

- vol. 17, Suppl 10, p. x76-78.
3. Bikfalvi A. Angiogenesis: health and disease. In: Ann Oncol. 2006, vol. 17, Suppl. 10, p. x65-70.
 4. Folkman J., Shing Y. Angiogenesis. In: J Biol Chem. 1992, vol. 267, nr. 16, p. 10931-10934.
 5. Gee M.S. et al. Selective cytokine inhibitory drugs with enhanced antiangiogenic activity control tumor growth through vascular inhibition. In: Cancer Res. 2003, vol. 63, nr. 23, p. 8073-8078.
 6. Korkolopoulou P. et al. Morphometric microvascular characteristics predict prognosis in superficial and invasive bladder cancer. In: Virchows Arch. 2001, vol. 438, nr. 6, p. 603-611.

CARACTERISTICA SUBCLASELOR CELULELOR ENDOTELIALE IMPLICATE ÎN ANGIOGENEZĂ LIMFANGIOGENEZĂ

Vitalie Mazuru, Lilian Șaptefrați, Tatiana Globa, Valeriu David, Lucian Rudico

Catedra Histologie, Citologie și Embriologie

Summary

Characteristic of endothelial cells subpopulations involved in the angiogenesis and lymphangiogenesis

Filopodia have been identified on endothelial cells from the tip of the sprouting for half a century, but the key role of these TIP cells in vessels branching have been identified in the past few years. Recent studies have discriminated in addition to TIP cells that are responsible for migration and leading the way, Stalk cells that trail behind the TIP, elongate the stalk, improve intercellular junctions and lumen formation, and the most recently discovered Phalanx cells that are the most quiescent and stabilize the branch, determining the tissue perfusion and oxygenation. Discovering of these endothelial cells subpopulations allows better understanding of angiogenesis, and its consequent clinical manipulating. In this paper, based on the most recent achievements in the field, the authors give a brief phenotypical and physiological description of each endothelial subpopulation convicted on vessels branching.

Rezumat

Filopodiile au fost identificate pe suprafața celulelor endoteliale de la frontul de înaintare cu jumătate de secol în urmă, însă rolul acestor celule în ramificarea vasculară a fost stabilit doar de câțiva ani. Studiile recente au identificat pe lângă celulele TIP, care sunt responsabile de migrare, celule Stalk, responsabile de alungirea prin proliferare tulpinei endoteliale, formarea joncțiunilor intercelulare și lumenului, și celule Falangiene, care sunt cele mai calme din punct de vedere fiziologic, stabilizează ramura formată și determină perfuzarea și oxigenarea tisulară. Descoperirea acestor subpopulații de celule endoteliale permite o mai bună înțelegere a fenomenului de angiogeneză și o mai bună manipulare clinică a ei, ulterior. În această lucrare, autorii, în baza celor mai recente rezultate din literatură, fac o succintă descriere a fiecărei subpopulații endoteliale în parte.

În ultimele decenii, angiogeneza ca și fenomen fiziopatologic este studiată foarte intens, fiind descrisă cu lux de amănunte importanța sa în diverse stări fiziologice, dar și patologice. Încă în 1971, Folkman a expus o părere, care mai apoi a devenit dogmă – progresia tumorală este angiogendependentă. De-a lungul anilor, în baza rezultatelor obținute în studii experimentale și clinice, au fost elaborate o serie întregă de preparate chimice potente de interveni la diferite verigi ale lanțului patogenetic angiogen: factor de creștere, receptor, co-receptor. În pofida acestor eforturi susținute, rezultatele clinice nu s-au dovedit a fi cele scontate. Este bine cunoscut

faptul că vasele tumorale de neoformație nu sunt niște structuri vasculare de tip terminal, ci anastomozează abundent între ele, formând o rețea densă. La baza formării unei rețele vasculare stă fenomenul de ramificare a vasului. Mecanismele ce determină și reglează această ramificare au început a fi înțelese și intens studiate pe parcursul ultimelor 7-8 ani.

