

# Die lymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D

## Teil 2: Die Rolle von VEGF-C und VEGF-D bei Krankheiten des Lymphgefäßsystems

R. Krebs<sup>1</sup>, M. Jeltsch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Transplantation Laboratory, Cardiopulmonary Research Group, Haartman Institute, Universität Helsinki, Finnland

<sup>2</sup>Wihuri Research Institute, Institute of Biomedicine and Translational Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki, Universität Helsinki, Finnland

### Zusammenfassung

Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C) und VEGF-D sind die beiden zentralen Signalmoleküle, die für die Entwicklung und das Wachstum des Lymphgefäßsystems verantwortlich sind. Fehlende oder überschießende Lymphangiogenese spielen bei einer Reihe von Krankheiten eine zentrale und manchmal auch ursächliche Rolle. Deshalb sind Lymphangiogenese steuernde Signalmoleküle, insbesondere VEGF-C und VEGF-Rezeptor-3, mögliche Ziele einer therapeutischen Intervention. Obwohl die Blockierung der Lymphangiogenese nicht als eigenständiges Therapiekonzept existiert, werden eine ganze Reihe von anti-lymphangiogenen Wirkstoffen zurzeit in klinischen Versuchen getestet. Man erhofft sich von ihnen eine Verbesserung der existierenden anti-angiogenen Tumorthherapie, weil bei therapeutischer Blockierung von VEGF-A viele Tumoren auf die angiogenen Formen von VEGF-C und VEGF-D ausweichen können, um ihre Versorgung mit Blutgefäßen sicherzustellen.

Trotz vieler Versuche konnte bislang auf der pro-angiogenen Seite noch keine Therapie einen entscheidenden Durchbruch vermelden, und pro-lymphangiogene, auf VEGF-C oder VEGF-D basierende Therapien, wurden bisher so gut wie nie in klinischen Studien untersucht. Zumindest eine klinische Studie mit VEGF-C befindet sich derzeit aber in Vorbereitung und zwar in Kombination mit Lymphknoten-Transplantationen bei der Therapie des postoperativen Lymphödems. In diesem Artikel geben wir einen Überblick über die Rolle, die VEGF-C, VEGF-D und ihre Rezeptoren bei Krankheiten des Lymphgefäßsystems spielen, und wir präsentieren verschiedene Möglichkeiten, diese Moleküle therapeutisch für das Wachstum von Lymphgefäßen bei der Lymphödemtherapie zu nutzen oder sie zu blockieren, um zum Beispiel die für das Tumorwachstum notwendige Angiogenese und die für die Tumorausbreitung förderliche Lymphangiogenese zu hemmen.

**Schlüsselwörter:** VEGF-C, VEGF-D, Lymphangiogenese, Lymphödem, lymphogene Metastasierung

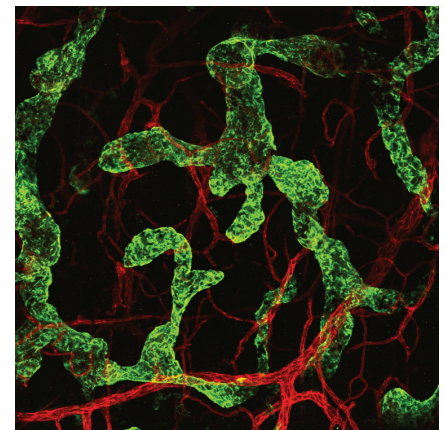
### The lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D Part 2: The role of lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D in lymphatic disorders

#### Summary

Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D are the two central signaling molecules that govern the development and growth of the lymphovascular system. The presence or absence of lymphangiogenesis plays a central and sometimes causative role in a variety of diseases. Therefore, molecules that govern lymphangiogenesis, especially VEGF-C and VEGFR-3, offer the possibility for therapeutic interventions. Although the blockade of lymphangiogenesis does not yet exist as an independent therapeutic concept, a number of anti-lymphangiogenic drugs are now being tested in clinical trials. The rationale is that targeting VEGF-C and VEGF-D can improve the current anti-angiogenic treatment, since tumors may deploy the angiogenic forms of VEGF-C and VEGF-D when VEGF-A-mediated angiogenesis is blocked therapeutically.

### Endothelzellen sind meist in der Ruhephase

Während der Embryonalentwicklung geht das Wachstum der Organe und deren Kapillarisation mit Blutgefäßen (Angiogenese) und Lymphgefäßen (Lymphangiogenese) Hand in Hand (Abb. 1). Nur wenige Organe sind hiervon ausgenommen; so bilden sich zum Beispiel im Gehirn keine Lymphgefäße, und die Hornhaut des Auges ist komplett avaskulär. Mit dem Wachstum stoppt in den meisten Organen auch die Angiogenese und Lymphangiogenese. Von wenigen Ausnahmen abgesehen befinden sich die Endothelzellen des ausgewachsenen Organismus nicht im Zellzyklus. Ein Wiedereintritt in den aktiven Zellzyklus kann während der Wundheilung [1], bei sportlichem Training in der Herz- und Skelettmuskulatur [2], periodisch im Haarzyklus [3], in den weiblichen Reproduktionsorganen und während der Plazentaentwicklung [4] beobachtet werden. Gemein ist diesen Angiogeneseprozessen die Rückkehr in die Ruhephase des Zellzyklus, nachdem das physiologische Ziel der Angiogenese erreicht wurde. Im Gegen-



**Abb. 1:**

Blut- und Lymphgefäße befinden sich in den meisten Organen. Hier dargestellt am Beispiel von Blut- und Lymphkapillaren in der Haut des Ohres einer Maus (*Mus musculus*). Die Blutgefäße wurden spezifisch mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt. Lyve-1 (grün) visualisiert die Lymphkapillaren im Vordergrund, PECAM-1 (rot) die Blutkapillaren. Aufgrund der intensiven LYVE-1-Färbung ist die PECAM-1-Färbung der Lymphkapillaren nicht sichtbar. Man beachte den größeren Durchmesser der Lymphkapillaren. Wir danken Harri Nurmi für die Bereitstellung dieses Bildes.

Despite numerous attempts, no breakthroughs have occurred in pro-angiogenic therapies to date. Furthermore, pro-lymphangiogenic, VEGF-C- or VEGF-D-based, therapies have not yet even entered the clinical trial phase. However, one clinical study with VEGF-C is now in preparation, namely in combination with lymph node transplantation for the treatment of postmastectomy edema. Here, we review the roles that VEGF-C, VEGF-D and their receptors play in diseases involving the lymphatic vascular system, and we present possibilities for utilizing these molecules to stimulate lymphatic vessel growth to treat lymphedema, or to block their functions in order to inhibit tumor angiogenesis and tumor lymphangiogenesis.

**Keywords:** VEGF-C, VEGF-D, growth factors, lymphangiogenesis, lymphedema, lymphogenic metastasis

Angiogenese-Mechanismen [Kooption; 15, 16] und die Mobilisierung myeloider Zellen aus dem Knochenmark [17] können zur Resistenzentwicklung beitragen. Eine zukünftige Antiangiogenese-Therapie wird daher mehrere angiogene Faktoren und Mechanismen gleichzeitig blockieren müssen, um einer Resistenzentwicklung vorzubeugen.

