

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Identifikation von Biomarkern und Charakterisierung von möglichen  
Pathomechanismen bei juckenden Hauterkrankungen“

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clemens Felix Krull

aus Hannover

Datum der Promotion: 09.12.2016

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abstrakt auf Deutsch .....	1
Abstrakt auf Englisch .....	3
Einführung .....	5
Zielsetzung .....	6
Material und Methoden .....	7
Patienten und Kontrollen .....	7
Verarbeitung der Blutproben .....	7
Immunohistochemische Färbung .....	8
Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	9
Statistische Analysen und graphische Darstellung .....	9
Ergebnisse .....	10
VEGF-A .....	10
Substance P .....	12
Biomarkerscreening bei der CSU .....	12
Diskussion .....	13
Literaturverzeichnis .....	16
Eidesstattliche Versicherung .....	18
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen .....	19
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen .....	21
Lebenslauf .....	39
Komplette Publikationsliste .....	41
Danksagung .....	42

# Zusammenfassung

## Abstrakt auf Deutsch

*Identifikation von Biomarkern und Charakterisierung von möglichen Pathomechanismen bei juckenden Hauterkrankungen*

**Hintergrund:** Chronischer Pruritus ist eines der klinischen Hauptsymptome bei der Prurigo und der chronisch spontanen Urtikaria (CSU). Wegen des Fehlens einer kausalen Therapie ist die Behandlung häufig nur unzureichend möglich.

**Ziel:** Zweck der hier zusammengefassten Untersuchungen war es, Erkenntnisse über mögliche Pathomechanismen bei der Prurigo und der CSU zu gewinnen. Durch ein besseres Verständnis dieser sollten Ansatzpunkte für neue Therapien gefunden werden. Hierfür wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt.

**Zusammenfassung:** Eine Patientin mit einer therapieresistenten Prurigo wurde aufgrund eines neu diagnostizierten Mamma-CA mit Antikörpern gegen den Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) behandelt. VEGF-A ist der wichtigste Wachstumsfaktor der Angiogenese. Unter der Therapie zeigte sich eine signifikante Reduktion des Pruritus. Dies ließ sich, trotz zahlreicher verabreichter Onkologika, am ehesten auf die Gabe des VEGF-A-Antikörpers zurückführen. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde die Konzentration von VEGF-A bei Prurigo Patienten und gesunden Probanden gemessen. Diese zeigte sich erhöht. Dies waren die ersten Ergebnisse, die eine Rolle von VEGF-A bei der Pathogenese der Prurigo anzeigten.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Expression von VEGF-A und dessen Hauptrezeptor VEGFR-2 in betroffenen Hautarealen von Prurigo Patienten und der Haut gesunder Probanden bestimmt. Dies erfolgte semiquantitativ mittels immunohistochemischer Färbungen. Es zeigte sich eine gesteigerte VEGF-A-Immunoreaktivität (IR) in der Epidermis, Dermis und Subkutis von Prurigo Patienten bei unveränderter Expression von VEGFR-2 - im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Die Bildanalyse CD31-immunohistochemisch markierter Gefäße ergab eine signifikante Zunahme bei der Gefäßanzahl, nicht jedoch bei der durchschnittlichen Größe der Gefäße. Die Gefäßdichte korrelierte hierbei mit der Dicke der Epidermis.

Zur Untersuchung der Rolle von VEGF in einer weiteren mit Pruritus assoziierten Hauterkrankung wurden die VEGF-A-Serumkonzentrationen im Rahmen eines Biomarkerscreenings von Patienten mit CSU gemessen. Die CSU-Patienten wiesen,

gegenüber gesunden Probanden, keine veränderten Serumspiegel von VEGF-A auf. Ebenso zeigte sich bei TSLP, C5a, TNF, IL-6, IL-9, IL-18, IL-31, IL-33, Neopterin und Histamin keine Korrelation mit der Krankheitsaktivität.

Mit der Analyse von Substance P konnte jedoch ein neuer, möglicher Pathomechanismus der CSU identifiziert werden. Verglichen mit gesunden Kontrollen konnten wir erhöhte Konzentrationen von Substance P bei der CSU messen.

**Schlussfolgerung:** Es ergaben sich Hinweise für eine klinisch relevante Rolle von VEGF-A bei der Pathogenese der Prurigo-Erkrankung, was an der Korrelation der Angiogenesparameter mit der Schwere der Erkrankung ersichtlich ist. Für die CSU konnte mit Substance P ein neuer möglicher Mediator der Pathogenese identifiziert werden.

## Abstrakt auf Englisch

*Identification of biomarkers and characterization of possible pathomechanisms in pruritic skin diseases*

**Background:** Chronic Pruritus is the hallmark symptom in patients suffering from prurigo or chronic spontaneous urticaria (CSU). Due to the lack of a causal therapy, an effective treatment is a clinical challenge.

**Aim:** With the performed investigations we wanted to achieve further understanding of the etiology and pathogenesis of prurigo and CSU in order to identify novel therapeutic targets to improve treatment. Therefore, we performed different studies.

**Summary:** A prurigo patient suffering from therapy-resistant pruritus was treated with an antibody against vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), due to her newly diagnosed mamma carcinoma. VEGF-A is the main factor of angiogenesis. Under this treatment she showed a dramatically improvement in pruritus. Although she had been treated with additional oncological treatments, the improvement in pruritus is most likely due to the administration of the anti-VEGF-A-antibody. Based on this clinical investigation we measured elevated VEGF-A-concentrations in patients suffering from prurigo compared to healthy controls. These were the first findings indicating a connection between VEGF-A, angiogenesis and the pathogenesis of prurigo.

Based on these results, we performed immunohistochemical stainings in lesional skin of prurigo patients and healthy controls in order to measure the expression of VEGF-A and its main receptor VEGFR-2. We saw an increased immunoreactivity (IR) in the epidermis, dermis and subcutis of prurigo patients. In contrast, the expression of VEGFR-2 was found to be similar to healthy controls. The computer assisted analysis of CD-31 marked vessels showed a significant increase in the average numbers but not in the average size of the marked vessels. Hereby the vessel density strongly correlated with epidermal thickness in prurigo lesions.

In order to characterize the role of VEGF-A in another skin disorder we measured the VEGF-A-concentration in patients suffering from CSU in the framework of a biomarkerscreening. The VEGF-A-levels showed no increase compared to healthy controls. Additionally, TSLP, C5a, TNF, IL-6, IL-9, IL-18, IL-31, IL-33, neopterin and histamine showed no correlation with disease activity in CSU.

With the analysis of substance P we were also able to identify a novel possible pathomechanism in CSU. Compared to healthy controls we measured elevated

concentrations of substance P in the blood samples of patients suffering from CSU.

**Conclusions:** We found evidence for a clinically relevant role of VEGF-A in the pathogenesis of prurigo as there is a correlation in the angiogenesis parameters and disease severity. With substance P we were able to identify a novel possible mediator in the pathogenesis of CSU.

## Einführung

Weder für die CSU noch für die Prurigo gibt es aktuell eine kausale Therapieoption. Beide Erkrankungen sind mit ausgeprägtem und häufig schwer therapiebarem, chronischen Juckreiz (Pruritus) assoziiert.

Chronischer Pruritus ist definiert als ein Juckreiz, der länger als sechs Wochen anhält. Gerade die Behandlung des Pruritus stellt behandelnde Ärzte vor Herausforderungen. Klinisch gibt es folgende Unterteilung: 1. Pruritus auf entzündeter Haut, 2. Pruritus auf nicht-entzündeter Haut und 3. Pruritus, der sich mit sekundären Kratz-Läsionen präsentiert (1). Die CSU wird zu der ersten und die Prurigo zu der dritten Gruppe gezählt. Die Pathophysiologie des Pruritus ist Gegenstand aktueller, intensiver Forschung. Trotzdem sind die zum Pruritus führenden Mechanismen weder bei der Prurigo noch bei der CSU ausreichend erforscht, was auch die Schwierigkeiten bei der Behandlung erklärt.

