

Aus dem

Charité Centrum für Innere Medizin und Dermatologie
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfram Sterry

Habilitationsschrift

Modulation der kutanen Angiogenese bei Entzündung und Wundheilung

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Dermatologie und Venerologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Bernhard Lange-Asschenfeldt

geboren am 25. Mai 1970 in Eckernförde

Eingereicht: Februar 2009

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Hertl

2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Zillikens

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1 Das Blutgefäßsystem der Haut	5
1.2 Vaskulogenese und Angiogenese der Haut	5
1.3 Endogene Angiogeneseinhibitoren der Haut	6
1.3.1 Thrombospondin 1 (TSP-1) als endogener Angiogeneseinhibitor der Haut	6
1.3.2 Thrombospondin 2 (TSP-2) als endogener Angiogeneseinhibitor der Haut	7
1.4 Lymphangiogenese der Haut	7
1.5 Angiogenese in der kutanen Wundheilung	8
1.6 Angiogenese in der kutanen Entzündung	8
1.7. Zielsetzung der Arbeit	9
1.7.1 Fragen zur Rolle der Angiogenese in der Wundheilung	9
1.7.2 Fragen zur Rolle der Angiogenese in der Entzündung	10
2. Methoden und Ergebnisse eigener Studien	11
2.1 Untersuchungen zur Angiogenese in der kutanen Wundheilung	11
2.1.1 Untersuchungen zur Rolle von VEGF-A in der kutanen Wundheilung (Arbeit 1)	12
2.1.2. Einfluss der Angiogeneseinhibition durch Vasostatin auf die Wundheilung (Arbeit 2)	33
2.2 Untersuchungen zur Angiogenese in der kutanen Entzündung	40
2.2.1 Untersuchungen zur Rolle von TSP-1 in der kutanen Entzündung (Arbeit 3)	41
2.2.2. Untersuchungen zur Rolle von TSP-2 in der allergischen Kontaktdermatitis (Arbeit 4)	50
2.2.3 Effekt der systemischen Applikation von Vasostatin auf die kutane Entzündung (Arbeit 5)	59
3. Diskussion	70
3.1 Einfluss proangiogener und antiangiogener Faktoren auf die kutane Wundheilung	70
3.2 Einfluss antiangiogener Faktoren auf die kutane Entzündung	73
4. Zusammenfassung	78
5. Literaturverzeichnis	80
Danksagung	83
Erklärung	85

Abkürzungsverzeichnis

Ang	angiopoietin
BV	blood vessels
cDNA	complementary DNA
CHS	contact hypersensitivity
EBD	Evans Blue dye
EC	endothelial cell
ECM	extracellular matrix
FGF-2	basic fibroblast growth factor
Flk-1	fetal liver kinase 1 (mouse VEGFR-2)
Flt-1	<i>fms</i> -like tyrosine kinase 1 (VEGFR-1)
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin
KDR	kinase insert domain containing receptor (human VEGFR-2)
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
MIP-2	macrophage inflammatory protein 2
MMP	matrix metalloproteinase
PBGD	porphobilinogen deaminase
PCR	polymerase chain reaction
PDGF-BB	platelet-derived growth factor BB
PIGF	placenta-derived growth factor
RT	reverse transcription
SEM	standard error of the mean
Tie-2	tunica interna endothelial cell kinase (Tek)
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TSP	thrombospondin
TSR	thrombospondin type-1 (properdin-like) repeat
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF receptor

1. Einleitung

1.1 Das Blutgefäßsystem der Haut

Das Blutgefäßsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung vitaler physiologischer Prozesse, wie der Versorgung der Haut mit Nährstoffen, der Rekrutierung von Zellen des Immunsystems und der Kontrolle der Thermoregulation. Um diesen Funktionen gerecht zu werden, kann die Blutzirkulation in der Haut auf das 10-20 fache gegenüber Normalbedingungen gesteigert werden. Die kutanen Blutgefäße sind in zwei miteinander engmaschig verbundenen Plexus angeordnet und bestehen aus Arteriolen, venösen Kapillaren und postkapillären Venolen. Während im tieferen Plexus zahlreiche Arterien und Sammelvenen lokalisiert sind, dominieren postkapilläre Venolen im oberflächlichen Plexus. Endothelzellen sind mesenchymaler Abkunft und nehmen im Organismus eine Gesamtoberfläche von 6300 m² ein. Sie verfügen über ein reichhaltiges Instrumentarium, bestehend aus Adhäsionsmolekülen, Gerinnungsfaktoren und zahlreichen Mediatoren, und werden bei ihren Aufgaben von Nachbarzellen, wie den Perizyten, glatten Muskelzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen unterstützt, mit denen sie gemeinsam eine funktionelle mikrovaskuläre Einheit bilden. Die mikrovaskulären Endothelzellen der postkapillären Venolen nehmen eine zentrale Stellung in der Haut ein, da sie über eine hohe Reagibilität verfügen und die niedrige Fließgeschwindigkeit Interaktionen zwischen Blutzellen und Endothelzellen ermöglicht. Sie sind für die Einleitung und Aufrechterhaltung entzündlicher Vorgänge, der Gerinnung und der Wundheilung verantwortlich.

1.2 Vaskulogenese und Angiogenese der Haut

Die Entwicklung des Blutgefäßsystems beinhaltet zahlreiche Schritte, die im Embryo mit der Differenzierung von Vorläuferzellen (Angioblasten) in Endothelzellen beginnen und nach einigen Umstrukturierungen in der Ausbildung erster Blutgefäße münden (Vaskulogenese). Dieses einfache Netzwerk reift durch verschiedene Wachstumsvorgänge der Endothelzelle zu einem differenzierten Gefäßsystem heran (Angiogenese). Angiogenese beinhaltet verschiedene Formen des Gefäßwachstums, wie das Aussprossen von Kapillaren aus bereits existenten Gefäßen, Wachstum durch Septen- und Brückenbildung und Einlagerung von zirkulierenden Endothelvorläuferzellen aus dem Blutstrom. Darüber hinaus gehört zur Angiogenese der Reifungsprozess der Gefäße durch Anlagerung von glatten Muskelzellen und Perizyten an die Endothelzellen, die somit erst ihre volle Funktionstüchtigkeit erreichen. Diese Assoziation von Endothelzellen mit Perizyten und glatten Muskelzellen ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität, indem diese Zellen die Permeabilität und den aktiven Transport von Zellen des Immunsystems bewerkstelligen. Neben der Beteiligung am Wachstumsprozess kommt der Angiogenese eine bedeutende Rolle beim Haarwachstum und beim Aufbau der Uterusschleimhaut zu. Die Angiogenese stellt aber auch einen fundamentalen Vorgang in der Genese pathologischer Prozesse dar, z.B. im Rahmen von chronisch entzündlichen Prozessen, Wundheilung oder Tumorwachstum (sekundäre Angiogenese) (1-3). Es ist eine Vielzahl proangiogener Faktoren verschiedener Herkunft bekannt. Aus der Menge der Angiogenesefaktoren der Haut sind vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (4-6), placenta-derived growth factor (PlGF), fibroblast growth factor 2 (FGF-2), Angiopoietin 2 (Ang-2), und Interleukin 8 (IL-8)

besonders hervorzuheben (7). Das Heparin-bindende homotrimere Glykoprotein VEGF-A bindet an zwei verschiedenen Typ-III-Tyrosin-Kinase Rezeptoren der Endothelzellen, Flt-1 und KDR/Flk-1. VEGF-A nimmt neben PlGF eine wichtige Rolle als Angiogenesefaktor in der kutanen Entzündung (8, 9) und im Rahmen des Tumorwachstums (10-12) ein. Ein besonderes Charakteristikum in der Pathophysiologie der Wundheilung stellt die im Gewebe vorherrschende Hypoxie und die damit verbundene gesteigerte Expression von VEGF-A dar (13). VEGF-A wurde in hoher Konzentration in Wundflüssigkeiten gefunden (14). Außerdem konnte eine starke Expression von VEGF-A in epidermalen Keratinozyten nachgewiesen werden, die für die Hyperpermeabilität der Gefäße in der frühen Phase der Wundheilung und die Neovaskularisation des Granulationsgewebes verantwortlich gemacht wurde (4). Vaskulogenese und Angiogenese stellen essentielle Prozesse für die Entstehung eines reifen Gefäßsystems im Embryo dar und sind bis auf wenige Ausnahmen nicht mehr im erwachsenen Organismus vorzufinden. Lediglich in einigen bedeutsamen physiologischen und pathologischen Prozessen wie dem weiblichen Reproduktionszyklus, der Wundheilung, der Entzündung und dem Tumorwachstum, die eine erhöhte Stoffwechsellage im Gewebe nach sich ziehen, stellt die Angiogenese eine fundamentale Komponente dar.

1.3 Endogene Angiogeneseinhibitoren der Haut

Nach derzeitigem Wissenstand lässt sich die Stabilität des Gefäßsystems der Haut unter physiologischen Bedingungen auf ein ausgewogenes Verhältnis endogener Angiogenesestimulatoren und –inhibitoren zurückführen (15). Es wird vermutet, dass Angiogeneseinhibitoren von epidermalen und dermalen Zellen gebildet und in der extrazellulären Matrix sowie in der Basalmembran der Gefäße abgelagert werden und dort für die Unterdrückung proangiogener Prozesse verantwortlich sind. Während bereits einige Erkenntnisse über die Funktion und Regulation von Angiogenesefaktoren in der Haut vorliegen, ist bisher wenig über die Expression und Funktion endogener Angiogeneseinhibitoren bekannt. In den letzten Jahren wurden einige dieser endogenen Angiogeneseinhibitoren, darunter Thrombospondin 1 (16), Endostatin (17), Angiostatin (18) und Thrombospondin 2 (TSP-2) (19) beschrieben. Das Vorkommen und die Bedeutung dieser Angiogeneseinhibitoren in der Haut sind derzeit noch nicht für alle genannten Peptide geklärt, jedoch scheint den Thrombospondinen in der Haut eine essentielle Bedeutung zuzukommen. Um den Ablauf einer kutanen Wundheilung unter dem Einfluß eines potenten Angiogeneseinhibitoren zu untersuchen, entschlossen wir uns die Substanz Vasostatin in unseren Experimenten zur Anwendung zu bringen. Vasostatin ist ein aus 180 Aminosäuren bestehendes Fragment des Calretikulins, dessen ausgesprochene antiangiogene Potenz in zahlreichen Versuchen zur Inhibition des Tumorwachstums gezeigt werden konnte. Vasostatin ist ein stabiles Peptid und steht in ausreichenden Mengen für experimentelle Anwendungen zur Verfügung (20-23).

1.3.1 Thrombospondin 1 (TSP-1) als endogener Angiogeneseinhibitor der Haut

TSP-1 ist ein matrizelluläres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 450kD, welches zuerst aus den α -Granula der Thrombozyten isoliert wurde. Es wird von einer Vielzahl von Zellen, darunter Keratinozyten (24) und Fibroblasten (25), sezerniert. TSP-1 inhibiert die Endothelzellproliferation (26-30) und -migration (26, 31), sowie die Ausbildung kapillärer Lumina (32). Das intakte TSP-1-Molekül bindet an mindestens 12 verschiedene

Rezeptoren, von denen sich viele auf der Oberfläche der Endothelzellen befinden (33, 34). Zu diesen Rezeptoren gehören CD36, auch Glykoprotein IV genannt, $\alpha\beta 3$ -Integrin und CD47 (Integrin-assoziiertes Protein). Der CD36-Rezeptor scheint für die Inhibition des Endothelzellwachstums *in vitro* verantwortlich zu sein (35). Alternative Wirkungsmechanismen des TSP-1 könnten u.a. in der beschriebenen TSP-1-vermittelten TGF β -Aktivierung liegen (36). Die besondere Rolle von TSP-1 als kutaner Angiogeneseinhibitor der Haut (37) wurde mittlerweile durch zahlreiche Experimente unterstrichen. Im Tiermodell führte die Transfektion von Tumorzellen mit TSP-1 zu einer signifikanten Hemmung der Angiogenese und damit des Tumorwachstums (38). Thrombospondin 1-transgene Tieren entwickelten in Karzinogenesestudien signifikant weniger Papillome (39). Die Fähigkeit von TSP-1 zur Unterdrückung der Angiogenese wird dabei im wesentlichen für dessen antitumorale Wirksamkeit verantwortlich gemacht (16, 40-42). Während die Angiogenese-kontrollierende Bedeutung von TSP-1 in der kutanen Wundheilung u.a. durch unsere Arbeitsgruppe erforscht wurde (43), fehlen noch weitgehend Einblicke zur Wirkung von TSP-1 auf die kutane Entzündung.

