

Kontrolle von Regeneration und Reparatur in der Haut*

Control Mechanisms of Skin Regeneration and Repair

Autor

S. A. Eming

Institut

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universität zu Köln

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1344692>
 Akt Dermatol 2013; 39: 468–471
 © Georg Thieme Verlag KG
 Stuttgart · New York
 ISSN 0340-2541

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Sabine Eming
 Klinik und Poliklinik für
 Dermatologie und Venerologie
 Kerpenerstr. 62
 50937 Köln
 sabine.eming@uni-koeln.de

Zusammenfassung

Die Ausbildung eines gefäßreichen, hyperpermeablen Granulationsgewebes ist eine der Grundvoraussetzungen für einen geweberekonstruierenden Heilungsprozess. Morphologische und funktionelle Untersuchungen am *Ulcus cruris venosum* geben Hinweis darauf, dass die Endothelzellfunktion und letztlich die Ausbildung eines gefäßreichen Granulationsgewebes gestört sind. Die Mechanismen der verzögerten Wundheilung, insbesondere der Kapillarrarifizierung im Wundbereich sind bisher in ihren molekularen Grundlagen nicht verstanden. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen formulierten wir die Hypothese, dass die verminderte Ausbildung eines gefäßreichen Granulationsgewebes im *Ulcus cruris venosum* mit einer eingeschränkten Aktivität der Proteine der Familie des vaskulären Endothelzellfaktors (Vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A; Placenta growth factor, PIGF-1/-2) einhergeht. Um die Rolle der VEGF-Proteine in der kutanen Wundheilung herauszuarbeiten, untersuchten wir die Expression und Stabilität

von VEGF-A und PIGF und ihrer Rezeptoren in heilenden und nicht heilenden humanen Wunden. Unsere Untersuchungen (Spaltung durch Proteinase, MALDI-TOF-Analyse, BIAcore-Analyse, funktionelle In-vitro- und In-vivo-Analysen der Gefäßbildung) weisen darauf hin, dass die Aktivität von VEGF165 und PIGF durch eine plasminkatalysierte Spaltung der Carboxyl-terminalen Heparinbindungsdomäne reguliert werden kann. Struktur-Funktions-Analysen der Moleküle zeigten, dass die Zellproliferation und die Bindung an extrazelluläre Matrix durch die Carboxyl-terminale Sequenz reguliert wird. In *db/db*-Mäusen führte die lokale Verabreichung einer plasminresistenten VEGF165-Mutante zu einer gesteigerten Angiogenese und letztlich zu einem beschleunigten Wundschluss. Die tierexperimentellen Studien unterstützen somit die von uns im Humanmodell gewonnenen Erkenntnisse eines Aktivitätsverlustes der VEGF-Proteine durch Proteolyse in der chronischen Wunde. Darüber hinaus unterstreichen sie das therapeutische Potenzial der plasminresistenten VEGF165-Mutante bei chronischen Wundheilungsstörungen.

Einleitung

Die Wiederherstellung der Barrierefunktion der Haut nach einer Verletzung ist von grundlegender Bedeutung für jeden Organismus und stellt das primäre Ziel der Geweberegeneration und Wundheilung dar. Für den Heilungsprozess verwendet die Natur Mechanismen, wie sie prinzipiell auch bei anderen Prozessen, z. B. der embryonalen Entwicklung, Entzündung, Fibrose, aber auch bei Tumorwachstum und Metastasierung beobachtet werden. Diesen Prozessen gemeinsam ist die stringente, zeitlich und räumlich aufeinander ab-

gestimmte Kontrolle des Zellwachstums und -differenzierung durch ein komplexes Netzwerk zahlreicher löslicher Zytokine und Matrixmoleküle. Fehlsteuerungen dieser Wechselwirkungen können zu Defiziten im Heilungsprozess (chronische Wunden), persistierender Entzündung, Fibrose oder auch Tumorwachstum führen.

