



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACOLOGICHE
INDIRIZZO IN
FARMACOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE
XXIII CICLO**

TESI DI DOTTORATO

**ATTIVITÀ PRO-ANGIOGENICA DI
UROTENSINA-II SU CELLULE ENDOTELIALI
VASCOLARI UMANE**

Direttore della Scuola: CH.MA PROF.SSA ROSA MARIA GAION
Coordinatore d'indirizzo: CH.MO PROF. PIETRO GIUSTI
Supervisore: CH.MO PROF. PIETRO GIUSTI
Supervisore esterno: DOTT. DIEGO GUIDOLIN

DOTTORANDA: ELISA SORATO

*Al mio Sig. Smooky,
la tua mancanza è incolmabile.*

- “Se gli animali creano tanti guai, perché li teniamo?”
“Perché ci donano amore incondizionato e fedeltà
e sono sempre pronti a perdonare
le nostre giornate nere e la nostra irritabilità.” -
SHARON DURIVAGE

INDICE

INDICE.....	I
SOMMARIO	III
SUMMARY	V
ABBREVIAZIONI	VII
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	1
1.1 Urotensina-II.....	1
1.1.1 Struttura e sintesi di U-II	1
1.1.2 Struttura recettoriale e trasduzione del segnale	2
1.1.3 Espressione di U-II/UT nel sistema cardiovascolare	5
1.1.4 Attività emodinamica di U-II.....	6
1.1.5 U-II e il rimodellamento vascolare	8
1.2 Angiogenesi	10
1.2.1 Tipi cellulari coinvolti nell'angiogenesi	11
1.2.2 Le fasi dell'angiogenesi	12
1.2.3 Metodi di valutazione dell'angiogenesi	14
1.2.4 La regolazione dell'angiogenesi: lo"switch" angiogenico	16
1.2.4.1 Fattori inibitori dell'angiogenesi	17
1.2.4.2 Stimolatori endogeni classici dell'angiogenesi	17
1.2.4.3 Stimolatori endogeni "non classici" dell'angiogenesi	23
CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI	25
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI.....	27
3.1 Colture di cellule endoteliali in vitro	27
3.1.1 Modello sperimentale	27
3.1.2 Isolamento delle cellule endoteliali	27

3.1.3 Mantenimento delle cellule endoteliali in coltura	28
3.2 Real Time RT-PCR	29
3.3 Immunocitochimica.....	30
3.4 Saggio di angiogenesi in vitro	32
3.5 Saggio di proliferazione cellulare	33
3.6 Saggio di migrazione cellulare	34
3.7 Misura del Ca^{2+} intracellulare	34
3.8 Western Blot.....	35
3.9 Statistica	36
CAPITOLO 4 RISULTATI	39
4.1 Espressione del sistema U-II e azione del peptide	39
4.1.1 Fenotipo e preparazione delle cellule.....	39
4.1.2 Effetti di U-II sull'angiogenesi in vitro.....	41
4.1.3 Effetto di U-II sull'espressione di VEGF e VEGFR.....	44
4.2 Meccanismo d'azione che media l'effetto pro-angiogenico di U-II	45
4.2.1 Effetto sul rilascio del Ca^{2+} intracellulare	45
4.2.2 Vie metaboliche coinvolte nell'effetto pro-angiogenico di U-II.....	46
4.2.3 Espressione di altri fattori pro-angiogenici indotta da U-II	49
CAPITOLO 5 DISCUSSIONE	51
BIBLIOGRAFIA.....	57
PUBBLICAZIONI	77
RINGRAZIAMENTI	

SOMMARIO

Urotensina-II (U-II) è un peptide ciclico, originariamente isolato dall'urofisi del pesce *Gillichthys mirabilis*, la cui isoforma umana (hU-II) è costituita di 11 aminoacidi. hU-II matura è sintetizzata da un precursore più grande, la prepro-U-II, il cui mRNA è stato individuato in vari tessuti. U-II è stata identificata quale ligando endogeno di uno specifico recettore ad alta affinità, il recettore orfano GPR14 che è stato successivamente rinominato UT. L'isoforma umana di UT appartiene alla classe A della superfamiglia di recettori accoppiati alle proteine G (GPCR). Il principale ruolo fisiologico di U-II nei mammiferi si esplica a livello del sistema cardiovascolare, dove il peptide esercita un notevole effetto ipertensivo e vasocostrittore e proprio per questo molti dati suggeriscono che U-II possa essere coinvolta nella regolazione del sistema cardiovascolare in condizioni sia fisiologiche che patologiche. In cellule endoteliali (EC) di origine animale sembra esercitare un chiaro effetto pro-angiogenico, ma pochi dati sperimentali sono attualmente disponibili per chiarire le azioni del peptide sull'endotelio vascolare umano.

In questo lavoro modelli *in vitro* basati sull'uso di cellule endoteliali vascolari umane isolate direttamente da vasi diversi, quali vena safena (HSVEC), vena giugulare (HJVEC), vena ombelicale (HUVEC) e aorta (HAEC), sono stati utilizzati per caratterizzare vari aspetti del profilo pro-angiogenico di U-II.

Analisi di RT-PCR ed immunocitochimica indicano che UT è espresso da tutte le EC umane considerate, mentre l'espressione di U-II risulta eterogenea, infatti il peptide si ritrova solo nelle HUVEC e nelle HAEC. Sottoposte a coltura su Matrigel, tutte le EC analizzate presentano una forte risposta angiogenica al peptide, con conseguente formazione di una rete di strutture capillaro-simili di maggiore densità e complessità rispetto alla situazione di controllo. L'effetto è comparabile a quello indotto da FGF-2 ed è antagonizzato da Palosuran, antagonista specifico di UT, ad indicare che l'attività del peptide è innescata dal legame con il suo recettore funzionale. E' stato interessante notare che nelle EC derivate da vasi adulti questa azione non è associata ad un effetto proliferativo. Al contrario, U-II induce un moderato ma significativo aumento della proliferazione cellulare nelle HUVEC.

Esperimenti condotti in presenza di specifici inibitori di vari step della cascata di segnalazione intracellulare dimostrano che l'auto-organizzazione in strutture capillaro-simili delle EC indotta da U-II è PKC-dipendente e coinvolge l'attivazione del pathway di trasduzione di ERK1/2. Analisi di western blot sulle forme fosforilate di queste

chinasi hanno confermato i dati ottenuti con il Matrigel. Inoltre, l'inibizione farmacologica di PI3K, ostacola la capacità di U-II di indurre un effetto pro-angiogenico nelle HUVEC, indicando che anche il pathway PI3K/Akt potrebbe essere coinvolto nella regolazione del processo.

E' da considerare che alcuni pathway attivati come conseguenza del legame di U-II ad UT, potrebbero essere innescati in diversi modi. Infatti, i GPCR potrebbero anche attivarli indirettamente inducendo la sintesi ed il rilascio di fattori di crescita. A questo proposito, si è messo in evidenza come, dopo 24 ore di stimolazione, U-II induca nelle HUVEC l'espressione di AM, ET-1 e VEGF, tutti fattori con proprietà pro-angiogeniche note. A tempi più lunghi, quindi, U-II potrebbe anche agire indirettamente stimolando nelle HUVEC l'espressione di altri fattori pro-angiogenici.

I risultati di questo lavoro suggeriscono quindi che U-II, oltre a regolare la funzionalità cardiovascolare, potrebbe anche esercitare un'azione diretta sullo sviluppo e il rimodellamento vascolare.

SUMMARY

Urotensin-II (U-II) is a cyclic peptide, originally isolated from the urophysis of the goby *Gillichthys mirabilis*. The human form of U-II (hU-II) is a cyclic undecapeptide. Mature hU-II is synthesized from a large precursor molecule, the prepro-U-II, whose mRNA has been found in many tissues. U-II has been identified as the endogenous ligand of a specific high-affinity receptor, recently identified as the orphan receptor GPR14 which has been renamed urotensin receptor (UT). The human UT isoform belongs to the class A superfamily of G-protein-coupled receptors. The principal physiological role of U-II in mammals is in the cardiovascular system, where it exerts a potent systemic vasoconstrictor and hypertensive effect and several lines of evidence suggested that U-II might be involved in the pathophysiology of the cardiovascular system. On endothelial cells (EC) of animal origin U-II has also been shown to exert a clearcut pro-angiogenic effect, but few experimental data are presently available clarifying the effect of U-II in human endothelium.

Thus, in the present study *in vitro* models based on human vascular endothelial cells directly isolated from different normal human vessels, including saphenous vein (HSVEC), jugular vein (HJVEC), umbilical vein (HUVEC) and aorta (HAEC) have been used to characterize different aspects of the pro-angiogenic profile exhibited by U-II.

RT-PCR and ICC analyses indicated that UT was expressed by all the human EC considered, while the expression of U-II resulted heterogeneous, in fact the peptide was detectable in HAEC and HUVEC only. When tested in the Matrigel assay all the investigated EC exhibited a strong angiogenic response to the peptide, with the formation of a meshwork of capillary-like structures of increased density and complexity when compared to the unstimulated condition. The effect was comparable to that of FGF-2 and was counteracted by Palosuran, a specific antagonist of UT, indicating that they were triggered by the binding of U-II to its receptor. Interestingly, in EC derived from adult vessels this activity was not associated with a proliferogenic effect. On the contrary, U-II induced a moderate but significant increase of cell proliferation in HUVEC.

Experiments performed in the presence of specific inhibitors of various steps of the signaling cascade showed that the U-II induced self organization of the cells in capillary-like structures is PKC dependent and involves the activation of the ERK1/2 transduction pathway. Western blot analyses on the phosphorylated forms of these

kinases provided further support to this finding. Interestingly, the pharmacological inhibition of PI3K, hindered the capacity of U-II to induce a pro-angiogenic effect on HUVEC, indicating that the PI3K/Akt pathway is also involved in regulating the process.

It has also to be observed that some of the signalling pathways activated as a consequence of the binding of U-II to UT can, in principle, be started in several ways. In fact GPCR can also indirectly activate them by inducing the synthesis and release of growth factors. In this respect, the stimulation of HUVEC with U-II for 24 hours, induced AM, ET-1 and VEGF expression, as mRNA and proteins. All these factors are characterized by well known pro-angiogenic properties. Therefore U-II can also act indirectly by stimulating in HUVEC the expression of other pro-angiogenic factors.

Altogether, the results of the present study suggested that U-II, in addition to regulating cardiovascular function, also exerts a direct action on the development and remodelling of the vascular network.

ABBREVIAZIONI

Akt	serine/threonine protein kinase Akt
AM	Adrenomedullin
Ang	Angiopoietin
ANG	Angiotensin
BrdU	BromodeoxyUridine
BSA	Bovin Serum Albumin
CAM	Corio-Allantoic Membrane
CD31 o PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CNS	Central Nervous System
COX	CycloOXygenase
CRLR	Calcitonin Receptor-Like Receptor
DAB	DiAminoBenzidine
DAPI	DiAmidino-2-Phenyl-Indole
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EBM	Endothelial Basal Medium
EC	Endothelial Cells
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extra Cellular Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cells
EPO	Erythropoietin
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ET	Endothelin
ET-R	Endothelin Receptor
FAK	Focal Adesion Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor

GAPDH	GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
GPR14	G-Protein-coupled Receptor 14
hEC	Human Endothelial Cells
HAEC	Human Aorta Endothelial Cells
HGF	Hapatocyte Growth Factor
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HJVEC	Human Jugular Vein Endothelial Cells
HRE	Hypoxia Responsive Element
HSVEC	Human Saphenous Vein Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICC	Immunocytochemistry
IFN	Interferon
IG	Immunoglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol trisphosphate
JNK	Jun N-terminal Kinase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
NP-1	Neuropilin-1
PBS	Phosphate Buffer Solution
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyde
PIGF	Placental Growth Factor
PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
PKC	Protein Kinase C
PL-C	Phospholipase-C
RAMP	Receptor Activity Modifying Protein
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
sst	Somatostatin receptor
TGF- β	Transforming growth factor β
Tie	Tie-like receptor tyrosine kinase

TNF- α	Tumor necrosis factor α
tPA	Tissue type Plasminogen Activator
TSP-1	Thrombospondin-1
U-II	Urotensin II
UCE	Urotensin II Converting Enzyme
UT	Urotensin II receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
vWF	von Willebrand Factor

Capitolo 1 **INTRODUZIONE**

1.1 UROTENSINA-II

Urotensina-II (U-II) è stata isolata 30 anni fa dal sistema neurosecretorio (urofisi) del pesce teleosteo *Gillichthys mirabilis* [1]. Successivamente è stata localizzata nel cervello di rana [2] e, più tardi, anche nei mammiferi, compreso l'uomo [3]. U-II è il più potente vasocostrittore conosciuto, più potente persino di endotelina-1 (ET-1) [4].

1.1.1 Struttura e sintesi di U-II

U-II è un peptide ciclico vasoattivo strutturalmente simile alla somatostatina-14 nella sequenza *Phe-Trp-Lys-Thr*, caratterizzato nei pesci come ormone dodecapeptidico di 1363 Dalton [1] (Figura 1). Tutte le isoforme conosciute presentano una sequenza ciclica esapeptidica (*Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys*) la quale è connessa da un ponte disolfuro tra due residui di cisteina, è pienamente conservata nelle diverse specie animali ed è localizzata nella porzione C-terminale, che conferisce alla proteina la maggior parte dell'attività biologica [3], mentre la sequenza N-terminale differisce in lunghezza e sequenza tra le varie specie animali e non influenza le proprietà farmacologiche di U-II. La lunghezza del peptide maturo è variabile dagli 11 aminoacidi per l'uomo ai 17 aminoacidi per il topo mentre l'omologia di sequenza è di solo il 48% tra uomo e topo [5].

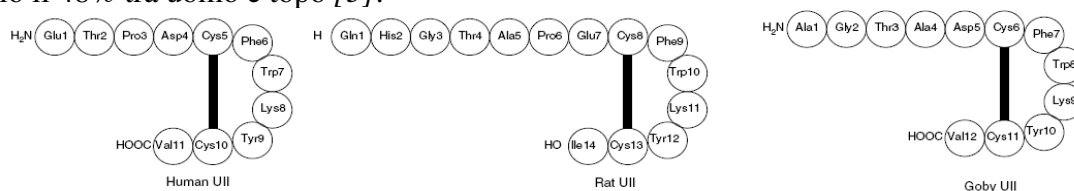


Figura 1: struttura di U-II umana, di ratto e di pesce [6].

Il peptide deriva da un precursore molto più grande, la prepro-U-II [3] il cui gene *UTS2* è localizzato nel cromosoma 1p36 e contiene 5 esoni [7] (Figura 2).

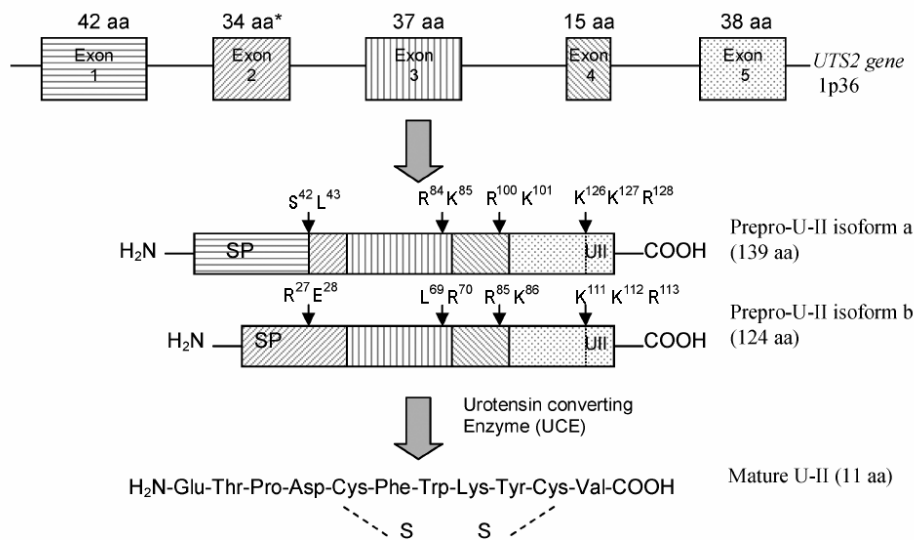


Figura 2: processi post-traslazionali del gene dell'hU-II con formazione finale dell'hU-II matura [7].

Esistono due varianti di splicing alternativo per la prepro-U-II umana, l'isoforma "a" e l'isoforma "b", con rispettivamente 139 e 124 residui aminoacidici. La differenza sostanziale sta nella porzione N-terminale. U-II matura viene prodotta dalla proteolisi della prepro-U-II nel sito tribasico $K^{126}K^{127}R^{128}$, per la variante "a", e $K^{111}K^{112}R^{113}$ per la variante "b" [3-4] (Figura 2). Il taglio enzimatico conferisce alla proteina la principale attività biologica [8]. L'enzima specifico UCE (Urotensin II Converting Enzyme), che converte la prepro-U-II in U-II, non è ancora stato identificato, ma sembra esistano diverse proteine che possano effettuare questo specifico taglio proteolitico. Russel et al. [9] in particolare, hanno dimostrato che una specifica endoproteasi (Furin), espressa in molti tipi di cellule e localizzata nell'apparato del Golgi [10], potrebbe funzionare come enzima intracellulare per la conversione di U-II.

1.1.2 Struttura recettoriale e trasduzione del segnale

U-II è il ligando endogeno del recettore orfano 14 associato alle proteine G (*GPR14*) [4-11-12], successivamente rinominato *UT* [13]. UT umano è una proteina di 389 aminoacidi con 7 domini trans-membrana (Figura 3) e con un'omologia del 75% con il recettore GPR14 di ratto il quale è strutturalmente simile al recettore della somatostatina *sst4* [14-4-11-12]. Sebbene però U-II e somatostatina siano strutturalmente simili, UT è selettivo solo per U-II [4]. Il gene codificante per UT umano è localizzato nel

cromosoma 17q25.3 ed è privo di introni [15]. La vasta distribuzione di U-II e di UT suggerisce che U-II potrebbe agire sia come peptide vasoattivo locale che circolante e spiegherebbe la variabilità della risposta contrattile a U-II, in grado di determinare sia vasocostrizione che vasodilatazione. I segnali di trasduzione intracellulare, indotti dal legame peptide-recettore, tuttavia, rimangono complessi e per lo più poco noti [16-17]. U-II interagisce con il frammento 281-300 di UT contenente il loop extracellulare III (EC-III) e piccole estensioni dei domini transmembrana VI e VII (TM-VI e TM-VII), indicando che EC-III potrebbe essere coinvolto nel processo di riconoscimento di U-II [18] (Figura 3).

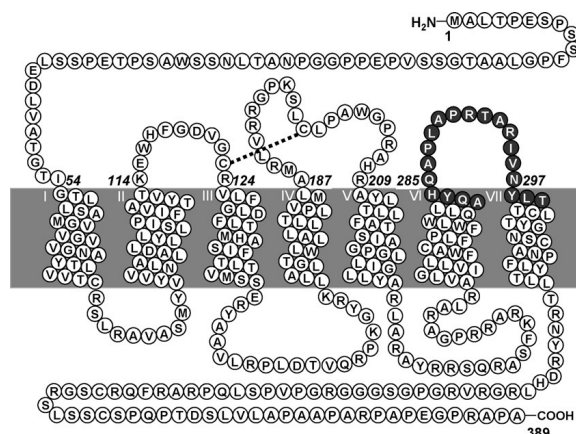


Figura 3: Struttura bidimensionale di UT; in nero gli aminoacidi coinvolti nel legame con U-II [18].

Il legame di U-II al suo recettore è essenzialmente irreversibile e questo fatto potrebbe essere correlato alla presenza del ciclo esapeptidico [19-20]. Giebing et al. [21] hanno dimostrato che il complesso U-II/UT viene internalizzato nella cellula e dopo la dissociazione di U-II, il recettore ritorna sulla membrana plasmatica. In questo modo, dopo la rimozione dell'agonista, i livelli di espressione di UT sulla superficie cellulare tornano uguali a quelli precedenti alla stimolazione con U-II, indicando un recupero quantitativo del recettore. Entrambe queste caratteristiche sono importanti determinanti per la funzionalità di UT e forniscono le basi molecolari per una risposta duratura U-II-mediata.

UT appartiene alla classe A della famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCR – G Protein-Coupled Receptors). Il principale meccanismo di trasduzione associato ad UT prevede l'attivazione della subunità $G\alpha_{q/11}$ della proteina G trimerica [22], di fosfolipasi-C (PL-C) con conseguente aumento di inositolo trifosfato [23] e mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare [4]. Un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare a seguito del legame con U-II è stato osservato nelle cellule endoteliali provenienti da aorta [24] e nelle cellule muscolari lisce (VSMC – Vascular Smooth

1.1.3 Espressione di U-II/UT nel sistema cardiovascolare

La Tabella 1 riassume l'espressione di U-II e UT nel tessuto vascolare umano e di ratto. U-II ed UT sono ampiamente espressi in vari tessuti tra cui rene, pancreas, ghiandola surrenale, tiroide ed ipofisi, ma più marcatamente nel sistema nervoso centrale [3] e nel sistema cardiovascolare. Tecniche di real time-PCR hanno rivelato che l'mRNA codificante U-II e UT è espresso nel cuore [12-30] e nei vasi sanguigni, compresa aorta, arteria toracica interna, arteria polmonare e la grande vena safena [31-32].

In accordo con questi risultati, studi di immunoistochimica ed RT-PCR individuano U-II in cellule endoteliali (EC) vascolari umane, sia di arterie come aorta, coronaria epicardiale, toracica interna e ombelicale, che di vene quali la safena e l'ombelicale, ma non nella lamina muscolare liscia sottostante e neppure nell'avventizia [33-34].

Per quanto riguarda il recettore di U-II, UT sembra essere ubiquitariamente espresso nel sistema cardiovascolare [35]. Utilizzando saggi di binding con radioligandi, UT è stato identificato nel miocardio umano e in vasi sanguigni di ratto e uomo [36], e analisi immunocitochimiche confermano una significativa localizzazione in cellule muscolari lisce (VSMC) ed EC di coronarie e in EC da vena safena umane [35], mentre l'espressione è inferiore a livello della muscolatura liscia di aorta di ratto. Prove di RT-PCR localizzano l'mRNA codificante per il recettore in campioni di tessuto cardiaco (atri e ventricoli), aortico e di vena safena, in cellule endoteliali di arteria coronaria e VSMC (arteria coronaria e aorta) [4-31-37]. Un pattern di espressione per UT simile è stato osservato in tessuto vascolare di ratto, con eccezione per le EC, le quali esprimono livelli di immunoreattività ad UT generalmente più bassi o non identificabili rispetto quelli da EC umane [35].

Dati da studi condotti su cellule in coltura sono in generale accordo con il profilo di espressione osservato su tessuto [37]. Come dimostrato mediante PCR ed immunocitochimica, EC di microcircolo cerebrale di ratto esprimono l'mRNA e le proteine UT e U-II [38].

E' interessante notare che altri tipi di cellule, come monociti, macrofagi e linfociti, i quali non appartengono al tessuto vascolare ma interagiscono con esso, esprimono significativamente il sistema di U-II. In particolare, monociti e macrofagi esprimono UT, mentre i linfociti ne esprimono piccole concentrazioni sebbene siano i maggiori produttori di U-II [39].

Tutti questi dati supportano l'idea che fisiologicamente, U-II sia un mediatore locale vasoattivo [34] e sempre maggiori evidenze indicano che potrebbe giocare un importante ruolo nel rimodellamento del tessuto vascolare.

		U-II mRNA	peptide	UT mRNA	proteina
Uomo	Cuore	[30-31]	[30] [34] (piccoli vasi)	[4-30-31]	[4-30] [35] (SMC e cardiomiociti)
	Aorta	[31]	[39] [34] (EC)	[4-31]	[35]
	Arteria coronaria		[34] (EC)	[4]	[36] [35] (SMC e EC)
	Arterie periferiche		[34] (EC)	[31]	[35] (SMC e EC)
	Vena safena	[31]	[34] (EC)	[31]	
	HUVEC				[35]
Ratto	Cuore	[5]		[12]	[35] (cardiomiociti)
	Aorta				[43-36]
	Arteria polmonare	[32]	[32]	[32]	[32]
	Arteria mesenterica				[43]
	EC da microcircolo cerebrale in coltura	[38]	[38]	[38]	[38]

Tabella 1: distribuzione di U-II e UT nel tessuto cardiovascolare.

1.1.4 Attività emodinamica di U-II

I primi studi funzionali per chiarire i ruoli fisiologici di U-II sono stati inizialmente focalizzati sui pesci dal momento che si pensava fosse prodotta esclusivamente dal sistema neurosecretorio caudale di questa specie. Lo stesso nome, Urotensina-II, fu originariamente utilizzato per descrivere l'attività stimolatoria sulla muscolatura liscia di estratti di urofisi e la capacità di U-II di contrarre preparati di intestino di trota [40]. Divenne però rapidamente chiaro che le azioni vasocostrittive e spasmogeniche di U-II sulla muscolatura liscia non erano limitate ai pesci [41]. Sono stati infatti riportati anche effetti di rilassamento sul muscolo anococcigeo isolato di topo [42], di contrazione nelle arterie di ratto [43-44] e un'azione ipotensiva in ratti anestetizzati [45]. Inoltre, dal momento che peptide e recettore sono ampiamente distribuiti in vari tessuti, inclusi il sistema cardiovascolare e il sistema nervoso centrale (CNS), la somministrazione di U-II provoca molteplici effetti.

La somministrazione sistemica di U-II altera la pressione sanguigna nei pesci, anfibi, uccelli e mammiferi [41]. Nei mammiferi il profilo emodinamico di U-II è complesso e consiste in azioni dirette su cuore e sistema vascolare periferico, ed effetti indiretti su

organi quali cervello, rene e sistema endocrino [46]. Comunque, gli effetti del peptide sulla pressione sanguigna non sono uniformi tra le specie [17].

Studi condotti in cuori di ratto isolati e perfusi hanno dimostrato che la somministrazione di U-II non altera il ritmo cardiaco e la pressione sistolica e diastolica del ventricolo destro, mentre incrementa il flusso coronarico in maniera dose e tempo-dipendente [47]. Iniezioni endovenose acute di U-II in ratti producono una riduzione della pressione sanguigna duratura nel tempo mentre l'infusione cronica non apporta sostanziali effetti a questo parametro [48]. In ratti non anestetizzati, iniezioni di hU-II inducono una risposta emodinamica bifasica in cui si sviluppa dapprima una risposta diretta che causa vasodilatazione, tachicardia e una piccola diminuzione della pressione sanguigna e successivamente un'azione indiretta che induce tachicardia, vasodilatazione e piccolo aumento pressorio [49]. In ratti anestetizzati, la somministrazione endovenosa di U-II umana induce una riduzione dose-dipendente della pressione arteriosa e sistolica del ventricolo destro, e della contrattilità cardiaca, ma non ci sono variazioni significative della velocità cardiaca o della pressione diastolica [50]. Iniezioni intravenose a basse dosi di U-II umana in scimmie anestetizzate, diminuiscono la gittata cardiaca e aumentano la resistenza periferica. L'iniezione di alte dosi di U-II, invece, determina una diminuzione della funzione miocardica, della gittata e frequenza cardiaca, del flusso sanguigno nella carotide e nelle coronarie con un successivo incremento della resistenza vascolare, la quale può portare ad ipertensione polmonare, depressione miocardica e a collasso fatale della circolazione [4-51].

U-II, *in vitro*, esplica anche effetti cardiostimolanti su cuore umano [52]. Altri studi hanno dimostrato che non è osservabile un incremento della pressione sanguigna e della successiva resistenza periferica in uomini sani, dopo iniezione intravenosa di U-II [53-54]. Al contrario l'infusione del peptide nell'arteria brachiale riduce in modo dose-dipendente il flusso sanguigno dell'avambraccio di volontari sani [55]. Sebbene non ci sia una spiegazione chiara per questa discrepanza, il meccanismo che induce una risposta variabile e di bassa efficacia di U-II esogena nell'uomo potrebbe essere imputabile al fatto che il tessuto vascolare è carente di una riserva di recettori UT liberi in quanto occupati per la maggior parte da U-II endogena [56].

U-II sembra giocare un ruolo anche nell'eziologia dell'ipertensione. Uno studio recente ha descritto "la classica risposta ipertensiva sistemica" dopo somministrazione endovenosa di U-II in gatti [57]. Il peptide causa ipertensione e tachicardia dopo iniezione intracerebroventricolare anche nei ratti [58] e nelle pecore [59]. Un aumento

dei livelli plasmatici di U-II, inoltre, si osserva in ratti ipertesi [60]. Uno studio caso-controllo condotto da Thompson et al. [61] non ha evidenziato differenze significative dei livelli plasmatici e cerebrospinali di U-II tra pazienti ipertesi in cura e pazienti sani. Cheung et al. [62] hanno invece dimostrato che le concentrazioni plasmatiche di U-II sono elevate in 62 pazienti ipertesi (di cui 37 in cura per l'ipertensione) rispetto a 62 pazienti di controllo sani, e queste sono indipendenti dalla terapia antiipertensiva.

Alcuni dati indicano come gli effetti emodinamici di U-II siano endotelio-dipendenti. Infatti è stato evidenziato come l'attivazione di UT nelle EC vascolari umane inneschi il rilascio di ossido nitrico e di prostaglandine che potrebbero modulare l'effetto vasocostrittivo di U-II a livello delle VSMC [63-64-65]. A questo proposito, sebbene Bennett et al. [66] non abbiano riscontrato attività vasocostrittiva di U-II in polmoni umani perfusi isolati e arterie polmonari umane con disfunzione endoteliale, sia nel ratto che nell'uomo l'effetto di vasocostrizione delle arterie polmonari indotto da U-II aumenta in seguito alla rimozione dell'endotelio e all'inibizione di eNOS [67]. Si è infatti osservato come U-II possa agire anche come vasodilatatore in presenza di un endotelio intatto [63-36].

La risposta emodinamica ad U-II esibisce dunque una certa variabilità a seconda della specie animale considerata, dei diversi letti vascolari e anche fra varie regioni dello stesso letto vascolare [68-69], e può essere causata da differenze nella conversione enzimatica del peptide, dell'attività dell'endotelio e dalla differente densità recettoriale [4].

1.1.5 U U-II e il rimodellamento vascolare

Il rimodellamento vascolare è un processo continuo di adattamento vascolare (fisiologico e/o patologico) a cambiamenti circolatori [70] o strutturali della parete vasale (dall'intima all'avventizia), e implica, una modificazione a livello dei vasi, di alcune funzioni cellulari di base come la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la migrazione cellulare e la degradazione e riorganizzazione della ECM. Questi processi possono comportare a lungo termine, a seconda dei casi, ipertrofia delle SMC e conseguente restringimento del lume vasale con implicazioni cliniche come ipertensione arteriosa, fattore di rischio per l'insorgenza dell'aterogenesi e ischemia [71].

A questo proposito è da osservare che U-II è il più potente vasocostrittore conosciuto ad oggi [68]. Nell'uomo, U-II, può causare vasocostrizione delle arterie coronarie,

toraciche e radiali così come delle vene safena e ombelicale e la sua capacità di contrarre vasi sanguigni è superiore all'ET-1 di circa 50 volte per le arterie e di 10 volte per le vene [36]. Conseguentemente, le proprietà emodinamiche di U-II insieme alle sue proprietà vasoattive suggeriscono un ruolo del peptide nel rimodellamento vascolare.

In questo contesto, dati di particolare rilevanza sono disponibili sul ruolo di U-II in condizioni patologiche quali aterosclerosi e insufficienza coronarica [72]. Pazienti con insufficienza coronarica presentano alti livelli plasmatici di U-II rispetto ai pazienti sani e la gravità della patologia aumenta proporzionalmente ad essi [73]. U-II è abbondantemente espressa, a livello genico e proteico, anche in EC e VSMC di arterie coronarie umane aterosclerotiche [30-74]. I macrofagi inoltre, che contribuiscono significativamente al rimodellamento aterosclerotico delle arterie, esprimono alti livelli di UT ed è stato dimostrato che U-II accelera il processo lesivo [75]. Un altro processo che avviene nelle prime fasi di formazione della placca è l'ispessimento dell'intima il quale implica la proliferazione delle EC e delle VSMC, assieme alla deposizione di collagene. E' stato dimostrato che U-II modula positivamente alcuni di questi cambiamenti cellulari stimolando la proliferazione delle VSMC attraverso l'attivazione di RhoA e del suo effettore Rho-K [26], in seguito alla fosforilazione di ERK1/2 [76], oppure anche tramite la trans-attivazione di EGFR e la secrezione di ET-1 [77], e la migrazione delle VSMC attraverso l'attivazione del pathway di ERK [78]. In entrambi i casi, l'inibizione farmacologica delle proteine coinvolte nelle cascate di segnalazione intracellulare inibisce anche l'effetto del peptide. Interessante è notare che l'antagonismo recettoriale di UT induce una significativa riduzione del rimodellamento vascolare in un modello di aterosclerosi murino [79].

U-II inoltre promuove la crescita ipertrofica e conseguenti cambiamenti morfologici in cardiomiociti di ratto [29].

A livello delle EC, U-II è in grado di modulare varie attività cellulari. Essa induce iperpermeabilità [80] con conseguente travaso plasmatico e la sua azione sembra essere specifica in quanto risulta indipendente da ET-1. U-II sovraregola l'espressione di collagene-I e diminuisce l'espressione e l'attività delle metalloproteasi di matrice (MMP1) nelle HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) [81]. Nello stesso tipo cellulare il peptide inibisce anche l'apoptosi e stimola la proliferazione cellulare [82]. UT, inoltre, è espresso in progenitori di EC e l'esposizione di questi a U-II induce migrazione cellulare [83]. Dal momento che la destabilizzazione, proliferazione e migrazione delle EC attraverso anche il rimodellamento della ECM sono eventi chiave

che avvengono durante il processo angiogenico [84], questi dati suggerirebbero un possibile ruolo del peptide nella regolazione dell'angiogenesi. In cellule endoteliali di microcircolo cerebrale di ratto coltivate su Matrigel [38] è stato dimostrato che U-II induce la formazione di strutture capillaro-simili, e un'analisi morfometrica ha messo in luce come l'effetto del peptide sia paragonabile a quello indotto da FGF-2, fattore pro-angiogenico classico. Allo stesso modo U-II somministrata alla membrana corioallantoidea di embrione di pollo (CAM), induce un'azione di tipo angiogenico. Gli effetti pro-angiogenici sia *in vitro* che *in vivo*, sono annullati da Palosuran, antagonista specifico di UT [85], indicando che l'azione del peptide è indotta dal legame al suo recettore. Nello stesso studio FGF-2 induce anche la proliferazione cellulare, mentre U-II non fa altrettanto. Nelle HUVEC, U-II è risultata inoltre in grado di stimolare la produzione e il rilascio di adrenomedullina (AM), noto fattore pro-angiogenico non-classico [86]. In Tabella 2 sono riassunte le azioni di U-II potenzialmente rilevanti per l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare.

