

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI ANATOMIA E FISIOLOGIA UMANA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO: INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
CICLO: XXII

TESI DI DOTTORATO

**COINVOLGIMENTO DEL RECETTORE-2 DI VEGF
NELL'EFFETTO PRO-ANGIOGENICO INDOTTO IN CELLULE
ENDOTELIALI UMANE DA AGONISTI DEL COMPLESSO
RECETTORIALE CRLR/RAMP-2**

Direttore della scuola: CH.MO PROF. PIERPAOLO PARNIGOTTO
Coordinatore d'indirizzo: CH.MO PROF. MARIA TERESA CONCONI
Supervisore: CH.MO PROF. PIERPAOLO PARNIGOTTO
Coorrelatori: DOTT.SSA G. ALBERTIN, DOTT. D. GUIDOLIN

Dottoranda: ALESSANDRA MASCARIN

Ai miei genitori

INDICE

Sommario	p. 1
Summary	p. 2
Abbreviazioni	p. 3
1. Introduzione	p. 5
1.1. Vasculogenesi e Angiogenesi	p. 5
1.1.1. Tipi cellulari coinvolti nell' Angiogenesi	p. 6
1.2. Le fasi dell' Angiogenesi	p. 8
1.2.1. Permeabilità e destabilizzazione dei vasi	p. 8
1.2.2. Proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali	p. 9
1.2.3. Formazione e stabilizzazione del lume	p. 10
1.3. Metodi di valutazione dell' angiogenesi	p. 10
1.3.1. Saggi <i>in vivo</i>	p. 10
1.3.2. Saggi <i>ex-vivo</i> : colture d'organi	p. 11
1.3.3. Saggi <i>in vitro</i>	p. 11
1.4. La regolazione dell' Angiogenesi	p. 13
1.4.1. Lo "switch" angiogenico	p. 13
1.4.1.1. Fattori inibitori dell' angiogenesi	p. 13
1.4.1.2. Fattori pro-angiogenici	p. 14
1.4.2. Il sistema del VEGF	p. 15
1.4.3. Fattori "non classici" di regolazione dell' Angiogenesi	p. 19
1.5. Adrenomedullina	p. 23
1.6. Intermedina	p. 27
2. Scopo del lavoro	p. 30
3. Materiali e Metodi	p. 31
3.1. Colture cellulari <i>in vitro</i>	p. 31
3.2. Mantenimento in coltura delle cellule endoteliali	p. 31
3.3. Saggio di proliferazione	p. 32
3.4. Immunocitochimica e immunofluorescenza	p. 32
3.5. Saggio di angiogenesi <i>in vitro</i>	p. 34
3.6. Inibizione di VEGFR-2	p. 35
3.7. Silenziamento genico	p. 35
3.8. Real-time PCR	p. 35
3.9. Western blotting	p. 37

3.10. Statistica	p. 37
4. Risultati	p. 39
4.1. Fenotipo e preparazione delle cellule	p. 39
4.2. Valutazione dell'effetto di AM nei saggi di angiogenesi <i>in vitro</i>	p. 39
4.3. Effetti di AM sull'espressione di VEGF e VEGFR	p. 41
4.4. L'effetto di AM non viene inibito dal silenziamento genico del VEGF o dall'antagonista del VEGFR2	p. 42
4.5. L'effetto di AM può essere inibito bloccando l'attività tirosin chinasi del VEGFR2	p. 42
4.6. Fosforilazione del recettore VEGFR2 in seguito a stimolazione con AM	p. 44
4.7. Stimolazione dei complessi recettoriali CRLR/RAMP con un diverso agonista: effetti indotti da IMD	p. 45
5. Discussione	p. 47
6. Bibliografia	p. 51
Pubblicazioni	p. 67

SOMMARIO

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sul coinvolgimento del recettore-2 del VEGF nell'effetto pro-angiogenico indotto in cellule endoteliali umane da agonisti del complesso recettoriale CRLR/RAMP-2. Punto di partenza è stata la dimostrazione, ottenuta con svariati esperimenti di angiogenesi *in vitro* (Matrigel assay e test di proliferazione) effettuati su cellule endoteliali umane di vena safena (HSVEC), che un ligando endogeno di tale recettore, quale Adrenomedullina (AM), ha un ruolo di stimolazione dell'angiogenesi *in vitro*. Il coinvolgimento del complesso CRLR/RAMP2 nel mediare tale effetto è stato verificato con esperimenti eseguiti su cellule in cui è stata inibita l'espressione di RAMP2 mediante RNA interference. Inoltre, l'azione pro-angiogenica del peptide osservata sulle HSVEC non è risultata secondaria ad un incremento della produzione di VEGF o dei suoi recettori. L'esame dell'effetto di adrenomedullina sull'espressione dell'mRNA per VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 non ha infatti evidenziato nessun cambiamento di espressione dell'mRNA per questi marker e sia il silenziamento genico del VEGF che l'uso di un antagonista di VEGFR2 (V1), non sono stati in grado di inibire l'effetto pro-angiogenico di adrenomedullina. L'utilizzo, invece, di SU5416, un potente inibitore dell'attività tirosin chinasi di VEGFR2 è stato in grado di inibire anche l'azione di AM.

Da ciò è stato ipotizzato che il legame di adrenomedullina al complesso CRLR/RAMP2 possa indurre una transattivazione del recettore VEGFR2 del VEGF. Questa ipotesi è stata confermata e supportata da esperimenti di immunocitochimica, immunofluorescenza e western blotting mirati a valutare la fosforilazione di VEGFR2 dopo stimolazione delle HSVEC con AM. Di ulteriore conferma sono stati i dati ottenuti con intermedina, un altro peptide appartenente alla famiglia del calcitonin gene-related peptide (CGRP), che agisce anch'esso attraverso i recettori derivati dalla dimerizzazione di CRLR e RAMP. Anche il trattamento con tale peptide è stato infatti in grado di indurre nelle HSVEC la fosforilazione di VEGFR2 e di produrre un'azione pro-angiogenica *in vitro*.

L'insieme di tali esperimenti ha portato alla conclusione che agonisti del complesso recettoriale CRLR/RAMP2 (quali adrenomedullina e intermedina) siano in grado di indurre un effetto pro-angiogenico in cellule endoteliali umane sfruttando l'attività tirosin chinasi del VEGFR2 e come quindi ci possano essere modi alternativi di attivazione della cascata del segnale VEGF-dipendente anche in assenza di legame del fattore trofico al suo recettore.

SUMMARY

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 *in vitro* proangiogenic effect when tested on specialized human endothelial cells, such as HUVECs and immortalized endothelial cell lines. In our study we used normal adult vascular endothelial cells isolated from human saphena vein to analyze *in vitro* the role of AM related to both early (increase in cell proliferation) as well as late (differentiation and self-organization into capillary-like structures) angiogenic events and its relationship with the VEGF signaling cascade. The results indicated that also in this endothelial cell phenotype AM promoted cell proliferation and differentiation in cord-like structures.

These pro-angiogenic actions resulted specific and mediated by the binding of AM to its AM1 (CRLR/RAMP2) receptor, as demonstrated by experiments performed on cells transfected with short interfering RNA inhibiting the expression of RAMP2 and, as a consequence, of a functional AM1 receptor. Furthermore, AM 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 AM administration. To further confirm these data, the effect of AM administration was studied in two different experimental conditions: i) in cells where the VEGF production was inhibited by gene silencing and ii) in the presence of a specific antagonist (V1) of the KDR receptor blocking the interaction of VEGF with that receptor. In both cases no significant reduction of the AM-induced effect on cell proliferation or capillary-like tube formation was observed.

Interestingly, however, when the experiments were performed in the presence of SU5416 (a selective inhibitor of the VEGF-R2 receptor at the level of the intra-cellular tyrosine kinase domain) the proangiogenic effects 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 VEGF-R2 receptor, leading to a signaling cascade inducing proangiogenic events in the cells. Immunocytochemical and Western blot data, obtained with antibodies raised against phosphorylated forms of KDR, seemed to confirm such an hypothesis. They suggested that AM administration could lead to the phosphorylation of KDR at Y951 and Y1175 phosphorylation sites, known to be involved in cellular responses such as proliferation, migration and cytoskeletal rearrangement.

In order to further support these data another peptide was studied. This peptide, belonging to the calcitonin gene-related peptide's family and called Intermedin (IMD), shares with AM the same receptor system. The results indicated that IMD was also able to induce the phosphorylation of VEGF-R2 and a pro-angiogenic response in HSVECs.

Altogether the results obtained suggest that in human endothelial cells there are alternative modes of activating the VEGF-dependent signaling cascade even in the absence of the trophic factor binding at the cell surface.

ABBREVIAZIONI

AdipoR	Adiponectin receptor
AM	Adrenomedullin
Ang	Angiopoietin
ANG	Angiotensin
AT ₁ -R	Angiotensin II-type 1 receptor
AT ₂ -R	Angiotensin II-type 2 receptor
bFGF (FGF-2)	basic Fibroblast Growth Factor
BM	Basement Membrane
BrdU	BromodeoxyUridine
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Corio-Allantoic Membrane
CGRP	Calcitonin receptor like receptor
C-GSF	granulocyte-colony stimulating factor
COX	CycloOXygenase
COX-2	CicloOXygenase-2
CRLR	Calcitonin receptor like receptor
DAPI	DiAmidino-2-Phenyl-Indole
EC	Endothelial cell
ECM	Extra cellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS	Endothelial Nitric Oxide
EPCs	Endothelial Progenitor Cells
EPO	Erythropoietin
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ET	Endotelin
ET _A -R	Endothelin type A receptor
ET _B -R	Endothelin type B receptor
FBS	Fetal Bovine Serum
GM-GSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
GPR G	Protein-coupled receptor
GSH-R	Growth hormone secretagogue receptor
HAEC	Human aortic endothelial cell
HGF	Hapatocyte Growth Factor
HGF/SF	Hepatocyte growth factor/scatter factor
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HS	Heparan sulphate
HSPG	Heparan sulphate containing proteoglycan
HSVEC	Human saphenous Vein Endothelial Cells
HUVECs	Human Umbelical Vein Endothelial Cells
hVEGF165	Human Vascular Endothelial Growth Factor 165
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	inducible Nitric Oxide
JAK	Janus Kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazoliumbromide
NK ₁ -R to NK ₃ -R	Neurokinin type 1 to 3 receptor
NO	Nitric Oxide
NPY	Neuropeptide-Y
NRP-1	Neutropilin-1

Ob-R	Leptin receptor
PA	Plasminogen activator
PAC ₁ -R	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide
PBS	Phosphate Buffer Solution
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PK	Protein kinase
PLC	Phospholipase C
PIGF	Placental growth factor
RAMP	Receptor-activity-modifying protein
RTK	Receptor tyrosine kinases
RT-PCR	Real time - polymerase chain reaction
SH ₂	Src-homology 2
Sst-1R to sst-5R	Somatostatin type 1 to 5 receptor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF- α	Transforming Growth Factor- α
TGF- β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor α
tPA	Tissue-type plasminogen activator
TPS-1	Thrombospondin-1
TSAd	T-cell-specific adaptor protein
Tyr	Tyrosine
UII	Uroensin
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
UT-R	Urotensin II receptor
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1
VE-cadherins	Vascular Endothelial-cadherins
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
VPAC ₁ -R	Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor
VPAC ₂ -R	Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 2 receptor
VRAP	VEGF receptor-associated protein
VSMC	Vascular smooth muscle cell
vWF	von Willebrand factor

1.1 Vasculogenesi e Angiogenesi

Le cellule dei mammiferi per la loro sopravvivenza e crescita richiedono l'apporto di ossigeno e nutrienti mediante una fitta vascolarizzazione. Tutti gli organismi, pertanto, hanno bisogno della formazione di nuovi vasi durante la loro crescita e questo processo si attua con la vasculogenesi e l'angiogenesi (Carmeliet, Macmillan Magazines Ltd 2000). Vasculogenesi e angiogenesi sono regolati dal bilanciamento tra fattori pro e anti angiogenici, sono fondamentali nell'embriogenesi e nella cicatrizzazione di ferite ma giocano un ruolo altrettanto importante in alcuni processi patologici come l'artrite reumatoide, la psoriasi, nella vascolarizzazione dei tumori e nella retinopatia diabetica (Bouïs D., Pharmacological Research 2006).

Col termine *vasculogenesi* si intende il processo attraverso il quale si sviluppa il sistema vascolare. E' uno dei primi eventi nell'embriogenesi. Durante il primo sviluppo embrionale, infatti, le cellule mesodermiche si differenziano in emangioblasti, progenitori sia delle cellule ematopoietiche che di cellule endoteliali (EC) dando origine a vasi sanguigni. Durante la differenziazione gli emangioblasti producono gli angioblasti e la loro aggregazione influisce nella formazione di strutture che andranno a costituire molteplici e differenti parti del sistema circolatorio. La fusione di queste strutture porta alla comparsa di capillari sottili formati da EC, che acquisiranno le caratteristiche di vene o di arterie. La fase della vasculogenesi è completata dalla formazione di plessi vascolari primari e da tutte le ulteriori trasformazioni della rete vascolare ottenute mediante angiogenesi (Karamysheva, Biochemistry (Mosc 2008).

L' *angiogenesi* è la crescita di nuovi vasi a partire da vascolatura già esistente: questo processo rimodella la rete vascolare esistente creandone una più complessa comportando un aumento dei vasi. Questi possono essere ottenuti da cellule periendoteliali o da ponti di cellule endoteliali che poi si scindono in capillari individuali (Carmeliet 2000 Nature Medicine). Lo studio sperimentale del processo di crescita di capillari risale al 1939 quando Clark e Clark (Clark et Clark, Am J Anat, 1953) osservarono il processo in tempo reale utilizzando un microscopio intravitale all'interno del padiglione auricolare di coniglio per valutare la rete microvascolare. Nei primi anni '70 Gimbrone e colleghi per primi ottennero colture a lungo termine di EC. Successivamente furono sviluppati modelli in vitro di formazione di reti capillari (Gimbrone, Cotran, & Folkman 1973; Folkman & Haudenschild 1980).

1.1.1. Tipi cellulari coinvolti nell'angiogenesi

Nel processo di angiogenesi sono coinvolti molti tipi di cellule:

cellule endoteliali (EC), progenitori di cellule endoteliali (EPC), periciti, cellule muscolari lisce, e cellule infiammatorie.

EC sono cellule del corpo quiescenti e geneticamente stabili. Il loro periodo di ricambio è di un centinaio di giorni, in contrasto con le cellule del midollo osseo che hanno un ricambio di cellule ogni 5 giorni. Le EC sono legate alla membrana basale (BM) dei capillari che è composta dal collagene IV, laminina, proteoglicani heparan-solfato, perlecani, nidogeno/entactina, SPARC/BM-40/osteopontina, collagene di tipo XV, collagene di tipo XVIII e altre molecole. Queste costituiscono segnali primari che inibiscono la proliferazione e promuovono un ambiente che facilita un' appropriata adesione cellula-cellula (Kalluri R, Nat Rev Cancer, 2003).

Anche al fine di prevenire la disgregazione della rete vascolare sottoposta a stimoli angiogenici e per mantenere l'irrorazione della regione, per far iniziare l'angiogenesi, è sufficiente il coinvolgimento di appena qualche EC all'interno dei capillari. Queste cellule sono chiamate "tip-cells" e hanno una posizione fondamentale durante la crescita di nuovi vasi: reagiscono al gradiente del VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A), che specifica la direzione di migrazione e induce i capillari a crescere verso il gradiente (Karamysheva, Biochemistry Mosc 2008), emettendo filopodi verso il gradiente del VEGF-A (Gerhardt et al., J Cell Biol, 2003). 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. Una volta selezionate le tip-cells, la formazione di nuovi capillari avviene mediante proliferazione e migrazione di altre EC (Karamysheva, Biochemistry Mosc 2008).

I primi EPC sono stati descritti come cellule mononucleari arricchite in CD-34, che in coltura acquisiscono l'espressione di marker endoteliali di superficie (Asahara et al., Science, 1997). Studi successivi hanno mostrato che una sottopopolazione di cellule CD34⁺ circolanti esprimenti CD34, CD133, VEGFR2 possono formare colonie endoteliali in vitro (Peichev et al, Blood, 2000; Gill et al., Circ Res, 2001). Altri studi hanno evidenziato come cellule mononucleari CD11b⁺ o CD14⁺ diano origine a colonie di cellule endoteliali-simili sia in vitro che in vivo. Sembra pertanto che cellule endoteliali-simili possano derivare da popolazioni di cellule di progenitori ematopoietici derivati da midollo osseo o da popolazioni di monociti (Gramy-Susini and Varner, Br J Cancer, 2005).

EPC coltivati da differenti fonti mostrano una marcata espressione di fattori di crescita come VEGF e il fattore di crescita epatocitaria (HGF). Il rilascio di fattori di crescita può a sua volta influenzare il processo di angiogenesi, la proliferazione e la migrazione come anche la sopravvivenza di cellule mature (Fig.1). Infine, la capacità di EPC di contribuire fisicamente alla struttura dei vasi può influenzare significativamente la neovascolarizzazione (Urbich and Dimmeler, Circ Res, 2004).

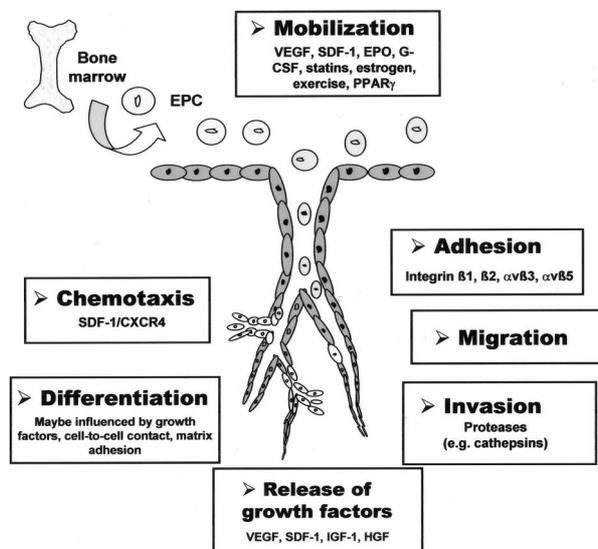


Fig. 1: Meccanismo di differenziazione di EPC. L'assunzione e l'incorporazione di EPC nel tessuto ischemico richiede un processo a più stadi coordinato che include la mobilitazione, la chemoattrazione, l'adesione, la transmigrazione, la migrazione, l'invasione tissutale e la differenziazione in situ. (Urbich and Dimmeler, Circ Res, 2004)

Periciti e cellule muscolari lisce: La maturazione dei tubuli vascolari primordiali è accompagnata dalla comparsa di cellule peri endoteliali che partecipano alla formazione della matrice e che eventualmente possono diventare periciti (cellule situate sulla stessa membrana basale come le EC) o cellule vascolari muscolari lisce (cellule situate fuori dalla membrana basale vascolare e dotate di specifici filamenti contrattili di actina-miosina). Recentemente l'endogлина, molecola transmembrana, è stata identificata come un essenziale regolatore del differenziamento di periciti e di cellule vascolari muscolari lisce, la quale modula le interazioni dei membri della superfamiglia del Transforming Growth Factor β (TGF- β) con i loro recettori. Essa risulta anche espressa nelle cellule vascolari muscolari lisce (Kurz, J Neuroonc, 2000).

Cellule infiammatorie: Molti componenti del sistema immunitario sono coinvolti nel processo di angiogenesi (Fig.2). L'alterazione dell'omeostasi del microambiente porta all'attivazione di cellule residenti come mastociti, macrofagi e cellule dendritiche (Albini and Sporn, Nat Rev Cancer, 2007). In particolare è noto che i macrofagi producono una serie di fattori angiogenici incluso il VEGF. L'esposizione di macrofagi all'ipossia aumenta l'espressione di molecole correlate all'angiogenesi, come MMP9, MMP12, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) e l'Interleukina-10 (IL-10). Oltre ad essere una fonte di VEGF i macrofagi sono a loro volta influenzati da questi fattori angiogenici, in quanto modulano la loro attività biologica nella risposta ai ligandi del VEGFR1.

Negli ultimi anni si è osservato che i neutrofili, come i macrofagi, sono sensibili a condizioni micro ambientali e regolano il loro comportamento in risposta a segnali locali (Noonan et al., Cancer Metastasis Rev., 2008). Inoltre sembra che abbiano un ruolo importante nell'angiogenesi fisiologica e patologica (Heryanto et al., Reproduction, 2004). L'angiogenesi in vivo dipendente dai neutrofili è stata mostrata necessitare del rilascio del VEGF-A ottenuto attraverso il coinvolgimento e la stimolazione dei neutrofili. Infatti, in risposta alla stimolazione questi degranulano, rilasciando proteasi e attivando la fagocitosi. Oltre al VEGF i neutrofili sembrano produrre un gran numero di molecole pro-angiogeniche, ma allo stesso tempo producono anche molte molecole anti-angiogeniche (Benelli et al., Chem Immunol Allergy, 2003). Il tipo di

comportamento adottato sembra dipendere da segnali provenienti dal microambiente (Noonan et al., *Cancer Metastasis Rev.*, 2008).

Alti livelli di VEGF possono reclutare leucociti e cellule natural-killer. Le cellule naturali killers sono conosciute come regolatori negativi dell'angiogenesi ma possono contribuire all'angiogenesi attraverso la secrezione di citochine proangiogeniche simili al VEGF, quali Platelet Growth Factor (PlGF) e Interleukin-8 (IL-8) (Hanna et al., *Nat Med.*, 2006).

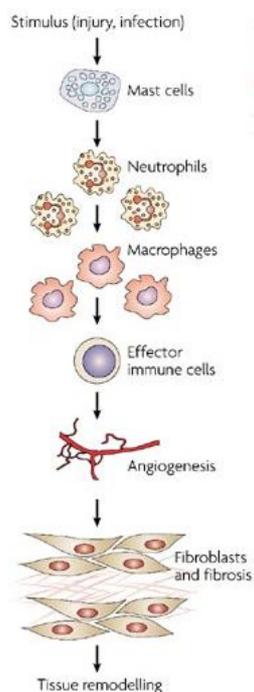


Fig. 2: Sequenza di eventi nell'infiammazione acuta e nella riparazione tissutale. Il processo di infiammazione inizia una serie di processi catabolici e anabolici che avvengono in un ordine preciso. Per primo avviene l'attivazione di cellule residenti (mast cellule, macrofagi residenti e cellule dendritiche) e la rapida entrata di granulociti in risposta al danno. Poi l'assunzione di macrofagi e l'infiltrazione di cellule immunitarie (linfociti) permettono alle EC e ai fibroblasti di formare nuovi vasi sanguigni e matrici di collagene. L'ultimo step è il rimodellamento tissutale.

