

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE  
XXII Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

**ESPRESSIONE E REGOLAZIONE DEI FATTORI  
ANGIOGENICI E LINFOANGIOGENICI  
NEI MACROFAGI POLMONARI UMANI**

TUTOR

**Chiar.mo  
Prof. Gianni Marone**

CANDIDATA

**Dott. Annunziata Frattini**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<i>pag. 4</i>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<i>pag. 15</i>
- Reagenti e tamponi	<i>pag. 15</i>
- Isolamento, purificazione dei macrofagi polmonari umani (HLM)	<i>pag. 16</i>
- Incubazioni cellulari	<i>pag. 17</i>
- RT-PCR	<i>pag. 18</i>
- Western blot	<i>pag. 20</i>
- ELISA per VEGF-A, VEGF-C e TNF- $\alpha$	<i>pag. 22</i>
- Saggio della membrana corioallantoidea di embrione di pollo	<i>pag. 22</i>
- Analisi statistica	<i>pag. 24</i>
<b>RISULTATI</b>	<i>pag. 25</i>
- I macrofagi polmonari umani esprimono VEGFs	<i>pag. 25</i>
- Le sPLA <sub>2</sub> inducono la produzione di VEGFs da HLM	<i>pag. 27</i>
- Le sPLA <sub>2</sub> inducono l'espressione dell'mRNA di VEGFs nei HLM	<i>pag. 28</i>
- Le sPLA <sub>2</sub> inducono la produzione di VEGF-A attraverso un meccanismo recettoriale	<i>pag. 30</i>
- I soprannatanti dei macrofagi attivati dalle sPLA <sub>2</sub> inducono l'angiogenesi nel modello della CAM	<i>pag. 32</i>
- Effetto di NECA sulla produzione di VEGF-A e di TNF- $\alpha$ nei macrofagi stimolati con la sPLA <sub>2</sub>	<i>pag. 33</i>

<b><i>DISCUSSIONE</i></b>	<i>pag. 36</i>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b>	<i>pag. 45</i>
<b><i>LEGENDA DELLE FIGURE</i></b>	<i>pag. 70</i>
<b><i>TABELLE</i></b>	<i>pag. 76</i>
<b><i>FIGURE</i></b>	<i>pag. 79</i>

## INTRODUZIONE

Il termine “angiogenesi” indica la crescita di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti. La formazione di vasi attraversa diversi stadi caratterizzati da modificazioni dell’endotelio vascolare e della matrice extracellulare <sup>1</sup>. In particolare, il processo angiogenico si articola in quattro fasi: nella prima fase si verifica una perdita delle connessioni tra cellule endoteliali seguita da un aumento della permeabilità vasale; successivamente, le cellule endoteliali migrano e proliferano nella zona di tessuto dove è richiesta la formazione di nuovi vasi. La terza fase è caratterizzata dall’arresto della proliferazione cellulare, dalla differenziazione di cellule endoteliali e dalla formazione di capillari primitivi. Il processo si conclude con il richiamo di cellule subendoteliali di supporto come i periciti che ricoprono le cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce in grado di regolare la perfusione sanguigna<sup>1</sup>.

Il sistema linfatico si sviluppa attraverso un processo analogo definito “linfoangiogenesi”<sup>2</sup>.

Angiogenesi e linfoangiogenesi rappresentano due fenomeni, distinti e complessi, controllati da un delicato bilancio tra fattori ad attività pro-angiogenica e fattori ad attività anti-angiogenica. La famiglia dei *Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs)* comprende diversi mediatori ad attività pro-angiogenica: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ed il *Placental Growth Factor (PlGF)*<sup>3</sup>. Il *Vascular Endothelial*

*Growth Factor* (VEGF) è un mediatore fondamentale nella regolazione del processo angiogenico ed il più potente fattore pro-angiogenico finora identificato<sup>3</sup>. Oltre alla modulazione della migrazione e della proliferazione delle cellule endoteliali, 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, 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<sup>4,5</sup>.

VEGF-A e -B rappresentano mediatori fondamentali nella formazione dei vasi sanguigni<sup>3</sup>; d'altro canto VEGF-C e -D regolano prevalentemente la formazione di nuovi vasi linfatici<sup>6,7</sup>. Alcuni di questi fattori presentano varie isoforme, con differente potenziale pro-angiogenico, derivanti da meccanismi di *splicing* alternativo. In particolare, sono state identificate 6 isoforme per VEGF-A: 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><sup>3</sup>. VEGF-A<sub>165</sub> è la forma predominante. VEGF-B ha due isoforme: VEGFB<sub>167</sub> e VEGFB<sub>186</sub>. L'isoforma 167 è la forma predominante ed interagisce con l'eparina<sup>8</sup>. Il PlGF, originariamente scoperto a livello placentare dal gruppo di Graziella Persico<sup>9</sup> modula lo sviluppo dei vasi della placenta e

di alcuni tumori<sup>10</sup>. Esso presenta tre isoforme: PlGF<sub>131</sub>, PlGF<sub>152</sub> e PlGF<sub>203</sub><sup>11, 12</sup>.

I membri della famiglia del VEGF esplicano la loro azione mediante l'interazione con tre recettori di membrana: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3<sup>3</sup>. Dal punto di vista strutturale, questi recettori presentano una porzione extracellulare costituita da 7 domini immunoglobulinici (*Ig-like*), un tratto transmembrana<sup>13</sup> ed una coda intracitoplasmatica responsabile dell'attività tirosin-chinasica.

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<sup>14</sup>, la malattia di Crohn<sup>15</sup> e l'asma bronchiale<sup>16</sup>. Inoltre, è stata riportata l'esistenza di una significativa correlazione tra neoformazione vascolare e severità dell'asma bronchiale<sup>17, 18</sup>. E' stato prospettato, che a livello delle vie aeree, i fattori angiogenici siano sintetizzati da diverse cellule del sistema immunitario come gli eosinofili<sup>19</sup>, i basofili<sup>4</sup>, i macrofagi<sup>20</sup>, i mastociti<sup>21</sup>, le cellule muscolari lisce<sup>22</sup> e le cellule epiteliali<sup>23</sup>. E' verosimile che stimoli infiammatori siano in grado di attivare i macrofagi, insieme ad altre cellule del sistema immunitario, inducendo la sintesi di diverse chemochine, citochine e fattori proangiogenici. Inoltre, è opportuno ricordare che studi sperimentali hanno documentato che i

meccanismi dell'angio/linfoangiogenesi contribuiscono alla crescita tumorale ed alla formazione delle metastasi<sup>7, 24</sup>.

I macrofagi originano dai monociti circolanti che migrano nei diversi tessuti ed *in loco* si differenziano in macrofagi. Durante i processi infiammatori queste cellule svolgono tre importanti funzioni: presentazione dell'antigene, fagocitosi ed immunomodulazione della risposta infiammatoria attraverso la produzione di citochine e fattori di crescita<sup>25</sup>. Molteplici evidenze indicano che i macrofagi sono implicati in diversi processi fisiopatologici quali l'infiammazione cronica e la crescita tumorale<sup>25, 26</sup>. Essi rappresentano le cellule immunitarie predominanti nei tessuti normali, nella sede della flogosi<sup>25</sup> ed in diversi tumori dove sono denominati "macrofagi associati al tumore" (TAM)<sup>27</sup>. Differenti fenotipi di TAM (es., M1 vs M2) consentono a queste cellule di svolgere differenti, spesso opposti, effetti sulle risposte immunitarie tumore-specifiche (stimolazione vs. soppressione) e sulla crescita tumorale (inibizione vs. promozione)<sup>28</sup>. In particolare, dal momento in cui le cellule immunitarie sfuggono alla sorveglianza immunologica, i TAM modificano il loro fenotipo da M1 proinfiammatorio, che contribuisce al rigetto del tumore, ad M2 proangiogenico, che stimola lo sviluppo tumorale<sup>28, 29</sup>. I macrofagi possono promuovere la progressione tumorale sia direttamente, stimolando la proliferazione delle cellule tumorali, sia indirettamente mediante la produzione di fattori angiogenici

e linfoangiogenici<sup>29</sup>. Si ritiene, infatti, che questi programmi proangiogenici siano attivati nei TAM dalla presenza di particolari condizioni metaboliche (es., ipossia, lattato, piruvato o ioni idrogeno), di mediatori prodotti a livello dei siti del danno tessutale (es., IL-10, M-CSF, LPS, adenosina)<sup>26, 28, 29</sup>.

Le fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) sono enzimi che catalizzano l'idrolisi degli acidi grassi dalla posizione *sn*-2 dei fosfolipidi costituenti le membrane cellulari. Questa reazione genera acidi grassi liberi e lisofosfolipidi che rappresentano i substrati di partenza per la sintesi di due importanti classi di mediatori lipidici<sup>30, 31</sup>. Infatti, nella maggior parte dei casi, l'acido grasso esterificato nella posizione *sn*-2 delle varie classi di fosfolipidi è rappresentato dall'acido arachidonico (AA) che una volta libero viene metabolizzato attraverso due vie biosintetiche: la via delle lipossigenasi che conduce alla sintesi dei leucotrieni e la via delle cicloossigenasi che determina la formazione di prostaglandine e trombossani<sup>32</sup>.

Nel corso degli ultimi dieci anni sono state caratterizzate e clonate molteplici PLA<sub>2</sub> (**Tabella I**). Attualmente, le PLA<sub>2</sub> vengono classificate in 12 diversi gruppi che a loro volta includono diversi sottogruppi per un totale di oltre 20 diverse molecole con attività PLA<sub>2</sub> che differiscono tra loro per sequenza aminoacidica, localizzazione cellulare e dipendenza dallo ione Ca<sup>2+</sup> come cofattore per l'attività enzimatica<sup>33</sup>. Le PLA<sub>2</sub> sono



classicamente distinte in PLA<sub>2</sub> citosoliche (cPLA<sub>2</sub>) e PLA<sub>2</sub> secretorie (sPLA<sub>2</sub>). A differenza delle cPLA<sub>2</sub>, le sPLA<sub>2</sub> sono molecole di basso peso molecolare (12-16 kDa) localizzate nei granuli citoplasmatici e secrete nell'ambiente extracellulare dove trovano le concentrazioni millimolari di Ca<sup>2+</sup> necessarie per la loro attività enzimatica<sup>34</sup>. Attualmente sono state identificate 10 diverse isoforme di sPLA<sub>2</sub> classificate come GIB, GII (sottogruppi da A ad F), GIII, GV, GX e GXII (sottogruppi A e B).

L'espressione delle sPLA<sub>2</sub> può variare in maniera significativa da cellula a cellula e da tessuto a tessuto. Inoltre, nell'ambito della stessa cellula o tessuto, l'espressione delle diverse isoforme di sPLA<sub>2</sub> può modificarsi a seconda delle condizioni fisiopatologiche<sup>33, 35-38</sup>. Nell'uomo la secrezione delle diverse sPLA<sub>2</sub> avviene sia da parte di cellule residenti nei tessuti (cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, mastociti, macrofagi, etc.) che di cellule immunocompetenti del sangue periferico che infiltrano i tessuti durante le risposte immunitarie (basofili, neutrofili, eosinofili, monociti e linfociti) (**Tabella I**).

Numerosi studi condotti nelle ultime due decadi hanno dimostrato che le sPLA<sub>2</sub> vengono secrete in numerosi fluidi biologici di natura infiammatoria<sup>39</sup>. Infatti, la presenza delle sPLA<sub>2</sub> è stata riportata non soltanto a livello sinoviale nei pazienti con artrite reumatoide<sup>40</sup>, ma anche nelle vie aeree di donatori sani<sup>41</sup> e di pazienti con diverse patologie

del polmone (polmoniti, ARDS, sarcoidosi ed asma bronchiale)<sup>42-47</sup>, nel seno coronarico di pazienti con ischemia miocardica<sup>48</sup> e nella mucosa intestinale dei pazienti con morbo di Crohn o rettocolite ulcerosa<sup>49-51</sup>. Inoltre, livelli elevati di sPLA<sub>2</sub> sono stati riscontrati nel plasma di pazienti affetti da patologie infiammatorie a carattere sistemico quali la pancreatite acuta<sup>52</sup>, lo shock settico<sup>53</sup>, l'ARDS<sup>54</sup>, le ustioni estese<sup>55</sup> e l'insufficienza multiorgano (MOF)<sup>56</sup>. In tutte queste patologie i livelli plasmatici di sPLA<sub>2</sub> sono significativamente correlati con la severità, la prognosi e la mortalità<sup>46, 48, 52, 53, 55, 56</sup>.

Infine, l'espressione di alcune isoforme di sPLA<sub>2</sub> è aumentata in diversi tumori solidi umani<sup>36, 57-60</sup> suggerendo che queste molecole possono rappresentare dei potenziali bersagli per lo sviluppo di terapie antitumorali<sup>61, 62</sup>. Due isoforme di sPLA<sub>2</sub>, hGIIA e hGX sono state implicate, più di altre isoforme, in diverse patologie infiammatorie e tumorali. In particolare, hGIIA è molto espressa nel fluido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide<sup>40</sup>, in pazienti con tumore del colon<sup>60</sup>, della prostata<sup>59</sup>, e della mammella<sup>63</sup>. Recentemente è stato dimostrato che hGX è secreta nelle vie aeree dei pazienti con asma bronchiale<sup>64</sup> e nel tumore del colon<sup>60</sup>. Inoltre, hGX partecipa alla tumorigenesi del colon mediante la generazione di PGE<sub>2</sub> e di altri mediatori lipidici<sup>65, 66</sup>.

Fino a pochi anni addietro si riteneva che il principale meccanismo attraverso il quale le sPLA<sub>2</sub> esplicano il loro effetto proinfiammatorio

fosse legato alla loro intrinseca capacità di generare substrati disponibili per la sintesi dei mediatori lipidici. Tuttavia, crescenti evidenze sperimentali indicano che le sPLA<sub>2</sub> sono in grado di esercitare altri effetti biologici rilevanti per l'induzione ed la modulazione delle reazioni infiammatorie<sup>67</sup>. In particolare, è stato riportato che le sPLA<sub>2</sub> sono in grado di attivare alcune funzioni cellulari e di indurre nelle cellule infiammatorie la produzione mediatori chimici diversi dagli eicosanoidi e dal PAF. Ad esempio, alcune sPLA<sub>2</sub> (GIA, GIB, GIIA, GIII) inducono nelle cellule infiammatorie la esocitosi<sup>68-71</sup>, l'espressione di molecole di superficie<sup>70, 72-78</sup>, la chemiotassi<sup>76-78</sup> e la produzione citochine<sup>70, 71, 79</sup>, chemochine<sup>70, 80, 81</sup> e di ossido nitrico<sup>82-84</sup>.

Un ulteriore livello di complessità nello studio delle sPLA<sub>2</sub> è dato da alcune osservazioni sperimentali che evidenziano come alcuni effetti delle sPLA<sub>2</sub>, sia *in vivo* che *in vitro*, sono indipendenti dalla loro attività enzimatica<sup>79, 80, 85-90</sup>. Queste osservazioni dimostrano che l'attività enzimatica delle sPLA<sub>2</sub> non è l'unico meccanismo con il quale queste molecole possono partecipare alle reazioni infiammatorie<sup>90</sup>.

Studi condotti nell'ultimo decennio hanno dimostrato che le sPLA<sub>2</sub> possiedono la capacità di interagire con alcune molecole presenti sulla membrana cellulare<sup>91</sup>. Questa importante osservazione ha generato l'ipotesi che le sPLA<sub>2</sub> possano funzionare come mediatori extracellulari oltre che come enzimi. I siti di membrana con i quali possono interagire

le sPLA<sub>2</sub> includono alcune proteine appartenenti a diverse famiglie di molecole di superficie. Infatti, le sPLA<sub>2</sub> possono legarsi ad alcuni proteoglicani contenenti eparan-solfato (HSPG) come il glipicano<sup>92</sup>, il biglicano<sup>93</sup> e la decorina<sup>94</sup>, ma soprattutto a recettori di membrana specifici per le sPLA<sub>2</sub> (recettore tipo M e recettore tipo N)<sup>95</sup>.

Una osservazione interessante confermata da studi condotti da diversi gruppi di ricerca è che il recettore tipo M è espresso ad alti livelli nel polmone umano<sup>96, 97</sup>, che rappresenta un sito di accumulo preferenziale delle sPLA<sub>2</sub>. Infatti, è noto da diversi anni che una attività sPLA<sub>2</sub> è rilevabile nel lavaggio broncoalveolare (BAL) di individui normali<sup>41</sup> e che i livelli di sPLA<sub>2</sub> sono notevolmente aumentati nel BAL di pazienti con patologie infiammatorie del polmone<sup>42-47</sup>. Ad esempio, nei pazienti asmatici i livelli di sPLA<sub>2</sub> nel BAL sono 3-5 volte più elevati rispetto ai pazienti di controllo non asmatici<sup>44, 45</sup> ed in corso di ARDS tali livelli possono aumentare anche fino a cento volte<sup>46</sup>. Inoltre, studi recenti condotti con tecniche di immunistochemica hanno evidenziato che a livello del polmone umano sono presenti ben 7 diverse isoforme di sPLA<sub>2</sub> (**Tabella I**) la cui espressione aumenta in corso di reazioni infiammatorie<sup>38, 98</sup>. In particolare, sono presenti in quantità elevate soprattutto le sPLA<sub>2</sub> GIB, GIIA e GX che rappresentano ligandi ad alta affinità per il recettore tipo M, nella specie murina<sup>99</sup>. Una ovvia implicazione della presenza simultanea di livelli elevati di sPLA<sub>2</sub> e di

recettore tipo M nelle vie aeree umane è la possibilità di interazione su potenziali cellule bersaglio.