Endothelial cells	Hyper-permeability Inhibition of apoptosis Stimulation of cell proliferation Stimulation of the expression of adhesion molecules Stimulation of cell migration Stimulation of the capillary-like structures formation Stimulation of an angiogenic response in the CAM assay Stimulation of adrenomedullin secretion
Smooth muscle cells	Stimulation of cell proliferation Induction of endothelin-1 expression Transactivation of EGFR Reduction of myointimal thickening in atherosclerotic arteries following U-II antagonism
Monocytes/macrophages	Chemo attraction of monocytes Acceleration of foam cells formation
Cardiomyocytes	Induction of hypertrophic growth Transactivation of EGFR

Tabella 2: effetti indotti da U-II potenzialmente rilevanti per l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare [87].

1.2 ANGIOGENESI

La vascolarizzazione nell'individuo adulto deriva da una rete di vasi sanguigni inizialmente formata nell'embrione mediante **vasculogenesi**, processo mediante il quale nuovi vasi sanguigni generano *de novo* da precursori di EC denominati angioblasti [84]. Durante la vasculogenesi, gli angioblasti proliferano e vanno a formare una primitiva rete vascolare denominata plesso capillare primario. Il reticolo di EC creato tramite vasculogenesi servirà poi come base per l'angiogenesi. Infatti dopo la formazione del plesso primario, esso viene rimodellato dalla generazione e diramazione di nuovi vasi sanguigni da altri già esistenti attraverso il processo di **angiogenesi** [88]. L'angiogenesi gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale e nella crescita tissutale [89] e

più tardi, nella vita adulta, in diverse condizioni fisiologiche quali la formazione del corpo luteo durante il ciclo mestruale e la cicatrizzazione delle ferite [90]. Nell'adulto, tuttavia, l'angiogenesi è riscontrabile soprattutto in stati patologici [91] come la crescita tumorale e stati di infiammazione cronica (artrite reumatoide, retinopatia diabetica, psoriasi, aterosclerosi).

La generazione e maturazione di nuovi vasi sanguigni, in ogni caso, avviene in modo estremamente complesso e coordinando diversi processi che richiedono l'attivazione di un'ampia gamma di recettori e ligandi e un attento bilancio tra segnali stimolatori ed inibitori [92].

1.2.1 Tipi cellulari coinvolti nella'angiogenesi

Il vaso sanguigno è una struttura cava il cui lume è delimitato da un monostrato di EC ancorato alla membrana basale. L'endotelio oltre a fornire un rivestimento atto a favorire il flusso sanguigno, è anche in grado di modulare a livello della parete, il tono e la struttura vasale producendo elevate quantità di sostanze attive, ed a livello luminale la coagulazione e le interazioni con le cellule ematiche con cui viene a contatto (leucociti e piastrine) [93]. Anche al fine di prevenire la disgregazione della rete vascolare sottoposta a stimoli angiogenici e per mantenere l'irrorazione della regione, per innescare l'angiogenesi è sufficiente il coinvolgimento di poche EC all'interno dei capillari. Queste cellule sono chiamate "tip-cells" e reagiscono al gradiente del VEGF-A che specifica la direzione di migrazione e induce i capillari a crescere verso il gradiente. Questo effetto è causato dall'interazione del VEGF-A con il recettore di tipo 2 del VEGF (VEGFR2), la cui concentrazione è maggiore nelle tip-cells. Esse diventano invasive e capaci quindi di migrare. Inoltre attivano proteasi per la distruzione parziale della membrana basale adiacente. Una volta selezionate le tip-cells, la formazione di nuovi capillari avviene in seguito alla proliferazione e alla migrazione di altre EC [92].

La stabilizzazione dei tubi vascolari implica il reclutamento di cellule peri-endoteliali come i *periciti* (cellule situate nella stessa membrana basale come le EC e che partecipano alla formazione della matrice), i quali stabilizzano la parete vasale [94], o VSMC (cellule situate fuori dalla membrana basale vascolare e dotate di specifici filamenti contrattili di actina-miosina) [95]. Tutti questi tipi cellulari sono immersi nella ECM formata da tessuto connettivo, fibroblasti e macrofagi.

In alcune situazioni, al processo angiogenico possono contribuire popolazioni di EPC (progenitori di cellule endoteliali) ematopoietiche derivate da midollo osseo o da popolazioni di monociti, che possono dare origine a cellule endoteliali-simili [96] e influenzare significativamente la neovascolarizzazione, contribuendo fisicamente allo strutturarsi dei nuovi vasi [97]. EPC coltivate da differenti fonti mostrano inoltre una marcata espressione di fattori di crescita come VEGF e il fattore di crescita epatocita (HGF). Il rilascio di tali fattori di crescita può ulteriormente influenzare il processo di angiogenesi, stimolando la proliferazione e la migrazione come anche la sopravvivenza delle cellule mature.

Infine anche molti componenti del sistema immunitario sono coinvolti nel processo di angiogenesi. Infatti l'alterazione dell'omeostasi del microambiente circolatorio porta all'attivazione di cellule residenti come mastociti, macrofagi e cellule dendritiche [98].

1.2.2 Le fasi dell'angiogenesi

La crescita angiogenica di nuovi vasi sanguigni è un processo che avviene in più fasi (Figura 5), caratterizzato da modifiche dell'endotelio e della ECM, e che prevede migrazione e proliferazione cellulare, nonché la formazione e la stabilizzazione del nuovo capillare [84].

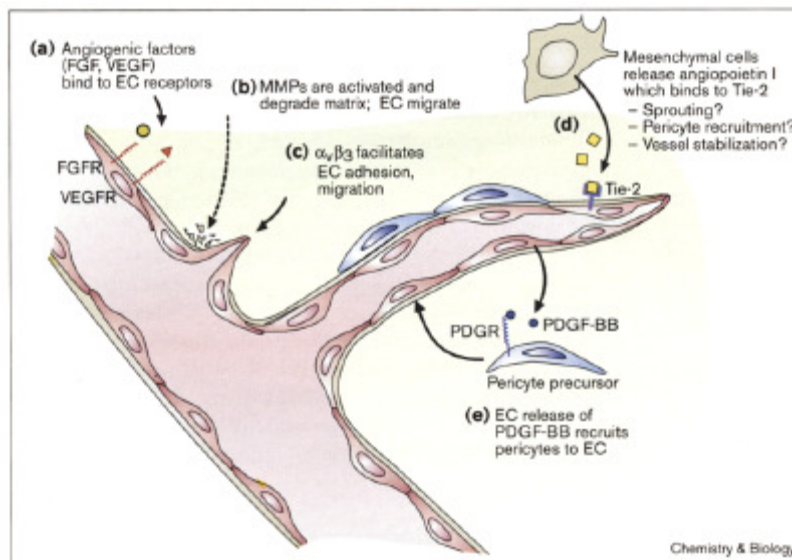


Figura 5: Meccanismi dell'angiogenesi fisiologica [90].

A – Stimoli iniziali

In risposta a stimoli angiogenici (lesioni, infiammazione, ipossia) le EC si attivano e stimolano la produzione e il rilascio di fattori pro- ed anti-angiogenici [99].

B – Destabilizzazione dei vasi preesistenti

Conseguentemente si verifica un aumento della permeabilità vasale, perdita delle connessioni tra EC e tra EC e cellule di supporto (periciti e VSMC) con formazione di fenestrazioni, destabilizzazione della parete vasale, degradazione della membrana basale per azione di enzimi proteolitici, come le metalloproteasi di matrice (MMP) e attivatori del plasminogeno secreti dalle EC, e deposizione di fibrina nello spazio extravasale [99].

C - Migrazione e proliferazione delle EC

I fattori proteolitici secreti dalle EC per degradare la ECM facilitano la migrazione delle EC [100]. Le proprietà migratorie delle EC sono determinate dai legami cellulari alle molecole della matrice e dalla modulazione intracellulare dei componenti citoscheletrici. In seguito alla degradazione proteolitica della ECM e alla migrazione attraverso la matrice danneggiata, le EC sono indotte a proliferare grazie agli stimoli di molti fattori angiogenici endogeni (taluni risultanti dalla stessa degradazione della ECM), quali fattori di crescita, come ad esempio i fattori appartenenti alla famiglia del VEGF, mediatori dell'infiammazione, enzimi, ormoni, molecole di adesione cellulare e fattori emopoietici [93].

D - Formazione del lume

Una volta raggiunto il sito che necessita della formazione di nuovi vasi, le EC arrestano gli eventi mitogeni a favore di variazioni morfologico-differenziative finalizzate a formare strutture capillari primitive. In particolare, la formazione del nuovo capillare richiede la sintesi della membrana basale con conseguente temporanea inibizione locale del processo di proteolisi extracellulare per permettere il deposito e l'assemblaggio dei componenti della nuova ECM. La genesi vascolare è dunque il risultato di continui cicli di attivazione ed inibizione di proteasi extracellulari [101]. I processi appena descritti fanno sì che le EC si riorganizzino a formare un cordone solido che successivamente sviluppa un lume.

E – Stabilizzazione del nuovo vaso

Per ottenere una funzionale rete vascolare i nuovi vasi formati devono essere rimodellati per formare vasi maturi. Il rilascio del fattore PDGF (Platelet-Derived-Growth Factor) è fondamentale per la loro maturazione che è inoltre stimolata dal reclutamento di periciti e di cellule muscolari lisce che stabilizzano la morfologia dei vasi e prevengono la regressione delle EC [100]. Infine, quando la neovascolarizzazione è avvenuta, si verifica una down-regulation di fattori angiogenici oppure un aumento locale della

concentrazione di fattori anti-angiogenici. Come risultato le EC tornano quiescenti e i vasi permangono oppure regrediscono se non più necessari [102].

1.2.3 Metodi di valutazione dell'angiogenesi

Come è stato descritto, l'angiogenesi è un processo complesso, che prevede il coinvolgimento di molteplici elementi e attualmente non è disponibile alcun saggio *in vitro* in grado di simulare l'intero processo nella sua totalità e complessità [103]. Al contrario, i saggi *in vivo* permettono una valutazione più complessiva e realistica. Tuttavia, anche in questo caso esistono delle limitazioni dovute alla specie usata e alla via di somministrazione degli stimoli da testare [104]. La combinazione di più saggi è quindi in genere necessaria per indagare i diversi processi cellulari e molecolari che avvengono durante l'angiogenesi.

Saggi in vivo

Negli studi di angiogenesi *in vivo* vengono utilizzati impianti subcutanei di matrici polimeriche (per esempio Matrigel) contenenti cellule o/e un fattore angiogenico. La neovascolarizzazione può essere valutata poi attraverso diversi metodi, quali la colorazione immunoistologica, il sangue o l'emoglobina trattiene dalla spugna [104]. Va tenuto presente che differenze nella dimensione, nella forma e nella composizione dell'impianto sono parametri importanti per il confronto tra diversi studi. Inoltre l'impianto può causare risposte immuni non specifiche che possono influenzare la risposta angiogenica.

Un altro comune approccio sperimentale è il trapianto di tessuto all'interno della membrana corioallantoidea (CAM) di embrione di pollo, caratterizzata da una fitta rete microvascolare è [105] Lo xenotrapianto (in genere da specie mammifere) può essere impiantato all'interno della CAM senza rigetto, perché l'embrione di pollo non ha un sistema immunitario completo [106]. Nel saggio della CAM il guscio d'uovo viene aperto e la CAM esposta. Gli effetti angiogenici possono essere misurati contando il numero di vasi sanguigni in un'area precisa utilizzando uno stereo microscopio [104].

Nel saggio di angiogenesi corneale la risposta angiogenica viene indotta dall'impianto di un pellet a lento rilascio o di un polimero contenente la sostanza angiogenica. Se l'animale viene sottoposto ad un saggio angiogenico, il risultato può essere quantificato analizzando l'immagine attraverso il computer dopo perfusione della cornea con un

cromoforo. La cornea infatti non è vascolarizzata quindi ogni vaso visibile è di nuova formazione [104].

Vi sono anche altre tipologie di saggi che prevedono l'utilizzo di impianti sub cutanei a livello dell'orecchio, del dorso e del cranio e di varie specie animali tra cui topo e pesce [104].

Saggi ex-vivo: colture d'organi

Dal momento che l'angiogenesi non coinvolge solo le EC, sono stati approntati protocolli sperimentali mirati a simulare l'angiogenesi in un ambiente più complesso. Sono di questo tipo saggi come l'anello aortico di ratto, l'arco aortico di pulcino, il saggio della carotide di suino. In questi saggi il disco o le sezioni di materiale rilevante sono coltivati *ex-vivo*, spesso su una matrice come la fibrina e per un periodo di 10-14 giorni viene monitorato lo sviluppo di EC e di altre cellule. Questi saggi su espianti mimano la situazione *in vivo* perché essi includono le cellule non endoteliali circostanti e una matrice di supporto [104]. Nicosia e Ottinetti hanno dimostrato che nel corso del saggio dell'anello di aorta di ratto si ha lo sviluppo di microvasi nella fibrina o nel gel di collagene e che il saggio costituisce uno strumento sensibile per lo studio di agonisti e antagonisti angiogenici in un ambiente chimico definito [107].

Saggi in vitro

I modelli di angiogenesi *in vitro* si sono concentrati prevalentemente sulla proliferazione, migrazione e formazione di tubuli nelle EC in risposta ad agenti esogeni, stimolatori o inibitori, per riprodurre singole fasi specifiche del processo angiogenico [104]. Questi studi hanno il vantaggio di essere poco costosi e permettono di esaminare gli effetti di fattori di regolazione su specifiche popolazioni cellulari coinvolte nell'angiogenesi [106] e in particolare sulle EC. Va osservato, tuttavia, che le EC in coltura non sono del tutto identiche, mostrano infatti differenze fenotipiche a seconda del letto vascolare da cui provengono. Inoltre *in vitro* le EC possono comportarsi diversamente se esposte ad un flusso continuo oppure se adese a differenti matrici. Anche se questi saggi sono rapidi non permettono lo studio di complesse interazioni fisiologiche come quelle che avvengono invece *in vivo*. Dovunque possibile, i saggi *in vitro* devono quindi essere effettuati utilizzando EC provenienti da fonti diverse, o ancora più importante, essere seguiti da uno o più saggi di angiogenesi *in vivo* o *ex-vivo* [104].

I saggi di proliferazione cellulare sono facili da effettuare, altamente riproducibili e si prestano ad una precisa quantificazione [103]. Vari marker di divisione cellulare

possono essere utilizzati per valutare il numero di cellule in fase di divisione cellulare. La somministrazione alle cellule di Bromodeossiridina (BrdU), precursore del DNA, permette di visualizzare le cellule proliferanti in relazione al numero di cellule totali per rivelazione mediante immunofluorescenza [104].

Le EC si muovono, attraverso un processo chiamato chemiotassi, lungo un gradiente di fattori che inducono angiogenesi. Il saggio modificato della camera di Boyden è utilizzato per valutare la migrazione delle EC. In questo saggio le EC vengono piastrate su una superficie porosa, migrano attraverso di essa in risposta a un fattore angiogenico posto nella camera sottostante. Questo saggio è molto sensibile alle piccole differenze di concentrazione del gradiente e la valutazione quantitativa avviene contando il numero di cellule che sono migrate attraverso il filtro [104].

Per la valutazione delle capacità auto-organizzative delle EC a formare strutture capillaro-simili sono stati sviluppati diversi metodi. Le EC di solito vengono coltivate su delle matrici di fibrina, collagene o Matrigel, che ne favoriscono l'adesione, la migrazione e l'organizzazione in tubuli [108]. Il più usato di tali test è il Matrigel, miscela di proteine extracellulari e della membrana basale prodotte dal sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm che riproduce verosimilmente la matrice extracellulare dei tessuti viventi sul quale le EC aderiscono e spontaneamente si auto-organizzano per formare una rete di strutture capillaro-simili. Un sistema di analisi di immagine può essere impiegato per valutare vari parametri di tale rete, quantificare e comparare diverse condizioni sperimentali [109]. Masse di matrigel e fibrina possono anche essere usate per simulare un sistema angiogenico 3D. Inizialmente le EC formano tubuli nel piano orizzontale e dopo 12 o più giorni i tubuli endoteliali incominciano a ramificare verso l'alto e penetrare il gel per formare una rete di tubuli 3D [110].

1.2.4 La regolazione dell'angiogenesi: lo “switch” angiogenico

In condizioni fisiologiche l'angiogenesi è regolata dall'equilibrio dinamico tra fattori inibitori e induttori [111].

Nell'organismo adulto sano le EC si trovano in uno stato di quiescenza dovuto in parte all'influenza dominante di sostanze inibitrici. La rottura di questo equilibrio (“switch” angiogenico), causata da un aumento dei fattori pro-angiogenici o dalla diminuzione di fattori anti-angiogenici, porta all'innescarsi e allo sviluppo del processo [91].

1.2.4.1 Fattori inibitori dell'angiogenesi

Gli inibitori endogeni classici delle EC attivate si suddividono in:

- mediatori solubili come ad esempio Trombospondina-1 (TSP-1), la quale è considerata il principale inibitore fisiologico della genesi vascolare essendo costitutivamente prodotta dalle cellule normali. La sovraespressione di TSP-1 causa inibizione del processo angiogenico [112]. Altri inibitori di questo tipo sono Troponina I, IFN- α e γ , IL-12 e -4, acido retinoico, ecc..
- Frammenti proteici come angiostatina ed endostatina, generate dalla proteolisi di precursori circolanti inattivi. Angiostatina, frammento del plasminogeno [113], lega l'ATP sintetasi interferendo così con la produzione di ATP e inibendo di conseguenza la crescita cellulare [114]. Sembra inoltre essere coinvolta nell'inibizione della migrazione e proliferazione di EC e nell'induzione di apoptosi [115]. Endostatina, frammento carbossi-terminale del collagene XVIII, sopprime la proliferazione delle EC *in vitro* ed aumenta l'apoptosi tumorale [93].
- Fattori genetici come il gene p53 il quale appartiene alla famiglia degli oncosoppressori, geni che codificano per proteine che impediscono alla cellula di proliferare in modo incontrollato. Alcuni studi hanno evidenziato il suo coinvolgimento nel causare la degradazione del fattore ipossia inducibile (HIF-1) il quale favorisce l'espressione di induttori angiogenici [116].

Tra gli inibitori endogeni non-classici si trova la somatostatina che, insieme ai suoi recettori, esercita molteplici azioni, tra cui inibizione della crescita cellulare e dell'angiogenesis specialmente in tessuti neoplastici [117-118]. Il recettore di somatostatina sst2-R media l'azione antiangiogenica del peptide in modo diretto coinvolgendo l'inibizione della proliferazione delle EC [119] e in modo indiretto sopprimendo la produzione di fattori di crescita come VEGF [120-121]. Grelina invece sopprime l'effetto antiapoptotico di FGF-2 [122-123], abbassa l'attività proliferativa di EC di ratto e HUVEC ed esercita un'azione inibitoria marcata sulla formazione di strutture capillaro-simili in queste cellule coltivate su Matrigel.

1.2.4.2 Stimolatori endogeni classici dell'angiogenesi

I principali fattori induttori dell'angiogenesi si possono suddividere in tre classi:

A – Fattori ad azione diretta (citochine, chemochine ed enzimi angiogenici) che attivano un ampio spettro di cellule target tra cui le EC. Il principale componente di questo gruppo è l'FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) il quale appartiene ad una famiglia di

almeno 19 membri [93]. Il gene FGF-2 codifica per più isoforme di FGF-2 con diversi pesi molecolari [124], ma sia le isoforme a basso che ad alto peso molecolare presentano attività angiogenica *in vivo* ed inducono la proliferazione cellulare, chemiotassi [125], induzione della formazione di strutture tubulari in gel di collagene, espressione di integrine e la sovra regolazione di VEGF e Flk-1 *in vitro* [126]. FGF-2 è espresso in quasi tutti gli organi, tessuti, in molte cellule in coltura e si accumula nell'ECM. Gli effetti di FGF-2 sulle cellule avvengono sia tramite legame specifico a recettori tirosinchinasici ad alta affinità (FGFR) [127] che a recettori a bassa affinità [128]. L'attivazione degli FGFR innesca una cascata intracellulare che induce molteplici risposte biologiche tra cui proliferazione e migrazione delle EC, differenziazione, produzione di proteasi e angiogenesi [129].

B – Fattori ad azione indiretta i cui effetti sull'angiogenesi derivano dal rilascio secondario di fattori ad azione diretta da parte di macrofagi, EC o cellule tumorali. TNF- α e TGF- β , ad esempio, inibiscono la proliferazione delle EC *in vitro* [93]. *In vivo*, TGF- β induce l'angiogenesi e stimola l'espressione di TNF- α , FGF-2, PDGF e VEGF [130]. TNF- α , a sua volta, è in grado di aumentare l'espressione di VEGF e dei suoi recettori, IL-8 e FGF-2 [131].

C – Molecole ad azione specifica sulle EC come la famiglia del VEGF e le angiopoietine. I recettori Tie, specifici delle EC, e i loro ligandi, le angiopoietine, giocano un ruolo importante nella maturazione dei vasi sanguigni. Ang-1 e Ang-2 legano entrambe Tie-2, ma solo il legame di Ang-1 induce la regolazione della maturazione dei vasi sanguigni [132], mentre Ang-2 è antagonista di Ang-1 [133]. E' stato anche proposto che Ang-1 legandosi a Tie-2, induca il rimodellamento e la stabilizzazione dei vasi sanguigni, una volta che VEGF abbia indotto la formazione del vaso non ancora maturo [134].

VEGF

Il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e i suoi recettori costituiscono il maggior sistema regolatore dello sviluppo vascolare e ricoprono un ruolo assai importante in particolare nella vasculogenesi e nell'angiogenesi sia fisiologica che patologica [135]. Tale sistema è espresso in molti tessuti e in molte cellule quando l'angiogenesi è attiva, mentre i suoi livelli sono bassi quando il processo angiogenetico non è in corso [91]. *In vitro* VEGF stimola la degradazione della ECM, la proliferazione, la migrazione, la formazione di tubuli di EC e promuove l'espressione di MMP-1 [135-93]. Il VEGF promuove la sopravvivenza cellulare attraverso

l'attivazione del pathway fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K)/Akt e attraverso l'associazione con l'integrina $\alpha_v\beta_3$ e l'attivazione di chinasi di adesione FAK. VEGF induce la proliferazione e migrazione delle EC attraverso numerosi pathway che coinvolgono l'attivazione di MAPK, ERK, p-38, JNK e membri della famiglia delle Rho GTPasi [136]. *In vivo*, VEGF regola la permeabilità vascolare necessaria per dare l'avvio al processo angiogenico [137].

VEGF appartiene ad una famiglia di glicoproteine (di circa 34-46 kDa) della quale sono stati identificati sei membri: VEGF-A (o VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF [138].

VEGF-A è principalmente coinvolto nella regolazione dell'angiogenesi e vasculogenesi. E' la forma maggiormente espressa di VEGF essendo distribuita ubiquitariamente nell'uomo. Si tratta di una glicoproteina di circa 34-46 kDa che si presenta come un omodimero disulfide. Il gene umano è organizzato in otto esoni e dallo splicing dell'RNA si ottengono otto isoforme: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165B}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ [99]. Un'importante caratteristica delle isoforme di VEGF-A è la differente capacità di legare l'eparina, il che determina se le proteine tendano ad accumularsi nella ECM o a diffondere [92]. VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅, ad esempio, vengono secreti nell'ambiente extracellulare mentre VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ e in certa misura VEGF₁₆₅ per la loro affinità con l'eparina solfato rimangono prevalentemente associati alle cellule o alla ECM. La forma più abbondante nell'uomo e con maggiore potenziale angiogenico è VEGF₁₆₅ che lega VEGFR1 e VEGFR2 [99]. L'espressione di VEGF-A è stimolata dall'ipossia indotta dal fattore HIF-1 α che si lega ad HRE all'interno del promotore del VEGF [139]. La produzione di VEGF-A è incrementata anche da fattori di crescita come EGF, IGF-1, FGF e PDGF, citochine dell'infiammazione (interleuchina 1 α e β , TGF- β , prostaglandine E2) o attivatori della ciclossigenasi2 (COX-2) [140]. VEGF-A, oltre ad esercitare un'azione angiogenica nelle EC, induce permeabilità vascolare e promuove la sopravvivenza delle EC inducendo l'espressione di proteine anti-apoptotiche, è neuroprotettivo e sembra avere anche un ruolo nella proliferazione e migrazione delle VSMC [139].

VEGF-B ha una struttura aminoacidica molto simile a quella del VEGF₁₆₅ (circa il 44%) e al PlGF (circa il 30%). Lo si può trovare in due isoforme nell'uomo, VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆ ed è in grado di formare eterodimeri con il VEGF-A. VEGF-B₁₆₇ è espresso in molti tessuti compresi muscolo scheletrico e miocardio, è l'isoforma più diffusa ed è sequestrato dalla ECM, mentre VEGF-B₁₈₆ è espresso in un limitato

numero di tessuti ma è diffusa facilmente [139]. VEGF-B lega e attiva VEGFR1 e sembra avere un ruolo nella degradazione della ECM e nella migrazione delle EC [99-88]. La funzione di VEGF-B non è tuttavia ben definita [141]: sembra essere richiesto per la normale funzionalità cardiaca adulta ma non per lo sviluppo cardiovascolare o per l'angiogenesi [142].

VEGF-C è prodotto da un precursore attivato nello spazio extracellulare da una proteasi e genera un omodimero che presenta alta affinità per VEGFR-2 e VEGFR-3. VEGF-C induce mitogenesi, migrazione, sopravvivenza delle EC ed è principalmente coinvolto nella linfoangiogenesi tramite l'interazione con VEGFR-3 [143-144].

VEGF-D è una glicoproteina che presenta il 48% di omologia con il VEGF-C e lega anch'essa VEGFR-2 e VEGFR-3. E' espresso in vari tessuti adulti compreso l'endotelio vascolare, cuore e muscolo scheletrico [145]. E' stato dimostrato che VEGF-D è responsabile della proliferazione di EC e SMC e presenta proprietà angiogeniche *in vitro* ed *in vivo*. Inoltre essendo simile a VEGF-C ha anche un potenziale linfoangiogenico nella vita adulta in risposta a condizioni patologiche [146].

VEGF-E si riferisce a un gruppo di proteine collegate al VEGF scoperte nel genoma del virus *orf*, un parapoxvirus che infetta pecore, capre e alcune volte anche l'uomo [147] ed ha un'omologia tra il 16 e il 27% con il VEGF-A dei mammiferi. Queste proteine virali hanno conservato le funzioni del VEGF perché legano specificamente VEGFR-2 e stimolano la mitogenesi e la permeabilità vascolare delle EC oltre che angiogenesi *in vitro* e *in vivo* [148].

PlGF è principalmente espresso nella placenta e nei tumori e forma omo- ed eterodimeri con VEGF. Esiste in tre diverse isoforme tutte leganti VEGFR-1, ma solo PlGF-2 lega l'eparina. Esso induce angiogenesi *in vivo* [99].

I fattori di crescita appartenenti alla famiglia del VEGF esercitano i loro effetti biologici attraverso l'interazione con dei recettori che si trovano sulla membrana delle EC. Sono stati identificati tre recettori che legano i diversi fattori di crescita del VEGF: VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (Flk1/KDR) e VEGFR3 (FLT4). Questi recettori fanno parte della famiglia dei recettori tirosin chinasi (RTK). Si tratta di proteine caratterizzate da un singolo dominio trans membrana (Figura 6); la regione extracellulare è formata da sette domini immunoglobuline-simili (IG I-VII), determinante per la specificità del legame, e la parte intracellulare presenta l'attività tirosin chinasi. Il dominio tirosin chinasi in questi recettori è diviso in due frammenti (TK-1 e TK-2) mediante un inserto inter-chinasi. Tutti i recettori del VEGF (VEGFR) sono altamente omologhi [92].

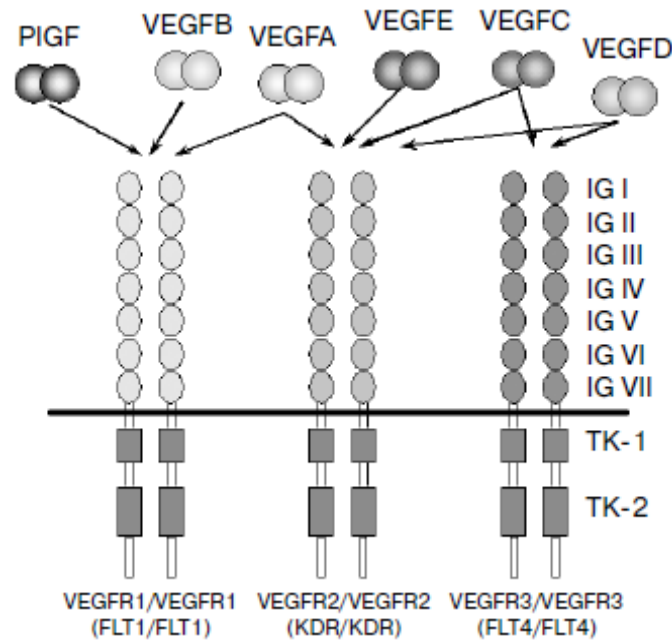


Figura 6: Interazioni dei fattori di crescita della famiglia del VEGF con i loro recettori VEGFR [92].

VEGFR sono stati caratterizzati prevalentemente nelle EC ma recentemente sono stati trovati anche in altri tipi cellulari come ad esempio nelle cellule muscolari vascolari lisce, monociti e macrofagi [88].

Recentemente, NP-1, glicoproteina di superficie, è stata identificata quale recettore di VEGF₁₆₅, è espressa dalle EC e aumenta gli effetti mitogenici di Flk1/KDR dopo stimolazione con VEGF₁₆₅ [149].

I VEGFR sono in grado di omo- o eterodimerizzare in seguito all'interazione con il ligando; la dimerizzazione del recettore è accompagnata dall'attivazione del dominio chinasi che induce una successione di fosforilazioni di vari residui tirosinici. Queste ultime, a loro volta, innescano l'attivazione di diversi pathway intracellulari che coinvolgono una gamma di messaggeri secondari che portano allo sviluppo dei molteplici effetti di VEGF (Figura 7) [135].

L'espressione dei VEGFR viene aumentata durante l'ipossia e ciò sembra essere un effetto indiretto e una possibile conseguenza dell'aumento di espressione del VEGF-A in condizioni di ipossia [93].

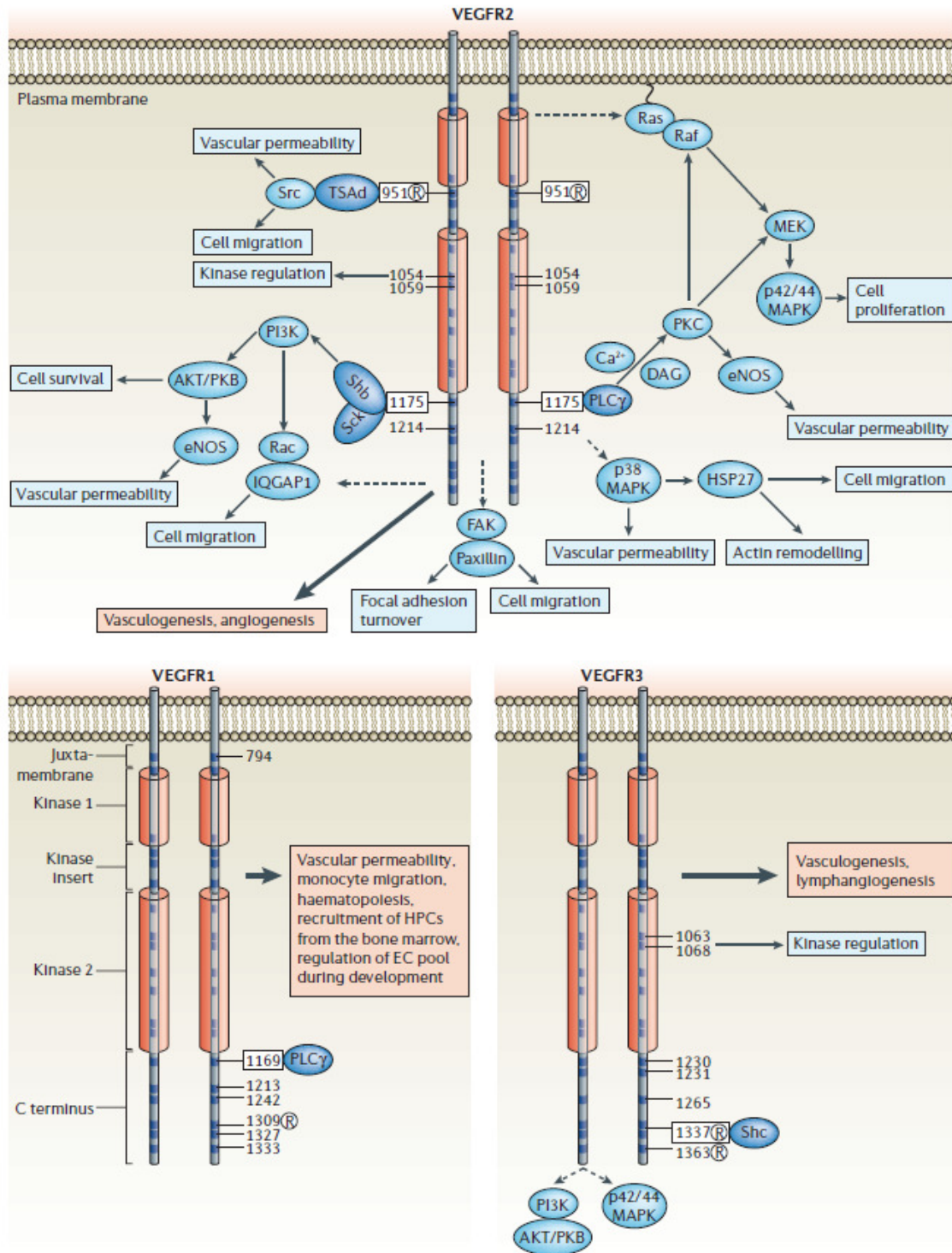


Figura 7: siti di fosforilazione dei VEGFR, trasduzione del segnale ed effetti prodotti [135].

