Journal de la Société de Biologie, 193 (2), 159-163 (1999)

Lymphangiogenèse et activité biologique du facteur de croissance vasculaire endothélial-C

par Stefano J. Mandriota & Michael S. Pepper

Centre Médical Universitaire, Département de Morphologie, 1, rue Michel Servet, 1211 Genève 4, Suisse.
email: stefano.mandriota@medecine.unige.ch

Reçu le 29 mars 1999

RÉSUMÉ

Le facteur de croissance vasculaire endothélial (vascular endothelial growth factor (VEGF))-C est un nouveau membre de la famille des VEGFs, facteurs de croissance polypeptidiques qui jouent un rôle clé dans la physiologie et la pathologie de plusieurs aspects du système cardiovasculaire, y compris la vasculogenèse, l'hématopoïèse, l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire. Les signaux des VEGFs sont transmis dans les cellules endothéliales grâce à des récepteurs de type tyrosine kinase, les VEGFRs, dont on connaît actuellement trois exemplaires, exprimés par les cellules endothéliales et les précurseurs hématopoïétiques. Comparé au premier VEGF décrit, le VEGF-A ; qui est un mitogène spécifique des cellules endothéliales et facteur angiogénique de premier ordre, le VEGF-C semble avoir un rôle principal dans le développement du système lymphatique. Ceci reflète le fait que, si VEGF-A est un ligand pour VEGFR-1 et VEGFR-2, VEGF-C exerce son activité biologique par l'intermédiaire du récepteur-3, dont l'expression, au cours du développement, va se restreindre aux vaisseaux lymphatiques et à certaines veines. Cependant, la capacité du VEGF-C de se lier aussi au VEGFR-2 et de l'activer est probablement responsable de son pouvoir d'induire une réponse angiogénique dans certains modèles, ce qui le rend intéressant du point de vue des manipulations expérimentales ou cliniques ayant pour but de bloquer ou de stimuler l'angiogenèse. Dans cet article nous discutons brièvement les connaissances actuelles sur l'activité biologique de VEGF-C, en mettant en évidence que celle-ci, comme dans le cas d'autres facteurs angiogéniques, est profondément influencée par l'activité d'autres régulateurs angiogéniques présents dans le microenvironnement des cellules endothéliales.

SUMMARY **Lymphangiogenesis and biological activity of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C**

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C is a new member of the VEGF family, a group of polypeptide growth factors which play key roles in the physiology and pathology of many aspects of the cardiovascular system, including vasculogenesis, hematopoiesis, angiogenesis and vascular permeability. VEGF signalling in endothelial cells occurs through three tyrosine kinase receptors (VEGFRs), expressed by endothelial cells and hematopoietic precursors. With respect to the first VEGF described, VEGF-A, which is an endothelial cell specific mitogen and key angiogenic factor, VEGF-C seems to play a major role in the development of the lymphatic system. This may reflect the different binding properties of VEGFs to VEGFRs, in that VEGF-A binds to VEGFR-1 and -2, whereas VEGF-C acts through VEGFR-3, whose expression becomes restricted to lymphatics and certain veins during development. However, the finding that VEGF-C also binds to and activates VEGFR-2 may explain why it induces angiogenesis under certain conditions, which makes it relevant to experimental or clinical settings in which one would wish to block or to stimulate angiogenesis. In this paper we briefly discuss current knowledge on the biological activity of VEGF-C, emphasizing that, as has already been shown for a number of other angiogenic factors, the biological effects of VEGF-C are strictly dependent on the activity of other angiogenic regulators present in the microenvironment of the responding endothelial cells.

Le développement du système cardiovasculaire chez l'embryon de mammifère débute avec la vasculogenèse, processus au cours duquel les premières structures vasculaires (comme le tube endocardique et les rudiments de l'aorte dorsale) se forment par différentiation *in situ* de précurseurs mésenchymateux (angioblastes) en cellules endothéliales. La vasculogenèse contribue également plus tard, au cours du développement, à la vascularisation de certains organes d'origine endodermique, comme le poumon ou le pancréas. Le reste de la vascularisation, au cours du développement et, plus tard, dans la vie adulte, se forme par angiogenèse, c'est-à-dire par bourgeonnement de nouveaux vaisseaux à partir de cellules endothéliales de vaisseaux dejà formés. Un troisième processus, la lymphangiogenèse, dont les étapes sont schématiquement similaires à celles de l'angiogenèse, a comme but final la formation des vaisseaux lymphatiques.

