

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI
(XXIII Ciclo)**

Dott.ssa Valeria Arena

**Ruolo delle fosfolipasi A₂ nella risposta angiogenica
indotta da linee tumorali in cellule endoteliali.**

TESI di DOTTORATO

Coordinatore: *Chiar.mo Prof. Angelo Vanella*

Tutor: *Chiar.mo Prof. Mario Alberghina*

Anni Accademici 2007-2010

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
1.1 La barriera emato-encefalica	pag. 5
1.1.1 <i>Cellule endoteliali</i>	pag. 7
1.1.2 <i>Periciti</i>	pag. 10
1.2 Fosfolipidi nei microcapillari cerebrali e retinici	pag. 11
1.2.1 <i>Composizione lipidica delle cellule endoteliali</i>	pag. 11
1.2.2 <i>Fosfolipasi A₂</i>	pag. 11
1.2.3 <i>Fosfolipasi A₂ citosolica</i>	pag. 12
1.2.4 <i>Fosfolipasi A₂ calcio-indipendente</i>	pag. 16
1.3 MAP chinasi	pag. 17
1.4 L'angiogenesi	pag. 18
1.5 Il melanoma	pag. 22
1.6 Il glioma	pag. 23
SCOPO DEL LAVORO	pag. 25
MATERIALI E METODI	pag. 29
2.1 Colture cellulari	pag. 30
2.2 Preparazione dei “media” condizionati dal melanoma e dal glioma	pag. 30
2.3 “Release” di acido arachidonico	pag. 31
2.4 Saggio di attività enzimatica per la PLA₂	pag. 31
2.5 Determinazione della produzione di PGE₂ e VEGF	pag. 32
2.6 Saggio di proliferazione cellulare	pag. 32
2.7 Migrazione cellulare mediante “wounding assay”	pag. 33
2.8 Elettroporazione	pag. 34

2.9 Trasfezione di siRNA	pag. 35
2.10 Wester Blotting	pag. 36
2.11 Microscopia confocale a fluorescenza	pag. 36
2.12 Estrazione dell'RNA totale e RT-PCR	pag. 37
RISULTATI	pag. 39
3.1 “Release” di acido arachidonico	pag. 40
3.2 Proliferazione cellulare	pag. 41
3.3 Migrazione cellulare	pag. 46
3.4 Effetto del VEGF su proliferazione, migrazione ed espressione della PLA₂	pag. 51
3.5 Attività della PLA₂ e produzione di PGE₂ e VEGF	pag. 53
3.6 Elettroporazione	pag. 56
3.7 Saggio di trasfezione di siRNA	pag. 59
3.8 Espressione delle PLA₂ ed effetto degli inibitori delle chinasi	pag. 60
3.9 “Up-regulation” dell'mRNA di cPLA₂ e iPLA₂ da parte dei media condizionati	pag. 63
3.10 Espressione delle COX ed effetto degli inibitori specifici	pag. 65
3.11 Espressione di PKC alfa ed ERK1/2 ed effetto degli inibitori specifici	pag. 67
3.12 Microscopia confocale	pag. 70
3.13 Espressione delle PLA₂ e di ERK1/2 in cellule endoteliali primarie (BBEC)	pag. 82

CONCLUSIONI

pag. 84

BIBLIOGRAFIA

pag. 90

INTRODUZIONE

1.1 La barriera emato-encefalica

La barriera emato-encefalica (BBB) rappresenta una struttura dinamica e selettiva, costituita da microcapillari altamente specializzati che svolgono l'importante funzione di isolare il tessuto nervoso dal circolo ematico proteggendolo da eventuali danni. Ciò consente di mantenere costante l'omeostasi del microambiente cerebrale che è fondamentale per l'attività e la funzionalità neuronale. I tipi cellulari che si organizzano a comporre questa complessa rete di microcapillari sono rappresentati da cellule endoteliali, periciti, macrofagi perivascolari, oltre che dalla lamina basale.

La tipica funzione di "barriera" dei microcapillari cerebrali è dovuta principalmente alla peculiare struttura delle cellule endoteliali che si organizzano disponendosi in maniera tale da circondarne il lume [1]. A ridosso delle cellule endoteliali, e circondati con esse dalla membrana basale, si trovano i periciti [2] (Fig. 1), cellule polimorfiche e ramificate, particolarmente abbondanti nei microcapillari cerebrali e di retina. Grazie ai loro prolungamenti, i periciti creano rapporti con la membrana basale e con l'endotelio. La funzione di queste cellule all'interno della BBB non è ancora del tutto nota, sebbene, grazie alla loro capacità contrattile, sembra che mantengano l'integrità strutturale dei microcapillari e ne regolino il calibro e il tono vascolare [3-5].

Una delle più importanti caratteristiche della barriera emato-encefalica è la presenza di *tight junctions*, che limitano fortemente il passaggio aspecifico attraverso l'endotelio; pertanto, il trasporto di sostanze e di nutrienti avviene tramite carrier e canali specifici che consentono di controllare il flusso di metaboliti [6,7]. Queste proprietà consentono alla BBB di regolare il passaggio di soluti come elettroliti, vitamine, minerali, precursori di neurotrasmettitori e proteine regolatrici in entrambe le direzioni. Questa struttura, inoltre, limita il passaggio soltanto a poche cellule mononucleari, come i linfociti-T attivati. Si ritiene, infatti, che la BBB sia immunologicamente avvantaggiata poiché sotto costante sorveglianza dei leucociti [8].

E' stato osservato che i periciti sono associati alle cellule endoteliali mediante diversi tipi di giunzioni, in particolare *gap junctions* e, comunicando metabolicamente, influenzano il loro reciproco grado di proliferazione e

differenziamento [9]. Questi due tipi cellulari, dunque, svolgono un ruolo centrale nella fisiologia dei microcapillari.

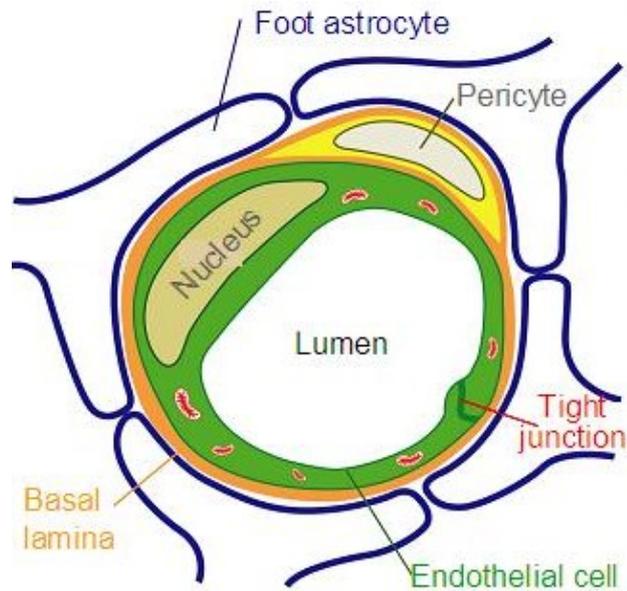


Fig. 1 Schema della sezione trasversale di un microcapillare cerebrale della BBB. Le cellule endoteliali che formano il lume del vaso, sono circondate dalla membrana basale ed associate ad astrociti e periciti.

Le cellule endoteliali contribuiscono, con il loro metabolismo fosfolipidico, al mantenimento dell'integrità vascolare e al controllo di aspetti fisiologici importanti, come la coagulazione e la pressione sanguigna. Molte di queste funzioni, infatti, dipendono dal rilascio di una serie di mediatori lipidici da esse prodotti come, ad esempio, gli eicosanoidi, il cui precursore è l'acido arachidonico [10,11]. Essi comprendono le prostaciline, le prostaglandine, i leucotrieni, e infine i trombossani, che svolgono complessivamente una serie di ruoli fisiologici importanti: le prostaglandine sono coinvolte nel mantenimento della normale omeostasi e del tono vascolare, mentre le prostaciline sono potenti vasodilatatori, oltre che inibitori dell'aggregazione piastrinica. Nei periciti, molti degli aspetti del metabolismo fosfolipidico devono essere chiariti, ma sembra accertato che esso svolga ruoli importanti nella cooperazione con l'endotelio, alla base della fisiologia dei microcapillari.

Le cellule endoteliali subiscono l'influenza oltre che dei periciti, probabilmente di altri tipi cellulari, quali gli astrociti, i macrofagi perivascolari e della lamina basale (Fig. 2); essi si pensa conferiscano le specifiche caratteristiche di barriera [12].

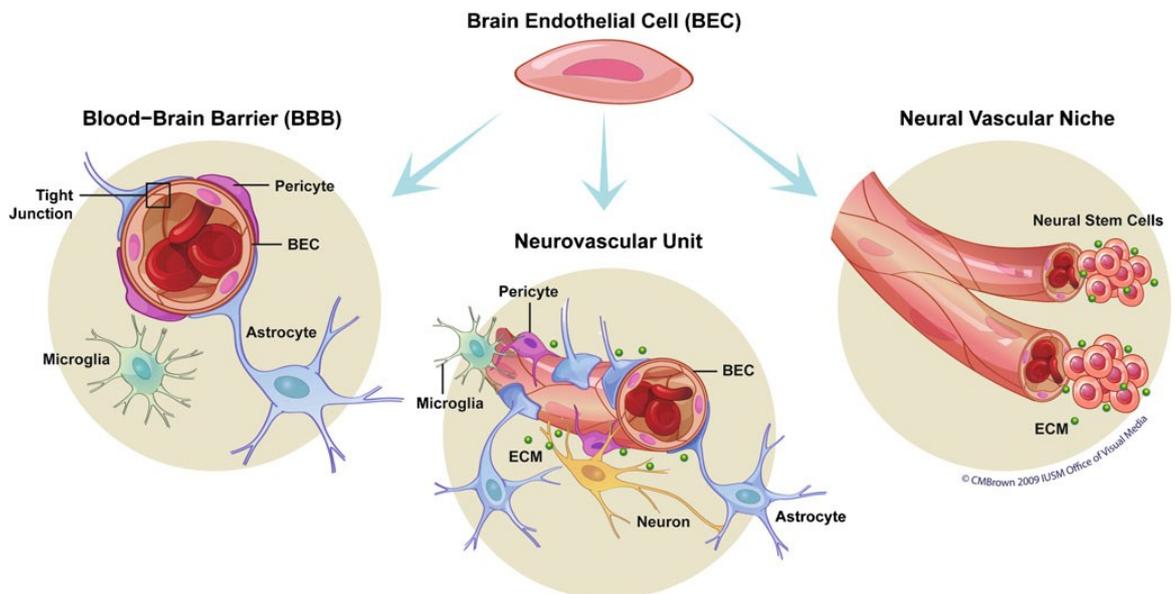


Fig. 2 Le cellule endoteliali di barriera interagiscono con le cellule gliali e neuronali per formare tre distinte strutture anatomiche e funzionali, essenziali per l'omeostasi del cervello.

1.1.1 Cellule endoteliali

Si tratta di cellule biologicamente dinamiche e attive, capaci di regolare e restringere il passaggio di sostanze tra sangue e sistema nervoso centrale (CNS). L'endotelio svolge l'importante funzione di modulare l'apporto di nutrienti e il passaggio di soluti, ormoni e macromolecole; esso è responsabile della produzione di molecole che regolano la contrazione di cellule muscolari lisce oppure periciti. Le cellule endoteliali restringono il passaggio di sostanze attraverso il CNS e ne controllano quindi il microambiente. Per svolgere tale funzione, infatti, queste cellule presentano delle differenze morfologiche e funzionali rispetto alle cellule endoteliali di organi periferici.

Le cellule endoteliali dei vasi sanguigni dei vari organi mostrano caratteristiche differenti, che vengono regolate da specifici segnali locali. L'endotelio dei microcapillari cerebrali, che costituiscono la base anatomica della BBB, mostra caratteristiche proprie sia dell'endotelio che dell'epitelio [13].

Le cellule endoteliali sono unite insieme da complessi sistemi specializzati comprendenti: *gap junctions*, desmosomi, *adherens junctions* e *tight junctions* [14-18]. Ciascuna giunzione è costituita da un complesso di proteine transmembrana specifico per ogni tipo. Nelle cellule epiteliali le giunzioni aderenti e le giunzioni strette sono ben separate tra di loro; nelle cellule endoteliali invece esse sono interconnesse ed interposte nello spazio paracellulare [19]. L'integrità delle *tight junctions* dipende dalle giunzioni aderenti [20], ed il numero di giunzioni strette è inversamente proporzionale alla permeabilità delle giunzioni stesse [21]. La funzione importante di queste giunzioni così serrate è quello di limitare e controllare il trasporto di composti idrofilici attraverso le pareti dei vasi sanguigni. La resistenza attraverso le cellule endoteliali dei microcapillari può essere di 1000-2000 Ω per cm^2 , comparato con i 10 Ω nelle cellule endoteliali periferiche [22].

Per quanto riguarda il trasporto transcellulare aspecifico esso è fortemente limitato dalla continuità dell'endotelio capillare e dalla quasi assenza di vescicole pinocitotiche nelle normali condizioni, se comparata alle cellule endoteliali periferiche o dei plessi coroidei [23-26]. Le molecole possono diffondere attraverso la membrana plasmatica delle cellule endoteliali, equilibrarsi e distribuirsi tra sangue e tessuto cerebrale. La libera diffusione dipende dalle proprietà fisico-chimiche dei composti, dalla liposolubilità, dal peso molecolare, dalla struttura terziaria, dalla carica elettrica [27,28]. Generalmente, molecole idrosolubili non usano questa *pahtway*, sebbene alcune sostanze, come morfina e alcuni peptidi, possono attraversare la BBB ad un certo grado mediante tale via [26,29-33]. Tali sostanze attraversano il CNS mediante specifici sistemi di trasporto coinvolti nei trasferimenti di molecole essenziali attraverso la barriera cellulare [12,34]. Sono stati identificati sistemi *carrier* per aminoacidi, vitamine (come tiamina, acido ascorbico, biotina), acidi grassi liberi (arachidonato, palmitato), esosi (glucosio, fruttosio), minerali, zinco, magnesio, acidi nucleici/basi puriniche, acidi monocarbossilici [34-37]. Per esempio, GLUT-1 un trasportatore specifico del D-glucosio, è espresso in maniera specifica nelle cellule endoteliali della BBB, oltre che negli eritrociti [38]. Altri composti come colina, proteine, polipeptidi e fattori di crescita sono in grado di attraversare la barriera grazie al riconoscimento da parte di uno specifico recettore seguito da internalizzazione del complesso mediante endocitosi [38]. Anche i meccanismi di efflusso sono importanti per la stabilità ed il mantenimento del microambiente del CNS [26-33]. Questi meccanismi regolano i livelli di nutrienti e

minerali e detossificano il CNS, aumentando l'impermeabilità della BBB contro le tossine circolanti.

Alcune attività enzimatiche peculiari delle cellule endoteliali sono responsabili della degradazione di composti entrati nel sangue e di prodotti di rifiuto nel fluido cerebro-spinale (CSF) [39,40]. Le monoamino ossidasi A e B, la catecol-*O*-metil transferasi, oppure la pseudocolinesterasi, sono enzimi coinvolti nella degradazione di neurotrasmettitori presenti nel CNS. Tra le barriere enzimatiche vanno ricordate inoltre le fosfatasi alcalina (PAlk) e la γ -GT, due tra i più importanti marker della BBB presenti sul lato luminale [41]. La presenza di PAlk è responsabile di processi di defosforilazione, transfosforilazione e trasporto di ioni fosfato [42-44]. La γ -GT è responsabile della degradazione del glutatione e cisteinilglicina [45,46]; partecipa, inoltre, al trasporto di aminoacidi attraverso la BBB [47-49] e al metabolismo dei peptidoleucotrieni [50].

Le cellule endoteliali possono esprimere l'antigene II MHC come le cellule endoteliali periferiche, sebbene esse non siano in grado di stimolare la proliferazione dei linfociti-T [51]. Inoltre la carica dei letti vascolari del CNS differisce da quella dei siti periferici; si incontra, infatti, una carica negativa più alta sulle cellule endoteliali, che però non ha effetto sull'adesione dei leucociti [52]. La carica anionica è più stabile sulle cellule endoteliali cerebrali che sulle cellule endoteliali periferiche, e non si altera in seguito all'attivazione di tali cellule da parte delle citochine, sebbene sia stata osservata una redistribuzione dell'endotelio aortico [52].

Un'altra importante differenza consiste nella loro capacità di catturare i leucociti circolanti, nonostante esse siano meno adesive rispetto agli altri letti vascolari [53,54]. Le cellule endoteliali, infatti, esprimono livelli più bassi delle molecole di adesione, come per esempio ICAM-1, ICAM-2 (*intercellular cell adhesion molecole*) e VACM (*vascular adhesion molecole*) [52]. ICAM-1 partecipa specificamente al traffico di leucociti. Esperimenti con topi knockout per tale proteina hanno messo in evidenza la sua importanza nella migrazione dei linfociti nel CNS [55]. ICAM-2 è espressa costitutivamente sulle cellule endoteliali e può essere importante per la circolazione in normali tessuti non infiammati [56]. Le VCAM sono coinvolte nel legame alle integrine. Nel sistema nervoso in condizioni basali i livelli di espressione di ICAM e VCAM sono molto bassi *in vitro* [57] e *in vivo* [58]. Generalmente la loro espressione sulle cellule endoteliali (ECs) è aumentata in

condizioni di infiammazione mediante citochine come IL-1 (*Interleukin-1*), TNF- α (*Tumor necrosis factor*), IFN- γ (*Interferon- γ*) e lipopolisaccaride (LPS) [59-61].

1.1.2 Periciti

I periciti sono un unico gruppo di cellule polimorfiche ramificate di origine mesenchimale, intimamente associate alle cellule endoteliali, presenti in molti tessuti (Fig. 1). Queste cellule proiettano i loro prolungamenti nella membrana basale e rivestono una vasta parte della circonferenza microvascolare. La loro distribuzione e struttura possono variare molto da tessuto a tessuto e a seconda del diametro dei capillari. Essi possono differire tra loro per il *pattern* di crescita, nell'organizzazione morfologica e nel turnover metabolico. In generale, sono più numerosi nei capillari cerebrali rispetto ai capillari retinici [62,63].

I periciti svolgono un ruolo regolatorio nell'angiogenesi del cervello [3], nella formazione di *tight junctions* tra le cellule endoteliali e contribuiscono al controllo della capacità vasodinamica dei microvasi ed alla loro stabilità strutturale. Esperimenti *in vitro* hanno mostrato che le cellule endoteliali ed i periciti comunicano metabolicamente ed insieme cooperano alla formazione della membrana basale [3,4]. E' stato recentemente osservato che i periciti cerebrali sono in grado di indurre e stimolare le funzioni della BBB in cellule endoteliali cerebrali in coltura [64 -66]. Nonostante la loro stretta relazione con le cellule endoteliali e il loro ruolo fondamentale nella stabilizzazione della struttura dei microcapillari cerebrali in vivo [67], pochi dati sono disponibili sulla rilevanza funzionale dei periciti per le proprietà della BBB. Probabilmente periciti e cellule endoteliali agiscono insieme modulando il calibro ed il tono vascolare. Un'importante caratteristica, che conferma tale ipotesi strutturale, è la presenza in essi di entrambe le isoforme (muscolare e non) di actina e miosina [68-70]. I periciti possono produrre e secernere diversi agenti immunomodulatori che possono regolare la risposta immunitaria nel Sistema Nervoso Centrale (CNS) [71-72]. I due tipi cellulari sono associati tra di loro tramite diversi tipi di giunzione, in particolare *gap junctions* [73,74] e sono in grado di influenzare il loro reciproco grado di proliferazione e differenziamento. A tal proposito è noto l'effetto inibente esercitato dai periciti sulla crescita delle cellule endoteliali tramite la produzione di TGF- β [75,76]. Non sorprende, dunque, che essi siano implicati nello sviluppo di varie patologie cardiovascolari [77,78], come

l'ipertensione [79] e, insieme alle cellule endoteliali, nello sviluppo di malattie come la sclerosi multipla, l'invecchiamento, la microangiopatia diabetica, la vascolarizzazione tumorale, le malattie autoimmuni, le infezioni e la malattia di Alzheimer, tutte condizioni degenerative associate ad un'aumentata permeabilità delle barriere ematiche.

Vari studi sostengono il ruolo regolatorio dei periciti sul flusso ematico dovuto alla loro capacità contrattile. Essi sembrano svolgere un ruolo analogo alle cellule muscolari lisce nei capillari, aiutando o eseguendo la vasocostrizione. E' stato anche osservato che i periciti sono cellule pluripotenti in quanto capaci di differenziarsi in adipociti [80], osteoblasti [81], macrofagi e fibroblasti [5,82]. In particolare i periciti dei microcapillari cerebrali possono essere considerati dei macrofagi cerebrali, in quanto è stato più volte suggerito che essi sono simili alle cellule della microglia [83-86]. I periciti hanno anche la capacità di fagocitare composti che hanno attraversato la barriera endoteliale [87] e così limitare il trasporto nel parenchima del CNS.

1.2 Fosfolipidi nei microcapillari cerebrali

1.2.1 Composizione lipidica delle cellule endoteliali

Le cellule endoteliali dei microcapillari contribuiscono, con il loro metabolismo fosfolipidico, al mantenimento dell'integrità vascolare. Sin dal 1970, anno in cui cominciarono i primi studi sulle cellule endoteliali di aorta bovina [88], le attività enzimatiche che degradano i fosfolipidi sono state descritte in maniera dettagliata, ed è oggi molto grande il numero di lavori scientifici sulle fosfolipasi e sugli agonisti coinvolti nei processi infiammatori e nell'aterosclerosi.

1.2.2 Fosfolipasi A₂

Le fosfolipasi A₂ (PLA₂), rappresentano una grande famiglia di enzimi che liberano un'ampia varietà di prodotti lipidici i quali possiedono attività in numerose vie di traduzione del segnale. Nei mammiferi sono stati identificati 19 enzimi che possiedono attività PLA₂ [11,89 90].

La famiglia di PLA₂ comprende tre enzimi, tra i quali la PLA₂ citosolica gioca un ruolo importante nel metabolismo dell'acido arachidonico.

La famiglia delle PLA₂ Ca⁺⁺-indipendente (iPLA₂, 80 kDa, tipo VI) comprende sia enzimi citosolici sia associati alle membrane, dove potrebbero svolgere un importante ruolo nel rimodellamento fosfolipidico. La iPLA₂ è fortemente inibita dal bromoenol lattone (BEL).

Le fosfolipasi A₂ secretorie (sPLA₂ tipo II) hanno basso peso molecolare (13-15 kDa), richiedono concentrazioni millimolari di Ca⁺⁺ e non sono specifiche per fosfolipidi contenenti acido arachidonico. Il loro preciso sito di azione (fosfolipidi della membrana plasmatica) e la loro potenziale attività sulle cellule vicine (periciti e astrociti perivasali) sono oggetto di studio.

Sebbene tutte queste forme di PLA₂ catalizzino la stessa reazione, esse differiscono notevolmente tra loro nella struttura primaria, secondaria e terziaria, nel meccanismo catalitico e negli eventi che regolano la loro espressione e attività. Da queste osservazioni si può ipotizzare che ci siano specifiche funzioni associate a ciascuna forma di PLA₂.

