

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**  
*INDIRIZZO IN SCIENZE IMMUNO-REUMATOLOGICHE*

**XX Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**Tesi di Dottorato**

**Titolo**

*IL RUOLO DEI MASTOCITI UMANI NELL'ANGIOGENESI E NELLA  
LINFOANGIOGENESI INFIAMMATORIA E NEOPLASTICA*

TUTOR

**Chiar.mo**

**Prof. Gianni Marone**

CANDIDATA

**Dott. ssa Aikaterini Detoraki**

## INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
MATERIALI E METODI	
<i>Reagenti e Tamponi</i>	pag. 14
<i>Isolamento, purificazione e coltura dei mastociti umani</i>	pag. 15
<i>RT-PCR</i>	pag. 16
<i>ELISA per VEGF-A e PlGF</i>	pag. 18
<i>Western blot</i>	pag. 18
<i>Chemiotassi dei mastociti umani</i>	pag. 19
<i>Rilascio di istamina dai mastociti umani</i>	pag. 20
<i>Saggio della membrana corioallantoidea di pollo</i>	pag. 20
<i>Analisi statistica</i>	pag. 21
RISULTATI	
<i>Espressione di mRNA per i VEGFs e PlGF nei mastociti umani</i>	pag. 22
<i>Contenuto di VEGF-A e PlGF nei mastociti umani</i>	pag. 22
<i>VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D nei mastociti umani</i>	pag. 23
<i>Secrezione spontanea di VEGF-A e PlGF dai mastociti umani</i>	pag. 24
<i>Effetti della actinomicina D, della cicloesimide e della brefeldina A sulla secrezione spontanea di VEGF-A dai mastociti umani</i>	pag. 24
<i>Effetti di PGE<sub>2</sub> sulla produzione di VEGF-A dai mastociti umani</i>	pag. 25

<i>Effetti della actinomicina D, della cicloesimide e della brefeldina A sulla produzione di VEGF-A indotta dalla PGE<sub>2</sub> nei mastociti umani</i>	pag. 26
<i>Effetti della PGE<sub>2</sub> sull'espressione di mRNA per i VEGFs nei mastociti umani</i>	pag. 26
<i>Effetti di un analogo dell'adenosina (NECA) sulla produzione di VEGF-A dai mastociti umani</i>	pag. 27
<i>Effetto di NECA sulla espressione di mRNA per i VEGFs nei mastociti umani</i>	pag. 27
<i>Risposta angiogenica nella membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM) indotta da soprannatanti di mastociti umani attivati con PGE<sub>2</sub></i>	pag.28
<i>Risposta angiogenica nella membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM) indotta da soprannatanti di mastociti umani attivati con NECA</i>	pag.29
<i>Espressione di mRNA per VEGFR-1, sVEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1 e NRP-2 nei mastociti umani</i>	pag. 29
<i>Effetti di VEGFs e PlGF sulla chemiotassi dei mastociti umani</i>	pag. 30
<i>Effetti degli anticorpi anti-VEGFR-1 e/o anti-VEGFR-2 sulla chemiotassi dei mastociti umani indotta da VEGF-A<sub>165</sub></i>	pag. 31
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 33

BIBLIOGRAFIA

pag. 41

FIGURE

pag. 57

TABELLA

pag.70

## INTRODUZIONE

Il termine “Angiogenesi”, originariamente proposto da John Hunter nel 1787, indica la crescita di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti. Tale complesso fenomeno ha affascinato numerosi scienziati ed è stato oggetto di studio per molti secoli. Secondo Galeno il sangue veniva localmente rigenerato nel corpo quando si era consumato (Carmeliet, 2005). Leonardo da Vinci ipotizzò che l’apparato vascolare si sviluppasse a partire dal cuore come un albero nasce dal seme; inoltre, egli paragonò l’aorta e le arterie al tronco ed ai suoi rami (Gupta, 2005). Nel 1628 William Harvey scoprì che il cuore è in grado di pompare il sangue attraverso il corpo e che le vene riportano il sangue venoso al cuore (Carmeliet, 2005). Nel 1661 Marcello Malpighi identificò la rete dei capillari. Nello stesso periodo Caspar Aselius scoprì i vasi linfatici (Carmeliet, 2005).

Negli animali meno evoluti, come il verme *Caenorhabditis elegans* e la mosca *Drosophila melanogaster*, l’ossigeno raggiunge la periferia attraverso un processo di diffusione semplice (Carmeliet, 2005). In specie più evolute la diffusione dell’ossigeno avviene attraverso il sistema circolatorio. Nell’embrione umano, i vasi sanguigni provvedono alla crescita degli organi ed al rifornimento dell’ossigeno necessario per lo sviluppo.

I vasi sanguigni si formano a partire da precursori endoteliali che condividono la stessa origine con i progenitori ematopoietici e si organizzano in un labirinto di piccoli capillari; questo processo è conosciuto con il nome di “Vasculogenesi” (Carmeliet, 2005). Durante l’angiogenesi, il plesso vascolare si espande progressivamente ed evolve in un sistema altamente organizzato di vasi più grandi ramificanti in vasi più piccoli. La formazione di vasi attraversa stadi ben definiti caratterizzati da modificazioni dell’endotelio vascolare e della

matrice extracellulare (Risau, 1997). In particolare, il processo angiogenico si articola in quattro fasi: durante la prima fase si verifica un aumento della permeabilità vasale successiva ad una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali; successivamente, le cellule endoteliali migrano e proliferano nella zona di tessuto dove è richiesta la formazione di nuovi vasi. Contestualmente, si ha la liberazione di enzimi proteolitici che modificano la matrice extracellulare facilitando la migrazione delle cellule endoteliali. La terza fase è contraddistinta dall'arresto della proliferazione cellulare, dalla differenziazione di cellule endoteliali e la formazione di capillari primitivi. Il processo si conclude con il richiamo di cellule subendoteliali di supporto come i periciti (PCs) che ricoprono le cellule endoteliali (ECs) e le cellule muscolari lisce (SMCs) in grado di regolare la perfusione sanguigna (Risau, 1997).

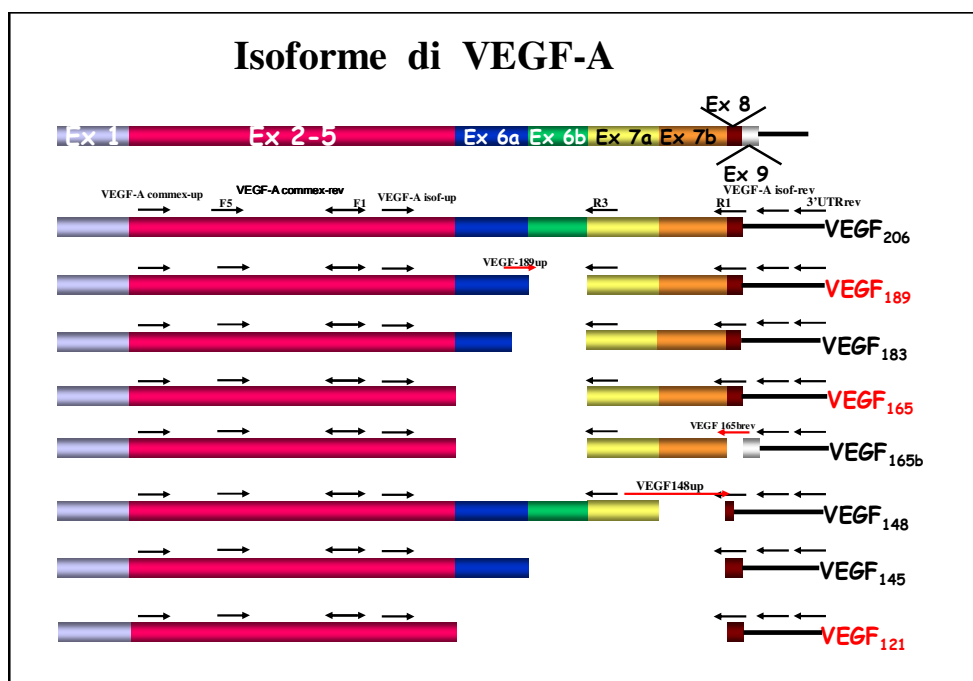
Il sistema linfatico si sviluppa attraverso un processo chiamato "Linfoangiogenesi" (Oliver, 2005). Storicamente, Sabin propose il modello più ampiamente accettato di linfoangiogenesi suggerendo che durante lo sviluppo precoce, isolati sacchi linfatici primitivi originano dalle ECs dei vasi venosi attraverso un processo di trans-differenziazione. Da questi vasi primitivi, il sistema linfatico periferico si dirama nei tessuti circostanti e negli organi.

Dopo la nascita e durante il periodo dell'accrescimento l'angiogenesi e la linfoangiogenesi continuano a contribuire alla crescita di tessuti ed organi; a partire dall'età adulta l'angiogenesi rimane attiva nel corso del ciclo mestruale, nella formazione della placenta durante la gravidanza, durante la cicatrizzazione delle ferite e la riparazione del danno tissutale (Carmeliet, 2005). Le cellule endoteliali conservano la loro capacità mitotica in seguito a stimoli fisiopatologici come l'ipossia, l'infiammazione o la crescita neoplastica. Angiogenesi e linfoangiogenesi rappresentano due distinti e complessi fenomeni controllati da un delicato bilancio tra fattori ad attività pro-angiogenica e fattori ad attività anti-angiogenica.

Questi molteplici fattori attivano specifici recettori sulle cellule endoteliali. La famiglia dei *Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs)* comprende diversi mediatori ad attività pro-angiogenica tra cui il **VEGF-A**, **VEGF-B**, **VEGF-C**, **VEGF-D** ed il **Placental Growth Factor (PIGF)** (Ferrara, 2007). Il **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** è un mediatore fondamentale nella regolazione del processo angiogenico ed il più potente fattore pro-angiogenico finora identificato (Ferrara, 2007). L'attività del VEGF venne identificata dal gruppo di Harold Dvorak nel 1983 sulla base della sua capacità di indurre aumento della permeabilità vasale e fu denominato *Vascular Permeability Factor (VPF)* (Senger, 1983). Successivamente, VPF fu clonato e denominato VEGF (Ferrara, 1989). Oltre alla modulazione della migrazione e della proliferazione delle cellule endoteliali, il VEGF esplica molteplici attività pro-angiogeniche. Esso, infatti, induce nelle cellule endoteliali l'espressione di proteasi (collagenasi, uPA e tPA) che liberano le cellule dall'ancoraggio alla matrice extracellulare permettendo la loro migrazione. Inoltre, il VEGF aumenta la permeabilità endoteliale ed induce vasodilatazione mediante l'induzione dell'ossido nitrico sintasi (eNOS) (Tammela, 2005). Infine, il VEGF promuove la mobilizzazione delle cellule staminali emopoietiche dal midollo, l'attivazione degli osteoblasti, la chemiotassi di diverse cellule del sistema immunitario e la regolazione dell'omeostasi neuronale (Tammela, 2005; de Paulis, 2006).

VEGF-A e -B rappresentano mediatori fondamentali nella formazione dei vasi sanguigni (Ferrara, 2007); d'altro canto VEGF-C e -D regolano la formazione di nuovi vasi linfatici (Haiko, 2007; Alitalo, 2005). Alcuni di questi fattori presentano varie isoforme, con differente potenziale pro-angiogenico, derivanti da meccanismi di splicing alternativo. Il gene umano del VEGF-A è organizzato in 8 esoni e 7 introni. Lo splicing alternativo genera

nell'uomo almeno 6 isoforme: VEGFA<sub>121</sub>, VEGFA<sub>145</sub>, VEGFA<sub>165</sub>, VEGFA<sub>183</sub>, VEGFA<sub>189</sub> e VEGFA<sub>206</sub> (Ferrara, 2007) (Immagine 1). VEGF-A<sub>165</sub> è la forma predominante, secreta come una glicoproteina omodimerica di 45 kDa in grado di legare l'eparina e la neuropilina 1 (NRP1) ( Tammela, 2005; Ferrara, 2007). VEGF-A<sub>121</sub> è un polipeptide acido, altamente diffusibile che non lega l'eparina e la NRP1; l'assenza del 4° dominio extracellulare che lega l'eparina determina una significativa riduzione delle attività biologiche del VEGF-A. VEGFA<sub>189</sub> e VEGFA<sub>206</sub> sono sequestrati nella matrice extracellulare ed interagiscono con l'eparina; queste due isoforme costituiscono un reservoir di fattore di crescita che può essere mobilizzato mediante proteolisi (Ikeda, 2000; Robinson, 2001). Le varianti 145 e 183 sono meno frequenti. Il VEGF-B presenta due isoforme: VEGFB<sub>167</sub> e VEGFB<sub>186</sub>. L'isoforma 167 è la forma predominante ed interagisce con l'eparina (Olofsson, 1999).



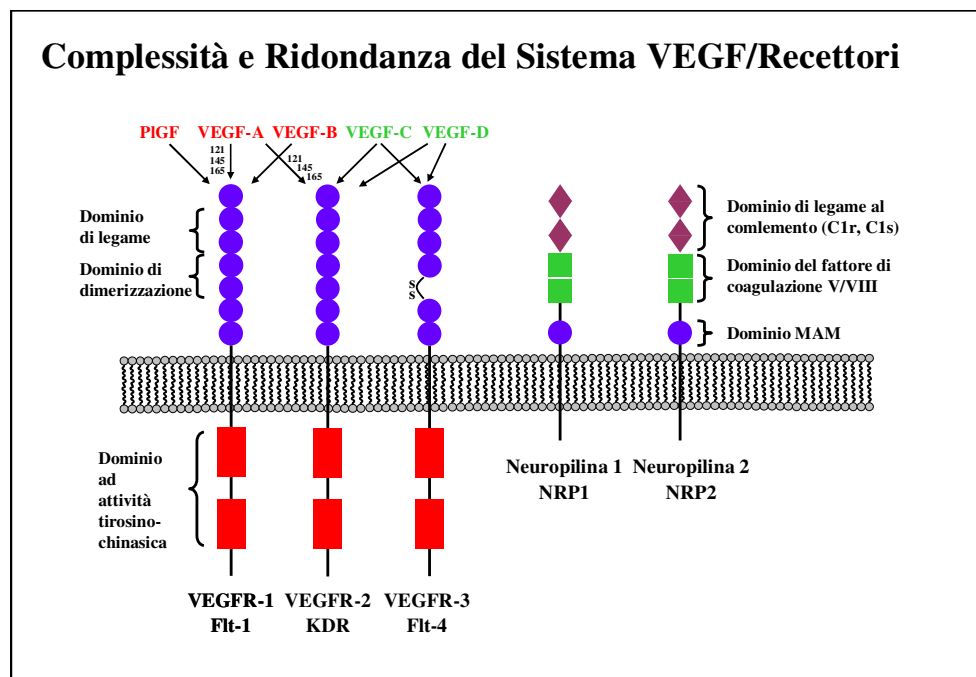
(Immagine 1)



Il PlGF, originariamente scoperto a livello placentare dal gruppo di Graziella Persico (Maglione, 1991) modula lo sviluppo dei vasi della placenta e di alcuni tumori (Viglietto, 1995). Esso presenta due maggiori isoforme: PlGF-1 (PlGF<sub>131</sub>) e PlGF-2 (PlGF<sub>152</sub>) (De Falco, 2002). E' stata riportata, inoltre, una terza isoforma il PlGF-3 (PlGF<sub>203</sub>) localizzata esclusivamente a livello placentare (Cao, 1997).

I membri della famiglia VEGFs esplicano la loro azione mediante l'interazione con tre recettori di membrana: **VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3** (Ferrara, 2007) (Immagine 2). Dal punto di vista strutturale, questi recettori presentano una porzione extracellulare costituita da 7 domini immunoglobulinici (Ig-like), un tratto transmembrana ed una coda intracitoplasmatica responsabile dell'attività tirosin-chinasica. Il secondo e terzo dominio immunoglobulinico dei recettori sono essenziali per il legame ad alta affinità del VEGF (Ferrara, 2007). Il quarto dominio è responsabile della dimerizzazione dei recettori, mentre il quinto ed il sesto dominio sembrano necessari per stabilizzare il legame del VEGF al suo recettore (Robinson, 2001). Il recettore VEGFR-1 è una glicoproteina di ~180 kDa con elevata affinità per VEGF-A, VEGF-B e VEGF-C. La fosforilazione della tirosina del VEGFR-1 induce un debole segnale mitogenico. Alcuni autori hanno ipotizzato che questo recettore possa svolgere attività di "decoy receptor" in grado di modulare l'attività del VEGF (Park, 1994). Il VEGFR-2 è un recettore di 200-300 kDa con una minore affinità per il VEGF-A rispetto al VEGFR-1; esso è attivato anche da VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Il VEGFR-2 viene fosforilato più efficacemente rispetto al VEGFR-1 dopo il legame con il ligando e può quindi indurre segnali mitogenici e chemiotattici (Robinson, 2001). Il VEGFR-3 è selettivamente attivato da VEGF-C e VEGF-D; la sua espressione è prevalentemente limitata all'endotelio dei vasi linfatici.

