

Institut "Vinča", Univerzitet u Beogradu, Laboratorija za molekularnu genetiku i radiobiologiju

ULOGA RECEPTORA ZA EPIDERMALNI FAKTOR RASTA U TROMBINOM REGULISANOJ PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆNIH ĆELIJA KRVNIH SUDOVA

ROLE OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN THROMBIN REGULATED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION

K. Smiljanić, I. Resanović, K. Savić, A. Jovanović, S. Zafirović, M. Obradović, E. R. Isenović

Sažetak

Zajednički činioc u nastanku vaskularnih oboljenja kao što su ateroskleroza, restenoza i hipertenzija je patološka proliferacija i akumulacija glatkih mišićnih ćelija krvnog suda (VSMC) u njegov unutrašnji (intima) sloj.

Trombin, ključni hormon koagulationo-aterogenetske mreže posreduje u regulisanju tonusa i propustljivosti krvnih sudova, migracije i proliferacije VSMC, privlačenja monocita i raznih proinflamatornih markera u aterosklerotske lezije i svoje efekte ostvaruje direktno kao serinska proteinaza i aktivacijom svojih receptora spregnutih sa G proteinom (GPCR). Pokazano je da trombin posreduje u proliferaciji VSMC transaktivacijom receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). Proces transaktivacije EGFR preko aktivacije trombinskih receptora, uključuje metaloproteinaze koje generišu ligande proteolitičkim cepanjem membranskih prekursora, kao što je heparin vezujući epidermalni faktor rasta (HB-EGF) koji se vezuje za EGFR i aktivira ga, što vodi proliferaciji VSMC preko nishodnih, signalnih puteva mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK).

U okviru ovog preglednog članka su prikazani i diskutovani novi literaturni podaci koji se odnose na: ulogu aktivacije EGFR u posredovanju proliferativnog efekta trombina na VSMC, razumevanje i reviziju koncepta trostruke kaskade transaktivacije EGFR stimulisane trombinom u mehanizmu proliferacije VSMC.

Ključne reči: trombin, VSMC, proliferacija, transaktivacija, EGFR, ateroskleroza.

Summary

The common factor in the development of vascular diseases, such as atherosclerosis, hypertension and restenosis, is excessive accumulation

and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) within inner (intima) layer of vessel wall.

Thrombin, a key player in athero-coagulation maze, mediates the regulation of vascular permeability and contraction, migration and proliferation of VSMC, attracting monocytes and a variety of pro-inflammatory markers in atherosclerotic lesions. Thrombin exerts its effects either directly as serine proteinases and/or via activation of its G proteins coupled receptors (GPCR). It has been shown that thrombin mediates transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) within the process of VSMC proliferation. EGFR transactivation process through the activation of thrombin protease activated receptor (PAR), includes a matrix metalloproteinase cleavage of membrane ligands precursors such as epidermal growth factor like growth factor that binds heparin (HB-EGF) that binds to the EGFR and activates it, leading to VSMC proliferation via downstream signaling pathways of mitogen activated protein kinase (MAPK).

This review article presents review of the new literature data concerning: the role of EGFR activation in mediating the proliferative effect of thrombin in VSMC and understanding of the concept of the triple cascade of EGFR transactivation stimulated by thrombin in the mechanism of VSMC proliferation.

Key words: thrombin, VSMC, proliferation, transactivation, EGFR, atherosclerosis.

Uvod

Glatke mišićne ćelije krvnih sudova (VSMC, engl. "Vascular Smooth Muscle Cell") od vitalnog su značaja za strukturu i funkcionisanje krvnih sudova. Zajednički činioci u nastanku vaskularnih oboljenja poput ateroskleroze, restenoze i hipertenzije su prekomerna proliferacija i abnormalna akumulacija VSMC [1, 2]. Kardiovaskularne bolesti danas su jedan

od vodećih uzroka smrtnosti ljudske populacije u čijoj osnovi, u najvećoj meri, dominira ateroskleroza kao patološka komponenta [3].

Trombin, ključni hormon koagulaciono-aterogenetske mreže posreduje u regulisanju: tonusa i propustljivosti krvnih sudova, migracije i proliferacije VSMC, privlačenja monocita i raznih proinflamatornih markera u aterosklerotske lezije i svoje efekte ostvaruje direktno kao serinska proteinaza i aktivacijom svojih receptora spregnutih sa G proteinom (GPCR, engl. "G Protein Coupled Receptor") [4-8]. Pokazano je da trombin posreduje u proliferaciji VSMC, fibroblasta, endotelnih ćelija, transaktivacijom receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. "Epidermal Growth Factor Receptor"), ali ne i kod astrocita. Proces transaktivacije EGFR, preko aktivacije GPCR, kao što su trombinski proteazom aktivirani receptori (PAR, engl. "Protease-Activated Receptor), uključuje metaloproteinaze (MP) koje cepaju ligande (engl. "shedding of ligands") od membranskih prekursora, kao što je prekursor faktora rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (pro-HB-EGF, engl. "pro Heparin Binding-Epidermal Growth Factor-like growth factor"). Otcepljeni faktor rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (HB-EGF, engl. "Heparin Binding Epidermal Growth Factor-like growth factor"), vezuje se za EGFR i aktivira ga [8-10]. Kao posledica njegove aktivacije, dolazi do aktivacije nishodnih signalnih puteva MAPK kinaza, što je i potvrđeno u našim ranije objavljenim istraživanjima o učešću ekstracelularnim signalom regulisane kinaze 1/2 (ERK1/2, engl. "Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2") u regulaciji proliferacije VSMC indukovanoj trombinom [7, 8].

Iz literaturnih radova može se primetiti da je još uvek nedovoljno rasvetljena uloga aktivacije kako EGFR tako i MAPK kinaza u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina. S jedne strane, naučni radovi govore u prilog kritične uloge aktivacije EGFR potrebne za aktiviranje ERK1/2 kinaze [9, 11-13], dok postoje i literaturni podaci koji ukazuju na aktivaciju ERK1/2 nezavisno od aktivacije EGFR [8, 11]. Postavlja se pitanje: da li je aktivacija EGFR receptora neophodna u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina?