Diversi tipi di cellule endoteliali esprimono la PLA₂ citosolica come mostrato da analisi con RT-PCR [91], da Western blotting e da studi di trasfezione con oligonucleotidi antisense. L'enzima potrebbe essere fosforilato a livello della serina 505 da parte di p42-p44 MAP kinasi (ERK-2 e ERK-1) e di conseguenza traslocare dal citosol alle membrane, in presenza di concentrazioni submicromolari di Ca⁺⁺ [92,93]. In molti tipi cellulari l'idrolisi della fosfatidilcolina (PtdCho) da parte delle PLA₂, dopo specifici stimoli fisiologici, è responsabile del rilascio della maggior parte di acido arachidonico. Il rilascio di acidi grassi dalla posizione *sn*-2 della PtdCho potrebbe essere un importante meccanismo di alterazione della composizione delle catene aciliche dei fosfolipidi per la successiva liberazione di acido arachidonico, indispensabile per la sintesi degli eicosanoidi in tutte le cellule dei mammiferi.

1.2.3 Fosfolipasi A₂ citosolica

La fosfolipasi A₂ citosolica (cPLA₂) è un enzima calcio dipendente che catalizza l'idrolisi del legame estere in posizione *sn*-2 dei fosfolipidi, con particolare

preferenza per quelli contenenti acido arachidonico [94,95], e rappresenta quindi un enzima chiave nella produzione di eicosanoidi mediata da recettori.

Tra le diverse isoforme delle PLA₂ trovate nei tessuti di mammifero, la PLA₂ del gruppo IV di 85 kDa gioca un ruolo chiave nel *release* indotto da agonisti di acido arachidonico [96,97]. Questo ruolo importante è stato confermato da esperimenti condotti su topi knockout per tale proteina ed è confermato dalla sua distribuzione ubiquitaria nei tessuti di mammifero [98,99]. L'acido arachidonico è presente in specie fosfolipidiche costituenti le membrane di una vasta gamma di tipi cellulari tra cui le cellule endoteliali [88]. L'arachidonato prodotto dalle cellule, una volta rilasciato, può divenire precursore di un elevato numero di molecole dette "eicosanoidi", un gruppo di derivati degli acidi grassi insaturi a lunga catena che funzionano come regolatori metabolici rivestiti di un ruolo cruciale nei processi fisiologici e patologici del CNS. Studi precedenti hanno mostrato che la cPLA₂ è presente nel citosol di cellule quiescenti e trasloca a livello delle membrane cellulari in seguito a stimolazione da parte di una varietà di agonisti [100-103]. La traslocazione dell'enzima è un processo mediato dal suo dominio di legame lipidico calcio-dipendente (CaLB) o dominio C2, che promuove il legame dei fosfolipidi in seguito ad alte [Ca²⁺] intracellulari [104] (Fig. 3).

La cPLA₂ è soggetta ad una complessa regolazione sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale [105] e regolata da differenti fattori come la [Ca⁺⁺] [96,97,106]. Il Ca⁺⁺ si lega ad un dominio aminoterminale C2 [107] e guida il legame alla membrana [104,108-111].

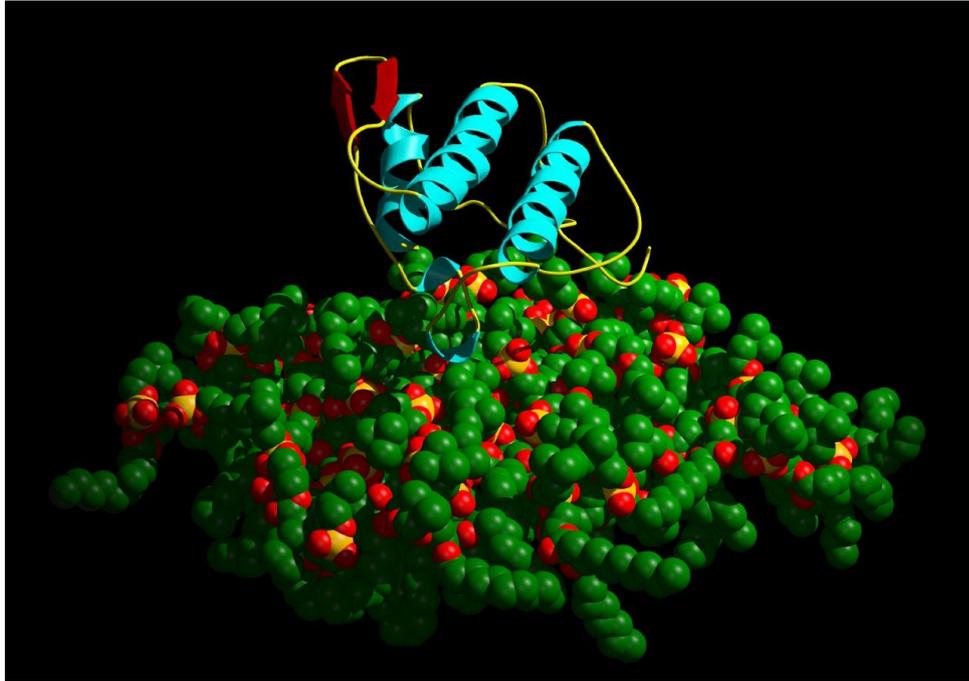


Fig. 3 Struttura 3D della fosfolipasi A₂ citosolica.

L'enzima è anche attivato in seguito alla fosforilazione dei residui di serina operata dalle MAPKs (chinasi attivate da mitogeni). Ad oggi, gli studi condotti su cellule endoteliali hanno dimostrato che sia la proteina chinasi mitogeno-attivata p38 che p42/44, membri della famiglia delle MAPK, sia la proteina chinasi C (PKC), sono coinvolti nel *release* di acido arachidonico mediato dalla cPLA₂ [112-116]. Alcuni recenti studi hanno dimostrato che la cPLA₂ è capace di traslocare anche all'interno del nucleo, meccanismo mediato proprio dalla fosforilazione da parte di p38^{MAPK} e p42/44^{MAPK}. L'uso di inibitori specifici che bloccano l'attivazione di queste chinasi ha dimostrato che la localizzazione nucleare di cPLA₂ dipende dalla loro attività [117].

Il meccanismo regolatorio della fosforilazione di cPLA₂ sembra piuttosto complesso. In cellule di ovario di Hamster cinese è stato visto che la fosforilazione della Ser⁵⁰⁵ da parte delle chinasi attivate da mitogeni è essenziale per il *release* di acido arachidonico mediato da agonisti [118]. Diversi studi hanno dimostrato che tale effetto dipende dal tipo cellulare e dal tipo di agonista. Per esempio, in piastrine stimulate da trombina, la fosforilazione a livello della Ser⁵⁰⁵ non è richiesta per il *release* di acido arachidonico [119]. Nei macrofagi tale fosforilazione non è essenziale per l'attivazione dell'enzima in risposta ad agonisti che provocano un aumento costante degli ioni calcio, ma è importante quando l'aumento di tali ioni è

temporaneo [120]. In realtà l'enzima viene fosforilato su siti multipli di Ser (per es. Ser⁴⁵⁴, Ser⁴³⁷, Ser⁵⁰⁵, Ser⁷²⁷). Come osservato in cellule SF9 di insetto, infettate con baculovirus, tali siti appaiono fosforilati costitutivamente in cellule non stimolate, ma solo la fosforilazione a livello della Ser⁵⁰⁵ sembra contribuire all'attivazione della cPLA₂ [104].

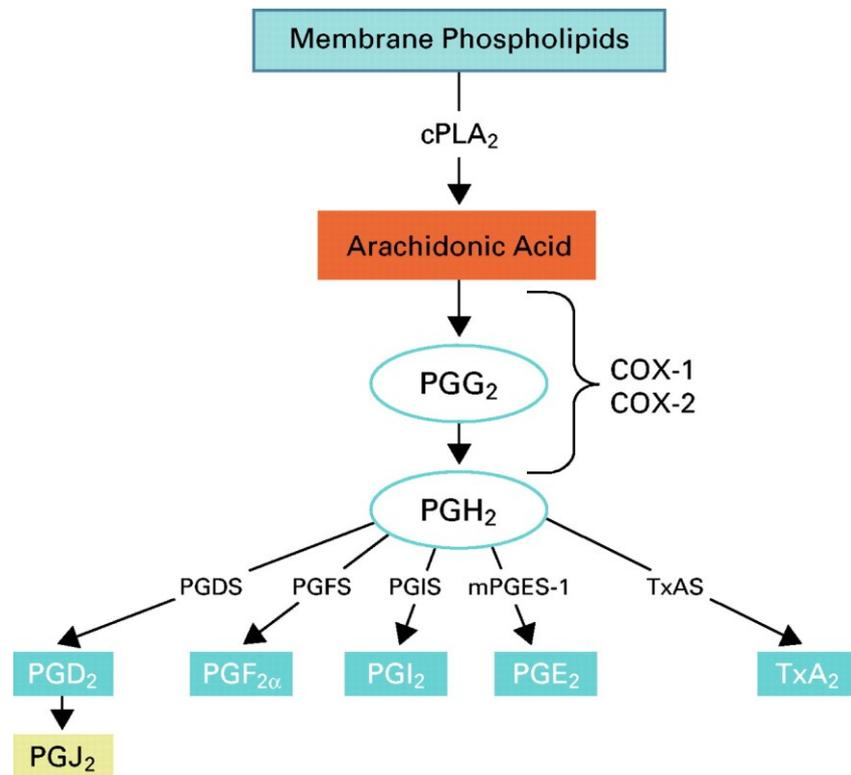


Fig. 4 Ruolo della cPLA₂ nell'attivazione dell'infiammazione.

Studi successivi condotti su altri tipi cellulari (piastrine umane, Hela, cellule di fegato di embrione umano) hanno dimostrato che i due siti fosforilati in risposta ad agonisti importanti nel *release* di acido arachidonico sono la Ser⁵⁰⁵ e la Ser⁷²⁷ [121,122]. Recentemente è stato anche osservato in cellule muscolari lisce che l'attività enzimatica della cPLA₂ è aumentata in seguito a fosforilazione sullo stesso sito ad opera della chinasi II dipendente dal complesso Ca⁺⁺calmodulina [123]. E' stato suggerito che il fosfatidil-inositolo 4,5-bisfosfato è in grado di attivare specificamente la cPLA₂ [124,125], inducendo cambiamenti nella conformazione dell'enzima, probabilmente promuovendo la giusta posizione del sito attivo a livello della membrana plasmatica [125] (Fig. 4).

1.2.4 Fosfolipasi A₂ calcio-indipendente

Sono state identificate almeno due isoforme enzimaticamente attive (iPLA₂ VIA-1, iPLA₂ VIA-2), di circa 85 kDa, che sono caratterizzate da un sito catalitico contenente un dominio lipasico conservato all'estremità C-terminale. L'estremità N-terminale, invece, contiene un dominio *ankyrin* formato da 8 ripetizioni conservate, presente anche in molti altri tipi di proteine, come fattori di trascrizione e proteine di regolazione del ciclo cellulare, e implicato proprio nelle interazione proteina-proteina. La iPLA₂ VIA-2 differisce dalla isoforma VIA-1 per la presenza di un dominio aminoacidico ricco in prolina all'interno del dominio *ankyrin*, oltre che per una porzione ricca in glicina prima del sito catalitico. iPLA₂ VIA-3 rappresenta una forma tronca rispetto alle precedenti, in cui manca l'estremità C-terminale. Anche se mantiene il sito catalitico, attualmente non è documentata una sua attività enzimatica [126-129]. Le isoforme corte, mancando del dominio fosfolipasico, sono enzimaticamente inattive e contengono solo il dominio *ankyrin*, comune a tutte, svolgendo probabilmente un ruolo nella interazione tra le varie subunità.

Evidenze recenti hanno dimostrato che in alcuni tipi cellulari, come gli astrociti, esiste il contributo della forma Ca⁺⁺-indipendente della fosfolipasi A₂ (iPLA₂) nella produzione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana. Inoltre, sia nei periciti che nelle cellule endoteliali, è stata saggiata la presenza di questo tipo di attività fosfolipasica Ca⁺⁺-indipendente. E' stato dimostrato, inoltre, che nelle cellule endoteliali, iPLA₂ è associata alle membrane cellulari ed esercita un ruolo importante nel metabolismo dei fosfolipidi, ad esempio, dopo stimolazione mediante trombina [91,130-134]. Studi condotti su cellule umane hanno evidenziato che iPLA₂ è presente in forma di tetramero le cui subunità rappresentano numerose varianti di *splicing* che sostanzialmente danno origine a forme proteiche sia corte che lunghe. Il gene umano mappa sul cromosoma 22q 13.1 e contiene 16 esoni; gli eventi di *splicing* si verificano tra gli esoni 7 e 10.

La fosfolipasi A₂ VIA mostra un'ampia specificità per i fosfolipidi metabolizzati, ed è pienamente attiva in assenza di Ca⁺⁺ [135]. Mostra, inoltre, una distribuzione pressoché ubiquitaria, anche se ogni variante di *splicing* mostra una distribuzione tessuto-specifica. Nei roditori la forma predominante sembra essere quella VIA-1 [91,136]. Studi recenti hanno dimostrato che iPLA₂ può avere ruoli importanti negli eventi di produzione di acido arachidonico e quindi nella risposta

infiammatoria in vari tipi cellulari. Ad esempio, è stata verificata una notevole diminuzione nella produzione di PG in macrofagi attivati e trattati con bromoenol lattone, inibitore specifico per iPLA₂, ed oligo-antisense [132,137]. In queste cellule è stato visto che si localizza dal citoplasma alle membrane cellulari, evento in cui è coinvolta PKC.

Recentemente sono emersi altri ruoli per iPLA₂, come ad esempio il rimodellamento dei fosfolipidi di membrana, attraverso la loro deacilazione, la proliferazione cellulare e l'apoptosi [138-142]. Cellule apoptotiche producono acidi grassi, in parte, attraverso il coinvolgimento di iPLA₂, che viene riconosciuta da caspasi-3 e tagliata a livello del residuo Asp¹⁸³ [138]. Le forme, mancanti dell'estremità N-terminale, diventano enzimaticamente più attive, accelerando il turnover fosfolipidico, e modificando dunque la composizione delle membrane apoptotiche.

1.3 MAP chinasi

Le MAP chinasi ERK1/2, p38 e JNK/SAPK sono gli elementi centrali di *pathways* usate dalle cellule dei mammiferi per trasdurre i messaggi generati da fattori di crescita o agenti di stress (Fig. 5). La cPLA₂, in seguito a cambiamenti della concentrazione intracellulare di calcio, può essere fosforilata a livello della serina⁵⁰⁵ dalle proteina chinasi mitogeno-attivate p42/p44 (MAPK ERK1/2) e può traslocare dal citosol all'involucro nucleare grazie al dominio CaLB.

Recenti studi hanno dimostrato che in cellule endoteliali umane di vena ombelicale (HUVEC), trombina e VEGF stimolano l'attivazione della cPLA₂ e la sintesi di PGI₂ mediante un meccanismo che coinvolge la fosforilazione da parte delle MAP chinasi, in particolare p42/p44 ERK chinasi [116]. E' stato suggerito che l'attivazione di ERK gioca un ruolo critico nella sopravvivenza delle cellule in seguito a stress ossidativo, attraverso l'attivazione sequenziale di chinasi quali Raf-1 e MEK. Una volta fosforilato, ERK1/2 fosforila un certo numero di proteine target, inclusi fattori trascrizionali e proteine citoplasmatiche.

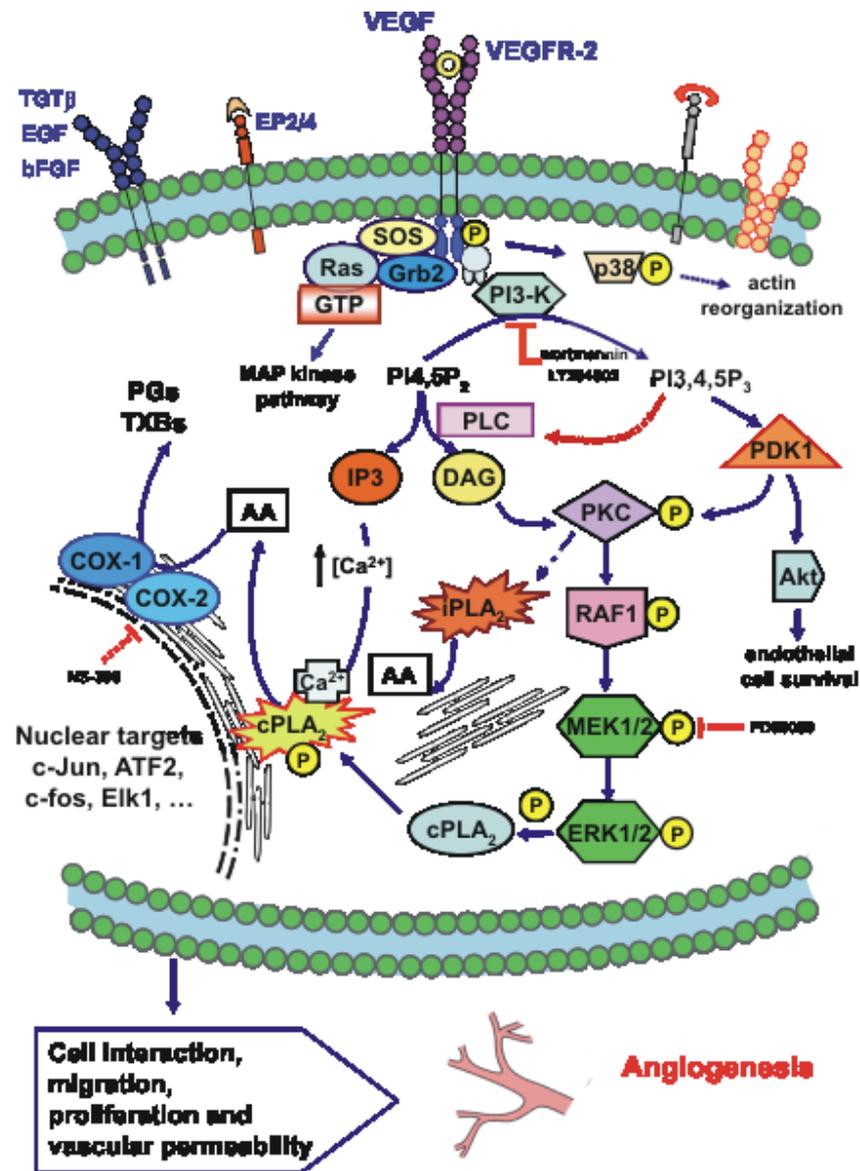


Fig. 5 Le MAP chinasi sono un gruppo di proteine serina/treonina chinasi attivate in risposta ad una varietà di stimoli extracellulari che mediano segnali di trasduzione dalla superficie cellulare al nucleo.

Inoltre le proteine ERK traslocano al nucleo, dove possono fosforilare Elk-1. Nelle cellule endoteliali tali chinasi sono state implicate nella regolazione della trascrizione genica mediante l'attivazione dei due fattori nucleari NF- κ B e AP-1 (c-jun/c-fos) [96,118,143,144].

1.4 L'angiogenesi

L'angiogenesi è un fenomeno molto complesso che consiste nella creazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli pre-esistenti. Durante la vasculogenesi

embrionale, i vasi sanguigni si formano a partire da precursori delle cellule endoteliali (angioblasti) che si assemblano e modellano a formare il plesso capillare primario. Questa primitiva rete sanguigna inizia quindi il suo differenziamento e nuovi vasi sanguigni nascono e si ramificano a partire da capillari pre-esistenti, processo noto come angiogenesi [145].

La formazione di nuovi vasi si realizza mediante alcune tappe fondamentali:

- ✓ la digestione della membrana basale ad opera di proteasi secrete dalle cellule endoteliali;
- ✓ la migrazione di cellule endoteliali circolanti nella sede di formazione dei nuovi vasi;
- ✓ la proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali per allungare i vasi e formarne il lume;
- ✓ la secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali che richiamano le cellule di supporto, i periciti e le cellule muscolari lisce al fine di costruire la membrana basale. In questo stadio finale i vasi sviluppano anche le caratteristiche specifiche proprie del tessuto o organo che devono irrorare [146].

L'angiogenesi è un processo fondamentale nel ciclo riproduttivo della donna, in quegli organi che fisiologicamente si accrescono [147] o nella riparazione tissutale. In queste condizioni la genesi di nuovi capillari è regolata accuratamente e i nuovi vasi sanguigni maturano velocemente e diventano stabili.

Il sistema vascolare di un uomo adulto è generalmente quiescente, e le cellule endoteliali rappresentano alcune fra le cellule che vivono più a lungo, eccezion fatta per quelle del sistema nervoso. Infatti, il fisiologico turnover delle cellule endoteliali è misurato in anni nei tessuti che non necessitano di angiogenesi.

L'angiogenesi è orchestrata da una varietà di attivatori e inibitori. Attivatori della proliferazione e della migrazione cellulare sono principalmente ligandi delle tirosina chinasi [145], come il fattore di crescita dell'endotelio (VEGF) [148,149], i fattori di crescita dei fibroblasti (FGFs), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) [150] e il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), ma possono anche avere un'origine differente, come l'acido lisofosfatidico (LPA) [151]. Il primo inibitore dell'angiogenesi descritto è stato la trombospondina-1 che modula la proliferazione e la motilità endoteliale [152].

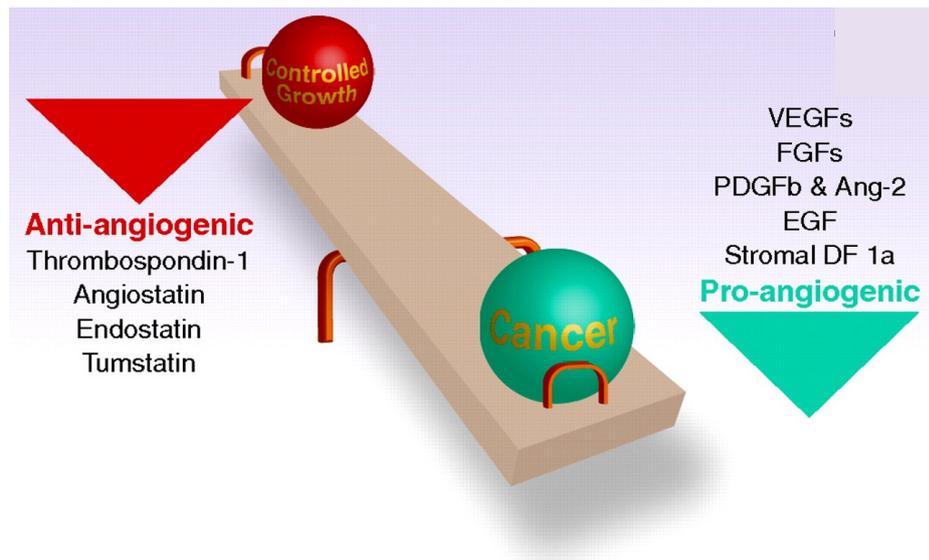


Fig. 6 L'angiogenesi è regolata da una varietà di attivatori ed inibitori, i cui livelli stabiliscono se una cellula endoteliale deve rimanere quiescente o andare incontro ad angiogenesi

In modo caratteristico, molti inibitori angiogenetici, come per esempio le “statine”, sono derivate da proteine più grandi che non mostrano alcun effetto sull'angiogenesi. Ricordiamo tra queste l'angiostatina (un frammento del plasminogeno) [153], come pure l'endostatina [153], la tumstatina [154], e la canstatina (frammenti del collagene che si legano alle integrine) [155]. In generale i livelli tra attivatori e inibitori stabiliscono se una cellula endoteliale rimarrà in quiescenza oppure andrà incontro ad angiogenesi (Fig. 6).