1.2. Le fasi dell'angiogenesi

Ipossia, infiammazione e fattori meccanici come lo stress sono i fattori più comuni che possono indurre l'angiogenesi. Ciascuno di questi fattori direttamente o indirettamente attiva le EC stimolando la produzione e il rilascio di fattori di crescita o citochine. La crescita angiogenica di nuovi vasi sanguigni è un processo che si suddivide in diverse fasi schematizzate in Fig. 3.

1.2.1. Permeabilità e destabilizzazione dei vasi

La risposta angiogenica inizia con l'attivazione delle EC per azione di citochine presenti nel tessuto circostante (Liekens, *Biochemical Pharmacology* 2001). Inoltre in presenza di ossido nitrico si ha la vasodilatazione dei vasi, un aumento della permeabilità vascolare, in risposta al VEGF, e di conseguenza si ha la fuoriuscita di proteine plasmatiche che costituiscono uno scaffold provvisorio per la migrazione delle EC. Questo aumento della permeabilità è mediato dalla redistribuzione di molecole di adesione e di VE-caderine endoteliali vascolari e dal coinvolgimento di chinasi Src. Si ha così perdita di connessioni tra EC e tra EC e cellule di supporto (periciti e cellule muscolari lisce) con conseguente formazione di fenestrazioni,

destabilizzazione delle pareti vasali e degradazione della membrana basale (Bouis D., Pharmacological Research 2006). Il processo fa sì che le EC attraggano e leghino leucociti e piastrine con ulteriore rilascio di fattori pro- e anti-angiogenici. Alla aumentata permeabilità vascolare si accompagna una deposizione di fibrina nello spazio extravascolare.

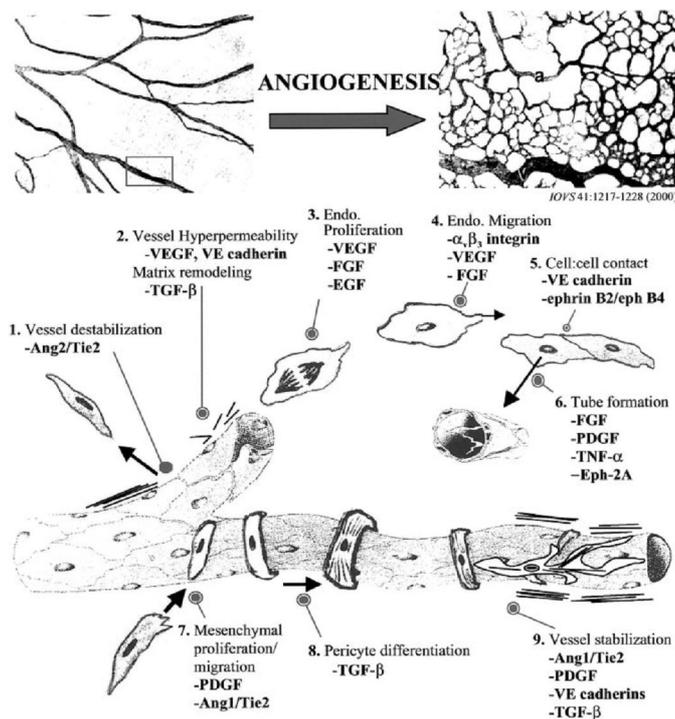


Fig. 3: Meccanismi dell'angiogenesi fisiologica. (Papetti and Herman, Am J Physiol 2002).

1.2.2. Proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali

Durante l'angiogenesi migrazione e proliferazione delle EC sono eventi cruciali nel corso della formazione dei nuovi vasi sanguigni.

Le EC, infatti, secernono e attivano fattori proteolitici come le metalloproteasi della matrice (MMPs), che degradano la ECM facilitando la migrazione delle EC (D'Andrea Chem Biol Drug Des. 2006). Le proprietà migratorie delle EC sono determinate dai legami cellulari alle molecole della matrice e dalla modulazione intracellulare dei componenti citoscheletrici. A questo proposito le integrine hanno un ruolo fondamentale nell'adesione matrice-cellula: è stato infatti osservato che l'espressione delle integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ aumenta durante la proliferazione delle EC. L'actina del citoscheletro è invece regolata dall'attività della famiglia delle Rho proteine. RhoA e Rac1 GTPase sono attive nel primo stadio della formazione della rete di EC e questi enzimi contribuiscono in modo significativo al successo della formazione della rete e all'allineamento cellulare. RhoA è coinvolto maggiormente nella formazione di fibre e nella contrazione/decontrazione di cellule, dato che Rac1 è localizzato su cellule migranti e regola la polimerizzazione dell'actina e la crescita di fibre (Milkiewicz M., Int J Biochem & Cell Biol 2006).

In seguito alla degradazione proteolitica della matrice extra cellulare e alla migrazione attraverso la matrice danneggiata, le EC sono indotte a proliferare grazie agli stimoli di molti fattori di crescita, taluni rilasciati dalla stessa degradazione della ECM, ad esempio fattori appartenenti alla famiglia del VEGF e le

angiopoietine che agiscono in modo specifico sulle EC; citochine, chemochine e enzimi angiogenici che attivano molti tipi cellulari e TNF- α e TGF- β che inibiscono la proliferazione delle EC in vitro (Liekens, Biochemical Pharmacology 2001).

1.2.3. Formazione e stabilizzazione del lume

I processi appena descritti fanno sì che le EC si riorganizzino a formare un cordone solido che successivamente sviluppa un lume. Questi capillari possono formare un lume attraverso un processo di canalizzazione intracellulare (che avviene per fusione di vescicole citoplasmatiche) o attraverso il processo alternativo di canalizzazione intercellulare (nel quale un lume è creato dall'apposizione di membrane di due differenti cellule). L'intercalarsi o il diradarsi delle EC e la fusione di vasi preesistenti permettono un incremento del diametro e della lunghezza dei vasi (Carmeliet P. Nature 2000).

La stabilizzazione dei nuovi capillari è la fase conclusiva dei processi angiogenici e risulta accompagnata dalla produzione di fattori quali ang1, ang2 e PlGF. (Milkiewicz M., Int J Biochem & Cell Biol 2006).

Una volta che i nuovi vasi si sono formati, la proliferazione e la migrazione delle EC vengono inibite, viene secreta la nuova membrana basale (BM) e le EC ritornano quiescenti. (Bouïs D., Pharmacological Research 2006). 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 recupero di periciti e di cellule muscolari lisce che stabilizzano la morfologia dei vasi e prevengono la regressione delle EC (D'Andrea Chem Biol Drug Des. 2006).

1.3. Metodi di valutazione dell'angiogenesi

Negli ultimi anni sono stati sviluppati un gran numero di saggi *in vivo*, *ex-vivo* e *in vitro* per studiare le fasi specifiche del processo e la combinazione di più saggi può quindi aiutare a comprendere i processi cellulari e molecolari che avvengono durante l'angiogenesi. Va inoltre tenuto presente che sebbene la migrazione, la proliferazione, la differenziazione e i riarrangiamenti strutturali delle EC abbiano un ruolo fondamentale nel processo angiogenico, queste cellule non sono l'unica struttura coinvolta nel processo (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004).

1.3.1. Saggi in vivo

Negli studi di angiogenesi *in vivo* vengono utilizzati impianti subcutanei di matrici polimeriche (p.es. Matrigel) contenenti cellule e/o un fattore angiogenico. La neovascolarizzazione può essere valutata attraverso diversi metodi, quali una colorazione immunohistologica o il sangue o l'emoglobina trattenuti dalla spugna (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004). 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 un embrione di pollo. All'interno di uova di pollo, la CAM funge da superficie di scambio di gas

come avviene nei polmoni. Questa membrana appare al terzo giorno di incubazione e rapidamente cresce fino al decimo giorno, dove lo strato adiacente del mesoderma del corion e l'allantoide si fondono per formare la CAM, che è caratterizzata da una fitta rete microvascolare (Ribatti et al., Anat Rec., 2001). 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 (Laschke and Menger, Hum Reprod Update, 2007). Nel saggio della CAM il guscio d'uovo viene aperto e la CAM esposta. L'irrigazione di questa con salina permette la visualizzazione della vascolatura della CAM. Gli impianti contenenti i fattori da valutare vengono quindi inseriti e gli effetti vengono osservati dopo 12 giorni (Leng et al., Retina, 2002). Nel saggio dell'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.

Per osservare i processi di angiogenesi cronica vi sono altre tipologie di impianti sub cutanei, a livello dell'orecchio, del dorso e del cranio (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004).

1.3.2. 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 (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004). Nicosia e Ottinetti dimostrarono 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 (Lab Invest., 1990).

1.3.3. Saggi in vitro

I modelli di angiogenesi *in vitro* si sono concentrati prevalentemente sulla proliferazione, migrazione e formazione di tubuli delle EC in risposta ad agenti esogeni stimolatori o inibitori (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004). Questi studi hanno il vantaggio di essere poco costosi e si possono esaminare gli effetti della regolazione dei fattori sulle cellule coinvolte nell'angiogenesi (Laschke and Menger, Hum Reprod Update, 2007). Le EC *in vitro*, tuttavia, non sono del tutto identiche, mostrano infatti differenze fenotipiche sia di tipo strutturale che di tipo organo-associate. Inoltre *in vitro* le EC possono comportarsi diversamente se sottoposte a flussi continui oppure se sono 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* (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004).

I saggi di proliferazione cellulare sono i più facili da effettuare, sono altamente riproducibili, e si prestano ad una precisa quantificazione (Auerbach et al, Clin Chem, 2003). Vari marker di divisione cellulare possono essere utilizzati per valutare la proliferazione di cellule in coltura. Ci sono due grandi classi di saggi di proliferazione: quelli che determinano un numero netto di cellule e quelli che valutano le cinetiche dei cicli cellulari. Un numero netto di cellule può essere ad esempio stabilito utilizzando un citofluorimetro. Altri metodi si basano invece sulla valutazione di parametri relativi al metabolismo cellulare. Di questo tipo è quello del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), o il sale tetrazolio, che è scisso dai mitocondri attivi per formare un composto insolubile blu scuro. Questo è stato usato come misura di proliferazione dato che cellule vitali producono il prodotto formazano ed è stata dimostrata una correlazione tra intensità di colorazione e numero di cellule. Alternativamente alla sintesi di DNA, una misura di proliferazione può essere valutata anche dall'incorporazione di timidina o colorando le cellule con un colorante legante il DNA e poi valutando l'intensità della colorazione utilizzando un colorimetro o un microdensitometro.

Le EC si spostano, attraverso un processo chiamato chemiotassi, lungo un gradiente di fattori che inducano angiogenesi. Il saggio modificato della camera di Boyden è stato usato per valutare la migrazione delle EC. In questo saggio le EC vengono piastrate su un filtro e migrano attraverso questo in risposta a un fattore angiogenico posto in una 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. (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004).

Per la valutazione della 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 (Kanzawa et al., Ann Plast Surg.,1993). Il Matrigel è una mistura di proteine di membrana extracellulari e della membrana basale derivate dal sarcoma di topo di Engelbreth-Holm-Swarm sul quale le EC si attaccano e rapidamente formano una rete di tubuli. Un sistema di analisi di immagine può essere impiegato per valutare vari parametri di tale rete e quantificare e comparare diverse condizioni sperimentali (Guidolin et al., Microvasc Res., 2004; Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004). 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 (Gagnon et al., Angiogenesis, 2003). Le analisi si effettuano prendendo le immagini a diverse altezze del gel dal fondo alla superficie e misurando la lunghezza e il diametro di ogni vaso. Altri saggi possono essere effettuati per valutare l'angiogenesi *in vitro* e la creazione di metodi innovativi è in continuo sviluppo (Staton et al., Int J Exp Pathol., 2004).

1.4. La regolazione dell'angiogenesi

L'angiogenesi è avviata e regolata dal bilanciamento di più fattori, che modulano il processo in senso positivo o negativo (Mandriota and Pepper, J Cell Science 1997).

1.4.1. Lo "switch" angiogenico

Nell'organismo adulto sano le EC si trovano in uno stato di quiescenza dovuto in parte all'influenza di sostanze inibitrici e in parte alle interazioni tra le cellule stesse. 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 angiogenico (Ribatti et al., Pharmacol Rew, 2007).

1.4.1.1. Fattori inibitori dell'angiogenesi

Molti dei segnali intracellulari associati al processo dell'angiogenesi sembrano permessi da un feedback positivo dovuto alla continua attivazione dell'angiogenesi grazie ai loro recettori (Bouis D., Pharmacological Research 2006). In tabella 1 sono riportati alcuni inibitori dell'angiogenesi con la relativa funzione, i più comuni inibitori sono l'angiostatina, l'endostatina e la trombospondina-1.

INIBITORI	FUNZIONE
Ang2	Antagonista di Ang1
TSP-1 e -2	Inibisce la migrazione, la crescita, la sopravvivenza e l'adesione delle EC
Angiostatina e plasminogeno Kringles	Inibiscono l'angiogenesi tumorale e la proliferazione
Endostatina (frammento di collagene XVIII)	Inibisce la sopravvivenza, la migrazione e la proliferazione di EC; promuove l'apoptosi; inibisce l'attivazione di pro-MMP-2 e inibisce l'attività catalitica di MMP-2 e MT1-MMP; inibisce l'angiogenesi tumorale.
Anti-trombina	Inibisce l'angiogenesi e la crescita tumorale
IFN- α , - β , - γ ; IP-10; IL-4, IL-12, IL-18	Inibisce la migrazione di EC; sottoregola bFGF
Vasostatina; Calreticulina	Inibisce il legame bFGF e VEGF
TIMPs; inibitori MMP; PEX	Inibiscono l'angiogenesi patologica
Meth-1; Meth-2	Inibitori contenenti MMP, TPS e i domini di disintegrina
Tumastatina	Inibisce l'angiogenesi e promuove apoptosi
Vasoibina	Inibisce l'angiogenesi tumorale
Prolattina (M _r 16K)	Inibisce bFGF/VEGF
Arrestina, canstatina, restina	Inibiscono l'angiogenesi tumorale

Tab. 1: Fattori inibitori dell'angiogenesi.

1.4.1.2. Fattori pro-angiogenici

I fattori pro angiogenici possono dividersi in due categorie:

- Fattori diretti in quanto stimolano in maniera diretta la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali;
- Fattori indiretti in quanto la proliferazione e la migrazione di EC osservata *in vitro* deve essere stata indotta da alcuni altri fattori o cellule probabilmente mobilizzate da molecole angiogeniche (Folkman and Shing, J Biol Chem 1992).

I principali fattori di crescita solubili, molecole legate alla membrana e forze meccaniche che mediano i processi angiogenici sono riassunti nella tabella 1 (vedi anche Milkiewicz M., Int J Biochem & Cell Biol 2006).

FATTORI	AZIONE BIOLOGICA
Mediatori solubili	
VEGF	Incrementa la permeabilità e la migrazione di EC; stimola l'angiogenesi <i>in vivo</i> , la proliferazione e la produzione di uPA/PAI-1 nelle EC; inibisce l'apoptosi.
Ang1	Stimola la formazione di EC e aumenta la superficie e la stabilità dell'endotelio.
Ang2	Antagonizza il segnale di Ang1 e destabilizza l'endotelio.
aFGF, bFGF	Stimola l'angiogenesi <i>in vivo</i> , la proliferazione, la formazione di tubuli, la produzione di PA/collagenasi in EC; aumenta la migrazione di EC.
PDGF	Stimola la sintesi di DNA in EC, la formazione di periciti e di cellule muscolari lisce, le EC a formare cordoni <i>in vitro</i> ; aumenta la stabilità della parete dei capillari; induce l'espressione di vWF, VEGF, and VEGFR-2 in EC cardiache.
TGF- β	Supporta l'ancoraggio indipendente dalla crescita dei fibroblasti; inibisce la proliferazione e la migrazione di EC; stimola/inibisce la formazione di tubuli in EC <i>in vitro</i> ; produce l'attività antiproteolitica attraverso la modulazione dei livelli di espressione di uPA/PAI-1; inibisce la produzione di proteasi e stimola la produzione di inibitori di proteasi; stimola la produzione di VSMA dai periciti; chemotattico per monociti e fibroblasti; stimola l'angiogenesi <i>in vivo</i> in presenza di risposta infiammatoria; aumenta la stabilità della parete dei capillari.
TNF- α	Stimola l'angiogenesi <i>in vivo</i> e la formazione di tubuli in EC <i>in vitro</i> ; Inibisce la proliferazione di EC.
EGF, TGF- α	Stimolano l'angiogenesi <i>in vivo</i> e la proliferazione di EC.
G-CSF, GM-CSF	Stimolano la proliferazione e la migrazione di EC.
Angiogenin	Stimolano l'angiogenesi <i>in vivo</i> e supportano il legame e l'estensione di EC.
Angiotropin	Stimolano l'angiogenesi <i>in vivo</i> , la formazione di tubuli in EC e la migrazione di EC nei capillari.
Tissue factor	Contribuisce allo sviluppo della vascolatura del sacco vitellino.
Factor V	Contribuisce allo sviluppo della vascolatura del sacco vitellino.
Prostaglandin	Stimola l'angiogenesi <i>in vitro</i> .
Nicotinamide	Stimola l'angiogenesi <i>in vitro</i> .

Monobutyryn	Stimola l'angiogenesi <i>in vitro</i> e la migrazione delle EC <i>in vitro</i> .
<u>Proteine legate alla membrana</u>	
$\alpha_v\beta_3$ -Integrin	Altamente espressa in EC attivate; media l'adesione, l'estensione e la migrazione di EC; presente sulla crescita endoteliale angiogenica; necessaria per l'angiogenesi <i>in vitro</i> stimolata da bFGF; localizzata MMP-2 su capillari in crescita; sopprime l'apoptosi in EC.
$\alpha_v\beta_5$ -Integrin	Richiesta per l'angiogenesi <i>in vivo</i> stimolata da VEGF.
$\alpha_5\beta_1$ -Integrin	Richiesta per l'angiogenesi <i>in vivo</i> stimolata da fattori di crescita non appartenenti alla famiglia del VEGF.
VE-cadherin	Può mediare la permeabilità dell'endotelio; richiesta per l'angiogenesi <i>in vivo</i> ; previene l'apoptosi di EC.
Eph-4B/Ephrin-B2	Localizzata nell'interfaccia venosa/arteriosa dello sviluppo embrionale; richiesta per l'angiogenesi della testa e del sacco vitellino e per la trabecolatura del miocardio.
Ephrin-A1	Richiesta per l'angiogenesi <i>in vivo</i> indotta da TNF- α ; Chemiotattica per EC <i>in vitro</i> .
Eph-2A	Richiesta per la formazione di tubuli di EC <i>in vitro</i> .
<u>Forze biomeccaniche</u>	
Blood flow/shear stress	Incrementa la formazione di fibre endoteliali (se laminare); promuove la divisione cellulare (se turbolento); Stimola la trascrizione dei geni bFGF and TGF- β .

Tab. 2: Fattori che regolano l'angiogenesi (Papetti and Herman, Am J Physiol 2002).

1.4.2. Il sistema del 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 nell'embriogenesi (vasculogenesi) e nella formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi). Tale sistema è espresso in molti tessuti e in molte cellule. *In vitro* VEGF stimola la degradazione della EMC, la proliferazione, la migrazione e la formazione di tubuli di EC, promuove l'espressione di uPA, PAI-1, uPAR e MMP-1 (Olsson AK, Molecular Cell Biology, 2006; Leikens, Biochemical Pharmacology, 2001).

Il VEGF è in realtà una famiglia di proteine (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.

VEGF-A è principalmente coinvolto nella regolazione dell'angiogenesi, mentre VEGF-C e VEGF-D sono coinvolti nella linfoangiogenesi. Il VEGF-E è la proteina codificata dal gene del parapox Orf virus, attiva solo il VEGFR2 ed è un potente stimolatore di angiogenesi; il PlGF induce angiogenesi *in vivo* ed è principalmente espresso nella placenta e nei tumori.

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 (vedi Fig. 4) da un singolo dominio transmembrana, una regione extracellulare formata da sette domini simili alle immunoglobuline (IG I-VII), e una parte intracellulare che 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-chinasico. Tutti i recettori del VEGF (VEGFR) sono altamente omologhi (Karamysheva, Biochemistry Mosc 2008).

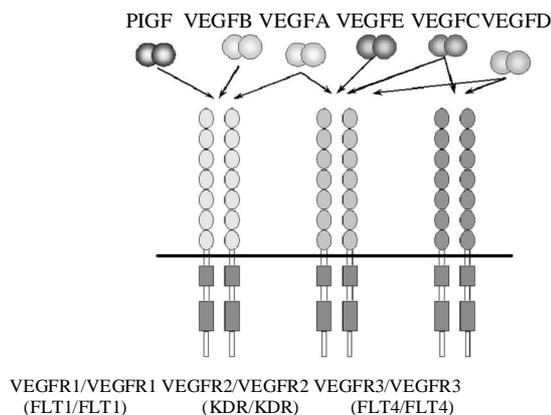


Fig. 4: Interazioni dei fattori di crescita della famiglia del VEGF e i loro recettori VEGFR.

VEGFR sono stati caratterizzati nelle EC ma recentemente sono stati trovati anche in altri tipi cellulari come ad esempio nelle cellule muscolari vascolari lisce, monociti e macrofagi (Papetti and Herman, Am J Physiol 2002).

