

Udział VEGF-A i jego receptorów w procesie angiogenezy

Received: 27.11.2013
Revised: 12.01.2014
Accepted: 15.03.2014
Published online: 31.12.2014

The role of VEGF-A and its receptors in angiogenesis

Anna M. Uttecht-Pudelko¹, Robert Partyka¹, Izabela Jałowiecka¹, Michał Żerdziński²,
Beata Pieczyrak², Danuta Kokocińska¹

STRESZCZENIE

Tworzenie naczyń krwionośnych jest niezbędne do prawidłowego rozwoju organizmu i przebiegu procesów naprawczych, ale też kluczowe w progresji choroby nowotworowej i generacji przerzutów odległych w guzach litych. Główną cytokiną promującą rozwój nowych naczyń krwionośnych jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (*vascular endothelial growth factor*), natomiast jego rozpuszczalne receptory (sVEGF-R1 i sVEGF-R2), w związku z wychwytywaniem wolnych cząsteczek VEGF-A oraz ich neutralizacją, charakteryzuje aktywność antyangiogenna.

SŁOWA KLUCZOWE:

angiogeneza, VEGF-A, sVEGF-R1, sVEGF-R2

ABSTRACT

Angiogenesis is essential for the proper development of the organism and repair processes, but also significant in cancer progression and metastasis in solid tumors. A major cytokine that promotes the development of new blood vessels is the vascular endothelial growth factor – VEGF, whereas its soluble receptors (sVEGF-R1 and sVEGF-R2) perform antiangiogenic activity because they capture and neutralize VEGF-A free molecules.

KEY WORDS

angiogenesis, VEGF-A, sVEGF-R1, sVEGF-R2

¹Oddział Kliniczny Anestezjologii i Intensywnej Terapii Katedry Anestezjologii, Intensywnej Terapii i Medycyny Ratunkowej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
²Wojewódzki Szpital Specjalistyczny nr 5 im. Św. Barbary w Sosnowcu

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Anna Maria Uttecht-Pudelko
Oddział Kliniczny Anestezjologii i Intensywnej Terapii Katedry Anestezjologii, Intensywnej Terapii i Medycyny Ratunkowej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Św. Barbary
Pl. Medyków 1
41-200 Sosnowiec
tel. +48 32 368 27 39
e-mail: uttecht@poczta.fm

Ann. Acad. Med. Siles. 2014, 68, 6, 457–464
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
eISSN 1734-025X
www.annales.sum.edu.pl

Transformacja nowotworowa komórek i rozwój choroby nowotworowej są niezwykle złożonym procesem oraz konsekwencją zaburzeń regulacji funkcji wielu genów w organizmie. Transformowana komórka przestaje reagować na zewnętrzne czynniki regulatorowe i zaczyna się dzielić w niekontrolowany sposób. Rozrost nowotworowy cechuje przewaga proliferacji nad obumieraniem komórek, z jednoczesnym zahamowaniem ich różnicowania. Podlegająca takim przemianom komórka prezentuje tzw. fenotyp nowotworowy, który charakteryzuje nasilenie wzrostu komórek, utrata zdolności do apoptozy i pobudzenie angiogenezy [1,2,3].

Proces nowotworzenia naczyń krwionośnych zależy od równowagi między czynnikami pro- i antyangiogennymi, syntetyzowanymi nie tylko przez komórki nowotworowe, lecz także przez monocyty, makrofagi naciekające nowotwór, komórki podścieliska nowotworowego oraz płytki krwi i leukocyty [4,5]. Główną cytokiną promującą rozwój nowych naczyń krwionośnych jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (*vascular endothelial growth factor*), natomiast jego rozpuszczalne receptory (sVEGF-R1 i sVEGF-R2) charakteryzuje aktywność antyangiogenna.

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu – VEGF

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu został wyizolowany w latach 80. przez kilku niezależnych badaczy. W 1983 r. Senger i wsp. opisali go jako czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń (*vascular permeability factor* – VPF) [6]. W 1989 r. białko o właściwościach mitogennych dla komórek śródbłonka zidentyfikowali Ferrara i Henzel [7], nazywając je naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostu (VEGF) oraz Plouet i wsp. [8], określając je mianem waskulotropiny (*vasculotropin*). Analiza wszystkich wspomnianych cząsteczek dowiodła jednak, że charakteryzują one ten sam czynnik, wykazujący silne proangiogenne działanie, związane z bezpośrednią aktywacją komórek śródbłonka naczyń [9,10].

Rodzinę VEGF tworzą: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz łożyskowy czynnik wzrostu (*placenta growth factor* – PlGF), a także wirusowy homolog VEGF, czyli VEGF-E oraz VEGF-F spotykamy w jadzie niektórych węży. Wszystkie cząsteczki należące do rodziny VEGF – poza tym że są produktami ekspresji różnych genów, mają różną strukturę i wykazują odmienne działanie biologiczne – charakteryzuje zdolność do dimeryzacji [10,11].