In den letzten Jahren hat eine intensiviertere Grundlagenforschung zur Aufklärung von zellulären und molekularen Mechanismen epidermaler und dermalen Reparaturprozesse geführt [1,2]. Mit der Identifizierung von Wachstumsfaktoren, die essenzielle Zellfunktionen im Wundheilungsverlauf regulieren, schien ein Durchbruch in der Therapie chronischer Wundheilungsstörungen erreicht. In tierexperimentellen Untersuchungen wurde sehr erfolgreich belegt, dass die topische

* Vortrag gehalten anlässlich der *Verleihung des Wissenschaftspreises 2012* der Berliner Stiftung für Dermatologie an die Autorin. Dresden, 2. Mai 2013

Applikation rekombinanter Wachstumsfaktoren den gestörten Wundheilungsprozess normalisiert [3]. Obwohl die molekularen und zellulären Grundlagen gestörter Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen in der Wunde wenig verstanden waren, führten die erfolgreichen experimentellen Untersuchungen rasch zum klinischen Einsatz rekombinanter Wachstumsmediatoren (Brown 1989, erster klinischer Einsatz eines rekombinanten Wachstumsfaktors in der kutanen Wundheilung). Das unzureichende Verständnis der gestörten molekularen und zellulären Vorgänge im Kontext eines „feindlichen Mikromilieus“ der chronischen Wunde hat letztlich zum Versagen moderner Therapieansätze mit rekombinanten Wachstumsfaktoren und zur Enttäuschung seitens der Industrie, der Patienten und klinisch tätiger Ärzte geführt. Diese Enttäuschung ist vermutlich nicht gerechtfertigt. Zwischenzeitlich liegen neue Berichte von anderen und unserer Arbeitsgruppe vor, die zeigen, dass eine bessere molekulare Charakterisierung des chronischen Wundmilieus nicht nur den rekombinanten Wachstumsfaktoren in modifizierter Anwendung eine ungleich bessere therapeutische Chance bietet, sondern vermutlich zu neuen kausalen, in die Pathophysiologie der chronischen Wunde eingreifenden, innovativen Therapieansätzen führt.

Die Ausbildung eines gefäßreichen, hyperpermeablen Granulationsgewebes ist eine der Grundvoraussetzungen für einen geweberekonstruierenden Heilungsprozess. Morphologische und funktionelle Untersuchungen am *Ulcus cruris venosum* geben Hinweis darauf, dass die Endothelzellfunktion und letztlich die Ausbildung eines gefäßreichen Granulationsgewebes gestört sind [4, 5]. Die Mechanismen der verzögerten Wundheilung, insbesondere der Kapillarrarifizierung im Wundbereich, sind bisher in ihren molekularen Grundlagen nicht verstanden. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen formulierten wir die Hypothese, dass die verminderte Ausbildung eines gefäßreichen Granulationsgewebes im *Ulcus cruris venosum* mit einer eingeschränkten Aktivität des vaskulären Endothelzellfaktors (VEGF-A), auch bekannt als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (vascular permeability factor, VPF), einhergeht. VEGF-A ist ein für das Gefäßwachstum essenzieller und seit seiner Identifizierung durch Senger und Ferrara meistuntersuchter Angiogenesemediator [6, 7, 8]. VEGF-A stellt ein zentrales Molekül in der Regulation von Vasculogenese (Neubildung von Gefäßen) und Angiogenese (Aussprossung von Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen) dar [9]. Neben VEGF-A sind weitere Wachstumsfaktoren beschrieben worden, die untereinander eine hohe strukturelle und funktionelle Homologie aufweisen und als Familie der VEGF-Moleküle mit VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und plazentarem Wachstumsfaktor (PlGF) bezeichnet werden [10, 11]. VEGF-A ist ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 35–45 kDa. Bisher wurden in humanen Zellen mindestens sechs verschiedene Isoformen identifiziert (VEGF121, 145, 165, 183, 189, 206), die durch alternatives Spleißen der mRNA aus einem einzelnen Gen hervorgehen. In den meisten humanen Geweben liegt die Expression der Isoformen VEGF121 und VEGF165 vor. Dabei scheint VEGF165 die größere biologische Relevanz und Aktivität zu haben. Ein wesentlicher biochemischer und letztlich funktioneller Unterschied der Isoformen besteht in ihrer Bindungseigenschaft an extrazelluläre Matrixmoleküle und ihre unterschiedliche Affinität zu den VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) und Neuropilin-1 [12]. Diese Eigenschaften werden insbesondere durch die Heparinbindungsdomäne, die in Exon 6 und 7 kodiert wird, bestimmt [13].