Die Prurigo wird klinisch in zwei Gruppen unterteilt. Die Patienten mit Prurigo nodularis präsentieren sich mit hyperkeratotischen Knoten. Die Patienten mit Prurigo simplex hingegen zeigen diese nicht. Bei der Prurigo ist es in 87% der Fälle möglich, eine zugrunde liegende Ursache zu finden. Zu diesen zählen unter anderen die Urämie, Cholestase oder hämatologische Erkrankungen wie die Polycythaemia Vera. Alle diese verschiedenen Erkrankungen können die Induktion der Prurigo befördern (2).

Bei der CSU handelt es sich um eine sehr häufige Hauterkrankung, welche von der akuten Urtikaria auf Grund der Erkrankungsdauer (länger als sechs Wochen) abgegrenzt wird. Im Gegensatz zur Prurigo ist es bei der CSU nur selten möglich, eine die Krankheit auslösende Ursache zu finden. Ziel der Therapie ist es somit, die Symptome zu unterdrücken oder zu lindern, indem man die Mastzelle und die von ihr sezernierten Mediatoren inhibiert (3).

Im Vorfeld des Biomarkerscreenings wurde deshalb gezielt nach Stoffen gesucht, die Mastzellen aktivieren können, oder von diesen bei der Degranulation sezerniert werden. Aus diesem Grunde wurden Thymic stromal lymphopoietin (TSLP), VEGF-A, Complement component 5a (C5a), Tumor Nekrose Faktor (TNF), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-9 (IL-9), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-31 (IL-31) Interleukin-33 (IL-33), Complement component 5a (C5a), Histamin und Substance P auf eine Rolle bei der Pathophysiologie der CSU untersucht.

## Zielsetzung

Gemeinsames Ziel der hier zusammengefassten Arbeiten war die Untersuchung der Pathophysiologie bei der Prurigo und der CSU.

Ziel von zwei Untersuchungen war es, den Einfluss von VEGF-A und der Angiogenese bei der Pathogenese der Prurigo und der CSU zu untersuchen und zu charakterisieren. Bei VEGF-A handelt es sich um den wichtigsten und am besten untersuchten Induktor der Angiogenese.

Die Behandlung der Prurigo und der CSU ist aktuell nur symptomatisch möglich und häufig nur unzureichend. Durch ein besseres Verständnis der beteiligten Mediatoren und zugrunde liegenden Mechanismen sollten Ziele für neue Therapien identifiziert werden. Letzten Endes sollte somit die Therapie der beiden Erkrankungen verbessert werden.

Ziel der Biomarkerstudie war es, neben der Identifizierung eines Biomarkers für die chronisch spontane Urtikaria bei allen untersuchten Stoffen einen möglichen Einfluss auf die Pathogenese der CSU zu untersuchen. Darüber hinaus gab es im Vorfeld des Projektes Publikationen, bei denen die Serumkonzentrationen von Interleukin-31 (IL-31), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-6 (IL-6) und Neopterin bei CSU-Patienten erhöht gemessen wurde. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht von anderen Laboren mit einem anderen Patientenkollektiv reproduziert worden. Diese potentiellen Biomarker sollten folglich einer erneuten Überprüfung unterzogen werden.

Abgesehen von den schon vorbeschriebenen, potenziellen Biomarkern analysierten wir mehrere Stoffe, die die Eigenschaft besitzen, Mastzellen zu aktivieren. Diese wurden ebenfalls auf ihre Eignung als Biomarker untersucht. Im Rahmen dieses Screenings wurden auch die Konzentration von VEGF-A bei der CSU gemessen. So war es uns möglich, die Prurigo und die CSU in diesem Punkt miteinander zu vergleichen.



# Material und Methoden

## Patienten und Kontrollen

- Bei den immunohistochemischen Studien zur Angiogenese bei der Prurigo benutzten wir Material von 11 Patienten mit der klinischen und histologisch gesicherten Diagnose einer Prurigo. Alle Patienten waren in Behandlung an der dermatologischen Klinik der Charité. Es handelte sich um vier männliche und 7 weibliche Patienten. Fünf der Patienten litten unter einer Prurigo nodularis und sechs unter einer Prurigo simplex. Als Kontrollen dienten uns sieben gesunde Individuen. Dabei handelte es sich um drei Männer und vier Frauen.
- Bei der Bestimmung der Konzentration von VEGF-A benutzten wir das Material von 27 Patienten mit der Diagnose einer Prurigo. Davon waren 12 männlich und 15 weiblich. Zur Kontrolle benutzten wir 19 gesunde Kontrollen. Des Weiteren führten wir die immunohistochemische Färbung von VEGF-A bei der besagten Patientin und einer gesunden Kontrolle durch.
- Bei der Messung von VEGF-A im Serum von Patientin mit CSU analysierten wir insgesamt 56 Proben und verglichen diese mit 24 gesunden Kontrollen. Im Rahmen des Biomarkerscreenings analysierten wir des Weiteren Proben von bis zu 58 Patienten und verglichen dies mit bis zu 24 gesunden Kontrollen.
- Für die Untersuchung von Substance P benutzten wir das Material von 34 gesunden Kontrollen und 118 Patienten mit der Diagnose einer CSU. Die Proben stammten aus zwei verschiedenen dermatologischen Kliniken (Uniklinik-Mainz und Charité-Berlin).
- Alle hier erwähnten und durchgeführten Studien wurden von der lokalen Ethikkommission geprüft und gebilligt.

## Verarbeitung der Blutproben

Die Serum- und Plasmaproben der Prurigo und der CSU wurden in einem standardisierten Verfahren gewonnen. Im Falle der CSU handelte es sich um Patienten, die das CSU Diagnoseprogramm der Charité durchlaufen hatten. Die Weiterverarbeitung der Blutproben erfolgte 30 Minuten nach Entnahme. Alle Proben

wurden bei -80 °C aufbewahrt. Im Falle der Prurigo und der gesunden Kontrollen wurde das gleiche Procedere angewandt. Für die Analyse von Substance P wurden zusätzlich Proben aus der dermatologischen Universitätsklinik in Mainz untersucht.

### **Immunohistochemische Färbung**

Die immunohistochemischen Färbungen wurden an 5 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Zur Färbung von VEGF-A wurde ein monoklonaler anti-VEGF-A Mausantikörper verwendet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, clone 26503). Die Verdünnung betrug 1:30. Zur Färbung von VEGFR-2 wurde ein polyklonaler anti-VEGFR-2 Antikörper aus der Ziege verwendet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, IgG). Die Verdünnung für die VEGFR-2-Färbung betrug 1:30. Für die Färbung des endothelspezifischen CD-31 wurde ein monoklonaler anti-CD31 Mausantikörper verwendet (Dako Denmark A/S, Glostrup Denmark, Clone JCA70A). Die Verdünnung betrug 1:50. Für die Färbung des lymphendothelspezifischen Podoplanins (D2.40) wurde ebenfalls ein monoklonaler Antikörper der Firma Dako verwendet (Dako Denmark A/S, Glostrup Denmark, Clone D2.40). Die Verdünnung betrug 1:200. Zur Entwicklung der Visualisierung wurden die Dako REAL™ Detection systems (LSAB+HRP und APAAP; Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) verwendet. Als Positivkontrolle diente die Gewebeprobe eines hochvaskularisierten Melanoms. Als negative Kontrolle wurden die Schnitte ohne primären Antikörper inkubiert. Alle Schnitte wurden anschließend mit Papanicolaou's 1a Harris' Haematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) gegengefärbt.

