

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Neuropiliny – budowa, funkcja, rola w powstawaniu nowotworów



Neuropilins – structure, function, role in cancerogenesis

Konrad Stępka^{1,*}, Agnieszka Wierzbowska^{1,2}

¹Klinika Hematologii – Oddział Hematologii, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Mikołaja Kopernika, Łódź, Polska

²Katedra i Klinika Hematologii Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 29.03.2015

Zaakceptowano: 28.08.2015

Dostępne online: 09.09.2015

Słowa kluczowe:

- angiogeneza
- neuropiliny
- czynniki wzrostu
- nowotwory
- naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu

Keywords:

- Angiogenesis
- Neuropilins
- Growth factors
- Neoplasms
- VEGF

ABSTRACT

Neuropilins are proteins involved in ontogenesis, immunology and cancerogenesis. Neuropilin-1 and its homologue neuropilin-2 are coreceptors that intensify response to different growth factors and other ligands. They are coreceptors for class 3 semaphorins which are involved in axon growth and for a number of proteins belonging to VEGF family. Recently it has been discovered that their activity is much broader. They interact with TGF- β 1 and its receptors, hepatocyte growth factor and its receptor, platelet derived growth factor and its receptors, fibroblasts growth factor and integrins. These ligands play a role in angiogenesis and wound healing. In immunology neuropilins are expressed mainly by dendritic cells and regulatory T lymphocytes and they apply mainly inhibitory effect. In neoplasms neuropilins are connected with a poor prognosis which is in accordance with their many interactions with ligands and receptors causing tumor progression.

© 2015 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Wprowadzenie

Neuropiliny są przezłonowymi białkami biorącymi udział w rozwoju ontogenetycznym oraz w procesach odpornościowych i nowotworowych [1–6]. Neuropilina-1 (Nrp1) i jej

homolog neuropilina-2 (Nrp2) są ko-receptorami, które wzmacniają odpowiedź na czynniki wzrostu i inne mediatory w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych. Białka te występują m.in. na komórkach śródbłonka naczyń serca, mózgu, mięśni szkieletowych, łożyska, wątroby czy kłębuszków nerkowych, a także są obecne w hepatocytach,

* Adres do korespondencji: Klinika Hematologii – Oddział Hematologii Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Mikołaja Kopernika, ul. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź, Polska. Tel.: +48426895191; fax: +48426895192.

Adres email: konrad_stepka@o2.pl (K. Stępka).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2015.08.001>

0001-5814/© 2015 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

komórkach kanalików nerkowych oraz na komórkach nowotworowych [2, 6–8]. Nrp1 (także znana jako CD304 i *blood dendritic cell antigen-4*; BDCA-4) została zidentyfikowana jako ko-receptor dla semaforiny klasy 3 (SEMA3) [9], które odpowiadają za rozwój aksonów w czasie rozwoju embrionalnego. W kolejnych badaniach wykazano, że neuropiliny są również ko-receptorami dla białek z rodziny naczyniowo śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor*; VEGF) [10, 11]. Nrp1 współdziała z VEGF-A₁₆₅ (a także z innymi białkami z rodziny VEGF) oraz jego receptorem (*vascular endothelial growth factor receptor 2*; VEGFR2), wzmacniając przekazywanie sygnału przez ten szlak i nasilając angiogenezę. Nrp2 ma inne powinowactwo do białek z rodziny VEGF i jest ko-receptorem dla obecnego na komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych receptora VEGF typu 3 (*vascular endothelial growth factor receptor 3*; VEGFR3) [11].

Neuropiliny uczestniczą w regulacji przesyłania sygnałów ścieżki Hedgehog (Hh) [12] oraz w przeżyciu i samoodnowie nowotworowych komórek macierzystych [13].

Właściwości neuropilin

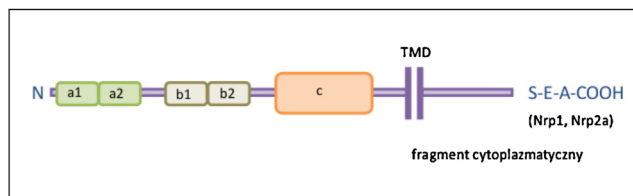
Ekspresja neuropilin w tkankach

Ekspresja Nrp1 i/lub Nrp2 została stwierdzona na różnych typach komórek, wliczając w to komórki śródbłonka, neurony, komórki wysp trzustkowych, hepatocyty, melanocyty i osteoblasty [6–8]. Niedawno udowodniono, że neuropiliny występują na komórkach śródbłonka wielu narządów (np. skóry, sutka, prostaty, przewodu pokarmowego, płuc, nerek i pęcherza) [6]. Na komórkach śródbłonka tętnic występuje głównie Nrp1, a na komórkach śródbłonka żył i naczyń limfatycznych występuje głównie Nrp2. W układzie odpornościowym Nrp1 występuje głównie na tymocytach [14], plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych (*plasmacytoid dendritic cells*; pDCs) [15] i regulatorowych limfocytach T (*regulatory T cells*; Treg) [16].

