetische, mitogene, permeabilitätssteigernde und vasodilatative Eigenschaften. Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchung von Kinetik und Wirkmechanismus dieses Wachstumsfaktors bei adenoviraler Transduktion und die Analyse der Auswirkung auf die Durchblutung und die Überlebensrate einer überdimensionierten Hautlappenplastik an der Ratte.

In der Zellkultur wurde der zeitliche Verlauf der VEGF-Produktion nach Applikation von AdVEGF<sub>165</sub> untersucht. Im Tiermodell an der Ratte (n=62) wurde die VEGF-Konzentration in Haut und Muskulatur nach subdermaler Injektion des Vektors gemessen. Eine Gefäßneubildung wurde durch immunhistochemische Aufarbeitung und Bestimmung der Mikrogefäßdichte untersucht. Die Analyse des Effekts von AdVEGF<sub>165</sub> auf die Perfusion und eine verbesserte Überlebensrate wurde an Hand einer kranial gestielten Lappenplastik mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1 an der vorderen Bauchwand der Ratte durchgeführt. Der Vektor wurde in 2 Konzentrationen ( $5 \times 10^8$  pfU oder  $1 \times 10^9$  pfU) subdermal in 4 Aliquots in die distale Lappenhälfte injiziert. Die Injektion erfolgte entweder intraoperativ, 3 oder 7 Tage präoperativ. Die Perfusion der Lappenplastiken wurde unmittelbar postoperativ mittels Indocyaningrün-Laser-Fluoroskopie untersucht. Die überlebende Lappenfläche und das Ausmaß der Nekrose wurden am Versuchsende nach 7 Tagen gemessen.

Eine maximale Produktion von VEGF in der Zellkultur konnte 48 Stunden nach Transduktion gezeigt werden. Die Therapie mit AdVEGF<sub>165</sub> an der Ratte resultierte in einer signifikant gesteigerten VEGF-Proteinkonzentration in der Haut ( $p < 0,05$ ). In den AdVEGF<sub>165</sub>-therapierten Tieren konnte eine signifikant erhöhte Mikrogefäßdichte gemessen werden ( $p < 0,05$ ). Am Modell der überdimensionierten Lappenplastik wurde nach Gentherapie mit VEGF<sub>165</sub> sowohl 3, als auch 7 Tage vor Lappenhebung eine statistisch signifikante Reduktion der Lappennekrose und eine Vergrößerung der überlebenden Fläche am Versuchsende von durchschnittlich 50% beobachtet

(jeweils  $p < 0,05$ ). Bei der Therapie 3 oder 7 Tage präoperativ konnte ebenfalls eine statistisch signifikant erhöhte Perfusion in der distalen Hälfte der Lappenplastiken gemessen werden ( $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die zentrale Rolle von VEGF im Prozess der Angiogenese. Eine subdermale Injektion von AdVEGF<sub>165</sub> resultiert in einer lokalisierten Gefäßneubildung, und das Zeitfenster für eine erfolgreiche Therapie konnte näher bestimmt werden. Die Steigerung des Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1 auf 3:1 bei Lappenplastiken vom random-pattern Typ scheint ein realistisches Ziel zu sein, wenn eine gentherapeutische Präkonditionierung 7 Tage präoperativ durchgeführt wird. Die Bedeutung dieser Erkenntnis ist eine erweiterte Indikationsstellung für diese chirurgisch relativ einfach durchzuführende und gut verfügbare Methode der Defektdeckung.

## 6. Summary

The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a key protein in the angiogenic process having significant angiogenic, mitogenic, vasodilatative and permeability inducing effects. Goals of this study were to closer investigate the kinetics and mechanisms of this growth factor when transduced using an adenoviral vector and also to analyse the effects on perfusion and viability of an overdimensioned skin flap model in the rat.

The VEGF expression over time after application of AdVEGF<sub>165</sub> was studied in cell culture. In a rat model (n=62) the VEGF concentration in skin and muscle after subdermal injection of the vector was measured. Neovascularization was examined by immunohistological methods and microvessel count. The effect of AdVEGF<sub>165</sub> on perfusion and improved viability was investigated in a cranially based skin flap model with a length-to-width ratio of 4:1 on the rat's anterior abdominal wall. The vector was injected subdermally in two different concentrations ( $5 \times 10^8$  pfU or  $1 \times 10^9$  pfU) into the distal part of the flap in 4 aliquots. Injection was performed intraoperatively, 3 or 7 days respectively before operation. Perfusion of the flap was measured postoperatively using laser-induced fluorescence of Indocyaninegreen. Flap survival and necrosis were observed at the end of the experiment at day 7.

A maximum production of VEGF in cell culture could be demonstrated 48 hours past transduction. The AdVEGF<sub>165</sub> gene therapy led to a significantly increased VEGF concentration in the skin ( $p < 0.05$ ). In animals treated with AdVEGF<sub>165</sub> a significantly increased microvessel density could be found ( $p < 0.05$ ). In the overdimensioned skin flap model adenoviral gene transfer of VEGF<sub>165</sub> 3 and 7 days before flap harvest showed a significantly increased flap survival of 50% together with a significantly reduced necrosis ( $p < 0.05$ ). A significantly raised perfusion in the distal part of the flaps could be demonstrated when therapy was performed 3 or 7 days prior to surgery.

The results of this study confirm the key role of VEGF in the angiogenic process. A subdermal injection of AdVEGF<sub>165</sub> results in a local formation of blood vessels and the time slot of a successful therapy could further be determined. The increase of the

length-to-width ratio of random-pattern flaps from 2:1 to 3:1 seems a realistic goal when the gene-therapeutical preconditioning of the flap is performed 7 days before surgery. The impact of these findings is a wider range of indication for this simple and well available technique.