Que les vaisseaux sanguins se forment par vasculogenèse et par angiogenèse est un fait bien établi. En revanche, l'origine des premières cellules endothéliales lymphatiques au cours du développement est encore l'objet de discussion. Deux théories différentes élaborées au début du siècle ont proposé que ces cellules pourraient se former *i*) par différentiation *in situ* de précurseurs mésenchymateux, ou, alternativement, *ii*) par bourgeonnement à partir des cellules endothéliales de sacs veineux (McClure, 1921). Quelle que soit l'origine des premiers vaisseaux lymphatiques, il est important de remarquer que ces vaisseaux, une fois formés, présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles qui les rendent très différents des vaisseaux sanguins : *i*) ils contiennent de la lymphe et non pas du sang ; *ii*) ils ont une paroi extrêmement fine et perméable, qui est typiquement dépourvue de cellules périvasculaires ; *iii*) au niveau ultrastructural, les cellules endothéliales lymphatiques présentent une lame basale discontinue ou absente. Donc, la différentiation d'une cellule endothéliale lymphatique comporte l'acquisition de toute une série de caractéristiques bien précises, et on peut raisonnablement assumer que ce processus serait dû à l'activité de régulateurs différentiels et spécifiques.

Le fait que la croissance tumorale, comme celle de tout autre tissu, est dépendante de l'apport de sang fourni par une néovascularisation efficace (Folkman, 1974), a provoqué un interêt général qui a fait de l'angiogenèse un processus certainement mieux connu que la lymphangiogenèse. Les efforts conjoints de la biochimie, de la biologie moléculaire et de la génétique ont permis l'identification et la caractérisation de facteurs angiogéniques cruciaux. Le VEGF a été mis en évidence à la fin des années 1980 grâce à son activité mitogène spécifique pour les cellules endothéliales et à sa capacité d'augmenter la perméabilité vasculaire (Connolly *et al.*, 1989 ; Ferrara & Henzel, 1989). C'est un facteur angiogénique-clé dans l'angiogenèse physiologique et pathologique. *In vitro*, VEGF induit, dans différents types de cellules endothéliales, la formation de structures tubulaires ressemblant à des capillaires (angiogenèse *in vitro*), ainsi que plusieurs fonctions cellulaires impliquées dans l'angiogenèse, y compris la prolifération et la production d'enzymes protéolytiques. Chez la Souris, l'absence d'un seul allèle de VEGF provoque des défauts létaux au cours de la formation du système cardiovasculaire. D'autre part, des antagonistes spécifiques de VEGF bloquent la croissance tumorale dans plusieurs modèles animaux, ce qui s' accompagne d'une réduction dramatique de la vascularisation. L'expression de VEGF est induite principalement par hypoxie, ce qui souligne l'importance de cette molécule dans la réponse tissulaire à une vascularisation insuffisante (Carmeliet & Collen, 1999 ; Ferrara, 1999).