Un'angiogenesi incontrollata, per eccesso o per difetto, può essere presente in alcune patologie quali artrite reumatoide e retinopatia diabetica, nell'infarto e nelle neoplasie. L'angiogenesi è particolarmente importante per la progressione metastatica. I tumori nascono come piccole masse non più grandi di 1 mm^3 di diametro. In assenza di angiogenesi, il tumore non è in grado di accrescersi ulteriormente, malgrado abbia un'attiva proliferazione cellulare. Le cellule tumorali in queste condizioni diventano ipossiche. In risposta ad un ambiente ipossico, viene stimolata la trascrizione di molti geni target, come i geni per VEGF, bFGF, TGF- β e PDGF, che stimolano la proliferazione e la migrazione dell'endotelio vascolare. L'interazione tra le cellule endoteliali, le cellule stromali e le cellule tumorali, determina la secrezione e l'attivazione delle metalloproteinasi che degradano la matrice extracellulare e innescano la formazione di nuovi vasi a partire da vasi pre-esistenti. Questi nuovi vasi formati attorno al tessuto tumorale, permettono alle cellule tumorali di invadere il

torrente circolatorio e di lasciare la loro localizzazione primaria per formare nuovi tumori o metastasi (Fig. 7).

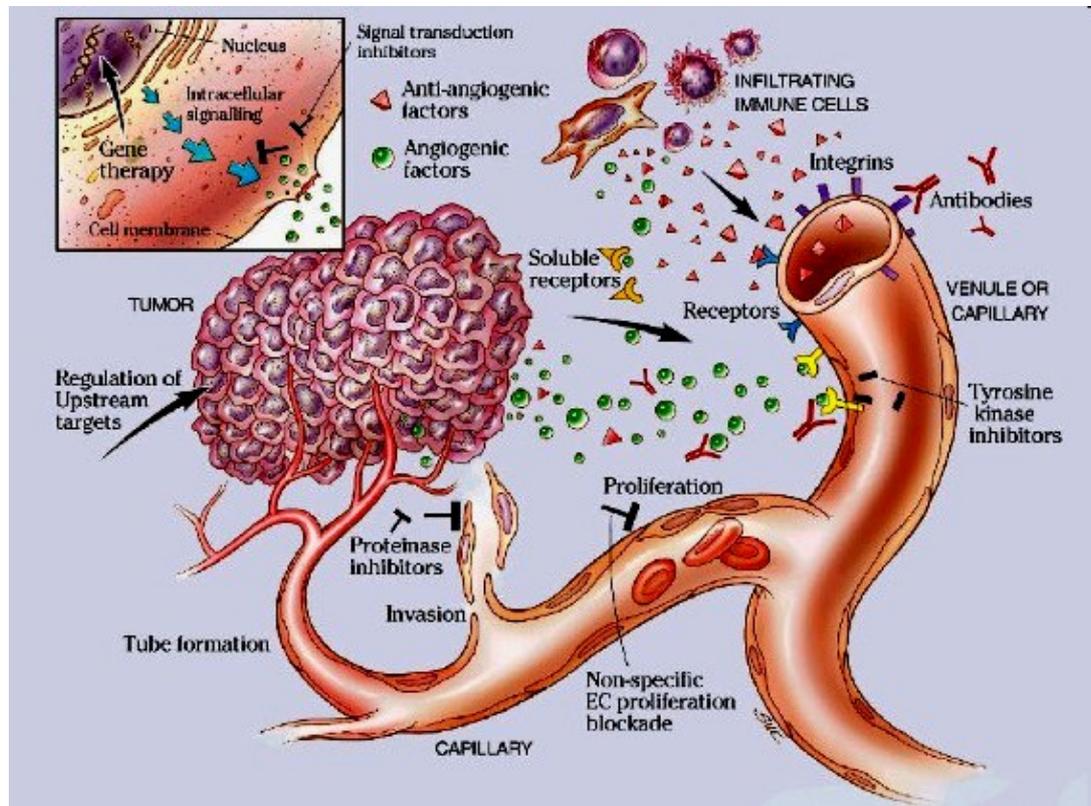


Fig. 7 Rappresentazione dello sviluppo di un tumore

Per molti tumori, la densità vascolare costituisce un indicatore prognostico del potenziale metastatico: i tumori altamente vascolarizzati, infatti, mostrano un'incidenza di metastatizzazione di gran lunga superiore rispetto ai tumori poco irrorati [156].

I vasi sanguigni tumorali non possiedono la normale organizzazione strutturale in venule, arteriole e capillari, ma presentano caratteristiche tipiche di tutti i tre tipi di vasi, hanno un'alterata espressione di antigeni sulla superficie cellulare e mancano della connessione con le cellule di supporto, il cui numero può essere più elevato o più basso rispetto ai vasi normali. [157]. Proprio a causa di questa anomala e caotica struttura, il flusso ematico nei vasi tumorali tende ad essere generalmente irregolare, più lento del normale, spesso con disfunzionalità dei capillari. Questo network irregolare non consente un apporto nutritivo ottimale per tutte le cellule: un aumento della distanza delle cellule tumorali in crescita dai vasi capillari o un'inefficienza dei nuovi vasi formati può produrre ipossia, che come detto poc'anzi, rappresenta lo stimolo per una

crescita vascolare continua e per la diffusione ed il trasporto delle cellule tumorali nelle sedi di formazione delle metastasi.

1.5 Il melanoma

Il melanoma rappresenta un tipo di tumore molto invasivo che si origina in seguito alla trasformazione dei melanociti. I melanociti sono cellule deputate alla sintesi della melanina, particolare pigmento che si presenta sotto forma di fini granuli di colore marrone scuro. Queste cellule appartengono alla linea della cresta neurale [158] e, durante lo sviluppo, migrano dalle creste neurali nella cute localizzandosi nello strato basale ed in quello spinoso dell'epidermide, con un pattern non casuale, immettendo dei processi dendritici arborizzanti che prendono contatto con i cheratinociti degli strati basali e superficiali della pelle [158].

Ogni melanocita trasferisce, tramite questi prolungamenti citoplasmatici, i melanosomi contenenti la melanina, a circa trentasei cheratinociti basali e soprabasali. All'interno dei cheratinociti, la melanina protegge la pelle dall'assorbimento delle radiazioni solari dannose [158].

Da un punto di vista istologico, i melanomi vengono classificati secondo la loro localizzazione e lo stadio di progressione. Sono stati suggeriti cinque stadi differenti dell'evoluzione del melanoma sulla base dei seguenti criteri istologici: nevi congeniti o acquisiti senza cambiamenti displasici; nevi displasici con atipie strutturali; melanoma in fase di crescita radiale; melanoma in fase di crescita verticale; e melanoma metastatico. Sia i nevi benigni che quelli displasici, sono caratterizzati dalla rottura dello strato dei cheratinociti basali, che porta ad un incremento del numero dei melanociti rispetto a quello dei cheratinociti. Queste lesioni portano alla formazione del melanoma *in situ*, che si accresce lateralmente e rimane largamente confinato a livello dell'epidermide, e questo stadio è definito come fase di crescita radiale. Al contrario, il melanoma in fase di crescita verticale invade gli strati più alti dell'epidermide, si spinge oltre e penetra nel sottostante derma e nei tessuti sottocutanei attraverso la membrana basale, formando noduli di cellule maligne.

Sembra che sia proprio il passaggio dalla fase di crescita radiale a quella verticale, a rappresentare un momento cruciale nell'evoluzione del melanoma anticipando l'acquisizione del potenziale metastatico e l'infausto esito clinico. In base a queste

considerazioni, l'altezza e lo spessore totali delle lesioni di melanoma primario sono ancora uno dei parametri maggiormente predittivi dell'evoluzione in metastasi e dell'avverso esito clinico [159].

Le cellule di melanoma in fase di crescita radiale necessitano di fattori di crescita esogeni, forniti dai cheratinociti circostanti, sono incapaci di crescere in assenza di punti di ancoraggio, non sono tumorigenici in topi immunodeficienti e non vanno incontro a metastasi nei pazienti. Al contrario, le cellule di melanoma in fase di crescita verticale, risultano totalmente indipendenti dal controllo dei cheratinociti e stabiliscono delle fitte reti di comunicazione con i fibroblasti, acquisiscono una crescita non più dipendente da fattori di crescita o da siti di ancoraggio, sono tumorigenici negli animali e altamente metastatici nei pazienti e nei modelli animali sperimentali [159].

Come per gli altri tipi di tumori, si crede che alla genesi del melanoma contribuiscano fattori sia genetici che ambientali. Intorno al 1820, il medico William Norris osservò una predisposizione familiare allo sviluppo del melanoma, particolarmente in individui con capelli e carnagione chiari [160]. Oggi, quasi due secoli dopo, si stanno pienamente comprendendo i fattori genetici ed ambientali che guidano la patogenesi del melanoma. L'incidenza del melanoma è influenzata dalla pigmentazione della popolazione e da parametri geografici, come latitudine e altitudine [161], suggerendo che la luce ultravioletta non costituisce il principale fattore di sviluppo del melanoma.

1.6 Il glioma

Il glioma è una forma molto aggressiva di astrocitoma maligno caratterizzata da un'elevata capacità di vascolarizzazione. Il glioblastoma rimane una malattia costantemente fatale, nonostante i progressi nella terapia chirurgica e medica. I due principali aspetti che caratterizzano la biologia del glioma sono la formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso il processo di angiogenesi e l'invasione delle cellule del glioma mediante tratti di sostanza bianca. Attraverso l'angiogenesi il glioma determina una marcata alterazione della struttura del vaso con conseguente diminuzione del trasporto dei chemioterapici e aumento di ipossia e di edema nelle parti di tessuto interessato dalla crescita tumorale [162].

E' stato dimostrato che nei gliomi questi vasi sanguigni anomali sono in grado di creare una nicchia vascolare che ospita le cellule staminali di glioma, [163] cellule che

formano una piccola frazione di glioma capace di dare poi origine al tumore intero [164] e le quali sono ritenute rappresentare una fonte di resistenza al trattamento.

L'ipossia che porta alla necrosi è considerata parte integrante della fisiopatologia di questi tumori maligni. E' ben noto che l'ipossia nei gliomi porta all'up-regolazione dell'espressione di VEGF e che questo stimoli l'angiogenesi [165]. Oltre a promuovere la crescita del tumore attraverso la neovascolarizzazione, l'ipossia ha anche l'effetto di rendere la popolazione di cellule tumorali periferica alla necrosi più resistente alla radioterapia e alla chemioterapia [166].

Cellule cancerose e cellule metastatiche comunicano con le cellule endoteliali mediante un network interattivo di segnali cellula-cellula e cellula-matrice, attraverso contatto con le cellule endoteliali o tramite la secrezione di fattori solubili (bFGF, VEGF, PDGF, angiopoietine, TGF- β , interleuchine, metalloproteinasi, ICAM-1 e altri fattori) [146,167-169]. D'altra parte, le stesse cellule endoteliali secernono fattori, per esempio IL-8 [170], ICAM-3 [171], e metalloproteinasi MMP-9 [169] che possono indurre la chemotassi e la migrazione transendoteliale delle cellule tumorali, un processo critico per la formazione di metastasi. Recentemente, è stato mostrato che le analisi effettuate su surnatanti collezionati da cellule di glioma altamente invasive rilevavano la presenza di diverse proteine con attività pro-angiogenetica, tra le quali IL-6, IL-8, Gro- α , TIMP-1/2, ENA-78, bFGF, MCP-1, PDGF-A/B, TGF- α , e VEGF-A che sono le più secrete [172-175].

“Media” condizionati concentrati ottenuti da diverse colture di glioma sono in grado di indurre *in vivo* un incremento della permeabilità dei capillari cerebrali, e subiscono depressione con l'utilizzo di inibitori delle lipossigenasi e di desametasone [176]. La produzione di prostaglandine e del metabolita della lipossigenasi, 12(S)-HETE, da parte di diversi tipi tumorali durante l'interazione con le cellule endoteliali dei microvasi cerebrali può rappresentare un fattore chiave nell'angiogenesi del cancro [177,178].

SCOPO DEL LAVORO

La neovascolarizzazione e il processo di maturazione vascolare sono eventi controllati da specifiche proteine deputate a questa funzione, quali le MAP chinasi (la forma fosforilata p42/p44 delle protein chinasi mitogeno attivate) e le isoforme della protein chinasi C (PKC) che stanno a monte delle MAP chinasi. I segnali angiogenici vengono quindi trasdotti attraverso la via di segnale PI3-K/Akt/ERK. Inoltre, l'isoforma citosolica della fosfolipasi A₂ (cPLA₂), la quale regola i livelli di acido arachidonico (AA), e la cicloossigenasi-2 (COX-2), la quale regola il rilascio di prostaglandine E₂, sono altamente upregolate nell'angiogenesi che si verifica nelle cellule endoteliali durante la progressione tumorale [179,180]. Studi precedenti hanno evidenziato che l'attivazione della via di segnale PKC-ERK1/2-cPLA₂ risulta coinvolta in svariate funzioni endoteliali, come la promozione della barriera ematoencefalica e l'angiogenesi [66].

La produzione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana rappresenta il più importante precursore di prostaglandine, leucotrieni e acido idrossieicosatetraenoico (HETEs); questi prodotti a valle delle fosfolipasi A₂ (PLA₂) hanno mostrato giocare un importante ruolo nel governare la proliferazione e la migrazione cellulare così come l'infiammazione. Tra le PLA₂, l'isoforma citosolica (cPLA₂), richiede ioni Ca²⁺ per la catalisi, mentre l'isoforma calcio-indipendente (iPLA₂β), sembra possedere diverse potenziali funzioni, tra le quali il rimodellamento dei fosfolipidi e un ruolo di segnale nella crescita cellulare, nell'apoptosi, nella secrezione e nell'infiammazione indotte da danni cellulari [181-182]. L'enzima iPLA₂ media la fosforilazione e la trascrizione di fattori attraverso la via PKA-dipendente [140], ed è attivata dall'enzima PKC nell'endotelio umano [184].

Il cross-talk tra cellule tumorali e cellule endoteliali è stato studiato in modelli di co-culture *in vitro* [169,185], ma il meccanismo del segnale di trasduzione nell'interazione e nell'adesione delle cellule tumorali con l'endotelio è ancora poco conosciuto. E' stato, inoltre, descritto il ruolo di supporto delle citochine solubili pro-angiogeniche, come il bFGF e il VEGF nella crescita endoteliale in co-culture con cellule di glioma [186].

I fattori solubili giocano un ruolo chiave nell'angiogenesi patologica, come per esempio il VEGF, che insieme al suo recettore, si è visto, viene overespresso in molti tumori [187,188].

In un modello di co-cultura con periciti di retina, cellule endoteliali immortalizzate di cervello di ratto (GP8.3) attivano l'espressione della cPLA₂, la sua forma fosforilata e

la iPLA₂ [66]. I livelli proteici di ERK1/2, PKC α e le loro forme fosforilate sono incrementati notevolmente. Wortmannina ed LY294002, usati come inibitori della via di segnale PI3 chinasi/PDK1, hanno attenuato marcatamente il release di acido arachidonico e l'espressione della forma fosforilata di cPLA₂, PKC α , ed ERK1/2.

Stimolate da fattori angiogenici, le cellule endoteliali in stato di quiescenza, si differenziano, esprimono enzimi proteolitici volti a degradare la membrana basale del vaso, migrano nello spazio interstiziale, proliferano, e vanno incontro ad una re-differenziazione finalizzata ad una nuova morfogenesi vasale [146].

Ad oggi non sono noti studi riguardo gli effetti dell'adesione di cellule tumorali o del loro medium condizionato sull'espressione delle fosfolipasi, come la cPLA₂ e la iPLA₂, così come sull'attivazione della via di segnale intracellulare Ras-Raf-PKC-MEK-MAPK sulla proliferazione cellulare, o il pathway PI3K-Akt nelle circostanti cellule non-neoplastiche, come le cellule endoteliali.

Sulla base di questi precedenti risultati, allo scopo di esaminare gli effetti del melanoma e del glioma sull'espressione delle fosfolipasi A₂, PKC α , MAP chinasi e COX-2 nelle cellule endoteliali, abbiamo allestito un sistema modello nel quale i media prelevati da colture di melanoma e di glioma, sono stati utilizzati per incubare cellule endoteliali immortalizzate (GP8.3) e cellule endoteliali primarie (BBEC).

Durante i tre anni di dottorato è stata investigata l'espressione delle fosfolipasi e degli enzimi coinvolti nella via di segnale PKC α -MAPK/ERK in seguito all'incubazione di cellule endoteliali immortalizzate di cervello di ratto con i media condizionati di due linee cellulari di melanoma umano, OCM-1 ed SK-MEL28 e dalla linea cellulare di glioma, C6. Lo scopo del lavoro è stato quello di sondare il possibile meccanismo di segnale e il cross-talk tra le cellule endoteliali e le cellule cancerose, mimando *in vitro* l'interazione tra questi tipi cellulari.

Nel sistema modello utilizzato, è stato ipotizzato che il rilascio di fattori solubili nel medium da parte delle cellule tumorali possa indurre delle variazioni nell'espressione delle fosfolipasi A₂ e permettere di individuare una possibile pathway metabolica che ne attivi la forma fosforilata.

Diversi tipi cellulari, incluse le linee immortalizzate, sono correntemente utilizzate come sistemi *in vitro* per studiare vari processi fisiologici e patologici. Sfortunatamente, le colture primarie di cellule endoteliali mostrano una durata limitata e caratteristiche che differiscono da coltura a coltura, in base all'origine delle cellule stesse [189-191]. La linea cellulare di endotelio immortalizzato di cervello di ratto utilizzato nel presente

studio, mantiene le caratteristiche fenotipiche e immunologiche delle loro cellule progenitrici [192]. Inoltre studi condotti usando cellule HUVEC comparate a linee di endotelio umano immortalizzato (ECV304 da vene ombelicali), hanno dimostrato una morfologia cellulare e un'espressione delle subunità delle integrine simili [193].

Gli esperimenti hanno mostrato che i media condizionati del melanoma e del glioma, stimolano in modo significativo la fosforilazione di cPLA₂, PKC α , ERK1/2 e incrementa l'espressione proteica di cPLA₂ e iPLA₂ nelle cellule endoteliali, insieme alla proliferazione e alla motilità cellulare.

MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

Le cellule endoteliali immortalizzate dei microcapillari di cervello di ratto (GP8.3) sono state generosamente fornite dal Dr. John Greenwood (Department of Clinical Ophthalmology, University College, London) [192] e incubate con medium F10-Ham contenente 10% di FCS, 80 µg/ml di eparina, 2 mM di glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina. Le colture sono state preparate e caratterizzate seguendo le procedure standard [192,194].

Le due linee cellulari di melanoma umano sono state generosamente fornite dal laboratorio di immunologia, Istituto Nazionale per il Cancro (Regina Elena, Roma). SK-MEL28 è una linea cellulare di melanoma metastatico; OCM-1 è una linea cellulare non metastatica di melanoma da corioide oculare. Le cellule sono state mantenute in medium RPMI contenente glutammina 2 mM, antibiotici e FBS al 10%.

La linea cellulare C6 di glioma di ratto è stata acquistata presso l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) e fatta crescere in medium F12-Ham contenente 10% di FCS, 2 mM di glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina.

Le cellule endoteliali primarie di microcapillari di cervello bovino (BBEC) sono state acquistate presso l'ECACC e nutrite con BBEC Growth Medium. I cambiamenti morfologici e la viabilità cellulare sono state determinate con test MTT [195,106].

2.2 Preparazione dei media condizionati dal melanoma e dal glioma

SK-MEL28 e OCM-1 (1×10^6 cells) sono state piastrate in piastre petri 10 cm e nutrite per 24 h con RPMI supplementato con FBS al 10%, glutammina 2 mM, penicillina 100 U/ml e streptomina 100 µg. Al raggiungimento di una subconfluenza, il terreno di coltura è stato sostituito per 48 h con medium RPMI/F10-Ham (1:1, vol/vol) contenente FBS 1%, antibiotici e glutammina, al fine di ottenere i media condizionati. I media così ottenuti, sono stati collezionati, centrifugati a 500 g per 10 min e filtrati usando un filtro da 0.2 µm. Le aliquote sono state conservate a -80°C fino all'utilizzo.

Il glioma è stato piastrato in piastre petri 10 cm e nutrito F12-Ham contenente 10% di siero bovino fetale, 2 mM di glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di

streptomicina. Raggiunta la semiconfluenza, il terreno di coltura è stato sostituito con F12/F10-Ham (1:1, vol/vol) contenente FCS 1% per 48 h, al fine di ottenere il medium condizionato. Il medium così ottenuto è stato raccolto e centrifugato a 500 g per 10 minuti. Le aliquote sono state conservate a -80°C fino all'utilizzo.

2.3 “Release” di acido arachidonico

Per quantificare il “release” di acido arachidonico, in seguito a trattamento delle GP8.3 con i media condizionati del melanoma, le cellule endoteliali sono state piastrate in transwells a sei pozzetti e incubate con 0,3 µCi/dish di [1-¹⁴C]AA (Dupont NEN) in medium F10-HAM supplementato con FBS al 5% e glutammina 2 mM, per 24 h a 37°C. Le cellule sono state lavate tre volte (5 minuti a lavaggio) con PBS contenente BSA 0,5%, ed incubate con o senza medium condizionato da SK-MEL28 o OCM-1, realizzati con medium RPMI/F10-Ham (1:1, vol/vol) deprivato di siero e contenente BSA allo 0,5%, utilizzata come trappola per il ¹⁴C-AA, in presenza o assenza di inibitori, quali wortmannina(60 nM) più LY294002 (20 µM), PD98059 (25 µM), AACOCF₃ (50 µM) per 24 h. Dopo l'incubazione, il medium è stato rimosso e centrifugato per 5 min. Il surnatante è stato concentrato a 1 ml mediante liofilizzazione, e un'aliquota di 100 µl è stata prelevata per determinarne la radioattività totale (Berthold DAR).

L'estrazione di composti organici, la separazione dell'acido arachidonico e degli eicosanoidi sono stati condotti come descritto in precedenti lavori [66,195].

2.4 Saggio di attività enzimatica per la fosfolipasi A₂

Dopo 24 h di incubazione con o senza media condizionati da ambedue i tipi tumorali, in presenza o in assenza di specifici inibitori delle chinasi,(AACOCF₃, BEL, PD98059, wortmannina ed LY294002) le GP8.3 e le BBEC sono state screpate e lisate secondo le procedure standard [66,196]. I lisati cellulari sono stati incubati in piastre da 96 pozzetti in presenza del substrato arachidonoil tiofosfatidilcolina (ATPC). L'uso di BEL sul controllo e sulle cellule stimulate dal medium condizionato ci ha permesso di discriminare tra l'attività delle due isoforme, citosolica (cPLA₂) e calcio-

indipendente (iPLA₂). I risultati sono espressi in pmol di ATPC per minuto e per mg di proteine (pmol/min/mg).

2.5 Determinazione della produzione di PGE₂ e VEGF

Per determinare le PGE₂ e l'accumulo di VEGF nel surnatante delle GP8.3 confluenti, tenute in coltura per 24 h alle condizioni standard (controllo) ed in presenza di medium condizionato dal glioma, sono stati usati due kit basati su immunosaggio enzimatico competitivo, rispettivamente (il kit per le PGE₂ è stato acquistato da Cayman Chemicals Co., Ann Arbor, MI, USA, quello per il VEGF è stato acquistato da R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Per le PGE₂, il range di rilevamento era 7.8-1000 pg/mL, mentre per il VEGF era 20-2500 pg/mL.

2.6 Saggio di proliferazione cellulare

La proliferazione delle cellule endoteliali (GP8.3 e BBEC) è stata quantificata in presenza o in assenza dei media condizionati, con o senza inibitori di proteine chinasi a monte dell'attivazione degli enzimi cPLA₂, iPLA₂, PKC α e COX-2. Le cellule sono state preventivamente fatte crescere per 3 giorni in medium F10-Ham contenente 10% di FCS e BBEC Growth Medium, rispettivamente; al raggiungimento della confluenza, le cellule sono state tripsinizzate, collezionate e quindi piastrate in piastre a 96 pozzetti. Dopo 12 h di coltura, le cellule sono state lavate e incubate per 24 h con i media condizionati.