I VEGFRs possono trasdurre il segnale solo nella forma omo- o eterodimerica. Sebbene il VEGFR-1 abbia una bassa capacità di fosforilare, può eterodimerizzare con VEGFR-2 formando un complesso con maggiori capacità di trasdurre il segnale rispetto agli omodimeri VEGFR-1 e VEGFR-2 (Tammela, 2005). La presenza di una variante del VEGFR-1 ottenuta da splicing alternativo e conosciuta come VEGFR-1 solubile (sVEGFR-1) è in grado di modulare le attività dei VEGF (Kendall, 1996). Il sVEGFR-1, essendo privo della regione transmembrana necessaria per l'interazione del recettore alla membrana cellulare, è privo della porzione intracellulare necessaria per la trasduzione del segnale. sVEGFR-1 lega il VEGF con alta affinità sequestrandolo e ne impedisce il legame con i recettori di membrana in grado di trasdurre il segnale; esso, è inoltre in grado di formare eterodimeri non funzionali con il VEGFR-2 (Roeckl, 1998).

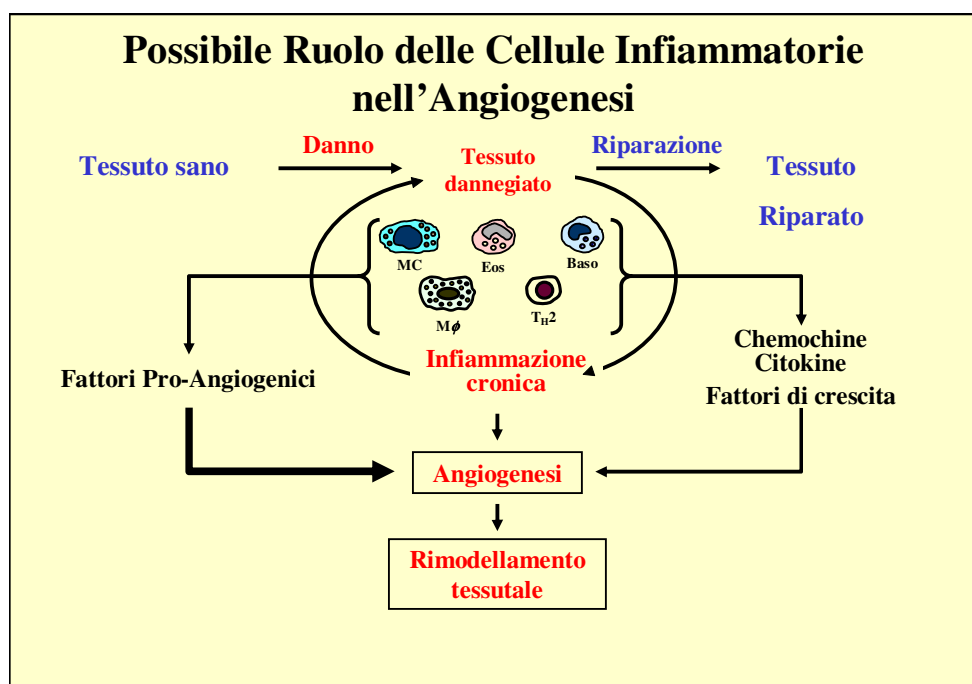


(Immagine 2)

Oltre alla famiglia dei VEGFRs sono stati recentemente identificati ulteriori siti recettoriali denominati Neuropiline (NRP): NRP1 e NRP2 (Ferrara, 2007). Le NRP sono implicate nei processi di trasmissione del segnale lungo gli assi neuronali (Tammela, 2005; Ferrara, 2007). Questi recettori riconoscono il VEGF-A165, ma non il VEGF-A121. La NRP1 agisce come co-recettore per il VEGF-A165 rafforzandone il legame al VEGFR-2 ed aumentandone l'attività. La NRP1 è anche un recettore per il VEGF-B.

Molteplici studi indicano che l'angiogenesi e la linfoangiogenesi sono associate al rimodellamento tessutale che si osserva in corso di diverse malattie infiammatorie croniche tra cui l'artrite reumatoide (Folkman, 1995), la malattia di Crohn (Danese, 2006) e l'asma bronchiale (Baluk, 2005). In particolare, studi effettuati su pazienti affetti da asma bronchiale hanno evidenziato la neoformazione di vasi sanguigni a livello della parete bronchiale (Li, 1997). Ulteriori studi eseguiti su biopsie di pazienti con asma bronchiale hanno dimostrato l'espressione peribronchiale di diversi fattori angiogenici [VEGF-A, Fibroblast Growth Factor- $\beta$  (FGF- $\beta$ ) e angiogenina] (Hoshino, 2001; Hoshino, 2001; Redington, 2001), dei loro recettori (Hoshino, 2001) ed un aumento dell'estensione della vascolarizzazione bronchiale (Hashimoto, 2005). Inoltre, è stata riportata l'esistenza di significative correlazioni tra le alterazioni vascolari e la severità dell'asma bronchiale (Vrugt, 2000; Chetta, 2005). Analoghe alterazioni vasali sono state evidenziate nell'ambito del rimodellamento tessutale osservato in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche ostruttive del polmone (COPD) (Hashimoto, 2005; Kranenburg, 2005; Calabrese, 2006). E' stato prospettato che a livello delle vie aeree i fattori angiogenici siano sintetizzati da diverse cellule del sistema immunitario come le cellule CD34+, gli eosinofili, i macrofagi (Hoshino, 2001; Hoshino, 2001), i mastociti (Zanini, 2007), le cellule muscolari lisce (Knox, 2001) e le cellule epiteliali

(Boussat, 2000). E' verosimile quindi che stimoli infiammatori siano in grado di attivare i mastociti insieme ad altre cellule del sistema immunitario inducendo la sintesi di diverse chemiochine, citochine e fattori proangiogenici (Immagine 3). E' opportuno ricordare che studi sperimentali hanno documentato che la risposta angiogenica e linfoangiogenica è alla base del rimodellamento tessutale presente in malattie infiammatorie dell'apparato respiratorio (Baluk, 2005). Inoltre, è noto che i meccanismi della angi/linfoangiogenesi contribuiscono alla crescita tumorale ed alla formazione delle metastasi (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2007; Haiko, 2007).



(Immagine 3)

I mastociti sono cellule filogenicamente primordiali; nei mammiferi tali cellule originano da progenitori midollari che completano la loro maturazione fenotipica dopo la migrazione nei tessuti periferici. I mastociti sono presenti in tutti i tessuti connettivi. Tali cellule, sono prevalentemente localizzate in prossimità dei vasi sanguigni e linfatici e delle

fibre nervose. I mastociti sono cellule secretorie multifunzionali caratterizzate dalla presenza di numerosi granuli citoplasmatici costituiti da una matrice proteoglicanica (e.g., eparina), da enzimi proteolitici (triptasi, chimasi, carbossipeptidasi A) e da istamina. L'attivazione dei mastociti è indotta da diversi stimoli immunologici IgE- e non IgE-mediati. Gli antigeni multivalenti e gli anticorpi anti-IgE interagiscono con specifici anticorpi della classe IgE legati alla membrana cellulare mediante un recettore ad alta affinità (FcεRI). Tale processo comporta il rilascio da parte dei mastociti di mediatori preformati (istamina, triptasi etc.) e di mediatori sintetizzati *de novo* (metabolici dell'acido arachidonico) e diverse citochine e chemochine (Marone, 2005).

Molteplici evidenze sperimentali hanno documentato l'importanza dei mastociti in diversi processi infiammatori cronici (Boyce, 2003; Galli, 2005) e nello sviluppo tumorale (Coussens, 1999; Nakayama, 2004; Theoharides, 2004). I mastociti infiltrano i siti di infiammazione cronica (Bishoff, 2007; Dawicki, 2007), processo che in alcune condizioni può indurre la formazione di neoplasie maligne (Coussens, 2001). La densità dei mastociti è incrementata ai margini di numerosi tumori nell'uomo (Acikalin, 2005; Chan, 2005; Ribatti, 2003; Welsh, 2005) e nei roditori (Kessler, 1976). L'infiltrazione dei mastociti nella lesione tumorale è strettamente correlata ai fenomeni dell'angiogenesi ed alle metastasi (Aoki, 2003; Iamaroon, 2003; Kondo, 2006; Ribatti, 2004; Takanami, 2000; Yano 1999).

Studi *in vitro* effettuati su modelli murini hanno dimostrato che i mastociti possono produrre diversi fattori angiogenici (Nakayama, 2004; Boesinger, 1998). Ulteriori studi ottenuti su linee mastocitarie umane trasformate come la HMC-1 indicano che queste cellule neoplastiche producono fattori angiogenici *in vitro* (Boesinger, 1998; Abdel-Majid, 2004; Cao, 2005; Feoktistov, 2003; Grutzkau, 1998). Inoltre, risultati ottenuti da colture primarie di

mastociti umani derivati dal midollo osseo e dal sangue del cordone ombelicale hanno dimostrato che queste cellule possono sintetizzare alcuni membri della famiglia dei VEGFs (Boesinger, 1998; Abdel-Majid, 2004; Cao, 2005).

E' importante sottolineare che i risultati di questi studi *in vitro* hanno evidenziato delle differenze significative nella produzione di fattori angiogenici e dei loro recettori tra i diversi tipi di mastociti umani e di mastociti ottenuti da roditori (Nakayama, 2004; Boesinger, 1998; Abdel-Majid, 2004; Cao, 2005; Feoktistov, 2003; Grutzkau, 1998). E' opportuno ricordare che gli studi finora eseguiti sono stati focalizzati sui fattori angiogenici mentre sono ancora limitati i dati sui specifici fattori linfoangiogenici e sui loro recettori. Inoltre, non sono disponibili risultati da studi condotti con colture primarie di mastociti umani o linee mastocitarie differenziate come la LAD-2 (Kirshenbaun, 2003). Infine, le attività angiogeniche, linfoangiogeniche e proinfiammatorie dei soprannatanti dei mastociti non sono state ancora caratterizzate *in vitro* o *in vivo*.

In questo programma di ricerche abbiamo caratterizzato l'espressione molecolare, la produzione e la funzione dei diversi membri della famiglia dei VEGFs e dei loro recettori, in tre diversi tipi di mastociti umani: i mastociti purificati dal tessuto polmonare (HLMC), la linea mastocitaria differenziata LAD-2 (Kirshenbaun, 2003) e la linea mastocitaria leucemica HMC-1 (Butterfield, 1990). Queste verifiche sono state eseguite al fine di ampliare le attuali conoscenze sul ruolo dei mastociti umani nell'ambito dell'angio-linfoangiogenesi infiammatoria e neoplastica.

## MATERIALI E METODI

### *Reagenti e Tamponi*

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: 60% HClO<sub>4</sub> (Baker Chemical Co., Deventer, The Netherlands); albumina sierica umana, tampone PIPES, inibitori delle proteasi, cicloesimide, brefeldina A (dal *Penicillium brefeldiano*), actinomicina D, 5'-(N-etilcarbosamido) adenosina (NECA), monotioglicerolo, L-glutamina, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); IMDM e soluzione antibiotica (10,000 UI/ml penicillina and 10 mg/ml streptomina) (Cambrex Bio Science, Milan, Italy); adenosina deaminasi, indometacina, teofillina e siero bovino fetale (FCS, MP Biomedicals Europe, Illkirch, Francia), PGE<sub>2</sub> (Biomol, Plymouth Meeting, PA); StemPro®34 SFM medium, Superscript III, TRIzol Reagent (Invitrogen Ltd., Paisley, UK); stem cell factor umano ricombinante (SCF) e PlGF-1 umano ricombinante (PeproTech, London, UK); RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies Gaithersburg, MD) con 25 mM HEPES; dosaggio colorimetrico per proteine (BIORAD, Richmond, CO); anticorpo policlonale di coniglio anti-VEGF-B (H-70), anticorpo policlonale di coniglio anti-VEGF-C (H-190), anticorpo policlonale di coniglio anti-VEGF-D (H-144), anticorpi di capra IgG e di topo IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticorpi di capra anti-VEGF-A, anticorpo di capra policlonale anti-VEGFR-1, anticorpo di topo monoclonale anti-VEGFR-2, VEGF-A<sub>165</sub> umano ricombinante, VEGF-B<sub>167</sub> umano ricombinante, VEGF-C umano ricombinante, VEGF-D umano ricombinante, (R&D System, Minneapolis, MN); IgG di scimmia anti-coniglio HRP-coniugato (GE Healthcare, Amersham, England).

Il tampone utilizzato in questi esperimenti è composto da PIPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 110 mM, KCl 5 mM. Esso è denominato "P". Il tampone PCG contiene, oltre a P, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e 1 g/L D-glucosio (de Paulis, 1991). Il tampone PACGM contiene, oltre a P, albumina sierica umana 3%, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 1 g/L di destrosio e 0,25 g/L di MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 7,4; il PGMD contiene, oltre a P, 0,25 g/L di MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mg/L di DNase, e 1 g/L gelatina, pH 7,4. Il PBS contiene 8 g/L di NaCl, 1,15 g/L di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg/L di KCl, e 200 mg/L di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

#### *Isolamento, purificazione e coltura dei mastociti umani*

Il protocollo di studio riguardante l'utilizzo di tessuto polmonare umano è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Napoli Federico II ed il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia toracica. Colture primarie di mastociti polmonari umani (HLMC) sono state ottenute dal parenchima polmonare dei suddetti pazienti (de Paulis, 2000). Il tessuto polmonare macroscopicamente sano è stato finemente tagliato con le forbici. I frammenti sono stati dispersi nei loro elementi cellulari attraverso incubazione sequenziale con pronasi (2 mg/g di tessuto), chimopapaina (0,5 mg/g di tessuto), collagenasi (1 mg/g di tessuto) ed elastasi (10 U/g di tessuto). Le cellule sono state risospese in PGMD ed ulteriormente purificate attraverso elutriazione controcorrente. Dopo questa procedura, le frazioni contenenti le maggiori percentuali di mastociti (15-20%) sono state selezionate ed ulteriormente purificate (> 80%) attraverso centrifugazione su gradienti di densità. Le cellule sono state purificate (>97%) attraverso selezione immunomagnetica positiva utilizzando il CD117 Microbead Kit (Miltenyi Biotec). Il numero e la purezza dei mastociti sono stati determinati attraverso una colorazione con toluidina/Alcian blue. La linea



mastocitaria umana HMC-1 è stata un gentilmente donata dal Dr. John H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN); le cellule sono state mantenute in coltura ad una densità di  $3-9 \times 10^5$  cellule/ml di IMDM supplementato con 10% FCS, 2 mM di L-glutamina, 1,2 mM di monotioglicerolo, 1% penicillina/streptomicina. La linea mastocitaria umana LAD-2 è stata generosamente donata dal Dr. Dean D. Metcalfe (NIH, Bethesda, MD); le cellule sono state mantenute in coltura con una densità di  $2-5 \times 10^5$  cellule/ml di StemPro®34 SFM medium contenente SCF 100 ng/ml, 2 mM L-di glutamina e 1% di soluzione antibiotica. Per gli esperimenti, HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state incubate in piastre di polistirene (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) in 1% di IMDM con aminoacidi non essenziali, 5% di FCS e 10 µg/ml di gentamicina da soli o contenenti una concentrazione ottimale di PGE<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M) o NECA ( $10^{-5}$  M). In alcuni esperimenti, le cellule sono state preincubate (37°C, 1 ora) con o senza actinomicina D (1 µg/ml), cicloesimide (10 µg/ml) o brefeldina A (10 µg/ml) e successivamente stimulate (37°C, 24 h) con PGE<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M).