VEGFR1 (FLT1) lega con maggiore affinità VEGF-A ed anche VEGF-B e PlGF ma induce solo un debole effetto mitogenico nelle EC. Regola infatti negativamente gli effetti di VEGF-A nelle EC ma gioca un ruolo importante nell'angiogenesi patologica, regola la permeabilità vasale [150].

VEGFR2 (Flk1/KDR) è implicato in tutti gli aspetti biologici delle cellule vascolari endoteliali normali e patologiche (la mitogenesi, la chemiotassi e i cambiamenti morfologici) anche se ha minore affinità per VEGF-A [139], di conseguenza è essenziale affinché il VEGF possa esprimere la maggior parte dei suoi effetti di stimolazione dell'angiogenesi.

VEGFR3 (FLT4) è importante per lo sviluppo e la funzione delle cellule endoteliali linfatiche [135].

1.2.4.3 Stimolatori endogeni “non classici” dell'angiogenesi

Oltre ai noti fattori di regolazione precedentemente trattati, ci sono molti altri fattori endogeni, meno conosciuti, in grado di regolare l'angiogenesi. Questi fattori grazie ai loro recettori sono in grado di agire in modo assai efficiente attraverso diverse vie metaboliche e sono oggi molto studiati in quanto risultano essere dei possibili target per la regolazione dell'angiogenesi [91].

Endoteline (ET)

ET è una famiglia di peptidi di 11 aminoacidi principalmente secreti dalle EC e comprende tre distinte isoforme, ET-1, ET-2 ed ET-3, che derivano dal taglio enzimatico di un precursore inattivo. Le ET agiscono tramite l'interazione con due classi di GPR, ET_A-R che lega principalmente ET-1 ed ET-2 ed ET_B-R che lega con uguale potenza le tre isoforme [151]. ET e i loro recettori sono presenti in vari tessuti dove esercitano azioni regolatorie nel sistema cardiovascolare sia in condizioni fisiologiche che patologiche [152]. Le HUVEC esprimono alti livelli di ET-1 ed ET_B-R [153]. ET-1 ed ET-3 agiscono tramite ET_B-R promuovendo la proliferazione e migrazione cellulare *in vitro* [154-155]. Sempre nelle HUVEC coltivate su matrigel, ET-1 induce la formazione di strutture reticolari capillaro-simili e l'effetto è inibito dall'antagonista di ET_B-R, confermando il coinvolgimento di ET_B-R nell'azione pro-angiogenica di ET-1 [153]. E' stato anche dimostrato che ET-1 agisce come fattore anti-apoptotico per le EC e VSMC, contribuendo così al mantenimento dell'integrità dei nuovi vasi sanguigni formati [156]. ET-1 poi in associazione con VEGF, esplica una chiara attività angiogenica: VEGF aumenta sia l'espressione dell'mRNA che la secrezione di ET-1 dalle EC [157], mentre ET-1, legandosi ad ET_A-R, stimola l'espressione e la secrezione di VEGF nelle VSMC [158]. In questo modo, VEGF ed ET-1 interagiscono reciprocamente stimolando la proliferazione di EC e VSMC.

Adrenomedullina (AM)

L'adrenomedullina (AM) è un potente peptide ipotensivo di 52 aminoacidi isolato da estratti di feocromocitoma umano [159]. AM appartiene a una grande famiglia di cui fanno parte calcitonin gene-related peptide (CGRP), amilina e calcitonina. Questi peptidi agiscono attraverso recettori selettivi derivati dalla dimerizzazione del calcitonin receptor-like receptor (CRLR) con delle receptor activity modifying proteins (RAMP). La famiglia dei RAMP comprende nell'uomo tre membri (RAMP1, RAMP2 e RAMP3). La formazione di eterodimeri tra RAMPs e CRLR è essenziale per definire la selettività del legame con il ligando. Per quel che riguarda AM, essa media le sue attività attraverso recettori eterodimerici composti da CRLR e RAMP2 o RAMP3, il che porta ai recettori AM1 e AM2 rispettivamente [160-161]. AM e i suoi recettori sono espressi in molti tessuti e organi, inclusi il cuore e i vasi sanguigni, e proprio la sua estesa distribuzione suggerisce che AM sia coinvolta nella regolazione di svariati effetti biologici come la regolazione dell'omeostasi di fluidi ed elettroliti [162-163] e l'azione protettiva sul sistema cardiovascolare [164].

AM esercita anche un chiaro effetto pro-angiogenico *in vitro* ed *in vivo* sia in condizioni fisiologiche che patologiche [165-166-167-168-169]. L'effetto pro-angiogenico di AM è mediato dal legame del peptide con il recettore AM1 e sembra esplicarsi tramite trans attivazione del VEGFR-2 [169-170-171].

AM inoltre inibisce l'apoptosi nelle EC e nelle cellule tumorali isolate [172-173-174].

Altri stimolatori endogeni "non classici" dell'angiogenesi comprendono ad esempio:

- Eritropoietina (EPO): stimola la proliferazione e migrazione di EC in coltura e diminuisce il loro potenziale apoptotico [175]. Il suo potenziale angiogenico sembra essere simile a quello di FGF-2 [176] e VEGF [177] e sembra essere indotto anche dal rilascio di ET-1 dopo stimolazione con EPO [178].
- Angiotensina II (ANG): presenta effetti pro-angiogenici *in vivo*, stimola la crescita di EC quiescenti, viene co-secreta con ET-1 nelle EC ed induce l'espressione di VEGF stimolando in questo modo la proliferazione e migrazione delle EC [91].
- Leptina ed Adiponectina: stimola l'angiogenesi in maniera simile all'FGF-2 [91].

Capitolo 2 **SCOPO DELLA TESI**

Urotensina-II (U-II) è un peptide endogeno il cui principale ruolo fisiologico nei mammiferi si esplica a livello di sistema cardiovascolare, dove il peptide agisce principalmente come vasocostrittore ed ipertensivo. A questo riguardo diversi dati suggeriscono che U-II potrebbe essere coinvolta in processi di rimodellamento cardiovascolare, sia in condizioni fisiologiche che patologiche [179]. Alcuni risultati preliminari hanno messo in evidenza come questo peptide fosse espresso, insieme al suo recettore, da EC di microcircolo cerebrale di ratto e fosse in grado di stimolarne l'auto-organizzazione in vitro a formare strutture capillaro-simili [38]. Ciò porterebbe a considerare la possibilità che U-II possa essere incluso nella classe dei fattori “non classici” di regolazione dell'angiogenesi.

Scopo della tesi è stato quindi valutare se effetti dello stesso tipo siano osservabili anche in diverse popolazioni di EC vascolari umane e caratterizzare i meccanismi d'azione attraverso cui il peptide stimola il processo angiogenico, utilizzando modelli *in vitro*.

Capitolo 3 MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE DI CELLULE ENDOTELIALI IN VITRO

3.1.1 Modello sperimentale

Sono state utilizzate cellule endoteliali umane primarie delle vene safena (HSVEC – Human Saphenous Vein Endothelial Cells) e giugulare (HJVEC – Human Jugular Vein Endothelial Cells), isolate direttamente da biopsie di vasi sanguigni provenienti dalla Chirurgia Vascolare dell'Università di Padova da pazienti non infartuati o ipertesi, della vena ombelicale (HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells), ottenute da cordone ombelicale, e di aorta (HAEC – Human Aorta Endothelial Cells), acquistate dalla ditta Cambrex BioScience (Walkersville, MD, USA). Per nominarli unitariamente, i 4 tipi cellulari considerati sono stati raggruppati nell'unica sigla hEC (human Endothelial Cells).

3.1.2 Isolamento delle cellule endoteliali

Dopo la resezione, i campioni sono stati posti in terreno per cellule endoteliali (EBM) e ripetutamente lavati con tampone fosfato (PBS) e 1% di antibiotico. Sono stati rimossi con attenzione il tessuto adiposo, i coaguli di sangue ed eventuali altre impurità. Dopo un ulteriore lavaggio si è proceduto con l'isolamento delle cellule endoteliali: è stato tagliato longitudinalmente il vaso ed è stato posto in una Petri con il lume rivolto verso la plastica e a contatto con una soluzione allo 0.1% di collagenasi di tipo II (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), nel caso invece della vena ombelicale le estremità del cordone ombelicale sono state pinzate dopo aver riempito il vaso con la stessa

soluzione di collagenasi ed infine il tutto è stato incubato a 37°C. Dopo 20 minuti è stato lavato con PBS il tessuto digerito, è stata recuperata la sospensione cellulare ed è stata centrifugata a 480 g a 4°C per 5 minuti. Il pellet ottenuto è stato risospeso in terreno EBM completo con l'aggiunta del 10% di siero bovino fetale (FCS), 100IU/mL di penicillina, 100mg/mL di streptomicina e 1% di UltroSer (Ciphergen, Fremont, CA, USA), quindi le cellule sono state seminate in piastre pre-condizionate con fibronectina (1µg/cm²) (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) e incubate a 37°C al 5% CO₂ e 95% umidità.

Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate dalla piastra, raccolte e incubate per 30 min a 4°C con Dynabeads M-450 (Oxid Italy, Milano, Italia) rivestite con anticorpo anti-human CD31 per separare le cellule endoteliali mediante immunoseparazione magnetica [180]. Il fenotipo endoteliale delle cellule isolate è stato confermato attraverso colorazione immunocitochimica utilizzando anticorpo policlonale rabbit anti-human von Willebrand Factor (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). In tutti gli esperimenti sono state utilizzate colture di cellule endoteliali dal secondo al sesto passaggio.

3.1.3 Mantenimento delle cellule endoteliali in coltura

Durante l'espansione, le cellule sono state fatte crescere con il relativo terreno per cellule endoteliali EBM (PBI International, Milano, Italia), con aggiunta di siero fetale bovino (FCS) al 10%, supplemento di crescita endoteliale (ECGS) 0,4%, eparina 0,4%, il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) 0,1 ng/ml, il fattore di crescita fibroblastico (FGF) 1 ng/ml, idrocortisone 1 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml e anfotericina-B 50 µg/ml. Il terreno e i reagenti come FCS, antibiotici, PBS, acido etilendiamminotetracetico (EDTA), tripsina, trypan blue, dimetilsolfossido (DMSO) sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA. Le cellule sono state mantenute in incubatore ThermoForma (Mariette, OH, USA) a 37°C e al 5% di CO₂, mentre tutte le operazioni effettuate con esse sono avvenute in sterilità lavorando sotto cappa a flusso laminare verticale Steril-VBH (Steril, Milano, Italia).

3.2 REAL TIME RT-PCR

Per individuare l'espressione dell'mRNA di VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, U-II, UT e i cambiamenti che avvengono nelle diverse condizioni sperimentali, le hEC sono state raccolte dopo trattamento o meno con U-II (Phoenix Europe, Karlsruhe, Germania) a tempi diversi, l'RNA totale estratto e purificato mediante il kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Durante l'estrazione dell'RNA è stato effettuato un trattamento con DNAsi per rimuovere contaminazioni di DNA genomico. L'RNA totale è stato poi quantificato mediante lettura allo spettrofotometro Lambda 11 (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) ed infine retrotrascritto in cDNA [181]. Campioni di RNA processati in assenza della Retro Trascrittasi sono stati utilizzati come controlli negativi per verificare l'assenza di DNA contaminante. Le reazioni di Real Time RT-PCR sono state tutte effettuate mediante l'impiego dell'iCycler iQTM Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia), utilizzando i primer e la sonda riportati in Tabella 3.

GENE	ACC. NUMBER	BP	PRIMERS
GAPDH F1 GAPDH R69	NM_002046.3	69	5'-CTC-TCT-GCT-CCT-CCT-GTT-CGA-C-3' 5'-TGA-GCG-ATG-TGG-CTC-GGC-T-3'
U-II F14 U-II R214	NM_006786	201	5'-CGT-CTA-TCT-TGT-GGC-GAT-CA-3' 5'-CCC-AGC-ATC-TCT-GGC-AGT-AT-3'
UT F157 UT R353	NM_018949.1	197	5'-ACC-ATT-GGG-ACT-CTG-CTG-TC-3' 5'-AAG-TGC-CAC-TCC-TTG-GTC-AC-3'
VEGF F1075 VEGF R1147	NM_001025368	73	5'-GCC-TTG-CTG-CTC-TAC-CTC-CAC-3' 5'-GAT-TCT-GCC-CTC-CTC-CTT-CTG-C-3'
VEGFR-1 F2491 VEGFR-1 R2683	NM_002019	192	5'-GTT-CAA-GGA-ACC-TCG-GAC-AA-3' 5'-GCT-CAC-ACT-GCT-CAT-CCA-AA-3'
VEGFR-2 F2527 VEGFR-2 R2699	NM_002253.1	143	5'-GTT-CTT-GGC-TGT-GCA-AAA-GT-3' 5'-GTC-TTC-AGT-TCC-CCT-CCA-TT-3'
AM F189 AM R295 AM Probe218	NM_001124.1	107	5'-GGG-TTC-GCT-CGC-CTT-CTT-A-3' 5'-GCA-GTT-CCC-TCT-TCC-CAC-GA-3' 5'-CCG-CTC-GGT-TGG-ATG-TCG-CGT-CGG-A-3'
ET-1 F856 ET-1 R1009	XM_043856	154	5'-AAG-ACA-AAC-CAG-GTC-GGA-GA-3' 5'-TGG-AGG-CTA-TGG-CTT-CAG-AC-3'

Tabella 3: sequenze senso, antisenso e sonda usate come primers per la Real Time RT-PCR.

Il programma di PCR prevede uno step di denaturazione a 95°C per 3 minuti, 40 cicli a due step di amplificazione (95° per 15 secondi e l'estensione di annealing a 60°C per 30 secondi) e una curva di melt (60-90°C con un aumento di 0,5°C ogni 10 secondi). Per

determinare l'espressione genica di AM è stato applicato lo stesso protocollo omettendo però la curva di melt, dato che è stata utilizzata una sonda TaqMan.

Mediante l'analisi delle curve di amplificazione e' possibile effettuare una misurazione dell'espressione relativa: durante la fase esponenziale, fissata una soglia del segnale di fluorescenza, si è proceduto a valutare il numero di cicli di PCR necessari a raggiungere tale soglia ("ciclo soglia" o Ct). I valori di Ct diminuiscono linearmente all'aumentare della quantità di mRNA target e vengono quindi usati per calcolare l'espressione relativa dell'mRNA, conformemente al modello matematico di quantificazione proposto da Pfaffl [182]. Secondo questo metodo, la variazione indotta da U-II nell'espressione dell'mRNA dei geni target rispetto a campioni di controllo non stimolati, viene stimata calcolando per ciascun gene analizzato l'espressione genica relativa [183]. Quando il gene è sotto o sovra-regolato per effetto dello stimolo applicato, questo parametro è significativamente minore o maggiore a 1,0, rispettivamente. Tutti i campioni sono stati amplificati in doppio e l'espressione di GAPDH (Gliceraldeide 3-Fosfato Deidrogenasi) è stata utilizzata come riferimento per normalizzare i dati. La specificità dell'amplificazione viene testata alla fine di ciascuna corsa attraverso l'analisi della curva di melt, usando l'I-Cycler software 3.0.

3.3 IMMUNOCITOCHIMICA

L'immunocitochimica (ICC) è stata usata per verificare l'espressione nelle hEC di specifiche proteine quali U-II, UT, VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2, e i cambiamenti che questa subisce nelle diverse condizioni sperimentali.

Le hEC sono state seminate su piastre da 24 pozzetti ($2 \cdot 10^4$ cell/pozzetto), aventi, per ogni pozzetto, un vetrino adagiato sul fondo e pre-condizionato con fibronectina. Dopo 18 ore di incubazione con terreno contenente o meno U-II (10^{-8} M), le hEC sono state fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS, trattate con Triton X-100 allo 0,1% in PBS e incubati con soluzione "blocking", costituita di albumina di siero bovino (BSA) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) al 3% in PBS, per un'ora a temperatura ambiente sotto agitazione. Rimossa la soluzione "blocking" le hEC sono state incubate per tutta la notte a 4°C con gli anticorpi primari riportati in Tabella 4.

ANTICORPO	SPECIE	DILUIZIONE	DITTA PRODUTTRICE	CODICE IDENTIFICATIVO
IgG policlonale anti-human U-II	Goat	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc.	(C-19): SC-21095
IgG policlonale anti-human GPR14	Goat	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc.	(N-15): SC-10190
IgG policlonale anti-human VEGF	Rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.	(147): SC-507
IgG policlonale anti-human Flt-1	Rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.	(H-225): SC-9029
IgG monoclonale anti-human KDR/Flk-1, clone CH-11	Mouse	1:200	Millipore (Milano, Italia)	05-554

Tabella 4: anticorpi primari utilizzati e loro rispettive diluizioni.

Dopo 3 lavaggi con PBS, le cellule sono state incubate per 30 min a temperatura ambiente sotto agitazione con gli anticorpi secondari riportati in Tabella 5.

ANTICORPO	SPECIE	DILUIZIONE	DITTA PRODUTTRICE	CODICE IDENTIFICATIVO
IgG HRP-coniugato	Mouse anti-goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.	SC-2354
IgG HRP-coniugato	anti-mouse/rabbit	Pronto all'uso	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA)	MP-7500

Tabella 5: anticorpi secondari utilizzati e loro rispettive diluizioni.

Dopo 3 lavaggi con PBS, i preparati sono stati trattati con DAB – diamminobenzidina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) per visualizzare il prodotto di reazione. Entro pochi minuti sono state osservate le variazioni di colore delle cellule che da incolore diventano scure e la reazione è stata bloccata con PBS. I vetrini infine sono stati montati in glicerolo su vetrino portaoggetti e i preparati osservati al microscopio ottico. In alcune prove le cellule sono state sottoposte a breve colorazione con ematossilina in modo da contrastare i nuclei. Per verificare la specificità della reazione, alcuni campioni (controlli negativi) sono stati processati allo stesso modo omettendo però l'anticorpo primario.

3.4 SAGGIO DI ANGIOGENESI IN VITRO

Per valutare la capacità delle hEC di auto-organizzarsi a formare strutture capillaro-simili, le cellule sono state seminate su Matrigel (Matrigel™ Basement Membrane Matrix, Becton-Dickinson Labware, Bedford, MA, USA), estratto solubile di membrana basale di sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm, tumore che produce in grande quantità proteine della matrice extracellulare (laminina, collagene IV, entactina ed eparan solfato) [184] e fattori di crescita essenziali per la crescita del tumore stesso (TGF- β , FGF, tPA) [185]. Matrigel, gelificando a temperatura ambiente, riproduce una matrice simile alla matrice extracellulare dei tessuti viventi.

A tal fine, viene lasciato in ghiaccio a 4°C la notte prima dell'utilizzo e, una volta distribuito su una piastra a 24 pozzetti (50 μ l), viene posto 30 minuti in incubatore a 37°C per gelificare. Le hEC sono state seminate ($2,5 \cdot 10^4$ cellule per cm²) con terreno basale EBM senza fattori di crescita, in presenza di 1% di antibiotico-antimicotico e 2% di FCS e contenente 50 ng/ml di FGF-2 (Preprotech, Londra, UK), utilizzato come controllo positivo, o U-II (10^{-12} – 10^{-7} M) in presenza o meno di appropriati inibitori farmacologici (10^{-12} – $5 \cdot 10^{-6}$ M), indicati in Tabella 6.

INIBITORE	PROTEINA INIBITA	IC ₅₀	DITTA PRODUTTRICE
Palosuran	UT	$5 \cdot 10^{-9}$ M	Fornito da dr. M. Clozel (Actelion Pharmaceuticals Ltd., Allschwil, Svizzera)
U73122	Fosfolipasi-C (PL-C)	$5 \cdot 10^{-8}$ M	Biomol (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germania)
Calphostin C	PKC	$5 \cdot 10^{-8}$ M	Biomol
PD98059	ERK1/2	$2 \cdot 10^{-6}$ M	Biomol
SB203580	P38-MAPK	$7 \cdot 10^{-8}$ M	Biomol
LY294002	PI3K	$1,4 \cdot 10^{-6}$ M	Biomol

Tabella 6: inibitori farmacologici.

Dopo 18 ore di incubazione a 37°C le cellule sono state fissate in PFA al 4% e osservate al microscopio rovesciato a contrasto di fase (DM-IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germania). Sono state prese delle immagini TIFF (cinque campi per ogni pozzetto: i quattro quadranti e il centro) con il fine di valutare i parametri dimensionali (area percentuale coperta dalle cellule endoteliali e lunghezza totale della rete cellulare per campo) e topologici (numero di maglie chiuse e punti di ramificazione per campo)

(Figura 8) mediante il QWin image analysis software (Leica Microsystems, Cambridge, UK) che consente di studiare la rete capillaro-simile formata dalle cellule [109]. I valori ottenuti sono stati espressi come percentuale rispetto al valore di controllo.

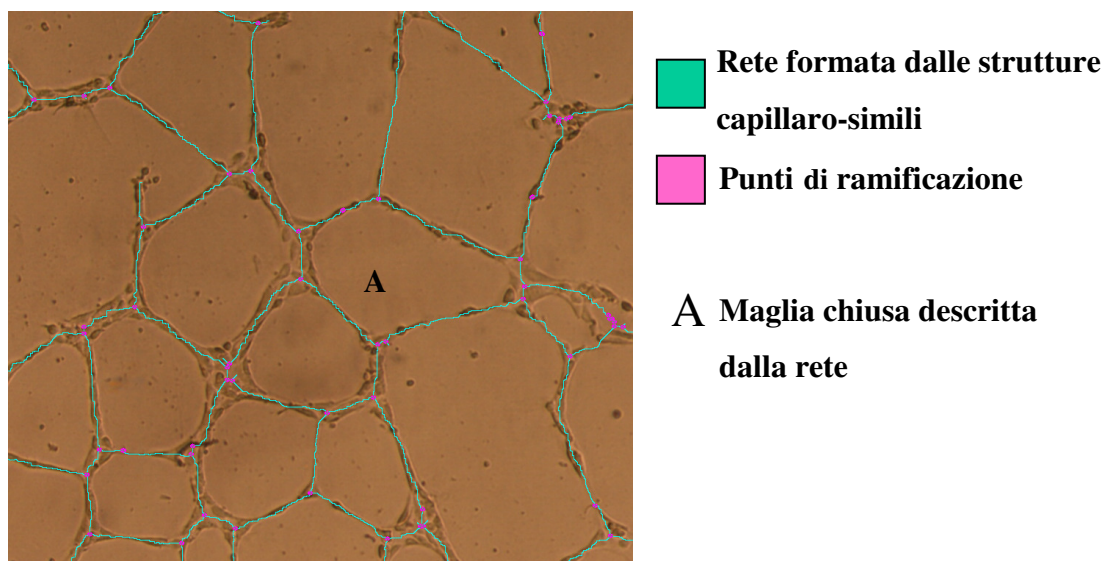


Figura 8: immagine esplicativa dei parametri dimensionali e topologici analizzati. Ing. 200x.

3.5 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

Le hEC sono state seminate ($2 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto) in una piastra da 24 pozzetti e sono state fatte crescere con terreno EBM. Dopo 24 ore di incubazione, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco contenente 50ng/mL di FGF-2 (controllo positivo) o addizionato di U-II (10^{-12} M - 10^{-7} M) e/o Palosuran (10^{-6} M). Dopo 6 ore di incubazione le cellule proliferanti sono state identificate con 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Labeling and detection Kit I (Roche Diagnostic, Mannheim, Germania) secondo le istruzioni fornite dal produttore. Brevemente, la BrdU (10^{-5} M) è stata somministrata alle cellule e ivi lasciata per altre 12 ore (la durata complessiva del test è stata dunque di 18 ore). Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate con una soluzione a base di etanolo (15 mM glicina in etanolo) per 30 minuti a 4°C e poi incubate con un anticorpo monoclonale fluoresceinato anti-BrdU, diluito 1:10, per 45 minuti a 37°C in incubatore. Infine si è utilizzato il 4',6'-diamine-2'-phenylindole DAPI (Boehringer, Mannheim, Germania) per visualizzare la totalità dei nuclei cellulari. Le immagini in fluorescenza sono state acquisite ad un ingrandimento di 10X (cinque campi per ogni pozzetto: i quattro quadranti e il centro) utilizzando una fotocamera digitale (DFC 480, Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) collegata ad un microscopio rovesciato DM-

IRE2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) e salvate come immagini TIFF. La stima dell'incorporazione di BrdU è stata effettuata attraverso un'analisi di immagine con il computer valutando la frazione di nuclei che hanno incorporato BrdU rispetto al numero totale di nuclei [186]. Per l'analisi è stato utilizzato il QWin image analysis software.

3.6 SAGGIO DI MIGRAZIONE CELLULARE

Sono state utilizzate delle camere di Boyden modificate per pozzetti da 24 con al fondo una membrana di policarbonato con pori di dimensione 8 μm (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA). Le HUVEC sono state raccolte e seminate ($5 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto) nel compartimento superiore dell'insert. Il compartimento inferiore invece è stato trattato con chemoattrattori quali VEGF (50 ng/ml) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) e U-II (10^{-12} – 10^{-6} M). Dopo 6 ore di incubazione a 37°C, le cellule che non sono migrate attraverso la membrana, sono state eliminate con un cotton-fiok. La membrana è stata poi fissata con PFA al 10% per 30 minuti a temperatura ambiente, colorata con DAPI e il numero di cellule migrate sono state contate. Come controllo negativo è stato usato EBM al posto del chemoattrattore.

3.7 MISURA DEL CA^{2+} INTRACELLULARE

Le HUVEC sono state seminate ($1,3 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto) su 10 mm FluoroDish glass bottom Petri dishes (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) e coltivate in EBM. Dopo 24 ore le cellule sono state lavate con HEPES Tyrode's buffer (MHTB: 129 mM NaCl, 8,9 mM NaHCO_3 , 0,3 mM KH_2PO_4 , 0,8 mM MgCl, 5,6 mM destrosio e 10 mM Hepes, pH 7,4) e incubate nello stesso tampone contenente l'indicatore Fluo-3 AM (10 μM) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) per 45 minuti a 37°C e in tampone da solo per ulteriori 15 minuti per permettere la de-esterificazione del colorante. Dopo lavaggio, le HUVEC sono state poi incubate in terreno basale con aggiunta o meno di Palosuran (10^{-6} M) o U73122 (10^{-6} M). Dopo 30 minuti la piastra è stata osservata al microscopio a fluorescenza (DM-IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) e l'immagine della fluorescenza basale (eccitazione = 488 nm; emissione = 525 nm) di un campo qualsiasi è stata acquisita ad un ingrandimento 10X utilizzando una fotocamera digitale e salvata come immagine TIFF. Le cellule sono state poi trattate con U-II (10^{-6} M, 10^{-8} M, 10^{-12}

M) e le immagini in fluorescenza degli stessi campi sono state acquisite ogni 30 secondi. L'intensità di fluorescenza esibita dalle singole cellule è stata misurata tramite analisi d'immagine con ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). I dati sono stati espressi come rapporto tra il valore medio misurato a ciascun tempo ed il valore di fluorescenza basale.

3.8 WESTERN BLOT

L'analisi del western blotting è stata utilizzata per valutare i livelli proteici della forma fosforilata di ERK1/2, p38 e focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in risposta alla stimolazione con U-II (10^{-8} M) a 5 e 10 minuti. Le cellule sono state lisate con un buffer di lisi contenente 0,6% TritonX-100, 0,15M NaCl, 10mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA più inibitore di proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Dopo la centrifugazione a 13000 rpm per 10 minuti, il surnatante raccolto è stato sottoposto a quantificazione utilizzando QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Le proteine (50 mg) sono state quindi caricate su SDS-PAGE al 7.5% e trasferite su una membrana di nitrocellulosa con porosità 0.2 μ m (GE Healthcare, Amersham Bioscience, Milano, Italia). Per poter riconoscere il peso molecolare delle proteine è stato utilizzato un marker di peso molecolare 10-250 KDa (Bio-Rad Laboratories Inc., Milano, Italia). Dopo aver bloccato i siti aspecifici con una soluzione di latte in polvere al 5% in PBS e Tween 20 allo 0.1%, la membrana è stata incubata dapprima con gli anticorpi primari delle forme fosforilate delle proteine in esame e successivamente è stata strippata e re-incubata con gli anticorpi primari delle forme totali delle stesse proteine. I vari anticorpi usati sono indicati in Tabella 7 e Tabella 8.

ANTICORPO	SPECIE	DILUIZIONE	DITTA PRODUTTRICE	CODICE IDENTIFICATIVO
IgG monoclonale anti-human GAPDH	Mouse	1:400	Millipore	MAB374
IgG policlonale Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr 202/Tyr 204)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology	#9101
IgG policlonale p44/42 MAPK (ERK1/2)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology	#9102
IgG policlonale Phospho-p38 MAP Kinase (Thr 180/Tyr 182)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology	#9211
IgG policlonale p38 MAP Kinase	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology	#9212
IgG policlonale anti-phospho-FAK (Tyr 576)	Rabbit	1:700	Millipore	07-157
IgG policlonale anti-FAK	Rabbit	1:700	Millipore	06-543

Tabella 7: anticorpi primari utilizzati.

ANTICORPO	DIRETTO PER	DILUIZIONE	DITTA PRODUTTRICE	CODICE IDENTIFICATIVO
Goat HRP IgG	Anti-Rabbit	1:700	Millipore	AP132P
Rabbit HRP IgG	Anti-Mouse	1:1000	Dako	P0260

Tabella 8: anticorpi secondari utilizzati.

Il segnale è stato rivelato con Enhanced Chemiluminescence Kit (ECL Plus Kit, GE Healthcare Amersham Bioscience, Milano, Italia). I livelli di proteina attiva e totale sono stati quantificati con ImageJ software e i dati densitometrici sono stati espressi come rapporto tra la forma attiva e la forma totale della proteina.

3.9 STATISTICA

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte in triplicato e i risultati sono espressi come media $\pm$ SEM. I dati del matrigel, della proliferazione, della migrazione

cellulare o del western blot sono stati analizzati con One-way analysis of variance (ANOVA) seguita dal test di Dunnett per comparare diversi gruppi di trattamento rispetto a quello di controllo. Analoga procedura è stata applicata ai dati relativi alla misura del Ca^{2+} intracellulare per comparare i risultati ai vari tempi con il valore basale di fluorescenza. I valori di espressione genica relativa ottenuti dall'analisi della RT-PCR sono stati comparati con il valore di riferimento 1,0 usando t-test di Student ad un campione. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software GraphPad PRISM (versione 3.03; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Capitolo 4 RISULTATI

4.1 ESPRESSIONE DEL SISTEMA U-II E AZIONE DEL PEPTIDE

4.1.1 Fenotipo e preparazione delle cellule

Le analisi di immunocitochimica dimostrano come le popolazioni cellulari ottenute dopo immunoseparazione con Dynabeads M-450 rivestite con l'anticorpo umano anti-CD31, risultano composte di EC, in quanto più del 95% di esse esprimono, oltre al CD31, il fattore di von Willebrand (Figura 9A). Inoltre risultano espressi anche VEGF e i suoi recettori VEGFRs (Figura 9B-D).

L'espressione di UT è stata osservata in tutte e quattro le popolazioni di EC considerate per lo studio (HSVEC, HJVEC, HUVEC e HAEC), mentre il peptide U-II è stato identificato solo nelle HAEC e HUVEC, cioè nei vasi di maggior calibro. La presenza, o l'assenza, di questi markers è stata confermata tramite RT-PCR come si può vedere dalla corsa elettroforetica su gel di agarosio fornita in Figura 10A, insieme alle immagini di immunoreattività per le proteine corrispondenti (Figura 10B-C).

Da un punto di vista funzionale alcune eterogeneità si osservano tra i quattro tipi di popolazioni endoteliali considerate. La Tabella 9 mostra i risultati a livello basale dei saggi condotti in termini di proliferazione e morfogenesi per le EC in esame a livello basale e come si può osservare tutte le popolazioni di EC non trattate presentano un grado di proliferazione simile. Le HAEC manifestano tuttavia un potenziale angiogenico basale minore rispetto le altre EC analizzate, come suggeriscono i valori dei parametri morfometrici che descrivono l'estensione e complessità della rete di strutture capillaro-simili generata su Matrigel.

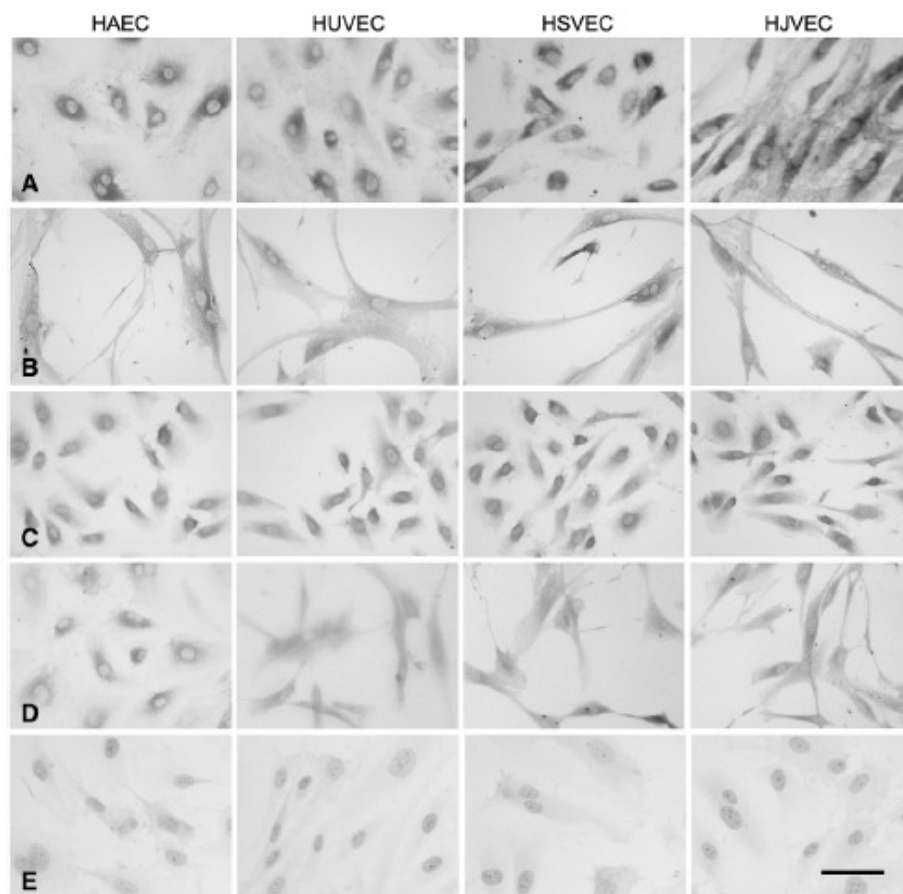


Figura 9: markers espressi dalle EC vascolari umane in coltura. A: visualizzazione immunocitochimica del fattore di von Willebrand. B-D: espressione a livello proteico di VEGF, VEGFR-2 e VEGFR-1, rispettivamente. E: controllo negativo (ottenuto omettendo l'anticorpo primario). Una debole colorazione con ematossilina è stata applicata per permettere una più facile identificazione delle cellule. Scala = 70 μ m.