Budowa

Nrp1 i Nrp2a są błonowymi glikoproteinami typu 1 o masie cząsteczkowej 130–140 kD i sekwencji aminokwasów homologicznej w 44%, podobnej budowie domen i nakładającym się zestawem ligandów. Składają się one z części zewnątrzkomórkowej, części przezbłonowej i krótkiego fragmentu cytoplazmatycznego złożonego z ~44 aminokwasów. Fragment cytoplazmatyczny nie ma żadnego znanego motywu sygnałowego, ale w Nrp1 i Nrp2 występuje C-końcowy motyw SEA (S-E-A-COOH), który reaguje z białkiem PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) określonym jako białko reagujące z neuropiliną 1 (*neuropilin-1 interacting protein*; NIP), GIPC (*G-alpha interacting protein*, C-terminus – białko reagujące z C-końcowym fragmentem białka G α) lub synektyną [17]. Część zewnątrzkomórkowa składa się z pięciu domen a1/a2, b1/b2 i c. (Ryc. 1)

Oprócz klasycznych form neuropilin (Nrp1 i Nrp2a) istnieje też kilka izoform. Zalicza się do nich rozpuszczalne formy neuropilin (*soluble neuropilin 1*; sNrp1, *soluble neuropilin 2*; sNrp2), które pozbawione są domen cytoplazmatycznych, przezbłonowych i domeny c. Odkryto także alternatywną



Ryc. 1 – Budowa neuropilin. Rycina przedstawia schemat budowy neuropilin. Część zewnątrzkomórkowa składa się z pięciu domen, oprócz niej neuropilina składa się z domeny przezbłonowej oraz z krótkiego fragmentu cytoplazmatycznego niewykazującego aktywności kinazy tyrozynowej. Neuropilina 1 i neuropilina 2a mają C-końcowy motyw SEA (którego nie ma neuropilina 2b), wiążący się z synektyną.

Skróty: Nrp1 – neuropilina 1; Nrp2a – neuropilina 2a; TMD – domena przezbłonowa (*transmembrane domain*)
Fig. 1 – Structure of neuropilins. Figure presents structure of neuropilin. Extracellular part consists of five domains, apart from that neuropilin consists of transmembrane domain and short cytoplasmatic fragment which lacks tyrosine kinase activity. Nrp1 and Nrp2a have C-terminal SEA motif (which neuropilin 2b is lacking) which binds with synectin

błonową wersję neuropiliny 2 (Nrp2b) pozbawioną cytoplazmatycznego motywu SEA i niewiążącą synektyny. Zazwyczaj neuropiliny występują w formie homodimerów, jednakże istnieją również heterodimery Nrp1/Nrp2 [18].

Zarówno Nrp1 jak i Nrp2 wykazują powinowactwo z białkami z rodziny VEGF i SEMA3. Nrp1 wiąże głównie SEMA3A, a Nrp2 – SEMA3F. W obrębie białek rodziny VEGF obie neuropiliny wiążą się z różnymi ligandami. Wartą podkreślenia cechą neuropilin jest zdolność reagowania z ligandami i receptorami pięciu niezwiązanych ze sobą grup mediatorów. Wiele badań wskazuje, że w tych interakcjach neuropiliny są modulatorami przekazywania sygnału, ale dokładny sposób wykonywania tej funkcji jest nieznan. Prawdopodobnie wynika to ze zdolności neuropilin do wiązania rozpuszczalnych ligandów na powierzchni błony komórkowej i zwiększania ich dostępności dla interakcji z receptorem. Możliwe, że dzieje się tak w obrębie wieloskładnikowych kompleksów przekazujących sygnały, stabilizowanych przez neuropiliny.

Odmierna hipoteza sugeruje, że neuropiliny przyczyniają się do endocytozy i/lub sterowania kompleksem ligand/receptor, co w niektórych przypadkach prowadzi do nasilania przekazywania sygnału.

Znaczenie neuropilin w rozwoju ontogenetycznym

Rola neuropilin w rozwoju ontogenetycznym została zbadana na modelu zwierzęcym. Myszy pozbawione genu kodującego Nrp1 umierały po okresie 10–12,5 dnia rozwoju płodowego z powodu zaburzeń rozwojowych serca, naczyń oraz włókien nerwowych [19]. Eliminacja Nrp1 jedynie w komórkach śródbłonka naczyń związana była z zaburzeniami rozwoju serca i naczyń [20]. Obserwacja myszy transgenicznym ze zmutowaną postacią Nrp1, która wiąże

wyłącznie VEGF, natomiast nie łączy się z SEMA3, wykazała, że przekazywanie sygnału przez SEMA3 nie jest niezbędne do prawidłowej angiogenezy, ale jest kluczowe dla prawidłowego wzrostu aksonów neuronów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego [21]. Stwierdzono także zaburzenia rozwoju serca, co może sugerować, że w organogenezie serca biorą udział zarówno VEGF, jak i SEMA3. Nadmierna ekspresja Nrp1 u myszy wiąże się z licznymi zaburzeniami rozwojowymi w obrębie serca, naczyń krwionośnych i włókien nerwowych jest letalna ok. 12,5 dnia życia płodowego [22]. Obserwacje te potwierdzają istotne znaczenie Nrp1 w rozwoju serca, układu krwionośnego i nerwowego. Wykazano natomiast, że myszy pozbawione Nrp2 są zdolne do życia, ale mają zmniejszoną liczbę naczyń limfatycznych i włosowatych, a także zaburzenia w obrębie ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego [23]. W badaniach przedklinicznych udowodniono, że zarodki myszy pozbawionych zarówno Nrp1, jak i Nrp2 żyją krócej niż zarodki myszy pozbawionych tylko Nrp1 [24].