VEGF-A. E' la forma maggiormente espressa di VEGF. 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 hanno otto isoforme: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165B}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ (Fig. 5) (Bouïs D., Pharmacological Research 2006). VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ vengono secreti nell'ambiente extracellulare mentre VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ e in certa misura VEGF₁₆₅ per la loro affinità con l'eparina solfato rimangono associati alle cellule o alla matrice. VEGF₁₂₁ è solubile dato che l'isoforma maggiore lega le cellule di superficie o ECM attraverso i domini leganti i proteoglicani e l'eparina. La forma più abbondante e con maggiori capacità di indurre angiogenesi è VEGF₁₆₅, inoltre si lega a VEGFR1, VEGFR2, Neutropilin-1 e Neutropilin-2 sulle EC (Bouïs D., Pharmacological Research 2006). La trascrizione del VEGF è stimolata dall'ipossia, come risultato del fattore che induce ipossia (HIF-1) che si lega agli elementi di risposta dell'ipossia (HRE) all'interno del promotore del VEGF. La produzione di VEGF è incrementata da fattori dell'infiammazione (interleuchina 1 α e β , TGF β , prostaglandine E2) o attivatori della ciclossigenasi2 (COX-2) come anche da forze meccaniche di sforzi di taglio e cellule allungate. Il VEGF promuove la sopravvivenza cellulare attraverso l'attivazione del fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K)/Akt e attraverso l'associazione con l'integrina $\alpha_v\beta_3$ e l'attivazione di chinasi di adesione (Milkiewicz M., Int J Biochem & Cell Biol 2006). Può incrementare la permeabilità delle EC attraverso l'aumento dell'attività di organelli vescicolo-vascolari, vescicole raggruppate in piccoli vasi ricoperti da EC che facilitano il trasporto di metaboliti tra le membrane plasmatiche del lume e dello strato sottostante. Inoltre il VEGF può aumentare la permeabilità attraverso la perdita delle aderenze delle giunzioni tra le EC in uno strato attraverso il riarrangiamento di complessi caderina/catenina. L'incremento della permeabilità vascolare può permettere la fuoriuscita di proteine plasmatiche e la formazione di ECM favorendo così la

migrazione di cellule stromali e EC. Inoltre il VEGF stimola la produzione di collagenasi interstiziale e del Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) nelle EC. Perciò il VEGF favorisce un bilanciato sistema di proteolisi che è in grado di rimodellare i componenti dell'ECM necessari per l'angiogenesi (Papetti and Herman, Am J Physiol 2002).

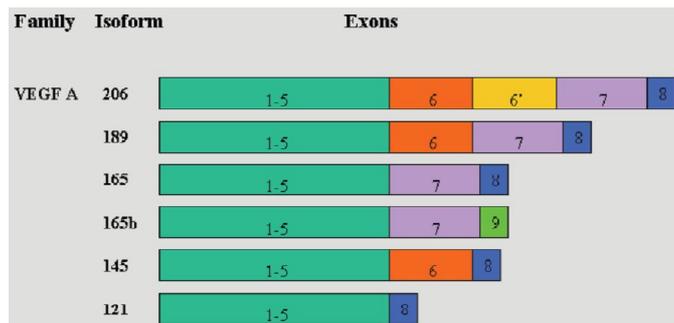


Fig. 5: Isoforme del VEGF-A. Ci sono almeno 6 differenti isoforme di VEGF-A, derivanti da uno splicing alternativo degli esoni. VEGF165 è il più potente induttore di angiogenesi, mentre il VEGF165b è un inibitore di angiogenesi. Tutte le isoforme contengono 1-5 esoni.

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 VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆ ed è in grado di formare eterodimeri con il VEGF. Il VEGF-B lega e attiva sia il VEGFR1 che il NRP-1 facendo esprimere e incrementando l'attività di PAI-1 suggerendo così un suo ruolo nella degradazione della ECM e nella migrazione delle EC (Bouis D., Pharmacological Research 2006; Papetti and Herman, Am J Physiol 2002). VEGF-B ha la caratteristica di indurre mitosi nelle EC e come il PlGF può interagire con il VEGF per la formazione di eterodimeri, tuttavia questo fattore non sembra necessario per l'angiogenesi in quanto è stato dimostrato che i topi carenti di VEGF-B manifestano solo difetti cardiaci minori (Aase et al., Circulation 2001).

VEGF-C e VEGF-D (conosciuto anche come c-Fos Induced Growth Factor, FIGF) formano un sottogruppo all'interno della famiglia del VEGF siccome possiedono un dominio centrale con omologia al VEGF con estensioni N- e C- terminale che sono scissi durante la maturazione proteica e che non si sono mai notati in altre forme di VEGF o PlGF. VEGF-C ha un'omologia del 32% con il VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ mentre VEGF-D del 31%. Entrambi legano e attivano VEGFR2 e VEGFR3. Il VEGF-C sembra avere un ruolo predominante nella linfoangiogenesi ed è principalmente espresso durante l'embriogenesi, mentre VEGF-D è espresso anche nel cuore, polmone e muscolo scheletrico dell'adulto. Inoltre promuovono l'attività mitogena nelle EC *in vitro* anche se molto meno potente rispetto a quella del VEGF-A. VEGF-C e VEGF-D promuovono l'angiogenesi *in vitro* e *in vivo* ma il loro ruolo fisiologico resta ancora sconosciuto (Bouis D., Pharmacological Research 2006; Papetti and Herman, Am J Physiol 2002).

VEGF-E si riferisce a un gruppo di proteine collegate al VEGF che codificano attraverso il virus *orf*, un parapoxvirus che infetta pecore, capre e alcune volte anche l'uomo 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 il loro segnale passa attraverso il VEGFR-2 e stimolano l'angiogenesi *in vitro* e *in vivo* (Papetti and Herman, Am J Physiol 2002; Byrne AM, J Cell Mol Med 2005). Una nuova isoforma è il VEGF-E_{NZ-7} che lega ad alta

affinità e attiva il VEGFR-2 comportando un'autofosforilazione del recettore e aumentando la concentrazione intracellulare libera di calcio (Otrock et al., Blood Cells Mol. Dis. 2007).

VEGFR Le proteine della famiglia del VEGF legano, in una sovrapposizione di tipi, tre recettori tirosin chinasi (RTKs), conosciuti come VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3, e anche corecettori come proteoglicani solfati (HSPGs) e neureopillina (recettore di proteina attivo nei neuroni). Per certi aspetti i VEGFRs inducono processi cellulari che sono comuni a molti recettori di fattori di crescita, quali la migrazione, la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. Tuttavia, i VEGFRs sembrano essere gli unici in grado di trasdurre i segnali che portano alla auto-organizzazione delle EC in tubuli vascolari tridimensionali, e anche alla regolazione della permeabilità vascolare. Il VEGFR1 è un regolatore positivo dei monociti e della migrazione dei macrofagi, ed è stato descritto come un regolatore positivo e negativo della capacità di segnale del VEGFR2. Il VEGFR2 è implicato in tutti gli aspetti biologici delle cellule vascolari endoteliali normali e patologiche, mentre il VEGFR3 è importante per lo sviluppo e le funzioni delle EC linfatiche (Olsson et al., Molecular Cell Biology, 2006).

I VEGFR possiedono una struttura con sette domini immunoglobulinici nel dominio extracellulare, una singola regione transmembrana e un dominio tirosin kinasico nella parte intracellulare che è interrotto da un dominio insert-kinasi (Sato et al., Annals New York Academy of Sciences, 2000). Nel dominio intracellulare sono presenti diversi siti di fosforilazione che possono servire come siti di ancoraggio per Src homology 2 domain (SH2)-binding proteins. Per quel che riguarda VEGFR2, la sua espressione viene aumentata durante l'ipossia e ciò sembra essere una possibile conseguenza dell'aumento di espressione del VEGF-A in condizioni di ipossia. Il legame del VEGF-A al VEGFR-2 causa la dimerizzazione del recettore, l'attivazione della kinasi e l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina nel complesso dimerico. Finora Tyr⁸⁰¹, Tyr⁹⁵¹, Tyr⁹⁹⁶, Tyr¹⁰⁵⁴, Tyr¹⁰⁵⁹, Tyr¹¹⁷⁵ e Tyr¹²¹⁴ del VEGFR-2 sono state coinvolte come siti di autofosforilazione. Tyr¹⁰⁵⁴ e Tyr¹⁰⁵⁹ sono collocate nel loop di attivazione del dominio delle tirosine kinasi, e sono necessarie per l'attivazione massima delle kinasi del VEGFR-2. Tyr⁹⁵¹ e Tyr⁹⁹⁶ si trovano nell'inserto kinasico e sembra che Tyr⁹⁵¹ sia essenziale per la migrazione delle HUVEC indotta dal VEGF-A (Claesson-Welsh, Biochemical Society Transaction, 2003). La forma fosforilata di Tyr⁹⁵¹ si lega a una molecola adattatrice, T-cell-specific adapter molecule (TSAd). TSAd è equivalente a VEGF receptor-associated protein (VRAP), Rlk e Itk-binding protein (RIBP) e Lck adaptor (LAD). TSAd inizialmente è stata identificata nei linfociti T, ma è espressa ad alti livelli nelle EC vascolari. L'accoppiamento tra VEGFR-2 e TSAd è fondamentale per la riorganizzazione dell'actina indotta dal VEGF e per la migrazione cellulare ma non per la proliferazione cellulare delle EC indotta dal VEGF (Matsumoto et al., Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2006).

Tyr¹¹⁷⁵ e Tyr¹²¹⁴ sono collocati nell'estremità C-terminale. E' stato dimostrato che la forma fosforilata di Tyr¹¹⁷⁵ è un sito di binding per PLC_{γ1} e che la fosforilazione di Tyr¹¹⁷⁵ aumenta l'afflusso di Ca²⁺ e l'attivazione della protein-chinasi C (Matsumoto et al., The EMBO Journal, 2005). La Tyr¹¹⁷⁵ sembra essere un sito di fosforilazione particolarmente importante, che, stimolato dal VEGF, regola la migrazione e la proliferazione. Parecchi studi riportano che le proteine contenenti il dominio SH2 sono associate

direttamente con alcuni residui di tirosine fosforilate del VEGFR-2. Nelle cellule vitali, è stato fin qui problematico dimostrare la formazione di complessi, tuttavia molte molecole di trasduzione di segnale sono attivate o modificate in risposta alla stimolazione del VEGF-A (Claesson-Welsh, Biochemical Society Transaction, 2003).

Le proprietà angiogeniche del VEGF, quali la stimolazione della proliferazione, della chemiotassi e la capacità di indurre cambiamenti morfologici, sono principalmente mediate dall'interazione con VEGFR-2.

Recentemente sono state proposte strategie per le terapie tumorali basate sulla neutralizzazione del segnale da VEGF o mediante anticorpi anti-VEGF, o mediante inibitori tirosin kinasici a basso peso molecolare che hanno come target i VEGFRs. Queste nuove strategie per il trattamento dei tumori confermano anche la rilevanza clinica della via di trasduzione del segnale di VEGF, la quale risulta sovraregolata nei processi di angiogenesi patologica come quella tumorale (Olsson et al., Molecular Cell Biology, 2006).

1.4.3. Fattori “non classici” di regolazione dell'Angiogenesi

Oltre ai noti fattori di regolazione riportati in tabella 2, ci sono molti altri fattori, meno conosciuti, in grado di regolare l'angiogenesi sia promuovendola sia inibendola. Questi fattori grazie ai loro recettori sono in grado di agire in modo assai efficiente attraverso diverse vie metaboliche. Questi fattori sono oggi molto studiati in quanto risultano essere dei possibili target per la regolazione dell'angiogenesi (Ribatti et al., Pharmacological review, 2007).

FATTORI	RECETTORI	VIA DEL SEGNALE	ATTIVITÀ ANGIOGENICA
Eritropoietina (EPO)	EPO-RA, EPO-RB	PI3K/Akt; JAK/STAT	Stimola la proliferazione, la migrazione, la formazione di tubuli capillari, la vascolarizzazione e la crescita tumorale; interagisce con ET-1.
Angiotensina II (ANG-II)	AT ₁ -R, AT ₂ -R	NOS/NO	Stimola la proliferazione, la migrazione e l'angiogenesi nelle EC; interagisce con VEGF.
Endoteline (ET-1, ET-2, ET-3)	ET _A -R, ET _B -R	BK _{ca} ; PGE ₂ /COX	ET-1 e ET-3, agendo attraverso ET _B -R, promuovono la proliferazione e la migrazione <i>in vitro</i> delle EC. HUVECs messe su matrigel in presenza di ET-1 migrano e formano delle strutture tubulari capillaro-simili. ET-1 stimola la proliferazione attraverso ET _B -Rs e sembra agire come un fattore antiapoptotico per EC e per VSMC (vascular smooth muscle cells), contribuendo così a mantenere l'integrità dei nuovi vasi sanguigni formati.
Adrenomedullina (AM)	AM ₁ -R, AM ₂ -R	AC; Akt; MAPK	Ha un effetto proangiogenico; promuove la proliferazione e la migrazione <i>in vitro</i> ; favorisce la formazione di strutture tubulari

			capillaro-simile in colture di HUVEC su matrigel e la formazione di vasi sanguigni nel saggio della CAM; interagisce con VEGF.
Proadrenomedullina (N-terminal 20 peptide PAMP)	Sconosciuti	Sconosciuto	Stimola la migrazione nelle EC, ha un minor effetto sulla formazione di strutture tubulari capillaro-simili e aumenta l'espressione dell'mRNA dei VEGF, FGF-2 e PDGF nelle EC. E' un potente fattore angiogenico e promuove la crescita tumorale.
Urotensin-II	UT-R		Stimola la formazione di strutture tubulari capillaro-simili in EC su Matrigel e sembra avere un effetto simile a quello dell'FGF-2, pertanto può essere considerata una sostanza con grandi potenzialità angiogeniche.
Leptina	Ob-Ra, OB-Rb	MAPK, STAT-3	Lo scambio mediato dalla leptina tra adipociti e EC promuove l'angiogenesi; E' stato riscontrato che le EC esprimono Ob-Ra e Ob-Rb funzionalmente attive, che mediano la proliferazione indotta da leptina attraverso l'attivazione di STAT-3 e chinasi (ERK) 1/2 regolate dal segnale extracellulare induce angiogenesi <i>in vivo</i> nella CAM e nel test della cornea di ratto, la risposta angiogenica è stato dimostrato essere molto simile a quella ottenuta con FGF-2. La leptina infine non solo stimola la proliferazione di linee cellulari di carcinoma alla mammella coltivate <i>in vitro</i> e impiantate in topi singenici, ma aumenta anche l'espressione del VEGF e del VEGF-R2, attraverso PI3K, JAK/STAT e la via metabolica ERK1/2.

Adiponectina	AdipoR ₁ , AdipoR ₂	AMP Kinase	Sembra attivare la chinasi adenosina monofosfato nelle EC, comportando un aumento dell'angiogenesi <i>in vivo</i> nel Matrigel murino e nel saggio della cornea di coniglio e l'inibizione dell'apoptosi mediata dalla caspasi 3 nelle HUVEC <i>in vitro</i> ; Inoltre ha un ruolo importante nell'angiogenesi indotta da ischemia. L'azione proangiogenica sembra essere mediata dalla stimolazione del segnale AMP chinasi dipendente all'interno del muscolo scheletrico dell'arto ischemico. Infine l'adiponectina sembra inibire la migrazione delle EC e la proliferazione <i>in vitro</i> e la neoangiogenesi <i>in vivo</i> nei saggi della CAM e della cornea.
Restina		PI3K, MAPK	Promuove la proliferazione nelle VSMC attraverso la via metabolica ERK1/2 e PI3K e stimola l'angiogenesi <i>in vitro</i> ; stimola la proliferazione, la migrazione e la formazione di strutture capillari-simili nelle HAEC; inoltre sovraregola l'espressione di VEGF-R1, VEGF-R2, MMP-1 e MMP-2 come l'm-RNA e la proteina nelle HAEC, come anche suscita un'attivazione transiente di ERK1/2 e di MAPK p38.
Neuropeptide-Y (NPY)	Y ₁ -R/ Y ₂ -R (Y ₅ -R)	MAPK	Stimola la proliferazione delle VSMC della aorta di ratto agendo attraverso Y ₁ -R e Y ₂ -R; sembra stimolare l'attività di ERK1/2 nelle colture primarie di EC di coronaria di ratto; Promuove l'angiogenesi <i>in vitro</i> attraverso il miglioramento dell'adesione, della migrazione, della proliferazione e della formazione di strutture capillari simili con HUVEC. <i>In vitro</i> l'attività proangiogenica sembra essere mediata principalmente dal recettore Y ₂ -R tuttavia alcuni studi più recenti riportano un coinvolgimento anche del recettore Y ₁ -R e Y ₅ -R.

Peptide vasoattivo intestinale (VIP) e Polipeptide pituitario adenilato ciclasasi attivato (PACAP)	VPAC ₁ -R	PKA; PI3K; MAPK	Incrementano l'espressione del VEGF nelle cellule del cancro al polmone.
Sostanza P	NK ₁ -R	PLC/PKC; NOS/NO	Aumenta la crescita dei capillari <i>in vivo</i> nel saggio della cornea di coniglio; stimola la proliferazione e la migrazione <i>in vitro</i> di differenti tipi cellulari.
Somatostatina	Sst-2R, sst-3R (sst-1R/sst-5R)	MAPK; NOS/NO	Inibisce la crescita cellulare, la proliferazione e l'angiogenesi.
Grelina	GHS-R1a	MAPK; PI3K/Akt	Inibisce la proliferazione di EC.
Peptidi Natriuretici	A-R/C-R (B-R)	MAPK; JNK	Inibiscono la proliferazione, la migrazione e la formazione di tubuli capillari e possono essere considerati i primi inibitori endogeni dell'angiogenesi modulata dal VEGF.

Tab. 3 : Fattori non classici dell'angiogenesi.

1.5. ADRENOMEDULLINA

L'adrenomedullina (AM) è un potente peptide ipotensivo di 52 aminoacidi isolato da estratti di feocromocitoma umano (Kitamura et al., Biochem Biophys Res Commun, 1993a). E' prodotta dal taglio proteolitico di un pro-ormone di 185 aminoacidi chiamato preproadrenomedullina, dal quale si origina anche un altro peptide la proadrenomedullina N-terminal 20 peptide (PAMP) (Kitamura et al., Biochem Biophys Res Commun, 1993b). Il gene della preproAM è costituito da quattro esoni e tre introni ed è localizzato nell'uomo sul cromosoma 11 (Ishimitsu et al, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1994). L'AM viene secreta come peptide immaturo(iAM), che rappresenta la forma circolante principale. Costituisce infatti l'85% dell'AM nel plasma e si trova legata ad un fattore H del complemento detto AMBP-1 (AM binding protein-1) (Beltowski et al., Pol. J. Pharmacol., 2004). L'iAM è convertita nella forma matura AM attraverso l'attività enzimatica della peptidilglicina α -monossigenasi (PAM) (Eipper et al., J. Biol. Chem., 1991). (Fig. 6)

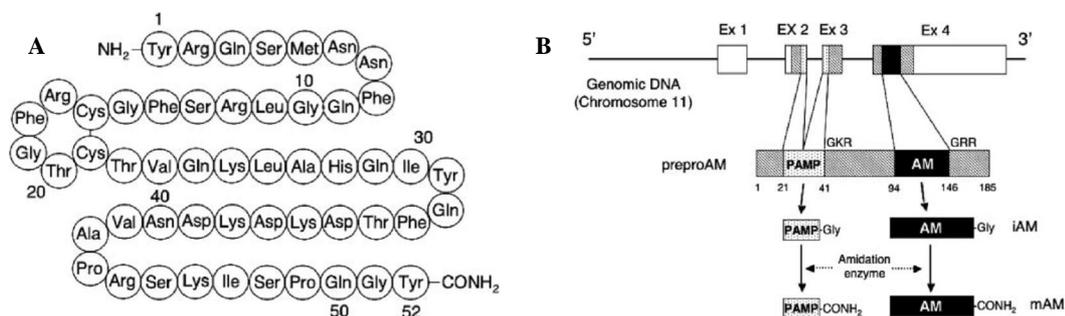


Fig. 6: A) Sequenza aminoacidica di AM. B) Rappresentazione del gene AM e della forma processata di AM e di PAMP. Ex indica gli esoni; PAMP, proadrenomedullina N-terminal 20 peptide; iAM e iPAMP, forme intermedie di AM e PAMP; mAM and mPAMP, forma matura di AM e PAMP (Nikitenko et al., British Journal of Cancer, 2006).

AZIONE BIOLOGICA DI AM SU CELLULE VASCOLARI	
TIPI CELLULARI	EFFETTI
Cellule endoteliali	Aumento dei livelli di cAMP; mobilitazione intracellulare di Ca ₂ ; Stimolazione della produzione di NO; Stimolazione di migrazione e proliferazione; Inibizione dell'apoptosi.
Cellule muscolari lisce	Aumento dei livelli di cAMP; Inibizione della stimolazione della proliferazione; Inibizione della migrazione; Riduzione dello stress ossidativo.
Fibroblasti avventiziali	Aumento dei livelli di cAMP; Inibizione della proliferazione; Aumento dell'azione di MMP-2.

Tab. 4: Azione di AM sulle cellule vascolari.

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). Si tratta di piccole proteine con un grande N-terminale extracellulare e un singolo dominio transmembrana. 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 (McLatchie et al., Nature, 1998; Poyner et al., Pharmacol Rev. 2002).

AM e i suoi recettori sono espressi in molti tessuti e organi, inclusi il cuore e i vasi sanguigni, i reni, i polmoni, il tratto gastrointestinale, la milza e il timo, le ghiandole endocrine e il cervello. La sua estesa distribuzione suggerisce che AM sia coinvolta nella regolazione di parecchie funzioni del corpo (Eto T, Peptides, 2001; Hinson et al., Endocr Rev 2000; Lopez et al, Int Rev Cytol, 2002). Inoltre l'espressione e la secrezione di AM è stata dimostrata in molti tumori e fluidi biologici e sembra essere implicata in numerosi processi fisiologici (Hinson et al., Endocr Rev 2000) :

- AM è un fattore di crescita (Hinson et al., Endocr Rev 2000; Rossi et al., Hypertens Res. 2003);
- AM è angiogenica nei modelli *in vitro* e *in vivo* (Zhao et al, Oncogene, 1998; Nikitenko et al, Mol Hum Reprod, 2000; Kim et al, FASEBJ 2003; Ribatti et al., Peptides 2005; Guidolin et al., Peptides 2008);
- AM inibisce l'apoptosi nelle EC e nelle cellule tumorali isolate (Kato et al., Endocrinology, 1997; Martinez et al., J Natl Cancer Inst, 2002; Oehler et al., Oncogene 2002);
- AM è un potente vasodilatatore (Hinson et al., Endocr Rev 2000);
- AM regola la permeabilità vascolare (Hippenstiel et al., Circ Res., 2002);
- AM contribuisce all'adesione e alla differenziazione di cellule mononucleari derivate dal midollo osseo in cellule endoteliali progenitrici (Iwase et al., Circulation, 2005).

