

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA  
SPERIMENTALE**

*INDIRIZZO IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI*  
**XIX Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

***IL RECETTORE BETA 2 ADRENERGICO MIGLIORA  
L'ANGIOGENESI MEDIATA DAI PROGENITORI  
MIDOLLARI DELLE CELLULE ENDOTELIALI***

TUTOR

**Chiar. Prof. Massimo Chiariello**

CANDIDATO

**Dott. Gennaro Galasso**

# INDICE

**Introduzione** pag. 2

**Materiali e Metodi** pag. 8

*Isolamento e caratterizzazione delle EPC*

*Citometria di flusso*

*Western Blot*

*Matrigel*

*Costrutti Adenovirali*

*Animali e Procedure Chirurgiche*

*Angiografie digitali e determinazione del flusso ematico*

**Risultati** pag. 14

*Caratterizzazione delle EPCs*

*Espressione di eNos e VEGF- R2*

*Espressione di  $\beta_2AR$  nelle “early” e nelle “late” EPCs*

*Effetto della stimolazione con isoproterenolo su  $\beta_2AR$ , p-AKT e GRK2*

*La stimolazione del recettore  $\beta_2AR$  induce differenziazione delle EPC*

*Effetto della stimolazione del  $\beta_2AR$  sull’angiogenesi in vitro*

*Effetto della stimolazione del  $\beta_2AR$  sull’angiogenesi in vivo*

**Discussione** pag. 21

**Bibliografia** pag. 25

**Legenda** pag. 35

**Figure** pag. 39

## INTRODUZIONE

La vasculogenesi rappresenta un paradigma di importanza critica per lo sviluppo dell'embrione ma è un concetto solo di recente introduzione nell'adulto. In età adulta infatti, è secondaria alla migrazione di cellule staminali emopoietiche (HSC) e di progenitori delle cellule endoteliali<sup>1</sup> (EPC) di origine midollare verso i siti di neovascolarizzazione, dove esse si differenziano in cellule endoteliali, contribuendo alla organogenesi vascolare. Fino a pochi anni fa si pensava che la vascolarizzazione di tessuti ischemici nell'adulto fosse ristretta alla migrazione ed alla proliferazione di cellule endoteliali mature, processo noto con il nome di "angiogenesi"<sup>2</sup>. Tuttavia, crescenti evidenze suggeriscono che progenitori di cellule endoteliali circolanti giungano ai siti di ischemia e contribuiscano alla formazione di nuovi vasi sanguigni<sup>3-5</sup>. Tale processo è noto come "vasculogenesi"<sup>6,7</sup>. Asahara<sup>3</sup> e collaboratori hanno per primi descritto, nel sangue periferico di individui adulti, un tipo di cellule circolanti, derivanti dal midollo osseo, con proprietà simili a quelle dell'emo-angioblasto embrionale. Tali cellule sono state isolate mediante selezione con microsfere magnetiche eseguita sulla base dell'espressione di un

particolare antigene di superficie, il CD34<sup>+</sup>, che rappresenta un potente marcatore fenotipico che identifica cellule ematopoietiche agli stadi primordiali di sviluppo. Tali cellule hanno la proprietà di assumere le caratteristiche fenotipiche delle cellule endoteliali, se coltivate su piastre ricoperte da fibronectina, ed inoltre, di proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature. Per tale motivo sono state denominate Progenitori di Cellule Endoteliali (EPC). Particolari stimoli (ad es. fattori di crescita) o condizioni patologiche (ad es. ischemia) sono in grado di mobilizzare le EPC, che sono cellule circolanti in piccole quantità nel torrente ematico, capaci di impiantarsi nei siti di neovascolarizzazione fisiologica e patologica o nei tessuti danneggiati e di differenziarsi in cellule endoteliali<sup>2</sup>. Studi recenti, condotti sia nell' animale che nell' uomo, hanno dimostrato che le EPC sono in grado di migliorare la funzione dei tessuti ischemici, sia inducendo e modulando la vasculogenesi e l'angiogenesi, in aree con ridotto apporto di ossigeno, che stimolando la re-endotelizzazione di vasi ematici danneggiati<sup>11</sup>. Successivamente, sono stati identificati i markers che caratterizzano funzionalmente le early EPC: il CD34, il vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGF-R2)<sup>8,9</sup> ed il CD133 che è un marcatore precoce di cellule staminali ematopoietiche e viene

espresso su cellule staminali e progenitori ematopoietici di midollo osseo umano, fegato fetale e sangue periferico<sup>10</sup>. L'origine embrionale di tali cellule è tuttora controversa. Si ritiene che esse originino nel midollo da un precursore emoangioblasto<sup>12-14</sup>, anche se altri studi riportano che anche precursori mesenchimali non ematopoietici possano differenziarsi in EPC in coltura<sup>15</sup>. Con l'immissione in circolo tali cellule cominciano a perdere l'espressione di CD133, e ad acquisire l'espressione di marcatori caratterizzanti le cellule endoteliali. Tra questi, il CD31, che gioca un ruolo importante nell'interazione adesiva tra cellule endoteliali adiacenti così come tra i leucociti e le cellule endoteliali, la VE-Cadherin, molecola fondamentale per l'organizzazione di nuovi vasi ed il vWF, proteina multimerica che media l'adesione piastrinica in prossimità del danno endoteliale.