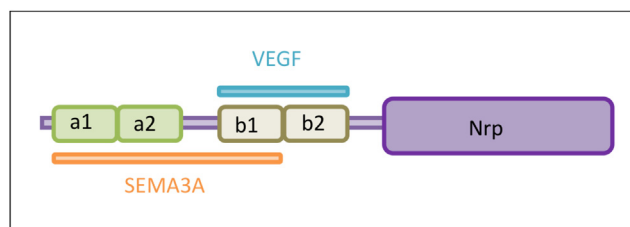
Interakcje NRP z ligandami

Białka z rodziny SEMA3 wydają się wiązać z domenami a1/a2, podczas gdy białka z rodziny VEGF wiążą domeny b1/b2. Wykazano, że przeciwciało anty-Nrp1 (anty-Nrp1^A), które blokuje domenę wiążącą SEMA3, nie blokuje wiązania z VEGF, natomiast przeciwciało blokujące domenę wiążącą VEGF (anty-Nrp1^B) nie blokuje wiązania z SEMA3 [25]. Analiza struktury krystalicznej Nrp1, zarówno samej, jak i związanej z przeciwciałami blokującymi wiązanie z VEGF lub SEMA3 wskazuje, że białka z rodziny VEGF i SEMA3 nie rywalizują bezpośrednio o wiązanie z Nrp1 [26]. Także analiza mutacji i delecji domen Nrp1 wykazała, że domeny a1/a2 wiążą białka z rodziny SEMA3, a domeny b1/b2 wiążą białka z rodziny VEGF. Jednakże delecja domeny b1 ogranicza także wiązanie białek z rodziny SEMA3 (Ryc. 2). Mutacja siedmiu aminokwasów z domeny a1 znosi możliwość wiązania białek z rodziny SEMA3 przez Nrp1, natomiast nie ogranicza zdolności wiązania VEGF, VEGFR2 czy pleksyny.

W wyniku analizy krystalicznej Nrp1 połączonego z VEGF-A wykazano, że wiązanie powstaje przy udziale C-końcowego motywu i sekwencji eksonu-7 ze strony VEGF. Do wytworzenia tego wiązania kluczowa okazała się reszta argininowa (Arg) [27].

Duże znaczenie reszty argininowej potwierdza fakt, że wariantowa forma VEGF (VEGF_{165b}) pozbawiona Arg nie wykazuje zdolności wiązania Nrp1 [28]. Wydaje się, że wszystkie ligandy wiążące się z Nrp1 mają C-końcową resztę argininową.

Wyniki nowych badań sugerują, że neuropiliny współdziałają ze znacznie większą ilością ligandów, niż początkowo zakładano (Tab. I) [29–36]. Nrp1 wiąże się z transformującym czynnikiem wzrostu β 1 (*transforming growth factor β 1*; TGF- β 1) i jego receptorami I (*transforming growth factor β receptor 1*; T β RI) i II (*transforming growth factor β receptor 2*; T β RII) [29–31], czynnikiem wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor*, HGF) i jego receptorem – cMet [31, 32], płytkopochodnym czynnikiem wzrostu (*platelet derived growth factor*; PDGF) i jego receptorami [32] oraz niektórymi członkami rodziny



Ryc. 2 – Miejsca wiązania najważniejszych ligandów do neuropilinu. Naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu łączy się z domenami b1 i b2 neuropilinu. Semaforyny klasy 3A łączą się z domenami a1, a2 i b1 neuropilinu
Skróty: VEGF – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor); Nrp – neuropilina; SEMA3A – semaforyna klasy 3A.

Fig. 2 – Neuropilin binding sites for most important ligands. VEGF binds b1 and b2 neuropilin domains. SEMA3A binds a1, a2 and b1 neuropilin domains

czynników wzrostu fibroblastów (*fibroblasts growth factor*; FGFs) – FGF 1, 2, 4, 7. Nrp-1 wchodzi także w interakcję z integrynami oraz licznymi sztucznymi i naturalnymi białkami penetrującymi komórkę (*cell-penetrating peptides*; CPPs). Znaczenie interakcji neuropiliny z ligandami innymi niż VEGF w kontekście angiogenezy nie zostało jeszcze ustalone.

Rola NRP w funkcjonowaniu układu odpornościowego

Efekt immunoregulujący

Rola Nrp1 była często wiązana z hamowaniem odpowiedzi immunologicznej. (Tab. II) W pojedynczych pracach udokumentowano, że semaforyny mają działanie immunoregulujące [37]. Właściwości takie mają najczęściej semaforyny klas 4, 6 i 7, które nie wiążą Nrp1 [40]. Jednakże interakcje pomiędzy SEMA3A i Nrp1 także mogą wywierać efekt immunologiczny [38]. SEMA3A tworzy kompleks z Nrp1 (ko-receptor) i pleksyną-A4 (receptor przekazujący sygnał), aby uruchomić działanie hamujące odpowiedź immunologiczną. U myszy pozbawionych pleksyny-A4 występuje nasilona aktywacja limfocytów T CD4+ zależna od antygeny oraz autoimmunologiczne zapalenie mózgu (*experimental autoimmune encephalitis*; EAE) [38]. Limfocyty T u myszy ze zmutowaną Nrp1, która nie potrafi wiązać SEMA3A, lub u myszy pozbawionych SEMA3A także wykazują skłonność do immunoaGRESJI. SEMA3A ma szczególne znaczenie w immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej, ponieważ guzy często produkują ten rozpuszczalny mediator, który hamuje proliferację ludzkich limfocytów T i produkcję cytokin [39]. Efekt ten jest związany z blokowaniem szlaku sygnalizacyjnego Ras/MAPK aktywowanego przez CD3/CD28.

Nrp1 może wywierać także efekt immunologiczny, działając na limfocyty Treg i/lub wzmacniając odpowiedź receptorów T β RI i T β RII na TGF- β 1. Nrp1 jest obecna na większości mysich limfocytów Treg i na subpopulacji aktywowanych ludzkich limfocytów Treg. U myszy Nrp1 zwiększa szansę na aktywację limfocyta Treg w procesie prezentacji

Tabela I – Ligandy dla neuropiliny 1 i neuropiliny 2
Table I – Neuropilin 1 and neuropilin 2 ligands