Un adevărat salt în domeniu l-a constituit identificarea câtorva tipuri specializate de celule endoteliale (CE), fiecare un fenotip celular distinct, fiind importantă în formarea ramurii vasculare – baza angiogenezei. Primele, și cu siguranță cele mai importante, sunt celulele TIP – celulele „deschizătoare de cale”. Cu ajutorul filopodiilor sale, aceste celule recunosc și răspund la semnalele de ghidare din micromediul extracelular în același mod cum o face conul de creștere în timpul neurogenezei [2]. Prin urmare, nu e de mirare că receptorii responsabili de creșterea neuronală sunt implicați și în angiogeneză [2,13].

Celulele „Stalk” se întind în spatele celulelor TIP și sunt responsabile de elongarea tulpinii endoteliale. Aceste celule proliferază, formează joncțiuni intercelulare, stabilesc relații cu matricele extracelulare și formează lumenul.

Celulele „Falangă” (celulele falangiene) funcțional sunt cele calme CE. Ele tapetează vasul din moment ce noua ramură vasculară este consolidată. Aceste celule formează un monostrat celular neted, sunt aranjate în formă de falangă, sunt acoperite de pericite, sunt fixate între ele prin joncțiuni strânse, localizate pe o membrană bazală groasă. Celulele falangiene sunt implicate în optimizarea fluxului sanguin, perfuziei și oxigenării tisulare [25].

Fiecare din aceste trei tipuri de CE are o menire strict definită în ramificarea vasculară. Modul în care aceste celule acționează depinde în mod particular de organizarea citoscheletului lor. De exemplu, pentru ca o CE să migreze, e nevoie ca ea să formeze filopodii, lamelopodii și să-și polarizeze citoscheletul actinic în direcția migrării.

I. Celulele endoteliale „TIP”

În pofida faptului că prezența „apofizelor filiforme” din zona de vârf a creșterii endoteliale a vaselor era cunoscută în creier mai bine de jumătate de secol, importanța lor în alungirea și creșterea orientată a vasului (sprouting) a fost descifrată doar recent. Studiile clasice au arătat prezența in vivo a CE „fără suturi” – celule endoteliale lipsite de zonula occludens și adherens – ceea ce a servit drept bază pentru formularea teoriei conform căreia ar exista mai multe tipuri de CE (celulele trunculare cu lumen și celulele TIP fără) în componența capilarului în creștere [43]. Studiile electronoptice au depistat prezența de filopodii în zona de proliferare a capilarului în creștere [23].

La moment, TIP CE sunt descrise în numeroase modele de angiogeneză. Particularitățile lor cheie sunt reprezentate de: localizarea lor în frontul de proliferare a vasului, polarizare înalt exprimată, cât și numeroase filopodii în contact intim cu componentele matricei extracelulare, orientate spre stimulul angiogenic [11,31]. Aceste celule nu participă la formarea cavității vasului nou-format, și, cu mici excepții, nu proliferază [1,44]. Ele posedă un fenotip molecular specific, exprimând așa markeri ca VEGFR-2, VEGFR-3, PDGF-BB, Unc5B, Dll4, NRP1 [12, 21,35,37,38]. Aceste celule detectează gradientele semnalelor de navigare și integrează coduri moleculare de combinare în direcția migrării. Abilitatea lor de bază este formarea filopodiilor.

Rolul de bază al celulelor TIP este de „a naviga”, proces care obligă la o cercetare minuțioasă a semnalelor din spațiul interstițial și transformarea lor într-un proces dinamic de adeziune (în frontul de proliferare) și deadeziune (în spate), care, în final, determină migrarea celulară. Pentru a îndeplini acest obiectiv celula TIP formează permanent lamelopodii și filpodii.

Lamelopodiile structuri scurte asemănătoare cu o basma, localizate în imediata vecinătate cu membrana celulară și care conține o bogată rețea actinică foarte ramificată. Filopodiile, însă, sunt niște protruziuni membranare foarte lungi, care conțin fascicule dense de actină filamentoasă (F-actin), care la rândul său se extinde din zona lamelopodiei [14,24,29]. Ambele structuri sunt extrem de dinamice, fiind generate în câteva minute după stimulare [7]. Atât lamelopodiile, cât filopodiile sunt capabile de a cerceta ambianța extracelulară, detectând semnale de ghidare atractive sau repulsive. Un semnal atractiv va induce polimerizarea F-actinei

ce va duce la extinderea filopodiei, în timp ce semnal repulsiv va determina depolimerizarea retrogradă a ei și, implicit, retracția filopodiei [14]. Filopodiile și lamelopodiile formează puncte focale de contact între citoschelet și matricele extracelulare [7]. Aceasta permite de a trage celula spre respectivele puncte de ancorare.