In definitiva EPC circolanti mature mostrano positività per CD34/VEGF-R2/CD31/VE-Cadherin/vWF<sup>11</sup>. Altri studi hanno riportato che cellule della linea mieloide monocitica CD14<sup>+</sup> possono differenziarsi in cellule con caratteristiche delle EPC<sup>16,17</sup>. Così, le EPC circolanti sembrano essere un eterogeneo gruppo di cellule originanti da un precursore comune, l'emoangioblasto, localizzato nel midollo osseo, e presenti nel sangue periferico in differenti stadi

di differenziazione endoteliale<sup>18</sup>. L'immissione in circolo delle EPC dal midollo osseo è regolato da una grande varietà di fattori di crescita, enzimi, ligandi e recettori di superficie<sup>11</sup>. Grande importanza riveste in tal senso la sintasi di ossido nitrico endoteliale (eNOS)<sup>19</sup>. L'ischemia<sup>4</sup> tissutale induce produzione di fattori come VEGF, che agendo sul suo recettore KDR attiva via-Akt la fosforilazione di eNOS. La produzione di NO è essenziale per l'attivazione di MMP-9<sup>19</sup>, enzima chiave, in virtù del rilascio di kit-ligand da essa mediato, per la mobilizzazione di cellule staminali e progenitrici<sup>20</sup>, incluso l'emoangioblasto. La concentrazione ematica di EPC è bassa in condizioni normali. Uno studio riporta che il numero di EPC in individui adulti ammonta a circa lo 0,002% del totale delle cellule mononucleate del sangue periferico, corrispondenti a un numero di cellule che va da 70 a 210 per ml<sup>8</sup>. Vasa e collaboratori<sup>21</sup> hanno dimostrato che il numero e l'attività migratoria delle EPC circolanti è inversamente correlato con i fattori di rischio per CAD. Gli stessi hanno dimostrato che il numero delle EPC era un predittore indipendente della funzione endoteliale rispetto alla presenza o meno dei tradizionali fattori di rischio cardiovascolari, suggerendo che l'abbondanza delle EPC può essere un utile marker della funzione vasale e del rischio cardiovascolare.

Il fumo è il maggior predittore indipendente per la riduzione dei livelli delle EPC, mentre una loro ridotta migrazione è principalmente correlata ad alti valori pressori. Tra gli effetti pleiotropici delle statine<sup>22,23</sup>, si annovera quello di mobilitare EPC attraverso il pathway di PI3k/Akt. Heiss e coll<sup>24</sup> hanno studiato la disfunzione endoteliale correlata all'età, evidenziando una danneggiata attività delle EPC in individui anziani rispetto ai giovani, che potrebbe esserne il substrato fisiopatologico. L'iperglicemia colpisce in maniera importante la funzione delle EPC, riducendone la sopravvivenza e alterandone il funzionamento<sup>25</sup>. Gli estrogeni inducono mobilitazione delle EPC e, in vitro, si sono dimostrati in grado di ridurre l'accelerazione della senescenza indotta dall'azione dell'angiotensina II sull'AT1R<sup>26</sup>. Le EPC giocano quindi un ruolo fondamentale nell'omeostasi vascolare. Uno dei regolatori principali della funzione cardiaca e vascolare è rappresentato dal sistema adrenergico. Tale sistema controlla la vasodilatazione endoteliale attraverso i recettori adrenergici  $\alpha_2$  e  $\beta$  ( $\beta$ ARs). In particolare,  $\beta_2$ AR, il più abbondante  $\beta$ AR nei vasi<sup>27</sup>, modula il rilascio di NO, causando la dilatazione endotelio dipendente<sup>28</sup>. I recettori  $\beta$  adrenergici sono "G protein coupled receptors" che regolano una serie di pathway intracellulari,

avviando numerose risposte specifiche in relazione al tipo di cellule che li esprimono<sup>29-30</sup>. Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che il  $\beta_2$ AR gioca un ruolo critico nella proliferazione e nella funzione delle cellule endoteliali, inclusa la neovascolarizzazione. Infatti in un modello animale, l'overespressione indotta da un vettore virale del recettore  $\beta_2$ AR aumenta la neoangiogenesi in vivo, documentata mediante angiografia digitale<sup>31</sup>. Scopo di questo studio è valutare il ruolo del recettore  $\beta_2$  adrenergico nella regolazione della funzione angiogenetica EPC mediata.

## **MATERIALI E METODI.**

### **Isolamento e caratterizzazione delle EPC**

Le EPC sono state isolate in maniera analoga nel ratto e nell'uomo. In breve, le cellule mononucleate, estratte da 2ml di sangue ottenuto da 10 ratti WKY mediante puntura cardiaca immediatamente prima del loro sacrificio, e nell'uomo da 120ml di sangue venoso periferico prelevato da 3 volontari sani, sono state isolate mediante gradiente di densità ottenuto con Histopaque-1077 (Sigma) centrifugando a 1300rpm per 30 minuti. La frazione di cellule mononucleate è stata raccolta, lavata in "Dulbecco's phosphate-buffered saline" (DPBS), i globuli rossi lisati con una soluzione di ammonio cloruro (Stemcell Technologies) e purificata con 3 successivi lavaggi. Un totale di  $2.5 \times 10^6$  cellule mononucleate/cm<sup>2</sup> sono state coltivate su piastre ricoperte da fibronectina (Biocoat®). Le cellule sono state coltivate in Endothelial Basal Medium-2 (Clonetics) supplementato con EGM-2 Bullet Kit e 20% FBS. Dopo 5 giorni di coltura, il supernatante è stato rimosso e le cellule aderenti lavate 2 volte. Le cellule adese sono state selezionate per la captazione di lipoproteine a bassa densità (LDL) acetilate marcate con 1,1'-dioctadecile-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Dil-Ac-

LDL) (Molecular Probes) e per la lectina da *Banderaea Simplicifolia* BS-4 Isolectina B4 FITC-coniugata (Sigma). Le cellule sono state prima incubate con Dil-Ac-LDL a 37°C per 3 ore e poi fissate con formaldeide al 2% per 10 min. Dopo lavaggi successivi, le cellule sono state fatte reagire con lectina per 1h. Le cellule sono state quindi quantizzate mediante esame di 15 campi random al microscopio a fluorescenza e le cellule positive per entrambi i marcatori sono state identificate come EPCs. E' stata effettuata anche la RT-PCR per confermare ulteriormente l'espressione delle proteine marker endoteliali eNOS e VEGFR2.

