

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE XVIII Ciclo – 2002 - 2006

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

IL RUOLO DEI BASOFILI UMANI NELL'ANGIOGENESI

TUTORE

Chiar.mo

Prof. Gianni Marone

CANDIDATA

Dott. ssa

Nella Prevete

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUZIONE | 4 |
| MATERIALI E METODI | 13 |
| <i>Reagenti</i> | 13 |
| <i>Tamponi</i> | 14 |
| <i>Purificazione dei basofili dal sangue periferico</i> | 14 |
| <i>Analisi citofluorimetrica</i> | 15 |
| <i>RT-PCR</i> | 16 |
| <i>Chemiotassi</i> | 18 |
| <i>Dosaggio del rilascio di istamina</i> | 19 |
| <i>ELISA</i> | 20 |
| <i>Saggio della membrana corioallantoidea di pollo (CAM)</i> | 20 |
| <i>Doppia immunofluorescenza su cytopsin</i> | 21 |
| <i>Doppia immunofluorescenza su sezioni criostatate di polipi nasali</i> | 22 |
| <i>Dosaggio della lattico deidrogenasi</i> | 23 |
| <i>Analisi statica</i> | 23 |

| | |
|---|----|
| RISULTATI | 24 |
| <i>Valutazione dell'espressione dell'mRNA per il VEGF nei basofili umani</i> | 24 |
| <i>Determinazione del VEGF-A nei basofili umani</i> | 24 |
| <i>Localizzazione del VEGF-A nei basofili umani</i> | 25 |
| <i>Localizzazione del VEGF-A nei basofili infiltranti i polipi nasali</i> | 26 |
| <i>Cinetica del rilascio di VEGF-A dai basofili umani</i> | 26 |
| <i>Espressione dei recettori per il VEGF nei basofili umani</i> | 28 |
| <i>Espressione di NRP1 ed NRP2 nei basofili umani</i> | 29 |
| <i>Effetto del VEGF-A₁₆₅ e del VEGF-A₁₂₁ sulla chemiotassi dei basofili umani</i> | 30 |
| <i>Effetto degli anticorpi anti-VEGFR-2/KDR sulla chemiotassi dei basofili umani indotta VEGF-A₁₆₅</i> | 31 |
| <i>Desensibilizzazione eterologa tra VEGF-A₁₆₅, eotassina e Hp(2-20)</i> | 31 |
| <i>Effetto del VEGF-A₁₆₅ sul rilascio di istamina e di citochine dai basofili</i> | 32 |
| <i>Il VEGF secreto dai basofili umani induce una risposta angiogenica nella CAM dell'embrione di pollo</i> | 33 |
| DISCUSSIONE | 35 |
| BIBLIOGRAFIA | 41 |

INTRODUZIONE

L'angiogenesi è un processo complesso attraverso il quale nuovi vasi sanguigni si formano a partire da quelli preesistenti. Durante il processo di neo-angiogenesi, la degradazione localizzata della matrice extracellulare precede la proliferazione, la migrazione e l'infiltrazione delle cellule endoteliali. Queste cellule si riorganizzano in una struttura capillare e nuova matrice extracellulare viene deposta (1).

L'angiogenesi è essenziale durante lo sviluppo embrionale, la cicatrizzazione delle ferite, il ciclo mestruale, la formazione e la crescita dell'osso. Viceversa, una alterata attività angiogenica può essere responsabile di differenti condizioni patologiche. Nella cardiopatia ischemica e nelle vasculopatie periferiche un insufficiente flusso sanguigno, associato a disordini della vascolatura, determina ischemia a livello tissutale. L'angiogenesi neoplastica contribuisce alla crescita tumorale ed alla formazione di metastasi. La neo-angiogenesi si associa, inoltre, al rimodellamento tissutale che si osserva in corso di diverse malattie infiammatorie croniche tra cui l'artrite reumatoide, la malattia di Crohn, la retinopatia diabetica e l'asma bronchiale (2).

Evidenze recenti indicano che la crescita e la maturazione dei nuovi vasi sono un processo coordinato e altamente complesso, che richiede l'attivazione sequenziale di una serie di recettori da parte di numerosi ligandi (3). L'unico

fattore di crescita che però si osserva ubiquitariamente nei siti di angiogenesi ed i cui livelli correlano più strettamente con la crescita di nuovi vasi è il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), che spesso rappresenta una tappa limitante per il processo di angiogenesi (4).

Oltre alla modulazione della migrazione e della proliferazione delle cellule endoteliali, il VEGF esplica molte altre attività pro-angiogeniche. Esso, infatti, induce, nelle cellule endoteliali, l'espressione di proteasi (collagenasi, uPA e tPA) in grado di liberare le cellule dall'ancoraggio alla matrice permettendone la migrazione e di generare prodotti di clivaggio a loro volta attivi nell'indurre l'angiogenesi. Il VEGF, inoltre, aumenta la permeabilità dell'endotelio mediante la formazione di vacuoli e fenestrazioni, causa vasodilatazione mediante l'induzione di nitrossido sintasi (eNOS) (5).

Il VEGF non è attivo soltanto sulle cellule endoteliali: è in grado di indurre la mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche dal midollo, l'attivazione degli osteoblasti, la chemiotassi dei monociti, la regolazione dell'omeostasi neuronale (5).

Il principale regolatore della sintesi di VEGF è la pressione dell'ossigeno, l'mRNA per il VEGF infatti, è fortemente indotto dalla esposizione a basse concentrazioni di ossigeno che si riscontrano in una grossa varietà di circostanze fisiopatologiche (6). Molte citochine e fattori di crescita up-regolano l'mRNA per il VEGF e ne inducono il rilascio: PDGF (platelet-derived growth factor),

TNF- α , TGF- α , TGF- β , FGF, EGF (epidermal growth factor), IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ed IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Infine, alcune mutazioni geniche presenti nelle cellule neoplastiche possono aumentare la sintesi del VEGF: mutazioni attivanti p53 o mutazioni oncogeniche ed amplificazioni di RAS (4).

La famiglia genica del VEGF comprende diversi membri, tra i quali VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (placental growth factor) (4). Il VEGF-A ed il VEGF-B regolano la crescita dei vasi sanguigni, mentre il VEGF-C ed il VEGF-D sono implicati nell'angiogenesi linfatica (7), il PlGF sembra invece mediare primariamente l'arteriogenesi. Alcuni di questi fattori presentano varie isoforme derivanti da meccanismi di splicing alternativo con differente potenziale pro-angiogenico. Il gene umano del VEGF-A è organizzato in 8 esoni e 7 introni. Lo splicing alternativo genera almeno 6 isoforme: VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉, e VEGF-A₂₀₆ (Fig. 1A) (8). Il VEGF-A₁₆₅ è la forma predominante, manca dei residui codificati dall'esone 6, è secreta come una glicoproteina omodimerica di 45 kDa in grado di legare l'eparina. Il VEGF-A₁₂₁ è un polipeptide acido che manca dei residui codificati dagli esoni 6 e 7, non lega l'eparina. Il VEGF-A₁₈₉ ed il VEGF-A₂₀₆ contengono una sequenza addizionale codificata dall'esone 6 e legano fortemente l'eparina. Le varianti 145 e 183 sono meno frequenti (4). Mentre il VEGF-A₁₂₁ è una proteina altamente diffusibile, il VEGF-A₁₈₉ ed il VEGF-A₂₀₆ sono completamente sequestrate nella matrice extracellulare. Il VEGF-A₁₆₅ ha

proprietà intermedie, viene infatti secreto ma una frazione significativa rimane legata alla matrice. Le isoforme di VEGF-A sequestrate nella matrice costituiscono un reservoir di fattore di crescita che può essere mobilizzato mediante proteolisi (9). La perdita del dominio legante l'eparina risulta anche in una significativa riduzione dell'attività mitogenica del VEGF-A. Questi dati suggeriscono, quindi, che il VEGF-A₁₆₅ abbia caratteristiche ottimali di biodisponibilità e la maggiore attività biologica (10).

Il VEGF-A esplica la sua azione mediante l'interazione con due principali recettori: VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/KDR (Fig. 1B) (11). Entrambi i recettori presentano una porzione extracellulare costituita da sette domini immunoglobulinici (Ig-like), un tratto transmembrana ed una coda intracitoplasmatica responsabile dell'attività tirosino-chinasica. Il secondo ed il terzo dominio immunoglobulinico dei recettori sono essenziali per il legame ad alta affinità del VEGF (4). Il quarto dominio media la dimerizzazione dei recettori. Il quinto ed il sesto dominio sembrano essere importanti per stabilizzare il legame del VEGF al suo recettore (9).

Il VEGFR-1/Flt-1 è una glicoproteina di ~180 kDa, ha la maggiore affinità per il VEGF-A, ma lega anche VEGF-B e PlGF. La fosforilazione in tirosina del VEGFR-1/Flt-1 è difficile da rilevare ed induce soltanto un debole segnale mitogenico, Park *et al.* ipotizzarono quindi che VEGFR-1/Flt-1 potesse svolgere il ruolo di "decoy receptor" in grado di regolare in senso negativo l'attività del

VEGF (12). Il VEGFR-2/KDR è un recettore di 200-230 kDa con una minore affinità per il VEGF-A rispetto a VEGFR-1/Flt-1, lega anche VEGF-C e VEGF-D. Il VEGFR-2/KDR viene fosforilato molto più efficacemente del VEGFR-1/Flt-1 dopo il legame del ligando ed è quindi in grado di indurre segnali mitogenici e chemiotattici (9). VEGFR-3/Flt-4 appartiene alla stessa famiglia di recettori ma lega VEGF-C e VEGF-D, la sua espressione è limitata all'endotelio dei vasi linfatici (9).

I recettori del VEGF sono in grado di tradurre il segnale solo nella forma omo od eterodimerica. Sebbene il VEGFR-1/Flt-1 abbia una più bassa capacità di fosforilare, può eterodimerizzare con VEGFR-2/KDR formando un complesso con maggiori capacità di tradurre il segnale rispetto agli omodimeri di VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/KDR (5).

Un importante meccanismo che regola l'attività del VEGF prevede la produzione per splicing alternativo di una variante solubile del VEGFR-1/Flt-1: sVEGFR-1/Flt-1 (13). Questa forma è praticamente identica a quella di membrana, differendo da essa per l'assenza della porzione transmembrana necessaria all'ancoraggio del recettore alla membrana citoplasmatica, e per l'assenza della porzione intracellulare necessaria per la trasduzione del segnale. sVEGFR-1/Flt-1 lega il VEGF con elevata affinità e sequestrandolo ne impedisce il legame con i recettori di membrana in grado di tradurre il segnale; sVEGFR-1/Flt-1 inoltre, è in grado di formare eterodimeri non funzionali con

VEGFR-2/KDR (14).

Esperimenti di cross-linking con l'utilizzo di VEGF radio-marcato indicano che i siti di legame del VEGF sulla membrana plasmatica non corrispondono esclusivamente ai VEGFRs. Soker *et al.* identificarono questi siti sui recettori NRP1 ed NRP2 (neuropiline) (15). Le neuropiline legano le semaforine di classe 3 e sono normalmente implicate nei processi di trasmissione dei segnali lungo gli assoni (5). Questi recettori legano il dominio codificato dall'esone 7 del gene del VEGF-A e quindi riconoscono il VEGF-A₁₆₅ ma non il VEGF-A₁₂₁. Il legame del VEGF a queste molecole non induce di per sé segnali di traduzione, piuttosto Soker dimostrò che la NRP1 agisce come corecettore per il VEGF-A₁₆₅ rafforzandone il legame al VEGFR-2/KDR ed aumentandone l'attività.

Le cellule che esprimono recettori ad alta affinità per le IgE (FcεRI) (granulociti basofili e mastociti tissutali) svolgono un ruolo patogenetico nelle malattie allergiche dell'apparato respiratorio e cutaneo ed in molteplici condizioni patologiche dell'apparato cardiaco, gastrointestinale e muscolo-scheletrico.

L'interazione dell'antigene con la porzione Fab delle IgE presenti su basofili e mastociti ed il conseguente legame a ponte dei recettori FcεRI attiva una serie di eventi biochimici che inducono la secrezione di numerosi mediatori chimici (16).

I mastociti, ma non i basofili esprimono il recettore c-kit, che è il ligando naturale dello stem cell factor (SCF) (17,18), una importante citochina che regola lo sviluppo, la chemiotassi e la degranolazione di tali cellule.

I mediatori chimici sintetizzati dai basofili e dai mastociti umani sono responsabili delle manifestazioni cliniche delle malattie allergiche. Queste cellule contengono granuli citoplasmatici, il cui contenuto può essere liberato, attraverso un meccanismo di esocitosi, in seguito ad attivazione da parte di stimoli immunologici IgE- e non IgE-mediati. Le cellule FcεRI⁺ sintetizzano l'istamina che è in grado di contrarre la muscolatura liscia bronchiale, aumentare la permeabilità vascolare, modulare il flusso coronarico e la funzione linfocitaria. I basofili ed i mastociti umani, dopo stimolazione IgE-mediata, sintetizzano quantità equivalenti di leucotriene C₄ (LTC₄) e prostaglandina D₂ (PGD₂).

Numerosi gruppi di ricercatori hanno dimostrato che le cellule FcεRI⁺ umane sintetizzano molteplici citochine e chemochine. In particolare, i basofili sintetizzano IL-4, IL-13 e MIP-1α, mentre i mastociti sintetizzano uno spettro più ampio di citochine (IL-4, IL-5, IL-8, IL-16, TNF-α, etc.) e MIP-1α. Queste ultime osservazioni indicano che in molteplici malattie immunomediate le cellule FcεRI⁺ umane svolgono anche una significativa funzione immunoregolatrice (19,20).