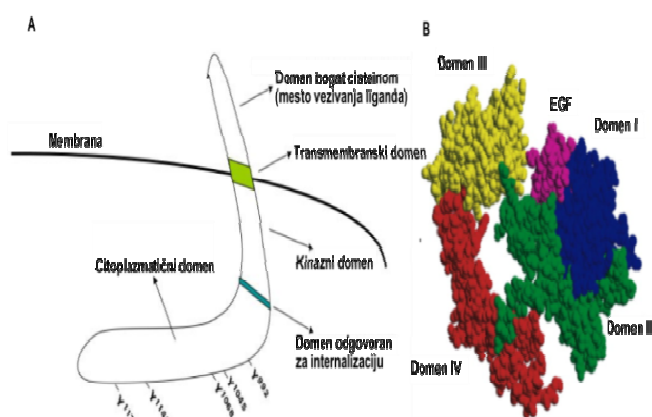
Cepanje EGFR liganada vrše adamalinske metaloproteinaze (ADAM, engl. "A Disintegrin And Metalloproteinase") i matriksne metaloproteinaze (MMP, engl. "Matrix Metalloproteinase"). Transaktivacija EGFR kao posledica dejstva nekih GPCR agonista, bila je i još uvek je aktuelna tema u istraživanju ćelijskih signalnih puteva [14]. U literaturi postoje brojni podaci o efektima angiotenzina II (ANG II), transformišućeg faktora rasta alfa (TGF- α), lizofosfatidne kiseline (LPA), fenilefrina, endotelina-1 (ET-1), kao ćelijskim aktivatorima koji dovode do cepanja EGFR liganada aktivacijom različitih ADAM

molekula i sledstvene transaktivacije EGFR i ćelijske proliferacije, ali ne i podaci o učešću ADAM u ostvarivanju efekata trombina u proliferaciji VSMC [15]. Prvi literaturni podatak, prema našim saznanjima, koji ukazuje na ADAM metaloproteinaznu aktivnost vezanu za transaktivaciju EGFR i proliferaciju bilo koje ćelijske linije uključujući i VSMC, pod delovanjem trombina, je iz naše studije (Smiljanić i sar. 2011), u okviru koje je istaknuta uloga ADAM 12 kao odgovorne molekulske makazice ("shedase") [15].

S druge strane, iako HB-EGF i matriksna metaloproteinaza 2 (MMP-2) u VSMC čine sastavni deo transaktivacione kaskade EGFR, koja vodi migraciji ovih ćelija pod uticajem trombina, još uvek nema potpunog odgovora na pitanje: da li i na koji način MMP-2 ima efekta na proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina, imajući u vidu kontroverzne literaturne podatke o uticaju MMP na proliferaciju VSMC [14-18]?

EGFR i kaskada transaktivacije EGFR

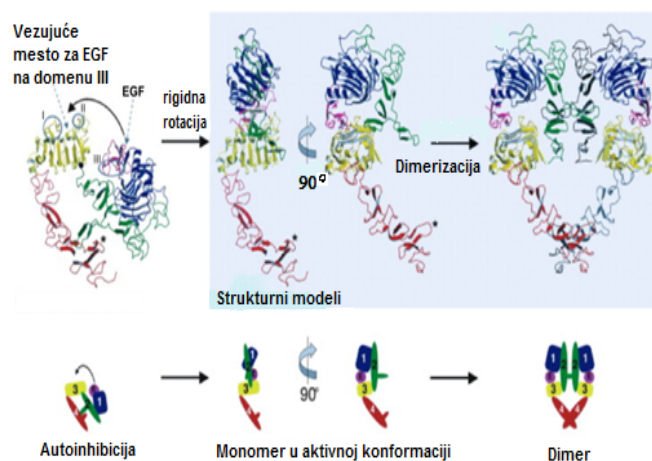
EGFR je jedan od četiri visoko srodna člana ErbB familije RTK [19]. Genski simbol, ErbB, potiče od imena viralnog onkogeno sa kojima su ovi receptori homolozi (engl. "Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene"). U fiziološkim uslovima za EGFR vezuju se sledeći članovi familije epidermalnih faktora rasta: epidermalni faktor rasta (EGF, engl. "Epidermal Growth Factor"), TGF- α , HB-EGF, amfiredulin, epiregulin, betacelulin i epigen [20, 21]. Poremećaj u mehanizmu ErbB signalizacije kod ljudi je povezan sa razvojem neurodegenerativnih bolesti, poput multiple skleroze i Alchajmerove bolesti [22], a njena povišena ekspresija dokumentovana je u više vrsta tumora [23-25].



Slika 1. (A) Šematski prikaz celovite strukture monomernog neaktivnog molekula EGFR. (B) Trodimenzionalni model ektodomena EGFR za koji je vezan EGF. Preuzeto iz doktorske disertacije: Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova. Smiljanić, 2012. [26]

EGFR je jednonlačani transmembranski glikoprotein od 170 kDa i 1186 aminokiselina, sa mnoštvom N-glikozilovanih oligosaharidnih komponenti (približno 40 kDa) (Slika 1). Sastoji se od ekstracelularnog dela koji ima četiri domena (I i III odgovorni za specifičnost receptora ka ligandu, a II i IV su bogati cisteinom) (Slika 1), transmembranskog alfa heliksa i citoplazmatskog dela koji sadrži kinazni domen [20].

Transdukcija hormonskog signala započinje kada se odgovarajući ligand tj., hormon veže za vanćelijski deo EGFR, što vodi ka dimerizaciji, odnosno rearanžmanu monomera u već postojećem dimeru [27-29]. U aktivnom dimeru domeni dve tirozinske kinaze su orijentisani da dovedu do uzajamne fosforilacije i aktivacije (Slika 2) [30].



Slika 2. Šematski prikaz vezivanja EGF za EGFR receptor. Vezivanje EGF dovodi do konformacionih promena i dimerizacije receptora što rezultuje u aktivaciji tirozin kinaznih domena EGFR dimera. Preuzeto i modifikovano iz članka: *EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization*, *J Molecular Cell* [30].

Proces koji još uvek privlači veliku pažnju naučne javnosti je upravo transaktivacija EGFR odnosno posredna aktivacija EGFR preko aktivacije GPCR. Prvi korak GPCR indukovane transaktivacije EGFR, poznate još i kao „trostruko prolazeća membranska kaskada” (engl. “triple membrane passing cascade”), je direktna uključenost sekundarnih glasnika i/ili signalnih puteva pod delovanjem sekundarnih glasnika kao što je povećanje intracelularnog nivoa Ca^{2+} [31, 32], aktivacije PKC [7, 9, 15, 33] ili proizvodnje ROS [33]. Drugi korak predstavlja uključenje ne-receptorskih tirozin kinaza, kao što su c-Src i prolinom bogate tirozin kinaze Pyk2 [8, 34, 35]. Poslednji u nizu, treći događaj, je proteolitičko cepanje EGFR liganda (engl. “ligand shedding”) od strane aktivirane MP [10, 32] koji se vezuje za EGFR i na taj način ga aktivira.