## 7. Literaturverzeichnis

1. NN. Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee: Assessment of adenoviral vector safety and toxicity. *Hum Gene Ther* 2002; 13:3-13
2. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D und Fiddes JC. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *Embo J* 1986; 5:2523-8
3. Abramsson A, Berlin O, Papayan H, Paulin D, Shani M und Betsholtz C. Analysis of mural cell recruitment to tumor vessels. *Circulation* 2002; 105:112-7
4. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J und Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998; 101:40-50
5. Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Addison PD, Moses MA, Levine RH und Pang CY. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H946-54
6. Barbeau D, Charbonneau R, Whalen SG, Bayley ST und Branton PE. Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 1994; 9:359-73
7. Barker JH, Frank J, Bidiwala SB, Stengel CK, Carroll SM, Carroll CM, van Aalst V und Anderson GL. An animal model to study microcirculatory changes associated with vascular delay. *Br J Plast Surg* 1999; 52:133-42
8. Baum C, Dullmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA und von Kalle C. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101:2099-114
9. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K und Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97:1114-23
10. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK und Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000; 86:E29-35
11. Benihoud K, Yeh P und Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:440-7
12. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W und Einspanier R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod* 2000; 63:1106-14
13. Bettan M, Ivanov MA, Mir LM, Boissiere F, Delaere P und Scherman D. Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry* 2000; 52:83-90
14. Bostanci A. Gene therapy. Blood test flags agent in death of Penn subject. *Science* 2002; 295:604-5
15. Breier G, Albrecht U, Sterrer S und Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114:521-32
16. Brigham KL, Meyrick B, Christman B, Berry LC, Jr. und King G. Expression of a prokaryotic gene in cultured lung endothelial cells after lipofection with a plasmid vector. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1:95-100

17. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR, Dvorak HF und Rosen S. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int* 1992; 42:1457-61
18. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF und van de Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176:1375-9
19. Burkholder JK, Decker J und Yang NS. Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *J Immunol Methods* 1993; 165:149-56
20. Burroughs KD, Kayda DB, Sakhujia K, Hudson Y, Jakubczak J, Bristol JA, Ennist D, Hallenbeck P, Kaleko M und Connelly S. Potentiation of oncolytic adenoviral vector efficacy with gutless vectors encoding GM-CSF or TRAIL. *Cancer Gene Ther* 2004; 11:92-102
21. Byzova TV, Goldman CK, Jankau J, Chen J, Cabrera G, Achen MG, Stacker SA, Carnevale KA, Siemionow M, Deitcher SR und DiCorleto PE. Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood* 2002; 99:4434-42
22. Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM und Minabe T. An anatomic review of the delay phenomenon: I. Experimental studies. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89:397-407
23. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P und Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003; 9:604-13
24. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-95
25. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9:653-60
26. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL und Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288:669-72
27. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943; 4:47-53
28. Chuah MK, Collen D und VandenDriessche T. Biosafety of adenoviral vectors. *Curr Gene Ther* 2003; 3:527-43
29. Coskunfirat OK, Oksar HS und Ozgentas HE. Effect of the delay phenomenon in the rat single-perforator-based abdominal skin flap model. *Ann Plast Surg* 2000; 45:42-7
30. Cui L, Li FC, Zhang Q, Qian YL und Guan WX. Effect of adenovirus-mediated gene transfection of vascular endothelial growth factor on survival of random flaps in rats. *Chin J Traumatol* 2003; 6:199-204
31. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC und Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87:1161-9
32. DePamphilis ML, Herman SA, Martinez-Salas E, Chalifour LE, Wirak DO, Cupo DY und Miranda M. Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. *Biotechniques* 1988; 6:662-80
33. Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP und Jain RK. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol* 1998; 111:1-6

34. Dhar SC und Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104:2079-91
35. Dinehart SM, Kincannon J und Geronemus R. Hemangiomas: evaluation and treatment. *Dermatol Surg* 2001; 27:475-85
36. Dor Y, Porat R und Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C1367-74
37. Dummer R, Hassel JC, Fellenberg F, Eichmuller S, Maier T, Slos P, Acres B, Bleuzen P, Bataille V, Squiban P, Burg G und Urosevic M. Adenovirus-mediated intralesional interferon-gamma gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas. *Blood* 2004; 104:1631-8
38. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M und Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-39
39. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L und Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:233-5
40. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF und Brown LF. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994; 180:341-6
41. Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L, Jessee JA, Seymour L, Szoka F, Thierry AR, Wagner E und Wu G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 1997; 8:511-2
42. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM und Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:7413-7
43. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF und Dvorak AM. Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 2004; 52:87-101
44. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77:527-43
45. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999; 56:794-814
46. Ferrara N und Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25
47. Ferrara N, Gerber HP und LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76
48. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J und Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 1991; 47:211-8
49. Flower RW. Injection technique for indocyanine green and sodium fluorescein dye angiography of the eye. *Invest Ophthalmol* 1973; 12:881-95
50. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6
51. Folkman J und Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235:442-7

52. Folkman J und Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-4
53. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC und Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177:275-83
54. Fu BM und Shen S. Structural mechanisms of acute VEGF effect on microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:H2124-35
55. Gerber HP, Condorelli F, Park J und Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272:23659-67
56. Gersting SW, Schillinger U, Lausier J, Nicklaus P, Rudolph C, Plank C, Reinhardt D und Rosenecker J. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. *J Gene Med* 2004; 6:913-22
57. Giunta RE und Gansbacher B. Angiogenese-Gentherapie - Auf der Schwelle zu einem neuen Innovationsschub für die Plastische Chirurgie? *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2005; 37:363-4
58. Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Brill T, Busch R, Gansbacher B und Biemer E. Prediction of flap necrosis with laser induced indocyanine green fluorescence in a rat model. *Br J Plast Surg* 2005; 58:695-701
59. Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Biemer E und Gansbacher B. AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps. *J Gene Med* 2005; 7:297-306
60. Glenn GM und Ricciardi RP. Detailed kinetics of adenovirus type-5 steady-state transcripts during early infection. *Virus Res* 1988; 9:73-91
61. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D und Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998; 78:1385-94
62. Graham FL, Smiley J, Russell WC und Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36:59-74
63. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK und Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; 105:1291-7
64. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B und Marme D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995; 270:25915-9
65. Gurunluoglu R, Ozer K, Skugor B, Lubiowski P, Carnevale K und Siemionow M. Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene. *Ann Plast Surg* 2002; 49:161-9
66. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M und Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348:255-6
67. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A und Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302:415-9

