

# Die lymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D

## Teil 1: Grundlagen und Embryonalentwicklung

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 und Translational Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki, Universität Helsinki, Finnland

### Zusammenfassung

VEGF-C und VEGF-D sind die zwei zentralen Signalmoleküle, die für die Entwicklung und das Wachstum des Lymphgefäßsystems verantwortlich sind. Beide gehören zur VEGF-Proteinfamilie, deren Mitglieder hauptsächlich das Wachstum von Blutgefäßen (Angiogenese) und Lymphgefäßen (Lymphangiogenese) steuern. Die VEGF-Familie umfasst bei Säugetieren fünf Mitglieder: VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D. Benannt wurde diese Familie nach ihrem zuerst entdeckten Mitglied VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF-C und VEGF-D bilden funktionell und strukturell eine Untergruppe innerhalb der VEGF-Familie. Sie unterscheiden sich von den anderen VEGFs durch ihre besondere Biosynthese: Sie werden als inaktive Vorstufen produziert, für deren Aktivierung ihre langen N- und C-terminalen Propeptide enzymatisch abgespalten werden müssen. Im Gegensatz zu den anderen VEGFs sind VEGF-C und VEGF-D direkte Stimulatoren für das Wachstum lymphatischer Gefäße. Ihre lymphangiogene Wirkung entfalten VEGF-C und VEGF-D über den VEGF-Rezeptor-3 (VEGFR-3), der im erwachsenen Organismus fast nur auf den Endothelzellen der Lymphgefäße zu finden ist. In diesem Artikel geben wir einen Überblick über die VEGF-Proteinfamilie und deren Rezeptoren mit dem Schwerpunkt auf den lymphangiogenen Mitgliedern VEGF-C und VEGF-D, ihre Biosynthese und ihre Rolle in der Embryonalentwicklung.

**Schlüsselwörter:** VEGF-C, VEGF-D, Wachstumsfaktoren, Lymphangiogenese

### The lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D Part 1: Basic principles and embryonic development

#### Summary

VEGF-C and VEGF-D are the two central signaling molecules that stimulate the development and growth of the lymphatic system. Both belong to the vascular endothelial growth factor (VEGF) protein family, which plays important roles in the growth of blood vessels (angiogenesis) and lymphatic vessels (lymphangiogenesis). In mammals, the VEGF family comprises five members: VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. The family was named after VEGF-A, the first member to be discovered. VEGF-C and VEGF-D form a subgroup within this family in terms of function and structure. Their distinctive biosynthesis differentiates them from the other VEGFs: they are produced as inactive precursors and need to be activated by proteolytic removal of their long N- and C-terminal propeptides. Unlike the other VEGFs, VEGF-C and VEGF-D are direct stimulators of lymphatic vessel growth. They exert their lymphangiogenic function via VEGF receptor 3, which is expressed in the adult organism almost exclusively on lymphatic endothelial cells. In this review, we provide an overview of the VEGF protein family and their receptors. We focus on the lymphangiogenic VEGF-C and VEGF-D, discussing their biosynthesis and their role in embryonic lymphangiogenesis.

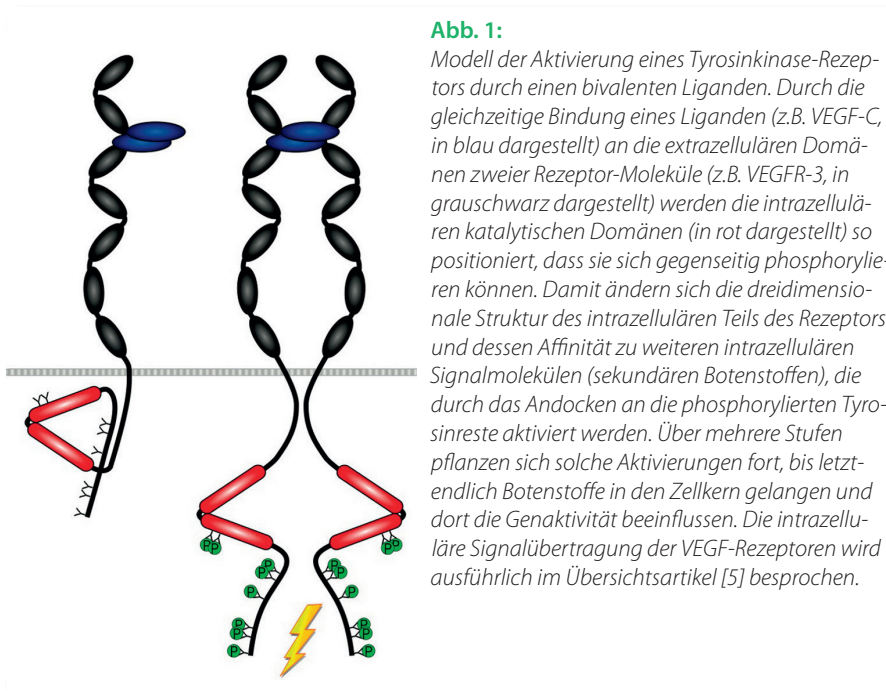
**Keywords:** VEGF-C, VEGF-D, growth factors, lymphangiogenesis

## Die VEGF-Proteinfamilie und ihre Rezeptoren

### VEGF-Rezeptoren

Die innerste Schicht aller Blut- und Lymphgefäße wird von Endothelzellen gebildet, und diese Zellen sind es, die beim Gefäßwachstum die Hauptrolle spielen. Gefäßwachstum erfordert das Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. Die zentrale Rolle spielt hierbei die VEGF-Proteinfamilie mit ihren Rezeptoren: hauptsächlich VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) für das Blutgefäßwachstum (Angiogenese) und VEGFR-3 für das Lymphgefäßwachstum (Lymphangiogenese). Andere wichtige Molekülfamilien, die im Folgenden nicht behandelt werden, sind die Tie-Rezeptoren mit ihren Angiopoietin-Liganden, die komplexe, teilweise kontextabhängige Rollen bei der Erhaltung, Stabilisierung und Umgestaltung der Blutgefäße spielen [1, 2], die PDGF-Rezeptoren mit ihren PDGF-Liganden, die notwendig sind für die Stabilisierung der Gefäßwand durch Perizyten und die glatte Gefäßmuskulatur [3], und die Eph-Rezeptoren mit ihren Ephrin-Liganden, deren Zusammenspiel die venöse und arterielle Identität der Blutgefäße bestimmt [4].