In condizioni fisiologiche AM dilata i vasi sanguigni, comprese le coronarie, e incrementa il flusso cardiaco (De Matteo et al., Br J Pharmacol, 2003; Kinnunen et al., Am J Physiol, 2000; Stangl et al., Eur J Pharmacol, 2000; Terata K, Am J Physiol, 2000). La sua sovraespressione inibisce la proliferazione sperimentale arteriosa intima (Agata et al., Regul Pept, 2003; Kawai et al., Circulation, 2004; Yamasaki et al., Hypertension, 2003) e il danno vascolare polmonare indotto dall'ipossia (Matsui et al., Circulation 2004). L'AM aumenta in pazienti con insufficienza cardiaca congestizia e danno al miocardio (Jougasaki et al., Circulation, 1995; Kobayashi et al., AM Heart J, 1996; Nishikimi et al., J Am Coll Cardiol, 1995) ed è clinicamente utilizzata nel trattamento contro l'insufficienza cardiaca (Nagaya et al., Circulation, 2000; Rademaker et al., Circulation 1997), mentre il sovraccarico della pressione cronica fa aumentare l'espressione dell'mRNA di AM in concomitanza con lo sviluppo dell'ipertrofia ventricolare (Baümer et al., J Appl Physiol, 2001; Foldes et al., Endocrinology, 2001; Hirano et al., J Card Fail, 2000; Luodonpää et al., Regul Pept, 2003; Morimoto et al., Hypertension, 1999; Rademaker et al., Regul Pept, 2003; Yoshihara et al., AM J Physiol, 2000). L'espressione dei recettori AM1 e AM2 è aumentata nell'ipertrofia del ventricolo sinistro indotta da ipertensione maligna (Nakamura et al., Circulation, 2004; Nishikimi et al., Hypertension, 2003, 41:512-8; Tadokoro et al., Regul Pept, 2003; Wang et al., J Hypertension, 2003), e l'infusione di AM attenua la transizione dell'ipertrofia dal ventricolo sinistro all'insufficienza cardiaca in ratti ipertesi (Nishikimi et al., Hypertension, 2003, 42:1034-41) e riduce l'estensione dell'infarto in ratti con ischemia al miocardio e danno da riperfusione (Okumura et al., Circulation, 2004). In ratti privati del gene dell'AM (knockout) è stato dimostrato che la somministrazione di AM endogena offre una forte protezione contro

l'ipertrofia cardiaca indotta da stress (Niu et al., *Circulation*, 2004). L'AM può anche influire indirettamente sul sistema cardiovascolare in quanto ha un'azione antisecretogena nei confronti dell'aldosterone; infine ha un ruolo modulatore nella crescita degli organi e nella differenziazione durante l'embriogenesi (Garayoa et al., *Microsc Res Tech*, 2002) e promuove la crescita di tessuti normali e neoplastici (Belloni et al., *Histol Hisopathol*, 2001; Cuttitta et al., *Microsc Res Tech*, 2002; Zudarie et al., *Regul Pept*, 2003).

Il meccanismo d'azione di AM nelle EC coinvolge l'attivazione di Akt, MAPK e le kinasi di adesione focale (Fernandez-Sauze et al., *Int J Cancer*, 2004; Kim et al., *FASEB J*, 2003; Miyashita et al., *FEBS Lett*, 2003), e può avere un ruolo anti-infiammatorio nel controllo dell'espressione genica delle molecole di adesione indotta dal VEGF e dell'adesività per i leucociti nelle EC (Kim et al., *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2003).

AM1 è considerato essere il principale recettore che media gli effetti di AM (McLatchie et al., *Nature*, 1998; Poyner et al., *Pharmacol Rev*, 2002). Esso è prevalentemente espresso nelle EC microvascolari, a conferma del fatto che questo GPCR (recettore associato alle G protein) è potenzialmente il maggiore regolatore degli effetti di AM sulla vascolatura (Nikitenko et al., *FASEB J*, 2003). Va osservato che la trascrizione del gene per il calcitonin-receptor-like receptor (uno dei due costituenti dei recettori per AM) è sovra-regolata nelle EC in condizioni di ipossia. La simultanea sovraregolazione del CRLR e il legame con AM nelle EC possono dunque avere un ruolo fondamentale nelle risposte vascolari all'ipossia e all'ischemia. Calcitonin-receptor-like receptor è anche sovra-regolato in alcuni tumori umani (Nikitenko et al., *FASEB J*, 2003).

Quanto ai processi di trasduzione del segnale nelle cellule endoteliali vascolari, l'attivazione di fosfatidilinositolo 3'Kinase (PI3K/Akt), mitogen-activated protein kinase (MAPK) e focal adesion kinase (p125FAK) sembrano avere un ruolo rilevante nell'angiogenesi indotta da AM. La migrazione stimolata da AM di HUVEC è infatti inibita da PI3K o da inibitori di MAPK (Kim et al., *FASEB J*, 2003). Inoltre, si è osservato che la sovra-regolazione di ossido nitrico mediata da AM comporta una vasodilatazione endotelio-dipendente (Hinson et al., *Endocr Rev*, 2000) e che AM riduce l'apoptosi dell'endotelio attraverso un meccanismo c-AMP indipendente, e attraverso la sovra-regolazione della trascrizione del fattore Max (Kato et al., *Endocrinology*, 1997; Shichiri et al., *Mol Endocrinol*, 1999). Riguardo ad altri tipi cellulari, è stato riportato che nelle VSMC l'attività mitogena di AM è mediata da processi cAMP dipendente e/o da MAPK (Hinson et al., *Endocr Rev*, 2000). Inoltre, gli effetti vasodilatatori endotelio-indipendente di AM sono legati a un meccanismo cAMP-dipendente in VSMC. La migrazione di VSMC stimolata da AM è inibita da wortmannin, un inibitore di PI3K, e ciò suggerisce che l'attivazione di PI3K/Akt attraverso il peptide contribuisca *in vivo* al reclutamento di VSMC per formare una nuova rete di capillari (Iwase et al., *Circulation*, 2005).

Più controversa è la relazione tra AM e VEGF, rimanendo infatti da appurare se AM e VEGF agiscano indipendentemente o con qualche forma di sinergia. Recenti studi mostrano che AM aumenta la formazione di capillari indotta dal VEGF su HUVEC in vitro, ma c'è un disaccordo sulla capacità di AM di stimolare la produzione di VEGF in queste cellule (Fernandez-Sauze et al., *Int J Cancer*, 2004; Imuro et al., *Circ Res*, 2004). Proprietà pro-angiogeniche di AM sono comunque emerse da vari esperimenti su colture vascolari di EC. Ad esempio dopo iniezione di gel contenente AM in topi, AM sembra promuovere la

neovascolarizzazione in maniera dipendente dalla protein kinasi A e da PI3K (Miyashita et al., FEBS Lett, 2003). E' stato inoltre dimostrato che AM incrementa la densità di capillari collaterali in topi con ischemia agli arti, aumentando l'espressione di VEGF e attivando Akt. Topi eterozigoti privati del gene dell' AM (knockout) mostrano uno scarso sviluppo di capillari, mentre topi omozigoti privati del gene dell'AM muoiono all'interno dell'utero per insufficiente sviluppo dei vasi sanguigni placentari (Shindo et al., Circulation, 2001). AM sembra inoltre aumentare la potenza angiogenica di impianti di cellule derivate da midollo osseo attraverso l'inibizione dell'apoptosi cellulare. L'angiogenesi dopo il trapianto di cellule mononucleate derivate da midollo osseo aumenta grazie ad AM in ratti con ischemia degli arti posteriori e le cellule mononucleate si differenziano in EC e facilitano la formazione di vasi maturi che includono VSMC (Iwase et al., Circulation, 2005). In modo analogo, in un ratto modello con infarto cerebrale, l' effetto angiogenico del trapianto di cellule staminali mesenchimali è aumentato dall'infusione di AM nel limite ischemico del cervello, migliorando i deficit neurologici (Hanabusa et al., Stroke, 2005).

Dati potenzialmente interessanti riguardo alla relazione tra AM e VEGF, sono quelli ottenuti sull'angiogenesi tumorale. Il VEGF è infatti il maggior regolatore associato all'angiogenesi tumorale e promuove la crescita tumorale, l'invasione e le metastasi. La sua quantità (misurata mediante immunistochemica, ibridazione in situ, immunodosaggi quantitativi, western blotting, reverse-transcriptase polymerase chain reaction) espressa da cellule cancerose è correlata con la dimensione del tumore, le metastasi e la scarsa prognosi in molti tipi di tumori solidi e di tumori ematologici (Dvorak et al., J Clin Oncol, 2002).

Huge et al., hanno mostrato che AM e VEGF sono i fattori angiogenici maggiormente espressi in leiomiomi uterini, e che questi tumori hanno una più alta densità vascolare e indice proliferativo endoteliale del normale miometrio e endometrio. Una sorprendente constatazione di questo studio è che l'espressione di AM, nonché di VEGF, è correlata alla densità vascolare dei leiomiomi. Imuro et al. (Imuro et al., Circ Res, 2004) hanno anche evidenziato che la somministrazione di AM sovra-regola l'espressione del VEGF in modelli *in vitro* e *in vivo*. E' stato ad esempio utilizzato un laser doppler perfusion imaging per mostrare come AM stimoli la ripresa del flusso sanguigno dell'arto colpito in topi con ischemia agli arti inferiori, promuovendo l'espressione locale di VEGF. L'immunistochemica per CD31 rivela che questo maggior il flusso riflette un aumento della densità di capillari. Ciò è confermato anche da studi condotti con cellule tumorali del sarcoma 180 trapiantate per via sottocutanea. Topi eterozigoti privati del gene dell'AM (AM^{+/-}) mostrano in modo significativo un minor recupero del flusso sanguigno con minor sviluppo di capillari collaterali e una più bassa espressione di VEGF. In coculture di EC e fibroblasti AM aumenta la formazione di capillari indotta da VEGF, mentre in colture di EC aumenta l'attivazione di Akt indotta da VEGF. E' stato tuttavia riportato che bloccando il VEGF mediante anticorpi specifici non si inibisce in modo significativo la formazione di tubuli capillari indotta da AM su HUVEC (Fernandez-Sauze et al., Int J Cancer, 2004), indicando che AM non funzionerebbe indirettamente attraverso la sovra-regolazione del VEGF.

1.6. INTERMEDINA

L'intermedina, conosciuta anche come adrenomedullina-2 (AM-2), è un peptide recentemente scoperto appartenente anch'esso alla famiglia del CGPR (calcitonin gene-related peptide), ed è stata isolata da pesce palla. Nell'uomo si trova nel cromosoma 22q13.33 e deriva dal taglio proteolitico del prepropeptide IMD di 148 aminoacidi (Fig. 7A). Dal taglio proteolitico del residuo basico in prossimità dell'N-terminale e un' α -amidazione del residuo C-terminale si hanno due forme di intermedina, IMD₁₋₄₇ (prepro- IMD₁₀₁₋₁₄₇ intermedin long - IMDL) e IMD₈₋₄₇ (prepro- IMD₁₀₈₋₁₄₇ intermedin short - IMDS) delle quali però solo una, la forma più corta, la IMD₈₋₄₇, ha un importante ruolo biologico (Fig. 7B) (Roh et al., Biol Chem, 2004). L'analisi delle sequenze dei vari prepro-peptidi appartenenti alla famiglia dei calcitonin/CGRP indica una certa omologia di sequenza tra la forma matura dell'intermedina e gli altri peptidi, circa il 25% con l'ADM e il 20% con il CGRP (Fig. 7C). La forma matura di IMD umana è per il 60% simile a quella di pesce e per l'87% a quella dei roditori.

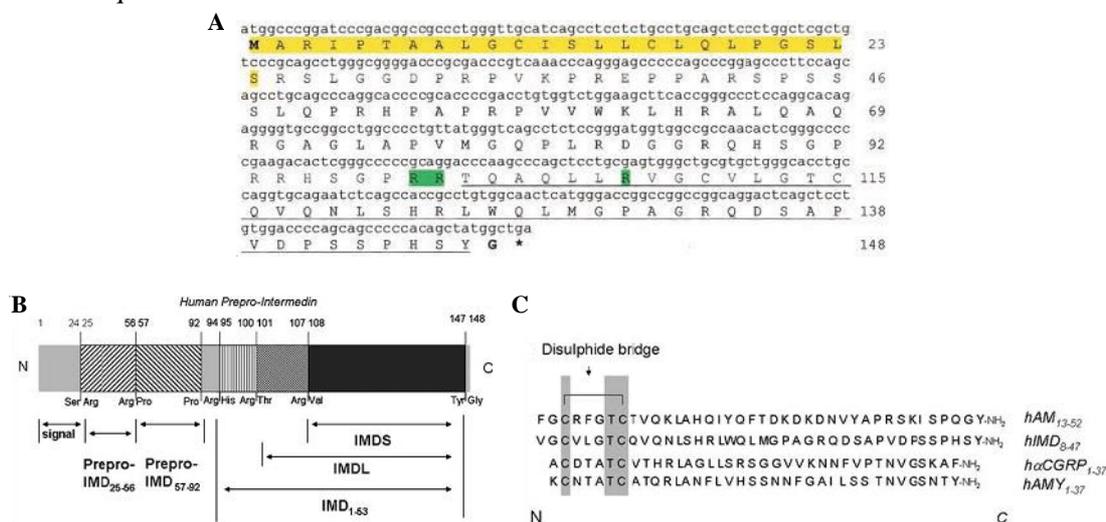


Fig. 7: A-B) Rappresentazione di prepro-IMD umana che mostra i frammenti derivati dal taglio proteolitico del prepro-peptide precursore di 148 aminoacidi. C) Confronto tra le sequenze primarie di h-adrenomedullina₁₃₋₅₂, h-intermedina₈₋₄₇ (IMDS), h- α CGRP₁₋₃₇, e h-AMY₁₋₃₇; le sequenze hanno in comune un residuo di cisteina che contribuisce alla formazione del ponte di solfuro caratterizzando la struttura del loop intramolecolare (Chang et al., Peptides, 2004; Roh et al., Biol Chem, 2004).

IMD interagisce in maniera non selettiva con CRLR/RAMP1-2-3, mentre CGRP interagisce preferibilmente con CRLR/RAMP1 e AM con CRLR/RAMP2-3 (Roh et al., Biol Chem, 2004). IMD è espressa in vari tessuti umani: nel tratto gastrointestinale, in particolare nella mucosa muscolare dello stomaco e nel digiuno, nel cervello, nell' ipotalamo, nella ghiandola pituitaria, nella pelle, nel pancreas, nei polmoni, nella milza, nel timo, nelle ovaie, nelle ghiandole sottomascellari, nel cuore, nei reni e plasma (Roh et al., Biol Chem, 2004; Takei et al., Peptides, 2004; Takei et al., FEBS Lett, 2004; Taylor et al., Am J Physiol, 2005; Takahashi et al., Peptides, 2006; Kindt et al., J Invest Dermatol, 2007). In tessuti umani di origine autoptica, immunocolorazioni per IMD hanno dato esito positivo nei reni e per la precisione nelle cellule tubulari renali, mentre nei glomeruli renali e nella vascolatura il peptide non sembra essere presente (Takahashi et al., J Clin Endocrinol Metab, 2004). Inoltre, sempre mediante immunoistochimica, la sua presenza è stata riscontrata nel ventricolo sinistro di cuore umano, nelle VSMC dell'arteria coronaria e nelle EC di vene del tessuto adiposo del pericardio (Morimoto et al., Peptides, 2007). La localizzazione di IMD a livello

dell'ipotalamo e della ghiandola pituitaria suggerisce un suo coinvolgimento, come per AM, nella regolazione della sete e nel bilanciamento dei fluidi e degli elettroliti, e come per CGRP e AM, nella risposta allo stress endocrino, e nella secrezione di ossitocina (Taylor et al., *Am J Physiol*, 2005; Taylor and Samson, *Brain Res*, 2005).

Le azioni biologiche di questo peptide sono mediate, come si è detto, dai complessi recettoriali CRLR/RAMPs. (Fig. 8).

CRLR è ubiquitariamente espresso nelle aree del sistema nervoso centrale correlate al controllo neuroendocrino e al sistema nervoso autonomo, alla sete e all'appetito, nei polmoni, nella ghiandola surrenalica, nei reni e nella pelle. Inoltre è presente nei vasi sanguigni, essendo distribuito nelle EC della vascolatura polmonare e sistemica e nelle cellule vascolari muscolari lisce (VSMC) e nel cuore (Hagner et al., *Cell Tissue Res*, 2002; Cottrell et al., *J Compl Neurol*, 2005; Totsune et al., *Clin Sci*, 2000; Cueille et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2002). RAMP1 è espresso nel cervello e nel midollo spinale, nel tratto gastrointestinale, nella ghiandola surrenalica, nel tessuto adiposo, nel timo e nella milza. All'interno della vascolatura è evidente nei nervi perivascolari e nella muscolatura liscia di arterie più piccole e arteriole e nei cardiomiociti e non miociti, presupponendo la presenza di CGRP₁ (Nagae et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; Cottrell et al., *J Compl Neurol*, 2005; Oliver et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002; Autelitano and Ridings, *Peptides*, 2001). RAMP2 è abbondantemente espresso nei polmoni, nella milza, nel tessuto adiposo e nei reni. Inoltre nel sistema cardiovascolare si trova nelle cellule endoteliali micro vascolari e macrovascolari, nella muscolatura liscia vascolare, nei cardiomiociti e meno abbondante nei non-miociti cardiaci (Nagae et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; Kamitani et al., *FEBS Lett*, 1999; Autelitano and Ridings, *Peptides*, 2001). RAMP3 è molto meno distribuito rispetto agli altri recettori; lo si può trovare in discrete quantità nei reni e in quantità inferiori nei polmoni, milza e timo; bassi livelli di RAMP3 sono stati riscontrati nel miocardio e nei cardiomiociti nell'adulto (Nagae et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; Zhao et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 2006). Va anche osservato che i RAMP mostrano gradi diversi di affinità per CRLR a seconda del tipo cellulare nel quale sono co-espressi: l'interazione di RAMP3 con CRLR è ad esempio predominante nelle EC di aorta di coniglio rispetto a quelle coinvolgenti RAMP1 e RAMP2 (Muff et al., *FEBS Lett*, 1998).

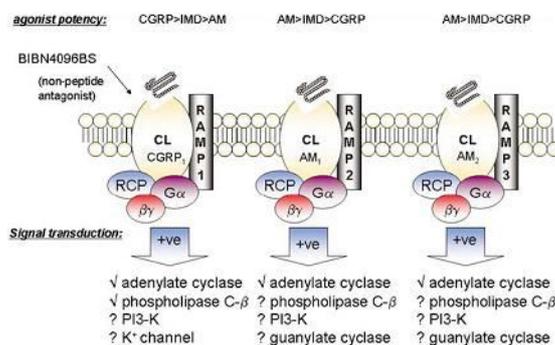


Fig. 8: CGRP, AM, IMD condividono la stessa famiglia di G-protein ($G\alpha\beta\gamma$)-coupled receptors formati dall'associazione del calcitonin receptor-like receptor (CRLR) con uno dei tre recettori receptor-activity-modifying proteins (RAMPs). La proteina componente del recettore (RCP) è richiesta per l'ottimale attivazione della trasduzione del segnale.

IMD ha dimostrato avere azioni sul sistema cardiovascolare simili a quelle di AM. Anche IMD ha infatti un effetto ipotensivo e vasodilatatorio (Roh et al., Biol Chem, 2004; Takei et al., FEBS Lett, 2004). Per esempio, IMD diminuisce la pressione sanguigna e incrementa la frequenza cardiaca e il flusso sanguigno renale in ratti coscienti (Fujisawa et al., Am J Physiol Heart Circul Physiol, 2006). Sia AM che IMD possono avere ruoli patofisiologici e sembrano mostrare protezione contro il danno da ischemia o riperfusione al miocardio nei cuori di ratto (Yang et al., Biochem Biophys Res Comm, 2006). Recenti studi hanno dimostrato che il trasferimento del gene di IMD impedisce la perdita di EC, il danno ai reni, l'infiammazione, e la fibrosi in ratti ipertesi (Hagiwara et al., Am J Physiol Renal Physiol, 2008). Sono stati inoltre osservati molti effetti renali, cardiaci, emodinamici comparabili con quelli di AM (Bunton et al., Pharmacol Ther, 2004; Chao et al., Peptides, 2001). Come si è detto, AM risulta anche essere un potente fattore di crescita angiogenico (Nagaya et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005), e data la notevole somiglianza strutturale, chimica e biologica di AM e IMD e che i loro effetti sono mediati dagli stessi complessi recettoriali, Smith et al., (Am J Physiol Heart Circul Physiol, 2009) hanno ipotizzato che anche IMD abbia effetti angiogenici. Dai loro esperimenti è infatti risultato che IMD è un potente peptide angiogenico: il trasferimento del gene di IMD umano in ratti con ischemia degli arti posteriori ha causato un marcato aumento della densità di capillari e di arteriole rispetto agli arti normoperfusi, ciò indica non solo la capacità proangiogenica di IMD ma anche l'aumento di arteriogenesi da un completo ristabilimento del flusso sanguigno. Inoltre l'impianto di matrigel contenente IMD in topi ha sottolineato la capacità di IMD di promuovere la crescita dei vasi sanguigni, infine IMD sembra promuovere la migrazione e la formazione di tubuli in colture di EC.

Anche gli eventi molecolari di trasduzione del segnale mostrano notevoli analogie con quelli indotti da AM. Come per AM (Kim et al., FASEB J, 2003), la via PI3K-Akt-eNOS è la via principale per l'induzione di processi di angiogenesi (Dimmeler et al., Circ Res, 2000; Jiang et al., Biochim Biophys Acta, 2008; Katusic et al., Arteriscler Thromb Vasc Biol, 2002; Smith et al., Arteriscler Thromb Vasc Biol, 2002) da parte di IMD (Smith et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009). (Vedi fig. 9).

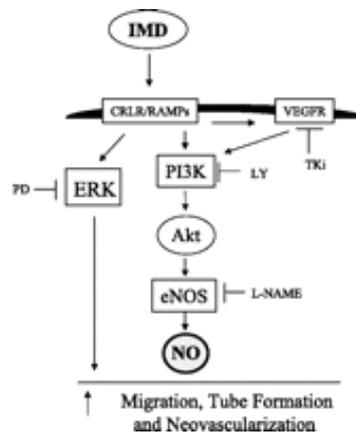


Fig. 9: Meccanismo d'azione di IMD su EC.

Il lavoro svolto in questa tesi è finalizzato allo studio dell'adrenomedullina, un peptide endogeno, induttore di angiogenesi in condizioni fisiologiche e patologiche. Sono stati approfonditi i meccanismi cellulari alla base della sua azione proangiogenica in cellule endoteliali umane da vena safena (HSVEC) valutando in particolare le relazioni che vi sono, nelle cellule endoteliali, tra il peptide e la via metabolica ad azione trofica, pilotata dal VEGF. Ad ulteriore conferma dei risultati ottenuti sono stati effettuati esperimenti utilizzando come stimolo IMD (Intermedina), peptide che condivide con AM il medesimo sistema recettoriale.

