

Received: 2012.05.11
Accepted: 2012.12.10
Published: 2013.02.19

Endogлина jako cel terapii przeciwnowotworowej*

Endoglin as a target of antitumor therapy

Magdalena Jarosz, Stanisław Szala

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów,
Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Naczynia krwionośne mają istotny wpływ na wzrost nowotworów. Zahamowanie proliferacji komórek śródbłonkowych naczyń przez leki antyangiogenne prowadzi do zahamowania wzrostu guzów pierwotnych i przerzutów. W czasie długotrwałej terapii komórki śródbłonkowe mogą się stać jednak odporne na działanie tych leków. Nowe rozwiązania terapeutyczne powinny zatem uwzględniać niekorzystne zjawisko takiej oporności. Jednym z rozwiązań, w którym nie powinno pojawić się zjawisko oporności, może być indukcja odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko białkom swoistym dla komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych. Odpowiedź ta powinna łamać tolerancję immunologiczną wobec własnych antygenów i eliminować komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych przez aktywowane cytotoksyczne limfocyty T. Odpowiedź taką można uzyskać przeciwko endoglinie (CD105). Białko to występuje na proliferujących, aktywnych komórkach śródbłonkowych naczyń krwionośnych. Obecność tego białka w naczyniach guzów litych ma prognostyczne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. Endogлина pojawia się także m.in. w komórkach czerniaka, mięsaka Ewinga i raka prostaty. Wydaje się, że strategie terapeutyczne skierowane przeciwko endoglinie pozwalają ominąć kilka mechanizmów oporności na leki antyangiogenne. Proponowane przez nas rozwiązanie terapeutyczne: kombinacja strategii niszczącej nowotworowe naczynia krwionośne z immunoterapią może się okazać skutecznym rozwiązaniem terapeutycznym.

Słowa kluczowe:

endogлина, terapia antyangiogenna, mechanizmy oporności, immunoterapia

Summary

Blood vascular supply significantly affects progression of tumor growth. Inhibition of endothelial cell proliferation by antiangiogenic drugs should lead to growth arrest of both primary tumors and metastases. During the course of lengthy therapy, endothelial cells may, however, become refractory to the action of antiangiogenic agents. Novel approaches to anticancer treatment should explore the issue of drug resistance shown by endothelial cells. One possible therapeutic solution might be tumor immunotherapy directed against antigens expressed on the surface of endothelial cells which co-form tumor blood vasculature. Such therapy is supposed to break immune tolerance to own antigens and to eliminate tumor blood vessel endothelial cells by activating cytotoxic T lymphocytes. This kind of response can be obtained against endoglin (CD105). Endoglin is overexpressed in proliferating endothelial cells which line tumor blood vessels. Presence of endoglin in solid tumor blood vessels has prognostic value in cancer treatment. CD105 is also expressed by certain cancer cells (prostate, melanoma and Ewing sarcoma). It appears that therapeutic strategies directed against endoglin allow several mechanisms of resistance to antiangiogenic drugs to be omitted. The therapeutic approach that we propose, i.e. a tumor blood vessel-destroying strategy combined with immunotherapy, may become an effective therapeutic tool.

Keywords:

endoglin, antiangiogenic therapy, mechanisms of resistance, immunotherapy

*Publikacja została sfinansowana z grantu MNiSW nr NN 401 587 540.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1034142>

Word count: 3188

Tables: –

Figures: 3

References: 97

Adres autorki: dr n. med. Magdalena Jarosz, Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: mjarosz@io.gliwice.pl

WSTĘP

Mimo postępów i znacznych osiągnięć w diagnostyce, leczenie chorych na nowotwory pozostaje znaczącym problemem medycyny. Obecnie wykrywa się 10 milionów nowych przypadków zachorowań na nowotwory w ciągu roku. WHO przewiduje, że liczba nowych przypadków wzrośnie do 15 milionów w 2020 r. [80]. Dlatego też poszukuje się nowych, coraz to bardziej skutecznych rozwiązań terapeutycznych.

Guzy lite, większe niż 1-2 mm³, potrzebują do dalszego rozwoju własnej sieci naczyń krwionośnych [2,80]. Od lat wiadomo, że terapia, której celem są nowotworowe naczynia krwionośne hamuje znacznie wzrost guzów nowotworowych [21]. Jednak dotychczasowe wyniki leczenia lekami antyangiogennymi, np. bewacizumabem (Avastinem), sorafenibem czy sunitinibem nie są zbyt zachęcające [19]. Długotrwałe stosowanie leków antyangiogennych może powodować powstanie oporności komórek śródbłonkowych [2,19,47]. Stosowanie w terapii antyangiogennej pojedynczych inhibitorów unaczynienia jest niewystarczające [2,9]. Terapia hamująca proliferację komórek śródbłonkowych nie jest skuteczna w eliminowaniu nowotworowych naczyń krwionośnych powstałych w procesie wgłobienia (bez udziału proliferacji komórek) [17] czy struktur naczyniopodobnych powstałych w wyniku waskulogennej mimikry [69,74,89]. Poza tym na skutek terapii antyangiogennej w obrębie guza nowotworowego powstaje tzw. polekowa hipoksja [9,19]. Hipoksja ta jest główną przyczyną inwazyjności komórek nowotworowych i powstawania przerzutów [2,20,40,62].

Nowe rozwiązania terapeutyczne powinny zatem omijać zjawisko oporności komórek EC na leki antyangiogenne. Jednym z takich rozwiązań może być immunoterapia nowotworów skierowana przeciwko antygenom występującym na komórkach śródbłonkowych naczyń nowotworowych [52,66]. Terapia ta łamie tolerancję immunologiczną organizmu wobec własnego antygeny, pobudza układ immunologiczny do rozpoznawania komórek śródbłonkowych jako obce i indukuje reakcję odpornościową (głównie limfocytów

T cytotoksycznych CD8⁺) skierowaną przeciwko tym komórkom [14,27,66]. Endogлина (CD105) jest jednym z takich antygenów. Jest to dość swoisty marker proliferujących, aktywnych komórek śródbłonkowych naczyń krwionośnych, którego obecność w naczyniach guzów litych ma prognostyczne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej.

W artykule próbujemy wyjaśnić niektóre mechanizmy oporności komórek śródbłonkowych, które ujawniają się podczas terapii antyangiogennej. Przedstawiamy także propozycję strategii terapeutycznej skierowanej przeciwko endoglinie omijającej tę oporność.

ROLA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH W PROGRESJI NOWOTWOROWEJ

Nowotworzenie jest procesem zależnym od genetycznych i epigenetycznych zmian akumulowanych w komórkach [29,30]. Komórki nowotworowe są odporne na apoptozę i są zdolne do nieograniczonej liczby podziałów. Wydzielają i wykorzystują własne czynniki wzrostu. Stają się niewrażliwe na zewnętrzne czynniki wzrostowe. Są zdolne do wytwarzania własnej sieci naczyń krwionośnych, samodzielnego przemieszczania (inwazyjności) i tworzenia przerzutów. Komórki te wykazują niestabilność genetyczną i metaboliczne przeprogramowanie podczas hipoksji. Zdolne są również do rekrutacji komórek stanu zapalnego, a także ucieczki spod nadzoru immunologicznego.

Wiele procesów niezbędnych do rozwoju nowotworów: proliferacja, inwazyjność, tworzenie sieci własnych naczyń czy przerzutów zależy również od czynników wydzielanych przez komórki mikrośrodowiska (fibroblastów, makrofagów, komórek przewlekłej reakcji zapalnej). Są to czynniki wzrostu, cytokiny, chemokiny i proteolityczne enzymy [35]. Komórki mikrośrodowiska mają istotny wpływ na progresję nowotworową [36,80]. Nowe naczynia krwionośne odgrywają ważną rolę w powstawaniu środowiska immunosupresyjnego ułatwiającego ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego [61,77]. Mikrośrodowisko nowotworowe sprzyja wzrostowi guza m.in. poprzez ochronę komórek nowotworowych przed rozpoznaniem ich przez układ immunologiczny [79]. Własna sieć naczyń krwionośnych

umożliwia komórkom nowotworowym i mikrośrodkowisku utlenowanie, zaopatrzenie w substancje wzrostowe i usunięcie produktów przemiany materii [6].