Die Signalmoleküle der VEGF-Proteinfamilie beeinflussen Wachstum und Funktion der Endothelzellen über die VEGF-Rezeptoren. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (aufgelistet im Supplement des Übersichtsartikels [5]) werden VEGF-Rezeptoren nur von Endothelzellen produziert. Die VEGF-Rezeptoren gehören zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Die N-terminalen Abschnitte der VEGF-Rezeptoren ragen aus der Zellmembran in den extrazellulären Raum und besitzen hohe Affinität für einen oder mehrere VEGF-Liganden (Bindungspartner), während die C-terminalen Abschnitte innerhalb der Zelle eine katalytische Funktion ausüben, sobald der extrazelluläre Teil mit dem Bindungspartner besetzt wird (Abb. 1). Im Falle der VEGF-Rezeptoren wird die Aktivierung der katalytischen Funktion dadurch erreicht, dass ein VEGF-Ligand jeweils zwei Rezeptor-Bindungsstellen besitzt (Bivalenz). Die



**Abb. 1:** Modell der Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors durch einen bivalenten Liganden. Durch die gleichzeitige Bindung eines Liganden (z.B. VEGF-C, in blau dargestellt) an die extrazellulären Domänen zweier Rezeptor-Moleküle (z.B. VEGFR-3, in grauschwarz dargestellt) werden die intrazellulären katalytischen Domänen (in rot dargestellt) so positioniert, dass sie sich gegenseitig phosphorylieren können. Damit ändern sich die dreidimensionale Struktur des intrazellulären Teils des Rezeptors und dessen Affinität zu weiteren intrazellulären Signalmolekülen (sekundären Botenstoffen), die durch das Andocken an die phosphorylierten Tyrosinreste aktiviert werden. Über mehrere Stufen pflanzen sich solche Aktivierungen fort, bis letztendlich Botenstoffe in den Zellkern gelangen und dort die Genaktivität beeinflussen. Die intrazelluläre Signalübertragung der VEGF-Rezeptoren wird ausführlich im Übersichtsartikel [5] besprochen.

zwei Bindungsstellen binden zwei VEGF-Rezeptoren. Dadurch werden die intrazellulären katalytischen Domänen der Rezeptoren so positioniert, dass sie sich gegenseitig durch die Übertragung von Phosphatgruppen auf bestimmte Tyrosinseitenketten aktivieren. Damit ändert sich die dreidimensionale Struktur der intrazellulären Domäne. Diese Veränderung erlaubt nun Wechselwirkungen mit und Aktivierungen von weiteren intrazellulären Signalmolekülen, die letztendlich eine Veränderung der Genexpression und damit des Zellverhaltens hervorrufen [6]. Neben den eigentlichen VEGF-Rezeptoren besitzen die meisten VEGFs noch

zusätzliche zellmembrangebundene Bindungspartner (sogenannte Korezeptoren), mit denen sie, allerdings mit geringerer Affinität, in Wechselwirkung treten. Zu den Korezeptoren gehören unter anderem die Neuropiline [7].

### Die VEGF-Wachstumsfaktoren

Säugetiere besitzen fünf verschiedene VEGFs: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF (Placenta Growth Factor).

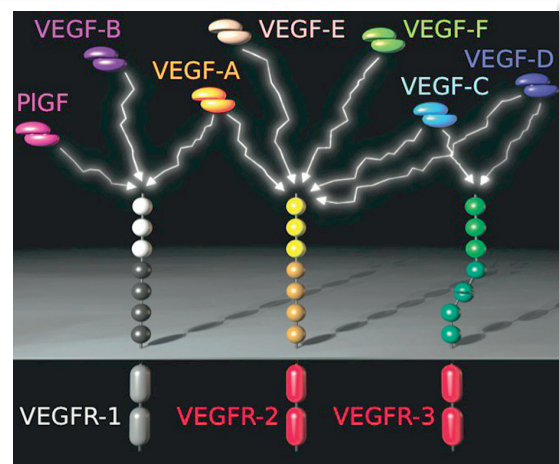
**VEGF-A:** VEGF-A ist der am längsten bekannte VEGF-Wachstumsfaktor und wird oft auch einfach als VEGF bezeichnet;

in der frühen Literatur auch als vaskulärer Permeabilitäts-Faktor (VPF) aufgrund seiner Eigenschaft, die Durchlässigkeit der Blutgefäße zu erhöhen [8]. Seine Hauptfunktion liegt normalerweise in der Stimulation des Blutgefäßwachstums (Angiogenese). Medizinisch relevant ist VEGF-A durch seine Rolle im Tumorwachstum. Die Blockade des Blutgefäßwachstums durch den gegen VEGF-A gerichteten Antikörper Bevacizumab (Avastin®) zeigte schon vor mehr als zehn Jahren, dass Anti-Angiogenese eine nützliche Erweiterung der Therapiemöglichkeiten gegen bestimmte Krebsformen darstellt. VEGF-A hat zwei verschiedene Rezeptoren auf Endothelzellen: VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1) und VEGFR-2 (Abb. 2).

**VEGF-B und PlGF:** Im Gegensatz zu VEGF-A können VEGF-B und PlGF nur mit VEGFR-1 in Wechselwirkung treten (Abb. 2). Fast alle wichtigen Funktionen von VEGF-A werden über die Signaltransduktion des VEGFR-2 vermittelt, und dementsprechend sind VEGF-B und PlGF nur schwach angiogen. VEGFR-1 hat im Gegensatz zu VEGFR-2 sogar eine hemmende Funktion, indem es das hochangiogene VEGF-A stärker bindet als VEGFR-2, ohne aber die starken Reaktionen in der Zelle auszulösen wie VEGFR-2 [9-13]. VEGF-B und PlGF scheinen allerdings spezifische Funktionen für die Angiogenese im Herzmuskel [14, 15], für bestimmte pathologische Prozesse [16] und den Fettsäurestoffwechsel [17] zu besitzen.