I macrofagi rappresentano il bersaglio principale delle sPLA<sub>2</sub> in quanto possono essere attivati mediante entrambi i meccanismi<sup>90, 100</sup>. Le sPLA<sub>2</sub>, attraverso la loro attività enzimatica, inducono la produzione di numerosi mediatori lipidici, (prostaglandine, leucotrieni, lipoxine e *Platelet-Activating Factor*)<sup>101</sup>. Inoltre, le sPLA<sub>2</sub> attivano l'esocitosi, la produzione di citochine/chemochine, la generazione di ossido nitrico, e l'adesione cellulare mediante un meccanismo indipendente dall'attività enzimatica e coinvolgente l'interazione con il recettore di tipo M espresso su numerose cellule infiammatorie, tra cui i macrofagi<sup>71, 84, 102-104</sup>. Sia la GIIA umana (hGIIA) che la GX umana (hGX) sono in grado di stimolare la produzione di citochine e l'esocitosi nei macrofagi *in vitro*<sup>71, 103, 105</sup>.

Non è stata sinora analizzata la capacità delle sPLA<sub>2</sub> di indurre la produzione di fattori angiogenici e linfoangiogenici dai macrofagi umani. Pertanto in questa serie di esperienze abbiamo valutato l'effetto della sPLA<sub>2</sub> hGX umana ricombinante sulla produzione di fattori angiogenici e linfoangiogenici dai macrofagi purificati dal tessuto polmonare umano (HLM). Inoltre, abbiamo verificato la dipendenza di questi effetti dall'attività enzimatica delle sPLA<sub>2</sub> ed il potenziale angiogenico *in vivo* delle sPLA<sub>2</sub>. In una ultima serie di esperimenti abbiamo valutato se la

risposta angiogenica indotta dalle sPLA<sub>2</sub> potesse essere modulata dall'adenosina, un importante nucleoside endogeno rilevante nei processi flogistici e neoplastici.

## MATERIALI E METODI

### *Reagenti e tamponi*

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: albumina sierica umana (HSA), inibitori delle proteasi, 5'-(N-etilcarbosamido) adenosina (NECA), monotioglicerolo, L-glutamina, il DMSO, il lipopolisaccaride (LPS) di *Escherichia coli* di sierotipo 026:B6, il Percoll® (densità 1,077), la piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), il PMSF, il Triton X-100, brefeldina A, cicloesimide, actinomicina-D (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); soluzione antibiotica (10,000 UI/ml penicillina and 10 mg/ml streptomicina) (Cambrex Bio Science, Milano, Italia); siero bovino fetale (FCS, MP Biomedicals Europe, Illkirch, Francia), Superscript III (Invitrogen Ltd., Paisley, UK); PIGF-1 umano ricombinante (PeproTech, Londra, UK); RPMI (GIBCO, Life Technologies Gaithersburg, MD) con 25 mM HEPES, il ditiotreitolo (DTT), ICN (Costa Mesa, CA); 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, Ab, VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-A<sub>121</sub> umani ricombinanti, 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). Le sPLA<sub>2</sub> umane ricombinanti di gruppo gruppo IIA (hGIIA), gruppo X (hGX), il composto Me-Indoxam e RO092906A sono stati donati dal Prof. Michael H. Gelb (Università di Washington, Dipartimento di Chimica e Biochimica, Seattle, USA). I mutanti H48Q di hGIIA (hGIIA-H48Q) e di hGX (hGX-H48Q) sono stati donati dal Prof. Gerard Lambeau (Istituto di Farmacologia Molecolare e Cellulare, Centro Nazionale di Ricerca Scientifica, Francia)., Tutti gli altri prodotti sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia).

Il tampone Pipes è composto di 25 mM piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), 110 mM NaCl e 5 mM KCl, pH 7,4. Il tampone PCG è composto da tampone PIPES contenente 1 mM CaCl<sub>2</sub> ed 1 g/L D-glucosio, pH 7,4. Il tampone PBS 0,15 M è composto da 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4.

#### *Isolamento e purificazione dei macrofagi polmonari umani (HLM)*

I macrofagi polmonari umani (HLM) sono stati isolati dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia toracica con una tecnica utilizzata nel nostro laboratorio da molti anni <sup>71</sup>. Il tessuto polmonare macroscopicamente sano è stato tagliato in piccoli



frammenti in tampone PIPES. La sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta a filtrazione su strato di Nytex (con pori di 120 µm di diametro) mediante ripetuti lavaggi con PIPES. Le cellule sono state separate mediante centrifugazione (2000 rpm, 22°C, 20 min) su gradienti discontinui di Percoll. La sospensione arricchita di macrofagi (> 80%) è stata risospesa ( $10^6$  cellule/ml) in RPMI contenente 5% di FCS, 2 mM di L-glutammina e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica ed incubate in piastre di polistirene a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 12 ore il mezzo di coltura è stato rimosso ed le cellule flottanti sono state rimosse mediante lavaggio con RPMI. Con questa procedura più del 98% delle cellule aderenti sono macrofagi, come dimostrato dalla positività al test dell'α naftil-acetato esterasi <sup>71</sup>. In esperimenti che utilizzavano HLM non aderenti, le cellule sono state centrifugate ripetutamente su gradienti di Percoll fino ad ottenere una purezza >95% come dimostrato dalla doppia per CD/CD71/HLA DR valutata mediante citometria a flusso.

#### *Incubazioni cellulari*

I macrofagi aderenti sono stati incubati (37°C, 3-48 h) in RPMI contenente 2% di FCS e diverse concentrazioni (0,1-10 µg/ml) di hGIIA, hGX, hGIIA-H48Q, hGX-H48Q, o LPS. In esperimenti selezionati, le cellule sono state preincubate (37°C, 30 min) con o senza actinomicina D

(Act-D, 1  $\mu\text{g/ml}$ ), cicloesimide (CHX, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) o brefeldina A (Bre-A, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) e successivamente stimulate (37°C, 24 h) con hGX (3  $\mu\text{g/ml}$ ). In altri esperimenti, hGX (3  $\mu\text{g/ml}$ ) è stata preincubata (37°C, 15 min) con concentrazioni crescenti (0,01-10  $\mu\text{M}$ ) di Me-Indoxam o RO092906A. I HLM sono stati lavati e incubati (37°C, 24 h) in RPMI contenente hGX (3  $\mu\text{g/ml}$ ) o combinazioni di hGX con diverse concentrazioni di inibitori. In un'altra serie di esperimenti, le cellule sono state incubate con mezzo da solo, o con concentrazioni crescenti (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) di NECA, hGX (3  $\mu\text{g/ml}$ ), o combinazioni di NECA più hGX. Alla fine dell'incubazione i sopranatanti sono stati recuperati, centrifugati (1,000 g, 4°C, 5 min) e conservati a -80°C per la successiva quantificazione di VEGF-A, VEGF-C, and TNF- $\alpha$ . Le cellule restanti sono state lisate con 0,1% di Triton X-100 per la quantificazione delle proteine totali con il metodo Bradford (Biorad Laboratories, Milano, Italia).

### *RT-PCR*

RNA totale ottenuto dai HLM è stato isolato mediante il sistema di isolamento dell'RNA totale SV 96 (PROMEGA) e trattato con RNase-free DNase I in accordo con il protocollo fornito dal produttore. RNA è stato quantizzato mediante spettrofotometria. 1  $\mu\text{g}$  di RNA totale è stato retroscritto a cDNA con 25 mM di  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$  di oligo(dT) e 200

U di Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Per la PCR semi-quantitativa, 2  $\mu$ l di cDNA retrotrascritto sono stati successivamente amplificati utilizzando primers specifici per: i fattori angiogenici (VEGF-A, VEGF-B, PlGF), i fattori linfoangiogenici (VEGF-C e VEGF-D) e per GAPDH utilizzato come controllo (**Tabella II**). I prodotti della reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% 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: HLM (5 x 10<sup>6</sup>/2 ml) sono stati incubati (37°C) in RPMI supplementato con 2% di FCS, 2 mM L-glutamina e 1% soluzione antibiotico-antimicotica con o senza hGX (3  $\mu$ g/ml) (3–18 h). Alla fine dell'incubazione, l'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> e VEGF-B<sub>167</sub> compatibili per la qPCR sono stati disegnati dal Beacon Designer 3.0 software (Biorad). Sono stati utilizzati i primers per GAPDH, VEGF-C e VEGF-D e compatibili per qRT-PCR. Dopo una iniziale denaturazione a 94°C per 30 sec, è stata effettuata un'amplificazione a 40 cicli con denaturazione (94°C) per 30 sec, appaiamento (55°C) per 30 sec ed estensione dei primers (72°C). Alla fine è stata eseguita un'estensione a 72°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>, e VEGF-C sono state espresse come incremento in numero di volte verso quello delle cellule non stimolate.

#### *Western blot*

Le cellule (2-4 x 10<sup>6</sup> 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)<sup>100</sup>. In esperimenti selezionati, i HLM (6 x 10<sup>6</sup>/4 ml) sono stati incubati (37°C, 24 h) con RPMI da solo o con hGX (3 µg/ml). Alla fine dell'incubazione i sopranatanti sono stati recuperati e concentrati mediante centrifugazione (4.000 g, 4°C 15 min) in tubi Amicon (Millipore, Billerica, CA) dotati di una membrana di filtrazione con *cut-off* di 10 kDa. 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 stata diluita in litio dodecil-solfato (LDS) con o senza 2 $\beta$ -mercaptoetanololo al 2,5% e conservata a -80°C. Gli estratti proteici (40  $\mu$ g per campione) sono stati separati su gel 4-12% Bis-Tris gels (NuPAGE<sup>®</sup>, Novex) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad) insieme ad un marker proteico biotinilato, a VEGF-A<sub>165</sub> umano ricombinante, estratti proteici di cellule di linea MCF-7, estratti proteici di cellule di linea EBNA, o estratti proteici di RAW264.7 usati come controlli positivi. 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 h) con un anticorpo primario. Dopo il lavaggio le membrane sono state incubate (22°C, 1 h) 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).

*ELISA per VEGF-A, VEGF-C e TNF- $\alpha$*

Il contenuto di VEGF-A, VEGF-C e TNF- $\alpha$  nei lisati cellulari e nei soprannatanti delle colture dei macrofagi è stato determinato in duplicato utilizzando un dosaggio ELISA commercialmente disponibile (R&D System, Minneapolis, MN). Il *range* di linearità di questi dosaggi era: 30,5-2000 pg/ml (VEGF-A), 93,5-6000 pg/ml (VEGF-C), e tra 6 e 200 pg/ml (TNF- $\alpha$ ). Dal momento che il numero delle cellule aderenti nei pozzetti può variare nell'ambito dello stesso esperimento e tra i diversi esperimenti, i risultati sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine determinato nei campioni cellulari lisati con Tryton 0,1% utilizzando il metodo di Bradford. L'inibizione della secrezione di VEGF-A è stata rappresentata come per cento della risposta massima calcolata come  $(R-R_b)/(R_{max}-R_b) \times 100$ , dove R rappresenta la secrezione nei campioni trattati con la combinazione hGX + inibitore,  $R_b$  rappresenta la secrezione nelle cellule non trattate e  $R_{max}$  rappresenta la secrezione nei campioni stimolati con hGX.

#### *Saggio della membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM)*

I macrofagi aderenti sono stati incubati (37°C, 24 h) in RPMI, con hGX (3  $\mu$ g/ml), Me-Indoxam (10  $\mu$ M) o la combinazione di hGX più Me-Indoxam. Al termine dell'incubazione, i soprannatanti sono stati usati per la determinazione dell'attività angiogenica nel saggio della membrana corioallantoidea di embrione 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 <sup>106</sup>. 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 corioallantoidea (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 CAM sono state incubate all’ottavo giorno con i soprannatanti di HLM trattati e non disciolti in 3 µl di DMEM ed assorbiti 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. Ulteriori controlli sono stati condotti con soprannatanti di HLM non stimolati in cui hGX (3 µg/ml) veniva aggiunta dopo aver allontanato il soprannatante dalle cellule. Le CAM 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 dati sono espresso come media dei valori  $\pm$  ES del numero di esperimenti indicati. L'analisi statistica è stata condotta mediante l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal *test di Dunnett* (laddove il confronto è stato fatto rispetto al controllo) o dal *test di Bonferroni* (laddove il confronto è stato fatto rispetto a ogni coppia dei gruppi) mediante l'uso del *Software Analyse-it* per Microsoft Excel, versione 2.16 (Analyse-it Software, Ltd.)<sup>105</sup>. Un valore *p* inferiore a 0,05 è stato considerato significativo.



## RISULTATI

### *I macrofagi polmonari umani esprimono VEGFs*

Il profilo di espressione dei VEGFs prodotti da macrofagi primari non è stato ancora riportato. Pertanto, inizialmente abbiamo valutato l'espressione costitutiva dei VEGFs nei macrofagi umani purificati dal tessuto polmonare. La **Figura 1** mostra i segnali di amplificazione di RT-PCR ottenuti in un esperimento rappresentativo. I macrofagi polmonari umani (HLM) esprimono costitutivamente tre isoforme di *VEGF-A* (*VEGF-A<sub>121</sub>*, *VEGF-A<sub>165</sub>*, ed *VEGF-A<sub>189</sub>*) e due isoforme di *VEGF-B* (*VEGF-B<sub>167</sub>* e *VEGF-B<sub>186</sub>*). Inoltre, queste cellule esprimono anche mRNA per *VEGF-C* e *VEGF-D*, due mediatori dello sviluppo dei vasi linfatici<sup>6</sup>. Al contrario, nessuna delle due maggiori isoforme di *PlGF* (*PlGF-1* e *PlGF-2*) era espressa nei HLM (**Figura 1**).

Per verificare la presenza delle proteine per VEGF nei macrofagi, abbiamo esaminato i lisati cellulari mediante analisi di Western blot. Gli estratti proteici di queste cellule sono stati inizialmente analizzati con anticorpi anti-VEGF-A ed anti-PlGF in condizioni riducenti. Infatti, esperimenti preliminari hanno dimostrato che gli agenti riducenti impedivano il rilevamento di VEGF-A e di PlGF. In queste condizioni sperimentali, si osservavano bande immunoreattive di ~38 kDa (Figura 2, gel I) e ~55 kDa (Figura 2, gel II) in due diverse preparazioni cellulari.

Queste bande co-migravano con i dimeri di rhVEGF-A<sub>165</sub> (Figura 2, gel I), e VEGF-A<sub>189</sub> espressi nelle cellule umane MCF-7 (Figura 2, gel II) usate come controllo positivo<sup>107</sup>. Al contrario, la proteina per VEGF-A<sub>121</sub> (dati non presentati) e il PlGF (Figura 2, gel III) non erano rilevate nei HLM. Quando gli estratti proteici erano testati con un anticorpo anti-VEGF-B in condizioni riducenti, si evidenziava una banda immunoreattiva di ~22 kDa (Figura 2, gel IV). Questa banda co-migrava con VEGF-B<sub>167</sub> espresso nelle MCF-7<sup>107</sup>. Al contrario, VEGF-B<sub>186</sub> non era presente (dati non presentati).

VEGF-C e VEGF-D sono sintetizzati dopo che i loro precursori, conservati all'interno dei granuli citoplasmatici, sono sottoposti ad un complesso processo proteolitico<sup>108, 109</sup>. Pertanto, abbiamo osservato la presenza dei VEGF-C e VEGF-D nei HLM in condizioni riducenti utilizzando anticorpi diretti contro i precursori di VEGF-C e VEGF-D. Due bande immunoreattive di ~58 kDa (Figura 2, gel V), e ~53 kDa (Figura 2, gel VI) erano identificate in due preparazioni cellulari diverse. Queste bande corrispondono ai precursori di VEGF-C<sup>108</sup> e di VEGF-D<sup>109</sup>, rispettivamente, contenuti nelle linea macrofagica RAW 264.7<sup>110</sup>. Quindi, i macrofagi polmonari umani esprimono e sintetizzano costitutivamente le maggiori isoforme di VEGF angiogenici (A e B) e i precursori dei VEGF linfoangiogenici (C e D).

*La sPLA<sub>2</sub> inducono la produzione di VEGFs da HLM*

Abbiamo precedentemente dimostrato che hGIIA e hGX inducono la produzione di citochine/chemochine e l'esocitosi dai macrofagi polmonari umani<sup>71, 102, 103, 105</sup>. Abbiamo, quindi, valutato se queste sPLA<sub>2</sub> fossero in grado di indurre la produzione di VEGF-A e VEGF-C dai HLM. Le **Figure 3 e 4** mostrano che hGIIA e hGX inducevano la secrezione sia di VEGF-A che di VEGF-C in maniera concentrazione dipendente. L'effetto di entrambe le sPLA<sub>2</sub> era significativo alla concentrazione di 1 µg/ml. hGX era più potente di hGIIA nell'indurre la secrezione di questi due fattori. È interessante notare che la secrezione di VEGF-A e di VEGF-C indotta da hGX era comparabile a quella indotta dall'LPS, il principale stimolo di attivazione dei macrofagi umani<sup>111, 112</sup>.

Per identificare il tipo di isoforma di VEGF-A secreta dai HLM dopo stimolazione con sPLA<sub>2</sub>, i soprannatanti di cellule attivate e non con hGX sono stati concentrati per ultrafiltrazione ed esaminati mediante Western blot. La **Figura 5** mostra che i livelli di VEGF-A<sub>165</sub> presente nei soprannatanti di HLM tenuti in coltura per 24 h (Ctr) erano bassi; dopo la stimolazione cellulare con hGX aumentava in maniera significativa le concentrazioni di VEGF-A<sub>165</sub> nei soprannatanti di HLM. Al contrario, la quantità di VEGF-A<sub>189</sub> secreto dai macrofagi non aumentava dopo stimolazione con la sPLA<sub>2</sub>, e quella del VEGF-A<sub>121</sub> non era rilevabile sia

nei soprannatanti delle cellule di controllo che di quelle stimulate con hGX (dati non presentati). Questi risultati indicano che la isoforma principale di VEGF-A secreta dai macrofagi attivati dalla sPLA<sub>2</sub> è VEGF-A<sub>165</sub>.