Um die Immunoreaktivität (IR) der Färbungen zu bewerten, wurden alle Schnitte der Patienten und gesunden Kontrollen verblindet und anschließend von ein und derselben Person analysiert. Um die Intensität zu evaluieren, benutzten wir ein Bewertungssystem von 0-3, mit 0 als keine Immunoreaktivität, 1 milde, 2 moderate und 3 starke Immunoreaktivität. Die Negativ- und Positivkontrollen wurden benutzt, um 0 und 3 zu definieren.

Die CD-31-positiven Schnitte wurden gesondert mittels eines Zeiss Axiotech 100 HD Mikroskops (Jena, Germany) untersucht und Bilder mit einer Digitalkamera gemacht (Q-Imaging CCD, Micropublisher 3.3 RTV, Surrey, Canada). Die morphometrische Analyse

der digitalen Bilder erfolgte mit Hilfe der iVision-Mac v4.5 Software (BioVision Technologies, Exton, Pennsylvania, USA). Die Gewebeaufnahmen erfolgten entlang der Epidermis in 10-facher Vergrößerung. Ermittelt wurden die Anzahl der Gefäße pro Quadratmillimeter, die durchschnittliche Größe der Gefäße und der Prozentsatz an immunohistochemisch markierten Gebiet im Vergleich zur Gesamtheit der untersuchten Fläche (% total vessel area), wie zuvor beschrieben (4).

### **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Bestimmung der Serum- bzw. Plasmalevels erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISA. Die Durchführung erfolgte streng nach den Gebrauchsanweisungen der jeweiligen Hersteller. Folgende Systeme wurden verwendet: Thymic stromal lymphopoetin (TSLP), VEGF-A, Complement component 5a (C5a), Tumor Nekrose Faktor (TNF), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-33 (IL-33), Interleukin-31 (IL-31) und Interleukin-18 (IL-18) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Neopterin (DRG-Systems, Marburg, Germany), Interleukin-9 (IL-9) (Biolegend, San Diego, California, USA). Bei allen Analysen wurden die Standards und Proben jeweils in Duplikaten angefertigt. Bis auf Complement component 5a, dessen Messung in Plasma stattfand, wurde alle Stoffe im Serum gemessen. Die Bestimmung von Histamin erfolgte mittels des Histareaders (Reflab ApS, Copenhagen, Denmark).

Die Messung von Substance P erfolgte ebenfalls mit einem kommerziellen ELISA der Firma R&D (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### **Statistische Analysen und graphische Darstellung**

Die statistischen Analysen und die Erstellung der Graphiken erfolgte mittels GraphPad Prism 5.0. Zur statistischen Auswertung wurde der t-test verwendet. Statistische Unterschiede mit einem p-Wert von  $<0,05$  wurden als signifikant erachtet. Im Rahmen des Biomarkerscreenings wurde der ANOVA-Test verwendet, um die Zusammenhänge zwischen Biomarkerlevel und Krankheitsschwere zu untersuchen, ein p-Wert von  $0,05$  wurde als signifikant gewertet.

# Ergebnisse

## VEGF-A

### *Serumkonzentrationen von VEGF-A bei der Prurigo erhöht, bei CSU jedoch nicht*

Bei den durchgeführten ELISA-Untersuchungen zeigte sich bei den Prurigo Patienten eine statistisch signifikante Erhöhung der Konzentration - im Vergleich mit den gesunden Kontrollen. Die Konzentration bei den Prurigo Patienten war bis auf das Vierfache erhöht ( $191,9 \pm 38,5$  pg/ml vs  $48,7 \pm 8,4$  pg/ml). Des Weiteren zeigte sich eine Korrelation zwischen der ärztlich festgestellten Krankheitsaktivität und der Höhe der VEGF-Konzentrationen. Bei einer Patientin führte die Behandlung mit Bevacizumab (einem Antikörper gegen VEGF-A), die im Rahmen der onkologischen Therapie ihres Mamma-Ca durchgeführt wurde, zu einer dramatischen Verbesserung ihres vorher therapieresistenten Pruritus (vgl. Krause et al. 2013, Publikation 4).

### *Die Expression von VEGF-A ist in der Haut von Prurigo-Patienten hochreguliert*

Wir benutzten ein Beurteilungssystem zur Einteilung der Immunoreaktivität (IR) (siehe Material und Methoden). Die IR von VEGF-A war in allen Bereichen der betroffenen Haut von Prurigo Patienten signifikant erhöht - verglichen mit den gesunden Kontrollen. (Epidermis,  $2,6 \pm 0,2$  vs.  $1,8 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ; Dermis,  $0,9 \pm 0,2$  vs  $0,2 \pm 0,1$ ;  $p < 0,05$ ; Subcutis,  $2,2 \pm 0,2$  vs  $1,3 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Die IR von VEGF-R2 zeigte sich zwischen Prurigo und gesunden Kontrollen gleichermaßen verteilt (vgl. Krull et al., Publikation 1).

### *Anzahl, aber nicht die durchschnittliche Größe der Gefäße ist erhöht*

Da VEGF-A für seine wichtige Rolle bei der Angiogenese bekannt ist, untersuchten wir als nächstes die Anzahl und Größe der mit dem endothelspezifischen Marker CD-31 gefärbten Strukturen. Die computergestützte Analyse zeigte uns, dass Prurigo-Patienten eine bis auf das doppelte gesteigerte Anzahl von Gefäßen aufweisen ( $12,8 \pm 2$  vs.  $5,6 \pm 0,5$ ,  $p < 0,05$ ). Ebenso ergab sich eine signifikante Erhöhung der gesamten CD-31 gefärbten Fläche im Vergleich zu den gesunden Proben ( $2,3 \pm 0,3\%$  vs  $0,8 \pm 0,1\%$ ,  $p < 0,005$ ). Die durchschnittliche Größe der markierten Gefäße zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen. Interessanterweise fanden sich bei der spezifischen Färbung der Lymphgefäße mittels D2-40 keine Unterschiede zwischen

Prurigo Patienten und Gesunden, wie sich bei einer quantitativen immunohistomorphometrischen Untersuchung herausstellte (vgl. Krull et al. 2015, Publikation 1).

*Die Dicke der Epidermis bei Prurigo ist erhöht und korreliert mit der Anzahl der Gefäße*

In der Haut geht Angiogenese oft einher mit Akanthose – einer Verdickung der Epidermis. Aus diesem Grunde maßen wir die Dicke der Epidermis (vom Stratum basale bis zum Stratum lucidum) bei Prurigo Patienten und gesunden Kontrollen. Wir beobachten hierbei eine mehr als das doppelte verdickte Epidermis bei den Prurigo-Patienten. Außerdem ergab sich ein verblüffender statistischer Zusammenhang zwischen der Dicke der Epidermis und der Gefäßanzahl bei der Prurigo ( $r^2= 0.85$ ,  $p<0.0001$ ). Dies deutet eine enge Verbindung zwischen Akanthose und Angiogenese an (vgl. Krull et al. 2015, Publikation 1).

*Erhöhte VEGF-A-Immunoreaktivität ist bei der Prurigo unabhängig vom klinischen Subtyp*

Um zu eruieren, ob es bei der Akanthose und Angiogenese einen Unterschied zwischen den beiden klinischen Subtypen Prurigo nodularis und Prurigo simplex gibt, verglichen wir die Expression von VEGF-A und VEGFR-2 sowie die Anzahl der Gefäße und die Dicke der Epidermis unter den beiden Subtypen. Klinisch präsentieren sich die Patienten mit Prurigo nodularis mit einem an die Psoriasis erinnernden Befund. Die Patienten mit Prurigo simplex hingegen nicht. Überraschenderweise fanden sich in unserer Untersuchung keine Unterschiede zwischen der Prurigo nodularis und der Prurigo simplex (vgl. Krull et al. 2015, Publikation 1).