1.3.2 Thrombospondin 2 (TSP-2) als endogener Angiogeneseinhibitor der Haut

Der Angiogeneseinhibitor Thrombospondin 2 (TSP-2) ist ein in der Haut vorkommendes 420kD großes homotrimeres Glykoprotein der extrazellulären Matrix (44). TSP-2 wird in normaler Haut in der dermoepidermalen Zone exprimiert und trägt wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung der antiangiogenen Barriere bei, die die avaskuläre Epidermis von der stark vaskularisierten Dermis trennt (37). Die Expression von TSP-2 ist darüber hinaus in der frühen Phase der Bindegewebsentwicklung des Knorpels und der Knochen zu finden (45). TSP-2-defiziente Tiere weisen eine verstärkt vaskularisierte Dermis (46) und eine beschleunigte Wundheilung (47) auf. TSP-2 ist auch in der Lage, das Wachstum von Tumoren zu inhibieren (19) und die Tumorbildung im Rahmen der experimentellen Karzinogenese zu reduzieren (48). Inwieweit TSP-2 eine Funktion in der Wundheilung oder der Entzündung übernehmen könnte wurde bisher nur unzureichend erforscht.

1.4 Lymphangiogenese der Haut

Die Bedeutung der Lymphgefäße bei der Aufrechterhaltung des interstitiellen Gewebedruckes und beim Transport von Immunzellen legen einen Einfluss dieser Gefäße in der kutanen Entzündung und der Wundheilung nahe. Nach derzeitigem Wissenstand entwickeln sich Lymphendothelzellen aus Endothelzellen der Blutgefäße oder Vorläuferzellen, die sich zwischen den Endothelzellen befinden (49). Weitere Studien zeigen, dass Endothelzellen in Blutgefäßen zu Lymphendothelzellen umprogrammiert werden können (50). Die vor kurzem entdeckten spezifischen Marker für lymphatische Gefäße, wie der Hyaluron-Rezeptor LYVE-1(51) und das Homeobox Gen Prox1 (52), versprechen jedoch erstmalig eine präzise Untersuchung der Lymphangiogenese, die jüngsten Entdeckungen zufolge spezifisch durch die Expression von vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) und vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) induziert werden soll. VEGF-C bindet an den Flt-4 (VEGFR-3)-Rezeptor, welcher nach derzeitigem Wissenstand ausschließlich auf der Oberfläche von lymphatischen Endothelien vorzufinden ist (53). VEGF-C und VEGF-D scheinen wichtige Funktionen für das Metastasierungsverhalten von Tumoren einzunehmen (54, 55), wobei die Funktion und Regulation dieser Faktoren im kutanen

Entzündungsgeschehen bisher noch nicht geklärt werden konnte. Der Einfluss von VEGF-A auf das Lymphgefäßsystem waren zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen noch weitgehend unerforscht. Ersten Untersuchungen zufolge, scheint auch VEGF-A das Wachstum von Lymphgefäßen zu induzieren (56). Weiterhin wurden bislang noch keine spezifischen Inhibitoren der Lymphangiogenese identifiziert.

1.5 Angiogenese in der kutanen Wundheilung

Kutane Wunden sind durch die Entwicklung eines extrem vaskularisierten Granulationsgewebes gekennzeichnet, um den hohen Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen der schnell proliferierenden und migrierenden Fibroblasten und Keratinozyten decken zu können (57-59). Darüber hinaus werden über das Gefäßsystem des Granulationsgewebes eine Vielzahl von Zellen des Immunsystems zur Abwehr mikrobieller Erreger in die Wunde transportiert. Zahlreiche Untersuchungen führten zu der Annahme, dass die Vaskularisation der Wunde eine Schlüsselfunktion im Wundheilungsprozess einnimmt und die Förderung der Angiogenese die Wundheilung zu beschleunigen vermag (60). Eine Vielzahl von Zytokinen mit proangiogener Wirkung, wie fibroblast growth factor 2 (FGF-2), insulin-like growth factor (IGF-1), epidermal growth factor (EGF) und tumor necrosis factor α (TNF α) werden im Rahmen des Wundheilungsprozesses exprimiert (59-62).

Insbesondere die durch das hypoxische Milieu in Wunden angetriebene Freisetzung von VEGF-A durch Keratinozyten (4, 13, 63) wird größtenteils für die Neovaskularisation in Wunden verantwortlich gemacht (5, 64). Mehrfach wurde deshalb versucht, durch Überexpression von VEGF-A eine schnellere Vaskularisation von Hauttransplantaten zu erreichen (65, 66). Aber auch verschiedene endogene Angiogeneseinhibitoren wurden in Wundheilungsexperimenten eingesetzt, um deren Einfluss im Rahmen einer antiangiogenen Tumorbehandlung auf die Wundheilung zu untersuchen. Eine Vielzahl von Experimenten zielte auf die Auswirkungen einer Antiangiogenese auf die Wundheilung ab und führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Berger et al. beobachteten keine wesentliche Beeinflussung der kutanen Wundheilung bei Mäusen nach Gabe von Endostatin, einem Fragment des Kollagen XVIII (17, 67, 68). Es wurden jedoch auch synthetische Substanzen, wie TNP-470 (69) und Blocker von VEGF-A-Rezeptoren (70) auf ihre Auswirkung auf die Wundheilung überprüft. Während TNP-470 die Wundheilung in Mäusen verzögerte, konnte keine Beeinflussung des Ablaufs der kutanen Wundheilung durch die Gabe des VEGF-A-Rezeptorblockers PTK787 beobachtet werden (70). Unserere eigenen Studien mit dem kutanen endogenen Angiogeneseinhibitoren TSP-1 ergaben eine verzögerte Wundheilung in TSP-1-transgenen Tieren bei deutlich verminderter Vaskularisierung des Granulationsgewebes (43).

1.6 Angiogenese in der kutanen Entzündung

Entzündliche Reaktionen sind geprägt durch Proliferation und Migration unterschiedlicher Gewebszellen sowie Rekrutierung inflammatorischer Zellen, deren Wirkung auf das entzündete Gewebe ein destruktives Ausmaß annehmen kann. Insbesondere das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis ist von ausgeprägten Entzündungsprozessen und damit Zonen relativer Hypoxie und hohen metabolischen Umsatzes gekennzeichnet. Im entzündeten Gewebe findet sich ein hoher metabolischer Umsatz, der einen erhöhten Bedarf an Blutversorgung nach sich zieht und seinen Ausdruck in einer gesteigerten Angiogenese

findet. Einige der vielen im Rahmen der Entzündung sezernierten Mediatoren sind in der Lage, direkt oder indirekt die Angiogenese im entzündeten Gewebe zu induzieren (71). Die Bedeutung der Angiogenese bei entzündlichen Dermatosen zeigt sich bereits in den histologisch erkennbaren vaskulären Veränderungen, beispielsweise in der Psoriasis, welche typischerweise elongierte und massiv erweiterte und hyperpermeable Blutgefäße in der Dermis aufweist (9). Viele Angiogenesefaktoren, wie GM-CSF (72), fibroblast growth factor 2 (FGF-2) (73) und VEGF-A (74) werden beispielsweise bei der Psoriasis in das entzündete Gewebe ausgeschüttet und entfalten direkt oder indirekt proangiogene Wirkungen, wie z.B. Prostaglandine (E_1 und E_2) (75), tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-1, IL-6 (76) und IL-8 (77). In gleicher Weise wirkt eine Anzahl von Zytokinen, die in der Entzündung vorzufinden ist, ausgeprägt chemotaktisch, wachstumsstimulierend und zugleich angiogen. Ein hierfür typisches Beispiel stellt die Familie der CXC-Chemokine dar, insbesondere IL-8, welches als chemotaktischer Faktor (78), als Mitogen für Keratinozyten und als Angiogenesefaktor (77) z.B. im Rahmen der Psoriasis beschrieben wurde. Andere Mediatoren der Entzündung (PGE₂, IL-6 und IL-1) sind wiederum in der Lage, VEGF-A direkt zu aktivieren (79-81) und auf diese Weise die Entzündung zu verstärken und eine angiogene Wirkung zu entfalten. In den letzten Jahren wurde zunehmend ein Zusammenhang zwischen proangiogener und proinflammatorischer Wirkung postuliert. Die vermehrte VEGF-Expression im Gewebe von Mäusen führte zu einem an Psoriasis erinnernden Phänotyp, der neben den geschlungenen Kapillaren auch die typischen epidermalen Veränderungen wie inflammatorische Infiltrate und Keratinozytenproliferation aufwies (82). Weiterhin zeigten Mäuse mit selektiv epidermaler Expression von placenta derived growth factor (PlGF) eine deutlich verstärkte Entzündungsantwort in der experimentellen Kontaktdermatitis. Demgegenüber wiesen PlGF-defiziente Tiere einen abgeschwächten Entzündungsablauf auf (83). Angesichts dieser im Rahmen der Entzündung freigesetzten Vielzahl Angiogenesefördernder Faktoren, wie VEGF-A und Mediatoren aus der Familie der CXC-Chemokine stellt sich die Frage, inwieweit der Organismus diesem proangiogenen Stimulus entgegenzuwirken vermag, um ein übermäßiges Wachstum von Blutgefäßen zu verhindern. Experimente an Mäusen mit einer selektiv epidermalen Überexpression des endogenen Angiogeneseinhibitors Angiopoietin-1 (Ang-1) zeigten eine deutlich verminderte Entzündung nach Applikation eines topischen Irritans der Haut (84, 85). Aus der kleinen Gruppe der bekannten, natürlich vorkommenden Angiogeneseinhibitoren der Haut könnte deshalb TSP-1 und TSP-2 beim Umbau der Blutgefäße im Rahmen entzündlicher Dermatosen eine wichtige Aufgabe als Gegenregulator zu den erwähnten proangiogenen Faktoren zukommen. In unserer Studie untersuchten wir die Wirkungen von Angiogeneseinhibitoren auf den Grad der Vaskularisierung und deren Einfluss auf funktionelle Parameter der Gefäße im entzündeten Gewebe.

1.7. Zielsetzung der Arbeiten

1.7.1 Fragen zur Rolle der Angiogenese in der Wundheilung

Um die Rolle der Angiogenese in der kutanen Wundheilung besser verstehen zu können, wurden Wundheilungsexperimente in verschiedenen Tiermodellen unter dem Einfluß pro- und antiangiogener Faktoren untersucht. Die Geschwindigkeit des Wundverschlusses und die Vaskularisation des Granulationsgewebes standen dabei im Mittelpunkt der Untersuchungen. Experimentelle Untersuchungen mit dem Angiogeneseinhibitor Vasostatin sollten uns

Aufschluß über Auswirkungen einer systemischen Angiogeneseinhibition auf Wundheilung und Entzündung geben.