68. Hadaczek P, Mirek H, Berger MS und Bankiewicz K. Limited efficacy of gene transfer in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for brain tumors. *J Neurosurg* 2005; 102:328-35
69. Hansen J, Qing K und Srivastava A. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* 2001; 75:4080-90
70. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendriks J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D und Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; 8:841-9
71. Hayward PG, Alison WE, Jr., Carp SS, Hui PS und Robson MC. Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate the delay phenomenon. *Br J Plast Surg* 1991; 44:526-9
72. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Narvanen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M und Yla-Herttuala S. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003; 107:2677-83
73. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM und Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2:289-300
74. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP und Jain RK. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4607-12
75. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD und Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284:1994-8
76. Holash J, Wiegand SJ und Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18:5356-62
77. Holzbach T, Taskov C, Henke J, Busch R, Gansbacher B, Biemer E und Giunta RE. Evaluation der Perfusion von Lappenplastiken mittels Laserfluoreszenz von Indocyaningrün. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2005; 37:396-402
78. Holzbach T, Taskov C, Neshkova I, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Gansbacher B, Biemer E und Giunta RE. Angiogenese-Gentherapie mit AdVEGF165 - Eine Art "Delay" für Lappenplastiken? *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2005; 37:365-74
79. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B und Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1806-14
80. Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U und Rosenecker J. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 2004; 6:923-36
81. Iijima K, Yoshikawa N, Connolly DT und Nakamura H. Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. *Kidney Int* 1993; 44:959-66
82. Iijima T, Aoyagi T, Iwao Y, Masuda J, Fuse M, Kobayashi N und Sankawa H. Cardiac output and circulating blood volume analysis by pulse dye-densitometry. *J Clin Monit* 1997; 13:81-9

83. Im MJ, Kim YS, Edwards RJ, Hoopes JE und Fenselau A. The effect of bovine basic fibroblast growth factor on skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg* 1992; 28:242-5
84. Islamoglu K, Tetik G und Ozgentas HE. Effect of the delay phenomenon on survival of rat island skin flaps with total venous occlusion. *J Reconstr Microsurg* 2003; 19:473-6
85. Isner JM und Takayuki A. Therapeutic angiogenesis. *Front Biosci* 1998; 3:e49-69
86. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9:685-93
87. Jain RK und Munn LL. Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* 2000; 6:131-2
88. Jozkowicz A und Dulak J. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochim Pol* 2005; 52:589-99
89. Kafri T, Morgan D, Krahl T, Sarvetnick N, Sherman L und Verma I. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11377-82
90. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T und Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999; 126:4895-902
91. Kerrigan CL und Daniel RK. Critical ischemia time and the failing skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1982; 69:986-9
92. Kircheis R, Schuller S, Brunner S, Ogris M, Heider KH, Zauner W und Wagner E. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med* 1999; 1:111-20
93. Kircheis R, Wightman L, Schreiber A, Robitza B, Rossler V, Kursa M und Wagner E. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther* 2001; 8:28-40
94. Kovedi I, Brough DE, Bruder JT und Wickham TJ. Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8:583-9
95. Kreppel F und Kochanek S. Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *J Virol* 2004; 78:9-22
96. Krum JM, Mani N und Rosenstein JM. Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* 2002; 110:589-604
97. Kryger Z, Dogan T, Zhang F, Komorowska-Timek E, Shi DY, Cheng C, Lineaweaver WC und Buncke HJ. Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat. *Ann Plast Surg* 1999; 43:172-8
98. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC und Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg* 2000; 53:234-9
99. Ku DD, Zaleski JK, Liu S und Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol* 1993; 265:H586-92
100. Kutryk MJ, Foley DP, van den Brand M, Hamburger JN, van der Giessen WJ, deFeyter PJ, Bruining N, Sabate M und Serruys PW. Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:281-7

101. Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, Eranen J, Kiviniemi M, Narvanen O, Makinen K, Manninen H, Syvanne M, Martin JF, Laakso M und Yla-Herttuala S. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther* 2000; 11:263-70
102. Laitinen M, Makinen K, Manninen H, Matsi P, Kossila M, Agrawal RS, Pakkanen T, Luoma JS, Viita H, Hartikainen J, Alhava E, Laakso M und Yla-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum Gene Ther* 1998; 9:1481-6
103. Laitinen M, Pakkanen T, Donetti E, Baetta R, Luoma J, Lehtolainen P, Viita H, Agrawal R, Miyanochara A, Friedmann T, Risau W, Martin JF, Soma M und Yla-Herttuala S. Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar: comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retroviruses, pseudotyped retroviruses, and adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1997; 8:1645-50
104. Lambert DM und Rigano WC. Delaying the skin for TRAM flaps. *Curr Surg* 2000; 57:480-483
105. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM und Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34:383-94
106. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999; 401:517-8
107. Li B, Ogasawara AK, Yang R, Wei W, He GW, Zioncheck TF, Bunting S, de Vos AM und Jin H. KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension* 2002; 39:1095-100
108. Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE, Abdalla S, Renehan A, O'Dwyer ST, Haboubi N und Kumar S. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 88:1424-31
109. Li QF, Reis ED, Zhang WX, Silver L, Fallon JT und Weinberg H. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. *J Reconstr Microsurg* 2000; 16:45-9
110. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlcke K, Eckert HG, Fehse B und Baum C. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002; 296:497
111. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D und Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg* 2004; 239:866-73
112. Liu MH, Jin H, Floten HS, Ren Z, Yim AP und He GW. Vascular endothelial growth factor-mediated, endothelium-dependent relaxation in human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg* 2002; 73:819-24
113. Liu PY, Tong W, Liu K, Han SH, Wang XT, Badiavas E, Rieger-Christ K und Summerhayes I. Liposome-mediated transfer of vascular endothelial growth factor cDNA augments survival of random-pattern skin flaps in the rat. *Wound Repair Regen* 2004; 12:80-5
114. Lopata MA, Cleveland DW und Sollner-Webb B. High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res* 1984; 12:5707-17