In un gruppo successivo di esperimenti abbiamo valutato la cinetica di secrezione del VEGF in macrofagi stimolati e non con hGX. I macrofagi tenuti in coltura per 48 h rilasciavano spontaneamente piccole quantità di VEGF-A ( $83 \pm 16$  pg/mg di proteine) e VEGF-C ( $59 \pm 20$  pg/mg di proteine). hGX (10 µg/ml) induceva una secrezione tempo-dipendente sia di VEGF-A che di VEGF-C (**Figura 6**). Tuttavia, le cinetiche di attivazione erano differenti: la secrezione del VEGF-A cominciava 6 h dopo la stimolazione e aumentava progressivamente fino a 48 h, mentre quella del VEGF-C era massima a 24 h ritornando a valori basali nelle ore successive.

#### *Le sPLA<sub>2</sub> inducono l'espressione dell'mRNA di VEGF nei HLM*

L'osservazione che la secrezione di VEGF-A e di VEGF-C indotta dall'sPLA<sub>2</sub> era rilevabile solo alcune ore dopo la stimolazione suggerisce che questi eventi dipendano dalla sintesi proteica. Pertanto, abbiamo esaminato gli effetti dell'actinomicina D (Act-D, inibitore della trascrizione genica), della cicloesimide (CHX, inibitore della sintesi proteica), e della brefeldina A (Bre-A, inibitore del trasporto proteico

intracellulare), sulla secrezione del VEGF indotto da hGX. La preincubazione (30 min) dei HLM con Act-D (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CHX (10  $\mu\text{g/ml}$ ), o Bre-A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) bloccavano completamente la secrezione di VEGF-A e di VEGF-C dai HLM indotta da hGX (**Tabella III**). Questi risultati indicano che questo effetto era un processo metabolicamente attivo coinvolgente la trascrizione dell'mRNA, la sintesi proteica e il trasporto intracellulare. In particolare, l'effetto inibente dell'Act-D indica che le sPLA<sub>2</sub> inducono la produzione di VEGF mediante l'incremento dell'espressione dell'mRNA. Pertanto, in una serie successiva di esperimenti, abbiamo esaminato le cinetiche di espressione dei geni che codificano per VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C nei HLM stimolati con hGX mediante qPCR real-time. La **Figura 7** mostra che hGX induceva un marcato aumento dell'espressione dell'mRNA sia di VEGF-A<sub>165</sub> che di VEGF-C con cinetiche simili. In particolare, l'espressione del VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C raggiungeva un valore massimo dopo 3 h di incubazione con hGX, si riduceva dopo 6 h ritornando ai valori di controllo entro 18 h. Questi dati indicano che la trascrizione genica di VEGF-A e di VEGF-C sono paragonabili e quindi è lecito pensare che il diverso *time course* di secrezione sia correlato a differenze nei meccanismi di trasporto e secrezione della proteina stessa. È interessante notare che hGX esercitava un effetto maggiore sull'espressione dell'mRNA per VEGF-A ( $12,49 \pm$

1,06 di aumento vs. controllo) rispetto a quella per VEGF-C ( $8,67 \pm 0,82$  di aumento vs. controllo).

*Le sPLA<sub>2</sub> inducono la produzione di VEGF-A attraverso un meccanismo recettoriale*

Le sPLA<sub>2</sub> possono esercitare i loro effetti biologici attraverso sia l'attività enzimatica sia mediante l'interazione con recettori di membrane espressi anche sulla superficie dei macrofagi<sup>100</sup>. Per comprendere il meccanismo responsabile della produzione di VEGF dai HLM, abbiamo effettuato due tipi di esperimenti. Inizialmente, abbiamo esaminato la capacità di due sPLA<sub>2</sub>, la cui attività catalitica era stata soppressa mediante mutagenesi sito-specifica, di indurre la secrezione di VEGF-A dai HLM. A tale scopo abbiamo usato due varianti di hGIIA e di hGX in cui il residuo di istidina in posizione 48 del sito catalitico era stato sostituito da un residuo di glutammina (mutazione H48Q). Sebbene la struttura tridimensionale, la stabilità e la capacità di legarsi al recettore di tipo M dei mutanti di GIIA e di hGX che abbiamo usato sia lievemente cambiata, i mutanti perdono completamente l'attività catalitica (<1% dell'attività rispetto all'enzima *wild-type*)<sup>88, 113, 114</sup>. La **Figura 8** mostra che hGIIA-H48Q e hGX-H48Q conservavano la capacità di indurre la secrezione di VEGF-A dai HLM, dimostrando che l'attività enzimatica

non è necessaria per la produzione di VEGF-A dai macrofagi polmonari umani.

In una seconda serie di esperimenti abbiamo usato due inibitori del sito attivo della sPLA<sub>2</sub> che bloccano sia l'attività enzimatica che la capacità delle sPLA<sub>2</sub> di legarsi ai recettori specifici, tra cui il recettore di tipo M<sup>115</sup>. Infatti, il composto Me-Indoxam ed altri inibitori competitivi della sPLA<sub>2</sub> quali RO092906A<sup>116</sup> protrudono fuori dal sito catalitico quando si legano alla sPLA<sub>2</sub> e quindi creano un ingombro sterico che impedisce alla sPLA<sub>2</sub> di interagire con il recettore<sup>115</sup>. Grazie a questa proprietà, in precedenti lavori, abbiamo potuto dimostrare che Me-Indoxam impediva l'attivazione recettore-mediata dei HLM stimolati con la sPLA<sub>2</sub><sup>102, 103</sup>. In tre esperimenti, i composti Me-Indoxam e RO092906A (0,01-10 µM) non influenzavano la secrezione basale di VEGF-A dai HLM. La preincubazione (15 min, 37°C) di hGX (3 µg/ml) con concentrazioni crescenti di Me-Indoxam o di RO092906A prima dell'aggiunta ai HLM, inibiva in maniera concentrazione dipendente la secrezione di VEGF-A (**Figura 9**). I valori di IC<sub>50</sub> di Me-Indoxam e RO092906A erano rispettivamente 221 ± 37 nM e 69 ± 17 nM. Questi valori erano consistenti con i valori di affinità di Me-Indoxam (valore di IC<sub>50</sub> di 400-1000 nM) e RO092906A (valore di IC<sub>50</sub> di 40-100 nM) per hGX, riportati in letteratura<sup>89, 116</sup>.

Pertanto, i risultati di questi due approcci sperimentali dimostrano che l'attività catalitica di hGIIA e di hGX non è richiesta per la produzione di VEGF dai HLM e suggeriscono che questo effetto è probabilmente mediato dall'interazione con un recettore di membrana, verosimilmente il recettore di tipo M espresso sui macrofagi polmonari umani<sup>103</sup>.

*I soprannatanti dei HLM attivati dalle sPLA<sub>2</sub> inducono l'angiogenesi nel modello della membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM)*

Gli esperimenti sopra descritti hanno dimostrato che i HLM producono fattori angiogenici in seguito a stimolazione con la sPLA<sub>2</sub>. Per verificare che questo evento effettivamente determini l'angiogenesi *in vivo* abbiamo valutato se i soprannatanti dei macrofagi attivati dalla sPLA<sub>2</sub> inducano una risposta angiogenica nel modello della membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM). In tre esperimenti, nelle CAM di embrioni di pollo all'ottavo giorno di incubazione sono state impiantate spugne di gelatina imbevute di soprannatante di macrofagi umani stimolati e non con hGX. Le spugne adsorbite con il tampone o con VEGF-A<sub>165</sub> sono state utilizzate rispettivamente come controllo negativo o positivo. Al dodicesimo giorno di incubazione nessuna risposta vascolare è stata osservata attorno alle spugne trattate con il tampone (**Figura 10A e 10F**). Nelle spugne imbevute con i soprannatanti



dei macrofagi non stimolati e tenuti in coltura per 24 ore, si osservava la formazione di pochi vasi allantoici che si distribuivano radialmente attorno alla spugna (**Figura 10B e 10F**). Questa risposta non era modificata dall'aggiunta di Me-Indoxam (10  $\mu$ M, **Figura 10C e 10F**). I soprannatanti di macrofagi trattati con hGX (3  $\mu$ g/ml) aumentavano notevolmente la risposta angiogenica nella CAM come testimoniato dalla presenza di vasi allantoidi che si distribuivano radialmente attraverso la spugna come i raggi di una ruota (**Figura 10D e 10F**). Una simile risposta angiogenica è stata osservata macroscopicamente negli impianti trattati con 50 ng di VEGF-A<sub>165</sub> mentre i soprannatanti dei macrofagi non stimolati e a cui era stato aggiunto hGX (3  $\mu$ g/ml) dopo l'incubazione cellulare non modificano la risposta angiogenica nella CAM. La preincubazione (15 min, 37°C) di hGX con Me-Indoxam prima della aggiunta ai HLM bloccava completamente la risposta angiogenica indotta da hGX (**Figura 10E e 10F**).

L'analisi statistica condotta su tre esperimenti confermava che i soprannatanti dei macrofagi trattati con hGX aumentavano significativamente il numero di vasi allantoidi formati radialmente alla spugna e che Me-Indoxam sopprimeva questa risposta (**Figura 10F**). Questi risultati indicano che i soprannatanti dei macrofagi umani inducono una risposta angiogenica *in vivo* che è verosimilmente dovuta alla presenza di VEGF-A.

*Effetto di NECA sulla produzione di VEGF-A e di TNF- $\alpha$  nei macrofagi stimolati con sPLA<sub>2</sub>*

L'adenosina è un nucleoside purinico endogeno che modula le risposte immunitarie mediante l'interazione con specifici recettori di membrana espressi su molteplici cellule<sup>117</sup>. Questo mediatore è stato implicato nei meccanismi patogenetici delle malattie croniche infiammatorie delle vie aeree quali l'asma e la BPCO attraverso sia la produzione che l'aumento della densità dei suoi recettori<sup>118</sup>. Inoltre, l'adenosina si accumula nei tumori solidi dove esplica diverse funzioni promuoventi lo sviluppo del tumore<sup>119</sup>. Precedentemente abbiamo dimostrato che le sPLA<sub>2</sub> sono potenti stimoli per la produzione di TNF- $\alpha$  dai macrofagi polmonari umani<sup>102, 103, 105</sup>. Pertanto in questo studio abbiamo valutato gli effetti di NECA, un analogo metabolicamente stabile dell'adenosina, sulla secrezione di VEGF-A e di TNF- $\alpha$  indotta dalla sPLA<sub>2</sub> dai HLM. L'incubazione (37°C, 24 h) dei HLM con concentrazioni crescenti (0,1-10  $\mu$ M) di NECA da solo induceva una secrezione significativa del VEGF-A alla più alta concentrazione esaminata (**Figura 11**). Viceversa, NECA non esercitava alcun effetto sulla secrezione di TNF- $\alpha$  (**Figura 12**). L'incubazione dei macrofagi con hGX (3  $\mu$ g/ml) in presenza di concentrazioni crescenti (0,1-10  $\mu$ M) di NECA esercitava un effetto sinergico sulla produzione di VEGF-A

rispetto a quella indotta da sPLA<sub>2</sub> e da NECA singolarmente (**Figura 11**). Considerato 100% come somma della secrezione netta di VEGF-A indotta dal NECA e hGX singolarmente, l'effetto sinergico del NECA aumentava in maniera concentrazione dipendente. In particolare, raggiungeva il ~160% alla concentrazione di 0,1 µM fino ad arrivare al ~190% alla concentrazione di 10 µM. Viceversa, NECA sopprimeva in maniera concentrazione-dipendente la secrezione di TNF-α indotta da hGX (Figura 6). Pertanto, sia l'aumento della secrezione di VEGF-A che l'inibizione di TNF-α indotte da NECA erano significative alla concentrazione di 0,1 µM, e massime a 10 µM. Questi risultati indicano che NECA induce uno *switch* in senso angiogenico nei macrofagi polmonari attivati dalla sPLA<sub>2</sub> attraverso la promozione della produzione di VEGF-A e l'inibizione della sintesi di TNF-α.

## DISCUSSIONE

I macrofagi sono cellule secretorie multifunzionali particolarmente abbondanti a livello delle superfici di contatto tra l'organismo e l'ambiente esterno. Queste cellule agiscono come sentinelle e sono probabilmente le prime, insieme ai mastociti, ad intervenire nelle risposte infiammatorie e nell'immunità innata contro agenti infettivi di tipo virale e batterico<sup>120</sup>. Molteplici evidenze sperimentali hanno documentato l'importanza dei macrofagi in diversi processi infiammatori cronici<sup>25, 121</sup> e nello sviluppo tumorale<sup>28, 122</sup>. L'esatto meccanismo attraverso il quale i tumori inducono angiogenesi è ancora sconosciuto. Negli ultimi anni, il ruolo della famiglia del VEGF emerge sempre di più nei meccanismi di regolazione dell'angiogenesi, della linfoangiogenesi e del rimodellamento tessutale in corso di patologie infiammatorie e neoplastiche<sup>3, 7</sup>.

In questo studio abbiamo dimostrato che i macrofagi umani del parenchima polmonare 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<sup>3</sup>. Inoltre, esprimono costitutivamente mRNA per VEGF-C e VEGF-D che regolano lo sviluppo dei vasi linfatici<sup>7</sup>. L'mRNA per le due isoforme di PlGF-1 e -2 non è stato rilevato. Le

proteine per VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D sono state rilevate mediante Western blot nei lisati cellulari dei HLM. Infine, il PlGF immunoreattivo non è stato rilevato nei macrofagi umani. In questo studio abbiamo dimostrato che i macrofagi secernono spontaneamente piccole quantità di VEGF-A durante un periodo di incubazione di 6 – 48 ore. Due isoforme di sPLA<sub>2</sub> umane (hGIIA e hGX) aumentano l'espressione e la secrezione del VEGF-A e del VEGF-C dai HLM e l'attività angiogenica di queste cellule attraverso un meccanismo indipendente dall'attività enzimatica e mediato dall'interazione con un recettore di membrana. Inoltre, l'attivazione dei HLM da parte delle sPLA<sub>2</sub> in presenza di un analogo dell'adenosina induceva uno *switch* funzionale dei macrofagi attraverso l'aumento della produzione di VEGF-A e la soppressione di quella del TNF- $\alpha$ .

Studi condotti su biopsie tessutali ottenute da pazienti con malattie infiammatorie e neoplastiche hanno dimostrato che i macrofagi esprimono VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D<sup>26, 29</sup>. Tuttavia, il profilo di espressione dei VEGF può cambiare a seconda delle condizioni fisiopatologiche a cui i macrofagi sono esposti<sup>123-126</sup>. In questo studio abbiamo dimostrato che i macrofagi isolati dal tessuto polmonare esprimono costitutivamente VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, e VEGF-D sia a livello di mRNA che di proteina. HLM secernono spontaneamente piccole quantità di VEGF-A e di VEGF-C e i loro soprannatanti stimolano

la formazione di vasi sanguigni in un modello *in vivo* di angiogenesi. Questo implica che i macrofagi possiedono una capacità intrinseca di produrre VEGF, responsabili della angiogenesi che si osserva nei tessuti normali e in condizioni infiammatorie e tumorali.

Recentemente, si è posta l'attenzione anche sul ruolo delle sPLA<sub>2</sub> nell'infiammazione tessutale e nella crescita tumorale<sup>61, 90, 127, 128</sup>. Gli effetti delle sPLA<sub>2</sub> nell'angiogenesi sono stati scarsamente investigati. Rizzo *et al.* hanno dimostrato che le sPLA<sub>2</sub>, sia umane che estratte da veleno di serpente o d'ape, inducono la migrazione delle cellule endoteliali attraverso un meccanismo coinvolgente, al meno in parte, la loro attività enzimatica<sup>77</sup>. Inoltre, evidenze indirette ottenute mediante l'uso di un inibitore dell'attività enzimatica della sPLA<sub>2</sub> suggeriscono che le sPLA<sub>2</sub> sono coinvolte nella proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali indotta dal FGFβ o da VEGF-A<sup>129</sup>. In questo studio, abbiamo riportato per la prima volta che due principali sPLA<sub>2</sub> umane, hGIIA e hGX, inducono l'espressione e la secrezione di VEGF-A e di VEGF-C dai macrofagi polmonari umani. VEGF-A è il più potente mediatore angiogenico sinora identificato nei tessuti infiammati o tumorali<sup>3</sup>. VEGF-C è il principale fattore responsabile della linfoangiogenesi che si osserva durante la progressione tumorale e la formazione di metastasi<sup>6</sup>. Pertanto, i nostri risultati dimostrano che le sPLA<sub>2</sub> prodotte nei siti dell'infiammazione e della crescita tumorale

possono modulare l'angiogenesi e la linfoangiogenesi attraverso la produzione di VEGF-A e di VEGF-C dai macrofagi.

L'intervallo di concentrazione delle sPLA<sub>2</sub> (1-10 µg/ml) che determina la produzione dei VEGF dai macrofagi è comparabile a quello riscontrato *in vivo*, almeno per quanto riguarda hGIIA. Infatti, nelle vie aeree di pazienti con malattie infiammatorie del polmone (e.s., asma bronchiale, BPCO, e sindrome da *distress* respiratorio nell'adulto) si riscontrano livelli di sPLA<sub>2</sub> tra 1 e 10 µg/ml mentre i livelli di sPLA<sub>2</sub> dosati nel lavaggio broncoalveolare sono corretti per la diluizione del lavaggio<sup>130</sup>. A questo proposito, le nostre osservazioni sono particolarmente rilevanti perchè hGIIA e hGX sono entrambe espresse nel polmone umano e vengono secrete nel corso di malattie infiammatorie polmonari e dei tumori<sup>38, 57, 64, 131</sup>. Pertanto, è ragionevole pensare che, *in vivo*, la produzione di fattori angiogenici dai macrofagi avvenga nelle vie aeree umane, verosimilmente, in seguito alla secrezione di sPLA<sub>2</sub>, quali hGIIA e hGX.