Per la misurazione della proliferazione cellulare delle GP8.3 e delle BBEC con i media condizionati delle due linee di melanoma in presenza o assenza di inibitori (wortmannina 60 nM, più LY 294002 20 μ M, NS-398 50 μ M) e del glioma, in presenza o in assenza di inibitori (20 nM wortmannina, 10 μ M LY294002, 20 μ M PD98059, 10 μ M AACOCF₃, 2.5 μ M BEL e 5 μ M NS-398), sono stati usati tre differenti metodi.

1) Nel primo metodo, GP8.3 e BBECs sono state incubate per 24 h in assenza (controllo) o in presenza dei media condizionati contenente inibitori delle chinasi, delle PLA₂ e COX-2. La proliferazione cellulare è stata misurata mediante il kit della bromodeossiuridina (Roche Cell Proliferation ELISA, BrdU kit).

2) Nel secondo metodo, GP8.3 e BBECs sono state incubate per 24 h in assenza (controllo) e in presenza dei media condizionati contenente inibitori, lavate due volte con PBS e tripsinizzate. Alla sospensione cellulare è stata aggiunta una soluzione dello 0.4% di trypan blue e il numero di cellule vive è stato determinato mediante l'uso dell'emocitometro. Le cellule che non erano in grado di escludere il colorante sono state considerate non vitali.

3) Nel terzo metodo, è stato calcolato il tasso mitotico di GP8.3 e BBECs mediante l'uso della microscopia time-lapse. Le piastre da 12 pozzetti contenenti le colture cellulari, sono state montate su di un microscopio invertito Leica AF6000LX dotato di telecamera CCD. Le condizioni di coltura sono state mantenute grazie ad un regolatore di temperatura dinamico a costante flusso di aria contenente il 5% di CO₂. Le cellule sono state incubate per 24 h in assenza (controllo) e in presenza dei media condizionati contenenti inibitori e anticorpi contro VEGF-A (100 ng/mL del peptide VEGF₁₆₅). Per il test effettuato con medium condizionato del glioma sono stati utilizzati anche gli anticorpi diretti contro i due recettori per il VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 (2 µg/mL). Il tasso mitotico è stato osservato nelle colture cellulari per 24 ore, esaminando ogni 15 minuti le sequenze di immagini e contando le divisioni cellulari.

2.7 Migrazione cellulare mediante “wounding assay”

Le cellule endoteliali GP8.3 sono state nutrite con medium F10-Ham supplementato con FBS (o FCS) al 10%, eparina 80 µg/ml, glutammina 2 mM, penicillina 100 U/ml e streptomina 100 µg. Sono state seminate in multiwell da 6 pozzetti per la misurazione della migrazione con i media condizionati dai melanomi, ed in multiwell da 12 pozzetti per il test con il medium condizionato del glioma. Al raggiungimento della confluenza, è stato eseguito un wound nel monolayer mediante la pressione di un puntale Gilson da 100 µl in modo da effettuare un taglio del monolayer cellulare e ottenere una visibile e definita demarcazione al margine del taglio (il wound era largo approssimativamente 1 mm). Il monolayer è stato quindi lavato 3 volte con PBS per rimuovere le eventuali cellule staccate, e incubato per 24 h a 37°C in medium (F10-Ham o media condizionati) con FBS (o FCS) 1%, con o senza inibitori.

La migrazione è stata eseguita con un microscopio invertito “time-lapse” Leica AF6000LX dotato di un piano x-y-z motorizzato, con camera di incubazione a CO₂

termoregolata. I dati presentati nella sezione Risultati sono stati estrapolati da tre separati esperimenti effettuati in doppio.

In alcuni di essi, due ore prima del wound e durante tutta la durata dell'esperimento, sono stati aggiunti specifici inibitori delle chinasi, delle fosfolipasi A₂ e di COX-2 (wortmannina, LY294002, AACOCF₃, PD98059, NS-398). Nessuno di questi componenti, usati a specifiche concentrazioni, influiscono sulla viabilità cellulare, come verificato mediante il test del tripan blu.

Per comprendere se la riparazione della ferita fosse dovuta a migrazione o proliferazione cellulare, le cellule endoteliali sono state trattate con 10 µg/ml di mitomicina C, per 2 h prima di effettuare il saggio di wound e durante le 24 h di trattamento con le sostanze saggiate. Esperimenti preliminari hanno mostrato che incubando le GP8.3 con 10 µg/ml di mitomicina C per 24 h, la proliferazione cellulare viene completamente inibita, senza tuttavia mostrare effetti sulla vitalità cellulare.

La migrazione è stata quantificata misurando il numero di cellule che migravano nel wound e la distanza percorsa dal fronte cellulare all'interno dell'area del wound nell'unità di tempo (software per l'analisi d'immagini computer-assistita, SPOT vers. 2.1.2, Diagnostic Instrument, Inc). Le misure sono state effettuate scegliendo in maniera random 4 campi della coltura trattata con il wound. Dal momento che il taglio è stato realizzato in direzione verticale, le cellule che migravano verso l'area priva di cellule provenivano da due direzioni, dalla destra e dalla sinistra dell'area trattata. I valori di 10 distanze sono stati mediati per ottenere la dimensione dei wounds dei campioni.

2.8 Elettroporazione

Dopo tripsinizzazione delle cellule all'80-90% di confluenza, la sospensione cellulare ($1.5-2 \times 10^6$ cells) è stata risospesa in medium F10-Ham contenente 10% FBS (o FCS). Il saggio di elettroporazione è stato eseguito incubando la sospensione cellulare con 10-20 µg di anticorpo anti-cPLA₂ e anti iPLA₂ per 10 min a 4°C in una cuvetta per elettroporazione, con un volume finale di 400 µl. Le cellule sono state elettroporate ad una intensità di 800 µF e ad un voltaggio di 150 V, con una lunghezza dell'impulso da 40 a 45 ms, usando un sistema di elettroporazione Bio-Rad Gene Pulser Xcell. Le cellule elettroporate sono state lasciate in cuvetta per 10 min a temperatura ambiente, lavate una volta con medium deprivato di siero, centrifugate e trasferite in una piastra petri di 60 mm contenente medium F10-Ham contenente 10% FBS (o FCS).

Più dell'80% delle cellule erano vitali dopo il lavaggio. Dopo 12 h le cellule sono state screpate, lisate in PBS contenente 0,5% Triton X-100 ed in seguito, è stata eseguita la procedura standard per l'analisi di Western Blot. In aggiunta, questi dati sono stati confermati qualitativamente visualizzando al microscopio, in cellule funzionalmente intatte, la fluorescenza intracellulare dell'anticorpo anti-cPLA₂ dopo elettroporazione, mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-cPLA₂ coniugato ad AlexFluor 488. Le cellule che mostrano fluorescenza (più del 90%) sono state considerate elettroporate con successo ed è stata quindi assicurata la validità della procedura di elettroporazione. I saggi di proliferazione cellulare sono stati eseguiti come descritto sopra. I controlli includono cellule miscelate con l'anticorpo ma non elettroporate, cellule elettroporate in assenza di anticorpo e cellule elettroporate con anticorpo anti-IgG.

2.9 Trasfezione di siRNA

Questo test è stato effettuato sulle cellule endoteliali GP8.3 in presenza o in assenza di medium condizionato dal glioma. Le cellule endoteliali sono state trattate con rat ON-TARGETplus SMART pool siRNA duplex (Dharmacon, Inc. Chicago, IL). Sono stati utilizzati due set di oligonucleotidi:

1) il primo set diretto su iPLA₂ (Gene Bank NM_001005560) con sequenza 5'-GGUGUGAGAUGGUCGGUAU-3', 5'-ACGCUGAGAUGGCCCGAAU-3', 5'-CAGCAAGGAUCCUCGCUAU-3' e 5'-CAGAAUGCUUCCAAUCGUA-3'.

2) Il secondo set contro cPLA₂ (Gene Bank NM_133551) contenente la sequenza 5'-AGAAUUUAGUCCAAUCGAA-3', 5'-CAUAUCUACACAUGCGAAA-3', 5'-CAGAUGAAUUUGAACGAAU-3' e 5'-GCGGAAAGAGAGUACCAA-3'.

L' siRNA controllo è un siRNA non-targeting aspecifico. Per la trasfezione di siRNA, le GP8.3 sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti all' 80% confluenza in presenza di F10-Ham contenente 10% di FCS, 80 µg/mL eparina, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL streptomina.

La trasfezione di siRNA è stata eseguita utilizzando come reagente INTERFERinTM. Le brevi sequenze di siRNA sono state sospese in F10-Ham in assenza di FCS ad una concentrazione di 50 nM per un volume finale di 200 µL. Dopo aver aggiunto 5 µL di INTERFERinTM le sequenze sono state incubate per 10 min a temperatura ambiente. La miscela di trasfezione è stata aggiunta alle cellule contenenti 2 mL di medium completo per ciascun pozzetto. L'efficienza della trasfezione è stata

valutata mediante l'utilizzo dell'indicatore siGLO green. L'effetto del silenziamento del gene è stata misurata tra le 24 e le 48 ore dalla trasfezione.

2.10 Western Blotting

Dopo 24 h di incubazione con i media condizionati, le cellule endoteliali sono state lisate come precedentemente descritto [66,196]. Il contenuto proteico dei lisati cellulari è stato quantificato mediante saggio di Lowry e gli immunoblots sono stati realizzati come descritto altrove [66]. Dopo la corsa elettroforetica ed il trasferimento su nitrocellulosa, le membrane sono state incubate con anticorpi primari contro la forma totale della cPLA₂ (anticorpo monoclonale di topo, diluizione 1:500), iPLA₂, (anticorpo policlonale di coniglio, diluizione 1:1000), COX-1 (anticorpo policlonale di coniglio, diluizione 1:500), COX-2 (anticorpo monoclonale di topo, diluizione 1:500), PKC α totale (anticorpo monoclonale di topo, diluizione 1:500), fosfo-cPLA₂ (anticorpo policlonale di coniglio, diluizione 1:1000), fosfo-PKC α (anticorpo policlonale di coniglio, diluizione 1:5000), ERK1/2 totale (anticorpo policlonale di coniglio, diluizione 1:250) e fosfo-ERK (anticorpo monoclonale di topo, diluizione 1:500). Per lo studio sui media condizionati dal melanoma le membrane sono state incubate anche con l'anticorpo primario contro sPLA₂ (anticorpo policlonale di coniglio, diluizione 1:500). Successivamente le membrane sono state incubate con anticorpi secondari per 1 ora a temperatura ambiente e l'immunocomplesso è stato rivelato in luminescenza (ECL, Amersham).

2.11 Microscopia confocale a fluorescenza

Nel caso del trattamento di GP8.3 e BBEC con i media condizionati dal melanoma, per identificare l'espressione e la traslocazione della PKC α e della cPLA₂, o l'espressione e la localizzazione di ERK1/2 e COX-2, è stata effettuata un'analisi della fluorescenza mediante microscopia confocale sulle cellule endoteliali (controllo, cellule indotte dai media condizionati e con i media condizionati più inibitori specifici) cresciute su specifici vetrini posizionati in una piastra a 6 pozzetti.

Nel caso del trattamento delle GP8.3 con i medium condizionato dal glioma, per individuare l'espressione di iPLA₂ e l'espressione/traslocazione di cPLA₂, così come l'isoforma di PKC α o l'espressione e la localizzazione di ERK1/2 e COX-2, la

microscopia confocale è stata eseguita piastrando le GP8.3 (controllo, medium condizionato e medium condizionato più inibitori) in piastre da 24 pozzetti.

Dopo 24 h di incubazione, con o senza media condizionati provenienti dalle due linee di melanoma e dalla linea cellulare di glioma, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS e processate per le analisi di immunocitochimica, come descritto altrove [66] usando anticorpi anti cPLA₂, anti iPLA₂, anti p-cPLA₂, anti PKC α e anti p-PKC α , anti ERK1/2 e anti p-ERK1/2, anti-COX-1, anti-COX-2 e vWF. La distribuzione cellulare degli immunocomplessi enzimatici è stata osservata mediante l'immunofluorescenza visibile tramite un microscopio confocale a scansione laser "Olympus FV1000".

2.12 Estrazione dell'RNA totale e RT-PCR

L'RNA cellulare totale è stato purificato dalle GP8.3 confluenti mediante l'utilizzo del reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies) e ridissolto in 30 μ L di acqua bidistillata RNase. La concentrazione e la purezza dell' RNA estratto sono stati valutati allo spettrofotometro mediante lettura OD sia a 260 che a 280 nm. La sintesi del first strand cDNA è stata effettuata utilizzando il kit SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) in 20 μ l finali di reazione. La miscela di RNA totale, 50 ng di random hexamers, 125 mM di dNTP mix (10 mM), 10 mM di ditiotreitolo, 50 mM di Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM di KCl e 3 mM di MgCl₂, è stata effettuata a 42°C per 50 min ed è stata stoppata a 70°C for 10 min.

Le condizioni per la reazione di amplificazione hanno previsto uno step iniziale di attivazione dell'enzima di 10 min a 95°C, seguiti da dei cicli di denaturazione (95°C per 35 sec), annealing (60°C per 35 sec), extension (72°C per 45 sec) e una extension finale (72°C per 5 min). Il numero appropriato di cicli di PCR è stato stabilito come descritto sotto.

Per l'analisi semi-quantitativa della RT-PCR, sono stati usati sulle GP8.3 i primers specifici per i geni di cPLA₂, iPLA₂ e GAPDH (sintetizzati dalla Invitrogen Life Technologies). Un prodotto di 450 bp, usando un primer forward (5'-AAGCCAAGTGACACCAGCC-3') e un primer reverse (5'-GAAACAGAGCAACGAGATGGG-3'), è stato amplificato per la cPLA₂ di ratto. Un prodotto di 353 bp, usando un primer forward (5'-AAGTGAACGTGTTCGAGAGG-3') e un primer reverse (5'-GATGATGCGGCTGTGATGG-3'), è stato amplificato per iPLA₂. I primers utilizzati per GAPDH erano 5'-TAGACAAGATGGTGAAGG-3'

(forward) e 5'-GCAGGGATGATGTTCTGG-3' (reverse) e i loro prodotti di amplificazione erano di 650 bp.

Il gene di GAPDH è stato usato come modello di controllo interno per normalizzare i relativi cambiamenti dell' mRNA target sulle GP8.3.

La PCR è stata realizzata con vari numeri di cicli, con controlli positivi e negativi per trovare il ciclo nel quale i prodotti diventano visibili all'interno della fase esponenziale di amplificazione. Le condizioni sperimentali sono state scelte in modo che nessuno degli RNA analizzati raggiungesse un plateau al termine del protocollo di amplificazione. Sono stati infine scelti 32, 32 e 34 cicli di amplificazione rispettivamente per cPLA₂, iPLA₂ e GAPDH per ottenere il lineare incremento dei prodotti di PCR prima di raggiungere il plateau nelle GP8.3.

Solitamente vengono effettuati dei controlli negativi per saggiare la presenza di contaminazioni di DNA.

I prodotti della PCR sono stati separati su gel d'agarosio all' 1,5% in buffer TAE 1x (Tris-Acetate-EDTA), e visualizzati con etidio bromuro su trans illuminatore a raggi UV. Le bande ottenute sono state convertite in immagini e la quantificazione delle bande è stata realizzata con un software Scion Images (Scion Corporation, Frederick, MD).

RISULTATI

3.1 “Release” di acido arachidonico

In cellule endoteliali nutrite con medium condizionato da SK-MEL28 e OCM-1 per 24 h, è stato osservato un significativo incremento nel release di acido arachidonico rispetto al controllo (endotelio *in solo*, senza aggiunte) (Fig. 8). Questo risultato dimostra indirettamente che il “release” endoteliale di acido arachidonico, stimolato dal medium condizionato del melanoma, è stato mediato dall’attivazione delle fosfolipasi A₂. L’aggiunta di wortmannina più LY294002 (inibitori della PI3 chinasi) o PD98059 (inibitore di MEK1) riduceva notevolmente il “release” di ¹⁴C-AA nel medium di incubazione rispetto al controllo, suggerendo che la chinasi PI3 e/o la chinasi MEK1 possano essere coinvolte nella liberazione di acido arachidonico e nell’attivazione delle fosfolipasi A₂ (PD98059 è ben conosciuto come un inibitore della fosforilazione della PLA₂) [66,196,197]. Non sono state riscontrate particolari differenze per le cellule endoteliali di controllo (nessuna aggiunta) rispetto alle colture cellulari trattate con wortmannina più LY294002 o PD98059.

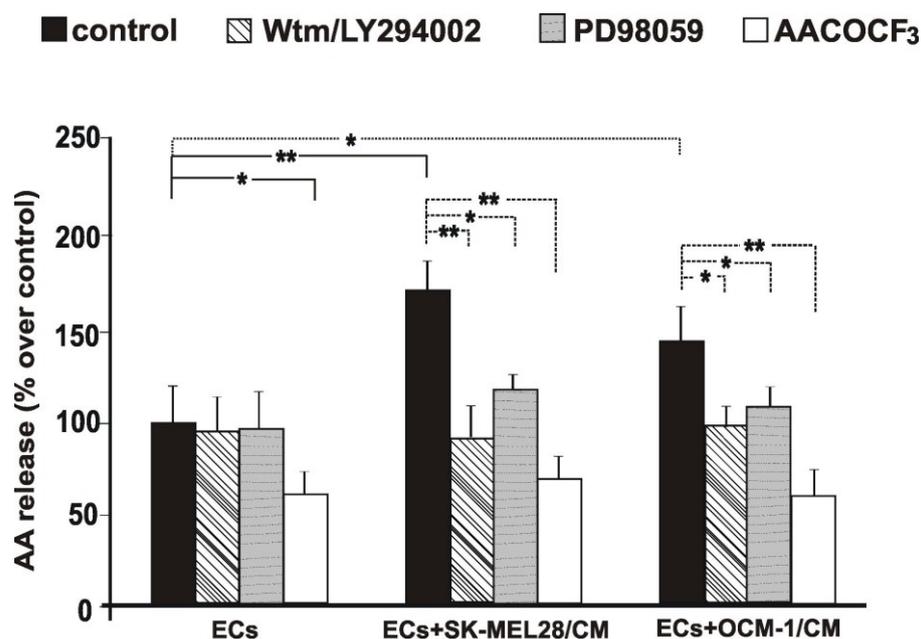


Fig. 8. Effetto di inibitori sul “release” di ¹⁴C-AA in cellule endoteliali GP8.3 in seguito ad incubazione con medium condizionato da melanoma. I valori riportati rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative (*p<0.05, **p<0.01) sono indicate da asterischi.

Per chiarire il ruolo della PLA₂ in seguito alla stimolazione delle cellule endoteliali con il medium condizionato, sono stati valutati gli effetti di un inibitore della PLA₂ come AACOCF₃. I risultati hanno mostrato che trattando cellule non stimulate per

24 h con AACOCF₃, inibitore dell'attività sia della cPLA₂ che della iPLA₂ [196], si osserva un decremento nel release di acido arachidonico del 40%. Quanto trovato riflette l'inibizione dell'attività basale della PLA₂ (somma delle attività di cPLA₂ e iPLA₂). In aggiunta, incubando per 24 h con AACOCF₃ le cellule stimulate con entrambi i media condizionati di melanoma, si osservava una diminuzione dei livelli di acido arachidonico rilasciato, circa del 56% per SK-MEL28 e del 58% per OCM-1, rispetto alle colture stimulate dai media condizionati ma in assenza di inibitore (Fig. 8).

3.2 Proliferazione cellulare

La proliferazione delle cellule endoteliali immortalizzate (GP8.3) e primarie (BBEC) in presenza o in assenza dei media condizionati del melanoma, con o senza inibitori, è stata misurata mediante l'incorporazione di BrdU, il test per la vitalità e il tasso mitotico.

1) Entrambi i media di melanoma, fanno aumentare significativamente la proliferazione delle GP8.3, misurata mediante un test ELISA BrdUr, circa del 142% (SK-MEL28) e del 157% (OCM-1), rispetto alle cellule mantenute in un medium all'1% di FBS (Fig. 9A). Per sondare il possibile ruolo delle chinasi che catalizzano la loro attività a monte delle MAPK/ERK1/2, così come delle fosfolipasi A₂ e COX-2 nella proliferazione endoteliale, mediata dalla presenza dei due media condizionati, abbiamo investigato l'effetto antiproliferativo di un insieme di specifici inibitori degli enzimi di nostro interesse. Come mostrato in Fig. 9A, l'incubazione con wortmannina più LY294002 e PD98059 (inibitori delle chinasi), AACOCF₃ (blocca l'attività delle PLA₂) ed NS-398 (inibitore della COX-2) [198], provocava una significativa riduzione degli effetti proliferativi dei due media condizionati. L'aggiunta di VEGF (100ng/ml) alle colture controllo ne aumentava la crescita del 93%, mentre la presenza dell'anticorpo anti-VEGF (5µg/ml) nei media condizionati del melanoma riduceva significativamente la proliferazione indotta del 29%. I media condizionati del melanoma promuovevano anche la proliferazione delle BBEC (BrdU) del 133% e del 153%. (Fig. 9B) comparata alle cellule controllo. La presenza degli inibitori specifici determinava una riduzione dell'effetto proliferativo. In seguito a incubazione delle BBEC con il peptide VEGF, questo incrementava la proliferazione di 2 volte.

Studi preliminari sono stati condotti per testare la tossicità di tutti gli inibitori, a differenti concentrazioni, mediante il test MTT, l'attività delle caspasi e il test del tripan

blu, non osservando proliferazione nelle cellule endoteliali GP8.3 e senza comportamenti apoptotici o compromissione della viabilità cellulare (dati non mostrati).

2) Mediante il “trypan blue exclusion test” (Fig. 9C), si è potuto osservare come entrambi i media condizionati dal melanoma aumentavano notevolmente la proliferazione cellulare di circa il 75% (SK-MEL28) e 50% (OCM-1) rispetto al controllo. L'utilizzo dei vari inibitori causava una sostanziale inibizione nel numero cellulare in presenza dei media condizionati. Risultati simili sono stati ottenuti per le BBEC (Fig. 9D).

3) Il test “time lapse” è stato svolto mediante l'osservazione al microscopio delle cellule durante incubazione in presenza di medium condizionato per 24 h e la relativa valutazione del loro tasso mitotico. Nel caso delle GP8.3, il tasso mitotico (espresso come percentuale di cellule replicanti per numero totale di cellule per 24h) risultava notevolmente incrementato durante le 24 h di incubazione, raggiungendo un incremento di 5.4 volte rispetto alle cellule controllo (Fig. 9E). La frequenza di replicazione era significativamente ridotta ai valori controllo in seguito ad incubazione con i rispettivi inibitori. Risultati simili sono stati ottenuti nel caso delle BBEC (Fig. 9F).