Najważniejszym i dotychczas najlepiej poznanym czynnikiem proangiogennym, uważanym za prototyp rodziny VEGF, jest VEGF-A. Znanych jest kilka, różniących się liczbą aminokwasów w cząsteczce, izoform tego białka, których powstanie oparte jest

na mechanizmie alternatywnego składania mRNA genu kodującego VEGF-A [12]. VEGF-B jest związany z progresją guzów nowotworowych niezależną od angiogenezy, VEGF-C i VEGF-D są zaangażowane przede wszystkim w proces limfangiogenezy, stymulują migrację i proliferację komórek śródbłonka naczyń chłonnych, natomiast PlGF odpowiada za wzrost komórek śródbłonka i komórek mięśni gładkich, jest chemoatraktantem komórek uczestniczących w zapaleniu, wzrost stężenia tego czynnika jest charakterystyczny dla nowotworów, zawału mięśnia sercowego i retinopatii [11,13,14,15,16].

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A (VEGF-A) zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, a to z kolei umożliwia przenikanie do przestrzeni pozanaczyniowej różnych białek osocza, m.in. plazminogenu i fibrynogenu, oraz przyczynia się do gromadzenia płynu w środowisku zewnątrznaczyniowym i zwiększenia ciśnienia śródtkankowego w guzie nowotworowym. Poza tym VEGF-A pośrednio uczestniczy w procesie degradacji kolagenu typu IV i uszkodzeniu błony podstawnej naczyń krwionośnych. Proces ten jest związany z przekształceniem plazminogenu w plazminę i aktywacją metaloproteinaz (MMPs). Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu jest także silnym mitogenem dla komórek śródbłonka naczyniowego, dzięki czemu stymuluje ich proliferację i migrację oraz uczestniczy w mobilizacji komórek macierzystych śródbłonka naczyń ze szpiku. Ponadto indukuje chemotaksję i aktywację monocytów oraz upośledza funkcje immunologiczne ustroju poprzez hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych [11,17,18,19].

W ostatnich latach zauważono, że zarówno w ośrodkowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym VEGF, oprócz podstawowej funkcji proangiogennej, przejawia również aktywność neurotroficzną i neuroprotekcijną [10].

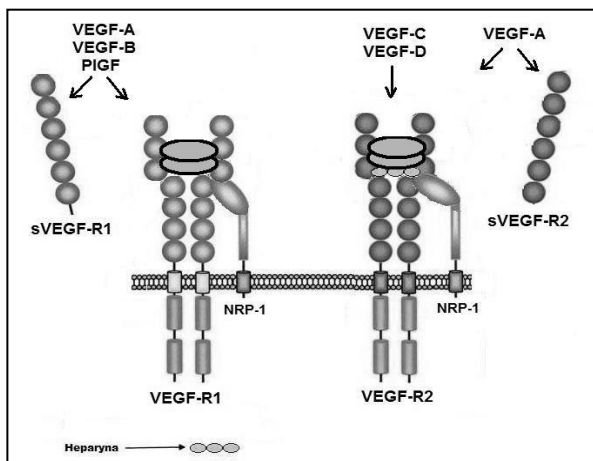
Zdolność syntezy VEGF wykazuje wiele komórek, m.in. śródbłonka, mięśni gładkich naczyń krwionośnych, makrofagi, fibroblasty, limfocyty, aktywowane płytki krwi i komórki nowotworowe [20]. Istotnymi czynnikami stymulującymi syntezę VEGF w komórce są: hipoksja, niektóre cytokiny, takie jak IL-1 β , TNF- α , czynniki wzrostowe (m.in. bFGF, PDGF i TGF- β) oraz hormony, tlenek azotu, reaktywne formy tlenu i chelaty żelaza [17,21,22,23,24]. Znaczny udział w regulacji ekspresji i syntezy VEGF przypisuje się także mutacjom genów supresorowych, m.in. *P53* i *VHL* (von Hippel-Lindau) oraz aktywacji onkogenów, np. *SRC* i *RAS* [21].

Niedotlenienie jest głównym czynnikiem zewnętrznym pobudzającym transkrypcję mRNA kodującego VEGF i stabilizację jego cząsteczki. Efekt ten jest regulowany przez aktywność czynnika indukowanego hipoksją, HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1*) [21,25].

Receptory powierzchniowe VEGF-R

Aktywność biologiczna cząsteczek z rodziny VEGF wiąże się ze znajdującymi się na powierzchni komórek docelowych swoistymi receptorami: VEGF-R1 (*fms like tyrosine kinase* – Flt-1), VEGF-R2 (*kinase domain region* – KDR) oraz VEGF-R3 (*fetal liver kinase-4* – Flk-4). Receptorem VEGF-R towarzyszą receptory neuropiliny 1 (NRP-1) i neuropiliny 2 (NRP-2), które w procesie angiogenezy i limfangiogenezy odgrywają rolę koreceptorów ułatwiających wiązanie ligandów do odpowiednich receptorów. Koreceptor NRP-1 oddziałuje z receptorami VEGF-R1 i VEGF-R2, a NRP-2 z receptorem VEGF-R3. Poza tym ekspresja poszczególnych rodzajów receptora VEGF jest charakterystyczna dla określonych komórek, ogólnie można przyjąć, że receptory 1 i 2 uczestniczą w angiogenezie, dlatego występują głównie na komórkach śródbłonka naczyniowego, natomiast VEGF-R3 uczestniczy w limfangiogenezie, więc jego ekspresja zachodzi w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych [26].