Mnoge studije su ukazale da aktivacija EGFR vodi širokom spektru bioloških odgovora, uključujući proliferaciju i inflamaciju [20, 36, 37]. EGFR su identifikovani u humanim aterosklerotskim plakovima imunocitohemijskim putem [38]. U kulturi VSMC poreklom iz aorte pacova pokazano je učešće EGFR u ćelijskoj proliferaciji i DNK sintezi [39, 40]. Centralna uloga EGFR u proliferaciji VSMC dokumentovana je u brojnim studijama, sa mnogim faktorima rasta uključujući i trombin.

Međutim, još uvek je nedovoljno rasvetljena veza aktivacije EGFR i proliferacije VSMC. Većina dosadašnjih naučnih radova ukazuje da bez aktivacije EGFR ne dolazi ni do proliferacije VSMC [9, 41]. Međutim, ima i radova koji ukazuju da je aktivacija ovog receptora važna, ali ne i neophodna za proces proliferacije VSMC [15, 42]. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razrešila ova dilema, imajući u vidu i različitu biologiju samog EGFR receptora u fenotipskim modulacijama VSMC [43]. Osim toga, potrebno je napraviti distinkciju pojmova aktivacija EGFR i transaktivacija EGFR. Prvi događaj je izolovan i direktan, ali je takođe i sadržan u okviru pojma «transaktivacija EGFR». S druge strane, transaktivacija podrazumeva sve gore navedene korake, ali i dalju divergenciju tih pomenutih signala.

Postavlja se pitanje, da li je zaista aktivacija EGFR neophodna za aktivaciju ERK1/2, kao i za proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina? Brojne studije ukazuju da bez aktivacije EGFR ne dolazi ni do aktivacije ERK1/2 kao ni do proliferacije VSMC [9, 10, 41, 44]. Bobe i sar. su 2003. godine, u uslovima smanjenog intracelularnog Ca^{2+} identifikovali EGFR nezavisni put aktivacije ERK1/2, pri čemu nisu eksperimentalno potvrdili, da li u takvim uslovima dolazi i do proliferacije VSMC. Ova potvrda bi bila relevantna i bitna kod pacijenata sa hipertenzijom koji su na terapiji sa blokatorima Ca^{2+} kanala. Zbog nedostatka naučne potvrđenosti, do sada se uglavnom prelazilo olako preko ovih, za sada, usamljenih studija [8] koje su u VSMC ukazivale na postojanje 2 puta aktivacije ERK1/2: zavisnog i nezavisnog od aktivacije EGFR. Druge istraživačke grupe su, u svojim objavljenim rezultatima, ukazivale na neophodnost EGFR aktivacije u proliferaciji VSMC, pri čemu su rezultate Bobe i sar. iz 2003. godine uglavnom objašnjavali „razlikama u eksperimentalnim uslovima” [9], ne ostavljajući mogućnost postojanja „baj-pas” signala za aktivaciju ERK1/2 u VSMC [8, 15, 45]. Moguće je da je signal koji premošćuje EGFR i univerzalnije prirode, tj., nije ograničen samo na VSMC. Takođe, „baj-pas” signal funkcioniše kako u fiziološkim uslovima, tako i u uslovima smanjenog intracelularnog Ca^{2+} , koji su omogućili da EGFR nezavisan put ERK1/2 aktivacije bude odmaskiran. To ne znači da on ne postoji u uslovima homeostaze Ca^{2+} , samo je mimikriran, obzirom na vodeću ulogu EGFR u

aktivaciji ERK1/2 i proliferaciji VSMC. Rezultati naših eksperimenata (Smiljanić i sar. 2012.), sa parcijalnom inhibicijom proliferacije VSMC, kao i aktivacije ERK1/2 stimulirane trombinom, pri potpunom farmakološkom isključenju EGFR receptora sa ireverzibilnim PD 169540 inhibitorom, ukazuju na postojanje „baj-pas” signala aktivacije ERK1/2 kaskade, kao i proliferacije VSMC pod delovanjem trombina, čiji je izvor uzvodno od EGFR [26]. Na osnovu naših rezultata, mi pretpostavljamo da aktivacija EGFR u okviru njegove transaktivacije inicirane trombinom nije neophodna za dalje provođenje proliferativnog odgovora u VSMC, što svakako predstavlja novootkriven koncept deobe VSMC pod delovanjem trombina.

Uloga HB-EGF u aktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC

HB-EGF je član familije EGF faktora rasta i sintetizira se kao transmembranski prekursor od 208 aminokiselina (pro-HB-EGF), poznat i kao receptor za toksin difterije, koji nakon proteolitičkog cepanja od strane metaloproteinaze, postaje zreo, solubilno EGFR ligand od 86 aminokiselina [10, 46]. Od njegovog pronalaska 1991. godine, smatran je važnim činiocem u nastanku ateroskleroze, hipertrofije miokarda, zarašćivanju rana o čemu svedoče brojne studije [47-49]. HB-EGF je eksprimiran u VSMC, makrofazima, T limfocitima i endotelnim ćelijama, a pokazao se i kao faktor proliferacije glatkih mišićnih ćelija i fibroblasta [46, 50-52].

Pod dejstvom heparina blokira se HB-EGF zavisna transaktivacija EGFR i sledstvena migracija VSMC pacova i babuna pod delovanjem trombina [12]. HB-EGF je, takođe, aktiviran (otcepljen) kao odgovor na aktivaciju PKC sa forbol estrima (npr., TPA) [53]. Smatra se da je PKC δ kao enzim, odgovoran za stimulaciju HB-EGF cepanja, izazvan TPA aktivacijom [54].