Awaskularne skupiska komórek nowotworowych (guzy *in situ*) nie mogą wzrastać bez wytworzenia własnej sieci naczyń krwionośnych [21,80]. Naczynia krwionośne dostarczają tlen, składniki odżywcze i usuwają toksyczne produkty metabolizmu komórkowego [72]. Naczynia te pośredniczą także w rozsiewie komórek nowotworowych i utrzymaniu specyficznego mikrośrodkowiska nowotworowego [68]. Naczynia krwionośne powstają z naczyń gospodarza, a mechanizmy angiogenezy nowotworowej są podobne do angiogenezy fizjologicznej. W zależności od typu guza i jego lokalizacji, architektura (ukształtowanie) naczyń może się dramatycznie różnić [68]. Nowotworowe naczynia krwionośne wykazują wiele strukturalnych i funkcjonalnych nieprawidłowości [15,26,68,72,78]. Nie można w nich odróżnić tętniczek i żyłek [3,72]. Chaotyczny przebieg naczyń i ślepe zakończenia powodują spowolnienie przepływu krwi [9]. W naczyniach pojawia się zastój krwi lub nawet jej cofanie. Nieszczelność naczyń powoduje wzrost ciśnienia śródmiąższowego, które ogranicza przepływ krwi do tkanki guza [3,10,53].

STRATEGIE TERAPEUTYCZNE SKIEROWANE PRZECIWKO NOWOTWOROWYM NACZYNIOM KRWIONOŚNYM

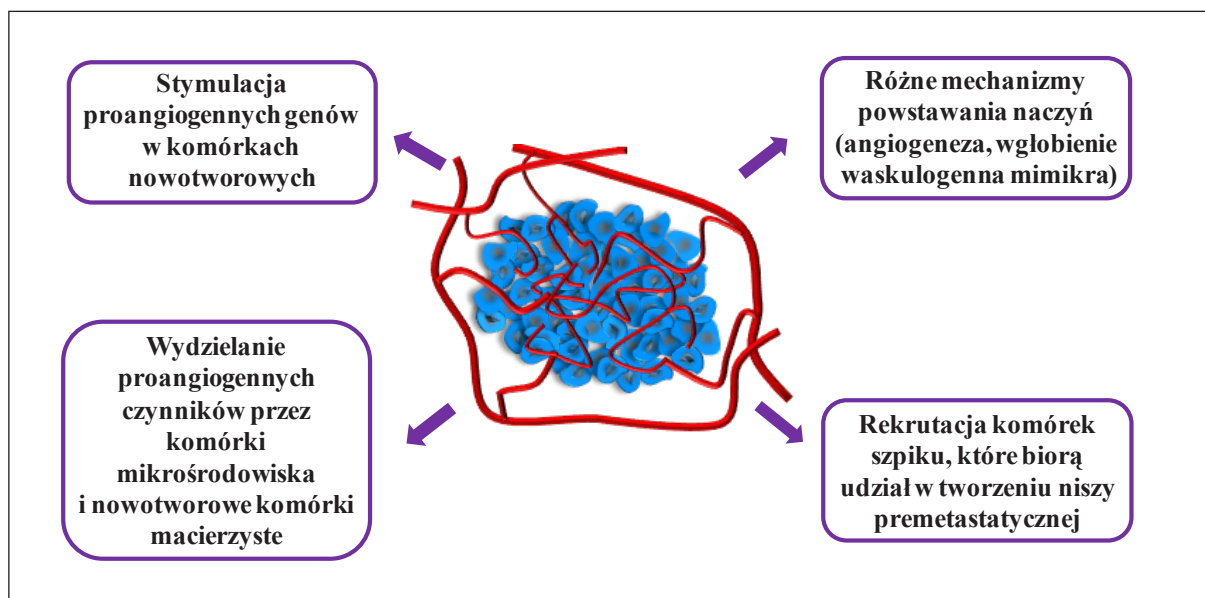
Terapia, której celem są nowotworowe naczynia krwionośne powinna hamować wzrost guzów nowotworowych [21]. Celem terapii mogą być zatem naczynia powstające *de novo* (terapia antyangiogenna) lub naczynia już istniejące (terapia antynaczyniowa) [72].

Czynniki antyangiogenne hamują różne etapy procesu angiogenezy nowotworowej. Leki mogą rozpoznawać białka

szlaków sygnałowych występujących w komórkach nowotworowych, śródbłonkowych i w komórkach mikrośrodkowiska. W terapii próbuje się wykorzystywać leki hamujące lub inaktywujące uwolnione proangiogenne czynniki, leki hamujące aktywację receptorów, czynniki hamujące proliferację komórek śródbłonkowych, a także inhibitory inwazyjności, samodzielnego przemieszczania się komórek EC [17,72]. Do zahamowania proliferacji komórek stosuje się głównie inhibitory (leki) blokujące aktywność głównego czynnika proangiogenego VEGF lub jego receptorów [51]. Długotrwałe stosowanie przeciwciała skierowanego przeciwko VEGF skutecznie hamowało wzrost guzów nowotworowych u myszy [73]. Z wielu przebadanych leków antyangiogennych jedynie kilka uzyskało aprobatę FDA (Food and Drug Administration) [19]. Bewacizumab (Avastin), swoiste przeciwciała skierowane przeciwko VEGF jako pierwsze przeszło fazę badań klinicznych. Fazę badań klinicznych skutecznie przeszły także niskocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych: sorafenib (celowany w VEGFR2, VEGFR3, B-Raf, PDGFR, FGFR1, c-Kit), sunitinib (skierowany w VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FLT3, PDGFR a i b, c-Kit, c-Ret) i pazopanib (działający na VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, c-Kit) [2,41], a także axitinib (skierowany w VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) [93] i vandetanib (działający na EGFR, VEGFR2, VEGFR3) [28]. Długotrwałe stosowanie leków antyangiogennych może powodować jednak powstanie oporności komórek śródbłonkowych [19]. W sposób niezamierzony terapia antyangiogenna może także stymulować inwazyjność komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów [20,62].

OPORNOŚĆ NA LEKI ANTYANGIOGENNE

Komórki śródbłonkowe, także komórki nowotworowe i komórki mikrośrodkowiska nowotworowego mają wiele różnych mechanizmów oporności na leki antyangiogen-



Ryc. 1. Niektóre mechanizmy oporności nowotworów na leki antyangiogenne. Zarówno komórki nowotworowe, komórki śródbłonkowe jak i komórki mikrośrodkowiska nowotworowego wykazują wiele różnych mechanizmów oporności (wg [47]; zmienione); opis mechanizmów w tekście

ne (ryc.1) [2,47]. Jednym z mechanizmów jest wytwarzanie wielu dublujących się czynników proangiogennych. Zahamowanie aktywności jednego czynnika może być skompensowane aktywnością innych [47].

Leki antyangiogenne najczęściej nacelowane są na szlak sygnałowy VEGF. Jednak żaden z tych leków nie inaktywuje wszystkich komponentów tego szlaku [2]. Oprócz szlaku sygnałowego VEGF jest wiele innych, które odgrywają ważną rolę w angiogenezie. PlGF aktywuje angiogenezę nowotworową przez stymulację komórek śródbłonkowych, perycytów i komórek mięśni gładkich, a także rekrutację makrofagów oraz komórek progenitorowych ze szpiku. PlGF może również zwiększać ekspresję VEGF, FGF2, PDGFB, MMPs i innych angiogennych czynników. Szlak sygnałowy Notch również odgrywa ważną rolę. Chroni komórki EC przed apoptozą poprzez aktywację ekspresji VEGFR3 i indukcję antyapoptotycznego białka BCL2 [2]. Nie ma jednego głównego szlaku sygnałowego charakterystycznego dla wszystkich typów nowotworów. Różne typy guzów nowotworowych wykorzystują różne kombinacje czynników proangiogennych. Udział tych czynników zmienia się w kolejnych etapach progresji nowotworu [67] także pod wpływem działania leków przeciwnowotworowych [47].