Das Ziel der durchgeführten Experimente lag damit in der Beantwortung folgender Fragen:

1. Welche Rolle spielt die Expression von VEGF-A und dessen Rezeptor VEGFR-2 in der Wundheilung und welche Parameter der Wundheilung werden durch VEGF-A beeinflusst? Beeinflusst das Ausmaß der VEGF-A-induzierten Angiogenese den Ablauf der Wundheilung? Ist VEGF-A in der Lage, Lymphangiogenese zu induzieren, und über welchen Rezeptor könnte diese Wirkung vermittelt werden?
2. Welche Auswirkungen hat die Gabe eines potenten Angiogeneseinhibitors auf den Ablauf der Wundheilung? Ist eine Antiangiogenese im Rahmen einer antitumoralen Behandlung notwendigerweise mit einer verzögerten Wundheilung verbunden?

1.7.2 Fragen zur Rolle der Angiogenese in der Entzündung

Um die Rolle der Angiogenese bei der kutanen Entzündung untersuchen zu können, wurde der Effekt pro- und antiangiogener Faktoren auf die contact hypersensitivity (CHS) Reaktionen im Tiermodell untersucht. Neben der Angiogenese wurden weitere Parameter der Entzündung, wie Plasmaextravasation und Rekrutierung von Leukozyten in die Untersuchungen mit einbezogen. Durch die Versuche sollten folgende Fragen zur experimentellen Kontaktdermatitis geklärt werden:

1. Welche Form der Angiogenese dominiert in der kutanen Kontaktdermatitis?
2. Welche Rolle spielen die endogenen Angiogeneseinhibitoren TSP-1 und TSP-2 in der Kontaktdermatitis?
3. Sind außer einer eventuellen Angiogeneseinhibition durch Thrombospondine auch Auswirkungen auf Gefäßfunktionen, wie der Plasmaextravasation oder Leukozytenrekrutierung zu erwarten?
4. Lässt sich durch die Modulation eines endogenen Angiogeneseinhibitors der Ablauf und das Ausmaß einer Kontaktdermatitis beeinflussen, und liegt in der Behandlung entzündlicher Erkrankungen mit Angiogeneseinhibitoren möglicherweise ein neues therapeutisches Konzept?

2. Methoden und Ergebnisse eigener Studien

2.1 Untersuchungen zur Angiogenese in der kutanen Wundheilung

2.1.1 Untersuchungen zur Rolle von VEGF-A in der kutanen Wundheilung

(Originalarbeit 1)

VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, Einblicke in die Funktion von VEGF-A und dessen Rezeptoren im Rahmen der Wundheilung zu gewinnen. Hierfür wurden Wundheilungsexperimente an Tieren mit einer selektiven epidermalen Überexpression von VEGF-A durchgeführt und durch Untersuchungen an Tieren nach systemischer Blockade von VEGFR-2 ergänzt. Unseren Untersuchungen entnahmen wir, dass sich die wachstumsfördernde Wirkung von VEGF-A nicht nur auf die Blutgefäßentwicklung beschränkt, sondern auch die Lymphangiogenese voranzutreiben vermag. Dieser lymphangiogene Effekt scheint insbesondere über $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Integrin-Rezeptoren auf der Oberfläche lymphatischer Endothelien vermittelt zu werden. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen an lymphatischen Endothelzellen gestützt, in denen die Expression von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Integrinen durch VEGF-A induziert werden konnte und damit zu vermehrter Ausbildung gefäßartiger Strukturen und haptotaktischer Migration *in vitro* führte. Diese Prozesse konnten durch anti- $\alpha 1$ und anti- $\alpha 2$ Integrin blockierende Antikörper unterdrückt werden. Ebenso konnte die VEGF-A-induzierte Lymphangiogenese *in vivo* durch die Blockade von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Integrinen unterdrückt werden. Die Ergebnisse unserer Experimente lassen vermuten, dass VEGF-A ein zumindest in der Wunde vergleichbares lymphangiogenes Potential wie die bereits identifizierten Lymphangiogenesefaktoren VEGF-C und VEGF-D besitzt.

VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. Hong YK*, **Lange-Asschenfeldt B***, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M. FASEB J. 2004 Jul;18(10):1111-3.*contributed equally.

Seite 12-32

2.1.2 Einfluss der Angiogeneseinhibition durch Vasostatin auf die Wundheilung

(Originalarbeit 2)

The angiogenesis inhibitor vasostatin does not impair wound healing at tumor inhibiting doses

Die Inhibition von Angiogenese wird zunehmend als Therapie verschiedener Tumore genutzt. Neben der Gefäßneubildung in Tumoren ist Angiogenese vor allem im Rahmen der Wundheilung, z.B. nach erfolgter chirurgischer Entfernung des Tumors, vorzufinden. Es liegt deshalb nahe, dass eine Inhibition der Angiogenese mit tumorwirksamen Dosen eines verabreichten Inhibitors generell zu einer negativen Beeinflussung der Wundheilung führen könnte.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Tiermodell entwickelt, welches die Untersuchung der Tumorangio-genese und der Wundangiogenese gleichzeitig erlaubte. Tiere, denen jeweils eine Wunde gesetzt und CA46 Burkitt-Lymphomzellen intradermal injiziert wurden, wurden mit dem Angiogeneseinhibitor Vasostatin, einem Calreticulin-Fragment, behandelt. Hierbei konnte kein negativer Einfluss auf die Geschwindigkeit des Wundverschlusses unter einer Behandlung mit Vasostatin beobachtet werden, obgleich eine signifikante Verminderung der Angiogenese in Wunden und Tumoren festgestellt werden konnte. Aus diesen Untersuchungen lässt sich ableiten, dass die Angiogenese in Tumoren und Wunden unterschiedlich sensitiv gegenüber der Behandlung mit Angiogeneseinhibitoren ist und dass eine Inhibition der Angiogenese nicht zwingend zu einer verzögerten Wundheilung führen muss.

The angiogenesis inhibitor vasostatin does not impair wound healing at tumor-inhibiting doses. **Lange-Asschenfeldt B**, Velasco P, Streit M, Hawighorst T, Pike SE, Tosato G, Detmar M. *J Invest Dermatol.* 2001 Nov;117(5):1036-41.

Seite 34-39

2.2 Untersuchungen zur Angiogenese in der kutanen Entzündung

2.2.1 Untersuchungen zur Rolle von TSP-1 in der kutanen Entzündung

(Originalarbeit 3)

The angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 inhibits acute cutaneous contact hypersensitivity reactions

Während bereits umfassende Erkenntnisse bezüglich der Angiogenese im Tumorgewebe vorliegen, sind die Form der Angiogenese und die für die Regulation notwendigen Faktoren in der Entzündung noch weitgehend unerforscht. Im Falle der Tumorentstehung und des Tumorwachstums in der Haut konnten der proangiogene Faktor VEGF-A und die antiangiogenen Faktoren TSP-1 und TSP-2 in den letzten Jahren als wesentliche Regulatoren der Tumorangiogenese identifiziert werden. Um die Gefäßentwicklung in der entzündeten Haut zu untersuchen, wurden experimentelle Entzündungen an der Haut von VEGF-transgenen, TSP-1-transgenen, TSP-1-defizienten Tieren und deren Wildtypen ausgelöst und die Form der Angiogenese in der entzündeten Haut beschrieben. Es konnte vorwiegend eine Vergrößerung der Blutgefäße (vascular remodeling) in der akuten kutanen Entzündung als vorwiegender Angiogenese-Typ beobachtet werden. Die Überexpression proangiogener Faktoren, wie VEGF-A oder das Fehlen des antiangiogenen Faktors TSP-1 führten zu einer übersteigerten Entzündungsreaktion. Die selektive epidermale Überexpression von TSP-1 schwächte die Entzündungsantwort im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen deutlich ab. Die nachfolgende Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit der Rolle von TSP-1 in der kutanen Entzündung. Neben der Kontrolle der Angiogenese konnte ein entzündungshemmender Effekt von TSP-1 auf die Plasmaextravasation und Leukozytenrekrutierung in der entzündeten Haut beobachtet werden. Die Arbeit wendet sich in diesem Zusammenhang der Frage zu, inwieweit die Inhibition der Angiogenese generell an eine antientzündliche Wirkung gekoppelt ist.

The angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 inhibits acute cutaneous hypersensitivity reactions. Velasco P, Huegel R, Brasch J, Schröder JM, Weichenthal M, Stockfleth E, Schwarz T, Lawler J, Detmar M, **Lange-Asschenfeldt B**. J Invest Dermatol. 2009 Aug;129(8):2022-30.

Seite 41-49

2.2.2 Untersuchungen zur Rolle von TSP-2 in der allergischen Kontaktdermatitis

(Originalarbeit 4)

Increased and prolonged inflammation and angiogenesis in delayed-type hypersensitivity reactions elicited in the skin of thrombospondin-2 deficient mice

Um die Rolle des endogenen Angiogeneseinhibitors TSP-2 in der kutanen Entzündung besser verstehen zu können, wurden experimentelle Entzündungen an der Haut von TSP-2-defizienten Tieren und deren Wildtypen ausgelöst. Hierbei zeigten TSP-2-defiziente Mäuse eine signifikant verstärkte Entzündungsreaktion, einhergehend mit vermehrtem vascular remodeling, gesteigerter Plasmaextravasation und übermäßigem entzündlichen Infiltrat im Vergleich zur entzündeten Haut von Wildtyp-Mäusen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TSP-2 in der entzündeten Haut nicht nur als Angiogeneseinhibitor fungiert, sondern auch funktionelle Parameter der Gefäße wie die Extravasation und die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen zu beeinflussen vermag. Während diese antiangiogene Wirkung bereits in Karzinogenese-Experimenten an der Haut von TSP-2-defizienten Tieren und mit Hilfe von TSP-2-transfizierten Tumorzellen, die in der Haut von Tieren implantiert wurden, festgestellt werden konnte, gab es bisher noch keine konkreten Hinweise für eine potentielle antiinflammatorische Wirkung von TSP-2.

Increased and prolonged inflammation and angiogenesis in delayed-type hypersensitivity reactions elicited in the skin of thrombospondin-2-deficient mice.
Lange-Asschenfeldt B, Weninger W, Velasco P, Kyriakides TR, von Andrian UH, Bornstein P, Detmar M. Blood. 2002 Jan 15;99(2):538-45.

Seite 51-58

2.2.3 Effekt der systemischen Applikation von Vasostatin auf die kutane Entzündung

(Originalarbeit 5)

Novel anti-inflammatory properties of the angiogenesis inhibitor vasostatin

Um den Einfluss eines systemisch verabreichten Angiogeneseinhibitors auf die Entzündung der Haut zu untersuchen, lösten wir experimentelle Entzündungen an der Haut von Mäusen aus und applizierten intraperitoneal Vasostatin. Vasostatin gelangte bereits in den Untersuchungen zur Auswirkung der Antiangiogenese auf die Wundheilung zur Anwendung und zeichnet sich neben seiner antiangiogenen Potenz durch seine einfache Herstellbarkeit und ausreichende Verfügbarkeit aus. Die systemische Applikation von Vasostatin führte zu einer Abschwächung der Entzündungsantwort im Vergleich zu den Kontroll-behandelten Tieren. Vorrangig wurde sowohl die Plasmaextravasation in das entzündete Gewebe als auch die Leukozyten-Endothelzellinteraktion unter einer Vasostatin-Behandlung vermindert. Die Gabe von Vasostatin führte zu einer signifikanten Verminderung insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im entzündeten Gewebe. In weiterführenden Untersuchungen konnten wir eine signifikant erniedrigte Expression von Ang-2 im entzündeten Gewebe Vasostatin-behandelter Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-behandelten Tieren feststellen. Ein bekannter Antagonist von Ang-1 ist Ang-2 und ist für eine vermehrte Destabilisierung der Gefäße bekannt, die zu einer vermehrten Plasmaextravasation führt. Interessanterweise konnte keine signifikante Veränderung der VEGF-A-Expression im entzündeten Gewebe von Vasostatin- und Kontrollbehandelten Tieren beobachtet werden.