#### *RT-PCR*

RNA totale ottenuto dalle HLMC, LAD-2 ed HMC-1 è stato isolato mediante il sistema di isolamento dell'RNA totale SV 96 (PROMEGA) o con reagente TRIzol (Invitrogen) trattato con RNase-free DNase I in accordo con il protocollo fornito dal produttore. RNA è stato quantizzato mediante spettrofotometria. 1 µg di RNA totale è stato retroscritto a cDNA con 25 mM di MgCl<sub>2</sub>, 50 µM di oligo(dT) e 200 U di Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) (de Paulis, 2004). Per la PCR semi-quantitativa, 2 µl di cDNA retroscritto sono stati successivamente amplificati utilizzando primers specifici per: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, VEGFR-1, VEGFR-2, sVEGFR-1, VEGFR-3,

NRP-1, NRP-2 e per GAPDH utilizzato come controllo (Tabella I). I prodotti della reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% contenente bromuro di etidio. La rilevazione è stata eseguita con luminescenza *UV-image analysis system ChemidocXRS* (Biorad). La real-time PCR (qRT-PCR) è stata effettuata come segue: le cellule ( $4 \times 10^6/2$  ml) sono state incubate ( $37^\circ\text{C}$ ) in IMDM supplementato con 1% di aminoacidi non essenziali, 5% di FCS e 10  $\mu\text{g/ml}$  di gentamicina con o senza  $\text{PGE}_2$  ( $10^{-6}$  M) o NECA ( $10^{-5}$  M) per tempi differenti (3–9 ore). Alla fine dell'incubazione, RNA totale è stato isolato e retrotrascritto come precedentemente riportato. La qPCR è stata eseguita su iCycler (Biorad) utilizzando il Platinum qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primers specifici per VEGF-A<sub>165</sub> (sense 5'-GCCTTGCCTTGCTGCTCTAC-3' e antisense 5'-TGATTCTGCCCTCCTCCTTCTG-3') e VEGF-B<sub>167</sub> (sense 5'-AGGACAGAGTTGGAAGAGGAG-3' e antisense 5'-AGGAAGAGCCAGTTGTAAGATG-3') compatibili per la qPCR sono stati disegnati dal Beacon Designer 3.0 software (Biorad) (Tabella I). Sono stati utilizzati i primers per GAPDH, VEGF-C e VEGF-D riportati in Tabella I e compatibili per qRT-PCR. Dopo una iniziale denaturazione a  $94^\circ\text{C}$  per 30 sec, è stata effettuata un' amplificazione a 40 cicli con denaturazione ( $94^\circ\text{C}$ ) per 30 sec, appaiamento ( $55^\circ\text{C}$ ) per 30 sec ed estensione dei primers ( $72^\circ\text{C}$ ). Alla fine è stata eseguita un'estensione a  $72^\circ\text{C}$  per 10 min. L'efficacia della PCR è stata esaminata diluendo in maniera sequenziale e sono stati ottenuti i risultati delle curve di melting per controllare la specificità della PCR. Ogni campione di cDNA è stato analizzato in triplicato mentre un campione privo di mRNA è stato incluso come controllo negativo. I risultati sono stati analizzati con *Cycler iQ analysis software* (Biorad). I segnali di mRNA in ogni campione sono stati normalizzati rispetto a quelli ottenuti dal GAPDH e le differenze per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e

VEGF-D sono state espresse come incremento in numero di volte verso quello delle cellule non stimulate.

#### *ELISA per VEGF-A e PlGF*

Il contenuto di VEGF-A e PlGF nei lisati cellulari e nei soprannatanti delle colture dei mastociti umani è stato determinato in duplicato utilizzando un dosaggio ELISA commercialmente disponibile (R&D System, Minneapolis, MN).

#### *Western blot*

Le cellule ( $2-4 \times 10^6$  per campione) sono state lisate in tampone di lisi (20 mM di Tris pH 7,5, 5 mM di EDTA, 1 mM di PMSF, 2 mM di benzamidina, 10 µg/ml di leupeptina, 10 mM di NaF, 150 mM di NaCl, 1% di Nonidet P-40 e 5% di glicerolo) (Granata, 2006). I lisati cellulari sono stati mantenuti in ghiaccio per 20 min e poi centrifugati (14.000 rpm, 4°C, 20 min). Un' aliquota dell' estratto proteico ottenuto dal lisato cellulare è stata utilizzata per quantificare le proteine con BCA Protein Assay Kit (Novagen, Merck Chemicals, Nottingham, UK). La restante aliquota dell'estratto proteico è stato diluita in litio dodecil-solfato (LDS) con o senza 2β-mercaptoetanololo al 2,5% e conservata a -80°C. Gli estratti proteici (40 µg per campione) sono stati separati su gel 4-12% Bis-Tris gels (NuPAGE®, Novex) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad) insieme ad un marker proteico biotinilato. Dopo 2 ore di permanenza in TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) contenente 5% ECL di agente bloccante (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), le membrane sono state lavate con TBST e successivamente incubate (4°C, 18 ore) con un anticorpo primario. Dopo il lavaggio le membrane sono state incubate

(22°C, 1 ora) con un anticorpo secondario coniugato con HRP insieme ad un anticorpo anti-biotina. Le proteine legate all'anticorpo sono state visualizzate con ECL plus o con *Advanced western blotting detection system* (GE Healthcare) utilizzando l'*Image analysis system ChemidocXRS* (Biorad, Hercules, CA).

#### *Chemiotassi dei mastociti umani*

La chemiotassi dei mastociti è stata effettuata utilizzando la tecnica della camera di Boyden modificata. 25 µl di tampone (PACGM) o di concentrazioni variabili degli stimoli da testare, sono stati posti in triplicato nel compartimento inferiore di una camera (48 pozzetti) per chemiotassi (Neuroprobe, Cabin John, MD). Il compartimento inferiore è stato ricoperto da una membrana a sandwich di policarbonato con pori di 8 µm (superiore) e 5 µm (inferiore). Le membrane di policarbonato prive di PVP sono state preincubate (1 ora, 22°C) con laminina (10 µg/ml). Successivamente, 50 µl di sospensione cellulare ( $5 \times 10^4$ /pozzetto) in PACGM sono stati aggiunti in ogni pozzetto del compartimento superiore. La camera per la chemiotassi è stata posta (3 ore, 37°C) in un incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> (Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, Model 160IR, ICN Flow). Al termine dell'incubazione dei mastociti la membrana di policarbonato è stata rimossa, lavata con PBS nella parte superiore, fissata e colorata con May-Grunwald/Giemsa e montata su slide con Cytoseal (Stephen Scientific, Springfield, NJ). La chemiotassi dei mastociti è stata valutata mediante la conta al microscopio del numero di cellule che sono rimaste adese alla superficie inferiore della membrana di nitrocellulosa con pori da 8-µm (Romagnani, 1999). Per ogni esperimento sono stati contati 10 campi per ciascuno dei pozzetti in triplicato ad un ingrandimento di 40x. I risultati sono stati confrontati con i tamponi controllo. E' stata eseguita l'analisi di controllo per distinguere la migrazione

spontanea (chemiochinesi) dalla chemiotassi indotta dagli stimoli. In questi esperimenti i mastociti 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 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.

#### *Rilascio di istamina dai mastociti umani*

Il contenuto di istamina nei lisati e nei soprannatanti in coltura dei mastociti umani è stato misurato in duplicato (de Paulis, 1991; Siraganian, 1974). I duplicati differivano tra loro meno del 10%.

#### *Saggio della membrana corioallantoidea di pollo*

Uova di pollo “White Leghorn” fecondate sono state incubate in condizioni di umidità costante a 37°C secondo una tecnica precedentemente descritta in dettaglio (Ribatti, 2002). Al terzo giorno di incubazione si crea un’apertura nel guscio e sono rimossi 2-3 ml di albume in maniera tale da staccare la membrana chorioallantoidea (CAM) in via di sviluppo dal guscio. L’apertura è stata sigillata con un vetrino di uguali dimensioni e le uova sono state riposte nell’incubatore. Le CAMs sono state incubate all’ottavo giorno con i soprannatanti di HLMC trattati con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) o NECA (10<sup>-5</sup> M) disciolto in 3 µl di DMEM ed adsorbiti su spugne di gelatina sterili di 1 mm<sup>3</sup> (Gelfoam, Upjohn Company, Kalamazoo, MI). Le spugne contenenti il solo veicolo sono state utilizzate come controllo negativo, mentre le spugne contenenti 50 ng/embrione di VEGF-A<sub>165</sub> umano ricombinante sono state utilizzate come

controllo positivo. In alcuni esperimenti, i sopranatanti di mastociti attivati sono stati preincubati con un anticorpo policlonale neutralizzante il VEGF-A (anti-VEGF-A di capra, 500 ng/embryo) (R&D Systems) o con anticorpi IgG come controllo isotipico (500 ng/ml) (Chemicon International, Temecula, CA) prima dell'impianto. Le CAMs sono state esaminate quotidianamente fino al dodicesimo giorno e fotografate *in ovo* con uno stereomicroscopio SR equipaggiato con Zeiss Camera System MC63. In alcuni esperimenti, i vasi sanguigni infiltranti le spugne sono stati contati in doppio cieco da due osservatori ad un ingrandimento 50x.

#### *Analisi statistica*

I risultati presentati rappresentano la media  $\pm$  SEM. I dati sono stati analizzati utilizzando il test t di Student o il test ANOVA; quando necessario è stato utilizzato il *Duncan's new multiple range test* (Snedecor, 1980). La significatività è stata definita come  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### *Espressione di mRNA per i VEGFs e PLGF nei mastociti umani*

In una prima serie di esperimenti abbiamo valutato l'espressione di mRNA per i diversi membri della famiglia di VEGFs nelle HLMC, LAD-2 ed HMC-1. L'analisi dei prodotti della RT-PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio ha rilevato l'espressione di tre isoforme di VEGF-A (VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-A<sub>189</sub>) e delle due isoforme di VEGF-B (VEGF-B<sub>167</sub> e VEGF-B<sub>186</sub>) in tutti i tipi di mastociti umani esaminati (Fig. 1). Il rapporto VEGF-B<sub>186</sub>/VEGF-B<sub>167</sub> era  $0,47 \pm 0,05$  nelle HLMC mentre risultava significativamente aumentato nelle cellule LAD-2 ( $1,32 \pm 0,14$ ;  $p < 0,05$ ) e nelle HMC-1 ( $4,73 \pm 0,77$ ;  $p < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). È opportuno sottolineare che l'espressione di mRNA per VEGF-C e VEGF-D, due mediatori dello sviluppo linfatico (Haiko, 2007) è stata rilevata in tutti i tipi di mastociti umani esaminati.

PlGF è altamente espresso a livello placentare (Maglione, 1991) ed in alcuni tumori umani (Viglietto, 1995). L'espressione di mRNA per le due maggiori isoforme di PlGF (PlGF-1 e PlGF-2) è stata rilevata soltanto nelle HMC-1 e non nelle HLMC e LAD-2 (Fig. 1).

### *Contenuto proteico di VEGF-A e PlGF nei mastociti umani*

In una serie parallela di esperimenti abbiamo valutato l'espressione a livello proteico di VEGF-A e PlGF nei mastociti umani. A tale scopo, i mastociti sono stati lisati ed il contenuto totale di VEGF-A immunoreattivo è stato misurato mediante la tecnica ELISA. La concentrazione di VEGF-A nelle HLMC, LAD-2 e HMC-1 era di  $28,0 \pm 6,0$  pg/ $10^6$  cellule,  $105,0 \pm 17,0$  pg/ $10^6$  cellule e  $70,0 \pm 11,0$  pg/ $10^6$  cellule, rispettivamente (HLMC vs. LAD-2,  $p$

< 0,01; HLMC vs. HMC-1,  $p < 0,01$ ; LAD-2 vs. HMC-1, NS). L'analisi dei livelli di PIGF immunoreattivo mediante ELISA ha rilevato l'assenza di questa proteina in tutti i tipi di mastociti esaminati incluse le HMC-1, che esprimevano il corrispondente mRNA (dati non mostrati).

#### *VEGF-B, VEGF-C, e VEGF -D nei mastociti umani*

Al fine di verificare se i mastociti umani esprimono a livello proteico gli altri membri della famiglia dei VEGFs (VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D) abbiamo utilizzato l'analisi Western blot. Quando gli estratti proteici di HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono stati incubati con un anticorpo anti-VEGF-B, una banda immunoreattiva di circa 20-22 kDa è stata rilevata in tutti e tre i tipi di mastociti umani esaminati (Fig. 2A). Questa banda co-migrava con il VEGF-B<sub>167</sub> presente nella linea cellulare MCF-7 utilizzata come controllo positivo (Ruohola, 1999). Al contrario, nessuna banda immunoreattiva corrispondente all'isoforma VEGF-B<sub>189</sub> è stata evidenziata nei mastociti umani presi in esame.

E' stato dimostrato che i precursori di VEGF-C e VEGF-D vengono sottoposti ad un complesso processo proteolitico (Joukov, 1997; Stacker, 1999). Pertanto, abbiamo valutato l'espressione a livello proteico di VEGF-C e VEGF-D nei mastociti umani utilizzando specifici anticorpi diretti contro i loro precursori. Nelle HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state evidenziate bande immunoreattive di 58 kDa (Fig. 2B) e 53 kDa (Fig. 2C) che corrispondono rispettivamente ai precursori proteici di VEGF-C e VEGF-D. Come controllo positivo abbiamo utilizzato la linea cellulare RAW 264.7 che esprime i precursori di VEGF-C e VEGF-D.



### *Secrezione spontanea di VEGF-A e di PIGF dai mastociti umani*

Abbiamo valutato la secrezione spontanea di VEGF-A e PIGF in condizioni basali nelle tre linee dei mastociti umani utilizzati per questo studio. A tale scopo, HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state poste in coltura per 48 ore. Al termine del periodo di incubazione le HLMC hanno rilasciato una quantità di VEGF-A pari a circa 40 pg/10<sup>6</sup> cellule (Fig. 3A). Non è stato documentato alcun rilascio di PIGF (dati non mostrati). Le cellule LAD-2 ed HMC-1 hanno rilasciato spontaneamente concentrazioni maggiori di VEGF-A (207 ± 20 pg/10<sup>6</sup> cellule e 181 ± 40 pg/10<sup>6</sup> cellule, rispettivamente) (Fig. 3A). E' interessante notare che le cellule HMC-1 pur esprimendo costitutivamente mRNA per PIGF-1/2, non rilasciano PIGF immunoreattivo. Analoghi risultati sono stati ottenuti con le cellule LAD-2. In questi esperimenti, il rilascio di istamina, un mediatore preformato, rimane sostanzialmente inalterato (dati non mostrati).

### *Effetti della actinomicina D, cicloesimide e brefeldina A sulla secrezione spontanea di VEGF-A dai mastociti umani*

La secrezione spontanea di VEGF-A dalle LAD-2 richiede alcune ore di incubazione suggerendo che possa essere necessaria la sintesi *de novo* della proteina. Pertanto, abbiamo esaminato gli effetti della actinomicina D (inibitore di trascrizione), della cicloesimide (inibitore della sintesi proteica) e della brefeldina A (inibitore del trasporto intracellulare) sul rilascio spontaneo di VEGF-A da parte delle LAD-2. In tre esperimenti, le LAD-2 sono state preincubate (30 minuti) con actinomicina D (1 µg/ml), cicloesimide (10 µg/ml) o brefeldina A (10 µg/ml) e successivamente poste in coltura per 48 ore. Al termine dell'incubazione con i tre inibitori il rilascio spontaneo di VEGF-A dalle cellule LAD-2 è risultato completamente

inibito (Fig. 3B). Risultati analoghi sono stati ottenuti con le HLMC (dati non mostrati). Questi risultati indicano che il rilascio spontaneo di VEGF-A è un processo metabolico attivo che coinvolge la trascrizione dell'mRNA, la sintesi proteica ed il trasporto cellulare della proteina. Al fine di indagare altri potenziali meccanismi responsabili della secrezione di VEGF-A nei mastociti umani, abbiamo studiato il potenziale ruolo dei metaboliti della cicloossigenasi e della fosfodiesterasi e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2. A tale proposito, le cellule sono state incubate in presenza di un inibitore della cicloossigenasi (indometacina,  $10^{-6}$  M), un inibitore delle fosfodiesterasi (teofillina,  $10^{-4}$  M) o di una combinazione di anticorpi anti-VEGFR-1 ed anti-VEGFR-2. I risultati ottenuti indicano che nessuna di queste sostanze è in grado di inibire la secrezione spontanea di VEGF-A dai mastociti umani (dati non mostrati).

#### *Effetto della PGE<sub>2</sub> sulla produzione di VEGF-A nei mastociti umani*

E' noto che la PGE<sub>2</sub> esercita effetti pro-oncogenici in diversi tumori (Gupta, 2001; Rask, 2006). E' stato, inoltre, dimostrato che la PGE<sub>2</sub> promuove la crescita tumorale attraverso il potenziamento dell'angiogenesi neoplastica (Tsujii, 1998; Williams, 2000). Pertanto, in un gruppo di esperimenti abbiamo valutato l'effetto della PGE<sub>2</sub> sul rilascio di VEGF-A da parte dei tre tipi di mastociti umani utilizzati in questo studio. La Figura 4A mostra che nelle HLMC la PGE<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M) induce un significativo incremento della secrezione di VEGF-A dopo 24 e 48 ore di stimolazione. Nelle cellule LAD-2 questo aumento risulta ancora più marcato mentre nelle cellule HMC-1 la PGE<sub>2</sub> non incrementa la secrezione di VEGF-A.