LIGAND	NRP-1	NRP-2
Białka z rodziny VEGF		
VEGF-A121	+	
VEGF-A145		+
VEGF-A165	+	+
VEGF-B167	+	
VEGF-C	+	+
VEGF-D	+	+
VEGF-E	+	
PlGF-2	+	+
VEGFR	+(R1/R2)	+(R1/R2/R3)
Białka z rodziny semaforyn		
SEMA3A	+	
SEMA3B, C, D, F	+	+
SEMA3G		+
Pleksyna-A1 do A4; D1	+	+
Białka z rodziny transformującego czynnika wzrostu		
TGF-β1 i LAP	+	+
TβRI i TβRII	+	+
Białka z rodziny czynnika wzrostu fibroblastów		
FGF-1, 2, 4, 7	+	
FGF receptor-1	+	
Inne		
Heparyna	+	
HGF i cMET	+	+
PDGF i PDGFR	+	
Integryny (α5β1, αvβ3 i inne)	+	+
Fibronektyna	+	

+ – odpowiednia neuropilina łączy się z danym ligandem,
 Skróty: Nrp1 – neuropilina 1; Nrp2 – neuropilina 2; VEGF (*vascular endothelial growth factor*) – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu; PlGF (*placental growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu; VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor dla VEGF; SEMA – semaforyna; TGF-β1 (*transforming growth factor β1*) – transformujący czynnik wzrostu β1; LAP (*latency associated protein*) – peptyd związany z latencją; TβR (*transforming growth factor β1 receptor*) – receptor dla TGF-β1; FGF (*fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; HGF (*hepatocyte growth factor*) – czynnik wzrostu hepatocytów; cMET – receptor dla HGF; PDGF (*platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu; PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) – receptor dla PDGF

antygeny przez niedojrzałą komórkę dendrytyczną (*immature dendritic cell*; iDC). Nrp1 hamuje odpowiedź immunologiczną poprzez zwiększenie aktywności limfocytów Treg. U myszy pozbawionych Nrp1 na limfocytach T CD4+ obserwowano

zwiększoną aktywność limfocytów Th17 i zmniejszoną aktywność limfocytów Treg oraz zwiększoną częstość występowania EAE [16]. Ekspresja Nrp1 na limfocytach CD4+ wiązała się z działaniem immunosupresyjnym zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Limfocyty T Nrp1+ CD4+ wykazywały działanie immunosupresyjne nawet przy braku markerów klasycznych limfocytów Treg takich jak Foxp3. Działanie supresyjne limfocytów T Nrp1+ CD4+ jest hamowane przez blokowanie TGF-β, ale nie interleukiny-10 (IL-10). Ekspresja Nrp1 na limfocytach CD4+ związana jest z funkcją supresorową limfocytów T, w której pośredniczy głównie TGF-β.

Wpływ NRP na funkcje komórek dendrytycznych

Subpopulacja komórek dendrytycznych Nrp1+ jest związana ze zwalczaniem infekcji wirusowych i jest odpowiedzialna za produkcję dużej ilości interferonu-α (IFN-α) [40]. Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne (pDCs) rozpoznają wirusowe kwasy nukleinowe poprzez receptory Toll podobne (*Toll like receptors*; TLR) i prawdopodobnie także przez inne receptory. Istnieją dowody, że pDC mogą aktywować limfocyty Treg [41]. Inkubacja pDC z przeciwciałem przeciw Nrp1 hamowała produkcję IFN-α wywołaną przez infekcję wirusową lub przez wirusowe kwasy nukleinowe. Mechanizm tego działania nie został jeszcze odkryty. Nrp1 jest także receptorem dla HTLV-1 i prawdopodobnie także dla innych wirusów i może odgrywać rolę w przenikaniu wirusów do wnętrza komórki. Znaczenie dla DC może mieć także Nrp2. Nrp2 nasila chemotaksję związaną z CCL21 i migrację dojrzałych DC [42], a udział w tym biorą kwasy sialowe przyłączone do Nrp2a i Nrp2b. Obserwacja ta może sugerować ważną biologiczną rolę Nrp2, gdyż migracja komórek dendrytycznych do wtórnych narządów limfatycznych jest kluczowym wczesnym krokiem w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej i następuje poprzez interakcję receptora CC7 z jego chemokinowymi ligandami CCL21 i CCL19.

Rola neuropilin w nowotworach

Ekspresja i rokowanie

Neuropiliny występują na powierzchni komórek wielu linii komórkowych nowotworów złośliwych. Ich nadekspresja jest często obserwowana w rakach (np. trzustki, prostaty, piersi, jelita grubego i nerki), czerniakach, glejaku wielopostaciowym,

Tabela II – Mechanizmy immunomodulujące neuropilin
Table II – Immunomodulatory effects of neuropilins

Typ neuropiliny	Mechanizm działania	Efekt immunomodulujący
Neuropilina-1	Tworzenie kompleksu Nrp1-SEMA3A-pleksyna A4	↓
Neuropilina-1	Nasilenie odpowiedzi TβRI i TβRII na TGF-β1 i zwiększenie aktywności limfocytów Treg	↓
Neuropilina-1	Nasilenie wytwarzania IFNα przez komórki dendrytyczne	↑
Neuropilina-2	Nasilenie chemotaksji i migracji dojrzałych komórek dendrytycznych	↑

↑ – nasilenie odpowiedzi immunologicznej, ↓ – osłabienie odpowiedzi immunologicznej

Skróty: Nrp1 – neuropilina 1; SEMA3A – semaforyna klasy 3A; TGF-β1 (*transforming growth factor β1*) – transformujący czynnik wzrostu β1; TβR (*transforming growth factor β1 receptor*) – receptor dla TGF-β1; Treg – limfocyty T regulatorowe; IFNα – interferon α

Tabela III – Mechanizm działania pronowotworowego neuropilin
Table III – Carcinogenic mechanisms of neuropilins