115. Lopez JJ, Laham RJ, Carrozza JP, Tofukuji M, Sellke FW, Bunting S und Simons M. Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am J Physiol* 1997; 273:H1317-23
116. Lubiatuski P, Goldman C, Gurunluoglu R, Carnevale K und Siemionow M. Enhancement of epigastric skin flap survival by adenovirus-mediated VEGF gene therapy. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109:1986-93
117. Machens HG und Mailander P. Mechanisms and Therapeutic Strategies for the Induction of Angiogenesis in Plastic Surgery. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2005; 37:383-95
118. Maeda H, Danel C und Crystal RG. Adenovirus-mediated transfer of human lipase complementary DNA to the gallbladder. *Gastroenterology* 1994; 106:1638-44
119. Magovern CJ, Mack CA, Zhang J, Rosengart TK, Isom OW und Crystal RG. Regional angiogenesis induced in nonischemic tissue by an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor. *Hum Gene Ther* 1997; 8:215-27
120. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN und Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277:55-60
121. Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E und Yla-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002; 6:127-33
122. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G und Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* 1999; 354:1493-8
123. Marcus R, Peritz E und Gabriel KR. On closed Testing Procedures with Special Reference to Ordered Analysis of Variance. *Biometrika* 1976; 63:655-60
124. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 1999; 286:2244-5
125. Maru Y, Yamaguchi S und Shibuya M. Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene* 1998; 16:2585-95
126. McGregor IA und Morgan G. Axial and random pattern flaps. *Br J Plast Surg* 1973; 26:202-13
127. Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC und Shows TB. The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 138:644-51
128. Milton SH. Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio. *Br J Surg* 1970; 57:502-8
129. Monacci WT, Merrill MJ und Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993; 264:C995-1002
130. Monsky WL, Fukumura D, Gohongi T, Ancukiewicz M, Weich HA, Torchilin VP, Yuan F und Jain RK. Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 1999; 59:4129-35
131. Morral N, O'Neal WK, Rice K, Leland MM, Piedra PA, Aguilar-Cordova E, Carey KD, Beaudet AL und Langston C. Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum Gene Ther* 2002; 13:143-54

132. Morris SF und Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective? An experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1995; 95:526-33
133. Morrison HG, Bauer SP, Lange JV, Esposito JJ, McCormick JB und Auperin DD. Protection of guinea pigs from Lassa fever by vaccinia virus recombinants expressing the nucleoprotein or the envelope glycoproteins of Lassa virus. *Virology* 1989; 171:179-88
134. Muckle TJ. Plasma proteins binding of indocyanine green. *Biochem Med* 1976; 15:17-21
135. Muhlhauser J, Merrill MJ, Pili R, Maeda H, Bacic M, Bewig B, Passaniti A, Edwards NA, Crystal RG und Capogrossi MC. VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res* 1995; 77:1077-86
136. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1:263-73
137. Mymryk JS und Bayley ST. Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5. *Virus Res* 1994; 33:89-97
138. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang ZY, San H, Shu HB, Liptay S, Gold L, Gordon D, Derynck R und et al. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:10759-63
139. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschield CC, Maciag T und Nabel GJ. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362:844-6
140. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S und Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999; 13:9-22
141. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O und Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:13-9
142. Neumeister MW, Song YH, Mowlavi A, Suchy H und Mathur A. Effects of liposome-mediated gene transfer of VEGF in ischemic rat gracilis muscle. *Microsurgery* 2001; 21:58-62
143. Nevins JR. Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 1981; 26:213-20
144. Nicolau C, Le Pape A, Soriano P, Fargette F, Muh JP und Juhel MF. In vivo transfer and expression of the liposome encapsulated rat insulin gene. *Prog Clin Biol Res* 1982; 102 pt A:321-30
145. Norton A, Peplinski GR und Tsung K. Expression of secreted platelet-derived growth factor-B by recombinant nonreplicating and noncytopathic vaccinia virus. *Ann Surg* 1996; 224:555-60; discussion 560-2
146. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T und Kerbel RS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3609-14
147. Okochi O, Kaneko T, Sugimoto H, Inoue S, Takeda S und Nakao A. ICG pulse spectrophotometry for perioperative liver function in hepatectomy. *J Surg Res* 2002; 103:109-13
148. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U und Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:528-35

149. Oshima Y, Deering T, Oshima S, Nambu H, Reddy PS, Kaleko M, Connelly S, Hackett SF und Campochiaro PA. Angiopoietin-2 enhances retinal vessel sensitivity to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol* 2004; 199:412-7
150. O'Toole G, MacKenzie D, Lindeman R, Buckley MF, Marucci D, McCarthy N und Poole M. Vascular endothelial growth factor gene therapy in ischaemic rat skin flaps. *Br J Plast Surg* 2002; 55:55-8
151. Padubidri A und Browne E, Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg* 1996; 37:604-11
152. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA und Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269:25646-54
153. Park JE, Keller GA und Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4:1317-26
154. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O und Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:6271-4
155. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W und Clauss M. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003; 92:378-85
156. Pislaru S, Janssens SP, Gersh BJ und Simari RD. Defining gene transfer before expecting gene therapy: putting the horse before the cart. *Circulation* 2002; 106:631-6
157. Plank C, Scherer F, Schillinger U, Bergemann C und Anton M. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J Liposome Res* 2003; 13:29-32
158. Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F, Anton M, Lausier J und Rosenecker J. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 2003; 384:737-47
159. Pu LL, Ahmed S, Thomson JG, Reid MA, Madsen JA und Restifo RJ. Endothelial cell growth factor enhances musculocutaneous flap survival through the process of neovascularization. *Ann Plast Surg* 1999; 42:306-12
160. Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS und Annex BH. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108:1933-8
161. Rasmussen HS, Rasmussen CS und Macko J. VEGF gene therapy for coronary artery disease and peripheral vascular disease. *Cardiovasc Radiat Med* 2002; 3:114-7
162. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB und Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001; 19:1029-34
163. Roberts WG und Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108 ( Pt 6):2369-79

164. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devoreux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW und Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100:468-74
165. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH und Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84:570-3
166. Saaristo A, Suominen E und Yla-Herttuala S. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth in plastic surgery. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2005; 37:375-82
167. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W und Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376:70-4
168. Schaper W und Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1143-51
169. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B und Plank C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2002; 9:102-9
170. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR und Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002; 110:521-9
171. Seify H, Bulky U und Jones G. Effect of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis on TRAM flap harvesting after abdominoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111:1212-6
172. Sellke FW, Wang SY, Stamler A, Lopez JJ, Li J und Simons M. Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium. *Am J Physiol* 1996; 271:H713-20
173. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:993-8
174. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS und Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219:983-5
175. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML und Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376:62-6
176. Shen BQ, Lee DY und Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274:33057-63
177. Shim WS, Teh M, Bapna A, Kim I, Koh GY, Mack PO und Ge R. Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel plasticity of human cervical cancer in mice. *Exp Cell Res* 2002; 279:299-309
178. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H und Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993; 91:2235-43