Novel anti-inflammatory properties of the angiogenesis inhibitor vasostatin.
Huegel R, Velasco P, De la Luz Sierra M, Christophers E, Schröder JM, Schwarz T,
Tosato G, **Lange-Asschenfeldt B**. J Invest Dermatol. 2007 Jan;127(1):65-74.

Seite 60-69

3. Diskussion

3.1 Einfluss proangiogener und antiangiogener Faktoren auf die kutane Wundheilung

Bereits in der frühen Phase der Wundheilung bilden sich erste kapilläre Aussprossungen, welche in die mit Fibrin angereicherte Wundmatrix eindringen und innerhalb weniger Tage ein mikrovaskuläres Netzwerk formen. Obgleich die Neovaskularisation ein klinisch signifikantes Ereignis im Rahmen der kutanen Wundheilung darstellt und häufig als limitierender Faktor für eine erfolgreiche Gewebsreparatur angesehen wird, ist wenig über die Angiogenesefaktoren, die für die Vaskularisation des Granulationsgewebes verantwortlich sind, bekannt. Einige Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass die Gabe von VEGF-A die Wundheilung verbessern könnte (86-88). Obwohl die Regulation von VEGF-A in der Wundheilung beschrieben wurde (4), konnte die funktionelle Bedeutung von VEGF-A in Wunden bisher nicht eindeutig geklärt werden, da zahlreiche andere Faktoren mit potenter angiogener Wirkung, wie z.B. FGF-2 (61, 89) ebenso stark exprimiert werden. Interessanterweise führte die Überexpression von VEGF-A in der Epidermis zu einer leichten Verlangsamung des Wundverschlusses im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen und erinnerte klinisch an den verzögerten Wundverschluß chronischer Wunden, die exzessives Granulationsgewebe produzieren. In einem weiteren Schritt wurde die Auswirkung einer Rezeptorblockade von VEGF-A auf den Wundheilungsprozess untersucht. Zur Blockade des KDR/Flk-1-Rezeptors (VEGFR-2) gelangte der DC101-Antikörper zur Anwendung, der für seine blockierende Wirkung des VEGFR-2 *in vivo* im Rahmen von Experimenten zur Hemmung der Tumoriangiogenese bekannt geworden ist. In der von uns angewandten Dosierung wurden im Tierexperiment bereits eine erfolgreiche Inhibition der Angiogenese und in Verbindung damit eine Hemmung des Tumorwachstums erreicht (90-97). Wir fanden eine Inhibition der Angiogenese im Granulationsgewebe DC101-behandelter Wunden vor, ohne dass die Geschwindigkeit der Wundheilung beeinflusst wurde. DC101-Applikation führte zu einer deutlichen Reduktion der Blutgefäßdichte bereits 3 Tage nach Wundsetzung. Die maximale Inhibition der Angiogenese bezüglich der Gefäßdichte wurde am Tag 10 beobachtet, gefolgt von einer Reduktion der mittleren Gefäßgröße. Der VEGFR-2-blockierende Antikörper vermochte darüber hinaus die Lymphangiogenese im Granulationsgewebe der Wunden fast komplett zu inhibieren.

Die durchgeführten Experimente verdeutlichen, dass die Überexpression von VEGF-A oder die Blockade eines der bedeutendsten Rezeptoren von VEGF-A (VEGFR-2) die Angiogenese im Granulationsgewebe von Wunden signifikant zu beeinflussen vermag und weisen auf eine zentrale Rolle von VEGF-A und dessen VEGFR-2 in der Wundangiogenese hin.

Obgleich die Blockade des VEGFR-2 die Vaskularisation der Wunden verminderte, konnte dennoch Angiogenese im Granulationsgewebe beobachtet werden. Es ist denkbar, dass andere Angiogenesefaktoren, wie z.B. Interleukin-8 (58) den Ausfall von VEGF zu kompensieren in der Lage sind. Weiterhin könnte der VEGFR-1 und sein spezifischer Ligand placental growth factor (PlGF) für einen großen Anteil der Angiogenese verantwortlich sein (98). Während bisher angenommen wurde, dass VEGF-A als ein selektiver Wachstumsfaktor für Blutgefäße agiert (7, 99), deuten unsere Experimente auf eine Rolle von VEGF-A in der Lymphangiogenese hin. Wir konnten zeigen, dass VEGFR-2, aber nicht VEGFR-1, auf der Oberfläche Wund-assoziiierter lymphatischer Gefäße exprimiert wird, und dass die dauerhafte

Applikation von VEGF-A zu vermehrter Lymphangiogenese führt. Die Blockade des VEGFR-2, die zur fast vollständigen Unterdrückung des Lymphgefäßwachstums führte, zeigt, dass die Lymphangiogenese im Rahmen der Wundheilung größtenteils über VEGFR-2 vermittelt wird.

Bisher wurden lediglich VEGF-C und VEGF-D als spezifische Lymphangiogenesefaktoren beschrieben (49), deren Signale über VEGFR-2 und VEGFR-3 vermittelt werden. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich bei VEGF-A um einen bedeutenden und potenten Lymphangiogenesefaktor handelt, der mit VEGF-C und VEGF-D vergleichbar ist. Die Bedeutung von VEGF-A als Lymphangiogenesefaktor konnte erst kürzlich in experimentellen Entzündungsreaktionen bestätigt werden. VEGF-A-transgene Tiere zeigten neben einer verstärkten Entzündungsreaktion und Angiogenese auch eine deutliche Zunahme der Lymphangiogenese (56). Diese durch die Entzündung induzierte Lymphangiogenese konnte ebenfalls durch VEGFR-2-Antikörper *in vivo* gehemmt werden.

Es ist bisher nicht bekannt, warum die Lymphangiogenese in kutanen Wunden ca. eine Woche nach dem Beginn des Blutgefäßwachstum einsetzt. Die Wundheilung ist charakterisiert durch die Ausbildung eines zunächst fibrinreichen Granulationsgewebes, welches im Verlauf von einer Woche durch Kollagenfasern ersetzt wird. Die vaskulären Endothelzellen im Granulationsgewebe exprimieren $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, einen zellulären Rezeptor für Fibrin und Fibronectin, welcher die Migration und Gefäßformierung der Endothelzellen in der frühen Phase der Wundheilung reguliert (100).

Lymphatische Endothelzellen hingegen exprimieren $\alpha_1\beta_1$ -Integrin, welcher für die Bindung an Kollagen in der späteren Phase der Wundheilung bedeutend ist (51). Dieses zeitlich versetzte Muster der unterschiedlichen Integrin-Expression könnte für die gegenüber der Angiogenese verzögerte Lymphangiogenese verantwortlich sein.

Wir konnten feststellen, dass VEGF-A zu einer verstärkten Expression von $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrinen in kultivierten lymphatischen Endothelzellen führt und für die unterschiedliche haptotaktische Migration *in vitro* verantwortlich ist. Eine Blockade dieser Integrine inhibierte die Migration der lymphatischen Endothelzellen. Darüber hinaus inhibierte die Blockade der $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrine die Lymphangiogenese im Granulationsgewebe und die Lymphangiogenese in den VEGF-A-sezernierenden Matrigel-Implantaten *in vivo* und deuten damit auf eine zentrale Rolle der $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrine im Rahmen der Lymphangiogenese bei der Wundheilung hin.

Während sich zahlreiche Studien mit der potentiellen Vermehrung von Blutgefäßen in Wunden beschäftigen, liegen nur wenige Erkenntnisse solche Faktoren vor, die der Angiogenese im Granulationsgewebe entgegenwirken. Dabei endet die kutane Wundheilung nicht nur mit dem Wundverschluss und erfolgreicher Reepithelialisierung des Wundgrundes, sondern insbesondere mit einer Verminderung der Angiogenese. Überschüssendes Granulationsgewebe würde zu Wundheilungsstörungen führen, wie sie im Rahmen hypertropher Narben oder der Keloide beobachtet werden. TSP-1 wurde bereits als endogener Angiogeneseinhibitor beschrieben, der zu einer Reduktion des Tumorstwachstums im Tiermodell befähigt ist. Aus diesem Grunde führten wir zunächst Wundheilungsexperimente mit TSP-1 transgenen Tieren durch und konnten eine verminderte Angiogenese im Granulationsgewebe TSP-1 transgener Tiere beobachten, die mit einer verzögerten Wundheilung einhergingen. Aufgrund der Multifunktionalität des TSP-1-

Moleküls (34) wurden neben der Auswirkung auf die Angiogenese weitere Komponenten der Wundheilung in unsere Untersuchungen eingeschlossen. Abgesehen von der Angiogenese ist die frühe Phase der Wundheilung geprägt von der Aktivität der Fibroblasten, die in das Granulationsgewebe eindringen und proliferieren (61, 101). Eine Limitierung der Fibroblastenaktivität durch TSP-1 könnte die bei TSP-1-transgenen Mäusen beobachtete verzögerte Progression der Granulationsgewebszone in Richtung der Wundmitte erklären. Der molekulare antiangiogene Mechanismus von TSP-1 konnte bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt werden. Eine Analyse proteolytischer Fragmente des TSP-1-Moleküls ließ insbesondere die Prokollagen-ähnliche Domäne des TSP-1 Moleküls für die antiangiogene Aktivität verantwortlich erscheinen. Insbesondere dessen NGVQYRN Peptidsequenz besitzt ausgeprägte antiangiogene Potenzen (40). Darüber hinaus wurden spezifische Sequenzen innerhalb der Properdin-ähnlichen Type-I-repeats, welche mit dem CD36-Rezeptor an der Oberfläche von Endothelzellen interagieren, als antiangiogene Komponenten des TSP-1 identifiziert (35, 40, 44).

In den letzten Jahren wurden auch andere endogene Angiogeneseinhibitoren, darunter TSP-2, auf ihre Rolle in der Wundheilung untersucht. TSP-2-defiziente Mäuse wiesen, anders als TSP-1-defiziente Mäuse, einen beschleunigten Wundverschluß und eine vermehrte Vaskularisation des Granulationsgewebes auf (47) und zeigten eine gesteigerte Fremdkörperreaktion mit Ausbildung einer stark vaskularisierten Kapsel um die Implantate (102). Um die Bedeutung der beiden Thrombospondine 1 und 2 im Wundheilungsprozess genauer zu evaluieren, wurden Experimente in TSP-1/TSP-2 Doppel-knockout Mäusen durchgeführt. Das Granulationsgewebe dieser Tiere wies eine Verminderung der Angiogenese und einen verzögerten Ablauf des Wundverschlusses auf und war dadurch insgesamt der Wundheilung von TSP-1-defizienten Mäusen ähnlicher (103).