### Hämatogene versus lymphogene Metastasierung

Tumoren breiten sich entweder über das Blutgefäßsystem (hämatogene Metastasierung) oder über die Lymphwege (lymphogene Metastasierung) aus. Die Blutgefäßdichte eines Tumors korreliert mit der hämatogenen Metastasierung [18, 19], und nicht unerwartet können daher VEGF-A oder VEGFR-2 als prognostischer Marker Verwendung finden [20, 21]. Ein ähnlicher Zusammenhang besteht zwischen VEGF-C/VEGF-D und der lymphogenen Metastasierung. VEGF-C und VEGF-D stimulieren das Wachstum von

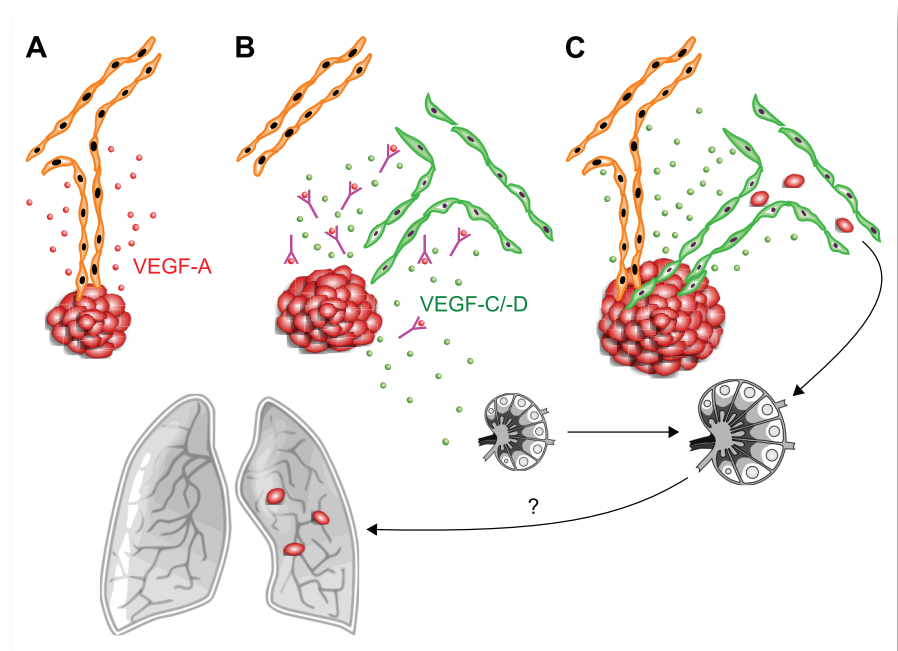
satz dazu steht die unkontrollierte, pathologische Angiogenese, die eine wichtige und teilweise ursächliche Rolle bei vielen Krankheiten spielt, nicht zuletzt beim Tumorwachstum.

### Rolle von VEGF-C und VEGF-D bei Tumorangiogenese und Tumorlymphangiogenese

Auf die Abhängigkeit des Tumorwachstums vom Blutgefäßwachstum wurde schon seit langem hingewiesen [5], und eine ganze Reihe von Therapieansätzen basieren auf diesem Konzept. In vielen experimentellen Tumormodellen wachsen Tumoren anfangs ohne die Notwendigkeit einer Blutgefäßversorgung. Ab einer gewissen Größe wird die Versorgung mit Sauerstoff durch Diffusion unzureichend und sukzessive beginnen die Tumorzellen das Blutgefäßwachstum zu stimulieren. Die Umschaltung von einem avaskulären auf ein angiogenes Wachstum kann bei der Tumorentwicklung schon recht früh stattfinden [6, 7]. Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) und sein dazugehöriger Rezeptor VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) übermitteln die wichtigsten Signale für die Tumorangiogenese [8]. Der erste klinisch routinemäßig verfügbare Antiangiogenese-Wirkstoff war dementsprechend auch ein monoklonaler, gegen VEGF-A gerichteter Antikörper (Bevacizumab, Handelsname Avastin®, siehe dazu auch Abb. 4).

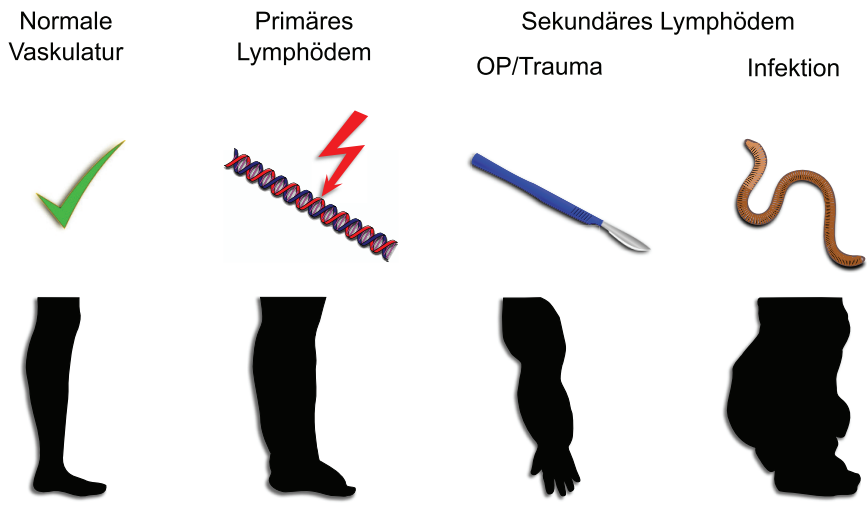
Entgegen anfänglicher Hoffnungen zeigte sich die Antiangiogenese-Therapie nicht als universell wirksam. Einige Tumorarten erwiesen sich als generell resistent; aber auch die Tumoren, bei denen die Antiangiogenese-Therapie anfangs erfolgreich ist, entwickeln mit der

Zeit Resistenzen (Abb. 2) [9-11]. Eine Resistenzentwicklung gegen die auf VEGF-A-Blockierung beruhende Antiangiogenese-Therapie kann verschiedene Ursachen haben: Der Tumor kann die Produktion von VEGF-A verstärken oder er kann auf einen alternativen Liganden (z.B. VEGF-C) oder Rezeptor (z.B. VEGFR-3) zurückgreifen. VEGFR-3, der von Tumorblutgefäßen exprimiert wird, kann von VEGF-C oder VEGF-D aktiviert werden. Zusätzlich können VEGF-C und VEGF-D in ihren reifen Formen VEGFR-2 aktivieren [12, 13]. Auch andere Wachstumsfaktoren wie FGFs [14], andere



**Abb. 2:**

Szenario für die Rolle von VEGF-C und VEGF-D bei der Tumorangiogenese und Metastasierung. A: Der Tumor sekretiert den primären Angiogenesefaktor VEGF-A und initiiert damit seine Vaskularisierung. B: Gegen VEGF-A gerichtete Therapien wirken antiangiogen und verlangsamen oder stoppen das Tumorwachstum. Im Folgenden führt die kompensatorische Mikroevolution im Tumor zur vermehrten Produktion oder Aktivierung von VEGF-C und/oder VEGF-D. C: VEGF-C und/oder VEGF-D vermitteln Tumorangiogenese und Tumorlymphangiogenese und damit ein Fortschreiten der Krankheit in Form von Lymphknotenmetastasierung und eventuell Fernmetastasen.