### **Citometria di flusso**

Le cellule in coltura sono state prelevate dalla piastra mediante incubazione con tripsina per 5 min a 37°C. Un totale di  $1 \times 10^5$  cellule sono state utilizzate per l'analisi FACS. Gli anticorpi per il recettore del VEGF (Flk-1) sono stati usati come anticorpi primari (PE-coiugated VEGF-R2; BD Pharmigen). Come controllo isotipico è stato usato un anticorpo anti-IgG.

## **Western Blot**

Le cellule sono state stimolate con isoproterenolo a una concentrazione di  $10^{-8}$  M per 30 min, 1-2-4-6h e quindi raccolte mediante buffer dedicati: MLB per il WB su  $\beta_2$ AR e RIPA-SDS buffer per pAKT e GRK2. Le proteine sono state analizzate mediante elettroforesi su gel SDS/PAGE e trasferite su PDVF.  $\beta_2$ AR, Serina 473 pAKT, GRK2, ERK totale sono stati visualizzati con anticorpi specifici (Santacruz), anticorpi secondari anti-rabbit e anti-mouse HRP-coniugati (Santacruz) e la chemiluminescenza standard (Pierce).

## **Matrigel**

I saggi Matrigel sono stati effettuati in six-well ricoperte con growth factor-reduced Matrigel (10mg/mL;M Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) in accordo con le istruzioni del produttore. La formazione della rete è stata osservata usando un microscopio a contrasto di fase invertito, fornito di microscopio digitale (Nikon). Sono stati presi i campi rappresentativi, e la media del numero totale di tubi completi formati dalle cellule è stata calcolata mediante la conta di 2 investigatori indipendenti in 15 campi presi a caso .

## **Costrutti Adenovirali**

Abbiamo utilizzato costrutti adenovirali codificanti per il gene wild type del  $\beta_2$ AR umano ( $\beta_2$ AR-wt). Abbiamo amplificato geni  $\beta_2$ AR da DNA genomico attraverso PCR usando specifici primers e subclonato in un vettore pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO (Invitrogen) contenente il promotore del citomegalovirus umano (hCMV). Sono stati sequenziati DNAs plasmidici al fine di confermare il corretto orientamento, il frame e l'identità. Cassette di espressione sono state escisse e inserite nel sito AscI del plasmide pShuttle-linker e il plasmide risultante è stato usato per generare la prima generazione di vettori adenovirali  $\beta_2$ -wt come precedentemente descritto. Le cellule sono state infettate ad un MOI di 100 PFU per cellula, in presenza di siero per 3 h a 37°C.

## **Animali e Procedure Chirurgiche**

Gli studi su animali sono stati effettuati in accordo con le linee guida dell' Università Federico II di Napoli. Ratti WKY di 12 settimane sono stati anestetizzati con tiletamina (50mg/kg) e zolazepam (50 mg/kg), l'arteria femorale comune destra è stata isolata e chiusa permanentemente con sutura non riassorbibile

mentre la vena femorale è stata campata. Attraverso un'incisione sull'arteria eseguita distalmente alla sutura un totale di  $1 \times 10^7$  EPCs precedentemente transfettate con l'adenovirus  $\beta_2AR$ -wt sono state iniettate per via intravenosa, al momento della legatura chirurgica dell'arteria femorale comune, mediante una cannula di plastica. Successivamente, la cannula è stata rimossa e la ferita chiusa per strati.

### **Angiografie digitali e determinazione del flusso ematico**

Gli animali sono stati anestetizzati e la carotide comune di sinistra esposta. Un catetere 50 PE è stato fatto avanzare in aorta addominale appena prima della biforcazione iliaca, sotto visione fluoroscopica (Advantix LCX, General Electrix). La vasodilatazione massimale è stata ottenuta con nitroglicerina (20 $\mu$ g i.a). Un iniettore regolato elettricamente (ACIST Medical Sistem INC) è stato usato per rilasciare a pressione costante (900 psi) 0.2 ml di mezzo di contrasto (Iomeron 400, Bracco). Il numero di cine-frames per la valutazione del "timi frame count" è stata misurata con un frame counter digitale sul monitor adatto alla cine visione. Tutti gli angiogrammi sono stati filmati con 5 frame/sec e sono stati

analizzati in doppio cieco da 2 investigatori. Il TIMI frame count è stato valutato dal primo frame nel quale si vedeva il mezzo di contrasto entrare in arteria iliaca fino al frame in cui veniva interamente visualizzata la prima biforcazione dell'arteria del piede.

## **Risultati**

### **Caratterizzazione delle Endothelial progenitor cells**

I progenitori circolanti delle cellule endoteliali si caratterizzano per l'espressione di marcatori tipici delle cellule endoteliali adulte. Al fine dunque di caratterizzare le nostre cellule, abbiamo utilizzato una marcatura immunostochimica cui sono positive le cellule endoteliali quali il Dil-Ac-LDL e la lectina. Cellule umane estratte dal sangue in toto come precedentemente esposto<sup>32</sup>, sono state coltivate su piastre rivestite da fibronectina e raccolte mediante tripsinizzazione dopo 5 giorni. Le cellule così raccolte sono state incubate rispettivamente con Dil-Ac-LDL e Isolectina B4 FITC-coniugata. Le cellule sono state quindi analizzate mediante microscopia e le cellule positive per entrambi i marcatori identificate come EPC<sup>32</sup>. La figura 1 riporta la captazione dei due fluorocromi da parte delle cellule. In particolare, il pannello **A** mostra l'immagine delle cellule in microscopia a contrasto di fase, mentre i pannelli successivi mostrano, rispettivamente, le cellule positive per Dil-Ac-LDL (**B**) e Isolectina (**C**). Mediante sovra-

imposizione delle immagini è possibile verificare la positività per entrambe i marcatori (pannello **D**) che identifica le EPC.