Au cours de ces dernières années, on assiste à un déploiement de la famille des VEGF, qui compte actuellement 5 facteurs de croissance différents (VEGF, qui a été renommé VEGF-A, ainsi que VEGF-B, -C, -D, E) (Grimmond *et al.*, 1996 ; Joukov *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1996 ; Olofsson *et al.*, 1996 ; Achen *et al.*, 1998 ; Ogawa *et al.*, 1998 ; Meyer *et al.*, 1999). Ceci a contribué de manière importante non seulement aux connaissances de l'angiogenèse, mais aussi à celles de la lymphangiogenèse. Les VEGFs transmettent leurs signaux aux cellules endothéliales *via* des récepteurs de type tyrosine-kinase, les VEGFRs. On connaît actuellement trois VEGFRs : VEGFR-1, -2 et 3, exprimés au cours du développement par les cellules endothéliales et les précurseurs hématopoïétiques (Ferrara, 1999 ; Shibuya *et al.*, 1999 ; Taipale *et al.*, 1999). Au cours du développement, l'expression des VEGFRs diminue progressivement mais persiste chez l'adulte, dans le cas de VEGFR-1 et -2, dans les vaisseaux dejà formés de plusieurs organes. L'expression de VEGFR-3, par contre, se restreint progressivement aux cellules endothéliales des veines et des lymphatiques, et, chez l'adulte, on la retrouve presque exclusivement dans les vaisseaux lymphatiques (Kaipainen *et al.*, 1995). Le fait que VEGF-A soit un ligand pour VEGFR-1 et -2, mais non pas pour VEGFR-3, a suggéré que l'activité d'un ligand encore inconnu de VEGFR-3 aurait pu constituer une base moléculaire spécifique possible pour la formation et le maintien du réseau lymphatique. Deux ligands pour VEGFR-3, nommés VEGF-C et -D, ont été découverts récemment. VEGF-C est, jusqu'à présent, le mieux caracterisé des deux (Joukov *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1996 ; Achen *et al.*, 1998). VEGF-C (et, apparemment, -D aussi) est produit sous forme d'un pré-pro-peptide qui subit un processus de protéolyse partielle donnant comme produit final un homodimère mature de ~ 40 kDa (Joukov *et al.*, 1997). Le processus de protéolyse augmente l'affinité de VEGF-C pour VEGFR-3, et, de façon remarquable, le rend également capable de se lier à VEGFR-2 et de l'activer (Joukov *et al.*, 1997). Au cours du développement, l'expression de VEGF-C se fait surtout dans le mésenchyme entourant les vaisseaux lymphatiques en voie de formation. Dans la vie adulte, l'expression de VEGF-C persiste dans le mésenchyme entourant les vaisseaux lymphatiques formés et exprimant VEGFR-3 (Kukk *et al.*, 1996 ; Eichmann *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que VEGF-C pourrait être impliqué dans la formation et le maintien de l'arbre lymphatique.

Depuis sa découverte, VEGF-C est devenu le sujet d'intenses recherches. Le fait qu'il peut activer VEGFR-

2 suggère qu'il pourrait également jouer un rôle dans l'angiogenèse. *In vitro*, VEGF-C (homodimère de ~ 40 kDa) induit la formation de structures tubulaires ressemblant à des capillaires, à partir de cellules endothéliales bovines cultivées à la surface de gels tridimensionnels de collagène. Cet effet a été montré sur des cellules endothéliales provenant de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques (Pepper *et al.*, 1998). Toutes les lignées endothéliales étudiées expriment VEGFR-1 et -2, et une seulement (BAE, d'origine aortique) exprime en plus VEGFR-3 (Pepper *et al.*, 1998 ; Pepper & Mandriota, 1998). D'une manière similaire aux résultats dejà décrits pour VEGF-A dans le même système (Pepper *et al.*, 1992), l'addition de bFGF (basic fibroblast growth factor), autre facteur angiogénique bien caractérisé, au VEGF-C a, comme résultat, un effet synergique sur la formation des tubules (Pepper *et al.*, 1998). Ceci peut être mis en corrélation, dans le cas de VEGF-A et de VEGF-C, avec le fait que bFGF augmente dans les cellules endothéliales l'expression de VEGFR-2 (Pepper & Mandriota, 1998).

Dans les cellules BAE qui, comme on l'a dejà mentionné, expriment les deux récepteurs au VEGF-C (VEGFR-2 et -3), le VEGF-C montre également un effet synergique important avec VEGF-A (Pepper *et al.*, 1998). La base moléculaire de ce phénomène reste pour l'instant inconnue.

In vivo, l'activité biologique de VEGF-C a été étudiée dans plusieurs systèmes. Dans deux modèles différents de souris transgéniques, l'un suréxprimant le cDNA entier de VEGF-C dans la couche basale de l'epiderme, l'autre dans les cellules β du pancréas endocrine, VEGF-C induit une hyperplasie de l'endothélium lymphatique, sans effet apparent sur les vaisseaux sanguins (Jeltsch *et al.*, 1997 ; Mandriota S. J., Christofori G., Jussila L., Jeltsch M., Baetens D., Montesano R., Orci L., Alitalo K., Pepper M.S., résultats non publiés). En ce qui concerne le modèle de la peau, l'effet de VEGF-C semble être dû à une augmentation de la taille, et non du nombre, de vaisseaux lymphatiques par rapport aux souris de type sauvage (Jeltsch *et al.*, 1997).