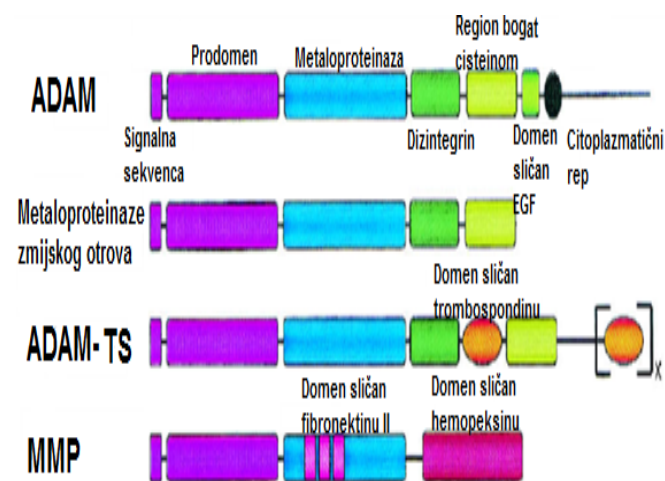
Dominantni ligand, detektovan u kulturi VSMC kao ligand aktivacije EGFR i proliferacije VSMC stimulacijom sa GPCR agonistima, jeste HB-EGF [10, 44]. Brojni literaturni podaci govore u prilog uloge HB-EGF u proliferaciji VSMC, aktivacijom EGFR sa raznim GPCR agonistima uključujući trombin, ANG II, ET-1, ATP, itd. [20, 41, 49, 55]. HB-EGF-indukovana proliferacija uključuje aktivnost ERK1/2 kinaze i PI3/Akt kinaze, ali ne i p38 kinaze [41]. Postoje radovi o učešću HB-EGF u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina [9, 12], ali se do skora nije znalo koje su MP uljučene u proteolitičko cepanje HB-EGF [15, 17]. Naši najnoviji eksperimentalni rezultati potvrđuju ulogu endogeno nastajućeg HB-EGF, koji pod delovanjem trombina, biva oslobođen proteolitičkim cepanjem od strane metaloproteinaza ADAM 12 i MMP-2 i aktivira EGFR receptor u primarnoj kulturi VSMC pacova [26].

Njegova blokada sa anti-HB-EGF neutrališućim antitelom, dovodi do potpune inhibicije aktivacije EGFR i delimičnih inhibicija aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC stimuliranih trombinom [26].

Uloga MMP u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC

MMP i ADAM pripadaju „metzincinskoj” grupi superfamilije cink zavisnih metaloproteinaza koju čini pet grupa podeljenih na osnovu primarne strukture katalitičkog mesta [56]. „Metzincinska” grupa kojoj pripadaju MMP i ADAM, sadrži još dve podgrupe MP: seralizinke i astacinske MP [57].

MMP su poznate i kao kolagenaze, uglavnom su solubilne i nalaze se u blizini ili na površini ćelija, mada postoje i transmembranske forme MMP (Slika 3). Ovi enzimi su odgovorni za degradaciju i remodeliranje ekstracelularnog matriksa (ECM), igraju važnu ulogu u razviću, zarastanju rana i nastanku oboljenja, kao što su ateroskleroza, artritis i kancer [18, 58].



Slika 3. Topograski prikaz domenskih struktura ADAM i MMP. Prikazana MMP odgovara potklasi želatinaza; druge MMP potklase nemaju hemopeksinu sličnu sekvencu i/ili fibronektinu II sličnu sekvencu. ADAM sa trombospondinu sličnim domenima (ADAM-TS) sadrži i varijabilni broj domena sličnih trombospondinu. Preuzeto i modifikovano iz članka: The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, J Genes Dev [59].

VSMC proizvode čitav spektar solubilnih i membranskih MMP (MMP-1,-2,-3,9,11,13, i membranska MT1-MMP), neke konstitutivno, a neke kao odgovor na istezanje, povredu ili delovanje faktora rasta [18, 60]. Analiza humanih aterosklerotskih lezija i naprednih plakova pokazala je visoku ekspresiju MMP, posebno želatinaza MMP-2 i MMP-9, prevashodno od strane VSMC [61, 62].

MMP regulišu migraciju, proliferaciju i smrt VSMC degradacijom komponenti ECM i drugih

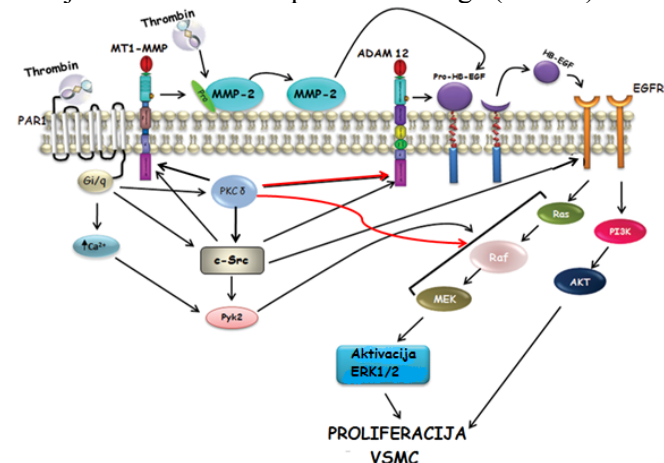
supstrata [18]. One su odgovorne za promenu (engl. "switch") fenotipa VSMC iz tihog, mirnog u migratorni [63]. Jasno je da MMP posreduju u migraciji VSMC u in vivo i in vitro uslovima, dok je uloga MMP u proliferaciji VSMC još uvek nedovoljno razjašnjena [18]. Inhibicija MMP blokirala je proliferaciju glatkih mišićnih ćelija traheja u odgovoru na serum, trombin i PDGF [64], proliferaciju VSMC iz komadića tkiva aorte (tzv. eksplanti aorte) [65], VSMC proliferaciju in vivo [66, 67], MMP-2-posredovanu VSMC migraciju nakon kateterizacije balonom [65, 68, 69] i nastanak neointimalnog zadebljanja [68]. Većina radova pokazala je inhibiciju proliferacije VSMC sa sintetičkim MMP inhibitorima u in vitro uslovima [70-72], ali neki i nisu [67].

Naši eksperimentalni rezultati (Smiljanić i sar 2011, 2012) ukazuju da trombin dovodi do proliferacije primarnih kultura VSMC, dvojakim mehanizmom: aktivacijom svojih PAR receptora (intaćelijski impuls signala) i direktnim proteolitičkim cepanjem molekula pro-MMP-2 izlučenog na površinu ćelijske membrane (spoljni, vanćelijski impuls signala) [26]. Ovim se objašnjava učešće MMP-2 kako u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC preko aktivacije ERK1/2 kinaze, tako i učešće MMP-2 u proliferativnom procesu preko drugih permisivnih interakcija vezanih za remodelovanje ekstracelularnog matriksa. Dalja istraživanja u ovom pravcu su potrebna kako bi se utvrdilo eventualno učešće drugih matriksnih metaloproteinaza (kolagenaza) u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC. Nova saznanja, u ovom smislu, svakako bi doprinela odgovoru na pitanje, koja klasa metaloproteinaza ima vodeću ulogu, u odsecanju membranskih prekursora faktora rasta i sledstvenoj transaktivaciji EGFR.