Mentre i mastociti sono cellule residenti esclusivamente a livello tessutale, i

basofili, normalmente confinati nel sangue periferico, infiltrano i tessuti in condizioni di infiammazione allergica (21,22). E' interessante sottolineare che i basofili sono presenti a livello tissutale anche in corso di infiammazione non allergica. Infatti, è stata recentemente dimostrata la presenza di un infiltrato di basofili nella mucosa gastrica di pazienti affetti da gastrite cronica *Helicobacter pylori*⁺ (23). Sebbene il ruolo dei basofili e dei loro mediatori nelle risposte infiammatorie croniche non sia ancora completamente elucidato è possibile ipotizzare che tali cellule possano svolgere un ruolo significativo anche in quei processi flogistici che spesso preludono alla genesi neoplastica.

Crescenti evidenze correlano l'angiogenesi non soltanto alla crescita tumorale ma anche a numerosi disordini di natura infiammatoria cronica (4).

I mastociti, sono spesso localizzati in prossimità dei vasi sanguigni e la loro densità è incrementata nei siti di angiogenesi. Tale osservazione induce a ritenere che i mastociti possano contribuire ad alcuni aspetti dell'angiogenesi (24,25). I mastociti inoltre, sintetizzano e rilasciano numerosi fattori pro-angiogenici (istamina, triptasi, TGF- β , IL-8, VEGF and I-309/CCL1) (26-28). La sintesi di VEGF da parte dei mastociti è aumentata dalla PGE₂ e da altri agenti che incrementano i livelli di cAMP (29).

Nei pazienti asmatici l'incremento della densità dei mastociti bronchiali correla con l'aumento del numero dei vasi (30); elevati livelli di VEGF e di bFGF (fibroblast growth factor) si rinvencono nella sottomucosa bronchiale di

pazienti asmatici rispetto al gruppo di controllo (31); le concentrazioni di VEGF misurate nello sputo ottenuto da soggetti asmatici sono più elevate rispetto a quelle osservate nei controlli (32). L'insieme di tali osservazioni suggerisce che i mastociti, attraverso il rilascio di VEGF, sostengano l'angiogenesi in corso di asma bronchiale.

Il sistema VEGF/recettori non è mai stato caratterizzato nei basofili umani, e non si conosce il loro potenziale pro-angiogenico.

Scopo del nostro studio è stato, quindi, valutare nei basofili umani l'espressione delle diverse isoforme del VEGF e la capacità di sintetizzare VEGF-A dopo attivazione immunologica. E' stata studiata l'espressione dei recettori per il VEGF e gli effetti del VEGF-A sulla chemiotassi di tali cellule. Ed infine, è stato valutato se basofili umani attivati potessero indurre una risposta angiogenica *in vivo*.

MATERIALI E METODI

Reagenti

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: HClO₄ 60% (Baker Chemical Co., Deventer, The Netherlands); albumina sierica umana (HSA), PIPES buffer ed inibitori delle protease, cicloesamide ed anti-VEGFR2/KDR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Hanks' balanced salt solution (HBSS); FCS, RNAqueousTM-4PCR (Ambion Ltd., Huntingdon, UK); Superscript III (Invitrogen Ltd., Paisley, UK); RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies Gaithersburg, MD, USA) con Heps buffer 25 mM; Eagle's minimum essential medium (MEM) (Flow Laboratories, Irvine, Scotland); Dextrano 70 e Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden); anticorpi IgG anti-coniglio HRP-coniugati (Amersham International, Amersham, England), saggio colorimetrico per proteine (Biorad, Richmond, CO, USA); anticorpi anti-IgE PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA); VEGF-A₁₆₅ ricombinate umana, VEGF-A₁₂₁ ricombinate umana, anticorpi monoclonali anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2 ed anti-VEGF (R&D System, Minneapolis, MN); anticorpi IgG anti-topo FITC (Becton & Dickinson, San Fernando, CA); kit per ECL (Amersham International, Amersham, England); filtri di fluoruro di polivinilidene (PVDF) (Millipore, Windsor, MA, USA); Ex-Taq (Takara Bio Europe S.A.,

Gennevilliers, France); filtri per chemiotassi (Neuroprobe, Cabin John, MD, USA).

Tamponi

Il tampone utilizzato in questi esperimenti è composto da PIPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 110 mM, KCl 5 mM. Esso è designato dalla lettera "P". Il tampone PCG contiene, oltre a P, CaCl₂ 5 mM e 1 g/L di D-glucosio (33). Il tampone PACGM contiene, oltre a P, albumina sierica umana al 3%, CaCl₂ 1 mM, 1 g/L di destrosio e 0,25 g/L di MgCl₂·6H₂O, pH 7,4; il PGMD contiene, oltre a P, 0,25 g/L di MgCl₂·6H₂O, 10 mg/L di DNase, e 1 g/L di gelatina, pH 7,4. Il PBS contiene 8 g/L di NaCl, 1,15 g/L di Na₂HPO₄, 200 mg/L di KCl, e 200 mg/L di KH₂PO₄, pH 7,4.

Purificazione dei basofili dal sangue periferico

I basofili sono stati purificati dal sangue periferico di donatori sani, negativi per gli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 (di età compresa tra i 20 ed i 39 anni) afferenti al Servizio di Immunoematologia dell'Università di Napoli Federico II. I leucociti sono stati risospesi in PBS contenente 0,5 g/L di albumina sierica umana (HSA) e 3,42 g/L di sodio citrato, e quindi purificati usando un elutriatore controcorrente (Beckman, Fullerton, CA). Le frazioni contenenti più di 20×10^6 basofili e con una buona purezza (> 15%) sono state purificate

usando un gradiente discontinuo Percoll. I basofili sono stati infine isolati, con un'omogeneità >98%, eliminando linfociti B, monociti, cellule NK, cellule dendritiche, eritrociti, piastrine, neutrofili, eosinofili e linfociti T mediante un cocktail di anticorpi anti-HLA-DR e apteni coniugati CD3, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA e MACS MicroBeads coniugate con anticorpi anti-aptini. Le cellule magneticamente marcate sono state eliminate attraverso ritenzione in una colonna su supporto magnetico della MidiMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Con tale metodica si ottiene un numero di basofili variabile tra 3 e 10×10^6 con una purezza in genere >99%, come attestato dalla colorazione dei basofili con Alcian blue e dal conteggio nella camera di conta per eosinofili di Spiers-Levy (34).

Analisi citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica delle molecole presenti sulla superficie cellulare è stata condotta come descritto di seguito. Dopo la saturazione dei siti di legame non specifici con IgG di coniglio, le cellule sono state incubate (20 minuti a 4 °C) con anticorpi specifici o con controlli isotipici. Per la marcatura indiretta a questa fase è seguita una seconda incubazione per 20 minuti a 4 °C con un anticorpo anti-isotipo marcato con un fluorocromo. Infine, le cellule sono state lavate ed analizzate con un citofluorimetro FACSCalibur utilizzando il software Cell Quest (Becton & Dickinson, San Fernando, CA). In tutte le analisi

citofluorimetriche eseguite è stato acquisito un totale di 10^4 eventi per ogni campione.

RT-PCR

L'RNA cellulare totale dei basofili umani purificati è stato isolato mediante RNAqueous™-4PCR (Ambion) in accordo con il protocollo fornito dal produttore. L'RNA è stato quantizzato mediante spettroscopia. 2 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA utilizzando 200 U di Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). 2 µl di DNA retrotrascritto è stato poi amplificato utilizzando primers specifici per VEGF-A₁₂₁₋₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-1/KDR, sVEGFR-1/Flt-1, NRP1, NRP2 e per GAPDH, utilizzato come controllo (Tabella 1). I prodotti della reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su un gel al 2% di agarosio contenente bromuro di etidio. La rilevazione è stata eseguita con luminescenza UV.

Tabella 1

| Specificità | Oligonucleotide senso (5'-3') | Oligonucleotide antisenso (5'-3') |
|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| VEGF-A ₁₂₁₋₁₆₅ | GTGAATGCAGACCAAAGAAAG | AAACCCTGAGGGAGGCTC |
| VEGF-A ₁₈₉ | GTATAAGTCCTGGAGCGT | AAACCCTGAGGGAGGCTC |
| VEGF-B | GTCCCTGGAAGAACACAGCC | GCCATGTGTCACCTTCGCA |
| VEGF-C | ATGTTTTCTCCTCGGATGCTGGA | CATTGGCTGGGGAAGAGTTT |
| VEGF-D | GTATGGACTCTCGCTCAGCAT | AGGCTCTCTTCATTGCAACAG |
| VEGFR-1/Flt-1 (coppia 1) | ATCAGAGATCAGGAAGCACC | GGAACTTCATCTGGGTCCAT |
| VEGFR-1/Flt-1 (coppia 2) | CTATGGAAGATCTGATTTCTT | GGTATAAATACACATGTGCTT |
| VEGR-2/KDR | GACTTCAACTGGGAATACCC | CATGGCCCTGACAAATGTG |
| sVEGFR-1 | ACAATCAGAGGTGAGCACTG | CTGCTATCATCTCCGAACTC |
| NRP1 | ATGGATATGTTTTCTCTCACC | CTGGAGATACTCCTTGTTGG |
| NRP2 | CCCCGAACCAACCAGAAGA | GAATGCCATCCCAGATGTCCA |
| GAPDH | GCCAAAGGGTCATCATCTC | GTAGAGGCAGGGATGATGTTC |

Chemiotassi

La chemiotassi dei basofili è stata effettuata utilizzando la tecnica della camera di Boyden. In sintesi, 25 µl di tampone (PACGM) o di concentrazioni variabili degli stimoli da testare, sono stati posti in triplicato nel compartimento inferiore di una camera per micro-chemiotassi costituita da 48 pozzetti (Neuroprobe, Cabin John, MD). Il compartimento inferiore è stato ricoperto da una membrana in policarbonato con pori di 5 µm (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA). Successivamente 50 µl (5×10^4 cellule/pozzetto) della sospensione in PAGCM sono stati aggiunti in ogni pozzetto del compartimento superiore. La camera per la chemiotassi è stata posta per 1 ora a 37°C, in un incubatore umidificato con CO₂ al 5% (Automatic CO₂ Incubator, Model 160 IR, ICN Flow). Al termine dell'incubazione dei basofili la membrana di policarbonato è stata rimossa, lavata con PAGCM nella parte superiore, fissata e colorata con May-Grunwald/Giemsa. La chemiotassi dei basofili è stata valutata mediante la conta al microscopio del numero di cellule che sono rimaste adese alla membrana con pori da 5 µm (34). Per ogni esperimento sono stati contati 10 campi per ciascuno dei pozzetti in triplicato ad un ingrandimento di 40x. L'analisi di controllo è stata eseguita per discriminare la migrazione spontanea (chemiochinesi) dalla chemiotassi indotta dagli stimoli. I basofili sono stati posti nei pozzetti del compartimento superiore della camera mentre concentrazioni ottimali degli

stimoli o del tampone PAGCM sono state aggiunte nel compartimento superiore, inferiore o in entrambi. La chemiochinesi è stata definita in assenza di stimoli chemiotattici o quando questi erano presenti sia nel compartimento superiore che in quello inferiore della camera di Boyden. Da questi esperimenti è risultato che i basofili migrano in risposta agli stimoli prevalentemente per chemiotassi e non per chemiochinesi.

Dosaggio del rilascio di istamina

I basofili ($\sim 6 \times 10^4$ cellule) sono stati risospesi in PCG, ed in quote di 0,1 ml sono stati posti in tubi di polietilene (Sarstadt Inc., Princeton, NJ) ed incubati a 37°C; è stato aggiunto 0.1 ml di ciascuno stimolo preincubato e l'incubazione è continuata a 37°C per 45 min (33). La reazione è stata bloccata mediante centrifugazione (1000 x g, 22°C, 2 min); i sovranatanti sono stati conservati a -20°C per il successivo dosaggio dell'istamina. Il dosaggio dell'istamina è stato effettuato con metodica fluoronefelometrica (35). Il contenuto totale di istamina è stato valutato nei campioni ottenuti mediante lisi delle cellule con HClO₄ 2% prima della centrifugazione. Per calcolare il rilascio di istamina come percentuale del contenuto totale di istamina, è stata utilizzata la seguente formula: $[(A-B)/(T-B)] \times 100$, dove A è il campione; B è il rilascio spontaneo di istamina; T è il contenuto totale di istamina (33). Tutti i valori esprimono la

media di determinazioni effettuate in duplicato o triplicato. I duplicati differiscono tra loro meno del 10% nel contenuto di istamina.

ELISA

Il rilascio del VEGF-A, dell'IL-4 e dell'IL-13 nei sovranatanti di basofili umani è stato determinato in duplicato utilizzando un kit commerciale per ELISA (R&D System, Minneapolis, MN).

Saggio della membrana corioallantoidea di pollo (CAM)

Uova di pollo "White Leghorn" fecondate (30/gruppo) sono state incubate in condizioni costanti di umidità a 37°C. Al terzo giorno di incubazione, è stata creata un'apertura nel guscio e sono stati rimossi 2-3 ml di albume. L'apertura è stata ricoperta con un vetro di uguali dimensioni, e le uova sono state riposte nell'incubatore (36). Le CAM sono state incubate all'ottavo giorno con sovranatanti di basofili umani del sangue periferico trattati con anti-IgE disciolto in 3 µl di DMEM ed adsorbiti su spugne di gelatina sterili di 1 mm³ (Gelfoam, Upjohn Company, Kalamazoo, MI). Le spugne contenenti il solo mezzo sono state utilizzate come controllo negativo, mentre quelle contenenti 500 ng/embrione di rVEGF (VEGF ricombinante) (R&D Systems, Abingdon, UK) sono state utilizzate come controllo positivo. In alcuni esperimenti, i

basofili sono stati preincubati con anticorpi policlonali neutralizzanti il VEGF umano (500 ng/embrione) per la specifica forma VEGF-A₁₆₅ (R&D Systems) o con anticorpi IgG di controllo (500 ng/ml) (Chemicon International, Temecula, CA, TSA) prima dell'impianto.