Receptory VEGF składają się z trzech elementów: zewnątrzkomórkowego, który charakteryzuje 7 domen immunoglobulinopodobnych, transbłonowego (domeny hydrofobowej) oraz części wewnątrzkomórkowej, zawierającej domenę o aktywności kinazy tyrozynowej (ryc. 1). Badania wskazują, że pierwsze trzy domeny immunoglobulinopodobne są niezbędne do utrzymania wysokiego powinowactwa do liganda, przy czym tylko domeny 2 i 3 odpowiadają za jego wiązanie, domeny 3 i 4 są odpowiedzialne za wiązanie heparyny oraz neuropiliny NRP-1, ponadto domena 4 zaangażowana jest w dimeryzację receptorów [9].



Ryc. 1. Budowa receptorów 1 i 2 dla VEGF.

Fig. 1. The structure of VEGF receptor 1 and 2.

(Źródło: <http://www.rosenthallab.com>, w modyfikacji własnej)

Do aktywacji receptorów naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu niezbędne są interakcja z VEGF oraz dimeryzacja, która wyzwała wzajemną fosforyla-

cję wewnątrzkomórkowych podjednostek tyrozynowych receptora i aktywację różnych szlaków przekazywania sygnału w komórce. Mechanizmy dimeryzacji wciąż nie są dokładnie poznane [27,28].

Poszczególne czynniki VEGF wykazują powinowactwo do różnych typów receptora. Z receptorem VEGF-R1 wiążą się VEGF-A, VEGF-B i PlGF, ligandami receptora 2 są VEGF-A, VEGF-C oraz VEGF-D, natomiast VEGF-R3 oddziałuje z VEGF-C i VEGF-D. Badania wskazują, że aktywacja tego samego receptora przez różne jego ligandy wywołuje odmienny efekt biologiczny [29].

Struktura receptorów 1 i 2 VEGF jest podobna, wykazują 40% homologię, ale skutek ich aktywacji dochodzi do pobudzenia innych szlaków przekazywania sygnału komórkowego [30]. Warto podkreślić, że receptor pierwszy VEGF-R1 ma 10-krotnie większe powinowactwo do swojego liganda niż receptor VEGF-R2, ale jednocześnie wykazuje wielokrotnie niższą aktywność domeny kinazy tyrozynowej i dlatego nie dochodzi do pełnej jego aktywacji [31,32]. Natomiast VEGF-R2 charakteryzuje około 100-krotnie większa zdolność do wiązania VEGF-A, gdy występuje w formie dimeru [33]. Poza tym na komórkach wykazujących ekspresję VEGF stwierdza się ponad 10 razy większą liczbę kopii VEGF-R2 w porównaniu z liczbą kopii receptora VEGF-R1 [34].

Przedstawione informacje wskazują, że receptor VEGF-R2 jest głównym receptorem, przez który VEGF przejawia swoje działanie, wywierając efekt mitogeny, angiogeny i zwiększając przepuszczalność naczyń krwionośnych [30].

VEGF-R1 występuje na powierzchni komórek śródbłonka naczyń, monocytów, makrofagów, macierzystych komórek szeregu hematopoetycznego oraz komórek nowotworowych guzów litych i nowotworów układu krwiotwórczego [35].

Funkcja receptora pierwszego VEGF-R1 wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji, wiadomo, że współwystępowanie z innymi receptorami oraz rodzaj liganda definiują efekt biologiczny i odpowiedź komórki na jego aktywację [36]. VEGF-R1 wiąże VEGF i PlGF, w związku z czym może wywierać efekt zarówno hamujący, jak i pobudzający angiogenezę [30,32]. Prawdopodobnie VEGF-R1 pełni rolę receptora przynętowego (*decoy receptor*), który wychwytuje VEGF i nie dopuszcza do jego połączenia z VEGF-R2 [32,37,38], poza tym aktywność kinaz w cząsteczce tego receptora jest upośledzona i mimo przyłączenia liganda dochodzi jedynie do słabej fosforylacji, która ogranicza możliwość aktywacji cząsteczek efektorowych. W przeciwieństwie do opisanego wcześniej działania antyangiogenego związanego z przyłączeniem cząsteczki VEGF do receptora 1, w obecności PlGF dochodzi do potencjalizacji aktywności VEGF i promowania angiogenezy [31]. Przyczyną takiego działania jest aktywacja VEGF-R2 przez „wypierany”

z receptora 1 VEGF oraz tworzenie heterodimerów między aktywowanym przez PlGF receptorem 1 a pobudzonym przez VEGF receptorem 2, a także transfosforylacja kinazy tyrozynowej VEGF-R2 [32, 38,39].

Receptory VEGF-R2 znajdują się na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego, na komórkach szeregu hematopoetycznego oraz komórkach nowotworów litych i niektórych nowotworów układu krwiotwórczego [35]. Aktywacja tego receptora prowadzi do pobudzenia cyklu komórkowego, proliferacji, migracji, różnicowania komórek, angiogenezy, zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz wyhamowania procesu apoptotycznej śmierci komórek śródbłonna i nasilenia w nich syntezy VEGF [21].