Le concentrazioni di hGIIA e hGX necessarie per l'induzione di una secrezione significativa di VEGF-A e VEGF-C sono comparabili, sebbene hGX sia più potente rispetto a hGIIA nell'indurre entrambi i VEGFs. Questi risultati concordano con i dati ottenuti precedentemente che dimostrano che hGX stimola maggiormente la secrezione di citochine e chemochine dai macrofagi rispetto a hGIIA<sup>71, 103, 105</sup>. Inoltre, è

importante notare che la secrezione di VEGF-A e di VEGF-C indotta da hGX è comparabile a quella mediata da principale attivatore dei macrofagi, LPS. In particolare, a concentrazione submicromolari (10  $\mu\text{g/ml}$  = 700 nM), hGX determinava la secrezione di una quantità di VEGF-A (~1,600 pg *per* mg di proteine) e di VEGF-C (~800 pg *per* mg di proteine) molto vicina a quella più alta documentata nei macrofagi stimolati<sup>111, 112, 132</sup>. Inoltre, i sopranatanti dei macrofagi stimolati con hGX inducevano una forte risposta angiogenica nel modello della CAM. Questo effetto è dovuto alla produzione di VEGF dal momento che hGX *per se* non stimolava l'angiogenesi in questo modello sperimentale. Pertanto, hGX sembra essere uno tra gli attivatori endogeni più potenti per la produzione di VEGF dai macrofagi.

Esperimenti con inibitori metabolici mostravano che l'Act-D, la CHX e la Bre-A bloccavano la secrezione di VEGF-A e di VEGF-C indotta dalla sPLA<sub>2</sub> indicando che questo evento era metabolicamente attivo e richiedeva la trascrizione dell'mRNA. Questo era confermato dalla nostra osservazione che hGX aumentava l'espressione dell'mRNA sia di VEGF-A che di VEGF-C. Sebbene le cinetiche di espressione di questi fattori erano simili, le cinetiche di secrezione erano differenti. Infatti, la secrezione di VEGF-A continuava oltre le 12-48 h, mentre quella di VEGF-C era massima a 24 h e ritornava a valori basali poco dopo. La seconda osservazione potrebbe essere spiegata considerando il



fatto che VEGF-C sia re-internalizzato nella cellula con un meccanismo mediato dal recettore VEGFR-3<sup>125</sup> o che VEGF-C venga degradato da enzimi lisosomiali secreti in risposta alla stimolazione con le sPLA<sub>2</sub><sup>71</sup>.

I risultati ottenuti con le sPLA<sub>2</sub> cataliticamente inattive (mutante H48Q) indicano che l'attività enzimatica non è coinvolta nella produzione di VEGFs indotta dalla sPLA<sub>2</sub>. Gli esperimenti effettuati con gli inibitori Me-Indoxam e RO092906A dimostrano che questo effetto è verosimilmente mediato dalla attivazione del recettore di tipo M espresso sui HLM<sup>103</sup>, od un altro recettore non ancora identificato<sup>113</sup>. Sebbene Me-Indoxam ed altri composti simili furono inizialmente caratterizzati come inibitori dell'attività enzimatica delle sPLA<sub>2</sub><sup>89</sup>, successivamente fu scoperto che il legame con l'inibitore riduce drammaticamente l'affinità delle sPLA<sub>2</sub> per il recettore di tipo M<sup>115</sup>. L'osservazione che i valori di IC<sub>50</sub> di Me-Indoxam e RO092906A per inibire la secrezione di VEGF-A sono simili a quelli per l'inibizione dell'attività enzimatica<sup>89, 116</sup> e per il legame con il recettore di tipo M<sup>115</sup> suggerisce che il recettore implicato nella produzione di VEGFs indotta dalle sPLA<sub>2</sub> sia il recettore di tipo M. Tuttavia, è opportuno ricordare che l'effetto inibente di Me-Indoxam e RO092906A non esclude una interazione di hGIIA e di hGX con altri bersagli espressi sulla membrana. In particolare, questi inibitori competitivi potrebbero prevenire l'interazione delle sPLA<sub>2</sub> con altri recettori sinora non identificati<sup>113</sup> che potrebbero legarsi alle sPLA<sub>2</sub>

attraverso un dominio situato nelle immediate vicinanze del dominio catalitico, come si verifica per il legame con il recettore di tipo M<sup>115</sup>. È importante notare che hGIIA induce l'adesione e la proliferazione della linea cellulare macrofagica U937 mediante l'interazione di un dominio distante dal sito catalitico della sPLA<sub>2</sub> con alcune integrine (e.s.,  $\alpha\beta3$  e  $\alpha4\beta1$ )<sup>104</sup>. Dal momento che la capacità del Me-Indoxam di bloccare alcuni effetti delle sPLA<sub>2</sub> resta da valutare, esiste la possibilità che hGIIA e hGX attivino la produzione di VEGFs nei macrofagi attraverso l'interazione con bersagli di membrana diversi dal recettore di tipo M.

E' noto che in alcune aree tumorali si verifica una transitoria o cronica ipossia<sup>133</sup> che può condurre all'accumulo extracellulare di adenosina<sup>134</sup>. E' noto che l'adenosina svolge un ruolo rilevante nei meccanismi patogenetici dell'asma bronchiale e delle malattie croniche ostruttive del polmone<sup>118</sup>. La stimolazione dei macrofagi con hGX in presenza di NECA, un analogo metabolicamente stabile dell'adenosina, induceva un aumento sinergico della secrezione di VEGF-A e riduceva quella di TNF- $\alpha$ . Leibovich *et al.* hanno dimostrato che NECA aumenta la produzione di VEGF-A dai macrofagi murini stimolati con LPS o altri prodotti batterici<sup>132, 135</sup>. Questo effetto è dovuto alla sinergia tra alcuni TLR e il recettore per l'adenosina di tipo A<sub>2A</sub>. Al pari dell'LPS, le sPLA<sub>2</sub> sono mediatori multipotenti che attivano diverse funzioni nei macrofagi<sup>100</sup>. Tuttavia, le sPLA<sub>2</sub> sono anche mediatori endogeni secreti

in alcune malattie infiammatorie del polmone<sup>130</sup> e nei tumori<sup>61</sup>. Questi processi patologici sono spesso associati ad un aumento della produzione locale di adenosina<sup>118, 119</sup>. Pertanto, è verosimile che *in vivo* le sPLA<sub>2</sub> e l'adenosina siano prodotte simultaneamente nei siti dell'infiammazione a livello polmonare e nella crescita tumorale e cooperino nel promuovere il rimodellamento vascolare mediante la produzione di fattori angiogenici dai macrofagi. In questo contesto, l'osservazione che la combinazione della sPLA<sub>2</sub> con un analogo dell'adenosina promuove l'attività angiogenica dei macrofagi fornisce una nuova informazione sui fattori derivati dai tumori implicati nello sviluppo dei TAM. Infatti, la maggior parte dei TAM esprime il fenotipo proangiogenico M2 caratterizzato da una aumentata produzione di VEGF-A e da una ridotta capacità di produrre TNF- $\alpha$ <sup>27-29</sup>. Attualmente si ritiene che il fenotipo proangiogenico sia indotto da mediatori locali prodotti nei siti di sviluppo tumorale<sup>26, 27, 29</sup>. Pertanto, è ipotizzabile pensare che la simultanea presenza di sPLA<sub>2</sub> ed adenosina nei siti di crescita tumorale<sup>61, 119</sup> possa contribuire allo *switch* del fenotipo dei macrofagi, da un fenotipo M1, inibente lo sviluppo del tumore, ad un fenotipo M2, promuovente lo sviluppo del tumore.

In conclusione, i risultati emersi da queste indagini hanno caratterizzato una nuova funzione delle sPLA<sub>2</sub> ed ampliato il campo degli effetti fisiopatologici indotti da queste molecole nelle cellule

infiammatorie. L'inibizione delle risposte angiogeniche indotte dalla sPLA<sub>2</sub> potrebbe rappresentare una strategia con cui ridurre l'angiogenesi e la linfoangiogenesi associata a malattie infiammatorie e neoplastiche del polmone.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4.
2. **Oliver G., Alitalo K.** The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21:457-83.
3. **Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor: pathophysiology and clinical implications. In: Ferrara N, editor. *Angiogenesis. From basic science to clinical applications.* New York: CRC; 2007. p. 1-36.
4. **de Paulis A., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F.W., Staibano S., Montuori N., Ragno P., Longobardi A., Liccardo B., Genovese A., Ribatti D., Walls A.F., Marone G.** Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J. Immunol.* 2006; 177:7322-31.
5. **Tammela T., Enholm B., Alitalo K., Paavonen K.** The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65:550-63.
6. **Alitalo K., Tammela T., Petrova T.V.** Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438:946-53.
7. **Haiko P.I., Karkkainen M.J., Achen M.G., Stacker A.** Growth factors and lymphangiogenesis. In *Angiogenesis from basic science to clinical applications.* 2007; N. Ferrara, ed. CRC.

8. **Olofsson B., Jeltsch M., Eriksson U., Alitalo K.** Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999; 10:528-35.
9. **Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico M.G.** Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1991; 88:9267-71.
10. **Viglietto G., Maglione D., Rambaldi M., Cerutti J., Romano A., Trapasso F., Fedele M., Ippolito P., Chiappetta G., Botti G., et al.** Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995; 11:1569-79.
11. **Cao Y., Ji W.R., Qi P., Rosin A., Cao Y.** Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 235:493-8.
12. **De Falco S., Gigante B., Persico M.G.** Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002; 12:241-6.
13. **Robinson C.J., Stringer S.E.** The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 2001; 114:853-65.

14. **Folkman J.** Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* 2002; 29:15-8.
15. **Danese S., Sans M., de la Motte C., Graziani C., West G., Phillips M.H., Pola R., Rutella S., Willis J., Gasbarrini A., Fiocchi C.** Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006; 130:2060-73.
16. **Baluk P., Tammela T., Ator E., Lyubynska N., Achen M.G., Hicklin D.J., Jeltsch M., Petrova T.V., Pytowski B., Stacker S.A., Yla-Herttuala S., Jackson D.G., Alitalo K., McDonald D.M.** Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:247-57.
17. **Chetta A., Zanini A., Torre O., Olivieri D.** Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 2007; 6:41-5.
18. **Vrugt B., Wilson S., Bron A., Holgate S.T., Djukanovic R., Aalbers R.** Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur. Respir. J.* 2000; 15:1014-21.
19. **Puxeddu I., Berkman N., Nissim Ben Efraim A.H., Davies D.E., Ribatti D., Gleich G.J., Levi-Schaffer, F.** The role of eosinophil major basic protein in angiogenesis. *Allergy* 2009; 64:368-74.

20. **Hoshino M., Nakamura Y., Hamid Q.A.** Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107:1034-8.
21. **Zanini A., Chetta A., Saetta M., Baraldo S., D'Ippolito R., Castagnaro A., Neri M., Olivieri D.** Chymase-positive mast cells play a role in the vascular component of airway remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 120:329-33.
22. **Knox A.J., Corbett L., Stocks J., Holland E., Zhu Y.M., Pang L.** 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.* 2001; 15:2480-8.
23. **Boussat S., Eddahibi S., Coste A., Fataccioli V., Gouge M., Housset B., Adnot S., Maitre B.** Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 279:L371-8.
24. **Ferrara N.** Angiogenesis from basic science to clinical applications. New York: *CRC*; 2007.
25. **Fujiwara N., Kobayashi K.** Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2005; 4:281-6.



26. **Ono M.** Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 2008; 99:1501-6.
27. **Mantovani A., Schioppa T., Porta C., Allavena P., Sica A.** Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25:315-22.
28. **Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A.** The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.* 2008; 222:155-61.
29. **Lamagna C., Aurrand-Lions M., Imhof B.A.** Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 80:705-13.
30. **Mayer R.J., Marshall L.A.** New insights on mammalian phospholipase. A<sub>2</sub>S; comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes. *FASEB J.* 1993; 7:339-48.
31. **Waite M.** Phospholipases, enzymes that share a substrate class. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990; 279:1-22.
32. **Waku K.** Origins and fates of fatty acyl-CoA esters. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1124:101-11.

33. **Kudo I., Murakami M.** Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 2002; 68-69:3-58.
34. **Diaz B.L., Arm J.P.** Phospholipase A<sub>2</sub>. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2003; 69:87-97.
35. **Hamaguchi K., Kuwata H., Yoshihara K., Masuda S., Shimbara S., Oh-ishi S., Murakami M., Kudo I.** Induction of distinct sets of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in rodents during inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1635:37-47.
36. **Masuda S., Murakami M., Ishikawa Y., Ishii T., Kudo I.** Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in several human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1736:200-10.
37. **Masuda S., Murakami M., Komiyama K., Ishihara M., Ishikawa Y., Ishii T., Kudo I.** Various secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells. *FEBS Lett.* 2005; 272:655-72.
38. **Masuda S., Murakami M., Mitsuishi M., Komiyama K., Ishikawa Y., Ishii T., Kudo I.** Expression of secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells. *Biochem. J.* 2005; 387:27-38.

39. **Uhl W., Nevalainen T.J., Buchler M.W.** Phospholipase A<sub>2</sub>. Basic and clinical aspects in inflammatory diseases. Basel: *Karger*; 1997.
40. **Seilhamer J.J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J.A., Kloss J., Johnson L.K.** Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:5335-8.
41. **Samet J.M., Madden M.C., Fonteh A.N.** Characterization of a secretory phospholipase A<sub>2</sub> in human bronchoalveolar lavage fluid. *Exp. Lung Res.* 1996; 22:299-315.
42. **Andersen S., Bjermer L., Selbo P.K., Dalaker M., Johansen B.** Extracellular phospholipase A<sub>2</sub> expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 1996; 13:70-6.
43. **Benfield T.L., van Steenwijk R., Nielsen T.L., Dichter J.R., Lipschik G.Y., Jensen B.N., Junge J., Shelhamer J.H., Lundgren J.D.** Interleukin-8 and eicosanoid production in the lung during moderate to severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: a role of interleukin-8 in the pathogenesis of *P. carinii* pneumonia. *Respir. Med.* 1995; 89:285-90.
44. **Bowton D.L., Seeds M.C., Fasano M.B., Goldsmith B., Bass D.A.** Phospholipase A<sub>2</sub> and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage

- fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155:421-5.
45. **Chilton F.H., Averill F.J., Hubbard W.C., Fonteh A.N., Triggiani M., Liu M.C.** Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. *J. Exp. Med.* 1996; 183:2235-45.
46. **Kim D.K., Fukuda T., Thompson B.T., Cockrill B., Hales C., Bonventre J.V.** Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A<sub>2</sub> activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol.* 1995; 269:L109-18.
47. **Sorensen J., Kald B., Tagesson C., Lindahl M.** Platelet-activating factor and phospholipase A<sub>2</sub> in patients with septic shock and trauma. *Intensive Care Med.* 1994; 20:555-61.
48. **Kugiyama K., Ota Y., Takazoe K., Moriyama Y., Kawano H., Miyao Y., Sakamoto T., Soejima H., Ogawa H., Doi H., Sugiyama S., Yasue H.** Circulating levels of secretory type II phospholipase A<sub>2</sub> predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100:1280-4.
49. **Haapamaki M.M., Gronroos J.M., Nurmi H., Alanen K., Nevalainen T.J.** Gene expression of group II phospholipase A<sub>2</sub> in intestine in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1999; 94:713-20.

50. **Haapamaki M.M., Gronroos J.M., Nurmi H., Irjala K., Alanen K.A., Nevalainen T.J.** Phospholipase A<sub>2</sub> in serum and colonic mucosa in ulcerative colitis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1999; 59:279-87.
51. **Haapamaki M.M., Gronroos J.M., Nurmi H., Soderlund K., Peuravuori H., Alanen K., Nevalainen T.J.** Elevated group II phospholipase A<sub>2</sub> mass concentration in serum and colonic mucosa in Crohn's disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998; 36:751-5.
52. **Schroder T., Kivilaakso E., Kinnunen P.K., Lempinen M.** Serum phospholipase A<sub>2</sub> in human acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 1980; 15:633-6.
53. **Vadas P.** Elevated plasma phospholipase A<sub>2</sub> levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. *J. Lab. Clin. Med.* 1984; 104:873-81.
54. **Romaschin A.D., DeMajo W.C., Winton T., D'Costa M., Chang G., Rubin B., Gamliel Z., Walker P.M.** Systemic phospholipase A<sub>2</sub> and cachectin levels in adult respiratory distress syndrome and multiple-organ failure. *Clin. Biochem.* 1992; 25:55-60.
55. **Nakae H., Endo S., Inada K., Yamashita H., Yamada Y., Takakuwa T., Kasai T., Ogawa M., Uchida K.** Plasma concentrations of type II

phospholipase A<sub>2</sub>, cytokines and eicosanoids in patients with burns. *Burns* 1995; 21:422-6.