Długotrwałe stosowanie terapii antyangiogennej może wywoływać oporność na leki antyangiogenne. W badaniach na zwierzętach obserwowano zwiększoną ekspresję PlGF, VEGF, ANG1, FGF i innych czynników po próbie blokowania receptora VEGFR2. Także w okresie progresji choroby (po nieudanej terapii celowanej w VEGF) występował zwiększony poziom FGF2 i SDF1 u pacjentów chorych na nowotwory mózgu (glejaki) [47]. Uwalnianie tych czynników może być indukowane hipoksją, będącą skutkiem niszczenia naczyń w tkance guza. Poza tym niektóre cytokiny (G-CSF i SDF1) mogą być wydzielane przez komórki otaczającej prawidłowej tkanki. Po zaprzestaniu terapii, aktywacja sygnałów proangiogennych może ponownie stymulować proces angiogenezy [47].

Leki antyangiogenne mogą powodować w nowotworach powstanie tzw. polekowej hipoksji [10,19,95]. Hipoksja ta indukuje inwazyjność komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów [2,20,40,47,62]. W warunkach niedotlenienia zmienia się potencjał angiogeny i zdolność przeżycia komórek nowotworowych [95]. Niski poziom tlenu w guzach (zbliżający się do warunków anoksji) tworzy niesprzyjające warunki do przeżycia i sprawia, że niektóre komórki nowotworowe migrują do miejsc bardziej utlenionych. Ponadto hipoksja powoduje uwalnianie się białka HMGB1 [84] i powstawanie przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) [19]. Hipoksja także hamuje czynniki antymetastatyczne i mobilizuje ze szpiku komórki, które biorą udział w powstawaniu tzw. niszy premetastatycznej. Niedotlenienie powoduje dysfunkcję perycytów i indukuje aktywację prozapalnych szlaków sygnałowych [19]. Nowotworowe komórki macierzyste (CSC), które mogą brać udział

w nawrocie choroby nowotworowej, występują w obrębie niszy okołonaczyniowej [7], a także w regionach hipoksyjnych guza [16,47]. Hipoksja stymuluje uwalnianie czynników proangiogennych przez te komórki oraz utrzymuje w nich zdolność do samoodnawiania się [47].

Kolejnym powodem oporności na terapię antyangiogenną jest udział różnych procesów w tworzeniu nowotworowych naczyń krwionośnych, które mogą się wzajemnie zastępować (angiogeneza, wgłobienie (intussusception), waskulogenna mimikra) [9]. Jeden antyangiogeny czynnik może nie wystarczać do hamowania tych wszystkich, niezachodzących na siebie mechanizmów wzrostu naczyń [47]. Inhibitory proliferacji komórek śródbłonkowych nie będą działały na naczynia krwionośne powstałe bez udziału proliferacji tych komórek, np. w wyniku wgłobienia (intussusception) [2,33] czy struktur naczyńopodobnych powstałych w procesie waskulogennej mimikry [69,74,89]. Poza tym nowotwory mogą wykorzystywać istniejące prawidłowe naczynia (w których komórki EC są w fazie spoczynkowej) do dalszego wzrostu [2,47]. Większość komórek nowotworowych do swego wzrostu wymaga obecności naczyń krwionośnych. Jednak istnieje populacja komórek (zawierają mutację genu *p53*), które są zdolne do przeżycia w hipoksyjnych regionach guza, odległych od naczyń [95].

Komórki śródbłonkowe nowotworowych naczyń krwionośnych mają nieprawidłowe kariotypy z nadmierną liczbą centrosomów. Aneuploidia ta wskazuje na niestabilność genetyczną, która może powodować oporność na wiele typów leków [2,34]. W strukturach naczyńopodobnych są obecne komórki EC powstałe w wyniku transróżnicowania komórek nowotworowych. Komórki te mają niski poziom receptorów VEGFR2 [74], mogą także wykazywać dużą aktywność genów oporności wielolekowej [37].

Fibroblasty CAF wywołują nadekspresję PDGFC odpowiedzialnego za wzrost guza i angiogenezy [2,9]. Czynniki ten rekrutuje perycyty i powoduje powstawanie stabilnych naczyń. Komórki CAF stymulują również proces waskulogenezy przez wydzielanie czynnika SDF1, który mobilizuje komórki EC ze szpiku (w procesie niezależnym od VEGF) [47,68]. Leki antyangiogenne, wywołujące ostrą hipoksję, powodują akumulację progenitorowych komórek śródbłonkowych na obrzeżach guza [2]. Znajdujące się w niedotlenionych obszarach guza makrofagi wydzielają VEGF, który może stymulować ponownie angiogenezę nowotworową [54]. Naciekające neutrofile także odgrywają rolę w angiogenym i inwazyjnym fenotypie nowotworu [2,85]. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC), uczestniczące w regeneracji tkanek, są mobilizowane ze szpiku do guzów nowotworowych z udziałem mechanizmów niezależnych od VEGF (podobnie jak CAFs). Komórki MSC obecne są w glejakach, nowotworach jelita i piersi. Komórki te promują inwazyjność komórek nowotworowych i przerzutowanie [47]. Poza tym supresorowe komórki mieloidalne (MDSC) o fenotypie CD11b⁺Gr1⁺

wydzielają czynnik Bv8, który stymuluje angiogenezę nowotworową [2,71].

Nie wiadomo czy oporność na terapię antyangiogenną może się pojawić u wszystkich leczonych pacjentów i czy jest zależna od dawki podawanych leków. Powstaje więc pytanie czy zasadne są próby całkowitego niszczenia sieci nowotworowych naczyń krwionośnych, czy powinno się stosować takie dawki i schematy leczenia, które pozwoliłyby raczej osiągnąć stan swoistej stabilizacji choroby. Stan ten pozwoliłby zapobiec inwazyjności komórek nowotworowych i powstawania przerzutów. Odpowiedź na powyższe pytanie jest szczególnie ważna dla pacjentów diagnozowanych we wczesnym stadium choroby nowotworowej [47].

IMMUNOTERAPIA SKIEROWANA PRZECIWKO NOWOTWOROWYM NACZYNIOM

Swoiste eliminowanie nowotworowych naczyń krwionośnych nie jest wystarczająco skutecznym rozwiązaniem w terapii nowotworów. Oporność, która może powstać na terapię antyangiogenną i stymulacja inwazyjności nowotworów stają się ważnymi przeszkodami w stosowaniu tej metody leczenia. Nowe rozwiązania powinny zatem pomijać zjawisko oporności komórek.

Jednym z rozwiązań może być immunoterapia. Od niedawna rozpoczęto badanie szczepionek, skierowanych przeciwko nowotworowym naczyniom krwionośnym. Immunoterapia skierowana przeciwko białkom swoistym dla komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych łamie tolerancję przeciwko własnemu antygenom i hamuje wzrost guzów nowotworowych [52,59,66].

Szczepionki wykazały obiecujące rezultaty w zahamowaniu wzrostu guzów i przerzutów. Pierwszą grupę stanowią szczepionki wykorzystujące żywe [11] lub utrwalone komórki śródbłonkowe [12,58,60,90], które indukują zarówno humoralną, jak i komórkową odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko naczyniom nowotworowym. W uzyskaniu odpowiedzi immunologicznej biorą udział limfocyty T cytotoksyczne oraz swoiste przeciwciała skierowane przeciwko antygenom występującym na komórkach EC [59].

Drugą grupą szczepionek są szczepionki skierowane przeciwko konkretnym białkom występującym na powierzchni komórek śródbłonkowych. Szczepionkami mogą być peptydy [82,83] bądź kwasy nukleinowe (DNA lub RNA) [44,50,56], które kodują swoiste dla naczyń białka. Białkami tymi mogą być czynniki wzrostu/receptory, które są bezpośrednio związane ze wzrostem komórek śródbłonkowych lub białka, które wpływają na wzrost i przeżycie zarówno komórek nowotworowych jak i śródbłonkowych: VEGFR2, VEGFA, FGFR1/bFGF, TEM8, CD105, angiomiotyna, a także surwiwina, legumina, MMP2 czy integryny [44,48,49,52,92,97].