Die oben beschriebenen Experimente verdeutlichen, dass für eine suffiziente Gewebsreparatur das Zusammenspiel von TSP-1 und TSP-2 von essentieller Bedeutung ist, TSP-1 jedoch den Ablauf des Wundheilungsprozesses zu dominieren scheint. Die Thrombospondine 1 und 2 scheinen die Rolle endogener Regulatoren der Angiogenese einzunehmen, indem sie die überschießende Bildung von Granulationsgewebe verhindern und für die Wiederherstellung einer adäquaten Vaskularisation zum Abschluss des Wundheilungsprozesses verantwortlich erscheinen. Darüber hinaus besitzen sie vermutlich eine wichtige Funktion in der Wundheilung, vor allem in der Kontrolle der Migration von Entzündungszellen und Fibroblasten.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Auswirkung einer Antiangiogenese-Therapie auf die Wundheilung ergaben zum Teil kontroverse Resultate (43, 67-70). In keinem der durchgeführten Experimente wurden die Auswirkungen einer Angiogeneseinhibition auf die Wundheilung und das Tumorstadium zur gleichen Zeit untersucht. Um die Frage zu klären, inwieweit die kutane Wundheilung durch therapeutisch eingesetzte Antiangiogenese beeinflusst wird, erschien es sinnvoll, den Effekt eines ausreichend verfügbaren endogenen Angiogeneseinhibitors auf die kutane Wundheilung bei gleichzeitiger Tumorzellinokulation zu untersuchen. Für diese Experimente bot sich der Angiogeneseinhibitor Vasostatin an, ein aus 180 Aminosäuren bestehendes Fragment des Calreticulins, welches in ausreichenden Mengen synthetisiert werden kann und dessen antitumorale Wirkung bereits hinreichend belegt ist (20, 23).

Der Wirkmechanismus von Vasostatin auf die Angiogenese ist bisher nicht bekannt. In den Vasostatin-behandelten Tumoren wurde ein signifikant erhöhter Anteil von α -smooth muscle actin-positiven Gefäßen gefunden. Vasostatin scheint einen höheren Grad der Gefäßreife zu induzieren, als er in sich langsam entwickelnden Geweben unter physiologischen Bedingungen vorzufinden ist (104). Perizyten sind im mikrovaskulären Gefäßsystem eng mit Endothelzellen verbunden (105). Diese Assoziation wurde mit einer verminderten Fähigkeit der Blutgefäße, neue Kapillaren zu formen, in Zusammenhang gebracht (106).

Die Vasostatin-Behandlung mit tumorinhibierenden Dosen führte zu keiner Einschränkung der Wundheilung. Die Untersuchung der Vaskularisation ergab jedoch eine signifikante Reduktion der Angiogenese des Granulationsgewebes in Vasostatin-behandelten Wunden, welche bis zu 14 Tagen nach der Wundsetzung vorzufinden war.

Die Experimente zeigen, dass eine erfolgreiche Inhibition der Angiogenese z. B. im Rahmen einer Tumorbehandlung nicht zwingend mit der Nebenwirkung einer verzögerten Wundheilung, wie z.B. durch Überexpression von TSP-1 hervorgerufen wurde, einhergehen muss. Darüber hinaus ergeben sich aus den Experimenten Hinweise, dass die Blutgefäße in Tumoren einer Angiogeneseinhibition gegenüber empfindlicher sein könnten, als Gefäße im Granulationsgewebe von Wunden. Dieser Effekt könnte in dem Umstand begründet liegen, dass das Tumorgewebe deutlich weniger vaskularisiert ist als das Granulationsgewebe von Wunden. Im Granulationsgewebe konnte im Rahmen dieser und vorhergehender Experimente (19, 37) eine bis zu dreifach höhere Blutgefäßdichte als im Tumorgewebe gemessen werden.

Obgleich die Förderung oder Inhibition der Angiogenese im Tiermodell den zeitlichen Ablauf und die Qualität der Wundheilung zu verändern vermochte, konnte in jedem der untersuchten Modelle dennoch eine erfolgreich abgeschlossene Gewebsreparatur beobachtet werden. Aus diesem Grunde stellt sich die generelle Frage, welches Ausmaß der Angiogenese für eine Gewebsreparatur überhaupt notwendig ist und inwieweit das klinische Dogma einer verbesserten Wundheilung durch vermehrte Vaskularisation haltbar ist.

Vielmehr scheint die Erhaltung des Gleichgewichtes pro- und antiangiogener Faktoren für die Gewebsreparatur von essentieller Bedeutung zu sein. Es ist zu vermuten, dass sowohl die Überexpression von proangiogenen Faktoren als auch von antiangiogenen Faktoren durch andere endogene Angiogenesefaktoren oder -inhibitoren ausgeglichen werden kann. Weitere Studien an Tiermodellen mit Wundheilungsstörungen z.B. in diabetischer Stoffwechsellaage werden helfen zu verstehen, ob unter diesen Umständen die therapeutische Induktion der Angiogenese die Wundheilung zu verbessern vermag.

3.2 Einfluss pro- und antiangiogener Faktoren auf die kutane Entzündung

Die Experimente mit TSP-1-transgenen und TSP-1-defizienten Tieren deuteten auf eine Kontrollfunktion von TSP-1 in der Regulation der Plasmaextravasion in das entzündete Gewebe hin. TSP-1 könnte damit den zahlreichen Permeabilitätsfaktoren in der kutanen Entzündung wie z.B. Histamin, Serotonin und Substanz P und insbesondere VEGF-A (84, 107), PIGF (83, 98) und TNF- α (108) entgegenwirken. Die besondere Wirksamkeit von VEGF-A und PIGF bezüglich der Steigerung der Gefäßpermeabilität konnte dabei in Experimenten mit selektiver epidermaler Überexpression dieser Faktoren in der experimentellen kutanen Entzündung aufgezeigt werden (56, 83). PIGF-defiziente Mäuse fielen zudem durch eine stark verminderte Plasmaextravasion (83) auf. Die funktionelle

Blockade der Rezeptoren mit gegen VEGFR-1 und VEGFR-2 gerichteten Antikörpern zogen eine signifikant abgeschwächte Ödembildung nach sich (56), wie auch die Blockade von VEGF-A mittels Tyrosinrezeptorkinaseinhibitoren (109). Die besondere Rolle von VEGF-A in der Entzündung der Haut wird durch neue Erkenntnisse unterstrichen, die sich auf die VEGF-A induzierte Lymphangiogenese im drainierenden Lymphknoten beziehen. Demnach ist in der entzündeten Haut exprimiertes VEGF-A in der Lage, auch entfernt vom primären Entzündungsgeschehen gefäßstrukturelle Veränderungen zu bewirken (110) und auch die Migration von dendritischen Zellen im Rahmen der kutanen Entzündung zu beeinflussen (109). Weiterhin wurde erst kürzlich berichtet, dass VEGF-A ebenfalls Funktionen auf die epidermale Barriere ausübt und nicht nur das Gefäßwachstum kontrolliert (111).

Es ist denkbar, dass TSP-1 direkt oder indirekt einen oder mehrere dieser Faktoren in der Entzündung beeinflusst und der Hyperpermeabilität entgegensteuert. Die epidermale Überexpression von TSP-1 konnte in verschiedenen Modellen stets mit verminderter Angiogenese assoziiert werden (39, 53). Unsere Beobachtungen verminderter Angiogenese insbesondere der Verringerung der mittleren Gefäßgröße bei eher gleichbleibender Dichte stehen dabei im Einklang mit den genannten Voruntersuchungen. In der kutanen Entzündung wurden bisher ebenfalls vorwiegend ein Anstieg insbesondere des Gefäßquerschnitts bei gleichbleibender Gefäßdichte beschrieben (56, 83, 112, 113) und der Begriff des vascular remodeling geprägt.

Die histologische Untersuchung der entzündeten Haut TSP-1-transgener und TSP-1-defizienter Tiere deutete aber auch auf eine Funktion von TSP-1 in der Kontrolle bei der Leukozyten-Rekrutierung hin. Die Kontrolle insbesondere der Neutrophilen-Infiltration ist von zentraler Bedeutung für den Ablauf einer Entzündung, da sie eine Vielzahl proangiogener und proinflammatorischer Faktoren beinhaltet wie VEGF-A, TNF- α , IL-8 oder Proteinase (z.B. MMP-9) (114). Die Berichte über den Effekt von TSP-1 bezüglich der Fähigkeit zur Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen *in vitro* sind kontrovers. Einige Arbeitsgruppen sehen TSP-1 hierzu in der Lage (115-118), während andere Arbeitsgruppen vermuten, dass TSP-1 mittels Interaktionen mit dem CD36-Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen eine molekulare Brücke zwischen Makrophagen und Neutrophilen ausbildet und damit für deren beschleunigte Eliminierung aus dem entzündeten Gewebe sorgen könnte (119). TSP-1-defiziente Tiere zeigten insbesondere eine stark verzögerte Resolution der Entzündung und unterstreichen damit diese Hypothese. Wir untersuchten die Expression von MIP-2, u.a. bekannt für dessen chemotaktische Wirkung auf Neutrophile (120), TNF- α und IL-1 β , deren Rolle als Modulatoren der CHS beschrieben wurde (121). Darüber hinaus quantifizierten wir die Faktoren mit proangiogener und permeabilitäts-förderndem Charakter, VEGF-A and PIGF. Wir fanden eine signifikanten Anstieg des mRNA-Expressionslevels für IL-1 β , TNF- α und MIP-2 in der entzündeten Haut TSP-1-defizienter Tiere. Es konnte kein Unterschied in den Expressionsleveln von VEGF-A oder PIGF zwischen den TSP-1-defizienten- und Wildtyp-Mäusen in gesunder Haut gemessen werden. Wir vermuten, dass die vermehrte Expression von MIP-2 für die erhöhte Rekrutierung von Neutrophilen durch die TSP-1-Defizienz verantwortlich sein könnte. Weiterhin könnte die Hochregulation von TNF- α die gesteigerte Permeabilität der Gefäße in der TSP-1-defizienten Mäus erklären. Dem gegenüber konnten wir keinen Unterschied im Expressionsmuster von IL-1 β , TNF- α , MIP-2, VEGF-A oder PIGF in in der entzündeten

Haut von TSP-1-transgenen Mäusen und deren Wildtypen beobachten. Es wurde berichtet, dass TSP-1-defiziente Mäuse bereits ohne Behandlung eine chronische Entzündung im Bereich der Lungen und des Pankreas aufweisen (122). Dieser Phänotyp wurde auf den Verlust der TSP-1 bedingten Aktivierung des latenten transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) zurückgeführt. Crawford et al konnten zeigen, dass die Behandlung mit einem synthetischem Peptid, welches in der Lage ist die TSP-1-medierte Aktivierung von latentem TGF- β 1 zu hemmen eine chronische Entzündung in Wildtyp-Mäusen auszulösen vermochte. Wenn darüber hinaus TSP-1-defiziente Mäuse mit einem TSP-1-ähnlichem Peptid behandelt wurden und damit die Aktivierung von TGF- β 1 zuließ, führte dies zu einer Normalisierung der Entzündung. (123). Es konnte zudem gezeigt werden, dass TSP-1 eine CHS-Reaktion signifikant abmildern kann (124). Auch wenn der Mechanismus derzeit ungeklärt bleibt, so deuten unsere Untersuchungen auf eine antiinflammatorische Rolle von TSP-1 *in vivo* hin. TSP-1 scheint dabei das Ausmaß der Entzündung insbesondere die Plasmaextravasation, das vascular remodeling und die Rekrutierung von Leukozyten zu beeinflussen. Vor kurzem wurde eine antientzündliche Wirkung von TSP-1-Fragmenten oder TSP-1-ähnlichen Peptiden in experimentellen Darmentzündungen (125) und rheumatoiden Arthritis-Tiermodellen (126) nachgewiesen. Zukünftige Studien werden zeigen, ob diese Peptide auch mit Erfolg bei kutanen Entzündungen eingesetzt werden können.