**Abb. 3:** Ursachen und Klassifizierung der Lymphödeme. Für mehrere primäre Lymphödeme konnten die ursächlichen Gendefekte identifiziert werden (siehe Tab. 1). Global werden die meisten sekundären Lymphödeme durch Parasiten hervorgerufen; in industrialisierten Ländern sind allerdings die Hauptverursacher Operationen und Traumata.

Lymphgefäßen innerhalb des Tumors und von tumorbegleitenden Lymphgefäßen sowie die lymphogene Metastasierung (Abb. 2) [22-24]. Lymphgefäße sind innerhalb des Tumors eher selten und nicht funktionstüchtig, wurden aber in mehreren Tumoren nachgewiesen, und zumindest in einigen Studien korrelierte die Zahl der Lymphgefäße mit der Expression von VEGF-C, VEGF-D und dem Krankheitsverlauf [25]. Tumorbegleitende Lymphgefäße entwickeln sich um den Tumor herum, stammen von der umgebenden Lymphvaskulatur [23, 26, 27] und tragen die Hauptverantwortung für die lymphogene Metastasierung in experimentellen Maus-Tumormodellen [26, 28, 29]. Dabei erscheint das Lymphgefäßsystem nicht nur als passiver Rezipient der ausbrechenden Tumorzellen, sondern als aktiver Komplize. Das vom Tumor erzeugte VEGF-C veranlasst das Lymphsystem zur Mithilfe bei der Lymphknoten-Metastasierung, indem es eine Vergrößerung der regionalen Lymphkollektoren bewirkt, einen verstärkten Lymphfluss und außerdem verstärkte Lymphangiogenese innerhalb der Wächterlymphknoten (Abb. 2) [30-32].

## Proangiogenese-Therapie

Sowohl überschießende als auch unzureichende Angiogenese oder Lymphangiogenese sind charakteristisch für bestimmte

Krankheiten. Das Fehlen einer robusten Angiogenese-Antwort auf den bei koronaren Herzkrankheiten auftretenden Sauerstoffmangel erscheint paradox. Das Wachstum neuer kollateraler Blutgefäße, um die Verengungen zu kompensieren, wäre hier therapeutisch bedeutsam; leider scheinen Angiogenese und Arteriogenese in vielen Krankheitszuständen nicht ausreichend stimuliert zu werden [33, 34]. An Versuchen, dieses Kollateralwachstum zu stimulieren, hat es nicht gefehlt [35]. Der einfachste Ansatz benutzte VEGF als Wachstumsfaktoren direkt, um die VEGF-Rezeptoren und damit die Endothelzellen zu aktivieren.

Auch wenn einige frühe Versuche, Herz-Kreislaufkrankungen mit VEGF-A [36] und VEGF-C [37, 38] zu therapieren, vielversprechend aussahen, haben diese trotz eines Jahrzehnts vorklinischer und klinischer Studien keinen Eingang in die Praxis gefunden [39, 40]. Es ist möglich, dass VEGFs allein nicht imstande sind, eine klinisch relevante Angiogenese anzukurbeln und dass zusätzliche Signale von anderen Wachstumsfaktoren oder Zytokinen benötigt werden. Als andere mögliche Ursache für das letztendliche Scheitern der direkten Therapie mit VEGFs wird auch die technologische Unausgereiftheit der frühen Versuche angeführt [41]. Falls die Ursache im Fehlen einer konzertierten Aktion mehrerer pro-angiogener Signale liegen sollte, wäre eine Therapie vorzuzie-

hen, die auf einen angiogenen Hauptschalter zielt, wie zum Beispiel auf den Hypoxie induzierten Faktor (HIF) [42].

## Lymphödeme und lymphatische Hypo- und Aplasien

Gewebeschwellungen aufgrund unzureichender Lymphdrainage werden in primäre Lymphödeme mit erblichen Ursachen und sekundäre, erworbene Lymphödeme unterteilt (Abb. 3) [43]. Die erblichen Lymphödeme, in denen das Ödem das dominante oder einzige Symptom ist, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Neben diesen gibt es eine ganze Reihe von Erbkrankheiten, bei denen das Lymphödem Teil eines Syndroms ist. Zwei aufgrund ihrer molekularen Ätiologie interessante Syndrome sind ebenfalls in Tabelle 1 zu finden. Eines dieser Syndrome ist für die häufigste Form des erblichen Lymphödems verantwortlich: das Lymphödem-Distichiasis-Syndrom (OMIM 153400). Seine Ursachen liegen in Mutationen des Transkriptionsfaktors FOXC2, die zu einer Fehlbildung der Klappenventile in den Lymphkollektoren führen, zur krankhaften Rekrutierung glatter Muskulatur zu den Lymphkapillaren und zur unerwünschten Ausbildung einer Basallamina für dieselben [44, 45]. Etwa 70 % der am Typ I des erblichen Lymphödems (OMIM 153100) Erkrankten haben Genmutationen, die die intrazelluläre Kinase des VEGFR-3 inaktivieren [46, 47] und damit die Lymphangiogenese inhibieren. Die Erkrankung ist autosomal dominant, weil durch die Heterodimerisierung des mutierten Rezeptors mit den verbliebenen intakten Rezeptoren die gesamte lymphangiogene Signalfunktion gedrosselt wird [48].

Für die medizinische Forschung ist es interessant, dass es eine Zuchtlinie von Mäusen gibt (die sogenannten Chy-Mäuse), die ebenfalls eine Mutation im VEGFR-3 aufweist und eine dem Typ I des erblichen Lymphödems ähnliche Symptomatik [49]. Obwohl alle Endothelzellen das mutierte Gen tragen, sind nicht alle Lymphgefäße und Körperteile gleichermaßen betroffen. Stark hypoplastisch oder aplastisch sind vor allem die Lymphkapillaren der Peripherie [50]. Dies könnte mit der vermehrten Not-

Krankheit	Gen (Protein)	Charakteristika	temporale Manifestation	molekularer Mechanismus	OMIM	Vererbung	Literatur	
Nonne-Milroy-Lymphödem	hereditäres Lymphödem Typ 1A	FLT4 (VEGFR-3)	Lymphödem der hauptsächlich unteren Extremitäten	kongenital	Der mutierte VEGF-Rezeptor-3 verliert die Fähigkeit, die Zelle zur Zellteilung anzuregen.	153100	ad	[46]
	hereditäres Lymphödem Typ 1B	6q16.2-q22.1	Lymphödem der hauptsächlich unteren Extremitäten	Kindheit bis Pubertät	?	611944	ad	[101]
	hereditäres Lymphödem Typ 1C	GJC2 (Connexin 47)	Lymphödem der Extremitäten	Kindheit bis Pubertät	Connexin-Kommunikation zwischen LECs bzw. LECs und ihrer Umgebung ist gestört.	613480	ad	[102]
	*	VEGFC (VEGF-C)	Lymphödem der unteren Extremitäten	kongenital oder in der frühen Kindheit	Das mutierte VEGF-C wird nicht mehr sekretiert.	*	ad	[55]
Meige-Lymphödem, hereditäres Lymphödem Typ 2	?	Lymphödem der hauptsächlich unteren Extremitäten	Pubertät	?	153200	?	[103]	
Lymphödem-Distichiasis-Syndrom	FOXC2 (FOXC2)	Lymphödem hauptsächlich der unteren Extremitäten, zweite überzählige Wimperreihe, Krampfadern	Pubertät oder später	Lymphklappenfehlbildung und pathologische Perizyten-Rekrutierung zu Lymphkapillaren	153400	ad	[44, 104]	
Hennekam-Syndrom	CCBE1 (CCBE1)	Lymphödem der Extremitäten, Lymphangiektasie des Darms, geistige Retardierung	kongenital	Das mutierte CCBE1-Protein kann die Wirkung von VEGF-C nicht mehr unterstützen.	235510	ar	[51]	