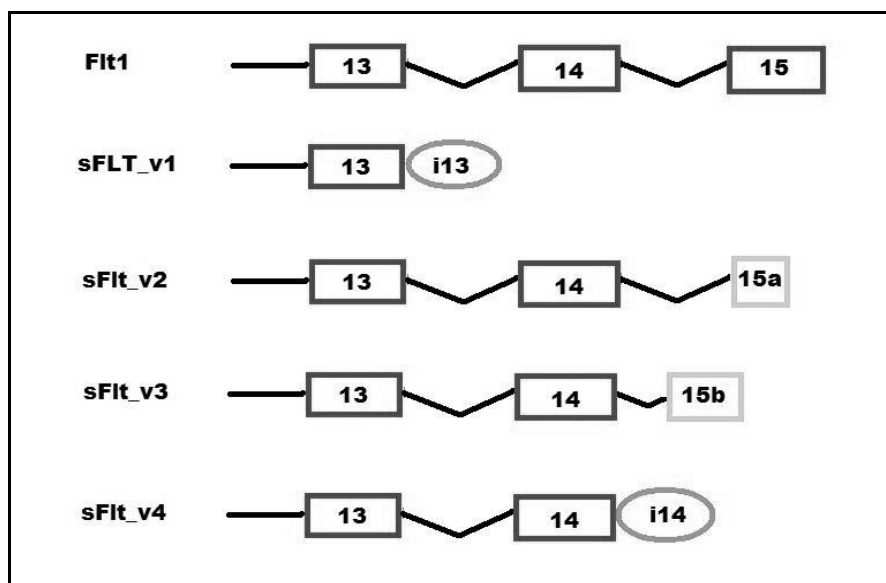
Pierwszym, niezbędnym etapem transdukcji wewnątrzkomórkowej sygnalizacji związanej z receptorem VEGF-R2 jest jego interakcja z VEGF i wzajemna fosforylacja podjednostek receptora, która wyzwala aktywację różnych szlaków sygnałowych w komórce. Ufosforylowane receptory wiążą wewnątrzkomórkowe enzymy i cząsteczki adaptorowe. Z jednej strony z receptorami wiążą się cząsteczki Shc, Grb-2 i SOS, które aktywują białka Ras odpowiedzialne za stymulację ścieżki MAPK i proliferację komórek śródbłonna. Drugi szlak sygnalizacji wewnątrz komórki jest związany z działaniem fosfolipazy C-gamma (PLC- γ), która hydrolizuje zlokalizowany w błonie komórkowej difosforan fosfatydilinozytolu (PIP2) do fosforanu inozytolu i diacyloglicerolu. Fosforan inozytolu (IP3) uwalnia wewnątrzkomórkowe magazyny wapnia Ca_2^+ , które zmieniają konformację kalmoduliny, umożliwiając tym samym jej interakcje z innymi białkami: fosfodiesterazą cAMP, cyklazą adenylanową oraz syntazą NO, odpowiedzialną za tworzenie tlenku azotu NO i zwiększenie przepuszczalności naczyń. Natomiast diacyloglicerol (DAG) pozostaje po wewnętrznej stronie błony komórkowej i aktywuje kinazę białkową C (*protein kinase C* – PKC) zależną od wapnia, która fosforyluje wiele innych białek w komórce, promując proliferację i migrację komórek. Ponadto aktywacja receptorów VEGF indukuje przeżycie komórek poprzez ścieżkę AKT aktywowaną przez kinazę trifosfatydilinozytolu (PI3K) [40]. Promuje także migrację komórek i reorganizację cytoszkieletu poprzez szlak sygnalizacyjny kinazy FAK (*focal adhesion kinase*, kinaza ogniskowo-adhezyjna) i fosforylację paksyliny [41]. Kinaza FAK zaangażowana jest także w procesy adhezji, wzrostu, różnicowania komórek, a badania wykazały ścisłą zależność tego białka z progresją nowotworu [42,43,44].

Receptory rozpuszczalne sVEGF-R1 oraz sVEGF-R2

Badania naukowe ostatnich lat wykazały, że receptory dla VEGF, oprócz postaci związanych z błoną komórkową, mogą mieć także formy rozpuszczalne (*soluble*): sVEGF-R1 i sVEGF-R2 [45]. Prawdopodobnie za ich powstawanie odpowiadają dwa różne mechanizmy: pierwszy związany z proteolizą zewnętrznego regionu receptora błonowego – domeny zewnętrznej wiążącej ligand – nazwany został *shedding* (zrzucenie) [46,47], natomiast drugi łączy się z procesem alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu *VEGFR* w dojrzałe mRNA, zawierające tylko informację o budowie domeny zewnątrzkomórkowej receptora [42].

W literaturze naukowej wielokrotnie opisano receptor sVEGF-R1 1, natomiast na temat sVEGF-R2 informacji jest bardzo mało. Pierwsze rozpuszczalne formy receptora 1 sVEGF-R1 (sFlt1) wykryto w latach 90. XX wieku w medium hodowlanym komórek HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) oraz płynie owodniowym [43,44]. Receptor sVEGF-R1 wydzielany jest przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, monocyty, komórki trofoblastu [47], komórki nabłonkowe rogowki [48] oraz komórki nabłonkowe części proksymalnej kanalika nerkowego [49]. Receptor sVEGF-R1 tworzy sześć z siedmiu domen immunoglobulinopodobnych części zewnątrzkomórkowej receptora powierzchniowego VEGF-R1 [50].