Fibrele de F-actină sunt elongate la capătul pozitiv cu ajutorul proteinelor din familiile Profilin, Ena/Vasp, Formin, care determină polimerizarea G-actinei în imediata vecinătate cu membrana celulară. La capătul negativ, Cofilina depolimerizează și scurtează filamentele de actină [7]. Ramificarea F-actinei este mediată de către proteinele complexului ARP2/3 și proteinele familiei WASP. Miozina X grupează filamentele în creștere în fascicule, care sunt intersectate de Fasceină [24].

Expresia VEGF în celulele TIP

Pe lângă VEGFR-2, în celulele mai sunt exprimați și alți receptori VEGF ca VEGFR-3 și NRP1. Pe parcursul dezvoltării, VEGFR-3 este exprimat în toate tipurile de endoteliu, fiind mai apoi restricționat doar la celulele endoteliale limfactice [38]. Cu toate acestea, în endoteliul vascular activat, expresia VEGFR-3 reapare, fiind mai specifică pentru zona filopodiilor din frontul de sprouting [19,38]. Blocarea VEGFR-3 reduce numărul apofizelor celulare, a punctelor de ramificare, cât și capacitatea de proliferare a CE. VEGFR-2 induce expresia VEGFR-3 în celulele TIP, în timp ce sistemul de semnalizare Notch o inhibă în elulele Stalk [38]. Ca și în cazul VEGFR-2, celulele TIP exprimă VEGFR-3 mai intens decât celulele Stalk. VEGFR-2 și VEGFR-3 sunt capabili de a forma heterodimeri, transmițând semnale distincte față de cele transduse de corespondenții lor homodimerici [8]. Se pare că aceste forme heterodimerice sunt implicate în funcționarea celulelor TIP. VEGFR-3 mai reglează și integritatea vasculară, cu toate că nu încă cunoscut dacă acest efect este mediat prin celulele TIP sau cele Stalk [19].

NRP (Neuropilinele) funcționează ca și receptori endoteliali, fiind membre a două familii de receptori – Sema3 și VEGF [2,10]. În calitate de VEGF receptori, NRP au un rol important în dezvoltarea cardiovasculară și angiogeneza tumorală [10]. Ambele Neuropiline, NRP1 și NRP2, sunt prezente în vasele ce se dezvoltă. Utilizarea anti-NRP1, pentru a bloca selectiv VEGF și nu Sema3, a arătat că Sema3 are un efect nesemnificativ în angiogeneza controlată de axul patogenic VEGF/NRP-1 [10]. Cu toate acestea, Sema3F este un inhibitor eficient angiogenezei și progresiei tumorale, și a metastazării. Neuropilinele pot forma coreceptori cu VEGFR-1, -2 și -3, sau acționa direct prin intermediul sinectinei [9]. Studiile genetice au arătat că NRP1 și sinectina reglează ramificarea vasculară [3]. În absența NRP1, vasele sangvine din trunchiul cerebral al embrionului nu se ramifică [12]. Ramificarea și fuzionarea vasculară deficiente, sunt cauzate nu de absența filopodiilor în celulele TIP, ci de extinderea laterală defectă a lor, mecanism crucial în formarea plexurilor vasculare datorită asigurării confluării celulelor TIP. Cum NRP1 reglează activitatea filopodiilor din celulele TIP, și îndeosebi extensia lor laterală, urmează încă de a fi studiat.