3.1. COLTURE CELLULARI IN VITRO

Sono state utilizzate cellule endoteliali umane primarie di vena safena (HSVEC – Human Safena Vein Endothelial Cells) isolate direttamente da biopsie di vasi sanguigni avuti dalla Chirurgia Vascolare dell'Università di Padova. Dopo la resezione le vene sono state poste in terreno EBM e lavate accuratamente con PBS e l'1% di antibiotico. Sono stati rimossi con attenzione il tessuto adiposo, i coaguli di sangue ed eventuali altre impurità. Dopo aver lavato nuovamente il vaso si è proceduto con l'isolamento delle cellule endoteliali, è stato tagliato longitudinalmente il vaso ed è stato posto con il lume del vaso adeso alla piastra e incubato con 0.1% di collagenasi di tipo II 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 con 10% siero bovino fetale, 100IU/mL di penicillina, 100mg/mL di streptomina, e 2% di Ultroser (BioSeptra S.A., Cergy-Saint-Christophe, France) quindi le cellule sono state piastrate in piastre pre-condizionate con fibronectina (1µg/cm²) e incubate a 37°C con 5% CO₂, 95% umidità. Una volta che le cellule hanno raggiunto la confluenza, sono state staccate dalla piastra e sottoposte a immunoseparazione magnetica per 30 min a 4°C con Dynabeads M-450 (Oxid Italy, Milan, Italy) rivestite con anticorpo anti-human CD31 per separare HSVEC attraverso immunoseparazione magnetica (Conconi et al., J BioMed Mater Res, 2004). Il fenotipo endoteliale delle cellule isolate è stato confermato attraverso l'immunocitochimica, utilizzando anticorpi anti-von Willebrand e anti-smooth muscle actin. In tutti gli esperimenti sono state utilizzate colture di HSVEC dal secondo al quinto passaggio.

3.2. MANTENIMENTO IN COLTURA DELLE CELLULE ENDOTELIALI

Durante l'espansione, le cellule sono state fatte crescere in fiasche da 75 cm² o 25 cm² con il relativo terreno per le cellule endoteliali EBM (PBI International, Milano, Italia), con aggiunta di siero fetale bovino (FCS) tra il 2% e il 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. Reagenti come FCS, antibiotici, tampone fosfato (PBS), acido etilendiamminotetracetico (EDTA), tripsina, trypan blue, dimetilsolfossido (DMSO) sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA. FGF fornito dalla ditta Preprotech, London, UK; diamminobenzidina (DAB) fornita dalla ditta Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA. 4',6'-diamine-2'-phenylindole (DAPI) è stato fornito dalla ditta Boehringer, Mannheim, Germany. Le cellule si mantengono in incubatore ThermoForma (Marietta, Ohio) a 37°C e al 5% di CO₂.

3.3. SAGGIO DI PROLIFERAZIONE

HSVEC sono state seminate (2×10^4 cells/well) 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 altro terreno contenente 50ng/mL di FGF-2 o VEGF (controllo positivo) o addizionato di AM (da 10^{-12} M a 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, Germany) secondo le istruzioni fornite dal produttore. La BrdU (10^{-5}) veniva 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 (15mM glicina in etanolo) per 30 minuti a 4°C e poi incubate con un anticorpo monoclonale fluorescinato anti-BrdU (1:10) per 45 minuti a 37°C in camera umida. Infine si è utilizzato DAPI per visualizzare i nuclei di tutte le cellule presenti.

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, Germany) collegata a un microscopio rovesciato DM-IRE2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 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 (Conconi et al., J Invest Med, 2003). Per l'analisi è stato utilizzato il software per l'analisi di immagine QWin (Leica Microsystems, Cambridge, UK).

3.4. IMMUNOCITOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule sono state poste su piastre da 24 pozzetti, aventi, per ogni pozzetto, adagiato un vetrino sul fondo. Le cellule sono state successivamente fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) per 45 minuti a temperatura ambiente. La PFA al 4% è stata poi rimossa con successivi lavaggi di PBS. Dopo "permeabilizzazione" con Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA) allo 0,1% in PBS per 5 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione, seguita da lavaggio con PBS, i campioni destinati all'analisi immunocitochimica sono stati sottoposti a blocco dei siti aspecifici con albumina di siero bovino (BSA; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) al 3% in PBS per un'ora a temperatura ambiente sotto agitazione. Per i campioni destinati all'osservazione in immunofluorescenza la soluzione per il blocco dei siti aspecifici era invece costituita da: 1:50 normal goat serum (Chemicon) in PBS e Triton 100X allo 0,3%. Successivamente le cellule sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente e poi per tutta la notte a +4°C (in leggera agitazione) con gli anticorpi primari riportati in Tabella 1 e diluiti in BSA 0,2% e Triton X-100 allo 0,2% in PBS per l'immunocitochimica e in PBS e Triton X-100 allo 0,3% per l'immunofluorescenza.

ANTICORPO	SPECIE	DILUIZIONE	DITTA PRODUTTRICE	CODICE IDENTIFICATIVO
Policlonale IgG Von Willebrand Factor	Rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich	F-3520
Policlonale IgG CRLR (H-42)	Rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.	SC-30028
Policlonale IgG RAMP2 (H-139)	Rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.	SC-11380
Policlonale IgG VEGF (147)	Rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.	SC-507
Policlonale IgG FLT-1 (H-225)	Rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.	SC-9029
Policlonale IgG KDR/Flk-1 (clone CH-11)	Mouse	1:100	Upstate	05-554
Monoclonale IgG TYR-951	Rabbit	1:125 IF 1:100 ICC	Cell Signaling	4991 (15D2)
Monoclonale IgG TYR-1175	Rabbit	1:100 IF 1:200 ICC	Cell Signaling	2478 (19A10)

Tab. 1: anticorpi primari utilizzati e loro rispettive diluizioni.

Dopo 3 lavaggi con PBS, le cellule sono quindi state incubate per 1 ora a temperatura ambiente sotto agitazione con gli anticorpi secondari riportati in Tabella 2.

ANTICORPO	DILUIZIONE	DITTA PRODUTTRICE	CODICE IDENTIFICATIVO
IgG Anti- Mouse e anti-rabbit	Pronto all'uso	Vector Laboratories Inc.	MP-7500
Anti-rabbit CY3	1:100 IF	Chemicon	AP132C
Biotin Anti- rabbit	1:500	Jackson ImmunoResearch	111-035-144

Tab. 2: anticorpi secondari utilizzati e loro rispettive diluizioni.

Sono stati infine eseguiti 3 lavaggi con PBS, dopodiché i preparati per l'immunocitochimica sono stati trattati con DAB preparata al momento. 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. I preparati per immunofluorescenza, invece, dopo i lavaggi in PBS sono stati sottoposti a colorazione dei nuclei con DAPI. Una volta montati i vetrini con glicerolo (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza.

3.5. SAGGIO DI ANGIOGENESI IN VITRO

Per valutare la capacità delle HSVEC di auto-organizzarsi a formare strutture capillaro-simili, le cellule sono state seminate su matrigel (Matrigel™ Basement Membrane Matrix, Becton-Dickinson Labware, Bedford, MA), estratto solubile di membrana basale di tumore di Engelbreth-Holm-Swarm che gelificando a temperatura ambiente riproduce una condizione simile alla presenza di membrana basale. A tal fine, viene lasciato a 4°C la notte prima dell'utilizzo e, una volta distribuito su una piastra a 24 pozzetti (50µl), viene posto 30 minuti in incubatore a 37°C per gelificare. Le cellule possono quindi essere seminate ($2,5 \times 10^4$ cellule per cm^2) con terreno basale EBM2 (PBI International, Milano, Italia) senza fattori di crescita, in presenza di 1% di antibiotico-antimicotico e 2% di siero bovino fetale (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Sono stati inoltre fatti i seguenti trattamenti: VEGF₁₂₁ (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e FGF-2 (Preprotech, London, UK), come controlli positivi, AM e IMD (da 10^{-12} a 10^{-6} M) (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA).

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 (LEICA DM-IRE2, Milano, Italia). 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) mediante un apposito programma che consente di studiare la rete capillaro-simile formata dalle cellule (Guidolin et al., *Microvasc Res*, 2004). Per l'analisi è stato utilizzato il software per l'analisi di immagine QWin (Leica Microsystems, Cambridge,UK).

3.6. INIBIZIONE DI VEGFR-2

La proliferazione cellulare e il saggio di angiogenesi in vitro sono stati eseguiti anche in presenza di inibitori specifici del VEGFR-2, V1 e SU5416. V1 è un eptapeptide (ATWLPPR) che si lega con alta affinità ($IC_{50}= 80 \mu M$) al VEGFR-2 e blocca la sua interazione con il VEGF. E' stato usato alla concentrazione di 200 μM , ed è stato dimostrato che a tale concentrazione inibisce sia la proliferazione delle HUVEC, che l'attività angiogenica indotte da VEGF (Binètruy-Tournaire et al., *EMBO J*, 2000). SU5416 è un inibitore selettivo ($IC_{50}= 0.16 \mu M$) dell'attività tirosin chinasi del recettore VEGFR-2. (Fong et al., *Cancer Res*, 1999) E' stato somministrato alle cellule alla concentrazione di 0.4 μM .

3.7. SILENZIAMENTO GENICO

La sotto-regolazione di RAMP2 e VEGF nelle HSVEC è stata ottenuta (Albertin et al., *Int J Mol Med*, 2006) mediante transfezione con short interfering RNA (siRNA). Per la transfezione delle cellule è stato utilizzato l'*Arrest-InTM Transfection Reagent for shRNA o siRNA* (Open Biosystems, Celbio, Milano, Italia). 1 μl di reagente di transfezione *Arrest-InTM* (per piastra da 24) è stato diluito in terreno senza siero, quindi dopo 10 minuti, sono stati aggiunti i siRNA diluiti in terreno senza siero in un volume complessivo di 50 μl , lasciato infine 10 minuti a temperatura ambiente. Le concentrazioni di ogni siRNA utilizzato è stata di 10 nM. 5×10^4 cellule/pozzetto nella piastra da 24 pozzetti sono state preparate per le reazioni di silenziamento genico. Per ogni reazione sono stati allestiti dei pozzetti "controllo" (aggiunta di agente transfettante privo di siRNA) e pozzetti "transfettati" con la sequenza silenziante (siRNA GAPDH, siRNA VEGF, siRNA RAMP2). I complessi siRNA/*Arrest-InTM* sono stati introdotti nelle piastre al momento della semina delle cellule e il volume finale in ogni pozzetto è stato di 300 μl . Dopo 4 ore è stato aggiunto del nuovo terreno completo per un volume totale di 500 μl e il giorno successivo si è cambiato il terreno. La durata dell'esperimento è stata di 48 ore, trascorse le quali le cellule sono state utilizzate per la valutazione dell'mRNA mediante RT-PCR o per test su matrigel.

3.8. REAL-TIME PCR

Per individuare l'espressione dell'mRNA per VEGF, VEGFRs, RAMP2 e i cambiamenti che avvengono nelle diverse condizioni sperimentali, le HSVEC vengono raccolte, l'RNA totale viene estratto, purificato

mediante un kit di estrazione dell'RNA (SV Total RNA Isolation System, Promega Corporation, Madison, WI), quantificato mediante lettura allo spettrofotometro e infine trascritto in cDNA (Albertin et al., Int J Mol Med, 2005). Le reazioni di RT-PCR sono state tutte effettuate mediante l'impiego dell'ICycler IQ (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Per la retrotrascrizione è stata utilizzata una quantità di RNA totale compresa tra 0,3 e 0,7 µg. Il programma di PCR prevede uno step di denaturazione a 95°C per 3 min, 40 cicli di due step di amplificazione (95° per 15 sec e l'estensione di annealing a 60°C per 30 sec) e una melt curve (60-90°C con un aumento di 0,5°C ogni 10 sec). Per determinare l'espressione genica di AM è stato applicato lo stesso protocollo eccetto per la melting curve, dato che è stata utilizzata una sonda TaqMan. I primers e la sonda utilizzati sono riportati nella tabella 3.

SEQUENCE NAME	PRIMERS	BP	ACC. NUMBER
HGAPD-F-1-5'	5'-CTC-TCT-GCT-CCT-CCT-GTT-CGA-C-3'	69	NM_002046.3
HGAPD-R-69-3'	5'-TGA-GCG-ATG-TGG-CTC-GGC-T-3'		
HVEGF-F-1075-5'	5'-GCC-TTG-CTG-CTC-TAC-CTC-CAC-3'	73	NM_001025368
HVEGF-R-1147-3'	5'-GAT-TCT-GCC-CTC-CTC-CTT-CTG-C-3'		
HFLT1-2491-5	5'-GTT-CAA-GGA-ACC-TCG-GAC-AA-3'	192	NM_002019
HFLT1-2683-5	5'-GCT-CAC-ACT-GCT-CAT-CCA-AA-3'		
HKDR-2527	5'-GTT-CTT-GGC-TGT-GCA-AAA-GT-3'	43	NM_002253.1
HKDR-2699	5'-GTC-TTC-AGT-TCC-CCT-CCA-TT-3'		
HRAMP2-F-75pb	5'-CTG-CTG-GGC-GCT-GTC-CTG-AA-3'	75	NM_005854.1
HRAMP2-R-75pb	3'-TTC-TGA-CCC-TGG-TGT-GCC-TGT-G-3'		
HADM-F-189-5'	5'-GGG-TTC-GCT-CGC-CTT-CTT-A-3'	107	NM_001124.1
HADM-pr-218	5'-CCG-CTC-GGT-TGG-ATG-TCG-CGT-CGG-A-3'		
HADM-R-295-3'	5'-GCA-GTT-CCC-TCT-TCC-CAC-GA-3'		

Tab. 3: Primers e sonda utilizzati.

Mediante analisi delle curve di amplificazione è possibile effettuare una misurazione dell'espressione relativa e precisamente: 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 (ovvero il 'ciclo soglia', Ct). I valori di Ct diminuiscono in modo lineare all'aumentare della quantità di mRNA target e vengono quindi usati per calcolare l'espressione relativa dell'mRNA. Questa è stata stimata utilizzando il modello matematico di quantificazione proposto da Pfaffl (Pfaffl, Nucleic Acid Res, 2001). Secondo questo metodo, la variazione indotta dall'mRNA specifico nell'espressione dell'mRNA rispetto a campioni di controllo non stimolati, viene espressa in termini di 'fattore di regolazione' per il gene analizzato (Pfaffl et al., Nucleic Acid Res, 2002). Quando il gene è sotto o sovra regolato come avviene in conseguenza ad uno stimolo applicato, questo parametro è rispettivamente minore o maggiore a 1.0. Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio e l'espressione di GAPDH è stata utilizzata come riferimento per normalizzare i dati. La specificità dell'amplificazione viene testata alla fine di ogni RT-PCR attraverso l'analisi della curva di melting, usando I-Cycler software 3.0.

3.9. WESTERN BLOTTING

L'analisi del western blotting è stata utilizzata per valutare i livelli proteici della forma fosforilata del VEGFR-2 in seguito a trattamenti con AM (10^{-8} M per 2 minuti) e IMD (10^{-6} M per 2 minuti) utilizzando un anticorpo anti-tirosina fosforilata (Phosphotyrosine, Upstate, Millipore). Per stimare i livelli di VEGFR-2 e Pecam-1 totali sono stati utilizzati anticorpi anti-KDR/Flk-1 (05-554 Upstate) e anti-Pecam-1 (H-300 sc8306, Santa Cruz Biotechnology Inc.) rispettivamente. 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 e un inibitore di proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis,MO). Dopo aver lisato le cellule utilizzando un raschietto sono state raccolte e sono state centrifugate a 13000 rpm per 10 min. e il surnatante raccolto è stato sottoposto a quantificazione utilizzando QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis,MO). Le proteine sono state quindi caricate su SDS-PAGE al 7.5% e trasferite su una membrana di nitrocellulosa con porosità $0.2 \mu\text{m}$ (GE Healthcare, Amersham Bioscience, Milan, Italy). Per poter riconoscere il peso molecolare delle proteine è stato utilizzato un marker di peso molecolare (10-250 KDa, Bio-Rad Laboratories). Dopo aver messo una soluzione di latte in polvere al 5% in PBS e Tween 20 allo 0.1% per il blocco dei siti aspecifici, la membrana di nitrocellulosa è stata incubata con l'anticorpo primario O/N a 4°C . Poi si è proceduto con l'incubazione dell'anticorpo secondario Polyclonal Rabbit Anti-Mouse HRP (Dako, P0260) o Goat Anti-Rabbit IgG HRP (Millipore, AP132P) e il segnale è stato rivelato con Enhanced Chemiluminescence Kit (ECL Plus Kit, GE Healthcare Amersham Bioscience, Milan, Italy).

3.10. 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 e della proliferazione cellulare sono stati analizzati con l'analisi della varianza (ANOVA) software GraphPad PRISM (versione 3.03; GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

4.1. FENOTIPO E PREPARAZIONE DELLE CELLULE

Le analisi di immunocitochimica mostrano che le cellule immunoseparate con Dynabeads M-450 rivestite di anti-CD31 sono endoteliali, in quanto più del 95% esprimono il fattore di von Willebrand (Fig. 1A) Per di più non è stata determinata nessuna espressione di α actina nella popolazione cellulare. Inoltre le cellule isolate esibiscono una significativa espressione del recettore AM1 (indicato dalla presenza di CRLR e RAMP2), di VEGF, di VEGFR-1 e di VEGFR-2. La presenza di questi marker è stata sempre confermata da RT-PCR e curve di melting rappresentative sono riportate in Fig. 1 insieme alle illustrazioni che mostrano l'immunoreattività per le proteine corrispondenti. Come illustrato le HSVEC esibiscono anche una significativa espressione di AM.

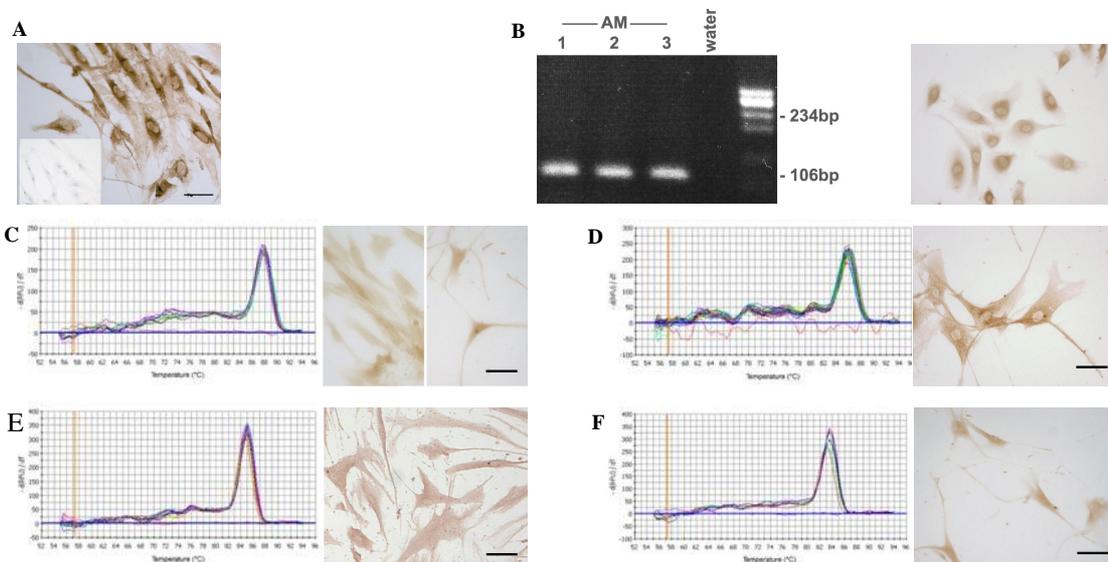


Fig. 1: Espressioni di marker su HSVEC. A) Immunocitochimica del fattore di Von Willebrand. Nell'angolo a sinistra vi è la colorazione aspecifica ottenuta omettendo l'anticorpo primario; è possibile individuare le cellule in quanto è stata fatta la colorazione dei nuclei con ematosilina. B) Gel di agarosio 1.5% in presenza di etidio bromuro che rappresenta l'espressione di AM umana ottenuta mediante RT-PCR con primers specifici dopo l'estrazione di RNA da HSVEC (figura a sinistra). A destra è rappresentata l'immunocitochimica del peptide AM in HSVEC. C) A sinistra vi è la curva di melting con lo specifico singolo picco che dimostra la presenza di RAMP2 nell'mRNA di HSVEC, inoltre vi è la dimostrazione immunocitochimica della presenza di RAMP2 e CRLR nelle cellule. D-F) Curva di melting che indica l'espressione dell'mRNA di VEGF, VEGFR-2, VEGFR-1 e relativa dimostrazione immunocitochimica delle corrispondenti proteine. Scala: 50 μ m.

4.2. VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI AM NEI SAGGI DI ANGIOGENESI IN VITRO

Fig. 2A mostra l'effetto della somministrazione di crescenti concentrazioni di AM sulla proliferazione cellulare e indica un significativo effetto stimolatorio a partire dalla dose di 10^{-8} M. I risultati dei saggi eseguiti trattando le cellule con AM 10^{-8} M sono riassunti in fig. 2B. Il peptide aumenta in modo significativo la proliferazione di HSVEC, portando a un incremento del 100% del grado di incorporazione di BrdU, un effetto comparabile a quello osservato con FGF-2 o VEGF.

Dopo aver seminato le cellule su Matrigel, le HSVEC si estendono e si auto-organizzano a formare tubuli con giunzioni multicentriche che danno luogo in 18 ore a una rete di strutture capillaro-simili. (Fig. 3A) Quando il terreno di coltura veniva miscelato con AM, FGF-2 o VEGF è stato osservato un maggiore effetto

morfofenico, con la formazione di una rete di maggior densità (vedi Fig. 3B e C). L'analisi di immagine (Fig. 4A) conferma queste osservazioni, mostrando come AM, alla dose di 10^{-8} M, aumenti significativamente sia l'estensione (l'area percentuale ricoperta dalle HSVEC e la lunghezza totale dei tubuli per campo) che i parametri topologici (numero di maglie e punti di ramificazione per campo) della rete cellulare. L'effetto di AM 10^{-8} M risulta essere comparabile con quello ottenuto con 50 ng/mL di FGF-2 e VEGF. (Fig. 4B) Come mostrato in fig. 2C e 4C quando i test sono stati eseguiti utilizzando HSVEC in cui RAMP2 era stato soppresso attraverso silenziamento genico (l'inibizione di RAMP2 risulta essere maggiore del 70%) l'azione proliferativa e morfogenica dell'FGF-2 e del VEGF non venivano alterate ma l'effetto di AM non è più stato possibile osservarlo, ad indicare che esso è mediato dal legame di AM con il suo recettore.