Le CAM sono state osservate quotidianamente fino al dodicesimo giorno e fotografate *in ovo* con uno stereomicroscopio SR equipaggiato con *Zeiss Camera System MC63*. In tali esperimenti, i vasi infiltranti le spugne sono stati contati in doppio-cieco da due osservatori ad un ingrandimento 50x.

Doppia immunofluorescenza su cytopsin

I basofili purificati come precedentemente descritto sono lasciati ad aderire su un vetrino trattato con 1% poli-L-lisina (Menzel-Glaser) per 1 h a 22°C. successivamente le cellule sono fissate in 4% paraformaldeide. I siti di legame non specifici sono saturati preincubando i basofili fissati con siero non immune di cavallo (Vector Laboratories) per 30 min a 22°C (37). Per la doppia immunofluorescenza le cellule sono state incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario di topo BB1 (1/100) e l'anticorpo anti-VEGF-A di coniglio (1/300) (A-20, Santa Cruz Biotechnology). Le cellule sono state successivamente incubate con anticorpi secondari anti-topo coniugati con il fluorocromo FITC (1/50) (DakoCytomation) per 1 h a 22°C e con anticorpi secondari anti-coniglio coniugati con il fluorocromo TRITC (1/50) (DakoCytomation) per 1 h a 22°C. Il

contrasto nucleare è stato ottenuto con 4',6'-diamino-2-phenylidole (Roche) e per 15 min a 22°C. Infine, i vetrini sono stati montati con dei copri-oggetto usando un mounting medium sintetico. I basofili sono stati visualizzati con un microscopio confocale (Zeiss Axiovert 100 M adattato con un sistema confocale LSM 510). Le immagini sono state acquisite con un software LSM 510 (Zeiss) ed esportate in JPEG.

Doppia immunofluorescenza su sezioni criostatate di polipi nasali

I campioni di polipi nasali sono stati ottenuti da pazienti sottoposti a polipectomia. Questi pazienti non assumevano steroidi anti infiammatori per almeno 15 giorni prima dell'intervento. I campioni, appena rimossi chirurgicamente, erano immediatamente congelati a -25°C, sezioni dello spessore di 5 µm sono state tagliate dai tessuti congelati con un cryostato automatico (37). Le sezioni erano poi poggiate su un vetrino, fissate in acetone per 10 min a 22°C, e conservate a -25°C fino all'uso. I siti di legame non specifici sono saturati preincubando i basofili fissati con siero non immune di cavallo (Vector Laboratories) per 30 min a 22°C (37). Per la doppia immunofluorescenza le cellule sono state incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario di topo BB1 (1/100) e l'anticorpo anti-VEGF-A di coniglio (1/300) (A-20, Santa Cruz Biotechnology). Le cellule sono state successivamente incubate con anticorpi secondari anti-topo coniugati con il fluorocromo FITC

(1/50) (DakoCytomation) per 1 h a 22°C e con anticorpi secondari anti-coniglio coniugati con il fluorocromo TRITC (1/50) (DakoCytomation) per 1 h a 22°C. Il contrasto nucleare è stato ottenuto con 4',6'-diamino-2-phenylidole (Roche) epr 15 min a 22°C. Infine, i vetrini sono stati montati con dei copri-oggetto usando un mounting medium sintetico. I basofili sono stati visualizzati con un microscopio confocale (Zeiss Axiovert 100 M adattato con un sistema confocale LSM 510). Le immagini sono state acquisite con un software LSM 510 (Zeiss) ed esportate in JPEG.

Dosaggio della lattico deidrogenasi

Il rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) al termine dell'incubazione è un indice di tossicità. L'LDH è stato misurato nei sovranatanti delle cellule usando un kit commercialmente disponibile (Sigma-Aldrich) (38).

Analisi statistica

Il risultati corrispondono alla media \pm SEM. I valori dei gruppi sono stati sottoposti a test t di Student (39). La significatività è stata definita come $p < 0.01$.

RISULTATI

Valutazione dell'espressione dell'mRNA per il VEGF nei basofili umani

In una prima serie di esperimenti abbiamo valutato l'espressione dell'mRNA per il VEGF nei basofili purificati (> 99%) dal sangue periferico di donatori sani. I basofili sono stati lisati in un buffer di lisi per la preparazione dell'RNA totale. L'RNA è stato retrotrascritto e poi amplificato con 40 cicli di PCR in presenza di primers specifici per le differenti isoforme di VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e per la GAPDH, utilizzata come controllo.

Nei basofili umani, l'analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ha mostrato l'espressione di tre isoforme del VEGF-A (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, e VEGF-A₁₈₉) e di due isoforme di VEGF-B (VEGF-B₁₆₇, e VEGF-B₁₈₆) (Fig. 2). Al contrario, l'mRNA di VEGF-C e VEGF-D, mediatori dell'angiogenesi linfatica (7), non sono stati rilevati.

Determinazione del VEGF-A nei basofili umani

In una serie parallela di esperimenti abbiamo valutato il contenuto a livello proteico di VEGF-A dei basofili purificati. I basofili sono stati lisati con 1% Triton X-100/PBS in presenza di inibitori delle proteasi. Il contenuto totale

di VEGF-A immunoreattivo è stato misurato mediante ELISA. In otto preparazioni la concentrazione di VEGF-A nei basofili umani varia da 50 a 160 pg/10⁶ basofili con un valore medio di 144 ± 10,8 pg/10⁶ cellule. Questi risultati dimostrano che i basofili umani esprimono VEGF-A anche livello di proteina.

Localizzazione del VEGF-A nei basofili umani

Al fine di verificare la localizzazione intracitoplasmatica di VEGF-A, abbiamo analizzato cytopspin di preparazioni arricchite in basofili ottenuti dal sangue periferico mediante microscopia confocale. Abbiamo usato un anticorpo BB1 che riconosce specificamente la basogranulina presente nei granuli secretori dei basofili umani ma non nei neutrofilo, linfociti e monociti (40,41). Abbiamo inoltre utilizzato un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro gli aminoacidi 1-140 del VEGF-A. La figura 3A mostra la localizzazione della basogranulina nei granuli secretori dei basofili. La figura 3B mostra la localizzazione del VEGF-A nel citoplasma dei basofili. Infine, La figura 3C evidenzia la colocalizzazione dei granuli secretori BB1⁺ con l'immunoreattività per il VEGF-A. La marcatura dei basofili con anticorpi isotipici di controllo era negativa (dati non mostrati). Risultati simili sono stati ottenuti con altre 10 preparazioni di basofili purificati dal sangue periferico di donatori sani. Questi risultati sono compatibili con l'ipotesi che il VEGF-A sia presente preformato nei granuli secretori dei basofili umani.

Localizzazione del VEGF-A nei basofili infiltranti i polipi nasali

I polipi nasali sono caratterizzati da iperplasia dell'epitelio mucosale e delle ghiandole sottomucose, un infiltrato di cellule infiammatorie e proliferazione dei vasi sanguigni (42). Il VEGF ed i suoi recettori sono implicati nella poliposi nasale (43). I polipi nasali ottenuti da 4 pazienti sottoposti a polipectomia sono stati esaminati mediante immunistochemica usando un anticorpo BB1 che riconosce specificamente i basofili umani anche nei tessuti (40,41) ed un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro gli aminoacidi 1-140 del VEGF-A. La figura 4A mostra basofili BB1⁺ nell'area perivascolare. La localizzazione della basogranulina nei granuli secretori dei basofili. Queste cellule sono anche positive per il VEGF-A (Fig. 4B). La figura 4C mostra inoltre la colocalizzazione di BB1⁺ con l'immunoreattività per il VEGF-A. La marcatura dei tessuti con anticorpi isotipici di controllo era negativa (dati non mostrati). Non sono stati rilevati basofili nella mucosa nasale normale ottenuta dai turbinati medi (dati non mostrati).

Cinetica del rilascio di VEGF-A ed istamina dai basofili umani

In una serie di 5 esperimenti sono state valutate le cinetiche di rilascio di VEGF-A e di istamina da basofili attivati immunologicamente con anti-IgE (0,3 µg/ml). La Figura 5 mostra che i basofili incubati con anti-IgE rilasciano rapidamente istamina, con un picco a 30 min. Figura 5 mostra che la

stimolazione dei basofili con anti-IgE causa un piccolo aumento della secrezione di VEGF-A rilevabile a 30 min. La stimolazione con anti-IgE induce un significativo incremento di VEGF-A, misurabile nei sovrinatanti, che raggiunge un plateau a 2 ore e rimane stabile sino a 4 ore. I basofili tenuti in coltura per 3-4 h hanno uno spontaneo rilascio di istamina (~ 10%) e di VEGF-A (~ 20 pg/10⁶ cellule).

Poiché il rilascio di VEGF-A indotto dall'anti-IgE richiede ore di incubazione, è verosimile che dipenda da sintesi proteica *de novo*. Al fine di investigare questo fenomeno abbiamo valutato gli effetti della cicloesimide (un inibitore della sintesi proteica) su entrambe le fasi di rilascio del VEGF-A, quella precoce (30 min) e quella più tardiva (2 h). In 3 esperimenti, la preincubazione (30 min) dei basofili con cicloesimide (10 µM) non altera la fase precoce (30 min) di rilascio di VEGF-A ($24,7 \pm 2,0$ vs $25,3 \pm 3,4$ pg/10⁶ cellule). Al contrario, la produzione di VEGF-A dopo due ore di incubazione con l'anti-IgE era significativamente ridotta dalla cicloesimide ($58,0 \pm 3,7$ vs $34,3 \pm 4,7$ pg/10⁶ cellule; $p < 0,01$). Questi risultati confermano l'ipotesi che l'aumento del VEGF-A nei sovrinatanti dei basofili incubati con anti-IgE per 2 h sia attribuibile alla sintesi proteica, e parallelamente suggeriscono che l'aumento nelle concentrazioni di VEGF-A osservato dopo 30 min possa essere riconducibile al rilascio nel mezzo del VEGF-A preformato presente nei granuli dei basofili.

Recentemente Abdel-Majid e Marshall (44) hanno dimostrato che la PGE₂ induce fortemente la sintesi di VEGF-A dai mastociti umani. Quindi, in 3 esperimenti, abbiamo verificato gli effetti di un ampio spettro di concentrazioni di PGE₂ (10⁻⁹ - 10⁻⁵ M) sulla sintesi di VEGF-A nei basofili umani. In nessuno dei nostri esperimenti la PGE₂ si è mostrata attiva nell'indurre il rilascio di VEGF-A dai basofili umani.

Espressione dei recettori per il VEGF nei basofili umani

I recettori per il VEGF, VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/KDR, sono costitutivamente espressi sulle cellule endoteliali (45) e su diverse cellule del sistema immunitario (46-48). Questi due recettori presentano una notevole analogia strutturale; tuttavia, differiscono per le loro caratteristiche biochimiche.

Abbiamo analizzato l'espressione a livello di mRNA di VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e sVEGFR-1/Flt-1 nei basofili umani. La Figura 6A mostra che l'mRNA per il VEGFR-2/KDR è espresso nei basofili, al contrario non è stata rilevata l'espressione di VEGFR-1/Flt-1 in tutte le preparazioni testate. D'interesse è che i basofili esprimono costitutivamente anche sVEGFR-1/Flt-1. In una serie successiva di esperimenti, abbiamo usato due differenti coppie di primers al fine di rilevare l'mRNA per VEGFR-1/Flt-1, come controllo positivo abbiamo scelto i PMN e i PBMC (47,49-51). La Figura 6B mostra i risultati di

un esperimento tipico che conferma che VEGFR-1/Flt-1 è espresso nei PMN e nei PBMC ma non nei basofili umani.

Abbiamo quindi studiato l'espressione dei recettori per il VEGF a livello proteico mediante citofluorimetria. I basofili sono stati incubati con anticorpi monoclonali anti-VEGFR-2/KDR coniugati con il fluorocromo PE, con anti-IgE coniugate con FITC o con controlli isotipici. La Figura 7 mostra che la maggior parte dei basofili esprimono costitutivamente VEGFR-2/KDR (70-84%). Questi risultati dimostrano che i basofili sintetizzano l'mRNA di KDR e lo esprimono a livello di membrana.

Espressione di NRP1 ed NRP2 nei basofili umani

Sia la NRP1 che la NRP2 sono espresse dalle cellule endoteliali (15,52). Crescenti evidenze suggeriscono che la NRP1 sia espressa anche da cellule Treg, linfociti B di roditore, monociti, cellule T e cellule dendritiche (53-55). La figura 8 mostra i risultati di un tipico esperimento di RT-PCR che dimostra che i basofili umani purificati dal sangue periferico di donatori sani esprimono costitutivamente l'mRNA per le due forme di neuropilina.

Successivamente abbiamo quindi verificato l'espressione a livello proteico di NRP1 ed NRP2 mediante analisi citofluorimetrica. I basofili sono stati incubati con anticorpi policlonali di coniglio anti-NRP1 ed anti-NRP2 o con anti-IgE coniugate con PE. Per la marcatura indiretta le cellule sono state

successivamente marcate con un anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con il fluorocromo FITC, o con controlli isotipici. La figura 9 mostra che la maggior parte (>80%) dei basofili umani esprime costitutivamente sulla membrana plasmatica NRP1 ed NRP2.

Effetto del VEGF-A₁₆₅ e del VEGF-A₁₂₁ sulla chemiotassi dei basofili umani

Tra le isoforme del VEGF-A, il VEGF-A₁₆₅ rappresenta l'isoforma più studiata per il suo effetto angiogenico e mitogeno sulle cellule endoteliali (10). Abbiamo valutato l'effetto *in vitro* di un ampio range di concentrazioni di VEGF-A₁₆₅ (5-500 ng/ml) sulla chemiotassi dei basofili umani. La figura 10 mostra i risultati di sette esperimenti di chemiotassi in cui basse concentrazioni di VEGF-A₁₆₅ esercitano un effetto chemiotattico sui basofili con un plateau a 250 ng/ml.