56. **Partrick D.A., Moore E.E., Silliman C.C., Barnett C.C., Kuypers F.A.** Secretory phospholipase A<sub>2</sub> activity correlates with postinjury multiple organ failure. *Crit. Care Med.* 2001; 29:989-93.
57. **Abe T., Sakamoto K., Kamohara H., Hirano Y., Kuwahara N., Ogawa M.** Group II phospholipase A<sub>2</sub> is increased in peritoneal and pleural effusions in patients with various types of cancer. *Int. J. Cancer* 1997; 74:245-50.
58. **Mounier C.M., Wendum D., Greenspan E., Flejou J.F., Rosenberg D.W., Lambeau G.** Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A<sub>2</sub> in human colorectal adenocarcinomas: sPLA<sub>2</sub>-III as a biomarker candidate. *Br. J. Cancer* 2008; 98:587-95.
59. **Sved P., Scott K.F., McLeod D., King N.J., Singh J., Tsatralis T., Nikolov B., Boulas J., Nallan L., Gelb M.H., Sajinovic M., Graham G.G., Russell P.J., Dong Q.** Oncogenic action of secreted phospholipase A<sub>2</sub> in prostate cancer. *Cancer Res.* 2004; 64:6934-40.
60. **Tribler L., Jensen L.T., Jorgensen K., Brunner N., Gelb M.H., Nielsen H.J., Jensen S.S.** Increased expression and activity of group IIA

and X secretory phospholipase A<sub>2</sub> in peritumoral versus central colon carcinoma tissue. *Anticancer Res.* 2007; 27:3179-85.

61. **Cummings B.S.** Phospholipase A<sub>2</sub> as targets for anti-cancer drugs. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 74:949-59.
62. **Laye J.P., Gill J.H.** Phospholipase A<sub>2</sub> expression in tumours: a target for therapeutic intervention? *Drug Discov. Today* 2003; 8:710-6.
63. **Mannello F., Qin W., Zhu W., Fabbri L., Tonti G.A., Sauter E.R.** Nipple aspirate fluids from women with breast cancer contain increased levels of group IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008; 111:209-18.
64. **Hallstrand T.S., Chi E.Y., Singer A.G., Gelb M.H., Henderson W.R., Jr.** Secreted phospholipase A<sub>2</sub> group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 176:1072-8.
65. **Morioka Y., Ikeda M., Saiga A., Fujii N., Ishimoto Y., Arita H., Hanasaki K.** Potential role of group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> in cyclooxygenase-2-dependent PGE<sub>2</sub> formation during colon tumorigenesis. *FEBS Lett.* 2000; 487:262-6.
66. **Surrel F., Jemel I., Boilard E., Bollinger J.G., Payre C., Mounier C.M., Talvinen K.A., Laine V.J., Nevalainen T.J., Gelb M.H.,**

- Lambeau G.** Group X Phospholipase A<sub>2</sub> stimulates the proliferation of colon cancer cells by producing various lipid mediators. *Mol. Pharmacol.* 2009;doi:10.1124/mol.108.053371 (Epub ahead of print).
67. **Granata F., Balestrieri B., Petraroli A., Giannattasio G., Marone G., Triggiani M.** Secretory phospholipases A<sub>2</sub> as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 131:153-63.
68. **Murakami M., Hara N., Kudo I., Inoue K.** Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Immunol.* 1993; 151:5675-84.
69. **Silliman C.C., Moore E.E., Zallen G., Gonzalez R., Johnson J.L., Elzi D.J., Meng X., Hanasaki K., Ishizaki J., Arita H., Ao L., England K.M., Banerjee A.** Presence of the M-type sPLA<sub>2</sub> receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002; 283:C1102-13.
70. **Triggiani M., Granata F., Balestrieri B., Petraroli A., Scalia G., Del Vecchio L., Marone G.** Secretory phospholipases A<sub>2</sub> activate selective functions in human eosinophils. *J. Immunol.* 2003; 170:3279-88.
71. **Triggiani M., Granata F., Oriente A., De Marino V., Gentile M., Calabrese C., Palumbo C., Marone G.** Secretory phospholipases A<sub>2</sub>



induce  $\beta$ -glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J. Immunol.* 2000; 164:4908-15.

72. **Hernandez M., Fuentes L., Fernandez Aviles F.J., Crespo M.S., Nieto M.L.** Secretory phospholipase A<sub>2</sub> elicits proinflammatory changes and upregulates the surface expression of fas ligand in monocytic cells: potential relevance for atherogenesis. *Circ. Res.* 2002; 90:38-45.
73. **Perrin-Cocon L., Agaugue S., Coutant F., Masurel A., Bezzine S., Lambeau G., Andre P., Lotteau V.** Secretory phospholipase A<sub>2</sub> induces dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34:2293-302.
74. **Ramoner R., Putz T., Gander H., Rahm A., Bartsch G., Schaber C., Thurnher M.** Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Blood* 2005; 105:3583-7.
75. **Takasaki J., Kawauchi Y., Yasunaga T., Masuho Y.** Human type II phospholipase A<sub>2</sub>-induced Mac-1 expression on human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 60:174-80.
76. **Gambero A., Landucci E.C., Toyama M.H., Marangoni S., Giglio J.R., Nader H.B., Dietrich C.P., De Nucci G., Antunes E.** Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A<sub>2</sub>: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 63:65-72.

77. **Rizzo M.T., Nguyen E., Aldo-Benson M., Lambeau G.** Secreted phospholipases A<sub>2</sub> induces vascular endothelial cell migration. *Blood* 2000; 96:3809-15.
78. **Sundell I.B., Aziz K.A., Zuzel M., Theakston R.D.** The role of phospholipases A<sub>2</sub> in the stimulation of neutrophil motility by cobra venoms. *Toxicon* 2003; 41:459-68.
79. **Triggiani M., Granata F., Oriente A., Gentile M., Petraroli A., Balestrieri B., Marone G.** Secretory phospholipases A<sub>2</sub> induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32:67-76.
80. **Beck G., Yard B.A., Schulte J., Haak M., van Ackern K., van der Woude F.J., Kaszkin M.** Secreted phospholipases A<sub>2</sub> induce the expression of chemokines in microvascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 300:731-7.
81. **Jo E.J., Lee H.Y., Lee Y.N., Kim J.I., Kang H.K., Park D.W., Baek S.H., Kwak J.Y., Bae Y.S.** Group IB secretory phospholipase A<sub>2</sub> stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF-kappaB in human neutrophils. *J. Immunol.* 2004; 173:6433-9.
82. **Baek S.H., Kwon T.K., Lim J.H., Lee Y.J., Chang H.W., Lee S.J., Kim J.H., Kwun K.B.** Secretory phospholipase A<sub>2</sub>-potentiated inducible

nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 2000; 164:6359-65.

83. **Baek S.H., Lim J.H., Park D.W., Kim S.Y., Lee Y.H., Kim J.R., Kim J.H.** Group IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub> stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF-kB in macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31:2709-17.
84. **Park D.W., Kim J.R., Kim S.Y., Sonn J.K., Bang O.S., Kang S.S., Kim J.H., Baek S.H.** Akt as a mediator of secretory phospholipase A<sub>2</sub> receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.* 2003; 170:2093-9.
85. **Bomalaski J.S., Lawton P., Browning J.L.** Human extracellular recombinant phospholipase A<sub>2</sub> induces an inflammatory response in rabbit joints. *J. Immunol.* 1991; 146:3904-10.
86. **Mounier C.M., Luchetta P., Lecut C., Koduri R.S., Faure G., Lambeau G., Valentin E., Singer A., Ghomashchi F., Beguin S., Gelb M.H., Bon C.** Basic residues of human group IIA phospholipase A<sub>2</sub> are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition comparison with other mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267:4960-9.

87. **Pruzanski W., Vadas P., Fornasier V.** Inflammatory effect of intradermal administration of soluble phospholipase A<sub>2</sub> in rabbits. *J. Invest. Dermatol.* 1986; 86:380-3.
88. **Rouault M., Rash L.D., Escoubas P., Boilard E., Bollinger J., Lomonte B., Maurin T., Guillaume C., Canaan S., Deregnaucourt C., Schrevel J., Doglio A. Gutierrez J.M., Lazdunski M., Gelb M.H. Lambeau G.** Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A<sub>2</sub> OS<sub>2</sub>: the N-terminal region is more important than enzymatic activity. *Biochemistry* 2006; 45:5800-16.
89. **Singer A.G., Ghomashchi F., Le Calvez C., Bollinger J., Bezzine S., Rouault M., Sadilek M., Nguyen E., Lazdunski M., Lambeau G., Gelb M.H.** Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:48535-49.
90. **Triggiani M., Granata F., Giannattasio G., Marone G.** Secretory phospholipases A<sub>2</sub> in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116:1000-6.
91. **Valentin E., Lambeau G.** Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1488:59-70.

92. **Murakami M., Kambe T., Shimbara S., Yamamoto S., Kuwata H., Kudo I.** Functional association of type IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub> with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:29927-36.
93. **Sartipy P., Bondjers G., Hurt-Camejo E.** Phospholipase A<sub>2</sub> type II binds to extracellular matrix biglycan: modulation of its activity on LDL by colocalization in glycosaminoglycan matrixes. *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.* 1998; 18:1934-41.
94. **Sartipy P., Johansen B., Gasvik K., Hurt-Camejo E.** Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A<sub>2</sub> and decorin in human atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* 2000; 86:707-14.
95. **Lambeau G., Lazdunski M.** Receptors for a growing family of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999; 20:162-70.
96. **Ancian P., Lambeau G., Mattei M.G., Lazdunski M.** The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A<sub>2</sub>. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:8963-70.

97. **Higashino K., Ishizaki J., Kishino J., Ohara O., Arita H.** Structural comparison of phospholipase-A<sub>2</sub>-binding regions in phospholipase-A<sub>2</sub> receptors from various mammals. *Eur. J. Biochem.* 1994; 225:375-82.
98. **Seeds M.C., Jones K.A., Duncan Hite R., Willingham M.C., Borgerink H.M., Woodruff R.D., Bowton D.L., Bass D.A.** Cell-specific expression of group X and group V secretory phospholipases A<sub>2</sub> in human lung airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2000; 23:37-44.
99. **Yokota Y., Higashino K., Nakano K., Arita H., Hanasaki K.** Identification of group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> as a natural ligand for mouse phospholipase A<sub>2</sub> receptor. *FEBS Lett.* 2000; 478:187-91.
100. **Triggiani M., Granata F., Frattini A., Marone G.** Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1761:1289-300.
101. **Dennis E.A.** Phospholipase A<sub>2</sub> in eicosanoid generation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161:S32-5.
102. **Granata F., Frattini A., Loffredo S., Del Prete A., Sozzani S., Marone G., Triggiani M.** Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A<sub>2</sub> in human lung macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:1938-50.

103. **Granata F., Petraroli A., Boilard E., Bezzine S., Bollinger J., Del Vecchio L., Gelb M.H., Lambeau G., Marone G., Triggiani M.** Activation of cytokine production by secreted phospholipases A<sub>2</sub> in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J. Immunol.* 2005; 174:464-74.
104. **Saegusa J., Akakura N., Wu C.Y., Hoogland C., Ma Z., Lam K.S., Liu F.T., Takada Y.K., Takada Y.** Pro-inflammatory secretory phospholipase A<sub>2</sub> type IIA binds to integrins  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 4\beta 1$  and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:26107-15.
105. **Triggiani M., Granata F., Petraroli A., Loffredo S., Frattini A., Staiano R.I., Monaco G., Marone G.** Inhibition of Secretory Phospholipase A<sub>2</sub>-Induced Cytokine Production in Human Lung Macrophages by Budesonide. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2009; 150:144-55.
106. **Ribatti D., Polimeno G., Vacca A., Marzullo A., Crivellato E., Nico B., Lucarelli G., Dammacco F.** Correlation of bone marrow angiogenesis and mast cells with tryptase activity in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2002; 16:1680-4.
107. **Ruohola J.K., Valve E.M., Karkkainen M.J., Joukov V., Alitalo K., Harkonen P.L.** Vascular endothelial growth factors are differentially

regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells.  
*Mol. Cell Endocrinol.* 1999; 149:29-40.

108. **Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K.** Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J.* 1997; 16:3898-911.
109. **Stacker S.A., Stenvers K., Caesar C., Vitali A., Domagala T., Nice E., Roufail S., Simpson R.J., Moritz R., Karpanen T., Alitalo K., Achen M.G.** Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:32127-36.
110. **Iwata C. Kano M.R., Komuro A., Oka M., Kiyono K., Johansson E., Morishita Y., Yashiro M., Hirakawa K., Kaminishi M., Miyazono K.** Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis. *Cancer Res.* 2007; 67:10181-9.
111. **Malaguarnera L., Imbesi R., Di Rosa M., Scuto A., Castrogiovanni P., Messina A., Sanfilippo S.** Action of prolactin, IFN-gamma, TNF-alpha and LPS on heme oxygenase-1 expression and VEGF release in human monocytes/macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2005; 5:1458-69.



112. **Ohsaka A., Hirota-Komatsu S., Shibata M., Ezaki J., Shinohara F., Yoshida T.** Specific association of increased vascular endothelial growth factor expression and its receptors with macrophage differentiation of HL-60 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 368:543-9.
113. **Beck S., Lambeau G., Scholz-Pedretti K., Gelb M.H., Janssen M.J., Edwards S.H., Wilton D.C., Pfeilschifter J., Kaszkin M.** Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA<sub>2</sub> and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:29799-812.
114. **Janssen M.J., van de Wiel W.A., Beiboer S.H., van Kampen M.D., Verheij H.M., Slotboom A.J., Egmond M.R.** Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein. Eng.* 1999; 12:497-503.
115. **Boilard E., Rouault M., Surrel F., Le Calvez C., Bezzine S., Singer A., Gelb M.H., Lambeau G.** Secreted phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor. *Biochemistry* 2006; 45:13203-18.

116. **Oslund R.C., Cermak N., Gelb M.H.** Highly specific and broadly potent inhibitors of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *J. Med. Chem.* 2008; 51:4708-14.
117. **Hasko G., Linden J., Cronstein B., Pacher P.** Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2008; 7:759-70.
118. **Caruso M., Holgate S.T., Polosa R.** Adenosine signalling in airways. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; 6:251-6.
119. **Spychala J.** Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* 2000; 87:161-73.
120. **Burke B., Lewis C.E.** The macrophage. 2nd ed. New York: *Oxford University Press*; 2002.
121. **Barnes P.J.** Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *Copd* 2004; 1:59-70.
122. **Kerjaschki D.** The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:2316-9.
123. **Nakano T., Nakashima Y., Yonemitsu Y., Sumiyoshi S., Chen Y.X., Akishima Y., Ishii T., Iida M., Sueishi K.** Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the

- atherosclerotic intima of human coronary arteries. *Hum. Pathol.* 2005; 36:330-40.
124. **Rutanen J., Leppanen P., Tuomisto T.T., Rissanen T.T., Hiltunen M.O., Vajanto I., Niemi M., Hakkinen T., Karkola K., Stacker S.A., Achen M.G., Alitalo K., Yla-Herttuala S.** Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59:971-9.
125. **Schoppmann S.F., Birner P., Stockl J., Kalt R., Ullrich R., Caucig C., Kriehuber E., Nagy K., Alitalo K., Kerjaschki D.** Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2002; 161:947-56.
126. **Barbera-Guillem E., Nyhus J.K., Wolford C.C., Friece C.R., Sampsel J.W.** Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer. Res.* 2002; 62:7042-9.
- 127 **Lambeau G., Gelb M.H.** Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Annu. Rev. Biochem.* 2008; 77:495-520.

128. **Burke J.E., Dennis E.A.** Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid. Res.* 2009; 50 Suppl:S237-42.
129. **Chen W., Li L., Zhu J., Liu J., Soria J., Soria C., Yedgar S.** Control of angiogenesis by inhibitor of phospholipase A<sub>2</sub>. *Chin. Med. Sci. J.* 2004; 19:6-12.
130. **Granata F., Nardicchi V., Loffredo S., Frattini A., Staiano R.I., Agostini C., Triggiani M.** Secreted phospholipases A<sub>2</sub>: a proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung. *Immunobiology* 2009:Epub ahead of print (doi:10.1016/j.imbio.2009.06.006).
131. **Henderson W.R., Jr., Chi E.Y., Bollinger J.G., Tien Y.T., Ye X., Castelli L., Rubtsov Y.P., Singer A.G., Chiang G.K., Nevalainen T., Rudensky A.Y., Gelb M.H.** Importance of group X-secreted phospholipase A<sub>2</sub> in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 2007; 204:865-77.
132. **Pinhal-Enfield G., Ramanathan M., Hasko G., Vogel S.N., Salzman A.L., Boons G.J., Leibovich S.J.** An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Am. J. Pathol.* 2003; 163:711-21.

133. **Harris A.L.** Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:38-47.
134. **Decking U.K., Schlieper G., Kroll K., Schrader J.** Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ. Res.* 1997; 81:154-64.
135. **Leibovich S.J., Chen J.F., Pinhal-Enfield G., Belem P.C., Elson G., Rosania A., Ramanathan M., Montesinos C., Jacobson M., Schwarzschild M.A., Fink J.S., Cronstein B.** Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine  $A_{2A}$  receptor agonists and endotoxin. *Am. J. Pathol.* 2002; 160:2231-44.

## LEGENDA DELLE FIGURE

### **Figura 1: Espressione delle differenti forme di VEGF nei macrofagi umani**

Le cellule sono state lisate e l'RNA totale è stato estratto. 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto ed amplificato con 40 cicli di PCR utilizzando primers specifici per VEGF-A (isoforme 189, 165, e 121), VEGF-B (isoforme 186, e 167), VEGF-C, VEGF-D e GAPDH come gene *housekeeping* (vedi Tabella II). 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 3 esperimenti nei quali sono stati ottenuti risultati sovrapponibili.

### **Figura 2: Espressione delle proteine VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D nei macrofagi umani**

Estratti proteici equivalenti (40 µg per campione) di HLM sono stati sottoposti ad immunoblotting con anticorpi anti-VEGF-A<sub>165</sub> (gel I) e anti-VEGF-A<sub>189</sub> (gel II), anti-PlGF (gel III), anti-VEGF-B (gel IV), anti-VEGF-C (gel V), e anti-VEGF-D (gel VI). La proteina ricombinante umana rhVEGF-A<sub>165</sub>, le cellule MCF-7 (esprimenti VEGF-B), EBNA

(esperimenti PlGF) e le cellule Raw 264.7 (esperimenti 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.