*Keine Korrelation von VEGF-A mit der Krankheitsaktivität bei der CSU*

Für die CSU zeigten sich keine erhöhten Konzentrationen von VEGF-A. Des Weiteren konnte kein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität festgestellt werden (vgl. Metz et al. 2013, Publikation 3).

## **Substance P**

*Substance P ist im Serum von Patienten mit chronischer spontaner Urticaria hochreguliert*

Bei der laborchemischen Untersuchung von Substance P bei Patienten mit chronischer spontaner Urtikaria zeigte sich die Konzentration von Substance P - im Vergleich zu gesunden Kontrollen - erhöht. Dieser Zusammenhang war bei den Proben aus zwei verschiedenen dermatologischen Zentren (Mainz und Berlin) zu finden. Des Weiteren korreliert die Konzentration von Substance P alleinige mit der Krankheitsaktivität. Ein Zusammenhang mit einer der CSU zur Grunde liegende Ursache, Vorhandensein eines Angioödems oder einer psychosomatischen Komorbidität konnte nicht gefunden werden (vgl. Metz et al. 2014, Publikation 2).

## **Biomarkerscreening bei der CSU**

*Thymic stromal lymphopoietin (TSLP), Complement component 5a (C5a), Tumor Nekrose Faktor, Interleukin-6, Interleukin-9, Interleukin-18, Interleukin-31, Interleukin-33, Neopterin und Histamin zeigen keine Korrelation mit der Krankheitsaktivität bei der chronisch spontanen Urtikaria.*

In Rahmen des Biomarkerscreenings fanden sich keine statistisch signifikanten Erhöhungen der untersuchten Stoffe. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen Konzentration und Krankheitsaktivität für die untersuchten Stoffe. Die vorher in anderen Laboren und bei anderen Patientenkollektiven beschriebenen erhöhten Konzentrationen von IL-31, IL-18, IL-6 und Neopterin ließen sich bei unserem Patientenkollektiv nicht reproduzieren (vgl. Metz et al. 2013, Publikation 3).

## Diskussion

In den hier vorgelegten Untersuchungen konnten wir zeigen, dass es in den betroffenen Hautarealen von Patienten mit Prurigo eine beständig erhöhte Expression von VEGF-A gibt und darüber hinaus ein Zusammenhang mit der erhöhten Gefäßanzahl besteht.

In den Serumproben von Patienten mit Prurigo ließen sich ebenfalls erhöhte VEGF-A-Konzentrationen detektieren. Dieser Zusammenhang ließ sich hingegen für die CSU nicht belegen. Bei der CSU fand sich jedoch eine erhöhte Konzentration von Substance P. Für keinen anderen der untersuchten Stoffe ließ sich bei der CSU eine derartige Erhöhung der Konzentration feststellen.

Für die Prurigo gilt es zu diskutieren, inwieweit VEGF-A zu der Aufrechterhaltung und Verstärkung der Entzündungsreaktion in den betroffenen Hautarealen der Prurigo-Patienten beiträgt. VEGF-A ist vor allem als pro-angiogener Faktor bekannt, der eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von Gewebsschäden und dem Wachstum von Tumoren spielt. Die Rolle von VEGF-A bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist hingegen noch nicht komplett erforscht.

Es ist bekannt, dass VEGF-A von Keratinozyten exprimiert wird und neben der Angiogenese auch die funktionellen Eigenschaften von Gefäßen verändert (5). Es gibt zunehmend Daten, die den Einfluss von VEGF-A auf proentzündliche Zustände zeigen (6). So führt VEGF-A in entzündetem Gewebe zu einer vermehrten Durchlässigkeit des Endothels und vermehrten Einstrom von Leukozyten (7). Bei der Prurigo wurden perivaskuläre Infiltrate beschrieben, die hauptsächlich aus Lymphozyten bestehen (8). Es gibt verschiedene Mechanismen, wie VEGF-A zu einem erhöhten Einstrom von Lymphozyten beitragen kann. So führt VEGF-A zu einer Hochregulierung von unterschiedlichen endothelialen Adhensionsmolekülen - wie z.B. E-selectin, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM) (8). Durch die Stimulation über den VEGFR-1-Rezeptor triggert VEGF-A die Bildung von Chemokinen in Endothelzellen, was ebenfalls die Migration von Entzündungszellen - wie Monozyten und Makrophagen - begünstigt (8).

VEGF-A kann also durch die Hochregulierung von Adhensionsmolekülen und der Induktion der Bildung von Chemokinen, zum Einstrom von Leukozyten beitragen. Diese könnten wiederum zur klinischen Symptomatik bei der Prurigo beitragen.

Außerdem ist VEGF-A bekanntermaßen ein Aktivator von STAT3. Eine Aktivierung von STAT6 durch Th2-Zytokine und STAT3 durch einen unbekanntem Einflussfaktor wurden

bereits als mögliche Ursachen für die pathologischen Hauterscheinungen bei Prurigo Patienten diskutiert (9). VEGF-A könnte dieser, bis jetzt unbekannte Faktor, sein. So kann VEGF-A zur Entstehung der Entzündungsreaktion beitragen.

Die genauen Begebenheiten der Angiogenese in entzündeter menschlicher Haut sind noch nicht komplett erforscht. Daten aus Tierversuchen weisen jedoch immer mehr auf die Verbindung zwischen Angiogenese und Inflammation hin (10). Bei einem Tiermodell des allergischen Kontaktekzems zeigten sich die Veränderungen bei der Angiogenese vor allem in einer Vergrößerung der Gefäße (11). Bei unserer Analyse war es hingegen eine Vermehrung der Anzahl der untersuchten Gefäße. Die durchschnittliche Größe der Gefäße war unverändert zu der von gesunden Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass es sich eher um neu gewachsene Kapillaren handelt als um vorher bestehende Gefäße, die sich vergrößert haben. Diese Form der Angiogenese wird Sprouting genannt und findet sich vor allem bei der Wundheilung und dem Wachstum von Tumoren. Beides ist jeweils mit einer Gewebeproliferation assoziiert. Passend hierzu war bei unserer Untersuchung eine Verbindung zwischen der Dicke der Epidermis und der Anzahl der Gefäße nachweisbar.

Hierdurch ließe sich auch erklären, warum sich bei der CSU in unseren Untersuchungen keine Zusammenhänge mit VEGF-A finden ließen. Es kommt bei der CSU zu keiner Gewebeproliferation und die typischen Quaddeln sind für maximal 24 Stunden präsent (3).

Abschließend ist es uns im Rahmen unserer Untersuchungen der Angiogenese und VEGF-A gelungen, ein mögliches Ziel von neuen Therapien bei der Prurigo zu identifizieren. Mit Bevacizumab steht ein Medikament zur Verfügung, welches bereits breite Anwendung in der Onkologie findet (12). In Grundlagen - sowie klinischer Forschung muss die Blockade von VEGF-A und die Beeinflussung der Angiogenese weiter untersucht werden, um diese Form der Therapie zu erproben und zu etablieren.

Im Falle der chronisch spontanen Urtikaria ist mit der Analyse von Substance P ebenfalls ein möglicher, neuer Pathomechanismus identifiziert worden. Die fehlende Expression des Neurokinin-1-Rezeptors auf mukosalen Mastzellen könnte auch erklären, warum die Symptome im Großteil der Fälle auf die Haut beschränkt sind (13). Der Neurokinin-1-Rezeptor ist der Hauptrezeptor von Substance P. Mit dessen Antagonist Aprepitant steht ebenfalls ein Medikament, welches schon als Strategie zur Behandlung von Pruritus diskutiert wurde, zur Verfügung (14). Eine weitere klinische Evaluierung



muss den Nutzen dieser Behandlung klären. Nicht abschließend auflösen ließ sich die Diskrepanz zwischen unserer Untersuchung und derer von Tedeschi et. al (15), wo die Konzentration von Substance P bei Patienten mit CSU nicht erhöht war.

