

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

Tesi sperimentale di Dottorato di Ricerca

MASTOCITI ED ANGIOGENESI

MECCANISMI DI ATTIVAZIONE E FATTORI DI REGOLAZIONE

TUTOR

Ch.^{mo} Prof. Amato de Paulis

CANDIDATO

Dott. Gabriele Delfino

XXII ciclo - Anno Accademico 2008-2009

INDICE

INTRODUZIONE	4
<i>Mastociti</i>	5
<i>Angiogenesi</i>	9
<i>Mastociti ed angiogenesi</i>	16
MATERIALI E METODI	19
<i>Reagenti</i>	19
<i>Tamponi</i>	20
<i>Colture di linee mastocitarie</i>	20
<i>Isolamento, purificazione e colture di mastociti sinoviali</i>	21
<i>Analisi citofluorimetrica</i>	22
<i>RT-PCR</i>	23
<i>Chemiotassi</i>	24
<i>ELISA</i>	26
<i>Irradiazione e fonte dei raggi ultravioletti A</i>	26
<i>Analisi statica</i>	27

RISULTATI	28
<i>Valutazione dell'espressione dell'mRNA per il VEGF nei mastociti umani</i>	28
<i>Determinazione del VEGF-A nei mastociti umani</i>	29
<i>Espressione dei recettori per il VEGF nei mastociti umani</i>	29
<i>Valutazione citofluorimetrica dei recettori per il VEGF nei mastociti sinoviali umani</i>	30
<i>Effetto del VEGF-A₁₆₅ sulla chemiotassi dei mastociti sinoviali umani</i>	30
<i>Effetto dei raggi ultravioletti A sul rilascio di VEGF-A dai mastociti umani</i>	32
<i>Valutazione dell'espressione dell'mRNA per il VEGF-A₁₆₅ nei mastociti umani dopo esposizione a radiazioni ultraviolette A</i>	34
DISCUSSIONE	35
FIGURE	41
BIBLIOGRAFIA	51

INTRODUZIONE

I mastociti sono cellule che esprimono recettori ad elevata affinità per le immunoglobuline di tipo E (FcεRI). La loro attivazione avviene principalmente attraverso l'interazione di un antigene multivalente con specifici anticorpi IgE legati alla membrana cellulare mediante il recettore FcεRI¹. Tale processo promuove l'aggregazione dei recettori FcεRI e determina il rilascio di mediatori preformati (amine vasoattive, proteasi, proteoglicani, citochine e fattori di crescita) e, successivamente, la sintesi *de novo* e la liberazione di mediatori lipidici pro-infiammatori (prostaglandine e leucotrieni).

Per la loro capacità di rilasciare potenti mediatori biologici in risposta alla stimolazione IgE-mediata, i mastociti sono considerati le cellule effettrici nelle reazioni di tipo allergico², così come nelle risposte nei confronti dei parassiti^{3,4}.

Studi condotti negli ultimi anni hanno definito un ruolo specifico per tali cellule anche nelle reazioni infiammatorie di tipo non allergico: esse sono verosimilmente coinvolte in molteplici condizioni patologiche quali alcune malattie infiammatorie croniche⁵, l'aterosclerosi⁶ ed i

processi neoplastici⁷. A conferma di questa ipotesi, vari gruppi di ricercatori hanno dimostrato che i mastociti umani sintetizzano, oltre ai classici mediatori della risposta allergica, numerose citochine tra cui IL-4, IL-5, IL-8, IL-16, TNF- α e diverse chemochine come MIP-1 α , MCP, CCL1. Tali osservazioni suggeriscono che tali cellule possano svolgere una rilevante funzione immunoregolatrice⁸ (*Figura 1*).

Mastociti

I mastociti sono cellule tessutali residenti, derivanti da specifici precursori ematopoietici che si rinvengono in circolo in forma immatura e migrano nella maggior parte dei tessuti vascolarizzati, dove, completando la loro differenziazione, risiedono in stretta prossimità dei vasi sanguigni⁹. Essendo localizzati in siti anatomici esposti all'ambiente esterno (cute, vie aeree, tratto gastrointestinale) i mastociti rappresentano, insieme alle cellule dendritiche, i primi componenti del sistema immunitario ad interagire con antigeni ambientali, agenti patogeni, tossine e radiazioni¹⁰.

I mastociti esprimono il recettore c-kit, attivato dallo *Stem Cell Factor* (SCF)¹¹, un'importante citochina che ne regola la maturazione, la chemiotassi e la degranolazione.

L'ipotesi che i mastociti si siano evoluti principalmente per rispondere ai parassiti è in qualche modo riduttiva. Infatti, in aggiunta alle IgE, esistono numerosi altri stimoli capaci di attivarli, inducendo il rilascio di molteplici prodotti con attività sia pro-infiammatoria che antinfiammatoria e/o immunosoppressiva¹². A questo proposito, i mastociti vengono attivati dalle IgG attraverso il recettore Fc γ , oltre che da diverse citochine, chemochine, peptidi endogeni ed esogeni, agenti chimici o stimoli fisici¹³.

Pertanto, i mastociti sono stati paragonati a “sentinelle” del sistema immunitario¹⁴, localizzate in prima linea per rispondere ad infezioni ed altri stimoli: una conferma importante a questa ipotesi viene dalla dimostrazione che topi privi di mastociti risultano incapaci di rispondere adeguatamente ad infezioni batteriche^{15, 16}. In realtà, se da una parte i mastociti, nella loro funzione di orchestrare le risposte ad agenti patogeni, rappresentano un anello di collegamento tra l'immunità innata e quella adattativa, dall'altra recenti evidenze sperimentali avvalorano

l'ipotesi di un loro coinvolgimento nella patogenesi di molteplici malattie autoimmunitarie. A questo proposito, in un modello sperimentale di malattia autoimmune, l'artrite indotta da collagene, è stato dimostrato che topi privi di mastociti, in quanto *knock-out* per il gene codificante lo *Stem Cell Factor* (SCF), sviluppano una forma di artrite molto più lieve rispetto ai controlli sani. Ricostituendo il pool di mastociti è possibile ripristinare la normale risposta infiammatoria ed il decorso della malattia¹⁷. Esistono ulteriori evidenze, sia *in vivo* che *in vitro*, circa l'implicazione dei mastociti in altre malattie autoimmuni, quali la sclerosi multipla¹⁸, il lupus eritematoso sistemico, il diabete mellito di tipo 1, la sindrome di Guillan-Barrè, la sindrome di Sjögren, la sclerosi sistemica ed alcune vasculiti¹⁹.

Osservazioni simili sono emerse riguardo alle malattie neopastiche, a proposito delle quali è stato recentemente dimostrato che, in modelli animali, i mastociti appaiono indispensabili per la crescita di tumori pancreatici: la loro inibizione, sia mediante un trattamento farmacologico (cromoglicato) che mediante una tecnica genetica, rallenta l'accrescimento della neoplasia²⁰. Dati comparabili sono stati ottenuti nell'uomo relativamente ai tumori della tiroide: si è osservato che, in

biopsie di tumori tiroidei, l'infiltrato mastocitario è aumentato in maniera direttamente proporzionale all'aggressività istologica e clinica del tumore. In una serie di esperimenti *in vitro* è stato inoltre dimostrato che il sovrnatante dei mastociti è capace di indurre la proliferazione delle cellule tumorali e che, viceversa, il sovrnatante delle cellule tiroidee promuove, in maniera specifica, la mobilizzazione e l'attivazione dei mastociti [dati non pubblicati].

Diverse osservazioni sperimentali hanno inoltre individuato un ruolo chiave dei mastociti anche nell'induzione dell'immunosoppressione mediata da ultravioletti. Da tempo è nota infatti la capacità delle radiazioni ultraviolette di interferire a più livelli del sistema immunitario^{21,22}. Sembra che il mastocita intervenga in questa interazione amplificando i meccanismi di immunosoppressione UV-indotti. Recenti studi dimostrano che topi geneticamente privi di mastociti non sviluppano immunosoppressione a seguito dell'esposizione ai raggi ultravioletti^{23,24}.

Del resto le radiazioni UV intervengono con molteplici meccanismi nella risposta immunitaria orchestrata dai mastociti, influenzando in maniera diretta il rilascio di numerosi mediatori. Alcuni

autori ipotizzano un ruolo determinate dei mastociti nella carcinogenesi foto-indotta²⁵. Uno dei meccanismi alla base della fotocarcinogenesi potrebbe essere proprio l'immunosoppressione mediata dai mastociti.

Nel caso delle neoplasie, la duplice natura dei mastociti è piuttosto evidente: sin dagli studi pionieristici di Paul Ehrlich, il quale per primo documentò il loro incremento nei carcinomi²⁶, i mastociti sono stati considerati quali fattori sia di resistenza che di suscettibilità alle neoplasie²⁷. I mastociti, invero, si accumulano a livello dello stroma che circonda i tumori, dove partecipano alla risposta immunitaria alla neoplasia, producendo citochine capaci di favorire l'eliminazione delle cellule tumorali. D'altra parte, i mastociti hanno la potenzialità di favorire nello stesso tempo l'espansione del tumore, promuovendo la degradazione della matrice extracellulare e la vascolarizzazione della neoplasia.