Dans d'autre modèles *in vivo*, VEGF-C (homodimère de ~ 40 kDa) peut d'autre part se comporter comme facteur angiogénique. Dans un modèle de membrane chorioallantoïdienne d'embryon de Poulet (CAM), VEGF-C se comporte d'une manière différente selon le moment du développement considéré. Dans une CAM de treize jours, lorsque les vaisseaux lymphatiques sont présents, VEGF-C induit une réponse exclusivement lymphangiogénique. Dans le même système, mais dix jours plus tôt, quand les lymphatiques ne se sont pas encore formés, VEGF-C induit une réponse angiogénique importante (Oh *et al.*, 1997 ; Cao *et al.*, 1998). D'une manière similaire, VEGF-C (homodimère de ~ 40 kDa) induit une réponse angiogénique importante dans la cornée de souris et dans des conditions d'ischémie expérimentale (Cao *et al.*, 1998 ; Witzenbichler *et al.*, 1998).

Si, d'une part, il semble raisonnable d'interpréter l'activité lymphangiogénique de VEGF-C comme le résultat de son interaction avec VEGFR-3 (et peut-être VEGFR-2, qui est aussi exprimé par l'endothélium lymphatique), il reste encore à comprendre pourquoi, malgré sa capacité à activer VEGFR-2, VEGF-C a un effet angiogénique limité à certains systèmes.

En ce qui concerne les modèles transgéniques, il faut noter que ces souris ont été générées avec le cADN entier de VEGF-C ; on ne sait pas si le produit de traduction subit réellement un clivage pour donner l'isoforme mature de ~ 40 kDa, capable d'interagir avec VEGFR-2. De toute façon, cet argument ne semble pas être une bonne raison pour expliquer l'absence d'effet angiogénique de VEGF-C dans ces systèmes, car *i*) l'isoforme de ~ 40 kDa, produite par voie recombinante, a aussi un effet spécifiquement lymphangiogénique et non angiogénique dans le CAM de 13 jours (Oh *et al.*, 1997) et *ii*) la surexpression de VEGF-A (qui active VEGFR-2) dans les cellules β du pancréas endocrine de souris ne comporte pas de phénotype vasculaire (Mandriota S. J., Huarte J., Ferrara N., Pepper M. S., résultats non publiés), ce qui suggère que, dans les transgéniques *a*), l'absence d'effet angiogénique de VEGF-C n'est pas révélatrice de l'absence de son isoforme capable d'activer VEGFR-2, et *b*) la seule présence de facteurs capables d'activer VEGFR-2 n'est pas suffisante pour assurer une réponse angiogénique.

Sur la base de plusieurs données publiées, il semble raisonnable d'attribuer la variabilité de l'activité biologique de VEGF-C à des caractéristiques spécifiques des systèmes concernés. En effet, il est de plus en plus évident que l'activité d'un facteur angiogénique est strictement dépendante d'autres régulateurs présents dans l'environnement des cellules endothéliales (Hanahan & Folkman, 1996 ; Pepper *et al.*, 1996). Une des premières évidences qui ont conduit à cette conclusion a été l'observation que VEGF-A et ses récepteurs VEGFR-1 et -2 sont normalement exprimés à des taux importants dans des tissus adultes dans lesquels il n'y a pas d'angiogenèse constitutive. En accord avec ce résultat, l'activité angiogénique *in vitro* et *in vivo* de VEGF-A est profondement influencée par d'autres régulateurs angiogéniques connus, tels que, par exemple, bFGF et TGF β-1 (Pepper *et al.*, 1992 ; 1993). L'interaction de VEGF-A avec bFGF est particulièrement intéressante car, à part le synergisme existant entre ces deux molécules et décrit auparavant, d'autres expériences ont montré que des anticorps neutralisant le bFGF bloquent complètement l'effet angiogénique *in vitro* de VEGF-A, sans d'ailleurs altérer l'expression de VEGFR-2 (Mandriota & Pepper, 1997). Ceci démontre que l'effet angiogénique *in vitro* de VEGF-A est dépendant de bFGF endogène, lui-même produit par les cellules endothéliales. Cet effet constitue une reproduction *in vitro* de ce qui est observé dans des situations physiologiques où une expression de VEGF-A et des récepteurs suffisante pour donner des effets biologiques n'a pas pour conséquence une angiogenèse constitutive. Le cas inverse semble être aussi vrai, étant donné que des anticorps neutralisants le VEGF-A bloquent l'angiogenèse induite *in vivo* par bFGF (Seghezzi *et al.*, 1998). Dans leur ensemble, ces résultats montrent que l'angiogenèse est le résultat d'une interdépendance