*Effetti della actinomicina D, della cicloesimide e della brefeldina A sulla produzione di VEGF-A indotta dalla PGE<sub>2</sub> nei mastociti umani*

Abbiamo esaminato gli effetti dell'actinomicina D, della cicloesimide e della brefeldina A sulla produzione di VEGF-A nei mastociti umani indotta da PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M). La preincubazione (30 min) delle cellule LAD-2 con actinomicina D (1 µg/ml), cicloesimide (10 µg/ml) o brefeldina A (10 µg/ml) blocca completamente il rilascio di VEGF-A indotto dalla PGE<sub>2</sub> nelle cellule LAD-2 (Fig. 4B). Analoghi risultati sono stati ottenuti con le cellule HLMC (dati non mostrati). Questi risultati suggeriscono che la produzione di VEGF-A indotta dalla PGE<sub>2</sub> è un processo metabolico attivo che richiede la trascrizione dell' mRNA, la sintesi proteica ed il trasporto cellulare.

*Effetti della PGE<sub>2</sub> sull'espressione di mRNA per i VEGFs nei mastociti umani*

L'inibizione della secrezione di VEGF-A indotto dalla PGE<sub>2</sub> in seguito all'azione di un inibitore della trascrizione (actinomicina D) è compatibile con l'ipotesi che la PGE<sub>2</sub> possa indurre la trascrizione di mRNA per il VEGF-A. Pertanto, abbiamo esaminato, mediante RT-PCR quantitativa (qRT-PCR), le cinetiche di espressione di mRNA per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D nelle cellule LAD-2 stimulate con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M). La Figura 5 mostra le diverse cinetiche di espressione di mRNA per le varie forme di VEGF. L'espressione di mRNA per VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C è rapidamente incrementata dopo 3 ore di incubazione dei mastociti con la PGE<sub>2</sub> con un ritorno al valore basale dopo 6 ore. E' interessante notare che l'espressione di mRNA per il VEGF-B<sub>167</sub> raggiunge il massimo dopo 6 ore di incubazione con la PGE<sub>2</sub> per poi ridursi dopo 9 ore. Al contrario, l'espressione di mRNA per il VEGF-D non si modifica dopo stimolazione con PGE<sub>2</sub>.

### *Effetti di un analogo dell'adenosina (NECA) sulla produzione di VEGF-A nei mastociti umani*

L'adenosina è un nucleoside purinico endogeno; dopo il suo rilascio dalla cellula o dopo la sua sintesi nell'ambiente extracellulare, può attivare specifici recettori (Marone, 1978; Hasko, 2004). E' noto che in alcune aree di tumori solidi è spesso presente uno stato di ipossia transitoria o cronica (Harris, 2002) riconducibile all'accumulo extracellulare di adenosina (Decking, 1997). Inoltre, è noto il ruolo di adenosina nell'asma e nelle malattie croniche ostruttive del polmone (Caruso, 2006; Mann, 1985; Feoktistov, 1998). Pertanto, abbiamo ritenuto interessante esaminare gli effetti di NECA, un analogo metabolicamente stabile dell'adenosina, sulla secrezione di VEGF-A dai mastociti umani. La Figura 6 mostra che NECA ( $10^{-5}$  M) induce un marcato incremento della secrezione di VEGF-A dopo 6 e 12 ore di stimolazione delle HMC-1.

### *Effetto di NECA sulla espressione di mRNA per i VEGFs nei mastociti umani*

In una successiva serie di esperimenti abbiamo valutato, mediante la tecnica qRT-PCR, la cinetica di espressione di mRNA per VEGF-A<sub>165</sub>, -B<sub>167</sub>, -C e -D nelle HMC-1 stimolate con NECA ( $10^{-5}$  M). La Figura 7 mostra che l'espressione di mRNA per il VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C incrementava rapidamente dopo 3 ore di incubazione rimanendo stabile fino a 9 ore. L'espressione di mRNA per VEGF-D rimaneva inalterato per le prime 3 ore di incubazione con NECA per poi aumentare progressivamente fino a 9 ore. Infine, NECA non modificava l'espressione di mRNA per VEGF-B<sub>167</sub>.

*Risposta angiogenica nella membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM) indotta da soprannatanti dei mastociti umani attivati con PGE<sub>2</sub>*

I risultati degli esperimenti precedenti dimostrano che i mastociti umani producono diversi fattori angiogenici. In una serie di tre esperimenti abbiamo valutato l'ipotesi che soprannatanti di HLMC stimolate con PGE<sub>2</sub> possano indurre una risposta angiogenica *in vivo*. Questi esperimenti sono stati eseguiti utilizzando la membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM) (Ribatti, 2002). Nelle CAM di embrioni di pollo all'ottavo giorno di incubazione sono state impiantate spugne di gelatina imbevute di soprannatante di mastociti umani. Le spugne adsorbite con il tampone o con il VEGF-A<sub>165</sub> sono state utilizzate rispettivamente come controllo negativo o positivo. Al dodicesimo giorno di incubazione, l'osservazione macroscopica delle CAMs non ha dimostrato nessuna risposta angiogenica nelle spugne trattate con tampone (numero di vasi della spugna-CAM =  $8 \pm 2$ ) (Fig. 8A). Il numero di vasi nelle spugne-CAM dopo l'adsorbimento con soprannatanti di mastociti umani non stimolati tenuti in coltura per 24 ore era  $15 \pm 4$  (Fig. 8B). I soprannatanti di HLMC attivate con PGE<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M) per 24 ore inducevano una risposta angiogenica caratterizzata dalla presenza di vasi allantoici che si distribuivano radialmente attraverso la spugna (numero di vasi della spugna-CAM =  $25 \pm 3$ ) (Fig. 8C). Una simile risposta angiogenica è stata osservata macroscopicamente negli impianti trattati con 50 ng di VEGF-A<sub>165</sub> (numero di vasi della spugna-CAM =  $28 \pm 4$ ) (dati non mostrati). Al fine di valutare se la risposta angiogenica indotta dai soprannatanti dei mastociti umani fosse in parte dovuta al loro contenuto di VEGF-A, i soprannatanti di mastociti attivati con la PGE<sub>2</sub> sono stati preincubati con un anticorpo anti-VEGF-A e successivamente aggiunti alla

CAM. La preincubazione con un anticorpo anti-VEGF-A riduceva in maniera significativa la risposta angiogenica dei mastociti (numero dei vasi della spugna-CAM =  $17 \pm 3$ ;  $p < 0,001$  vs i soprannatanti di mastociti attivati da PGE<sub>2</sub>) (Fig. 8D). L'incubazione dei mastociti con il controllo isotipico non influenzava la risposta angiogenica (dati non mostrati).

*Risposta angiogenica nella membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM) indotta da soprannatanti dei mastociti umani attivati con NECA*

In altri due esperimenti, abbiamo valutato la risposta angiogenica *in vivo* dei soprannatanti di mastociti attivati con NECA utilizzando la membrana CAM dell'embrione di pollo. Nessuna risposta vascolare è stata osservata attorno alle spugne trattate con il tampone (numero di vasi nella spugna =  $7 \pm 2$ ) (Fig. 9A). Nelle spugne imbevute con i soprannatanti dei mastociti non stimolati tenuti in coltura per 9 ore, il numero dei vasi era  $16 \pm 4$  (Fig. 9B). I soprannatanti di HLMC attivate con NECA ( $10^{-5}$  M) per 9 ore inducevano una marcata risposta angiogenica (numero di vasi nella spugna-CAM =  $26 \pm 4$ ) (Fig. 9C). La risposta angiogenica dei mastociti attivati con il NECA è stata parzialmente inibita dalla preincubazione con un anticorpo anti-VEGF-A (numero di vasi =  $18 \pm 3$ ) (Fig. 9D).

*Espressione di mRNA per VEGFR-1, sVEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 e NRP-1 e NRP-2 nei mastociti umani*

I recettori per VEGFR-1 e VEGFR-2 sono espressi sulle cellule endoteliali (Ferrara, 2007) e su alcune cellule del sistema immunitario (Barleon, 1996; Sawano, 2001; de Paulis, 2006). Tali recettori sono strutturalmente simili, pur presentando alcune caratteristiche

biochimiche distinte. Abbiamo valutato l'espressione a livello di mRNA di VEGFR-1, VEGFR-2, sVEGFR-1, VEGFR-3, NRP-1 e NRP-2 nei tre tipi di mastociti umani esaminati. La figura 10 mostra i risultati di un tipico esperimento che dimostra che VEGFR-1, VEGFR-2, sVEGFR-1, NRP1 e NRP-2 sono costitutivamente espressi nei tre tipi di mastociti umani esaminati (HLMC, LAD-2 ed HMC-1). Il recettore VEGFR-3 è costitutivamente espresso solo nelle cellule LAD-2.

#### *Effetti di VEGFs e PlGF sulla chemiotassi dei mastociti umani*

E' noto che il VEGF-A stimola la migrazione delle cellule endoteliali (Nagy, 2003) ed è chemiotattico per alcune cellule del sistema immunitario (Barleon, 1996; Sawano, 2001; de Paulis, 2006;). L'espressione dei recettori VEGFRs sui mastociti umani consente di prospettare che diversi membri della famiglia di VEGFs possano indurre la chemiotassi di tali cellule. Pertanto, abbiamo valutato comparativamente gli effetti *in vitro* di un ampio range di concentrazioni (10 – 500 ng/ml) di VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C, VEGF-D e PlGF-1 sulla chemiotassi di HLMC. La Figura 11 mostra i risultati di cinque esperimenti nei quali VEGF-A<sub>165</sub> induceva la chemiotassi dose-dipendente di HLMC. Abbiamo eseguito un'analisi di controllo per stabilire se la migrazione dei mastociti indotta da VEGF-A<sub>165</sub> fosse dovuta alla chemiotassi od alla chemiochinesi. VEGF-A<sub>165</sub> induceva una migrazione dose-dipendente dei mastociti quando veniva aggiunto nel compartimento inferiore della camera di Boyden. Viceversa, una concentrazione ottimale di VEGF-A<sub>165</sub> (500 ng/ml) aggiunta alle cellule nei pozzetti superiori od in entrambi i compartimenti non induceva la migrazione direzionale dei mastociti (dati non mostrati). Pertanto, la migrazione dei mastociti indotta da VEGF-A è dovuta alla chemiotassi piuttosto che alla chemiochinesi.

Abbiamo precedentemente dimostrato che le HLMC esprimono mRNA per VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D (Fig. 1 e 3). Abbiamo quindi valutato gli effetti chemiotattici di questi fattori angiogenici. I risultati riportati nella Fig. 11 dimostrano che questi fattori inducono la chemiotassi dose-dipendente delle HLMC. Inoltre, PlGF-1, espresso a livello di mRNA soltanto nelle HMC-1, induceva la chemiotassi delle HLMC. L'efficacia di questi fattori nell'indurre la chemiotassi era paragonabile a quella di VEGF-A<sub>165</sub> ad eccezione della concentrazione maggiore di VEGF-B<sub>167</sub> e PlGF-1 che sono agonisti selettivi di VEGFR-1 (Tammela, 2005; Ferrara, 2007).

*Effetti degli anticorpi anti-VEGFR-1 e/o anti-VEGFR-2 sulla chemiotassi dei mastociti umani indotta da VEGF-A<sub>165</sub>*

Abbiamo precedentemente dimostrato che le HLMC esprimono costitutivamente mRNA per VEGFR-1 e VEGFR-2 (Fig. 10). Al fine di verificare se la chemiotassi delle HLMC indotta dal VEGF-A<sub>165</sub> era mediata dall'attivazione di VEGFR-1 e/o VEGFR-2 abbiamo preincubato le cellule con anticorpi specifici diretti contro questi recettori. La Figura 12 mostra che la preincubazione delle HLMC con un anticorpo anti-VEGFR-1 inibisce significativamente la chemiotassi indotta dal VEGF-A<sub>165</sub>. Inoltre, la preincubazione delle cellule con un anticorpo anti-VEGFR-2 ha inibito in maniera ancora più marcata la chemiotassi indotta dal VEGF-A<sub>165</sub>. Questo risultato è in accordo con l'osservazione che gli agonisti selettivi per il VEGFR-1 (VEGF-B<sub>167</sub> e PlGF-1) sono meno potenti nell'indurre la chemiotassi nei mastociti umani esaminati (Fig. 11). La preincubazione delle HLMC con una combinazione di entrambi gli anticorpi (anti-VEGFR-1 + anti-VEGFR-2) blocca completamente la chemiotassi delle HLMC indotta dal VEGF-A<sub>165</sub>. La preincubazione delle



HLMC con un anticorpo isotipico irrilevante non modificava la chemiotassi causata da VEGF-A<sub>165</sub>. Pertanto, appare lecito concludere che la chemiotassi delle HLMC indotta dal VEGF-A<sub>165</sub> è mediata dalla attivazione di entrambi i recettori, VEGFR-1 e VEGFR-2.

## DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, la famiglia VEGFs/VEGFRs emerge sempre di più come un meccanismo di regolazione fondamentale per la modulazione dell'angiogenesi, della linfoangiogenesi e del rimodellamento tessutale in corso di patologie infiammatorie e neoplastiche (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2007; Haiko, 2007). I risultati emersi da recenti osservazioni dimostrano che questo complesso sistema biologico può modulare anche diversi aspetti delle reazioni immunitarie ed infiammatorie (Danese, 2006; Hoshino, 2001; Ikeda, 2000; de Paulis, 2006; Barleon, 1996; Sawano, 2001). In questo studio abbiamo identificato un nuovo meccanismo attraverso il quale i mastociti umani influenzano l'angiogenesi, la linfoangiogenesi e l'infiammazione attraverso la sintesi ed il rilascio di diverse forme di VEGFs. Inoltre, abbiamo dimostrato che diverse componenti della famiglia dei VEGFs esercitano una funzione chemiotattica attraverso l'interazione con i recettori per i VEGFs presenti sui mastociti umani.

Esistono diversi modelli *in vitro* per lo studio della biologia dei mastociti umani. I mastociti primari purificati da tessuto umano, tra cui i mastociti ottenuti dal tessuto polmonare (HLMC) rappresentano probabilmente il modello che più fedelmente riproduce le condizioni *in vivo*. Tuttavia, le difficoltà tecniche di ottenere un numero di cellule sufficiente per esperimento *in vitro* ostacolano un esteso utilizzo di questo eccellente modello sperimentale. La linea di mastociti umani di origine leucemica HMC-1 viene spesso utilizzata per studiare la biologia mastocitaria. Questa linea cellulare indifferenziata è stata spesso utilizzata per valutarne gli aspetti angiogenici dei mastociti umani (Abdel-Majid, 2004; Cao, 2005; Feoktistov, 2003; Grutzkau, 1998). Tuttavia, le cellule HMC-1 sono prive di alcuni aspetti fenotipici e biologici caratteristici dei mastociti umani normali. In particolare, queste cellule

non esprimono i recettori ad alta affinità per le IgE (Butterfield, 1990). Più recentemente, è stata sviluppata la linea mastocitaria LAD-2 che presenta notevoli somiglianze con le colture primarie di mastociti umani derivanti dalle cellule CD34<sup>+</sup> (Kirshenbaun, 2003). Infatti, l'espressione di alcuni markers di superficie, di mediatori e recettori FcεRI e FcγRI rendono questa linea idonea per lo studio dei mastociti. Al fine di approfondire le attuali conoscenze sul possibile ruolo dei mastociti umani nell'ambito dell'angiogenesi e della linfoangiogenesi, il presente studio è stato condotto con tutti e tre i tipi di mastociti umani suddetti: HLMC, HMC-1 e LAD-2.

I mastociti umani del parenchima polmonare, le cellule LAD-2 e le HMC-1 esprimono costitutivamente mRNA per le principali isoforme di VEGF-A (121, 165 e 189) e per le due isoforme di VEGF-B (167 e 186) che svolgono un ruolo fondamentale nell'angiogenesi (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2007). Inoltre, i tre tipi di mastociti umani esaminati esprimono costitutivamente mRNA per VEGF-C e VEGF-D che regolano lo sviluppo dei vasi linfatici (Haiko, 2007; Wirtzenius, 2007). Questi risultati confermano ed estendono alle cellule HLMC e LAD-2 le osservazioni precedentemente ottenute da altri studi sulle HMC-1 e/o sui mastociti derivati da cellule del cordone ombelicale (CBMC) (Boesiger, 1998; Abdel- Majid, 2004; Cao, 2005; Grutzkau, 1998). mRNA per le due isoforme di PlGF-1 e -2 è stato rilevato solo nelle cellule HMC-1. E' interessante segnalare che mRNA per PlGF è stato precedentemente riscontrato in linee di mastociti murini (Nakayama, 2004). Pertanto questi ultimi risultati ampliano le significative differenze tra i diversi tipi di mastociti umani e tra mastociti umani e murini.