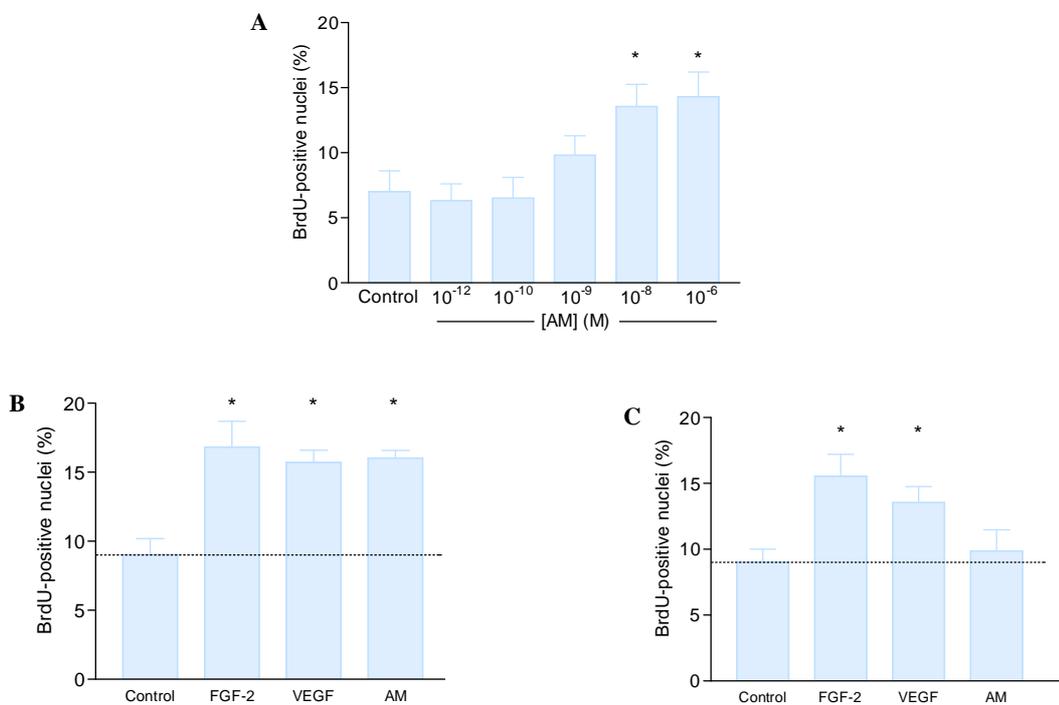


Fig. 2 : Effetto di AM, FGF-2, VEGF sulla proliferazione di HSVEC. A) Effetto sulla proliferazione di HSVEC aumentando la somministrazione della concentrazione di AM. E' stato osservato un significativo effetto stimolatorio dalla dose di 10^{-8} M. B) In cellule normali il trattamento con AM 10^{-8} M induce un incremento della proliferazione di circa il 100%, comparabile a quella ottenuta con FGF-2 e VEGF. C) Quando l'espressione di RAMP2 nelle cellule è stata soppressa mediante silenziamento genico l'effetto di AM 10^{-8} M sulla proliferazione cellulare non è più osservabile, indicando che è mediato dal recettore AMI. Viceversa l'azione proliferativa di FGF-2 o di VEGF non è stata alterata in queste condizioni sperimentali. * $p < 0.05$ vs. il gruppo di controllo.



Fig. 3: Immagini in contrasto di fase di strutture tubulari capillaro-simile di HSVEC in coltura su Matrigel per 18h. A) Cellule di controllo; B) Cellule con FGF-2 50 ng/mL; C) cellule con AM 10^{-8} M. In B e C si può osservare un incremento di densità e di complessità della rete.

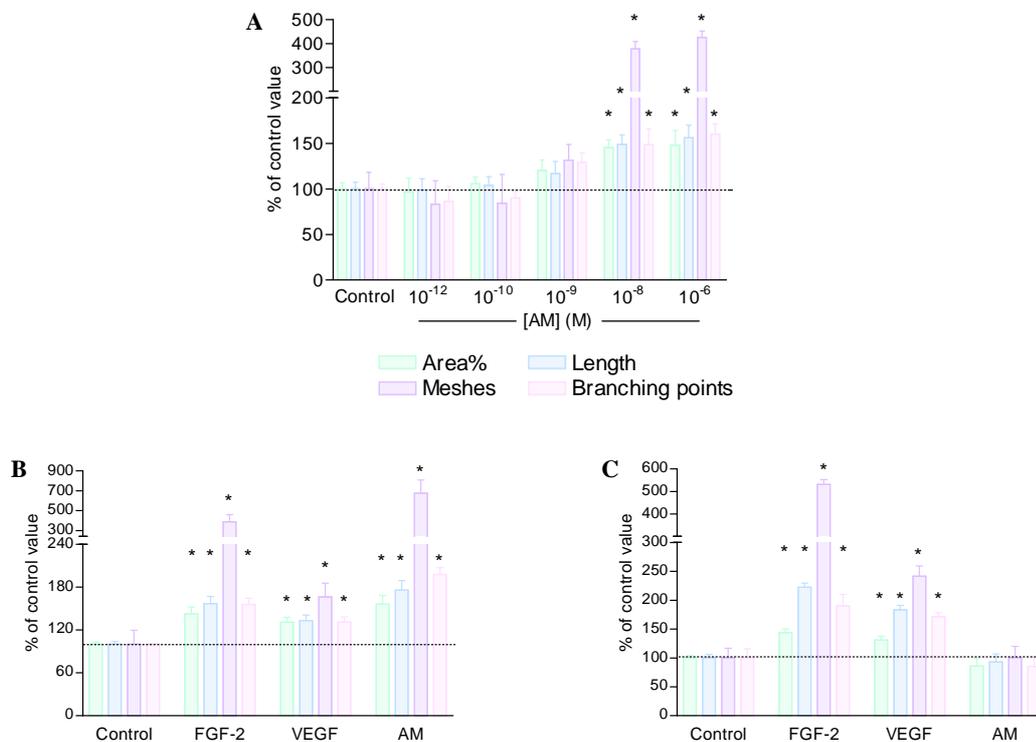


Fig. 4 : Analisi morfometrica dell'effetto di AM, FGF-2, VEGF su strutture formate da HSVEC su Matrigel. A) Dose-risposta di AM su HSVEC; un significativo incremento complessivo dei parametri alla dose di 10^{-8} M. B) In cellule normali, AM 10^{-8} M (come FGF-2 e VEGF) incrementa significativamente i parametri topologici (numero di maglie e ramificazioni) e dimensionali (area percentuale coperta da HSVEC e totale lunghezza delle maglie per campo). C) Quando l'espressione di RAMP-2 nelle cellule viene soppressa, AM 10^{-8} M non permette più la formazione di strutture capillaro-simili.

4.3. EFFETTI DI AM SULL'ESPRESSIONE DI VEGF E VEGFR

Per determinare se l'azione pro-angiogenica di AM sulle HSVEC fosse collegata ad un incremento della produzione di VEGF o dell'espressione del VEGFR, è stato esaminato l'effetto di AM sull'espressione dell'mRNA del VEGF, VEGFR1 e VEGFR2. (Tab. 1) Non ci sono significativi cambiamenti dell'espressione dell'mRNA per questi marker che sono stati determinati attraverso RT-PCR nelle HSVEC dopo stimolazione con AM. Inoltre le analisi di immunocitochimica confermano i risultati, nessuna differenza nella colorazione è stata riscontrata se comparata ai campioni di controllo non stimolati.

	VEGF	VEGFR2	VEGFR1
Fattore di regolazione (media \pm SEM, n = 9)	0.997 \pm 0.128	0.876 \pm 0.133	1.100 \pm 0.073
P (one-sample t-test)	0.982	0.378	0.208

Tab. 1: RT-PCR semiquantitativa dell'effetto di AM sull'espressione relativa

4.4. L'EFFETTO DI AM NON VIENE INIBITO DAL SILENZIAMENTO GENICO DEL VEGF O DALL'ANTAGONISTA DEL VEGFR2

Per determinare se l'azione di AM necessita della presenza del segnale da VEGF, i saggi di angiogenesi in vitro e di proliferazione cellulare sono stati eseguiti su HSVEC in cui VEGF è stato soppresso attraverso il silenziamento genico (l'inibizione del VEGF risulta essere maggiore del 60%). L'azione pro-angiogenica di AM non viene significativamente ridotta dal silenziamento del VEGF (Fig. 6A). Il risultato viene confermato dagli esperimenti effettuati in presenza dell'inibitore V1, il quale agisce come antagonista del VEGFR2, bloccando le interazioni del VEGF con il suo recettore. I risultati illustrati in Fig. 6B mostrano che l'inibitore non riesce a bloccare la formazione di tubuli e la proliferazione cellulare indotti da AM.

4.5. L'EFFETTO DI AM PUÒ ESSERE INIBITO BLOCCANDO L'ATTIVITÀ TIROSIN CHINASICA DEL VEGFR2

In Fig. 6C sono illustrati i risultati dei saggi di angiogenesi e di proliferazione in vitro effettuati in presenza di SU5416, che inibisce selettivamente l'attività tirosin chinasi del VEGFR2. Come mostrato, in queste condizioni l'effetto di AM risulta soppresso e nessuna differenza significativa è stata osservata tra HSVEC trattate con AM e i campioni di controllo non stimolati, sia nel test di proliferazione cellulare che nel test su matrigel. Viceversa, le azioni morfogenetiche e proliferative dell'FGF-2 non venivano alterate. Come riportato in Fig.5, tali risultati non erano associati a variazioni dell'espressione proteica di VEGFR2 in seguito a trattamento con SU5416.

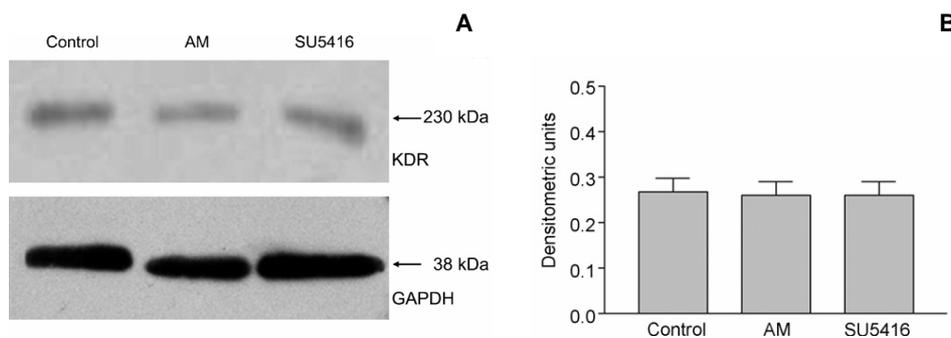


Fig. 5: A) Espressione proteica mediante western blot di VEGFR2 e del gene housekeeping GAPDH su cellule HSVEC trattate con AM 10^{-8} M o con SU5416 0,4 μ m. B) Le bande sono state quantificate mediante densitometria e i dati sono espressi come rapporto tra VEGF-2 e GAPDH. Non vi è alcun cambiamento nell'espressione di VEGFR2 in seguito ai trattamenti con AM e SU5416.

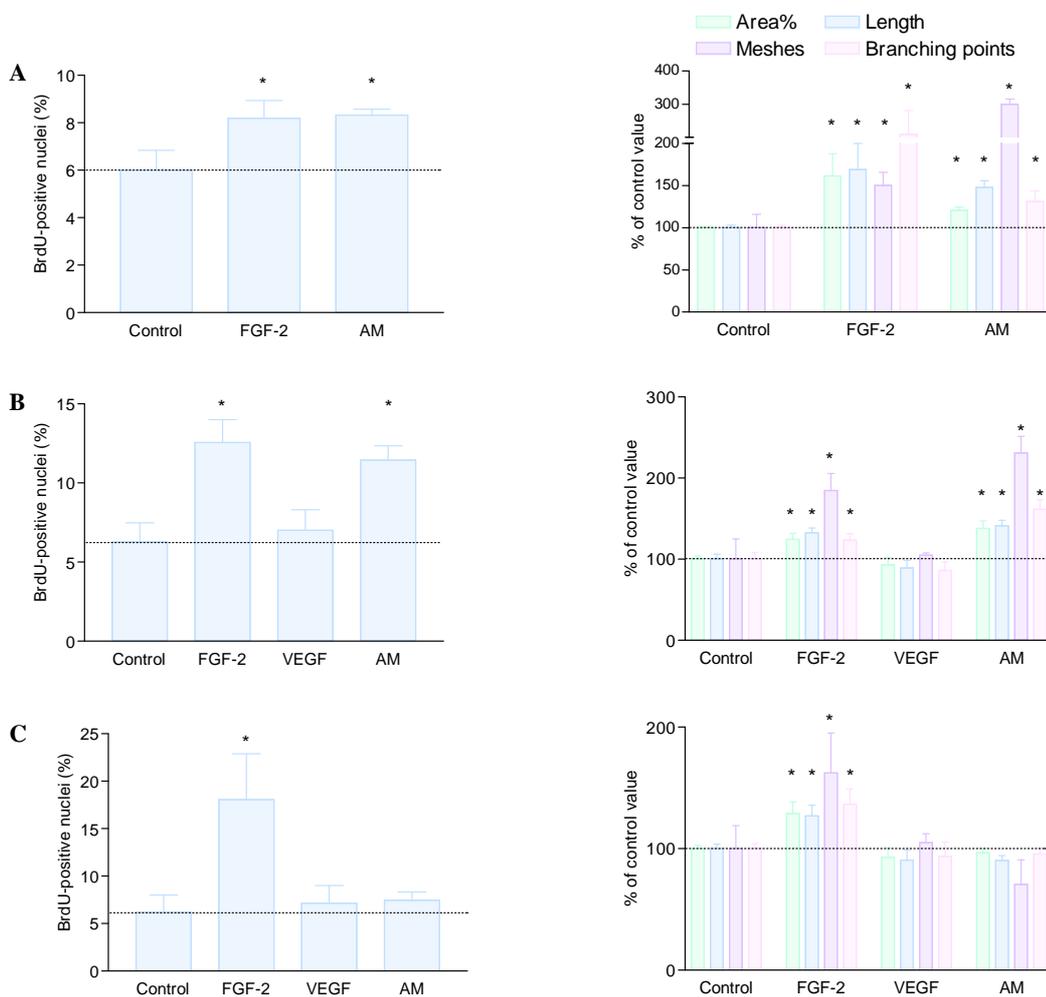


Fig. 6: Effetto di AM 10^{-8} M sulla proliferazione (parte a sinistra) e sull'auto-organizzazione (parte destra) di HSVEC seguendo differenti protocolli di inibizione del segnale del VEGF. A) Nelle HSVEC in cui l'espressione del VEGF è sottoregolata mediante silenziamento genico si può osservare un significativo effetto proliferativo e morfogenico di AM su colture di HSVEC. B) Stimolando con AM non è evidente alcun cambiamento nella proliferazione cellulare e nel Matrigel in presenza dell'inibitore del VEGFR-2 V1, il quale agisce come un antagonista del VEGFR-2, bloccando le interazioni del VEGF con il suo recettore. Viceversa, in queste condizioni sperimentali l'effetto del VEGF risulta inibito come previsto. C) In presenza dell'inibitore del VEGFR-2 SU5416, il quale blocca l'attività tirosin chinasi del VEGFR-2, non solo viene bloccato l'effetto del VEGF, ma anche l'azione di AM sulla proliferazione e l'auto-organizzazione. Come mostrato, FGF-2 in tutte queste condizioni sperimentali rimane attivo. * $p < 0.05$ vs. il gruppo di controllo.

4.6. FOSFORILAZIONE DEL RECETTORE VEGFR2 IN SEGUITO A STIMOLAZIONE CON AM

In seguito alla stimolazione delle HSVEC con AM (10^{-8} M) per due minuti è stata osservata effettuando immunocitochimica, immunofluorescenza e western blotting, la fosforilazione del recettore del VEGFR2 ed in particolare la fosforilazione di due tirosine, Tyr 951 e Tyr 1175. In Fig. 7 sono illustrate i risultati dell'immunofluorescenza e del western blotting effettuati in presenza di VEGF (50 μ g/ml) e di AM (10^{-8} M). Ne risulta che AM è in grado, come fa il VEGF, di fosforilare il VEGFR2.

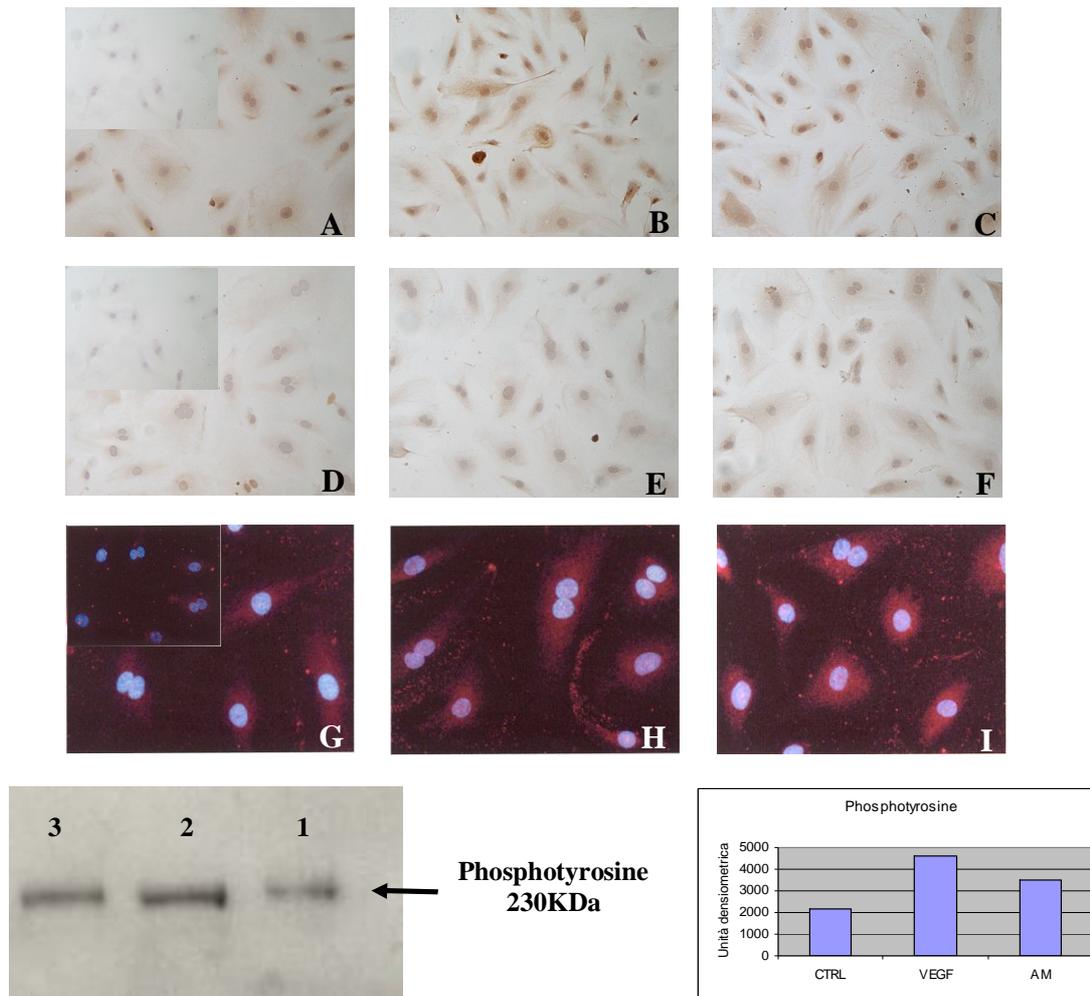


Fig. 7: Immunocitochimica A: Ctrl e Cn Tyr 951; B: VEGF (50 μ g/ml per 2 minuti) Tyr 951; C: AM (10^{-8} M per 2 minuti) Tyr 951; D: Ctrl e Cn Tyr 1175; E: VEGF (50 μ g/ml per 2 minuti) Tyr 1175; F: AM (10^{-8} M per 2 minuti) Tyr 1175; Immunofluorescenza G: Ctrl e Cn Tyr 1175; H: VEGF (50 μ g/ml per 2 minuti) Tyr 1175; I: AM (10^{-8} M per 2 minuti) Tyr 1175; L: Western blotting per Phosphotirosine, 1:Ctrl; 2: VEGF (50 μ g/ml per 2 minuti); 3: AM (10^{-8} M per 2 minuti).

4.7. STIMOLAZIONE DEI COMPLESSI RECETTORIALI CRLR/RAMP CON UN DIVERSO AGONISTA: EFFETTI INDOTTI DA IMD

IMD e AM sono entrambi peptidi appartenenti alla famiglia del calcitonin gene-related peptide (CGRP), che agiscono mediante i recettori derivati dalla dimerizzazione di calcitonin receptor-like receptor (CRLR) con receptor modifying proteins (RAMP). Anche per l'intermedina (IMD) sono stati effettuati svariati saggi di angiogenesi *in vitro*. In fig. 8A è riportata la dose-risposta a IMD osservata nel test su matrigel, in cui si può vedere che l'effetto massimo di IMD si ha ad una concentrazione di 10^{-6} M. Come illustrato in Fig.8B l'effetto pro-angiogenico di 10^{-6} M IMD non è più osservabile su cellule sottoposte a silenziamento del recettore CRLR. In fig. 9 si può invece osservare che IMD (alla concentrazione di 10^{-6} M per 2 minuti), così come AM e VEGF, è in grado di fosforilare il recettore VEGFR-2 del VEGF. Ciò suggerisce che entrambi i peptidi siano in grado di indurre un effetto pro-angiogenico in cellule endoteliali umane, sfruttando l'attività tirosin chinasi del VEGFR-2.