Zur Klärung der Frage nach der Bedeutung des endogenen Angiogeneseinhibitors TSP-2 in der kutanen Entzündung wurde zunächst die Regulation von TSP-2 in der experimentellen Kontaktdermatitis untersucht. Das Expressionsmuster von TSP-2 war mit dem des TSP-1 vergleichbar und konnte im Bereich der Blutgefäße, der Basalmembranzone und vereinzelt auch in dermalen Zellen beobachtet werden. Die mesenchymale Expression von TSP-2 steht im Einklang mit anderen Autoren, die eine Expression von TSP-2 in dermalen Zellen von Wunden (47), in Fremdkörperreaktionen (102) und im Stroma im Rahmen der Karzinogenese beobachteten (48).

TSP-2-defiziente Mäuse zeigten eine deutlich verstärkte Entzündungsantwort mit einer Vergrößerung der Blutgefäße und einem ausgeprägtem inflammatorischem Infiltrat und Ödem in der CHS-Reaktion und ähnelte damit dem Ablauf der Entzündung TSP-1-defizienter Tiere. Zudem erstreckte sich diese übersteigerte Entzündung über einen Zeitraum von mehr als 4 Wochen in den TSP-2-defizienten Mäusen. Obgleich die mittlere Blutgefäßgröße im Rahmen der Entzündung sowohl in TSP-2-defizienten als auch in Wildtyp-Mäusen anstieg, konnte keine signifikante Veränderung in der Blutgefäßdichte zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. TSP-2 weist eine 65%ige Sequenzhomologie zu TSP-1 auf und beinhaltet, wie auch TSP-1, zwei CSVTCG-Domänen innerhalb der Properdin-ähnlichen Type-I-Repeats, die für die Interaktion mit dem CD36-Rezeptor verantwortlich gemacht werden (35, 44).

Um die Frage zu klären, ob die in der entzündeten Haut von TSP-2-defizienten Mäusen beobachtete Ödembildung sich bereits auf eine erhöhte Permeabilität der Gefäße im Ruhezustand zurückführen lässt, erschien es zweckmäßig, die Plasmaextravasation in unbehandelter Haut nach intravenöser Injektion von Evans Blue-Farbstoff zu messen. In normaler Haut konnte jedoch kein Unterschied der Plasmaextravasation zwischen TSP-2-defizienten und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Nach Applikation von proinflammatorisch wirkendem Senföl (84, 127, 128) auf die Haut war hingegen eine

deutlich gesteigerte Plasmaextravasation in der entzündeten Haut TSP-2-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu beobachten.

Dieses Ergebnis könnte auf eine bestimmte Rolle von TSP-2 in Bezug auf die Kontrolle der Gefäßpermeabilität in der Entzündung hinweisen und steht im Einklang mit der im Rahmen der Entzündung beschriebenen Lokalisation der Expression von TSP-2 im Bereich der Gefäße. Da in der entzündeten Haut TSP-2-defizienter Mäuse ein dichtes inflammatorisches Infiltrat vorgefunden wurde, waren Untersuchungen zur Leukozyten-Rekrutierung mittels intravitaler Mikroskopie angebracht. Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut bedarf einer geordneten Kaskade molekularer Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten, die das Rollverhalten, die Adhäsion und die Extravasation in die postkapillären Venolen steuern (129, 130). Um zu prüfen, inwieweit eine bereits veränderte Leukozyten/Endothelzellinteraktion in normaler Haut von TSP-2-defizienten Mäusen zum gesteigerten Ausmaß der Entzündung beigetragen haben könnte, bot es sich an, zunächst das Rollverhalten der Leukozyten in den postkapillären Venolen mittels intravitaler Mikroskopie zu untersuchen. In den Blutgefäßen TSP-2-defizienter Mäuse zeigte sich eine um 39% signifikant erhöhte Rollfraktion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Der molekulare Mechanismus für das Rollverhalten von Leukozyten in kutanen Gefäßen wurde kürzlich beschrieben (131). E-Selektin ist kontinuierlich in kutanen Gefäßen exprimiert und ermöglicht den Leukozyten bei niedriger Geschwindigkeit langsam zu rollen, während die P-Selektin-Expression die Anzahl rollender Leukozyten beeinflusst (131). In der Haut von TSP-2-defizienten Mäusen konnte immunhistochemisch und mittels FACS-Analyse von isolierten Endothelzellen eine erhöhte Expression von P-Selektin festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle von TSP-2 in der Modulation der Zelladhäsionsmoleküle und damit des Verhaltens der Leukozyten-Rekrutierung hin. Der näheren Untersuchung der Leukozyten-Adhäsion in entzündeter Haut dienten Lektin-Perfusionen von TSP-2-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen, da die intravitale Mikroskopie aufgrund der im Rahmen der Entzündung angestiegenen Gewebsdicke über keine ausreichende Auflösung mehr verfügt. L. esculentum-Lektin bindet an die luminale Seite der Blutgefäße und an adhärenente Leukozyten und erlaubt somit eine Quantifizierung der Adhäsionsdichte der Leukozyten auf der Oberfläche der Gefäße (132). Diese Untersuchungen ergaben eine signifikant erhöhte Anzahl adhärenente Leukozyten in der entzündeten Haut TSP-2-defizienter Mäuse im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen und deuten auf eine potentielle Rolle von TSP-2 in der Modulation der Rekrutierung von Immunzellen in der Entzündung hin. Es ist zu vermuten, dass TSP-2 wie auch TSP-1 die Entzündung neben der Kontrolle der Vaskularisation über funktionelle Parameter der Gefäße, wie die Kontrolle der Plasmaextravasation oder der Leukozyten-Rekrutierung zu beeinflussen vermag. Unsere Ergebnisse, insbesondere die antiinflammatorische Wirkung von TSP-2, stehen im Einklang mit neuen Berichten, in denen TSP-2 die Entzündung und Angiogenese in der Synovia in der rheumatoiden Arthritis unterdrückt (133).

In einem weiteren Schritt interessierten wir uns für die Auswirkungen eines systemisch applizierbaren Angiogeneseinhibitors auf die kutane Entzündung. Für diese Untersuchungen zogen wir Vasostatin heran, welches bereits in unseren Untersuchungen zur Wundheilung zur Anwendung gelangte. Die Behandlung einer experimentellen kutanen Entzündung (CHS-Reaktion) führte zu einer ausgeprägten Abschwächung der Entzündungsantwort insbesondere

über die Kontrolle der Gefäßpermeabilität, der Leukozyten-Rekrutierung und der Angiogenese. Andere Arbeiten haben von vergleichbaren Ergebnissen einer Behandlung mit Angiogeneseinhibitoren auf die Entzündung berichtet. Hierbei gelangten TNP-470, Caplostatin, Angiostatin (134) und v.a. VEGF-A-blockierende Antikörper zur Anwendung (56). In unseren Untersuchungen konnte Vasostatin die VEGF-A-induzierte Hyperpermeabilität der Gefäße *in vivo* unterdrücken, wie in einem modifiziertem Miles-Assay gezeigt werden konnte. Die Expression von VEGF-A wurde mittels real-time RT-PCR bestimmt und schien im entzündeten Gewebe nicht durch Vasostatin beeinflusst zu werden. Vasostatin blockierte hingegen die Regulation von Ang-2 mRNA *in vivo* in der Entzündung und könnte damit die verminderte Plasmaextravasation in der Haut Vasostatin-behandelter Tiere erklären. Angiopoietin 2 ist, vergleichbar mit VEGF-A, in der Lage, die inter-endothelialen Lücken zu öffnen und damit zur erhöhten Permeabilität beizutragen (135) und wurde maßgeblich für die erhöhte Permeabilität von Tumorgefäßen verantwortlich gemacht (136). Ang-2 ist u.a. im Synovialgewebe während einer rheumatoiden Arthritis arthritis (137) und in psoriatischen Läsionen überexprimiert (138). Ang-1 ist als Antagonist von Ang-2 für seine entgegengesetzte Wirkung bekannt. Ang-1-transgene Mäuse zeigten eine abgeschwächte Permeabilität, provoziert durch Histamin, Serotonin und Senföl (84). Die adenovirale Transfektion mit Ang-1, die zu einer Überexpression von Ang-1 im Gewebe von Mäusen führte, zeigte ebenfalls einer Verminderung der Gefäßpermeabilität wie in den Experimenten mit Ang-1-transgenen Tieren (85). Vasostatin unterdrückte außerdem wie in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten und vorhergehenden Berichten (56, 83, 112, 139) das vascular remodeling der postkapillären Venolen. Vasostatin reduzierte aber auch die Rekrutierung von Entzündungszellen insbesondere von Neutrophilen, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen in das entzündete Gewebe wie mittels immunhistochemischen Färbungen und der intravitalen Mikroskopie gezeigt werden konnte. Erst vor kurzem wurden vergleichbare Fähigkeiten für den Angiogeneseinhibitor Angiostatin bezüglich Adäsion und endothelialen Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen *in vitro* beschrieben (140). Ein direkter Einfluß von Vasostatin auf die Regulation verschiedener ausgewählter Zelladhäsionsmoleküle auf der Oberfläche TNF- α -stimulierter Endothelzellen konnte in unseren Versuchen zumindest *in vitro* nicht beobachtet werden. Angiopoietine sind jedoch in der Lage, die Expression von platelet activating factor und des β 2-integrin Komplexes von neutrophilen Granulozyten zu induzieren, welche eine entscheidene Rolle bei der Adhäsion dieser Zellen am Endothel spielen (141). Da Vasostatin die entzündungsbedingte Expression von Ang-2 verminderte könnte damit auch die Ang-2 vermittelte Leukozytenadhäsion beeinflusst worden sein und für das verminderte Infiltrat neutrophiler Granulozyten verantwortlich sein.

Unsere Ergebnisse legen den Gedanken nahe, dass die Behandlung entzündlicher Erkrankungen mit Angiogeneseinhibitoren oder Angiogenesefaktor-hemmenden Ansätzen in der Zukunft von therapeutischem Nutzen sein könnten. Vasostatin könnte aufgrund seiner Stabilität und Verfügbarkeit dabei für therapeutische Anwendungen von Bedeutung sein. Hierbei wäre ein Einsatz insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen, die sich durch gesteigerte Gefäßpermeabilität auszeichnen denkbar. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Wirkung von Vasostatin auf chronisch entzündliche Erkrankungen zu ermitteln und den Effekt und potentielle Nebenwirkungen einer Langzeitbehandlung mit dieser Substanz zu erforschen.

4. Zusammenfassung

Der Angiogenese kommt eine essentielle Bedeutung im Rahmen der Wundheilung und der Entzündung zu. Es wird angenommen, dass die Neubildung von Blutgefäßen auf einem Übergewicht proangiogener Faktoren gegenüber endogenen Angiogeneseinhibitoren beruht. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) scheint eine zentrale Rolle in der Vaskularisation von Wunden einzunehmen und wird für die Hyperpermeabilität von Gefäßen im Entzündungsgeschehen verantwortlich gemacht. Während zahlreiche Angiogenesefaktoren in der Haut bekannt sind, liegen nur wenige Erkenntnisse über endogene Angiogeneseinhibitoren und deren mögliche Bedeutung hinsichtlich der Kontrolle pathophysiologischer Abläufe wie der Wundheilung oder Entzündung vor. Früheren Untersuchungen zufolge scheinen hierbei in der Haut insbesondere die Thrombospondine 1 und 2 (TSP-1 und TSP-2) eine wichtige Rolle zu spielen.

Ziel unserer Arbeiten war es, die Auswirkung der Modulation proangiogener und antiangiogener Faktoren auf die kutane Wundheilung und die Kontaktdermatitis darzustellen. Mit Hilfe eines VEGF-A-transgenen Tiermodells und der systemischen Applikation von VEGFR-2-blockierenden Antikörpern konnte VEGF-A als einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren in der Wundheilung identifiziert werden. Gleichzeitig konnte erstmalig VEGF-A als ein Lymphangiogenesefaktor beschrieben werden. Obgleich die Vaskularisation der Wunden im Rahmen dieser Experimente durch VEGF-A dramatisch verändert wurde, konnte keine wesentliche Störung des Ablaufs der Wundheilung festgestellt werden.