**Tab. 1:**

Die hereditären Lymphödeme und ausgewählte Syndrome mit Lymphödem-Komponente.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; ad: autosomal dominant; ar: autosomal rezessiv; \*: noch keine Zuordnung; LEC: Lymphendothelzellen.

wendigkeit für Drainage in den Extremitäten erklärt werden, in denen der höhere hydrostatische Druck mehr Gewebsflüssigkeit entstehen lässt. Gegen diese Erklärung und für eine unterschiedliche Abhängigkeit verschiedener lymphvaskulärer Strukturen von VEGF-C spricht die Tatsache, dass auch bei Mäusen (deren hydrostatischer Druck vernachlässigbar klein ist) sich das Ödem auf die Kapillaren der Extremitäten konzentriert [49].

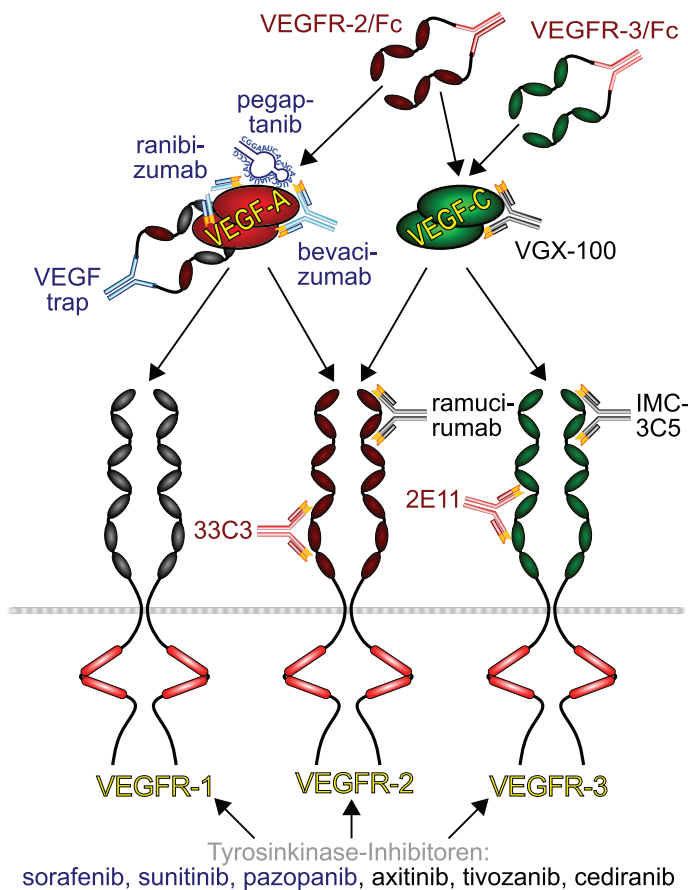
Eine sehr seltene Form des erblichen Lymphödems, das Hennekam-Syndrom (OMIM 235510), wird durch Mutationen im CCBE1-Gen hervorgerufen [51]. Auch hier ist die VEGF-C induzierte Lymphangiogenese beeinträchtigt [52, 53]. Ein ähnliches Krankheitsbild kann in Mäusen hervorgerufen werden, wenn die Signalfunktion des VEGFR-3 blockiert wird [54]. Ebenfalls sehr selten und bisher nur einmal dokumentiert ist eine die Sekretion verhindernde Mutation in der proteinkodierenden Sequenz des VEGF-C-Gens, was ein dem Typ I des erblichen Lymphödems ähnliches Krankheitsbild zur Folge hat [55]. Eine funktionell analoge Mutation wurde auch in Zebrafischen identifiziert und detailliert charakterisiert [56].

Die global häufigsten Ursachen des Lymphödems sind allerdings nicht genetischer, sondern infektiöser und traumatischer Art. In tropischen Ländern rufen die Filariosen den Großteil der Lymphödeme hervor. Filariosen sind parasitäre Infektionen mit Fadenwürmern wie zum Beispiel *Wuchereria bancrofti* oder *Brugia malayi*, deren unbehandelte Endstadien als Elefantiasis bekannt sind. Die Übertragung der Erreger geschieht über Mückenstiche; die Lymphgefäße dienen den Parasiten als Lebensraum [57]. Die daraus resultierende Vergrößerung der Lymphgefäße scheint direkt von parasitären Antigenen und indirekt über VEGF-C gesteuert zu sein [58, 59].

### Prolymphangiogenese-Therapie

In den Industrieländern sind offensichtlich iatrogene, postoperative Lymphödeme die am häufigsten vorkommenden Formen des Lymphödems, insbesondere die, die nach der Resektion von Lymphknoten bei Krebsoperationen entstehen. Inwieweit der chirurgische Eingriff selbst

für das Ödem verantwortlich ist, ist unbekannt, aber es ist bemerkenswert, dass postoperative Ödeme sich noch Jahre nach dem Eingriff herausbilden können [60, 61]. Therapeutisch scheint sich die Lymphknotentransplantation zu etablieren [62]. Weil sich die Integration transplantierter Lymphknoten in das regionale Lymphgefäßsystem mithilfe von VEGF-C in experimentellen Modellen verbessern ließ [63, 64], ist mittlerweile eine klinische Studie geplant, um die kombinierte Therapie von Lymphknotentransplantation mit Lymfactin™ (VEGF-C) zu erforschen ([http://www.contractpharma.com/contents/view\\_breaking-news/2012-10-15/ark-to-make-lymfactin-for-laurantis](http://www.contractpharma.com/contents/view_breaking-news/2012-10-15/ark-to-make-lymfactin-for-laurantis)). Eine ähnlich hochdosierte prolymphangiogene Gentherapie mit VEGF-C war bei dem Chy-Mausmodell des Nonne-Milroy-Lymphödems und in anderen experimentellen Modellen erfolgreich und konnte Lymphgefäße zum Wachstum anregen [49, 65]. Ob und inwieweit sich diese Ergebnisse auf erbliche Lymphödeme des Menschen übertragen lassen, ist aufgrund der molekularen Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen unklar (siehe dazu Abb. 5 in Teil 1 dieses Artikels in Lymph-



**Abb. 4:** Biopharmazeutische Medikamente, die auf die Signaltransduktion von VEGFs einwirken. Biopharmazeutika mit Marktzulassung in Blau, in klinischen Versuchen in Schwarz, in vorklinischen Versuchen in Rot. Alle Biopharmazeutika in dieser Abbildung wirken blockierend auf die Signaltransduktion und damit auf Angiogenese und Lymphangiogenese ein. Das einzige Biopharmazeutikum mit lymphangiogener Wirkung ist das (mit VEGF-C identische) Lymfactin™.