Bei dem Biomarkerscreening der CSU hat sich herausgestellt, dass die Identifizierung eines klinisch wertvollen Biomarkers nur in großen Patientenkollektiven aus verschiedenen Zentren möglich sein wird. Erfahrungen in der Praktikabilität dieses Vorgehens konnten wir bei der Untersuchung von Substance P gewinnen.

Zusammenfassend haben wir sowohl für die Prurigo als auch für die CSU neue, wichtige Erkenntnisse erlangt, die die Behandlung dieser beiden Erkrankungen in Zukunft verbessern könnten.

## Literaturverzeichnis

1. Stander S, Weisshaar E, Mettang T, Szepietowski JC, Carstens E, Ikoma A, et al. Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch. *Acta dermato-venereologica*. 2007;87(4):291-4.
2. Iking A, Grundmann S, Chatzigeorgakidis E, Phan NQ, Klein D, Stander S. Prurigo as a symptom of atopic and non-atopic diseases: aetiological survey in a consecutive cohort of 108 patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2013;27(5):550-7.
3. Zuberbier T, Asero R, Bindslev-Jensen C, Walter Canonica G, Church MK, Gimenez-Arnau AM, et al. EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO guideline: management of urticaria. *Allergy*. 2009;64(10):1427-43.
4. Velasco P, Huegel R, Brasch J, Schroder JM, Weichenthal M, Stockfleth E, et al. The angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 inhibits acute cutaneous hypersensitivity reactions. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(8):2022-30.
5. Kakurai M, Demitsu T, Umemoto N, Kobayashi Y, Inoue-Narita T, Fujita N, et al. Vasoactive intestinal peptide and inflammatory cytokines enhance vascular endothelial growth factor production from epidermal keratinocytes. *The British journal of dermatology*. 2009;161(6):1232-8.
6. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, et al. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(3):1141-6.
7. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87(8):3336-43.
8. Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, et al. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *The Journal of investigative dermatology*. 1998;111(1):1-6.
9. Fukushi S, Yamasaki K, Aiba S. Nuclear localization of activated STAT6 and STAT3 in epidermis of prurigo nodularis. *The British journal of dermatology*. 2011;165(5):990-6.
10. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB journal : official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1997;11(6):457-65.

11. Kunstfeld R, Hirakawa S, Hong YK, Schacht V, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood*. 2004;104(4):1048-57.

12. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34(12):1785-8.

13. Bischoff SC, Schwengberg S, Lorentz A, Manns MP, Bektas H, Sann H, et al. Substance P and other neuropeptides do not induce mediator release in isolated human intestinal mast cells. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2004;16(2):185-93.

14. Stander S, Siepmann D, Herrgott I, Sunderkotter C, Luger TA. Targeting the neurokinin receptor 1 with aprepitant: a novel antipruritic strategy. *PLoS one*. 2010;5(6):e10968.

15. Tedeschi A, Lorini M, Asero R. No evidence of increased serum substance P levels in chronic urticaria patients with and without demonstrable circulating vasoactive factors. *Clinical and experimental dermatology*. 2005;30(2):171-5.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Clemens Krull, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Identifikation von Biomarkern und Charakterisierung von möglichen Pathomechanismen bei juckenden Hauterkrankungen“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## **Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen**

Clemens Krull hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** [Krull C, Schoepke N, Ohanyan T., Brachaczek T., Maurer M, Lange-Asschenfeldt B, Metz M], [Increased angiogenesis and VEGF expression correlates with disease severity in prurigo patients], [Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology], [2015]

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche im Vorfeld der Arbeit, Durchführung der Färbungen nach vorheriger Einarbeitung. Analyse der Färbungen. Statistische Auswertung und Interpretation der Ergebnisse. Erstellung der Graphiken. Erstellung eines Posters zur Vorstellung der Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen. Verfassen und Überarbeiten des Manuskriptes.

**Publikation 2:** [Metz M, Krull C, Hawro T, Saluja R, Groffik A, Stanger C, Staubach P, Maurer M.], [Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria], [Journal of Investigative Dermatology], [2014]

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche im Vorfeld. Selbstständige Durchführung der Messungen. Statistische Analyse und Interpretation der Ergebnisse. Erstellung der Graphiken. Mitarbeit bei der Verfassung und Überarbeitung des Manuskriptes.

**Publikation 3:** [Metz M, Krull C, Maurer M], [Histamine, TNF, C5a, IL-6, -9, -18, -31, -33, TSLP, neopterin, and VEGF are not elevated in chronic spontaneous urticaria], [Journal of Dermatological Science], [2013]

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche über mögliche Biomarker bei der chronisch spontanen Urticaria, Durchführung der Messungen, Analyse und Interpretation der Ergebnisse. Mitarbeit und kritische Revision des Manuskriptes.

**Publikation 4:** [Krause K, Krull C, Kessler B, Lange-Asschenfeldt B, Maurer M, Metz M], [Effective control of recalcitrant pruritus by bevacizumab: a possible role for vascular endothelial growth factor in chronic itch?], [Acta Dermatologica et Venereologica],

[2013]

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Messungen von VEGF im Serum. Durchführung der Färbung. Erstellung der Graphiken. Zusammenfassen von Informationen aus den Krankenakten der Patienten. Mitarbeit und kritische Revision am Manuskript.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## **Druckexemplare der ausgewählten Publikationen**

Krull C, Schoepke N, Ohanyan T, Brachaczek M, Maurer M, Lange-Asschenfeldt B, et al. Increased angiogenesis and VEGF expression correlates with disease severity in prurigo patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. 2016;30(8):1357-61.

DOI-Verlinkung: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.13406>











Metz M, Krull C, Hawro T, Saluja R, Groffik A, Stanger C, et al. Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(11):2833-6.

DOI-Verlinkung: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.226>







Metz M, Krull C, Maurer M. Histamine, TNF, C5a, IL-6, -9, -18, -31, -33, TSLP, neopterin, and VEGF are not elevated in chronic spontaneous urticaria. *Journal of dermatological science*. 2013;70(3):222-5.

DOI-Verlinkung: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.03.003>









## CLINICAL REPORT

# Effective Control of Recalcitrant Pruritus by Bevacizumab: A Possible Role for Vascular Endothelial Growth Factor in Chronic Itch?

Karoline KRAUSE, Clemens KRULL, Birgit KESSLER, Bernhard LANGE-ASSCHENFELDT, Marcus MAURER and Martin METZ  
*Allergie-Centrum-Charité, Department of Dermatology and Allergy, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany*

**Prurigo is a difficult to treat condition characterized by severe pruritus presenting with chronic secondary scratch lesions. We report here a dramatic improvement in pruritus in a patient with prurigo simplex who was being treated with bevacizumab, a monoclonal vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody. On the basis of the increased VEGF expression measured in the skin of this patient, serum levels of VEGF were subsequently analysed in 27 consecutive patients with prurigo and 19 healthy controls. VEGF levels were significantly increased in the serum of patients with prurigo. Moreover, VEGF concentrations correlated with physician-assessed disease activity. Based on these observations, we speculate that VEGF is involved in the pathophysiology of prurigo. Key words: VEGF, pruritus, itch, prurigo.**

Accepted May 23; Epub ahead of print Aug 29, 2012

Acta Derm Venereol 2013; 93: 175–179.