Abbiamo quindi comparato gli effetti di concentrazioni crescenti di VEGF-A₁₆₅ e di VEGF-A₁₂₁ sulla chemiotassi dei basofili, dimostrando che la potenza del VEGF-A₁₂₁ è significativamente inferiore a quella del VEGF-A₁₆₅ (Fig. 10).

Per stabilire se la migrazione dei basofili fosse dovuta alla chemiotassi o alla chemochinesi, è stata eseguita un'analisi di controllo. È stato dimostrato che VEGF-A₁₆₅ induce una migrazione dei basofili dose-dipendente solo quando viene aggiunto nei pozzetti inferiori della camera di Boyden. Viceversa una concentrazione ottimale di VEGF-A₁₆₅ (250 ng/ml), aggiunta alle cellule nei

pozzetti superiori o in entrambi i compartimenti, non induce alcuna migrazione dei basofili (dati non mostrati). Pertanto, la migrazione dei basofili indotta dal VEGF-A₁₆₅ deriva dalla chemiotassi e non dalla chemochinesi.

Effetto degli anticorpi anti-VEGFR-2/KDR sulla chemiotassi dei basofili umani indotta da VEGF-A₁₆₅

Per verificare se la chemiotassi indotta da VEGF-A fosse mediata dall'attivazione di VEGFR-2/KDR, sono stati effettuati degli esperimenti di inibizione utilizzando anticorpi contro tali recettori. La Figura 11 mostra che la preincubazione dei basofili con un anticorpo monoclonale anti-VEGFR-2/KDR (1 - 10 µg/ml) inibisce in maniera dose-dipendente la chemiotassi dei basofili VEGF-A-dipendente. La preincubazione dei basofili con un anticorpo isotipico irrilevante (1 - 10 µg/ml) non altera la chemiotassi dei basofili indotta da VEGF-A₁₆₅. Quindi, il legame del VEGF-A₁₆₅ al recettore VEGFR-2/KDR sembra essere essenziale per la chemiotassi dei basofili VEGF-A-dipendente.

Desensibilizzazione eterologa tra VEGF-A₁₆₅ ed eotassina o Hp(2-20)

I basofili umani esprimono un'ampia varietà di recettori di membrana la cui attivazione induce la chemiotassi. Recentemente abbiamo dimostrato che la maggior parte dei basofili (~ 80%) esprime il recettore per chemochine CCR3

che attivato dall'eotassina/ CCL11 ne induce la chemiotassi (34). Inoltre, è stato anche dimostrato che il peptide Hp(2-20), rilasciato da *Helicobacter pylori*, è un potente fattore chemiotattico *in vitro* per i basofili attraverso l'attivazione dei recettori per FMLP (FPRL1 e FPRL2) (23). È noto che la preincubazione dei basofili con alte concentrazioni di un agonista comporta una desensibilizzazione nei confronti dello stesso stimolo o di altri stimoli che agiscono sullo stesso recettore (23). Abbiamo quindi valutato gli effetti della desensibilizzazione eterologa tra VEGF-A₁₆₅ ed eotassina or Hp(2-20) sulla chemiotassi dei basofili. I basofili purificati sono stati preincubati con buffer, con VEGF-A₁₆₅ (500 ng/ml), eotassina (100 ng/ml) o Hp(2-20) (500 nM) in P-EDTA per 1 ora a 37 °C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate e sospese in PACGM. La Figura 12A mostra i risultati di un tipico esperimento nel quale la risposta al VEGF-A₁₆₅ è stata abolita dalla preincubazione con lo stimolo omologo. Quando i basofili venivano preincubati con eotassina o Hp(2-20), che esplicano i loro effetti interagendo con recettori diversi (23,34), la risposta alla stimolazione con VEGF-A₁₆₅ non era influenzata.

Risultati simili sono stati ottenuti quando i basofili erano stimolati con concentrazioni inferiori (100 ng/ml) di VEGF-A₁₆₅ (Fig. 12B).

Effetto del VEGF-A₁₆₅ sul rilascio di istamina e di citochine dai basofili

In una serie successiva di esperimenti, abbiamo valutato gli effetti di

concentrazioni crescenti di VEGF-A₁₆₅ sul rilascio di istamina e di citochine (IL-4 e IL-13) dai basofili purificati (>99%) da soggetti sani. Il VEGF-A₁₆₅ non determina rilascio di istamina e di citochine dai basofili. Un anticorpo anti-IgE (0,1 µg/ml) utilizzato come controllo induceva il rilascio di quantità significative di istamina e di citochine dai basofili (dati non mostrati). Inoltre, in 3 esperimenti la preincubazione dei basofili con VEGF-A₁₆₅ per 1 h a 37°C non modifica il rilascio di istamina, di IL-4 e di IL-13 indotto da concentrazioni ottimali di anti-IgE (dati non mostrati).

Il VEGF secreto dai basofili umani induce una risposta angiogenica in vivo

I risultati degli esperimenti precedenti dimostrano che un'isoforma del VEGF-A sintetizzata dai basofili umani (VEGF-A₁₆₅) induce *in vitro* la chemiotassi di tali cellule. In una serie successiva di esperimenti, abbiamo valutato *in vivo* la capacità di indurre una risposta angiogenica di lisati e di sovrantanti di basofili attivati immunologicamente. Per tali esperimenti abbiamo utilizzato la membrana corionallantoidea di embrione di pollo (CAM).

Nelle CAM di embrioni di pollo all'ottavo giorno di incubazione sono state impiantate spugne di gelatina imbevute di sovrantante di basofili isolati dal sangue periferico. Le spugne adsorbite con il solo mezzo o con VEGF erano utilizzate come controllo negativo e positivo, rispettivamente. Al

dodicesimo giorno di incubazione (Fig. 13), l'osservazione al microscopio delle CAM mostrava che sovrinatanti di basofili umani attivati con anti-IgE inducono una risposta angiogenica caratterizzata dalla presenza di vasi allantoici, che si distribuiscono radialmente attraverso la spugna (numero di vasi nella spugna-CAM limite = 27 ± 4). Una simile risposta angiogenica macroscopica è stata osservata negli impianti trattati con 500 ng di rVEGF (numero di vasi nella spugna-CAM limite = 30 ± 4), mentre nessuna risposta vascolare è stata osservata nelle spugne trattate con il solo mezzo (numero di vasi nella spugna-CAM limite = 7 ± 2). Per determinare se la risposta angiogenica indotta dai basofili fosse dovuta in parte al VEGF preformato, i sovrinatanti dei basofili sono stati incubati con anticorpi anti-VEGF e poi aggiunti alla CAM. Gli anticorpi anti-VEGF riducevano in maniera significativa la risposta angiogenica dei basofili (Fig. 13). L'incubazione dei basofili con il controllo isotipico non influenzava la risposta angiogenica (dati non mostrati).

DISCUSSIONE

Il sistema VEGF/recettore è considerato il principale sistema che regola l'angiogenesi ed il rimodellamento tessutale (2). Il VEGF-A, oltre ad essere considerato uno dei più potenti fattori angiogenici, esplica importanti effetti regolatori in diversi processi infiammatori (4).

Nel nostro studio abbiamo identificato un nuovo meccanismo attraverso il quale i basofili regolano l'angiogenesi mediante la sintesi e la secrezione di differenti isoforme di VEGF-A. Abbiamo inoltre identificato un nuovo loop autocrino dimostrando che il VEGF-A è un potente fattore chemiotattico per i basofili attraverso l'interazione con il recettore VEGFR-2/KDR.

I basofili isolati dal sangue periferico di donatori sani esprimono mRNA per le tre principali forme di VEGF-A (121, 165, 189), e per due isoforme di VEGF-B (167, 186). L'mRNA per VEGF-C e VEGF-D, due mediatori della linfoangiogenesi, non è invece rilevabile nei basofili (7). Perciò, sembra che il VEGF sintetizzato dai basofili umani giochi un ruolo selettivo nell'angiogenesi vascolare. Sembrerebbe, inoltre, che alcune isoforme di VEGF-A siano più espresse nei basofili che nei monociti, il che enfatizza ulteriormente il ruolo delle cellule FcεRI⁺ nell'angiogenesi.

Abbiamo inoltre dimostrato che il VEGF-A è contenuto nei granuli citoplasmatici secretori dei basofili umani. Di particolare interesse è che il

VEGF è presente non soltanto nei basofili circolanti, ma anche nei basofili infiltranti i siti di infiammazione cronica. Quest'ultima osservazione enfatizza la possibilità che il VEGF-A sintetizzato e rilasciato dai basofili possa giocare un doppio ruolo nell'angiogenesi infiammatoria. Infatti, è possibile che i basofili circolanti partecipino, attraverso il rilascio di VEGF-A, al normale turn-over delle cellule endoteliali in svariate condizioni fisiopatologiche (sviluppo embrionale, ovulazione e cicatrizzazione delle ferite) (2). Diverso è invece il ruolo dei basofili infiltranti i siti di flogosi. Essi, intervenendo in una fase successiva, in diversi processi patologici (crescita neoplastica, rimodellamento tessutale, retinopatia diabetica etc.) andrebbero ad implementare la sintesi locale di VEGF-A che, rilasciato immunologicamente, è in grado di promuovere l'angiogenesi.

I nostri risultati indicano che il rilascio di VEGF-A, da parte dei basofili umani attivati immunologicamente, è regolato diversamente rispetto al rilascio di altri mediatori preformati (istamina) e/o sintetizzati *de novo* (IL-4 e IL-13). Infatti, il rilascio di istamina, IgE-mediato, è estremamente rapido e raggiunge un plateau dopo circa 15 minuti. Al contrario, il rilascio di IL-4 e di IL-13 raggiunge il plateau all'incirca dopo 4 e 18 ore, rispettivamente (56). Il VEGF-A è preformato nei granuli secretori ed il suo rilascio dai basofili attivati sembrerebbe seguire un pattern bifasico: un rapido rilascio nei primi 30 minuti ed un secondo picco che si completa in circa 2-4 ore. Nel corso

della prima fase è probabilmente secreto tutto il VEGF-A preformato, mentre quello rilasciato successivamente costituisce il prodotto della sintesi *de novo*. E' interessante sottolineare che nei mastociti umani (26) e nei roditori (25) le cinetiche di liberazione del VEGF-A presentano un diverso pattern di rilascio.

I mastociti, i basofili e gli eosinofili sono considerati le cellule effettrici nelle malattie allergiche (57,58). È stato dimostrato che i mastociti umani sintetizzano e rilasciano diverse isoforme di VEGF-A (26). Anche gli eosinofili umani esprimono fattori con effetti pro-angiogenici diretti (59). Nel nostro studio abbiamo dimostrato che i basofili umani rilasciano il VEGF-A. Tali dati supportano l'ipotesi che la secrezione di fattori angiogenici dalle cellule effettrici primarie delle malattie allergiche potrebbe rappresentare un aspetto rilevante del rimodellamento tessutale nelle patologie allergiche croniche.

Un importante aspetto di questo studio è la dimostrazione che il VEGF-A è un potente fattore chemiotattico per i basofili umani. Questa osservazione evidenzia un nuovo loop autocrino che comprende il rilascio immunologico del VEGF-A dai basofili umani e l'espressione dei suoi recettori sulla superficie di queste cellule. I recettori del VEGF (VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/KDR) sono stati identificati su differenti tipi cellulari (5). Nel nostro studio abbiamo dimostrato che i basofili umani esprimono il recettore VEGFR-2/KDR, la forma solubile del VEGFR-1 (sVEGFR-1/Flt-1) e i due corecettori

NRP1 ed NRP2. Il recettore VEGFR-2/KDR sembra sia espresso sulla superficie cellulare di circa il 70% dei basofili purificati da donatori sani. Abbiamo dimostrato che gli anticorpi anti-VEGFR-2/KDR antagonizzano l'effetto chemiotattico di VEGF-A sui basofili umani. Inoltre, abbiamo condotto alcuni esperimenti di cross-desensibilizzazione per verificare la specificità della via di attivazione del VEGF-A. I nostri esperimenti hanno dimostrato che i basofili preincubati con VEGF-A non davano alcuna risposta chemiotattica in seguito ad una successiva stimolazione con lo stimolo omologo. Al contrario, quando i basofili venivano preincubati con eotassina, che lega il recettore CCR3 (34), o con Hp(2-20), che lega FPRL1 ed FPRL2 (23), la risposta chemiotattica al VEGF-A non era influenzata. I risultati di questi due gruppi di esperimenti concordano con l'ipotesi che il VEGF-A agisce attraverso l'interazione specifica con VEGFR-2/KDR per indurre la chemiotassi dei basofili.

L'espressione dei recettori del VEGF sulle cellule del sistema immunitario è ancora in studio. In letteratura è noto che la maggior parte dei monociti umani esprimono solo VEGFR-1/Flt-1, ma non VEGFR-2/KDR (47,49), diversamente dalle cellule endoteliali che esprimono entrambi i recettori (45). Comunque, una piccola frazione di cellule CD14⁺ presenti nel circolo sanguigno esprime VEGFR-2/KDR (60). È stato dimostrato che il recettore VEGFR-2/KDR, espresso su di un piccolo numero di cellule CD34⁺,

è rapidamente down-regolato quando esse vanno incontro a differenziazione emopoietica (61).

Abbiamo inoltre dimostrato che la maggior parte dei basofili umani esprime NRP1, un corecettore per VEGF-A₁₆₅ (15,5) in grado di aumentare al risposta indotta da VEGFR-2/KDR. Abbiamo anche dimostrato che i basofili esprimono NRP2 a livello di mRNA e di proteina. NRP1 non ha una attività enzimatica conosciuta, e sembrerebbe partecipare agli eventi trasduzionali formando complessi con i recettori a tirosina chinasi. E' stata, però, evidenziata una funzione autocrina del VEGF supportata dalla NRP1 anche in cellule che non esprimono VEGFR-2/KDR (62). Questi dati sono compatibili con l'ipotesi che, in alcuni tipi cellulari, NRP1 possa funzionare sia da solo che in associazione con il VEGFR-2/KDR.