Angiogenesi

Tra i molteplici meccanismi implicati nella crescita tumorale nonché nella cronicizzazione dell'infiammazione, risulta fondamentale la

formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da precursori endoteliali, processo che va sotto il nome di angiogenesi²⁸.

Angiogenesi e linfoangiogenesi (quest'ultima intesa quale processo specifico di sviluppo dei vasi linfatici²⁹) sono di fondamentale importanza in molte condizioni fisiologiche, quali la normale crescita dei tessuti, lo sviluppo embrionale, la cicatrizzazione delle ferite ed il ciclo mestruale, fenomeni caratterizzati dalla formazione di nuovi vasi per il rifornimento di O₂ e sostanze nutritive e per l'eliminazione dei residui metabolici³⁰. L'angiogenesi e linfoangiogenesi sono fondamentali anche in processi patologici quali la crescita tumorale³¹ e la flogosi cronica³². E' noto che l'angiogenesi neoplastica rappresenta una tappa fondamentale per la crescita tumorale e la formazione delle metastasi. Inoltre, l'angiogenesi si associa al rimodellamento tessutale che si osserva in corso di diverse malattie infiammatorie croniche tra cui l'artrite reumatoide, la psoriasi, la malattia di Crohn, la retinopatia diabetica e l'asma bronchiale. In tali disordini si verifica un'alterazione dell'equilibrio tra fattori stimolanti e fattori inibenti la formazione di nuovi vasi, con una conseguente attivazione costante dell'angiogenesi.

Esempio caratteristico è la formazione del panno sinoviale in corso di artrite reumatoide³³.

L'angiogenesi risulta essere un processo altamente coordinato e complesso, che richiede l'attivazione sequenziale di una serie di recettori da parte di numerosi ligandi³⁴. Tra questi, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)³⁵, originariamente identificato per la sua capacità di indurre la permeabilità vascolare³⁶, è il più potente mediatore pro-angiogenico conosciuto³⁷. Oltre a modulare la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali, il VEGF esplica altre attività pro-angiogeniche: esso induce nelle cellule endoteliali l'espressione di proteasi (collagenasi, uPA e tPA) in grado di liberare le cellule dall'ancoraggio alla matrice permettendone la migrazione; il VEGF aumenta inoltre la permeabilità dell'endotelio mediante la formazione di vacuoli e fenestrazioni, oltre a causare vasodilatazione mediante l'induzione di nitrossido sintasi (eNOS). Il VEGF non è attivo soltanto sulle cellule endoteliali, esso è in grado di indurre la mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche dal midollo, l'attivazione degli osteoblasti, la chemiotassi dei monociti e la regolazione dell'omeostasi neuronale³⁸.

Il principale regolatore della sintesi di VEGF è la pressione di O₂: l'mRNA per il VEGF, infatti, è fortemente indotto dalla esposizione a basse concentrazioni di ossigeno, condizione che si verifica in una ampia varietà di circostanze fisiopatologiche³⁹. Molte citochine e fattori di crescita (PDGF, TNF- α , TGF- α , TGF- β , FGF, EGF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ed IGF-1) stimolano la sintesi di VEGF. Infine, alcune mutazioni geniche presenti nelle cellule neoplastiche possono aumentare la produzione del VEGF: mutazioni attivanti p53, mutazioni oncogeniche ed amplificazioni di RAS.

La famiglia del VEGF comprende diversi membri, tra i quali VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (Placental Growth Factor). Il VEGF-A ed il VEGF-B regolano la crescita dei vasi sanguigni, il VEGF-C ed il VEGF-D sono implicati nell'angiogenesi linfatica⁴⁰, mentre il PlGF sembra mediare principalmente l'arteriogenesi (Tabella 1).

Tabella 1				
Vengono mostrate le caratteristiche delle differenti isoforme di VEGF				
Gene	Omologia di sequenza	Localizzazione cromosomica	Varianti di splicing	Dimensioni della proteina (kDa)
VEGF-A		6p23.1	121, 145, 165, 183, 189, 206	21
VEGF-B	45% di omologia con il VEGF-A	11q13	167, 186	21, 30
VEGF-C	30% di omologia con il VEGF-A165	4q34	–	20–21
VEGF-D	61% di omologia con il VEGF-C; 31% di omologia con il VEGF-A165	Xp22.31	–	20–21
PlGF	42% di omologia con il VEGF-A	14q24	131, 152, 219	38, 30

Alcuni di questi fattori presentano varie isoforme derivanti da meccanismi di splicing alternativo con differente potenziale pro-angiogenico. Il gene umano del VEGF-A è organizzato in 8 esoni e 7 introni. Lo splicing alternativo genera almeno 6 isoforme: VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉, e VEGF-A₂₀₆⁴¹. Il VEGF-A₁₆₅ è la isoforma biologicamente più attiva.

Il VEGF-A esplica la sua azione mediante l'interazione con due principali recettori con attività tirosino-chinasica: VEGFR-1/Flt-1 e

VEGFR-2/KDR (*Figura 2*)⁴². Il VEGFR-1/Flt-1 è una glicoproteina di ~180 kDa, che pur avendo maggiore affinità per il VEGF-A, lega anche VEGF-B e PlGF. Poiché la fosforilazione in tirosina del VEGFR-1/Flt-1 è difficile da rilevare ed induce soltanto un debole segnale mitogenico, Park *et al.* ipotizzarono che VEGFR-1/Flt-1 potesse svolgere il ruolo di *decoy receptor* in grado di regolare in senso negativo l'attività del VEGF⁴³. Il VEGFR-2/KDR è un recettore di 200-230 kDa con una minore affinità per il VEGF-A rispetto a VEGFR-1/Flt-1. Il VEGFR-2/KDR viene fosforilato molto più efficacemente del VEGFR-1/Flt-1 dopo il legame del ligando ed è quindi in grado di indurre efficaci segnali mitogenici e chemiotattici. Il VEGFR-3/Flt-4 attivato da VEGF-C e VEGF-D; la sua espressione è infatti limitata all'endotelio dei vasi linfatici, dove regola in maniera specifica il processo di linfoangiogenesi⁴².

Un importante meccanismo che regola l'attività del VEGF prevede la produzione per splicing alternativo di una variante solubile del VEGFR-1/Flt-1: sVEGFR-1/Flt-1⁴⁴. Questa forma è praticamente identica a quella di membrana, differendo da essa per l'assenza della porzione transmembrana necessaria all'ancoraggio del recettore alla

membrana citoplasmatica e per l'assenza della porzione intracellulare necessaria per la trasduzione del segnale. sVEGFR-1/Flt-1 lega il VEGF-A con elevata affinità e sequestrandolo ne impedisce il legame con i recettori di membrana in grado di trasdurre il segnale; sVEGFR-1/Flt-1 inoltre, è in grado di formare eterodimeri non funzionali con VEGFR-2/KDR⁴⁵.

Esperimenti di *cross-linking* con l'utilizzo di VEGF radio-marcato indicano che i siti di legame del VEGF sulla membrana plasmatica non corrispondono esclusivamente ai VEGFRs.

Soker *et al.* identificarono questi siti sui recettori NRP1 ed NRP2 (neuropiline)⁴⁶. Le neuropiline legano le semaforine di classe 3 e sono normalmente implicate nei processi di trasmissione dei segnali lungo gli assoni. Questi recettori legano il dominio codificato dall'esone 7 del gene del VEGF-A e quindi riconoscono il VEGF-A₁₆₅, ma non il VEGF-A₁₂₁. Il legame del VEGF a queste molecole non induce di per sé segnali di trasduzione. La NRP1 agisce come co-recettore per il VEGF-A₁₆₅ rafforzandone il legame al VEGFR-2/KDR ed aumentandone l'attività.

Mastociti ed angiogenesi

Le evidenze esposte suggeriscono un ruolo centrale per i mastociti in diverse malattie infiammatorie e neoplastiche.

I mastociti, localizzati fisiologicamente in prossimità dei vasi sanguigni, sono capaci di favorirne la crescita mediante la sintesi e il rilascio di diversi fattori angiogenici (istamina, triptasi, TGF- β , IL-8, VEGF⁴⁷⁻⁴⁸ and I-309/CCL1⁴⁹). In particolare, la sintesi di VEGF da parte dei mastociti è aumentata dalla PGE₂ e da altri agenti che incrementano i livelli di cAMP⁵⁰.

Nei pazienti asmatici l'incremento della densità dei mastociti bronchiali correla con l'aumento del numero dei vasi⁵¹; elevati livelli di VEGF e di bFGF (fibroblast growth factor) si rinvencono nella sottomucosa bronchiale di pazienti asmatici rispetto al gruppo di controllo⁵² e le concentrazioni di VEGF misurate nello sputo ottenuto da soggetti asmatici sono più elevate rispetto a quelle osservate nei controlli⁵³. L'insieme di tali osservazioni suggerisce che i mastociti, attraverso il rilascio di VEGF, sostengano l'angiogenesi in corso di asma bronchiale.

Analogamente, nell'artrite reumatoide la formazione del panno sinoviale è un momento patogenetico fondamentale, per il quale

l'angiogenesi rappresenta un processo indispensabile. In tali condizioni i mastociti risultano implicati per la loro capacità di indurre neovascolarizzazione.