Um die Auswirkungen der Behandlung mit einem potenten Angiogeneseinhibitor auf die Wundheilung zu untersuchen, wurde im Tierexperiment Vasostatin verabreicht und eine Verminderung der Vaskularisation im Granulationsgewebe beobachtet, jedoch ohne Verzögerung des Wundverschlusses. Um die Wirkung der systemischen Antiangiogenese auf Granulationsgewebe in Wunden und Angiogenese in Tumoren zu vergleichen, wurden in einem kombinierten Tumor- und Wundmodell tumorwirksame Dosen von Vasostatin verabreicht. Diese Experimente zeigten, dass eine erfolgreiche Antiangiogenese z.B. im Rahmen einer Tumorbehandlung nicht zwingend mit einer Wundheilungsstörung verbunden sein muss, sofern die Wirkung des eingesetzten Angiogeneseinhibitors sich selektiv auf das Endothelzellwachstum beschränkt. Für diesen Effekt könnte eine unterschiedliche Sensitivität des Granulationsgewebes in Wunden und in Tumoren verantwortlich sein, die u.a. in der deutlich höheren Vaskularisation des Granulationsgewebes von Wunden gegenüber Tumoren begründet sein könnte. Die Beobachtung, dass weder die VEGFR-2-Blockade noch die Applikation von Vasostatin die Geschwindigkeit des Wundverschlusses wesentlich veränderte, stellt das klinische Dogma einer beschleunigten Wundheilung durch vermehrtes Blutgefäßwachstum in Frage, da auch bei gezielter Förderung der Angiogenese oder Angiogeneseinhibition ein erfolgreicher Abschluss der Gewebsreparatur erreicht werden konnte.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeiten stellen die Untersuchungen zur Rolle der endogenen Angiogeneseinhibitoren der Haut im Entzündungsgeschehen dar. Hierbei wurde zunächst die Expression des endogenen Angiogeneseinhibitors TSP-1 in der allergischen Kontaktdermatitis und dessen Auswirkungen auf die kutane Entzündung mit Hilfe von TSP-

1-transgenen und TSP-1-defizienten Tiermodellen untersucht. Für die Untersuchung der Rolle von TSP-2 in der allergischen Kontaktdermatitis standen TSP-2-defiziente Mäuse zur Verfügung, die auf eine antiinflammatorische Wirkung von TSP-2 in der kutanen Entzündung hindeuteten. TSP-1 und TSP-2 scheinen neben der Kontrolle der Vaskularisation noch weitere Funktionen, wie die Kontrolle der Plasmaextravasation und der Leukozyten-Rekrutierung, auszuüben und deuten damit auf eine gemeinsame Wirkung der Angiogeneseinhibitoren in der kutanen Entzündung hin. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen mit dem Angiogeneseinhibitor Vasostatin gestützt, der ebenfalls im Rahmen einer experimentellen Entzündung in der Lage war, die Vaskularisation und das Ausmaß der Entzündungsantwort zu reduzieren. Dabei scheint Vasostatin ebenso die Plasmaextravasation aus den Blutgefäßen sowie die Rekrutierung von Leukozyten in der entzündeten Haut zu kontrollieren. Unsere Arbeiten werfen insgesamt die Frage auf, inwieweit bekannte, insbesondere auch antitumoral eingesetzte, antiangiogene Substanzen generell mehr auf eine qualitative funktionale Veränderung der Gefäße abzielen, im Vergleich zu Ihren gefäßreduzierenden und damit quantitativen Veränderungen des Gefäßsystems. Die in dieser Arbeit zusammengestellten Ergebnisse zeigen, dass der Ablauf einer kutanen Wundheilung und Entzündungsreaktion sowohl durch proangiogene Faktoren, vor allem VEGF-A, als auch durch endogene Angiogeneseinhibitoren wie TSP-1 und TSP-2 kontrolliert wird, und dass an einige Mitglieder dieser Substanzgruppen weitere wichtige funktionelle Eigenschaften der Gefäße geknüpft zu sein scheinen, die für die Kontrolle dieser pathophysiologischen Abläufe von fundamentaler Bedeutung sind.

5. Literaturverzeichnis

1. J. Folkman, *EXS* 79, 1-8 (1997).
2. J. Folkman, *N Engl J Med* 334, 921 (1996).
3. J. Folkman, *Nat Med* 1, 27-31 (1995).
4. L. F. Brown *et al.*, *J Exp Med* 176, 1375-1379 (1992).
5. S. Frank *et al.*, *J Biol Chem* 270, 12607-13 (1995).
6. K. G. Peters, V. C. De, L. T. Williams, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8915-9 (1993).
7. P. Carmeliet, *Nat Med* 6, 389-95 (2000).
8. L. F. Brown *et al.*, *J Immunol* 154, 2801-7 (1995).
9. M. Detmar *et al.*, *J Exp Med* 180, 1141-6 (1994).
10. L. F. Brown *et al.*, *Hum Pathol* 26, 86-91 (1995).
11. M. Detmar *et al.*, *Am J Pathol* 156, 159-67 (2000).
12. D. R. Senger *et al.*, *Cancer Metastasis Rev* 12, 303-24. (1993).
13. M. Detmar *et al.*, *J Invest Dermatol* 108, 263-268 (1997).
14. T. R. Howdieshell *et al.*, *Ann Surg* 228, 707-15. (1998).
15. M. Detmar, *J Dermatol Sci* 24 Suppl 1, S78-84. (2000).
16. M. Streit *et al.*, *Am J Pathol* 155, 441-52 (1999).
17. M. S. O'Reilly *et al.*, *Cell* 88, 277-85 (1997).
18. M. S. O'Reilly *et al.*, *Cell* 79, 315-28 (1994).
19. M. Streit *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14888-93 (1999).
20. S. E. Pike *et al.*, *J Exp Med* 188, 2349-2356 (1998).
21. S. E. Pike *et al.*, *Blood* 94, 2461-8 (1999).
22. L. Yao *et al.*, *Cancer Immunol Immunother* 51, 358-66 (Sep, 2002).
23. L. Yao *et al.*, *Blood* 96, 1900-5 (2000).
24. P. Hiscott, L. Sorokin, Z. Z. Nagy, S. U. Schlotzer, G. Naumann, *Exp Cell Res* 226, 140-6 (1996).
25. K. M. Dameron, O. V. Volpert, M. A. Tainsky, N. Bouck, *Science* 265, 1582-4 (1994).
26. D. J. Good *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6624-8 (1990).
27. P. Bagavandoss, J. W. Wilkes, *Biochem Biophys Res Commun* 170, 867-872 (1990).
28. G. Taraboletti, D. Roberts, L. A. Liotta, R. Giavazzi, *J Cell Biol* 111, 765-72 (1990).
29. T. Vogel *et al.*, *J. Cell Biochem.* 53, 74-84 (1993).
30. A. Rayhaudhury, W. A. Frazier, P. A. D'Amore, *J Cell Sci* 107, 39-46 (1994).
31. F. Rastinejad, P. J. Polverini, N. P. Bouck, *Cell* 56, 5062-5072 (1989).
32. M. Iruela-Arispe, P. Bornstein, H. Sage, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5026-5030 (1991).
33. J. C. Adams, *Int J Biochem Cell Biol* 29, 861-5 (1997).
34. J. Lawler, *J Cell Mol Med* 6, 1-12 (Jan-Mar, 2002).
35. D. W. Dawson *et al.*, *J Cell Biol* 138, 707-17 (1997).
36. C. S. Schultz *et al.*, *J Biol Chem* 270, 7304-10 (1995).
37. M. Detmar, *J Investig Dermatol Symp Proc* 5, 20-3. (2000).
38. D. L. Weinstat-Saslow *et al.*, *Cancer Res* 54, 6504-11 (1994).
39. T. Hawighorst *et al.*, *Oncogene* 21, 7945-56 (Nov 14, 2002).
40. S. S. Tolsma *et al.*, *J Cell Biol* 122, 497-511 (1993).
41. P. Boukamp, K. Bleuel, S. Popp, D. V. Vormwald, N. E. Fusenig, *J Cell Physiol* 173, 256-60 (1997).
42. J. C. Rodriguez-Manzaneque *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12485-90 (Oct 23, 2001).
43. M. Streit *et al.*, *Embo J* 19, 3272-82 (2000).
44. O. V. Volpert *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 217, 326-32 (1995).
45. T. R. Kyriakides, Y. H. Zhu, Z. Yang, P. Bornstein, *J Histochem Cytochem* 46, 1007-15 (1998).
46. T. R. Kyriakides *et al.*, *J Cell Biol* 140, 419-30 (1998).
47. T. R. Kyriakides, J. W. Tam, P. Bornstein, *J Invest Dermatol* 113, 782-7 (1999).

48. T. Hawighorst *et al.*, *Embo J* 20, 2631-40. (2001).
49. K. Alitalo, P. Carmeliet, *Cancer Cell* 1, 219-27 (Apr, 2002).
50. Y. K. Hong *et al.*, *Dev Dyn* 225, 351-7 (Nov, 2002).
51. S. Hirakawa *et al.*, *Am J Pathol* 162, 575-86 (Feb, 2003).
52. M. Detmar *et al.*, *J Invest Dermatol* 111, 1-6 (1998).
53. K. Yano, L. F. Brown, M. Detmar, *J Clin Invest* 107, 409-17. (2001).
54. M. Skobe *et al.*, *J Invest Dermatol* 113, 1047-53. (1999).
55. S. A. Stacker *et al.*, *Nat Med* 7, 186-91. (2001).
56. R. Kunstfeld *et al.*, *Blood* 104, 1048-57 (Aug 15, 2004).
57. H. F. Dvorak, *N Engl J Med* 315, 1650-1659 (1986).
58. A. J. Singer, R. A. Clark, *N Engl J Med* 341, 738-46. (1999).
59. R. A. F. Clark, *J Dermatol Surg Oncol* 19, 693-706 (1993).
60. F. Arnold, D. C. West, *Pharmacol Ther* 52, 407-22. (1991).
61. W. K. Stadelmann, A. G. Digenis, G. R. Tobin, *Am J Surg*. 176 Suppl 2A, 26S-38S (1998).
62. J. F. Roesel, L. B. Nanney, *J Surg Res* 58, 449-59. (1995).
63. Y. Okuda *et al.*, *Life Sci* 63, 477-84 (1998).
64. N. N. Nissen *et al.*, *Am J Pathol* 152, 1445-52. (1998).
65. M. D. Rio *et al.*, *Gene Ther* 6, 1734-41. (1999).
66. D. M. Supp, A. P. Supp, S. M. Bell, S. T. Boyce, *J Invest Dermatol* 114, 5-13. (2000).
67. A. C. Berger *et al.*, *J Surg Res* 91, 26-31 (2000).
68. W. Bloch *et al.*, *FASEB J* 14, 2373-6. (2000).
69. S. A. Klein, S. J. Bond, S. C. Gupta, O. A. Yacoub, G. L. Anderson, *J Surg Res* 82, 268-74 (1999).
70. J. M. Wood *et al.*, *Cancer Res* 60, 2178-89 (2000).
71. J. R. Jackson, M. P. Seed, C. H. Kircher, D. A. Willoughby, J. D. Winkler, *FASEB J* 11, 457-65 (1997).
72. F. Bussolino *et al.*, *Nature* 337, 471-3 (1989).
73. J. Slavin, *Cell Biol Int* 19, 431-44 (1995).
74. D. W. Leung, G. Cachianes, W.-J. Kuang, D. V. Goeddel, N. Ferrara, *Science* 246, 1306-1309 (1989).
75. J. Stjernschantz, S. F. Nilsson, M. Astin, *Prog Clin Biol Res* 312, 155-70 (1989).
76. B. Motro, A. Itin, L. Sachs, E. Keshet, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3092-6 (1990).
77. B. J. Nickoloff, R. S. Mitra, J. Varani, V. M. Dixit, P. J. Polverini, *Am J Pathol* 144, 820-8 (1994).
78. J. M. Schroder, *Arch Immunol Ther Exp* 40, 23-31 (1992).
79. T. Cohen, D. Nahari, L. W. Cerem, G. Neufeld, B. Z. Levi, *J Biol Chem* 271, 736-41 (1996).
80. A. P. Ben, L. J. Crofford, R. L. Wilder, T. Hla, *FEBS Lett* 372, 83-7 (1995).
81. D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, E. Keshet, *Nature* 359, 843-845 (1992).
82. Y. P. Xia *et al.*, *Blood* 102, 161-8 (Jul 1, 2003).
83. H. Oura *et al.*, *Blood* 5, 560-567 (2002).
84. G. Thurston *et al.*, *Science* 286, 2511-4 (1999).
85. G. Thurston *et al.*, *Nat Med* 6, 460-3 (2000).
86. P. J. Taub *et al.*, *Plast Reconstr Surg* 102, 2033-9 (1998).
87. P. J. Taub *et al.*, *J Reconstr Microsurg* 14, 387-90. (1998).
88. P. J. Taub, L. Silver, H. Weinberg, *Plast Reconstr Surg* 105, 1034-42. (2000).
89. D. G. Greenhalgh, K. H. Sprudel, M. J. Murray, R. Ross, *Am J Pathol* 136, 1235-1246 (1990).
90. C. J. Bruns *et al.*, *Cancer* 89, 488-99. (2000).
91. K. Inoue *et al.*, *Clin Cancer Res* 6, 2635-43. (2000).
92. A. Kadambi *et al.*, *Cancer Res* 61, 2404-8. (2001).
93. G. Klement *et al.*, *J Clin Invest* 105, R15-24. (2000).
94. S. V. Kozin *et al.*, *Cancer Res* 61, 39-44. (2001).