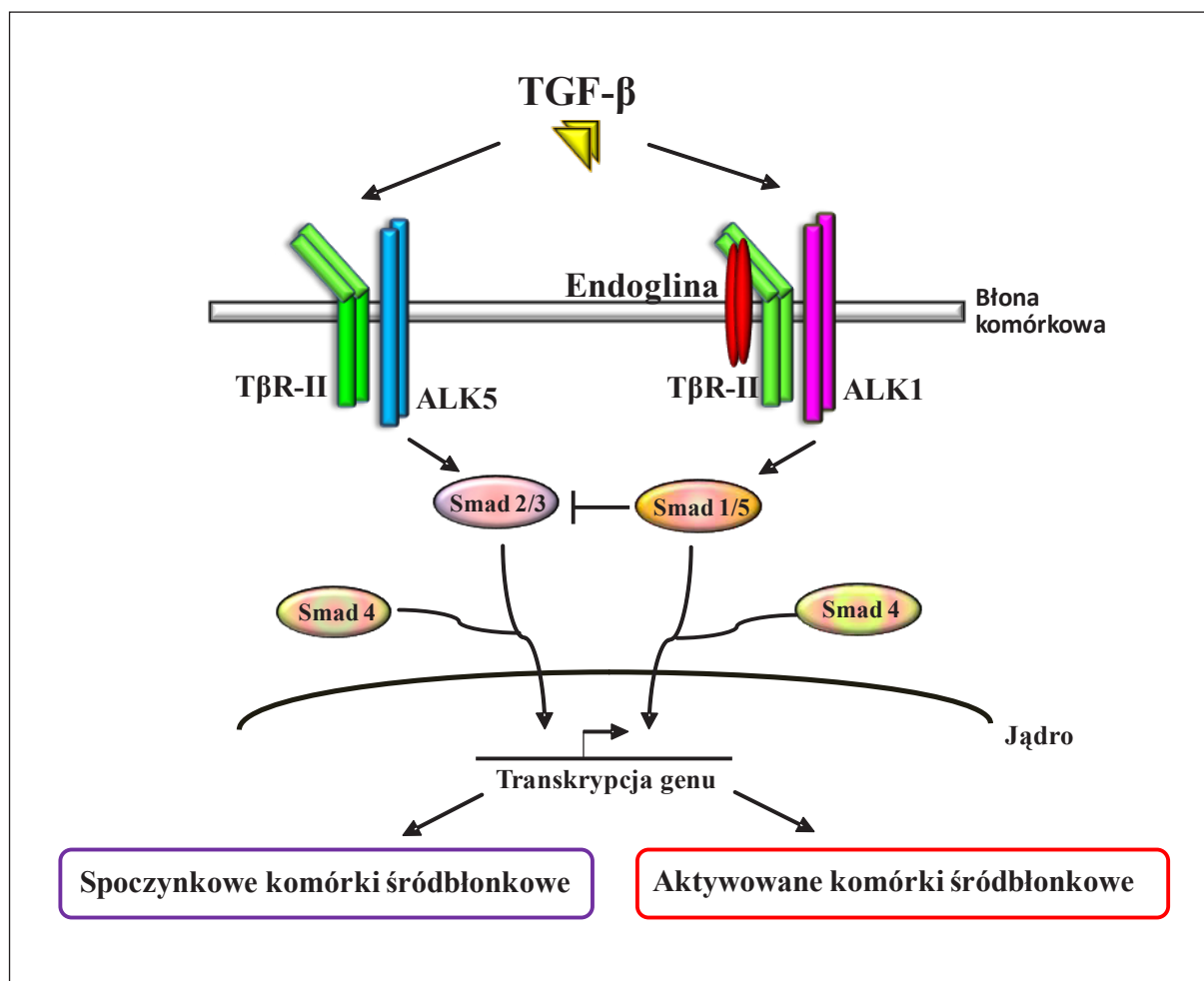
Swoiste szczepionki, skierowane przeciwko konkretnym białkom (antygenom) występującym w komórkach śródbłonkowych naczyń nowotworowych pobudzają układ immunologiczny do złamania tolerancji przeciwko własnemu antygenom [52,56,66]. W tej odpowiedzi główną rolę odgrywają aktywowane cytotoksyczne limfocyty T CD8⁺ [52,66]. Immunoterapia skierowana przeciwko komórkom śródbłonkowym naczyń nowotworowych ma wiele zalet [52]. Po pierwsze, nowotworowe komórki śródbłonkowe są bardziej dostępne komórkom układu odpornościowego niż komórki nowotworowe znajdujące się w różnych odległościach od naczyń. Po drugie, zniszczenie pojedynczej komórki śródbłonkowej może zahamować podziały ponad 100 komórek nowotworowych. Po trzecie, komórki śródbłonkowe nowotworowych naczyń krwionośnych są lepszym celem dla indukowanej odpowiedzi immunologicznej CD8⁺ niż komórki nowotworowe, które mają obniżoną ekspresję cząsteczek MHC.

Wiele receptorów powierzchniowych pojawia się w guzach nowotworowych [35]. Receptory te mogą być nowymi celami terapeutycznymi. Wśród nich są: integryny $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, endogлина (CD105), receptor VEGFR2, receptor trombospodiny 1 (CD36), Thy-1, fosfatydyloseryna, antygen błonowy swoisty dla prostaty (PSMA), czy markery nowotworowych komórek śródbłonkowych (TEM) [3].

ENDOGLINA JAKO CEL TERAPEUTYCZNY

Endogлина (CD105), glikoproteina towarzysząca receptorowi TGF- β , występuje na proliferujących, aktywnych komórkach śródbłonkowych naczyń krwionośnych [5,18,23,24,55]. TGF- β reguluje główne procesy komórkowe, takie jak: proliferacja, migracja, programowana śmierć komórki, adhezja, organizacja cytoszkieletu, przekształcanie macierzy pozakomórkowej i plastyczność fenotypowa [64,86]. Endogлина to białko homodimeryczne składające się z dwóch podjednostek (95 kDa) połączonych disiarczowym mostkiem. Endogлина występuje w dwóch izoformach, różniących się długością cytoplazmatycznej domeny. Długa (L) zawiera 46 reszt aminokwasowych, a krótka (S) 14 reszt aminokwasowych [13,18,64]. Nie ma funkcjonalnych różnic między tymi izoformami. 72% sekwencji aminokwasowej jest wspólna dla ludzkiego i mysiego białka [46]. Ludzkie białko zawiera dodatkową sekwencję: arginina-glicyna-kwas asparaginowy (RGD) [18,24]. Sekwencja ta jest umiejscowiona w domenie pozakomórkowej i uczestniczy w rozpoznawaniu białek ECM [18]. Najbardziej konserwatywne regiony CD105 to transbłonowa i cytoplazmatyczna domena [18].

Endogлина wiąże TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 3$ (ale nie TGF- $\beta 2$), aktywiny A, BMP-2 i BMP-7 [64]. Fosforylacja endogliny reguluje zależny od ALK1 proces proliferacji komórek śródbłonkowych [13,24,43] (ryc. 2). W komórkach śródbłonkowych naczyń krwionośnych endogлина bierze udział w kontroli proliferacji komórek, migracji i tworzenia naczyń włosowatych. Odgrywa rolę czyn-