I risultati di questo studio potrebbero avere importanti implicazioni di ordine farmacologico. Infatti, è possibile ipotizzare che un efficace antagonismo del sistema VEGF/recettore, ottenuto utilizzando un inibitore a peso molecolare della tirosina-chinasi associata ai VEGFRs (63), un anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF (64), un decoy receptor solubile per il VEGF (65) o proteine di fusione che sequestrano il VEGF (66), possa essere utilizzato nella pratica clinica per controllare alcune patologie, come quelle allergiche, nelle quali i basofili infiltranti i siti di infiammazione giocano un ruolo rilevante.

In conclusione, i risultati descritti in questo studio hanno identificato i basofili del sangue periferico e quelli infiltranti i tessuti, come principale fonte di VEGF-A, importante fattore angiogenico. L'identificazione dei recettori VEGFR-2/KDR, NRP1 ed NRP2 sulla superficie dei basofili ha individuato un nuovo loop autocrino. Queste scoperte conducono ad ipotizzare che i basofili possano modulare l'angiogenesi attraverso il rilascio di fattori angiogenici.

BIBLIOGRAFIA

1. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-74.
2. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Med* 1:27-31.
3. Yancopoulos, G. D., S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, J. Holash. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-8.
4. Ferrara, N., H. P. Gerber, J. Lecouter. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9:669-76.
5. Tammela, T., B. Enholm, K. Alitalo, K. Paavonen. 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 65:550-63.
6. Dor, Y., R. Porat, E. Keshet. 2001. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:C1367-74.
7. Karkkainen, M. J., T. Makinen, K. Alitalo. 2002. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell. Biol.* 4:E2-E5.
8. Frelin, C., A. Ladoux, G. D'Angelo. 2000. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis. *Ann. Endocrinol.* 61:70-4.

9. Robinson, C. J., S. E. Stringer. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 114:853-65.
10. Keyt, B. A., L. T. Berleau, H. V. Nguyen, H. Chen, H. Heinsohn, R. Vandlen, N. Ferrara. 1996. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.* 271: 7788-95.
11. Matsumoto, T., L. Claesson-Welsh. 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE.* 112:RE21.
12. Park, J. E., H. H. Chen, J. Winer, K. A. Houck, N. Ferrara. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 269:25646-54.
13. Kendall, R. L., G. Wang, K. A. Thomas. 1996. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226:324-8.
14. Roeckl, W., D. Hecht, H. Sztajer, J. Waltenberger, A. Yayon, H. A. Weich. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp. Cell. Res.* 241:161-70.

15. Soker, S., S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld, M. Klagsbrun. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735-745.
16. Marone G., L. M. Lichtenstein, S. J. Galli. 2000. Mast cells and Basophils. *Academic Press. San Diego.*
17. Galli, S. J., M. Tsai, B. K. Wershil. The *c-kit* receptor, stem cell factor and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J Pathol.* 142:965-74.
18. de Paulis, A., G. Minopoli, E. Arbustini, G. De Crescenzo, F. Dal Piaz, P. Pucci, T. Russo, G. Marone. 1999. Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. *J. Immunol.* 163:2799-808.
19. Williams, C. M. M., S. J. Galli. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic diseases. *J Allergy Clin. Immunol.* 105:847-59.
20. Metcalfe, D. D., D. Baram, Y. A. Mekori. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033-79.
21. KleinJan, A., A. R. McEuen, M. D. Dijkstra, M. G. Buckley, A. F. Walls, W. J. Fokkens. 2000. Basophil and eosinophil accumulation and mast cell degranulation in the nasal mucosa of patients with hay fever after local allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol.* 106:677-86.

22. KleinJan, A., J. G. Vinke, L. W. Severijnen, W. J. Fokkens. 2000. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *Eur Respir J.* 15:491-97.
23. de Paulis, A., N. Prevede, I. Fiorentino, A. F. Walls, M. Curto, A. Petraroli, V. Castaldo, P. Ceppa, R. Fiocca, G. Marone. 2004. Basophils infiltrate human gastric mucosa at sites of *Helicobacter pylori* infection, and exhibit chemotaxis in response to *H.pylori*-derived peptide Hp(2-20). *J. Immunol.* 172:7734-43.
24. Hiromatsu, Y., S. Toda. 2003. Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech.* 60:64-9.
25. Ribatti, D. E. Crivellato, L. Candussio, A. Vacca, B. Nico, V. Benaglio, L. Roncali, F. Dammacco. 2002. Angiogenic activity of rat mast cells in the chick embryo chorioallantoic membrane is down-regulated by treatment with recombinant human alpha-2a interferon and partly mediated by fibroblast growth factor-2. *Haematologica.* 87:465-71.
26. Boesiger, J., M. Tsai, M. Maurer, M. Yamaguchi, L. F. Brown, K. P. Claffey, H. F. Dvorak, S. J. Galli. 1998. Mast cells can secrete vascular permeability factor/ vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med.* 188:1135-45.

27. Grutzkau, A., S. Kruger-Krasagakes, H. Baumeister, C. Schwarz, H. Kogel, P. Welker, U. Lippert, B. M. Henz, A. Moller. 1998. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell.* 9:875-84.
28. Gilchrest, H., B. Cheewatrakoolpong, M. Billah, R. W. Egan, J. C. Anthes, S. Greenfeder. 2003. Human cord blood-derived mast cells synthesize and release I-309 in response to IgE. *Life Sci.* 73:2571-81.
29. Abdel-Majid, R. M., J. S. Marshall. 2004. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J Immunol.* 172:1227-36.
30. Chetta, A., A. Zanini, A. Foresi, M. Del Donno, A. Castagnaro, R. D'Ippolito, S. Baraldo, R. Testi, M. Saetta, D. Olivieri. 2003. Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone. *Am J Respir Crit Care Med.* 167:751-57.
31. Hoshino, M., M. Takahashi, N. Aoike. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 107:295-301.
32. Lee, Y. C., H. K. Lee. 2001. Vascular endothelial growth factor in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 107:1106-12.

33. de Paulis, A., R. Cirillo, A. Ciccarelli, M. Condorelli, G. Marone. 1991. FK-506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human FcεRI⁺ cells. *J. Immunol.* 146:2374-81.
34. Romagnani, P., A. de Paulis, C. Beltrame, F. Annunziato, V. Dente, E. Maggi, S. Romagnani, G. Marone. 1999. Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am. J. Pathol.* 155:1195-204.
35. Siraganian, R. P. 1974. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal. Biochem.* 57:383-406.
36. Ribatti, D., E. Crivellato, L. Candussio, B. Nico, A. Vacca, L. Roncali, F. Dammacco. 2001. Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Clin. Exp. All.* 31:602-08.
37. Tuccillo, C., A. Cuomo, A. Rocco, E. Martinelli, S. Staibano, M. Mascolo, A. G. Gravina, G. Nardone, V. Ricci, F. Ciardiello, C. Del Vecchio Blanco, M. Romano. 2005. Vascular endothelial growth factor and neo-angiogenesis in *H. pylori* gastritis in humans. *J. Pathol.* 207: 277-284.
38. de Paulis, A., N. Montuori, N. Prevete, I. Fiorentino, F.W. Rossi, V. Visconte, G. Rossi, G. Marone, P. Ragno. 2004. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an

- endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2. *J Immunol.* 173:5739-48.
39. Snedecor, G. W., and W. G. Cochran. 1980. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press. Ames, IA.
40. Ying, S., D. S. Robinson, Q. Meng, L. T. Barata, A. R. McEuen, M. G. Buckley, A. F. Walls, P. W. Askenase, A. B. Kay. 1999. C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue eosinophilia, and relationship to basophils and other C-C chemokines (monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES). *J. Immunol.* 163: 3976-3984.
41. McEuen, A. R., M. G. Buckley, S. J. Compton, and A. F. Walls. 1999. Development and characterization of a monoclonal antibody specific for human basophils and identification of a unique secretory product of basophil activation. *Lab. Invest.* 79: 27-38.
42. Kakoi, H., and F. Hiraide. 1987. A histological study of formation and growth of nasal polyps. *Acta Otolaryngol.* 103: 137-144.
43. Wittekindt, C., A. Hess, W. Bloch, S. Sultanie, and O. Michel. 2002. Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF receptors in nasal

- polyps as compared to normal turbinate mucosa. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 259: 294-298.
44. Abdel-Majid, R. M., J. S. Marshall. 2004. Prostaglandin E₂ induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J. Immunol.* 172: 1227-1236.
45. Ferrara, N., T. Davis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 18:4-25.
46. Feistritzer, C., Kaneider, N. C., Sturn D. H., Mosheimer, B. A., Kähler C. M., Wiedermann C. J. 2004. Expression and function of the vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 in human eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30:729-35.
47. Barleon, B., S. sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani, D. Marme. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-43.
48. Levi-Schaffer, F., J. Pe'er. 2001. Mast cells and angiogenesis. *Clin Exp Allergy* 31:521-24.
49. Sawano, A., S. Iwai, Y. Sakurai, M. Ito, K. Shitara, T. Nakahata, M. Shibuya. 2001. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97:785-91.

50. Eubank, T. D., R. Roberts, M. Galloway, Y. Wang, D. E. Cohn, C. B. Marsh. 2004. GM-CSF induces expression of soluble VEGF receptor-1 from human monocytes and inhibits angiogenesis in mice. *Immunity* 21: 831-842.
51. Ancelin, M., S. Chollet-Martin, M. A. Hervé, C. Legrand, J. El Benna, M. Perrot-Appianat. 2004. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab. Invest.* 84: 502-12.
52. Yamada, Y., Y. Oike, H. Ogawa, Y. Ito, H. Fujisawa, T. Suda, N. Takakura. 2003. Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood* 101: 1801-09.
53. Tordjman, R., Y. Lepelletier, V. Lamarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine, P-H. Roméo. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.* 3: 477-482.
54. Bruder, D., M. Probst-Kepper, A. M. Westendorf, R. Geffers, S. Biessert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T-cells. *Eur. J. Immunol.* 34: 623-30.
55. Genovese, A., G. Borgia, L. Bjorck, A. Petraroli, A. de Paulis, M. Piazza, G. Marone. 2003. Immunoglobulin superantigen protein L induces IL-4

- and IL-13 secretion from human Fc epsilon RI+ cells through interaction with the kappa light chains of IgE. *J Immunol.* 170:1854-61.
56. Marone, G., M. Triggiani, A. de Paulis. 2005. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma. *Trends Immunol.* 26:25-31.
57. Kay, A. B., L. Barata, Q. Meng, S. R. Durham, S. Ying. 1997. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 113:196-99.
58. Puxeddu, I., A. Alian, A. M. Piliponsky, D. Ribatti, A. Panet, F. Levi-Schaffer. 2005. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:628-36.
59. Elsheikh, E., M. Uzunel, Z. He, J. Holgersson, G. Nowak, S. Sumitran-Holgersson. 2005. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood* 106: 2347-55.
60. Casella, I., T. Feccia, C. Chelucci, P. Samoggia, G. Castelli, R. guerriero, I. Parolini, E. Petrucci, E. Pelosi, O. Morsilli, M. Gabbianelli, U. Testa, C. Peschle. 2003. Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* 101:1316-23.
61. Wang, L., H. Zeng, P. Wang, S. Soker, D. Mukhopadhyay. 2003. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J. Biol. Chem.* 49: 48848-60.

62. Wood, J. M., G. Bold, E. Buchdunger, R. Cozens, S. Ferrari, J. Frei, F. Hofmann, J. Mestan, H. Mett, T. O'Reilly, E. Persohn, J. Rösel, C. Schnell, D. Stover, A. Theuer, H. Towbin, F. Wenger, K. Woods-Cook, A. Menrad, G. Siemeister, M. Schirner, K. H. Thierauch, M. R. Schneider, J. Dreves, G. Martiny-Baron, F. Totzke, D. Marmé. 2000. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res.* 60: 2178-89.
63. Presta, L. G., H. Chen, S. J. O'Connor, V. Chisholm, Y. G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, N. Ferrara. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57:4593-99.
64. Holash, J., S. Davis, N. Papadopoulos, S. D. Croll, L. Ho, M. Russell, P. Boland, R. Leidich, D. Hylton, E. Burova, E. Ioffe, T. Huang, C. Radziejewski, K. Bailey, J. P. Fandl, T. Daly, S. J. Wiegand, G. D. Yancopoulos, J. S. Rudge. 2002. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci* 99:11393-98.
65. van Bruggen, N., H. Thibodeaux, J. T. Palmer, W. P. Lee, L. Fu, B. Cairns, D. Tumas, R. Gerlai, S. P. Williams, M. van Lookeren Campagne, N. Ferrara. 1999. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue

damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest.*
104:1613-20.