A livello proteico il VEGF-A è contenuto in concentrazioni significativamente diverse nei tre tipi di mastociti umani valutati. Le proteine per VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D sono

state rilevate mediante Western blot nei lisati cellulari dei tre i tipi di mastociti esaminati. In particolare, l'espressione e sintesi di VEGF-C e VEGF-D nei mastociti umani supporta l'ipotesi che queste cellule, localizzate in prossimità dei vasi ematici e linfatici (Bowers, 1979; Paiva, 1996; Patella, 1998) possano svolgere un ruolo significativo nella linfoangiogenesi attraverso la produzione di fattori che promuovono lo sviluppo dei vasi linfatici. Infine, PlGF immunoreattivo non è stato rilevato nei mastociti umani esaminati e/o nei loro soprannatanti. Ciò apparentemente contrasta con la osservazione che le cellule HMC-1 esprimono costitutivamente mRNA per PlGF-1 and -2.

In questo studio abbiamo dimostrato che i mastociti umani secernono spontaneamente VEGF-A durante un periodo di 6 – 48 ore. La secrezione spontanea di VEGF-A risulta più elevata nelle LAD-2 ed HMC-1 rispetto alle HLMC. Questa ultima osservazione potrebbe aggiungersi alle differenze precedentemente riportate sulla secrezione spontanea di VEGF-A nelle HMC-1, CBMC e BMMC (Boesiger, 1998; Abdel-Majid, 2004; Grutzkau, 1998). Abbiamo anche dimostrato che i soprannatanti di mastociti non stimolati esercitano una risposta angiogenica *in vivo*. Il significato biologico e fisiopatologico del rilascio spontaneo di fattori angiogenici da parte dei mastociti rimane da chiarire. E' interessante notare che il rilascio spontaneo di VEGF-A dai mastociti umani non viene modificato dall'indometacina, dalla teofillina, o dalla combinazione di anti-VEGFR-1 ed anti-VEGFR-2. Viceversa, la preincubazione con inibitori della trascrizione (actinomicina D), della sintesi proteica (cicloesimide) e del trasporto intracellulare (brefeldina A) lo inibiscono completamente. Questa osservazione suggerisce che l'espressione e la produzione di fattori angiogenici dai mastociti umani è un processo metabolicamente attivo.

Molteplici studi dimostrano che la PGE<sub>2</sub> è un importante mediatore proinfiammatorio, rilevante nella crescita tumorale (Gupta, 2001; Rask, 2006; Tsuji, 1998; Williams, 2000). Per tale motivo abbiamo esaminato la cinetica dell'espressione delle diverse forme di VEGF in mastociti umani stimolati con la PGE<sub>2</sub>. Abbiamo documentato che la PGE<sub>2</sub> è un potente stimolo per la produzione di VEGF-A nelle cellule LAD-2 ed HLMC, ma non nelle HMC-1. Anche in questo caso, il rilascio di VEGF-A indotto dalla PGE<sub>2</sub> veniva inibito dall'actinomicina D, dalla cicloesimide e dalla brefeldina A suggerendo che in questo processo sia coinvolto un meccanismo trascrizionale dell'mRNA. In effetti, ulteriori esperimenti hanno dimostrato che la PGE<sub>2</sub> incrementava l'espressione a livello di mRNA di diversi membri della famiglia di VEGF con differenti cinetiche: per il VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C mRNA l'incremento della trascrizione indotto dalla PGE<sub>2</sub> raggiungeva rapidamente un picco mentre l'espressione di mRNA per VEGF-B<sub>167</sub> iniziava più tardivamente. È interessante sottolineare che l'espressione VEGF-D mRNA non veniva modificata dalla PGE<sub>2</sub>. E' stato precedentemente riportato che la PGE<sub>2</sub> è un potente induttore della secrezione di VEGF-A dai mastociti umani CBMC (Abdel-Majid, 2004). In questo studio, abbiamo esteso la precedente osservazione dimostrando che la PGE<sub>2</sub> può indurre l'espressione di VEGF-B e VEGF-C. Questi dati suggeriscono che la PGE<sub>2</sub> potrebbe svolgere un ruolo importante non soltanto nell'angiogenesi, ma anche nella linfoangiogenesi.

E' noto che in alcune aree tumorali si verifica ad una transitoria o cronica ipossia (Harris, 2002) che può condurre all'accumulo extracellulare di adenosina (Decking, 1997). E' stato ampiamente dimostrato che l'adenosina svolge un ruolo rilevante nei meccanismi patogenetici dell'asma bronchiale e delle malattie croniche ostruttive del polmone (Caruso, 2006; Mann, 1985; Feoktistov, 1998). Pertanto, abbiamo esaminato le cinetiche degli effetti di

un analogo stabile dell'adenosina (NECA) sull'espressione di mRNA per i VEGFs nei differenti tipi di mastociti umani utilizzati. NECA induce un rapido e duraturo incremento della trascrizione di VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C mentre l'aumento dell'espressione di VEGF-D è più tardivo. Viceversa l'espressione di VEGF-B<sub>167</sub> non è apparentemente inducibile da NECA. Questi risultati dimostrano che un analogo dell'adenosina è un potente induttore dell'espressione di VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D suggerendo che l'adenosina possa essere un modulatore importante non soltanto nell'angiogenesi, ma anche nella linfoangiogenesi.

Gli esperimenti suddetti dimostrano che PGE<sub>2</sub> e NECA modulano in maniera differente l'espressione dei diversi membri della famiglia del VEGF incrementando diversamente la trascrizione delle varie forme di VEGF. Queste osservazioni implicano che i fattori prodotti e secreti dai mastociti potrebbero intervenire in tempi diversi nella regolazione del complesso processo di angiogenesi e linfoangiogenesi nell'ambito di patologie infiammatorie e neoplastiche.

I mastociti sono strategicamente localizzati in prossimità dei vasi sanguigni e linfatici (Bowers, 1979; Pavia, 1996) e risultano aumentati in diversi tumori umani (Acikalin, 2005; Chan, 2005; Welsh, 2005). La loro presenza è correlata all'angiogenesi ed alla formazione di metastasi (Aoki, 2003; Iamaroon, 2003; Kondo, 2006; Ribatti, 2004; Takanami, 2000; Yano, 1999). Inoltre, i mastociti ed i loro mediatori sono implicati nella patogenesi dell'asma bronchiale ed di alcune malattie infiammatorie croniche (Marone, 2005; Bishoff, 2007; Dawicki, 2007). Pertanto, la produzione (spontanea ed indotta) dei fattori angiogenici e linfoangiogenici dai mastociti umani potrebbe contribuire all'angiogenesi ed alla linfoangiogenesi infiammatoria e neoplastica. Questa ipotesi è supportata dai risultati ottenuti nel modello *in vivo* dell'angiogenesi della CAM. In effetti, i soprannatanti di mastociti non

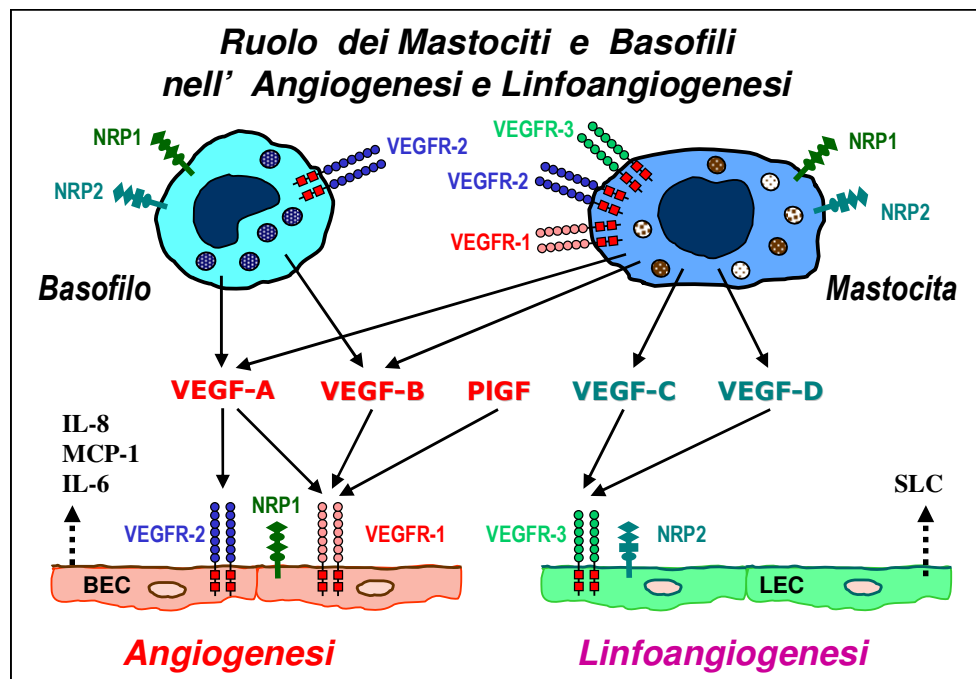
stimolati e/o attivati con la PGE<sub>2</sub> ed il NECA inducono una risposta angiogenica parzialmente inibita da un anticorpo anti-VEGF-A.

Un'altra importante osservazione di questo studio è che VEGF-A, -B, -C, -D e PlGF esercitano effetti chemiotattici sui mastociti umani, attraverso l'attivazione dei recettori tirosin-chinasici VEGFR-1 e VEGFR-2, espressi in tutti i mastociti esaminati. E' anche possibile che i VEGFs e PlGF prodotti nelle sedi di infiammazioni (Bishoff, 2007) e/o tumori (Acikalin, 2005; Ribatti, 2003; Welsh, 2005; Ribatti, 2004) possano contribuire all'infiltrazione mastocitaria. Inoltre, i mastociti umani, attraverso la produzione di VEGFs, possono rappresentare una fonte locale di fattori chemiotattici che contribuiscono al reclutamento di altre cellule del sistema immunitario nei siti di infiammazione e dei tumori.

L'espressione dei recettori dei VEGFs sulle cellule del sistema immunitario varia notevolmente ed è tuttora oggetto di studio. La maggior parte dei monociti umani esprime soltanto VEGFR-1 (Barleon, 1996; Sawano, 2001), mentre una piccola frazione (~ 2%) di CD14<sup>+</sup> esprime il VEGFR-2 (Elsheik, 2005). I mastociti umani, esprimendo sia VEGFR-1 che VEGFR-2, si differenziano dalla maggior parte dei monociti (Barleon, 1996; Sawano, 2001; Elsheik, 2005), degli eosinofili (Feistritzer, 2004) e dei neutrofili (Ancelin, 2004) che esprimono solo il VEGFR-1. Pertanto, il VEGFR-1 sembrerebbe mediare la chemiotassi dei monociti umani (Barleon, 1996; Sawano, 2001), neutrofili (Ancelin 2004) ed eosinofili (Feistritzer, 2004). Viceversa, nei basofili umani il VEGF-A esercita effetti chemiotattici attraverso l'attivazione del recettore VEGFR-2 (de Paulis, 2006). Abbiamo dimostrato che gli anticorpi diretti contro i VEGFR-1 e VEGFR-2 riducono l'effetto chemiotattico di VEGF-A<sub>165</sub> sui mastociti umani. Soltanto la combinazione dei due anticorpi è in grado di sopprimere

completamente l'attività chemiotattica del VEGF-A. Pertanto, l'attivazione di entrambi i recettori appare implicata nell'induzione della chemiotassi nei mastociti umani.

Questi ultimi risultati, insieme a molteplici precedenti osservazioni ultrastrutturali, immunologiche e biochimiche (de Paulis, 2006) evidenziano le differenze tra i mastociti umani ed i basofili del sangue periferico in termini di potenziale angiogenico. I basofili esprimono in maniera costitutiva soltanto fattori angiogenici (VEGF-A e VEGF-B) e non VEGF-C, -D (de Paulis, 2006) e PlGF (dati non pubblicati). Al contrario, i mastociti umani, attraverso l'espressione di VEGF-C e VEGF-D, possono svolgere un ruolo non soltanto nell'angiogenesi, ma anche nella linfoangiogenesi (Immagine 4). Inoltre, la PGE<sub>2</sub> costituisce un potente stimolo per il rilascio di VEGF-A nei mastociti mentre non ha alcun effetto sui basofili (de Paulis, 2006). Infine, i basofili esprimono selettivamente il VEGFR-2, mentre i mastociti umani esprimono VEGFR-1 e VEGFR-2.



(Immagine 4)



I risultati di questo studio ampliano le marcate differenze biochimiche ed immunologiche che si osservano tra i mastociti derivati da specie diverse (uomo - roditori) e l'influenza esercitata dai differenti stadi di maturazione sull'espressione e la produzione di fattori angiogenici. Pertanto i dati sull'angiogenesi e la linfoangiogenesi ottenuti in modelli murini non debbono essere invariabilmente ritenuti applicabili ai mastociti umani. Inoltre, risulta evidente che le linee mastocitarie neoplastiche come le HMC-1 ed in minore misura le LAD-2, esprimono differenze biochimiche rispetto alle colture primarie di mastociti tessutali. Per i suddetti motivi in questo studio abbiamo incluso le colture di mastociti polmonari primari.

In conclusione, questo gruppo di esperienze offre un esteso approfondimento sui meccanismi fondamentali della angiogenesi e della linfoangiogenesi, e sul coinvolgimento dei mastociti umani in questi processi nell'ambito delle malattie infiammatorie (Marone, 2005; Bishoff, 2007) e neoplastiche (Acikalin, 2005; Ribatti, 2003; Welsh, 2005; Kessler, 1976). Infatti, abbiamo dimostrato che i mastociti umani rappresentano una fonte rilevante di molteplici fattori angiogenici e linfoangiogenici. Infine, i risultati di queste esperienze consentono di prospettare nuove strategie terapeutiche per modulare l'angiogenesi e la linfoangiogenesi infiammatoria e neoplastica attraverso la regolazione della produzione di fattori angiogenici sintetizzati dai mastociti umani.

## BIBLIOGRAFIA

Abdel-Majid, R. M., and J. S. Marshall. 2004. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J. Immunol.* 172: 1227-1236.

Acikalin, M. F., U. Oner, I. Topcu, B. Yasar, H. Kiper, and E. Colak. 2005. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. *Dig. Liver. Dis.* 37: 162-169.

Alitalo, K., T. Tammela, and T. V. Petrova. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438: 946-953.

Ancelin, M., S. Chollet-Martin, M. A. Herve, C. Legrand, J. El Benna, and M. Perrot-Applanat. 2004. Vascular endothelial growth factor VEGF<sub>189</sub> induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab. Invest.* 84: 502-512.

Aoki, M., R. Pawankar, Y. Niimi, and S. Kawana. 2003. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 130: 216-223.

Baluk, P., T. Tammela, E. Ator, N. Lyubynska, M.G. Achen, D.J. Hicklin, M. Jeltsch, T.V. Petrova, B. Pytowski, S. A. Stacker, S. Yla-Herttuala, D. G. Jackson, K. Alitalo and

- D.M. Mc Donald. 2005. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 115: 247-257.
- Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani, and 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: 3336-3343.
- Bischoff, S. C. 2007. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 93-104.
- Boesiger, J., M. Tsai, M. Maurer, M. Yamaguchi, L. F. Brown, K. P. Claffey, H. F. Dvorak, and 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 Fcε receptor I expression. *J. Exp. Med.* 188: 1135-1145.
- Boussat, S., S. Eddahibi, A. Coste, V. Fataccioli, M. Gouge, B. Housset, S. Adnot, and B. Maitre. 2000. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L371-L378.
- Bowers, H. M., Jr., R. C. Mahapatro, and J. W. Kennedy. 1979. Numbers of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer* 43: 568-573.
- Boyce, J. A. 2003. The role of mast cells in asthma. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 69: 195-205.

- Butterfield, J. H., D. A. Weiler, L. W. Hunt, S. R. Wynn, and P. C. Roche. 1990. Purification of tryptase from a human mast cell line. *J. Leukoc. Biol.* 47: 409-419.
- Calabrese, C., V. Bocchino, A. Vatrella, C. Marzo, C. Guarino, S. Mascitti, C.M.E. Tranfa, M. Cazzola, P. Micheli, M. Caputi, and S.A. Marsico. 2006. Evidence of angiogenesis in bronchial biopsies of smokers with and without airway obstruction *Respir. Med.* 100: 1415–1422.
- Cao, J., N. Papadopoulou, D. Kempuraj, W. S. Boucher, K. Sugimoto, C. L. Cetrulo, and T. C. Theoharides. 2005. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J. Immunol.* 174: 7665-7675.
- Cao, Y., W. R. Ji, P. Qi, A. Rosin, and Y. Cao. 1997. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 493-498.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936.
- Caruso, M., S. T. Holgate, and R. Polosa. 2006. Adenosine signalling in airways. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6: 251-256.
- Chan, J. K., A. Magistris, V. Loizzi, F. Lin, J. Rutgers, K. Osann, P. J. DiSaia, and M. Samoszuk. 2005. Mast cell density, angiogenesis, blood clotting, and prognosis in women with advanced ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 99: 20-25.

Chetta, A., A. Zanini, A. Foresi, R. D'Ippolito, A. Tipa, A. Castagnaro, S. Baraldo, M. Neri, M. Saetta, and D. Olivieri. 2005. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodeling in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 35: 1437–1442.

Coussens, L. M., and Z. Werb. 2001. Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med.* 193: F23-F26.