Capacitatea de invazie a celulelor TIP

Sprouting-ul, fără de care angiogeneza nu poate avea loc, este un fenomen invaziv, care necesită degradarea proteolitică a matricei extracelulare. CE TIP exprimă metaloproteinaze matriceale, expresia cărora este determinată de compoziția chimică a substanței intercelulare ce urmează a fi invadată. Metaloproteinaza 14 (MMP14) reglează angiogeneza și se pare că este indispensabilă formării canalelor de invazie de către CE [6,39,44]. Există multiple date care arată că MMP14 este prezent pe versantul anterior al CE invadante, în timp ce expresia sa e inhibată gradual în celulele Stalk în timpul maturării și stabilizării vasculare ca rezultat al interacțiunilor dintre endoteliocite și pericite [44]. Rolul și necesitatea metaloproteinazelor în ramificarea vaselor poate varia. Într-adevăr, vasele sangvine adulte sunt înconjurate de o membrană bazală groasă (bogată în collagen IV și laminină), în timp ce pe parcursul angiogenezei embrionare ea este foarte subțire sau chiar absentă. Acest lucru poate explica de ce pierderea expresiei MMP14 nu diminuează dezvoltarea vasculară embrionară. Aceste date sugerează faptul că degradarea

membranei bazale nu este fenomen obligator pentru ramificarea vasculară în embriogeneză, în schimb e absolut necesară în angiogeneza postnatală.

Componentele matricei extracelulare sunt deseori utilizate de celulele TIP drept repere de navigare [30]. De exemplu, integritatea induce modificări în citoschelet, Cofilina intensifică migrarea celulară, iar în lipsa lamininei $\beta 1$ sprouting-ul este deficitar [15]. Când vasele se ramifică, CE TIP sunt expuse la alte componente ale matricei extracelulare decât cele prezente în membrana bazală; unele din aceste molecule matriceale sunt capabile de a stimula sprouting-ul [30].

II. Celulele endoteliale „Stalk”

Reprezintă a doua subclasă de celule endoteliale, care se localizează în spatele CE TIP. Scopul lor este de a alungi, prin proliferare, tulpina de endoteliocite, de a forma lumen și de a conecta această ramură nou-formată la circulație [11,31]. Spre deosebire de celulele TIP, celulele Stalk nu formează filopodii [11].

Celulele Stalk și menținerea integrității vasculare

Pentru alungirea tulpinii de CE, celulele Stalk trebuie să se dividă, să mențină contactul cu celulele TIP din față, care înaintază în permanență, și să formeze lumenul. Similar cu celulele TIP, menținerea fenotipului celulelor Stalk necesită restructurări ale citoscheletului. Cu toate acestea, mecanismele moleculare responsabile de înaintarea celulelor Stalk după cele TIP, rămân în mare parte un mister. VE-Caderina este importantă în menținerea contactelor celulă-celulă, iar absența ei duce la o migrare non-direcționată, aleatorie a celulelor a celulelor ce nu mai sunt conectate între ele [40]. Caderinele nu formează structuri fixe, rigide, ci mai degrabă sunt implicate în reorganizarea citoscheletului prin așa numita mișcare „flow-like” [17]. Când celulele epiteliale se mișcă, aglomerări caderinice se formează rapid în zona din față (de înaintare), în timp ce pe versanții dorso-laterali sunt supuși degradării. Sistemul de semnalizare Wnt Nrp1 indus, de asemenea este important în stabilizarea tulpinii și prevenirea retracției CE prin multiplicarea joncțiunilor intercelulare [28]. FGF (Factorul de Creștere al Fibroblastelor) este și el implicat în integritatea vasculară prin fortificarea punctelor de contact dintre CE [26]. Pe lângă mecanismul descris mai sus „pull”, care presupune tragerea celulelor Stalk din tulpina endotelială de către celulele TIP de la frontul de invazie, sunt date foarte recente care pledează pentru mecanismul „push”, de împingere, conform căruia celulele Stalk, care proliferază, împing celulele TIP de la spate, măbind astfel ramura vasculară care se formează. În susținerea acestei teorii este adus argumentul că în absența factorului de secreție vascular-specific EGFL7, proteină componentă a matricei extracelulare secretată de celulele Stalk, endoteliocitele nou-apărute se acumulează la baza tulpinii, determinând lărgirea ramificației fără elongarea ei [34].