**Figure 3 e 4: Le sPLA<sub>2</sub> inducono la secrezione di VEGF-A, VEGF-C dai HLM**

I macrofagi sono stati incubati (37°C, 24 h) con RPMI (Controllo) o con hGIIA, hGX, o LPS. Al termine dell'incubazione la secrezione di VEGF-A (Figura 3) e di VEGF-C (Figura 4) è stata valutata mediante ELISA. I dati sono la media  $\pm$  ES di 4 esperimenti.

\*p<0,05 vs. controllo

**Figura 5: Espressione di VEGF-A nei soprannatanti di cellule stimulate con hGX**

I macrofagi sono stati incubati (37°C, 24 h) con RPMI (Controllo) o con hGX (3  $\mu$ g/ml). Alla fine dell'incubazione i soprannatanti sono stati recuperati, concentrate per ultrafiltrazione e gli estratti proteici (40  $\mu$ g per sample) sono stati analizzati mediante western blot usando un anticorpo anti-VEGF-A. rhVEGF-A<sub>165</sub> è stato usato come controllo

positivo. La membrana è stata sottoposta 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.

**Figura 6: Cinetica di secrezione dei VEGF indotta da hGX dai macrofagi umani**

I macrofagi sono stati incubati con RPMI [controllo, (○) e (□)] o con hGX [10 µg/ml, (●) e (■)]. Ad ogni tempo indicato i soprannatanti sono stati centrifugati (800 x g, 4°C, 5 min). Il dosaggio di VEGF-A [(○) e (●)] e di VEGF-C [(□) e (■)] è stato eseguito mediante ELISA. I valori sono espressi come pg/mg di proteine e come media ± ES di tre esperimenti.

\*p<0,05 vs. controllo

**Figura 7: Cinetiche dell'espressione di mRNA per VEGFA<sub>165</sub> e VEGFC in HLM stimolati con hGX**

Il grafico riassume l'analisi in real-time RT-PCR per VEGF-A<sub>165</sub>, e VEGF-C in HLM incubati con hGX (10 µg/ml) per i tempi indicati. L'espressione dell'mRNA per VEGF-A<sub>165</sub> (●), e VEGF-C (○) indotta da hGX è indicata come rapporto dell'intensità di segnale delle bande



rispetto alle cellule non stimolate. I risultati sono stati normalizzati per GAPDH ed espressi come media  $\pm$  ES di tre esperimenti.

\* $p < 0,05$  vs. controllo

**Figura 8: Ruolo dell'attività enzimatica delle sPLA<sub>2</sub> sulla secrezione sulla secrezione di VEGF-A dai macrofagi**

I macrofagi sono stati incubati (37°C, 24 h) con RPMI (controllo), hGIIA e hGX *wild type*, o con i mutanti H48Q di hGIIA e di hGX. Al termine dell'incubazione la secrezione di VEGF-A è stata determinata mediante ELISA. I risultati sono la media  $\pm$  ES di 3 esperimenti.

\* $p < 0,05$  vs. controllo

**Figura 9: Effetto di Me-Indoxam e RO092906A sulla secrezione di VEGF-A indotta da hGX**

hGX (3  $\mu$ g/ml) è stata preincubata (37°C, 15 min) con RPMI, o con Me-Indoxam (●) o RO092906A (○) alle concentrazioni indicate. I macrofagi sono stati successivamente incubati (37°C, 24 h) con hGX (3  $\mu$ g/ml) o con le diverse combinazioni di hGX con Me-Indoxam (●) o RO092906A (○). Al termine dell'incubazione la secrezione di VEGF-A è stata determinata mediante ELISA. L'inibizione della secrezione di VEGF-A è stata rappresentata come per cento della risposta massima calcolata come  $(R - R_b) / (R_{max} - R_b) \times 100$ , dove R rappresenta la secrezione

nei campioni trattati con la combinazione hGX + inibitore,  $R_b$  rappresenta la secrezione nelle cellule non trattate e  $R_{max}$  rappresenta la secrezione nei campioni stimolati con hGX. I dati sono la media  $\pm$  ES di tre esperimenti. La secrezione di VEGF-A indotta da hGX era di  $661 \pm 83$  pg/mg di proteine. Le linee continue e tratteggiate rappresentano la best fit per l'inibizione mediata Me-Indoxam e da RO092906A, rispettivamente.

**Figura 10: Attività angiogenica dei sopranatanti di HLM attivati dalla sPLA<sub>2</sub> nel saggio della CAM**

Le CAM sono state impiantate con spugna di gelatina assorbita con buffer (A, controllo), con sopranatanti degli HLM incubati (24 ore a 37°C) con RPMI (B, non stimolato) Me-Indoxam (C,  $10^{-6}$  M), hGX (3  $\mu$ g/ml, D) o con la combinazione hGX + Me-Indoxam (E). Le CAM sono state esaminate quotidianamente fino al dodicesimo giorno e fotografate *in ovo* con uno stereomicroscopio ed i vasi sanguigni infiltranti le spugne sono stati contati ad un ingrandimento 50x.

Gli esperimenti sono rappresentativi di tre esperimenti. Nel pannello F, i dati sono espressi come numero di vasi formatesi radialmente intorno alla spugna e sono la media  $\pm$  ES di tre esperimenti.

\* $p < 0,05$  vs. controllo

**Figure 11 e 12: Effetto dell'adenosina sulla secrezione di VEGF-A e  
TNF- $\alpha$  indotta da hGX dai macrofagi**

I macrofagi sono stati incubati (37°C, 24 h) con RPMI (controllo), NECA (0,1-10  $\mu$ M), hGX (3  $\mu$ g/ml), o con la combinazione di hGX + NECA. La secrezione di VEGF-A e di TNF- $\alpha$  è stata determinata mediante ELISA. I dati sono la media  $\pm$  ES di tre esperimenti

\*p<0,05 vs. controllo

§p<0,05 vs. hGX

**Tabella I. Classificazione delle Fosfolipasi A<sub>2</sub>**

<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>	<b>Specie</b>	<b>Origine</b>	<b>Classe</b>
I	A	Serpenti	—	Secretoria
	B	Mammiferi	Polmone/rene/pancreas/milza	Secretoria
II	A	Mammiferi/ Serpenti	Polmone/placenta/siero/milza/timo/midollo osseo/sinovia/ condrociti/cheratinociti/piastrine/mastociti/macrofagi	Secretoria
	B	Serpenti	—	Secretoria
	C	Roditori	—	Secretoria
	D	Uomo/Roditori	Organi linfoidi/colon/pancreas/endotelio/ eosinofili/cheratinociti/mastociti	Secretoria
	E	Uomo/Roditori	Cervello/cuore/polmone/placenta/muscolo liscio	Secretoria
	F	Uomo/Roditori	Rene/fegato/placenta/sinovia/testicolo/timo/endotelio	Secretoria
III		Uomo/Roditori	Cuore/rene/fegato/muscolo scheletrico	Secretoria
IV	A/B/C	Mammiferi	La maggior parte delle cellule di mammifero	Citosolica
V		Uomo/Roditori	Polmone/cuore/placenta/epitelio respiratorio/condrociti/ fibroblasti/cheratinociti/macrofagi/neutrofilo	Secretoria
VI	A-1/A-2/B	Mammiferi	La maggior parte delle cellule di mammifero	Citosolica
VII (Acetilidrolasi)		Mammiferi	Plasma/fegato/rene/macrofagi	Secretoria
VIII	A/B	Uomo	Cervello	Citosolica
IX		Lumaca marina	—	Secretoria
X		Uomo/Topo	Intestino/polmone/milza/timo/epitelio e endotelio respiratorio/macrofagi/ cheratinociti/neutrofilo	Secretoria
XI	A/B	Piante	—	Secretoria
XII	A	Uomo/Topo	Cuore/cervello/intestino/rene/fegato/polmone/ pancreas/placenta/muscolo scheletrico	Secretoria
	B	Uomo	Intestino/rene/fegato	Secretoria

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

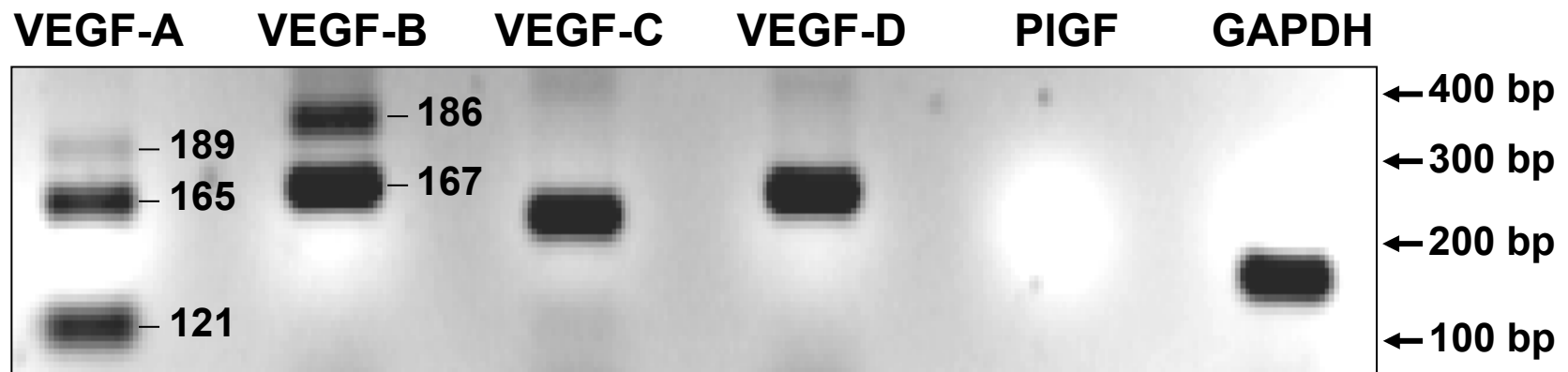
Target	Lunghezza del prodotto (bp)	Temperatura di annealing (°C)	Primer (5'-3')	Genbank Accession N° o Referenza
<b>PIGF</b> (RT-PCR)	440 (Is1)	51°C	Forward GAGGCTGTTCCCTTGCTTC	NM_002632
	516 (Is2)		Reverse GGTTACCTCCGGGGAACAG	
<b>VEGF-A</b> (RT-PCR)	225 (Is <sub>121</sub> )	51°C	Forward TCTTCAAGCCATCCTGTGTG	NM_003376
	297 (Is <sub>145</sub> )		Reverse GCCTCGGCTTGTCACATC	
	357 (Is <sub>165</sub> )			
	429 (Is <sub>189-206</sub> )			
<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> )	59°C	Forward TGTCCCTGGAAGAACACAGCC	NM_003377
	336 (Is <sub>186</sub> )		Reverse GCCATGTGTCACCTTCGCA	
<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 ATGTTTTTCCTCGGATGCTGGA Reverse CATTGGCTGGGGAAGAGTTT	NM_005429
<b>VEGF-D</b> (qRT-PCR)	226	52°C	Forward GTATGGACTCTCGCTCAGCAT Reverse AGGCTCTCTTCATTGCAACAG	NM_004469
<b>GAPDH</b> (qRT-PCR)	141	55°C	Forward GTCCACTGGCGTCTTCAC Reverse CTTGAGGCTGTTGTCATACTTC	Granata 2006

**Tabella III. Effetto di Inibitori Metabolici sulla Secrezione di VEGF-A e di VEGF-C dai Macrofagi Umani**

	<b>VEGF-A (pg/mg di proteine)</b>	<b>VEGF-C (pg/mg di proteine)</b>
Vehicle + hGX	650 ± 128	516 ± 79
Actinomicina D + hGX	74 ± 18*	53 ± 23*
Cicloesimide + hGX	70 ± 13*	56 ± 18*
Brefeldina A + hGX	64 ± 15*	45 ± 19*

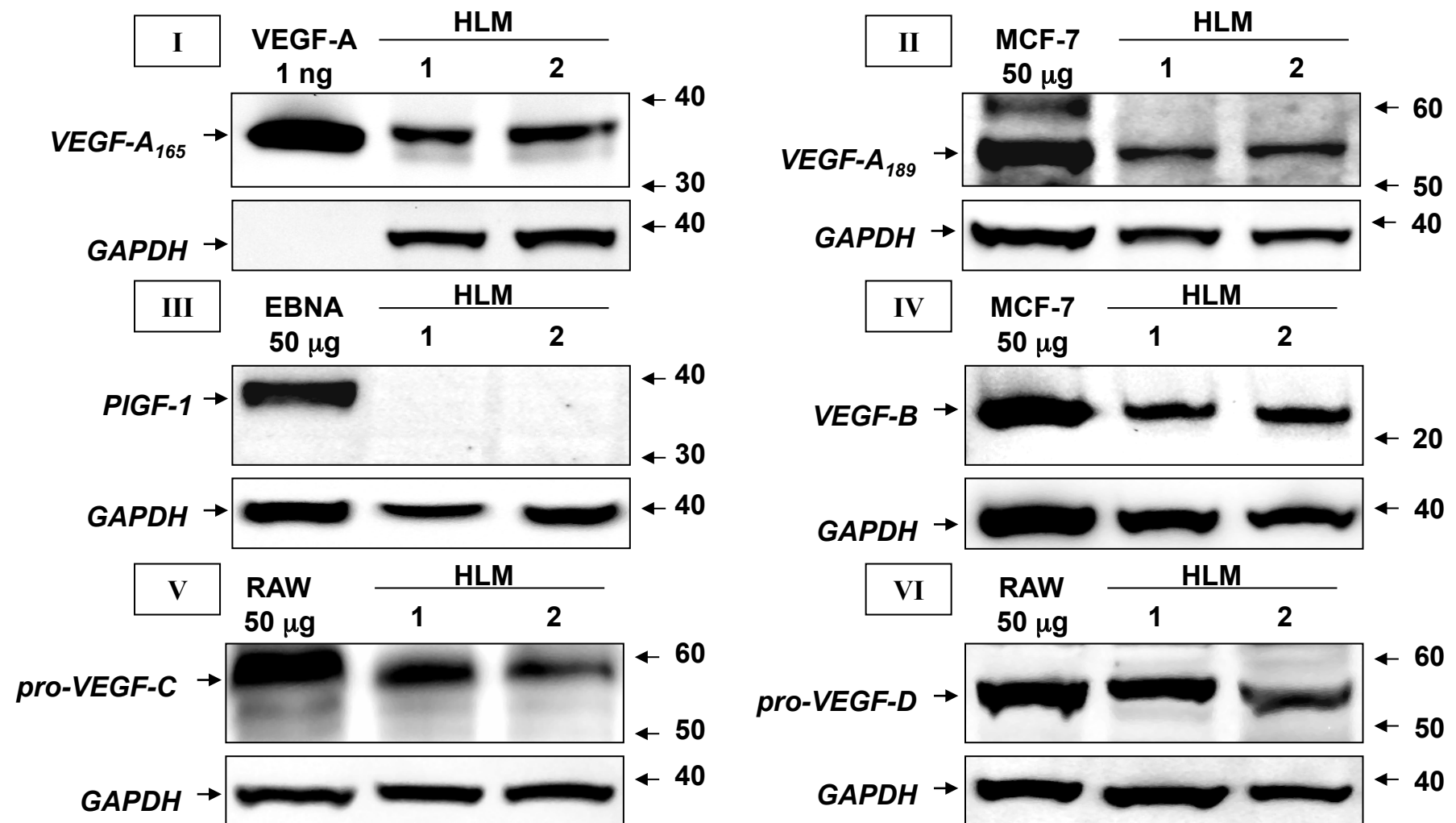
I macrofagi sono stati preincubati (37°C, 30 min) con RPMI, actinomicina D (1 µg/ml), cicloesimide (10 µg/ml), o brefeldina A (10 µg/ml) e successivamente stimulate (37°C, 24 h) con hGX (3 µg/ml). La secrezione di VEGF-A e di VEGF-C è stata determinata nei soprannatanti mediante ELISA e normalizzata per il contenuto totale di proteine. I dati sono la media ± ES di tre esperimenti

\*p<0,05 vs. Vehicle + hGX.