Nella carcinogenesi foto-indotta, l'angiogenesi, come in tutti i processi neoplastici, rappresenta una tappa essenziale per la crescita tumorale; la possibilità dei mastociti di modulare l'angiogenesi lascia ipotizzare il coinvolgimento di tali cellule nel processo patogenetico.

Al di là delle evidenze fin qui esposte, tra le quali l'osservazione che i mastociti sono capaci di liberare VEGF in risposta a differenti stimoli⁴⁸, il sistema del VEGF e dei suoi recettori non è mai stato caratterizzato a fondo nei mastociti.

In questo studio abbiamo valutato l'espressione delle diverse isoforme del VEGF da parte dei mastociti nonché la loro capacità di sintetizzare e rilasciare VEGF dopo attivazione immunologica. È stata studiata l'espressione dei recettori per il VEGF e gli effetti del VEGF-A sulla chemiotassi di tali cellule.

Al fine di approfondire il ruolo dei mastociti nell'angiogenesi associata a malattie infiammatorie croniche, è stato messo a punto un protocollo⁵⁴ per isolare i mastociti primari dalla sinovia di pazienti affetti

da artrite reumatoide che andavano incontro ad intervento di sinoviectomia, onde caratterizzare l'espressione e le funzioni del VEGF e dei suoi recettori.

Infine abbiamo studiato gli effetti dei raggi UV (in particolare degli UVA) sul rilascio di mediatori proangiogenici dai mastociti.

MATERIALI E METODI

Reagenti

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: HClO₄ 60% (Baker Chemical Co., Deventer, The Netherlands); albumina sierica umana (HSA), PIPES buffer ed inibitori delle protease, cicloesamide ed anti-VEGFR2/KDR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Hanks' balanced salt solution (HBSS); FCS, RNAqueous™-4PCR (Ambion Ltd., Huntingdon, UK); Superscript III (Invitrogen Ltd. Paisley, UK); RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies Gaithersburg, MD, USA) con HEPES buffer 25 mM; Eagle's minimum essential medium (MEM) (Flow Laboratories, Irvine, Scotland); Dextrano 70 e Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden); anticorpi IgG anti-coniglio HRP-coniugati (Amersham International, Amersham, England), saggio colorimetrico per proteine (Biorad, Richmond, CO, USA); anticorpi anti-IgE PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA); VEGF-A₁₆₅ ricombinate umana, VEGF-A₁₂₁ ricombinate umana, anticorpi monoclonali anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2 ed anti-VEGF (R&D System, Minneapolis, MN); anticorpi IgG antitopo FITC (Becton & Dickinson, San Fernando, CA);

kit per ECL (Amersham International, Amersham, England); filtri di fluoruro di polivinilidene (PVDF) (Millipore, Windsor, MA, USA); Ex-Taq (Takara Bio Europe S.A., 14 Gennevilliers, France); filtri per chemiotassi (Neuroprobe, Cabin John, MD, USA).

Tamponi

Il tampone utilizzato in questi esperimenti è composto da PIPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 110 mM, KCl 5 mM. Esso è designato dalla lettera "P". Il tampone PCG contiene, oltre a P, CaCl₂ 5 mM e 1 g/L di D-glucosio⁵⁵. Il tampone PACGM contiene, oltre a P, albumina sierica umana al 3%, CaCl₂ 1 mM, 1 g/L di destrosio e 0,25 g/L di MgCl₂·6H₂O, pH 7,4; il PGMD contiene, oltre a P, 0,25 g/L di MgCl₂·6H₂O, 10 mg/L di DNase, e 1 g/L di gelatina, pH 7,4. Il PBS contiene 8 g/L di NaCl, 1,15 g/L di Na₂HPO₄, 200 mg/L di KCl, e 200 mg/L di KH₂PO₄, pH 7,4.

Colture di linee mastocitarie

La linea mastocitaria umana HMC-1 è stata gentilmente donata dal Dr. J.H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN); le cellule sono state mantenute in coltura ad una densità di $3-9 \times 10^5$ cellule/ml di IMDM

supplementato con 10% FCS, 2 mM L-glutamina, 1.2 mM monotioglicerolo, 1% penicillina/streptomina. La linea mastocitaria umana LAD2 è stata generosamente donata dal Dr. D.D. Metcalfe (NIH, Bethesda, MD); le cellule sono state mantenute in coltura con una densità di $2-5 \times 10^5$ cellule/ml di StemPro[®]34 SFM medium contenente 100 ng/ml SCF, 2 mM L-glutamina e 1% soluzione antibiotica.

Isolamento, purificazione e colture dei mastociti sinoviali

Per l'utilizzo di tessuto umano, il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Napoli Federico II ed i pazienti hanno firmato un consenso informato. Colture primarie di mastociti sinoviali umani (HSyMC) sono state ottenute dal tessuto sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide sottoposti ad intervento di sinoviectomia. Il tessuto sinoviale microscopicamente sano è stato finemente tagliato con le forbici. I frammenti sono stati dispersi nei loro elementi cellulari attraverso incubazione sequenziale con pronasi (2 mg/g di tessuto), chimopapaina (0,5 mg/g di tessuto), collagenasi (1 mg/g di tessuto) ed elastasi (10 U/g di tessuto). Le cellule sono state risospese in PGMD ed ulteriormente purificate attraverso elutriazione controcorrente.

Dopo questa procedura, le frazioni contenenti le maggiori percentuali di mastociti (15-20%) sono state selezionate ed ulteriormente purificate (>80%) attraverso centrifugazione su gradienti di densità. Le cellule sono state purificate (>97%) attraverso selezione immunomagnetica positiva utilizzando il CD117 Microbead Kit (Miltenyi Biotec) ed utilizzate per gli esperimenti. Il numero e la purezza dei mastociti sono stati determinati attraverso una colorazione toluidina/Alcian blue.

Analisi citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica delle molecole presenti sulla superficie cellulare è stata condotta come descritto di seguito. Dopo la saturazione dei siti di legame non specifici con IgG di coniglio, le cellule sono state incubate (20 minuti a 4 °C) con anticorpi specifici o con controlli isotipici. Per la marcatura indiretta a questa fase è seguita una seconda incubazione per 20 minuti a 4°C con un anticorpo anti-isotipo marcato con un fluorocromo. Infine, le cellule sono state lavate ed analizzate con un citofluorimetro FACSCalibur utilizzando il software Cell Quest (Becton & Dickinson, San Fernando, CA). In tutte le analisi

citofluorimetriche eseguite è stato acquisito un totale di 10^4 eventi per ogni campione.

RT-PCR

L'RNA cellulare totale dei mastociti è stato isolato mediante RNAqueous™-4PCR (Ambion) in accordo con il protocollo fornito dal produttore. L'RNA è stato quantizzato mediante spettroscopia. 2 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA utilizzando 200 U di Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). 2 µl di DNA retrotrascritto è stato poi amplificato utilizzando primers specifici per VEGF-A₁₂₁₋₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-1/KDR, sVEGFR-1/Flt-1, e per GAPDH, utilizzato come controllo (Tabella 2). I prodotti della reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su un gel al 2% di agarosio contenente bromuro di etidio. La rilevazione è stata eseguita con luminescenza UV.

Specificità	Oligonucleotide senso (5'-3')	Oligonucleotide antisenso (5'-3')
VEGF-A121-165	GTGAATGCAGACCAAAGAAAG	AAACCCTGAGGGAGGCTC
VEGF-A189	GTATAAGTCCTGGAGCGT	AAACCCTGAGGGAGGCTC
VEGF-B	GTCCCTGGAAGAACACAGCC	VEGF-B GCCATGTGTCACCTTCGCA
VEGF-C	ATGTTTTCTCGGATGCTGGA	CATTGGCTGGGGAAGAGTTT
VEGF-D	GTATGGACTCTCGCTCAGCAT	AGGCTCTCTTCATTGCAACAG
VEGFR-1/Flt-1 (coppia 1)	ATCAGAGATCAGGAAGCACC	GGAACCTCATCTGGGTCCAT
VEGFR-1/Flt-1 (coppia 2)	CTATGGAAGATCTGATTTCTT	GGTATAAATACACATGTGCTT
VEGR-2/KDR	GACTTCAACTGGGAATACCC	CATGGCCCTGACAAATGTG
sVEGFR-1	ACAATCAGAGGTGAGCACTG	CTGCTATCATCTCCGAACTC
GAPDH	GCCAAAGGGTCATCATCTC	GTAGAGGCAGGGATGATGTTC

Tabella 2. Primers utilizzati per PCR.