### **Espressione di eNos e VEGF R2**

Le EPC si caratterizzano inoltre per l'espressione di proteine endoteliali quali eNOS e VEGF-R2. Abbiamo quindi valutato l'espressione di tali proteine mediante la RT-PCR in cellule coltivate per 5 (early EPC) o 21 (late EPC) giorni. Il pannello **A** della figura 2, riporta l'espressione di eNOS e KDR nelle early-EPC, mentre il pannello **B** mostra l'espressione di tali markers nelle late EPC. E' da notare come, in accordo con i dati esistenti in letteratura, le early EPC mostrino una significativa maggior espressione di VEGF-R2.

### **Espressione del recettore $\beta_2$ Adrenergico nelle "early" e nelle "late" EPCs**

Dopo aver caratterizzato le EPC, abbiamo valutato l'espressione del recettore  $\beta_2$ AR, su tali cellule. Come riportato nella figura 3, il recettore  $\beta_2$  adrenergico risulta espresso sia nelle early (pannello **A**)

che nelle late EPC (pannello **B**). Abbiamo dunque dimostrato per la prima volta che il recettore  $\beta_2$  Adrenergico viene espresso sin dai progenitori circolanti delle cellule endoteliali (early EPC) confermando l'importante ruolo che tale recettore svolge nella regolazione delle cellule endoteliali.

### **Effetto della stimolazione con isoproterenolo su $\beta_2$ AR, p-AKT e GRK2**

L'isoproterenolo è un potente agonista del recettore  $\beta_2$  adrenergico. Al fine di valutare funzionalmente il recettore  $\beta_2$  Adrenergico sulle EPC, abbiamo effettuato una curva dose risposta utilizzando concentrazioni da  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  M di isoproterenolo e valutando poi l'attivazione del recettore mediante analisi western blot della forma attivata della chinasi del recettore adrenergico (p-AKT). Le concentrazioni più alte ( $10^{-6}$ ) risultavano tossiche per le cellule mentre quelle più basse ( $10^{-9}$ ) risultavano inefficaci. L'optimum di risposta in termini di attivazione recettoriale era rappresentato da un concentrazione di isoproterenolo di  $10^{-8}$ M. Abbiamo dunque condotto gli esperimenti successivi utilizzando sempre la stessa concentrazione di isoproterenolo a diversi intervalli di tempo. La

figura 4 mostra i risultati della stimolazione con isoproterenolo, a tempi crescenti (controllo, 1, 2, 4 e 6 ore), di  $\beta_2$ AR, p-AKT e GRK2. E' possibile notare come la stimolazione con isoproterenolo non induca un aumento dell'espressione del recettore  $\beta_2$  adrenergico (figura 4 pannello **A** e **B**) né nelle early, nè nelle late EPCs. Tuttavia, tale stimolazione induce un aumento significativo dell'attivazione del  $\beta_2$ AR come indicato da un significativo aumento della concentrazione della forma attiva di Akt (pAKT). Tale comportamento era evidente sia nelle early che nelle late EPC ed è sovrapponibile alla risposta delle cellule endoteliale adulte<sup>31</sup>. Abbiamo infine esplorato l'effetto della stimolazione con isoproterenolo su GRK2, una proteina coinvolta nella desensitizzazione del recettore  $\beta_2$  adrenergico. Come riportato nella figura 4, l'agonista  $\beta$ AR isoproterenolo induceva una significativa riduzione dell'attivazione di GRK2 sia nelle early che nelle late EPC.

## **La stimolazione del recettore $\beta_2$ AR induce differenziazione delle EPC**

L'espressione del recettore per il VEGF rappresenta una caratteristica tipica delle cellule endoteliali. Tale recettore risulta inoltre fondamentale per il processo di angiogenesi. Abbiamo dunque studiato l'effetto della stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR con isoproterenolo sull'espressione del VEGF-R2. Come riportato nelle figure 5 e 6, la stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR con isoproterenolo induce una differenziazione delle EPC come confermato dal significativo aumento dell'espressione del recettore per il VEGF. Tale risultato era evidente sia nelle early- (figura 5) che nelle late- (figura 6) EPC.

## **Effetto della stimolazione del $\beta_2$ AR sull'angiogenesi in vitro**

Come precedentemente riportato, le EPC svolgono un importante ruolo nella modulazione della angiogenesi. Il nostro gruppo ha inoltre dimostrato come il recettore  $\beta_2$  Adrenergico svolga un ruolo importante nell'angiogenesi. Abbiamo quindi valutato in vitro,

mediante saggi di Matrigel, l'effetto sulla capacità angiogenetica delle EPC della stimolazione del recettore  $\beta_2$  Adrenergico. Cellule coltivate su piastre rivestite di fibronectina venivano prelevate mediante tripsinizzazione e piastrate su 6 well rivestite con Matrigel. Le cellule venivano poi stimolate per 1, 2, 4 e 6 ore con isoproterenolo  $10^{-8}$  M ed analizzate al microscopio a contrasto di fase. In queste condizioni venivano fotografati 5 diversi campi su ogni piastra e determinata la lunghezza di ciascun tubulo considerando come tale un segmento che mostrava una lunghezza pari a 4 volte la sua larghezza. Come riportato in figura 7 la stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR con isoproterenolo risulta in un significativo incremento del numero di tubi formati rispetto al controllo.

### **Effetto della stimolazione del $\beta_2$ AR sull'angiogenesi in vivo**

Nostri precedenti studi dimostrano che l'overespressione del recettore  $\beta_2$ AR migliora l'angiogenesi in vivo indotta dall'ischemia. Abbiamo quindi valutato il ruolo dell'attivazione di tale recettore. Tutti i ratti sono sopravvissuti dopo induzione chirurgica di ischemia dell'arto destro. Le angiografie effettuate nei ratti dopo 28

giorni dalla legatura dei vasi femorali hanno mostrato un aumento significativo dell'angiogenesi nei ratti in cui venivano infuse le EPC. Tale incremento era inoltre potenziato quando si infondevano EPC transfettate con l'adenovirus  $\beta_2$ AR (figura 8)

## Discussione

In questo studio abbiamo dimostrato per la prima volta che le EPC esprimono il recettore  $\beta_2$ AR. Inoltre, la stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR potenzia la capacità angiogenetica delle EPC in vivo ed in vitro.