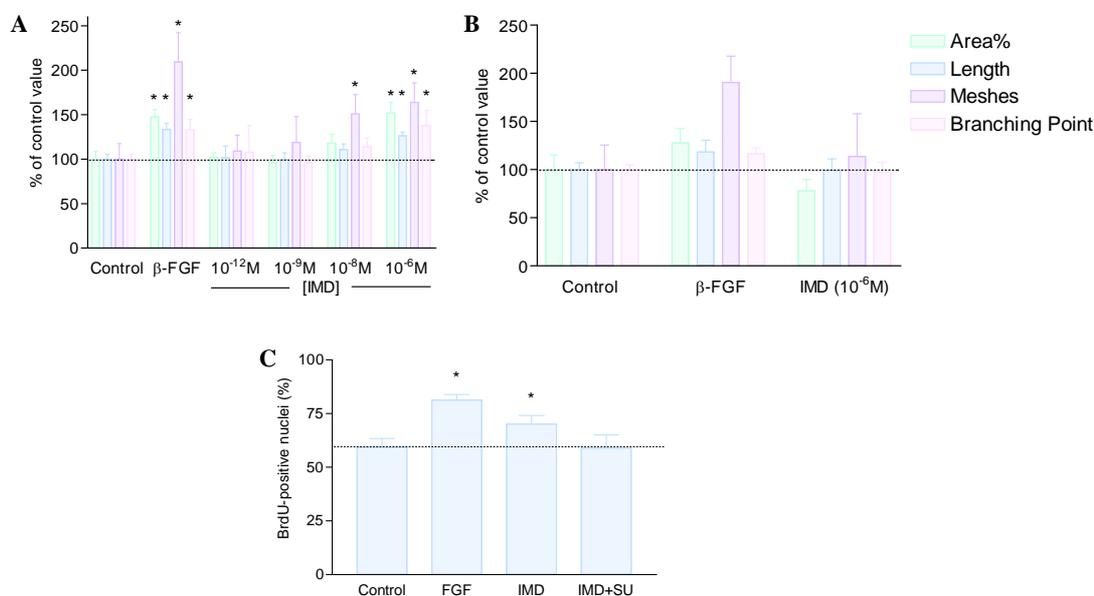


Fig. 8: Analisi morfometrica dell'effetto di IMD, β -FGF su strutture formate da HSVEC su Matrigel. A) Dose-risposta di IMD su HSVEC; si può osservare un significativo incremento complessivo dei parametri dalla dose di 10^{-6} M. B) Quando l'espressione di CRLR nelle cellule viene soppressa, l'effetto di IMD 10^{-6} M non permette la formazione di strutture capillaro-simili. C) In presenza dell'inibitore del VEGFR-2 SU5416, il quale blocca l'attività tirosin chinasi del VEGFR-2, si ottiene anche una inibizione dell'azione di IMD sulla proliferazione e l'auto-organizzazione. Come mostrato, FGF-2 in tutte queste condizioni sperimentali rimane attivo. * $p < 0.05$ vs. il gruppo di controllo.

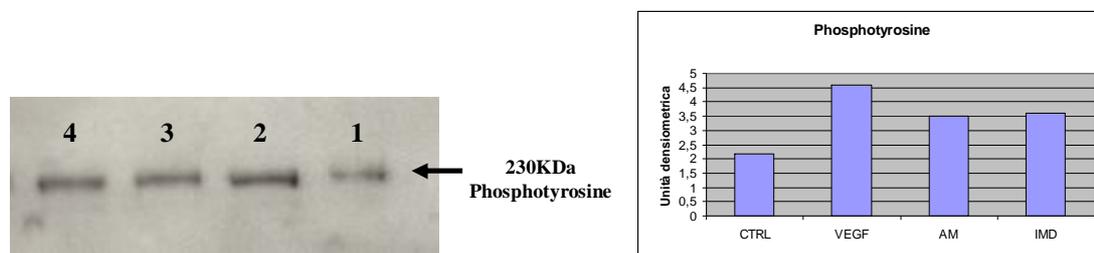


Fig. 9: Rappresentazione della capacità di VEGF $50\mu\text{g/ml}$, AM 10^{-8} M, IMD 10^{-6} M di fosforilare il recettore del VEGF, VEGFR2 stimolando le HSVEC per 2 minuti.

L'angiogenesi, ovvero il processo che induce la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vascolatura già esistente, è regolata da numerosi fattori. Recentemente (Ribatti et al., *Pharmacol Rev* 2007) questi sono stati suddivisi in due grandi categorie: la prima comprende i cosiddetti "fattori classici" (quali VEGF, FGF-2, TGF, le angiopoietine, PDGF, trombospondina-1 e angiostatina), dei quali è nota da tempo la primaria funzione di regolazione del processo angiogenico, mentre la seconda include i cosiddetti "fattori non classici" dell'angiogenesi (come angiotensina, endotelina, eritropoietina, VIP, adrenomedullina e intermedina). I fattori non classici dell'angiogenesi sono dei peptidi endogeni che, tra le altre funzioni, si sono dimostrati svolgere un ruolo di modulazione del processo angiogenico sia in condizioni fisiologiche sia in condizioni patologiche. In questo senso, un notevole numero di evidenze sono state ottenute in questi ultimi anni relativamente al peptide adrenomedullina (Ribatti et al., *Peptides* 2005; Ribatti et al., *Pharmacol Rev* 2007; Nikitenko et al., *Trends Pharmacol Sci* 2002; Nikitenko et al., *Br J Cancer* 2006; Nagaya et al., *Am J Physiol* 2005). Questo peptide, infatti, gioca un importante ruolo durante lo sviluppo del sistema vascolare, come dimostrato da Shindo et al. (Shindo et al., *Circulation* 2001) dal cui studio, effettuato su topi privati del gene che codifica AM, è emerso che i topi omozigoti (AM^{-/-}) morivano in utero al quattordicesimo giorno di gestazione per gravi anomalie vascolari a carico della placenta. Alti livelli di AM sono stati rilevati anche in associazione con processi di angiogenesi patologica come l'angiogenesi tumorale. Vari tessuti neoplastici (carcinoma polmonare, atrocioma, glioblastoma, feocromocitoma, aldosteronoma, adenocarcinoma) esprimono infatti significative quantità di AM (Belloni et al., *Histol Histopathol* 2001) e sono allo stesso tempo caratterizzati da un'intensa vascolarizzazione. (Oheler et al., *Br J Cancer* 2003). L'utilizzo di modelli sperimentali *in vivo* (come la membrana corioallantoidea di pollo) ha ulteriormente confermato la capacità di AM di favorire l'angiogenesi e studi *in vitro* mirati all'analisi dei meccanismi attraverso cui AM esercita la sua azione pro-angiogenica hanno ben documentato come essa agisca a livello delle cellule endoteliali, stimolando risposte cellulari importanti al fine del processo angiogenico. Studi *in vitro* su cellule vascolari endoteliali specializzate, come le HUVEC o in linee microvascolari di cellule endoteliali immortalizzate hanno dimostrato la capacità di AM di stimolare la migrazione delle cellule (Schwarz et al., *J Endocrinol* 2006) e anche il loro differenziarsi e autorganizzarsi a formare strutture capillaro-simili (Albertin et al., *Int J Mol Med* 2006, Fernandez-Sauze et al., *Int J Cancer* 2004, Ribatti et al., *Oncogene* 2003). Tale effetto è risultato specifico e mediato principalmente dal legame di AM con il suo recettore AM1.

I dati ottenuti nel presente studio, confermano e ampliano queste evidenze. Si è infatti osservato come il trattamento per 18h con AM (10^{-8} M) induca un fenotipo pro-angiogenico in cellule endoteliali isolate direttamente da vasi adulti umani normali di origine sia arteriosa che venosa. In particolare, il trattamento con AM è stato in grado di stimolare in tali cellule due processi rilevanti al fine dell'angiogenesi: l'incremento della proliferazione cellulare (evento precoce nel processo angiogenico) e la differenziazione e

l'auto organizzazione delle cellule in strutture capillaro-simili (evento più tardivo nel corso dell'angiogenesi). L'attività di AM è risultata inoltre specificatamente innescata dal legame di AM con il suo recettore AM1, in quanto inibendo l'espressione di RAMP2 (e di conseguenza del recettore AM1) mediante transfezione con short interfering RNA l'attività di AM viene meno. L'effetto di AM risulta essere massimo alla concentrazione di 10^{-8} M, un valore maggiore rispetto al livello di AM dovuto alla secrezione basale delle cellule, come dimostrato da dati di radioimmunoassay (RIA) (Michibata et al., *Kidney Int* 1998; Pearson et al., *J Endocrinol* 2006). Va osservato, tuttavia, che specifiche condizioni patologiche, come ad esempio l'ipossia, stimolano la sintesi e la secrezione di AM, comportando un forte incremento della concentrazione del peptide nel microambiente cellulare (Garayoa et al., *Mol Endocrinol* 2000; Nakayama et al., *Peptides* 1999; Nakayama et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 1998).

Come indicato da vari studi (Ribatti et al., *Leukemia* 2007; Sporn et al., *Nature* 1988) la natura delle risposte indotte da un determinato fattore angiogenico è contestuale, ovvero dipende dalla presenza o dall'assenza di altre molecole regolatorie nell'ambiente delle cellule. In questo senso, va osservato che nei modelli in vitro usati nel presente studio AM agisce sinergicamente con VEGF, il quale risulta ben espresso con i suoi recettori dalle cellule endoteliali in coltura. E' noto che il VEGF è anche attivamente secreto dalle cellule in coltura (Fernandez-Sauze et al., *Int J Cancer* 2004) e sembra essere il principale fattore chemotattico che comporta l'elongazione delle EC, l'auto-organizzazione e la formazione di reti strutture capillaro-simile *in vitro* (Guidolin et al., *Leukemia* 2007; Helmlinger et al., *Nature* 2000; Merks et al., *Dev Biol* 2006; Guidolin et al., *Dev.Dyn.*, 2009). I risultati ottenuti nel presente studio indicano che AM non agisce attraverso la sovra-regolazione del VEGF e/o dei suoi recettori, dato che nessun cambiamento nell'espressione di questi marker è stata osservata in seguito alla somministrazione di AM (né attraverso RT-PCR, né mediante immunostochimica o WB). Ad ulteriore conferma di questi dati è stato studiato l'effetto della somministrazione di AM in due differenti condizioni sperimentali: i) nelle cellule in cui la produzione di VEGF è inibita mediante silenziamento genico e ii) in presenza dell'antagonista specifico V1 del VEGFR2 che blocca l'interazione del VEGF con il suo recettore. In entrambi i casi non è stata osservata nessuna significativa riduzione dell'effetto indotto da AM sulla proliferazione cellulare e sulla formazione di tubuli capillaro-simili. Questi risultati sono in accordo con i quelli ottenuti da Fernandez-Sauze (Fernandez-Sauze et al., *Int J Cancer* 2004), in cui si mostra che il trattamento di AM non altera la secrezione del VEGF e che bloccando il VEGF mediante anticorpi anti-VEGF non viene inibita la formazione in vitro da parte di HUVEC di tubuli capillaro-simili dopo trattamento con AM.

Il risultato più importante dello studio qui presentato, tuttavia, è l'osservazione che l'azione pro-angiogenica di AM può essere soppressa dall'inibizione selettiva del VEGFR-2 a livello del dominio tirosin chinasi intra-cellulare e che la somministrazione di AM è in grado di indurre una rapida fosforilazione del recettore-2 di VEGF, in particolare a livello delle tirosine Y1175 e Y951. Questi risultati suggeriscono una visione alternativa dell'interazione tra AM e VEGF, secondo la quale il legame di AM col suo recettore AM1 è in grado di indurre una transattivazione di VEGFR-2 con conseguente avvio della cascata di eventi molecolari sottostanti ad una risposta pro-angiogenica. Il fenomeno per cui recettori accoppiati a proteine G utilizzano

recettori tirosinchinasici quali intermediari per indurre a livello cellulare risposte di tipo trofico (quali proliferazione e differenziamento) è noto da tempo (Luttrell et al., *Science* 1999; Lowes et al., *Neurosignals* 2002) e negli ultimi dieci anni sono stati riportati molti esempi di transattivazione di recettori per fattori di crescita in risposta a segnali da GPCR. Tali esempi comprendono i recettori del platelet-derived growth factor (PDGF) (Linseman et al., *J Biol Chem* 1995), epidermal growth factor (EGF) (Daub et al., *Nature* 1996) e insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Rao et al., *J Biol Chem* 1995). I meccanismi molecolari attraverso cui si realizza tale interazione sembrano essere, tuttavia, vari, complessi e non del tutto chiariti. Essi, infatti, dipendono significativamente dal tipo di recettori coinvolti oltre che dal tipo cellulare che si considera. Il coinvolgimento e l'attivazione di chinasi Src è un tema ricorrente nell'interazione tra GPCR e RTK, come illustrato da Lev et al. (1995) in cellule neuronali, da Daub et al. (1997) e da Gao et al. (2001) in studi sulla transattivazione del recettore per EGF. Sono stati proposti anche altri meccanismi di transattivazione di RTK da parte di GPCR. Prenzel et al. (1999) hanno ad esempio suggerito che la transattivazione di EGFR indotta da vari recettori accoppiati a proteina G (come quelli muscarinici o per l'endotelina) possa coinvolgere l'attivazione di una metalloproteasi ed Eguchi et al. (2001) hanno fornito evidenze dell'importanza di questa via per la transattivazione di EGFR da parte del recettore per angiotensina-II. Al momento, tuttavia, non risultano delineati né i meccanismi attraverso cui venga indotta l'espressione di tale metalloproteasi, né la sua identità. Un ulteriore modello di transattivazione è stato suggerito da Luttrell et al. (1999) in uno studio sui recettori adrenergici β_2 . In tale modello il legame del GPCR con β -arrestina, che interrompe l'accoppiamento alla proteina G, darebbe il via ad una seconda via di trasduzione (basata su complessi contenenti Src attivata) che porterebbe all'attivazione di RTK.

Al di là dei dettagli molecolari attraverso cui si esplica la transattivazione di RTK da parte di GPCR, i risultati ottenuti nel presente studio sembrano comunque indicare che tale paradigma potrebbe essere applicato anche ad AM1 e VEGFR-2. Infatti la stimolazione di AM1 (un GPCR) con due diversi agonisti (AM e IMD) è risultata in entrambi i casi in grado di attivare la via di segnalazione pilotata dal VEGFR-2, non inducendo la produzione e il rilascio secondari di VEGF, bensì già all'inizio della propagazione del segnale (Fuxe et al., *Brain Res Rev* 2007; Lowes et al., *Neurosignals* 2002; Luttrell et al., *Curr Opin Cell Biol* 1999; Marinissen et al., *Trends Pharmacol Sci* 2001) mediante una rapida fosforilazione del recettore tirosin chinasi stesso. Tali risultati trovano ulteriore conferma in dati già pubblicati, i quali dimostrano che l'attività angiogenica di AM è associata, nelle cellule endoteliali, all'attivazione della cascata della mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Kim et al., *FASEB J* 2003; Schwarz et al., *J Endocrinol* 2006) e della Akt (Kim et al., *FASEB J* 2003; Miyashita et al., *FEBS Lett* 2003). Infatti, è stato riportato che entrambi questi eventi possono essere innescati dalla fosforilazione di specifici siti nel dominio tirosin chinasi del VEGFR-2. (Olsson et al., *Nat Rev* 2006)

Una volta transattivato il VEGFR-2 fornirebbe quindi lo scaffold strutturale per l'assemblaggio di complessi di segnalazione del tutto analoghi a quelli che si formano quando il recettore tirosin chinasi incontra il VEGF, suo ligando endogeno (Fig. 1.) con conseguente stimolazione di risposte cellulari di tipo pro-angiogenico.

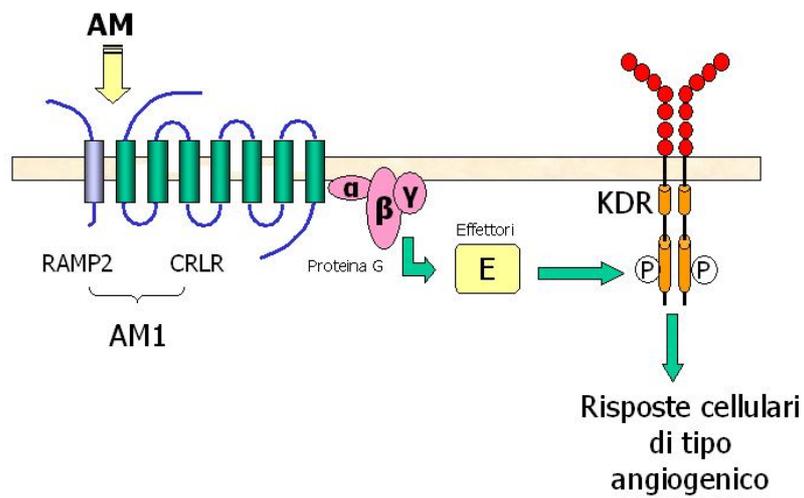


Fig. 1: Transattivazione del recettore del VEGFR2/KDR in risposta all'azione di AM.

I risultati ottenuti, infine, rivestono una potenziale rilevanza anche da un punto di vista clinico e terapeutico. Essi indicano, infatti, che ci potrebbero essere modi alternativi di attivare processi angiogenici anche in assenza del principale regolatore endogeno degli stessi, ovvero di VEGF, suggerendo l'inibizione dei suoi recettori (in particolare VEGFR-2) quale strategia privilegiata di future terapie anti-angiogeniche.

- Aase K, von Euler G, Li X, Pontén A, Thorén P, Cao R, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C, Eriksson U, *Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect*, *Circulation* 2001; 104(3):358-64.
- Agata J, Zhang JJ, Chao J, Chao L, *Adrenomedullin gene delivery inhibits neointima formation in rat artery after balloon angioplasty*, *Regul Pept.* 2003; 112(1-3):115-20.
- Albertin G, Rucinski M, Carraro G, Forneris M, Andreis P, Malendowicz LK, Nussdorfer GG, *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(3):431-5.
- Albertin G, Ruggero M, Guidolin D, Nussdorfer GG, *Gene silencing of human RAMP2 mediated by short-interfering RNA*, *Int J Mol Med.* 2006; 18(4):531-5.
- Albini A, Sporn MB, *The tumour microenvironment as a target for chemoprevention*, *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(2):139-47.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM, *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*, *Science* 1997; 275(5302):964-7.
- Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N, *Angiogenesis assay: a critical overview*, *Clin Chem.* 2003; 49(1):32-40. Review.
- Autelitano DJ, Ridings R, *Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression*, *Peptides* 2001; 22(11):1851-7.
- Bäumer AT, Schumann C, Cremers B, Itter G, Linz W, Jockenhövel F, Böhm M, *Gene expression of adrenomedullin in failing myocardium: comparison to atrial natriuretic peptide*, *J Appl Physiol.* 2002; 92(3):1058-63.
- Belloni AS, Albertin G, Forneris ML, Nussdorfer GG, *Proadrenomedullin-derived peptides as autocrine-paracrine regulators of cell growth*, *Histol Histopathol* 2001; 16(4):1263-74.
- Beltowski J, Jamroz A, *Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery?*, *Pol J Pharmacol.* 2004; 56(1):5-27. Review.
- Benelli R, Albini A, Noonan D, *Neutrophils and angiogenesis: potential initiators of the angiogenic cascade*, *Chem Immunol Allergy.* 2003; 83:167-81.
- Bouis D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GA, *A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention*, *Pharmacol Res.* 2006; 53(2):89-103, Review.

Bunton DC, Petrie MC, Hillier C, Johnston F, McMurray JJ, *The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile?*, Pharmacol Ther. 2004; 103(3):179-201.

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH, *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*, J Cell Mol Med. 2005; 9(4):777-94. Review.

Carmeliet P, *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*, Nature Medicine 2000; 6(4):389-95. Review

Carmeliet P, Rakesh K Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*, Nature 2000; 407:249-57. Review.

Chao J, Kato K, Zhang JJ, Dobrzynski E, Wang C, Agata J, Chao L, *Human adrenomedullin gene delivery protects against cardiovascular remodeling and renal injury*, Peptides 2001 Nov; 22(11):1731-7.

Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N, Sexton PM, *Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins*, J Biol Chem. 2003; 278(5):3293-7. Epub 2002 Nov 21.

Claesson-Welsh L, *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*, Biochemical Society Transaction 2003; 31(Pt 1):20-4.

Clark ER, Clark el, *Growth and behaviour of epidermis as observed microscopically in observation chambers inserted in the ears of rabbits*, Am J Anat. 1953; 93(2):171-219.

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 Investig Med. 2003; 51(4):227-32.

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.

Cottrell GS, Roosterman D, Marvizon JC, Song B, Wick E, Pikiros S, Wong H, Berthelie C, Tang Y, Sternini C, Bunnett NW, Grady EF, *Localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in enteric neurons, dorsal root ganglia, and the spinal cord of the rat*, J Comp Neurol. 2005; 490(3):239-55.

Cueille C, Pidoux E, de Vernejoul MC, Ventura-Clapier R, Garel JM, *Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure*, Biochem Biophys Res Commun. 2002; 294(2):340-6.

Cuttitta F, Pío R, Garayoa M, Zudaire E, Julián M, Elsasser TH, Montuenga LM, Martínez A, *Adrenomedullin functions as an important tumor survival factor in human carcinogenesis*, Microsc Res Tech. 2002; 57(2):110-9. Review.

D'Andrea LD, Del Gatto A, Pedone C, Benedetti E, *Peptide-based molecules in angiogenesis*, Chem Biol Drug Des. 2006; 67(2):115-26. Review.

Daub H, Wallash C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A, *Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor*, EMBO J. 1997; 16:7032-7044.

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A, *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*, Nature 1996; 379(6565):557-60.

De Matteo R, May CN, *Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide*, Br J Pharmacol. 2003; 140(8):1414-20. Epub 2003 Nov 17.

Dimmeler S, Zeiher AM, *Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression*, Circ Res. 2000; 87(6):434-9. Review.

Dvorak HF, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*, J Clin Oncol. 2002; 20(21):4368-80.

Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T, *Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells*, J.Biol.Chem. 2001; 276:7957-7962.

Eipper BA, Perkins SN, Husten EJ, Johnson RC, Keutmann HT, Mains RE, *Peptidyl-alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase. Purification, characterization, and expression*, J Biol Chem. 1991; 266(12):7827-33.

Eto T, *A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides*, Peptides 2001 ; 22(11):1693-711. Review.

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.

Földes G, Suo M, Szokodi I, Lakó-Futó Z, deChâtel R, Vuolteenaho O, Huttunen P, Ruskoaho H, Tóth M, *Factors derived from adrenals are required for activation of cardiac gene expression in angiotensin II-induced hypertension*, Endocrinology 2001; 142(10):4256-63.