Chemiotassi

La chemiotassi dei mastociti sinoviali è stata effettuata utilizzando la tecnica della camera di Boyden. In sintesi, 25 µl di tampone (PACGM) o di concentrazioni variabili degli stimoli da testare, sono stati posti in triplicato nel compartimento inferiore di una camera per micro-chemiotassi costituita da 48 pozzetti (Neuroprobe, Cabin John, MD). Il compartimento inferiore è stato ricoperto da una membrana in

policarbonato con pori di 8 μm (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA). Successivamente 50 μl (5×10^4 cellule/pozzetto) della sospensione in PAGCM sono stati aggiunti in ogni pozzetto del compartimento superiore. La camera per la chemiotassi è stata posta per 3 ore a 37°C, in un incubatore umidificato con CO₂ al 5% (Automatic CO₂ Incubator, Model 160 IR, ICN Flow). Al termine dell'incubazione la membrana di policarbonato è stata rimossa, lavata con PAGCM nella parte superiore, fissata e colorata con May-Grunwald/Giemsa. La chemiotassi è stata valutata mediante la conta al microscopio del numero di cellule che sono rimaste adese alla membrana con pori da 8 μm ⁵⁶. Per ogni esperimento sono stati contati 10 campi per ciascuno dei pozzetti in triplicato ad un ingrandimento di 40x. L'analisi di controllo è stata eseguita per discriminare la migrazione spontanea (chemiochinesi) dalla chemiotassi indotta dagli stimoli. I mastociti sono stati posti nei pozzetti del compartimento superiore della camera mentre concentrazioni ottimali degli stimoli o del tampone PAGCM sono state aggiunte nel compartimento superiore, inferiore o in entrambi. La chemiochinesi è stata definita in assenza di stimoli chemiotattici o quando questi erano presenti sia nel compartimento superiore che in quello inferiore della

camera di Boyden. Da questi esperimenti è risultato che i mastociti migrano in risposta agli stimoli prevalentemente per chemiotassi e non per chemiochinesi.

ELISA

Il rilascio del VEGF-A nei sovranatanti dei mastociti umani è stato determinato in duplicato utilizzando un kit commerciale per ELISA (R&D System, Minneapolis, MN).

Irradiazione e fonte dei raggi ultravioletti A

L'irradiazione dei campioni è stata ottenuta con una banca di tre tubi fluorescenti (Philips TL09, 40 W) di cui lo spettro di emissione era compreso tra i 320 e 400 nm. L'irradianza di 3.0 mW/cm^2 alla distanza di 10 cm, è stata misurata prima di ogni irradiazione con un *UVA meter* (Spectrolyne Model DM-365H, Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA). I campioni sono stati irradiati in piastre di plastica con le seguenti dosi di raggi ultravioletti A (UVA): 5 J/cm^2 , 25 J/cm^2 , 50 J/cm^2 per la valutazione del rilascio di VEGF-A; 0.5 J/cm^2 , 1.5 J/cm^2 , 2.5 J/cm^2 , 5 J/cm^2 , 15 J/cm^2 , 25 J/cm^2 , per la valutazione della mortalità cellulare; e 5

$J//\text{cm}^2$ per l'analisi dell'mRNA. Per eliminare le lunghezze d'onda al di sotto dei 320 nm, è stato utilizzato un filtro di vetro dello spessore di 5 mm.

Analisi statistica

Il risultati corrispondono alla media \pm ES. I valori dei gruppi sono stati sottoposti a test t di Student⁵⁷. La significatività è stata definita come $p < 0.01$.

RISULTATI

Valutazione dell'espressione dell'mRNA per il VEGF nei mastociti umani

In una prima serie di esperimenti abbiamo valutato l'espressione dell'mRNA per il VEGF nei mastociti, utilizzando le cellule di due linee mastocitarie umane (HMC1 e LAD2). Le cellule sono state lisate in un tampone per la preparazione dell'RNA totale. L'RNA è stato retrotrascritto e poi amplificato con la PCR in presenza di primers specifici per le differenti isoforme di VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e per la GAPDH, utilizzata come controllo. L'analisi dei prodotti della PCR mediante elettroforesi in gel di agarosio ha rilevato l'espressione di tre isoforme del VEGF-A (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, e VEGF-A₁₈₉) e due isoforme del VEGF-B (VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆) da parte dei mastociti. Inoltre è stato individuato l'mRNA per VEGF-C e VEGF-D, due mediatori dello sviluppo linfatico²⁹ (Figura 3).

Determinazione del VEGF-A nei mastociti umani

Successivamente abbiamo esaminato l'espressione proteica di VEGF-A nei mastociti umani. A tale scopo, i mastociti sono stati lisati con 1% Triton X-100/PBS in presenza di inibitori delle proteasi. Il contenuto totale di VEGF-A è stato misurato mediante saggio ELISA. La Figura 4 mostra come i mastociti contengano effettivamente il VEGF-A a livello proteico.

Espressione dei recettori per il VEGF nei mastociti umani

I recettori per il VEGF, VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/KDR, sono costitutivamente espressi sulle cellule endoteliali³⁷ e su diverse cellule del sistema immunitario⁵⁸⁻⁵⁹⁻⁶⁰. Questi due recettori presentano una notevole analogia strutturale; tuttavia, differiscono per le loro caratteristiche biochimiche. Abbiamo analizzato l'espressione a livello di mRNA di VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e sVEGFR-1/Flt-1 nei mastociti umani. L'analisi dei prodotti della PCR mediante elettroforesi in gel di agarosio ha rilevato l'espressione costitutiva dell'mRNA per VEGFR-1, VEGFR-2, e sVEGFR-1 (Figura 5).

Valutazione citofluorimetrica dei recettori per il VEGF nei mastociti sinoviali umani.

Al fine di confermare l'espressione dei recettori per i VEGFR anche in cellule primarie isolate da tessuti umani, abbiamo condotto una serie di esperimenti di citofluorimetria su preparazioni di mastociti isolati dalla sinovia di pazienti che andavano incontro a sinoviectomia in quanto affetti da artrite reumatoide.

Abbiamo valutato l'espressione dei recettori per il VEGF nei mastociti sinoviali umani. Le cellule sono state incubate con anticorpi monoclonali anti-VEGFR1, anti VEGFR2, anti-VEGFR3 coniugati con il fluorocromo PE e con anti-IgE coniugate con il fluorocromo FITC o con controlli isotipici. La Figura 6 mostra che la maggior parte dei mastociti sinoviali esprime tali recettori.

Effetto del VEGF-A₁₆₅ sulla chemiotassi dei mastociti sinoviali umani

Il VEGF-A stimola la migrazione delle cellule endoteliali⁶¹ ed è chemiotattico per alcune cellule del sistema immunitario umano^{62, 63}. Tra le isoforme del VEGF-A, il VEGF-A₁₆₅ rappresenta l'isoforma più studiata per il suo effetto angiogenico e mitogenico sulle cellule

endoteliali. In questo gruppo di esperimenti abbiamo valutato gli effetti *in vitro* di un ampio intervallo di concentrazioni (10-500 ng/ml) di VEGF-A₁₆₅ sulla chemiotassi degli HSyMC. La Figura 7 mostra i risultati di due esperimenti che dimostrano che il VEGF-A₁₆₅ induce la chemiotassi degli HSyMC in maniera concentrazione-dipendente, raggiungendo un plateau a 500 ng/ml. È stata inoltre effettuata un'analisi di controllo per verificare se la migrazione dei mastociti indotta dal VEGF-A₁₆₅ fosse provocata dalla chemiotassi o dalla chemiocinesi. I risultati di tale analisi indicano che il VEGF-A₁₆₅ provoca la migrazione dei mastociti in maniera concentrazione-dipendente quando aggiunto nel compartimento inferiore della camera di chemiotassi, mentre una concentrazione ottimale di VEGF-A₁₆₅ (500 ng/ml) aggiunta alle cellule nei pozzetti superiori o in entrambi i compartimenti della camera di chemiotassi non induce la migrazione direzionale dei mastociti (dati non mostrati). Quindi, la migrazione dei mastociti indotta dal VEGF-A è un risultato della chemiotassi e non della chemiocinesi.

Questi esperimenti confermano che i mastociti sinoviali esprimono i recettori per il VEGF e che questi ultimi sono attivi nell'indurre la migrazione direzionale.

Effetto dei raggi ultravioletti A sul rilascio di VEGF-A dai mastociti umani

Nell'ultima serie di esperimenti abbiamo studiato le variazioni del rilascio di mediatori proangiogenici dai mastociti (HMC-1) a seguito dell'esposizione a raggi UVA. E' noto infatti, che nella carcinogenesi foto-indotta l'angiogenesi rappresenta una tappa essenziale per la crescita tumorale. Questi esperimenti intendono verificare il coinvolgimento di mastociti ed UVA nel processo di cancerogenesi.

Le HMC-1 sono state irradiate in piastre di plastica ad una distanza di 10 cm dai tubi fluorescenti e con una dose crescente di raggi ultravioletti A (UVA): 5 J/cm², 25 J/cm², 50 J/cm². Al termine dell'irradiazione metà dei campioni sono stati stimolati con lo ionoforo del calcio A23187 (200 nM) e con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA 25 ng/ml) ed incubati in mezzo supplementato per 24 ore a 37° C. Al termine dell'incubazione, il sovranatante delle colture cellulari è stato raccolto ed il contenuto totale di VEGF-A immunoreattivo è stato misurato mediante ELISA. I risultati hanno mostrato che la stimolazione con ionoforo e PMA induce un forte rilascio di VEGF-A dalle HMC-1. Inoltre, abbiamo potuto osservare che l'irradiazione con UVA inibisce significativamente ed in

maniera dose-dipendente il rilascio di VEGF-A nei mezzi condizionati (Figura 8).