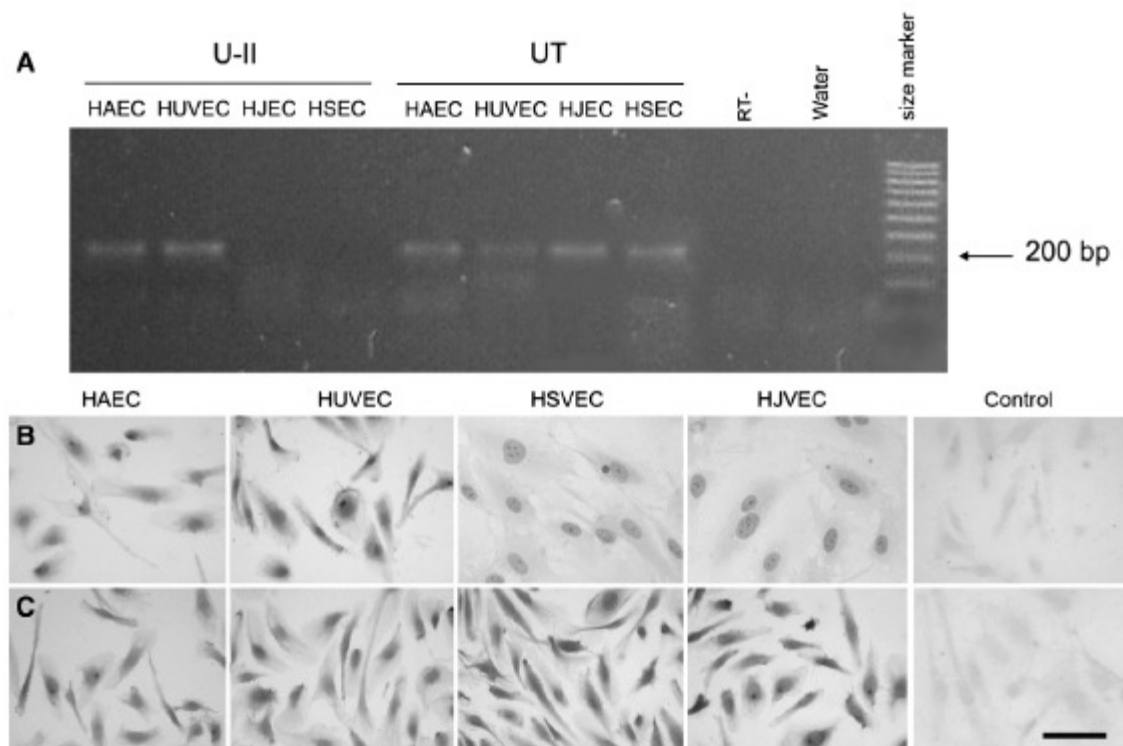


Figura 10: Espressione del sistema di U-II nelle EC vascolari umane. A: gel di agarosio all'1,5% colorato con etidio bromuro per visualizzare gli amplificati di cDNA con primers specifici per U-II umana (lato sinistro) e UT (lato destro) a partire da RNA delle quattro popolazioni considerate. Essendo il gene di UT privo di introni, è stato anche analizzato un controllo negativo (RT-) per verificare l'assenza di qualsiasi contaminazione genomica. Ciò è stato ottenuto processando un campione di RNA totale in assenza della retrotrascrittasi inversa. B-C: visualizzazione immunocitochimica di U-II e UT nelle cellule studiate. Il controllo prova l'assenza di immunoreattività ad U-II ed UT in assenza di anticorpo primario nelle HUVEC utilizzate come esempio. Come si osserva, il pattern di espressione a livello proteico è supportato a livello genico. Scala = 70 μ m.

Feature	HSVEC	HJVEC	HUVEC	HAEC	Statistics (One-way ANOVA)
% of BrdU-positive cells (n=9)	17.3 $\pm$ 0.69	17.6 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 1.3	16.9 $\pm$ 1.9	F=0.273 (p=0.84)
Matrigel assay (n=9):					
Area%	15.1 $\pm$ 1.3	19.0 $\pm$ 1.7	16.5 $\pm$ 1.7	9.7 $\pm$ 0.50 *	F=8.00 (p<0.05)
Length (mm)	6.0 $\pm$ 0.13	6.9 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.20 *	F=12.79 (p<0.05)
Meshes (No./field)	0.42 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.15	1.0 $\pm$ 0.34	0.33 $\pm$ 0.08	F=3.52 (p<0.05)
Branching points (No./field)	34.6 $\pm$ 2.8	54.9 $\pm$ 4.5	35.1 $\pm$ 3.1	20.7 $\pm$ 1.90 *	F=19.16 (p<0.05)

Tabella 9: Grado di proliferazione e caratterizzazione morfometrica della rete capillaro-simile generata su Matrigel in condizioni basali. I valori sono espressi come media $\pm$ sem. *=p<0,05 (Tukey test).

4.1.2 Effetti di U-II sull'angiogenesi in vitro

Una volta seminate su Matrigel, HSVEC, HJVEC, HUVEC e HAEC si distribuiscono e si allineano tra loro a formare tubuli ramificati e anastomizzati con giunzioni multicentriche che danno luogo in 18 ore ad una rete di strutture capillaro-simili. Quando al terreno di coltura vengono aggiunti U-II o FGF-2 si osserva un chiaro effetto

morfogenico con conseguente formazione di una rete di maggiore complessità (Figura 11C). L'analisi d'immagine (Figura 11A-B) conferma queste osservazioni, dimostrando che U-II, a partire dalla dose di 10^{-8} M aumenta significativamente sia i parametri dimensionali (area percentuale coperta dalle EC e lunghezza totale della rete cellulare per campo) che topologici (numero di maglie chiuse e punti di ramificazione per campo) della rete capillaro-simile. L'effetto di U-II 10^{-8} M risulta comparabile a quello ottenuto con FGF-2 alla concentrazione di 50 ng/ml (Figura 11B).

Palosuran, antagonista specifico di UT, alla concentrazione di 10^{-6} M è di per sé inefficace e non modifica l'attività pro-angiogenica di FGF-2. Al contrario, Palosuran è in grado di contrastare l'effetto di U-II, indicando che l'attività pro-angiogenica del peptide è mediata dal legame di U-II con il suo recettore funzionale (Figura 11B).

I risultati inerenti l'effetto del trattamento con U-II sulla proliferazione cellulare sono riassunti in Figura 12A. Come si vede, un moderato ma significativo aumento della percentuale di proliferazione si osserva solo nelle HUVEC a partire da una concentrazione di U-II pari a 10^{-8} M e probabilmente l'effetto osservato nelle HUVEC è imputabile alla derivazione fetale di queste ultime cellule (Figura 12B). Proprio in base al dato di proliferazione le cellule da qui in poi considerate sono state le HUVEC in quanto presentano il più completo quadro di sviluppo angiogenico.

Il saggio di migrazione cellulare conferma ancora una volta l'effetto pro-angiogenico del peptide. Come si osserva dalla Figura 13, un aumento significativo del numero di cellule migrate (pari al 47%) si ottiene dopo stimolazione con U-II 10^{-6} M ed esso è paragonabile a quello indotto da VEGF (50 ng/ml). In entrambi i casi l'effetto del peptide è contrastato da Palosuran (10^{-6} e 10^{-4} M rispettivamente).

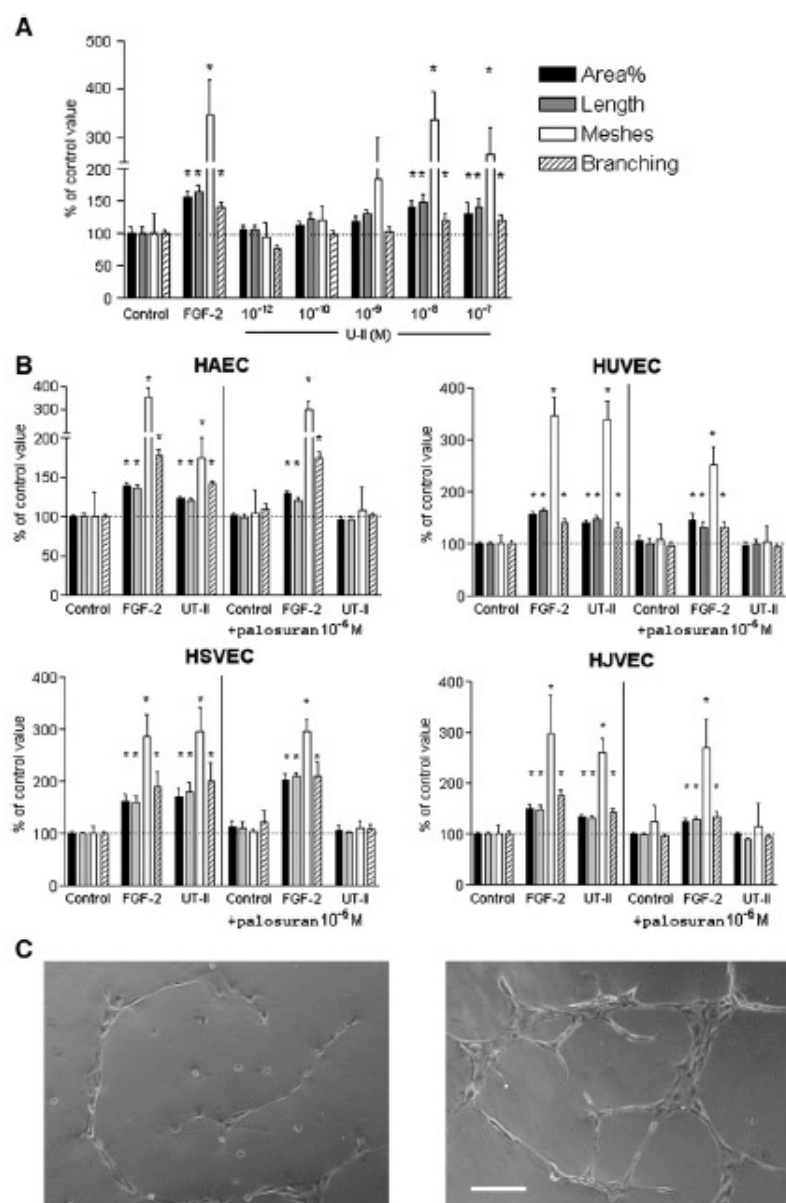


Figura 11: effetto di U-II sulla struttura della rete capillaro-simile formata dalle EC vascolari umane considerate coltivate su Matrigel. A: analisi morfometrica degli effetti sull'auto-organizzazione delle HUVEC a concentrazioni crescenti di U-II. Un aumento significativo della complessità strutturale si osserva dalla dose di 10^{-8} M di U-II. Anche gli altri tipi di EC mostrano una simile relazione dose-risposta (dati non mostrati). B: nelle EC di tutti i letti vascolari testati, il trattamento con U-II 10^{-8} M (così come per FGF-2) aumenta significativamente la complessità della struttura formatasi. * $p < 0,05$ vs il gruppo di controllo. C: immagini a contrasto di fase esemplificative del pattern formato dalle HSVEC in condizioni basali (sinistra) e in presenza di U-II 10^{-8} M (destra). Scala = 200 μ m.

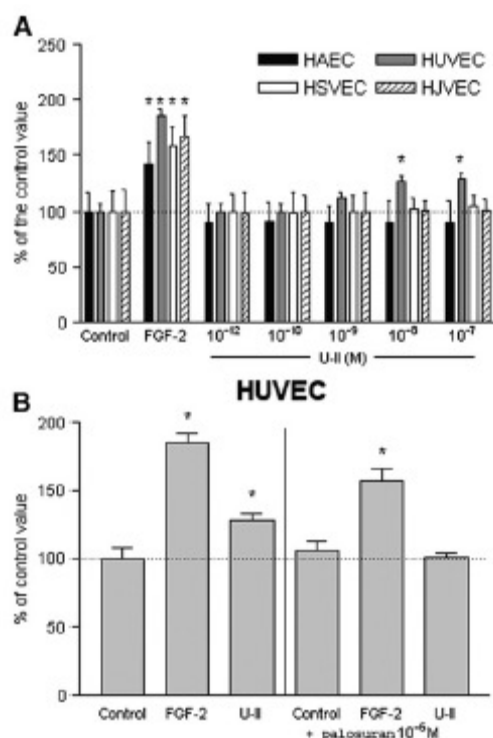


Figura 12: Effetto di U-II e FGF-2 sulla proliferazione delle EC vascolari umane. A: Un effetto stimolatorio significativo si osserva solo nelle HUVEC a partire da una concentrazioni di U-II pari a 10^{-8} M. B: nelle EC U-II 10^{-8} M induce un moderato ma significativo aumento della percentuale di proliferazione (circa 30%) che viene annullato in presenza di Palosuran 10^{-6} M. $^* = p < 0,05$ vs il gruppo di controllo.

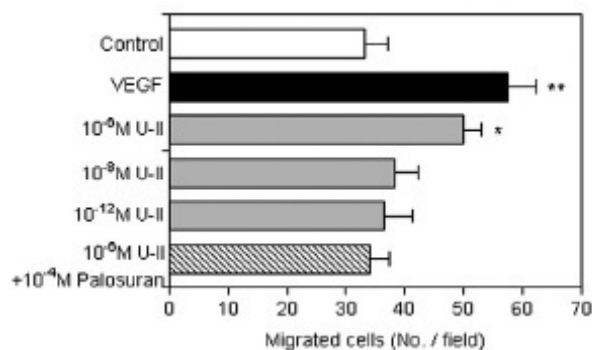


Figura 13: effetto di U-II e VEGF sulla migrazione cellulare. I dati sono espressi come numero medio ($\pm$ sem, n=9) delle cellule migrate per campo.

4.1.3 Effetto di U-II sull'espressione di VEGF e VEGFR

Gli effetti precedentemente osservati sembrano essere di tipo diretto in quanto non risultano associati ad una sovraregolazione del VEGF e dei suoi recettori ai tempi osservati (Tabella 10). Come si può vedere non si ottengono cambiamenti significativi nell'espressione dell'mRNA di questi markers nelle EC trattate con U-II.

	VEGF	VEGFR-2	VEGFR-1
HSVEC	0.99 ± 0.07 ($p=0.890$)	1.07 ± 0.15 ($p=0.653$)	0.95 ± 0.05 ($p=0.347$)
HJVEC	0.91 ± 0.05 ($p=0.110$)	1.17 ± 0.17 ($p=0.347$)	0.95 ± 0.16 ($p=0.763$)
HUVEC	0.97 ± 0.04 ($p=0.475$)	1.05 ± 0.15 ($p=0.747$)	0.93 ± 0.09 ($p=0.459$)
HAEK	1.01 ± 0.10 ($p=0.923$)	1.11 ± 0.13 ($p=0.422$)	0.98 ± 0.11 ($p=0.860$)

Tabella 10: dati di RT-PCR semiquantitativa sull'effetto di U-II 10^{-8} M nelle EC analizzate. I valori espressi come media $\pm$ sem (n=9) rappresentano l'espressione relativa dei campioni trattati rispetto ai campioni di controllo. P deriva da t-test e compara la media con l'ipotetico valore di 1,0.

4.2 MECCANISMO D'AZIONE CHE MEDIA L'EFFETTO PRO-ANGIOGENICO DI U-II

4.2.1 Effetto sul rilascio del Ca^{2+} intracellulare

La formazione di strutture capillaro-simili indotta da U-II risulta inibita, oltre che da Palosuran, anche in presenza di U-II e U73122 (a partire da concentrazioni pari a 10^{-6} M), inibitore specifico di fosfolipasi-C (PL-C) (Figura 14), suggerendo che il legame del peptide al suo recettore innesca l'attivazione del pathway PL-C/ IP_3 .

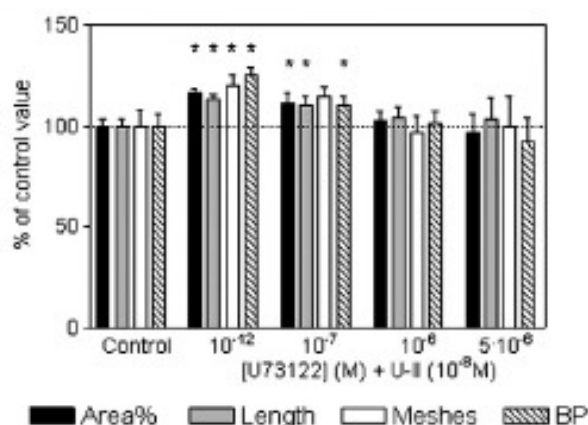


Figura 14: saggio su Matrigel in presenza di concentrazioni crescenti di U73122. * $p < 0,05$.

Osservazioni sul Ca^{2+} citosolico confermano ulteriormente questi ultimi dati. La somministrazione di U-II induce infatti un aumento dose-dipendente della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare, la quale è inibita sia da Palosuran che da U73122 (Figura 15). L'induzione del rilascio del Ca^{2+} è rapida, infatti avviene in circa 2 minuti.

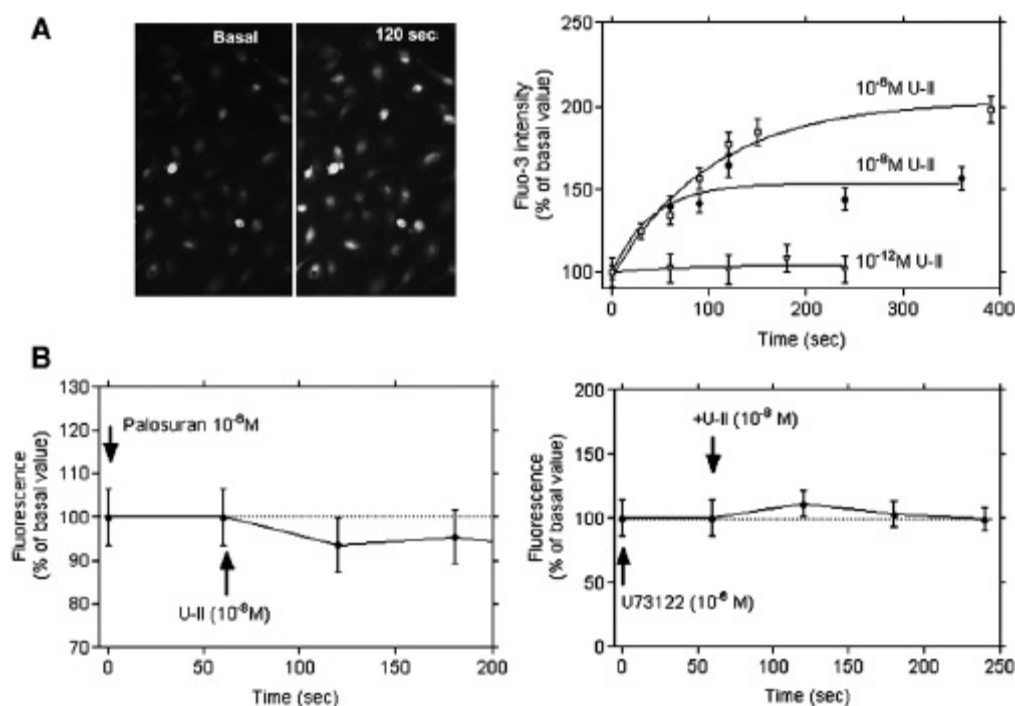


Figura 15: effetto di U-II sulla concentrazione di Ca^{2+} intracellulare. A: le immagini a sinistra illustrano l'aumento della fluorescenza di Fluo-3 (corrispondente ad un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare) dopo somministrazione nelle cellule di U-II 10^{-8} M. Nel pannello a destra si osservano i risultati delle misure dei valori di fluorescenza nel tempo dopo somministrazione di dosi crescenti di U-II nelle HUVEC. I dati sono espressi come media $\pm$ sem dell'intensità di fluorescenza delle singole cellule. B: Sia Palosuran (10^{-6} M) che U73122 (10^{-6} M) annullano l'effetto indotto da U-II (10^{-8} M).

4.2.2 Vie metaboliche coinvolte nell'effetto pro-angiogenico di U-II

I risultati del saggio su Matrigel eseguiti in presenza di specifici inibitori di ERK1/2, p38-MAPK e PI3K sono illustrati in Figura 16. Come si può vedere, PD98059, inibitore selettivo di ERK1/2, a partire da una concentrazione di $5 \cdot 10^{-6}$ M, è in grado di inibire completamente la formazione di strutture reticolari capillaro-simili indotte da U-II, indicando il coinvolgimento di questo pathway nell'effetto del peptide. L'attivazione di ERK1/2 sembra essere PKC-dipendente dal momento che l'effetto di U-II è annullato da Calphostin-C (10^{-6} M). Al contrario, SB203580, inibitore selettivo della p38-MAPK, non inibisce l'effetto pro-angiogenico di U-II nelle HUVEC. Interessante è notare che l'inibizione farmacologica di PI3K, ottenuta con LY294002 (10^{-6} M), ostacola la capacità di U-II di indurre un effetto pro-angiogenico nelle HUVEC, suggerendo che anche il pathway PI3K-dipendente potrebbe essere coinvolto nella regolazione del processo. Gli inibitori da soli non interferiscono con la spontanea auto-organizzazione delle HUVEC seminate su Matrigel e non variano le concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare.

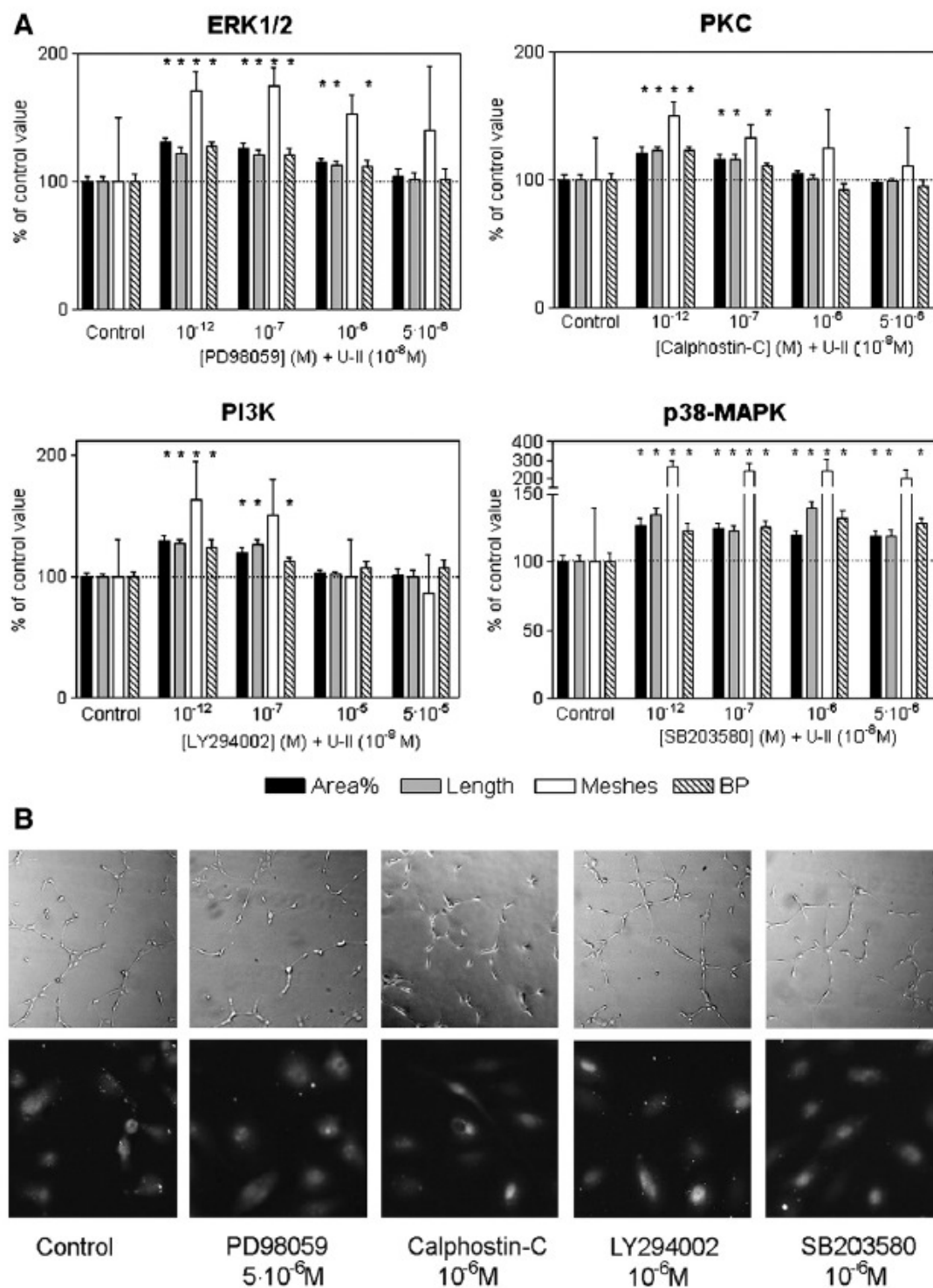


Figura 16: effetto di U-II 10^{-8} M sull'auto-organizzazione delle HUVEC in presenza di concentrazioni crescenti di inibitori di specifici step della cascata di segnali intracellulari. A: l'azione di U-II è annullata su Matrigel dagli inibitori di ERK1/2, PKC e PI3K, ma non dall'inibitore di p38-MAPK. * $p < 0,05$, $n=9$. B: pattern rappresentativo generato su Matrigel (pannello in alto) e immagini della fluorescenza di Fluo-3 (pannello in basso) di HUVEC coltivate in terreno basale o con aggiunti i soli inibitori.

Le analisi di Western blot delle forme fosforilate delle proteine considerate supportano i dati suddetti. La stimolazione delle HUVEC con U-II 10^{-8} M induce un aumento della forma fosforilata di ERK1/2, ma non di p38-MAPK, dopo 10 minuti, confermando che

il pathway che prevede l'attivazione di ERK1/2 è quello principalmente coinvolto nel mediare l'effetto pro-angiogenico di U-II nelle HUVEC. Inoltre i livelli della forma fosforilata della proteina p125^{FAK} (proteina di segnalazione intracellulare associata alla proliferazione, migrazione cellulare, la quale dipende dall'attivazione del pathway PI3K [167]) aumentano già a 5 minuti di stimolazione con U-II, confermando ulteriormente che migrazione e auto-organizzazione delle HUVEC *in vitro* indotte da U-II sono associate ad una attivazione del pathway PI3K-dipendente (Figura 17).

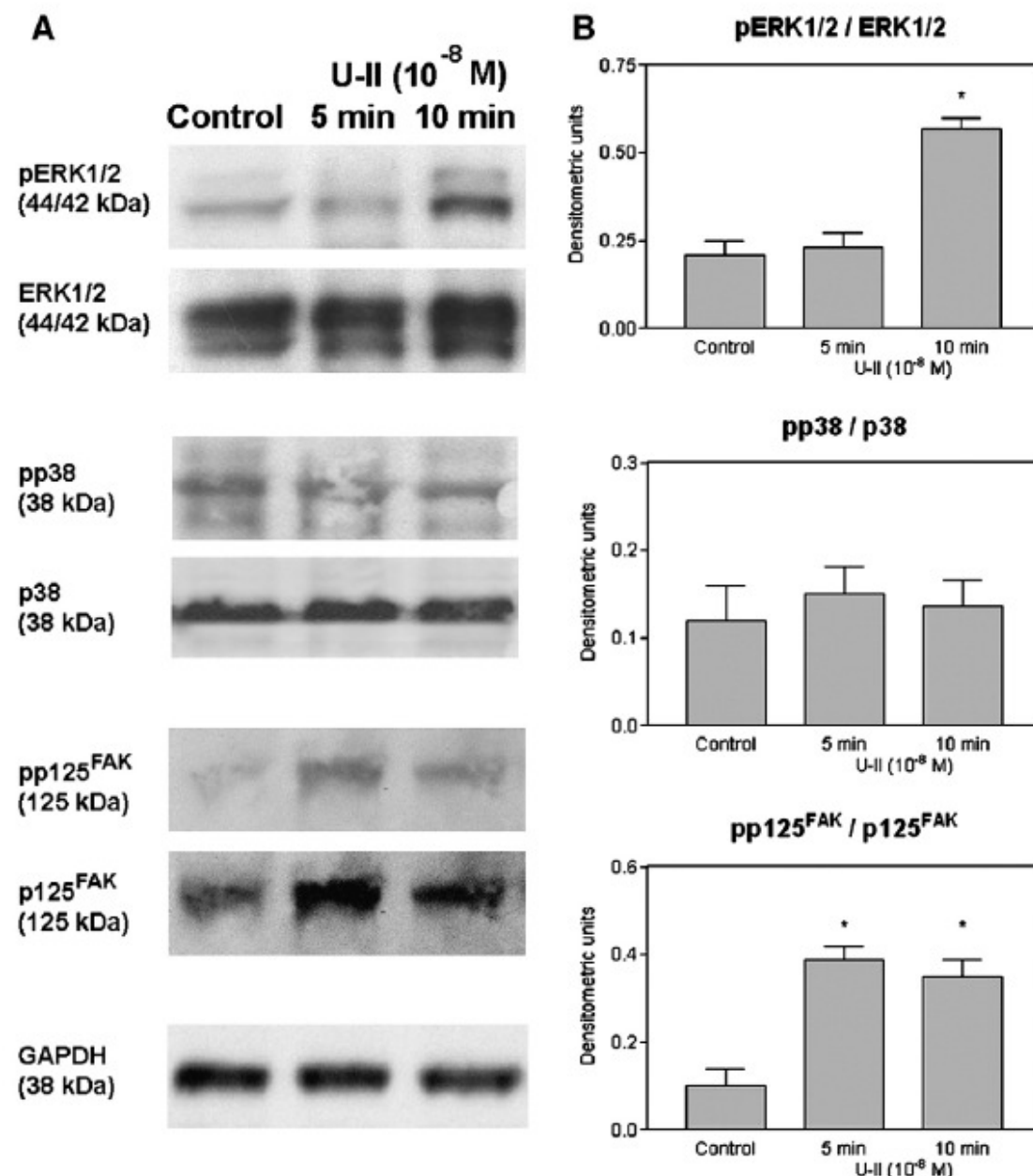


Figura 17: A: western blot eseguito sulle forme fosforilate di ERK1/2, p38-MAPK e p125^{FAK} in HUVEC di controllo e trattate con U-II 10^{-8} M per 5 e 10 minuti. I livelli di GAPDH sono stati usati come controllo. B: le bande sono state quantificate e i dati sono espressi come rapporto tra forma fosforilata e totale della proteina. * $p < 0,05$, $n = 3$.

4.2.3 Espressione di altri fattori pro-angiogenici indotta da U-II

Mediante tecniche di Real Time RT-PCR è stata valutata l'espressione relativa dell'mRNA di ET-1, AM e VEGF dopo stimolazione delle HUVEC con U-II a 3, 6, 18 e 24 ore. I risultati (Figura 18) indicano che dopo 24 ore di trattamento si ottiene una sovra regolazione dell'espressione dei tre fattori considerati.

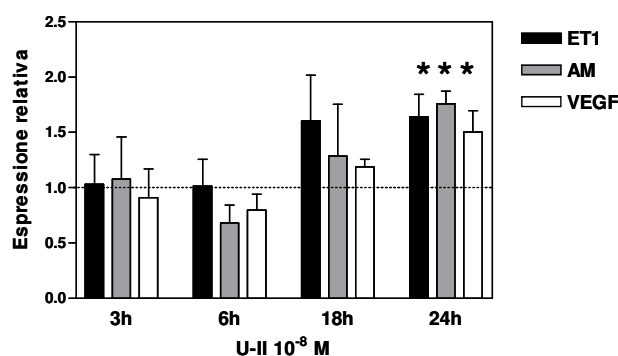


Figura 18: Real Time RT-PCR semiquantitativa sull'effetto di U-II 10^{-8} M nelle HUVEC. I valori, espressi come media $\pm$ sem (n=9), rappresentano l'espressione relativa dei campioni trattati rispetto ai campioni di controllo. P deriva da t-test e compara la media con l'ipotetico valore di 1,0.

Le analisi di Western blot delle proteine considerate supportano i risultati suddetti (Figura 19). Infatti si può osservare un aumento di intensità della banda a 24 ore di stimolazione in tutte le proteine analizzate. Ciò suggerisce una possibile azione indiretta di U-II sull'angiogenesi, cioè innescata anche dalla produzione di altri fattori pro-angiogenici da parte delle EC umane.