Forsch 1/2013). Allerdings würden diesbezügliche klinische Versuche um einiges vereinfacht, falls die Phase-I-Studien über die Verträglichkeit und Sicherheit von Lymfactin™ erfolgreich abgeschlossen werden. Dabei ist auch von Interesse, dass in mehreren großen Studien die Resektion des tumorzellinfiltrierten Wächterlymphknotens nicht mit einem Überlebensvorteil einherging [66-68].

### Lymphangiogenese bei entzündlichen Erkrankungen

Entzündungen stimulieren nicht nur Angiogenese [69] sondern auch Lymphangiogenese. Blut- und Lymphgefäße versorgen die Entzündung mit Immunzellen, und

diese wiederum produzieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren, nicht zuletzt VEGF-C [70]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass neben der Angiogenese oft auch Lymphangiogenese charakteristisch für viele chronische Entzündungen ist. Auch in Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel Typ-1-Diabetes [71] und anderen Zuständen mit Entzündungscharakter, so zum Beispiel in chronischen Atemwegserkrankungen [72, 73], Psoriasis [74] und eventuell Adipositas [75], kann pathologische Lymphangiogenese beobachtet werden. Und obwohl nicht ursächlich an der Krankheitsentstehung beteiligt, könnte eine Antilymphangiogenese-Therapie bei diesen Krankheiten von Nutzen sein, weil die Lymphgefäße die bevorzugten Wanderwege der Immunzellen sind [24].

## Tumoren des Endothels und Gefäßmalformationen

### Hämangiome

Das Hämangiom ist ein häufiger Tumor, der sich durch unkontrollierte Endothelzellen-Proliferation entwickelt. Der Behandlung bedürfen Hämangiome nur in den Fällen, in denen der Tumor ein größeres kosmetisches Problem oder funktionelles Risiko für die umliegenden Organe darstellt [76], weil Hämangiome sich meist spontan innerhalb einiger Jahre zurückbilden. Warum Hämangiome entstehen, ist unbekannt, aber es wird angenommen, dass der unkontrollierten Angiogenese hypoxieinduzierte Veränderungen in der Expression von VEGFs und VEGF-Rezeptoren zugrunde liegen [77, 78].

### Lymphangiome

Lymphangiome sind vaskuläre Malformationen der Lymphgefäße. Ihre Entstehung scheint ausschließlich sporadisch zu erfolgen und unterscheidet sich damit von kapillären und venösen Malformationen, von denen es sowohl sporadisch auftretende als auch vererbte Varianten gibt [79]. Die genetische Komponente der venösen Malformationen wurde bisher allerdings nicht in Mutationen der VEGF-Rezeptor-Gene, sondern in den Genen der ebenfalls endothelspezifischen Tie-Rezeptoren gefunden [80, 81].

### Maligne Endothelzelltumoren

Im Gegensatz zu den sich aus Epithelzellen bildenden Tumoren (den Karzinomen) sind die Tumoren, die sich aus Endothelzellen entwickeln, meist gutartig. Mit dem Hämangiosarkom und dem Lymphangiosarkom gibt es allerdings auch seltene, maligne Endothelzelltumoren. Wie diese sich genau entwickeln ist nicht geklärt, aber es ist interessant, dass das Lymphangiosarkom als seltene Komplikation des Postmastektomie-Ödems auftritt [82]. Ein weitaus häufigerer Tumor, dessen Ursprung in der Reprogrammierung lymphatischer Endothelzellen durch Herpesvirus-8 vermutet wird, ist das Karposi-Sarkom [83].

## Antilymphangiogenese-Therapie

Als unabhängiges Prinzip in der Tumorkämpfung existiert die Antilymphangiogenese-Therapie bislang nicht, weil – anders als bei der Angiogenese – Lymphangiogenese keine Voraussetzung für das Tumorstadium darstellt. Bei der Metastasierung sieht die Situation etwas anders aus, weil die Antilymphangiogenese-Therapie hier eine vorbeugende Funktion haben könnte [84]. Diesbezügliche klinische Studien gibt es allerdings nicht. Trotzdem werden antilymphangiogene Therapien indirekt in klinischen Studien angewendet. Zum einen, weil sich die Tumoriangiogenese der lymphangiogenen Signalwege bedient (insbesondere wenn der primär angiogene Signalweg über VEGF-A und VEGFR-2 therapeutisch blockiert wird) und zum anderen weil die medikamentös eingesetzten, antiangiogenen Tyrosinkinase-Inhibitoren bisher immer auch den lymphangiogenen VEGFR-3 blockieren. Wichtige diesbezügliche Medikamente mit ihren Zielstrukturen sind in der Abbildung 4 dargestellt.

## Tyrosinkinase-Inhibitoren

Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Inhibitoren sind meist Analoga des Adenosintriphosphats (ATP). Eine ganze Reihe von ihnen (unter anderem Sorafenib, Sunitinib und Pazopanib) inhibiert die enzymatische Aktivität der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne der VEGF-Rezeptoren [85]. Zusätzlich zu den VEGF-Rezeptoren inhibieren diese Arzneimittel allerdings auch andere an der Angiogenese oder Lymphangiogenese unbeteiligte Kinasen, was eine Hauptursache für deren Nebenwirkungen ist. In klinischen Versuchen mit den sogenannten VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren der zweiten Generation (Tivozanib, Axitinib und Cediranib) konnte gezeigt werden, dass sie trotz verminderter Nebenwirkungen antiangiogen wirksam sind [85]. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der VEGF-Rezeptoren untereinander gibt es trotz aller Fortschritte auch unter diesen neuen RTK-Inhibitoren keinen, der einzig den angiogenen VEGFR-2 inhibiert und

gleichzeitig den lymphangiogenen VEGFR-3 unbeeinflusst lässt. Daher ist es vorstellbar, dass eine Therapie mit diesen Inhibitoren auch antilymphangiogen der Ausbildung sekundärer Tumoren entgegenwirkt.

## VEGF-Blocker und VEGF-Rezeptor-Blocker

Die Blockade von VEGF-A durch Bevacizumab in Kombinationstherapie mit traditionellen Zytostatika gehört mittlerweile bei bestimmten Krebsarten zur medizinischen Standardversorgung [86, 87]. Trotz alledem ist der klinische Nutzen begrenzt, was auf die komplexe Natur der Tumoriangiogenese und die Notwendigkeit der gleichzeitigen Blockierung verschiedener Angiogenese-Mechanismen, so z.B. auch der durch VEGF-C induzierten Angiogenese, hinweist. Auch gegen VEGF-C gerichtete Therapien sind in vorklinischen Studien getestet worden. Obwohl Antikörper gegen VEGF-C (z.B. VGX-100) schon seit einiger Zeit existieren und obwohl auf Konferenzen vorläufige Berichte präsentiert worden sind ([http://www.circadian.com.au/sites/default/files/VGX-100%20Poster%20Presentation%20at%20EORTC\\_0.pdf](http://www.circadian.com.au/sites/default/files/VGX-100%20Poster%20Presentation%20at%20EORTC_0.pdf)), wurden noch keine positiven Ergebnisse vorklinischer Tumorstudien in der begutachteten Literatur veröffentlicht. Demgegenüber konnte in experimentellen Tumormodellen bei Mäusen die Metastasierung mit einem gegen VEGF-C gerichteten, löslichen VEGFR-3 verhindert werden [84]. Lösliche Rezeptoren binden VEGFs und verhindern so, dass diese die VEGF-Rezeptoren auf der Zellmembran der Endothelzellen besetzen und aktivieren.