L'identificazione da parte di Asahara e collaboratori<sup>3</sup> nel torrente ematico un particolare tipo cellulare, derivanti dal midollo osseo con proprietà simili a quelle dell'emoangioblasto embrionale, capaci di assumere caratteristiche fenotipiche delle cellule endoteliali di proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature, ha aperto nuovi ed interessanti orizzonti per la ricerca scientifica. I progenitori delle cellule endoteliali (EPC) hanno la capacità, tipica delle cellule staminali, di contribuire alla vasculogenesi. Recenti studi hanno dimostrato che le EPC sono in grado di migliorare la funzione dei tessuti ischemici inducendo sia la vasculogenesi che l'angiogenesi e stimolando la re-endotelizzazione di vasi ematici danneggiati<sup>11</sup> giocando quindi un ruolo fondamentale nell'omeostasi vascolare. Il sistema beta adrenergico rappresenta uno dei principali regolatori del sistema vascolare<sup>26-28</sup>. Il nostro gruppo ha recentemente

dimostrato che l'overespressione indotta da un vettore virale del recettore  $\beta_2AR$  aumenta la neoangiogenesi in vitro ed in vivo<sup>31</sup>. Poichè ad oggi non sono noti dati sul ruolo del recettore  $\beta_2AR$  nelle EPC, abbiamo valutato in questo studio, l'espressione ed il ruolo del recettore  $\beta_2AR$  a livello delle EPC. I nostri risultati dimostrano per la prima volta che tale recettore è presente nelle cellule endoteliali fin dalle prime fasi dell'ontogenesi come confermato dall'espressione sia nelle early che nelle late EPC (figura 3), sottolineando l'importante ruolo che tale recettore svolge nella regolazione delle cellule endoteliali. Abbiamo quindi valutato l'attivazione di tale recettore mediante stimolazione con isoproterenolo, un potente agonista del sistema adrenergico. La stimolazione del recettore  $\beta_2AR$  induceva un significativo aumento dell'espressione della forma attiva di AKT (figura 4) una proteina che svolge un ruolo fondamentale nella crescita e nella sopravvivenza cellulare promuovendo la differenziazione e la progressione del ciclo cellulare e riducendo l'apoptosi. L'aumento di espressione del recettore per VEGF-R2 (figure 5 e 6) sia nelle early che nelle late EPC conferma il ruolo determinante che la stimolazione del recettore  $B_2AR$  gioca nella differenziazione cellulare mediante l'attivazione di AKT. Inoltre, tale risultato è

sovrapponibile a quanto già riscontrato nelle cellule endoteliali adulte. Nell'esplorare GRK, la proteina determinante la desensitizzazione del recettore, abbiamo riscontrato che, a differenza di quanto avviene nelle cellule endoteliali adulte, la stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR provocava una significativa riduzione di GRK2. Tale comportamento è stato già dimostrato in cuori fetali e neonatali di ratto da Zeiders e collaboratori<sup>33</sup>. I progenitori delle cellule endoteliali quindi presentano un comportamento tipico delle cellule endoteliali neonatali e fetali. Avendo dimostrato l'espressione del recettore  $\beta_2$ AR nelle EPC, ne abbiamo quindi valutato il ruolo nell'angiogenesi. E' interessante notare come la stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR induca un significativo aumento della capacità delle EPC di formare nuovi vasi sia in vitro che in vivo. Infatti, lo stimolo con isoproterenolo induce un aumento significativo della formazione di network vascolare in vitro (figura 7). Abbiamo infine esplorato se l'aumento funzionale in vivo corrispondesse ad un aumento della capacità funzionale delle EPC in vivo. In un modello animale di ischemia riperfusione, le EPC sono state iniettate dopo overespressione adenovirus mediata, del recettore  $\beta_2$ AR. Come si evince dai filmati in figura 8, in queste

condizioni l'overespressione del recettore  $\beta_2$ AR sulle EPC induce un significativo miglioramento del flusso nell'arto ischemico.

In conclusione, il nostro studio dimostra per la prima volta che il recettore  $\beta_2$ AR risulta espresso nelle EPC e che l'overespressione di tale recettore potenzia la funzione angiogenetica delle EPC.

La comprensione dei meccanismi di regolazione della funzione angiogenetica delle EPCs e la possibilità di modularne la funzione mediante farmaci e/o tecniche di ingegneria genetica, apre la strada ad interessanti prospettive terapeutiche nel campo cardiovascolare ed oncologico.

## **Bibliografia:**

1. Isner JM, Losordo DW

**Therapeutic angiogenesis for heart failure.**

Nat Med. 1999 May;5(5):491-2.

2. Folkman J

**Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.**

Nat Med. 1995 Jan;1(1):27-31. Review.

3. 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 Feb 14;275(5302):964-7.

4. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney

M, Magner M, Isner JM, Asahara T.

**Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for**

**neovascularization.**

Nat Med. 1999 Apr;5(4):434-8.

5. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP.

**Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.**

Blood. 1998 Jul 15;92(2):362-7.

6. Risau W.

**Mechanisms of angiogenesis.**

Nature. 1997 Apr 17;386(6626):671-4. Review.

7. Carmeliet P.

**Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.**

Nat Med. 2000 Apr;6(4):389-95. Review

8. 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 functional endothelial precursors.**

Blood. 2000 Feb 1;95(3):952-8.

9. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W.

**In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells.**

Blood. 2000 May 15;95(10):3106-12.

10. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW.

**AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.**

Blood. 1997 Dec 15;90(12):5002-12.

11. Hristov M, Erl W, Weber PC.

**Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing.**

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Jul 1;23(7):1185-9. Epub  
2003 Apr 24. Review.

12.Rafii S, Lyden D.

**Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for  
organ vascularization and regeneration.**

Nat Med. 2003 Jun;9(6):702-12. Review

13.Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver  
M, Kearne M, Magner M, Isner JM.

**Bone marrow origin of endothelial progenitor cells  
responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and  
pathological neovascularization.**

Circ Res. 1999 Aug 6;85(3):221-8.

14.Masuda H, Asahara T.

**Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization  
in tissue regeneration.**

Cardiovasc Res. 2003 May 1;58(2):390-8. Review.

15.Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH,  
Verfaillie CM.

**Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone  
marrow.**

J Clin Invest. 2002 Feb;109(3):337-46

16.Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM,  
Dimmeler S.

**Relevance of monocytic features for neovascularization  
capacity of circulating endothelial progenitor cells.**

Circulation. 2003 Nov 18;108(20):2511-6. Epub 2003 Oct 27.

Erratum in: Circulation. 2005 Apr 5;111(13):1718.

17.Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL.

**Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived  
from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth  
factors.**

Circulation. 2003 Mar 4;107(8):1164-9.

18.Dzau VJ, Gnechi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG.

**Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases.**

Hypertension. 2005 Jul;46(1):7-18. Epub 2005 Jun 13. Review.

19. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S.

**Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells.**

Nat Med. 2003 Nov;9(11):1370-6. Epub 2003 Oct 12. Erratum in: Nat Med. 2004 Sep;10(9):999.

20. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S.

**Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.**

Cell. 2002 May 31;109(5):625-37.

21. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S.

**Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.**

Circ Res. 2001 Jul 6;89(1):E1-7.

22. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM.

**Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.**

Circulation. 2002 Jun 25;105(25):3017-24.

23. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM.

**HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway.**

J Clin Invest. 2001 Aug;108(3):391-7.

24. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C.

**Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction.**

J Am Coll Cardiol. 2005 May 3;45(9):1441-8.

25.Krankel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R .

**Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells.**

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Apr;25(4):698-703. Epub 2005 Jan 20

26.Imanishi T, Hano T, Nishio I.

**Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells.**

Hypertens Res. 2005 Mar;28(3):263-71.

27.Osswald W, Guimaraes S.

**Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects.**

Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1983; 96: 53–122.

28.Lefkowitz RJ, Caron MG.

**The adrenergic receptors.**

Adv Second Messenger Phosphoprotein Res. 1990; 24: 1–8.

29.Guimaraes S, Moura D.

**Vascular adrenoceptors: an update.**

Pharmacol Rev. 2001; 53: 319–356.

30. Hall RA, Lefkowitz RJ.

**Regulation of G-protein–coupled receptor signaling by scaffold proteins.**

Circ Res. 2002; 91: 672–680.

31.Iaccarino Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Galasso G,

Campanile A, Santulli G, Cipolletta E, Cerullo V, Cimini V,

Altobelli GG, Piscione F, Priante O, Pastore L, Chiariello M,

Salvatore F, Koch WJ, Trimarco B. **Ischemic neoangiogenesis**

**enhanced by beta2-adrenergic receptor overexpression: a**

**novel role for the endothelial adrenergic system.** Circ Res.

2005 Nov 25;97(11):1182-9.

32. Galasso G, Schiekofer S, Sato K, Shibata R, Handy DE, Ouchi N, Leopold JA, Loscalzo J, Walsh K.

**Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction.**

Circ Res. 2006 Feb 3;98(2):254-61. Epub 2005 Dec 22.

33. Zeiders JL, Seidler FJ, Iaccarino G, Koch WJ, Slotkin TA.

**Ontogeny of cardiac beta-adrenoceptor desensitization mechanisms: agonist treatment enhances receptor/G-protein transduction rather than eliciting uncoupling.**

J Mol Cell Cardiol. 1999 Feb;31(2):413-23.

## **Legenda**

### **Figura 1. Caratterizzazione delle Endothelial progenitor cells**

Il pannello **A** riporta un'immagine al microscopio a contrasto di fase in cui sono evidenziate EPC a 5 giorni di coltura dalla caratteristica morfologia fusiforme (freccie). Nei pannelli **B** e **C** è mostrato lo stesso campo microscopico dopo marcatura, rispettivamente, con Dil-Ac-LDL e con Isolectina FITC-coniugata. Nel pannello **D** la sovrapposizione di **B** e **C** evidenzia le cellule positive per entrambi i marcatori, identificate come EPC.

### **Figura 2. Espressione di eNos e KDR nelle early e late EPCs**

I pannelli **A** e **B** riportano l'espressione di eNOS e KDR rispettivamente nelle early- e late-EPCs.

### **Figura 3. Espressione del recettore $\beta_2$ Adrenergico EPCs**

Espressione di  $\beta_2$ AR nelle Early (pannello **A**) e nelle Late (pannello **B**) EPC. Nei riquadri inferiori è mostrata la normalizzazione con ERK totale.

**Figura 4. Effetto della stimolazione con isoproterenolo su  $\beta_2$ AR, p-AKT e GRK2**

Sono mostrati i risultati della stimolazione con isoproterenolo, a tempi crescenti (controllo, 1, 2, 4 e 6 ore), di  $\beta_2$ AR, p-AKT e GRK2 nelle early (**A**) e nelle late (**B**) EPC. La stimolazione con isoproterenolo non induce aumento dell'espressione del recettore  $\beta_2$  adrenergico né nelle early, né nelle late EPCs. Tale stimolo induce tuttavia un aumento significativo dell'attivazione di Akt, mentre si riduce l'attivazione di GRK2. Nei pannelli **C** e **D** è riportata la rappresentazione istografica dei risultati suddetti. N= 3 per ciascun esperimento, \* $<0.05$  vs controllo; § $<0.05$  vs isoproterenolo

**Figura 5. Effetto della stimolazione con Isoproterenolo sull'espressione di KDR nelle early EPC.**

La stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR induce aumento di espressione di KDR, come evidenziato dai grafici dell'analisi FACS (pannello **A**). Il pannello **B** riporta la rappresentazione istografica dei risultati suddetti. N= 3 per ciascun esperimento, \* $<0.05$  vs controllo § $<0.05$  vs isoproterenolo