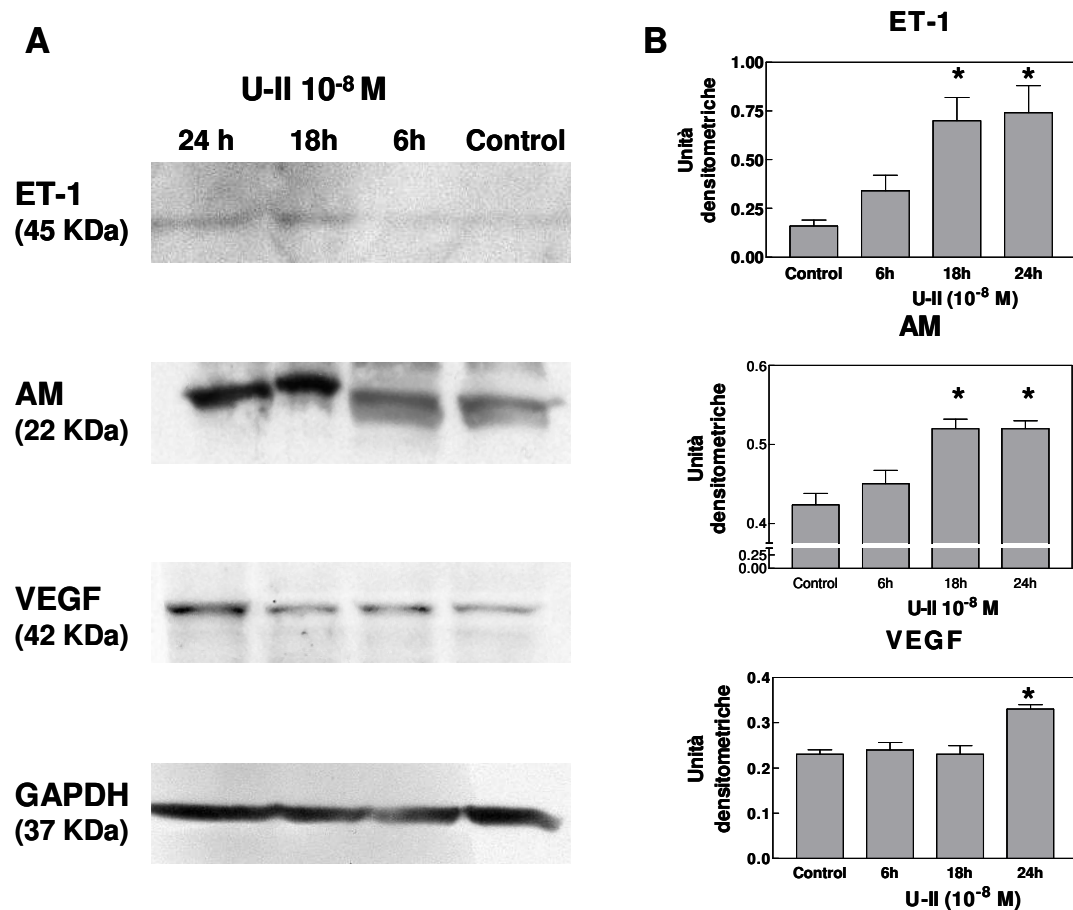


Figura 19: A: western blot eseguito sulle proteine ET-1, AM e VEGF in HUVEC di controllo e trattate con U-II 10^{-8} M per 6, 18 e 24 ore. I livelli di GAPDH sono stati usati come controllo. B: le bande sono state quantificate e i dati sono espressi come rapporto tra proteina e GAPDH. * $p < 0,05$, $n = 3$.

Capitolo 5 **DISCUSSIONE**

Urotensina-II (U-II) è un peptide ciclico la cui isoforma umana (hU-II) è costituita di 11 aminoacidi [5]. hU-II matura è sintetizzata da un precursore più grande, la prepro-U-II, il cui mRNA è stato individuato in vari tessuti [3]. U-II è stata identificata quale ligando endogeno di uno specifico recettore orfano GPR14 [4] che è stato successivamente rinominato UT [13]. Il principale ruolo fisiologico di U-II nei mammiferi si esplica a livello del sistema cardiovascolare, dove il peptide esercita un notevole effetto ipertensivo e vasocostrittore e proprio per questo molti dati suggeriscono che U-II possa essere coinvolta nella regolazione del sistema cardiovascolare in condizioni sia fisiologiche che patologiche. In un precedente lavoro [38] era stato messo in evidenza come U-II fosse espressa, insieme al suo recettore, dalle cellule endoteliali da microcircolo cerebrale di ratto e fosse in grado di stimolarne l'auto-organizzazione *in vitro* ed *in vivo* a formare strutture capillaro-simili. Ciò portava a considerare la possibilità che questo peptide potesse essere incluso nella classe dei fattori “non classici” di regolazione dell'angiogenesi.

Scopo della ricerca è stato quindi valutare se effetti dello stesso tipo fossero osservabili anche in cellule endoteliali vascolari umane di origine venosa (HSVEC, HJVEC e HUVEC) e arteriosa (HAEC) e caratterizzare i meccanismi d'azione attraverso cui U-II stimola il processo angiogenico.

Queste cellule presentano un andamento eterogeneo in termini di espressione del sistema U-II. Analisi di RT-PCR ed immunocitochimica hanno indicato che UT è espresso in tutte le hEC esaminate, mentre U-II è stata identificata solo nelle HAEC e HUVEC. Questi risultati sono in accordo con quelli presenti in letteratura ottenuti sulla localizzazione immunocitochimica di U-II e UT nei tessuti umani [35] dove è riportata la presenza del peptide in specifiche popolazioni di EC come le HUVEC, mentre

l'espressione di UT è diffusa nelle hEC. La localizzazione preferenziale del peptide nelle HAEC e nelle HUVEC potrebbe essere spiegabile alla luce di risultati [187] che indicano come EC da grandi vasi (quali appunto l'aorta e la vena ombelicale) esprimano specificatamente geni coinvolti nella biosintesi e nel rimodellamento della spessa parete vascolare che circonda l'endotelio. L'espressione di U-II da parte di HAEC e HUVEC potrebbe quindi suggerire un ruolo del peptide nei processi di interazione delle EC con le popolazioni cellulari circostanti durante il rimodellamento vascolare.

Una volta testate su Matrigel, le hEC dei quattro letti vascolari studiate presentano alcune eterogeneità anche da un punto di vista funzionale. Infatti, nella situazione basale hanno una diversa tendenza ad auto-organizzarsi, essendo il pattern di strutture capillaro-simili generato dalle HAEC meno complesso rispetto a quello generato dalle hEC venose. A questo proposito è stato riportato che nelle EC di origine venosa i geni correlati alla crescita cellulare, differenziazione e angiogenesi sono in genere sovraespressi [188]. I risultati qui ottenuti potrebbero pertanto riflettere tale differenza nel profilo di espressione genica tra HAEC ed hEC venose.

I risultati del presente lavoro indicano comunque che nelle quattro popolazioni di cellule considerate U-II esercita una significativa attività pro-angiogenica comparabile a quella ottenuta da una delle principali citochine angiogeniche classiche, FGF-2 [189]. Inoltre, l'effetto angiogenico di U-II risulta innescato dal legame del peptide con il suo recettore funzionale UT, dal momento che viene inibito dallo specifico antagonista di UT, Palosuran [35]. Infatti Palosuran non influisce sull'angiogenesi basale, né sull'attività pro-angiogenica di FGF-2, il che esclude la possibilità che l'inibizione osservata sia dovuta ad un effetto tossico non specifico. L'azione pro-angiogenica di U-II, in contrasto rispetto a quella indotta da FGF-2, non è però associata ad un effetto mitogenico nelle hEC derivate da vasi adulti. Questo risultato suggerisce che meccanismi diversi sottostanno all'attività delle due citochine, e fornisce un'ulteriore evidenza al fatto che nelle EC mature segnali intracellulari differenti sono responsabili dei differenti step della cascata angiogenica [135]. Un moderato ma significativo aumento della proliferazione cellulare indotto da U-II si è invece osservato nelle HUVEC. Ciò è in accordo con dati presenti in letteratura [190-191], che evidenziano uno specifico profilo di plasticità e potenziale proliferativo per le EC fetali di origine venosa.

I risultati ottenuti nel presente studio dai saggi di migrazione confermano e caratterizzano ulteriormente U-II quale fattore pro-angiogenico “non classico”. Una

dettagliata conoscenza dei meccanismi molecolari che mediano tale effetto pro-angiogenico potrebbe pertanto essere di particolare rilevanza anche al fine di elaborare eventuali strategie terapeutiche mirate a modularlo. Essendo, tuttavia, scarse le informazioni disponibili in letteratura a tale riguardo, nel presente studio sono stati utilizzati approcci sperimentali atti ad indagare alcuni possibili pathway che regolano il processo angiogenico indotto da U-II nelle EC. Com'è noto, l'isoforma umana del recettore di U-II, UT, appartiene alla classe A della superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) [4]. In molti tipi cellulari il principale pathway di trasduzione del segnale associato ad UT prevede l'attivazione della subunità $G\alpha_{q/11}$ della proteina G trimerica [22], con conseguente attivazione della PL-C, aumento di inositolo trifosfato [23] e mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare [4]. Un aumento di Ca^{2+} intracellulare a seguito di stimolazione con U-II è stato riportato nelle HAEC [24] e i risultati qui presentati forniscono l'evidenza che anche nelle HUVEC il pathway PL-C/IP₃ è il principale meccanismo di trasduzione del segnale attivato da UT. Infatti, la concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} aumenta in seguito alla stimolazione con U-II e sia questo effetto che quello pro-angiogenico sono inibiti dall'inibitore della PL-C, U73122.

Per quel che riguarda le vie metaboliche attivate successivamente, i dati ottenuti dimostrano il coinvolgimento dell'attivazione di PKC e ERK1/2 nel processo di auto-organizzazione delle HUVEC su Matrigel indotto da U-II, suggerendo che il pathway PL-C/PKC/ERK1/2 contribuisce all'effetto pro-angiogenico indotto da U-II nelle HUVEC (Figura 20). Tale risultato è in linea con dati di letteratura che indicano come l'attivazione di ERK1/2 nelle HUVEC sia associata ad altri effetti trofici e metabolici indotti da U-II e rilevanti per il processo angiogenico, quali la stimolazione della proliferazione cellulare e la protezione dall'apoptosi [82].

I risultati degli esperimenti condotti in presenza di LY294002 indicano, tuttavia, che anche PI3K potrebbe essere coinvolta nella regolazione del processo angiogenico indotto da U-II (Figura 20), e l'osservato aumento della fosforilazione di $p125^{FAK}$ in seguito a somministrazione con U-II ulteriormente conferma tale aspetto. Infatti, la fosforilazione tirosinica di questa chinasi (passaggio di segnalazione intracellulare chiave per l'auto-organizzazione delle HUVEC [167]) avviene tramite il pathway dipendente da PI3K. Tale via di segnalazione, come recentemente riportato per un tipo cellulare non endoteliale [192], potrebbe essere semplicemente attivata dall'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare indotta dal legame di U-II ad UT.

E' interessante notare che il pattern di induzione del segnale attivato da U-II nelle HUVEC coinvolge ERK1/2 e PI3K, ma non p38-MAPK. Ciò è in linea con quanto osservato in linee cellulari transfettate per UT [28]; ma, presenta differenze rispetto agli eventi cellulari innescati da U-II nei cardiomiociti dove ERK1/2 e p38-MAPK, ma non PI3K, sono associati con l'attivazione di UT da parte di U-II [29]. Va tuttavia ricordato che i processi di crescita e differenziazione cellulare innescati dall'attivazione di un GPCR sono regolati da un network di segnali intercorrelati, il contributo di ciascuno dei quali differisce non solo in base al tipo di recettore ma anche in base al tipo cellulare [193]. A questo proposito, i risultati ottenuti nel presente studio sulla cascata di segnalazione intracellulare indotta da U-II nelle HUVEC è in accordo con dati precedentemente riportati in letteratura in cui si dimostra il coinvolgimento di ERK1/2, PI3K e p125^{FAK} nella risposta angiogenica di EC al peptide adrenomedullina [167].

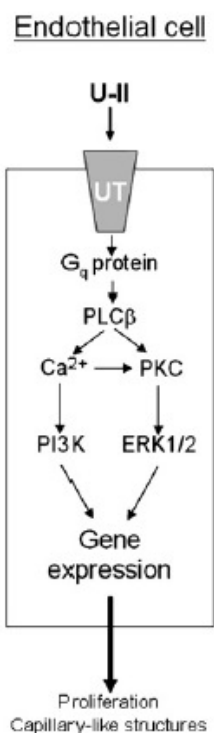


Figura 20: meccanismo d'azione diretto coinvolto nell'effetto pro-angiogenico di U-II [194].

Sempre maggiori dati indicano che la natura della risposta ottenuta da uno specifico fattore angiogenico dipende dalla presenza o assenza di altre molecole regolatorie nel microambiente cellulare [91]. Inoltre i GPCR possono anche attivare indirettamente i pathway precedentemente considerati inducendo la sintesi e il rilascio di fattori di crescita e/o tramite la trans-attivazione di recettori tirosin chinasi [195]. Nei modelli *in vitro* utilizzati in questo studio U-II agisce in sinergia con VEGF il quale risulta espresso insieme ai suoi recettori dalle hEC in coltura. E' noto che VEGF è secreto

dalle EC [196] ed è il principale chemoattrattore per l'auto-organizzazione e la formazione di strutture capillaro-simili nelle EC *in vitro* [197]. I risultati ottenuti indicano che nell'arco temporale in cui si esprime l'osservato effetto pro-angiogenico indotto da U-II (18 ore) non si osservano cambiamenti nell'espressione di questi marker (né tramite RT-PCR né tramite immunocitochimica), a suggerire che l'azione di stimolazione del processo di angiogenesi *in vitro* da parte del peptide può essere diretta, cioè non avvenire tramite sovraregolazione di VEGF e/o dei suoi recettori.

A tempi più lunghi (24 ore) di stimolazione con U-II si è potuto tuttavia osservare (sia a livello di mRNA che di proteina) un aumento dell'espressione di fattori quali VEGF, Endotelina-1 e Adrenomedullina da parte delle EC in coltura. Quest'ultimo risultato è coerente con alcuni dati riportati in letteratura, indicanti un aumento della secrezione di AM nelle hEC vascolari [198] e dell'espressione di ET-1 nelle VSMC di aorta [77] in seguito a stimolazione delle cellule con U-II. Va osservato che tutti questi fattori sono caratterizzati da proprietà pro-angiogeniche note [91]. U-II potrebbe quindi essere in grado di sostenere e amplificare ulteriormente il processo angiogenico anche tramite un meccanismo indiretto, ovvero stimolando nelle EC l'espressione di altri fattori pro-angiogenici.

In conclusione, il lavoro qui presentato suggerisce, pertanto, che U-II, oltre a regolare la funzionalità cardiovascolare, potrebbe anche esercitare un'azione importante sullo sviluppo e il rimodellamento vascolare. In particolare è stato possibile delineare in maniera approfondita il profilo di U-II quale fattore "non classico" di regolazione positiva dell'angiogenesi. Dato che l'aumentata produzione di stimoli angiogenici può condurre a vascolarizzazione anomala, quale quella che si riscontra in importanti patologie come cancro, infiammazione cronica, retinopatia diabetica e disordini cardiovascolari, il lavoro di ricerca svolto costituisce un contributo originale al più ampio campo di ricerca mirato allo sviluppo di strategie atte ad affrontare situazioni patologiche angiogenesi dipendenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77(8):5021-4.
2. Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC, Vaudry H. Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188(2):578-83.
3. Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conolon M, Bern HA, Vaudry H. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(26):15803-8.
4. Ames RS, Sarau HM, Cambers JK, et al. Human urotensin II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401(6750):282-6.
5. Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihrmann I. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursor. *FEBS Lett* 1999;457(1):28-32.
6. Ashton N. Renal and vascular actions of urotensin II. *Kidney Int.* 2006;70(4):624-9. Review.
7. Ong KL, Lam KS, Cheung BM. Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19(1):65-75. Review.

8. Russel FD, Meyers D, Galbraith AJ, Bett N, Toth I, Kearns P, Molenaar P. Elevated plasma levels of human urotensin II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(4):H1576-81.
9. Russel FD, Kearns P, Toth I, Molenaar P. Urotensin II converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(1):209-14.
10. Nakayama K. Furin: A mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 1997;327(Pt 3):625-35.
11. Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265(1):123-9.
12. Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266(1):174-8.
13. Davenport AP and Maguire JJ, *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(3):80-2.
14. Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P, George SR, O'Dowd BF, Docherty JM. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoded receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 1995;29(2):335-44.
15. Protopopov A, Kashuba V, Podowski R, Gizatullin R, Sonnhammer E, Wahlestedt C, Zabarovsky ER. Assignment of the GPR14 gene coding for the G-protein-coupled receptor 14 to human chromosome 17q25.3 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88(3-4):312-3.
16. Yoshimoto T, Matsushita M, Hirata Y. Role of urotensin II in peripheral tissues as an autocrine/paracrine growth factor. *Peptides* 2004;25(10):1775-81.
17. Russel FD. Emerging roles of urotensin II in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 2004;103(3):223-43. Review.

18. Boivin S, Ségalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Fournier A, Davoust D. Solution structure of urotensin-II receptor extracellular loop III and characterization of its interaction with urotensin-II. *Peptides* 2008;29(5):700-10.
19. Douglas SA, Naselsky D, Ao Z, Disa J, Herold CL, Lynch F, Aiyar NV. Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br J Pharmacol* 2004;142(6):921-32.
20. Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, Thompson JP, Rowbotham DJ, Lambert DG. Cell and tissue responses of a range of urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006;373(2):148-57.
21. Giebing G, Tölle M, Jürgensen J, Eichhorst J, Furkert J, Beyermann M, Neuschäfer-Rube F, Rosenthal W, Zidek W, van der Giet M, Oksche A. Arrestin-independent internalization and recycling of the urotensin receptor contribute to long-lasting urotensin II-mediated vasoconstriction. *Circ Res* 2005;97(7):707-15.
22. Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE, Krum H. Direct actions of urotensin II on the heart: Implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* 2003;93(3):246-53.
23. Saetrum OO, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN. Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* 2000;406(2):5-71.
24. Brailoiu E, Jiang X, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Wang H, Dun NJ. State-dependent calcium mobilization by urotensin-II in cultured human endothelial cells. *Peptides* 2008;29(5):721-6.
25. Chen YH, Zhao MW, Yao WZ, Pang YZ, Tang CS. The signal transduction pathway in the proliferation of airway smooth muscle cells induced by urotensin II. *Chin Med J (Eng)* 2004;117(1):37-41.
26. Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 2001;88(11):1102-4.
27. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(7):368-76.

28. Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O. Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPCR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Res* 2002;22(1-4):155-68.
29. Onan D, Pipolo L, Yang E, Hannan RD, Thomas WG. Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 2004;18(9):2344-54.
30. Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 2002;359(9322):1990-7.
31. Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu n, Hirata Y. Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J Hypertens* 2001;19(12):2185-90.
32. Zhang YM, Liu WJ, Shi YZ, Gao YF, Wang LL, Cheng MX. Expressions of urotensin II and its receptor in pulmonary arteries in rats with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2008;31(1):37-41.
33. Tu XW, Liu YF, Li ZL, Wu HC, Lu Q, Tang CS. Expression of urotensin II in human coronary artery and coronary atherosclerosis. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003;23(6):572-4. Chinese.
34. Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Kleinz MJ, Davenport AP. Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increate expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* 2004;25(10):1767-74.
35. Maguire JJ, Kuc Re, Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and humam tissues: relevance to function. *Peptides* 2008;29(5):735-42.
36. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Orphan-receptor ligand human urotensin II: Receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2000;131(3):441-6.
37. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, Murakami O. Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci* 2003;104(1):1-5.

-
38. Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D, Nussdorfer GG. Urotensin II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells and UII via UT-R stimulates angiogenesis in vivo ed in vitro. *Int J Mol Med* 2006;18(6):1107-12.
 39. Bousette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A. Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 2004;176(1):117-23.
 40. Bern HA, Lderis K. A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J Endocrinol* 1969;45(1):Suppl:xi-xii.
 41. Conlon JM, Yano K, Waugh D, Hazon N. Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *J Exp Zool* 1996;275(2-3):226-38.
 42. Gibson A, Bern HA, Ginsburg M, Bottin JH. Neuropeptide-induced contraction and relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81(2):625-9.
 43. Itoh H, Itoh Y, Rivier J, Lederis K. Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am J Physiol* 1987(2 Pt 2);21:R361-6.
 44. Gibson A. Complex effect of *Gillichthys* urotensin II on rat aortic strips. *Br J Pharmacol* 1987;91(1):205-12.
 45. Gibson A, Wallace P, Bern HA. Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats. *Gen Comp Endocrinol* 1986;64(3):435-9.
 46. Douglas SA, Dhanak D, Johns DG. From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(2):76-85.
 47. Li L, Yuan WJ, Su DF. Effects of rat urotensin II on coronary flow and myocardial eNOS protein expression in isolated rat heart. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(11):1444-9.
 48. Kompa AR, Thomas WG, See F, Tzanidis A, Hannan RD, Krum H. Cardiovascular role of urotensin II: effect of chronic infusion in the rat. *Peptides* 2004;25(10):1783-8.

49. Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennett T. Bolus injection of human UII in conscious rats evokes a biphasic haemodynamic response. *Br J Pharmacol* 2004; 143(3):422-30.
50. Hassan GS, Chouiali F, Saito T, Hu F, Douglas SA, Ao Z, Willette RN, Ohlstein EH, Giaid A. Effect of human urotensin-II infusion on hemodynamics and cardiac function. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81(2):125-8.
51. Zhu YZ, Wang ZJ, Zhu YC, Zhang L, Oakley RM, Chung CW, Lim KW, Lee HS, Ozoux ML, Linz W, Böhm M, Kostenis E. Urotensin II causes fatal circulatory collapse in anesthetized monkeys *in vivo*: a “vasoconstrictor” with a unique hemodynamic profile. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(3):H830-6.
52. Russell FD, Molenaar P, O'Brien DM. Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart *in vitro*. *Br J Pharmacol* 2001;132(1):5-9.
53. Affolter JT, Newby DE, Wilkinson IB, Winter MJ, Balment RJ, Webb DJ. No effect on central or peripheral blood pressure of systemic urotensin II infusion in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54(6):617-21.
54. Wilkinson IB, Affolter JT, de Haas SL, Pellegrini MP, Boyd J, Winter MJ, Balment RJ, Webb DJ. High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. *Cardiovasc Res* 2002;53(2):341-7.
55. Böhm F, Pernow J. Urotensin II evokes potent vasoconstriction in human *in vivo*. *Br J Pharmacol* 2002;135(1):25-7.
56. Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: ‘heart ‘ of the matter or simply a fish ‘tail’? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(2):159-67.
57. Behm DJ, Doe CP, Johns DG, Maniscalco K, Stankus GP, Wibberley A, Willette RN, Douglas SA. Urotensin-II: a novel systemic hypertensive factor in the cat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004;369(3):274-80.
58. Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Abe I, Iida M. Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J Hypertens* 2003;21(1):159-65.
59. Watson AMD, Lambert GW, Smith KJ, May CN. Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension* 2003;42(3):373-9.

-
60. Song W, Ashton N, Balment RJ. A radioimmunoassay to detect urotensin II in the plasma of rat models of hypertension. *J Physiol* 2002;544P:S024.
61. Thompson JP, Watt P, Sanghavi S, Strupish JW, Lambert DG. A comparison of cerebrospinal fluid and plasma urotensin II concentrations in normotensive and hypertensive patients undergoing urological surgery during spinal anesthesia: a pilot study. *Anesth Analg* 2003;97(5):1501-3.
62. Cheung BMY, Leung R, Man YB, Wong LYF. Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* 2004;22(7):1341-4.
63. Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R. Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000;130(8):1865-70.
64. Katano Y, Ishihata A, Aita T, Ogaki T, Horie T. Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 2000;402(1-2):R5-7.
65. Gray GA, Jones MR, Sharif I. Human urotensin II increases coronary perfusion pressure in the isolated rat heart. Potentiation by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition. *Life Sci* 2001;69(2):175-80.
66. Bennett RT, Jones RD, Morice AH, Smith CF, Cowen ME. Vasoconstrictive effects of endothelin-1, endothelin-3, and urotensin II in isolated perfused human lungs and isolated human pulmonary arteries. *Thorax* 2004;59(5):401-7.
67. MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I, Pollard K. Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 2000;130(2):201-4.
68. Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH, Willette RN. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* 2000;131(7):1262-74.
69. Douglas SA, Ashton DJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ohlstein DH, Ruffolo MR, Ohlstein EH, Aiyar NV, Willette RN. Human urotensin II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36(5 Suppl 1):S163-6.
-

70. Papadopoulos P, Bousette N, Giaid A. Urotensin-II and cardiovascular remodeling. *Peptides* 2008;29(5):764-9.
71. Calò L, Semplicini A. L'endotelio vascolare. Piccin 1998.
72. Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, Katagiri T. Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res* 2006;29(6):375-87.
73. Heringlake M, Kox T, Uzun O, Will B, Bahlmann L, Klaus S, Eleftheriadis S, Armbruster FP, Franz N, Kraatz E. The relationship between urotensin II plasma immunoreactivity and left ventricular filling pressures in coronary artery disease. *Regul Pept* 2004;121(1-3):129-36.
74. Hassan GS, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A. Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides* 2005;26(12):2464-72.
75. Watanabe T, Suguro T, Kanome T, Sakamoto Y, Kodate S, Hagiwara T, Hongo S, Hirano T, Adachi M, Miyazaki A. Human urotensin II accelerates foam cell formation in human monocyte derived macrophages. *Hypertension* 2005;46(4):738-44.
76. Tamura K, Okazaki M, Tamura M, Isozumi K, Tasaki H, Nakashima Y. Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: Involvement of cell adhesion-mediated integrin signalling. *Life Sci* 2003;72(9):1049-1060.
77. Tsai CS, Loh SH, Liu JC, Lin JW, Chen YL, Chen CH, Cheng TH. Urotensin II-induced endothelin-1 expression and cell proliferation via epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2009;206(1):86-94.
78. Matsusaka S, Wakabayashi I. Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006;373(5):381-6.
79. Papadopoulos P, Bousette N, Al-Ramli W, You Z, Behm DJ, Ohlstein EH. Targeted overexpression of the human urotensin receptor transgene in smooth muscle cells : effect of UT antagonism in ApoE knockout mice fed with western diet. *Atherosclerosis* 2009;204(2):395-404.

-
80. Gendron G, Simard B, Gobeil F, Sirois P, D'Orleans-Juste P, Regoli D. Human urotensin-II enhance extravasation in specific vascular districts in Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;82(1):16-21.
81. Wang H, Mehta JL, Chen K, Zhang X, Li D. Human urotensin II modulates collagen synthesis and the expression of MMP-1 in human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44(5):577-81.
82. Shi L, Ding W, Li D, Wang Z, Jiang H, Zhang J, Tang C. Proliferation and anti-apoptotic effects of human urotensin II on human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2006;188(2):260-4.
83. Xu S, Jiang H, Wu B, Yang J, Chen S. Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Tohoku J Exp Med* 2009;219(4):283-8.
84. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386(6626):671-4.
85. Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Müller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311(1):204-12.
86. Shi XD, Li ZL, Wu HC, Wang TH, Fu Q, Yan QN, Tang CS. Mechanism of urotensin II-stimulated adrenomedullin secretion in human vascular endothelial cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005;25(7):791-3.
87. Guidolin D, Albertin G, Ribatti D. Urotensin-II a san angiogenic factor. *Peptides* 2010;31(6):1219-24.
88. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(5):C947-70.
89. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18.
90. Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 1999;6(8):R217-24.
91. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2007;59(2):185-205.
-

92. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(7):751-62.
93. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001;61(3):253-70.
94. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 2006;312(5):623-9.
95. Kurz H. Physiology of angiogenesis. *J Neurooncol* 2000;50(1-2):17-35.
96. Garmy-Susini B, Varner JA. Circulating endothelial progenitor cells. *Br J Cancer* 2005;93(8):855-8.
97. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95(4):343-53.
98. Albini A, Sporn MB. The tumor microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007;7(2):139-47.
99. Bouïs D, Kusamanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GAP. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacol Res* 2006;53(2):89-103.
100. D'Andrea LD, Del Gatto A, Pedone C, Benedetti E. Peptide-based molecules in angiogenesis. *Chem Biol Drug Des* 2006;67(2):115-26.
101. Bischoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest* 1997;100(11 Suppl):S37-9.
102. Bussolino F., Mantovani A., Persico G. Molecular mechanisms of blood vessels formation. *Trends Biochem Sci* 1997;22(7):251-6.
103. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assay: a critical overview. *Clinical Chemistry* 2003;49(1):1:32-40.
104. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Exp Pathol* 2004;85(5):233-48.
105. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. *Anat Rec* 2001;264(4):317-24.

106. Laschke MW, Menger MD. *In vitro* and *in vivo* approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007;13(4):331-42.
107. Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro*. *Lab Invest* 1990;63(1):115-22.
108. Kanzawa S, Endo H, Shioya N. Improved *in vitro* angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type III collagen. *Ann Plast Surg* 1993;30(3):244-51.
109. Guidolin D, Vacca A, Nussdorfer GG, Ribatti D. A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay *in vitro*. *Microvasc Res* 2004;67(2):117-124.
110. Gagnon E, Cattaruzzi P, Griffith M, Muzakare L, LeFlao K, Faure R, Béliveau R, Hussain SN, Koutsilieris M, Doillon CJ. Human vascular endothelial cells with extended life spans: *in vitro* cell response, protein expression, and angiogenesis. *Angiogenesis* 2002;5(1-2):21-33.
111. Mandriota SJ, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-induced *in vitro* angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 1997;110 (Pt 18):2293-302.
112. Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, Lawler J, Detmar M. Overexpression of thtombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999;155(2):441-52.
113. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinomas. *Cell* 1994;79(2):315-28.
114. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Højrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(6):2811-6.
115. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anan D, Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkmann J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of

- focal adhesion kinase independently of the integrin binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(10):5579-83.
116. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dilleay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p-53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 Alpha. *Genes Dev* 2000;14(1):34-44.
117. Patel Y. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999;20(3):157-98.
118. Garcia de la Torre N, Wass JAH, Turner HE. Antiangiogenic effects of somatostatin analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57(4):425-41.
119. Danesi R, Ager C, Benelli U, Paolo AD, Nardini D, Bocci G, Basolo F, Campagni A, Tacca MD. Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995). *Clin Cancer Res* 1997;3(2):265-72.
120. Cascinu S, Del Ferro E, Ligi M, Staccioli MP, Giordani P, Catalano V, Agostinelli R, Muretto P, Catalano G. Inhibition of vascular endothelial growth factor by octreotide in colorectal cancer patients. *Cancer Invest* 2001;19(1):8-12.
121. Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, Held-Feindt J. Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int J Cancer* 2001;92(4):545-50.
122. Baiguera S, Conconi MT, Guidolin D, Mazzocchi G, Malendowicz LK, Parnigotto PP, Spinazzi R, Nussdorfer GG. Ghrelin inhibits *in vitro* angiogenic activity of rat brain microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med* 2004;14(5):849-54.
123. Conconi MT, Nico B, Guidolin D, Baiguera S, Spinazzi R, Rebuffat P, Malendowicz LK, Vacca A, Carraro G, Parnigotto PP, Nussdorfer GG, Ribatti D. Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Peptides* 2004;25(12):2179-85.
124. Florkiewicz RZ, Sommer A. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(11):3978-81.
125. Presta M., Moscatelli D, Joseph-Silverstein, Rifkin DB. Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates

- capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol* 1986;6(11):4060-6.
126. Bussolino F, Albini A, Camussi G, Presta M, Viglietto G, Ziche M, Persico G. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2401-12.
127. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993;60:1-41.
128. Rusnati M, Presta M. Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparin sulphate proteoglycans. Biological implications in neovascularisation. *Int J Clin Lab Res* 1996;26(1):15-23.
129. Schlessinger J, Lax I, Lemmon M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* 1995;83(3):357-60.
130. Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Garcia M. Transforming growth factor- β 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1993;155(3):595-605.
131. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17(7):4015-23.
132. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the TIE-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87(7):1171-80.
133. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997;277(5322):55-60.
134. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18(38):5356-62.
135. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nature Rev* 2006;7(5):359-371.

136. Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 6):1171-7.
137. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146(5):1029-39.
138. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9(3):211-20.
139. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580(12):2879-87.
140. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581-611.
141. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65:550-63.
142. Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62(3):179-213.
143. Enholm B, Karpanen T, Jeltsch M, Kubo H, Stenback F, Prevo R, Jackson DG, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-c induces lymphangiogenesis in the skin. *Circ Res* 2001;88:623-9.
144. Karkkainen MJ, Haila P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5(1):74-80.
145. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276(5317):1423-5.
146. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005;25(6):2441-9.
147. Lytle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1994;68(1):84-92.

148. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003;94(9):751-6.
149. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92(6):735-45.
150. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109(3):227-41.
151. Nussdorfer GG, Rossi Gp, Malendowicz LK, Mazzocchi G. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. *Pharmacol Rev* 1999;51(3):403-38.
152. Rossi GP, Seccia TM, Nussdorfer GG. Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Int Rev Cytol* 2001;209:241-72.
153. Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. *Am J Pathol* 2000;157(5):1703-11.
154. Vigne P, Marsault R, Breittmayer JP, Frelin C. Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem J* 1990;266(2):415-20.
155. Ziche M, Morbidelli M, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization *in vivo* and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* 1990;40(2):264-78.
156. Shikiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* 1997;30(5):1198-203.
157. Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interactions between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension* 1998;32(1):89-95.
158. Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 1997;272(27):17097-103.

159. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194(2):720-5.
160. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998;393(6683):333-9.
161. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International Union of Pharmacology XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):233-46.
162. Samson WK. Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol* 1999;61:363-89.
163. Nussdorfer GG. Proadrenomedullin-derived peptides in the paracrine control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol* 2001;206:249-84.
164. Kato J, Tsuruda T, Kita T, Kitamura K, Eto T. Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(12):2480-7.
165. Zhao Y, Hague S, Manek S, Zhang L, Bicknell R, Rees MC. PCR display identifies tamoxifen induction of the novel angiogenic factor adrenomedullin by a non estrogenic mechanism in the human endometrium. *Oncogene* 1998;16(3):409-15.
166. Nikitenko LL, MacKenzie IZ, Reese MC, Bicknell R. Adrenomedullin is an autocrine regulator of endothelial growth in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000;6(9):811-9.
167. Kim W, Moon SO, Sung MJ, Kim SH, Lee S, So JN, Park SK. Angiogenic role of adrenomedullin through activation of Akt, mitogen-activated protein kinase, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *FASEB J* 2003;17(13):1937-9.
168. Ribatti D, Nico B, Spinazzi R, Vacca A, Nussdorfer GG. The role of adrenomedullin in angiogenesis. *Peptides* 2005;26(9):1670-5.
169. Guidolin D, Albertin G, Spinazzi R, Sorato E, Mascarini A, Cavallo D, Antonello M, Ribatti D. Adrenomedullin stimulates angiogenic response in cultured human

- vascular endothelial cells: involvement of the vascular endothelial growth factor receptor 2. *Peptides* 2008;29(11):2013-23.
170. Albertin G, Sorato E, Oselladore B, Mascarin A, Tortorella C, Guidolin D. Involvement of vascular endothelial growth factor signaling in CLR/RAMP1 and CLR/RAMP2-mediated pro-angiogenic effect of intermedin on human vascular endothelial cells. *Int J Mol Med* 2010;26(2):289-94.
171. Guidolin D. The multifaceted world of angiogenesis control. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(11):1135-8.
172. Kato H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology* 1997;138(6):2615-20.
173. Martinez A, Vos M, Guédez L, Kaur G, Chen Z, Garayoa M, Pio R, Moody T, Stetler-Stevenson WG, Kleinman HK, Cuttitta F. The effects of adrenomedullin overexpression in breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(16):1226-37.
174. Oehler MK, Hague S, Rees MC, Bicknell UK. Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis. *Oncogene* 2002;21(18):2815-21.
175. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 2003;33(10):891-6.
176. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;93(8):2627-36.
177. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002;64(2):326-33.
178. Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int* 1993;43(5):1010-4.
179. Douglas SA, Ohlstein EH. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(6):229-37.