étroite entre les activités de régulateurs angiogéniques différents.

Dans le cas spécifique de VEGF-C, quels pourraient être les éléments qui déterminent que cette molécule se comporte ou non comme facteur angiogénique ? Comme dans le cas d'autres facteurs angiogéniques, il est fort possible que d'autres régulateurs jouent un rôle déterminant. Dans les situations d'ischémie, par exemple, il est possible que l'effet angiogénique de VEGF-C soit dû à l'environnement pro-angiogénique créé par l'hypoxie du tissu ischémique à travers le changement de profil d'expression d'autres régulateurs angiogéniques ou leurs récepteurs. Un de ces régulateurs, dont l'expression est induite par hypoxie, est notamment VEGF-A, qui pourraît augmenter l'effet angiogénique de VEGF-C *in vivo*, de manière similaire à ce qui est observé *in vitro* (Pepper *et al.*, 1998). Dans les autres situations dans lesquelles VEGF-C a un effet angiogénique (c'est-à-dire dans la cornée de souris et dans le CAM de trois jours), il est raisonnable d'assumer que le profil d'expression d'autres régulateurs angiogéniques existant dans le modèle employé permet une réponse angiogénique au VEGF-C. Du moins dans le cas de la cornée de souris, certains de ces régulateurs pourraient provenir de l'inflammation qui accompagne souvent ce type d'essais biologiques. Il est possible que certains de ces régulateurs agissent en partie en modifiant dans les cellules endothéliales l'expression de VEGFR-2.

Comme dans le cas de VEGF-A, il reste à déterminer quels sont les différents régulateurs qui influencent l'activité angiogénique de VEGF-C, et en particulier, quelle est la configuration de ces régulateurs nécessaire pour déterminer, dans chaque contexte spécifique, le fait qu'il y ait une réponse angiogénique ou non. Entre autres, il serait très intéressant de pouvoir établir quels sont les régulateurs communs et non communs qui entrent en jeu dans la formation et le maintien des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, étant donné que ces deux processus utilisent certainement d'une manière ou d'une autre, des régulateurs différents. L'étude des régulateurs lymphangiogéniques, dont VEGF-C est jusqu'à présent l'exemple le mieux connu, pourraît contribuer de manière importante à la compréhension de certains événements pathologiques comme la diffusion tumorale par voie lymphatique. Enfin, il serait certainement très intéressant de pouvoir établir si les effets lymphangiogéniques de VEGF-C sont dus exclusivement à son activité proliférative sur des cellules endothéliales lymphatiques déjà formées, ou si le VEGF-C intervient aussi dans la différentiation de ces cellules à partir de cellules primitives (e.g. angioblastes) au cours de l'embryogenèse.

Remerciements. – Nous remercions Mylène Amherdt pour son aide dans la rédaction de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

Achen M. G., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks A. F., Alitalo K. & Stacker S. A., Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, *95*, 548-553.

Carmeliet P. & Collen D., Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999, *237*, 133-158.

Cao Y., Linden P., Farnebo J., Cao R., Eriksson A., Kumar V., Qi J.-H., Claesson-Welsh L. & Alitalo K., Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, *95*, 14389-14394.