**Figura 6. Effetto della stimolazione con Isoproterenolo sull'espressione di KDR nelle late EPC.**

La stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR induce aumento di espressione di KDR, come evidenziato dai grafici dell'analisi FACS (pannello **A**). Il pannello **B** riporta la rappresentazione istografica dei risultati suddetti. N= 3 per ciascun esperimento, \* $<0.05$  vs controllo § $<0.05$  vs isoproterenolo

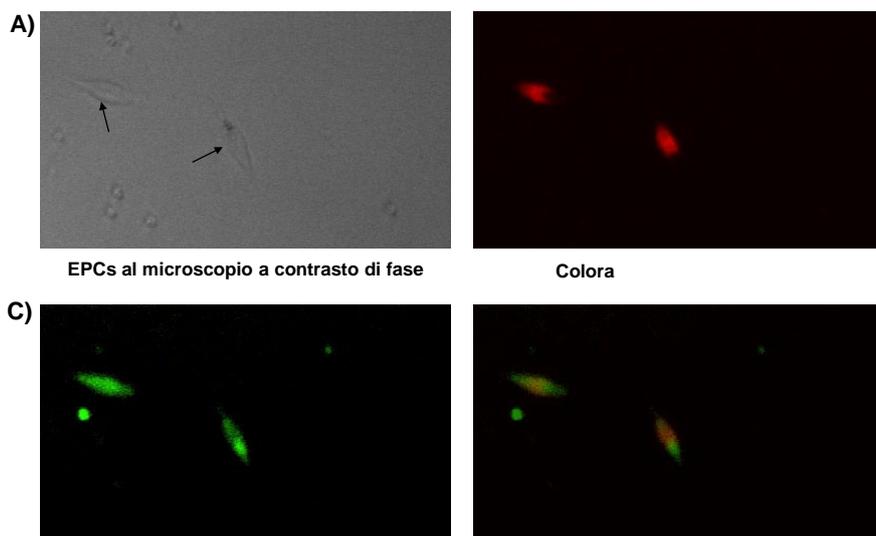
**Figura 7. Effetto della stimolazione con Isoproterenolo sulle capacità angiogenetiche delle EPC in vitro.**

Le immagini mostrano la formazione di tubuli su Matrigel dopo stimolo con isoproterenolo. E' evidente come la stimolazione del  $\beta_2$ AR induca un aumento nella capacità delle EPC di formare tubuli. I pannelli mostrano campi microscopici del controllo (**A**) e delle cellule stimulate per 1 h (**B**), 3h (**C**) e 6h (**D**). Il pannello **E** riporta la rappresentazione grafica della conta dei tubuli. N= 3 per ciascun esperimento, \* $<0.05$  vs controllo

**Figura 8. Effetto della stimolazione con Isoproterenolo sulle capacità angiogenetiche delle EPC in vitro.**

Le tre immagini riportano lo sviluppo di circoli collaterali nei ratti sottoposti a resezione della arteria femorale destra. L'immagine **A** è riferita al controllo. In **B** è mostrata un'immagine angiografica di un ratto a cui sono state infuse EPC dopo chirurgia. Infine, in **C** è riportata l'immagine angiografica dell'arto del ratto in cui sono state infuse, al momento della chirurgia, EPC che overesprimevano il  $\beta_2$ AR. Il pannello **D** riporta il timi frame count per ciascuna angiografia. N= 3 per ciascun esperimento, \*<0.05 vs controllo §<0.05 vs isoproterenolo

**Figura 1. Caratterizzazione delle Endothelial proge**



**Figura 2. Espressione di eNos e VEGF R2**

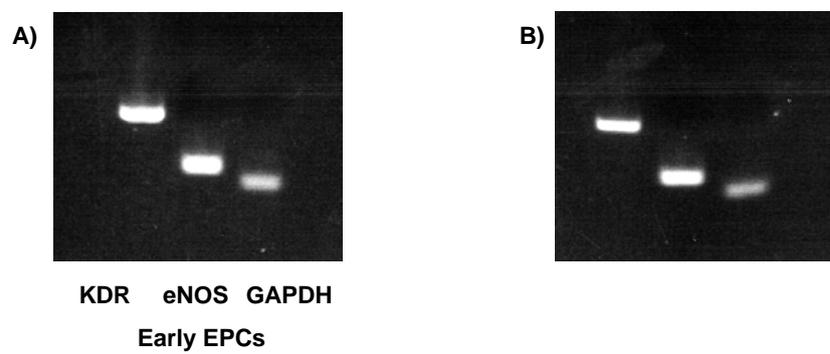




Figura 4. Effetto della stimolazione con isoproterenolo

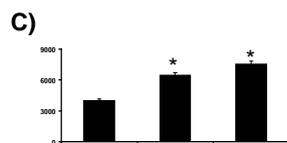
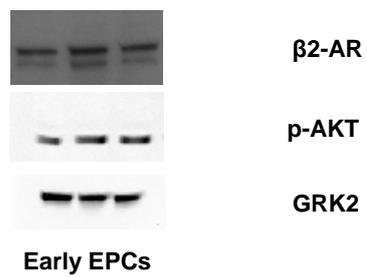


Figura 5. Effetto della stimolazione del  $\beta$ 2AR sull'espressione di KDR nelle early EPC