180. Conconi MT, Lora S, Baiguera S, Boscolo E, Folin M, Scienza R, Rebuffat P, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. *In vitro* culture of rat neuromicrovascular endothelial cells on polymeric scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2004;71(4):669-74.
181. Albertin G, Carraro G, Nussdorfer GG. Human adrenomedullin gene silencing by short interfering RNAs: a preliminary study. *Int J Mol Med* 2005;15(4):579-83.
182. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):2002-7.
183. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(9):e36.
184. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982;21(24):6188-93.
185. McGuire PG, Seeds NW. The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem* 1989;40(2):215-27.
186. Conconi MT, Baiguera S, Guidolin D, Furlan C, Menti AM, Vigolo S, Belloni AS, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblast 3T3/J2 cell line. *J Invest Med* 2003;51(4):227-32.
187. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(19):10623-8.
188. Deng DX, Tsalenko A, Vailaya A, Ben-Dor A, Kundo R, Estay I, Tabibiazar R, Kincaid R, Yakhini Z, Bruhn L, Quertermous T. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ Res* 2006;98(2):200-8.
189. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 2000;35(5):227-31.
190. Lang I, Schweizer A, Hiden U, Ghaffari-Tabrizi N, Hagendorfer G, Biban M, Pabst MA, Korgun ET, Dohr G, Desoye G. Human fetal placental endothelial cells

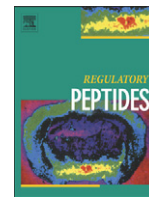
- have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential. *Differentiation* 2008;76(10):1031-43.
191. Zhang Y, Fisher N, Newey SE, Smythe J, Tatton I, Tsaknakis G, Forde SP, Carpenter L, Athanassopoulos T, Hale SJ, Ferguson DJ, Tyler MP, Watt SM. The impact of proliferative potential of umbilical cord-derived endothelial progenitor cells and hypoxia on vascular tubule formation *in vitro*. *Stem Cells Dev* 2009;18(2):359-75.
192. Liu Z-M, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, Shum CKY, van Hasselt CA. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(11):1428-36.
193. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(7):368-76.
194. Guidolin D, Albertin G, Ribatti D. Urotensin-II as an angiogenic factor. *Peptides* 2010;31(6):1219-24.
195. New DC, Wong YH. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal* 2007;2:2.
196. Fernandez-Sauze S, Delfino C, Mabrouk K, Dussert C, Chinot O, Martin PM, Grisoli F, Ouafik L, Boudouresque F. Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors. *Int J Cancer* 2004;108(6):797-804.
197. Helmlinger G, Endo M, Ferrara N, Hlatki L, Jain RK. Formation of endothelial cell networks. *Nature* 2000;405(6783):139-41.
198. Shi XD, Li ZL, Wu HC, Wang TH, Fu Q, Yan QN, Tang CS. Mechanism of urotensin II-stimulated adrenomedullin secretion in human vascular endothelial cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005;25(7):791-3.

PUBBLICAZIONI



Contents lists available at ScienceDirect

Regulatory Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/regpep

Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations

Giovanna Albertin^{a,1}, Diego Guidolin^{a,*,1}, Elisa Sorato^a, Raffaella Spinazzi^a, Alessandra Mascarin^a, Barbara Oselladore^a, Monica Montopoli^b, Michele Antonello^c, Domenico Ribatti^d^a Department of Human Anatomy and Physiology (Section of Anatomy), University of Padova Medical School, Via Gabelli, 65 I-35121 Padova, Italy^b Department of Pharmacology and Anesthesiology, University of Padova Medical School, Via Gabelli, 65 I-35121 Padova, Italy^c Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Sciences, University of Padova Medical School, Via Gabelli, 65 I-35121 Padova, Italy^d Department of Human Anatomy and Histology, University of Bari Medical School, Bari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2009

Received in revised form 3 April 2009

Accepted 5 April 2009

Available online 10 April 2009

Keywords:

Angiogenesis

Human endothelial cells

Matrigel assay

Urotensin-II

Urotensin receptor

ABSTRACT

Urotensin-II (U-II), along its receptor UT, is widely expressed in the cardiovascular system, where it exerts regulatory actions under both physiological and pathological conditions. In the present study, human vascular endothelial cells (EC) from one arterious and three venous vascular beds were used to investigate *in vitro* their heterogeneity in terms of expression of U-II and UT and of angiogenic response to the peptide. Real-time PCR and immunocytochemistry demonstrated the expression of UT, as mRNA and protein, in all the EC populations investigated. U-II, on the contrary, was detectable only in EC from aorta and umbilical vein. U-II did not affect the proliferation rate of adult human EC, but induced a moderate proliferative effect on EC from human umbilical vein. When tested in the Matrigel assay, however, all EC exhibited a strong angiogenic response to the peptide, comparable to that of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and it was not associated to an increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and/or its receptors. The angiogenic effect of U-II was abolished by the UT antagonist palosuran. Overall, these data suggest that U-II, in addition to the well known role in the regulation of cardiovascular function, also exert a specific angiogenic activity.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Urotensin-II (U-II) is a hormone first isolated from an extract of the urophysis of the teleost *Gillichthys mirabilis* as a dodecapeptide of 1363 Dalton [1]. The human form of U-II is a somatostatin-like cyclic 11-amino acid peptide, synthesized by proteolytic cleavage of a precursor, the prepro-U-II. Prepro-U-II mRNA was found by dot-blot analysis in many tissues, such as spinal cord, kidney, spleen, small intestine, thymus, prostate, pituitary gland and adrenal gland and, to a lesser extent, in stomach, pancreas, ovary, and liver [2,3].

U-II binds to a specific high-affinity receptor identified as the orphan receptor GPR14 [4] that has been renamed [5] urotensin receptor (UT). Northern blot analysis, autoradiographic and immunohistochemical studies [6–8] demonstrated a high expression of UT in the brain, kidney cortex, heart and smooth muscle cells of human and rat vessels.

A significant expression of U-II and UT was also detected in several tumor cell lines [9] and U-II exerts a marked mitogenic activity on many types of cells [9,10].

The principal physiological activity of U-II in mammals (see [11] for a review) is a potent systemic vasoconstrictor and hypertensive effect [4,6], different in anatomic sites and animal species. In human vascular tissues, contractile responses to U-II were reported in coronary, mammary, and radial arteries, as well as in saphena and umbilical veins [7]. U-II plays also an important role in the pathophysiology of the cardiovascular system [12–15]. In fact, plasma U-II level was positively correlated with carotid atherosclerosis in hypertensive patients [16] and in patients with coronary artery disease [17–20]. Endothelial factors might modulate the actions of U-II [21], but few experimental data are available clarifying the effect of U-II on endothelium.

In a previous work [22] we demonstrated an angiogenic activity of U-II when tested *in vitro* on rat cerebral microvascular endothelial cells (EC) in the Matrigel assay or *in vivo* in the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. However, although EC exhibit many common functional and morphological features, they also display a remarkable heterogeneity dependent not only on the species considered [23], but also on the vessel type, as demonstrated by the differences of gene expression profile exhibited by human EC from different sources [24,25]. In the present study we have further characterized the angiogenic activity of U-II by testing it on human vascular EC from different vascular beds, and we have provided data on the different response exhibited by these human EC populations in terms of expression of the U-II system and of the angiogenic response to the peptide.

* Corresponding author. Tel.: +39 049 8272316; fax: +39 049 8272319.

E-mail address: diego.guidolin@unipd.it (D. Guidolin).¹ These two authors equally contributed to the work.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Human U-II was purchased from Phoenix Europe (Karlsruhe, Germany), FGF-2 from Preprotech (London, UK) and 4',6'-diamine-2'-phenylindole (DAPI) from Boehringer (Mannheim, Germany). UltroSer was obtained from Ciphergen (Fremont, CA) and Matrigel from Becton Dickinson Labware (Bedford, MA). Mouse anti-Flk-1/KDR Ab (clone CH-11) was provided by Upstate (Charlottesville, VA). Rabbit anti-human VEGF (sc-507), rabbit anti-human Flt-1 (sc-9029), goat anti-human UT (N-15, sc-10190), goat anti-human U-II (C-19, sc-21095) Ab, UT blocking peptide (sc-10190P) and U-II blocking peptide (sc-21095P) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse/rabbit IgG (ImmPress universal reagent) was provided by Vision Biosystems (Norwell, MA), HRP-conjugated anti-goat IgG from Santa Cruz Biotechnology and Cy3-conjugated anti-rabbit IgG (AP132C) from Millipore (Milan, Italy). Rabbit anti-human von Willebrand factor Ab, EC basal medium (EBM), fetal calf serum (FCS), bovine serum albumine (BSA), phosphate buffered saline (PBS) and all other chemicals and reagents were provided by Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). The UT antagonist (UTA) palosuran (ACT-058362) [26] was a gift from Dr. M.Clozel (Actelion Pharmaceutical Ltd., Allschwil, Switzerland).

2.2. Endothelial cell cultures

Human EC of both venous and arterial origin were used. EC from human saphena (HSVEC) and jugular (HJVEC) veins were harvested from samples of the vessels obtained during surgery from patients with no history of heart failure or hypertension. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from samples of the umbilical cord. Informed consent was obtained from all patients and all the procedures were approved by the local ethical committee. After resection, the specimens were immediately placed into EC basal medium (EBM) and repeatedly rinsed with PBS and antibiotics. Remaining impurities, such as adherent blood cells and adipose tissue, were then carefully removed. After rinsing, the isolated vessels were longitudinally cut and placed in a culture plate with 0.1% type II collagenase at 37 °C. After 20 min the digested tissue was collected and the cell suspension centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The pellet was then resuspended in fresh EBM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/L streptomycin, and 1% UltroSer and plated onto a fibronectin-precoated culture dish (1 µg/cm²) at 37 °C in a humidified incubator (5% CO₂, 95% air). When cultures were grown to near-confluence, cells were detached, harvested and incubated for 30 min at 4 °C with Tosylactivated Dynabeads M-450 (Oxoid Italy, Milan, Italy) coated with anti-human CD31 antibodies in order to separate EC

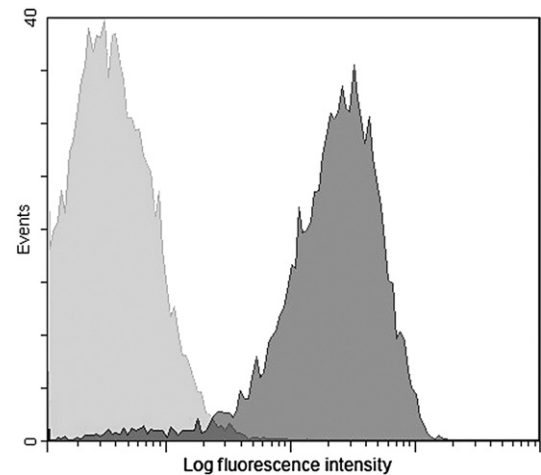


Fig. 1. Binding of anti-human von Willebrand factor antibody to a HSVEC preparation determined by indirect immunofluorescence followed by flow cytometric analysis. The distribution of labeling intensities from 10,000 cells is shown in dark grey, together with the distribution (shown in light grey) obtained from cells stained with the isotype control antibody (background control). The percent of cells specifically expressing the von Willebrand factor resulted of 95.7%. Similar patterns (not shown) were observed for the other primary cell cultures used in the present study (HJVEC, HUVEC).

by magnetic immunoseparation [27]. The endothelial phenotype of the isolated cells was confirmed by flow cytometry and immunocytochemistry, using anti-von Willebrand factor antibody.

Endothelial cells from human aorta (HAEC) were purchased from Cambrex BioScience (Walkersville, MD). In all the experiments, cultures of HSVEC, HJVEC, HUVEC and HAEC from the 3rd to the 6th passage were used.

2.3. Cell proliferation assay

EC were seeded (2×10^4 cells/well) into a 24-well plate and cultured in EBM medium. After 24 h of incubation, the culture medium was replaced with a fresh one containing 50 ng/ml FGF-2 (positive control) or supplemented with U-II (10^{-12} – 10^{-7} M) and/or palosuran (10^{-6} M). After 6 h of incubation the proliferating cells were identified by using the 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Labeling and detection kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer directions. Briefly, BrdU (10^{-5} M) was added to the cell cultures and EC were incubated for a further 12 h. After washing in PBS, cells were fixed in an ethanol based solution (15 mM glycine in ethanol) for 30 min at 4 °C and then incubated with a fluorescein conjugated monoclonal anti-BrdU antibody at a dilution of 1:10 for 45 min at 37 °C in a humid chamber. Finally, counterstaining with DAPI was applied to visualize the whole population of cell nuclei. Fluorescence images were recorded at a primary magnification of $\times 10$ (5 fields for each well: the four quadrants and the center) using a digital camera (DFC 480, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) connected to a DM-IRE2 inverted microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and saved as TIFF files. The rate of BrdU incorporation was estimated by computer-assisted image analysis as the ratio between the number of BrdU-labeled nuclei and that of DAPI-stained nuclei [28]. The QWin image analysis software (Leica Microsystems, Cambridge, UK) was used for the analysis.

2.4. In vitro Matrigel assay

Growth factor-depleted Matrigel was thawed on ice overnight, and spread evenly over each well (50 µl) of a 24-well plate. The plates were incubated for 30 min at 37 °C to allow Matrigel to gel, and EC were seeded (2.5×10^4 cells/cm²) and cultured in basal medium, containing 50 ng/ml FGF-2 (positive control) or supplemented with U-II (10^{-12} –

Table 1
Sense and antisense sequences used as RT-PCR primers.

	Acc. number	Primers
GAPDH	NM_002046.3	5'-CTC-TCT-GCT-CCT-CCT-GTT-CGA-C-3' 5'-TGA-GCG-ATG-TGG-CTC-GGC-T-3'
U-II	NM_006786	5'-CGT-CTA-TCT-TGT-GGC-GAT-CA-3' 5'-CCC-AGC-ATC-TCT-GGC-AGT-AT-3'
UT	NM_018949	5'-ACC-ATT-GGG-ACT-CTG-CTG-TC-3' 5'-AAG-TGC-CAC-TCC-TTG-GTC-AC-3'
VEGF	NM_001025368	5'-GCC-TTG-CTG-CTC-TAC-CTC-CAC-3' 5'-GAT-TCT-GCC-CTC-CTT-CTG-C-3'
VEGFR-1	NM_002019	5'-GTT-CAA-GGA-ACC-TCG-GAC-AA-3' 5'-GCT-CAC-ACT-GCT-CAT-CCA-AA-3'
VEGFR-2	NM_002253.1	5'-GTT-CIT-GGC-TGT-GCA-AAA-GT-3' 5'-GTC-TTC-AGT-TCC-CCT-CCA-TT-3'

Each analyzed gene is reported together with the accession number identifying it in the NCBI Nucleotide data bank.

10^{-7} M) and/or palosuran (10^{-6} M). After 18 h of incubation at 37 °C, cultures were observed under the microscope at a primary magnification of $\times 5$. Phase contrast images were recorded (5 fields for each well: the four quadrants and the center) and saved as TIFF files. Image analysis of the cell pattern was carried out using the QWin image analysis software, as previously detailed [29], and the following parameters were estimated: percent area covered by EC, total length of EC network per field, and number of meshes and branching points per field. Values were expressed as percent of the control value.

2.5. Real-time PCR

To detect the expression of mRNA for VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2, U-II, UT and the changes it underwent in the different experimental conditions applied, EC were harvested and total RNA was extracted with the SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI) and purified. During RNA extraction a DNase treatment was also carried out to remove genomic DNA contamination. Total RNA was then reverse transcribed to cDNA [30]. Samples of RNA were similarly processed in the absence of Reverse Transcriptase to be used as negative controls to verify the absence of contaminating DNA.

Real-time PCR (RT-PCR) was carried out in an I-Cycler iQ detection system (BioRad Laboratories, Milan, Italy), as detailed previously [31], using the primers reported in Table 1. The PCR program included a

denaturation step at 95 °C for 3 min, 40 cycles of two amplification steps (95 °C for 15 s and annealing extension at 60 °C for 30 s) and melting curve (60–90 °C with a heating rate of 0.5 °C/10 s). During the exponential phase, the fluorescence signal threshold was calculated and the fraction number of PCR cycles required to reach the threshold (cycle threshold, Ct) was determined. Ct values decreased linearly with increasing input target quantity and were used to calculate the relative mRNA expression, according to the mathematical quantification model proposed by Pfaffl [32]. Following this method, the U-II-induced variation in mRNA expression with respect to unstimulated control samples was estimated by calculating for each analysed gene a parameter, indicating the relative gene expression [33]. When up-regulation or down-regulation of the gene occurs as an effect of the applied stimulus, this parameter is significantly greater or lower than 1.0, respectively. All samples were amplified in duplicate and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression was used as a reference to normalize the data. The specificity of the amplification was tested at the end of each run by melting curve analysis, using the I-Cycler software 3.0.

2.6. Immunocytochemistry

Immunocytochemistry (ICC) was used to verify the expression in the EC of specific proteins, such as U-II, UT, VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2, and

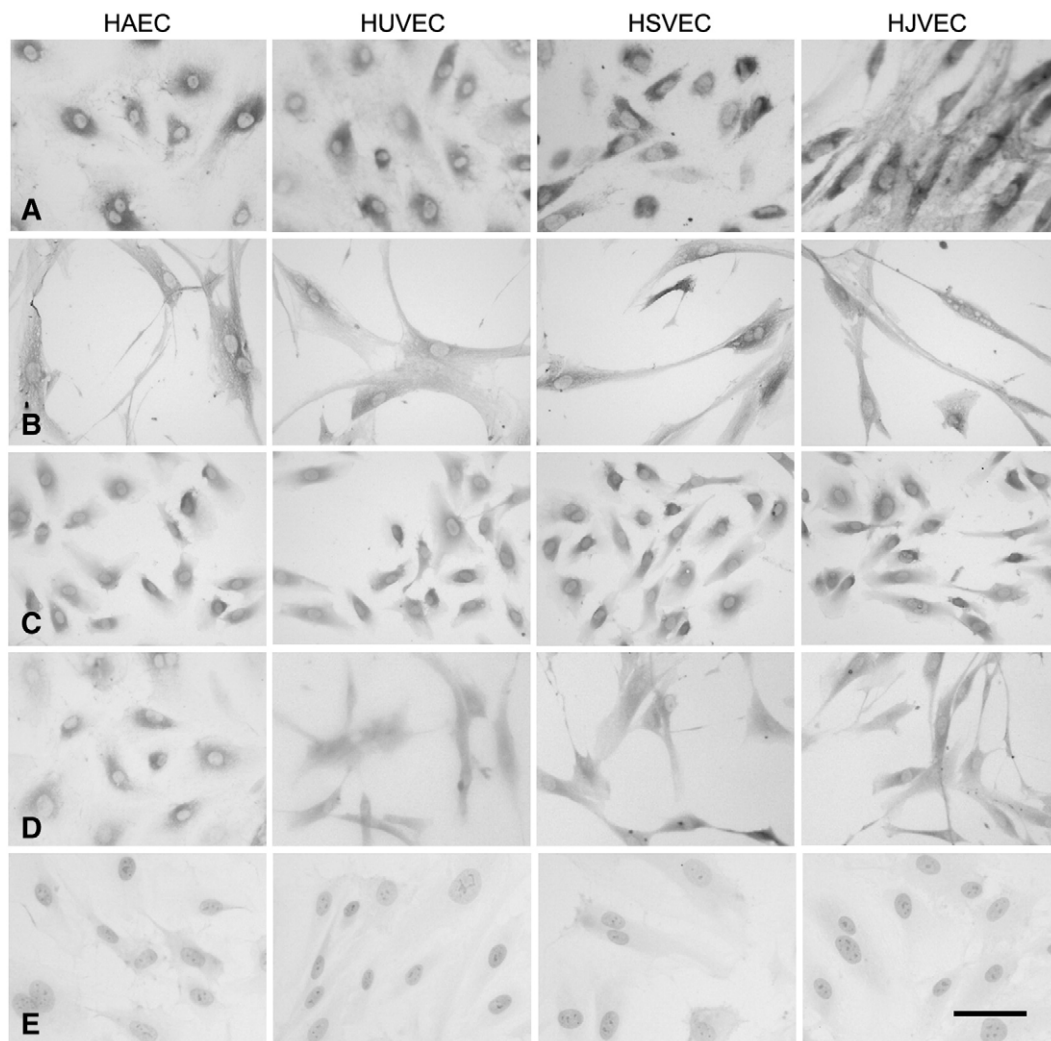


Fig. 2. Markers expressed by cultured human vascular endothelial cells. A. Immunocytochemical visualization of the Von Willebrand factor. B–D. Immunocytochemistry showing the expression at protein level of VEGF, VEGFR-2 and VEGFR-1, respectively. E. Unspecific staining (obtained by omitting the primary antibody). Weakly counterstaining with hematoxylin was applied to allow an easier identification of the cells. Bar = 70 μ m.

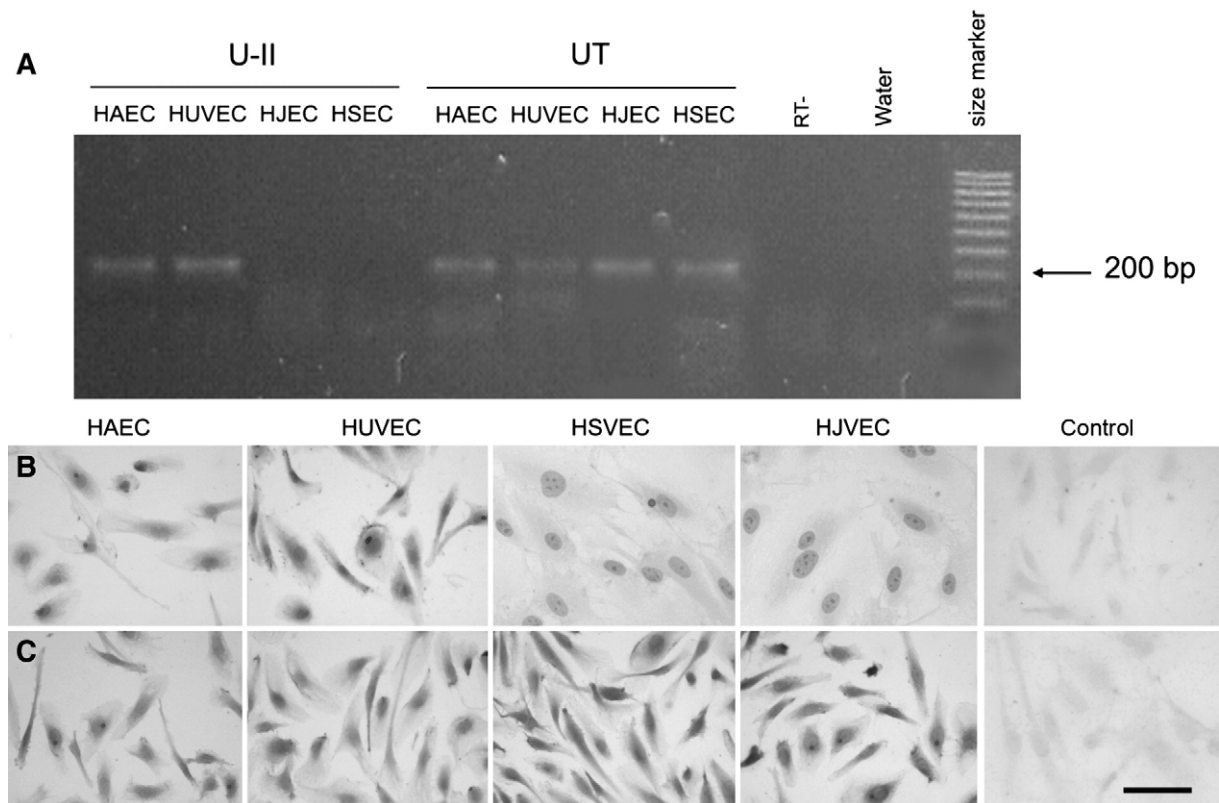


Fig. 3. Expression of the urotensin system by cultured human vascular endothelial cells. A. Ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel showing cDNA amplified with human U-II (left side) and UT (right side) specific primers from RNA of HAEC, HUVEC, HSVEC and HJVEC cultures. At the mRNA level UT was expressed by all the cell populations analyzed, while U-II resulted expressed by HAEC and HUVEC. Being UT an intronless gene, a negative control sample (RT-) was also analyzed to verify that any genomic contamination was removed (see Materials and methods). It was obtained by processing a sample of total RNA in the absence of reverse transcriptase. B–C. Immunocytochemical detection of U-II and UT peptides in HAEC, HUVEC, HSVEC and HJVEC cultures. An example (HUVEC) of the absence of U-II and UT immunoreactivity following pre-absorption of the primary antibodies with the immunising peptides is illustrated in the panels labeled as “Control”. As shown, the detected pattern of expression at protein level resulted consistent with the observations at mRNA levels. Bar = 70 μ m.

the changes they underwent in the different experimental conditions. EC from the 3rd passage were seeded (2×10^4 cells/well) on fibronectin-coated cover slides on a 24-well plate. After 24 h incubation with a medium containing or not containing U-II (10^{-8} M), they were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, treated with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated with the blocking solution (3% BSA in PBS) for 60 min. The blocking solution was then removed and EC were incubated overnight at 4 °C with one of the following primary antibodies: goat anti-U-II, goat anti-UT, rabbit anti-VEGF, rabbit anti-VEGFR-1, mouse anti-VEGFR-2. Cells were then washed in PBS for three times and incubated with HRP-conjugated anti-mouse/rabbit or anti-goat IgG for 30 min at room temperature. After rinsing in PBS, 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride was applied to visualize the reaction product. To verify the specificity of the immunostaining, some sample (negative control) was similarly processed omitting the primary antibody as well as using primary antibodies pre-adsorbed with antigen excess.

2.7. Flow cytometry

The cells were detached from culture flasks, washed and fixed with ice cold methanol for 10 min. After centrifugation at 2000 rpm, cells were resuspended in ice cold PBS, 10% FCS, 1% sodium azide. Tubes containing approximately 2×10^5 cells in 100 μ l were incubated at room temperature, for 30 min, with rabbit anti-human von Willebrand factor antibody (1:250). After washing, the cell samples were stained for 30 min at room temperature in the dark with Cy3-conjugated anti-rabbit IgG (1:200). Following centrifugation, the cells were resuspended and analyzed in an Epics XL-flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Samples of cells similarly stained with an isotypic control antibody (Rabbit IgG, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) were used to

estimate the unspecific staining. For each sample fluorescence intensities from 10,000 cells were collected and the percentage of cells with fluorescence intensity greater than the background observed in isotypic control antibody stained samples was determined.

2.8. Statistics

All the experiments were carried out at least three times in triplicate and the results were expressed as means $\pm$ SEM. Data from Matrigel or cell proliferation assays were analyzed with One-way

Table 2
Proliferation rates and morphometric characterization of the capillary-like network generated on Matrigel at baseline.

Feature	HSVEC	HJVEC	HUVEC	HAEC	Statistics (One-way ANOVA)
% of BrdU-positive cells (n = 9)	17.3 $\pm$ 0.69	17.6 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 1.3	16.9 $\pm$ 1.9	$F = 0.273$ ($p = 0.84$)
Matrigel assay (n = 9):					
Area%	15.1 $\pm$ 1.3	19.0 $\pm$ 1.7	16.5 $\pm$ 1.7	9.7 $\pm$ 0.50 *	$F = 8.00$ ($p < 0.05$)
Length (mm)	6.0 $\pm$ 0.13	6.9 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.20 *	$F = 12.79$ ($p < 0.05$)
Meshes (No./field)	0.42 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.15	1.0 $\pm$ 0.34	0.33 $\pm$ 0.08	$F = 3.52$ ($p < 0.05$)
Branching points (No./field)	34.6 $\pm$ 2.8	54.9 $\pm$ 4.5	35.1 $\pm$ 3.1	20.7 $\pm$ 1.90 *	$F = 19.16$ ($p < 0.05$)

Values are mean $\pm$ sem of the parameters when measured on unstimulated cells.
* = $p < 0.05$ (Tukey's test) with respect to HSVEC, HJVEC and HUVEC.

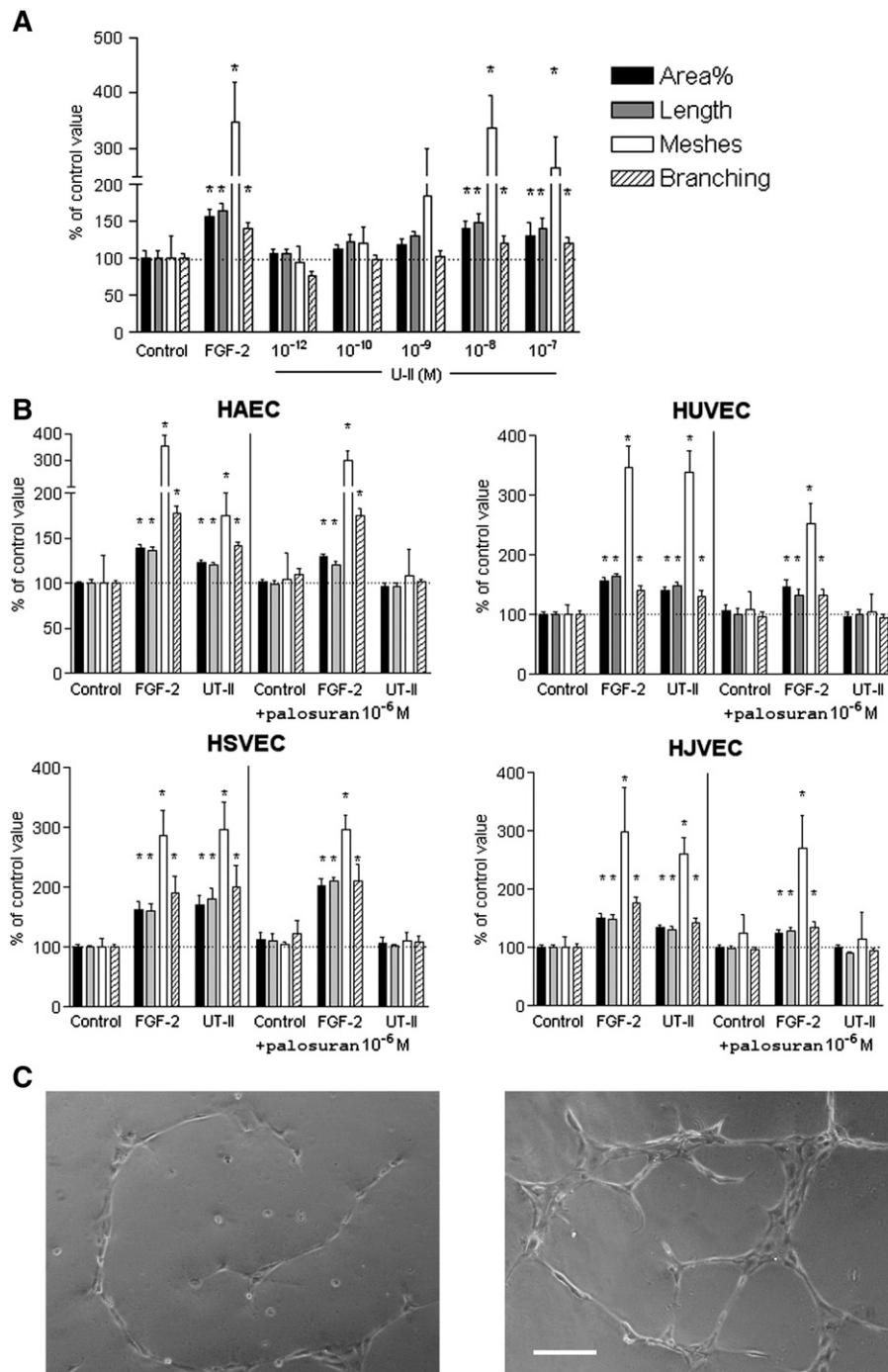


Fig. 4. Effect of U-II on the structure of the capillary-like network formed by human endothelial cells cultured on Matrigel. **A.** Morphometric analysis of the effect on HUVEC self-organization of increasing concentrations of U-II. A significant increase of the cell pattern complexity was observed from the dose of 10^{-8} M. The other endothelial cell types showed a comparable dose–response relationship (not shown). **B.** In endothelial cells from all the vascular beds tested, 10^{-8} M U-II treatment (as well as FGF-2) significantly increased both dimensional (percent area covered by cells and total length of the meshwork per field) and topological (number of meshes and branching points per field) parameters of the capillary-like network. In the presence of 10^{-6} M palosuran (a specific antagonist of UT) the effect of U-II on the capillary-like structure formation was no longer detectable, indicating that it was mediated by the binding of U-II to its receptor. Conversely, the morphogenetic action of FGF-2 was not altered by palosuran treatment. * $p < 0.05$ vs. the control group. **C.** Phase contrast micrographs providing an example of the pattern formed by HSVEC at baseline (left) and in the presence of 10^{-8} M U-II (right). Bar = 200 μ m.

Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for multiple comparisons versus the control group. The gene regulation factor values obtained by RT-PCR analysis were tested for difference from the basal value of 1.0 using one-sample *t*-test. Values of $p < 0.05$ were always considered to be statistically significant. The statistical analysis was carried out using GraphPad PRISM software (version 3.03; GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

3. Results

3.1. Cell preparation and phenotype

As demonstrated by flow cytometry analysis, the cell populations obtained after the extraction with Dynabeads M-450 coated with human anti-CD31 antibodies resulted composed of EC, because, in

addition to CD31, more than 95% of the obtained cells also expressed the von Willebrand factor (see Fig. 1). The expression of this specific EC marker was further confirmed by immunocytochemistry (Fig. 2A). Furthermore (Fig. 2B–D), VEGF and VEGFRs resulted well expressed. A significant expression of the U-II receptor (GPR14) was observed in the four EC populations considered for the study (HSVEC, HJVEC, HUVEC, HAEC), while the U-II peptide was detected only in HAEC and HUVEC. The presence (or absence) of these markers was confirmed by RT-PCR and representative ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis is provided in Fig. 3 together with pictures of the observed immunoreactivity for the corresponding proteins.