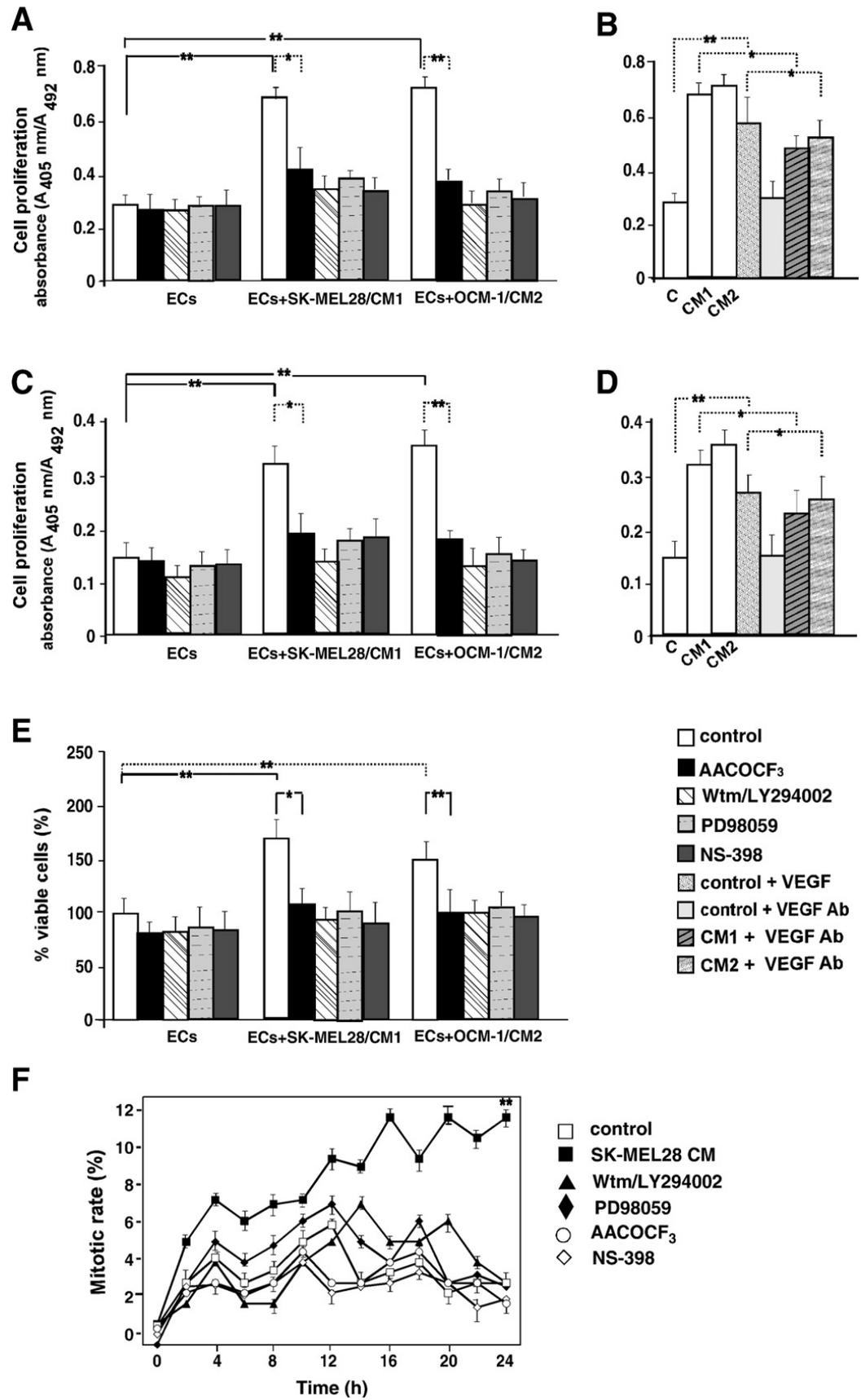


Fig. 9 Didascalia a pagina seguente

Fig. 9 Effetto del medium condizionato dal melanoma sulla proliferazione GP8.3 e BBEC. Ambedue i tipi cellulari sono stati piastrati per 24 h in assenza (controllo) e in presenza di medium condizionato, con e senza inibitori o VEGF e l'anticorpo contro il VEGF. I cambiamenti relativi alla crescita di popolazione cellulare sono stati valutati mediante il saggio di incorporazione della BrdU (pannello A per le GP8.3 e pannello B per le BBECs), e contando le cellule vitali con il "trypan blue exclusion assay" (pannello C per le GP8.3 e pannello D per le BBECs). Il tasso mitotico, espresso come percentuale di cellule replicanti per numero totale di cellule, è stato misurato per 24 h di coltura, con un microscopio time-lapse (pannello E per le GP8.3 e pannello F per le BBECs). Le immagini, ottenute da cinque diverse posizioni nella camera di coltura, sono state acquisite ogni 30 min, mentre il tasso di divisione cellulare è stato analizzato esaminando le sequenze di immagini e contando la divisione cellulare. I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative ($*p<0.05$, $**p<0.01$) sono indicate da asterischi.

Anche la proliferazione delle cellule endoteliali immortalizzate (GP8.3) e primarie (BBEC) in presenza o in assenza di medium condizionato del glioma, con o senza inibitori, è stata misurata mediante l'incorporazione di BrdU, il test per la vitalità e il tasso mitotico.

1) Il medium condizionato dal glioma aumentava la proliferazione delle GP8.3 di circa il 125% rispetto al controllo (Fig. 10A). Per esaminare il possibile ruolo delle chinasi MAPK/ERK1/2, PLA₂ e COX-2 nella proliferazione indotta dal medium condizionato, sono stati utilizzati specifici inibitori enzimatici. Come mostrato in Fig. 10A, l'incubazione con gli inibitori delle chinasi (Wortmannina, LY294002 e PD98059), con l'inibitore per la PLA₂ (AACOCF₃), con l'inibitore specifico per la iPLA₂ (BEL) e con l'inibitore selettivo per la COX-2 (NS-398), causava una notevole inibizione della proliferazione indotta dal medium condizionato, del 45%, 35%, 36%, 53%, 47% e 57% rispetto al controllo, rispettivamente.

Il medium condizionato aumentava significativamente anche la proliferazione delle BBEC del 165% rispetto alle cellule controllo (Fig.10B). I rispettivi inibitori diminuivano significativamente tale proliferazione del 37%, 66%, 48%, 44%, 42% e 61%.

Anche in questo caso, per verificare una possibile tossicità degli inibitori, sono stati effettuati esperimenti preliminari sulle GP8.3 utilizzando diverse concentrazioni di tali inibitori attraverso il test MTT, il saggio di attività per le caspasi e il "trypan blue exclusion test". I dati ottenuti ci hanno permesso di verificare l'assenza di processi apoptotici e di compromissioni nella viabilità cellulare.

2) Mediante il "trypan blue exclusion test" (Fig. 10C), si è potuto osservare come il medium condizionato da C6 aumentava notevolmente la proliferazione

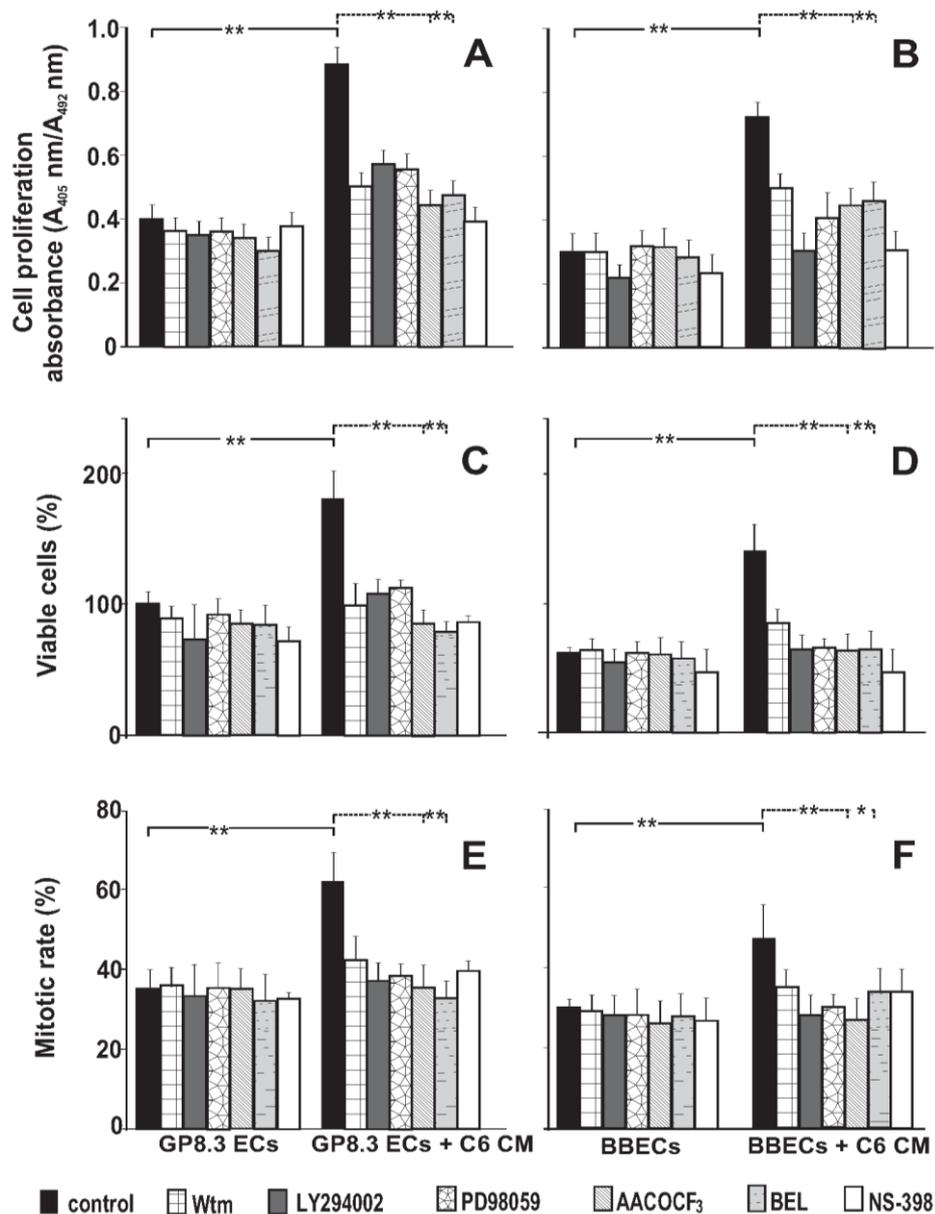


Fig. 10 Effetto del medium condizionato dal glioma sulla proliferazione di cellule endoteliali immortalizzate (GP8.3) e di cellule endoteliali primarie di cervello bovino (BBEC). Ambedue I tipi cellulari sono stati piastrati per 24 h in assenza (controllo) e in presenza di medium condizionato da C6, con e senza inibitori. I cambiamenti relativi alla crescita di popolazione cellulare sono stati valutati mediante il saggio di incorporazione della BrdU (pannello A per le GP8.3 e pannello B per le BBECs), e contando le cellule vitali con il “trypan blue exclusion assay” (pannello C per le GP8.3 e pannello D per le BBECs). Il tasso mitotico, espresso come percentuale di cellule replicanti per numero totale di cellule, è stato misurato per 24 h di coltura, con un microscopio time-lapse (pannello E per le GP8.3 e pannello F per le BBECs). Le immagini, ottenute da cinque diverse posizioni nella camera di coltura, sono state acquisite ogni 15 min, e il numero di cellule netto è stato calcolato a 0 h e 24 h rispettivamente, mentre il tasso di divisione cellulare è stato analizzato esaminando le sequenze di immagini e contando la divisione cellulare. I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) sono indicate da asterischi.

cellulare di circa il 78% rispetto al controllo. L'utilizzo dei vari inibitori causava una sostanziale inibizione nel numero cellulare in presenza di medium condizionato dal glioma (del 46%, 40%, 39%, 55%, 57% e 55% rispetto al controllo, rispettivamente). Risultati simili sono stati ottenuti per le BBECs (Fig. 10D).

3) Mediante il test "time lapse" è stato possibile osservare le colture cellulari durante incubazione in presenza di medium condizionato per 24 h e quantificare il loro relativo tasso mitotico. Nel caso delle GP8.3, il tasso mitotico risultava notevolmente incrementato durante le 24 h di incubazione, raggiungendo un incremento di 1.8 volte rispetto alle cellule controllo (Fig. 10E). La frequenza di replicazione era significativamente ridotta ai valori controllo in seguito ad incubazione con i rispettivi inibitori. Risultati simili sono stati ottenuti nel caso delle BBECs (Fig. 10F).

Nel loro insieme, i dati indicano che le chinasi a monte della via di segnale dipendente dalle PLA₂ e dalla COX, contribuiscono all'effetto proliferativo stimolato dal medium condizionato dal glioma, e che l'inibizione dell'AA e la produzione di prostaglandine (PGI₂, E₂) è correlata con l'inibizione della proliferazione.

3.3 Migrazione cellulare

La Fig. 11 mostra fotografie rappresentative di colture di cellule endoteliali GP8.3 in seguito al "wounding" in un monolayer e l'avanzamento del fronte del "wound" al passare tempo dopo trattamento in presenza o in assenza di media condizionati dai melanomi.

Effettuando un "wound" nel monolayer cellulare e incubando le cellule per 24 h con il medium contenente 1% di FBS, la migrazione delle cellule endoteliali di controllo non è sufficiente a riparare la ferita (Fig. 11). Le immagini mostrano il punto di inizio (0 h dopo l'incisione), il periodo intermedio (10 h dopo l'incisione) e il punto finale (20 h dopo l'incisione) dell'analisi.

Il "wound" viene riparato in maniera stereotipata: le cellule polarizzano attorno al solco, iniziano la protrusione, migrano e ricoprono lo spazio generato dal "wound" (in circa 36-48 h). L'aggiunta dei media condizionati da SK-MEL28 o OCM-1 alla coltura, induceva un significativo aumento (2 volte più alto rispetto alle cellule non stimolate alle 20 h) delle cellule che migrano all'interno dell'area denudata (Fig. 11).

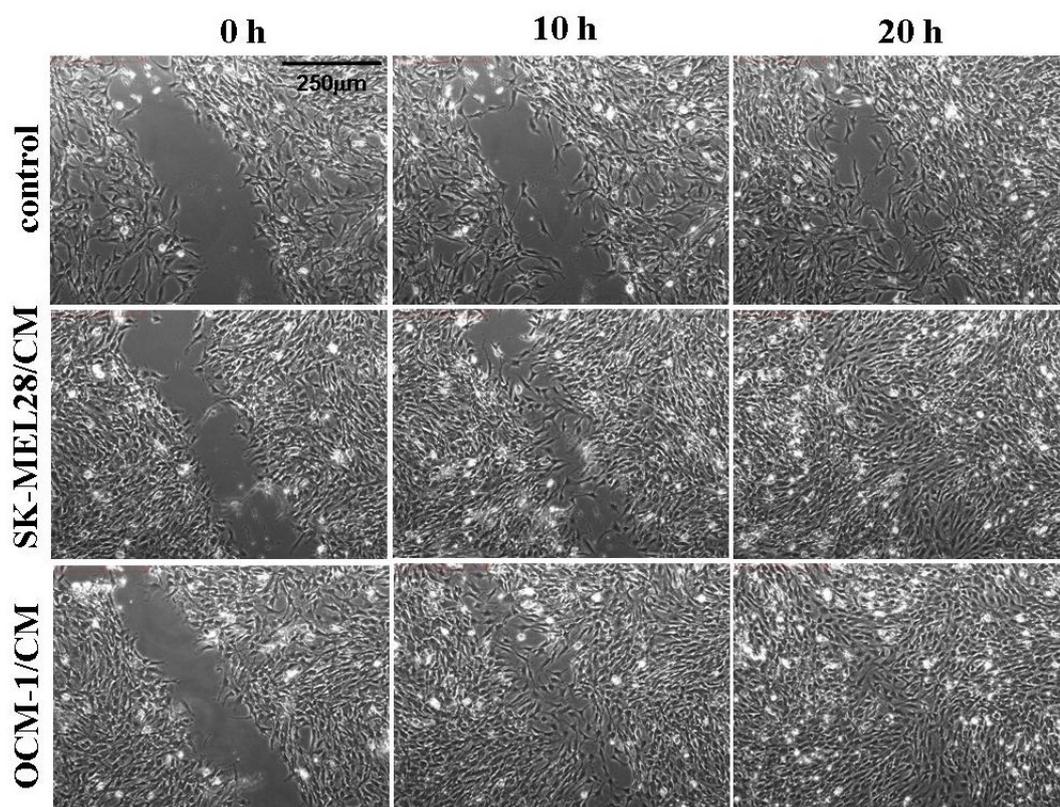
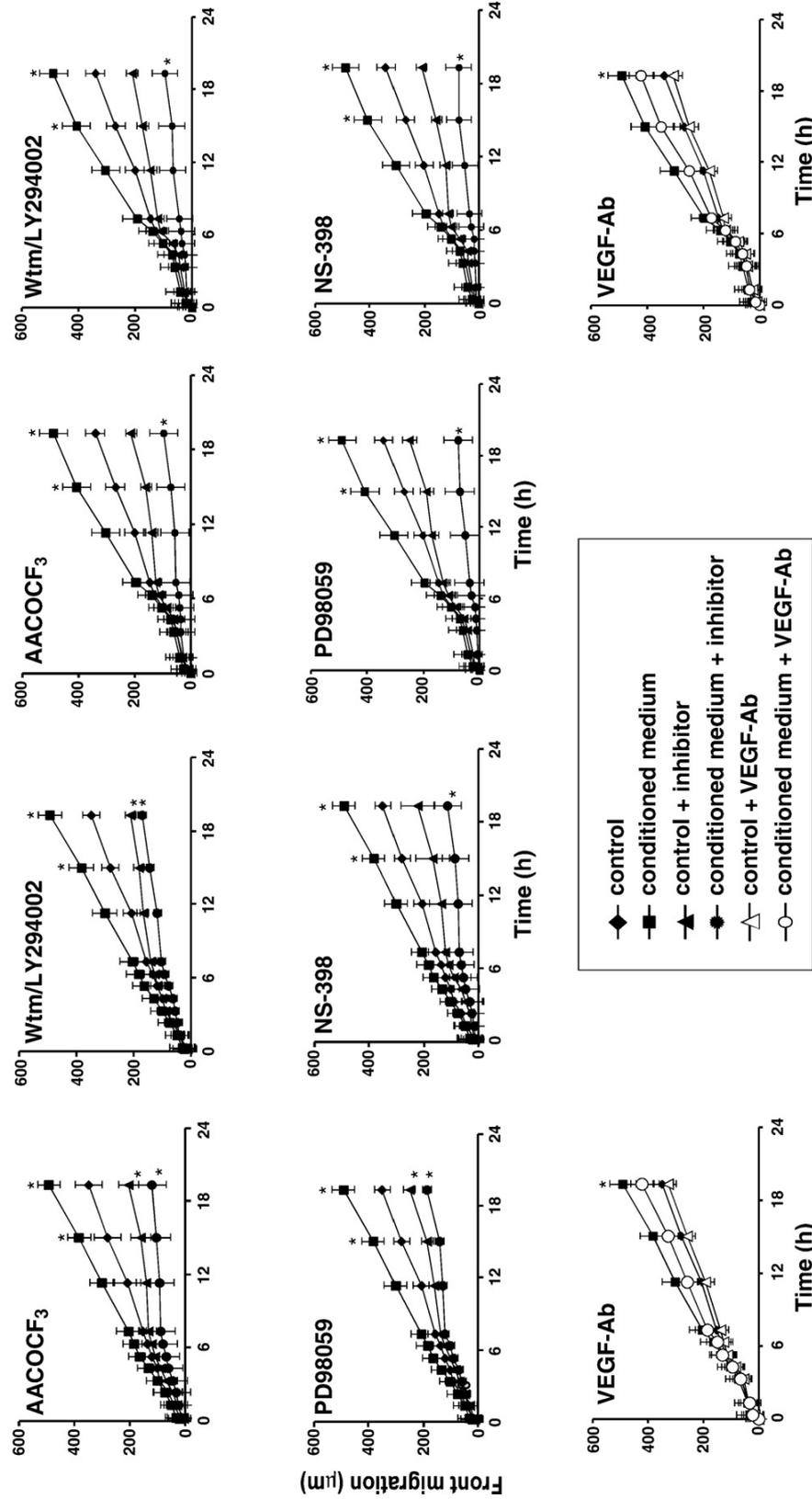


Fig. 11 Effetto del medium condizionato di SK-MEL28 ed OCM-1 sulla capacità delle GP8.3 di riparazione del “wound” *in vitro*. Le colture di endotelio sono state trattate come descritto nella sezione Materiali e metodi. Le fotografie digitali prese nelle stesse posizioni e ai tempi indicati, mostrano la migrazione delle cellule endoteliali all’interno dell’area deprivata di cellule. Le immagini rappresentative mostrate, sono state prese a 0, 10 e 20 h dopo il “wound”. La scala bar è di 250 μm . L’esperimento è stato ripetuto tre volte e sono stati osservati risultati simili.

Per evidenziare se l’aumento della migrazione cellulare e/o proliferazione, in risposta alla presenza di medium condizionato, fosse direttamente mediato da fattori attivanti le chinasi, le fosfolipasi o le ciclossigenasi, sono stati aggiunti specifici inibitori al medium di coltura 90 minuti prima di effettuare il “wound” nel monolayer cellulare e prima dell’aggiunta del medium condizionato, o di SK-MEL28 o di OCM-1. La Fig. 12, mostra i risultati del tasso di riparazione della ferita dopo il wounding e il trattamento con vari agenti. Il trattamento con wortmannina più LY294002, PD98059, AACOCF₃ ed NS-398, in cellule endoteliali incubate con i due media condizionati, causava un significativo decremento dell’avanzamento del fronte della ferita in funzione del tempo, in paragone con le cellule endoteliali stimulate dal medium condizionato o con le cellule controllo (senza aggiunta di medium condizionato). I dati, inoltre, indicano che l’aggiunta di anticorpo anti-VEGF ai media condizionati riducono la migrazione endoteliale del 18% e del 20%, comparata ai valori controllo.