Celulele Stalk și formarea lumenului

După inițierea celulelor TIP și elongarea tulpinii, ramura vasculară are nevoie de un lumen pentru a fi conectată la circulație. Majoritatea conceptelor despre formarea lumenului au fost create în baza experimentelor desfășurate in vitro, studiind comportamentul CE în gel bi- și tridimensional [6]. În aceste metode s-a arătat că lumenogeneza este dependentă de formarea și fuziunea ulterioară a vacuolelor pinocitare intracelulare, fenomen caracteristic CE din tulpină, adică celulelor Stalk. În cazul embrionilor de zebrafish, fuziunea intracelulară și intercelulară a acestor vacuole determină apariția lumenului [16]. Cu toate acestea, studiile recente au arătat că formarea lumenului la embrionii de zebrafish apare ca rezultat al aranjării CE în jurul lumenului intercelular [1].

Formarea vacuolelor depinde de interacțiunea integrinelor cu matricele extracelulare, în timp ce fuziunea lor e condiționată de rearanjarea microfilamentelor actinice și microtubulilor scheletului celular [6]. Vacuolele celulelor endoteliale sunt acumulate intracelular într-o manieră polarizată – lângă centrozom [18]. Fuzionarea ulterioară a acestor vacuole este dirijată de componentele căilor de semnalizare Rac1 și Cdc42, care se localizează lângă membrana

vacuolară [6,18]. Cascada enzimatică, pornită la formarea lumenului, mai include factori proteici din familiile WASP, PAK, proteine de polarizare și protein-kinaza C. La moment nu este clar elucidată implicarea factorilor din familia RhoA în lumenogeneză. La acțiunea directă a acestor factori lumen nu se formează, dar inhibitorul proteic al ROCK, care este un membru al acestei familiei, inhibă lumenogeneza. Mai mult ca atât, activarea Rho-A-GTP-azei endoteliale în CE cu CCM2 inactivată (Cerebral Cavernous Malformations 2), generează modificări citoscheletice cu inhibarea formării lumenului [42]. Odată ce lumenul a fost format, semnale activatorii adiționale determină CE să prolifereze, să crească, să-și mărească, sau din contra, să-și micșoreze dimensiunile, modificând astfel dimensiunile lumenului nou-format. Asemenea efecte sunt determinate de VEGF [31], Notch1 [33] și laminină [15].

III Celulele endoteliale Falangiene

Odată ce ramura vasculară este formată, celulele endoteliale devin fiziologic „calme”, doar 0,01% din ele având capacitatea de a se divide mitotic la un adult sănătos. Funcția de bază a vaselor este de a asigura țesuturile cu oxigen și nutrienți. Pentru a fi asigurată această funcție, vasul sangvin, ca și structură morfologică, trebuie să fie menținut într-o stare stabilă, în care CE – componentele structurale cheie ale unui vas – să se afle în „tăcere funcțională”. Fluxul sangvin este un factor important în menținerea acestei „tăceri”, câteva molecule, ce determină acest fenotip endotelial, au fost recent identificate cu ajutorul studiilor genetice. Într-adevăr, deleția genei endotelial-specifice PHD2 (prolyl-hydroxylase domain-2) care este un sensor pentru oxigen, duce la „normalizarea endotelială” a vaselor tumorale. În contrast cu vasele tumorale neprelucrate (wild type tumor blood vessels), unde CE sunt hiperactivate, formează multiple filopodii și contacte intercelulare de tip ocludent, CE la șoarecii PHD2 haplodeficienți erau aranjate într-un monostrat bine organizat, arătând ca falangă greacă antică, de unde au și primit denumirea de celule falangiene. Modificarea CE tumorale în CE falangiene îmbunătățește perfuzia și oxigenarea tumorii, astfel prevenind aproape complet metastazarea și determinând apariția unui comportament mai puțin agresiv [25]. Prin urmare, odată cu pierderea activității sensorului pentru oxigen (PHD2), CE ajustează forma lor pentru a îmbunătăți transportul de oxigen în cazul deficitului său.