From a functional point of view some heterogeneity was observed among the four types of human vascular EC analysed. Table 2 shows the results of the assays performed to compare the untreated HSVEC, HJVEC, HUVEC and HAEC in terms of proliferation and capillary-like structures formation when seeded on Matrigel. As shown, all the EC populations exhibited a similar basal proliferation rate. However, HAEC showed a lower angiogenic potential at baseline when compared to HSVEC, HJVEC and HUVEC, as suggested by the lower value of the morphometric parameters describing the extension and complexity of the capillary-like network generated on Matrigel.

3.2. U-II effect on *in vitro* proliferation and morphologic differentiation of human vascular EC

After seeding on Matrigel HSVEC, HJVEC, HUVEC and HAEC spread and aligned with each other to form branching anastomosing tubes with multicentric junctions that gave rise within 18 h to a meshwork of capillary-like structures. When culture medium was admixed with U-II or FGF-2 a higher morphogenetic effect was observed with the formation of a meshwork of increased density (an example of the obtained cell pattern

Table 3

Semiquantitative RT-PCR assay of the effect of U-II (10^{-8} M).

	VEGF	VEGFR-2	VEGFR-1
HSVEC	0.99 ± 0.07 ($p = 0.890$)	1.07 ± 0.15 ($p = 0.653$)	0.95 ± 0.05 ($p = 0.347$)
HJVEC	0.91 ± 0.05 ($p = 0.110$)	1.17 ± 0.17 ($p = 0.347$)	0.95 ± 0.16 ($p = 0.763$)
HUVEC	0.97 ± 0.04 ($p = 0.475$)	1.05 ± 0.15 ($p = 0.747$)	0.93 ± 0.09 ($p = 0.459$)
HAEC	1.01 ± 0.10 ($p = 0.923$)	1.11 ± 0.13 ($p = 0.422$)	0.98 ± 0.11 ($p = 0.860$)

Values (mean $\pm$ sem, $n = 9$) represent the relative mRNA expression with respect to the untreated control samples.

p from one-sample t -test comparing means to the hypothetical value 1.0.

is shown in Fig. 4C). Image analysis (Fig. 4A) confirmed these observations, showing that U-II, from the dose of 10^{-8} M significantly increased both dimensional (percent area covered by EC and total length of the network per field) and topological parameters (number of meshes and branching points per field) of the capillary-like meshwork. The effect of 10^{-8} M U-II resulted comparable to that obtained with 50 ng/ml FGF-2 (Fig. 4B).

Palosuran, a specific antagonist of UT, (10^{-6} M) was *per se* ineffective and did not modify the pro-angiogenic activity of FGF-2. However, palosuran was able to counteract the effect of U-II, indicating that the pro-angiogenic activity of U-II was mediated by the binding of the peptide to its receptor.

The results concerning the effect of U-II treatment on cell proliferation are summarized in Fig. 5. As shown, a significant increase of the proliferation rate was observed only in HUVEC, starting from the concentration of 10^{-8} M. The effect of the peptide on HUVEC proliferation rate was counteracted by palosuran (10^{-6} M).

3.3. Effect of U-II on VEGF and VEGFRs expression

To determine whether the above described pro-angiogenic action of U-II on human EC was linked to an increased VEGF production and/or VEGFRs expression, the effect of U-II on the mRNA expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 were examined (Table 3). As shown, no significant changes of mRNA expression for these markers were detected by RT-PCR in ECs following U-II stimulation. Immunocytochemical analysis further confirmed these results; in fact, no difference in immunostaining was recognizable as compared to the unstimulated control samples (data not shown).

4. Discussion

In a previous work [22] we documented a clearcut pro-angiogenic effect of U-II on rat cerebral microvascular ECs *in vitro* and *in vivo*. In the present study, we have further investigated the effect of U-II on four populations of human EC of venous (HSVEC, HJVEC, HUVEC) and arterial (HAEC) origin. Interestingly, these EC exhibited a significant heterogeneity in terms of expression of the uterine system. RT-PCR and immunocytochemistry analyses indicated that UT was expressed by all the EC examined, whereas U-II was detectable in HAEC and HUVEC. These results are in general agreement with available literature data on the immunocytochemical localization of U-II and UT in human tissues (see [8]), reporting the presence of the peptide in specific EC populations, such as HUVEC, while the expression of UT was diffuse in human EC.

The pattern of expression observed in HAEC and HUVEC could be interpreted in the framework proposed by Chi et al. [24], who highlighted that EC from large vessels (such as aorta and umbilical vein) differentially express genes involved in the biosynthesis and remodelling of the relatively thick vascular wall surrounding the endothelium. Thus, the localization of U-II in HAEC and HUVEC is consistent with a possible involvement of the peptide in the cross-talk between the EC and the surrounding cells, such as smooth muscle cells, during vascular remodelling (see [34]). To this purpose, it has to

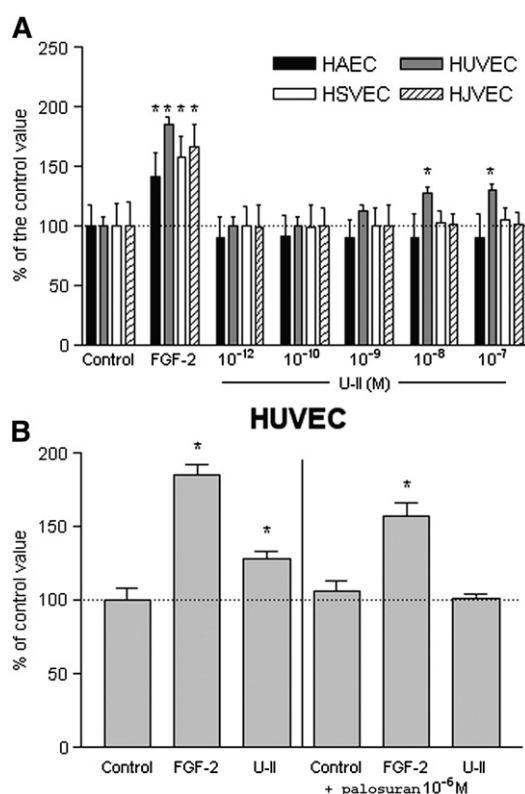


Fig. 5. Effect of U-II and FGF-2 on human vascular EC proliferation. A. A significant stimulatory effect was observed only in HUVEC, starting from the dose of 10^{-8} M. B. In this endothelial cell type 10^{-8} M U-II induces a moderate but significant increase of the proliferation rate (about 30%), which is no longer detectable in the presence of 10^{-6} M palosuran, indicating that it was mediated by the binding of U-II to UT. $*p < 0.05$ vs. the control group.

be noticed that both U-II and UT were recently reported [8] to be significantly expressed in human vascular smooth muscle cells.

As far as HSVEC are concerned, however, a discrepancy emerged between the lack of U-II immunoreactivity observed in the present *in vitro* study and the presence of U-II like immunoreactivity reported for EC in sections of human saphenous vein [20]. Although the possibility exists that alterations in peptide expression may have occurred during the culture process of HSVEC compared to native tissue, alternative hypotheses could deserve some consideration. In particular, it has been shown that a paracrine regulation of U-II expression plays an important role in some cell types, as for instance renal epithelium [35]. Thus, the discrepancy between *in vitro* and *in vivo* results could be reconciled by surmising that a similar mechanism is operating in HSVEC, needing an intact tissue environment to express the peptide.

When tested in the Matrigel assay, EC from the four vascular beds here analyzed showed some heterogeneity also from a functional point of view. In fact, they exhibited at baseline different tendency to self-organize, being the meshwork of capillary-like structures generated by the HAEC generally less branched and complex than the meshwork generated by the venous EC. It has been reported [25] that in venous EC genes related to cell growth, differentiation and angiogenesis are overexpressed. Thus, our findings could reflect such a difference in gene expression profiles between HAEC and venous EC. It has to be pointed out, however, that, unlike the other cell populations used in the present study, HAEC were from a commercially available cell preparation and we cannot exclude the possibility that the observed differences could be simply related to different cell management protocols applied before experimentation.

Our data, anyway, provided unequivocal evidence that in the four human ECs tested U-II exerts a significant pro-angiogenic activity, comparable to that of one of the main classic angiogenic cytokines, namely FGF-2 [36]. Moreover, the angiogenic activity of U-II resulted specifically triggered by the binding of U-II to its receptor, because it was suppressed by the specific UT antagonist palosuran [8]. In fact, palosuran neither *per se* affected basal angiogenesis nor altered the pro-angiogenic activity of FGF-2, thereby ruling out the possibility of its nonspecific toxic effect.

Remarkably, the pro-angiogenic action of U-II, in contrast with that of FGF-2, was not associated with a mitogenic effect on human EC derived from adult vessels. This finding suggests that different mechanisms underlie the activity of these two cytokines and provides a further evidence that in mature EC different intracellular signal pathways are responsible for the various steps of the angiogenic cascade [37,38]. On the contrary, when tested on HUVEC, U-II induced a moderate, but significant, increase of cell proliferation, a result consistent with published data [39,40] describing a specific profile of the fetal venous EC, characterized by high plasticity and proliferative potential.

Increasing evidence indicates that the nature of the response elicited by a specific angiogenic factor is contextual, i.e., it depends on the presence or absence of other regulatory molecules in the microenvironment [41,42]. In particular, in the *in vitro* models used in the present study U-II acts synergistically with VEGF, which resulted expressed together with its receptors by the human EC in culture. It is known that VEGF is actively secreted by the EC [43] and it was proposed to be the principal chemoattractant driving EC elongation, self-organization and the formation of capillary-like networks *in vitro* [44–46]. The results obtained in the present study indicate that U-II is not acting through an up-regulation of VEGF and/or its receptors, since no changes in the expression of these markers was detected (neither by RT-PCR nor immunocytochemistry) following U-II administration.

Finally, it has to be noticed that a stimulation of the *in vitro* angiogenesis by U-II was observed starting from the concentration of 10^{-8} M, a value significantly higher than the reported plasma U-II

levels in normal physiological conditions, corresponding to 10^{-9} M [16,19]. However, plasma U-II levels around 10^{-8} M were observed in patients with hypertension or atherosclerosis [16] and high local concentrations could be achieved in the EC microenvironment as an effect of the U-II release from surrounding cells [47].

In conclusion, the results of the present study suggest that U-II, in addition to regulating cardiovascular function, also exert an action on the development and remodelling of the vascular network, indicating that it could be a target of potential relevance in future antiangiogenic therapeutic strategies.

References

- Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, et al. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5021–4.
- Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15803–8.
- Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, et al. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* 1999;1:383–5.
- Ames RS, Sarau HM, Cambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, et al. Human urotensin II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401:282–6.
- Davenport AP, Maguire JJ. Urotensin II: fish neuropeptide catches orphan receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:80–92.
- Douglas SA, Ohlstein EH. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:229–37.
- Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2000;131:441–6.
- Maguire JJ, Kuc RE, Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* 2008;29:735–42.
- Yoshimoto T, Matsushita M, Hirata Y. Role of urotensin II in peripheral tissues as an autocrine/paracrine growth factor. *Peptides* 2004;25:1775–81.
- Albertin G, Casale V, Ziolkowska A, Spinazzi R, Malendowicz LK, Rossi GP, et al. Urotensin-II and U-II-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *Int J Mol Med* 2006;17:1111–5.
- Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: “heart” of the matter or simply a fishy “tail”? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:159–67.
- Cheung BMY, Leung R, Man YB, Wong LYF. Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* 2004;22:1341–4.
- Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Gaiad A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 2002;359:1990–7.
- Russel FD, Molenaar P. Cardiovascular actions of human urotensin II: considerations for hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004;369:271–3.
- Thamassoulis G, Huyhn T, Gaiad A. Urotensin II and cardiovascular diseases. *Peptides* 2004;25:1789–94.
- Suguro T, Watanabe T, Ban Y, Kodate S, Misaki A, Hirano T, et al. Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2007;20:211–7.
- Bousette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH, Gaiad A. Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 2004;176:117–23.
- Hassan GS, Douglas SA, Ohlstein EH, Gaiad A. Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides* 2005;26:2464–72.
- Heringlake M, Kox T, Uzun O, Will B, Bahlmann L, Klaus S, et al. The relationship between urotensin II plasma immunoreactivity and left ventricular filling pressures in coronary artery disease. *Regul Pept* 2004;121:129–36.
- Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Kleinz MJ, Davenport AP. Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* 2004;25:1767–74.
- MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, et al. Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 2000;130:201–4.
- Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, et al. Urotensin-II and its receptor (UT) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT stimulates angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Int J Mol Med* 2006;18:1107–12.
- Garlanda C, Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1193–202.
- Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10623–8.
- Deng DX, Tsalenko A, Vailaya A, Ben-Dor A, Kundu R, Estay I, et al. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ Res* 2006;92:200–8.

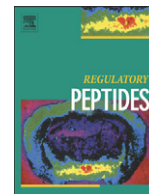
- [26] Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, et al. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin system. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:204–12.
- [27] Conconi MT, Lora S, Baiguera S, Boscolo E, Folini M, Scienza R, et al. In vitro culture of rat neuromicrovascular endothelial cells on polymeric scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2004;71:669–74.
- [28] Conconi MT, Baiguera S, Guidolin D, Furlan C, Menti AM, Vigolo S, et al. Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblast 3T3/J2 cell line. *J Investig Med* 2003;51:227–32.
- [29] Guidolin D, Vacca A, Nussdorfer GG, Ribatti D. A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay in vitro. *Microvasc Res* 2004;67:117–24.
- [30] Albertin G, Carraro G, Nussdorfer GG. Human adrenomedullin gene silencing by short interfering RNAs: a preliminary study. *Int J Mol Med* 2005;15:579–83.
- [31] Albertin G, Rucinski M, Carraro G, Forneris M, Andreis PG, Malendowicz LK, et al. Adrenomedullin and vascular endothelium growth factor genes are overexpressed in the regenerating rat adrenal cortex, and AM and VEGF reciprocally enhance their mRNA expression in cultured rat adrenocortical cells. *Int J Mol Med* 2005;16:431–5.
- [32] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 2001;29:e45.
- [33] Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acid Res* 2002;30:e36.
- [34] Zhang Y, Li Y, Wei R, Wang Z, Bu D, Zhao J, et al. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for aortic adventitia of rat. *Regul Pept* 2008;151:88–94.
- [35] Tian L, Li C, Qi J, Fu P, Yu X, Li X, et al. Diabetes-induced upregulation of urotensin II and its receptor plays an important role in TGF- β 1-mediated renal fibrosis and dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1234–42.
- [36] Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 2002;35:227–31.
- [37] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat Rev* 2006;7:359–71.
- [38] Rusnati M, Presta M. Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenic strategies. *Curr Pharm Des* 2007;13:2025–44.
- [39] Lang I, Schweizer A, Hiden U, Ghaffari-Tabrizi N, Hagendorfer G, Bilban M, et al. Human fetal placental endothelial cells have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential. *Differentiation* 2008;76:1031–43.
- [40] Zhang Y, Fisher N, Newey SE, Smythe J, Tatton L, Tsaknakis G, et al. The impact of proliferative potential of umbilical cord-derived endothelial progenitor cells and hypoxia on vascular tubule formation in vitro. *Stem Cells Dev* 2009;18:359–75.
- [41] Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia* 2007;21:44–52.
- [42] Sporn MB, Roberts A. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 1988;332:217–9.
- [43] Fernandez-Sauze S, Delfino C, Mabrouk K, Dussert C, Chinot O, Martin PM, et al. Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors. *Int J Cancer* 2004;108:797–804.
- [44] Guidolin D, Nico B, Belloni AS, Nussdorfer GG, Vacca A, Ribatti D. Morphometry and mathematical modelling of the capillary-like patterns formed *in vitro* by bone marrow macrophages of patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2007;21:2201–3.
- [45] Helmlinger G, Endo M, Ferrara N, Hlatki L, Jain RK. Formation of endothelial cell networks. *Nature* 2000;405:139–41.
- [46] Merks RMH, Brodsky SV, Goligorsky MS, Newman SA, Glazier JA. Cell elongation is key to *in silico* replication of *in vitro* vasculogenesis and subsequent remodeling. *Dev Biol* 2006;289:44–54.
- [47] Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, Katagiri T. Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res* 2006;29:375–87.



Contents lists available at ScienceDirect

Regulatory Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/regpep



Short communication

The pro-angiogenic activity of urotensin-II on human vascular endothelial cells involves ERK1/2 and PI3K signaling pathways

Diego Guidolin^{a,*}, Giovanna Albertin^{a,1}, Barbara Oselladore^a, Elisa Sorato^a, Piera Rebuffat^a, Alessandra Mascarin^a, Domenico Ribatti^b

^a Departments of Human Anatomy and Physiology (Section of Anatomy), University of Padova Medical School, Padova, Italy

^b Departments of Human Anatomy and Histology, University of Bari Medical School, Bari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 October 2009

Received in revised form 17 December 2009

Accepted 11 February 2010

Available online 19 February 2010

Keywords:

Angiogenesis

Human endothelial cells

Urotensin-II

Signaling pathways

ABSTRACT

Human vascular endothelial cells express the urotensin-II (U-II) receptor and exhibit a strong *in vitro* angiogenic response to the peptide. Thus, in the present study an *in vitro* model, based on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured on Matrigel, was used to characterize more in detail the signaling pathways that control the pro-angiogenic action of U-II. The activation of the U-II receptor (UT) was associated with an increase of intracellular calcium concentration. Both calcium rise and pro-angiogenic effect of the peptide can be blocked by U73122, a selective inhibitor of phospholipase-C, indicating that the signal transduction from UT mainly involves the phospholipase-C/IP₃ pathway. As far as the downstream signaling pathways are concerned, western blot analyses and experiments with specific inhibitors indicated that the U-II-induced self-organization of the cells into capillary-like structures was PKC dependent and involved the activation of the ERK1/2, but not p38-MAPK, transduction pathway. Interestingly, the pharmacological inhibition of PI3K (obtained with LY294002), hindered the capacity of U-II to induce a proangiogenic effect on HUVEC, suggesting that PI3K-dependent pathways also play a role in regulating the process.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The human form of urotensin-II (U-II) is a somatostatin-like cyclic 11-amino acid peptide [1,2], synthesized by proteolytic cleavage of a precursor (the prepro-U-II), and identified as the endogenous ligand of GPR14 [2,3], a seven-transmembrane spanning G protein-coupled receptor (GPCR), referred to as the U-II receptor (UT).

U-II and UT are highly expressed in cardiovascular tissues [4–6], where the principal physiological activity of the peptide (see [7] for a review) is a potent systemic vasoconstrictor and hypertensive effect [2,8], different in anatomic sites and animal species. In human vascular tissues, contractile responses to U-II were reported in coronary, mammary, and radial arteries, as well as in saphenous and umbilical veins [9].

Several lines of evidence indicate that U-II also plays an important role in the pathophysiology of the cardiovascular system [10–13]. In fact, upregulation of UT was observed in patients with end-stage heart failure [10] and plasma U-II level was positively correlated with carotid atherosclerosis in hypertensive patients [14] and in patients with coronary artery disease [9,15–17].

Furthermore, a significant involvement of the peptide and its receptor in cardiovascular tissue remodeling is emerging [18]. U-II has mitogenic growth properties in vascular smooth muscle cells [19,20] and promotes hypertrophic growth (increase in cell size and protein content in the absence of proliferation) of cultured cardiomyocytes [21]. As far as endothelial cells are concerned, we recently showed that U-II (starting from the concentration of 10^{−8} M) exerts a significant pro-angiogenic activity *in vitro*, comparable to that of one of the main classic angiogenic cytokines, namely FGF-2, in both rat [22] and human [23] vascular endothelial cells. Moreover, the angiogenic activity of U-II was specifically triggered by the binding of U-II to its receptor, because it was suppressed by the specific UT antagonist palosuran.

Thus, the aim of the present study was to characterize more in detail the signaling pathways that control the pro-angiogenic action of U-II on cultured human vascular endothelial cells.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Human U-II was purchased from Phoenix Europe (Karlsruhe, Germany), FGF-2 from Preprotech (London, UK) and 4',6'-diamine-2'-phenylindole (DAPI) from Boehringer (Mannheim, Germany). Ultraser was obtained from Ciplagen (Fremont, CA) and Matrigel from Becton Dickinson Labware (Bedford, MA). Monoclonal antibodies to

* Corresponding author. University of Padova Medical School, Dept. of Human Anatomy and Physiology (Section of Anatomy), Via Gabelli, 65 I-35121 Padova Italy. Tel.: +39 049 8272316; fax: +39 049 8272319.

E-mail address: diego.guidolin@unipd.it (D. Guidolin).

¹ These two authors equally contributed to the work.

phospho-p44/42 (ERK1/2), p44/42 MAPK, phospho-p38, p38 MAPK were provided by Cell Signaling Technology (Danvers, MA), antibodies for focal adhesion kinase (p125^{FAK}), phospho-p125^{FAK} and GAPDH were from Millipore (Milan, Italy). U73122, Calphostin C, PD98059, SB203580, LY294002 were received from Biomol (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany). Fluo-3, EC basal medium (EBM), fetal calf serum (FCS), bovine serum albumine (BSA), phosphate buffered saline (PAS) and all other chemicals and reagents were provided by Sigma-Aldrich Corp. (St.Louis, MO). The UT antagonist palosuran (ACT-058362) [24] was a gift from dr. M.Clozel (Actelion Pharmaceutical Ltd., Allschwil, Switzerland).

2.2. Endothelial cell cultures

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from samples of the umbilical cord as previously reported [23]. Briefly, after resection, the specimens were immediately placed into EC basal medium (EBM) and repeatedly rinsed with PBS and antibiotics. Remaining impurities, such as adherent blood cells and adipose tissue, were then carefully removed. After rinsing, the isolated vessels were longitudinally cut and placed in a culture plate with 0.1% type II collagenase at 37 °C. After 20 min the digested tissue was collected and the cell suspension centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The pellet was then re-suspended in fresh EBM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/L streptomycin, and 1% UltroSer and plated onto a fibronectin-precoated culture dish (1 µg/cm²) at 37 °C in a humidified incubator (5% CO₂, 95% air). When cultures were grown to near-confluence, cells were detached, harvested and incubated for 30 min at 4 °C with Tosylactivated Dynabeads M-450 (Oxoid Italy, Milan, Italy) coated with anti-human CD31 antibodies in order to separate EC by magnetic immunoseparation [25]. The endothelial phenotype of the isolated cells was confirmed by flow cytometry using anti-von Willebrand factor antibody.

2.3. In vitro Matrigel assay

Growth factor-depleted Matrigel was thawed on ice overnight, and spread evenly over each well (50 µl) of a 24-well plate. The plates were incubated for 30 min at 37 °C to allow Matrigel to gel, and EC were seeded (2.5 × 10⁴ cells/cm²) and cultured in basal medium, containing 50 ng/ml FGF-2 (positive control) or supplemented with U-II (10⁻⁸ M) alone or in the presence of the appropriate pharmacological inhibitor: U73122 (specific inhibitor of phospholipase-C, IC₅₀ = 5 · 10⁻⁸ M), Calphostin C (specific inhibitor of PKC, IC₅₀ = 5 · 10⁻⁸ M), PD98059 (specific inhibitor of ERK1/2, IC₅₀ = 2 · 10⁻⁶ M), SB203580 (specific inhibitor of p38-MAPK, IC₅₀ = 7 · 10⁻⁸ M), LY294002 (specific inhibitor of PI3K, IC₅₀ = 1.4 · 10⁻⁶ M). For each inhibitor a range of concentrations (10⁻¹² – 5 · 10⁻⁶ M) was tested. After 18 h of incubation at 37 °C, cultures were observed under the microscope (DM-IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at a primary magnification of x5. Phase contrast images were recorded (5 fields for each well: the four quadrants and the center) and saved as TIFF files. Image analysis of the cell pattern was carried out using the QWin image analysis software, as previously detailed [26], and the following parameters were estimated: percent area covered by EC, total length of EC network per field, and number of meshes and branching points per field. Values were expressed as percent of the control value.

2.4. Cell migration assay

For the migration assay in a modified Boyden chamber a 24-well transwell chamber apparatus with 8 µm pore size polycarbonate membrane (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) was used. HUVEC were harvested by trypsinization, collected by centrifugation and seeded (5 · 10⁴ cells/well) into the upper compartment of the microchamber. The lower compartment was filled with the chemoat-

tractant U-II (in the concentration range 10⁻¹²–10⁻⁶ M) or VEGF (50 ng/ml). After 6 hrs of incubation at 37 °C, cells that had not migrated from the top of the filter were scraped away with a cotton applicator. The filter was then fixed in 10% formaldehyde for 30 min at room temperature, stained with DAPI and the number of cells that migrated through the lower surface of each membrane was counted. A negative control consisted of EBM as chemoattractant. Each experimental point was analyzed in triplicate.

2.5. Ca²⁺ measurement

HUVEC were seeded (1.3 × 10⁴ cells) on 10 mm FluoroDish glass bottom Petri dishes (Ted Pella Inc., Redding, CA) and cultured in EBM. After 24 h HUVEC were washed with modified HEPES Tyrode's buffer (MHTB; 129 mM NaCl, 8.9 mM NaHCO₃, 0.3 mM KH₂PO₄, 0.8 mM MgCl₂, 5.6 mM dextrose and 10 mM Hepes, pH 7.4) and incubated in the same buffer containing the Ca²⁺ indicator Fluo-3 AM (10 µM) for 45 min at 37 °C and in buffer alone for additional 15 min to allow deesterification of the dye. After washing, HUVEC were then incubated in basal medium alone or supplemented with palosuran (10⁻⁶ M) or U73122 (10⁻⁶ M).

After 30 min the dish was mounted on a fluorescence microscope (DM-IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and the baseline fluorescence image (emission = 525 nm) of a random field was recorded at a primary magnification of ×10 using a digital camera (DFC 480, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and saved as a TIFF file. The cells were then treated with U-II (10⁻⁶ M, 10⁻⁸ M, 10⁻¹² M) and fluorescence images of the same field were recorded every 30 sec and saved as TIFF files.

The mean fluorescence intensity of each single cell was then measured by image analysis using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Single cell data were expressed as the ratio between the measured value at each time step and the value exhibited by the cell at baseline.

2.6. Western Blot

Activation of ERK1/2, p38 and focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in response to urotensin-II stimulation was examined by Western blot as detailed elsewhere [27]. Briefly, 5 or 10 min following stimulation with U-II (10⁻⁸ M) cells were lysed with Lysis Buffer (0.6% TritonX-100; 0.15 M NaCl; 10 mM Tris pH 7.4; 1 mM EDTA) plus protease and phosphatase inhibitors and homogenized. Cell extracts were western blotted and probed with monoclonal antibodies to phospho-p44/42 (pERK1/2), phospho-p38 and phospho-p125^{FAK}.

Blots were then stripped and reprobed for total kinase using anti-ERK1/2, anti-p38 and anti-p125^{FAK} antibodies respectively. A mouse anti-human GAPDH protein antibody was used as a control for equal loading. The relative levels of active and total protein were quantified by image analysis using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and densitometric data were expressed as the ratio between active and total protein.

2.7. Statistical analysis

All the experiments were carried out at least three times in triplicate and the results were expressed as means ± sem. Two-samples comparisons were performed by Student's t-test. For multigroup comparisons, data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test for multiple comparisons versus the control group. Values of p < 0.05 were considered to be statistically significant. The statistical analysis was carried out using GraphPad PRISM software (version 3.03; GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

3. Results

3.1. UT-stimulated *in vitro* angiogenesis

After seeding on Matrigel HUVEC spread and aligned with each other to form branching anastomosing tubes with multicentric junctions that gave rise within 18 h to a meshwork of capillary-like structures. As expected, when culture medium was admixed with U-II (10^{-8} M) a higher morphogenetic effect was observed with the formation of a meshwork of increased density and complexity (Fig. 1A). The effect of 10^{-8} M U-II resulted comparable to that obtained with 50 ng/ml FGF-2 (not shown). Cell migration assays further confirmed the pro-angiogenic effect of U-II administration. As shown in Fig. 1B, a significant 47% increase in the number of migrated cells was detected with 10^{-6} M U-II, similar to that observed in the presence of VEGF (50 ng/ml).

Palosuran, a specific antagonist of UT, was *per se* ineffective (Fig. 1A) but it was able to counteract the effect of U-II in both the capillary forming and the cell migration assay (Fig. 1A,B), indicating that the pro-angiogenic activity of U-II was mediated by the binding of the peptide to its receptor.

As shown in Fig. 1C, the U-II-stimulated capillary-like structures formation resulted also inhibited when the peptide was administered in the presence of U73122 (starting from the concentration of 10^{-6} M),

a specific inhibitor of phospholipase-C, suggesting that the binding of U-II to UT triggers the activation of phospholipase-C/IP₃ pathways. Observations of the cytosolic Ca²⁺ confirmed this finding. As illustrated in Fig. 2A, U-II administration induced in HUVEC a dose dependent increase of intra-cellular calcium concentration, which was inhibited (Fig. 2B) by both palosuran and U73122.

3.2. Signaling mechanisms involved in the U-II pro-angiogenic effect

The results of Matrigel assays performed in the presence of specific inhibitors of ERK1/2, p38-MAPK and PI3K are illustrated in Fig. 3A. As shown, PD98059, a selective inhibitor of ERK1/2, from the dose of $5 \cdot 10^{-6}$ M was able to completely inhibit the U-II-induced capillary-like tubes formation, indicating the involvement of this signaling pathway in the effect of the peptide. Such an activation of ERK1/2 appeared to be PKC dependent, being the U-II effect also blocked by Calphostin-C. On the contrary, SB203580, a selective inhibitor of p38-MAPK, didn't inhibit the pro-angiogenic effect of U-II on HUVEC. Interestingly, the pharmacological inhibition of PI3K (obtained by LY294002) hindered the capacity of U-II to induce a pro-angiogenic effect on HUVEC, suggesting that PI3K-dependent pathways also play a role in regulating the process. As illustrated in Fig. 3B, the inhibitors by themselves neither interfered significantly with the spontaneous self-

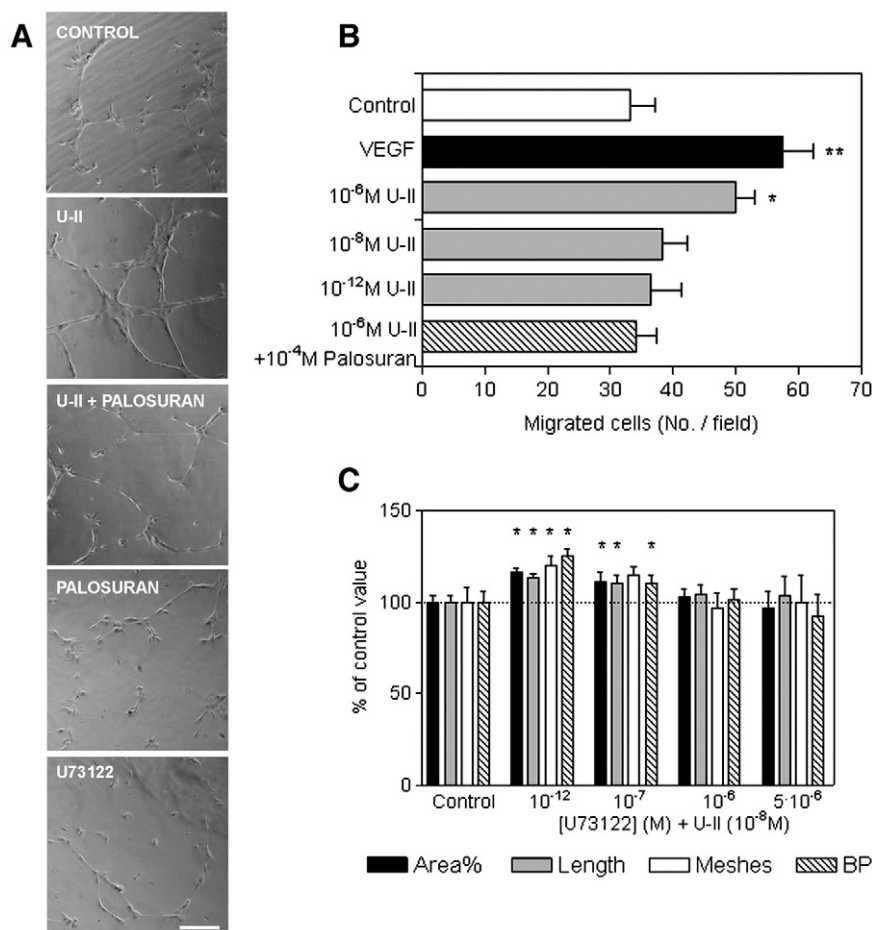


Fig. 1. Pro-angiogenic effect of U-II. A. Representative patterns formed by HUVEC on Matrigel at baseline and in the presence of 10^{-8} M U-II (bar = 200 μ m). In the presence of 10^{-6} M palosuran (specific antagonist of UT) the stimulatory effect of U-II on the self-organization of the cells into capillary-like structures was no longer detectable. A representative pattern after treatment with palosuran alone is also shown to illustrate that the antagonist was by itself ineffective. B. Effect of U-II and VEGF on HUVEC migration. Data are expressed as the mean number ($\pm$ sem, N=9) of migrated cells per field. U-II stimulates the endothelial cell migration in a dose-dependent way and the effect is inhibited by the UT antagonist palosuran. C. Results of the Matrigel assay in the presence of increasing concentrations of U73122 (selective inhibitor of phospholipase-C). As illustrated, the pro-angiogenic action of 10^{-8} M U-II was completely inhibited starting from the dose of 10^{-6} M of U73122. A representative pattern generated by HUVEC treated with 10^{-6} M U73122 alone is shown in A (last panel). As illustrated the inhibitor by itself didn't interfere with the self-organization of the cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

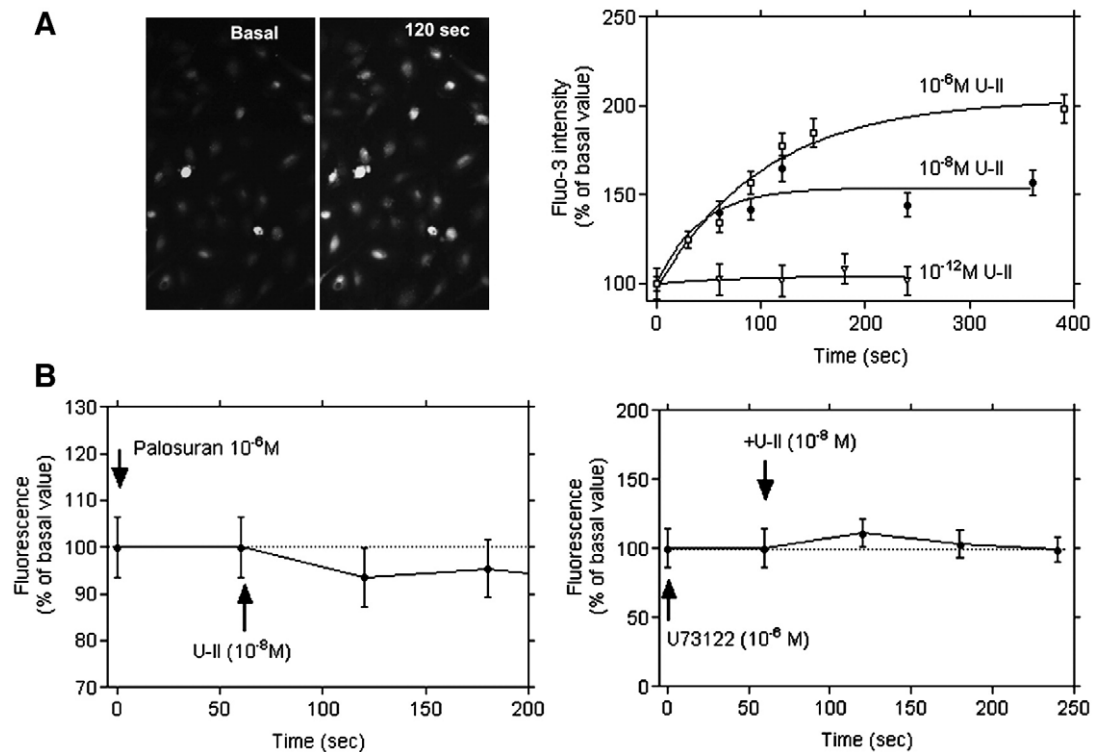


Fig. 2. Effect of U-II on intracellular calcium concentration. A. In the left panel are shown representative images to illustrate the increase of Fluo-3 fluorescence in the cells (corresponding to an increase of intracellular calcium concentration) following 10^{-8} M U-II administration. The result of the measurement of the time-course of the fluorescence values exhibited by the HUVEC following the exposure to increasing concentrations of U-II are shown in the right panel. Data are mean $\pm$ sem of single cell fluorescence intensities, expressed as percent of the value each cell exhibited at baseline. B. Both 10^{-6} M palosuran (specific antagonist of UT) or 10^{-6} M U73122 (selective inhibitor of phospholipase-C) completely abolished the calcium signal induced by 10^{-8} M U-II.

organization of HUVEC when seeded on Matrigel nor changed their intracellular calcium concentration.