**VEGF-C und VEGF-D:** VEGF-C und VEGF-D können beide mit VEGFR-2 und

**Abb. 2:** Schematische Darstellung der VEGF-Liganden und Rezeptoren. Die drei VEGF-Rezeptoren sind Transmembran-Rezeptoren mit einer extrazellulären Domäne, die aus sieben Immunoglobulin (Ig)-Homologie-Domänen besteht, und einer intrazellulären, zweigeteilten Kinase-Domäne. Die äußeren drei Ig-Homologie-Domänen (farblich abgehoben) sind hinreichend, um mit den jeweiligen Liganden in Wechselwirkung zu treten. Die VEGFs bestehen aus jeweils zwei einzelnen Eiweißketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Typischerweise verbinden sich zwei gleiche Eiweißketten zu einem VEGF-Molekül (Homodimer), aber auch zwei verschiedene Eiweißketten können sich zu einem sogenannten Heterodimer verbinden (z.B. PlGF mit VEGF-A). Ähnlich können auch zwei verschiedene VEGF-Rezeptoren sich zu Heterodimern verbinden; beispielsweise können durch VEGF-C VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimere entstehen. Solche Rezeptor-Heterodimere können spezielle Funktionen haben [64, 86]. Unter den VEGF-Rezeptoren ist VEGFR-3 der einzige, dessen extrazelluläre Domäne proteolytisch geschnitten wird [87].

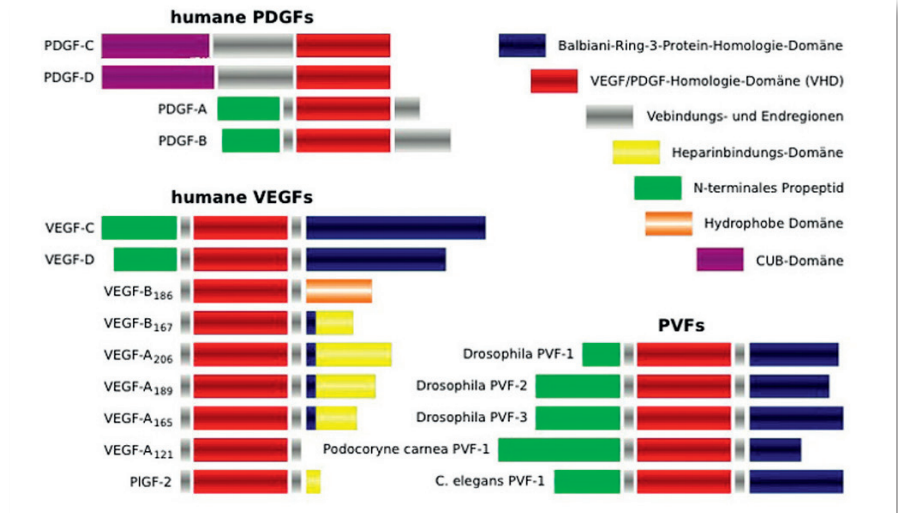


VEGFR-3 interagieren (Abb. 2). Ihre Hauptaufgabe liegt in der Stimulation des Lymphgefäßwachstums. VEGF-C wurde 1996 als erster Bindungspartner des VEGFR-3 entdeckt, für den bis dahin noch kein Ligand gefunden worden war [18]. Wenig später wurde VEGF-C in Mäusen beschrieben, allerdings unter dem Namen VRP (VEGF-related protein [19]). Daraufhin wurden die spezifisch lymphangiogenen Eigenschaften von VEGF-C in verschiedenen Modellorganismen untersucht [20, 21]. Weil sich in einigen dieser Modelle auch die angiogenen Eigenschaften von VEGF-C manifestierten [21-23], wurde eine VEGF-C-Mutante entwickelt (die sogenannte VEGF-C-C156S Mutante), die ausschließlich mit dem VEGF-Rezeptor-3 wechselwirkt und damit keinerlei angiogene Potenz mehr aufweist [24], sodass die lymphangiogene Funktion von VEGF-C getrennt von der angiogenen Funktion erforscht werden kann. VEGF-D wurde unabhängig von drei verschiedenen Forscherteams identifiziert und beschrieben, und zwar einmal unter dem Namen FIGF (c-fos-induzierter Wachstumsfaktor [25]) und zweimal unter dem Namen VEGF-D [26, 27].

**VEGF-E und VEGF-F:** Neben den fünf Säugetier-VEGFs gibt es noch VEGF-E und VEGF-F (Abb. 2). VEGF-E ist die Sammelbezeichnung für eng mit den VEGFs verwandte Proteine, die im Erbgut bestimmter pathogener Viren entdeckt wurden und die für das jeweilige spezifische Krankheitsbild kausal sind [28-32]. Der Sammelbegriff VEGF-F wiederum bezeichnet homologe Proteine, die als akzessorische Bestandteile von Schlangengiften identifiziert wurden [33-37] und die vermutlich durch die Erhöhung der Permeabilität der Blutgefäße die Wirkungen der primären Bestandteile des Schlangengifts potenzieren.

### Vom Aufbau der VEGF-Moleküle

Als VEGFs werden Moleküle klassifiziert, deren zentrale Domäne homolog zu VEGF ist. Diese Domäne wird als VEGF-Homologie-Domäne (VHD) bezeichnet (rot dargestellt in Abb. 3). Diese Homologie lässt sich auf allen Proteinstrukturebe-



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Domänen-Struktur ausgewählter Mitglieder der VEGF- und PDGF-Proteinfamilien. Die PDGF-Familie ist so eng mit der VEGF-Familie verwandt, dass die beiden manchmal als PDGF/VEGF-Familie zusammengefasst werden. Beide Familien lassen sich bei den wirbellosen Tieren nicht voneinander unterscheiden und werden dort als PVFs (PDGF/VEGF-ähnliche Wachstumsfaktoren) bezeichnet [85]. Der Vergleich menschlicher VEGFs mit den PVFs lässt Rückschlüsse auf die Struktur der PDGF/VEGF Urformen zu, die vermutlich den heutigen lymphangiogenen VEGF-C und VEGF-D ähnlicher waren als dem angiogenen VEGF-A. Die PVFs der Fruchtfliege *Drosophila* haben Funktionen für die Migration der Blutzellen und die PVFs der Qualle *Podocoryne carnea* für die Ausbildung der Tentakel und des gastrovaskulären Apparats. Die Funktionen des PVF-1 des Fadenwurms *C. elegans* sind unbekannt.

nen (von der Aminosäuresequenz bis hin zum dreidimensionalen Aufbau des Proteins) erkennen. Die VHD ist der Teil des Moleküls, der den Rezeptor bindet. Daneben weisen die meisten VEGFs zusätzliche Domänen auf, die bestimmte Eigenschaften individueller VEGFs bestimmen, z.B die Affinität von VEGF zu den Korezeptoren Neuropilin-1 und -2 [38] oder die von VEGF-C zum Korezeptor Neuropilin-2 [39, 40].