Martin Metz, Allergie-Centrum-Charité, Department of Dermatology and Allergy, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, DE-10117 Berlin, Germany. E-mail: martin.metz@charite.de

Chronic pruritus, i.e. itching for longer than 6 weeks, is a major therapeutic problem, which can have a severe impact on quality of life. According to the International Forum for the Study of Itch (IFSI), chronic pruritus should be classified as: (i) pruritus on inflamed skin, (ii) pruritus on non-inflamed skin, and (iii) pruritus presenting with chronic secondary scratch lesions (1). The last group consists mainly of patients with prurigo, a condition that is frequently associated with chronic itching that is refractory to therapy, and which may continue for several years. Prurigo can present either with hyperkeratotic nodules as prurigo nodularis or without nodules as prurigo simplex. In some patients with prurigo the severe pruritus can be associated with different dermatological or systemic diseases. Iking and colleagues reported recently that in 87% of patients with prurigo nodularis, an underlying disease can be detected (2). Reported underlying diseases range from various dermatological diseases, metabolic diseases, hepatic or renal diseases to malignancies and psychological factors (2). However, the pathomechanisms underlying chronic itch in prurigo are

largely unknown, regardless of the potential underlying disease. Fukushi et al. (3) demonstrated recently that a high rate of STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) and STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) activation can be detected in the epidermis of patients with prurigo nodularis, indicating a potential role for Th2 cytokines and other unknown factors leading to STAT3 activation in prurigo nodularis.

Lack of knowledge of the pathophysiological mechanisms responsible for prurigo means that no efficient, targeted therapy is available. Therefore, the management of patients with prurigo is often difficult and frustrating for both patients and physicians. Although various therapeutic approaches have been reported, efficient and safe long-term treatment remains challenging. Current therapy consists mainly of topical anti-inflammatory treatment with potent steroids and additional ultraviolet (UV) therapy. To obtain a long-term improvement in the patients' symptoms, systemic anti-pruritic treatment is usually necessary. As antihistamines are not sufficient to suppress pruritus in these patients, immunosuppressive therapies, such as cyclosporine and various off-label drugs, for example anticonvulsants, opioid receptor antagonists, intravenous immunoglobulins, thalidomide or anti-emetics, have been used with varying results (4–7).

The observation of antipruritic effects of drugs targeting specific pathways in patients with chronic pruritus may shed light on some of the relevant signals in the condition and lead to more detailed studies aimed at identifying potential underlying mechanisms.

We report here a dramatic improvement in pruritus in a patient with prurigo with newly diagnosed breast cancer treated with a vascular endothelial growth factor (VEGF) antagonist. This observation led us to investigate further the potential role of VEGF in prurigo. VEGF and its receptors are known to be pro-angiogenic under physiological and pathological conditions. Furthermore, VEGF has been shown to be involved in the progression of various cancers, and VEGF inhibitors are used in the treatment of different types of cancer (8). Bevacizumab is a humanized monoclonal antibody targeting VEGF and thereby inhibiting its activity. It is approved in combination with chemotherapy for the treatment of many advanced cancers, for example colorectal cancer, non-small cell lung cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, and glioblastoma multiforme (9, 10).

## MATERIALS AND METHODS

## Patients

Apart from 1 patient for whom data was collected retrospectively (see Case report), we prospectively evaluated a total of 27 consecutive patients with prurigo who were admitted to our department (12 males, 15 females, mean age 70.6 years), and 19 healthy volunteers. Serum was collected from all patients and healthy controls. Disease activity of prurigo was assessed by the attending physician on the ward prior to VEGF analysis. Disease activity was based on skin status (e.g. number and area of scratch lesions, erosions/ulcerations) and overall well-being of the patient, and was scored on a scale from 0 (no apparent disease) to 10 (maximum disease severity). Itch intensity was documented using a verbal rating scale (0–10, 0 = no itch, 10 = worst itch imaginable) at the time of admission. Laboratory analyses (in all patients) and histological analyses (in 13 patients) were performed during routine diagnostic workup. Blood eosinophilia was defined as eosinophil counts above 0.85/nl, and occurrence of eosinophils in lesional skin was defined as tissue eosinophilia. Written informed consent was given by all patients and healthy controls. The study was approved by the local ethics committee.

## Immunohistochemistry

VEGF-immunoreactivity was studied in 5- $\mu$ m paraffin sections of lesional skin using a primary mouse monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, USA) and the Dako REAL TM Detection System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Slides were then counterstained with Papanicolaou's 1a Harris' haematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany).

## Vascular endothelial growth factor measurement

The concentration of VEGF in the serum was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). Standards and samples were assayed in duplicate. The assay's detection limit is <10 pg/ml.

## Statistical analyses

For comparison of VEGF levels in healthy individuals and patients with prurigo and with different clinical characteristics, an unpaired Student's *t*-test was used. For correlational analysis of VEGF levels and disease activity or itch intensity, Pearson's correlation coefficient was calculated. For all analyses, a *p*-value <0.05 was considered significant.

## RESULTS

## Case report of effective anti-vascular endothelial growth factor treatment of prurigo simplex

A 68-year-old woman with prurigo simplex since 2004, presented to our outpatient itch clinic in 2008 with severe chronic pruritus and a massive reduction in quality of life. Since 2004, the patient had received numerous systemic drugs, including various antihistamines, azathioprine, cyclosporine, gabapentin, and paroxetine, none of which had any significant effect. At that time, no underlying diseases had been identified.

In June 2009, the patient was diagnosed with a fast-growing breast cancer and was enrolled into the GeparQuinto

trial, a neoadjuvant chemotherapy regimen for primary breast cancer (11). Under the study protocol, the patient received 4 3-week cycles of epirubicin (an anthracycline cytostatic agent; 90 mg/m<sup>2</sup>), cyclophosphamide (an alkylating agent; 600 mg/m<sup>2</sup>) and bevacizumab (Avastin® Roche, Welwyn Garden City, UK, a humanized anti-VEGF monoclonal antibody; 15 mg/kg), followed by 4 3-week cycles of docetaxel (Taxotere® Sanofi-Aventis, Antony Cedex, France, a taxane chemotherapeutic; 100 mg/m<sup>2</sup>) and again bevacizumab (15 mg/kg), and subsequently underwent surgery. During chemotherapy, the patient received anti-emetic drugs (ondansetron, a serotonin receptor antagonist and aprepitant, a neurokinin-1-receptor antagonist). The severe pruritus, which constantly had the highest ratings on a verbal rating scale of itch severity, resolved after initiation of this treatment and was almost completely absent throughout the 8 cycles (Fig. 1). The patient reported the return of only mild itch towards the end of each cycle. At the end of the treatment the chronic secondary scratch lesions were virtually absent. After chemotherapy and tumour resection, the patient was considered tumour-free and, to date, has not developed metastasis or tumour recurrence. The pruritus, however, returned to maximal levels within 2 months after the end of docetaxel and bevacizumab treatment, indicating that the control of her chronic pruritus was not due to the anti-tumour effects of the therapy.

We hypothesized that the relief of her pruritus was due to the application of either the anti-VEGF antibody bevacizumab, which was the only drug given throughout the complete 8-cycle chemotherapy regimen, or the anti-emetics ondansetron and aprepitant. We first initiated treatment with ondansetron, which did not reduce itching in our patient. Subsequent treatment with aprepitant, which has been shown previously to be an efficient anti-pruritic drug in some patients (7), also did not improve the pruritus. This indicates that the blockade of VEGF by bevacizumab was likely to

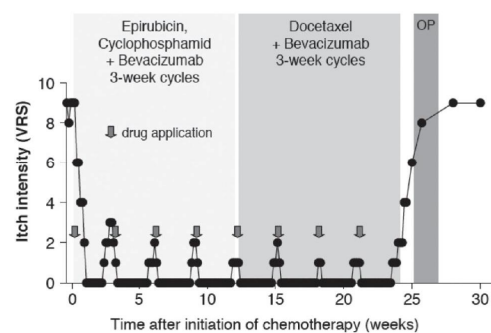


Fig. 1. Suppression of severe chronic pruritus during bevacizumab treatment. Itch intensity was assessed using a verbal rating scale (VRS) ranging from 0 (no itch at all) to 10 (maximum itch imaginable). Itch intensity was assessed retrospectively and thus reflects only an approximate estimation. OP: surgery.

be the cause of the abrogation of pruritus, although a placebo effect cannot be ruled out. We were not able to directly prove that VEGF blockade was responsible for the anti-pruritic effect, as the patient experienced severe, bevacizumab-induced side-effects after the chemotherapy and an additional bevacizumab infusion was contraindicated.