Powstawanie opisywanego receptora oparte jest na dwu wspomnianych wcześniej mechanizmach. Znane są 4 splicingowe warianty tego receptora, każdy ma unikalną sekwencję C-końcową (ryc. 2). Jako pierwszy w 1993 r. odkryty został sFlt1-v1 [43], który w części C-końcowej posiada sekwencję aminokwasową kodowaną w egzonie i intronie 13 genu *vegfr1*. W 2007 r. Thomas i wsp. [51], a w 2008 r. Sela i wsp. [52] zidentyfikowali sFlt1-v2, natomiast w 2009 r. Heydarian i wsp. udokumentowali obecność sFlt1-v3 [53]. Wymienione izoformy mają sekwencję aminokwasową egzonu 14 i egzonu 15 rozszerzonego o sekwencję intronową, odpowiednio fragment 15a i 15b. Heydarian i wsp. zidentyfikowali także czwartą izoformę – sFlt-v4, której koniec karboksylowy składa się z sekwencji aminokwasowej egzonu i intronu 14 [53]. Wszystkie izoformy sVEGF-R1 na poziomie transkrypcji i translacji podlegają tkankowo i komórkowo specyficznej regulacji, ale dokładne mechanizmy tych procesów nie są jeszcze znane [52,53].



Ryc. 2. Warianty splicingowe sVEGF-R1.
 Fig. 2. The splice variants of soluble VEGF-R1.
 (Źródło: Heydarian i wsp. [53], w modyfikacji własnej)

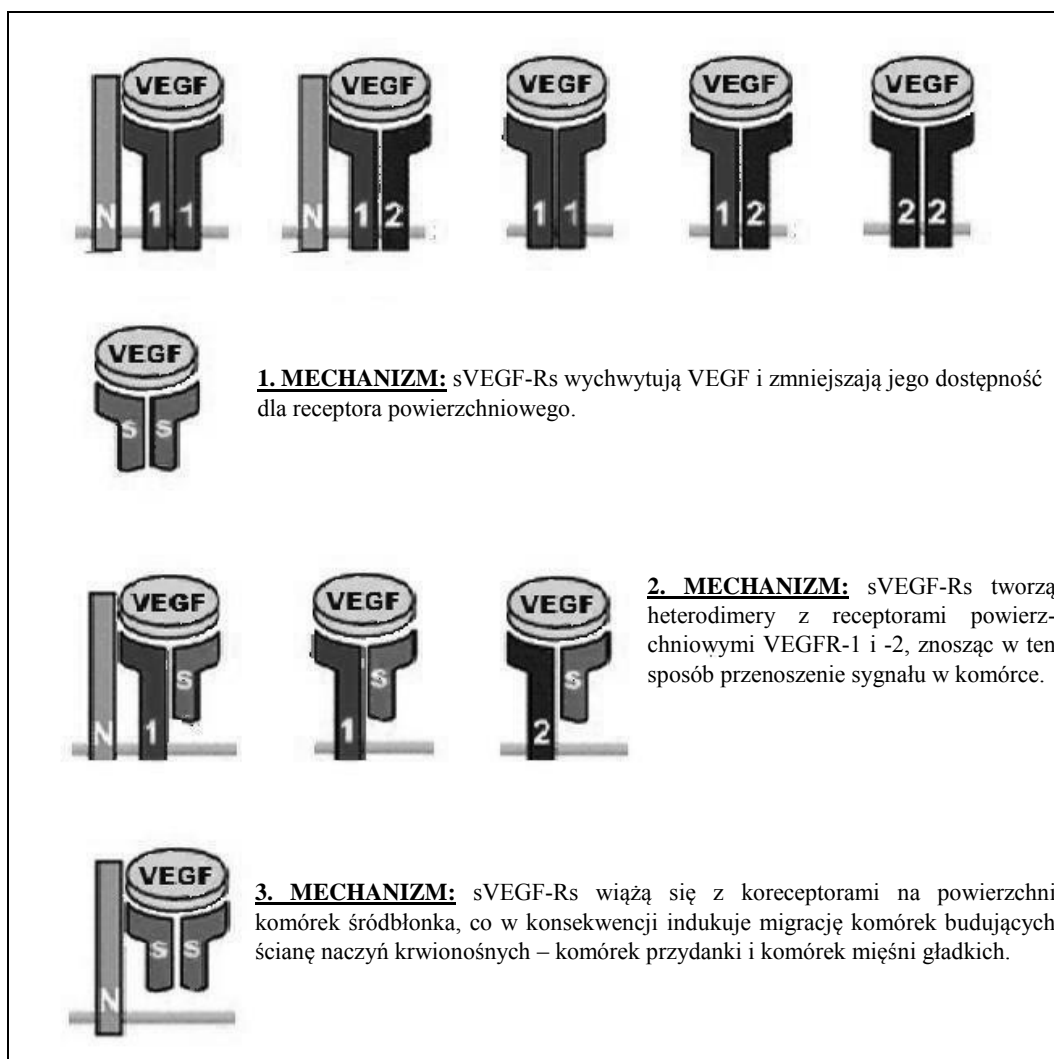
Masa molekularna sFlt1 zależy od stopnia glikozylacji i jest gatunkowo specyficzna. U myszy zidentyfikowano 60 kDa cząsteczkę tego białka, w komórkach HUVEC oraz MVEC (*primary human derma microvascular endothelial cells*) występuje sVEGF-R1 o masie 110 kDa, w lizacie tkankowym łożyska – 116 kDa, w surowicy i płynie owodniowym kobiet ciężarnych – 150 kDa [54].