Lösliche Varianten gibt es für alle VEGF-Rezeptoren. So blockiert zum Beispiel ein Fusionsprotein aus der Ligandenbindungsdomäne von VEGFR-1 und der konstanten Region des Immunglobulins G (Flt(1-3)-IgG) effektiv den Liganden VEGF-A [88]. Auch ein Fusionsprotein aus Teilen des VEGFR-1, VEGFR-2 und IgG (VEGF-A-Trap) ist ein antiangiogenes Molekül [89], das inzwischen für die Behandlung der feuchten Makuladegeneration und des oxaliplatinresistenten, metastasierenden Darmkrebs zugelassen

wurde (<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs>).

Da die prozessierten, reifen Formen von VEGF-C auch den VEGFR-2 binden, kann ein löslicher VEGFR-2 auch die Lymphangiogenese hemmen. Eine vom Körper selbst produzierte, lösliche Spleißvariante des VEGFR-2 scheint genau auf diese Art als Lymphangiogenese-Repressor zu dienen [90], wie eine lösliche Spleißvariante des VEGFR-1 als körpereigener Angiogenese-Hemmer fungiert [91]. Ob gegen VEGF-C gerichtete Therapien in klinischen Studien als unabhängige Antiangiogenese-Arzneimittel erfolgreich sein werden, erscheint fraglich, da VEGF-C nicht der primäre Angiogenesefaktor im Tumorstadium ist, sondern nur ein Reservefaktor, auf den der Tumor ausweichen kann, wenn der primäre Angiogenesefaktor VEGF-A therapeutisch blockiert wird. So gesehen erscheint nur eine gleichzeitig gegen VEGF-A und VEGF-C gerichtete Kombinationstherapie sinnvoll, und die einzige zur Zeit stattfindende klinische Studie mit einem gegen VEGF-C gerichteten Antikörper untersucht daher auch die Kombinationstherapie des monoklonalen Antikörpers gegen VEGF-C (VGX-100) mit Bevacizumab (<http://clinicaltrials.gov>). Dass das Ausschalten mehrerer angiogener Signalwege Erfolg versprechend ist, wurde schon in vorklinischen Studien mit der gleichzeitigen Blockade von VEGFR-2 und VEGFR-3 gezeigt [12]. Mit dem gleichen VGX-100-Antikörper gegen VEGF-C wurden auch mit einigem Erfolg versuchsweise Benetzungstörungen des Auges (Keratokonjunktivitis sicca) behandelt [92].

Theoretisch sollte die Blockierung eines Rezeptors, den mehrere Liganden binden können, effektiver dessen Aktivierung verhindern als die Blockierung eines individuellen Liganden. Daher überrascht es, dass sich keine Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren unter den Antiangiogenese-Arzneimitteln befinden. Die Aktivierung der VEGF-Rezeptoren erfordert erstens das Binden des Liganden und zweitens die Dimerisierung des Rezeptors. Daher kann die Rezeptor-Aktivierung entweder auf der Ebene der Ligandenbindung oder auf der Ebene der Rezeptor-Dimerisierung blockiert werden. Die sich zurzeit in klinischen

Studien befindenden Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren verhindern den ersten Schritt: das Binden des Liganden [93, 94].

Antikörper, die den zweiten Schritt der Aktivierung (die Dimerisierung des Rezeptors) blockieren, haben den ersten gegenüber den Vorteil, dass sie nicht mit den Liganden um die Bindung am Rezeptor konkurrieren müssen, und in vorklinischen Studien haben solche Antikörper ihre Überlegenheit demonstriert [95-97]. Therapien mit dem gegen VEGFR-3 gerichteten Antikörper IMC-3C5 werden zurzeit in klinischen Studien untersucht (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01288989>). Die Stärke der gegen VEGFR-3 gerichteten Therapien scheint bei den vorklinischen Studien eher in der Prävention der frühen Metastasierung und des Rückfalls zu liegen [98], und der Ausgang der Anti-VEGFR-3-Studien ist daher ungewiss. Eine andere Zielgruppe für den gleichen Antikörper wären an Lymphangiomeleiomyomatosis (LAM) erkrankte Patientinnen. Durch Mutationen in den Tumorsuppressoren TSC1 oder TSC2 hervorgerufen, infiltrieren die den glatten Muskelzellen ähnlichen LAM-Zellen obstruktiv das Interstitium und die Lymphgefäße der Lungen mit der Konsequenz einer letztendlich unausweichlichen Lungentransplantation [99]. LAM-Zellen sekretieren typischerweise hohe Mengen an VEGF-D, was ihre Affinität zum Lymphgefäßsystem erklären könnte [100].

## Schlussbemerkungen

Die Proteine der VEGF-Familie sind die wohl wirksamsten Moleküle, die das Gefäßwachstum anregen. VEGF-A ist der wichtigste Wachstumsfaktor für die Blutgefäße, VEGF-C der wichtigste für die Lymphgefäße. Weil Lymphgefäße fast überall im Körper anzutreffen sind, sind sie bei vielen Krankheitsverläufen beteiligt. Die Kenntnisse der VEGF-Wachstumsfaktoren und der VEGF-Rezeptoren hat zur Entwicklung neuer Therapieansätze geführt, die bei der Antiangiogenese schon zur routinemäßigen Anwendung gelangt sind. Demgegenüber konnten sich bisher weder Proangiogenese-, Prolymphangiogenese- oder Antilymphangiogenese-Therapien in der Klinik etablieren.

Gerade weil diese Therapien einen großen Nutzen für viele weit verbreitete Krankheiten haben könnten, erscheint hier ein großer Nachholbedarf zu liegen. Dabei scheint in der Tumorthherapie das volle Potenzial der antiangiogenen Therapien auch noch nicht ausgeschöpft zu sein, und die Suche nach besseren Wirkstoffen und Kombinationen ist daher nach wie vor in vollem Gang. Dabei wird es aber auch Grenzen der Anwendbarkeit geben. Zumindest theoretisch könnte eine Proangiogenese-Therapie der koronaren Herzkrankheit oder eine Prolymphangiogenese-Therapie eines Lymphödems das Krebsrisiko erhöhen, genauso wie Langzeit-Therapien mit Antiangiogenese- oder Antilymphangiogenese-Arzneimitteln das Blut- oder Lymphgefäßsystem beeinträchtigen könnten.