Al fine di verificare che gli effetti inibitori degli UVA non fossero dovuti ad un'aumentata mortalità cellulare, abbiamo analizzato le cellule mediante colorazione con tripan blue (per la valutazione della mortalità) e mediante analisi citofluorimetrica dopo marcatura con propidio ioduro (per la valutazione dell'apoptosi). Le cellule sono state irradiate con UVA a dosi crescenti: 0.5 J/cm^2 , 1.5 J/cm^2 , 2.5 J/cm^2 , 5 J/cm^2 , 15 J/cm^2 , 25 J/cm^2 e successivamente stimulate con lo ionoforo del calcio e PMA. I risultati, come si vede nella Figura 9, mostrano che la percentuale di cellule in necrosi o in apoptosi rispetto al campione non irradiato era al di sotto del 10 % per le dosi di UVA di 0.5 J/cm^2 , 1.5 J/cm^2 , 2.5 J/cm^2 , tra il 15 ed il 20 % per la dose di UVA di 5 J/cm^2 e tra il 20 ed il 30 % per la dose di UVA di 15 J/cm^2 e 25 J/cm^2 . Poiché alla dose di 5 J/cm^2 osserviamo già una forte inibizione del rilascio di VEGF in assenza di mortalità cellulare significativa, abbiamo deciso di continuare i nostri esperimenti irradiando le cellule con questa dose ottimale di UVA.

Valutazione dell'espressione dell'mRNA per il VEGF-A₁₆₅ nei mastociti umani dopo esposizione a radiazioni ultraviolette A

Negli esperimenti successivi abbiamo valutato l'espressione dell'mRNA per il VEGF-A nelle HMC-1 irradiate con UVA a 5 J/cm² e successivamente stimulate con ionoforo e PMA. Dopo amplificazione con PCR in presenza di primers specifici per VEGF-A e per la GAPDH, i prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi. L'analisi dell'RNA ha dimostrato che l'irradiazione con UVA inibisce significativamente l'espressione del VEGF-A₁₆₅ rispetto al controllo (Figura 10).

Questi risultati mostrano un'azione inibitoria dose-dipendente dei raggi UVA sul rilascio e sulla espressione di VEGF-A dalle cellule HMC-1, sottolineando come i mastociti possano essere influenzati dalle radiazioni UV nella secrezione di mediatori proangiogenici, importanti in diverse situazioni patologiche.

DISCUSSIONE

Il sistema VEGF/VEGFR è considerato il principale sistema che regola l'angiogenesi, la linfoangiogenesi ed il rimodellamento tessutale nelle malattie infiammatorie e nei tumori^{30, 32}. Infatti, è sempre più evidente il ruolo che questo complesso sistema biologico può svolgere nelle reazioni immunitarie ed infiammatorie⁶⁴⁻⁶⁵⁻⁶⁶

Tra le varie isoforme del VEGF, il VEGF-A, oltre ad essere il più potente, esplica importanti effetti regolatori in diversi processi infiammatori³⁷.

Nel nostro studio abbiamo identificato un nuovo meccanismo attraverso il quale i mastociti regolano l'angiogenesi mediante la sintesi e la secrezione di differenti isoforme di VEGF-A.

Tra i diversi sistemi disponibili *in vitro* per studiare la biologia dei mastociti umani, l'isolamento di mastociti primari purificati da tessuto umano rappresenta senza dubbio la metodica che più di ogni altra consente di avvicinarsi alle condizioni fisiopatologiche *in vivo*. A tal scopo è stata messa a punto una metodica per isolare mastociti primari dalla sinovia di pazienti affetti da artrite reumatoide che andavano

incontro ad intervento di sinoviectomia. Considerate le difficoltà tecniche e di resa correlate a tale metodica, abbiamo utilizzato a scopo comparativo le linee mastocitarie HMC-1 e LAD2.

Nei nostri esperimenti abbiamo dimostrato che i mastociti umani esprimono costitutivamente l'mRNA per le tre principali isoforme di VEGF-A (121, 165, and 189) e per le due isoforme di VEGF-B (167 and 186) che giocano un ruolo essenziale nell'angiogenesi. I mastociti esprimono inoltre l'mRNA per il VEGF-C e -D⁶⁷, i principali fattori che regolano la linfoangiogenesi. Abbiamo inoltre confermato la presenza di VEGF-A a livello proteico.

Gli esperimenti successivi sono stati eseguiti su mastociti sinoviali umani, i quali rappresentano un modello particolarmente interessante, considerate le forti evidenze riguardanti il ruolo dei mastociti in diverse forme di artrite, tra cui spicca il lavoro nel quale Lee *et al.* hanno dimostrato come la presenza dei mastociti risulti essenziale nello sviluppare una forma di artrite sperimentale nel topo¹⁷.

Abbiamo determinato, mediante analisi citofluorimetrica, l'espressione dei recettori per il VEGF sulla superficie cellulare dei mastociti sinoviali. Tali esperimenti hanno mostrato che i mastociti

sinoviali esprimono costitutivamente sulla membrana plasmatica i recettori per il VEGF.

Successivamente abbiamo valutato dal punto di vista funzionale il sistema del VEGF e dei suoi recettori sui mastociti. Gli esperimenti di chemiotassi hanno confermato l'ipotesi che il VEGF rappresenti un forte stimolo chemiotattico per le cellule. In base a questi dati, è possibile tracciare uno scenario nel quale il VEGF, liberato nei siti di infiammazione ed angiogenesi, funge da fattore chemiotattico per i mastociti. Tali cellule risultano a loro volta capaci di produrre VEGF, amplificando pertanto la risposta angiogenica e promuovendo l'ulteriore reclutamento di cellule infiammatorie.

Queste evidenze definiscono inoltre un nuovo ed interessante loop autocrino, che comprende il rilascio immunologico del VEGF-A da parte dei mastociti e l'espressione dei suoi recettori sulla loro superficie.

Tali osservazioni rafforzano la significatività del sistema VEGF/recettori da noi individuato sui mastociti soprattutto in considerazione di eventuali applicazioni farmacologiche. I risultati di questo studio potrebbero avere importanti implicazioni in questo senso: è possibile ipotizzare che un efficace antagonismo del sistema

VEGF/recettore, ottenuto utilizzando un inibitore a peso molecolare della tirosina-chinasi associata ai VEGFRs⁶⁸, un anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF⁶⁹, un decoy receptor solubile per il VEGF⁷⁰ o proteine di fusione che sequestrano il VEGF, possa essere utilizzato nella pratica clinica per controllare alcune patologie, come l'artrite reumatoide, nelle quali i mastociti giocano un ruolo rilevante. D'altro canto è noto che i mastociti, strategicamente localizzati intorno e vicino ai vasi sanguigni e linfatici^{71, 72}, sono aumentati in diversi tumori umani^{73, 74}, nei quali la loro presenza è correlata all'angiogenesi ed alle metastasi^{75, 76}. Inoltre, i mastociti ed i loro mediatori sono implicati nella patogenesi dell'asma bronchiale⁷⁷ e di diverse malattie infiammatorie croniche⁷⁸. A questo proposito, recentemente è stato ad esempio dimostrato che, in un modello sperimentale di artrite indotta da collagene, l'utilizzo di un inibitore della tirosina kinasi (imatinib mesilato) previene e riduce in maniera significativa l'artrite⁷⁹. Poiché l'imatinib mesilato è capace di bloccare, insieme ad altre vie di segnale dipendenti da tirosina-kinasi, il fattore di sopravvivenza c-Kit espresso in maniera specifica sui mastociti, gli autori hanno ipotizzato che l'effetto protettivo nei confronti dell'artrite fosse dovuto ad una inibizione dei mastociti. Il meccanismo

alla base di queste osservazioni potrebbe essere almeno in parte riconducibile agli effetti di tale farmaco sul rilascio di VEGF da parte dei mastociti.

Nell'ultima serie di esperimenti abbiamo infine considerato l'influenza che i raggi ultravioletti (UVA) hanno sul rilascio di mediatori proangiogenici dai mastociti. Tali cellule sono localizzate in siti anatomici esposti all'ambiente esterno (cute, vie aeree, tratto gastrointestinale) ed i raggi UVA penetrano in profondità fino al derma, per cui potrebbero direttamente interagire con i mastociti. I nostri risultati dimostrano che gli UVA inibiscono in maniera dose-dipendente il rilascio di VEGF dai mastociti. Questo potrebbe in parte spiegare l'effetto benefico dei trattamenti fototerapici in alcune dermatosi croniche. I livelli di VEGF sono aumentati in diverse malattie infiammatorie della cute; emblematica è la psoriasi dove l'angiogenesi sostiene lo stato flogistico e favorisce l'iperplasia tissutale^{80,81}. La capacità dei raggi ultravioletti di modulare l'angiogenesi mediata dai mastociti, potrebbe rappresentare un nuovo target terapeutico, applicabile in diverse condizioni morbose autoimmunitarie.

In conclusione, i risultati descritti in questo studio hanno dimostrato che i mastociti umani rappresentano una importante fonte di VEGF-A, principale fattore angiogenico. L'identificazione dei recettori del VEGF sulla superficie dei mastociti ha individuato un nuovo ed importante loop autocrino. Queste evidenze convalidano l'ipotesi che il rilascio di fattori angiogenici, insieme alla capacità di rispondere ad essi, rappresenti un meccanismo importante attraverso il quale i mastociti sono implicati in molteplici condizioni patologiche. Inoltre gli esperimenti eseguiti dimostrano che la modulazione dell'angiogenesi da parte dei mastociti può essere condizionata da agenti fisici esterni; questo dato aggiunge un ulteriore tassello alla comprensione della complessa interazione tra ambiente esterno e cellule del sistema immunitario.