Allen Mitgliedern der VEGF-Familie ist gemeinsam, dass sie aus jeweils zwei Polypeptidketten aufgebaut werden (dimere Proteine). Während der Biosynthese lagern sich die Polypeptidketten antiparallel mit einer hydrophoben Berührungsfläche aneinander und verbinden sich kovalent mit zwei Disulfidbrücken. Die dadurch entstehende Form ähnelt im Groben einem abgeflachten Ellipsoid. An beiden Enden dieses Ellipsoids befindet sich jeweils ein Epitop, das einen passenden VEGF-Rezeptor binden kann. Jedes Epitop setzt sich aus Teilen beider Polypeptidketten zusammen, sodass mono-

mere VEGFs (VEGFs mit nur einer Polypeptidkette) biologisch inaktiv sind, weil sie nicht zwei Rezeptoren miteinander verbinden können [41].

### Alternatives Spleißen

Wie die Mehrzahl der sekretierten Proteine sind auch VEGFs Glykoproteine. Sie werden zumeist in verschiedenen Formen produziert, wobei die Vielfalt entweder durch alternatives Spleißen oder durch die Modifikation (z. B. Trimmen) des fertigen Proteins entsteht. Durch das alternative Spleißen der mRNA von VEGF-A werden verschiedene Isoformen produziert, die sich hauptsächlich in ihrer Affinität zu Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) unterscheiden, also zu Molekülen die hauptsächlich in der extrazellulären Matrix (EZM) und auf Zelloberflächen vorkommen (Abb. 3) [12, 41]. Durch die Wechselwirkung mit HSPGs werden die sogenannten „Heparin bindenden“ VEGF-A-Isoformen immobilisiert und bilden ein



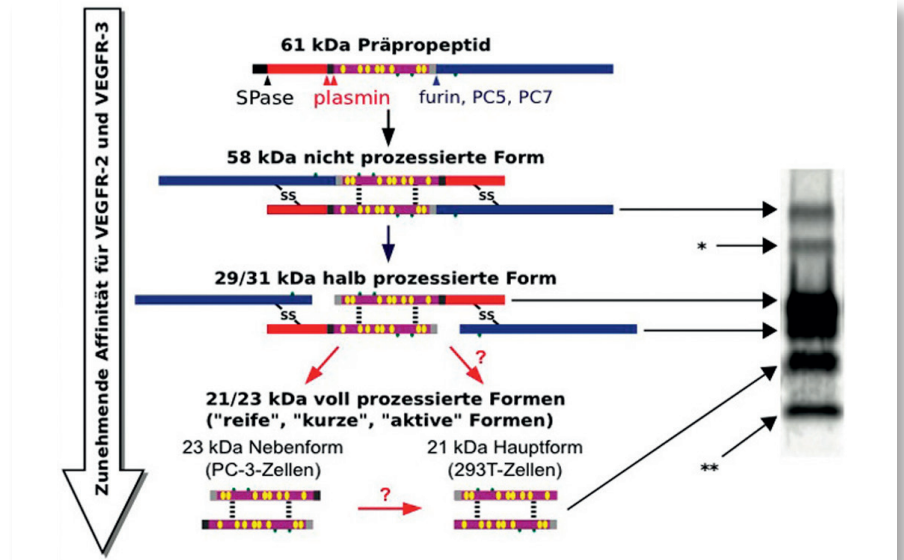
lokales Konzentrationsgefälle, an dem sich wachsende Blutgefäße orientieren [42, 43].

## Die Aktivierung von VEGF-C und VEGF-D

Auch von VEGF-C und VEGF-D wurden Spleiß-Isoformen beschrieben, deren Funktionen allerdings unbekannt sind [19]. VEGF-C und VEGF-D erhalten ihre Formenvielfalt hauptsächlich durch die enzymatische (proteolytische) Abspaltung der Propeptide von den VEGF-C- und VEGF-D-Vorgängermolekülen (Abb. 4). Die Affinität der Vorgängermoleküle für den VEGF-Rezeptor-3 ist recht gering und die für den VEGF-Rezeptor-2 noch unbedeutender. Mit zunehmendem Prozessierungsgrad steigen die Affinitäten zu beiden Rezeptoren, und voll prozessierte, reife VEGF-C- und VEGF-D-Moleküle haben zusätzlich zu ihrer lymphangiogenen eine stark angiogene Komponente [44-47]. Wie die Aktivierung von VEGF-C und VEGF-D im Organismus kontrolliert wird, ist nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass die Verfügbarkeit der spezifischen Proteasen, die für die Aktivierung verantwortlich sind, einer der entscheidenden Faktoren dafür ist, ob VEGF-C und VEGF-D nur lymphangiogen oder auch angiogen wirksam werden. Neben der Regulierung der Aktivität hat das C-terminale Propeptid von VEGF-C und VEGF-D noch andere Funktionen: Ähnlich wie die Heparinbindungs-Domäne bei VEGF-A verleiht es den Molekülen ihre Heparinaffinität [48]. Interessant ist außerdem, dass im C-terminalen Propeptid eine repetitive Anordnung der Cystein-Seitenketten vorliegt, wie sie sonst fast nur von Speichelproteinen der Seide spinnenden Mückenlarven des Genus *Chironomus* bekannt ist; daher auch der Name „Seidenhomologie-Domäne“ für das C-terminale Propeptid [18, 49]. Warum VEGF-C diese Ähnlichkeit aufweist, ist allerdings gänzlich unbekannt.