Ergebnisse und Diskussion



Um die Rolle von VEGF-A in der kutanen Wundheilung herauszuarbeiten, untersuchten wir zunächst die Expression von VEGF-A und seiner Rezeptoren mittels immunhistochemischer Färbungen, In-situ-Hybridisierung und semiquantitativen RT-PCR-Analysen in heilenden und nicht heilenden humanen Wunden. Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl in heilenden wie auch in nicht heilenden Wunden die Expression von VEGF-A sowie seiner Rezeptoren induziert ist [14]. Diese Beobachtungen veranlassten uns, die Stabilität von VEGF-A-Protein im Wundmilieu zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde rekombinantes humanes VEGF165-Protein in Wundsekret humaner heilender und nicht heilender Wunden über einen definierten Zeitraum inkubiert und die Integrität von VEGF165-Protein mittels Western-Blot-Analyse dargestellt. Hier zeigte sich, dass VEGF165 im Milieu der chronischen Wunde im Gegensatz zur heilenden Wunde proteolytisch abgebaut wird [14]. Um herauszuarbeiten, welche Proteasen im Milieu der nicht heilenden Wunden an der Degradation von VEGF165-Protein beteiligt sind, wurden umfassende Proteinaseinhibitoranalysen durchgeführt. Zusammenfassend legen diese Untersuchungen nahe, dass Plasmin eine der Serinproteinasen darstellt, die an der Degradation von VEGF165 im Milieu nicht heilender Wunden maßgeblich beteiligt ist. Die Spaltung von VEGF165 durch Plasmin konnte durch eine amino-terminale Sequenzierung und MALDI-TOF-Analyse der VEGF-Spaltprodukte nach Plasmindegradation bestätigt werden [14]. Mittels dieser Techniken konnte die am weitesten N-terminal gelegene Plasminschnittstelle zwischen Arginin110 und Alanin111 identifiziert werden. Die Spaltung resultiert somit in den Verlust der Heparinbindungsdomäne von VEGF165. Weiterführende Untersuchungen belegten, dass diese Domäne wesentlich an der Regulation der VEGF165-Aktivität beteiligt ist [15]. Zu diesen zählen die Interaktion mit extrazellulären Matrixmolekülen, die Affinität zu VEGF-Rezeptoren, die Interaktion mit pro- und anti-angiogenen Mediatoren. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die mitogene VEGF165-Aktivität durch die Plasmindegradation signifikant reduziert ist. Diese Untersuchungen weisen zum einen darauf hin, dass die fördernde Wirkung von VEGF165 auf die Zellproliferation durch eine plasminkatalysierte Spaltung reguliert werden kann. Ferner dienen diese Untersuchungen Struktur-Funktions-Analysen des VEGF-Moleküls, da sie zeigen, dass die proliferative Wirksamkeit von VEGF165 durch die Carboxyl-terminale Sequenz, die im wesentlichen durch Exon 7 kodiert ist, reguliert wird. Letztlich unterstützen diese Ergebnisse unsere Arbeitshypothese, dass eine eingeschränkte Gefäßausbildung im *Ulcus cruris venosum* mit einer verminderten VEGF-Aktivität assoziiert ist.

In einem Folgeprojekt, in dem die Bedeutung der Plasminspaltung von VEGF165 für die Wundheilung herausgearbeitet wurde, ist es uns gelungen, durch einen zielgerichteten Mutageneseansatz eine plasminresistente VEGF165-Mutante zu generieren [16]. Alanin an der Position 111 wurde durch ein Prolin ersetzt. Da die Mutation an einer für die biologische Aktivität des VEGF165-Moleküls kritischen Stelle durchgeführt wurde, war zu befürchten, dass eine veränderte Proteinstruktur in diesem Bereich die Aktivität von VEGF165 negativ beeinflusst. Insbesondere die Aminosäure Prolin wirkt als starker α -Helix-Brecher und kann die Konformation des Proteins beeinflussen. Es war daher in besonderem Maße positiv überraschend, dass die generierte VEGF165-Mutante sowohl gegenüber Plasmin und im Sekret chronischer humaner Wunden stabil war und zugleich noch