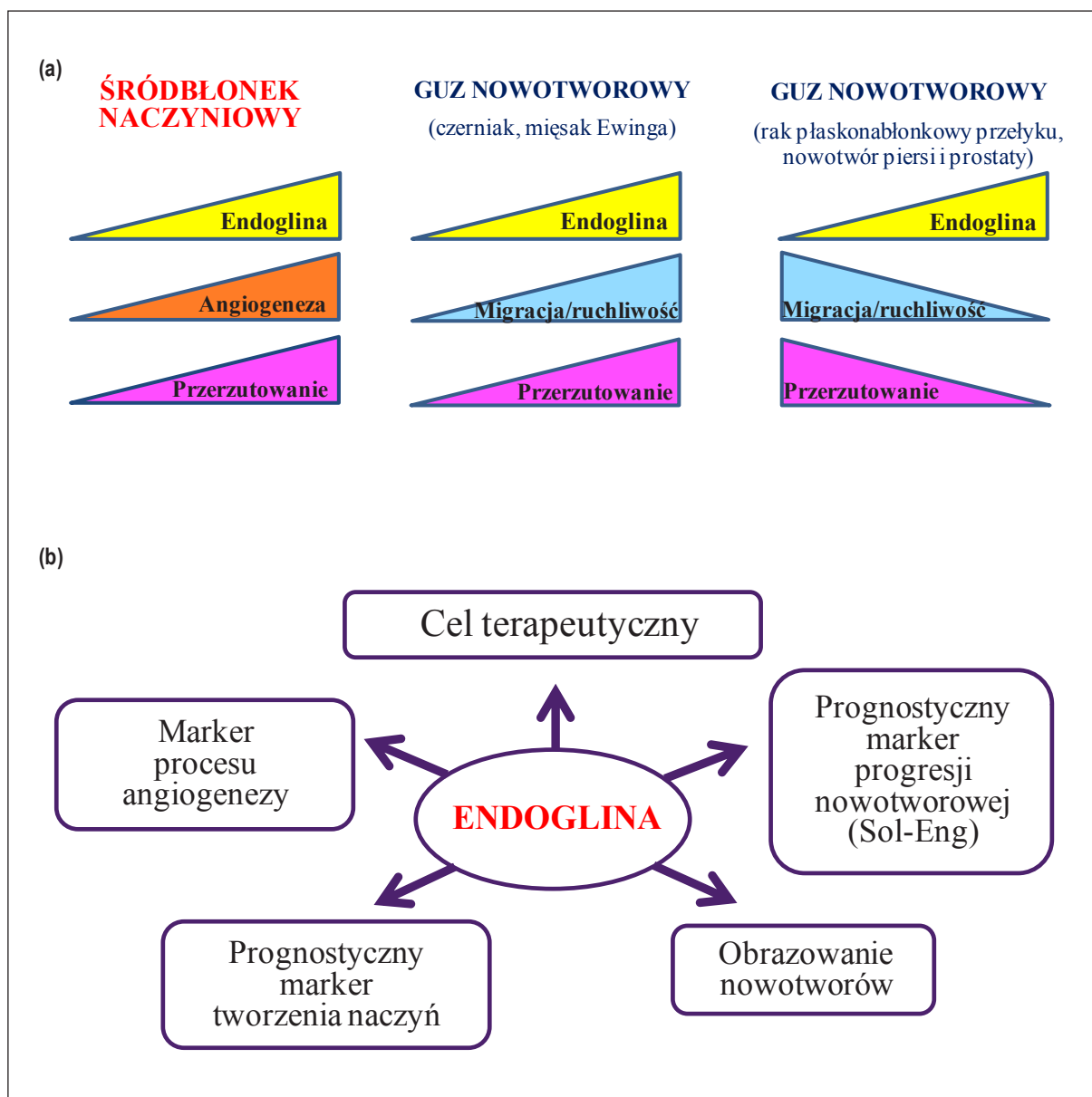
Ryc. 2. Rola TGF-β i endogliny w aktywacji komórek śródbłonkowych. W obecności endogliny jest fosforylowane białko ALK1. Białko to fosforyluje następnie białko Smad 1/5. Aktywowane Smad 1/5 połączone z Smad 4 są translokowane do jądra i aktywują komórki śródbłonkowe. ALK5 pośredniczy w szlaku sygnałowym TGF-β w spoczynkowych komórkach śródbłonkowych (wg [13,24]; zmienione)

nika proangiogenne (ryc. 3) [5,64]. Myszy niemające białka CD105 wykazują wiele naczyniowych defektów, które powodują śmierć we wczesnych stadiach embrionalnych [18,23]. U ludzi mutacja genu kodującego endoglinę powoduje wrodzoną chorobę naczyniakowatości krwotocznej (HTT1, hereditary haemorrhagic teleangiectasia I) [18,86].

Endoglina występuje na komórkach śródbłonkowych naczyń uczestniczących w procesie angiogenezy, np. podczas gojenia się ran czy progresji nowotworowej. W ludzkich komórkach prawidłowych, takich jak np.: aktywowane monocyty, makrofagi, prekursorzy erytrocytów, fibroblasty, komórki dendrytyczne i melanocyty, CD105 występuje w małym stężeniu [18,22]. Duże stężenie jest natomiast obserwowane w syncytiotrofoblastach łożyska [18]. W wielu nowotworach białko CD105 obecne jest zarówno w naczyniach peryferyjnych, jak i w naczyniach zlokalizowanych wewnątrz guzów nowotworowych [13,23]. W angiogenezie nowotworowej CD105 bierze udział w aktywowaniu an-

tyapoptotycznych sygnałów w hipoksyjnych regionach guza [24]. Hipoksja, a także czynniki, takie jak: TGF-β, BMP9 i ALK1 stymulują syntezę endogliny, podczas gdy czynnik TNF-α hamuje ją [86]. Obecność CD105 w nowotworowych naczyniach jest prognostycznym markerem w wielu typach guzów litych [13,96]. W nowotworach żołądka, jelita, piersi, prostaty, głowy i szyi, wysoki poziom CD105 w komórkach śródbłonkowych koreluje z powstawaniem odległych przerzutów [13,18,57]. Endoglina jest dużo lepszym markerem tworzenia nowotworowych naczyń krwionośnych, jak i prognostycznym, u pacjentów chorych na glejaki niż CD31 czy CD34 [4,75,94].

Endoglina występuje również na niektórych typach komórek nowotworowych [64,86]. W nowotworach prostaty [46,70], piersi [32], a także raku płaskonabłonkowym przełyku [91] endoglina hamuje inwazyjność i przerzutowanie komórek nowotworowych. Natomiast w czerniaku i mięsaku Ewinga CD105 stymuluje te procesy (ryc. 3) [63].



Ryc. 3. Endogлина jako cel terapii przeciwnowotworowej: (a) Endogлина odgrywa ważną rolę w progresji bądź regresji nowotworu oddziałując na procesy angiogenezy, migracji, ruchliwości i przerzutowania. W zależności od typu nowotworu endogлина w czerniaku i mięsaku Ewinga zwiększa migrację komórek nowotworowych i ich przerzutowanie, natomiast w raku płaskonabłonkowym przełyku, nowotworach piersi i prostaty - zmniejsza migrację komórek nowotworowych oraz ich przerzutowanie. Stąd terapia skierowana przeciwko endoglinie może być wykorzystana jedynie tylko w niektórych typach nowotworów; (b) Endogлина może mieć znaczenie prognostyczne (w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych i progresji nowotworowej), diagnostyczne (obrazowanie guzów), a także terapeutyczne (terapię przeciwnowotworową skierowaną na endoglinę) (wg [5]; zmienne), opis w tekście

Pozakomórkowa domena endogliny może być proteolitycznie odcięta, uwalniając krążącą w krwiobiegu postać endogliny zwaną „rozpuszczalną endogliną” (Sol-Eng) [31,64]. Pozakomórkowa domena endogliny odcinana jest przez metaloproteinazę 14 (MMP-14; membrane - type 1 matrix metalloproteinase MT1-MMP) [31,64]. Występowanie endogliny z MMP-14 na powierzchni komórek powoduje odcięcie endogliny w pozycji 568 pomiędzy glicyną-leucyną, uwalniając

domenę zewnątrzkomórkową endogliny [31]. Zwiększony poziom MMP-14 na powierzchni błony komórek powoduje uwalnianie Sol-Eng, zmniejszając ilość endogliny na powierzchni komórek i przekształcając komórki śródbłonkowe z proliferujących na spoczynkowe [31]. Sol-Eng uwalniana jest nie tylko przez komórki śródbłonkowe, ale także przez komórki nowotworowe, które zawierają endoglinę na swojej powierzchni [5].

Stężenie rozpuszczalnej endogliny w osoczu chorych na nowotwory koreluje z zaawansowaniem choroby nowotworowej, wrażliwością na chemioterapię czy wystąpieniem ewentualnej wznowy choroby [18,55,81]. Jest to także czynnik predykcyjny ryzyka powstawania przerzutów, np. zwiększenie poziomu Sol-Eng koreluje ze wzrostem przerzutów u chorych z nowotworem piersi lub odbytnicy [81]. W nowotworze prostaty duże stężenie w surowicy „rozpuszczalnej endogliny” związane jest z zaawansowanym stadium progresji nowotworu [25,76]. Stężenie endogliny było małe u pacjentów leczonych chemioterapią. Konwencjonalna chemioterapia powinna niszczyć komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych i hamować uwalnianie Sol-Eng przez komórki śródbłonkowe [42]. Duże stężenie Sol-Eng jest także obecne w nowotworach złośliwych szpiku [8]. Natomiast w nowotworach żołądka, przełyku i jajnika nie stwierdzono prognostycznego znaczenia poziomu „rozpuszczalnej endogliny” [64].