## Vaskulogenese oder Angiogenese?

Zwei unterschiedliche Mechanismen führen zur Entstehung neuer Gefäße: Vasku-



**Abb. 4:**

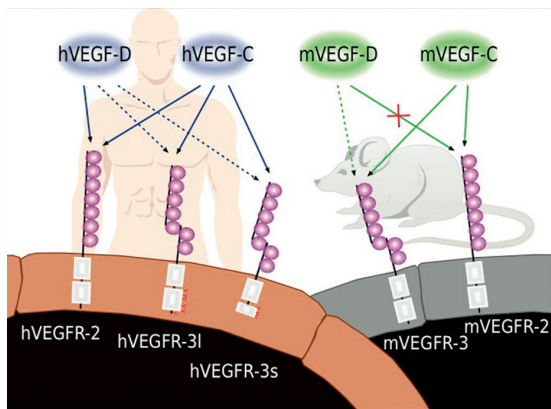
Die enzymatische Reifung von VEGF-C. VEGF-C wird als Vorgängermolekül produziert. Im Zuge der Proteinbiosynthese wird das Signalpeptid bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten. Im ER findet die Proteinfaltung statt. Auf dem Weg durch den Golgi-Apparat findet der erste enzymatische Schnitt statt. Die beiden Hälften des VEGF-C werden danach immer noch durch Disulfid-Brücken zusammengehalten. Nachdem diese halb prozessierte Form sekretiert wurde, werden durch zwei weitere enzymatische Schnitte die reifen Formen hergestellt. Der erste, intrazelluläre Schnitt kann durch die Enzyme Furin, PC5 oder PC7 erfolgen [88]. Die Enzyme, die die extrazellulären Schnitte katalysieren, sind nicht genau definiert. Plasmin kann Schnitte ausführen, die VEGF-C-Formen entstehen lassen, die dem reifen VEGF-C ähnlich oder identisch sind [89]. Die VEGF-C Aktivierung durch Plasmin könnte zumindest bei der Wundheilung von Bedeutung zu sein [90, 91]. Je nach Zelltyp werden zwei unterschiedliche reife VEGF-C-Formen produziert, die sich um neun Aminosäureseitenketten unterscheiden [44]. Beide binden und aktivieren VEGFR-2 und VEGFR-3. Es ist auch nicht bekannt, ob die 21-kDa-Hauptform durch Prozessierung der 23-kDa-Nebenform entsteht oder ob beide direkt aus der halb prozessierten Form gebildet werden.

Rechts ist ein typisches Bandenmuster zu sehen, das nach elektrophoretischer Auftrennung bei der Produktion von VEGF-C beobachtet werden kann. \* Markiert eine untergeordnete 43-kDa-Form [44]. \*\* Markiert das N-terminale Propeptid. Die enzymatische Reifung von VEGF-D verläuft zum größten Teil analog zu der von VEGF-C [45]. Ein entscheidender Unterschied besteht aber zwischen den zwei reifen Formen von VEGF-D: Die kürzere besitzt keine Affinität mehr zum VEGFR-3 [92].

logene und Angiogenese. Vaskulogenese ist die Differenzierung von Vorläuferzellen (Angioblasten oder Lymphangioblasten) zu Endothelzellen und die damit verbundene Entstehung eines primitiven Gefäßnetzwerks, während Angiogenese das Wachstum neuer Gefäße ausgehend von existierenden Gefäßen bezeichnet. Während Vaskulogenese hauptsächlich während der frühen Entwicklung des Blutgefäßsystems eine Rolle spielt, ist Angiogenese der Hauptmechanismus für Gefäßwachstum während der Spätphase der Embryonalentwicklung und im

erwachsenen Organismus. Das Lymphgefäßsystem bildet sich in Säugetieren durch von den großen Venen ausgehende angiogene Prozesse [50, 51]. Dass aber auch Vaskulogenese einen Beitrag zur Entwicklung des Lymphgefäßsystems leisten kann, wurde unter anderem bei Vögeln [52] und Fröschen [53] gezeigt.

Um neue Gefäße zu bilden, müssen die Endothelzellen ein komplexes Programm bewältigen: Sie müssen aus der Ruhephase zurück in den aktiven Zellzyklus. Einer der wichtigsten Auslöser dieser Wiederaufnahme der Zellteilung bei



**Abb. 5:**

Wichtige molekulare Regulatoren der Lymphangiogenese unterscheiden sich zwischen Mäusen und Menschen. Maus-VEGF-D kann nicht Maus-VEGFR-2 aktivieren. Mäuse weisen auch keine zweite, kurze Spleiß-Isoform des VEGFR-3 auf. Die Funktion der kurzen Spleiß-Isoform ist unbekannt. Weil der letztgenannte Unterschied auf einer retroviralen Integration beruht, die spezifisch für den Menschen (oder höhere Primaten) ist, bleibt unklar, inwieweit Forschungsergebnisse zum Lymphgefäßsystem sich von den gängigen Modellorganismen auf den Menschen übertragen lassen [82].

Blutgefäßendothelzellen ist der Mangel an Sauerstoff (Hypoxie), der zwangsläufig beim avaskulären Wachstum entsteht. Molekulare Sauerstoff-Sensoren aktivieren einen genetischen Hauptschalter, der das Angiogenese-Programm „einschaltet“ [54]. Die Auslöser für die Expansion des Lymphsystems sind weniger gut bekannt, aber der interstitielle Druck spielt während der Embryonalentwicklung [55] und der Entzündungsstatus für pathologische Lymphangiogenese [56] eine wichtige Rolle.

### Unterschiede zwischen Blut- und Lymphgefäßsystem

Der Druck innerhalb des Blutgefäßsystems führt zum Austritt von Blutplasma, das damit zu Gewebsflüssigkeit wird. Die Hauptfunktion der Lymphgefäße besteht in der Rückführung der überschüssigen Gewebsflüssigkeit in die Blutzirkulation. Nach der Aufnahme durch die Lymphgefäße wird die Gewebsflüssigkeit zu Lymphe. Diese durchfließt auf ihrem Weg zurück zum Blutgefäßsystem die Lymphknoten, die Basisstationen des körpereigenen Abwehrsystems. Hier reifen und vermehren sich maßgeschneiderte Immunzellen gegen die Antigene, die als fremd erkannt worden sind. Eine weitere Funktion der Lymphgefäße beschränkt sich auf den Darm: die Aufnahme und der Transport der Nahrungsfette und fettlöslichen Vitamine [57].