W 2004 r. Ebos i wsp. [55] zidentyfikowali rozpuszczalny receptor 2 VEGF – sVEGF-R2 (sFlk1), o którym w piśmiennictwie nadal jest niewiele informacji. Pod względem budowy wykazuje on podobieństwo do sVEGF-R1 i prawdopodobnie również uwalniany jest z komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Mechanizm powstawania sVEGF-R2 pozostaje nieznanym, Ebos i wsp. przypuszczają się, że jest on produktem proteolizy pełnej długości receptora na powierzchni komórki, natomiast Alburquerque i wsp. twierdzą, że powstaje w wyniku alternatywnego splicingu, zawiera sekwencję aminokwasową zakodowaną w intronie 13 i ma unikalny 16-aminokwasowy koniec karboksylowy [56,57].

Receptor sVEGF-R2 wiąże VEGF-A oraz VEGF-C i VEGF-D, dlatego – poza działaniem antyangiogennym – hamuje indukowany przyłączeniem VEGF-C i VEGF-D do receptora VEGF-R3 proces tworzenia nowych naczyń limfatycznych, które także odgrywają istotną rolę w progresji choroby nowotworowej [58]. Molekularny, antyangiogeny mechanizm działania sVEGF-R1 i sVEGF-R2 jest związany z wychwytywaniem VEGF i zmniejszeniem jego dostępności dla receptora powierzchniowego. Receptory sVEGF-R1

i -R2 wiążą się z cząsteczką VEGF z takim samym powinowactwem jak pełnej długości receptory błonowe i dzięki temu efektywnie redukują promowaną przez VEGF angiogenezę. Tworząc heterodimery z receptorami powierzchniowymi VEGFR-1 i VEGFR-2 znoszą ponadto przenoszenie sygnału w komórce [44], a wiążąc się z koreceptorami na powierzchni komórek śródbłonna promują migrację komórek tworzących ścianę naczynia krwionośnego – pericytów i komórek mięśni gładkich [58] (ryc. 3). Poza tym sVEGF-R1 wpływa na przepuszczalność naczyń krwionośnych, dzięki czemu wykazuje działanie przeciwobrzękowe [32], a przez osłabienie zależnej od VEGF aktywacji i migracji monocytów oraz makrofagów ma działanie przeciwzapalne [59].

Przegląd piśmiennictwa wskazuje na zainteresowanie rozpuszczalnymi formami receptorów VEGF. Dotychczasowe badania pozwoliły wyjaśnić ich rolę w niektórych procesach fizjologicznych i patologicznych. Fizjologicznie sVEGF-R1 i sVEGF-R2 są zaangażowane w mechanizm prawidłowego widzenia. Mimo wielu obecnych w rogówce oka cząsteczek hamujących angiogenezę, tylko rozpuszczalny receptor 1 dla VEGF jest konieczny do miejscowej modyfikacji proangiogennej aktywności VEGF-A, natomiast sVEGF-R2 pełni kluczową rolę w hamowaniu promowanej przez VEGF-C limfangiogenezy [56,60]. Dobrze udokumentowano znaczenie sVEGF-R1 u ciężarnych z zespołem przedrzucawkowym – zaobserwowano, że ilość sVEGF-R1 oraz redukcja stężenia VEGF i PlGF we krwi były u nich wyższe niż u kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży [61,62,63].



Ryc. 3. Mechanizmy antyangiogenego działania rozpuszczalnych receptorów dla VEGF.

Fig. 3. The antiangiogenic activity of soluble VEGF receptors.

(Źródło: Wu i wsp. [54] oraz Lorquet i wsp. [59], w modyfikacji własnej)

W marskości wątroby zwiększony poziom VEGF i jego rozpuszczalnego receptora 1 w osoczu krwi koreluje ze stopniem niewydolności tego narządu [64]. Badacze coraz częściej wskazują na kliniczną użyteczność niezależnych oznaczeń sVEGF-R1 lub w połączeniu z oceną stężenia VEGF czy PlGF zarówno w celach diagnostycznych, jak i w prognozowaniu rozwoju choroby.

Od kilku lat naukowcy podejmują próby oceny zależności między stężeniem rozpuszczalnych receptorów dla VEGF a procesem angiogenezy w czasie nowotworzenia komórek i generowania przerzutów odległych. W opublikowanych dotąd nielicznych pracach opisano zmiany stężenia tych cząsteczek u chorych na nowotwory. Badacze sugerują, że sVEGF-R1 trwale hamuje wzrost guza, utrudnia przerzutowanie i promuje przeżycie pacjenta. Spostrzeżenia takie