FIGURE

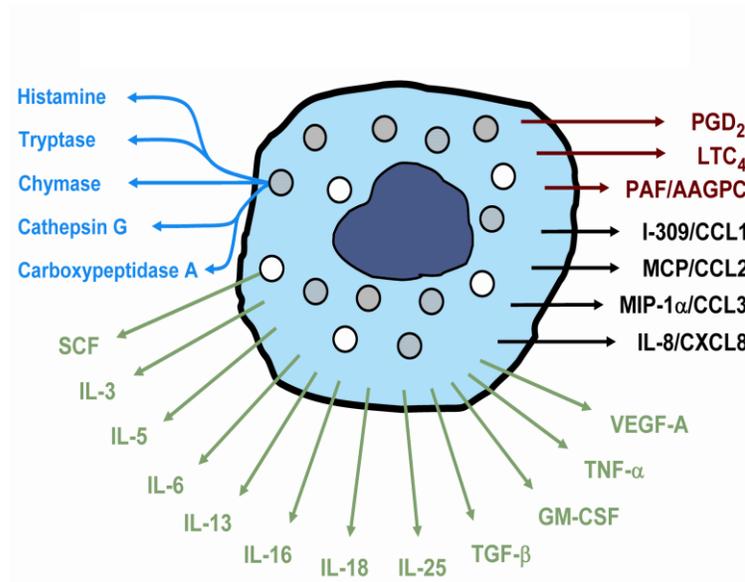


Figura 1. Mediatori sintetizzati e liberati da mastociti umani

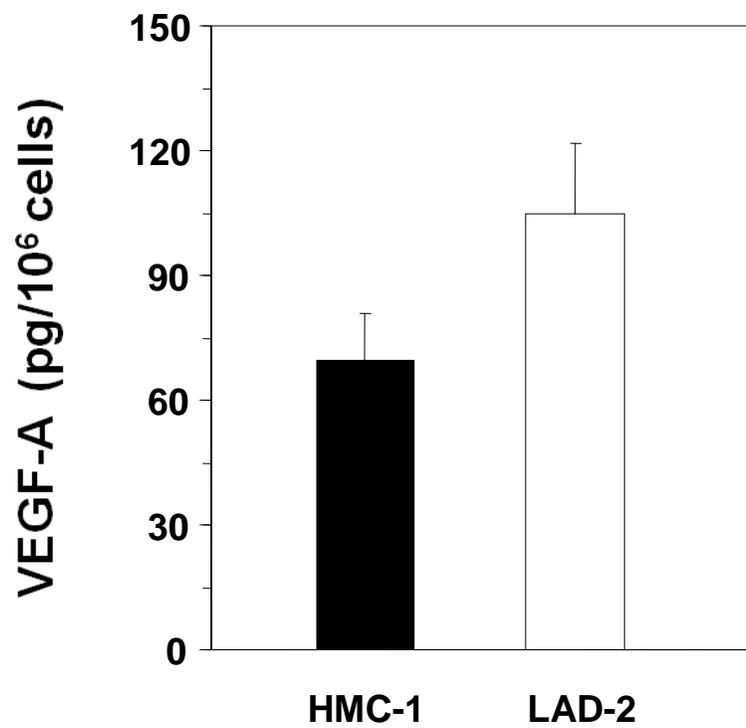


Figura 4. Espressione del VEGF nei mastociti umani

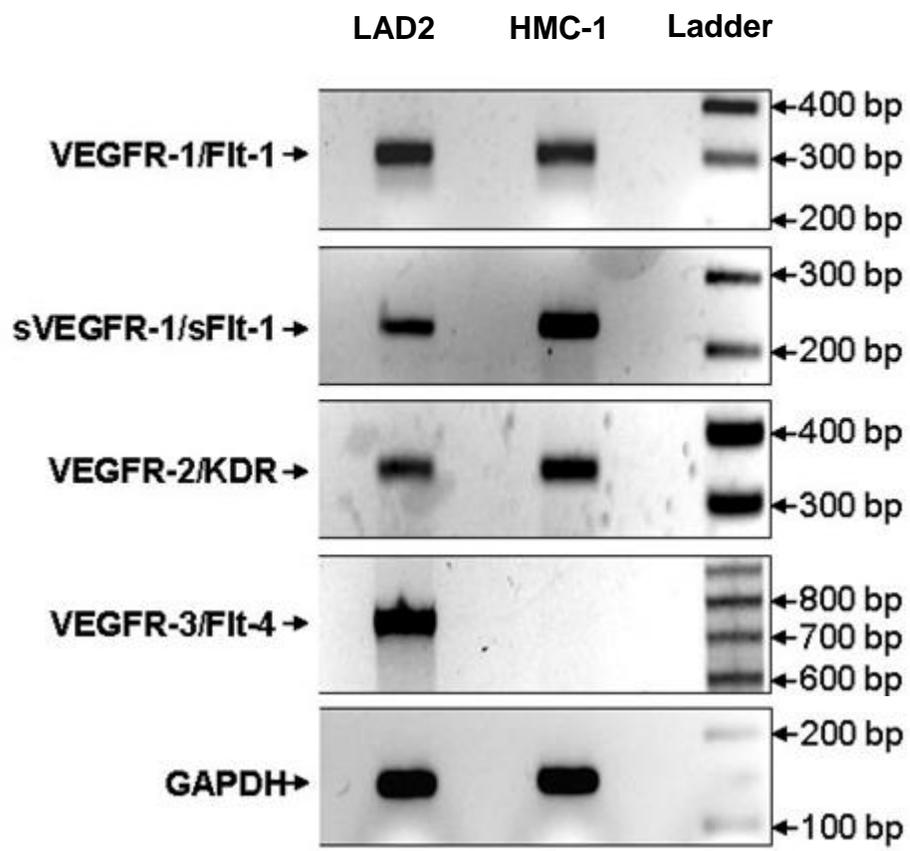


Figura 5. Espressione dell'mRNA per i recettori del VEGF nei mastociti umani

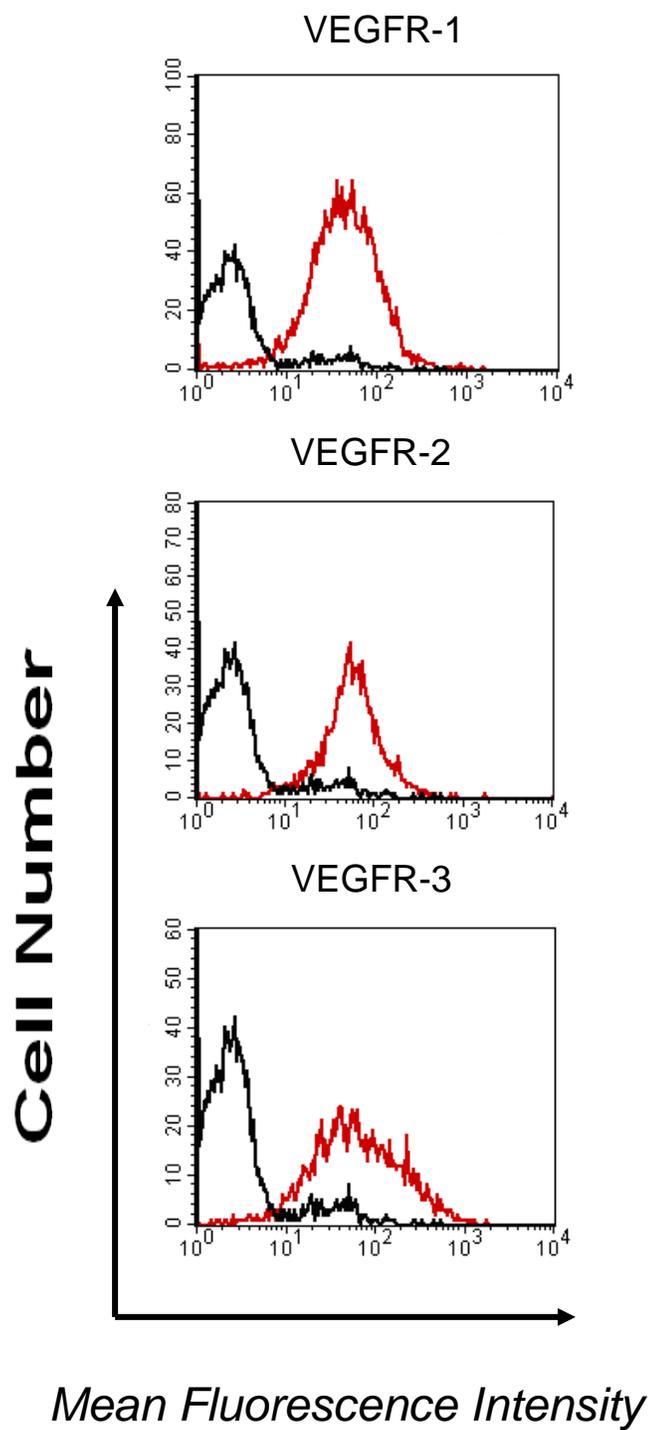


Figura 6. Valutazione citofluorimetrica dell'espressione dei VEGFRs nei mastociti sinoviali