Blutgefäße und Lymphgefäße sind unterschiedlich aufgebaut. Blutendothelzellen sind über Tight Junctions („dichte

Verbindungen“) und Adherens Junctions („Adhäsionsverbindungen“) miteinander verbunden und weisen auf der dem Gewebe zugewandten Seite meistens eine geschlossene Basalmembran auf. Hingegen sind Lymphendothelzellen klappenartig miteinander verbunden, und ihre Basalmembran ist unvollständig. Mit dem angrenzenden Gewebe sind sie über Fasern (Ankerfilamente) verbunden. Diese sorgen offensichtlich bei erhöhtem interstitiellem Druck für ein Öffnen der Klappen und gewährleisten so den Abfluss der Gewebsflüssigkeit [58-60]. Blut- und Lymphendothel unterscheiden sich auch durch die Expression bestimmter Marker-moleküle: Sowohl Blut- als auch Lymphendothelzellen exprimieren den generellen Endothelmarker PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1; CD31). Aber sie exprimieren verschiedene VEGF-Rezeptoren: Blutendothelzellen exprimieren VEGFR-1 und VEGFR-2, Lymphendothelzellen hingegen VEGFR-2 und VEGFR-3. Ausnahmen unter den Blutendothelien bilden das fenestrierte Endothel [61], hochendotheliale Venolen (HEVs [62, 63]) und die Blutgefäße von Tumoren [64], die wie die Lymphgefäße den VEGFR-3 exprimieren. Die Mechanismen des gerichteten Wachstums sind bei Blutgefäßen ähnlich wie beim Axonwachstum der Nervenzellen [65]: Spezialisierte Zellen an den Spitzen der Gefäßsprossen können mithilfe von Filopodien Konzentrationsunterschiede an Wachstumsfaktoren wahrnehmen [66-68] und die Wachstumsrichtung der nachfolgenden Zellen bestimmen.

### VEGF-C und VEGF-D in der Embryonalentwicklung

VEGF-C und VEGF-D binden zwei Rezeptoren: VEGFR-2 und VEGFR-3 (Abb. 2). VEGFR-2 ist der primäre Rezeptor auf den Endothelzellen der Blutgefäße (BECs) und stimuliert deren Wachstum, während VEGFR-3 dieselbe Funktion auf Lymphendothelzellen ausübt. Dementsprechend können VEGF-C und VEGF-D sowohl angiogen als auch lymphangiogen wirken. VEGFR-3 wurde früher entdeckt als VEGF-C und VEGF-D, und deshalb war VEGFR-3 für einige Zeit ein „orphan receptor“, also ein Rezeptor ohne bekannten Bindungspartner. Bald nach der Entdeckung von VEGFR-3 wurde jedoch aufgrund des spezifischen Expressionsmusters von VEGFR-3 klar, dass seine Funktion eng mit dem Lymphgefäßsystem zu tun haben muss. In der frühen Embryonalentwicklung wird VEGFR-3 aber generell von allen Endothelzellen exprimiert; erst mit fortschreitendem Alter reduziert sich die Expression von VEGFR-3 mehr und mehr auf Lymphendothelzellen [63], um schließlich so spezifisch für sie zu sein, dass VEGFR-3 als Marker für diese Zellen benutzt wird [69].

Genmanipulierte Mäuse, die kein VEGFR-3 exprimieren, sterben zwischen dem neunten und zehnten Tag der Embryonalentwicklung aufgrund von Fehlern bei der Organisation und Reifung der Blutgefäße [70]. Zu diesem Zeitpunkt hat die Entwicklung des Lymphgefäßsystems noch gar nicht begonnen, und damit bestätigt sich die essentielle Funktion von VEGFR-3 für die Entwicklung des Blutgefäßsystems.

Mäuse, die den VEGFR-3-Liganden VEGF-C nicht exprimieren, sterben ungefähr drei Tage später (ET 12,5) an einem generalisierten Ödem, da sich kein Lymphgefäßsystem bei ihnen entwickelt [71].

Interessanterweise ist weder die embryonale Entwicklung des Blut- noch die des Lymphgefäßsystems von dem zweiten lymphangiogenen Wachstumsfaktor VEGF-D abhängig [72]. Selbst die Abwesenheit beider VEGFR-3-Liganden (VEGF-C und VEGF-D) während der Embryonalentwicklung führt nicht zu den gleichen schweren Störungen bei der Entwicklung des Blutgefäßsystems wie die Abwesenheit von VEGFR-3 [73]. Daher wird angenommen, dass es entweder neben VEGF-C und VEGF-D noch andere Liganden für den VEGFR-3 gibt, oder dass VEGFR-3 bis zu einem gewissen Grad unabhängig von seinen Liganden aktiviert werden kann [74, 75].

Ein Molekül, das genauso früh wie VEGF-C für die Embryonalentwicklung des Lymphgefäßsystems benötigt wird und die Lymphangiogenese durch VEGF-C unterstützt, ist CCBE1 (collagen and calcium binding EGF domains 1 protein). CCBE1-defiziente Mäuse ähneln sehr den VEGF-C-defizienten Mäusen, aber es ist unklar, welche genaue Rolle CCBE1 für das Lymphgefäßsystem spielt [76-78]. Mutationen im menschlichen CCBE1-Gen verursachen das Hennekam-Syndrom, eine seltene Erbkrankheit, zu deren Leitsymptomen Lymphödeme und Lymphangiektasie des Darms gehören [79].