Coussens, L. M., W. W. Raymond, G. Bergers, M. Laig-Webster, O. Behrendtsen, Z. Werb, G. H. Caughey, and D. Hanahan. 1999. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13: 1382-1397.

Danese, S., M. Sans, C. de la Motte, C. Graziani, G. West, M. H. Phillips, R. Pola, S. Rutella, J. Willis, A. Gasbarrini, and C. Fiocchi. 2006. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 130: 2060-2073.

Dawicki, W., and J. S. Marshall. 2007. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 31-38.

De Falco, S., B. Gigante, and M. G. Persico. 2002. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc. Med.* 12: 241-246.

de Paulis, A., N. Prevete, I. Fiorentino, F. W. Rossi, S. Staibano, N. Montuori, P. Ragno, A. Longobardi, B. Liccardo, A. Genovese, D. Ribatti, A. F. Walls, and G. Marone. 2006.

Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J. Immunol.* 177: 7322-7331.

de Paulis, A., N. Montuori, N. Prevete, I. Fiorentino, F. W. Rossi, V. Visconte, G. Rossi, G. Marone, and 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: 5739-5748.

de Paulis, A., R. Cirillo, A. Ciccarelli, M. Condorelli, and G. Marone. 1991. FK-506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human FcεRI<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 146: 2374-2381.

de Paulis, A., R. De Palma, L. Di Gioia, M. Carfora, N. Prevete, G. Tosi, R. S. Accolla, and G. Marone. 2000. Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human FcεRI<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 165: 7171-7179.

Decking, U. K., G. Schlieper, K. Kroll, and J. Schrader. 1997. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ. Res.* 81: 154-164.

Elsheikh, E., M. Uzunel, Z. He, J. Holgersson, G. Nowak, and S. Sumitran-Holgersson. 2005. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood* 106: 2347-2355.

Feistritzer, C., N. C. Kaneider, D. H. Sturn, B. A. Mosheimer, C. M. Kahler, and C. J. Wiedermann. 2004. Expression and function of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 in human eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30: 729-735.

Feoktistov, I., and I. Biaggioni. 1998. Pharmacological characterization of adenosine A2B receptors: studies in human mast cells co-expressing A2A and A2B adenosine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 55: 627-633.

Feoktistov, I., S. Ryzhov, A. E. Goldstein, and I. Biaggioni. 2003. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ. Res.* 92: 485-492.

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

Ferrara, N. 2007. Vascular endothelial growth factor: pathophysiology and clinical implications. In *Angiogenesis. From basic science to clinical applications*. N. Ferrara, ed. CRC, New York, 1-36.

Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Med.* 1:27-31.

Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimaldeston, A. M. Piliponsky, C. M. Williams, and M. Tsai. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 749-786.

Granata, F., A. Frattini, S. Loffredo, A. Del Prete, S. Sozzani, G. Marone, and M. Triggiani. 2006. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A<sub>2</sub> in human lung macrophages. *Eur. J. Immunol.* 36: 1938-1950.

Grutzkau, A., S. Kruger-Krasagakes, H. Baumeister, C. Schwarz, H. Kogel, P. Welker, U. Lippert, B. M. Henz, and 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 VEGF<sub>206</sub>. *Mol. Biol. Cell.* 9: 875-884.

Gupta, R. A., and R. N. Dubois. 2001. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* 1: 11-21.

Gupta, K., and J. Zhang. 2005. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad. Med. J.* 81:236-242.

Haiko, P. I., M. J. Karkkainen, M. G. Achen, A. Stacker, and K. Alitalo. 2007. Growth factors and lymphangiogenesis. In *Angiogenesis from basic science to clinical applications*. N. Ferrara, ed. CRC, New York, 53-74.



Harris, A. L. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2: 38-47.

Hashimoto, M., H. Tanaka, and S. Abe. 2005. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. *Chest* 127: 965-972.

Hasko, G., and B. N. Cronstein. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25: 33-39.

Hoshino, M., M. Takahashi, and 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

Hoshino, M., Y. Nakamura, and Q. A. Hamid. 2001. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 1034-1038.

Iamaroon, A., S. Pongsiriwet, S. Jittidecharaks, K. Pattanaporn, S. Prapayasadok, and S. Wanachantararak. 2003. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.* 32: 195-199.

Ikeda, M., Y. Hosoda, S. Hirose, Y. Okada, and E. Ikeda. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR, and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J. Pathol.* 191: 426-433.

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

Kendall, R. L., G. Wang, and 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: 324-328.

Kessler, D. A., R. S. Langer, N. A. Pless, and J. Folkman. 1976. Mast cells and tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* 18: 703-709.

Keyt, B. A., L. T. Berleau, H. V. Nguyen, H. Chen, H. Heinsohn, R. Vandlen, and N. Ferrara. 1996. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.* 271: 7788-7795.

Kirshenbaum, A. S., C. Akin, Y. Wu, M. Rottem, J. P. Goff, M. A. Beaven, V. K. Rao, and D. D. Metcalfe. 2003. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcεRI or FcγRI. *Leuk. Res.* 27: 677-682.

Knox, A.J., L. Corbett, J. Stocks, E. Holland, Y.M. Zhu, and L. Pang. 2001. Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism. *FASEB J.* 15: 2480-2488

Kondo, K., M. Muramatsu, Y. Okamoto, D. Jin, S. Takai, N. Tanigawa, and M. Miyazaki. 2006. Expression of chymase-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis. *J. Surg. Oncol.* 93: 36-42; discussion 42-33.

Kranenburg, A.R., W.I. de Boer, V.K.T. Alagappan, P.J. Sterk, and H.S. Sharma. 2005. Enhanced bronchial expression of vascular endothelial growth factor and receptors (Flk-1 and Flt-1) in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 60: 106-113

Li, X. and J.W. Wilson. 1997. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am. J. Respir. Care Med.* 156: 229-233.

Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M. G. Persico. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9267-9271.

Mann, J. S., M. J. Cushley, and S. T. Holgate. 1985. Adenosine-induced bronchoconstriction in asthma. Role of parasympathetic stimulation and adrenergic inhibition. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 1-6.

- Marone, G., M. Plaut, and L. M. Lichtenstein. 1978. Characterization of a specific adenosine receptor on human lymphocytes. *J. Immunol.* 121: 2153-2159.
- Marone, G., M. Triggiani, A. Genovese, and A. de Paulis. 2005. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv. Immunol.* 88: 97-160.
- Nagy, J. A., A. M. Dvorak, and H. F. Dvorak. 2003. VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 169-175.
- Nakayama, T., L. Yao, and G. Tosato. 2004. Mast cell-derived angiopoietin-1 plays a critical role in the growth of plasma cell tumors. *J. Clin. Invest.* 114: 1317-1325.
- Oliver, G., and K. Alitalo. 2005. The Lymphatic Vasculature: Recent Progress and Paradigms. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21: 457-483.
- Olofsson, B., M. Jeltsch, U. Eriksson, and K. Alitalo. 1999. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 528-535.
- Paiva, D. D., J. C. Morais, J. Pilotto, V. Veloso, F. Duarte, and H. L. Lenzi. 1996. Spectrum of morphologic changes of lymph nodes in HIV infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 371-379.
- 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.* 269:25646-25654.

Patella, V., I. Marino, E. Arbustini, B. Lamparter-Schummert, L. Verga, M. Adt, and G. Marone. 1998. Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 97: 971-978.

Rask, K., Y. Zhu, W. Wang, L. Hedin, and K. Sundfeldt. 2006. Ovarian epithelial cancer: a role for PGE<sub>2</sub>-synthesis and signalling in malignant transformation and progression. *Mol. Cancer*. 5: 62-74.

Redington, A.E., W.R. Roche, J. Madden, A.J. Frew, R. Djukanovic, S.T. Holgate, and P.H. Howarth. 2001. Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 384-387

Ribatti, D., A. Vacca, R. Ria, A. Marzullo, B. Nico, R. Filotico, L. Roncali, and F. Dammacco. 2003. Neovascularisation, expression of fibroblast growth factor-2, and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathological progression in human malignant melanoma. *Eur. J. Cancer*. 39: 666-674.

Ribatti, D., E. Crivellato, A. M. Roccaro, R. Ria, and A. Vacca. 2004. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. *Clin. Exp. Allergy* 34: 1660-1664.

Ribatti, D., G. Polimeno, A. Vacca, A. Marzullo, E. Crivellato, B. Nico, G. Lucarelli, and F. Dammacco. 2002. Correlation of bone marrow angiogenesis and mast cells with tryptase activity in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 16: 1680-1684.

- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674.
- Robinson, C. J., S. E. Stringer. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 114:853-865.
- Roeckl, W., D. Hecht, H. Sztajer, J. Waltenberger, A. Yayon, and H. A. Weich. 1998. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp. Cell. Res.* 241: 161-170.
- Romagnani, and 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: 1195-1204.
- Romagnani, P., A. de Paulis, C. Beltrame, F. Annunziato, V. Dente, E. Maggi, S.
- Ruohola, J. K., E. M. Valve, M. J. Karkkainen, V. Joukov, K. Alitalo, and P. L. Harkonen. 1999. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 149: 29-40.
- Sawano, A., S. Iwai, Y. Sakurai, M. Ito, K. Shitara, T. Nakahata, and 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: 785-791.
- Schoppmann, S. F., P. Birner, J. Stockl, R. Kalt, R. Ullrich, C. Caucig, E. Kriehuber, K. Nagy, K. Alitalo, and D. Kerjaschki. 2002. Tumor-associated macrophages express

lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* 161: 947-956.

Senger, D. R., S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey, and H. F. Dvorak. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.

Siraganian, R. P. 1974. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal. Biochem.* 57: 383-394.

Snedecor, G. W. 1980. *Statistical Methods*. Iowa State University Press, Ames.

Stacker, S. A., K. Stenvers, C. Caesar, A. Vitali, T. Domagala, E. Nice, S. Roufail, R. J. Simpson, R. Moritz, T. Karpanen, K. Alitalo, and M. G. Achen. 1999. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 274: 32127-32136.

Takanami, I., K. Takeuchi, and M. Naruke. 2000. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 88: 2686-2692.

Tammela, T., B. Enholm, K. Alitalo, and K. Paavonen. 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 65: 550-563.

Theoharides, T. C., and P. Conti. 2004. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol.* 25: 235-241.

Tsujii, M., S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, and R. N. DuBois. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716.

Viglietto, G., D. Maglione, M. Rambaldi, J. Cerutti, A. Romano, F. Trapasso, M. Fedele, P. Ippolito, G. Chiappetta and G. Botti. 1995. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 11: 1569-1579.

Vrugt, B., S. Wilson, A. Bron, S.T. Holgate, R. Djukanovic and R. Aalbers. 2000. Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid dependent asthma. *Eur. Respir. J.* 15: 1014-1021.

Welsh, T. J., R. H. Green, D. Richardson, D. A. Waller, K. J. O'Byrne, and P. Bradding. 2005. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 23: 8959-8967.

Williams, C. S., M. Tsujii, J. Reese, S. K. Dey, and R. N. DuBois. 2000. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J. Clin. Invest.* 105: 1589-1594.

Wirzenius, M., T. Tammela, M. Uutela, Y. He, T. Odorisio, G. Zambruno, J. A. Nagy, H. F. Dvorak, S. Yla-Herttuala, M. Shibuya, and K. Alitalo. 2007. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J. Exp. Med.* 204: 1431-1440.



Yano, H., M. Kinuta, H. Tateishi, Y. Nakano, S. Matsui, T. Monden, J. Okamura, M. Sakai, and S. Okamoto. 1999. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric Cancer* 2: 26-32.

Zanini, A., A. Chetta, M. Saetta, S. Baraldo, R. D'Ippolito, A. Castagnaro, M. Neri, and D. Olivieri. 2007. Chymase-positive mast cells play a role in the vascular component of airway remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120(2):329-33.

## FIGURE

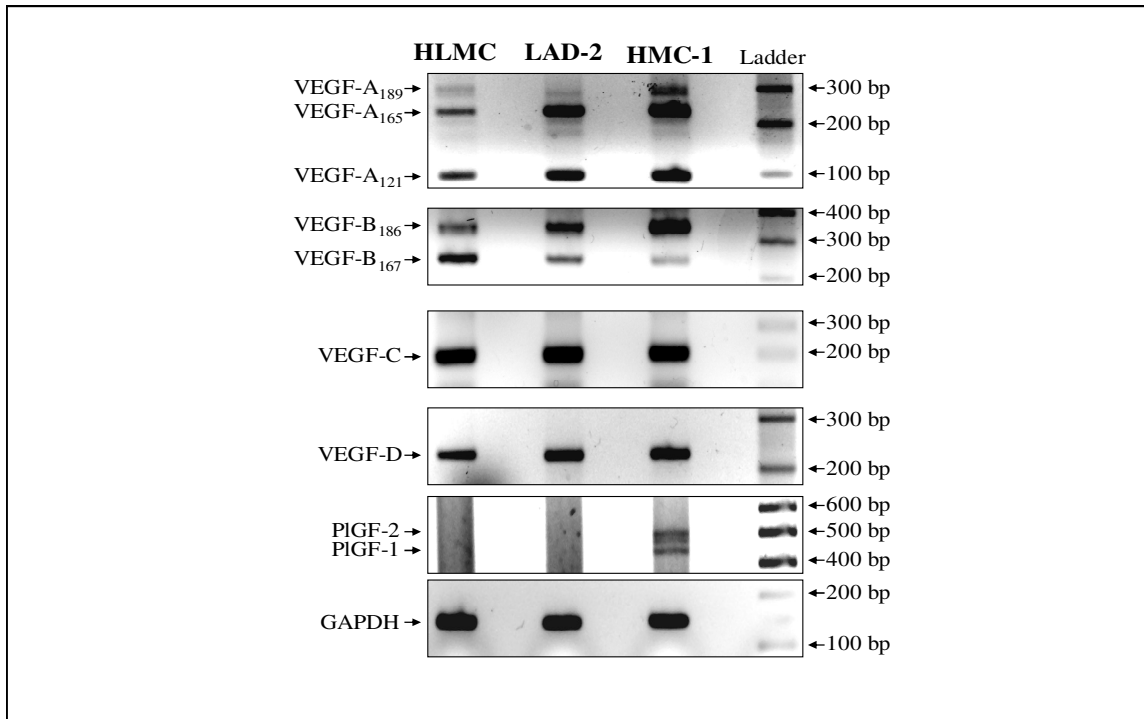


Fig. 1 Espressione a livello di mRNA delle differenti forme di VEGFs nei mastociti umani. Le cellule HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state lisate e l' RNA totale è stato estratto come descritto nei "Materiali e Metodi". 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto ed amplificato con 40 cicli di PCR utilizzando primers specifici per VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e GAPDH come gene *housekeeping* (vedi Tabella 1). I prodotti dell'amplificazione specifica RT-PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5%, marcati con etidio bromuro, visualizzati sotto illuminazione UV e digitalizzati attraverso un sistema di analisi. Questo esperimento è rappresentativo di 6 esperimenti nei quali sono stati ottenuti risultati sovrapponibili.

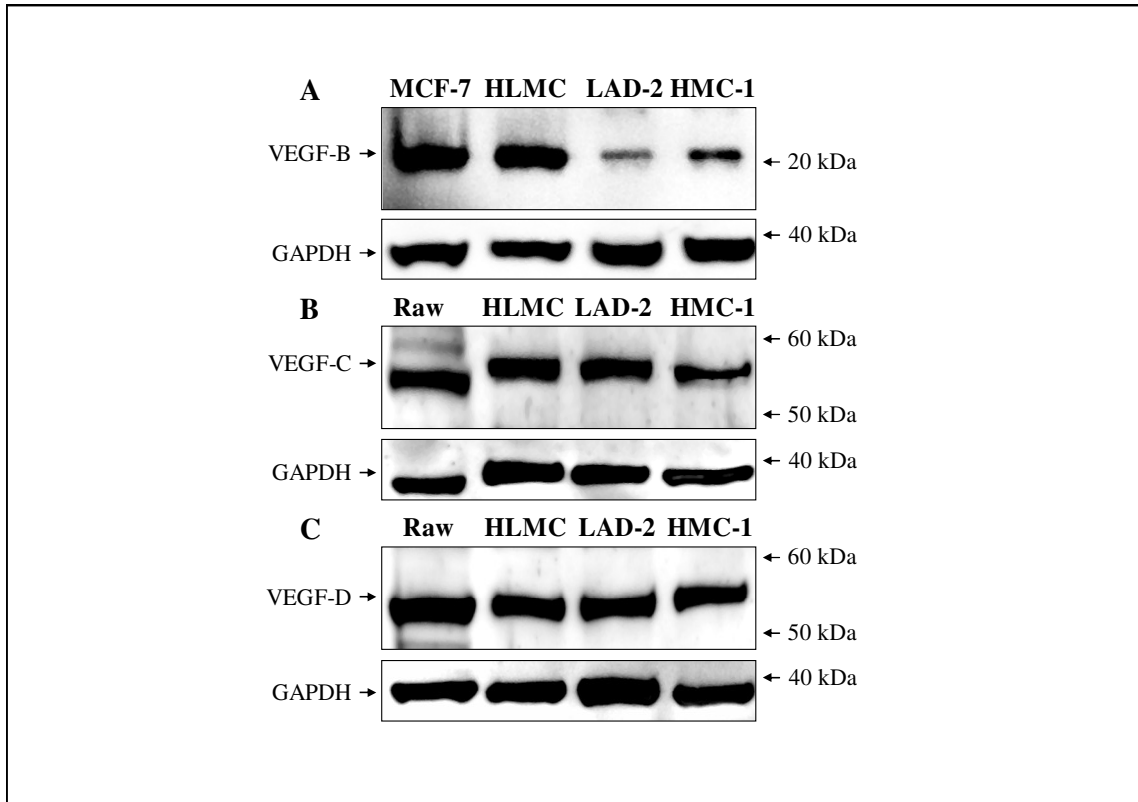


Fig. 2 Espressione delle proteine VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D nei mastociti umani. Estratti proteici equivalenti (40  $\mu$ g per campione) di HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono stati sottoposti ad immunoblotting con anticorpi anti-VEGF-B (panello A), anti-VEGF-C (panello B) ed anti-VEGF-D (panello C). Le cellule MCF-7 esprimenti VEGF-B e le cellule Raw 264.7 esprimenti VEGF-C e VEGF-D sono state utilizzate come controllo positivo. Le membrane sono state sottoposte a blotting con un anticorpo anti-GAPDH per confermare l'equivalenza del contenuto proteico per ogni campione. Questo esperimento è rappresentativo di 3 esperimenti nei quali sono stati ottenuti risultati sovrapponibili.