Typ neuropiliny	Mechanizm działania	Efekt działania
Neuropilina-1	Wiązanie fibronektyny i aktywacja integryny $\alpha 5\beta 1$	Nasilenie wzrostu guza
Neuropilina-2	Nasila działanie VEGF-C na VEGFR3	Pobudzenie limfangiogenezy → wzrost guza i tworzenie przerzutów
Neuropilina-2	Nieznany	Wzrost ekspresji genów antyapoptotycznych
Neuropilina-2	Nieznany, prawdopodobnie wykorzystujący β -kateninę	Wzrost oporności na cytostatyki
Neuropilina-2	Zahamowanie ekspresji IGF-1R z wykorzystaniem VEGF-A i Bmi-1	Stymulacja wzrostu guza
Neuropilina-1	Nasilenie odpowiedzi T β RI i T β RII na TGF- β 1	Ułatwienie tworzenia przerzutów i hamowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej
Neuropilina-2		

Skróty: VEGF (*vascular endothelial growth factor*) – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu; VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor dla VEGF; IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1; Bmi-1 – *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*; TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*) – transformujący czynnik wzrostu β 1; T β R (*transforming growth factor β 1 receptor*) – receptor dla TGF- β 1

białaczkach czy chłoniakach [2, 5–8]. Ekspresja neuropilin często związana jest z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym. Badania przeprowadzone w Japonii na grupie 113 pacjentek leczonych z powodu raka piersi wykazały, że ekspresja Nrp2 jest niezależnym czynnikiem związanym ze skróceniem czasu przeżycia (*overall survival*; OS) pacjentek [43]. Badania przeprowadzone na Uniwersytecie w Yale na grupie 642 pacjentek także wykazały, że OS jest krótszy u pacjentek z ekspresją Nrp1 na komórkach nowotworowych [44].

Wpływ neuropilin na rozwój guzów litych

Choć ekspresja neuropilin koreluje z gorszym rokowaniem w niektórych typach nowotworów, w większości badań nie różnicowano, czy chodzi o ekspresję białka na komórkach śródbłonka w sieci naczyń krwionośnych guza, czy na powierzchni komórek nowotworowych. Ekspresja neuropilin na komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych jest częsta, natomiast ekspresja na powierzchni komórek guza jest bardzo zmienna i zależna od nowotworu [7, 8]. Można stąd wysnuć wniosek, że neuropiliny są zaangażowane głównie w nowotworową angiogenezę. Udowodniono jednak, że istotna jest także ekspresja neuropilin na komórkach nowotworowych. W badaniu na 5 liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc (*non-small cell lung cancer*; NSCLC) udowodniono, że zwiększona ekspresja Nrp1 na komórkach nowotworowych koreluje z ich zwiększoną inwazyjnością, a w badaniu 60 pacjentów leczonych z powodu NSCLC udowodniono, że ekspresja Nrp1 na komórkach nowotworowych wiąże się ze skróceniem OS i czasu wolnego od choroby (*disease free survival*; DFS) [34]. Ponadto wyłączenie genu dla Nrp1 w komórkach raka płuc skutkuje zmniejszeniem ich zdolności do migracji, inwazyjności i zdolności tworzenia wypustek, co istotnie ograniczyło zdolność tworzenia przerzutów. W badaniach na komórkach raka jelita grubego udowodniono, że zwiększona ekspresja Nrp2 nasilała wzrost guza, podczas gdy wyłączenie genu kodującego Nrp2 zapobiegało tworzeniu guza [31] lub hamowało jego wzrost i nasilało apoptozę [45]. Podobnie wyłączenie genu kodującego Nrp1 w komórkach raka nerki powodowało ograniczenie wzrostu guza [12]. U myszy delecja Nrp1 w komórkach prawidłowego naskórka hamowała inicjację raka skóry [13].

Potencjalne mechanizmy działania neuropilin w nowotworach

Trudno określić dokładne mechanizmy działania neuropilin, ponieważ wchodzi w reakcję z wieloma cząsteczkami powiązanych z rozwojem nowotworów. Mogą one wpływać na proliferację, migrację, inwazyjność, przyleganie i zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów (Tab. III). Neuropiliny występują także na różnych komórkach zrębu, takich jak fibroblasty, komórki śródbłonka czy komórki układu odpornościowego, które mogą wchodzić w interakcję z komórkami nowotworowymi. Na przykład Nrp1 wiąże fibronektynę i aktywuje integrynę $\alpha 5\beta 1$, co wywołuje interakcję pomiędzy miofibroblastami i rozpuszczalną fibronektyną [46]. Konsekwencją jest zwiększenie sztywności macierzy komórkowej i nasilenie wzrost guza. Z powodu swojej uniwersalności neuropiliny prawdopodobnie biorą udział we wszystkich ogniwach ewolucji nowotworu, od formowania guza do tworzenia przerzutów.

Nrp2 występuje na komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych i może pełnić istotną funkcję w procesie tworzenia przerzutów. Nrp2 wchodzi w interakcję z VEGF-C i jego receptorem VEGFR3, które są głównymi regulatorami limfangiogenezy. W badaniach *in vitro* na komórkowych liniach nowotworowych (C6 oraz 66C14) wykazano, że przeciwciała przeciw Nrp2 blokuje wiązanie VEGF-C z receptorem i zaburza zależną od VEGF-C migrację komórek śródbłonka naczyń limfatycznych [47]. Efektem było zahamowanie nowotworowej limfangiogenezy i ochrona przed tworzeniem przerzutów do lokalnych węzłów chłonnych, a także do miejsc odległych. W badaniach na liniach komórkowych raka żołądka udowodniono, że Nrp2 może także nasilać ekspresję genów kodujących białka anty-apoptotyczne i odpowiadające za tworzenie przerzutów (białko S100A4). Nrp2 może także zwiększać oporność na cytostatyki, prawdopodobnie w mechanizmie wykorzystującym β -kateninę [48]. Wysoka ekspresja Nrp2 jest także wiązana ze zwiększoną agresywnością raka prostaty [49]. W tym przypadku przekazywanie sygnałów na drodze VEGF/Nrp2 hamuje ekspresję receptora dla insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (*insuline-like growth factor receptor-1*; IGF-1R) w mechanizmie wykorzystującym Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*). Zahamowanie ekspresji zarówno Nrp2 jak i IGF-1R *in vivo* prowadzi do zahamowania wzrostu guza.