## Von Unterschieden zwischen Mäusen und Menschen

Da wir einen beträchtlichen Teil unseres Wissens über die molekularen Mechanismen der Lymphangiogenese der Labormaus verdanken, ist es notwendig, zwei wichtige Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen bezüglich des VEGF-C-/VEGF-D-/VEGFR-3-Signalwegs zu erläutern (Abb. 5). Während humanes VEGF-D nach entsprechender Reifung den angiogenen VEGFR-2 aktivieren kann, ist dies beim Maus-VEGF-D nicht der Fall [80]. Es wird daher angenommen, dass VEGF-D bei Mäusen und Menschen unterschiedliche Funktionen erfüllt. Weiterhin gibt es

beim Menschen zwei Spleißvarianten des VEGFR-3, eine kurze und eine lange [81], wogegen es bei der Maus nur eine gibt. Das Erscheinen zweier Spleißvarianten des Rezeptors lässt sich auf eine retrovirale Insertion in das VEGFR-3-Gen zurückführen [82]. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in den Signalen, die sie intrazellulär nach VEGF-C-Stimulierung weiterleiten [83, 84].

Der zweite Teil unseres Übersichtsartikels (in *LymphForsch* 2/2013) wird die Rollen von VEGF-C und VEGF-D bei verschiedenen das Lymphgefäßsystem betreffenden Erkrankungen thematisieren. Von einigen dieser Krankheiten gibt es Mausmodelle. Allerdings sollte man sich der molekularen Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen bewusst sein, wenn man von vorklinischen Studien mit Tiermodellen auf klinische Studien beim Menschen extrapoliert.

## Literatur

1. Thomas M, Augustin HG: The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009;12:125-137.
2. Saharinen P, Bry M, Alitalo K: How do angiopoietins Tie in with vascular endothelial growth factors? *Curr Opin Hematol* 2010;17:198-205.
3. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008;22:1276-1312.
4. Adams RH, Eichmann A: Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001875.
5. Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:359-371.
6. Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117-1134.
7. Koch S, Claesson-Welsh L: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006502.
8. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J et al.: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-1312.
9. de Vries J, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.
10. Plouet J, Moukadir H: Characterization of the receptor to vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 1990;265:22071-22074.
11. Shibuya M, Claesson-Welsh L: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:549-560.
12. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
13. Ho VC, Duan LJ, Cronin C, Liang BT, Fong GH: Elevated vascular endothelial growth factor receptor-2 abundance contributes to increased angiogenesis in vascular endothelial growth factor receptor-1-deficient mice. *Circulation* 2012;126:741-752.
14. Lähteenvuo JE, Lähteenvuo MT, Kivellä A, Rosenlew C, Falkevall A, Klar J, et al.: Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. *Circulation* 2009;119:845-856.
15. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F et al.: Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8:831-840.
16. Li X, Tjwa M, Van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K et al.: Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1614-1620.
17. Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I et al.: Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 2010;464:917-921.
18. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E et al.: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290-298.
19. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI: Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1988-1992.
20. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H et al.: Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:1423-1425.
21. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B et al.: VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997;188:96-109.
22. Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V et al.: Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14389-14394.
23. Eichmann A, Corbel C, Jaffredo T, Brant C, Joukov V, Kumar V et al.: Avian VEGF-C: cloning, embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR2-expressing endothelial cell precursors. *Development* 1998;125:743-752.
24. Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O et al.: A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 1998;273:6599-6602.



25. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S: Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11675-11680.
26. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y: Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 1997;42:483-488.
27. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF et al.: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:548-553.
28. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ: Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1994;68:84-92.
29. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M: A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-31282.
30. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, et al.: A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999;18:363-374.
31. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, et al.: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3071-3076.
32. Wise LM, Inder MK, Real NC, Stuart GS, Fleming SB, Mercer AA: The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cell Microbiol* 2012;14:1376-1390.
33. Komori Y, Nikai T, Taniguchi K, Masuda K, Sugihara H: Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). *Biochemistry* 1999;38:11796-11803.
34. Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, Ho PL: Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem* 2001;276:39836-39842.
35. Gasmi A, Abidi F, Srairi N, Ojattayer A, Karoui H, Elayeb M: Purification and characterization of a growth factor-like which increases capillary permeability from *Vipera lebetina* venom. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:69-72.
36. Gasmi A, Bourcier C, Aloui Z, Srairi N, Marchetti S, Gimond C et al.: Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling. *J Biol Chem* 2002;277:29992-29998.
37. Yamazaki Y, Matsunaga Y, Tokunaga Y, Obayashi S, Saito M, Morita T: Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *J Biol Chem* 2009;284:9885-9891.
38. Neufeld G, Kessler O, Herzog Y: The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol* 2002;515:81-90.
39. Kärpänen T, Heckman CA, Keskkitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G et al.: Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J* 2006;20:1462-1472.
40. Xu Y, Yuan L, Mak J, Pardanaud L, Caunt M, Kasman I et al.: Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J Cell Biol* 2010;188:115-130.
41. Grunewald FS, Protá AE, Giese A, Ballmer-Hofer K: Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:567-580.
42. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A et al.: VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:1163-1177.
43. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H et al.: Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002;16:2684-2698.
44. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y et al.: Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997;16:3898-3911.
45. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E et al.: Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999;274:32127-32136.
46. 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;104:1302-1312.
47. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI et al.: VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003;92:1098-1106.
48. Harris NC, Davydova N, Roufail S, Paquet-Fifield S, Paavonen K, Karnezis T, et al.: The Propeptides of VEGF-D Determine Heparin Binding, Receptor Heterodimerization, and Effects on Tumor Biology. *J Biol Chem* 2013;288:8176-8186.
49. Case ST, Cox C, Bell WC, Hoffman RT, Martin J, Hamilton R: Extraordinary non-conservation of cysteines among homologous Chironomus silk proteins sp185 and sp220. *J Mol Evol* 1997;44:452-462.
50. Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999;98:769-778.
51. Oliver G: Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 2004;4:35-45.
52. Papoutsis M, Tomarev SI, Eichmann A, Prols F, Christ B, Wilting J: Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane. *Dev Dyn* 2001;222:238-251.
53. Ny A, Koch M, Schneider M, Neven E, Tong RT, Maity S et al.: A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med* 2005;11:998-1004.
54. Lendahl U, Lee KL, Yang H, Poellinger L: Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat Rev Genet* 2009;10:821-832.
55. Planas-Paz L, Strlic B, Goedecke A, Breier G, Fassler R, Lammert E: Mechanoinduction of lymph vessel expansion. *EMBO J* 2012;31(4):788-804.
56. Carmeliet P: Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438: 932-936.
57. Nordskog BK, Phan CT, Nutting DF, Tso P: An examination of the factors affecting intestinal lymphatic transport of dietary lipids. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:21-44.
58. Casley-Smith JR, Florey HW: The structure of normal small lymphatics. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1961;46:101-106.
59. Leak LV, Burke JF: Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am J Anat* 1966;118:785-809.
60. Jeltsch M, Tammela T, Alitalo K, Wilting J: Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* 2003;314:69-84.
61. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M et al.: VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000;14:2087-2096.
62. Lacorre D-A, Baekkevold ES, Garrido I, Brandtzaeg P, Haraldsen G, Amalric F et al.: Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood* 2004;103:4164-4172.
63. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D et al.: Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3566-3570.
64. 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;454:656-660.
65. Carmeliet P: Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 2003;4:710-720.
66. Gerhardt H, Ruhrberg C, Abramsson A, Fujisawa H, Shima D, Betsholtz C: Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev Dyn* 2004;231:503-509.
67. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S et al.: Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 2010;116:829-840.

68. Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H: VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans* 2009;37:1233-1236.

69. Petrova TV, Bono P, Holthöner W, Chesnes J, Pytowski B, Sihto H et al.: VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer Cell* 2008;13:554-556.

70. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K et al.: Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998;282:946-949.

71. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV et al.: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5:74-80.

72. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Graill D et al.: Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005;25:2441-2449.

73. Haiko P, Makinen T, Keskkitalo S, Taipale J, Karkkainen MJ, Baldwin ME et al.: Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. *Mol Cell Biol* 2008;28:4843-4850.

74. Zhang X, Groopman JE, Wang JF: Extracellular matrix regulates endothelial functions through interaction of VEGFR-3 and integrin alpha5beta1. *J Cell Physiol* 2005;202:205-214.

75. Galvagni F, Pennacchini S, Salameh A, Rocchigiani M, Neri F, Orlandini M et al.: Endothelial cell adhesion to the extracellular matrix induces c-Src-dependent VEGFR-3 phosphorylation without the activation of the receptor intrinsic kinase activity. *Circ Res* 2010;106:1839-1848.

76. 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;41:396-398.

77. 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;109:486-491.

78. Hagerling R, Pollmann C, Andreas M, Schmidt C, Nurmi H, Adams RH, et al.: A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. *EMBO J* 2013;32:629-644.

79. 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;41:1272-1274.

80. Baldwin ME, Catimel B, Nice EC, Roufail S, Hall NE, Stenvers KL et al.: The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-d is different in mouse and man. *J Biol Chem* 2001;276:19166-19171.

81. Pajusola K, Aprelikova O, Armstrong E, Morris S, Alitalo K: Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene* 1993;8:2931-2937.

82. Hughes DC: Alternative splicing of the human VEGFR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *J Mol Evol* 2001;53:77-79.

83. Borg JP, deLapeyriere O, Noguchi T, Rottapel R, Dubreuil P, Birnbaum D: Biochemical characterization of two isoforms of FLT4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase. *Oncogene* 1995;10:973-984.

84. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K et al.: Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003;278:40973-40979.

85. Tarsitano M, De Falco S, Colonna V, McGhee JD, Persico MG: The *C. elegans* pvf-1 gene encodes a PDGF/VEGF-like factor able to bind mammalian VEGF receptors and to induce angiogenesis. *FASEB J* 2006;20:227-233.

86. Nilsson I, Bahram F, Li X, Gualandi L, Koch S, Jarvius M, et al.: VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J* 2010;29:1377-1388.

87. Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 1994;9:3545-3555.

88. Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chretien M et al.: The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003;111:1723-1732.

89. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ et al.: Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 2003;198:863-868.

90. Saaristo A, Tammela T, Timonen J, Yla-Herttuala S, Tukiainen E, Asko-Seljavaara S et al.: Vascular endothelial growth factor-C gene therapy restores lymphatic flow across incision wounds. *FASEB J* 2004;18:1707-1709.

91. Saaristo A, Tammela T, Farkkilä A, Kärkkäinen M, Suominen E, Yla-Herttuala S et al.: Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *Am J Pathol* 2006;169:1080-1087.

92. Leppänen V-M, Jeltsch M, Anisimov A, Tvorogov D, Aho K, Kalkkinen N et al.: Structural determinants of vascular endothelial growth factor-D receptor binding and specificity. *Blood* 2011;117:1507-1515.

**Der 2. Teil des Artikels erscheint in der nächsten Ausgabe.**

## Korrespondenzadresse

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



**Praktische Sklerotherapie**  
Sklerosierungsbehandlung der Varikose und anderer Indikation  
3. erweiterte und vollständig überarbeitete Auflage  
K. Hübner, F. X. Breu (Hrsg.)

Mit über 400 farbigen Abbildungen  
Din-A4-Format, 264 Seiten  
ISBN: 978-3-934371-49-1  
Bestellnummer: 6830049  
Preis: 46,- Euro



Coupon ausfüllen und einsenden an:  
WPV Verlag GmbH, Belfortstraße 9  
50668 Köln, Tel. 02 21/9883 01-00  
Fax 02 21/9883 01-05

**Schneller gehts per**  
E-Mail: [info@wpv.de](mailto:info@wpv.de) oder über  
[www.der-niedergelassene-arzt.de](http://www.der-niedergelassene-arzt.de)

## BESTELLCOUPON

**Ja**, hiermit bestelle ich zum Preis von 46,- Euro (zzgl. Versandkosten)  
\_\_\_\_\_ Expl. „Praktische Sklerotherapie ...“  
Best.-Nr. 6830049

Name, Vorname \_\_\_\_\_

Straße, Nr. \_\_\_\_\_

PLZ Ort \_\_\_\_\_

Mein Zahlungswunsch:

Bequem und bargeldlos

Geldinstitut: \_\_\_\_\_

BLZ: | | | | | | | | | |

Konto-Nr.: \_\_\_\_\_

Nach Erhalt der Rechnung

Datum, Unterschrift \_\_\_\_\_

Diese Bestellung kann innerhalb von 10 Tagen (Datum des Postvermerks) schriftlich widerrufen werden beim WPV Verlag GmbH, Belfortstraße 9, 50668 Köln.

Datum, Unterschrift \_\_\_\_\_