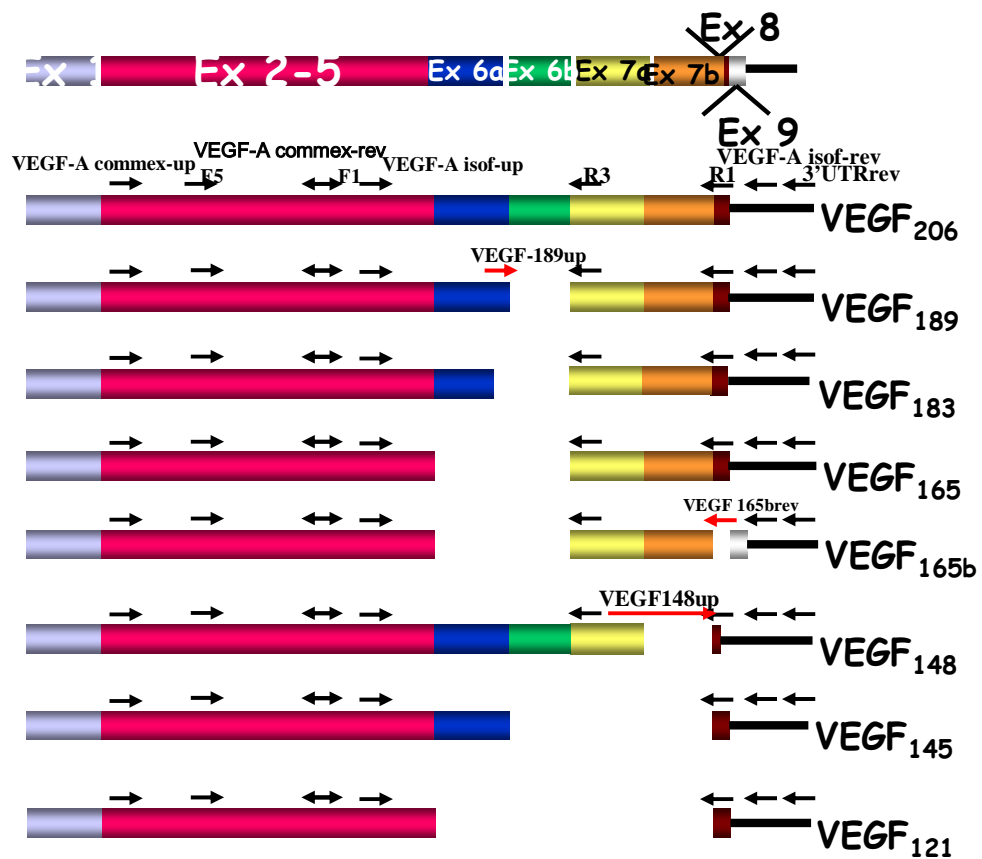


Fig. 1A. *Isoforme del VEGF-A.* Il gene umano del VEGF-A è costituito da 8 esoni separati da 7 introni. Meccanismi di splicing alternativo danno luogo a varie isoforme con differente capacità angiogenica. Il VEGF-A comprende almeno 6 isoforme. Il VEGF-A₁₆₅ è l'isoforma predominante e si presenta come una glicoproteina omodimerica basica che lega l'eparina e che una volta secreta rimane in parte legata alla superficie cellulare ed in parte alla matrice extracellulare (ECM). Il VEGF-A₁₄₅ ed il VEGF-A₁₈₃ sono le isoforme meno frequenti. Il VEGF-A₁₂₁ è una glicoproteina acida che non lega l'eparina. Il VEGF-A₁₈₉ ed il VEGF-A₂₀₆ sono isoforme altamente basiche e legano l'eparina con elevata affinità; esse sono completamente sequestrate nella ECM. Le isoforme legate alla ECM possono essere rilasciate in seguito al clivaggio del dominio C-terminale da parte della plasmina, che genera un frammento attivo.

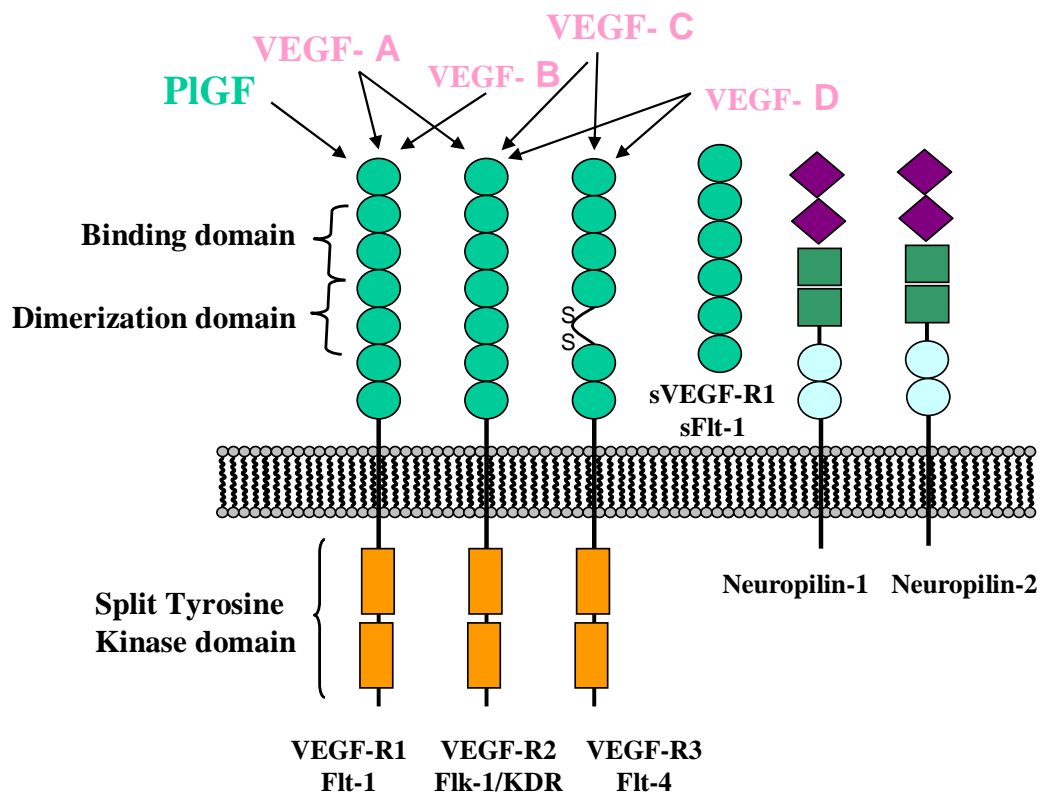


Fig. 1B. *Recettori del VEGF.* I recettori VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/KDR sono espressi sulla superficie cellulare della maggior parte delle cellule endoteliali e su diverse cellule del sistema immunitario. Il VEGFR-3/Flt-4 è principalmente coinvolto nei processi di angiogenesi linfatica, infatti ad esso si legano il VEGF-C ed il VEGF-D. Il VEGF-A lega sia VEGFR-1 che VEGFR-2. Al contrario, il PIGF e il VEGF-B interagiscono soltanto con il recettore VEGFR-1/Flt-1. Numerose evidenze in letteratura attribuiscono al recettore VEGFR-2/KDR il ruolo di principale mediatore degli effetti mitogenici ed angiogenici del VEGF nelle cellule endoteliali. Viceversa, il recettore VEGFR-1/Flt-1 non media un effettivo segnale mitogenico nelle cellule endoteliali ma può, specialmente durante lo sviluppo embrionale, esercitare un ruolo inibitorio attraverso il sequestro del VEGF bloccando la sua interazione con il VEGFR-2/KDR. Lo stesso ruolo inibitorio (“decoy receptor”) sarebbe esercitato anche dall’sVEGFR-1/Flt-1.

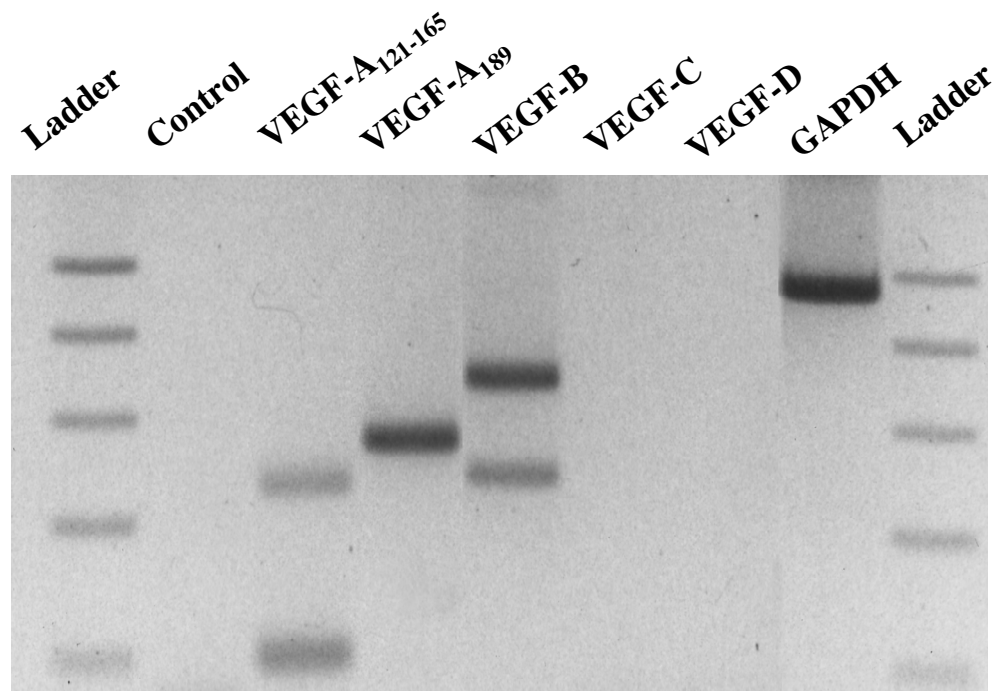


Fig. 2. *Espressione del VEGF nei basofili umani.* L'analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ha mostrato l'espressione nei basofili umani delle tre isoforme del VEGF-A (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, e VEGF-A₁₈₉) e di due isoforme di VEGF-B. Mentre l'mRNA per il VEGF-C ed il VEGF-D non è presente nei basofili umani.

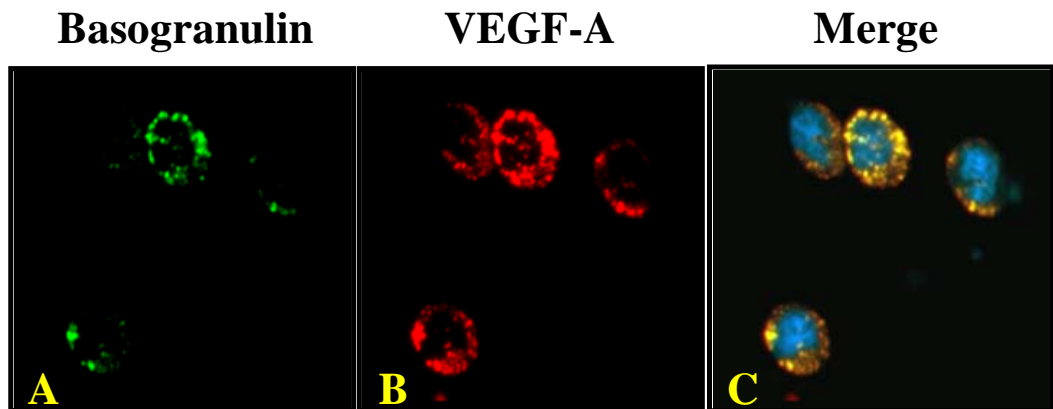


Fig. 3 . *Localizzazione intracellulare del VEGF-A nei basofili umani.* Una doppia immunofluorescenza condotta su una preparazione arricchita in basofili è stata analizzata al microscopio confocale.

- A localizzazione intracellulare della basogranulina evidenziata mediante un anticorpo monoclonale BB1 (verde)
- B cellule immunoreattive per VEGF-A (rosso)
- C colocalizzazione della basogranulina e del VEGF-A nei basofili umani (giallo)

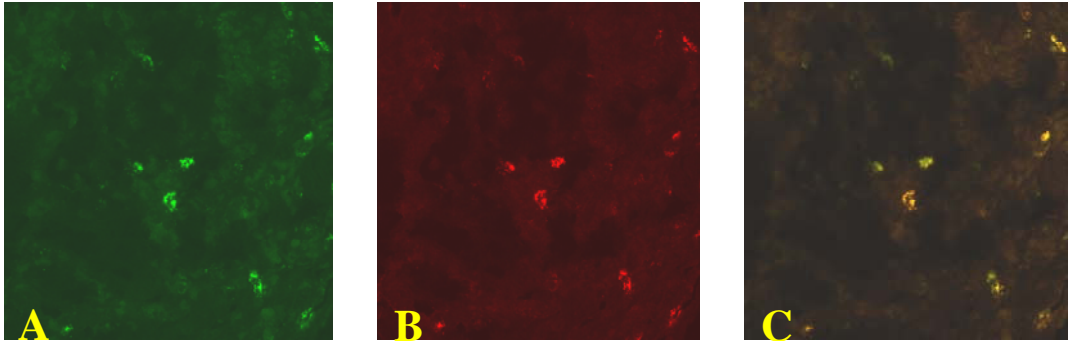


Fig. 4. *Microscopia confocale di polipi nasali.*

- A un cluster di basofili immunoreattivi per BB1 (verde)
- B cellule immunoreattive per VEGF-A (rosso)
- C colocalizzazione della basogranulina e del VEGF-A nei basofili umani infiltranti i polipi nasali (giallo)

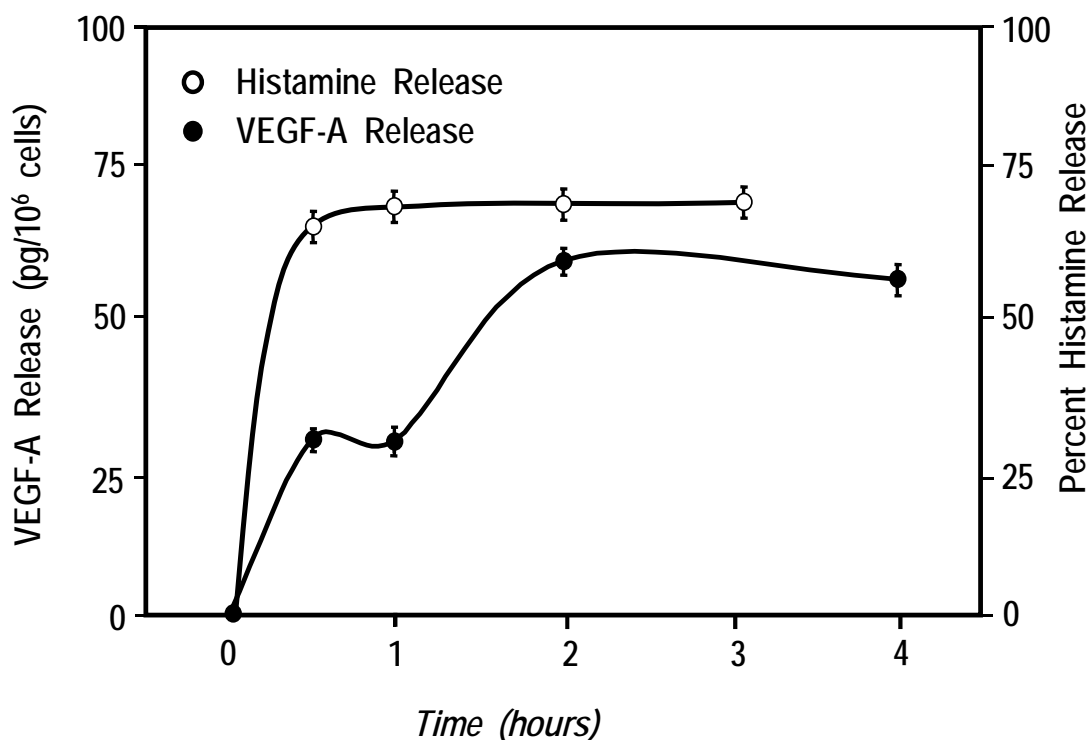


Fig. 5. *Cinetica di rilascio di VEGF-A e di istamina dai basofili umani.* I basofili sono stati incubati con tampone da solo (rilascio spontaneo) o con anti-IgE (0,3 $\mu\text{g/ml}$). Ad ogni tempo, il sovrinatante è stato raccolto e centrifugato (1000 x g, 4°C, 5 min). Il rilascio di VEGF-A dai basofili umani indotto dall'anti-IgE è indicato con i cerchi pieni. Il rilascio di istamina dai basofili umani indotto dall'anti-IgE è indicato con i cerchi vuoti. Il contenuto di VEGF-A e di istamina nei sovrinatanti dei basofili è stato valutato mediante metodica ELISA e fluoronefelometrica, rispettivamente. I valori sono la media \pm SEM di 5 esperimenti.