Interakcija trombina sa heparan-sulfat proteoglikanima vodi takvim alosternim promenama katalitičkog mesta, koje menjaju njegovu specifičnost ka supstratu čineći ga potentnim enzimom degradacije vanćelijskih komponenata [16]. Posebno se naglašava njena sposobnost aktivacije pro-MMP-2, nezavisne od aktivacije preko MT1-MMP [16]. S druge strane, u VSMC, MMP-2 može biti aktivirana i od strane MT1-MMP [18], koju aktiviraju c-Src u endotelnim i tumorskim ćelijama [73]. Svi rezultati, uključujući i naša istraživanja [15, 26], omogućili su nam da elaboriramo i doradimo signalizacionu šemu ekstra- i intracelularnih događaja kaskade transaktivacije EGFR, kao i nizvodnih signala u proliferaciji VSMC stimulisanoj trombinom (Slika 4).

Naš predloženi model je sledeći: postojanje spoljno-membranskog delovanja trombina koji vodi aktivaciji pro-MMP-2, nezavisnoj od MT1-MMP [16] (Slika 4) i intracelularnog delovanja preko PAR-1 receptora, sa c-Src i PKC δ posredovanom fosforilacijom i aktivacijom MT1-MMP koja, takođe, doprinosi daljoj aktivaciji pro-MMP-2 [74]. Aktivirani

MMP-2 cepa pro-HB-EGF; oslobođeni HB-EGF vezuje se za EGFR receptor i aktivira ga (Slika 4).



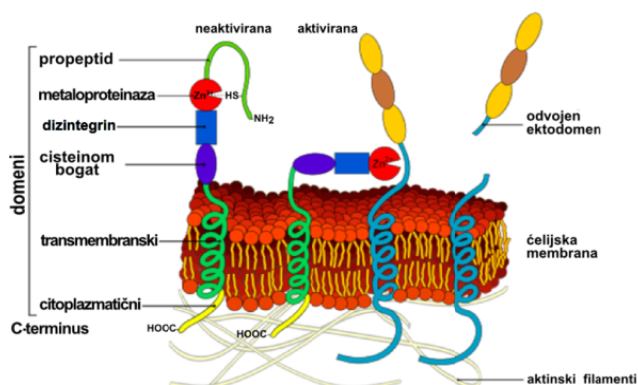
Slika 4. Prikaz signalnih puteva uključenih u efekte trombina na proliferaciju VSMC. Legenda: PAR 1: proteolitički aktiviran receptor 1; Gi/q: subjedinica i i q receptora spregnutog sa proteinom G; EGFR: receptor za epidermalni faktor rasta; pro-HB-EGF: transmembranski prekursor faktora rasta sličnog epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin; HB-EGF: faktor rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin; MMP-2: matriksna metaloproteinaza-2; MT1-MMP: transmembranska matriksna metaloproteinaza 1; ADAM 12: adamalizinska metaloproteinaza 12; Ca²⁺: kalcijum; PKC δ : protein kinaza C delta; Pyk2: ne-receptorska tirozin kinaza, bogata prolinom i zavisna od kalcijuma; c-Src: konstitutivna-Src tirozinska kinaza; PI3-K: fosfatidilinozitol-3 -kinaza; AKT: protein kinaza B; Ras: mali GTP-vezujući protein (mala GTP-aza); Raf-Raf specifična serin/treonin protein kinaza; MEK: mitogenom aktivirana kinaza koja reguliše ERK1/2 kinazu; ERK1/2: ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2. Preuzeto i modifikovano iz doktorske disertacije: Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova. Smiljanić, 2012. [26].

c-Src tirozin kinaza ima važno mesto u prenosu signala od PAR-1 receptora aktiviranog trombinom do transaktivacije EGFR u nekoliko vrsta ćelija, uključujući i VSMC [8, 75]. Kao što se može videti sa Slike 4. c-Src fosforiliše citoplazmatski deo MT1-MMP, koji potom biva aktiviran i proteolitički cepa pro-MMP-2 [76, 77]. Obzirom da c-Src nije membranski solubilna i deluje unutar ćelije, ona ne može direktno da fosforiliše MMP-2 i aktivira ga, kao što su to u svom modelu predložili Huang i sar. (2009), već to radi fosforilisani MT1-MMP (Slika 4). MT1-MMP je fiziološki aktivator pro-MMP-2 [78]. Osim toga, c-Src i direktno transaktivira EGFR receptor na Tyr845 [75, 79]. Luttrell i sar. (1997) pokazali su da G $\beta\gamma$ subjedinica receptora spregnutog sa Gi proteinom

aktivira c-Src koja potom dovodi do fosforilacije EGFR receptora [34].

Uloga ADAM u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC

ADAM su transmembranske metaloproteinaze koje pripadaju adamalizinskoj grupi i razlikuju se od MMP po tome što imaju vanćelijski deo sa dizintegrinskim domenom i citoplazmatski domen koji može da stupa u interakciju sa unutarćelijskim proteinima (Slika 5.). Adamalizinaska grupa takođe sadrži i klasu III metaloproteinaza zmijskog otrova i podgrupu ADAM-TS, koja se od ADAM familije razlikuje po tome što sadrži trombospondinu slične domene [59] (Slike 4 i 5).



Slika 5. Šematski prikaz strukture ADAM molekula. Preuzeto i modifikovano sa sajta: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding_01.svg [80].

ADAM su uključene u važne procese kao što su: proteoliza membranskih prekursora faktora rasta i citokina, degradacija ECM i odsecanje drugih membranskih proteina uključujući i obradu priona [81]. Pored ADAM i neke MMP mogu otcepiti membranske proteine i proizvoditi ligande za aktivaciju EGFR [59]. ADAM, kao i MMP, osetljive su na endogene, tkivne inhibitore metaloproteinaza (TIMP, engl. "Tissue Inhibitor of Metaloproteinases") [59].