pochodzą m.in. z badań przeprowadzonych u chorych na raka gruczołu piersiowego [65,66,67], raka nerki [68], włókniako-mięsaka [69], guzów mózgu [70], raka jelita grubego [71] i raka płuca [72,73]. Stężenie rozpuszczalnego receptora 2 dla VEGF oceniane było głównie u chorych z czerniakiem złośliwym i na białaczkę [74,75,76], u których również zaobserwowano korelację między ilością rozpuszczalnego receptora a progresją choroby oraz rokowaniem dla pacjenta. U chorych na raka jelita grubego [77,78], raka żołądka [79] i chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy [80] dokonano analizy stężeń obu rozpuszczalnych receptorów. Uzyskane w tych badaniach wyniki wskazują na istotną rolę VEGF i jego rozpuszczalnych receptorów w rozwoju nowotworów złośliwych, a ponadto sugerują, że ocena ich stężeń we krwi może mieć znaczenie diagnostyczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Carmeliet P., Jain R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249–257.
2. Zielonka T.M., Angiogeneza. Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alerg. Astma Immunol.* 2003; 8: 167–174.
3. Kerbel R.S. Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 2039–2049.
4. Imhof B.A., Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat. Med.* 2006; 12: 171–172.
5. Dworak H.F. Angiogenesis: update 2005. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 1835–1842.
6. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.S., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983–985.
7. Ferrara N., Hanzel W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 161: 851–858.
8. Plouet J., Schilling J., Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 1989; 8: 3801–3806.
9. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; 9: 669–676.
10. Namiecińska M., Marciniak K., Nowak J.Z. VEGF jako czynnik angiogeny, neurotroficzny, neuroprotektynowy. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2005; 59: 573–583.
11. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and VEGF receptor family. *Semin. Thromb. Hemost.* 2000; 26: 561–569.
12. Gruchlik A., Chodurek E., Domal-Kwiatkowska D., Dzierżewicz Z. VEGF-A celem antyangiogennej terapii przeciwnowotworowej. *Post. Biol. Komórki* 2007; 34: 557–580.
13. Jussila L., Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 673–700.
14. Karkkainen M.J., Petrova T.V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 5598–5603.
15. Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A. 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.
16. Ki-Jo K., Chul-Soo C., Wan-Uk K. Role of placenta growth factor in cancer and inflammation. *Exp. Mol. Med.* 2012; 44: 10–19.
17. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001; 280: 1358–1366.
18. Carol V.A., Binder B.R. The role of the plasminogen activation system in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999; 25: 183–197.
19. Vecchiarelli-Federico L.M., Cervi D., Haeri M., Li Y., Nagy A., Ben-David Y. Vascular endothelial growth factor—a positive and negative regulator of tumor growth. *Cancer Res.* 2010; 70: 863–867.
20. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 581–611.
21. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E. Podstawy terapii antyangiogennej u chorych na nowotwory. *Onkol. Prakt. Klin.* 2009; 5(supl. A): A1–A14.
22. Dulak J., Józkowicz A. Rola cytokin, tlenku azotu i oksygenazy hemowej-1 w angiogenezie. W: *Szlaki przekazywania sygnałów komórkowych – XXI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2004.* Red. I. Nalepa. *Inst. Farmakol. PAN*, 2004; 115–122.
23. Dor Y., Keshet E. Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 1997; 7: 289–294.
24. Zagórska A., Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxic sensing. *Acta Bioch. Pol.* 2004; 51: 563–585.
25. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 4604–4613.
26. Schaller M.D. Biochemical signaling and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1540: 1–21.
27. Stüttfeld E., Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 2009; 6: 915–922.
28. Mac Gabhann F., Popel A.S. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophys. Chem.* 2007; 128: 125–139.
29. Jia H., Bagherzadeh A., Bicknell R., Duchon M.R., Liu D., Zachary I. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 36148–36157.
30. Rahimi N. Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Exp. Eye Res.* 2006; 83: 1005–1016.
31. Park J.E., Chen H.H., Winer J. Placenta growth factor. Potentialization of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Kik-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 25646–25654.
32. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling – in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006; 7: 359–371.
33. Fuh G., Li B., Crowley C., Cunningham B., Wells J.A. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 11197–11204.
34. Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 4368–4380.
35. Kowantek M., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 5018–5022.
36. Cao Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGF-R1 ligands. *Sci. Signal* 2009; 2(59): re1.
37. Scadden D.T. Cancer stem cells refined. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 701–703.
38. Autiero M., Waltenberger J., Communi D et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003; 9: 936–943.
39. Autiero M., Waltenberger J., Communi D. Role of PlGF in the intra and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt-1 and Flk-1. *Nat. Med.* 2003; 9: 936–943.
40. diPietro L.A. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. *EXS* 1997; 79: 295–314.
41. Rahimi N., Golde T.E., Meyer R.D. Identification of ligand-induced cleavage and ectodomain shedding of VEGFR-1/FLT1 in leukemic cancer cells. *Cancer Res.* 2009; 69: 2607–2614.
42. Barleon B., Reusch P., Totzke F. et al. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 2001; 4: 143–154.
43. Kendall R.L., Thomas K.A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10705–10709.
44. Kendall R.L., Weich H.A., Thomas K.A. Identification of a natural soluble form of vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 226: 324–328.
45. Horing C., Weich H.A. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999; 3: 33–39.
46. Cai J., Jiang W.G., Grant M.B., Boulton M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 3604–3613.
47. Karumanchi S.A., Bdelah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: The “chicken-and egg” question. *Endocrinology* 2004; 145: 4835–4837.
48. Ambati B.K., Patterson E., Jani P. et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *Br. J. Ophthalmol.* 2007; 91: 505–508.
49. Kim N.H., Oh J.H., Seo J.A. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 67: 167–177.
50. Barleon B., Totzke F., Herzog C. et al. Mapping of sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 10382–10388.
51. Thomas C.P., Andrews J.I., Liu K.Z. Intronic polyadenylation signal sequences and alternate splicing generate human soluble sFLT1 variants and regulate the abundance of soluble sFLT1 in the placenta. *FASEB J.* 2007; 21: 3885–3895.
52. Sela S., Itin A., Natanson-Yaron S. et al. A novel human – specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: Cell-type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and preeclampsia. *Circ. Res.* 2008; 102: 1566–1574.
53. Heydarian M., Mc Caffrey T., Florea L. et al. Novel splice variants of sFlt1 are upregulated in preeclampsia. *Placenta* 2009; 30: 250–255.
54. Wu F.T., Stefanini M.O., Mac Gabhann F., Kontos C.D., Annex B.H., Popel A.S. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J. Cell. Mol. Med.* 2010; 14: 528–552.
55. Ebos J.M., Bocci G., Man S. et al. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol. Cancer Res.* 2004; 2: 315–326.
56. Albuquerque R.J.C., Hayashi T., Cho W.G. et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nature Med.* 2009; 15: 1023–1030.
57. Pavlakovic H., Becker J., Albuquerque R., Wilting J., Ambati J. Soluble VEGFR-2: an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010; 1207(S1): E7–E15.