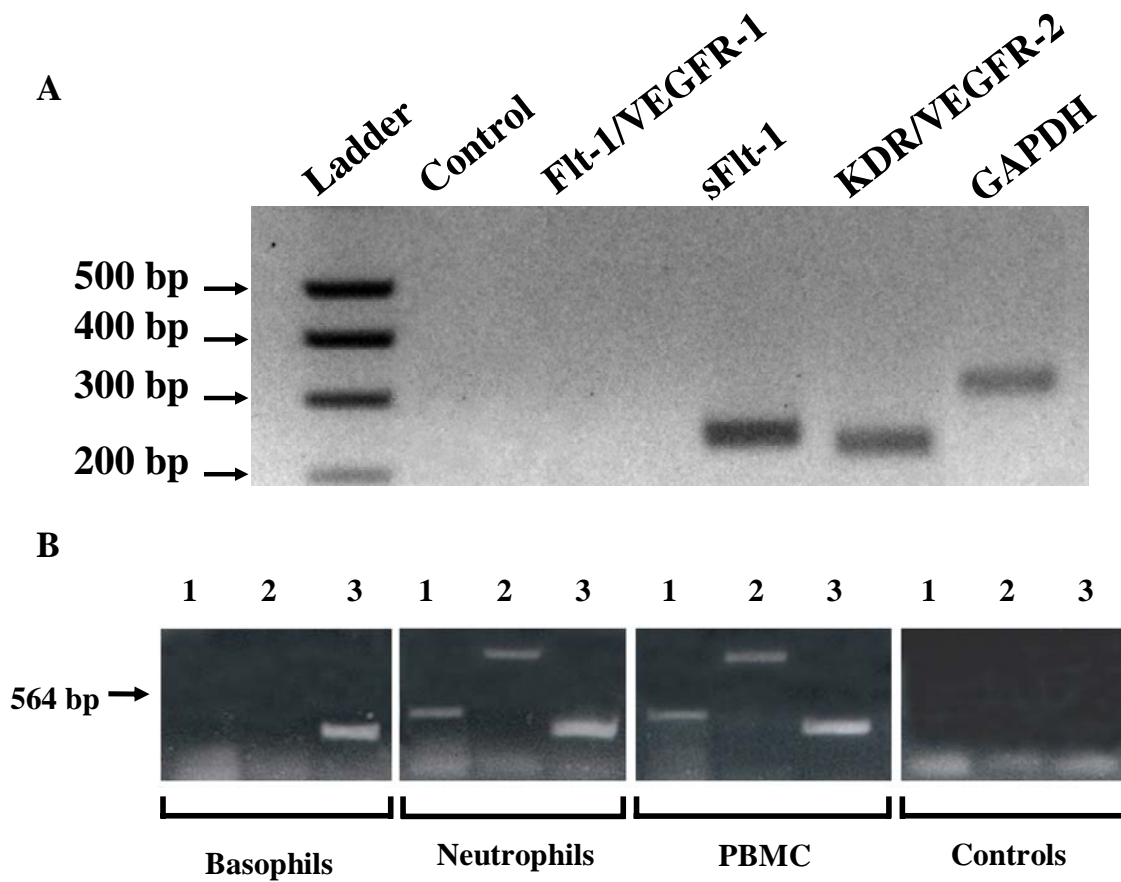


Fig. 6. *Espressione dei recettori del VEGF nei basofili umani.*

- A mediante RT-PCR è stata evidenziata nei basofili umani la presenza di mRNA specifico per VEGFR-2/KDR e per sVEGFR-1/Flt-1.
- B RT-PCR comparativa per VEGFR-1/Flt-1 tra basofili, PMN e PBMC. L'amplificazione del trascritto è stata condotta con due diverse coppie di primers (1 e 2)

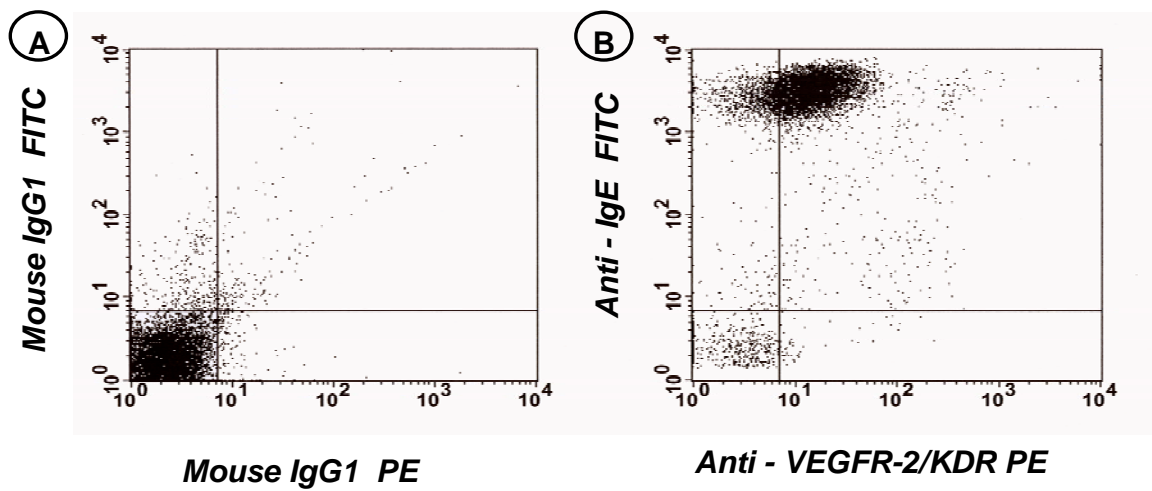


Fig. 7. *Espressione dei recettori per il VEGF nei basofili umani. L'analisi citofluorimetrica mostra che la maggior parte dei basofili umani esprimono costitutivamente VEGFR-2/KDR (70-84%).*

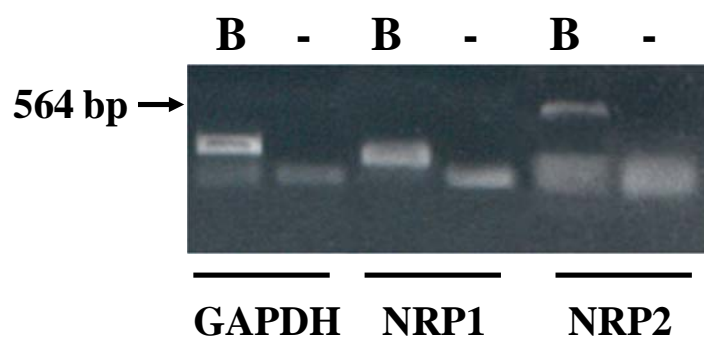


Fig. 8. *Espressione dell'mRNA per NRP1 and NRP2 nei basofili umani. I basofili umani esprimono costitutivamente mRNA per NRP1 e NRP2.*

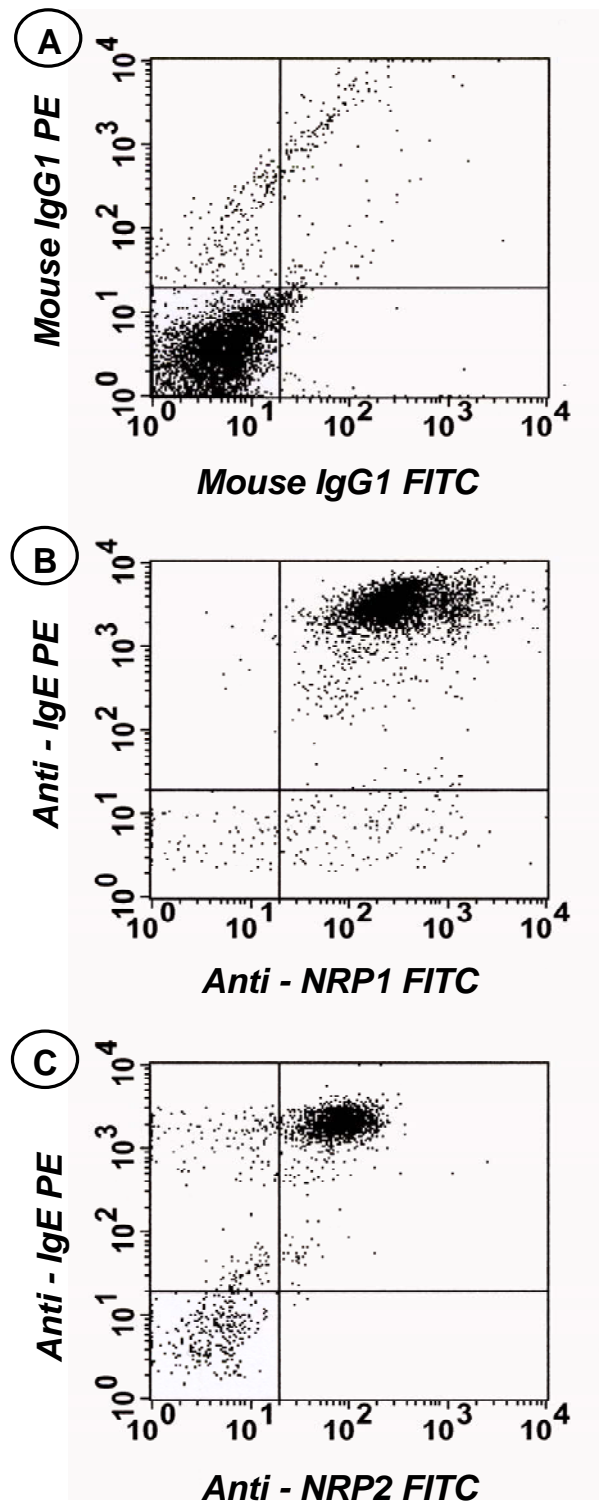


Fig. 9. *Espressione di NRP1 ed NRP2 nei basofili umani. L'analisi citofluorimetrica mostra che la maggior parte dei basofili umani esprimono costitutivamente sia NRP1 che NRP2*

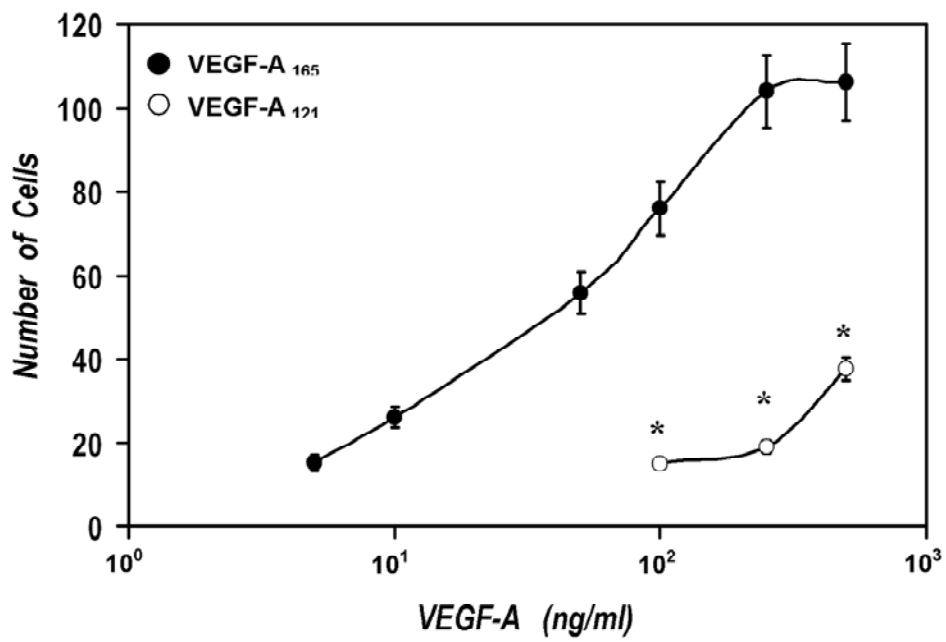


Fig. 10. Effetti di VEGF-A₁₆₅ e VEGF-A₁₂₁ sulla chemiotassi dei basofili umani. I basofili sono stati stimolati con le concentrazioni indicate di VEGF-A₁₆₅ e VEGF-A₁₂₁ per 1 h a 37°C in un incubatore. I valori sono la media \pm SEM di 6 esperimenti