Spre deosebire de celulele TIP, celulele falangiene formează un număr mai mic de filopodii și migrează mult mai slab la stimularea cu VEGF, în schimb prin multiplele joncțiuni celulă-celulă formează o barieră celulară strânsă. Ramificarea vasculară, bazată pe modelul TIP/Stalk, sugerează că concentrațiile înalte de VEGF determină inducția fenotipului migrator al CE TIP, în timp ce concentrațiile medii ale aceluiași factor de creștere vor condiționa inducția fenotipului proliferativ al celulelor Stalk. Modelele experimentale in vitro au arătat că lipsa stimulului VEGF duce la dezintegrarea masivă a cordoanelor endoteliale, sugerând importanța crucială a concentrațiilor mici de VEGF în supraviețuirea CE „fiziologic calme” [20]. De asemenea, este cunoscută importanța moleculei de adeziune VE-Caderin în modificarea răspunsului CE la stimularea VEGF, de la proliferare la calmare fiziologică și supraviețuire [41]. Celulele falangiene PHD2 haplodeficiente sunt mai calme datorită sintezei mărite de VE-Caderin și sFlt1 care acționează ca o capcană pentru VEGF, prevenind efectul lui de inducere asupra celulelor TIP [25].

Recent au fost descrise mai multe căi moleculare implicate în calmarea și supraviețuirea CE. Activarea fosfatidilinozitol-3-kinazei și protein kinazei B determină supraviețuirea CE ca răspuns la activarea lor cu VEGF, FGF (Fibroblast Growth Factor), Ang1 (Angiopoietina 1), IGF (Insulin-like Growth Factor) [26,22,4,27]. Mai mult ca atât, în CE calmate care exprimă VE-Caderin, Ang1 induce translocarea receptorului său – Tie2 – în contactele celulă-celulă cu formarea complexelor homotipice transasociate Tie2-Tie2, care includ VEPP (Vascular Endothelial Phosphotyrosine Phosphatase), lucru care duce la micșorarea permeabilității paracelulare [32]. Mai mult ca atât, inhibarea receptorului pentru FGF duce la degradarea integrității endoteliale cu dizolvarea joncțiunilor interendoteliale [26]. De asemenea, a fost identificat rolul de calmare a CE de către BMP-9 (bone-morphogenetic protein) și receptorul său

ALK1 [5]. Interacțiunea dintre TSP-1 și TSP-2 (trombospondină) cu receptorul lor CD36, transformă stimulii migratori și proliferativi ai factorilor de creștere în semnale de supraviețuire [36].

Concluzie

Clasificarea CE în cele trei grupe descrise mai sus, a fost făcută în baza studierii mecanismului de ramificare vasculară. În pofida faptului că clasificarea dată a fost făcută utilizând metode moderne, ea lasă un șir de întrebări neclare. De exemplu, sunt aceste tipuri de CE fenotipic distincte capabile de a se transdiferenția între ele, și dacă da, atunci care sunt determinantele moleculare ale acestei transdiferențieri reciproce? Nivelul de expresie sau statutul de activare al receptorilor membranari este relevant în clasificarea fenotipică a CE? Cum celulele Stalk mențin contactul cu cele TIP și reușesc să nu se disperseze de ele în timpul migrării? Care este fundamentul molecular al lumenogenezei? Cum se recunosc celulele TIP din două ramuri diferite între ele pentru a fuziona și a pune bazele unei rețele vasculare? Este hipoxia un factor codeterminant în diferențierea fenotipică ulterioară a CE?

Toate aceste întrebări urmează a fi elucidate prin studii ulterioare, iar cunoștințele obținute transpuse în practică.

Bibliografie

1. Blum Y, Belting HG, Ellertsdottir E, Herwig L, Luders F, Affolter M. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol.* 2008;316:312–322. 13
2. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature.* 2005;436:193–200. 2
3. Chittenden TW, Claes F, Lanahan AA, Autiero M, Palac RT, Tkachenko EV, Elfenbein A, Ruiz de Almodovar C, Dedkov E, Tomanek R, Li W, Westmore M, Singh JP, Horowitz A, Mulligan-Kehoe MJ, Moodie KL, Zhuang ZW, Carmeliet P, Simons M. Selective regulation of arterial branching morphogenesis by synectin. *Dev Cell.* 2006;10:783–795. 46
4. Conti E, Carrozza C, Capoluongo E, Volpe M, Crea F, Zuppi C, Andreotti F. Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation.* 2004;110:2260–2265. 93
5. David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige JJ, Bailly S. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res.* 2008;102:914–922. 96
6. Davis GE, Bayless KJ, Mavila A. Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *Anatom Record.* 2002;268:252–275. 33
7. Defilippi P, Olivo C, Venturino M, Dolce L, Silengo L, Tarone G. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microscopy Res Tech.* 1999;47:67–78. 27
8. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, Claesson-Welsh L. 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. 43
9. Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault JP, Neufeld G, Savi P, Herbert JM, Bono F. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood.* 2006;108:1243–1250. 45
10. Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008;11:31–39. 44
11. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161:1163–1177. 7