58. Tsao P., Chan F., Wie S. et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 protects mice in sepsis. *Crit. Care Med.* 2007; 35: 1955–1960.
59. Lorquet S., Berndt S., Blacher S. et al. Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB J.* 2010; 24: 3782–3795.
60. Chin K.F., Greenman J., Reusch P., Gardiner E., Marme D., Monson J. Changes in serum soluble VEGFR-1 and Tie-2 receptors in colorectal cancer patients following surgical resections. *Anticancer Res.* 2004; 24: 2353–2357.
61. Luttun A., Carmeliet P. Soluble VEGF receptor Flt1: The elusive preeclampsia factor discovered? *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 600–602.
62. Widmer M., Villar J., Benigni A., Conde-Agudelo A., Karumanchi S.A., Lindheimer M. Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: A systematic review. *Obstet. Gynecol.* 2007; 109: 168–180.
63. Ahmad S., Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ. Res.* 2004; 95: 884–891.
64. Jaroszewicz J., Januszkiewicz M., Flisiak R., Rogalska M., Kalinowska A., Wierzbicka I. Circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in patients with liver cirrhosis. Possible association with hepatic function impairment. *Cytokine* 2008; 44: 14–17.
65. Thielemann A., Koczyński Z., Baszczuk A., Ćwiklińska K., Grodecka-Gazdecka S. Ocena stężenia rozpuszczalnego receptora sVEGF-R1 u chorych na raka gruczołu piersiowego. *Współcz. Onkol.* 2010; 14: 189–195.
66. Toi M., Bando H., Ogawa T., Muta M., Hornig C., Weich H.A. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int. J. Cancer* 2002; 98: 14–18.
67. Bando H., Weich H.A., Brokelmann M. et al. Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 2005; 92: 553–561.
68. Harris A.L., Reusch P., Barleon B., Hang C., Dobbs N., Marme D. Soluble Tie2 and Flt1 extracellular domains in serum of patients with renal cancer and response to antiangiogenic therapy. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 1992–1997.
69. Goldman C.K., Kendall R.L., Cabrera G. et al. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 8795–8800.
70. Lamszus K., Ulbricht U., Matschke J., Brockmann M.A., Fillbrandt R., Westphal M. Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 1399–1405.
71. Yamaguchi T., Bando H., Mori T. et al. Overexpression of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in colorectal cancer: Association with progression and prognosis. *Cancer Sci.* 2007; 98: 405–410.
72. Świdzińska E., Ossolińska M., Naumnik W., Izycki T., Kucejko W., Chyczewska E. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu – VEGF i rozpuszczalny receptor – sVEGFR-1 w surowicy chorych na raka płuca. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72: 389–394.
73. Koczyńska E., Danczewicz M., Kowalewski J. et al. Time-dependent changes of plasma concentrations of angiopoietins, vascular endothelial growth factor, and soluble forms of their receptors in nonsmall cell lung cancer patients following surgical resection. *ISRN Oncol.* 2012; 2012: 638352.
74. Tas F., Duranyildiz D., Oguz H., Camlica H., Yasasever V., Topuz E. Circulating serum levels of angiogenic factors and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in melanoma patients. *Melanoma Res.* 2006; 16: 405–411.
75. Aref S., El Sherbiny M., Goda T., Fouda M., Al Askalany H., Abdalla D. Soluble VEGF/sFlt1 ratio is an independent predictor of AML patient outcome. *Hematology* 2005; 10: 131–134.
76. Faderl S., Do K.A., Johnson M.M. et al. Angiogenic factors may have a different prognostic role in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2005; 106: 4303–4307.
77. Kumara S., Cabot J.C., Hoffman A. et al. Minimally invasive colon resection for malignant colonic conditions is associated with a transient early increase in plasma sVEGFR1 and decrease in sVEGFR2 levels after surgery. *Surg. Endosc.* 2010; 24: 283–289.
78. Jayasinghe C., Simiantonaki N., Michel-Schmidt R., Kirkpatrick C.J. Comparative study of human colonic tumor-derived endothelial cells (HCTEC) and normal colonic microvascular endothelial cells (HCMEC): Hypoxia-induces sVEGFR-1 and sVEGFR-2 levels. *Oncol. Rep.* 2009; 21: 933–939.
79. Kikuchi S., Obata Y., Yagyu K. et al. Reduced serum vascular endothelial growth factor receptor-2 (sVEGFR-2) and sVEGFR-1 levels in gastric cancer patients. *Cancer Sci.* 2011; 102: 866–869.
80. Korzeniewska M., Kołomecki K., Stępień H., Naze M., Stępień T., Kuzdak K. Ocena stężeń wybranych czynników pro- i antyangiogennych we krwi chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy. *Endokrynol. Pol.* 2005; 56: 39–44.