179. Silverman WF, Krum JM, Mani N und Rosenstein JM. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience* 1999; 90:1529-41
180. Soker S, Fidler H, Neufeld G und Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1996; 271:5761-7
181. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G und Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92:735-45
182. Sondell M, Lundborg G und Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999; 19:5731-40
183. Storkebaum E, Lambrechts D und Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 2004; 26:943-54
184. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN und Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87:1171-80
185. Sylvén C, Sarkar N, Ruck A, Drvota V, Hassan SY, Lind B, Nygren A, Kallner Q, Blomberg P, van der Linden J, Lindblom D, Brodin LA und Islam KB. Myocardial Doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A165 plasmid in patients with inoperable angina pectoris. *Coron Artery Dis* 2001; 12:239-43
186. Taipale J, Makinen T, Arighi E, Kukk E, Karkkainen M und Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:85-96
187. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, Senderoff D, Nhat PD, Phelps R, Urken ML, Silver L und Weinberg H. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102:2033-9
188. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM und Zelt RG. An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89:408-16; discussion 417-8
189. Thomas CE, Birkett D, Anozie I, Castro MG und Lowenstein PR. Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther* 2001; 3:36-46
190. Thomas CE, Ehrhardt A und Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4:346-58
191. Thorne SH, Brooks G, Lee YL, Au T, Eng LF und Reid T. Effects of febrile temperature on adenoviral infection and replication: implications for viral therapy of cancer. *J Virol* 2005; 79:581-91
192. Thurston G. Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat* 2002; 200:575-80
193. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC und Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266:11947-54
194. Tomanin R und Scarpa M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Curr Gene Ther* 2004; 4:357-72
195. Van Royen N, Piek JJ, Schaper W, Bode C und Buschmann I. Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. *J Nucl Cardiol* 2001; 8:687-93

196. VandenDriessche T, Collen D und Chuah MK. Biosafety of onco-retroviral vectors. *Curr Gene Ther* 2003; 3:501-15
197. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M und Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269:26988-95
198. Wang F, Zhao M, Huang B, Liu Z, Xiong B, Cheng T und Huo M. [Subcutaneous injection of plasmid VEGF gene: a method of gene therapy to enhance the viability of random skin flap]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2002; 18:157-9
199. Wilhelm K, Putz R, Hierner R und Giunta RE. Gestielte Hautlappenplastiken. In: *Lappenplastiken in der Handchirurgie*: Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1997; 124-125
200. Witzensbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS und Isner JM. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998; 153:381-94
201. Wold WS und Gooding LR. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 1991; 184:1-8
202. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ und Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-8
203. Yang D und Morris SF. Comparison of two different delay procedures in a rat skin flap model. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102:1591-7
204. Ylä-Herttua SM und Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nature Med* 2003; 9:694-701
205. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, Buncke HJ und Lineaweaver WC. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg*. 2001; 46:314-319
206. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, Angel MF und Lineaweaver WC. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg* 2003; 56:653-9
207. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA und Liu D. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 2004; 11:675-82

## 8. Anhang

### 8.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

- Agarose (Fa. PEQ Lab Biotechnologie, Erlangen)
- Antikörper gegen CD31 (MCA 1334G mouse anti rat, Serotec Ltd, Kidlington, UK)
- Borsäure (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Cäsiumchlorid, CsCl (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Calciumchlorid, CaCl<sub>2</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- Complete<sup>TM</sup>-Mini tablet (Fa. Boehringer, Mannheim)
- DMSO (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- EDTA (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Ethanol, absolut (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Fa. Boeringer, Mannheim)
- FKS (Fa. Biochrom, Berlin)
- Formaldehyd (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Glutaraldehyd (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Glycerin (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Hepes (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Kristallviolett (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- L-Arginin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- L-Glutamin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Ladder 1kb (Fa. PEQ Lab Biotechnologie, Frankfurt)
- Magnesiumchlorid, MgCl<sub>2</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- NAP-1-Säule (Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Natriumchlorid, NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumcitrat, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Nucleotidtriphosphat, dCPT (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Polyethylenglycol (Fa. Serva, Heidelberg)
- Primer E1A, E2A (Fa. MWG Biotech, Ebersberg)
- Restriktionsendonukleasen (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Salzsäure, HCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Sephadex G25 Medium (Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg)

- Tris (Fa. Merck, Darmstadt)
- Trypsin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Tryptanblau (Fa. Merck, Darmstadt)

#### Lösungen und Puffer:

- Antibiotika-Stockmedium:  
90% DMEM  
10% FKS  
Penicillin 100 IU/ml  
Streptomycin 100µg/ml  
Glutamin 4mmol/l
- Cäsiumchlorid-Lösung:  
1,33 M CsCl  
1,45 M CsCl  
5mM HEPES, pH 7,8
- Ethidiumbromid-Lösung :  
Ethidiumbromid 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest.
- IEC-6 Kulturmedium :  
45% DMEM  
45% RPMI  
10% FKS  
Insulin 0,1 IU/ml
- Optimem-Medium:  
2,5% FBS  
200 mM Glutamin, Penicillin, Streptomycin je 5ml  
0,4 M L-Arginin 2 ml
- PBS:  
140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,7 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- 10x SSC:  
15 mM NaCl  
1,5 mM Na-Citrat, pH 7,0

- 20x SSC:  
30 mM NaCl  
3 mM Na-Citrat, pH 7,0
  
- TBE-Puffer:  
1 M Tris  
0,83 M Borat  
10 mM EDTA
  
- Tris-Puffer:  
10 mM Tris-HCl, pH 7,6-7,8
  
- Trypsin/EDTA-Lösung:  
0,25% Trypsin  
0,02% EDTA  
in PBS w/o
  
- Viral Preservation Medium:  
1 M Tris, pH 8,0 1ml  
5 M NaCl 2ml  
BSA 0,1g  
H<sub>2</sub>O ad 50 ml  
Glycerin 50ml

## 8.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

- Brutschränke für die Zellkultur (Fa. Life Sciences International, Frankfurt)
- Cell Disrupter (Fast Prep<sup>®</sup> FP 120, Fa. Qbiogene, Carlsbad, USA)
- Dialysekassetten (Slide-A-Lyzer<sup>®</sup>-10K, Fa. Pierce Chemical Company, Rockford, USA)
- Eismaschine (Fa. Ziegra, Isernhagen)
- Elektrophoresekammer (Hoefler<sup>™</sup> HE 33, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg)
- ELISA-Kit (Quantikine<sup>®</sup>, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Ethilon<sup>®</sup> 4-0 (Fa. Ethicon Products, Norderstedt)
- Gefrierschrank / -80°C (Hera freeze, Fa. Heraeus Holding, Hanau)
- Handschuhe steril (Sempermed, Fa. Lohmann & Rauscher, Neuwied)
- Hybridisierbrutschrank (7601, Fa. GLF, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