Folkman J, and Shing Y, *Angiogenesis*, J Biol Chem. 1992; 267(16):10931-4. Review.

Folkman J, Haudenschild C, *Angiogenesis in vitro*. Nature 1980; 288(5791):551-6.

Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G, *SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase*

catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types, Cancer Res. 1999; 59(1):99-106.

Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Shokoji T, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y, *Roles of adrenomedullin 2 in regulating the cardiovascular and sympathetic nervous systems in conscious rats*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 290(3):H1120-7. Epub 2005 Oct 14.

Fuxe K, Dahlström A, Höistad M, Marcellino D, Jansson A, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Jacobsen K, Tinner-Staines B, Hagman B, Leo G, Staines W, Guidolin D, Kehr J, Genedani S, Belluardo N, Agnati LF, *From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission*, Brain Res Rev. 2007; 55(1):17-54. Review.

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 2003; 5(1-2):21-23.

Gao Y, Tang S, Zhou S, Ware JA, *The thromboxane A2 receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent Gi coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor*, J.Pharmacol.Exp.Ther. 2001; 296:426-433.

Garayoa M, Bodegas E, Cuttitta F, Montuenga LM, *Adrenomedullin in mammalian embryogenesis*, Microsc Res Tech. 2002; 57(1):40-54. Review.

Garayoa M, Martínez A, Lee S, Pío R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga LM, Ryan H, Johnson R, Gassmann M, Cuttitta F, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis*, Mol Endocrinol. 2000; 14(6):848-62.

Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C, *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*, J Cell Biol. 2003; 161(6):1163-77. Epub 2003 Jun 16.

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S, *Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133(+) endothelial precursor cells*, Circ Res. 2001; 88(2):167-74.

Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J, *Endothelial regeneration: studies with human endothelial cells in culture*, Ser Haematol. 1973; 6(4):453-5.

Gramy-Susini B, Varner JA, *Circulating endothelial progenitor cells*, Br J Cancer. 2005; 93(8):855-8.

Guidolin D, Albertin G, Spinazzi R, Sorato E, Mascarin 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: 2013-23.

Guidolin D, Albertin G, Sorato E, Oselladore B, Mascarin A, Ribatti D, *Mathematical modeling of the capillary-like pattern generated by adrenomedullin-treated human vascular endothelial cells in vitro*, *Dev Dyn.* 2009; 238(8):1951-63.

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(10):2201-3.

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):117-24.

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 Mar;67(2):117-24.

Hagiwara M, Bledsoe G, Yang ZR, Smith RS Jr, Chao L, Chao J, *Intermedin ameliorates vascular and renal injury by inhibition of oxidative stress*, *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295(6):F1735-43. Epub 2008 Oct 1.

Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE, *Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues*, *Cell Tissue Res.* 2002; 310(1):41-50. Epub 2002 Aug 28.

Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K, *Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats*, *Stroke* 2005; 36(4):853-8. Epub 2005 Mar 3.

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Aron TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O, *Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface*, *Nat Med.* 2006; 12(9):1065-74. Epub 2006 Aug 6.

Helmlinger G, Endo M, Ferrara N, Hlatky L, Jain RK, *Formation of endothelial cell networks*, *Nature* 2000; 405(6783):139-41.

Heryanto B, Girling JE, Rogers PA, *Intravascular neutrophils partially mediate the endometrial endothelial cell proliferative response to oestrogen in ovariectomised mice*, *Reproduction* 2004; 127(5):613-20.

Hinson JP, Kapas S, Smith DM, *Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide*, *Endocr Rev.* 2000; 21(2):138-67.

Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krüll M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schütte H, Suttrop N, *Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability*, *Circ Res.* 2002; 91(7):618-25.

Hirano S, Imamura T, Matsuo H, Ishiyama Y, Kato J, Kitamura K, et al., *Differential responses of circulating and tissue adrenomedullin and gene expression to volume overload*, *J Card Fail.* 2000; 6:120-9.

Iimuro S, Shindo T, Moriyama N, Amaki T, Niu P, Takeda N, Iwata H, Zhang Y, Ebihara A, Nagai R, *Angiogenic effects of adrenomedullin in ischemia and tumor growth*, *Circ Res.* 2004; 95(4):415-23. Epub 2004 Jul 8.

Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H, *Genomic structure of human adrenomedullin gene*, *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 203(1):631-9.

Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K, *Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia*, *Circulation* 2005; 111(3):356-62. Epub 2005 Jan 17.

Jiang BH and Liu LZ, *PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis*, *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1784: 150-158.

Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC Jr, *Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure*, *Circulation* 1995; 92(3):286-9.

Kalluri R, *Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis*, *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6):422-33.

Kamitani S, Asakawa M, Shimekake Y, Kuwasako K, Nakahara K, Sakata T, *The RAMP2/CRLR complex is a functional adrenomedullin receptor in human endothelial and vascular smooth muscle cells*, *FEBS Lett.* 1999; 448(1):111-4.

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.

Karamysheva AF, *Mechanisms of angiogenesis*, *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73(7):751-62. Review.

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.

Katusic ZS, *Therapeutic angiogenesis: new indication for endothelial NO synthase gene transfer*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(8):1254-5.

Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato ML, Yamasaki M, Ogita T, Nakaoka T, Fujita T, *Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury in mice*, *Circulation* 2004; 109(9):1147-53. Epub 2004 Feb 9.

Kim W, Moon SO, Lee S, Sung MJ, Kim SH, Park SK, *Adrenomedullin reduces VEGF-induced endothelial adhesion molecules and adhesiveness through a phosphatidylinositol 3'-kinase pathway*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(8):1377-83. Epub 2003 Jun 12.

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. Epub 2003 Aug 1.

Kindt F, Wiegand S, Löser C, Nilles M, Niemeier V, Hsu SY, Steinhoff M, Kummer W, Gieler U, Haberberger RV, *Intermedin: a skin peptide that is downregulated in atopic dermatitis*, *J Invest Dermatol.* 2007; 127(3):605-13. Epub 2006 Sep 28.

Kinnunen P, Szokodi I, Nicholls MG, Ruskoaho H, *Impact of NO on ET-1- and AM-induced inotropic responses: potentiation by combined administration*, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279(2):R569-75.

Kitamura et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 1993b Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T, *Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma*, *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 192(2):553-60 B.

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. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Jul 15;202(1):643 A.

Kobayashi K, Kitamura K, Hirayama N, Date H, Kashiwagi T, Ikushima I, Hanada Y, Nagatomo Y, Takenaga M, Ishikawa T, Imamura T, Koiwaya Y, Eto T, *Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction*, *Am Heart J.* 1996; 131(4):676-80.

Kurz H, *Physiology of angiogenesis*, *J Neurooncol.* 2000; 50(1-2):17-35.

Kuwasako K, Cao YN, Nagoshi Y, Tsuruda T, Kitamura K, Eto T, *Characterization of the human calcitonin gene-related peptide receptor subtypes associated with receptor activity-modifying proteins*, *Mol Pharmacol.* 2004; 65(1):207-13.

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. Epub 2007 Mar 8, Review.

Leng T, Miller JM, Bilbao KV, Palanker DV, Huie P, Blumenkranz MS, *The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and stimulation*, Retina 2004; 24(3):427-34.

Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J, *Protein tyrosine kinase PYK2 is involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions*, Nature 1995; 376:737-745.

Liekens S, De Clercq E, Neyts J, *Angiogenesis: regulators and clinical applications*, Biochemical Pharmacology 2001; 61(3):253-70.

Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA, *Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells*, J Biol Chem. 1995; 270(21):12563-8.

López J, Martínez A, *Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin*, Int Rev Cytol. 2002; 221:1-92.

Lowes VL, Ip NY, Wong YH, *Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors*, Neurosignals 2002; 11:5-19.

Luodonpää M, Rysä J, Pikkarainen S, Tenhunen O, Tokola H, Puhakka J, Marttila M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, *Mechanisms regulating adrenomedullin gene expression in the left ventricle: role of mechanical load*, Regul Pept. 2003; 112(1-3):153-9.

Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ, *Regulation of tyrosine kinase cascade by G-protein-coupled receptors*, Curr Opin Cell Biol. 1999; 11:177-183.

Luttrell LM, Ferguson SSG, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F-T, Kawatsu H, Owada K, Luttrell DK, *β -arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor/Src protein kinase complexes*, Science 1999; 283:655-661.

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 Science 1997; 110(Pt18):2293-302.

Marinissen MJ, Gutkind JS, *G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms*, Trends Pharmacol Sci. 2001; 22(7):368-76.

Martínez A, Vos M, Guédez L, Kaur G, Chen Z, Garayoa M, Pío 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.

Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Guanqun X, Ando K, Fujita T, *Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia*, Circulation 2004; 109(18):2246-51. Epub 2004 Apr 19.

Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, Wang L, Wikner C, Qi JH, Wernstedt C, Wu J, Bruheim S, Mugishima H, Mukhopadhyay D, Spurkland A, Claesson-Welsh L, *VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis*, The EMBO Journal 2005; 24(13):2342-53. Epub 2005 Jun 16.

Matsumoto T, Mugishima H, *Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis*, Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 2006; 13(3):130-5.

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.

Merks RM, Brodsky SV, Goligorsky MS, Newman SA, Glazier JA, *Cell elongation is key to in silico replication of in vitro vasculogenesis and subsequent remodelling*, Dev Biol. 2006; 289(1):44-54.

Michibata H, Mukoyama M, Tanaka I, Suga S, Nakagawa M, Ishibashi R, Goto M, Akaji K, Fujiwara Y, Kiso Y, Nakao K, *Autocrine/paracrine role of adrenomedullin in cultured endothelial and mesangial cells*, Kidney Int. 1998; 53(4):979-85.

Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL, *Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation*, Int J Biochem & Cell Biol. 2006; 38(3):333-57. Epub 2005 Nov 7. Review.

Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Nakao K, *Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo*, FEBS Lett. 2003; 544(1-3):86-92.

Morimoto A, Nishikimi T, Yoshihara F, Horio T, Nagaya N, Matsuo H, Dohi K, Kangawa K, *Ventricular adrenomedullin levels correlate with the extent of cardiac hypertrophy in rats*, Hypertension. 1999; 33(5):1146-52.

Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K, *Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney*, Peptides. 2007; 28(5):1095-103. Epub 2007 Feb 8.

Muff R, Leuthäuser K, Bühlmann N, Foord SM, Fischer JA, Born W, *Receptor activity modifying proteins regulate the activity of a calcitonin gene-related peptide receptor in rabbit aortic endothelial cells*, FEBS Lett. 1998; 441(3):366-8.

Nagae T, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Yahata K, Kasahara M, Suganami T, Makino H, Fujinaga Y, Yoshioka T, Tanaka I, Nakao K, *Rat receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) for adrenomedullin/CGRP receptor: cloning and upregulation in obstructive nephropathy*, Biochem Biophys Res Commun. 2000; 270(1):89-93.

Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S, *Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy*, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 288(6):R1432-7. Review.

Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, Oya H, Kyotani S, Nakanishi N, Goto Y, Masuda Y, Miyatake K, Kangawa K, *Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure*, Circulation 2000; 101(5):498-503.

Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Cao Y, Marutsuka K, Asada Y, Kangawa K, Eto T, *Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats*, Circulation 2004; 110(4):426-31. Epub 2004 Jul 19.

Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Shirato K, Shibahara S, *Induction of adrenomedullin by hypoxia and cobalt chloride in human colorectal carcinoma cells*, Biochem Biophys Res Commun. 1998 Feb 13;243(2):514-7.

Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Shirato K, Shibahara S, *Induction of adrenomedullin by hypoxia in cultured human coronary artery endothelial cells*, Peptides 1999; 20(6):769-72.

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.

Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, Rees MC, Bicknell R, *Adrenomedullin and tumour angiogenesis*, Br J Cancer. 2006; 94(1):1-7.

Nikitenko LL, MacKenzie IZ, Rees MC, Bicknell R, *Adrenomedullin is an autocrine regulator of endothelial growth in human endometrium*, Mol Hum Reprod. 2000; 6(9):811-9.

Nikitenko LL, Smith DM, Bicknell R, Rees MC, *Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia*, FASEB J 2003; 17(11):1499-501. Epub 2003 Jun 17.

Nikitenko LL, Smith DM, Hague S, Wilson CR, Bicknell R, Rees MC, *Adrenomedullin and the microvasculature*, Trends Pharmacol Sci. 2002; 23:101-103.

Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Ishimitsu T, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, Matsuoka H, *Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure*, J Am Coll Cardiol 1995; 26(6):1424-31.

Nishikimi T, Tadokoro K, Mori Y, Wang X, Akimoto K, Yoshihara F, Minamino N, Kangawa K, Matsuoka H, *Ventricular adrenomedullin system in the transition from LVH to heart failure in rats*, Hypertension 2003; 41(3):512-8. Epub 2003 Feb 3.

Nishikimi T, Yoshihara F, Horinaka S, Kobayashi N, Mori Y, Tadokoro K, Akimoto K, Minamino N, Kangawa K, Matsuoka H, *Chronic administration of adrenomedullin*

attenuates transition from left ventricular hypertrophy to heart failure in rats, Hypertension 2003; 42(5):1034-41. Epub 2003 Oct 20.

Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R, *Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage*, Circulation 2004; 109(14):1789-94. Epub 2004 Feb 16.

Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A, *Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions*, Cancer Metastasis Rev. 2008; 27(1):31-40. Review.

Oehler MK, Fischer DC, Orłowska-Volk M, Herrle F, Kieback DG, Rees MC, Bicknell R, *Tissue and plasma expression of the angiogenic peptide adrenomedullin in breast cancer*, Br J Cancer. 2003; 89(10):1927-33.

Oehler MK, Hague S, Rees MC, Bicknell R, *Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis*, Oncogene 2002; 21(18):2815-21.

Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K, *Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway*, Circulation. 2004; 109(2):242-8. Epub 2003 Dec 22.

Oliver KR, Wainwright A, Edvinsson L, Pickard JD, Hill RG, *Immunohistochemical localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying proteins in the human cerebral vasculature*, J Cereb Blood Flow Metab. 2002 ; 22(5):620-9.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L, *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*, Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7(5):359-71. Review.

Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI, *Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms*, Blood Cells Mol. Dis. 2007; 39(2):212-20. Epub 2007 Jun6. Review.

Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, Vuaroqueaux V, Dussert C, Palmari J, Dufour H, Grisoli F, Casellas P, Brünner N, Martin PM, *Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo*, Am J Pathol. 2002; 160(4):1279-92.

Papetti M, Herman IM, *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*, Am J Physiol. 2002; 282(5):C947-70. Review.

Pearson LJ, Rait C, Nicholls MG, Yandle TG, Evans JJ, *Regulation of adrenomedullin release from human endothelial cells by sex steroids and angiotensin-II*, J Endocrinol. 2006; 191(1):171-7.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S, *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of endothelial precursors*, Blood 2000; 95(3):952-8.

Pfaffl MW, *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*, Nucleic Acids Res. 2001; 29(9):e45.

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.

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. Review.

Prado MA, Evans-Bain B, Oliver KR, Dickerson IM, *The role of the CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor signal transduction*, Peptides 2001; 22(11):1773-81.

Prenzel N, Zwich E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A, *EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*, Nature 1999; 402:884-888.

Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM, *Adrenomedullin and heart failure*, Regul Pept. 2003; 112(1-3):51-60. Review

Rademaker MT, Charles CJ, Lewis LK, Yandle TG, Cooper GJ, Coy DH, Richards AM, Nicholls MG, *Beneficial hemodynamic and renal effects of adrenomedullin in an ovine model of heart failure*, Circulation 1997; 96(6):1983-90.

Rao GN, Delafontaine P, Runge MS, *Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells*, J Biol Chem. 1995; 270(46):27871-5

Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG, *Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis*, Pharmacol Rev. 2007; 59(2):185-205.

Ribatti D, Guidolin D, Conconi MT, Nico B, Baiguera S, Parnigotto PP, Vacca A, Nussdorfer GG, *Vinblastine inhibits the angiogenic response induced by adrenomedullin in vitro and in vivo*, Oncogene 2003; 22(41):6458-61.

- Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A, *The history of the angiogenic switch concept*, Leukemia. 2007; 21(1):44-52. Review.
- Ribatti D, Nico B, Spinazzi R, Vacca A, Nussdorfer GG, *The role of adrenomedullin in angiogenesis*, Peptides 2005; 26(9):1670-5.
- 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.
- Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY, *Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes*, J Biol Chem. 2004; 279(8):7264-74. Epub 2003 Nov 13.
- Rossi GP, Conconi MT, Malendowicz LK, Nussdorfer GG, *Role of the endogenous adrenomedullin system in regulating the secretion and growth of rat adrenal cortex*, Hypertens Res. 2003; 26 Suppl:S85-92.
- Sato Y, Kanno S, Oda N, Abe M, Ito M, Shitara K, Shibuya M, *Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction*, Annals New York Academy of Sciences 2000; 902:201-5; discussion 205-7. Review.
- Schwarz N, Renshaw D, Kapas S, Hinson JP, *Adrenomedullin increases the expression of calcitonin-like receptor and receptor activity modifying protein 2 mRNA in human microvascular endothelial cells*, Endocrinol. 2006; 190(2):505-14.
- Shichiri M, Kato H, Doi M, Marumo F, Hirata Y, *Induction of max by adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide antagonizes endothelial apoptosis*, Mol Endocrinol. 1999; 13(8):1353-63.
- Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H, *Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene*, Circulation 2001; 104(16):1964-71.
- Smith RS Jr, Gao L, Bledsoe G, Chao L, Chao J, *Intermedin is a new angiogenic growth factor*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009; 297(3):H1040-7. Epub 2009 Jul 10.
- Smith RS Jr, Lin KF, Agata J, Chao L, Chao J, *Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery promotes angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia*, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22(8):1279-85.
- Sporn MB, Roberts AB, *Peptide growth factors are multifunctional*, Nature 1988; 332(6161):217-9. Review.

Stangl V, Dschietzig T, Bramlage P, Boyé P, Kinkel HT, Staudt A, Baumann G, Felix SB, Stangl K, *Adrenomedullin and myocardial contractility in the rat*, Eur J Pharmacol. 2000; 408(1):83-9.

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. Review.
Tadokoro K, Nishikimi T, Mori Y, Wang X, Akimoto K, Matsuoka H, *Altered gene expression of adrenomedullin and its receptor system and molecular forms of tissue adrenomedullin in left ventricular hypertrophy induced by malignant hypertension*, Regul Pept. 2003; 112(1-3):71-8.

Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, Imai Y, Murakami O, Totsune K, *Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney*, Peptides 2006; 27(6):1383-9. Epub 2005 Dec 15.

Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Saruta M, Nakabayashi M, Suzuki T, Sasano H, Shibahara S, *Expression of urocortin III/stresscopin in human heart and kidney*, J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(4):1897-903.

Takei Y, Hyodo S, Katafuchi T, Minamino N, *Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function*, Peptides 2004; 25(10):1643-56.

Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S, *Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator*, FEBS Lett. 2004; 556(1-3):53-8.

Taylor MM, Bagley SL, Samson WK, *Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake*, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 288(4):R919-27. Epub 2004 Dec 2.

Taylor MM, Samson WK, *Stress hormone secretion is altered by central administration of intermedin/adrenomedullin-2*, Brain Res. 2005; 1045(1-2):199-205. Epub 2005 Apr 19.

Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman DD, *Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K(+) channels*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 279(6):H2620-6.

Tfelt-Hansen J, Hansen JL, Smajilovic S, Terwilliger EF, Haunso S, Sheikh SP, *Calcium receptor is functionally expressed in rat neonatal ventricular cardiomyocytes*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 290(3):H1165-71. Epub 2005 Oct 21.

Totsune K, Takahashi K, Mackenzie HS, Murakami O, Arihara Z, Sone M, Mouri T, Brenner BM, Ito S, *Increased gene expression of adrenomedullin and adrenomedullin-receptor complexes, receptor-activity modifying protein (RAMP)2 and calcitonin-receptor-*

like receptor (CRLR) in the hearts of rats with congestive heart failure, Clin Sci (Lond). 2000; 99(6):541-6.

Urbich C, Dimmeler S, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*, Circ Res. 2004; 95(4):343-53.

Wang X, Nishikimi T, Akimoto K, Tadokoro K, Mori Y, Minamino N, *Upregulation of ligand, receptor system, and amidating activity of adrenomedullin in left ventricular hypertrophy of severely hypertensive rats: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and diuretic*, J Hypertens. 2003; 21(6):1171-81.

Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA, Wang D, Warren RS, Donner DB, *Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation*, J Biol Chem. 2000; 275(7):5096-103.

Yamasaki M, Kawai J, Nakaoka T, Ogita T, Tojo A, Fujita T, *Adrenomedullin overexpression to inhibit cuff-induced arterial intimal formation*, Hypertension. 2003; 41(2):302-7.

Yang JH, Pan CS, Jia YX, Zhang J, Zhao J, Pang YZ, Yang J, Tang CS, Qi YF, *Intermedin1-53 activates l-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas*, Biochem Biophys Res Commun. 2006; 341:567-572.

Yoshihara F, Nishikimi T, Horio T, Yutani C, Nagaya N, Matsuo H, Ohe T, Kangawa K, *Ventricular adrenomedullin concentration is a sensitive biochemical marker for volume and pressure overload in rats*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 278(2):H633-42.

Zhao JH, Inoue T, Shoji W, Nemoto Y, Obinata M, *Direct association of YY-1 with c-Myc and the E-box binding protein in regulation of glycophorin gene expression*, Oncogene 1998; 17(8):1009-17.

Zhao Y, Bell D, Smith LR, Zhao L, Devine AB, McHenry EM, Nicholls DP, McDermott BJ, *Differential expression of components of the cardiomyocyte adrenomedullin/intermedin receptor system following blood pressure reduction in nitric oxide-deficient hypertension*, J Pharmacol Exp Ther. 2006; 316(3):1269-81. Epub 2005 Dec 2.

Zudaire E, Martínez A, Cuttitta F, *Adrenomedullin and cancer*, Regul Pept. 2003; 112(1-3):175-83. Review.

PUBBLICAZIONI

Guidolin D, Albertin G, Spinazzi R, Sorato E, Mascarin 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: 2013-23.

Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Spinazzi R, Mascarin A, Oselladore B, Montopoli M, Antonello M, Ribatti D, *Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations*, Regul Pept. 2009; 157(1-3):64-71.

Guidolin D, Albertin G, Sorato E, Oselladore B, Mascarin A, Ribatti D, *Mathematical modeling of the capillary-like pattern generated by adrenomedullin-treated human vascular endothelial cells in vitro*, Dev Dyn. 2009; 238(8):1951-63.