eine dem Wildtypprotein entsprechende Aktivität zeigte. Darüber hinaus war die molekulare Modifikation eines Schlüsselmediators der Wundheilung, die zu einer erhöhten Stabilität und Aktivität im proteasereichen Mikromilieu der chronischen Wunde resultiert, seinerzeit innovativ und bisher einzigartig in diesem Kontext. Es stellte sich nun die Frage, ob sich die plasminresistente VEGF165-Mutante auch in der In-vivo-Situation durch gesteigerte angiogenetische Eigenschaften auszeichnet und somit für die Behandlung chronischer Wundheilungsstörungen therapeutisch nutzbar ist.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten die Bedeutung von VEGF165 als Modulator der Wundangiogenese in einem Mausmodell mit einer gestörten Wundheilung (*db/db*-Maus) aufzeigen [15]. In diesem Modell ist der verzögerte Wundschluss, vergleichbar zur Humansituation, durch eine Reduzierung der Angiogenese, verminderte VEGF165-Aktivität und erhöhte Plasminaktivität gekennzeichnet. Unsere Untersuchungen zeigen, dass in *db/db*-Mäusen die lokale Verabreichung der plasminresistenten VEGF165-Mutante die Angiogenese während der Wundheilung stimuliert und letztlich zu einem beschleunigten Wundschluss führt. Darüber hinaus sind die Gefäßstrukturen der mit der VEGF165-Mutante behandelten Wunden gegenüber den mit Wildtypprotein behandelten Wunden signifikant verändert. Die Dichte der sich neu ausgebildeten Gefäße war signifikant erhöht und die Gefäßstrukturen zeigten eine erhöhte Stabilität. Die erhöhte Gefäßstabilität war durch eine reduzierte Endothelzellapoptose und gesteigerte Rekrutierung perivaskulärer Zellen charakterisiert. Diese vaskulären Veränderungen waren mit einer erhöhten Stabilität des mutierten Proteins assoziiert, die auf eine erhöhte und verlängerte VEGF165-Aktivität im Wundgewebe schließen lässt. Die tierexperimentellen Studien unterstützen somit die von uns im Humanmodell gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung des Aktivitätsverlustes von VEGF in der Pathogenese der gestörten Wundheilung. Darüber hinaus unterstreichen sie das therapeutische Potenzial der plasminresistenten VEGF165-Mutante bei chronischen Wundheilungsstörungen.

In den vergangenen Jahren wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen die Bedeutung der extrazellulären Matrix für die Ausbildung eines funktionellen Gefäßsystems herausgearbeitet [17]. Durch diese Arbeiten wurde ebenfalls die wesentliche Funktion der Interaktion zwischen Komponenten der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF-A, für das Gefäßwachstum deutlich. In den vergangenen Jahren befassten wir uns zusätzlich mit der Entwicklung neuer molekularer Technologien, welche die Wirksamkeit von VEGF im Kontext mit der extrazellulären Matrix optimieren. In Zusammenarbeit mit Jeffrey Hubbel (EPFL Lausanne) haben wir ein Verfahren entwickelt, um neue Gewebeersatzmaterialien (z. B. Fibrin) mit VEGF-Protein zu bestücken, um somit die Gefäßbildung zu fördern. Zu diesem Zweck wurden VEGF-Mutanten mit neuen biologischen Funktionen (z. B. Matrixbindung, Integrinbindung) generiert. In In-vitro- und In-vivo-Modellen der Angiogenese und Gewebereparatur wurden die funktionellen Eigenschaften der Moleküle charakterisiert [18]. Diese Projekte verfolgen langfristig das Ziel, eine biologisch aktive Matrix für den Gewebeersatz zu schaffen.

Seit der Entdeckung von VEGF-A wurden bisher 6 weitere Proteine mit struktureller und funktioneller Homologie identifiziert, die als Familie der VEGF-Proteine zusammengefasst werden. Die biologischen Eigenschaften und die Regulation dieser unterschiedlichen Moleküle sind bisher nur ansatzweise verstanden. Auf der Grundlage der Erkenntnisse über VEGF-A beschäftigten

wir uns auch mit der Frage, ob die Regulationsmechanismen von VEGF-A (z. B. Proteasensensitivität, Funktion der Heparinbindungsdomäne) generelle Prinzipien für die Regulation der Aktivität der Proteine der VEGF-Familie darstellen. Hier konnten wir in einer aktuellen Arbeit zeigen, dass auch der plazentare Wachstumsfaktor (PlGF) durch Plasmin-vermittelte Proteolyse der C-terminalen, heparinbindenden Domäne reguliert wird [19].

Zusammenfassend verdeutlichen die vorliegenden Untersuchungen, dass der von der Arbeitsgruppe gewählte Ansatz, der neben In-vitro-Analysen und experimentellen Tiermodellen auch die Humansituation einbezieht, sehr wertvoll für das Verständnis der Physiologie des Wundprozesses und die Identifizierung klinisch relevanter Pathomechanismen ist. Die vorliegenden Arbeiten tragen zur Aufklärung von Mechanismen bei, die einen physiologischen Wundschluss verhindern. Darüber hinaus bieten die Erkenntnisse neue Ansätze zur Entwicklung rationaler Therapien.