- 
- IC-View<sup>®</sup>-System (Pulsion Medical Systems AG, München)
  - Kanülen 36G-20G (Microlance<sup>™</sup>, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden)
  - Laboruhr (Fa. Oregon Scientific, Villingen)
  - Laborwaage (Fa. Ohaus, Giessen)
  - Magnetrührer (Variomag<sup>®</sup>, Fa. H+P Labortechnik, München)
  - Megafuge (2,0 R, Fa. Hereus Instruments, Hanau)
  - Micro Spin<sup>™</sup> 625 Columns (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg)
  - Microplate Reader (Biolumin<sup>®</sup> 960, Fa. Molecular Dynamics, Tokyo, Japan)
  - Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)
  - Mikroskop (Axiovert<sup>®</sup> 25, Fa. Zeiss, Jena)
  - Mikrowellenofen (Fa. Siemens, München)
  - Neubauer-Zählkammer (Fa. Schubert & Weiß, Schwandorf)
  - Nylonmembranen (Fa. Bioscience Schleicher & Schuell, Dassel)
  - Orbitalschüttler (Duomax<sup>®</sup> 2030, Fa. Heidolph Instruments, Schwabach)
  - PCR-Thermocycler (Robo Cycler<sup>®</sup> Gradient 40, Fa. Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)
  - Photokamera / digital (Optio<sup>®</sup> S, Pentax Corp., Tokyo, Japan)
  - Photomikroskop (Axiophot<sup>®</sup>, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen)
  - Skalpellklingen 11, 23 (Fa. Aesculap, Tuttlingen)
  - Spritzen 1-10ml (Fa. Codan Medical, Rødby, Dänemark)
  - Stromgerät für die Elektrophorese (EC 105) (Fa. E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida)
  - Surgical Skin Marker (Securline<sup>®</sup>, Fa. Precision Dynamics, San Fernando, USA)
  - Thermomixer (Compact) (Fa. Eppendorf, Hamburg)
  - Ultrazentrifuge (Optima-LE-80-K<sup>®</sup>, Beckman, Krefeld)
  - UV-Transilluminator (Fa. Biotech Fischer, Reiskirchen)
  - Venenverweilkanülen 24G (Ventoflon<sup>™</sup> Pro, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden)
  - Vortexer Minishaker MS 2 (Fa. IKAR Werke, Stauffen)
  - Wasserbad (Fa. Memmert, Schwabach)
  - Werkbank (Fa. Hereus Instruments, Hanau)
  - Zellkulturplastikmaterialien (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)

### 8.3 Pharmaka und Tiernahrung

- Buprenorphin (Temgesic<sup>®</sup>, Essex Pharma, München)
- Indocyaningrün (ICG-Pulsion<sup>®</sup>, Pulsion Medical Systems AG, München)
- Insulin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Isofluran (Attane<sup>™</sup> Isoflurane, Provet AG, Lyssach, Schweiz)
- Penicillin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>, Fa. Merial, Hallbergmoos)
- Perphenazin-Enanthat (Decentan-Depot<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt)
- Rattenpellets (1320, Fa. Altromin, Lage)
- Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Triglyzeride, mittelkettig (Miglyol 812<sup>®</sup>, Fa. Caesar & Loretz, Hilden)

### 8.4 Software

- Diskus<sup>®</sup> v4.50.20, Hilgers, Königswinter)
- IC-Calc<sup>®</sup> (Pulsion Medical Systems AG, München)
- Image-J<sup>®</sup> v1.29 (NIH, Rodville Pike, USA)
- Xperiments<sup>®</sup> v1.1.0 (Fa. Molecular Dynamics, Tokyo, Japan)
- SPSS<sup>®</sup> v11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA)

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** (S. 8): Schematische Darstellung von Prozessen der Gefäßbildung und Reifung mit beteiligten Faktoren und Rezeptoren (mod. n. Carmeliet 2003 und Holzbach und Mitarb. 2005)
- Abb. 2** (S. 11): Rezeptorinteraktionen der VEGF – Familie (mod. n. Yancopoulos und Mitarb. 2000)
- Abb. 3** (S. 13): rekombinantes Plasmid
- Abb. 4** (S. 17): Adenovirus
- Abb. 5** (S. 17): Adenovirales Kapsid
- Abb. 6** (S. 18): Genom des Adenovirus vom Serotyp 5
- Abb. 7** (S. 22): Der Axial-pattern-Flap
- Abb. 8** (S. 22): Der Random-pattern-Flap
- Abb. 9** (S. 34): Versuchsaufbau 2.6.1
- Abb. 10** (S. 35): ELISA
- Abb. 11** (S. 37): Injektionsmodell
- Abb. 12** (S. 43): Schnittführung
- Abb. 13** (S. 43): Präparation des Hautlappens von der Rektusscheide
- Abb. 14** (S. 43): Fixierung des Hautlappens in ursprünglicher Position
- Abb. 15** (S. 45): Delay – Tag 1: Umschneidung des Lappens ohne Durchtrennung der Perforatoren
- Abb. 16** (S. 48): Messaufbau ICG-Messung
- Abb. 17** (S. 49): Auswertung der Fluoreszenzmessung: Bestimmung des Perfusionsindex (Steigung der Kurve) und der maximalen Fluoreszenzintensität in definierten „Regions of Interest“ (Roi's), grün: Referenz, rot: distale Hälfte, blau: proximale Hälfte, gelb: Standard; Darstellung der Perfusion in Grauwerten (hell: gute Perfusion, dunkel: schlechte Perfusion); Darstellung über die Zeit nach Injektion von ICG
- Abb. 18** (S. 52): Kontaminationskontrolle AdCMV.VEGF<sub>165</sub>
- Abb. 19** (S. 52): Nachweis E2A