A) SK-MEL28 conditioned medium



B) OCM-1 conditioned medium

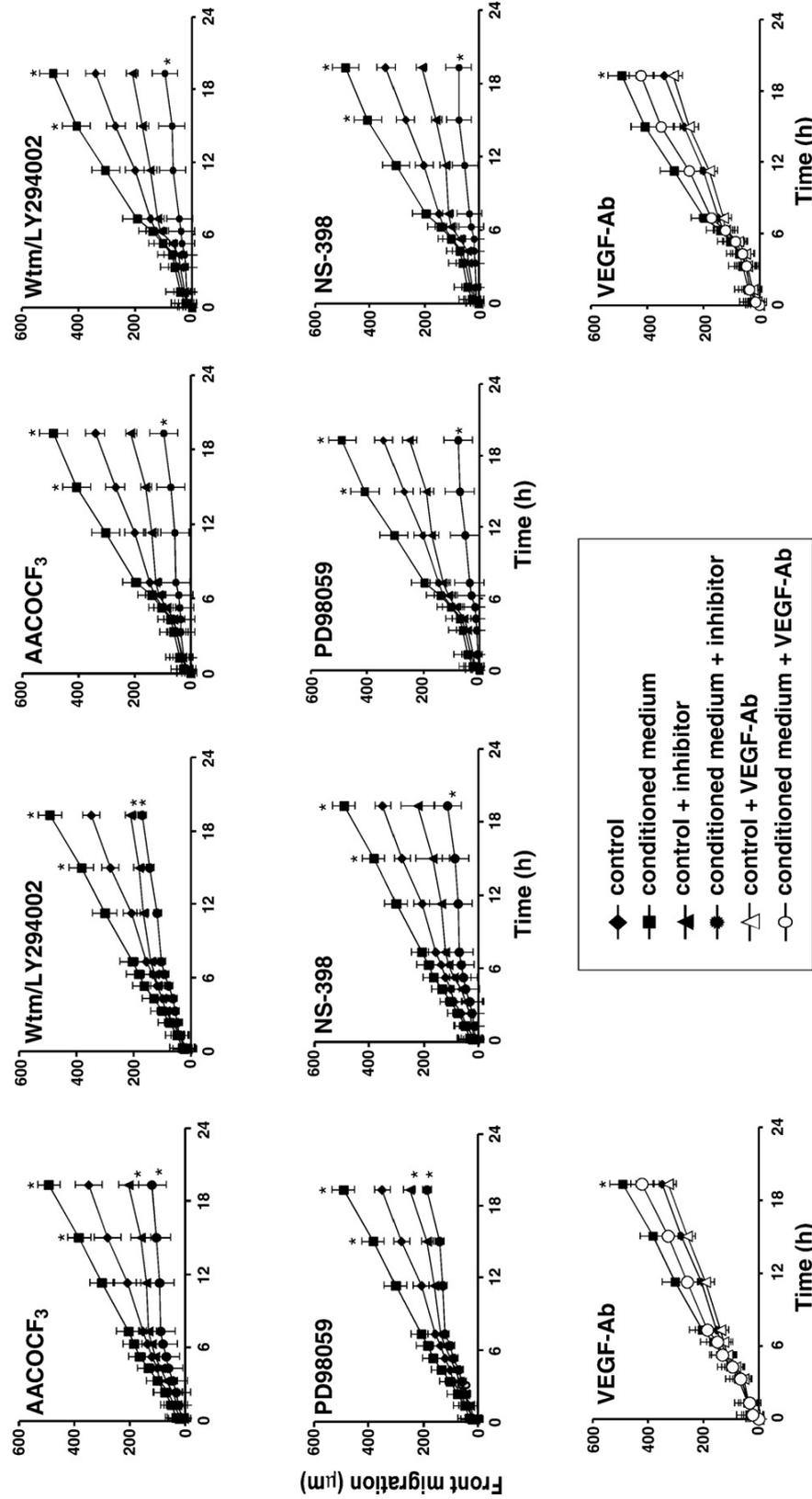


Fig. 12 Quantificazione degli effetti del medium condizionato dei melanomi sulla capacità delle GP8.3 di riparazione del “wound” (fronte di migrazione in μm in funzione del tempo). Il fronte di migrazione cellulare è stato calcolato come descritto nella sezione Materiali e metodi. Dopo 24 h, i “wounds” sono stati quasi completamente chiusi nelle cellule endoteliali stimolate dai media condizionati, ma non nelle cellule incubate con gli inibitori. I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) sono indicate da asterischi.

La Fig. 13 mostra fotografie rappresentative di colture di cellule endoteliali GP8.3 in seguito al “wounding” in un monolayer e l’avanzamento del fronte di migrazione durante le 24 h, dopo trattamento in presenza o in assenza di medium condizionato del glioma.

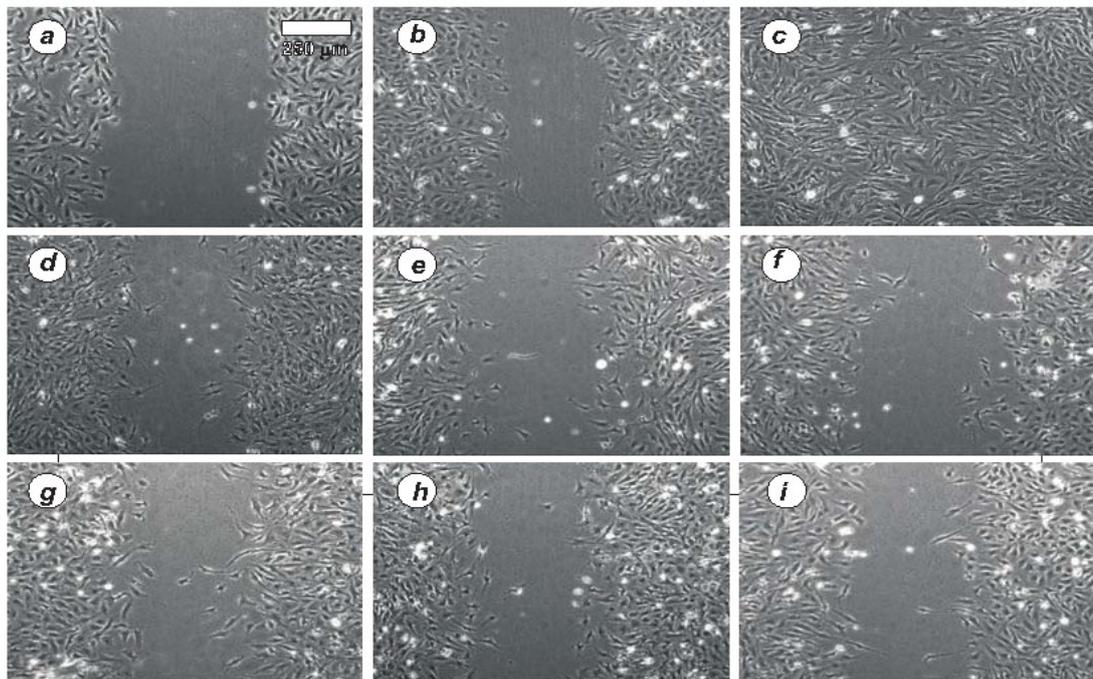
Effettuando un “wound” nel monolayer cellulare e incubando le cellule per 24 h con il medium contenente 1% di FCS, la migrazione delle cellule endoteliali di controllo non è sufficiente a riparare la ferita (Fig. 13, controllo, pannelli a e b). Le immagini mostrano il punto di inizio (0 h dopo l’incisione) e il punto finale (24 h dopo l’incisione) dell’analisi.

Anche in questo caso le cellule polarizzano attorno al solco, iniziano la protrusione, migrano e ricoprono lo spazio generato dal “wound” (in circa 36-48 h). L’aggiunta di medium condizionato dal glioma alla coltura induce un significativo aumento (1.5 volte più alto rispetto alle cellule non stimolate alle 24 h) delle cellule che migrano all’interno dell’area denudata (Fig. 13, pannello c; Fig.14).

L’effetto degli inibitori specifici, aggiunti al medium di coltura 2 h prima di effettuare il “wound” nel monolayer cellulare e prima dell’aggiunta del medium condizionato, è mostrato in Fig. 12 (pannelli d-i). Il trattamento con wortmannina, LY294002, PD98059, AACOCF₃, BEL ed NS-398, in quelle cellule stimolate dal medium condizionato, causa un significativo decremento dell’avanzamento del fronte della ferita in funzione del tempo, in paragone con le cellule endoteliali stimolate dal medium condizionato o con le cellule controllo (Fig 13).

Anche la Fig. 14 mostra il tasso di rimarginazione della ferita nelle GP8.3 in assenza o presenza di medium condizionato.

Quanto trovato indica chiaramente che gli effetti positivi sulla migrazione, dovuti ad entrambi i media condizionati, sono mediati da segnali intra-endoteliali che coinvolgono il pathway PI3 chinasi/fosfolipasi A₂/ERK, che stimolano l’attività della COX-2. Sembra quindi, che l’inibizione dell’attività di COX-2 e i prodotti del pathway della COX-2 possano influenzare la proliferazione e la migrazione endoteliali.



a: cell wound at 0 h, control
b: wound healing at 24 h; control ECs
c: wound healing at 24 h; ECs cultured in C6 CM
d: wound healing at 24 h; ECs cultured in C6 CM + wortmannin
e: wound healing at 24 h; ECs cultured in C6 CM + LY294002
f: wound healing at 24 h; ECs cultured in C6 CM + PD98059
g: wound healing at 24 h; ECs cultured in C6 CM + AACOCF₃
h: wound healing at 24 h; ECs cultured in C6 CM + BEL
i: wound healing at 24 h; ECs cultured in C6 CM + NS-398

Fig. 13 Effetto del medium condizionato dal glioma sulla capacità delle GP8.3 di riparazione del “wound” in vitro. Le colture di endotelio sono state trattate come descritto nella sezione Materiali e metodi. Le fotografie digitali prese nelle stesse posizioni e ai tempi indicati, mostrano la migrazione delle cellule endoteliali all’interno dell’area deprivata di cellule. Le immagini rappresentative mostrate, sono state prese a 0 e 24 h dopo il “wound” (ingrandimento 10 x). Dopo 24 h, i “wounds” erano quasi completamente chiusi nelle colture trattate con medium condizionato da C6, ma non in quelle incubate con gli inibitori. La scala bar è di 250 μm

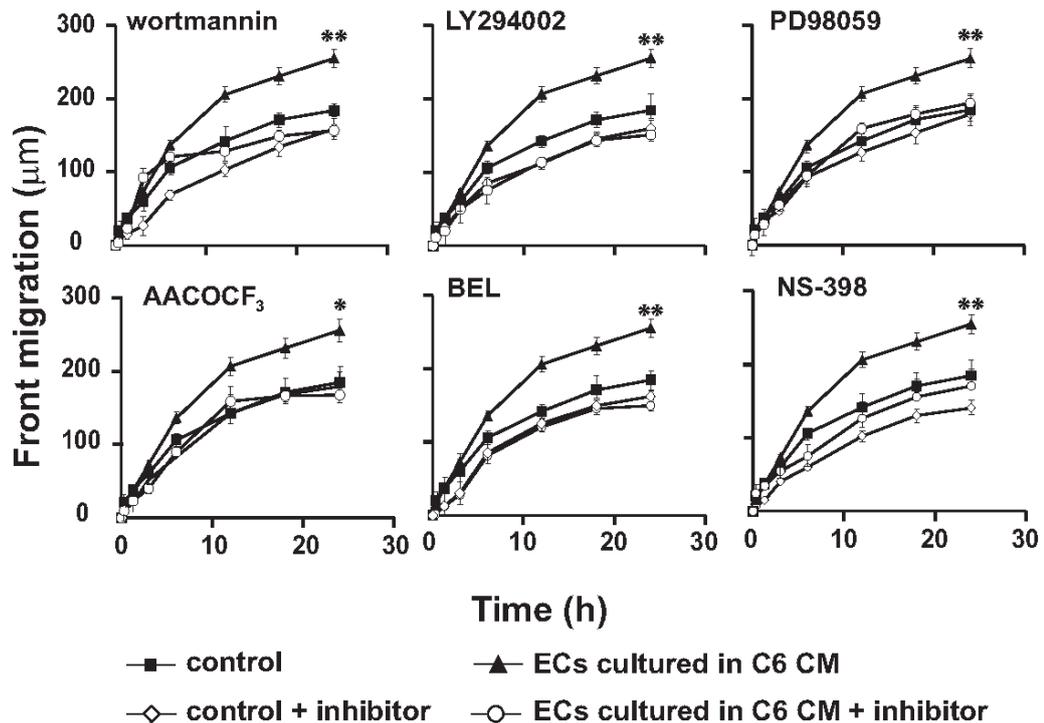


Fig. 14 Quantificazione degli effetti del medium condizionato del glioma sulla capacità delle GP8.3 di riparazione del “wound” (fronte di migrazione in μm in funzione del tempo). Il fronte di migrazione cellulare è stato calcolato come descritto nella sezione Materiali e metodi. I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) sono indicate da asterischi.

3.4 Effetto del VEGF su proliferazione, migrazione ed espressione della PLA₂

Al fine di comprovare che la secrezione tumorale di VEGF, il principale fattore angiogenico tumorale nel glioma umano, sia responsabile della proliferazione cellulare, le cellule sono state trattate con il peptide VEGF₁₆₅. L’aggiunta di questo (100 ng/mL) o di medium condizionato del glioma ha potenziato significativamente la proliferazione delle GP8.3 del 52% e del 78%, rispettivamente (Fig. 15A). Al contrario, l’aggiunta di VEGF-Ab (2 $\mu\text{g/mL}$) nel medium contenente VEGF₁₆₅ e nel medium condizionato da glioma induceva significativamente una riduzione dell’incremento proliferativo del 45% e del 68%, rispettivamente. Risultati simili sono stati ottenuti con l’aggiunta di anticorpi contro VEGFR-1 e VEGFR-2, recettori del VEGF molto espressi nelle cellule endoteliali durante la genesi tumorale, dove la riduzione del tasso mitotico era del 36% e del 40%, rispettivamente (nelle cellule

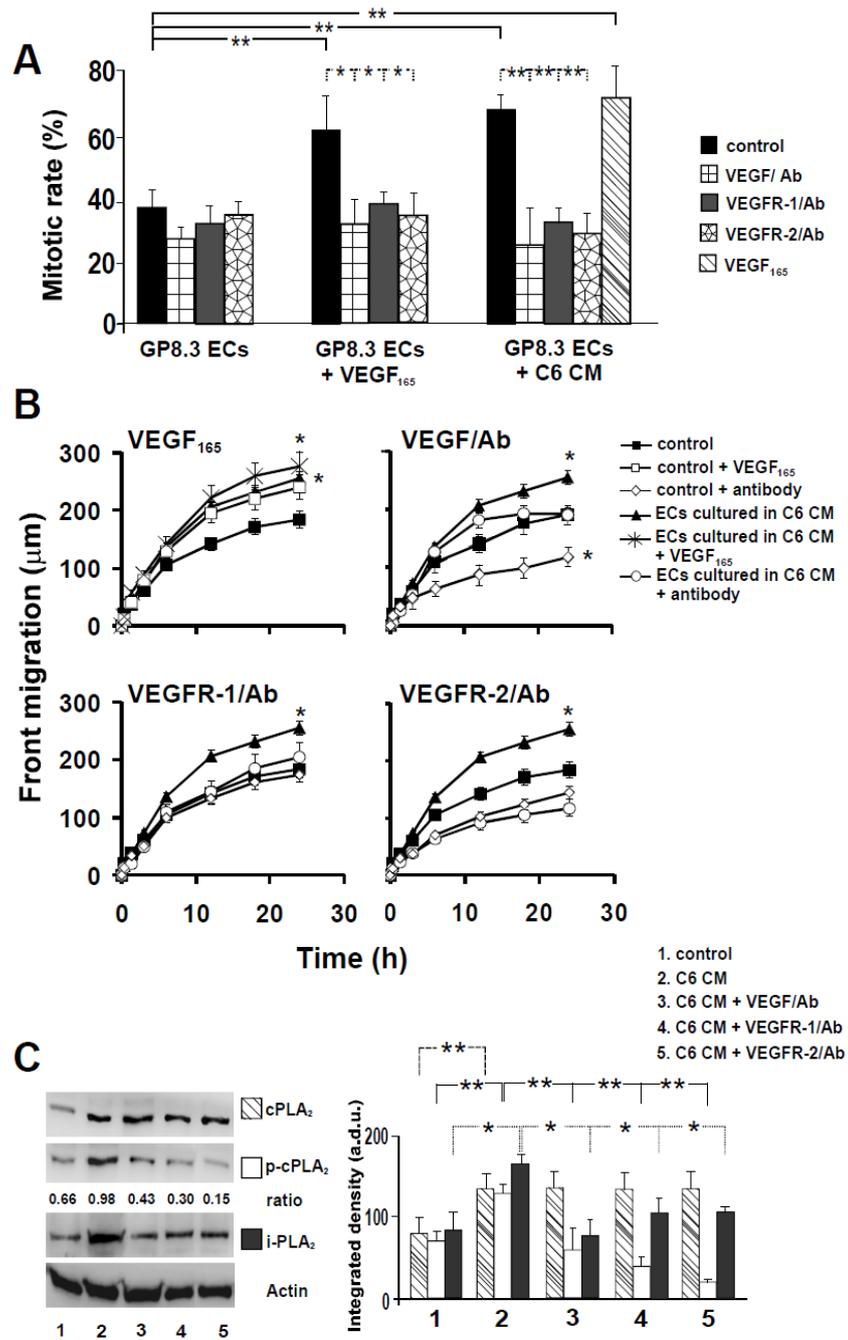


Fig. 15 Ruolo del VEGF sulla proliferazione e migrazione delle GP8.3 stimolata dal medium condizionato dal glioma. Le cellule endoteliali sono cresciute in medium contenente 1% FCS per 24 h (controllo), con VEGF₁₆₅ e con medium condizionato da C6. Inoltre, sono stati aggiunti al medium di crescita gli anticorpi diretti contro VEGF, VEGF-R1 e VEGF-R2. **Pannello A:** il tasso mitotico è stato misurato mediante microscopio time-lapse. **Pannello B:** l'effetto degli anticorpi contro VEGF/VEGF-R1/VEGF-R2 (alle concentrazioni di cui sopra) sulle cellule trattate con medium condizionato da C6 è stato testato *in vitro* mediante il "wound healing assay" (fronte di migrazione in μm in funzione del tempo). **Pannello C:** l'espressione totale delle proteine iPLA₂ e cPLA₂, e la forma fosforilata di cPLA₂ sono state valutate tramite l'analisi Western blot. I valori, espressi come unità arbitrarie densitometriche (a.d.u.), sono stati ottenuti dalla lettura delle intensità delle bande, e rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le barre dei grafici rappresentano l'intensità netta delle bande proteiche ottenute con il programma Image J. Le differenze statisticamente significative (*p<0.05, **p<0.01) sono indicate da asterischi.

trattate con VEGF₁₆₅), e del 49% e del 59% (nelle cellule trattate con il medium condizionato dal glioma). L'aggiunta di VEGF (100 ng/mL) al medium condizionato determinava un aumento proliferativo dell' 85% (Fig. 15A), suggerendo che il medium condizionato dal glioma, fortificato dal VEGF₁₆₅ esogeno, non esprimeva un importante effetto additivo sul tasso mitotico.

I risultati osservati per la migrazione, dopo aver effettuato il solco sulla piastra di coltura, indicavano che l'aggiunta di VEGF₁₆₅ al medium di crescita ne aumentava marcatamente i livelli (Fig. 15B) in maniera simile a quelli visti in presenza di medium condizionato dal C6, ma anche in presenza di medium condizionato dal C6 più VEGF₁₆₅. L'aggiunta dell'anticorpo contro VEGF al medium condizionato dal glioma sopprimeva la migrazione endoteliale del 38% rispetto a quelle cellule stimulate dal medium condizionato, ma senza anti-VEGF (Fig. 15B). L'anticorpo contro VEGF era anche in grado di ridurre fortemente del 47% la migrazione della cellule controllo. L'utilizzo degli anticorpi diretti contro i recettori del VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2, confermava i dati ottenuti in precedenza. In particolare, l'anti VEGFR-2 era in grado di ridurre la migrazione indotta dal medium condizionato del C6 nelle 24 h del 58% (Fig. 15B).

Le analisi Western blot per i campioni trattati in presenza di medium condizionato supplementato con anticorpi contro VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 hanno mostrato una forte repressione della forma fosforilata di cPLA₂, e un significativo indebolimento dell'espressione della iPLA₂ (Fig. 15C). Queste osservazioni confermano il ruolo specifico e critico del VEGF e dei suoi recettori nel segnale di risposta e di regolazione endoteliale.

3.5 Attività della PLA₂ e produzione di PGE₂ e VEGF

Come mostrato in Tabella 1, nelle GP8.3 stimulate dai media condizionati del melanoma, l'attività della PLA₂ risultava fortemente attivata (188.4% per SK-MEL28/CM e 154.9% per OCM-1/CM) comparata ai valori controllo. Nei campioni controllo e in quelli trattati con medium condizionato, la presenza per 24 h di AACOCF₃, un inibitore competitivo di entrambe le PLA₂, causava un significativo decremento nell'attività enzimatica (38.3% nel controllo; 53.5% e 62.2% per SK-MEL28 e OCM-1, rispettivamente). La presenza di BEL, inibitore specifico per la iPLA₂, nei campioni controllo e in quelli trattati con medium condizionato, alle stesse

condizioni sperimentali, ci ha permesso di discriminare tra le due isoforme enzimatiche della PLA₂. Nelle colture controllo, non si osservava una significativa inibizione dell'attività enzimatica in presenza di BEL, mentre nelle colture trattate, si assisteva ad un notevole decremento dell'attività in PLA₂ (27.9% per SK-MEL28/CM e 29.7% per OCM-1/CM), suggerendo un maggior contributo dell'attività enzimatica di iPLA₂ nel mediare il rilascio di AA nelle cellule trattate con medium condizionato.. L'attività totale delle PLA₂ era notevolmente inibita in presenza di PD98059 e wortmannina + LY294002 (45.9% e 50.9% di inibizione nelle cellule trattate con il medium condizionato di SKMEL28; 48.2% e 60.8% di inibizione nelle cellule trattate con il medium condizionato da OCM-1). Risultati simili sono stati ottenuti nel caso del controllo e delle cellule trattate per le colture primarie BBEC.

Tabella 1

Attività della PLA₂ in GP8.3 stimulate e non stimulate dal medium condizionato del melanoma.

	ECs	ECs + SK-MEL28/CM	ECs + OCM-1/CM
	<i>(pmol/min/mg protein)</i>		
Control	19.1 ± 0.9	55.1 ± 5.1**	47.7 ± 3.2**
AACOCF ₃	11.8 ± 0.7 [†]	25.6 ± 1.9* [†]	18.4 ± 1.3 [†]
BEL	14.9 ± 0.6	39.7 ± 2.0* [†]	34.2 ± 2.1* [†]
PD98059	14.0 ± 0.4	29.8 ± 1.8* [†]	25.2 ± 1.1 [†]
Wtm/LY294002	15.9 ± 0.8	27.0 ± 1.5* [†]	19.1 ± 0.8 [†]

I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative dell'attività enzimatica nelle cellule trattate con media condizionati comparate alle cellule controllo, sono indicate da asterischi (* p<0.05, ** p<0.01). Le differenze statisticamente significative dell'attività enzimatica misurata in presenza di inibitori, nel controllo e nelle cellule stimulate dal media condizionati sono indicate dal segno [†]p<0.05.

Come riportato in Tabella 2, nelle GP8.3 stimulate da dal medium condizionato del glioma, l'attività della PLA₂ risultava fortemente attivata (di circa 2,3 volte) rispetto al controllo. L'uso di AACOCF₃ causava un significativo decremento nell'attività enzimatica (38,1% nel controllo e 32,5% nelle colture trattate,

rispettivamente). Nelle colture controllo, non si osservava una significativa inibizione dell'attività enzimatica in presenza di BEL, mentre nelle colture trattate, si assisteva ad un notevole decremento dell'attività in PLA₂ (47.2%), suggerendo, anche in questo caso, un maggior contributo dell'attività enzimatica di iPLA₂ nel mediare il rilascio di AA nelle cellule trattate con medium condizionato. L'attività totale delle PLA₂ era notevolmente inibita in presenza di PD98059, wortmannina ed LY294002 (36.5%, 38.7% e 42.3% di inibizione in presenza di medium condizionato). Risultati simili sono stati ottenuti nel caso del controllo e delle cellule trattate per le colture primarie BBEC.

Questi ultimi dati mostrano chiaramente il coinvolgimento di PI3K ed ERK1/2, nella via di segnale che attiva principalmente la cPLA₂, e indicano che queste chinasi agiscono a monte della cPLA₂.

Tabella 2

Attività della PLA₂ in GP8.3 e BBEC stimulate e non stimulate dal medium condizionato del glioma

	GP8.3 ECs	GP8.3 ECs + C6 CM	BBEC	BBEC + C6 CM
	<i>(pmol/min/mg protein)</i>			
Control	22.0 ± 1.9	50.6 ± 6.3**	14.8 ± 0.9	31.7 ± 4.2**
AACOCF ₃	13.6 ± 0.5 [†]	34.4 ± 4.6 [†]	9.3 ± 0.4	19.6 ± 2.6 [†]
BEL	17.4 ± 1.3	26.7 ± 1.8 [†]	10.9 ± 0.7	21.1 ± 1.4 [†]
PD98059	14.0 ± 0.7 [†]	32.1 ± 2.0 [†]	9.7 ± 0.9	18.6 ± 4.1 [†]
Wtm	16.6 ± 0.7	31.0 ± 3.5 [†]	10.1 ± 0.5	21.1 ± 3.0
LY294002	15.0 ± 1.5	29.2 ± 5.3 [†]	11.0 ± 0.9	20.2 ± 2.2 [†]

I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative dell'attività enzimatica nelle cellule trattate con medium condizionato da C6 sono indicate da asterischi (**p<0.01). Le differenze statisticamente significative dell'attività enzimatica misurata in presenza di inibitori, nel controllo e nelle cellule stimulate dal medium condizionato da C6 sono indicate dal segno [†]p<0.05.