*Vascular endothelial growth factor levels are increased in patients with prurigo*

To determine whether increased expression of VEGF was detectable in our patient, we analysed VEGF expression in a skin biopsy obtained approximately one year prior to the chemotherapy. Using immunohistochemistry, strong expression of VEGF was detected in lesional epidermis of the patient (Fig. 2a), while only weak staining was observed in non-prurigo control skin (Fig. 2b).

Next, we aimed to characterize further the role and relevance of VEGF in prurigo, and assessed serum levels of VEGF in patients with prurigo in comparison with healthy controls. Overall, 27 inpatients with prurigo nodularis or prurigo simplex with different underlying diseases, such as chronic kidney disease, hepatic diseases, haematological malignancies or unknown causes of pruritus, and 19 healthy individuals were assessed for VEGF serum levels, eosinophilia, and disease activity. Patients with prurigo exhibited 4-fold higher VEGF levels than healthy controls ( $191.9 \pm 38.5$  pg/ml vs.  $48.7 \pm 8.4$  pg/ml,  $p < 0.001$ ; Fig. 3a), and VEGF concentrations correlated with levels of physician-assessed disease activity (Fig. 3b). Severity of pruritus alone, as assessed by a patient-based verbal rating scale ranging from 0 (no itch) to 10 (maximal itch imaginable), showed a similar trend, but this correlation did not reach statistical significance (Fig. 3c). While none of the underlying diseases was clearly associated with increased VEGF serum levels, patients with atopy displayed slightly higher VEGF concentrations than those without atopy ( $315 \pm 97$  vs.  $130 \pm 23$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 3d). As atopic dermatitis is often associated with eosinophilia, and since eosinophils are known to produce

VEGF (12), we hypothesized that eosinophils might be responsible for the elevated VEGF levels. Therefore, we compared VEGF concentrations in patients with or without eosinophilia in the blood and with or without eosinophils in skin tissue. In all patients, the number of eosinophils in the blood ranged from 0.08/nl to 3.39/nl. Counts above 0.85/nl were considered as blood eosinophilia and any occurrence of eosinophils in the skin biopsy was defined as tissue eosinophilia. Overall, we identified some patients with blood (8 of 27, 29.6%) or tissue eosinophilia (5/13, 38.5%) but we did not detect any significant differences in VEGF levels between these groups (Fig. 3e and f). Furthermore, a comparison of patients with prurigo presenting with hyperkeratotic pruritic nodules (prurigo nodularis) and those without (prurigo simplex) revealed no significant differences in VEGF levels between these 2 subtypes.

## DISCUSSION

To our knowledge this is the first report indicating that a pharmacological blockade of VEGF might efficiently suppress severe, therapy-refractory pruritus. Our data indicates that VEGF may be an important factor in the pathogenesis of chronic itch, at least in patients with prurigo.

The aetiology of prurigo is largely unknown, and it is still a matter of debate whether it is a separate entity or the result of a vicious circle of itching and scratching originally induced by different pruritogenic stimuli (2). It is possible that the increased VEGF levels detected in the serum of prurigo patients are secondary to skin damage and that VEGF may be involved in the chronic pruritus associated with prurigo, but not in the initial acute pruritus that led to the skin lesions. It has been shown previously that VEGF is constitutively expressed at low levels in epidermal keratinocytes (13, 14), and mechanical manipulation may stimulate keratinocytes to enhance VEGF production. It would therefore be interesting to investigate whether patients with prurigo exhibit increased expression of VEGF and/or VEGF receptor in both lesional and non-lesional skin.

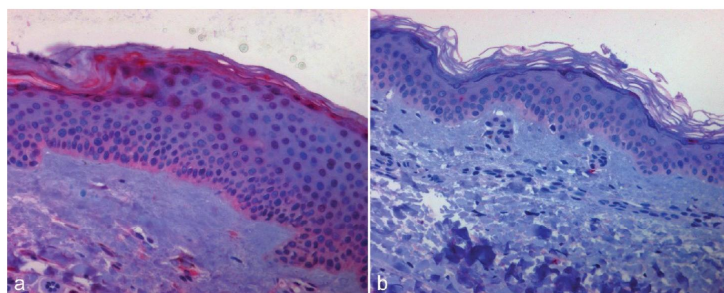


Fig. 2. Increased expression (red colour) of vascular endothelial growth factor (VEGF) in lesional prurigo skin (a) compared to healthy control skin (b).

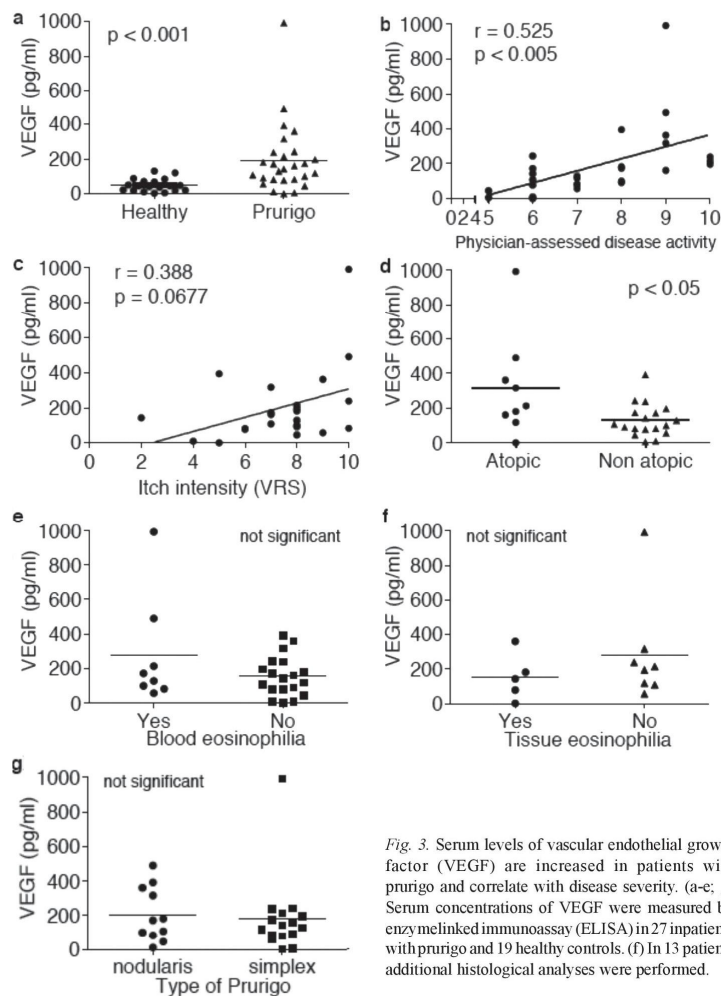


Fig. 3. Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) are increased in patients with prurigo and correlate with disease severity. (a-e; g) Serum concentrations of VEGF were measured by enzyme-linked immunoassay (ELISA) in 27 inpatients with prurigo and 19 healthy controls. (f) In 13 patients additional histological analyses were performed.