Western blot analyses on the phosphorylated forms of the major MAPK provided support to the above mentioned findings. As shown in Fig. 4, the stimulation of HUVEC with 10^{-8} M U-II resulted after 10 min. in an increased phosphorylation of ERK1/2, but not p38-MAPK, confirming ERK1/2 as the signaling pathway mainly involved in the U-II-mediated pro-angiogenic effect in HUVEC. Furthermore, the Western blot analysis showed that the phosphorylation levels of p125^{FAK} were increased as early as 5 min following U-II treatment, providing additional evidence that the activation of PI3K-dependent signaling pathways are associated with the U-II-induced HUVEC migration and tube formation *in vitro*.

4. Discussion

In a previous work [23] we documented that U-II, the most potent vasoconstrictor agonist yet identified, is well expressed, together with its receptor, by cultured HUVEC. Moreover, when tested in cell proliferation and Matrigel assays, the peptide, starting from the concentration of 10^{-8} M, exerted a significant pro-angiogenic activity, comparable to that of one of the main classic angiogenic cytokines, namely FGF-2. The cell migration data provided in the present study further confirm and extend the characterization of the peptide as a “nonclassic” pro-angiogenic factor [28].

The fact that this peptide induces both vasoconstriction and angiogenesis could open the door to more in-depth understanding of pathological processes associated with vascular remodeling and on the relationship between U-II and other signaling molecules. In this respect, Suguro et al. [29] have recently demonstrated a significant correlation between increased plasma levels of U-II, blood pressure, VEGF expression, diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in patients with type-2 diabetes. It is to note that plasma VEGF levels were significantly increased in patients with diabetes compared with non-

diabetic controls [30] and that angiogenesis plays a crucial role in the progression of atherosclerotic plaque [31]. In fact, several angiogenic factors are present in the atherosclerotic lesions, including various growth factors, chemokines, cytokines and proteinases. Moreover, pharmacological inhibition of angiogenesis in atherosclerotic plaques is a novel and intriguing therapeutic strategy [31]. In this context 4-aminoquinolone, a UT antagonist, inhibited the development of atherosclerotic lesions both in the presence and absence of exogenous U-II administration in apolipoprotein E-knockout mice [32].

Therefore, a better knowledge of the mechanisms mediating the pro-angiogenic effect of the peptide could be of particular importance for the therapy of cardiovascular disease. Almost no information, however, is presently available on this topic. Thus, in the present study, we have used the *in vitro* Matrigel assay of U-II-stimulated angiogenesis to investigate signaling pathways regulating the process at the endothelial cell level. It has to be pointed out that this study, being largely based on the pharmacological inhibition of various steps of the intracellular cascade, represents only a reasonable initial exploration of signalling downstream of U-II.

As reported in previous studies [22,23], the pro-angiogenic effect of U-II was mediated by the binding of the peptide to UT, being inhibited by the selective antagonist palosuran. UT belongs to the class A family of G protein-coupled receptors, which are homologous with the rhodopsin receptor (see [33]). In many cell types, as for instance rat astrocytes [34], the main transduction pathway associated with UT is the coupling and activation of the $G_{\alpha q/11}$ subtype of heterotrimeric G proteins [21], leading to the activation of phospholipase-C and to an increase in inositol triphosphates [35] with mobilisation of intracellular Ca^{2+} [2]. An increase of intracellular Ca^{2+} following UT stimulation by U-II was reported to occur in endothelial cells from human aorta [36] and the data here presented provide evidence that in HUVEC the phospholipase-C/IP₃ pathway is the main signal transduction pathway from UT. In fact, the

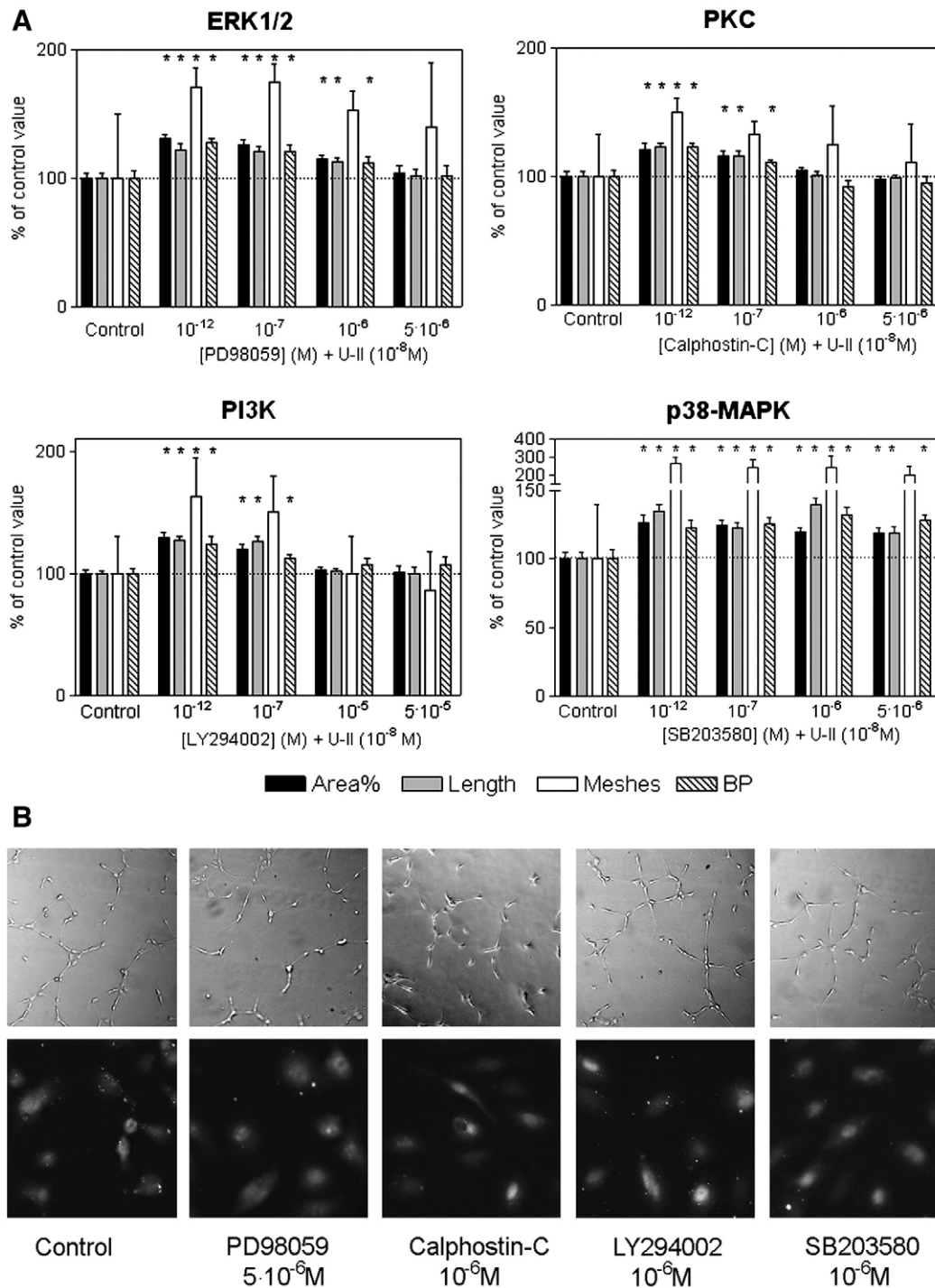


Fig. 3. Effect of 10⁻⁸ M U-II on the self-organization of HUVEC in the presence of increasing concentrations of inhibitors for specific steps in the intracellular signaling cascade. **A.** The pro-angiogenic effect of 10⁻⁸ M U-II can be abolished when the Matrigel assay is performed in conditions of pharmacological inhibition of ERK1/2, PKC and PI3K, obtained with the selective inhibitors PD98059 (from 5·10⁻⁶ M), Calphostin C (from 10⁻⁶ M) and LY294002 (from 10⁻⁶ M) respectively. On the contrary, in the presence of SB203580, selective inhibitor of p38-MAPK, U-II (10⁻⁸ M) was still able to stimulate the formation of capillary-like structures by HUVEC (* p<0.05, N=9). **B.** Representative patterns generated on Matrigel (upper panels) and Fluo-3 fluorescence images (lower panels) when HUVEC are cultured in basal medium alone or supplemented with 5·10⁻⁶ M PD98059, 10⁻⁶ M Calphostin, 10⁻⁶ M LY294002 or 10⁻⁶ M SB203580. As illustrated, the inhibitors didn't change the self-organization of the cells nor their intracellular calcium level at baseline.

cytoplasmic Ca²⁺ increase induced by the binding of U-II to UT and the pro-angiogenic effect of the peptide were both inhibited by the phospholipase-C inhibitor U73122.

As far as the downstream signaling pathways are concerned, in the present study we showed the involvement of PKC and ERK1/2 activation in the U-II-mediated self-organization of HUVEC seeded on Matrigel, suggesting that the PLC/PKC/ERK pathway (see [37]) contributes to the U-II-induced pro-angiogenic effect in HUVEC. In addition, the recently

reported mechanism of ERK1/2 autophosphorylation triggered by the βγ subunits released from activated G_q proteins [38] could contribute as well to the U-II-stimulated ERK1/2 activation. The observed involvement of ERK1/2 pathway is consistent with previously reported data, showing that ERK1/2 activation in HUVEC is associated with other U-II-induced metabolic and trophic effects relevant for angiogenesis, such as upregulation of collagen-I [39], stimulation of cell proliferation and protection from apoptosis [40].

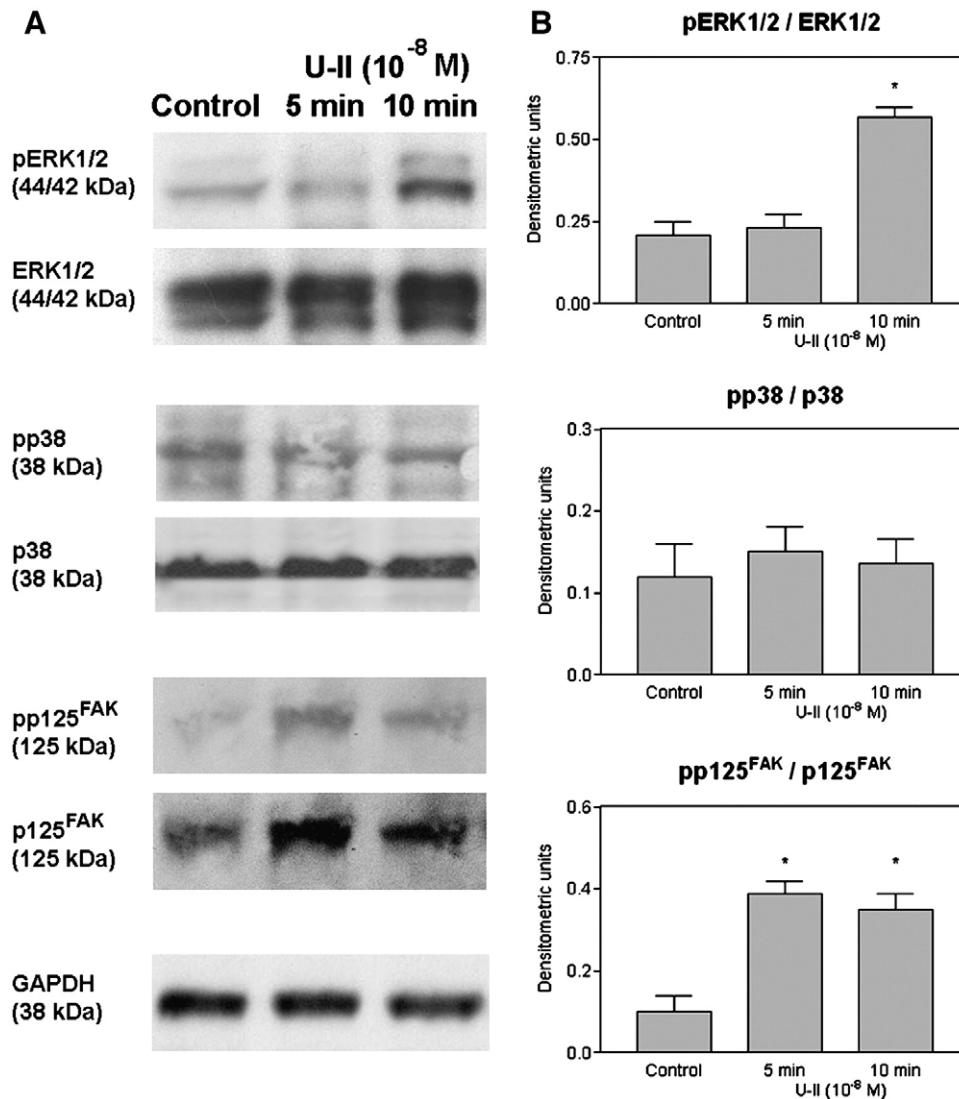


Fig. 4. A. Western blot assessment of the phosphorylated ERK1/2, p38-MAPK and focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in control HUVEC and in HUVEC treated for 5 and 10 min with 10^{-8} M U-II. p125^{FAK} is an intracellular signal (associated with endothelial cell proliferation, migration and sprouting) which depends on the activation of the PI3K pathway [40,41]. The level of GAPDH in the total protein was used as a control. B. The bands were quantitated by densitometry and data are expressed as the ratio between phosphorylated and total protein. A significant increase of activated ERK1/2 and p125^{FAK} can be observed after 10 and 5 min of U-II stimulation respectively (* $p < 0.05$, $N = 3$). On the contrary, following treatment of HUVEC with 10^{-8} M U-II no changes in the active form of p38-MAPK were detected with respect to the unstimulated condition.

In the present study, the results obtained in the presence of LY294002 provided evidence that PI3K is also involved in the signaling cascade mediating the pro-angiogenic effect of U-II. The observed increase in p125^{FAK} phosphorylation following U-II administration further supported this finding. In fact, tyrosine-phosphorylation of this kinase (a key intracellular signaling step for the self-organization of HUVEC [41]) was shown to occur through a PI3K-dependent pathway [41,42]. As recently reported for non-endothelial cell types [43], this pathway could be simply initiated by the elevation of intracellular calcium concentration induced by the binding of U-II and UT. Alternative hypotheses, however, have to be considered, since GPCR can also activate PI3K pathways via receptor tyrosine kinase or integrin transactivation [37] and U-II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor was demonstrated in smooth muscle cells and cardiomyocytes [44,45].

It is interesting to notice that the pattern of U-II-induced signaling observed in HUVEC and involving ERK1/2 and PI3K, but not p38-MAPK, is consistent with data obtained in UT-transfected cell lines [46] but exhibits some difference with the set of cellular events triggered by U-II in cardiomyocytes, where ERK1/2 and p38-MAPK, but not PI3K, were

associated with UT activation by U-II (see [44]). It has to be observed, however, that after signal initiation from a GPCR, cell growth and differentiation are regulated by a network of interrelated signaling pathways, the relative contribution of each differs not only between receptors but also between cell types [47,48]. In this respect, the results here presented on the U-II-induced signaling cascade in HUVEC show consistency with previously reported data concerning endothelial cells and demonstrating the involvement of ERK1/2, PI3K and p125^{FAK} in the angiogenic response to the peptide adrenomedullin [41].

In conclusion, the results of the present study show that the pro-angiogenic action of U-II occurs through activation of ERK1/2 and PI3K, confirming the importance of these intracellular signaling steps for angiogenesis and this peptide as a target of potential relevance in future antiangiogenic therapeutic protocols.

References

- [1] Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anovar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, et al. Cloning of cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and humans reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;95:15803–8.

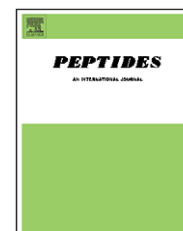
- [2] Ames RS, Sarau HM, Cambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, et al. Human urotensin II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401:282–6.
- [3] Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams Jr DL, et al. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:174–8.
- [4] Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu N, et al. Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J Hypertens* 2001;19:2185–90.
- [5] Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2000;131:441–6.
- [6] Maguire JJ, Kuc RE, Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues : relevance to function. *Peptides* 2008;29:735–42.
- [7] Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: “heart” of the matter or simply a fishy “tail”? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:159–67.
- [8] Douglas SA, Ohlstein EH. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:229–37.
- [9] Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Kleinz MJ, Davenport AP. Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* 2004;25:1767–74.
- [10] Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 2002;359:1990–7.
- [11] Cheung BM, Leung R, Man YB, Wong LY. Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* 2004;22:1341–4.
- [12] Russel FD, Molenaar P. Cardiovascular actions of human urotensin II: considerations for hypertension. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2004;369:271–3.
- [13] Thanassoulis G, Huyhn T, Giaid A. Urotensin II and cardiovascular diseases. *Peptides* 2004;25:1789–94.
- [14] Suguro T, Watanabe T, Ban Y, Kodate S, Misaki A, Hirano T, et al. Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2007;20:211–7.
- [15] Boussette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A. Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 2004;176:117–23.
- [16] Heringlake M, Kox T, Uzun O, Will B, Bahlmann L, Klaus S, et al. The relationship between urotensin II plasma immunoreactivity and left ventricular filling pressures in coronary artery disease. *Regul Pept* 2004;121:129–36.
- [17] Hassan GS, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A. Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides* 2005;26:2464–72.
- [18] Papadopoulos P, Boussette N, Giaid A. Urotensin-II and cardiovascular remodeling. *Peptides* 2008;29:764–9.
- [19] Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 2001;88:1102–4.
- [20] Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens* 2001;19:2191–6.
- [21] Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, et al. Direct actions of urotensin II on the heart. Implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* 2003;93:246–53.
- [22] Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, et al. Urotensin-II and its receptor (UT) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* 2006;18:1107–12.
- [23] Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Spinazzi R, Mascarini A, Oselladore B, et al. Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations. *Regul Pept* 2009;157:64–71.
- [24] Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, et al. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin system. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:204–12.
- [25] Conconi MT, Lora S, Baiguera S, Boscolo E, Folin M, Scienza R, et al. In vitro culture of rat neuromicrovascular endothelial cells on polymeric scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2004;71:669–74.
- [26] Guidolin D, Vacca A, Nussdorfer GG, Ribatti D. A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay in vitro. *Microvasc Res* 2004;67:117–24.
- [27] Guidolin D, Albertin G, Spinazzi R, Sorato E, Mascarini A, Cavallo D, et al. Adrenomedullin stimulates angiogenic response in cultured human vascular endothelial cells: involvement of the vascular endothelial growth factor receptor 2. *Peptides* 2008;29:2013–23.
- [28] Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2007;59:185–205.
- [29] Suguro T, Watanabe T, Kodate S, Xu G, Hirano T, Adachi M, et al. Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clin Science* 2008;115:327–34.
- [30] Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999;48:1899–906.
- [31] Ribatti D, Levi-Schaffer F, Kovanen PT. Inflammatory angiogenesis in atherogenesis. A double-edged sword. *Ann Med* 2008;40:606–21.
- [32] Shiraishi Y, Watanabe T, Suguro T, Nagashima M, Kato R, Hongo S, et al. Chronic urotensin II infusion enhances macrophage foam cell formation and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *J Hypertens* 2008;26:1955–65.
- [33] Proulx CD, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides* 2008;29:691–9.
- [34] Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desruets L, Schouff MT, et al. Biochemical and functional characterization of high affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 2006;99:582–95.
- [35] Saetrum Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN. Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* 2000;406:265–71.
- [36] Brailoiu E, Jiang X, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Wang H, et al. State-dependent calcium mobilization by urotensin-II in cultured human endothelial cells. *Peptides* 2008;29:721–6.
- [37] New DC, Wong YH. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal* 2007;2:2.
- [38] Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2009;15:75–83.
- [39] Wang H, Mehta JL, Chen K, Zhang X, Li D. Human urotensin II modulates collagen synthesis and the expression of MMP-1 in human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:577–81.
- [40] Shi L, Ding W, Li D, Wang Z, Jiang H, Zhang J, et al. Proliferation and anti-apoptotic effects of human urotensin II on human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2006;188:260–4.
- [41] Kim W, Moon S-O, Sung MJ, Kim SH, Lee S, So J-N, et al. Angiogenic role of adrenomedullin through activation of Akt, mitogen activated protein kinase, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *FASEB J* 2003;17:1937–9.
- [42] Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1432–7.
- [43] Liu Z-M, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, Shum CKY, van Hasselt CA. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1428–36.
- [44] Onan D, Pipolo L, Yang E, Hannan RD, Thomas WG. Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 2004;18:2344–54.
- [45] Tsai CS, Loh SH, Liu JC, Lin JW, Chen YL, Chen CH, et al. Urotensin II-induced endothelin-1 expression and cell proliferation via epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2009;206:86–94.
- [46] Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O. Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* 2002;22:155–68.
- [47] Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:368–76.
- [48] Kholodenko BN. Cell-signaling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:165–75.



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides



Adrenomedullin stimulates angiogenic response in cultured human vascular endothelial cells: Involvement of the vascular endothelial growth factor receptor 2

Diego Guidolin^{a,1,*}, Giovanna Albertin^{a,1}, Raffaella Spinazzi^a, Elisa Sorato^a, Alessandra Mascarin^a, Donatella Cavallo^a, Michele Antonello^b, Domenico Ribatti^c

^a Department of Human Anatomy and Physiology (Anatomy Section), University of Padova Medical School, Via Gabelli, 65, I-35121 Padova, Italy

^b Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Sciences, University of Padova Medical School, Padova, Italy

^c Department of Human Anatomy and Histology, University of Bari Medical School, Bari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2008

Received in revised form

12 July 2008

Accepted 14 July 2008

Published on line 23 July 2008

Keywords:

Adrenomedullin

Angiogenesis

Human vascular endothelial cells

Receptor transactivation

VEGF

VEGF receptors

ABSTRACT

In recent years, evidence has accumulated that many endogenous peptides play an important regulatory role in angiogenesis by modulating endothelial cell behavior. Adrenomedullin (AM), one such factor, was previously shown to exert a clearcut proangiogenic effect *in vitro* when tested on specialized human endothelial cells, such as HUVECs and immortalized endothelial cell lines. In the present study we used normal adult vascular endothelial cells isolated from human saphenous vein to analyze *in vitro* the role of AM, related to both early (increased cell proliferation) and late (differentiation and self-organization into capillary-like structures) angiogenic events and their relationship with the vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling cascade. The results indicated that also in this endothelial cell phenotype AM promoted cell proliferation and differentiation into cord-like structures. These actions resulted specific and were mediated by the binding of AM to its AM1 (CRLR/RAMP2) receptor. Neither the administration of a VEGF receptor 2 (VEGFR-2) antagonist nor the downregulation of VEGF production by gene silencing were able to suppress the proangiogenic effect of AM. However, when the experiments were performed in the presence of SU5416 (a selective inhibitor of the VEGFR-2 receptor at the level of the intra-cellular tyrosine kinase domain) the proangiogenic effect of AM was abolished. This result suggests that in vascular endothelial cells the binding of AM to its AM1 receptor could trigger a transactivation of the VEGFR-2 receptor, leading to a signaling cascade inducing proangiogenic events in the cells.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Angiogenesis, or the formation of new blood vessels from pre-existing ones [14], plays a pivotal role during embryonal development and later, in adult life, in a variety of physiological

(e.g. corpus luteum formation) and pathological conditions, such as malignancy and chronic inflammation [7,13]. The angiogenic cascade is a complex multistep process [43] that includes sequential basement membrane degradation, endothelial cell (EC) migration and proliferation, self-organization of

* Corresponding author. Tel.: +39 049 8272316; fax: +39 049 8272319.
E-mail address: diego.guidolin@unipd.it (D. Guidolin).

¹ These two authors equally contributed to the paper.

0196-9781/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2008.07.009

Mathematical Modeling of the Capillary-Like Pattern Generated by Adrenomedullin-Treated Human Vascular Endothelial Cells In Vitro

Diego Guidolin,^{1*} Giovanna Albertin,¹ Elisa Sorato,¹ Barbara Oselladore,¹ Alessandra Mascarin,¹ and Domenico Ribatti²

A recently proposed approach was used to model the self-organization into capillary-like structures of human vascular endothelial cells cultured on Matrigel. The model combines a Cellular Potts Model, considering cell adhesion, cytoskeletal rearrangement and chemotaxis, and a Partial Differential Equation model describing the release and the diffusion of a chemoattractant. The results were compared with the data from real in vitro experiments to establish the capability of the model to accurately reproduce both the spontaneous self-assembly of unstimulated cells and their self-organization in the presence of the pro-angiogenic factor adrenomedullin. The results showed that the model can accurately reproduce the self-assembly of unstimulated cells, but it failed in reproducing the adrenomedullin-induced self-organization of the cells. The extension of the model to include cell proliferation led to a good match between simulated and experimental patterns in both cases with predicted proliferation rates in agreement with the data of cell proliferation experiments. *Developmental Dynamics* 238:1951–1963, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: angiogenesis; human vascular endothelial cells; Matrigel assay; adrenomedullin; image analysis; Cellular Potts Model

Accepted 20 May 2009

INTRODUCTION

Angiogenesis, the development of new blood vessels from an existing vasculature, represents an important area of the actual biological research due to its involvement in various physiological and pathological conditions (Folkman, 1995). The angiogenic cascade is a complex multistep process (Risau, 1997), and numerous forms of in vitro assays have been developed (see Statton et al., 2004) to study specific steps, such as cell proliferation, migration, or differentiation. In this regard, assays that stimulate the formation of

capillary-like structures (see Donovan et al., 2001) by endothelial cells (EC) have become increasingly popular in recent years, because they allow the study of the EC's intrinsic ability to self-organize to form vascular-like patterns. In the most extensively used assay of this type, EC are cultured on Matrigel, a gelatinous mixture of extracellular and basement membrane proteins derived from the mouse Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma (Lawley and Kubota, 1989). When EC are seeded onto this matrix, they attach to it and rapidly form a branching mesh-

work of tubules. This assay is presently considered as a reliable in vitro tool to identify substances with potential anti- or pro-angiogenic properties, allowing a qualitative and quantitative evaluation of the morphological changes the EC self-organization undergoes when the cells are stimulated with such factors. Examples include pharmacological trials (Guidolin et al., 2004; Martinez-Poveda et al., 2008; Basu et al., 2008), as well as studies focused on the identification of endogenous factors involved in the modulation of the angiogenic process

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

¹Department of Human Anatomy and Physiology, Section of Anatomy, University of Padova Medical School, Padova, Italy

²Department of Human Anatomy and Histology, University of Bari Medical School, Bari, Italy

*Correspondence to: Diego Guidolin, University of Padova-Medical School, Department of Human Anatomy and Physiology, Gabelli, 65 I-35121 Padova, Italy. E-mail: diego.guidolin@unipd.it

DOI 10.1002/dvdy.22022

Published online 14 July 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Involvement of vascular endothelial growth factor signaling in CLR/RAMP1 and CLR/RAMP2-mediated pro-angiogenic effect of intermedin on human vascular endothelial cells

GIOVANNA ALBERTIN, ELISA SORATO, BARBARA OSELLADORE, ALESSANDRA MASCARIN, CINZIA TORTORELLA and DIEGO GUIDOLIN

Department of Human Anatomy and Physiology, Section of Anatomy,
University of Padova-Medical School, I-35121 Padova, Italy

Received January 27, 2010; Accepted March 30, 2010

DOI: 10.3892/ijmm_00000464

Abstract. Intermedin (IMD) is a recently discovered peptide closely related to adrenomedullin. Its principal physiological activity is its role in the regulation of the cardiovascular system, where it exerts a potent hypotensive effect. In addition, data were recently provided showing that this peptide is able to exert a clearcut pro-angiogenic effect both *in vitro* and *in vivo*. IMD acts through the non-selective interaction with receptor complexes formed by the dimerization of calcitonin-like receptor (CLR) with the receptor activity-modifying proteins RAMP1, 2 or 3. Thus, in the present study, the role of CLR/RAMP complexes in mediating the pro-angiogenic effect induced by IMD on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) cultured on Matrigel was examined. Real-time PCR demonstrated the expression of IMD, CLR/RAMP1 and CLR/RAMP2 (but not CLR/RAMP3) mRNA in HUVECs. IMD exerted a significant *in vitro* angiogenic action, specifically triggered by the binding of the peptide to CLR/RAMP complexes. Both CLR/RAMP1 and CLR/RAMP2 appeared to mediate the pro-angiogenic effect, which was associated with a significant increase of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression 18 h following IMD administration, indicating that the observed pro-angiogenic effects are related, at least in part, to an increased synthesis of this growth factor promoted by the peptide. Western blot analysis, however, showed a significant increase of VEGF receptor-2 phosphorylation as early as 5 min following IMD administration, indicating that IMD induces a pro-angiogenic response in human vascular endothelial cells not only via CLR/RAMP-induced release of VEGF, but also during signal

initiation and propagation by transactivating the VEGF receptor-2 machinery.

Introduction

In early 2004, a novel member of the calcitonin (CT)/calcitonin-gene related peptide (CGRP) family was independently identified by two separate groups. Roh and colleagues (1) discovered the human form of this peptide in cells within the intermediate lobe of the pituitary and called it intermedin (IMD). At the same time, Takei *et al* (2) identified in mammals a 146-150 amino acid prepro-hormone which yielded to a 47-amino acid mature peptide with 33% sequence homology to adrenomedullin (AM) and 71% homology to the puffer fish AM orthologue AM2. Thus, they called it mammalian AM2. Confirmation that the sequences of human prepro-AM2 and -IMD (148 amino acids each) were identical and that the mature peptides induced similar biological actions, led to general acceptance that IMD and AM2 were the same peptide (reviewed in ref. 3).

In mammals, IMD is expressed not only in the central nervous system (CNS) but also in peripheral tissues such as heart, kidney, lung, gastrointestinal tract and thymus (1,2,4,5). IMD has been quantified in plasma of rat and human (3), but the origin of the peptide in plasma is unclear. The pituitary is likely to make a significant contribution but, recently, human aortic endothelial cells (ECs) were also shown to express IMD mRNA and secrete the peptide (6).

As with other members of its peptide family, the principal physiological activity of IMD is its role in the regulation of the cardiovascular system. Following intravenous or intraperitoneal administration in rodents, the peptide exerts a potent hypotensive effect with a decrease in arterial pressure and increase in heart rate (7,8). However, when IMD was administered intracerebroventricularly (4,9) or injected into the nucleus tractus solitarius (10), it showed inverse effects on the regulation of arterial pressure, suggesting that distinct regulatory mechanisms are triggered by the peptide in the CNS and periphery.

In addition to the mentioned role in the control of cardiovascular function, recently, data were provided showing that IMD has antiapoptotic activity in human ECs (6) and, like other members of its peptide family, such as CGRP (11,12) and, in

Correspondence to: Dr Diego Guidolin, Department of Human Anatomy and Physiology, Section of Anatomy, Via Gabelli 65, I-35121 Padova, Italy
E-mail: diego.guidolin@unipd.it

Key words: intermedin, calcitonin-like receptor/RAMP, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, transactivation

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Pietro Giusti, il Dott. Diego Guidolin e la Dott.ssa Giovanna Albertin per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro.

Ringrazio inoltre tutti miei colleghi di laboratorio: Barbara, Alessandra, Davide, Lucia e Damiana, e i miei compagni di dottorato, in modo particolare Ilena.

Un grazie particolare alla mia “nuova” famiglia: Sebastiano e Leo, stare senza voi due sarebbe ormai impensabile; senza dimenticare il fondamentale supporto ed incoraggiamento avuto da quella “vecchia”: mamma Gabriella, papà Aliberto, nonna Giuseppina, zii Lorenzo e Fiorella, i miei amori Eleonora e Ludovico, Toby e Roccia.

Un grazie infinito a Maddalena e Sabrina, i miei due angeli terreni, e a tutti i miei amici. Infine il grazie maggiore va a Chi da lassù mi ha sempre tenuta per mano lungo la mia avventura...e continuerà a farlo sempre.