I livelli della produzione basale di PGE₂ e di VEGF nel surnatante delle ECs controllo, dosati mediante ELISA (Tabella 3), avevano valori di 21 pg/mL e 10 pg/mL, rispettivamente, mentre i livelli trovati nel medium condizionato collezionato da

colture di C6 (per 24 h di incubazione) raggiungevano valori di 105 pg/mL (un incremento di 5 volte rispetto al surnatante dei campioni controllo) e 139 pg/mL (13,9 volte più alto rispetto al surnatante controllo), rispettivamente. I livelli di PGE₂ e VEGF nel surnatante collezionato da endotelio stimolato dal medium condizionato da C6 per 24 h, erano di 181 pg/mL and 142 pg/mL, rispettivamente. Inoltre, nel surnatante delle colture trattate con medium condizionato da C6 in presenza degli inibitori BEL e AACOCF₃, i livelli di PGE₂ erano di 127 pg/mL e 112 pg/mL, rispettivamente. Le PGE₂, non sono state riscontrate nel surnatante di colture cellulari trattate con NS-398, inibitore di COX-2.

Tabella 3

Produzione di PGE₂ e VEGF nei media condizionati da C6 e nel surnatante delle GP8.3 stimulate dal medium condizionato del glioma.

	PGE ₂	VEGF
	<i>(pg/mL)</i>	
C6 CM	105 ± 9.3*	139 ± 11.2*
GP8.3 ECs (control)	21 ± 1.7	10 ± 0.4
GP8.3 ECs + C6 CM	181 ± 16.4*†§	142 ± 11.6*†
GP8.3 ECs + C6 CM + AACOCF ₃	112 ± 9.8	
GP8.3 ECs + C6 CM + BEL	127 ± 10.5	

I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Il segno * ($p < 0.01$) è riferito alle cellule controllo; il segno † ($p < 0.05$) è riferito al medium condizionato dal glioma; il segno § ($p < 0.05$) è riferito alle cellule stimulate dal medium condizionato più gli inibitori AACOCF₃ (2.5 mM) e BEL (50 mM).

3.6 Elettroporazione

Un ulteriore approccio al fine di verificare il coinvolgimento delle attività di cPLA₂ e iPLA₂ è stato fornito mediante l'incorporazione degli anticorpi anti-cPLA₂ e anti-iPLA₂ nelle cellule endoteliali. Le cellule sono state elettroporate per l'inserzione di anticorpi in condizioni ottimali senza influire sulla loro integrità fisiologica. Per l'esperimento svolto nel caso di trattamento con i media condizionati dalle due linee di melanoma, come mostrato in Fig. 16, i risultati ottenuti sono stati in linea con quanto atteso: il legame dell'anticorpo anti-cPLA₂ con il corrispondente enzima intracellulare

ha abolito la proliferazione cellulare indotta dai due media condizionati (inibizione dell'83% per SK-MEL28 e del 76% per OCM-1, in comparazione con i valori osservati per cellule elettroporate stimolate dai media condizionati dai melanomi), mentre l'elettroporazione di anti-IgG di controllo non ha avuto effetti né sulle cellule controllo (senza incubazione con i media) né su cellule endoteliali stimolate dai media condizionati.

I dati mostrati sono indicativi perchè suggeriscono direttamente la presenza all'interno della cellula del complesso cPLA₂-anticorpo anti-cPLA₂, e indirettamente forniscono una spiegazione dell'inibizione della formazione di derivati idrolitici a partire da substrati fosfolipidici.

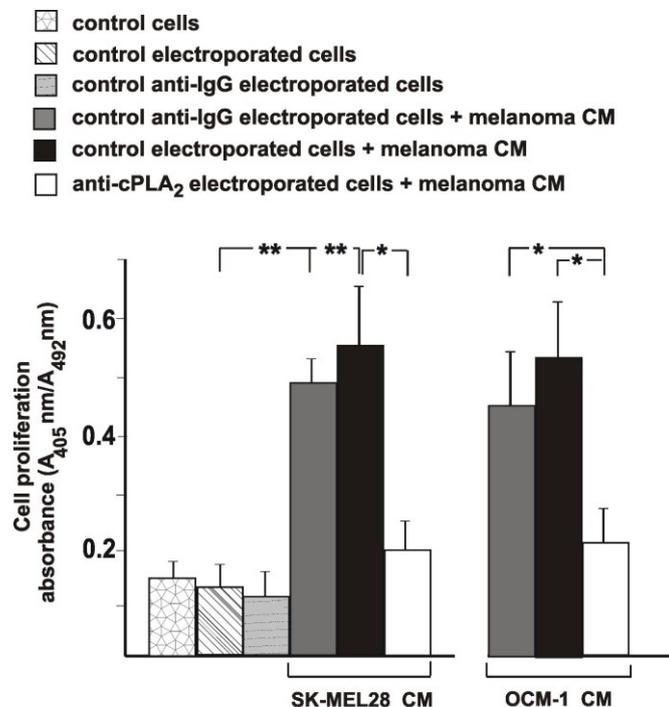


Fig. 16 Effetto dell'anticorpo anti-cPLA₂ elettroporato all'interno delle GP8.3 sulla proliferazione cellulare indotta dal medium condizionato. La proliferazione cellulare è stata misurata mediante il test della BrdUr. I dati mostrati rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative sono indicate da asterischi, *p<0.05.

Come mostrato in Fig. 17, la quale si riferisce al saggio svolto per trattamento delle GP8.3 con il medium condizionato dal glioma, gli anticorpi, una volta penetrati nelle cellule, legavano il corrispondente enzima intracellulare, bloccando la proliferazione indotta dal medium condizionato da glioma (Fig. 17A, cell number, inibizione del 17% e del 28% rispettivamente; Fig. 17B, mitotic rate, inibizione del 15% e del 30%, rispettivamente); mentre l'introduzione, in quei campioni, di anticorpo

anti-IgG non ha avuto effetti né sulle cellule controllo, né sulle cellule trattate con medium condizionato. Una maggiore inibizione è stata riscontrata con l'aggiunta di entrambi gli anticorpi anti-cPLA₂ e anti-iPLA₂, suggerendo che ambedue le PLA₂ sono responsabili dell'aumento proliferativo visto in presenza di medium condizionato dal glioma. L'utilizzo di questa tecnica ci ha permesso di valutare lo specifico effetto della cascata della cPLA₂ sulla proliferazione cellulare dopo trattamento con i media condizionati.

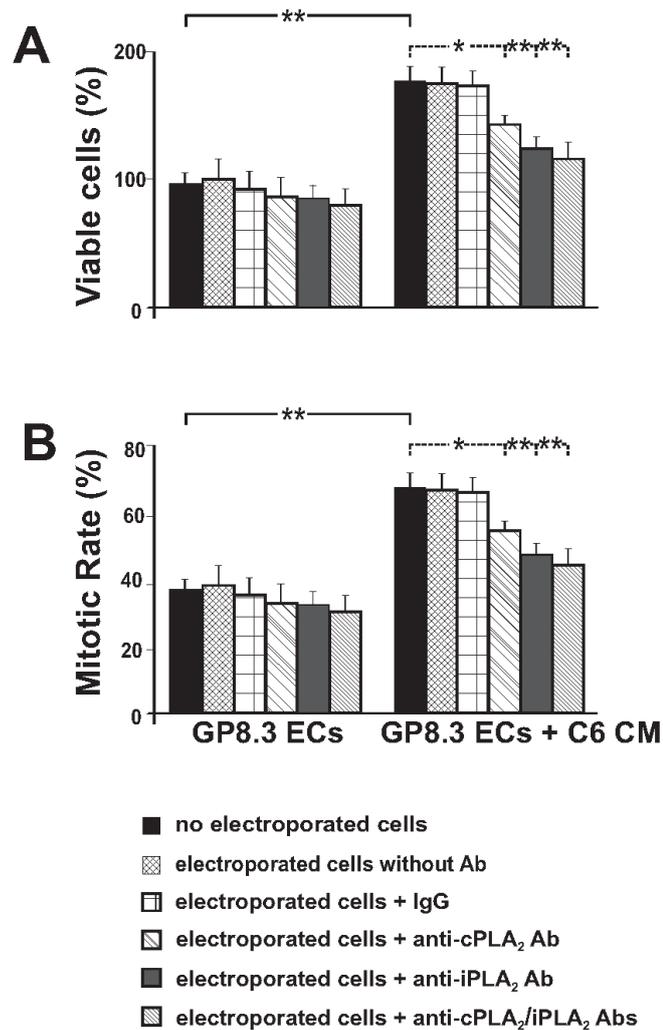


Fig. 17 Effetto dell'elettroporazione con anticorpi anti-cPLA₂ e iPLA₂ sulla proliferazione delle cellule endoteliali indotta dal medium condizionato da C6. Pannello A: la proliferazione è stata misurata contando le cellule vitali tramite il "trypan blue exclusion assay". I risultati sono espressi come percentuale di cellule vitali sul numero totale di cellule. Pannello B: il tasso mitotico (espresso come percentuale di cellule replicanti per numero totale di cellule) è stato misurato mediante microscopio time-lapse. I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative (*p<0.05, **p<0.01) sono indicate da asterischi.

3.7 Saggio di trasfezione di siRNA

Dall'analisi Western blot si è potuto osservare come l'espressione basale di entrambe le proteine cPLA₂ e iPLA₂ era fortemente attenuata nei campioni trasfettati (100 nmol/mL siRNA, Fig. 18A, punto 3), rispetto a quelli trasfettati con un vettore vuoto (controllo, punto 1) e con siRNA no-targeting aspecifico (punto 2).

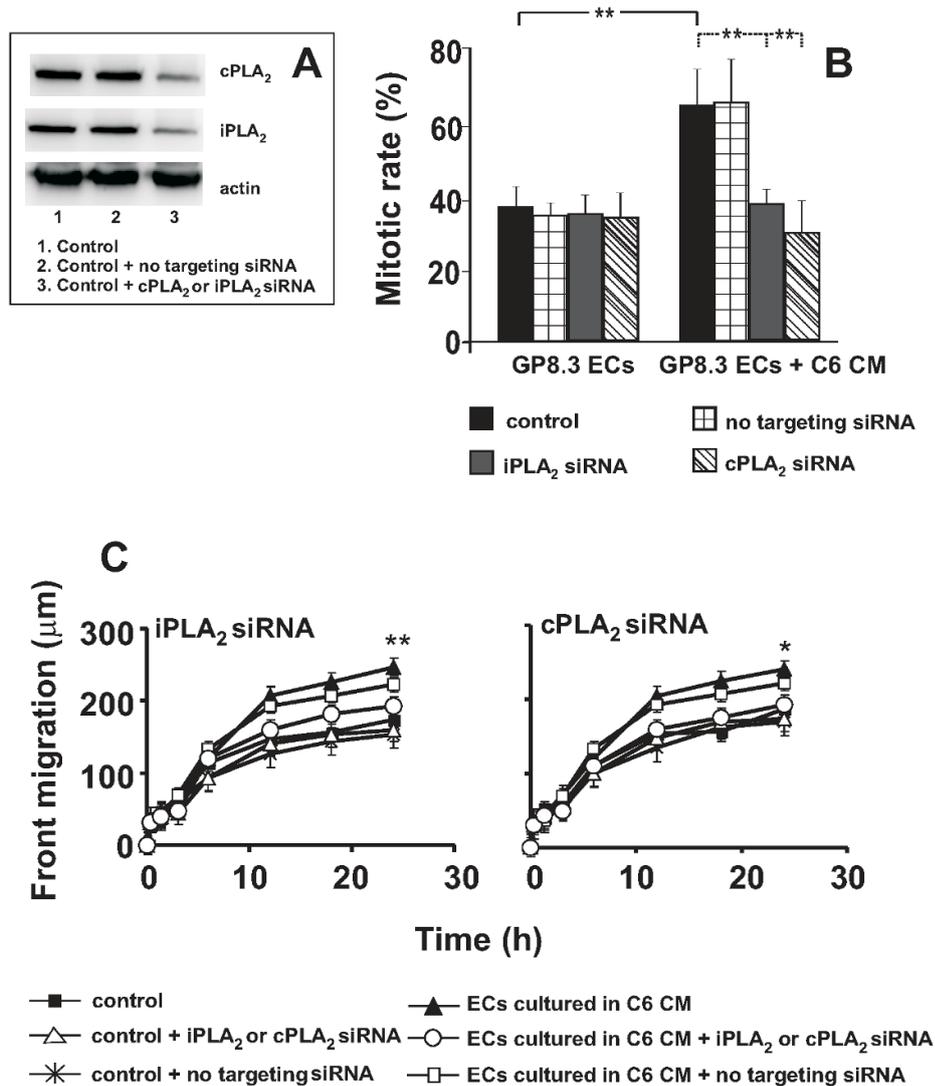


Fig. 18 Contributo delle PLA₂ nell'induzione della proliferazione e motilità cellulare stimolata dal medium condizionato da C6 sulle GP8.3. Le cellule sono state trasfettate con e senza siRNA e con siRNA no targeting. **Pannello A:** Le analisi Western Blot effettuate sulle colture cellulari confermano la drastica riduzione dei livelli proteici delle PLA₂ per quei campioni trattati con siRNA-treated. **Pannello B:** misurazione del tasso mitotico. **Pannello C:** viabilità cellulare. I valori riportati in grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le differenze statisticamente significative (*p<0.05, **p<0.01) sono indicate da asterischi.

La trasfezione di cellule con siRNA rivolto verso cPLA₂ e iPLA₂ riduceva significativamente il numero di cellule stimulate dal medium condizionato del glioma (Fig. 18B) di circa il 43% (iPLA₂) e il 48% (cPLA₂), e la migrazione cellulare (Fig. 18C) di circa il 36% e il 31%, rispettivamente, in comparazione ai campioni controllo. Questi risultati dimostrano ancora una volta che l'inibizione di cPLA₂ e iPLA₂ determina una diminuzione della proliferazione cellulare e che l'attività delle PLA₂ gioca un importante ruolo nell'induzione proliferativa.

3.8 Espressione delle PLA₂ ed effetto degli inibitori delle chinasi

Per chiarire il ruolo delle fosfolipasi A₂ calcio-dipendente e calcio-indipendente, sul release di acido arachidonico stimolato dal medium condizionato di ambedue i tipi tumorali sulla proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali, è stata analizzata l'espressione proteica e l'attivazione delle fosfolipasi mediante analisi di Western blotting.

I risultati dimostrano che in sistemi di co-cultura che permettono la diffusione di fattori solubili presenti nel medium condizionato da melanoma per 24 h, le cellule endoteliali esprimono livelli proteici di cPLA₂ ed iPLA₂ più alti rispetto alle colture controllo (senza aggiunta di medium condizionato), rispettivamente del 42% e del 60% per SK-MEL28 e del 50% e 70% per OCM-1 (Fig. 19A, 19B e 19C). Un eguale caricamento di proteine nelle varie lanes della membrana è stato dimostrato dall'intensità simile delle bande di actina. I risultati mostrano che nelle cellule endoteliali stimulate dai media condizionati, l'incremento dell'attività totale delle fosfolipasi (vedere Fig. 8) potrebbe essere realmente mediata da entrambi gli enzimi, cPLA₂ e iPLA₂.

L'incubazione con entrambi i media condizionati da melanoma, ha inoltre indotto un incremento della forma fosforilata della cPLA₂ endoteliale dell'87% (SK-MEL28) e dell'84% (OCM-1), in confronto alle cellule controllo cresciute senza nessuna aggiunta di medium condizionato. Sembra che nell'endotelio la forma costitutivamente fosforilata della cPLA₂ sia un 30% della forma totale dell'enzima, come descritto precedentemente [195,196]. In tal modo, l'incremento della sintesi e della fosforilazione della cPLA₂ (rapporto p-cPLA₂/cPLA₂ da 0.33 a 1.29 per SK-MEL28, e da 0.30 a 0.86 per OCM-1), potrebbe confermare un incremento dell'attività della cPLA₂ (vedere Fig. 8).

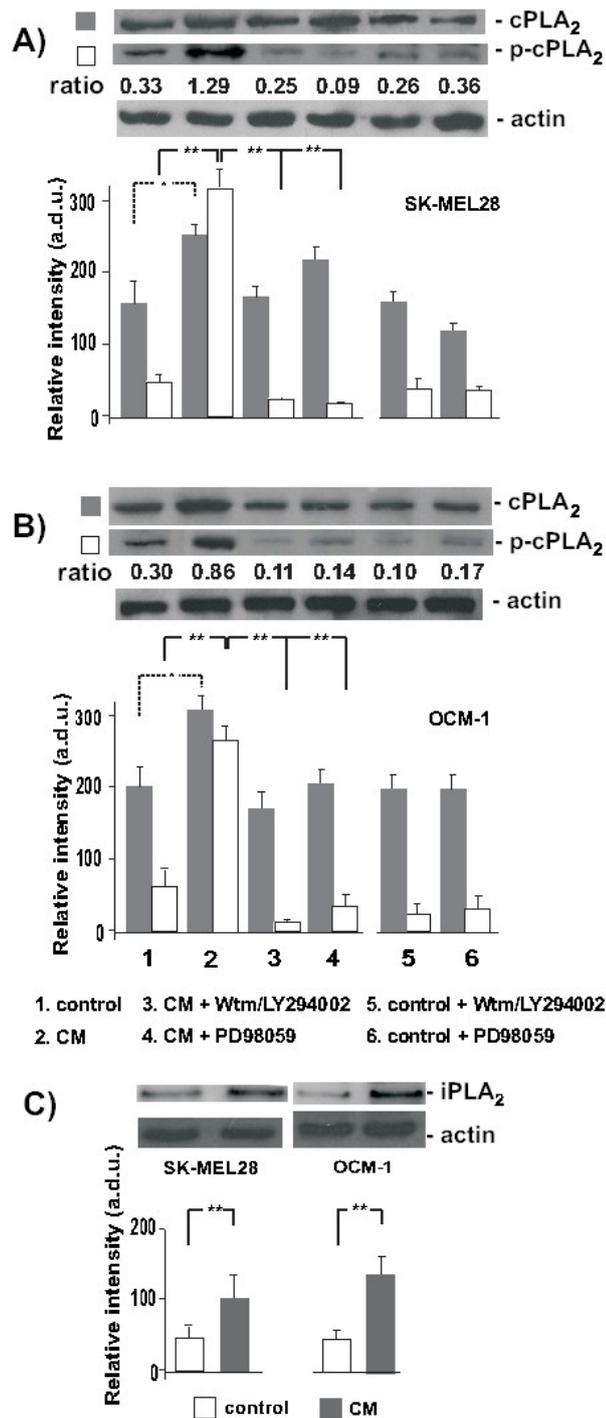


Fig. 19 Effetto del medium condizionato di SK-MEL28 ed OCM-1 sull'espressione della cPLA₂ totale (pannelli A e B), iPLA₂ (pannello C), e delle forme fosforilate di cPLA₂ in cellule endoteliali GP8.3. Sono indicati i rapporti delle intensità di banda per p-cPLA₂/cPLA₂ totale. Le membrane sono state trattate con il sistema di rilevazione ECL Plus per Western Blotting ed esposte alle lastre fotografiche (Kodak) per lo stesso periodo di tempo. I valori, espressi come unità arbitrarie densitometriche (a.d.u.), sono stati ottenuti dalla lettura delle intensità delle bande, e rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le barre dei grafici rappresentano l'intensità netta delle bande proteiche ottenute con il programma Scion Image. Le differenze statisticamente significative sono indicate da asterischi, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, comparando le colture di cellule trattate con le cellule controllo cresciute senza trattamento.

Per sondare il possibile meccanismo di signaling mediante il quale i media condizionati dei melanomi possano mediare la fosforilazione della cPLA₂ endoteliale, sono stati utilizzati una batteria di tre inibitori, quelli della fosforilazione della PI3-chinasi responsabile della fosforilazione a monte della PKC α e di ERK1/2 endoteliali (miscela di wortmannina ed LY294002), e PD98059 contro la chinasi MEK1. Wortmannina più LY294002 hanno inibito in maniera significativa a livello basale (rapporto p-cPLA₂/cPLA₂ da 1.29 a 0.25 per SK-MEL28, e da 0.86 a 0.11 per OCM-1) l'espressione della forma fosforilata della cPLA₂ endoteliale in presenza di entrambi gli inibitori (Fig. 19A e B).

La pre-incubazione dell'endotelio con una miscela di wortmannina ed LY294002 per 24 h, non ha apportato significativi cambiamenti della viabilità delle GP8.3 (test MTT, media di quattro esperimenti indipendenti), comparata alle cellule controllo non trattate. Gli stessi risultati sono stati ottenuti con l'uso di PD98059 quando utilizzato in colture di endotelio trattate con medium condizionato (dati non mostrati).

In un set di esperimenti preliminari, è stato confermato che i livelli proteici della sPLA₂(IIA) in colture di cellule endoteliali immortalizzate GP8.3, erano appena percepibili e, inoltre, è stato trovato che sPLA₂(IIA) non subisce alcuna up-regolazione né induzione da parte del medium condizionato (dati non mostrati). Il fluido sinoviale proveniente da pazienti sofferenti di osteoartrite infiammatoria, dopo appropriato consenso informato, è stato utilizzato come controllo positivo della sPLA₂(IIA).

Ventiquattro ore di esposizione al medium condizionato del glioma determinavano un significativo incremento nell'espressione totale delle PLA₂ e rispettivamente di 1.7 volte nel caso di iPLA₂ e 2.5 volte per cPLA₂. I risultati mostrano che nelle cellule endoteliali stimolate dal medium condizionato, l'incremento dell'attività totale delle fosfolipasi (Fig. 20) potrebbe essere realmente mediata da entrambi gli enzimi, cPLA₂ e iPLA₂.

Inoltre, le cellule trattate con il medium condizionato mostravano un incremento nella forma fosforilata di cPLA₂ di 5.6 volte rispetto al controllo. Anche in questo caso, l'incremento della sintesi e della fosforilazione della cPLA₂ (rapporto p-cPLA₂/cPLA₂ da 0.37 a 0.88 per le cellule trattate con medium condizionato), potrebbe confermare un incremento dell'attività della cPLA₂.