HSyMC

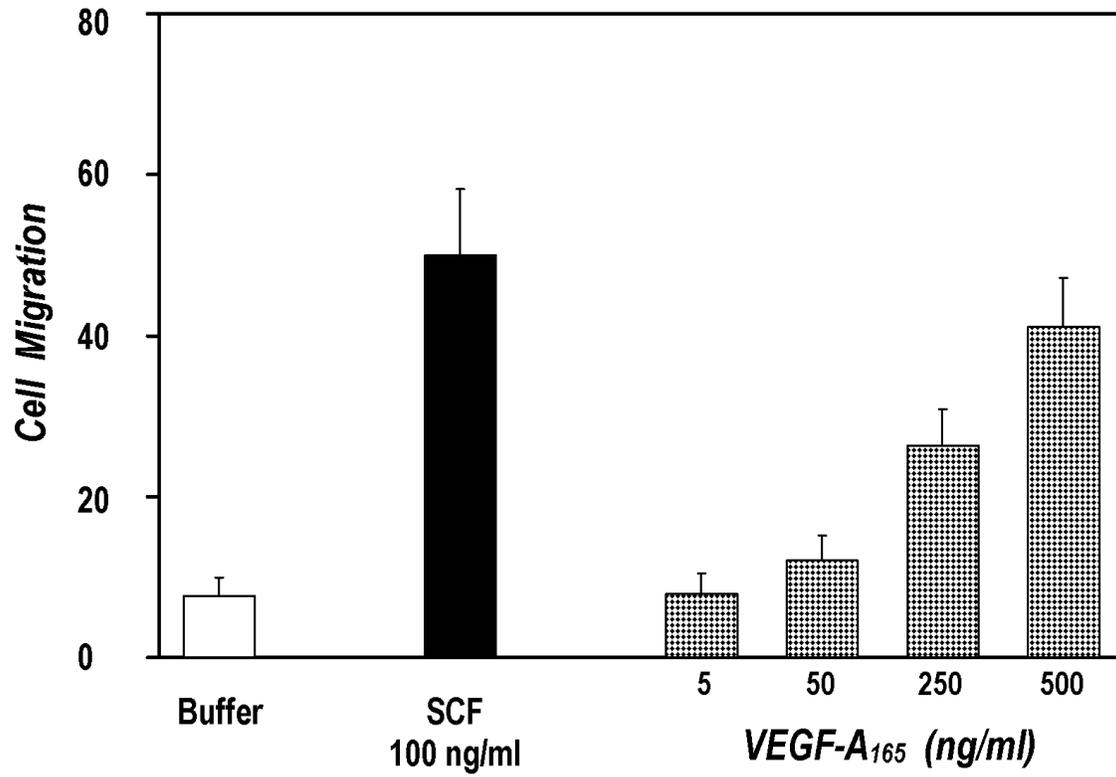


Figura 7. Effetto del VEGFA₁₆₅ sulla chemiotassi dei mastociti sinoviali

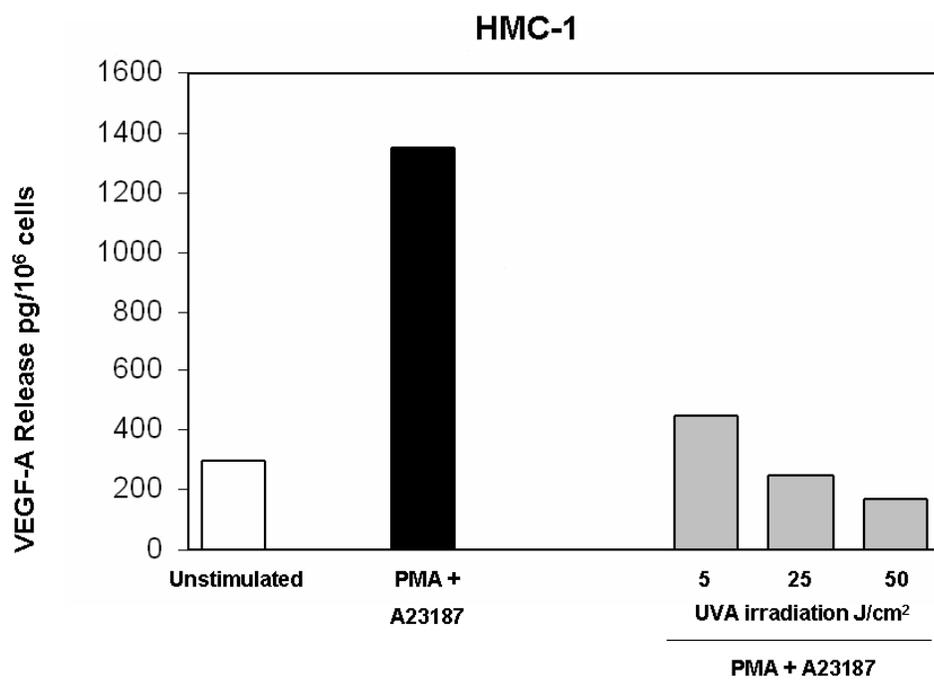


Figura 8. Effetto degli UVA sul rilascio di VEGF-A dalle cellule HMC-1

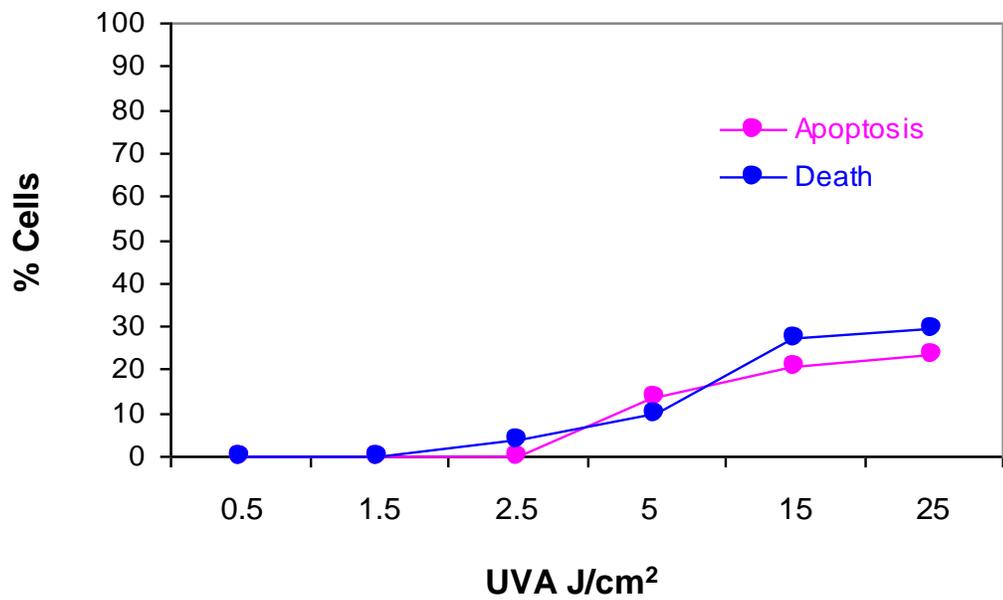


Figura 9. Valutazione della mortalità cellulare delle HMC-1 dopo esposizione a differenti dosi di UVA

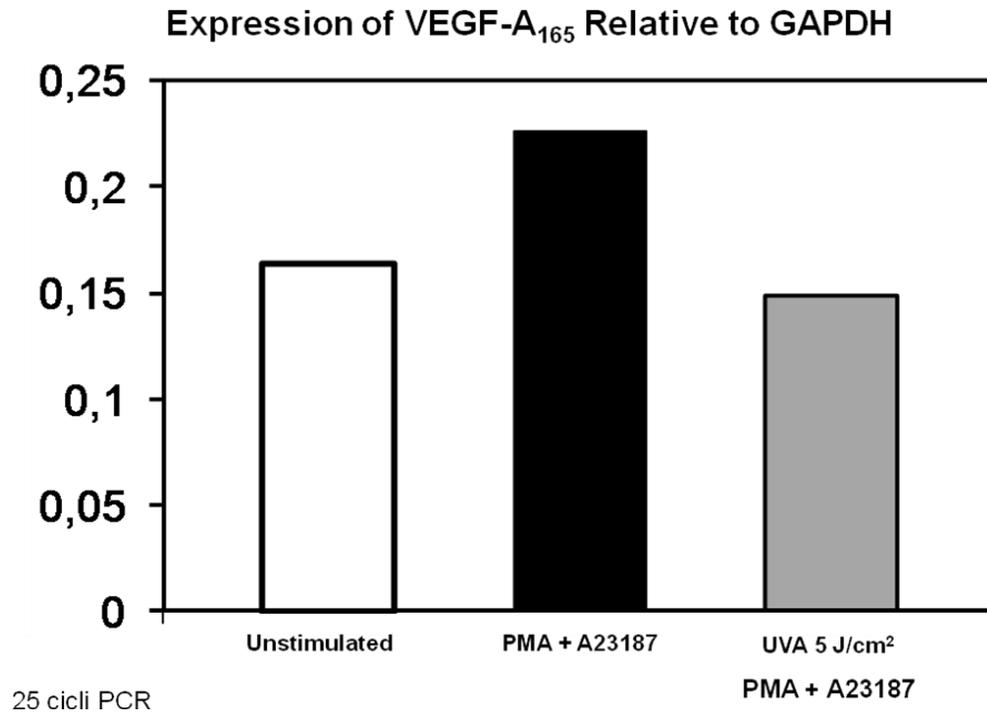


Figura 10. Espressione dell'mRNA per il VEGF nelle HMC-1 dopo esposizione a raggi UVA

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Turner H, Kinet JP. 1999. Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature* 402:B24-30
- ² Williams CMM, Galli SJ. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:847-59
- ³ McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK. 2003. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7761-66
- ⁴ Knight PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR. 2000. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J. Exp. Med.* 192:1849-56
- ⁵ Metz M, Grimaldeston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. 2007. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol. Rev.* 17:304-28.
- ⁶ Kovanen PT. 2007. Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol. Rev.* 217:105-22.
- ⁷ Theoharides TC, Conti P. 2004. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol.* 25:235-41.