## Literatur

1. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA: Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5(1):40-46.
2. Prior BM, Yang HT, Terjung RL: What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 2004;97(3):1119-1128.
3. Yano K, Brown LF, Detmar M: Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest* 2001;107(4):409-417.
4. Augustin HG: Angiogenesis in the female reproductive system. *EXS* 2005;(94):35-52.
5. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-1186.
6. Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J: Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2386-2393.
7. Baeriswyl V, Christofori G: The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009;19(5):329-337.
8. Ferrara N, Mass RD, Campa C, Kim R: Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration. *Annu Rev Med* 2007;58:491-504.
9. Sennino B, McDonald DM: Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2012;12(10):699-709.
10. Singh M, Ferrara N: Modeling and predicting clinical efficacy for drugs targeting the tumor milieu. *Nat Biotechnol* 2012;30(7):648-657.
11. Abdullah SE, Perez-Soler R: Mechanisms of resistance to vascular endothelial growth factor blockade. *Cancer* 2012;118(14):3455-3467.
12. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomaki A, Suchting S, Wirzenius M, et al.: Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008;454(7204):656-660.
13. Anisimov A, Alitalo A, Korpisalo P, Soronen J, Kajjalainen S, Leppänen V-M, et al.: Activated forms of VEGF-C and VEGF-D provide improved vascular function in skeletal muscle. *Circ Res* 2009;104(11):1302-1312.
14. Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, Wang Z, Zhao X, Wetterskog D, et al.: Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest* 2007;117(10):2766-2777.
15. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al.: Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284(5422):1994-1998.
16. Huang J, Bae J-O, Tsai JP, Kadenhe-Chiweshe A, Papa J, Lee A, et al.: Angiopoietin-1/Tie-2 activation contributes to vascular survival and tumor growth during VEGF blockade. *Int J Oncol* 2009;79-87.
17. Ferrara N: Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor-independent tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2010;17(3):219-224.
18. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
19. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379(6560):88-91.
20. Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ, et al.: Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res* 1996;56(1):172-181.
21. Bremnes RM, Camps C, Sirera R: Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51(2):143-158.
22. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K: Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):573-583.
23. He Y, Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, et al.: Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 2004;64(11):3737-3740.
24. Alitalo K: The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 2011;17(11):1371-1380.
25. Achen MG, Stacker SA: Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1131:225-234.
26. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttua S, Jäättelä M, et al.: Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001;61(5):1786-1790.
27. He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Ylä-Herttua S, et al.: Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation

- of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 2005;65(11):4739-4746.
28. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al.: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7(2):192-198.
29. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al.: Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001;20(4):672-682.
30. He Y, Kozaki K-I, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, et al.: Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(11):819-825.
31. Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabinska S, Persaud K, Wu Y, et al.: Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 2006;66(5):2650-2657.
32. Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Yla-Herttuala S, Andersson LC, Virolainen S, et al.: Photodynamic ablation of lymphatic vessels and intralymphatic cancer cells prevents metastasis. *Sci Transl Med* 2011;3(69):69ra11.
33. Choi YH, Cowan DB, Nathan M, Poutias D, Stamm C, del Nido PJ, et al.: Myocardial hypertrophy overrides the angiogenic response to hypoxia. *PLoS ONE* 2008;3(12):e4042.
34. Wallberg-Henriksson H, Gunnarsson R, Henriksson J, Ostman J, Wahren J: Influence of physical training on formation of muscle capillaries in type I diabetes. *Diabetes* 1984;33(9):851-857.
35. Zachary I, Morgan RD: Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease: biological context, challenges, prospects. *Heart* 2011;97(3):181-189.
36. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al.: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999;18(14):3964-3972.
37. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, et al.: Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002;105(17):2012-2018.
38. Reilly JP, Grise MA, Fortuin FD, Vale PR, Schaer GL, Lopez J, et al.: Long-term (2-year) clinical events following transthoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no-option patients. *J Interv Cardiol* 2005;18(1):27-31.
39. Helisch A, Schaper W: Angiogenesis and arteriogenesis - not yet for prescription. *Z Kardiol* 2000;89(3):239-244.
40. Vuorio T, Jauhiainen S, Yla-Herttuala S: Pro- and anti-angiogenic therapy and atherosclerosis with special emphasis on vascular endothelial growth factors. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12(1):79-92.
41. Ylä-Herttuala S: Gene therapy with vascular endothelial growth factors. *Biochem Soc Trans* 2009;37(Pt 6):1198-1200.
42. Kim HA, Mahato RI, Lee M: Hypoxia-specific gene expression for ischemic disease gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(7-8):614-622.
43. Norrmén C, Tammela T, Petrova TV, Alitalo K: Biological basis of therapeutic lymphangiogenesis. *Circulation* 2011;123(12):1335-1351.
44. Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, et al.: Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med* 2004;10(9):974-981.
45. Sabine A, Agalarov Y, Maby-El Hajjami H, Jaquet M, Hagerling R, Pollmann C, et al.: Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. *Dev Cell* 2012;22(2):430-445.
46. Irrthum A, Karkkainen MJ, Devriendt K, Alitalo K, Vikkula M: Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *Am J Hum Genet* 2000;67(2):295-301.
47. Connell FC, Ostergaard P, Carver C, Brice G, Williams N, Mansour S, et al.: Analysis of the coding regions of VEGFR3 and VEGFC in Milroy disease and other primary lymphoedemas. *Hum Genet* 2009;124(6):625-631.
48. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, et al.: Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet* 2000;25(2):153-159.
49. Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, et al.: A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(22):12677-12682.
50. Bollinger A, Isenring G, Franzeck UK, Brunner U: Aplasia of superficial lymphatic capillaries in hereditary and congenital lymphedema (Milroy's disease). *Lymphology* 1983;16(1):27-30.
51. Alders M, Hogan BM, Gjini E, Salehi F, Al-Gazali L, Hennekam EA, et al.: Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nat Genet* 2009;41(12):1272-1274.
52. Hogan BM, Bos FL, Bussmann J, Witte M, Chi NC, Duckers HJ, et al.: Ccbe1 is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting. *Nat Genet* 2009;41(4):396-398.
53. Bos FL, Caunt M, Peterson-Maduro J, Planas-Paz L, Kowalski J, Karpanen T, et al.: CCBE1 is essential for mammalian lymphatic vascular development and enhances the lymphangiogenic effect of vascular endothelial growth factor-C in vivo. *Circ Res* 2011;109(5):486-491.
54. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, et al.: Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001;7(2):199-205.
55. Gordon K, Schulte D, Brice G, Simpson MA, Roukens MG, van Impel A, et al.: Mutation in vascular endothelial growth factor-C, a ligand for vascular endothelial growth factor receptor-3, is associated with autosomal dominant milroy-like primary lymphedema. *Circ Res* 2013;112(6):956-960.
56. Villefranc JA, Nicoli S, Bentley K, Jeltsch M, Zarkada G, Moore JC, et al.: A truncation allele in vascular endothelial growth factor c reveals distinct modes of signaling during lymphatic and vascular development. *Development* 2013;140(7):1497-1506.
57. Melrose WD: Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. *Int J Parasitol* 2002;32(8):947-960.
58. Bennuru S, Nutman TB: Lymphangiogenesis and lymphatic remodeling induced by filarial parasites: implications for pathogenesis. *PLoS Pathog* 2009;5(12):e1000688.
59. Debrah AY, Mand S, Specht S, Marfo-Debrekyei Y, Batsa L, Pfarr K, et al.: Doxycycline reduces plasma VEGF-C/sVEGFR-3 and improves pathology in lymphatic filariasis. *PLoS Pathog* 2006;2(9):e92.
60. Pain SJ, Purushotham AD: Lymphoedema following surgery for breast cancer. *Br J Surg* 2000;87(9):1128-1141.
61. Stanton AW, Modi S, Mellor RH, Levick JR, Mortimer PS: Recent advances in breast cancer-related lymphedema of the arm: lymphatic pump failure and predisposing factors. *Lymphat Res Biol* 2009;7(1):29-45.
62. Becker C, Assouad J, Riquet M, Hidden G: Post-mastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann Surg* 2006;243(3):313-315.
63. Lahteenvuoto M, Honkonen K, Tervala T, Tammela T, Suominen E, Lahteenvuoto J, et al.: Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. *Circulation* 2011;123(6):613-620.
64. Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Lyytikka J, Kotronen A, Pitkonen M, et al.: Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med* 2007;13(12):1458-1466.
65. Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB, et al.: Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* 2002;16(14):1985-1987.
66. Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV, Whitworth PW, Blumencranz PW, Reintgen DS, et al.: Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. *JAMA* 2011;306(4):385-393.
67. Louis-Sylvestre C, Clough K, Asselain B, Vilcoq JR, Salmon RJ, Campana F, et al.: Axillary treatment in conservative management of operable breast cancer: dissection or radiotherapy? Results of a randomized study with 15 years of follow-up. *J Clin Oncol* 2004;22(1):97-101.
68. Sleeman JP, Nazarenko I, Thiele W: Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development. *Int J Cancer* 2011;128(11):2511-2526.
69. Costa C, Incio Jo, Soares R: Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007;10(3):149-166.