IMMUNOTERAPIA SKIEROWANA PRZECIWKO ENDOGLINIE

W próbach stymulacji układu immunologicznego skierowanego przeciwko endoglinie wykorzystywano obcogatunkowe białko lub przeciwciała monoklonalne [39,82,87,88]. Strategie skierowane przeciwko endoglinie traktowane były jako terapie skierowane wyłącznie przeciwko nowotworowym komórkom śródbłonkowym [52]. Jednak coraz więcej danych świadczy o obecności tego transbłonowego białka w komórkach nowotworowych [86]. CD105 hamuje migrację, ruchliwość i przerzutowanie komórek nowotworowych raka prostaty [46,70]. Zwiększony poziom endogliny w raku płaskokomórkowym przełyku i nowotworze piersi zmniejsza inwazyjność i tumorogenną komórek nowotworowych [32,91]. Natomiast w przypadku czerniaka czy mięsaka Ewinga CD105 jest silnym stymulatorem progresji nowotworowej (ryc. 3) [63]. Poziom ekspresji endogliny w tych dwóch typach nowotworów wiąże się ze zdolnością komórek nowotworowych do tworzenia struktur naczyniopodobnych (waskulogennej mimikry) [64]. Białko CD105 reguluje ekspresję integryny $\beta 3$ i osteopontyny, które są niezbędne w procesie waskulogennej mimikry [63]. Eliminowanie komórek nowotworowych zawierających na swojej powierzchni endoglinę może stymulować ze złośliwienie nowotworu (rak prostaty) bądź hamować jego progresję (czerniak). Dlatego też terapia skierowana przeciwko endoglinie może być wykorzystana tylko w wybranych typach nowotworów.

W naszych badaniach podjęliśmy próbę wykorzystania nowego rozwiązania terapeutycznego, które może ominąć wiele mechanizmów oporności na leki antyangiogenne. Skonstruowaliśmy szczepionkę DNA skierowaną przeciwko endoglinie, której nośnikiem były atenuowane bakterie *Salmonella Typhimurium* SL7207. Okazało się, że stosowana w badaniach szczepionka DNA jest skierowana przeciwko komórkom śródbłonkowym i nowotworowym [38]. To podwójne celowa-

nie: niszczenie nowotworowych naczyń krwionośnych i komórek nowotworowych może się okazać wystarczające do zahamowania wzrostu guzów. Poza tym jedną z ważnych zalet endogliny jest to, że ulega ona ekspresji w aktywnych, proliferujących komórkach śródbłonkowych na znacznie wyższym poziomie (powyżej 3×10^6 kopii na komórkę) niż inne białka związane z procesem angiogenezy, tj. VEGFRs ($< 0,2 \times 10^6$ kopii na komórkę) [96]. Większość stosowanych leków antyangiogennych działa jedynie na proliferujące komórki śródbłonkowe biorące udział w procesie angiogenezy. Występująca na aktywowanych komórkach śródbłonkowych endoglina bierze także udział w procesie waskulogennej mimikry. W ludzkim nerwiaku zarodkowym, 70% komórek śródbłonkowych wykazuje zarówno ekspresję CD105 jak i amplifikację onkogenu *MYCN* [65]. Niszcząc komórki zawierające endoglinę (komórki śródbłonkowe jak i transróznicowane komórki nowotworowe), hamuje się proces waskulogennej mimikry.

Hipoksja stymuluje wydzielanie czynników proangiogennych i progresję nowotworową [1,16]. Niedotlenienie indukuje zwiększoną ekspresję CD105 w komórkach śródbłonkowych naczyń [13]. CD105 działa niezależnie od TGF- β przeciwdziałając apoptozie komórek śródbłonkowych w warunkach hipoksji. Eliminowanie endogliny zwiększa więc apoptozę komórek w warunkach hipoksji [45].

Wydaje się, że szczepionka DNA skierowana przeciwko endoglinie jest jednym z wariantów terapii eliminującej nowotworowe naczynia krwionośne i komórki nowotworowe, która może omijać wiele mechanizmów oporności na leki antyangiogenne. Odpowiednia kombinacja tej szczepionki DNA z czynnikami zarówno antyangiogennymi jak i immunomodulacyjnymi (takimi jak interleukina 12 czy cyklofosfamid) powoduje polaryzację fenotypu komórek mikrośrodowiska w kierunku fenotypu antyangiogennego znoszącego immunosupresję, prowadząc do stabilizacji choroby, a nawet całkowitej regresji nowotworu u doświadczalnych zwierząt [38]. Wydaje się, że kombinacja strategii niszczącej nowotworowe naczynia krwionośne z immunoterapią jest obiecującym rozwiązaniem terapeutycznym.

ZAKOŃCZENIE

Endoglina odgrywa ważną rolę w progresji nowotworu oddziałując na procesy angiogenezy, migracji i przerzutowania. Występuje na powierzchni komórek śródbłonkowych nowotworowych naczyń krwionośnych jak i na niektórych typach komórek nowotworowych. Podwójne celowanie: niszczenie nowotworowych naczyń krwionośnych i komórek nowotworowych może się okazać wystarczające do zahamowania wzrostu guzów nowotworowych. Rozwiązanie terapeutyczne skierowane przeciwko endoglinie wydaje się omijać niektóre mechanizmy oporności jakie mogą powstać podczas zastosowania leków antyangiogennych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abdollahi A., Folkman J.: Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist. Updat.*, 2010; 13: 16-28
- [2] Azam F., Mehta S., Harris A.L.: Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *Eur. J. Cancer*, 2010; 46: 1323-1332
- [3] Baluk P., Hashizume H., McDonald D.M.: Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2005; 15: 102-111
- [4] Behrem S., Zarkovic K., Eskinja N., Jonjic N.: Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat. Med. J.*, 2005; 46: 417-422
- [5] Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M., Quintanilla M.: The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1792: 954-973
- [6] Box C., Rogers S.J., Mendiola M., Eccles S.A.: Tumour-micro-environmental interactions: paths to progression and targets for treatment. *Semin. Cancer Biol.*, 2010; 20: 128-138
- [7] Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T.L., Fuller C., Hamner B., Oh E.Y., Gaber M.W., Finklestein D., Allen M., Frank A., Bayazitov I.T., Zakharenko S.S., Gajjar A., Davidoff A., Gilbertson R.J.: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 2007; 11: 69-82
- [8] Calabrò L., Fonsatti E., Bellomo G., Alonci A., Colizzi F., Sigalotti L., Altomonte M., Musolino C., Maio M.: Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J. Cell Physiol.*, 2003; 194: 171-175
- [9] Carmeliet P., Jain R.K.: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011; 473: 298-307
- [10] Carmeliet P., Jain R.K.: Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011; 10: 417-427
- [11] Chen X.Y., Zhang W., Zhang W., Wu S., Bi F., Su Y.J., Tan X.Y., Liu J.N., Zhang J.: Vaccination with viable human umbilical vein endothelial cells prevents metastatic tumors by attack on tumor vasculature with both cellular and humoral immunity. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 5834-5840
- [12] Corsini E., Gelati M., Calatuzzolo C., Alessandri G., Frigerio S., De Francesco M., Poesi C., Parati E., Croci D., Boiardi A., Salmaggi A.: Immunotherapy with bovine aortic endothelial cells in subcutaneous and intracerebral glioma models in rats: effects on survival time, tumor growth, and tumor neovascularization. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2004; 53: 955-962
- [13] Dallas N.A., Samuel S., Xia L., Fan F., Gray M.J., Lim S.J., Ellis L.M.: Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 1931-1937
- [14] Darji A., Guzmán C.A., Gerstel B., Wachholz P., Timmis K.N., Wehland J., Chakraborty T., Weiss S.: Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*, 1997; 91: 765-775
- [15] De Bock K., Cauwenberghs S., Carmeliet P.: Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2011; 21: 73-79
- [16] De Bock K., Mazzone M., Carmeliet P.: Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2011; 8: 393-404
- [17] Döme B., Hendrix M.J., Paku S., Tóvári J., Tímár J.: Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.*, 2007; 170: 1-15
- [18] Duff S.E., Li C., Garland J.M., Kumar S.: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.*, 2003; 17: 984-992
- [19] Ebos J.M., Kerbel R.S.: Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2011; 8: 210-221
- [20] Ebos J.M., Lee C.R., Cruz-Munoz W., Bjarnason G.A., Christensen J.G., Kerbel R.S.: Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 2009; 15: 232-239
- [21] Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285: 1182-1186
- [22] Fonsatti E., Altomonte M., Nicotra M.R., Natali P.G., Maio M.: Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene*, 2003; 22: 6557-6563
- [23] Fonsatti E., Maio M.: Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J. Transl. Med.*, 2004; 2: 18
- [24] Fonsatti E., Nicolay H.J., Altomonte M., Covre A., Maio M.: Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc. Res.*, 2010; 86: 12-19
- [25] Fujita K., Ewing C.M., Chan D.Y., Mangold L.A., Partin A.W., Isaacs W.B., Pavlovich C.P.: Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 2009; 124: 664-669
- [26] Fukumura D., Jain R.K.: Tumor microvasculature and micro-environment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc. Res.*, 2007; 74: 72-84
- [27] Gardlik R., Behuliak M., Palfy R., Celec P., Li C.J.: Gene therapy for cancer: bacteria-mediated anti-angiogenesis therapy. *Gene Ther.*, 2011; 18: 425-431
- [28] Grabowski P., Briest F., Baum R.P., Zaknun J.J., Kulkarni H.R., Zeitz M., Hörsch D.: Vandetanib therapy in medullary thyroid cancer. *Drugs Today*, 2012; 48: 723-733
- [29] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646-674
- [30] Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57-70
- [31] Hawinkels L.J., Kuiper P., Wiercinska E., Verspaget H.W., Liu Z., Pardali E., Sier C.F., ten Dijke P.: Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.*, 2010; 70: 4141-4150
- [32] Henry L.A., Johnson D.A., Sarrió D., Lee S., Quinlan P.R., Crook T., Thompson A.M., Reis-Filho J.S., Isacke C.M.: Endoglin expression in breast tumor cells suppresses invasion and metastasis and correlates with improved clinical outcome. *Oncogene*, 2011; 30: 1046-1058
- [33] Hida K., Hida Y., Shindoh M.: Understanding tumor endothelial cell abnormalities to develop ideal anti-angiogenic therapies. *Cancer Sci.*, 2008; 99: 459-466
- [34] Hida K., Klagsbrun M.: A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res.*, 2005; 65: 2507-2510
- [35] Hofmeister V., Vetter C., Schrama D., Bröcker E.B., Becker J.C.: Tumor stroma-associated antigens for anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 481-494
- [36] Hu M., Polyak K.: Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2008; 18: 27-34
- [37] Huse J.T., Holland E.C.: Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer*, 2010; 10: 319-331