12. 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. 15
13. Horowitz A, Simons M. Branching morphogenesis. *Circ Res.* 2008;103: 784–795. 1
14. Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:509–563. 26
15. Jakobsson L, Domogatskaya A, Tryggvason K, Edgar D, Claesson-Welsh L. Laminin deposition is dispensable for vasculogenesis but regulates blood vessel diameter independent of flow. *Faseb J.*2008;22:1530–1539. 61
16. Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature.* 2006;442:453–456. 86
17. Kametani Y, Takeichi M. Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nat Cell Biol.* 2007;9:92–98. 76
18. Koh W, Mahan RD, Davis GE. Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *J Cell Sci.* 2008;121:989–1001. 87
19. Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, Awane M, Sakai Y, Takabayashi A, Alitalo K, Yamaoka Y, Nishikawa SI. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood.* 2000;96:546–553. 42
20. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP, Iruela-Arispe ML. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell.* 2007;130:691–703. 90
21. Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, Breant C, Claes F, De Smet F, Thomas JL, Autiero M, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M, Eichmann A. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature.* 2004;432:179–186. 17
22. Makinde T, Agrawal DK. Intra and extravascular transmembrane signaling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease. *J Cell Mol Med.* 2008;12:810–828. 92
23. Marin-Padilla M. Early vascularization of the embryonic cerebral cortex: Golgi and electron microscopic studies. *J Comp Neurol.* 1985; 241:237–249. 10
24. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:446–454. 24
25. Mazzone M, Dettori D, Leite de Oliveira R, Schmidt T, Lanahan A, Jonckx B, De Smet F, Aragonés A, Vinckier S, Loges S, Lutun A, Wyns S, Jordan B, Pisacane A, Gallez A, Lampugnani MG, Dejana E RP, Simons M, Maxwell P, Carmeliet P. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell.* 2009;136:839–851. 5
26. Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, Simons M. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest.* 2008;118:3355–3366. 77
27. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:359–371. 94
28. Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G, Gerhardt H. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell.* 2009;16:70–82. 66
29. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003;112:453–465. 25
30. Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med.* 2007;11:176–205. 58

31. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002;16:2684–2698. 11
32. Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, Nottebaum A, Vestweber D, Deutsch U, Koh GY, Olsen BR, Alitalo K. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol.* 2008;10: 527–537. 95
33. Sainson RC, Aoto J, Nakatsu MN, Holderfield M, Conn E, Koller E, Hughes CC. Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *Faseb J.* 2005;19:1027–1029. 67
34. Schmidt M, Paes K, De Maziere A, Smyczek T, Yang S, Gray A, French D, Kasman I, Klumperman J, Rice DS, Ye W. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Development (Cambridge, England).* 2007;134:2913–2923. 78
35. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature.* 2007;445:781–784. 14
36. Silverstein RL, Febbraio M. CD36-TSP-HRGP interactions in the regulation of angiogenesis. *Curr Pharmaceut design.* 2007;13:3559–3567. 98
37. Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Breant C, Duarte A, Eichmann A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:3225–3230. 18
38. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomaki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellstrom M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Yla-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature.* 2008;454:656–660. 16
39. van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.* 2008; 78:203–212. 57
40. Vitorino P, Meyer T. Modular control of endothelial sheet migration. *Genes Dev.* 2008;22:3268–3281. 51
41. Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:55–59. 91
42. Whitehead KJ, Chan AC, Navankasattusas S, Koh W, London NR, Ling J, Mayo AH, Drakos SG, Marchuk DA, Davis GE, Li DY. The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat Med.* 2009. 89
43. Wolff JR, Bar T. ‘Seamless’ endothelia in brain capillaries during development of the rat’s cerebral cortex. *Brain Res.* 1972;41:17–24. 9
44. Yana I, Sagara H, Takaki S, Takatsu K, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Taniguchi S, Aoki T, Sato H, Weiss SJ, Seiki M. Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 9):1607–1614. 12