Efekt pronowotworowy neuropilin często był łączony z nasileniem aktywacji VEGFR2 w odpowiedzi na VEGF. Jednakże w niektórych przypadkach wykazano, że ekspresji neuropiliny na komórkach nowotworowych nie towarzyszy ekspresja VEGFR1 czy VEGFR2, co wskazuje na niezależne od VEGF pronowotworowe działanie neuropilin. Wpływ semaforyn jest złożony, ale wydaje się, że białka rodziny SEMA3 wywierają głównie działanie przeciwnowotworowe [9]. Neuropiliny wchodzi w reakcję z różnymi czynnikami wzrostu (VEGF, TGF- β , HGF i PDGF), z których każdy może wywierać wpływ na progresję nowotworu.

TGF- β jest często produkowany przez komórki nowotworowe i odgrywa ważną i złożoną rolę w procesie nowotworzenia. We wczesnych stadiach nowotworzenia TGF- β wywiera efekt supresyjny, podczas gdy w zaawansowanych stadiach nasila tworzenie przerzutów i hamuje odporność przeciwnowotworową [50]. Zjawisko to określane mianem paradoksu TGF- β jest słabo poznane. Nrp1 i Nrp2 wiążą zarówno aktywną formę TGF- β 1, jak i LAP-TGF- β 1 (nieaktywną formę TGF- β). Co ciekawe, wolny LAP (*latency associated protein*), LAP-TGF- β 1 i TGF- β 1 rywalizują z VEGF₁₆₅ o wiązanie z Nrp1, co sugeruje, że wszystkie te białka mają to samo (lub niezbyt oddalone od siebie) miejsce wiązania.

Zarówno Nrp1, jak i Nrp2 wchodzi w reakcję z receptorami T β RI i T β RII dla TGF- β 1 i wzmacniają przekazywanie sygnału na drodze Smad2/3 [30]. W związku z tym wydaje się, że neuropiliny odgrywają kluczową rolę na powierzchni błony komórkowej, wiążąc aktywny lub latentny TGF- β 1, aktywując jego latentną formę i wzmacniając przekazywanie sygnałów przez receptory TGF- β .

Rola neuropilin w ostrych białaczkach

Badania przeprowadzone zarówno metodą immunohistochemicznego barwienia preparatów histopatologicznych, jak i za pomocą oceny ekspresji mRNA Nrp-1 na liniach komórkowych i u pacjentów leczonych z powodu ostrej białaczki szpikowej (*acute myeloid leukemia*; AML) i limfoblastycznej (*acute lymphoblastic leukemia*; ALL) wykazują zwiększoną ekspresję Nrp-1 zarówno w szpiku kostnym, jak i na komórkach nowotworowych. Zwiększona ekspresja związana jest z wysokim odsetkiem blastów w krwi obwodowej i w szpiku kostnym, natomiast nie ma związku z płcią, wiekiem, parametrami hematologicznymi w momencie rozpoznania, podtypem wg FAB (*French-American-British*) czy kariotypem [51, 52]. Nie wykazano także związku pomiędzy ekspresją Nrp-1 a gęstością drobnych naczyń (*micro vessel density*; MVD), ekspresją VEGF, VEGF-R1 i VEGF-R2 [51]. Wykazano natomiast, że wysoki poziom ekspresji Nrp-1 związany jest z krótszym czasem przeżycia w porównaniu z chorymi, u których ta ekspresja była poniżej mediany [51].

Neuropiliny jako punkt uchwytu leczenia przeciwnowotworowego

Pierwsze próby wykorzystania neuropilin w leczeniu nowotworów polegały na podawaniu różnych form rozpuszczalnej Nrp1 w celu wiązania krążącego VEGF i zmniejszenia puli białka dostępnego dla receptora VEGF. W innych

próbach leczniczych wykorzystywano białka wiążące neuropiliny lub blokujące ich łączenie z ligandami lub hamowano ich syntezę za pomocą siRNA (*small interfering RNA*) i shRNA (*small hairpin RNA*) [33-36]. W badaniach *in vitro* na liniach komórkowych zastosowanie białek wiążących Nrp1 lub jej wyłączenie przez siRNA hamowało wzrost nowotworu i zwiększało wrażliwość na chemioterapeutyki (5-fluorouracyl, paklitaksel i cisplatynę) [35]. W badaniach *in vitro* na linii komórkowej glejaka wielopostaciowego zaobserwowano zmniejszoną proliferację oraz nasiloną apoptozę po wyłączeniu genu dla Nrp1 za pomocą siRNA [53].

Domena b1 miejsca wiążącego C-końcowy motyw VEGF została bardzo dobrze zbadana za pomocą badań krystalograficznych, co umożliwiło stworzenie drobnocząsteczkowych leków, które specyficznie łączą się z tą domeną i w konsekwencji blokują wiązanie VEGF. Przypuszczalnie leki te hamują również wiązanie innych ligandów, które łączą się z tym miejscem wiążącym. Opracowano już budowę molekularną takich drobnocząsteczkowych ligandów [54]. Część cząsteczka EG00229 hamuje wiązanie VEGF-A do Nrp1, zmniejsza także żywotność komórek raka płuca z linii A549. Zwiększa także ich wrażliwość na działanie leków przeciwnowotworowych: paklitakselu i 5-fluorouracylu.