Interessenkonflikt



Die Autorin ist Erfinderin des Patentes EP 1 485 483 B1, US 7, 491, 696 B2.

Abstract

Control Mechanisms of Skin Regeneration and Repair



VEGF family members are key mediators in vascular remodeling. Structure-function analysis of this protein family is not complete and a detailed analysis is mandatory for a comprehensive understanding of this essential growth factor family in processes such as tissue repair and cancer. A common structural feature of VEGF proteins is differential mRNA splicing, which gives rise to different protein isoforms, that differ primarily in the absence or presence of a C-terminal domain of highly basic-amino acids. This so called heparin-binding domain (HBD) has been identified as the epitope for neuropilin and proteoglycans, both of which are central receptor molecules to control vascular growth. Furthermore, there is genetic evidence demonstrating that the HBD is essential for vascular patterning and survival. However, it is still unclear how cell functions are specifically modulated by HBD-interactions in different VEGF proteins. Furthermore, beside genetic mechanisms no other process has been identified that controls the activity of the HBD. We performed systematic structure-function analysis of different VEGF family members (Vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A; Placenta growth factor, PlGF-1/-2). Using screens for protease sensitivity, MALDI-TOF-mass spectrometry, BIAcore analysis and functional in vitro and in vivo angiogenic assays, we revealed novel chemotactic and molecular binding activities of the C-terminal domain of PlGF isoforms. Furthermore, in different VEGF proteins (VEGF-A, PlGF) we identified a specific plasmin-cleavage site, which leads to loss of the HBD and significant alterations in functional properties of VEGF proteins. Differential analysis of the amino acid sequence of the plasmin cleavage site in VEGF proteins across different species revealed a high conservation. Our data strongly support the significant impact of the HBD of different VEGF proteins on vascular remodeling and emphasize plasmin-mediated cleavage as a general mechanism that controls interactions of different VEGF family members with neuropilins and proteoglycans.

Literatur

- 1 *Martin P.* Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75–81
- 2 *Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y et al.* Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314–321
- 3 *Werner S, Grose R.* Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835–870
- 4 *Luetolf O, Bull RH, Bates DO et al.* Capillary perfusion in chronic venous insufficiency: a cause for leg ulceration? *Br J Dermatol* 1993; 128: 249–254
- 5 *Scelsi R, Scelsi L, Cortinovis R et al.* Morphological changes of dermal blood and lymphatic vessels in chronic venous insufficiency of the leg. *Intern Angiol* 1994; 13: 308–311
- 6 *Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983–985
- 7 *Detmar M, Yeo KT, Nagy JA et al.* Keratinocyte-derived VEGF (VEGF) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 44–50
- 8 *Ferrara N.* VEGF: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 581–611
- 9 *Eming SA, Krieg T.* Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J Invest Dermatol, Symposium Proceedings* 2006; 126: 79–86
- 10 *Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242–248
- 11 *Failla CM, Odorisio T, Cianfarani F et al.* PIGF is induced in human keratinocytes during wound healing. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 388–395
- 12 *Olsson A, Dimberg A, Kreuger J et al.* VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev* 2006; 7: 359–371
- 13 *Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV et al.* The carboxyl-terminal domain (111-165) of VEGF is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996; 271: 7788–7795
- 14 *Lauer G, Sollberg S, Cole M et al.* Expression and Proteolysis of VEGF is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 12–18
- 15 *Roth D, Piekarek M, Christ H et al.* Plasmin modulates VEGF-A mediated angiogenesis during wound repair. *Am J Pathol* 2006; 168: 670–684
- 16 *Lauer G, Sollberg S, Cole M et al.* Generation of a novel proteolytic resistant VEGF165 variant by a site directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Letter* 2002; 531: 309–313
- 17 *Eming SA, Hubbell JA.* Extracellular matrix in angiogenesis: dynamic structures with translational potential. *Exp Dermatol* 2011; 20: 605–613
- 18 *Traub S, Morgener J, Martino MM et al.* The promotion of endothelial cell attachment and spreading using FNIII10 fused to VEGF-A165. *Biomaterials* 2013; 34: 5958–5968
- 19 *Hoffmann D, Willenborg S, Koch M et al.* Plasmin processing regulates Placental growth factor activities. *J Biol Chem* 2013; 288: 17976–17989