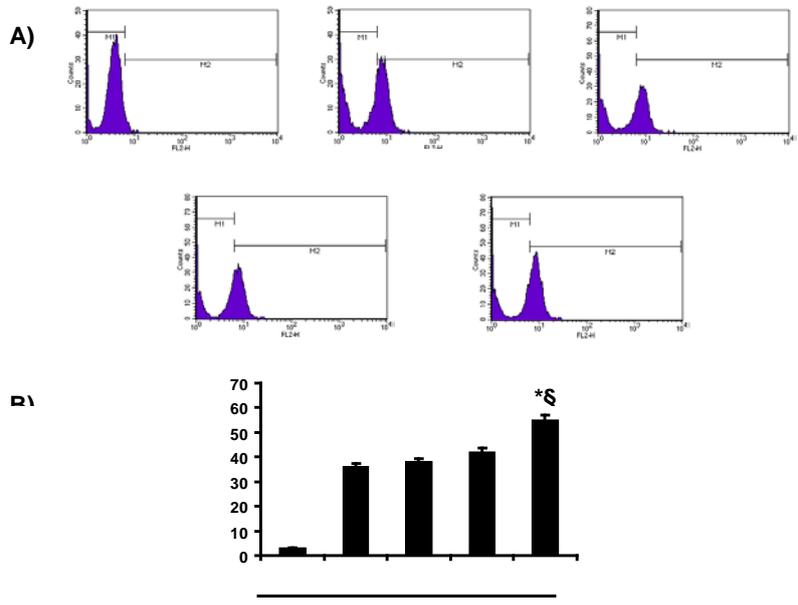
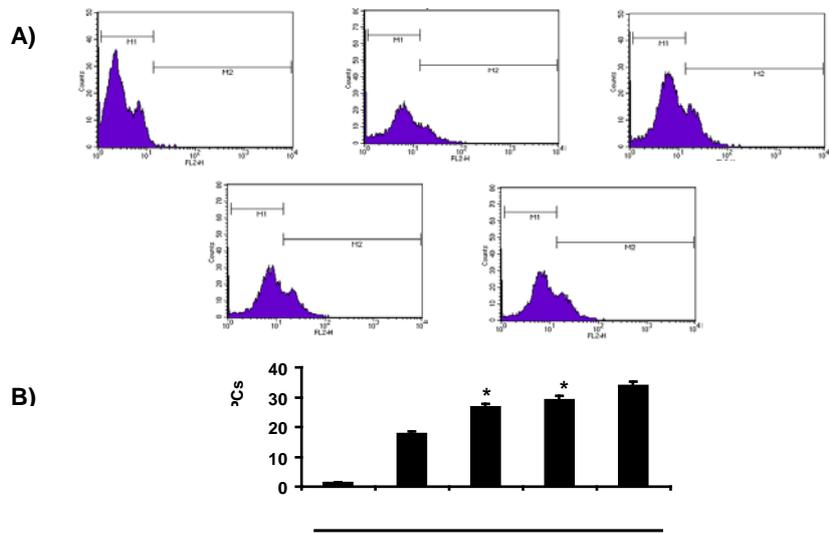


Figura 6. Effetto della stimolazione del  $\beta$ 2AR sull'espressic



**Figura 7. La stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR migliora la ca  
EPCs in vitro**

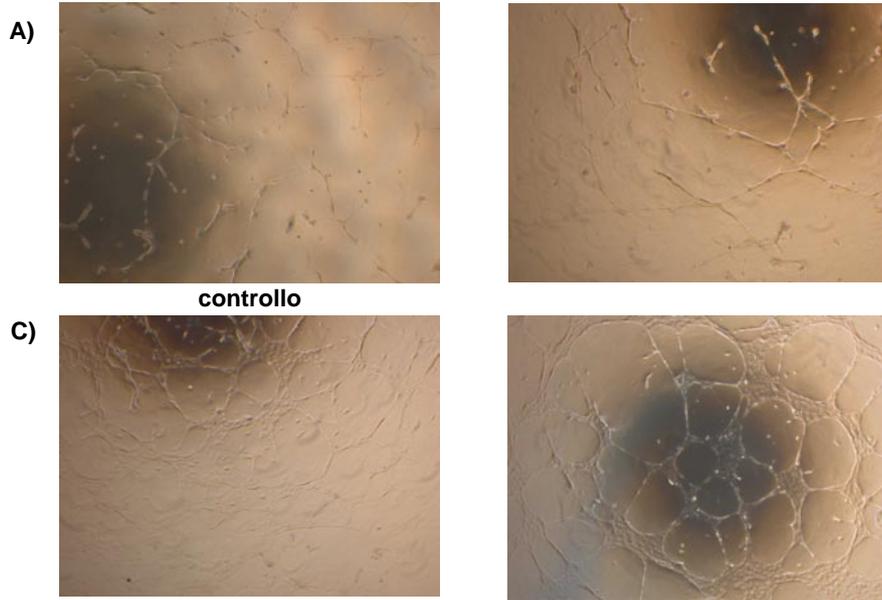


Figura 7. La stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR migliora la  $\alpha$  EPCs in vitro

E)

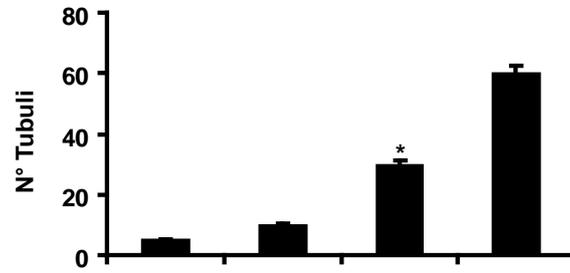


Figura 7. La stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR migliora la ca  
EPCs in vivo

D)

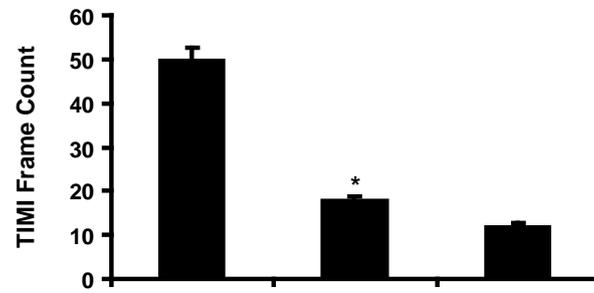


Figura 8. La stimolazione del recettore  $\beta_2$ AR migliora la  $ca$  EPCs in vivo