W badaniu na mysich modelach nowotworowych udowodniono, że zastosowanie połączonej terapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-VEGF i anti-Nrp1 wykazuje efekt synergistyczny skutkujący zahamowaniem wzrostu guza [25]. W tym samym badaniu oceniono efekt działania przeciwciał przeciwko miejscu wiążącemu białka z rodziny SEMA3 (anti-Nrp1^A) i białka z rodziny VEGF (anti-Nrp1^B) [25]. Przeciwciała te mają podobny efekt antyangiogeny i hamujący remodelling naczyń. Powód nie jest do końca jasny, ale może to być związane z indukowaniem przez oba te przeciwciała endocytozy Nrp1. Zablockowanie Nrp1 miało tylko nieznaczny wpływ na przekazywanie sygnałów przez VEGFR2, co sugeruje, że niektóre funkcje Nrp1 i VEGFR2 mogą być rozdzielone.

Nrp2 jako bardziej powiązana z tworzeniem przerzutów wydaje się być kluczowym celem terapeutycznym. Stworzono przeciwciała blokujące miejsca wiążące VEGF na Nrp2 (anti-Nrp2^B) i udowodniono, że hamują one rozwój sieci naczyń limfatycznych wewnątrz guza i zapobiegają tworzeniu przerzutów [47]. Ponieważ Nrp1 i Nrp2 mają podobne, ale nie jednakowe znaczenie w angiogenezie i nowotworzeniu, skutecznym rozwiązaniem powinno być zablokowanie obu tych cząsteczek. Wadą takiej strategii terapeutycznej jest wysokie ryzyko ogólnoustrojowych działań niepożądanych, ponieważ neuropiliny występują na komórkach śródbłonna w całym układzie naczyniowym (w tętnicach, żyłach i naczyniach limfatycznych), a także na innych rodzajach komórek. W badaniu klinicznym I fazy z ludzkim przeciwciałem anti-Nrp1 MNRP1685A obserwowano przejściową trombocytopenię [55]. Analiza bezpieczeństwa skojarzonego leczenia anti-Nrp1 z bewacizumabem (przeciwciałem anti-VEGF) w połączeniu z lub bez paklitakselem ujawniła dużą częstość proteinurii [56].

Zupełnie inne podejście wiąże się z odkryciem, że białka, które wiążą się z Nrp1, szybko ulegają internalizacji. Ponieważ Nrp1 często występuje na powierzchni komórek białaczkowych, może zostać celem umożliwiającym przenikanie

wielu leków, zwłaszcza wielkocząsteczkowych, do wnętrza komórki nowotworowej [33].

Wnioski

Neuropiliny są wszechstronnymi białkami reagującymi z licznymi ligandami i biorącymi udział w zarodkowym rozwoju układu sercowonaczyniowego i nerwowego, a także w angiogenezie, odpowiedzi immunologicznej i nowotworzeniu u osób dorosłych. Mechanizm działania neuropilin polega na współdziałaniu z rozpuszczalnymi ligandami, takimi jak VEGF, TGF- β , HGF i PDGF oraz ich receptorami. Neuropiliny nie są niezbędne do przekazywania sygnałów, ale na ogół wzmacniają albo modyfikują odpowiedź. Interakcje pomiędzy białkami SEMA3, neuropiliną i pleksyną często hamują proangiogenne i pronowotworowe działanie VEGF. Obecne na powierzchni komórek dendrytycznych i limfocytów T regulatorowych neuropiliny hamują odpowiedź immunologiczną, w tym również odpowiedź immunologiczną przeciw komórkom nowotworowym. W nowotworach wysoka ekspresja neuropilin często związana jest ze złym rokowaniem. Wpływają na to mediowane przez neuropiliny procesy związane z nasileniem wzrostu, ułatwieniem tworzenia przerzutów i opornością na apoptozę indukowaną przez leki cytostaticzne. Zdolność do szybkiego przemieszczania do wnętrza komórki substancji związanych z Nrp1 może być wykorzystana jako potencjalna droga do transportu leków (zwłaszcza o dużej masie cząsteczkowej, źle przenikających przez błonę komórkową) do wnętrza komórek nowotworowych. Obserwacje te wskazują, że neuropiliny mogą być potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych.

Wkład autorów/Authors' contributions

KS – zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, zebranie danych i interpretacja, zebranie piśmiennictwa, akceptacja ostatecznej wersji do opublikowania. AW – zebranie danych i interpretacja, krytyczne zrecenzowanie pod kątem istotnej zawartości intelektualnej, zebranie piśmiennictwa, akceptacja ostatecznej wersji do opublikowania.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

- [1] Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J* 2008;411:211–226.
- [2] Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res* 2006;312:584–593.
- [3] Staton CA, Kumar I, Reed MW, Brown NJ. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J Pathol* 2007;212:237–248.
- [4] Rizzolio S, Tamagnone L. Multifaceted role of neuropilins in cancer. *Curr Med Chem* 2011;18:3563–3575.
- [5] Grandclement C, Pallandre JR, Valmary Degano S, et al. Neuropilins: A new target for cancer therapy. *Cancers* 2011;3:1899–1928.
- [6] Wild JR, Staton CA, Chapple K, Corfe BM. Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int J Exp Pathol* 2012;93:81–103.
- [7] Jubb AM, Strickland LA, Liu SD, Mak J, Schmidt M, Koeppen H. Neuropilin-1 expression in cancer and development. *J Pathol* 2012;226:50–60.
- [8] Jubb AM, Sa SM, Ratti N, et al. Neuropilin-2 expression in cancer. *Histopathology* 2012;61:340–349.
- [9] Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, et al. Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2009;15:6763–6770.
- [10] Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem* 2000;275:26690–26695.
- [11] Kärpänen T, Heckman CA, Keskitalo S, et al. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J* 2006;20:1462–1472.
- [12] Cao Y, Wang L, Nandy D, et al. Neuropilin-1 upholds dedifferentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes. *Cancer Res* 2008;68:8667–8672.
- [13] Beck B, Driessens G, Goossens S, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 2011;478:399–403.
- [14] Mendes-da-Cruz DA, Linhares-Lacerda L, Smaniotto S, Dardenne M, Savino W. Semaphorins and neuropilins: new players in the neuroendocrine control of the intrathymic T-cell migration in humans. *Exp Physiol* 2012;97(11):1146–1150.
- [15] Grage-Griebenow E, Löseke S, Kauth M, Gehlhar K, Zawatzky R, Bufe A. Anti-BDCA-4 (neuropilin-1) antibody can suppress virus-induced IFN- α production of plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2007;85:383–390.
- [16] Solomon BD, Mueller C, Chae WJ, Alabanza LM, Bynoe MS. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:2040–2045.
- [17] Wang L, Dutta SK, Kojima T, Xu X, Khosravi-Far R, Ekker SC, et al. Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS One* 2007;2:e1161.
- [18] Herzog B, Pellet-Many C, Britton G, Hartzoulakis B, Zachary IC. VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2011;22:2766–2776.
- [19] Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999;126:4895–4902.
- [20] Mukoyama YS, Gerber HP, Ferrara N, Gu C, Anderson DJ. Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial

- differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development* 2005;32:941-952.
- [21] Gu C, Rodríguez ER, Reimert DV, et al. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 2003;5:45-57.
- [22] Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995;121:4309-4318.
- [23] Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002;129:4797-4806.
- [24] Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, et al. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3657-3662.
- [25] Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 2007;11:53-67.
- [26] Appleton BA, Wu P, Maloney J, et al. Structural studies of neuropilin/antibody complexes provide insights into semaphorin and VEGF binding. *EMBO J* 2007;26:4902-4912.
- [27] Parker MW, Xu P, Li X, Vander Kooi CW. Structural basis for the selective vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) binding to neuropilin-1. *J Biol Chem* 2012;287:11082-11089.
- [28] Cébe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2067-2077.
- [29] Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 2008;84:302-310.
- [30] Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* 2011;32:613-621.
- [31] Grandclement C, Pallandre JR, Valmary Degano S, et al. Neuropilin-2 expression promotes TGF-beta1-mediated epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *PLoS One* 2011;6:e20444.
- [32] Evans IM, Yamaji M, Britton G, et al. Neuropilin-1 Signaling through p130Cas Tyrosine Phosphorylation Is Essential for Growth Factor-Dependent Migration of Glioma and Endothelial Cells. *Mol Cell Biol* 2011;31:1174-1185.
- [33] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 2010;328:1031-1035.
- [34] Hong TM, Chen YL, Wu YY, et al. Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:4759-4768.
- [35] Jia H, Cheng L, Tickner M, Bagherzadeh A, Selwood D, Zachary I. Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity. *Br J Cancer* 2010;102:541-552.
- [36] Karjalainen K, Jaalouk DE, Bueso-Ramos CE, et al. Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood* 2011;117:920-927.
- [37] Vadasz Z, Attias D, Kessel A, Toubi E. Neuropilins and semaphorins - from angiogenesis to autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2010;9(12):825-829.
- [38] Yamamoto M, Suzuki K, Okuno T, et al. Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int Immunol* 2008;20:413-420.
- [39] Catalano A, Caprari P, Moretti S, Faronato M, Tamagnone L, Procopio A. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 2006;107:3321-3329.
- [40] Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011;29:163-183.
- [41] Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, Gautreau L, Heslan M, Josien R. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol* 2008;180:5862-5870.
- [42] Rey-Gallardo A, Delgado-Martín C, Gerardy-Schahn R, Rodríguez-Fernández JL, Vega MA. Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo. *Glycobiology* 2011;21:655-662.
- [43] Ghosh S, Sullivan CA, Zerkowski MP, et al. High levels of vascularendothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum Pathol* 2008;39:1835-1843.
- [44] Yasuoka H, Kodama R, Tsujimoto M, et al. Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* 2009;9:220.
- [45] Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, et al. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:109-120.
- [46] Yaqoob U, Cao S, Shergill U, et al. Neuropilin-1 Stimulates Tumor Growth by Increasing Fibronectin Fibril Assembly in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 2012;72:4047-4059.
- [47] Caunt M, Mak J, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008;13:331-342.
- [48] Samuel S, Gaur P, Fan F, et al. Neuropilin-2 mediated beta-catenin signaling and survival in human gastro-intestinal cancer cell lines. *PLoS One* 2011;6:e23208.
- [49] Goel HL, Chang C, Pursell B, et al. VEGF/Neuropilin-2 regulation of Bmi-1 and consequent repression of IGF-1R define a novel mechanism of aggressive prostate cancer. *Cancer Discov* 2012;2(10):906-921.
- [50] Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest* 2007;87:1077-1091.
- [51] Kreuter M, Woelke K, Bieker R, et al. Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20:1950-1954.
- [52] Lu L, Zhang L, Xiao Z, Lu S, Yang R, Han ZC. Neuropilin-1 in acute myeloid leukemia: expression and role in proliferation and migration of leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2008;49(2):331-338.
- [53] Li X, Tang T, Lu X, Zhou H, Huang Y. RNA interference targeting NRP-1 inhibits human glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis. *Mol Med Report* 2011;4:1261-1266.
- [54] Jarvis A, Allerston CK, Jia H, et al. Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. *J Med Chem* 2010;53:2215-2226.
- [55] Darbonne WC, Du X, Dhawan P, et al. Mechanism for platelet reduction in anti-neuropilin-1 (MNRP1685A)-treated phase I patients. *J Clin Oncol* 2011;29 (suppl; abstr e13598).
- [56] Weekes CD, LoRusso P, Ramakrishnan V, et al. A phase Ib study for MNRP1685A (anti-NRP1) administered intravenously with bevacizumab with or without paclitaxel to patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2011;29 (suppl; abstr 3050).