- [38] Jarosz M., Jazowiecka-Rakus J., Cichoń T., Głowala-Kosińska M., Smolarczyk R., Smagur A., Malina S., Sochanik A., Szala S.: Therapeutic antitumor potential of endoglin-based DNA vaccine combined with immunomodulatory agents. *Gene Ther.*, 2012 (doi:10.1038/gt.2012.28)
- [39] Jiao J.G., Li Y.N., Wang H., Liu Q., Cao J.X., Bai R.Z., Huang F.Y.: A plasmid DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces anti-tumour immune response against self-endoglin-related angiogenesis in two liver cancer models. *Dig. Liver Dis.*, 2006; 38: 578-587
- [40] Keunen O., Johansson M., Oudin A., Sanzey M., Rahim S.A., Fack F., Thorsen F., Taxt T., Bartos M., Jirik R., Miletic H., Wang J., Stieber D., Stühr L., Moen I., Rygh C.B., Bjerkvig R., Niclou S.P.: Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 3749-3754
- [41] Koda Y., Katanasaka Y., Kitamura Y., Tsuda H., Nishio K., Tamura T., Koizumi F.: Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res.*, 2011; 13: R66
- [42] Koczyńska E., Danciewicz M., Kowalewski J., Makarewicz R., Kardymowicz H., Kaczmarczyk A., Tyrakowski T.: Influence of surgical resection on plasma endoglin (CD105) level in non small cell lung cancer patients. *Exp. Oncol.*, 2012; 34: 53-56
- [43] Lebrin F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R.L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., ten Dijke P.: Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J.*, 2004; 23: 4018-4028
- [44] Lee S.H., Mizutani N., Mizutani M., Luo Y., Zhou H., Kaplan C., Kim S.W., Xiang R., Reisfeld R.A.: Endoglin (CD105) is a target for an oral DNA vaccine against breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 1565-1574
- [45] Li C., Issa R., Kumar P., Hampson I.N., Lopez-Novoa J.M., Bernabeu C., Kumar S.: CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 2677-2685
- [46] Liu Y., Jovanovic B., Pins M., Lee C., Bergan R.C.: Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene*, 2002; 21: 8272-8281
- [47] Loges S., Schmidt T., Carmeliet P.: Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes Cancer*, 2010; 1: 12-25
- [48] Luo Y., Markowitz D., Xiang R., Zhou H., Reisfeld R.A.: FLK-1-based minigene vaccines induce T cell-mediated suppression of angiogenesis and tumor protective immunity in syngeneic BALB/c mice. *Vaccine*, 2007; 25: 1409-1415
- [49] Luo Y., Zhou H., Krueger J., Kaplan C., Lee S.H., Dolman C., Markowitz D., Wu W., Liu C., Reisfeld R.A., Xiang R.: Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 2132-2141
- [50] Luo Y., Zhou H., Mizutani M., Mizutani N., Reisfeld R.A., Xiang R.: Transcription factor Fos-related antigen 1 is an effective target for a breast cancer vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 8850-8855
- [51] Maity A., Bernhard E.J.: Modulating tumor vasculature through signaling inhibition to improve cytotoxic therapy. *Cancer Res.*, 2010; 70: 2141-2145
- [52] Matejuk A., Leng Q., Chou S.T., Mixson A.J.: Vaccines targeting the neovasculature of tumors. *Vasc. Cell*, 2011; 3: 7
- [53] McDonald D.M., Baluk P.: Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5381-5385
- [54] Murdoch C., Lewis C.E.: Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int. J. Cancer*, 2005; 117: 701-708
- [55] Nassiri F., Cusimano M.D., Scheithauer B.W., Rotondo F., Fazio A., Yousef G.M., Syro L.V., Kovacs K., Lloyd R.V.: Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.*, 2011; 31: 2283-2290
- [56] Niethammer A.G., Xiang R., Becker J.C., Wodrich H., Pertl U., Karsten G., Eliceiri B.P., Reisfeld R.A.: A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1369-1375
- [57] Nikiteas N.I., Tzanakis N., Theodoropoulos G., Atsaves V., Christoni Z., Karakitsos P., Lazaris A.C., Papachristodoulou A., Klonaris C., Gazouli M.: Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2007; 10: 12-17
- [58] Okaji Y., Tsuno N.H., Kitayama J., Saito S., Takahashi T., Kawai K., Yazawa K., Asakage M., Hori N., Watanabe T., Shibata Y., Takahashi K., Nagawa H.: Vaccination with autologous endothelium inhibits angiogenesis and metastasis of colon cancer through autoimmunity. *Cancer Sci.*, 2004; 95: 85-90
- [59] Okaji Y., Tsuno N.H., Saito S., Yoneyama S., Tanaka M., Nagawa H., Takahashi K.: Vaccines targeting tumour angiogenesis- a novel strategy for cancer immunotherapy. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2006; 32: 363-370
- [60] Okaji Y., Tsuno N.H., Tanaka M., Yoneyama S., Matsushashi M., Kitayama J., Saito S., Nagura Y., Tsuchiya T., Yamada J., Tanaka J., Yoshikawa N., Nishikawa T., Shuno Y., Todo T., Saito N., Takahashi K., Nagawa H.: Pilot study of anti-angiogenic vaccine using fixed whole endothelium in patients with progressive malignancy after failure of conventional therapy. *Eur. J. Cancer*, 2007; 44: 383-390
- [61] Ostrand-Rosenberg S.: Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2008; 18: 11-18
- [62] Páez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Viñals F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D., Casanovas O.: Anti-angiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 2009; 15: 220-231
- [63] Pardali E., van der Schaft D.W., Wiercinska E., Gorter A., Hogendoorn P.C., Griffioen A.W., ten Dijke P.: Critical role of endoglin in tumor cell plasticity of Ewing sarcoma and melanoma. *Oncogene*, 2010; 30: 334-345
- [64] Pérez-Gómez E., Del Castillo G., Juan Francisco S., López-Novoa J.M., Bernabeu C., Quintanilla M.: The role of the TGF- β coreceptor endoglin in cancer. *Sci. World J.*, 2010; 10: 2367-2384
- [65] Pezzolo A., Parodi F., Corrias M.V., Cinti R., Gambini C., Pistola V.: Tumor origin of endothelial cells in human neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 376-383
- [66] Reisfeld R.A., Niethammer A.G., Luo Y., Xiang R.: DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of anti-angiogenesis. *Immunol. Rev.*, 2004; 199: 181-190
- [67] Relf M., LeJeune S., Scott P.A., Fox S., Smith K., Leek R., Moghaddam A., Whitehouse R., Bicknell R., Harris A.L.: Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.*, 1997; 57: 963-969
- [68] Ribatti D., Vacca A.: Overview of angiogenesis during tumor growth. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 161-168
- [69] Ricci-Vitiani L., Pallini R., Biffoni M., Todaro M., Invernici G., Cenci T., Maira G., Parati E.A., Stassi G., Larocca L.M., De Maria R.: Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 2010; 468: 824-828