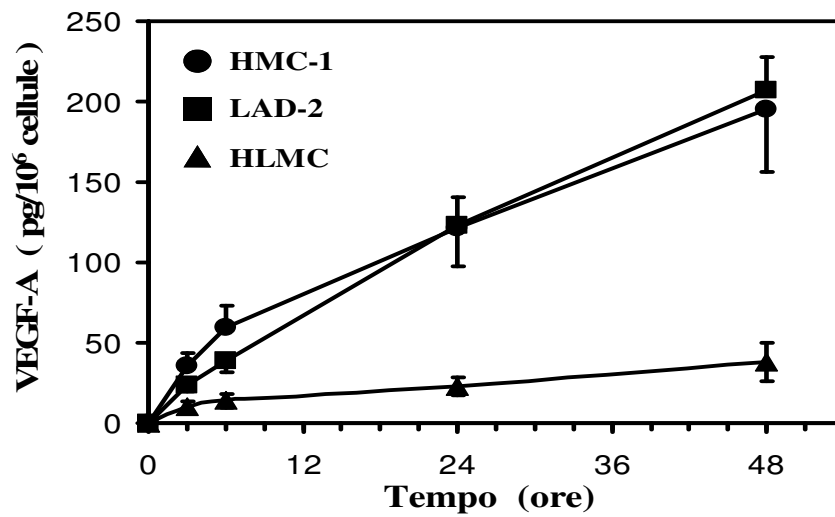


Fig. 3A Cinetica della secrezione spontanea di VEGF-A dai mastociti umani. HLMC purificate ( $\blacktriangle$ ), cellule LAD-2 ( $\blacksquare$ ) ed HMC-1 ( $\bullet$ ) ( $10^6$  cellule per campione) sono state incubate con un tampone per differenti periodi di tempo (1 – 48 ore). I sopranatanti ottenuti per ogni tempo della cinetica sono stati centrifugati ( $800 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min). Il dosaggio del VEGF-A è stato eseguito mediante ELISA. I valori sono espressi come la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.

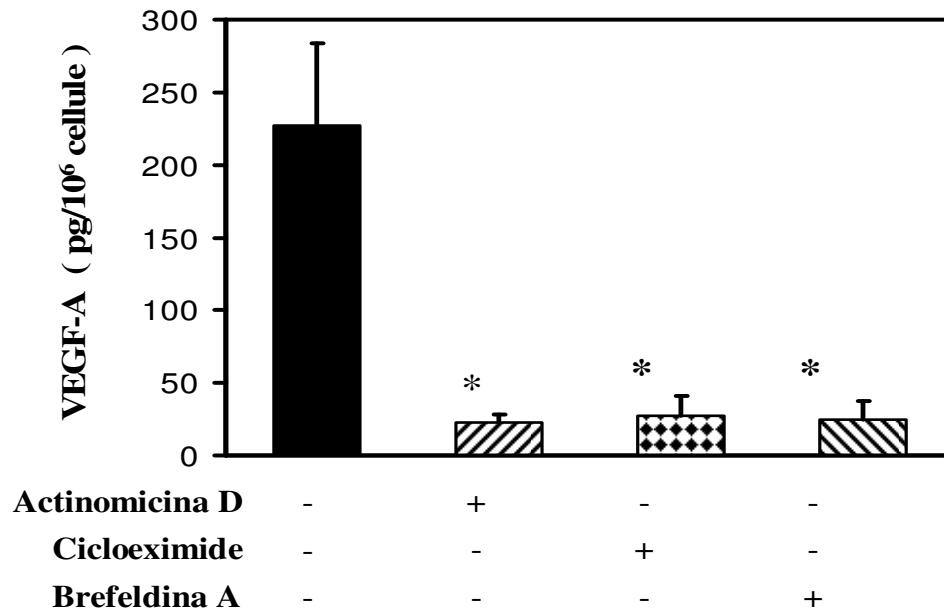


Fig.3B Effetti dell'actinomicina D, della cicloesimide e della brefeldina A. Le cellule LAD-2 (10<sup>6</sup> cellule per campione) sono state incubate (37°C, 24 ore) con o senza actinomicina D (1 µg/ml), cicloesimide (10 µg/ml) o brefeldina A (10 µg/ml). Al termine dell'incubazione, i sopranatanti ottenuti sono stati centrifugati (800 x g, 4°C, 5 min). Il dosaggio del VEGF-A è stato eseguito mediante ELISA. I valori sono espressi come media ± SEM di tre esperimenti.

\*  $p < 0,01$  se comparato con il valore corrispondente non trattato con gli inibitori metabolici.

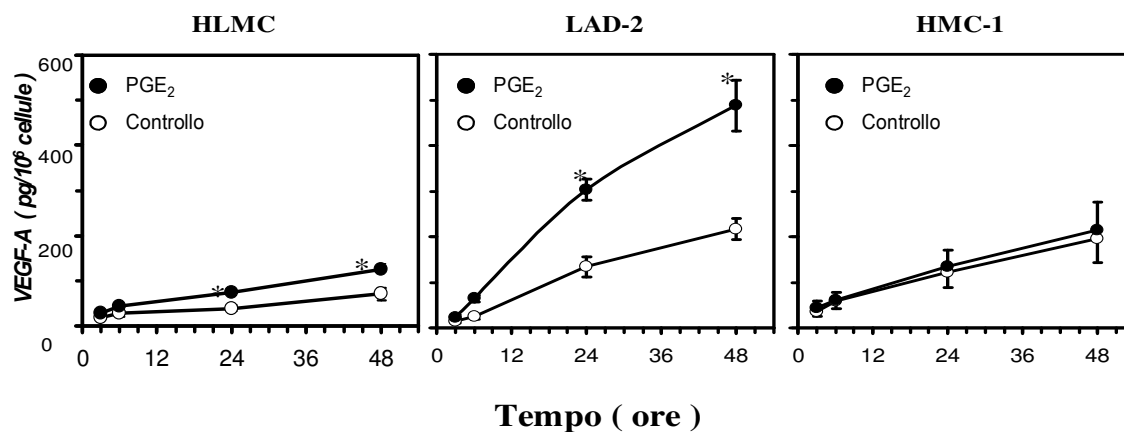


Fig. 4 Cinetica della secrezione di VEGF-A indotta dalla PGE<sub>2</sub> nei mastociti umani. Cellule HLMC purificate, LAD-2 od HMC-1 (10<sup>6</sup> cellule per campione) sono state incubate con un tampone (controllo) o con la PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M). I sopranatanti ottenuti per ogni tempo della cinetica sono stati centrifugati (800 x g, 4°C, 5 min). Il dosaggio del VEGF-A è stato eseguito mediante ELISA. I valori sono espressi come media ± SEM di tre esperimenti.

\*  $p < 0,01$  se comparato con il valore corrispondente non trattato con PGE<sub>2</sub>.

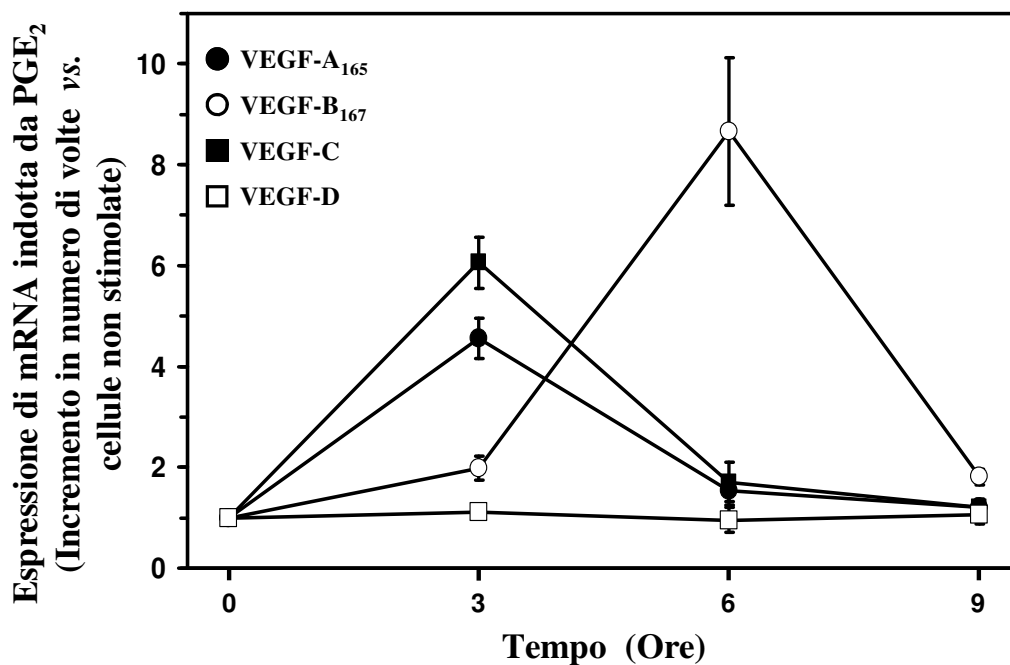


Fig. 5 Cinetica di espressione di mRNA per VEGFs indotta dalla PGE<sub>2</sub> nelle LAD-2. Analisi RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D nelle cellule LAD-2 tenute in coltura con la PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) per i tempi indicati. qRT-PCR è stata eseguita con la tecnica SYBR Green come descritto nei “*Materiali e Metodi*”. L’espressione di mRNA indotta dalla PGE<sub>2</sub> per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D è espressa come aumento rispetto alle cellule non stimulate. I risultati sono stati normalizzati per GAPDH. I valori sono espressi come la media ± SEM di tre esperimenti.

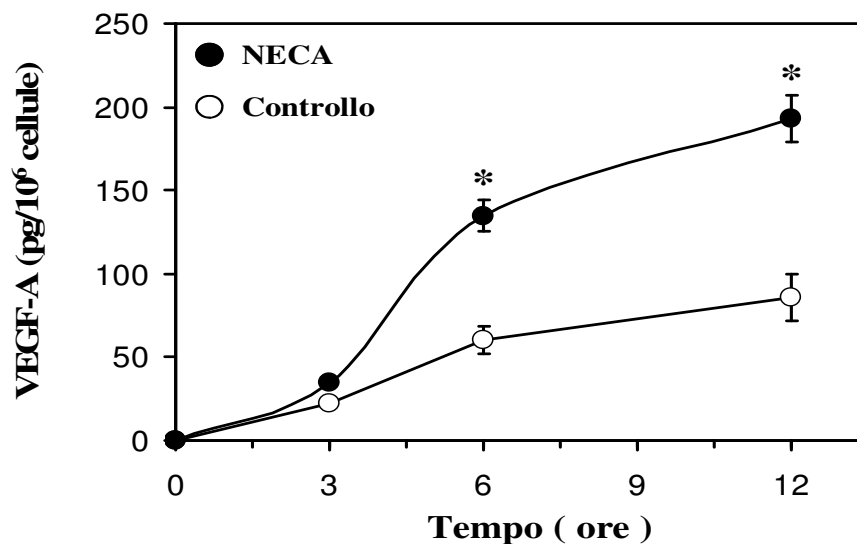


Fig. 6 Cinetica della secrezione di VEGF-A indotta dal NECA nelle HMC-1. Le cellule ( $10^6$  cellule per campione) sono state incubate con un tampone (controllo) o con NECA ( $10^{-5}$  M). I sopranatanti ottenuti per ogni tempo della cinetica sono stati centrifugati ( $800 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min). Il dosaggio del VEGF-A è stato eseguito mediante ELISA. I valori sono espressi come la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.

\*  $p < 0,01$  se comparato con il valore corrispondente non trattato con NECA.



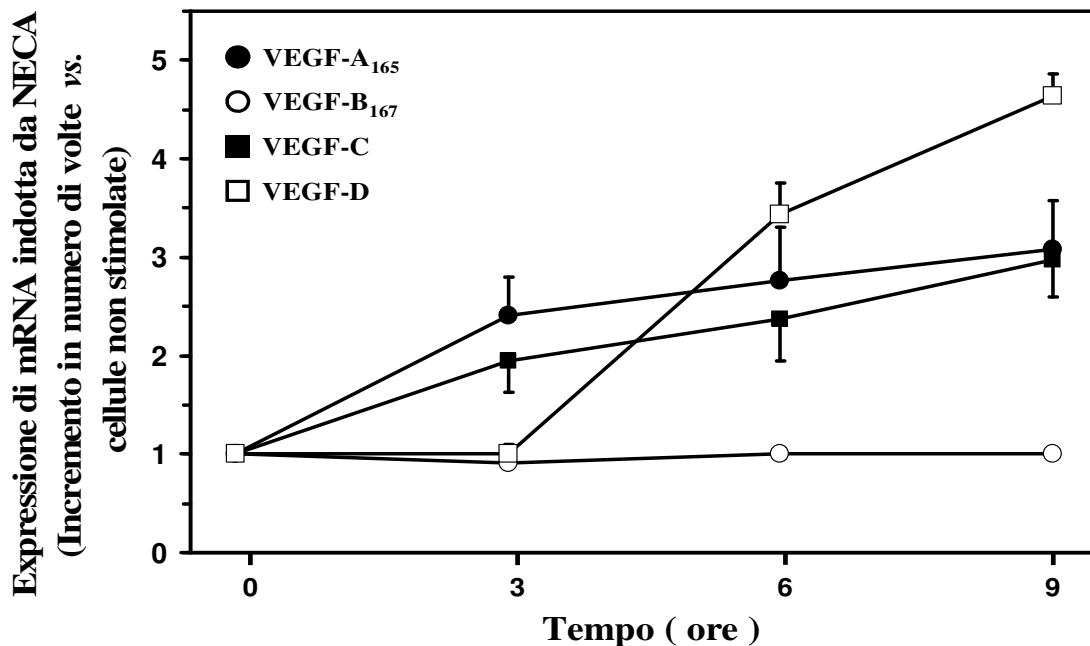


Fig. 7 Cinetica di espressione di mRNA per VEGFs indotta dal NECA nelle HMC-1. Analisi RT-PCR quantitativa per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D nelle cellule HMC-1 tenute in coltura con NECA ( $10^{-5}$  M) per i tempi indicati. qRT-PCR è stata eseguita con la tecnica SYBR Green come descritto nei “*Materiali e Metodi*”. L’espressione di mRNA indotta da PGE<sub>2</sub> per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D è espressa come aumento rispetto alle cellule non stimulate. I risultati sono stati normalizzati per GAPDH. I valori sono espressi come la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.