-
- ⁸ Metz M, Maurer M. 2007. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* 28:234-41.
- ⁹ Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky A, Williams CM, Tsai M. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23:749-86.
- ¹⁰ Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:53-9.
- ¹¹ Galli SJ, Tsai M, Wershil BK. 1993. The *c-kit* receptor, stem cell factor and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol.* 142:965-74.
- ¹² Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8:478-86.
- ¹³ Gilfillan AM, Tkaczyk C. 2006. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 6:218-30
- ¹⁴ Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:53-59
- ¹⁵ Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381 75-77.
- ¹⁶ Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature* 381:77-80.

-
- ¹⁷ Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. 2002. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 297:1689-92
- ¹⁸ Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. 2000. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 191:813-22.
- ¹⁹ Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. 2008. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Ann. Rev. Immunol.* 26:705-39.
- ²⁰ Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. 2007. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat. Med.* 13:1211-8.
- ²¹ Kripke M. 1984. Immunological unresponsiveness induced by ultraviolet radiation. *Immunol Rev.* 102:80- 87; 102: 38.
- ²² Fisher M, Kripke M. 1977. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74:1688–1692.
- ²³ Byrne SN, Limon-Flores AY, Ullrich SE. 2008. Mast cell migration from the skin to the draining lymph nodes upon ultraviolet irradiation represents a key step in the induction of immune suppression. *J Immunol.* 180:4648–55.
- ²⁴ Hart PH, Grimaldeston MA, Finlay-Jones JJ. 2000. Mast cells in UV-B-induced immunosuppression. *J Photochem Photobiol B.* 55:81–7

-
- ²⁵ Grimbaldston MA, Finlay-Jones JJ, Hart PH. 2006. Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? *Photochem. Photobiol. Sci.* 5: 177–183.
- ²⁶ Crivellato E, Nico B, Ribatti D. 2008. Mast cells and tumour angiogenesis: New insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Lett.* Apr 29. [Epub ahead of print]
- ²⁷ Theoharides TC, Conti P. 2004. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol.* 25:235-41.
- ²⁸ Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-74.
- ²⁹ Adams RH, Alitalo K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:464-78.
- ³⁰ Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-36.
- ³¹ Kerbel RS. 2008. Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 358:2039-49.
- ³² Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1:27-31.
- ³³ Taylor PC, Sivakumar B. 2005. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17:293-98.
- ³⁴ Yancopoulos GD, Davis S, W. Gale N, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-48.

-
- ³⁵ Haiko PI, Karkkainen MJ, Achen MG, Stacker A, Alitalo K. 2007. Growth factors and lymphangiogenesis. In *Angiogenesis. From basic science to clinical applications*. N. Ferrara, ed. CRC, New York. 53-74.
- ³⁶ Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak H. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:983-85.
- ³⁷ Ferrara N. 2007. Vascular endothelial growth factor: pathophysiology and clinical implications. In *Angiogenesis. From basic science to clinical applications*. N. Ferrara, ed. CRC, New York. 1-36.
- ³⁸ Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 65:550-63.
- ³⁹ Dor Y, Porat R, Keshet E. 2001. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280:C1367-74
- ⁴⁰ Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. 2002. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell. Biol.* 4:E2-E5.
- ⁴¹ Robinson CJ, Stringer SE. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 114:853-65.
- ⁴² Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2003. VEGF-receptor signal transduction *Trends Biochem. Sci.* 28:488-94.

-
- ⁴³ Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 269:25646-54.
- ⁴⁴ Kendall RL, Wang G, Thomas KA. 1996. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226:324-8.
- ⁴⁵ Roeckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA. 1998. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp. Cell. Res.* 241:161-70.
- ⁴⁶ Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
- ⁴⁷ Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kogel H, Welker P, Lippert U, Henz BM, Moller A. 1998. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol. Biol. Cell.* 9:875-84.
- ⁴⁸ Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli SJ. 1998. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of Fc epsilon receptor I expression. *J. Exp. Med.* 188:1135-45.

-
- ⁴⁹ Gilcrest H, Cheewatrakoolpong B, Billah M, Egan RW, Anthes JC, Greenfeder S. 2003. Human cord blood-derived mast cells synthesize and release I-309 in response to IgE. *Life Sci.* 73:2571-81.
- ⁵⁰ Abdel-Majid RM, Marshall JS. 2004. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J. Immunol.* 172:1227-36.
- ⁵¹ Chetta A, Zanini A, Foresi A, Del Donno M, Castagnaro A, D'Ippolito R, Baraldo S, Testi R, Saetta M, Olivieri D. 2003. Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:751-57.
- ⁵² Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:295-301.
- ⁵³ Lee YC, Lee HK. 2001. Vascular endothelial growth factor in patients with acute asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:1106-12.
- ⁵⁴ de Paulis A, Marinò I, Ciccarelli A, de Crescenzo G, Concardi M, Verga L, Arbustini E, Marone G. 1996. Human synovial mast cells. I. Ultrastructural in situ and in vitro immunologic characterization. *Arthritis Rheum.* 39:1222-33.
- ⁵⁵ de Paulis A, Cirillo R, Ciccarelli A, Condorelli M, Marone G. 1991. FK-506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human FcεRI+ cells. *J. Immunol.* 146:2374-81.

-
- ⁵⁶ Romagnani P, de Paulis A, Beltrame C, Annunziato F, Dente V, Maggi E, Romagnani S, Marone G. 1999. Tryptase-chymase doublepositive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am. J. Pathol.* 155:1195-204.
- ⁵⁷ Snedecor GW, Cochran WG. 1980. Statistical Methods. *The Iowa State University Press.* Ames, IA.
- ⁵⁸ Feistritzer C, Kaneider NC, Sturn DH, Mosheimer BA, Kähler CM, Wiedermann CJ. 2004. Expression and function of the vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 in human eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30:729-35.
- ⁵⁹ Levi-Schaffer F, Pe'er J. 2001. Mast cells and angiogenesis. *Clin. Exp. Allergy* 31:521-24.
- ⁶⁰ Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-43.
- ⁶¹ Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. 2003. VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 13:169-75.
- ⁶² Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-43.
- ⁶³ Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. 2001. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97:785-91

-
- ⁶⁴ Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, Pola R, Rutella S, Willis J, Gasbarrini A, Fiocchi C. 2006. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 130:2060-73.
- ⁶⁵ Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. 2001. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:1034-38.
- ⁶⁶ Ikeda M, Hosoda Y, Hirose S, Okada Y, Ikeda E. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR, and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J. Pathol.* 191:426-33.
- ⁶⁷ Wirzenius M, Tammela T, Uutela M, He Y, Odorisio T, Zambruno G, Nagy JA, Dvorak HF, Yla-Herttuala S, Shibuya M, Alitalo K. 2007. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J. Exp. Med.* 204:1431-40.
- ⁶⁸ Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57:4593-99.
- ⁶⁹ Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Oland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Adziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Ancopoulos GD, Rudge JS. 2002. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11393-8.

⁷⁰ van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M, Ferrara N. 1999. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J. Clin. Invest.* 104:1613-20.

⁷¹ Bowers HM Jr, Mahapatro RC, Kennedy JW. 1979. Numbers of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer* 43:568-73.

⁷² Paiva DD, Morais JC, Pilotto J, Veloso V, Duarte F, Lenzi HL. 1996. Spectrum of morphologic changes of lymph nodes in HIV infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91:371-79.

⁷³ Acikalin MF, Oner U, Topcu I, Yasar B, Kiper, H, Colak E. 2005. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. *Dig. Liver. Dis.* 37:162-69.

⁷⁴ Welsh TJ, Green RH, Richardson D, Waller DA, O'Byrne KJ, Bradding P. 2005. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 23:8959-67.

⁷⁵ Kondo K, Muramatsu M, Okamoto Y, Jin D, Takai S, Tanigawa N, Miyazaki M. 2006. Expression of chymase-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis. *J. Surg. Oncol.* 93:36-42.

⁷⁶ Takanami I, Takeuchi K, Naruke M. 2000. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 88:2686-92.

⁷⁷ Marone G, Triggiani M, Genovese A, de Paulis A. 2005. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv. Immunol.* 88:97-160.

⁷⁸ Dawicki W, Marshall JS. 2007. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 19:31-38.

⁷⁹ Paniagua RT, Sharpe O, Ho PP, Chan SM, Chang A, Higgins JP, Tomooka BH, Thomas FM, Song JJ, Goodman SB, Lee DM, Genovese MC, Utz PJ, Steinman L, Robinson WH. 2006. *J. Clin. Invest.* 116:2633-42

⁸⁰ Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF. 1994. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med.* 180:1141–1146

⁸¹ Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. 2001. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol.* 96:822–828