- [70] Romero D., O'Neill C., Terzic A., Contois L., Young K., Conley B.A., Bergan R.C., Brooks P.C., Vary C.P.: Endoglin regulates cancer-stromal cell interactions in prostate tumors. *Cancer Res.*, 2011; 71: 3482-3493
- [71] Shojaei F., Ferrara N.: Refractoriness to antivascular endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells. *Cancer Res.*, 2008; 68: 5501-5504
- [72] Siemann D.W.: Tumor Vasculature: a Target for Anticancer Therapies. W: *Vascular-Targeted Therapies in Oncology*, red.: D.W. Siemann. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK 2006
- [73] Singh M., Couto S.S., Forrest W.F., Lima A., Cheng J.H., Molina R., Long J.E., Hamilton P., McNutt A., Kasman I., Nannini M.A., Reslan H.B., Cao T.C., Ho C.C., Barck K.H., Carano R.A., Foreman O., Eastham-Anderson J., Jubb A.M., Ferrara N., Johnson L.: Anti-VEGF antibody therapy does not promote metastasis in genetically engineered mouse tumour models. *J. Pathol.*, 2012; 227: 417-430
- [74] Soda Y., Marumoto T., Friedmann-Morvinski D., Soda M., Liu F., Michiue H., Pastorino S., Yang M., Hoffman R.M., Kesari S., Verma I.M.: Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 4274-4280
- [75] Sugita Y.: Angiogenesis of Primary Brain Tumors: The Role of Endoglin (CD105). W: *Molecular Targets of CNS Tumors*, red.: M. Garami. ISBN: 978-953-307-736-9, InTech 2011
- [76] Svatek R.S., Karam J.A., Roehrborn C.G., Karakiewicz P.I., Slawin K.M., Shariat S.F.: Preoperative plasma endoglin levels predict biochemical progression after radical prostatectomy. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 3362-3366
- [77] Szala S.: Angiogeneza i immunosupresja: jin i jang progresji nowotworów? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 598-612
- [78] Szala S., Jarosz M.: Nowotworowe naczynia krwionośne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 437-446
- [79] Szala S., Mitrus I., Sochanik A.: Can inhibition of angiogenesis and stimulation of immune response be combined into a more effective antitumor therapy? *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010; 59: 1449-1455
- [80] Tabi Z., Man S.: Challenges for cancer vaccine development. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006; 58: 902-915
- [81] Takahashi N., Kawanishi-Tabata R., Haba A., Tabata M., Haruta Y., Tsai H., Seon B.K.: Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 524-532
- [82] Tan G.H., Li Y.N., Huang F.Y., Wang H., Bai R.Z., Jang J.: Combination of recombinant xenogeneic endoglin DNA and protein vaccination enhances anti-tumor effects. *Immunol. Invest.*, 2007; 36: 423-440
- [83] Tan G.H., Tian L., Wei Y.Q., Zhao X., Li J., Wu Y., Wen Y.J., Yi T., Ding Z.Y., Kan B., Mao Y.Q., Deng H.X., Li H.L., Zou C.H., Fu C.H.: Combination of low-dose cisplatin and recombinant xenogeneic endoglin as a vaccine induces synergistic antitumor activities. *Int. J. Cancer*, 2004; 112: 701-706
- [84] Tang D., Kang R., Zeh H.J. 3rd, Lotze M.T.: High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1799: 131-140
- [85] Tazzyman S., Lewis C.E., Murdoch C.: Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2009; 90: 222-231
- [86] ten Dijke P., Goumans M.J., Pardali E.: Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*, 2008; 11: 79-89
- [87] Tsujie M., Tsujie T., Toi H., Uneda S., Shiozaki K., Tsai H., Seon B.K.: Anti-tumor activity of an anti-endoglin monoclonal antibody is enhanced in immunocompetent mice. *Int. J. Cancer*, 2008; 122: 2266-2273
- [88] Uneda S., Toi H., Tsujie T., Tsujie M., Harada N., Tsai H., Seon B.K.: Anti-endoglin monoclonal antibodies are effective for suppressing metastasis and the primary tumors by targeting tumor vasculature. *Int. J. Cancer*, 2009; 125: 1446-1453
- [89] Wang R., Chadalavada K., Wilshire J., Kowalik U., Hovinga K.E., Geber A., Fligelman B., Leversha M., Brennan C., Tabar V.: Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, 2010; 468: 829-833
- [90] Wei Y.Q., Wang Q.R., Zhao X., Yang L., Tian L., Lu Y., Kang B., Lu C.J., Huang M.J., Lou Y.Y., Xiao F., He Q.M., Shu J.M., Xie X.J., Mao Y.Q., Lei S., Luo F., Zhou L.Q., Liu C.E., Zhou H., Jiang Y., Peng F., Yuan L.P., Li Q., Wu Y., Liu J.Y.: Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine. *Nat. Med.*, 2000; 6: 1160-1166
- [91] Wong V.C., Chan P.L., Bernabeu C., Law S., Wang L.D., Li J.L., Tsao S.W., Srivastava G., Lung M.L.: Identification of an invasion and tumor-suppressing gene, Endoglin (ENG), silenced by both epigenetic inactivation and allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2008; 123: 2816-2823
- [92] Xiang R., Mizutani N., Luo Y., Chiodoni C., Zhou H., Mizutani M., Ba Y., Becker J.C., Reisfeld R.A.: A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res.*, 2005; 65: 553-561
- [93] Yang L.P., McKeage K.: Axitinib: in advanced, treatment-experienced renal cell carcinoma. *Drugs*, 2012; 72: 2375-2384
- [94] Yao Y., Kubota T., Takeuchi H., Sato K.: Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology*, 2005; 25: 201-206
- [95] Yu J.L., Coomber B.L., Kerbel R.S.: A paradigm for therapy-induced microenvironmental changes in solid tumors leading to drug resistance. *Differentiation*, 2002; 70: 599-609
- [96] Zhang Y., Yang Y., Hong H., Cai W.: Multimodality molecular imaging of CD105 (Endoglin) expression. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2011; 4: 32-42
- [97] Zuo S.G., Chen Y., Wu Z.P., Liu X., Liu C., Zhou Y.C., Wu C.L., Jin C.G., Gu Y.L., Li J., Chen X.Q., Li Y., Wei H.P., Li L.H., Wang X.C.: Orally administered DNA vaccine delivery by attenuated *Salmonella typhimurium* targeting fetal liver kinase 1 inhibits murine Lewis lung carcinoma growth and metastasis. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010; 33: 174-182

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.