70. Kerjaschki D: The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest* 2005;115(9):2316-2319.
71. Yin N, Zhang N, Lal G, Xu J, Yan M, Ding Y, et al.: Lymphangiogenesis is required for pancreatic islet inflammation and diabetes. *PLoS ONE* 2011;6(11):e28023.
72. Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, et al.: Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 2005;115(2):247-257.
73. Krebs R, Tikkanen JM, Ropponen JO, Jeltsch M, Jokinen JJ, Ylä-Herttuala S, et al.: Critical role of VEGF-C/VEGFR-3 signaling in innate and adaptive immune responses in experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Pathol* 2012;181(5):1607-1620.
74. 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):1048-1057.
75. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH, Boyd K, et al.: Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet* 2005;37(10):1072-1081.
76. North PE, Waner M, Buckmiller L, James CA, Mihm MCJ: Vascular tumors of infancy and childhood: beyond capillary hemangioma. *Cardiovasc Pathol* 2006;15(6):303-317.
77. Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, Blechman KM, Chang EI, Ceradini DJ, et al.: Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(12):2664-2670.
78. Przewratił Pa, Sitkiewicz A, Andrzejewska E: Local serum levels of vascular endothelial growth factor in infantile hemangioma: intriguing mechanism of endothelial growth. *Cytokine* 2010;49(2):141-147.
79. Brouillard P, Viskula M: Genetic causes of vascular malformations. *Hum Mol Genet* 2007;16 Spec No. 2:R140-149.
80. Limaye N, Wouters V, Uebelhoer M, Tuominen M, Wirkkala R, Mulliken JB, et al.: Somatic mutations in angiopoietin receptor gene TEK cause solitary and multiple sporadic venous malformations. *Nat Genet* 2009;41(1):118-124.
81. Viskula M, Boon LM, Carraway K Jr, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, et al.: Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996;87(7):1181-1190.
82. Janse AJ, van Coevorden F, Peterse H, Keus RB, van Dongen JA: Lymphedema-induced lymphangiosarcoma. *Eur J Surg Oncol* 1995;21(2):155-158.
83. Liu R, Li X, Tulpule A, Zhou Y, Sehnet JS, Zhang S, et al.: KSHV-induced notch components render endothelial and mural cell characteristics and cell survival. *Blood* 2010;115(4):887-895.
84. Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu W-W, Luan B, et al.: Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res* 2005;65(15):6901-6909.
85. Bhargava P, Robinson MO: Development of second-generation VEGFR tyrosine kinase inhibitors: current status. *Curr Oncol Rep* 2011;13(2):103-111.
86. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350(23):2335-2342.
87. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W: Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333(2):328-335.
88. Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N: Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000;60(22):6253-6258.
89. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al.: VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(17):11393-11398.
90. Albuquerque RJC, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, et al.: Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 2009;15(9):1023-1030.
91. Kendall RL, Thomas KA: Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(22):10705-10709.
92. Goyal S, Chauhan SK, Dana R: Blockade of prolymphangiogenic vascular endothelial growth factor C in dry eye disease. *Arch Ophthalmol* 2012;130(1):84-89.
93. Lu D, Shen J, Vil MD, Zhang H, Jimenez X, Bohlen P, et al.: Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *J Biol Chem* 2003;278(44):43496-43507.
94. Persaud K, Tille J-C, Liu M, Zhu Z, Jimenez X, Pereira DS, et al.: Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 13):2745-2756.
95. Tvorogov D, Anisimov A, Zheng W, Leppänen V-M, Tammela T, Laurinavicius S, et al.: Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization. *Cancer Cell* 2010;18(6):630-640.
96. Kendrew J, Eberlein C, Hedberg B, McDaid K, Smith NR, Weir HM, et al.: An antibody targeted to VEGFR-2 Ig domains 4-7 inhibits VEGFR-2 activation and VEGFR-2-dependent angiogenesis without affecting ligand binding. *Mol Cancer Ther* 2011;10(5):770-783.
97. Hyde CA, Giese A, Stüttfeld E, Abram Saliba J, Villemagne D, Schleier T, et al.: Targeting extracellular domains D4 and D7 of vascular endothelial growth factor receptor 2 reveals allosteric receptor regulatory sites. *Mol Cell Biol* 2012;32(19):3802-3813.
98. Tammela T, Saariisto A, Holopainen T, Ylä-Herttuala S, Andersson LC, Virolainen S, et al.: Photodynamic ablation of lymphatic vessels and intralymphatic cancer cells prevents metastasis. *PLoS ONE* 2011;6(9):e28023.
99. Harari S, Torre O, Moss J: Lymphangioliomyomatosis: what do we know and what are we looking for? *Eur Respir Rev* 2011;20(119):34-44.
100. Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, et al.: Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangioliomyomatosis. *Lymphat Res Biol* 2006;4(3):143-152.
101. Malik S, Grzeschik KH: Congenital, low penetrance lymphedema of lower limbs maps to chromosome 6q16.2-q22.1 in an inbred Pakistani family. *Hum Genet* 2008;123(2):197-205.
102. Kanady JD, Simon AM: Lymphatic communication: connexin junction, what's your function? *Lymphology* 2011;44(3):95-102.
103. Rezaie T, Ghoroghchian R, Bell R, Brice G, Hasan A, Burnand K, et al.: Primary non-syndromic lymphoedema (Meige disease) is not caused by mutations in FOXC2. *European journal of human genetics*: EJHG 2008;16(3):300-304.
104. Fang J, Dagenais SL, Erickson RP, Arlt MF, Glynn MW, Gorski JL, et al.: Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67(6):1382-1388.

**Teil 1 des Beitrages wurde in LymphForsch 1/2013 veröffentlicht.**

## Korrespondenzadresse

PD Dr. Michael Jeltsch  
Wihuri Research Institute, Institute of Biomedicine and Translational Cancer Biology Program  
Biomedicum Helsinki  
Postfach 63 (Haartmaninkatu 8)  
FIN-00014 Universität Helsinki, Finnland  
E-Mail: michael@jeltsch.org