Do sada je opisano 35 ADAM molekula iz raznih vrsta. Kod čoveka opisano je 19 od kojih su ADAM-9, -10, -12, -15, -17 i -19 uključene u transaktivaciju EGFR u VSMC stimulacijom ograničenog broja GPCR agonista [14].

Malo je literaturnih podataka o ulozi članova ADAM familije u proliferaciji VSMC. U in vitro uslovima pokazano je da ADAM-17 transaktivira EGFR i dovodi do proliferacije VSMC u kulturi [55]. Takođe, i u in vivo uslovima, ADAM 17 dovodi do aktivacije EGFR i subsekventne neointimalne hiperplazije nakon povrede krvnog suda delovanjem ANG II [82].

ADAM 12 učestvuje u proliferaciji hondrocita proteolitičkim cepanjem proteina 5 koji vezuje insulinu

sličan faktor rasta (IGFBP5) u osteoartritičnoj hrskavici [83]. Visoko pojačana selektivna ekspresija ADAM 12 u ćelijama glioblastoma povezuje se sa ćelijskom proliferacijom i proteolitičkim cepanjem HB-EGF [84]. Asakura i sar. (2002) sugerisali su da je ADAM-12 učesnik HB-EGF otcepljivanja (engl. "shedding") i hipertrofije miokarda pod delovanjem fenilefrina, ANG II i ET-1 [15]. Međutim, do skora nije bilo nijednog objavljenog rada koji se odnosi na ulogu ADAM 12 u proliferaciji VSMC. Na identitet i učešće ADAM molekula u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC, odsecanjem HB-EGF, pod delovanjem trombina, ukazala je naša grupa [15].

Naša pretpostavka je da ADAM 12 proteolitički cepa HB-EGF, što sledstveno aktivira EGFR receptor [15]. Za aktivaciju ADAM 12, odgovorna je PKC δ i c-Src, koje direktno interaguju sa citoplazmatskim delom ADAM 12, kao što su pokazali [85] za ADAM 9 i PKC δ i/ili direktnom interakcijom sa c-Src [74, 86] (Slika 4). Ova interakcija uključuje region bogat prolinom u citoplazmatskom delu ADAM 12 i SH3 domen Src kinaze [87]. Naš predloženi model zahteva dalja istraživanja kako bi se priroda ove interakcije u VSMC i ekperimentalno potvrdila.

Zaključak

Nishodni signali u trombinom stimulisanoj proliferaciji preko ERK1/2 i PI3K/Akt puteva zavisi su od signala transaktivacione kaskade EGFR, s tim da sama aktivacija EGFR nije neophodna za dalje provođenje signala (aktivaciju ERK1/2 i proliferaciju VSMC), što je i jedan od bitnih zaključaka naših istraživanja. Izolovana aktivacija EGFR, u okviru njegove transaktivacione kaskade pod delovanjem trombina, nije neophodna za dalje provođenje signala aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC. To govori u prilog postojanju EGFR-zavisnih puteva aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC, kao i EGFR-nezavisnih puteva aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC stimulisanih trombinom. Za „baj pas” signala od transaktivacione kaskade EGFR, pa do aktivacije ERK1/2, u našem modelu predlažemo PKC δ , koja direktno aktivira MAPK kaskadu, ili preko mehanizma koji uključuje β -arestine. Inhibicija svih izoformi PKC vodi znatnom smanjenju aktivnosti ERK1/2 posredovanim β 1-arestin-protein G receptorskim kompleksima (Slika 4). U zaključku, ADAM 12, MMP-2 i PKC δ uključeni su u trombinom stimulisanoj proliferaciji VSMC. Saznanje o učešću nekog od ADAM molekula u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova pod delovanjem trombina od izuzetne je važnosti za bolje razumevanje uloge trombina u kardiovaskularnoj biologiji i medicini. Pošto je za ADAM 12 potvrđeno da ima ulogu medijatora nastanka hipertrofije VSMC, on, zajedno sa MMP-2 može biti prepoznat kao ključna „meta” u novim terapijskim intervencijama, kojima bi se smanjilo

ireverzibilno oštećenje tkiva povezano sa aterosklerozom i hipertenzijom. Regulisana sinteza PKC δ , MMP-2 i ADAM 12 in vivo, mogla bi u

budućoj terapijskoj intervenciji, doprineti smanjenju patološke proliferacije VSMC.

Literatura

1. Beckman, J.A., Creager, M.A., and Libby, P., Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 2002. 287(19): p. 2570-81.
2. Mnjoyan, Z.H., Doan, D., Brandon, J.L., Felix, K., Sitter, C.L., Rege, A.A., Brock, T.A., and Fujise, K., The critical role of the intrinsic VSMC proliferation and death programs in injury-induced neointimal hyperplasia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(5): p. H2276-84.
3. Hozawa, A., Folsom, A.R., Sharrett, A.R., and Chambless, L.E., Absolute and attributable risks of cardiovascular disease incidence in relation to optimal and borderline risk factors: comparison of African American with white subjects--Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Intern Med*, 2007. 167(6): p. 573-9.
4. Borissoff, J.I., Spronk, H.M., Heeneman, S., and ten Cate, H., Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*, 2009. 82(3): p. 392-403.
5. Fager, G., Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 645-50.
6. Gutkind, J.S., Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, 1998. 17(11 Reviews): p. 1331-42.
7. Isenovic, E.R., Kedees, M.H., Haidara, M.A., Trpkovic, A., Mikhailidis, D.P., and Marche, P., Involvement of ERK1/2 kinase in insulin-and thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Angiology*, 2010. 61(4): p. 357-64.
8. Bobe, R., Yin, X., Roussanne, M.C., Stepien, O., Polidano, E., Faverdin, C., and Marche, P., Evidence for ERK1/2 activation by thrombin that is independent of EGFR transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(2): p. H745-54.
9. Hsieh, H.L., Tung, W.H., Wu, C.Y., Wang, H.H., Lin, C.C., Wang, T.S., and Yang, C.M., Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(10): p. 1594-601.
10. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A., EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 1999. 402(6764): p. 884-8.
11. Yin, X., Polidano, E., Faverdin, C., and Marche, P., Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J Hypertens*, 2005. 23(2): p. 337-50.
12. Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A., and Clowes, A.W., Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res*, 2000. 87(2): p. 92-8.
13. Hsieh, H.L., Sun, C.C., Wang, T.S., and Yang, C.M., PKC-delta/c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1783(9): p. 1563-75.
14. Ohtsu, H., Dempsey, P.J., and Eguchi, S., ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. 291(1): p. C1-10.
15. Smiljanic, K., Dobutovic, B., Obradovic, M., Nikolic, D., Marche, P., and Isenovic, E.R., Involvement of the ADAM 12 in thrombin-induced rat's VSMCs proliferation. *Curr Med Chem*, 2011. 18(22): p. 3382-6.
16. Koo, B.H., Han, J.H., Yeom, Y.I., and Kim, D.S., Thrombin-dependent MMP-2 activity is regulated by heparan sulfate. *J Biol Chem*, 2010. 285(53): p. 41270-9.
17. Huang, Y.L., Shi, G.Y., Lee, H., Jiang, M.J., Huang, B.M., Wu, H.L., and Yang, H.Y., Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2009. 21(6): p. 954-68.
18. Newby, A.C., Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res*, 2006. 69(3): p. 614-24.
19. Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X., Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 127-37.
20. Dreux, A.C., Lamb, D.J., Modjtahedi, H., and Ferns, G.A., The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2006. 186(1): p. 38-53.

21. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E., The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 2000. 19(13): p. 3159-67.
22. Bublil, E.M. and Yarden, Y., The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007. 19(2): p. 124-34.
23. Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., and Schlessinger, J., Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*, 1985. 313(5998): p. 144-7.
24. Kohler, M., Janz, I., Wintzer, H.O., Wagner, E., and Bauknecht, T., The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Res*, 1989. 9(6): p. 1537-47.
25. Yoshida, K., Tosaka, A., Takeuchi, S., and Kobayashi, N., Epidermal growth factor receptor content in human renal cell carcinomas. *Cancer*, 1994. 73(7): p. 1913-8.
26. Smiljanic, K., Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih misicnih celija aorte pacova., in *Bioloski fakultet. Doktorska disertacija*, 2012, Univerzitet u Beogradu: Beograd.
27. Jiang, G. and Hunter, T., Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol*, 1999. 9(15): p. R568-71.
28. Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M., Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*, 2000. 6(3): p. 743-50.
29. Adak, S., Yang, K.S., Macdonald-Obermann, J., and Pike, L.J., The membrane-proximal intracellular domain of the epidermal growth factor receptor underlies negative cooperativity in ligand binding. *J Biol Chem*, 2011. 286(52): p. 45146-55.
30. Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.-S., Leahy, D.J., and Lemmon, M.A., EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell*, 2003. 11(2): p. 507-17.
31. Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K., and Ullrich, A., Critical role of calcium- dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J Biol Chem*, 1997. 272(40): p. 24767-70.
32. Eguchi, S., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Motley, E.D., and Inagami, T., Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem*, 2001. 276(11): p. 7957-62.
33. Frank, G.D., Mifune, M., Inagami, T., Ohba, M., Sasaki, T., Higashiyama, S., Dempsey, P.J., and Eguchi, S., Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(5): p. 1581-9.
34. Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., and Lefkowitz, R.J., Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*, 1997. 272(7): p. 4637-44.
35. Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H., and Schlessinger, J., Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J Biol Chem*, 2001. 276(23): p. 20130-5.
36. Wahl, M.I. and Carpenter, G., Role of growth factors and their receptors in the control of normal cell proliferation and cancer. *Clin Physiol Biochem*, 1987. 5(3-4): p. 130-9.
37. Woodworth, C.D., Michael, E., Marker, D., Allen, S., Smith, L., and Nees, M., Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulate inflammation, apoptosis, and cell attachment. *Mol Cancer Ther*, 2005. 4(4): p. 650-8.
38. Tamura, R., Miyagawa, J., Nishida, M., Kihara, S., Sasada, R., Igarashi, K., Nakata, A., Yamamori, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S., and Matsuzawa, Y., Immunohistochemical localization of Betacellulin, a member of epidermal growth factor family, in atherosclerotic plaques of human aorta. *Atherosclerosis*, 2001. 155(2): p. 413-23.
39. Nanney, L.B., Stoscheck, C.M., and King, L.E., Characterization of binding and receptors for epidermal growth factor in smooth muscle. *Cell Tissue Res*, 1988. 254(1): p. 125-32.
40. Tomita, M., Hirata, Y., Uchihashi, M., and Fujita, T., Characterization of epidermal growth factor receptors in cultured vascular smooth muscle cells of rat aorta. *Endocrinol Jpn*, 1986. 33(2): p. 177-84.

41. Reynolds, C.M., Eguchi, S., Frank, G.D., and Motley, E.D., Signaling mechanisms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 2002. 39(2 Pt 2): p. 525-9.
42. Schreier, B., Döhler, M., Rabe, S., Schneider, B., Schwerdt, G., Ruhs, S., Sibilia, M., Gotthardt, M., Gekle, M., and Grossmann, C., Consequences of Epidermal Growth Factor Receptor (ErbB1) Loss for Vascular Smooth Muscle Cells From Mice With Targeted Deletion of ErbB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011. 31(7): p. 1643-52.
43. Ivanov, A., Gerzanich, V., Ivanova, S., DenHaese, R., Tsybalyuk, O., and Simard, J.M., Adenylate cyclase 5 and KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle. *The Journal of Physiology*, 2006. 570(1): p. 73-84.
44. Kalmes, A., Daum, G., and Clowes, A.W., EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. 947: p. 42-54; discussion 54-5.
45. Ginnan, R., Pfeleiderer, P.J., Pumiglia, K., and Singer, H.A., PKC-delta and CaMKII-delta 2 mediate ATP-dependent activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 286(6): p. C1281-9.
46. Raab, G. and Klagsbrun, M., Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1333(3): p. F179-99.
47. Matsumoto, S., Kishida, K., Shimomura, I., Maeda, N., Nagaretani, H., Matsuda, M., Nishizawa, H., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Yamada, A., Yamashita, S., Tamura, S., and Kawata, S., Increased plasma HB-EGF associated with obesity and coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 292(3): p. 781-6.
48. Miyagawa, J., Higashiyama, S., Kawata, S., Inui, Y., Tamura, S., Yamamoto, K., Nishida, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., and et al., Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995. 95(1): p. 404-11.
49. Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., and Higashiyama, S., Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, 2002. 8(1): p. 35-40.
50. Higashiyama, S., Abraham, J.A., Miller, J., Fiddes, J.C., and Klagsbrun, M., A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 1991. 251(4996): p. 936-9.
51. Dluz, S.M., Higashiyama, S., Damm, D., Abraham, J.A., and Klagsbrun, M., Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. *J Biol Chem*, 1993. 268(24): p. 18330-4.
52. Nakano, T., Raines, E.W., Abraham, J.A., Klagsbrun, M., and Ross, R., Lysophosphatidylcholine upregulates the level of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(3): p. 1069-73.
53. Gechtman, Z., Alonso, J.L., Raab, G., Ingber, D.E., and Klagsbrun, M., The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem*, 1999. 274(40): p. 28828-35.
54. Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., and Mekada, E., A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*, 1998. 17(24): p. 7260-72.
55. Ohtsu, H., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Brailoiu, E., Higuchi, S., Suzuki, H., Nakashima, H., Eguchi, K., and Eguchi, S., ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(9): p. e133-7.
56. Hooper, N.M., Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett*, 1994. 354(1): p. 1-6.
57. Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., and Bode, W., The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*, 1995. 4(5): p. 823-40.
58. Chang, C. and Werb, Z., The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(11): p. S37-43.
59. Seals, D.F. and Courtneidge, S.A., The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 2003. 17(1): p. 7-30.
60. Lutgens, E., Lievens, D., Beckers, L., Donners, M., and Daemen, M., CD40 and its ligand in

- atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(4): p. 118-23.
61. Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P., Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1994. 94(6): p. 2493-503.
62. Li, Z., Li, L., Zielke, H.R., Cheng, L., Xiao, R., Crow, M.T., Stetler-Stevenson, W.G., Froehlich, J., and Lakatta, E.G., Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1996. 148(1): p. 121-8.
63. Risinger, G.M., Jr., Hunt, T.S., Updike, D.L., Bullen, E.C., and Howard, E.W., Matrix metalloproteinase-2 expression by vascular smooth muscle cells is mediated by both stimulatory and inhibitory signals in response to growth factors. *J Biol Chem*, 2006. 281(36): p. 25915-25.
64. Johnson, S. and Knox, A., Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *Am J Physiol*, 1999. 277(6 Pt 1): p. L1109-17.
65. Bendeck, M.P., Zempo, N., Clowes, A.W., Galaray, R.E., and Reidy, M.A., Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*, 1994. 75(3): p. 539-45.
66. Kenagy, R.D., Hart, C.E., Stetler-Stevenson, W.G., and Clowes, A.W., Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation*, 1997. 96(10): p. 3555-60.
67. Zempo, N., Koyama, N., Kenagy, R.D., Lea, H.J., and Clowes, A.W., Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(1): p. 28-33.
68. Cheng, L., Mantile, G., Pauly, R., Nater, C., Felici, A., Monticone, R., Bilato, C., Gluzband, Y.A., Crow, M.T., Stetler-Stevenson, W., and Capogrossi, M.C., Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation*, 1998. 98(20): p. 2195-201.
69. Jenkins, G.M., Crow, M.T., Bilato, C., Gluzband, Y., Ryu, W.S., Li, Z., Stetler-Stevenson, W., Nater, C., Froehlich, J.P., Lakatta, E.G., and Cheng, L., Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*, 1998. 97(1): p. 82-90.
70. Lovdahl, C., Thyberg, J., and Hultgardh-Nilsson, A., The synthetic metalloproteinase inhibitor batimastat suppresses injury-induced phosphorylation of MAP kinase ERK1/ERK2 and phenotypic modification of arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res*, 2000. 37(5): p. 345-54.
71. Uglow, E.B., Slater, S., Sala-Newby, G.B., Aguilera-Garcia, C.M., Angelini, G.D., Newby, A.C., and George, S.J., Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*, 2003. 92(12): p. 1314-21.
72. Southgate, K.M., Davies, M., Booth, R.F., and Newby, A.C., Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*, 1992. 288 (Pt 1): p. 93-9.
73. Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Beliveau, R., Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem*, 2007. 282(21): p. 15690-9.
74. Smiljanic, K., Resanovic, I., Savic, K., Obradovic, M., Putnikovic, B., Djordjevic, J., Isenovic, E.R., Uloga PKC δ i ERK1/2 u trombinom stimulisanoj proliferaciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova Medicinska istrazivanja, 2012. accepted.
75. Wu, W., Graves, L.M., Gill, G.N., Parsons, S.J., and Samet, J.M., Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J Biol Chem*, 2002. 277(27): p. 24252-7.
76. Egeblad, M. and Werb, Z., New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(3): p. 161-74.
77. Visse, R. and Nagase, H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 827-39.
78. El Bedoui, J., Oak, M.H., Anglard, P., and Schini-Kerth, V.B., Catechins prevent vascular smooth muscle cell invasion by inhibiting MT1-MMP activity and MMP-2 expression. *Cardiovasc Res*, 2005. 67(2): p. 317-25.
79. Martorell, L., Martinez-Gonzalez, J., Rodriguez, C., Gentile, M., Calvayrac, O., and Badimon, L., Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2008. 99(2): p. 305-15.
80. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding_01.svg.

81. Huovila, A.P., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Karkkainen, I., and Ortiz, R.M., Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci*, 2005. 30(7): p. 413-22.
82. Takaguri, A., Kimura, K., Hinoki, A., Bourne, A.M., Autieri, M.V., and Eguchi, S., A Disintegrin and Metalloprotease 17 Mediates Neointimal Hyperplasia in Vasculature. *Hypertension*, 2011. 57(4): p. 841-45.
83. Okada, A., Mochizuki, S., Yatabe, T., Kimura, T., Shiomi, T., Fujita, Y., Matsumoto, H., Sehara-Fujisawa, A., Iwamoto, Y., and Okada, Y., ADAM-12 (meltrin alpha) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(3): p. 778-89.
84. Kodama, T., Ikeda, E., Okada, A., Ohtsuka, T., Shimoda, M., Shiomi, T., Yoshida, K., Nakada, M., Ohuchi, E., and Okada, Y., ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol*, 2004. 165(5): p. 1743-53.
85. Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., and Mekada, E., A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*, 1998. 17((24)): p. 7260-72.
86. Suzuki, A., Kadota, N., Hara, T., Nakagami, Y., Izumi, T., Takenawa, T., Sabe, H., and Endo, T., Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene*, 2000. 19(51): p. 5842-50.
87. Kang, Q., Cao, Y., and Zolkiewska, A., Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J*, 2000. 352 Pt 3: p. 883-92.