95. M. Prewett *et al.*, *Cancer Res* 59, 5209-18. (1999).
96. R. M. Shaheen *et al.*, *Int J Oncol* 18, 221-6. (2001).
97. B. Stoelcker *et al.*, *J Interferon Cytokine Res* 20, 511-7. (2000).
98. P. Carmeliet *et al.*, *Nat Med* 7, 575-83 (May, 2001).
99. T. T. Rissanen *et al.*, *Circ Res* 92, 1098-106 (May 30, 2003).
100. D. R. Senger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci (USA)* 94, 13612-13617 (1997).
101. P. Martin, *Science* 276, 75-81 (1997).
102. T. R. Kyriakides, K. J. Leach, A. S. Hoffman, B. D. Ratner, P. Bornstein, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4449-54 (1999).
103. A. Agah, T. R. Kyriakides, J. Lawler, P. Bornstein, *Am J Pathol* 161, 831-9 (Sep, 2002).
104. L. E. Benjamin, I. Hemo, E. Keshet, *Development* 125, 1591-1598 (1998).
105. L. Beck, P. A. D'Amore, *FASEB J* 11, 365-373 (1997).
106. D. C. Darland, P. A. D'Amore, *J Clin Invest* 103, 157-8 (1999).
107. D. R. Senger *et al.*, *Science* 219, 983-985 (1983).
108. S. E. Goldblum, W. L. Sun, *Am J Physiol* 258, L57-67 (Feb, 1990).
109. C. Halin, M. Detmar, *Immunity* 24, 129-31 (Feb, 2006).
110. C. Halin, N. E. Tobler, B. Vigl, L. F. Brown, M. Detmar, *Blood* 110, 3158-67 (Nov 1, 2007).
111. P. M. Elias *et al.*, *Am J Pathol* 173, 689-99 (Sep, 2008).
112. I. M. Braverman, J. Sibley, *J. Invest. Dermatol.* 78, 12-17 (1982).
113. P. Carmeliet, R. K. Jain, *Nature* 407, 249-57. (2000).
114. M. A. Cassatella, *Adv Immunol* 73, 369-509 (1999).
115. S. J. Suchard, M. J. Burton, V. M. Dixit, L. A. Boxer, *J Immunol* 146, 3945-52 (Jun 1, 1991).
116. B. J. Schuepp, T. W. Jungi, *Biochem Biophys Res Commun* 177, 1087-94 (Jun 28, 1991).
117. P. J. Mansfield, S. J. Suchard, *J Immunol* 153, 4219-29 (1994).
118. P. J. Mansfield, L. A. Boxer, S. J. Suchard, *J Cell Biol* 111, 3077-86 (1990).
119. J. Savill, N. Hogg, Y. Ren, C. Haslett, *J Clin Invest* 90, 1513-22 (1992).
120. S. D. Wolpe *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 612-6 (Jan, 1989).
121. A. H. Enk, S. I. Katz, *J Invest Dermatol* 105, 80S-83S (Jul, 1995).
122. J. Lawler *et al.*, *J Clin Invest* 101, 982-92 (1998).
123. S. E. Crawford *et al.*, *Cell* 93, 1159-70 (1998).
124. R. Meade *et al.*, *J Immunol* 149, 521-8 (Jul 15, 1992).
125. S. Punekar *et al.*, *Pathobiology* 75, 9-21 (2008).
126. M. C. Rico *et al.*, *J Cell Physiol* 211, 504-12 (May, 2007).
127. H. Inoue, T. Asaka, N. Nagata, Y. Koshihara, *Eur J Pharmacol* 333, 231-40 (1997).
128. I. T. Lippe, A. Stabentheiner, P. Holzer, *Eur J Pharmacol* 232, 113-20 (1993).
129. T. A. Springer, *Cell* 76, 301-14 (1994).
130. E. C. Butcher, L. J. Picker, *Science* 272, 60-6 (1996).
131. W. Weninger *et al.*, *Immunity* 12, 665-76 (2000).
132. T. J. Murphy, G. Thurston, T. Ezaki, D. M. McDonald, *Am J Pathol* 155, 93-103 (1999).
133. Y. W. Park *et al.*, *Am J Pathol* 165, 2087-98 (Dec, 2004).
134. R. Satchi-Fainaro *et al.*, *Cancer Cell* 7, 251-61 (Mar, 2005).
135. W. B. Carter, *Surgery* 130, 382-7 (Aug, 2001).
136. H. Hashizume *et al.*, *Am J Pathol* 156, 1363-80 (2000).
137. B. B. Scott *et al.*, *J Rheumatol* 29, 230-9 (Feb, 2002).
138. K. Kuroda, A. Sapadin, T. Shoji, R. Fleischmajer, M. Leibold, *J Invest Dermatol* 116, 713-20 (May, 2001).
139. B. Lange-Asschenfeldt *et al.*, *Blood* 99, 538-45. (2002).
140. T. Chavakis *et al.*, *Blood* 105, 1036-43 (Feb 1, 2005).
141. C. Lemieux *et al.*, *Blood* 105, 1523-30 (Feb 15, 2005).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Sterry, dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, danke ich für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeiten und insbesondere im Rahmen des Laboraufbaus. Herrn Prof. Dr. med. Eggert Stockfleth, Leiter des Hauttumorcentrums danke ich für sein Vertrauen und zahlreichen wissenschaftlichen Hilfestellungen in den letzten Jahren.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz, dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, danke ich für die Unterstützung und Förderung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen im Rahmen des Laboraufbaus in Kiel. Seine großzügige Hilfestellung und seine Unterstützung in jeder Phase meines wissenschaftlichen Werdeganges empfand ich stets als herausragend. Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Enno Christophers, dem ehemaligen Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, gebührt für die nachhaltige Förderung meiner beruflichen Entwicklung seit Beendigung des Studiums mein besonderer Dank. Es gelang ihm als meinem Doktorvater und akademischen Lehrer, mich für klinisch-praktische und theoretisch-wissenschaftliche Fragestellungen der Dermatologie zu begeistern.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schröder, dem Leiter der Forschungsabteilung der Universitäts-Hautklinik, danke ich für seine ausdauernde, fachlich anregende und persönlich sehr angenehme Beratung bei der Bearbeitung zahlreicher Forschungsvorhaben.

Ein besonderes Anliegen ist es mir auch, Herrn Dr. med. Michael Detmar, vormals Associate Professor an der Harvard Medical School in Boston/USA für die freundliche Aufnahme in seinem Labor als wissenschaftlicher Mitarbeiter und die Enarbeitung in anspruchsvolle Methoden der Molekularbiologie sowie für seine bis heute fortwährende Unterstützung bei verschiedenen wissenschaftlichen Projekten, speziell im Zusammenhang mit Fragestellungen zur Rolle der Thrombospondine in der Wundheilung und Entzündung, zu danken.

Herrn Dr. med. Ulrich von Andrian, Associate Professor an der Harvard Medical School in Boston/USA danke ich für die Möglichkeit, als Gast in seinem Labor zahlreiche Methoden, insbesondere die Technik der intravitalem Mikroskopie erlernt zu haben.

Mein Dank gilt weiterhin unserer Kooperationspartnerin, Frau Dr. Tosato am National Institute of Cancer in Bethesda/USA, für ihre Unterstützung bei der Aufklärung der Rolle von Vasostatin in der kutanen Entzündung und Wundheilung und Herrn Dr. J. Lawler Professor an der Harvard Medical School in Boston/USA für die Überlassung des TSP-1-defizienten Tiermodells.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft schulde ich Dank für die außerordentliche Gelegenheit, als wissenschaftlicher Mitarbeiter in Boston tätig gewesen sein zu können, sowie für die spätere Anschlussförderung, die mir den Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe mit dem Schwerpunkt der kutanen Angiogeneseforschung an der Universitäts-Hautklinik in Kiel ermöglichte. Weiterhin danke ich der Hensel-Stiftung der Universität Kiel und der Kreitzstiftung für ihre Förderung, ohne deren Förderung diese Arbeiten nicht zustande gekommen wären.

Nicht zuletzt danke ich auch meiner eigenen Arbeitsgruppe für ihre tatkräftige und ideenreiche Unterstützung, die selbst vor Wochenenden nicht halt machte. Hier gilt mein ganz besonderer Dank Frau Paula Velasco, die ihre reiche experimentelle Erfahrung in die

gemeinsame Arbeit einbrachte, und Herrn Dr. med. Rainer Hügel für den unermüdlichen Einsatz bei der Durchführung der den verschiedenen Projekten zu Grunde liegenden Versuche. Ihre Einsatzfreude, Kreativität und Ausdauer haben entscheidend zum Erfolg beigetragen. Frau Dr. Jahnke danke ich für ihre Hilfe bei der Bearbeitung der klinischen Untersuchungen.

Schließlich bin ich den zahlreichen Kolleginnen und Kollegen der Hautklinik Kiel und Berlin für die Unterstützung unserer Arbeit, insbesondere für die zahlreichen Vertretungen, die aufgrund des Besuchs wichtiger Kongresse und der zeitweisen Freistellung von klinischen Aufgaben erforderlich wurden, sehr dankbar.

Große Dankbarkeit empfinde ich meiner Familie gegenüber, ohne deren weitgehende Unterstützung, aber auch geistige Anregung schon in frühen Lebensjahren diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen wäre.

Erklärung gemäß §4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Datum

Unterschrift