- Abb. 20** (S. 53): Nachweis VEGF-Transgen in AdCMV.VEGF<sub>165</sub>
- Abb. 21** (S. 54): zeitlicher Verlauf der VEGF-Produktion
- Abb. 22** (S. 55): VEGF-Konzentration in der Haut pro g Gewebe
- Abb. 23** (S. 56): Gesamtproteinkonzentration in der Haut pro g Gewebe
- Abb. 24** (S. 57): VEGF-Konzentration in der Haut pro mg Gesamtprotein
- Abb. 25** (S. 58): VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro g Gewebe
- Abb. 26** (S. 59): Gesamtproteinkonzentration in der Muskulatur pro g Gewebe
- Abb. 27** (S. 60): VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro mg Gesamtprotein
- Abb. 28** (S. 61): Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD31, Nachweis einer erhöhten Gefäßdichte in Gruppe G2 (Pfeile), links jeweils Übersichts-, rechts Detailvergrößerung
- Abb. 29** (S. 62): Mikrogefäßdichte in der Haut als Chalkley points
- Abb. 30** (S. 63): Mikrogefäßdichte in der Muskulatur als Chalkley points
- Abb. 31** (S. 64): Lappenfläche unmittelbar postoperativ in cm<sup>2</sup>
- Abb. 32** (S. 65): Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>
- Abb. 33** (S. 66): Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>
- Abb. 34** (S. 67): Überlebende Lappenfläche und Nekrosefläche nach 7 Tagen in %
- Abb. 35** (S. 69): Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ
- Abb. 36** (S. 71): Lappenfläche unmittelbar postoperativ in cm<sup>2</sup>
- Abb. 37** (S. 72): Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>
- Abb. 38** (S. 73): Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>
- Abb. 39** (S. 74): Überlebende Lappenfläche und Nekrosefläche nach 7 Tagen in %
- Abb. 40** (S. 75): Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ
- Abb. 41** (S. 76): Perfusionsindex proximale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

**Abb. 42** (S. 85): in klinischen Gentherapiestudien verwendete Vektoren (mod. aus The Journal of Gene Medicine, Database 2005)

**Abb. 43** (S. 85): Indikationen klinischer Gentherapiestudien (mod. aus The Journal of Gene Medicine, Database 2005)

Tabellen:

**Tab. 1** (S. 38): Versuchsplan - Quantifizierung der VEGF Produktion an der Ratte

**Tab. 2** (S. 41): Versuchsplan - Bestimmung der Mikrogefäßdichte an der Ratte

**Tab. 3** (S. 46): Versuchsplan - Random-pattern-Flap Modell

**Tab. 4** (S. 54): Zeitlicher Verlauf der VEGF-Expression in vitro, durchschnittliche Menge VEGF in ng/ml gemessen im Zellüberstand (Gruppen V1-V4 und K1-K2)

**Tab. 5** (S. 55): VEGF-Konzentration in der Haut pro g Gewebe

**Tab. 6** (S. 56): Gesamtproteinkonzentration in der Haut pro g Gewebe

**Tab. 7** (S. 57): VEGF-Konzentration in der Haut pro mg Gesamtprotein

**Tab. 8** (S. 58): VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro g Gewebe

**Tab. 9** (S. 59): Gesamtproteinkonzentration in der Muskulatur pro g Gewebe

**Tab. 10** (S. 60): VEGF-Konzentration in der Muskulatur pro mg Gesamtprotein

**Tab. 11** (S. 62): Mikrogefäßdichte in der Haut als Chalkley points

**Tab. 12** (S. 63): Gefäßdichte in der Muskulatur als Chalkley points

**Tab. 13** (S. 64): Lappenfläche postoperativ in cm<sup>2</sup>

**Tab. 14** (S. 65): Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

**Tab. 15** (S. 66): Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>

**Tab. 16** (S. 67): Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in %

**Tab. 17** (S. 68): Nekrosefläche nach 7 Tagen in %

**Tab. 18** (S. 69): Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

- 
- Tab. 19** (S. 70): Perfusionsindex proximale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ
- Tab. 20** (S. 71): Lappenfläche postoperativ in cm<sup>2</sup>
- Tab. 21** (S. 72): Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>
- Tab. 22** (S. 73): Nekrosefläche nach 7 Tagen in cm<sup>2</sup>
- Tab. 23** (S. 74): Überlebende Lappenfläche nach 7 Tagen in %
- Tab. 24** (S. 74): Nekrosefläche nach 7 Tagen in %
- Tab. 25** (S. 75): Perfusionsindex distale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ
- Tab. 26** (S. 76): Perfusionsindex proximale Lappenhälfte standardbereinigt in % der Referenz gemessen direkt postoperativ

## 10. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	Arteria
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
Ad312	E1A deletiertes Adenovirus Serotyp 5
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
AdCMV.VEGF <sub>165</sub>	E1A deletiertes Adenovirus Serotyp 5 kodierend für die VEGF-Isoform 165 mit einem konstitutiven Zytomegalievirus-Promotor
AG	Aktiengesellschaft
Ang	Angiopoetin
AP	Angina pectoris
Bp	Basenpaare
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
DIG	disseminierte intravasale Gerinnung
DMEM-Medium	Dulbecco's Modified Eagles-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP <sub>3</sub>	Desoxyribonukleotid Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia coli
ED <sub>50</sub>	Effektivdosis 50%
EDRF	Endothelium derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant Assay
env-Gene	für virale Hüllproteine kodierende Gene

---

et al.	et alii
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fetales Kälberserum
Flk	Fetale Leberkinase
Flt	fms-like Tyrosinkinase
G	Guanin
Gag	gruppenspezifische Antigene
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Grdl	Gridlock
HE	Haematoxinilin
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin Ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	humane Lymphozytenantigene
HSV	Herpes simplex Virus
ICG	Indocyaningrün
Id-1	Inhibitor of DNA binding-1
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
KAT-Studie	„Kuopio Angiogenesis Trial“-Studie
kBp	Kilobasenpaare
KDR	Kinase insert domain-containing receptor
KG	Körpergewicht
LIM-Domain	Domain benannt nach Lin-11, Isl-1 and Mec-3 Genen
LMO2	LIM-Domain only 2
M.	Musculus
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid

---

NAK	Neurofilament- $\kappa$ B-aktivierende Kinase
NAP-1	NAK-assoziiertes Protein 1
Nr.	Nummer
NRP	Neuropilin
OP	Operation
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
pDNA	Plasmid DNA
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEI	Polyethylenimin
PIGF	Placenta Growth Factor
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
Ras	Rat Sarcoma
RAVE-Studie	„Regional Angiogenesis with VEGF“-Studie
REVASC-Studie	„Randomized Evaluation of VEGF for Angiogenesis in Severe Coronary Disease“-Studie
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial-Institute-Medium
s.c.	subkutan
SCID	schwere kombinierte Immundefizienz
Shh	Sonic hedgehog
SSC	standard saline citrate
Std.	Standard
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
Tie	Tunica interna Endothelzell-Kinase
TRAM-Lappen	transverser Rectus abdominis Myokutanlappen
U	Uracil

---

UV-Licht	ultraviolettes Licht
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor

Einheiten:

Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikcentimeter
G	gauge
g	Gramm
h	Stunde
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
IU	Internationale Einheiten
l	Liter
lx	Lux
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
λ	Wellenlänge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol

---

pfU	plaquebildende Einheiten
pg	Pikogramm
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
W	Watt
%	Prozent

## 11. Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. E. Biemer danke herzlich ich für die Überlassung des Themas und die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Giunta für die hervorragende Betreuung, seine Hilfestellung und das Vertrauen, dass er mir in den vergangenen Jahren entgegenbrachte.