Connolly D. T., Heuvelman D. M., Nelson R., Olander J. V., Eppley B. L., Delfino J. J., Siegel N. R., Leimgruber R. M. & Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 1989, *84*, 1470-1478.

Eichmann A., Corbel C., Jaffredo T., Bréant C., Joukov V., Kumar V., Alitalo K. & Le Douarin N., Avian VEGF-C: cloning, embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR2-expressing endothelial cell precursors. *Development*, 1998, *125*, 743-752.

Ferrara N., Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999, *237*, 1-30.

Ferrara N. & Henzel W. J., Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, *161*, 851-858.

Folkman J., Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, 1974, *19*, 331-358.

Grimmond S., Lagercrantz J., Drinkwater C., Silins G., Townson S., Pollock P., Gotley D., Carson E., Rakar S., Nordenskjold M., Ward L., Hayward N. & Weber G., Cloning and characterization of a novel human gene related to vascular endothelial growth factor. *Genome Res.*, 1996, *6*, 124-131.

Hanahan D. & Folkman J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, *86*, 353-364.

Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Swartz M., Fukumura D., Jain R. K. & Alitalo K., Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 1997, *276*, 1423-1425.

Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N. & Alitalo K., A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, 1996, *15*, 290-298.

Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N. & Alitalo K., Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.*, 1997, *16*, 3898-3911.

Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen T., van Hinsberg V. M., Fang G.-H., Dumont D., Breitman M., Alitalo K., Expression of the fms-like tyrosine kinase FLT4 gene becomes restricted to endothelium of lymphatic vessels during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, *92*, 3566-3570.

Kukk E., Lymboussaki A., Taira S., Kaipainen A., Jeltsch M., Joukov V. & Alitalo K., VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*, 1996, *122*, 3829-3837.

Lee J., Gray A., Yuan J., Luoh S.-M., Avraham H. & Wood W.I., Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, *93*, 1988-1992.

Mandriota S. J. & Pepper M. S., Vascular endothelial growth factor-induced *in vitro* angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J. Cell Sci.*, 1997, *110*, 2293-2302.

McClure C. F. W.,The endothelial problem. *Anat. Rec.*, 1921, *22*, 219-237.

Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., Waltenberger J., Augustin H. G., Ziche M., Lanz C., Bittner M., Rziha H. J. & Dehio C., A novel vascular endothelial growth factor encoded by orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, 1999, *18*, 363-374.

Ogawa S., Oku A., Sawano A., Yamaguchi S., Yazaki Y. & Shibuya M., A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 31273-31282.

Oh S. J., Jeltsch M., Birkenhager R., McCarthy J. E., Weich H. A., Christ B., Alitalo K. & Wilting J., VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.*, 1997, *188*, 96-109.

Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R. F., Alitalo K. & Eriksson U., Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, *93*, 2576-2581.

Pepper M. S., Ferrara N., Orci L. & Montesano R., Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, *189*, 824-831.

Pepper M. S. & Mandriota S. J., Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.*, 1998, *241*, 414-425.

Pepper M. S., Mandriota S. J., Jeltsch M., Kumar V. & Alitalo K., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J. Cell. Physiol.*, 1998, *177*, 439-452.

Pepper M. S., Mandriota S. J., Vassalli J.-D., Orci L. & Montesano R., Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996, *213*, 31-67.

Pepper M. S., Vassalli J.-D., Orci L. & Montesano R., Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on *in vitro* angiogenesis. *Exp. Cell Res.*, 1993, *204*, 356-363.

Seghezzi G., Patel S., Ren C. J., Gualandris A., Pintucci G., Robbins E. S., Shapiro R. L., Galloway A. C., Rifkin D. B. & Mignatti P., Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. Cell Biol.*, 1998, *141*, 1659-1673.

Shibuya M., Ito N. & Claesson-Welsh L., Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999, *237*, 59-83.

Taipale J., Makinen T., Arighi E., Kukk E., Karkkainen M. & Alitalo K., Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999, *237*, 84-96.

Witzenbichler B., Asahara T., Murohara T., Silver M., Spyridopoulos I., Magner M., Principe N., Kearney M., Hu J. S. & Isner J. M., Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am. J. Pathol.*, 1998, *153*, 381-394.