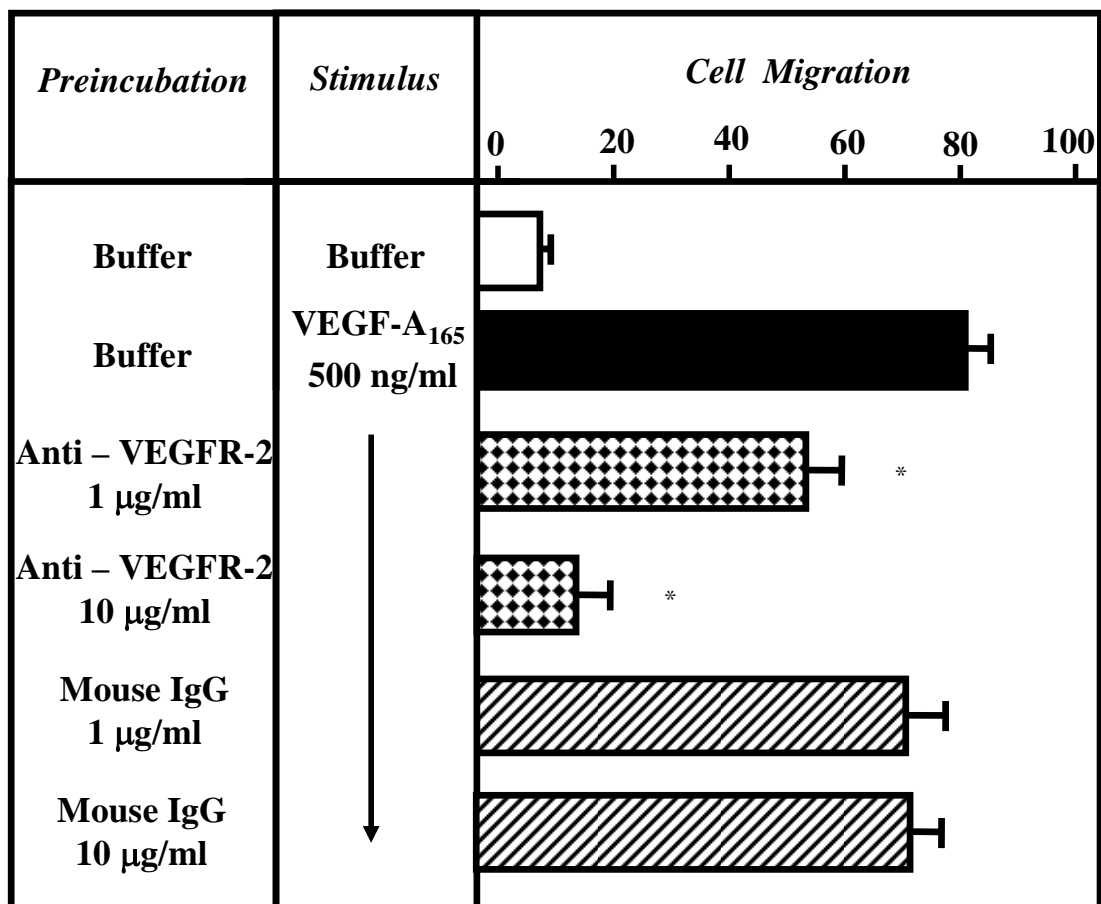


Fig. 11. Effetti della preincubazione con un anticorpo anti-VEGFR-2/KDR sulla chemiotassi dei basofili indotta VEGF-A₁₆₅ e VEGF-A₁₂₁. I basofili sono stati stimolati con le concentrazioni indicate di VEGF-A₁₆₅ e VEGF-A₁₂₁ per 1 h a 37°C in un incubatore. I valori sono la media ± SEM di 6 esperimenti

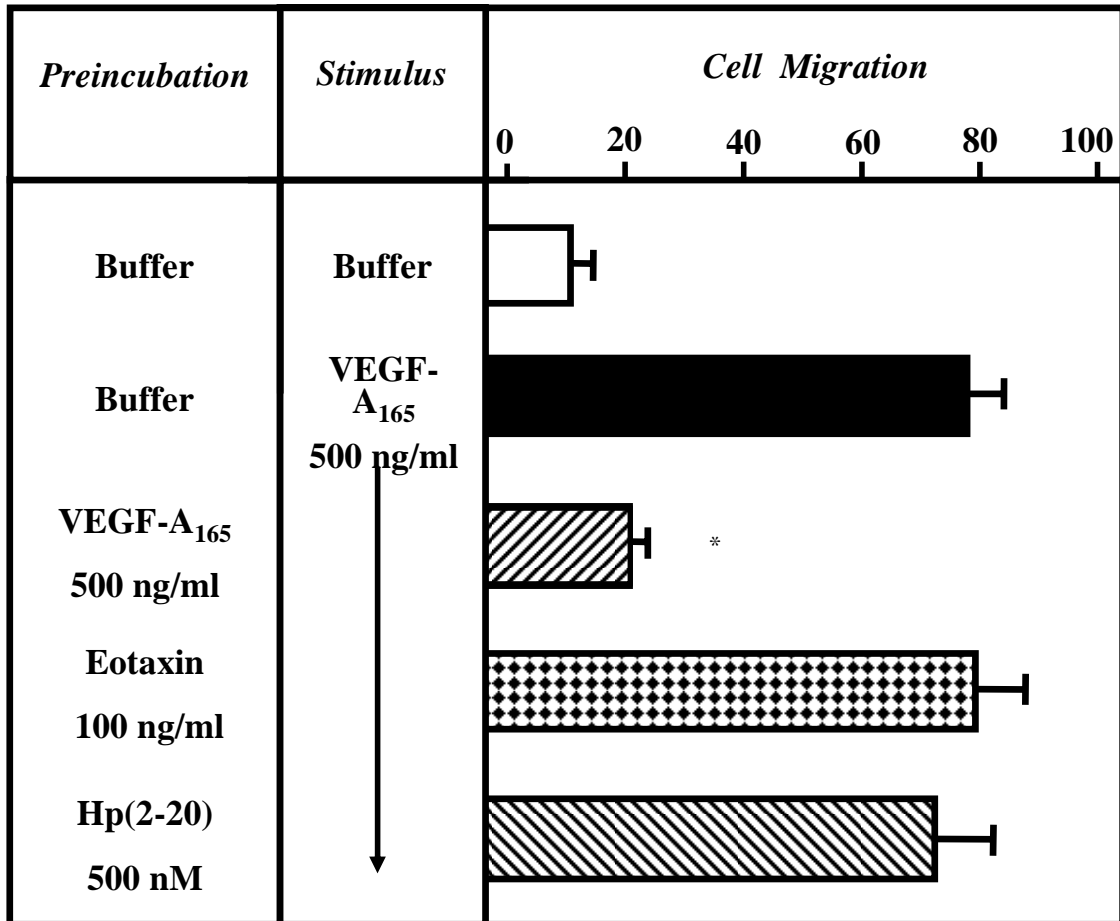


Fig. 12A. *Effetti della desensibilizzazione eterologa tra VEGF-A165, eotassina e Hp(2-20).* I basofili purificati sono stati preincubati con buffer, con VEGF-A₁₆₅ (500 ng/ml), eotassina (100 ng/ml) o Hp(2-20) (500 nM) in P-EDTA per 1 ora a 37 °C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate e sospese in PACGM ed indotte a migrare verso VEGF-A₁₆₅ (500 ng/ml).

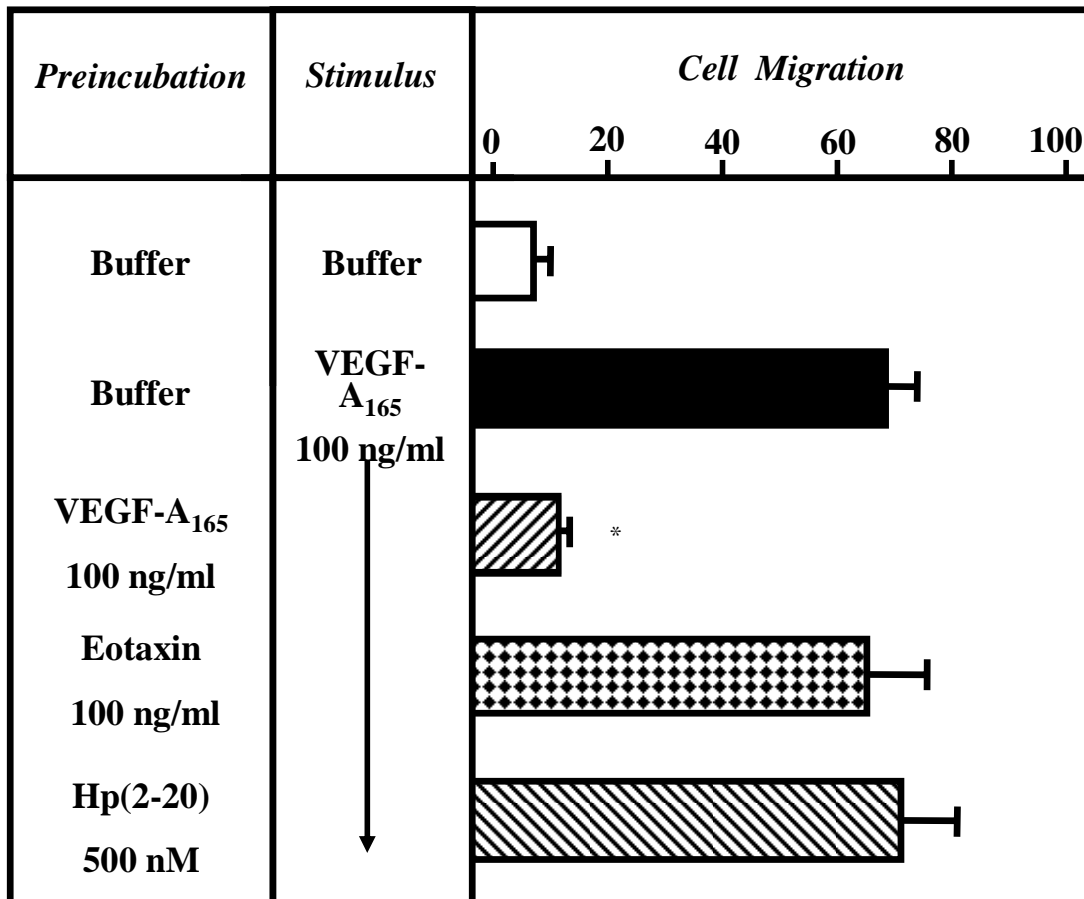


Fig. 12B. *Effetti della desensibilizzazione eterologa tra VEGF-A₁₆₅, eotassina e Hp(2-20).* I basofili purificati sono stati preincubati con buffer, con VEGF-A₁₆₅ (100 ng/ml), eotassina (100 ng/ml) o Hp(2-20) (500 nM) in P-EDTA per 1 ora a 37 °C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate e sospese in PACGM ed indotte a migrare verso VEGF-A₁₆₅ (100 ng/ml).

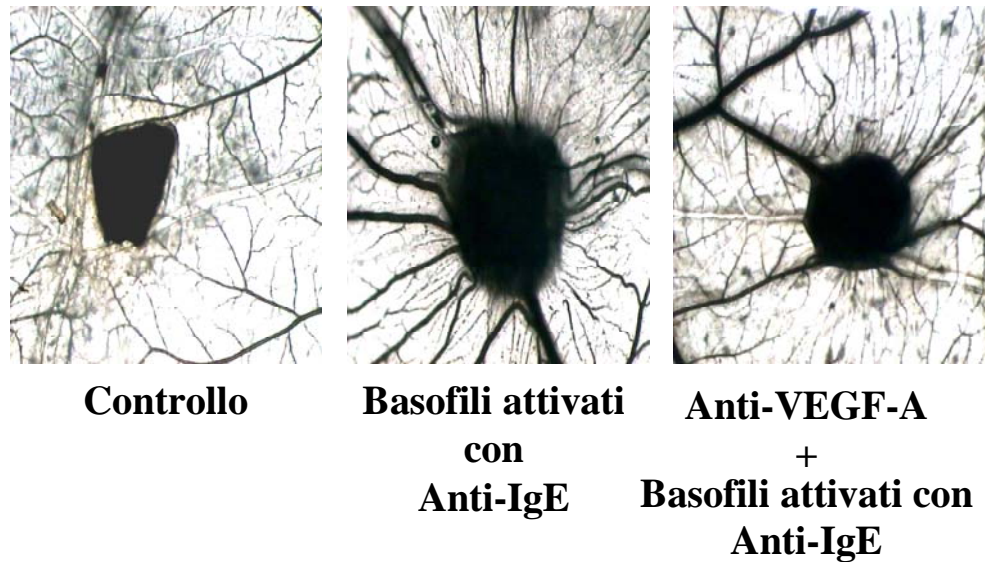


Fig. 13. *Effetto angiogenico in vivo del soprannatante di basofili umani in vivo.* Al dodicesimo giorno di incubazione i soprannatanti di basofili umani attivati con anti-IgE inducono una risposta angiogenica caratterizzata dalla presenza di vasi allantoici, che si distribuiscono radialmente attraverso la spugna (numero di vasi nella spugna-CAM limite = 27 ± 4). Una simile risposta angiogenica macroscopica è stata osservata negli impianti trattati con 500 ng di rVEGF (numero di vasi nella spugna-CAM limite = 30 ± 4) (dati non mostrati), mentre nessuna risposta vascolare è stata osservata nelle spugne trattate con il solo mezzo (numero di vasi nella spugna-CAM limite = 7 ± 2). I soprannatanti dei basofili sono stati incubati con anticorpi anti-VEGF e poi aggiunti alla CAM. Gli anticorpi anti-VEGF riducono in maniera significativa la risposta angiogenica del soprannatante dei basofili.