Herrn Univ- Prof. Dr. med. B. Gänsbacher und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P.-S. Holm danke ich ebenfalls ganz herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. med. vet. T. Brill danke ich für die Unterstützung bei Planung und Durchführung der Tierversuche.

Herrn Univ. Prof. Dr. rer. nat. D. Schams danke ich für die Unterstützung bei der Quantifizierung der VEGF-Produktion.

Herrn Univ. Prof. Dr. med. M. Konerding danke ich für die Unterstützung bei der Bestimmung der Mikrogefäßdichte.

Frau Dipl. math. R. Busch danke ich für Ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herzlich sei auch den Technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Holm, den OP-Schwestern und Mitarbeitern des Tierbereichs gedankt.

Für seine Unterstützung möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. C. Taskov ganz herzlich bedanken.

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Thomas Kurt Hellmuth Holzbach  
 Wohnort: Rupprechtstr. 7, 80636 München  
 Geburtsdatum: 3. April 1979  
 Geburtsort: Neuss  
 Eltern: Frauke Holzbach, geb. Erler, Lehrerin  
 Dr. med. dent. Eckhart Holzbach (†)  
 Konfession: evangelisch  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1986-1989 Theodor-Fliedner-Grundschule, Neuss  
 1989-1998 Quirinus-Gymnasium, Neuss  
 1995-1996 Marlborough-College, Marlborough, England  
 Juni 1998 Abitur, Auszeichnung (Note: 1,6)

### Wehr-/Ersatzdienst:

August 1998 bis September 1999 Zivildienst in den Städtischen Kliniken Neuss, Einsatz als Springer im chirurgischen Zentral-OP

### Studium/Berufsausbildung:

Oktober 1999 bis September 2001 Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

September 2001 Ärztliche Vorprüfung / Physikum, Note: gut (mündlich), gut (schriftlich)

Oktober 2001 bis November 2005 Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar

September 2002 1. Staatsexamen, Note: gut

September 2004 2. Staatsexamen, Note: sehr gut (mündlich), gut (schriftlich)

Praktisches Jahr (10/2004-10/2005):

1. Tertial - Abteilung für Toxikologie, Klinikum rechts der Isar, TU München  
 - I. Med. Klinik / Kardiologie, Klinikum rechts der Isar, TU München

2. Tertial - Chirurgische Klinik, Viszeralchirurgie, Klinikum rechts der Isar, TU München  
 - Abteilung für Wiederherstellungschirurgie, UniversitätsSpital Zürich, CH

3. Tertial - Department for Head and Neck Surgery, Mount Sinai Medical Center, New York City, NY, USA  
 - Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Klinikum rechts der Isar, TU München

November 2005 3. Staatsexamen, Note: sehr gut; Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: sehr gut

seit Februar 2006 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. E. Biemer), finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Priv.-Doz. Dr. med. R. Giunta)

**Famulaturen / Praktika:**

September-Oktober 1999	Anstellung im Unfallchirurgischen OP, Lukaskrankenhaus, Neuss
September 2000	Allgemeinmedizinisches Praktikum, Düsseldorf
März-April 2002	Plastische- / Wiederherstellungschirurgie, Klinikum rechts der Isar, TU München
März-April 2003	Kardiologische Intensivmedizin, Deutsches Herzzentrum München
Juli-August 2003	Orthopaedic Surgery / Surgery of the Hand, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
Februar-März 2004	Plastic Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
August 2003 bis September 2004	Anstellung als studentische Hilfskraft, Klinikum rechts der Isar, TU München

**Sonstige Kurse / Qualifikationen:**

- Kursus Chirurgische Nahttechniken, München, 2002
- Seminar Notfallmedizin und Rettung, Anästhesie und Rettungsdienst, München, 2002
- Kursus Laparoskopie und minimalinvasive Chirurgie, München, 2002
- Kursus Sonografie, München, 2003
- Kursus Mikrochirurgie, Mayo Clinic, Rochester MN, USA, 2003
- Seminar Powerpoint, Karl v. Linde Akademie, München, 2004
- Seminar Rhetorik und Vortragstechniken, Karl v. Linde Akademie, München, 2005
- fundierte Kenntnisse MS Office, SPSS, SAP

**Sprachliche Ausbildung:**

1989-1995	Latein, Abschluss des Großen Latinums
1991-1998	Englisch, fließend in Sprache und Schrift
1993-1995	Französisch, gute Kenntnisse in Sprache und Schrift
1998	Spanisch, Erwerb von Grundlagen

**Sonstige Aktivitäten:**

- Mitglied des ROTARACT-Clubs Rheinkreis
- *Exchange Officer* des *dfa*, Deutscher Famulantenaustausch, Vertretung München
- Mitglied des Grenadier-Corps Neuss

**Hobbys:**

- Sport: Skifahren, Fitness, Leichtathletik
- Gitarrenspiel
- Literatur

---

### 13. Veröffentlichungen

Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Biemer E und Gansbacher B

AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps.

J Gene Med 2005; 7:297-306

Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Brill T, Busch R, Gansbacher B und Biemer E

Prediction of flap necrosis with laser induced indocyanine green fluorescence in a rat model.

Br J Plast Surg 2005; 58:695-701

Holzbach T, Taskov C, Henke J, Busch R, Gansbacher B, Biemer E und Giunta RE  
Evaluation der Perfusion von Lappenplastiken mittels Laserfluoreszenz von Indocyaningrün.

Handchir Mikrochir Plast Chir 2005; 37:396-402

Holzbach T, Taskov C, Neshkova I, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Gansbacher B, Biemer E und Giunta RE

Angiogenese-Gentherapie mit AdVEGF165 - Eine Art "Delay" für Lappenplastiken?

Handchir Mikrochir Plast Chir 2005; 37:365-74