---

**Figura 1: Espressione delle differenti forme di VEGF nei macrofagi umani**



**Figura 2: Espressione delle proteine VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D nei macrofagi umani**



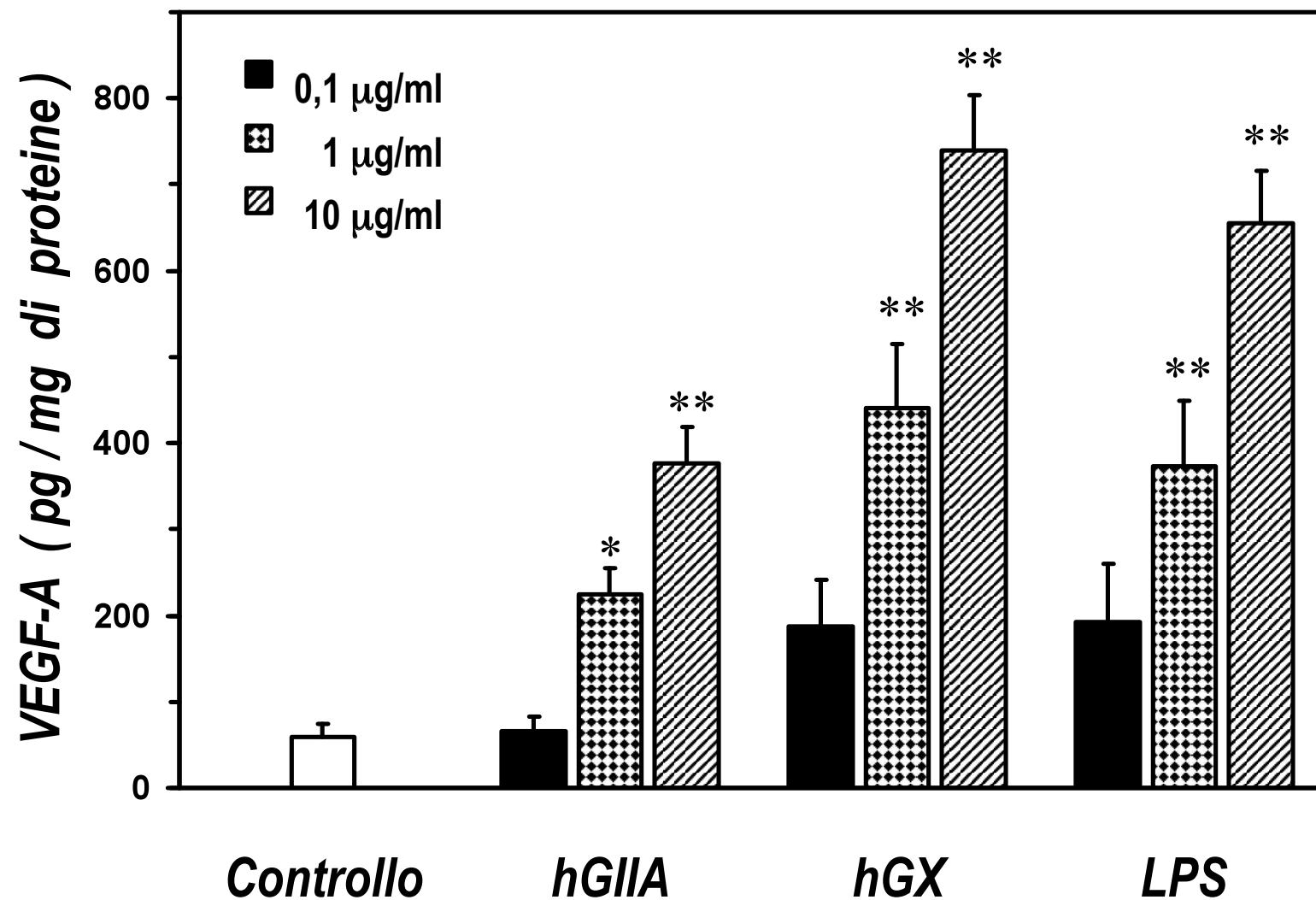


Figura 3: Le sPLA<sub>2</sub> inducono la secrezione di VEGF-A dai macrofagi umani

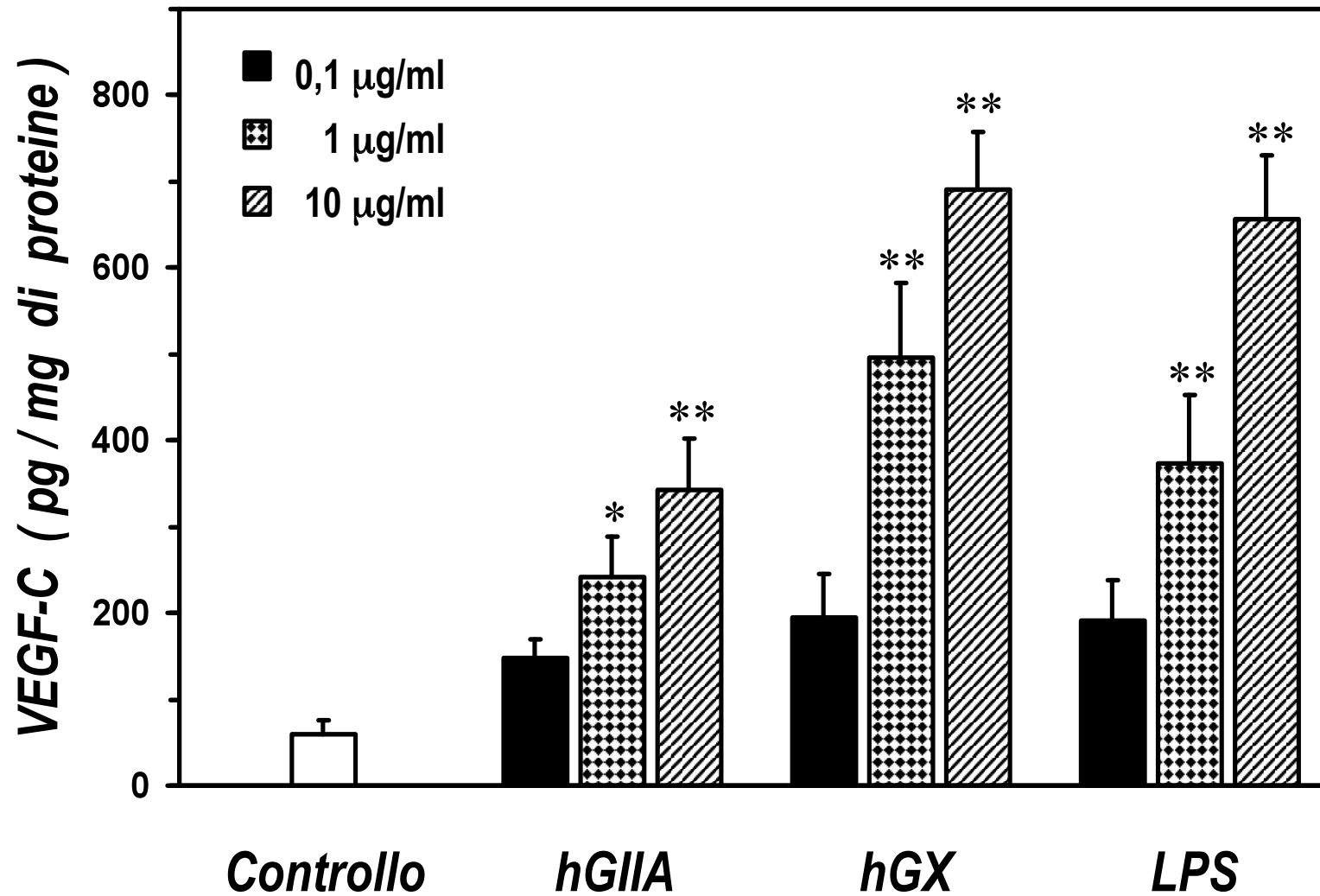
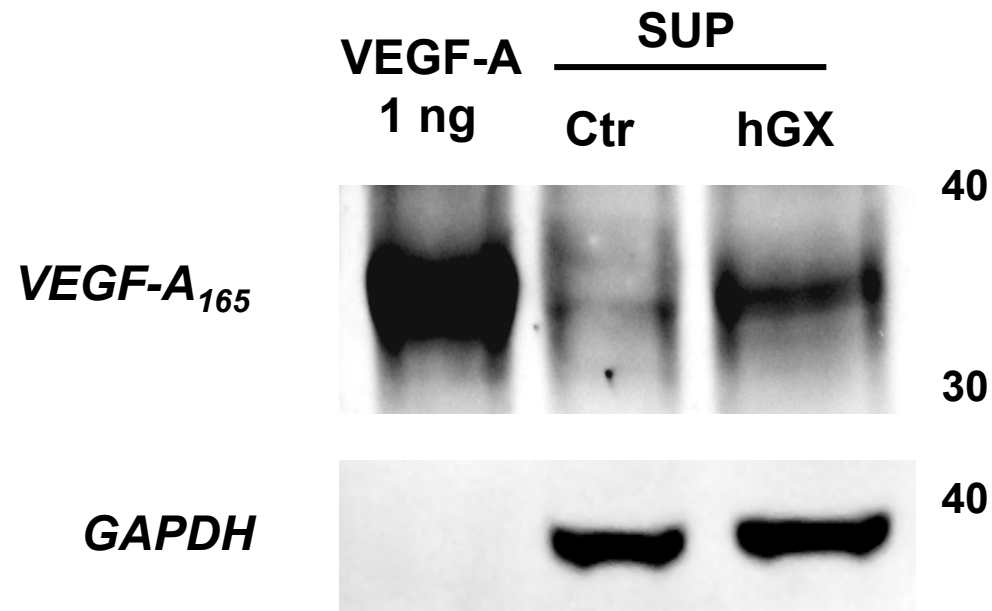


Figura 4: Le sPLA<sub>2</sub> inducono la secrezione di VEGF-C dai macrofagi umani



---

**Figura 5: Espressione del VEGF-A nei sopranatanti di cellule stimulate con hGX**

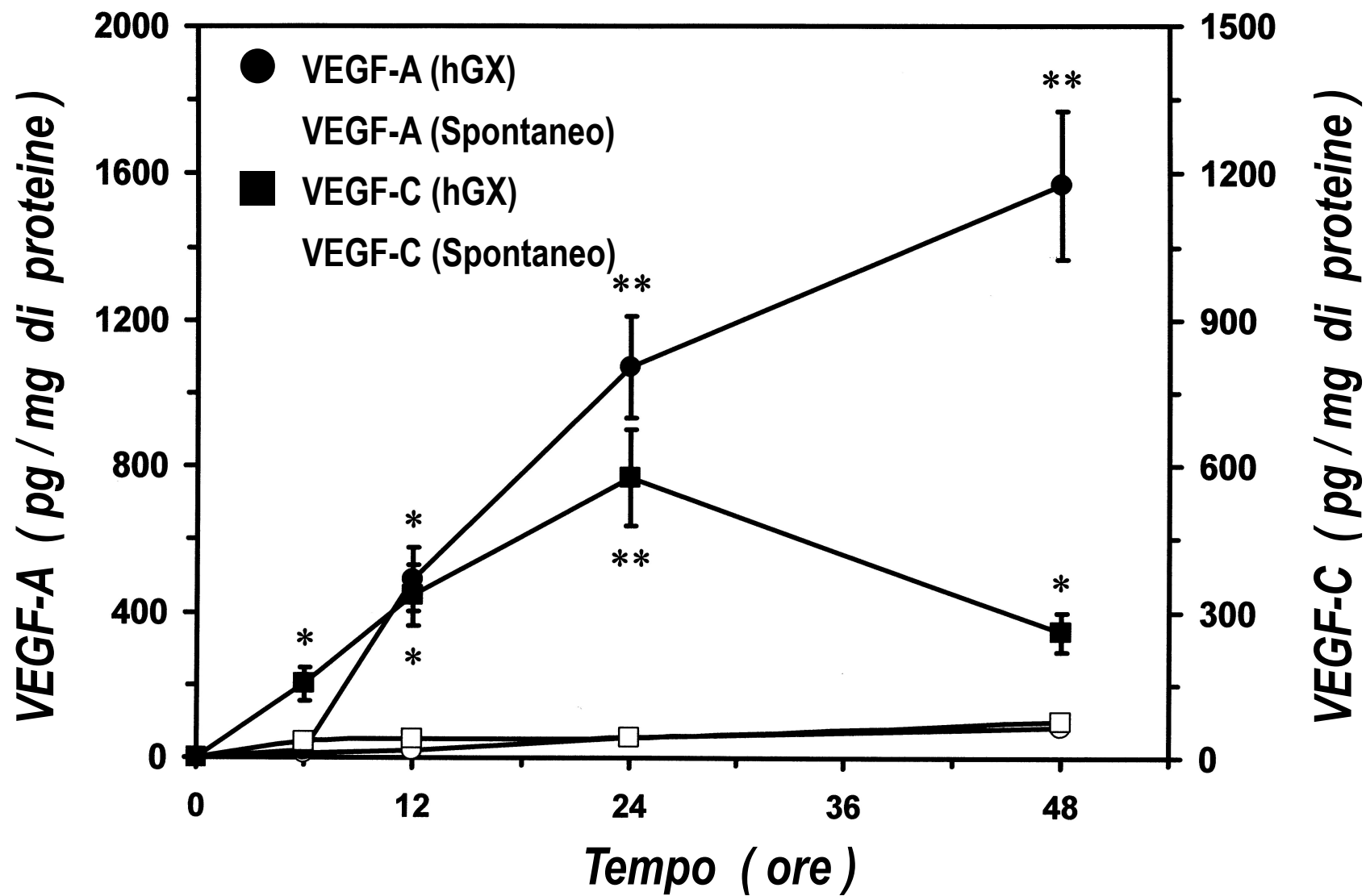


Figura 6: Cinetica di secrezione dei VEGF indotta dalla hGX dai macrofagi umani

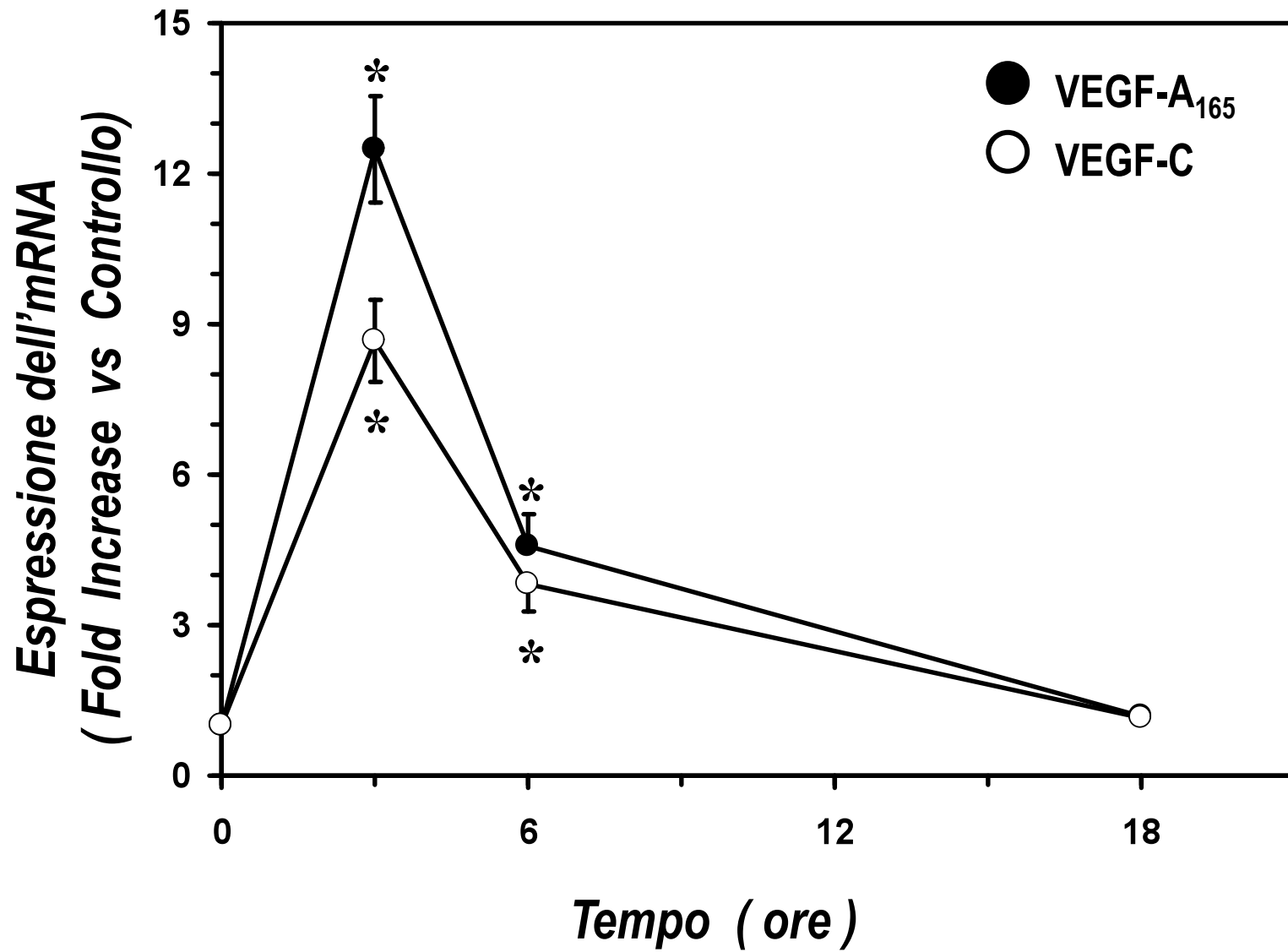
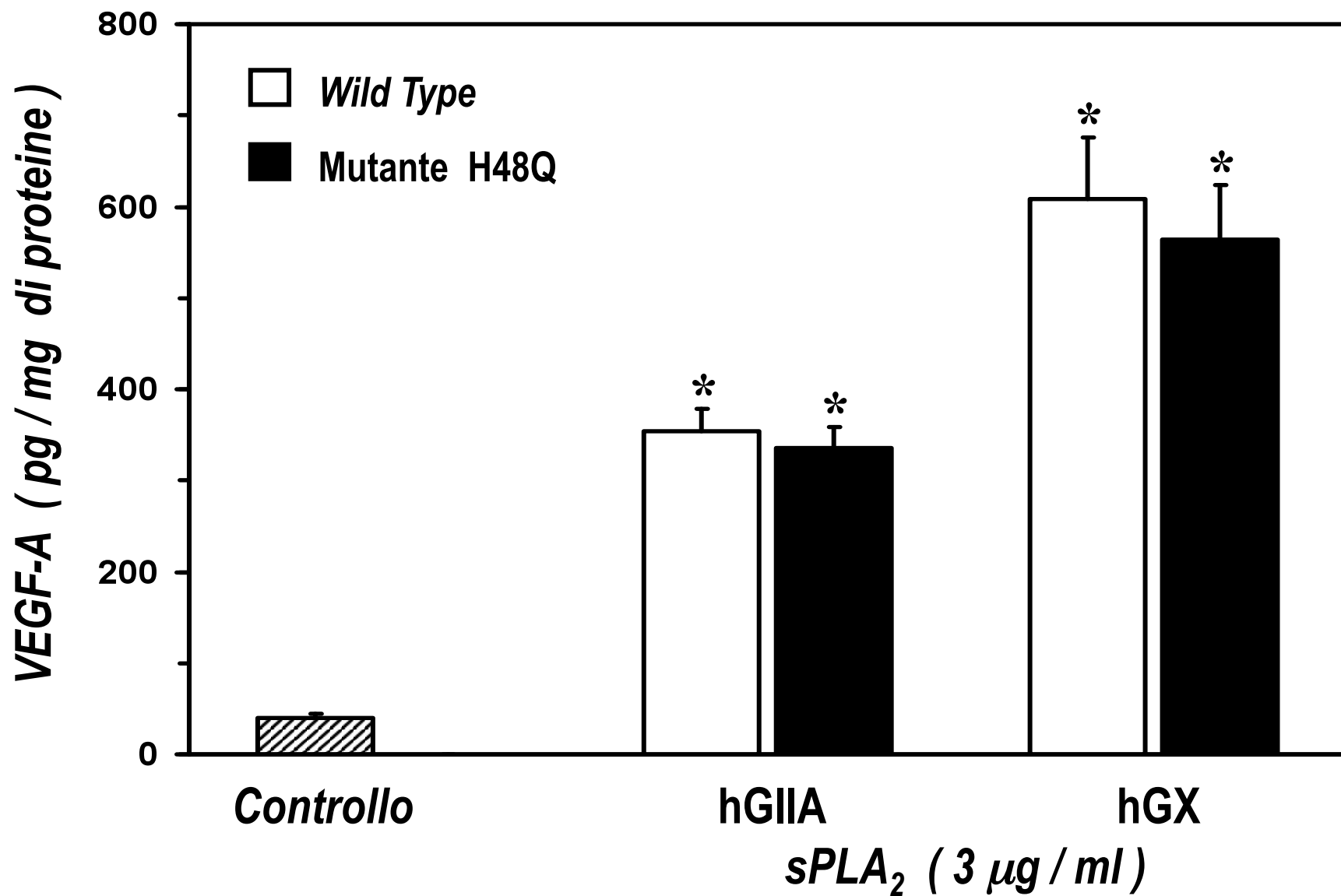