How VEGF might contribute to severe pruritus is currently unknown. It has been postulated that activation of STAT6 by Th2 cytokines and STAT3 by unknown stimuli in the skin of patients is responsible for prurigo symptoms (3). Interestingly, VEGF is a known activator of STAT3 (15) and could therefore represent this unknown factor. Furthermore, VEGF has been shown to induce the production of autotaxin (16). Lysophosphatidic acid, an enzymatic product of autotaxin, has recently been demonstrated to be an important effector in pruritus associated with cholestasis (17). It would therefore be interesting to assess VEGF in these patients and correlate VEGF with autotaxin levels. In other causes of chronic pruritus, such as uraemia, Hodgkin's disease or atopic dermatitis, no increase in autotaxin has been

observed (17); therefore other mechanisms must be relevant in these diseases. It should also be noted that chronic pruritus in other diseases may not be associated with VEGF at all. For example, it was recently reported that pruritus associated with primary myelofibrosis does not correlate with VEGF levels (18). Future studies are necessary to determine whether keratinocytes are the primary source of VEGF or to identify other cellular sources responsible for the elevated VEGF levels in patients with prurigo. Furthermore, the pathomechanisms of VEGF-induced itch require further detailed investigation, and VEGF-mediated effects, i.e. on vasculature, in the skin of patients with prurigo should be characterized. Furthermore, based on our findings, anti-VEGF could present a potential new therapy in prurigo. To this end,

placebo-controlled clinical trials with drugs blocking VEGF activity are required. Apart from the monoclonal antibody bevacizumab, other drugs blocking VEGF or VEGF receptors are currently used in anti-tumour therapy (i.e. the kinase inhibitors sunitinib and sorafenib or the VEGF-trap aflibercept) (8).

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded in part by Dr med. Otto Eppenauer, MD, and Lieselotte Gutzeit Stiftung. We thank Marina Frömming and Sascha Petz for excellent technical assistance.

*The authors declare no conflicts of interest.*

#### REFERENCES

1. Ständer S, Weisshaar E, Mettang T, Szepietowski JC, Carstens E, Ikoma A, et al. Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch. *Acta Derm Venereol* 2007; 87: 291–294.
2. Iking A, Grundmann S, Chatzigeorgakidis E, Phan NQ, Klein D, Ständer S. Prurigo as a symptom of atopic and non-atopic diseases: aetiological survey in a consecutive cohort of 108 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (in press).
3. Fukushi S, Yamasaki K, Aiba S. Nuclear localization of activated STAT6 and STAT3 in epidermis of prurigo nodularis. *Br J Dermatol* 2011; 165: 990–996.
4. Feldmeyer L, Werner S, Kamarashev J, French LE, Hofbauer GF. Atopic prurigo nodularis responds to intravenous immunoglobulins. *Br J Dermatol* 2012; 166: 461–462.
5. Hammes S, Hermann J, Roos S, Ockenfels HM. UVB 308-nm excimer light and bath PUVA: combination therapy is very effective in the treatment of prurigo nodularis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 799–803.
6. Metz M, Ständer S. Chronic pruritus – pathogenesis, clinical aspects and treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 1249–1260.
7. Ständer S, Siepmann D, Herrgott I, Sunderkötter C, Luger TA. Targeting the neurokinin receptor 1 with aprepitant: a novel antipruritic strategy. *PLoS One* 2010; 5: e10968.
8. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharmaceut Bull* 2011; 34: 1785–1788.
9. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Rev Drug Discovery* 2004; 3: 391–400.
10. Ranpura V, Hapani S, Wu S. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *JAMA* 2011; 305: 487–494.
11. von Minckwitz G, Eidtmann H, Loibl S, Blohmer JU, Costa SD, Fasching PA, et al. Integrating bevacizumab, everolimus, and lapatinib into current neoadjuvant chemotherapy regimen for primary breast cancer. Safety results of the GeparQuinto trial. *Ann Oncol* 2011; 22: 301–306.
12. Horiuchi T, Weller PF. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 70–77.
13. Kakurai M, Demitsu T, Umemoto N, Kobayashi Y, Inoue-Narita T, Fujita N, et al. Vasoactive intestinal peptide and inflammatory cytokines enhance vascular endothelial growth factor production from epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol* 2009; 161: 1232–1238.
14. Smith JR, Lanier VB, Brazziel RM, Falkenhagen KM, White C, Rosenbaum JT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea. *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 226–229.
15. Wang H, Byfield G, Jiang Y, Smith GW, McCloskey M, Hartnett ME. VEGF-mediated STAT3 activation inhibits retinal vascularization by down-regulating local erythropoietin expression. *Am J Pathol* 2012; 180: 1243–1253.
16. Ptaszynska MM, Pendrak ML, Stracke ML, Roberts DD. Autotaxin signaling via lysophosphatidic acid receptors contributes to vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 309–321.
17. Kremer AE, Dijk RV, Leckie P, Schaap FG, Kuiper EM, Mettang T, et al. Serum autotaxin is increased in pruritus of cholestasis, but not of other origin and responds to therapeutic interventions. *Hepatology* 2012; 56: 1391–1400.
18. Vaa BE, Wolanskyj AP, Roeker L, Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, et al. Pruritus in primary myelofibrosis: clinical and laboratory correlates. *Am J Hematol* 2012; 87: 136–138.



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Komplette Publikationsliste

### *Veröffentlichungen in peer-reviewed journals*

Krull C, Schoepke N, Ohanyan T, Brachaczek M, Maurer M, Lange-Asschenfeldt B, et al. Increased angiogenesis and VEGF expression correlates with disease severity in prurigo patients. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV. 2016;30(8):1357-61. (Impact Factor: 2.8)

Metz M, Krull C, Hawro T, Saluja R, Groffik A, Stanger C, et al. Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. The Journal of investigative dermatology. 2014;134(11):2833-6. (Impact Factor: 7.2)

Metz M, Krull C, Maurer M. Histamine, TNF, C5a, IL-6, -9, -18, -31, -33, TSLP, neopterin, and VEGF are not elevated in chronic spontaneous urticaria. Journal of dermatological science. 2013;70(3):222-5. (Impact Factor: 3.4)

Krause K, Krull C, Kessler B, Lange-Asschenfeldt B, Maurer M, Metz M. Effective control of recalcitrant pruritus by bevacizumab: a possible role for vascular endothelial growth factor in chronic itch? Acta dermato-venereologica. 2013;93(2):175-9. (Impact Factor: 3.0)

### *Kongressbeiträge*

Krull C, Maurer M, Metz M. Why do we still not have a biomarker for chronic spontaneous urticaria? (4th International Consensus Meeting on Urticaria 2012, 28-29 November 2012, Berlin, GERMANY)

### *Posterpräsentation:*

Krull C, Maurer M, Lange-Asschenfeldt B, Metz M. A role for VEGF in prurigo? Blood level and expression in the skin is increased and correlates with vascular remodelling and disease activity (International Investigative Dermatology Meeting; MAY 08-11, 2013; Edinburgh, SCOTLAND)

Krull C, Maurer M, Lange-Asschenfeldt B, Metz M. Increased VEGF expression and enhanced vascular remodelling in the skin of patients with prurigo (40th Annual Meeting of the Association-of-Dermatological-Research; MAR 14-16, 2013; Dessau, GERMANY)

## **Danksagung**

Ich danke allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Charité, die mir bei meiner Dissertation geholfen haben und diese ermöglicht haben.

Dies gilt insbesondere für Prof. Dr. Martin Metz, Prof. Dr. Marcus Maurer und PD. Dr. med. Bernhard Lange-Asschenfeldt.

Bei Evelin Hagen möchte ich mich für die exzellente technische Unterstützung bei der Arbeit im Labor bedanken.

Ich danke meinen Eltern. Besonders meiner Mutter Susanne, die sich über die Fertigstellung dieser Arbeit mehr gefreut hätte als ich selbst. Sonst dem Rest der Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.