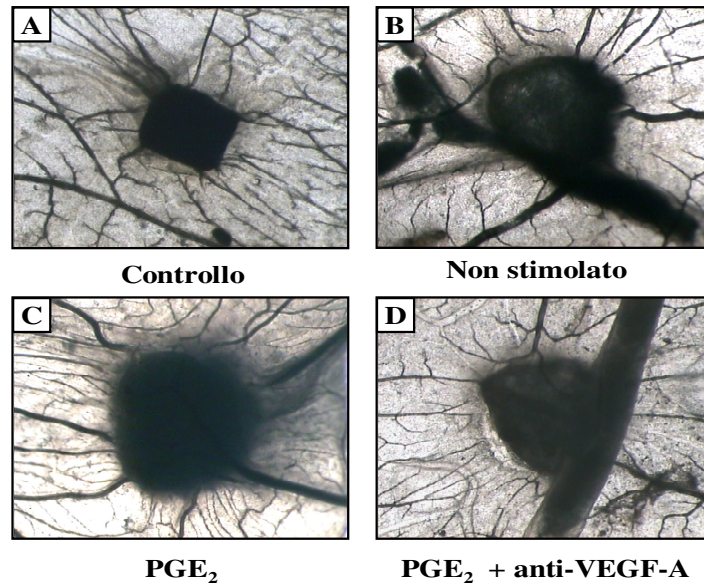


Fig. 8 Effetti dei sopranatanti di HLMC stimulate con la PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M, 24 ore, 37°C) o con un tampone sulla risposta angiogenica nella CAM di embrione di pollo. Nelle CAMs di embrione di pollo all'ottavo giorno di incubazione sono state impiantate spugne di gelatina su cui precedentemente erano stati fatti assorbire i sopranatanti delle HLMC incubate con il tampone (A), i sopranatanti delle HLMC tenute in coltura per 24 ore a 37°C (B), oppure i sopranatanti delle HLMC attivate con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) (C). Al dodicesimo giorno di incubazione l'esame macroscopico delle CAMs ha mostrato che i sopranatanti delle HLMC (B e C) inducevano una risposta angiogenica caratterizzata dalla presenza di vasi allantoici estesi radialmente intorno alle spugne come a formare i raggi di una ruota. Il trattamento con un anticorpo anti-VEGF-A riduceva significativamente la risposta angiogenica indotta dai sopranatanti delle HLMC attivate con la PGE<sub>2</sub> (D).

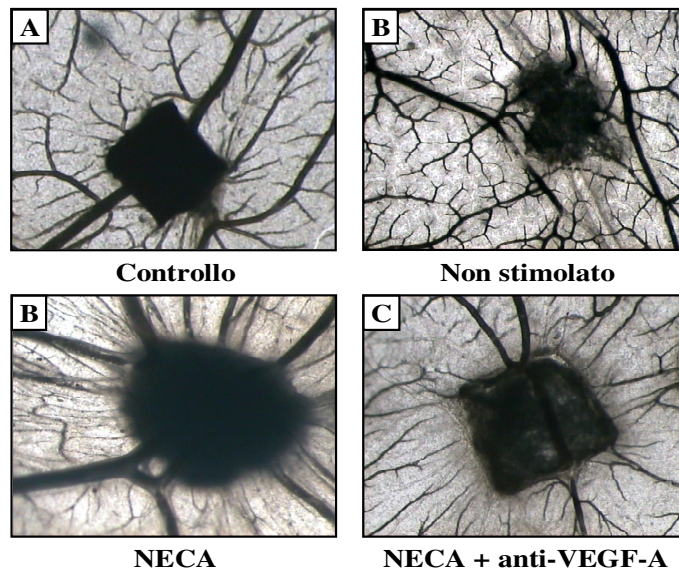


Fig. 9 Effetti dei sopranatanti di HLMC stimulate con NECA ( $10^{-5}$  M, 9 ore,  $37^{\circ}\text{C}$ ) o con un buffer sulla risposta angiogenica nella CAM di embrione di pollo. Nelle CAMs di embrioni di pollo all'ottavo giorno di incubazione sono state impiantate spugne di gelatina su cui precedentemente erano stati fatti assorbire i sopranatanti delle HLMC incubate con il solo buffer (A), i sopranatanti delle HLMC tenute in coltura per 9 ore a  $37^{\circ}\text{C}$  (B), oppure i sopranatanti delle HLMC attivate con NECA ( $10^{-5}$  M) (C). Al dodicesimo giorno di incubazione l'esame macroscopico delle CAMs ha mostrato che entrambi i sopranatanti di HLMC (B e C) inducevano una risposta angiogenica caratterizzata dalla presenza di vasi allantoici estesi radialmente intorno alle spugne come a formare i raggi di una ruota. Il trattamento con un anticorpo anti-VEGF-A riduceva la risposta angiogenica indotta dai sopranatanti delle HLMC attivate con NECA (D).

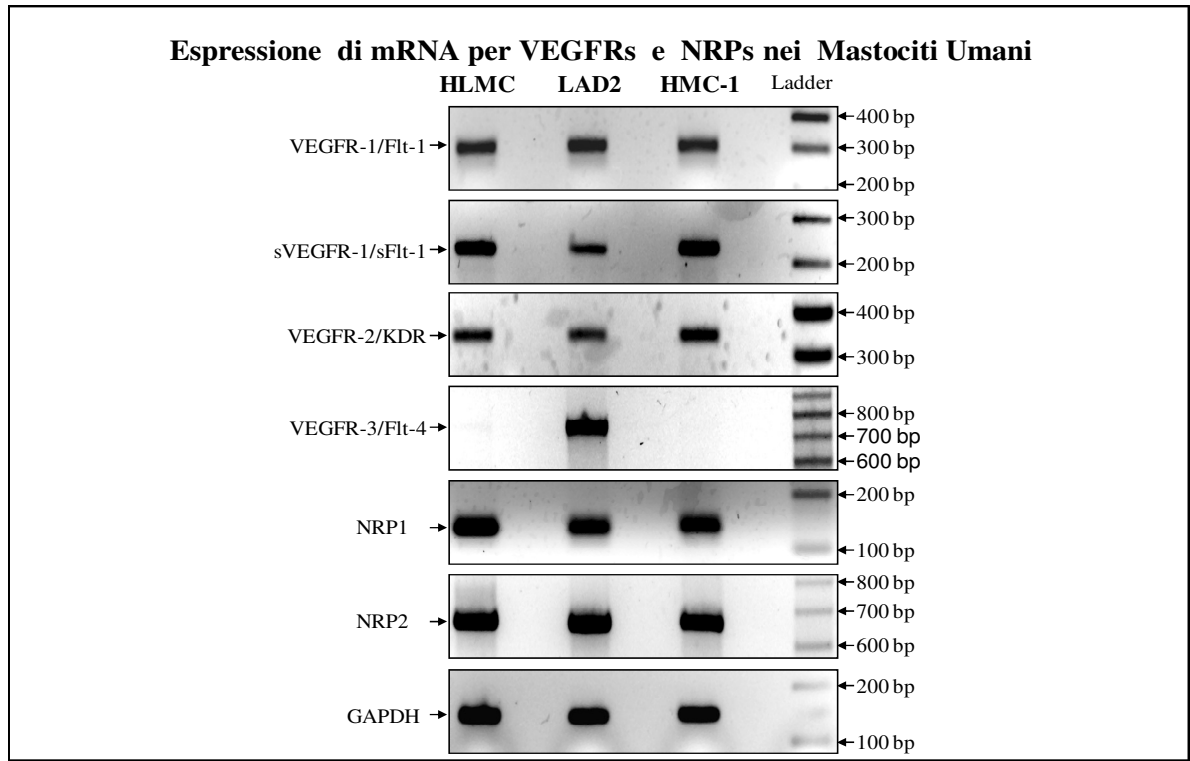


Fig. 10 Espressione a livello di mRNA dei recettori dei VEGFs nei mastociti umani. Le cellule HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state lisate e l'RNA totale è stato estratto come descritto nei "Materiali e Metodi". 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto ed amplificato con 40 cicli di PCR in presenza di specifici primers per VEGFR-1, sVEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1, NRP-2 e GAPDH come gene *housekeeping* (vedi Tabella 1). I prodotti dell'amplificazione RT-PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5%, marcati con etidio bromuro, visualizzati sotto illuminazione UV e digitalizzati con un sistema di analisi. Questo esperimento è rappresentativo di 4 esperimenti nei quali sono stati ottenuti risultati sovrapponibili.

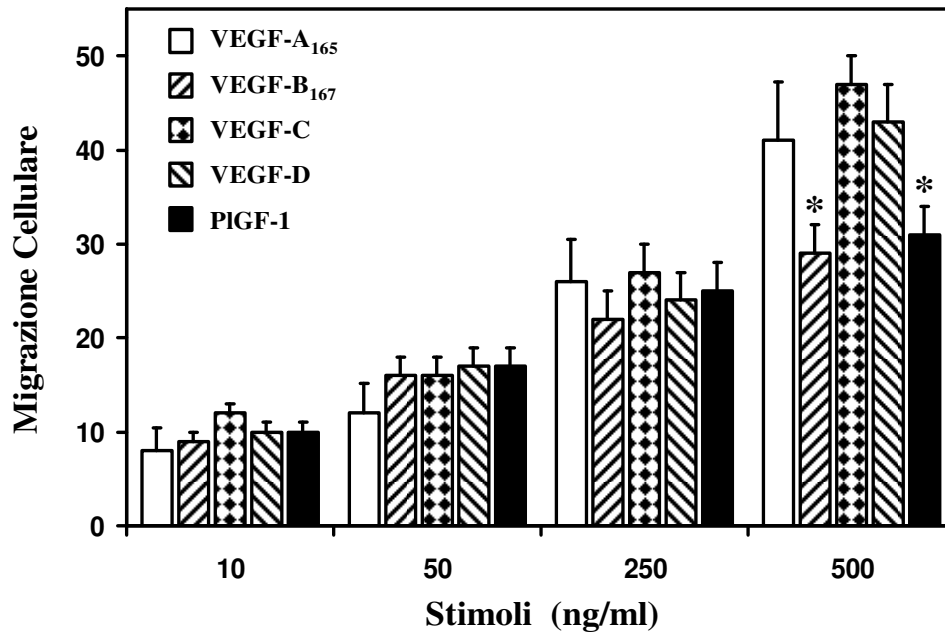


Fig. 11 Effetti di concentrazioni crescenti di VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF sulla chemiotassi di HLMC. HLMC sono state incubate (1 ora, 37°C) in presenza delle concentrazioni indicate di fattori angiogenici in un incubatore ad umidità costante (5% CO<sub>2</sub>). I valori sono espressi come la media ± SEM di 6 esperimenti con differenti preparazioni di HLMC.

\*  $p < 0,01$  se comparato con cellule stimulate con VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-C e VEGF-D (Test di Duncan).

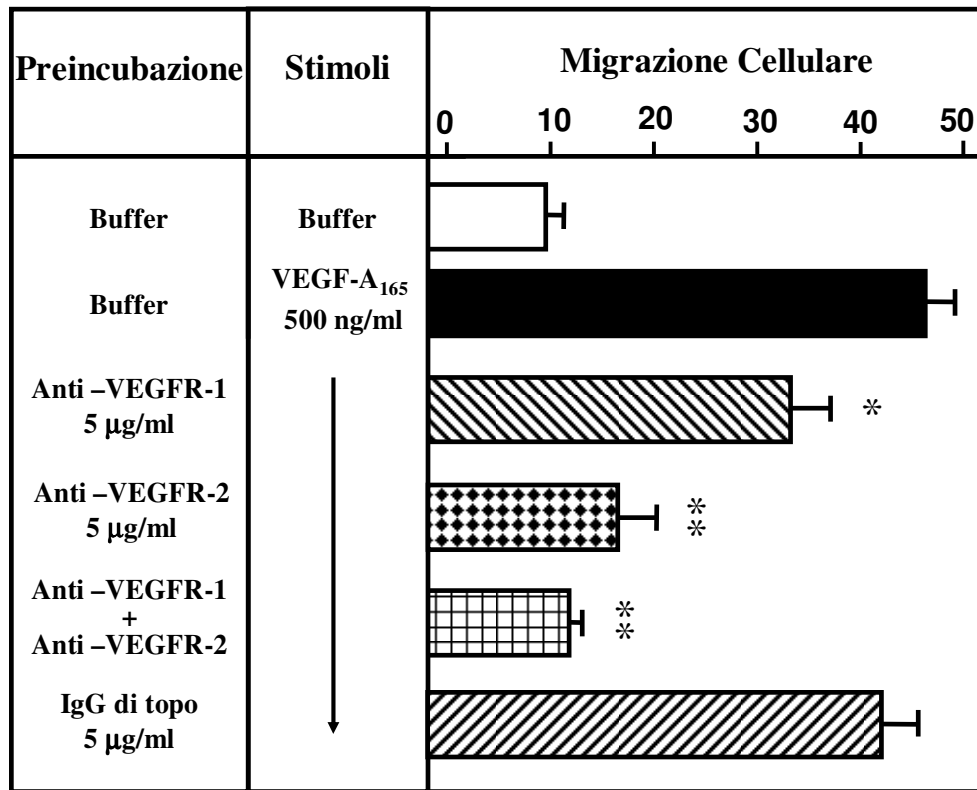


Fig. 12 Effetti della preincubazione delle HLMC con un anticorpo anti-VEGFR-1 (5 µg/ml), anti-VEGFR-2 (5 µg/ml), da soli o in combinazione, o con un anticorpo di topo IgG non immunizzato (5 µg/ml) sulla chemiotassi indotta da VEGFF-A<sub>165</sub>. HLMC preincubate (37°C, 30 min) con gli anticorpi suddetti sono state incubate (1 ora, 37°C) in presenza di VEGF-A<sub>165</sub>, in un incubatore ad umidità costante (5% CO<sub>2</sub>). I valori sono espressi come la media ± SEM di 3 esperimenti con differenti preparazioni di HLMC.

\*  $p < 0,01$  se comparato con le cellule stimulate con VEGF-A<sub>165</sub>.

\*  $p < 0,01$  se comparato con le cellule preincubate con anti-VEGFR-1 (Test di Duncan).

**Tabella I. Sequenza dei Primers e Condizioni per RT-PCR ed RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)**

<b>Target</b>	<b>Lunghezza del prodotto (bp)</b>	<b>Temperatura di annealing (°C)</b>	<b>Primer (5'-3')</b>	<b>Genbank Accession N° o Referenza</b>
<b>PIGF</b> (RT-PCR)	440 (Is1) 516 (Is2)	51°C	Forward GAGGCTGTTCCCTTGCTTC Reverse GGTTACCTCCGGGGAACAG	NM_002632
<b>VEGF-A</b> (RT-PCR)	225 (Is <sub>121</sub> ) 297 (Is <sub>145</sub> ) 357 (Is <sub>165</sub> ) 429 (Is <sub>189-206</sub> )	51°C	Forward TCTTCAAGCCATCCTGTGTG Reverse GCCTCGGCTTGTCACATC	NM_003376
<b>VEGF-A<sub>165</sub></b> (qRT-PCR)	79	54.4°C	Forward GCCTTGCCTTGCTGCTCTAC Reverse TGATTCTGCCCTCCTCCTTCTG	NM_003376
<b>VEGF-B</b> (RT-PCR)	230 (Is <sub>167</sub> ) 336 (Is <sub>186</sub> )	59°C	Forward TGTCCCTGGAAGAACACAGCC Reverse GCCATGTGTACACCTTCGCA	NM_003377
<b>VEGF-B</b> (qRT-PCR)	128	52°C	Forward AGGACAGAGTTGGAAGAGGAG Reverse AGGAAGAGCCAGTTGTAAGATG	NM_003377
<b>VEGF-C</b> (qRT-PCR)	197	52°C	Forward ATGTTTTCTCCGGATGCTGGA Reverse CATTGGCTGGGGAAGAGTTT	NM_005429
<b>VEGF-D</b> (qRT-PCR)	226	52°C	Forward GTATGGACTCTCGCTCAGCAT Reverse AGGCTCTCTTCATTGCAACAG	NM_004469
<b>VEGFR-1</b> (RT-PCR)	300	56°C	Forward CTTGGATTTTACTGCGGACAG Reverse GGGGACACCATTAGCATGAC	<a href="#">De Paulis 2006</a>
<b>sVEGFR-1</b> (RT-PCR)	232	56°C	Forward CTTGGATTTTACTGCGGACAG Reverse AACAGCCTTTTTGTTGCAGTG	<a href="#">De Paulis 2006</a>
<b>VEGFR-2</b> (RT-PCR)	349	56°C	Forward AGAGTGAGGAAGGAGGACGAAG Reverse GGCCAAGAGGCTTACCTAGC	<a href="#">De Paulis 2006</a>
<b>VEGFR-3</b> (RT-PCR)	787	57°	Forward CAGACGGGCAGGAGGTGGTGTG Reverse CGGCTGTGACGCGAGTAGATGC	<a href="#">Schoppmann 2002</a>
<b>GAPDH</b> (qRT-PCR)	141	55°C	Forward GTCCACTGGCGTCTTCAC Reverse CTTGAGGCTGTTGTCATACTTC	<a href="#">Granata 2006</a>
<b>NRP-1</b> (qRT-PCR)	131	53,7°C	Forward ACTTGGTGGATGAATGTGATG Reverse TGATTGTATGGTGTCTATG	
<b>NRP-2</b> (qRT-PCR)	475	56,7°C	Forward CCCCGAACCCAACCAGAAGA Reverse GAATGCCATCCCAGATGTCCA	