Figura 7: Cinetiche dell'espressione di mRNA per VEGFA165 e VEGFC nei macrofagi stimolati con hGX



**Figura 8: Ruolo dell'attività enzimatica delle sPLA<sub>2</sub> sulla secrezione di VEGF-A dai macrofagi**

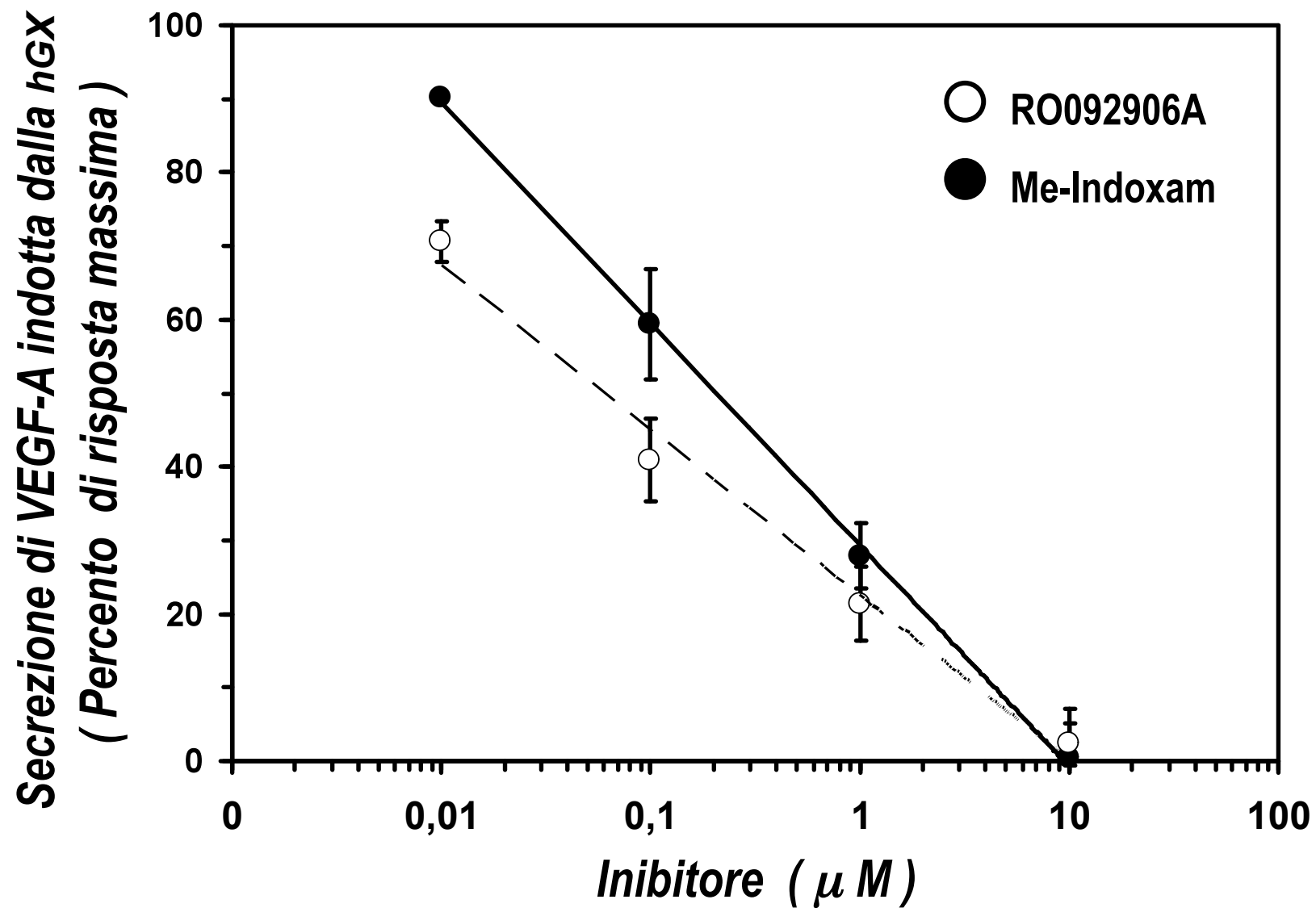
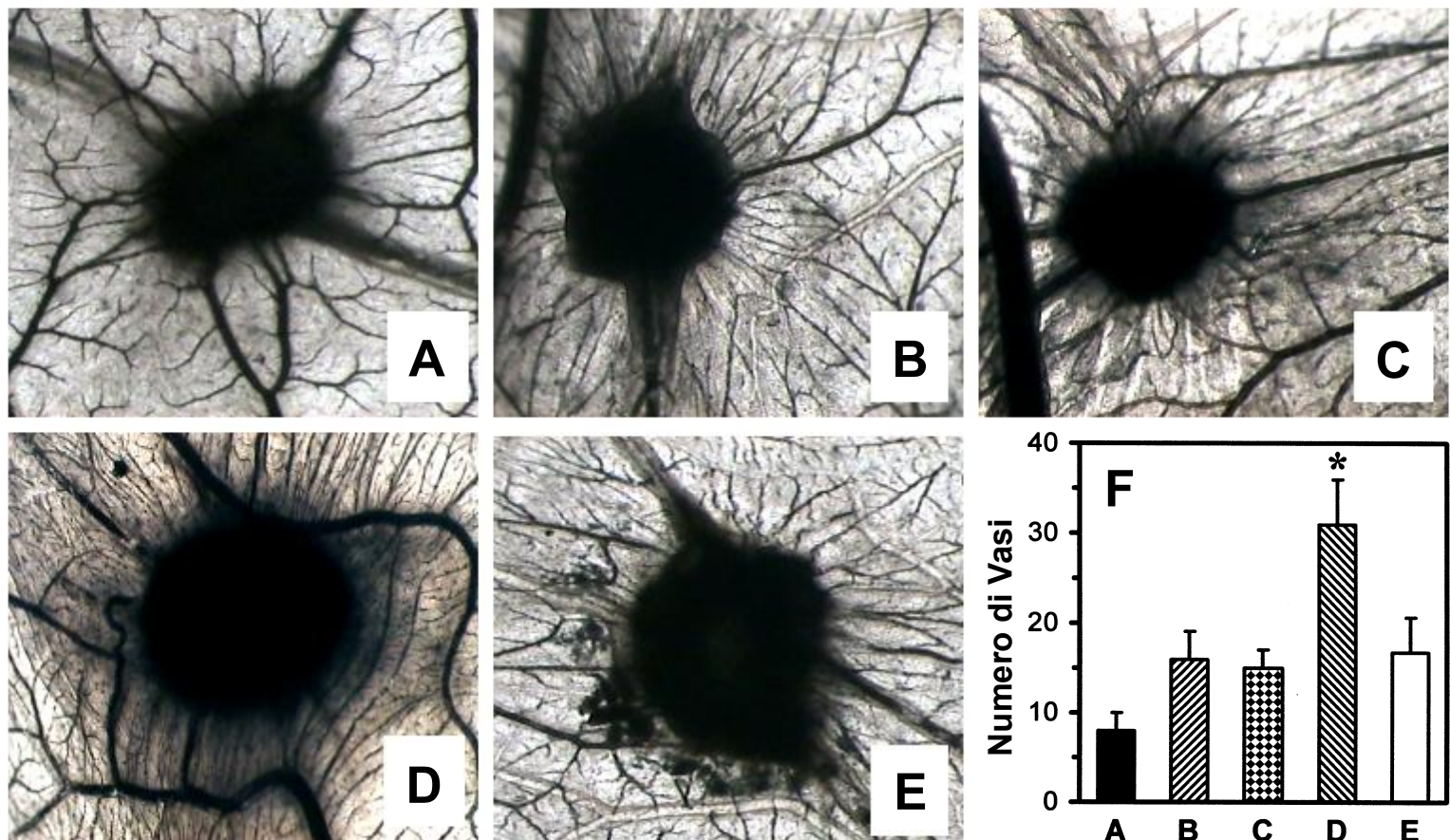


Figura 9: Effetto di Me-Indoxam e RO092906A sulla secrezione di VEGF-A indotta dalla hGX



**Figura 10: Attività angiogenica dei sopranatanti di macrofagi attivati dalla sPLA<sub>2</sub> nel saggio della CAM**



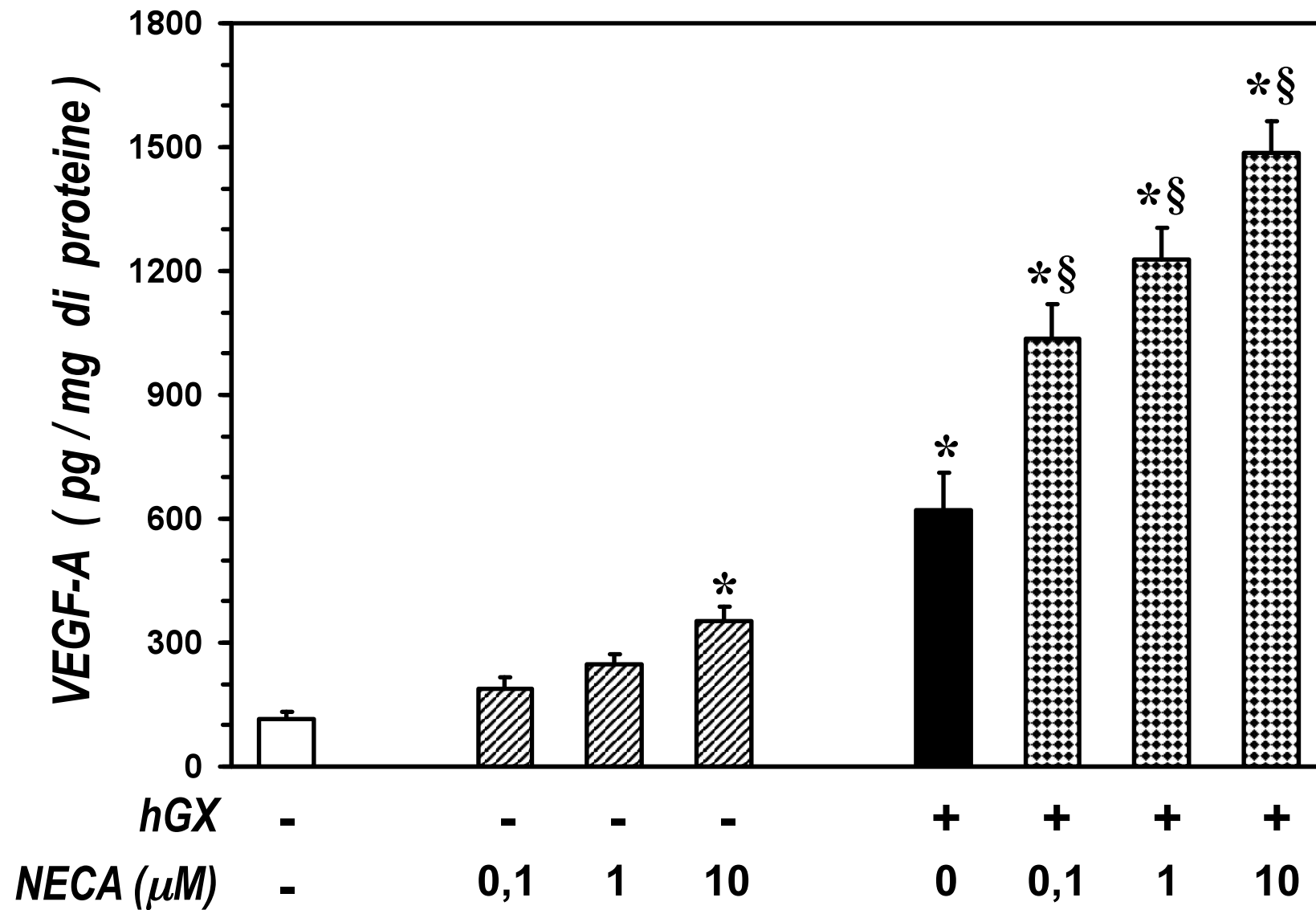


Figura 11: Effetto dell'adenosina sulla secrezione di VEGF-A indotta dalla hGX dai macrofagi

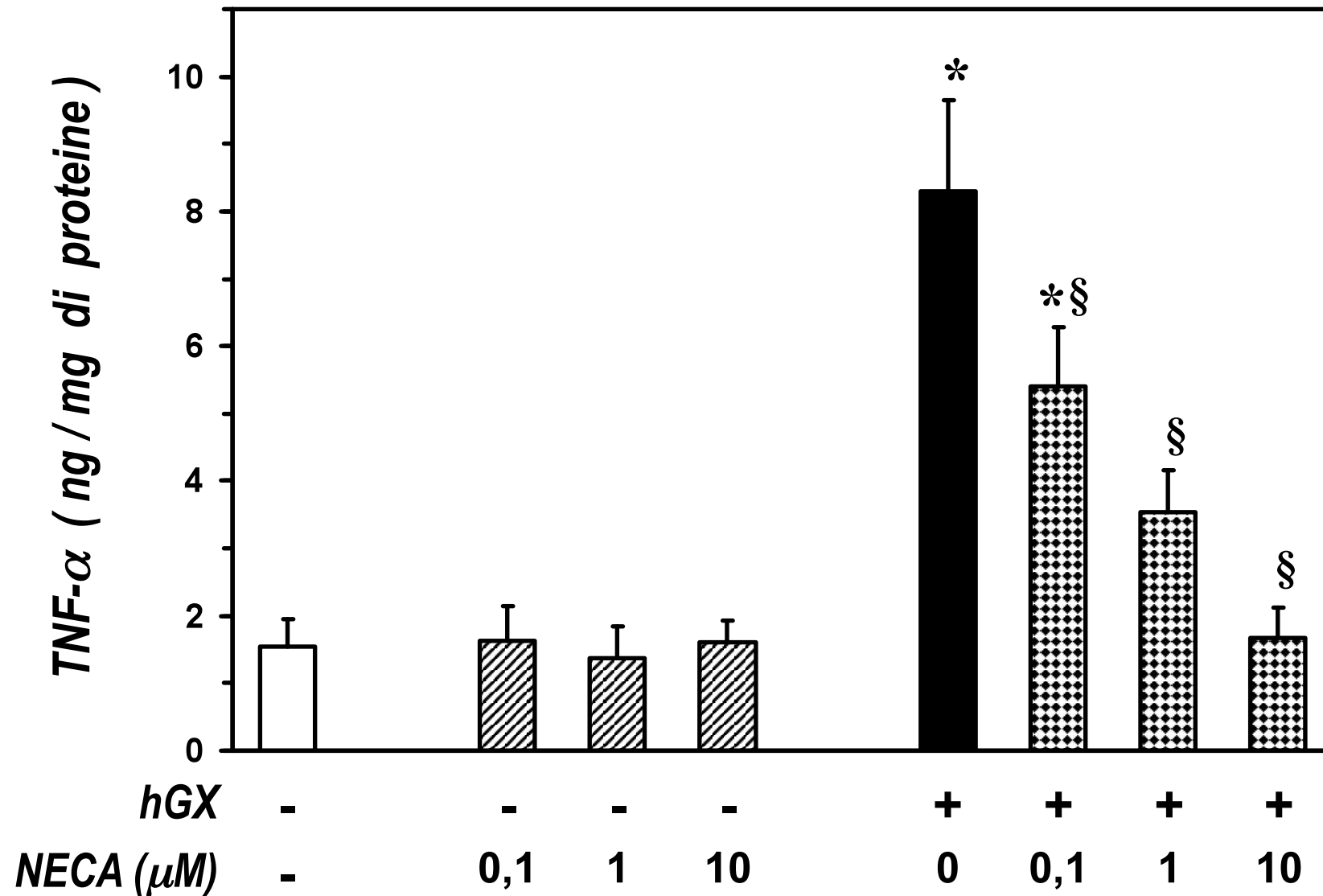


Figura 12: Effetto dell'adenosina sulla secrezione di TNF- $\alpha$  indotta dalla hGX dai macrofagi