Per comprovare che il medium condizionato dal glioma possa mediare la fosforilazione della cPLA₂ endoteliale, sono stati utilizzati gli inibitori relativi alla

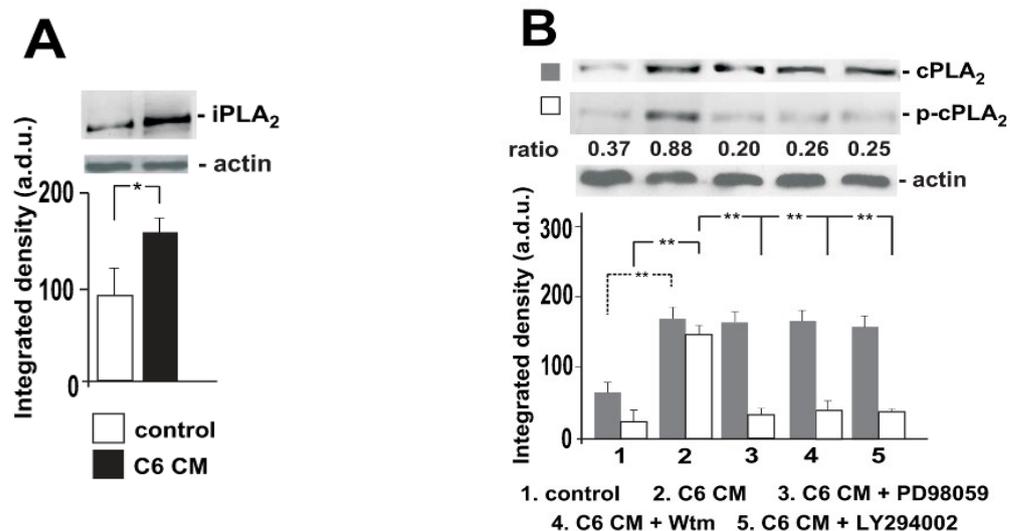


Fig. 20 Effetto del medium condizionato dal glioma sull'espressione di iPLA₂ (pannello A) e sull'espressione di cPLA₂ e della sua forma fosforilata (pannello B). I valori, espressi come unità arbitrarie densitometriche (a.d.u.), sono stati ottenuti dalla lettura delle intensità delle bande, e rappresentano la media dei risultati ottenuti da tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le barre dei grafici rappresentano l'intensità netta delle bande proteiche ottenute con il programma Image J. Le differenze statisticamente significative (*p<0.05, **p<0.01) sono indicate da asterischi.

fosforilazione della PI3-chinasi. PD98059 e wortmannina erano in grado di inibire significativamente a livelli quasi basali (rapporto p-cPLA₂/cPLA₂ da 0.88 a 0.20 o 0.26 per le cellule trattate con il medium condizionato) l'espressione della forma fosforilata di cPLA₂ (Fig. 20B). Gli stessi risultati sono stati ottenuti con l'utilizzo di LY294002.

3.9 Up-regulation dell'mRNA di cPLA₂ e iPLA₂ da parte dei media condizionati

Dato che la presenza dei media condizionati tumorali nella coltura di cellule endoteliali ha prodotto un incremento della sintesi proteica di cPLA₂, sono stati analizzati anche i livelli dell'mRNA di cPLA₂ e iPLA₂ mediante RT-PCR, dopo incubazione con i media condizionati da melanoma e da glioma per 24 h.

Come mostrato nelle Fig. 21 e 22, e in accordo con gli effetti sull'espressione proteica della cPLA₂, i media condizionati del melanoma e del glioma inducono un importante incremento dell'mRNA dell'enzima endoteliale. Lo studio è stato esteso anche all'mRNA della forma calcio indipendente della PLA₂. I risultati indicano che nelle cellule endoteliali cresciute in presenza dei media condizionati, il gene dell'iPLA₂ è costitutivamente espresso, e che i fattori solubili rilasciati nel medium dalle cellule

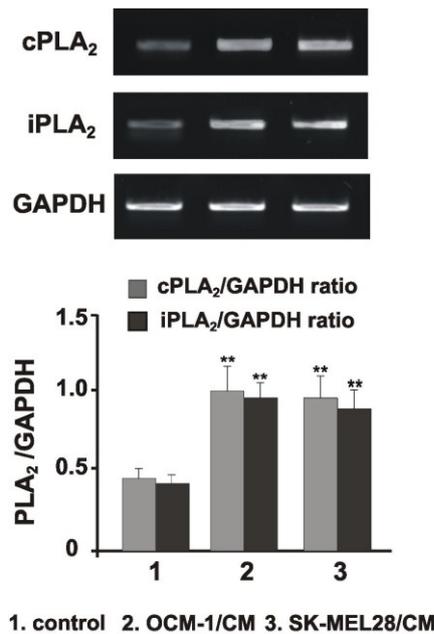


Fig. 21 Effetto dei media condizionati delle due linee di melanoma SK-MEL28 e OCM-1 sull'espressione dell'mRNA di cPLA₂ ed iPLA₂ nelle GP8.3. Sono mostrati dei gels rappresentativi di tre ripetizioni differenti dello stesso esperimento. I risultati mostrati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti. Le differenze statisticamente significative (**p<0.01) sono indicate da asterischi, comparando le cellule endoteliali trattate con i media condizionati, con le cellule controllo, cresciute senza trattamento.

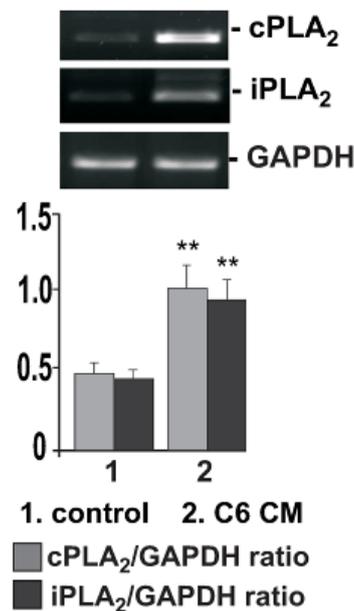


Fig. 22 Effetto del medium condizionato dal glioma sull'espressione dell'mRNA di cPLA₂ ed iPLA₂ nelle GP8.3. Sono mostrati dei gels rappresentativi di tre ripetizioni differenti dello stesso esperimento. I risultati mostrati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti. Le differenze statisticamente significative (**p<0.01) sono indicate da asterischi, comparando le cellule endoteliali trattate con i media condizionati, con le cellule controllo cresciute senza trattamento.

cancerose, causano un incremento nell'espressione dell'mRNA. Quindi l'aumento dell'espressione proteica di cPLA₂ e di iPLA₂ collima con i livelli dei rispettivi mRNA.

3.10 Espressione delle COX ed effetto degli inibitori specifici

La presenza dei media condizionati induce un significativo incremento dei livelli proteici dell'enzima COX-2, rispetto al controllo rispettivamente dell'80% per SK-MEL28 e del 60% per OCM-1 (Fig. 23).

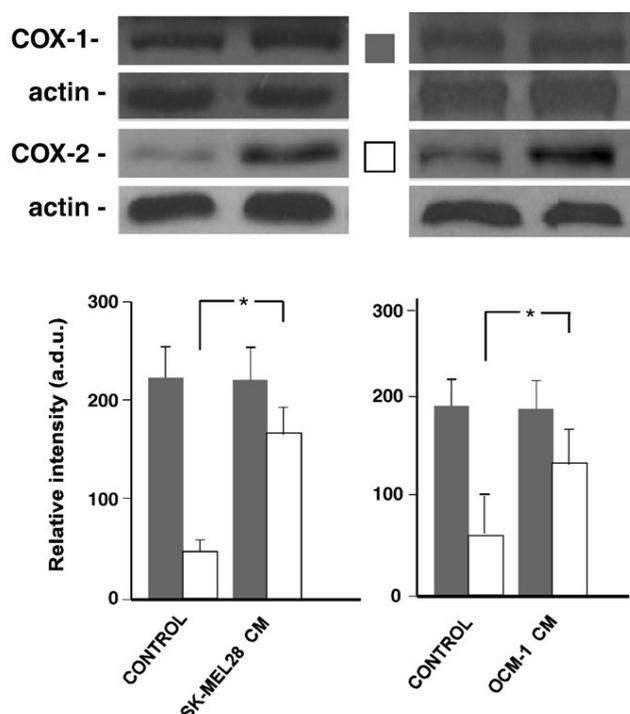


Fig. 23 Effetto dei media condizionati di SK-MEL28 e OCM-1 sull'espressione proteica di COX-1 e COX-2 in cellule endoteliali GP8.3. Le bande immunoreattive sono state visualizzate mediante chemiluminescenza (sistema ECL dell'Amersham). I valori, espressi come unità arbitrarie densitometriche (a.d.u.), sono stati ottenuti dalla lettura delle intensità delle bande, e rappresentano la media dei risultati ottenuti da almeno tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le barre dei grafici rappresentano l'intensità netta delle bande proteiche ottenute con il programma Scion Image. Le differenze statisticamente significative (** $p < 0.01$) sono indicate da asterischi, confrontando colture di cellule trattate con colture di cellule controllo.

Entrambi i media condizionati non inducevano nessun cambiamento dell'espressione di COX-1. L'utilizzo di NS-398, specifico inibitore dell'attività di COX-2, non induceva significativi cambiamenti nell'espressione dell'enzima, come atteso per un inibitore che ne inibisce l'attività catalitica.

In aggiunta, è stato osservato che il medium condizionato di SK-MEL28 stimola l'attività della COX-2 di 9.2 volte, e OCM-1 di 8.5 volte, mentre l'attività di COX-1 non mostra nessun cambiamento in entrambi i sistemi. L'incubazione dell'endotelio con NS-398 causa un brusco decremento della sola attività della COX-2 di 7.8 volte.

I Western blot relativi a COX-1 e COX2 delle cellule endoteliali controllo e di quelle trattate con medium condizionato dal glioma (Fig. 24) evidenziano, anche in questo caso, che la presenza del medium condizionato attiva in maniera significativa la forma inducibile dell'enzima COX2. La forma costitutiva sembra essere ben espressa, sia nelle cellule controllo che in quelle trattate e non subisce cambiamenti dopo incubazione con il medium condizionato.

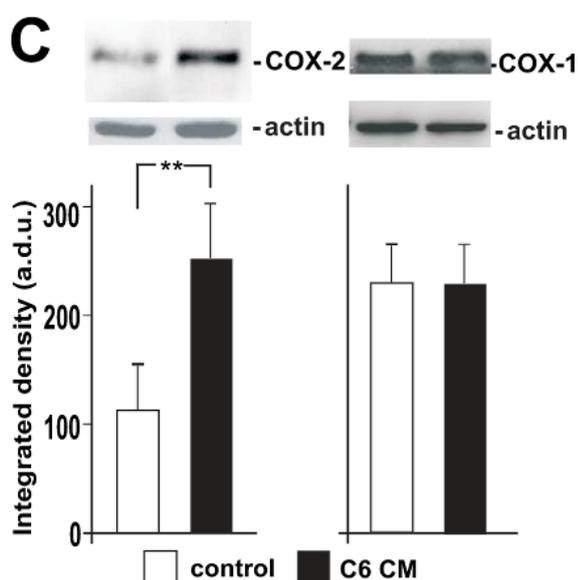


Fig. 24 Effetto del medium condizionato dal glioma sull'espressione di COX-1 e COX-2

Questi risultati indicano un contributo importante dell'attività di COX-2 nella sintesi dei prostanoidi endoteliali, e nella proliferazione e migrazione dell'endotelio in seguito all'esposizione ai media condizionati tumorali.

3.11 Espressione di PKC α ed ERK1/2 ed effetto degli inibitori specifici

L'enzima PKC α risulta essere coinvolto nella fosforilazione di p42/44 MAPK stimolata dalle cellule tumorali mediante la via Raf-MEK. Questo suggerisce indirettamente che l'attivazione della PLA₂ nelle cellule endoteliali è mediata dalla PKC α . Abbiamo, pertanto, analizzato, nel nostro sistema modello, l'attivazione di questi due enzimi.

I risultati hanno mostrato che le cellule endoteliali, cresciute in presenza dei media condizionati dal melanoma per 24 h, esprimvano la forma totale della PKC α agli stessi livelli del controllo (Fig. 25A). Inoltre i risultati hanno indicato che nelle cellule endoteliali stimulate con il medium condizionato di SK-MEL28, la forma fosforilata PKC α ^{Ser657} era più del 54%, comparata alle cellule controllo cresciute in assenza di medium condizionato, mentre era del 50% in cellule endoteliali stimulate dal medium di OCM-1.

Una fosforilazione di base della PKC α (circa 70% del pool totale) è stata rilevata nelle cellule endoteliali non stimulate [66]. La serina 657 nella PKC α è un sito di fosforilazione presente all'interno del dominio catalitico, che controlla la fosforilazione in altri siti (autofosforilazione) della stessa proteina [199,200]. È stato quindi esaminato il potenziale controllo dell'espressione della PKC α da parte di una miscela di wortmannina più LY294002, che sopprime quasi al livello basale l'espressione della forma fosforilata della PKC α endoteliale, aumentata dall'esposizione al medium condizionato (rapporto p-PKC α /PKC α da 1.50 a 0.77 per SK-MEL28 e da 0.90 a 0.40 per OCM-1).

I dati indicano quindi, che le cellule endoteliali immortalizzate hanno un buon livello di PKC α endogeno, che viene significativamente incrementato dall'esposizione per 24 h al medium condizionato dei melanomi. Il trattamento dell'endotelio con inibitori delle chinasi, ha effettivamente ridotto la presenza all'interno della cellula della PKC α fosforilata ai livelli del controllo, mostrando evidenze che i fattori solubili rilasciati dalle cellule di melanoma hanno indotto un incremento dell'espressione proteica della PKC α e della sua attivazione da parte delle chinasi che catalizzano la loro attività a monte, e che l'espressione della PKC α gioca un ruolo chiave nella

proliferazione e nella migrazione endoteliali indotte dai media condizionati del melanoma.

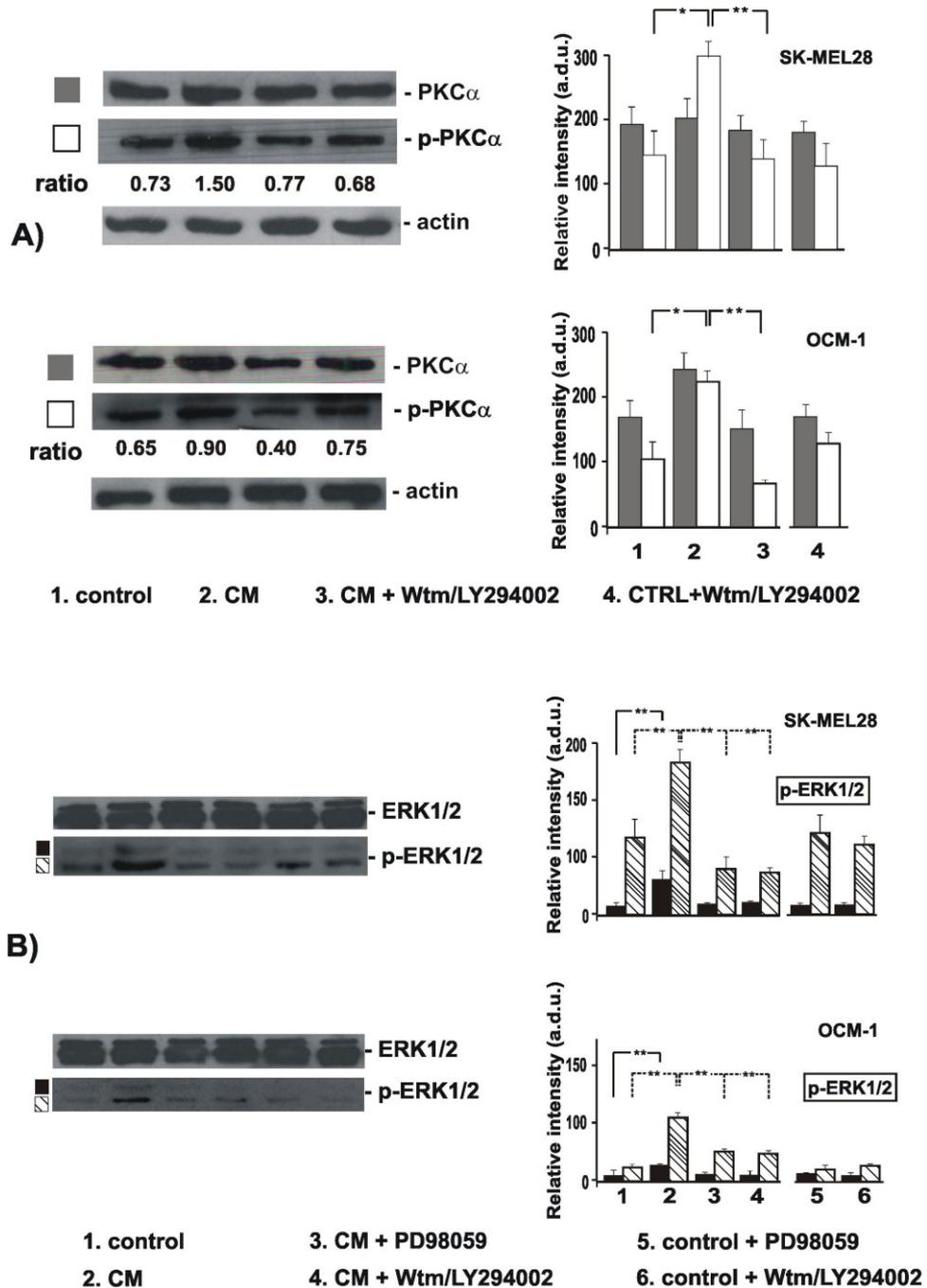


Fig. 25 Effetto dei media condizionati di SK-MEL28 e OCM-1 sull'espressione proteica di PKC α (pannello A), ERK1/2 (pannello B) e delle loro forme fosforilate nelle GP8.3. Le bande immunoreattive sono state visualizzate mediante chemiluminescenza (sistema ECL dell'Amersham). I valori, espressi come unità arbitrarie densitometriche (a.d.u.), sono stati ottenuti dalla lettura delle intensità delle bande, e rappresentano la media dei risultati ottenuti da almeno tre ripetizioni diverse dello stesso esperimento. Le barre dei grafici rappresentano l'intensità netta delle bande proteiche ottenute con il programma Scion Image. Le differenze statisticamente significanti (** $p < 0.01$) sono indicate da asterischi, confrontando colture di cellule trattate con colture di cellule controllo.

Inoltre, come mostrato in Figura 25B, la presenza nelle colture endoteliali di entrambi i media condizionati, non ha prodotto cambiamenti o incrementi nell'espressione della forma totale di p42/p44 MAPK (ERK1/2). Sono stati invece osservati incrementi della forma fosforilata di ERK1/2 del 30% (SK-MEL28) e 70% (OCM-1), rispetto al controllo.

Il medium condizionato dal glioma ha avuto significativi effetti sull'espressione totale dell'enzima PKC α comparati alle cellule controllo (Fig. 26A); tuttavia, si verificava un incremento di 2.2 volte nell'espressione della forma fosforilata della PKC α ^{Ser657} con livelli di fosforilazione basale intorno al 70% nelle cellule controllo [66]. L'aggiunta degli inibitori wortmannina ed LY294002 sopprimeva a livello quasi basale l'espressione della forma fosforilata della PKC α endoteliale, aumentata dall'esposizione al medium condizionato (rapporto p-PKC α /PKC α da 0.66 a 0.42 rispettivamente).

La PKC è coinvolta nella regolazione della PLA₂ intracellulare in diversi tipi cellulari. L'importante effetto degli inibitori dell'attività di fosforilazione a monte osservato nelle cellule endoteliali, potrebbe dipendere dalla funzione chiave svolta dalle isoforme della PKC nel controllo della fosforilazione di base di molte proteine regolatrici target, presenti in tutti i compartimenti cellulari, che includono anche la fosfolipasi A₂, sia in eventi cellulari precoci (contrazione e metabolismo, per esempio) che eventi tardivi (differenziazione, proliferazione).

Relativamente all'enzima ERK, come mostrato in Fig. 26B, la presenza del medium condizionato dal glioma nelle colture endoteliali, non ha prodotto cambiamenti o incrementi nell'espressione della forma totale (ERK1/2, doppia banda). E' stato invece osservato un aumento della forma fosforilata di 2.7 volte (per la p42) e di 1.2 volte (per la p44) rispettivamente, comparati al controllo. Sembra che nelle cellule endoteliali la forma costitutivamente fosforilata di ERK1/2 sia circa il 30% della forma totale della proteina, come descritto precedentemente [66,196]. In aggiunta, questi dati indicano che nell'endotelio la fosforilazione di ERK e l'attivazione della PLA₂ coincidono. Wortmannina ed LY294002 sono stati in grado di inibire in maniera significativa al livello basale, l'espressione, stimolata dai media condizionati tumorali, della forma fosforilata di ERK1/2, indicando che l'attivazione delle MAP chinasi è un processo regolato a monte dall'attività della PI3 chinasi.

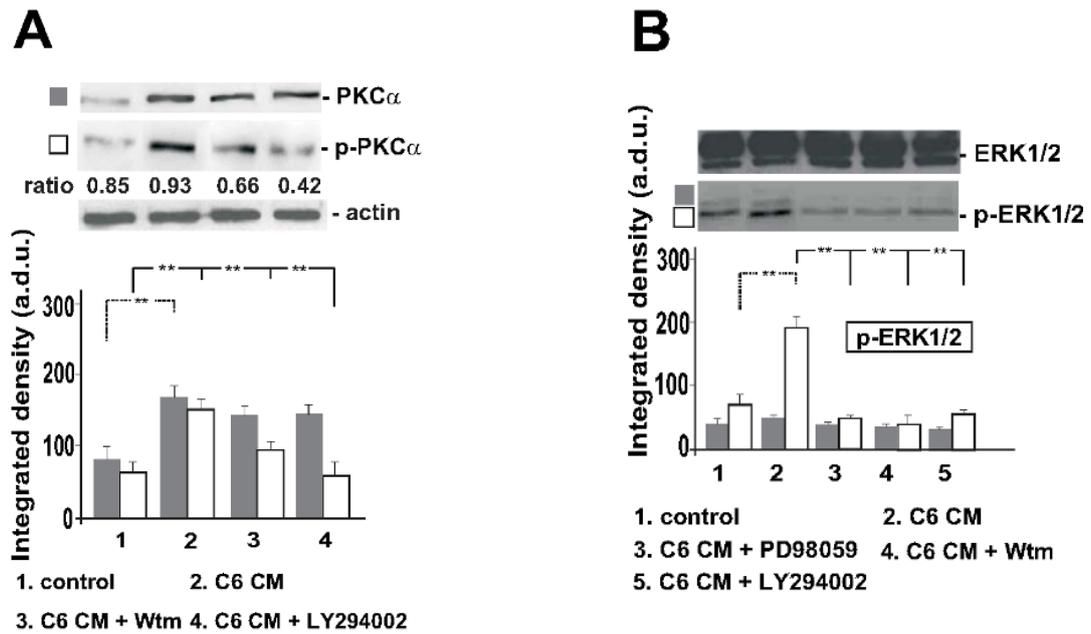


Fig. 26 Effetto del medium condizionato dal glioma sull'espressione degli enzimi PKC α (panel A), ERK1/2 (panel B) e delle loro forme fosforilate sulle GP8.3. Le differenze statisticamente significative (** $p < 0.01$) sono indicate da asterischi, comparando le cellule endoteliali trattate con il medium condizionato, con le cellule controllo cresciute senza trattamento.

3.12 Microscopia confocale

Con l'utilizzo di un microscopio confocale, abbiamo investigato l'attivazione e la localizzazione subcellulare di cPLA₂, ERK1/2, PKC α e COX-2, in cellule endoteliali incubate per 24 h con i media condizionati di SK-MEL28 o OCM-1.

In Fig. 27 è mostrata l'espressione della cPLA₂ e della sua forma fosforilata nell'endotelio, in assenza o presenza del medium condizionato di SK-MEL28. Le cellule sono state marcate doppiamente con un anticorpo monoclonale anti-cPLA₂ accoppiato ad un anticorpo secondario marcato con il fluorocromo rosso CY3, o con un anticorpo monoclonale anti-p-cPLA₂ accoppiato ad un anticorpo secondario legato ad un fluorocromo verde.

L'intensità di fluorescenza è stata acquisita separatamente con filtri per il CY3 (pannelli a-a'') e per il FITC (pannelli b-b'') ed è stata anche riportata la sovrapposizione delle due immagini (pannelli c-c''). Come mostrato in Fig. 27 (a',b'), il segnale di fluorescenza associato a cPLA₂ e alla sua forma fosforilata, è marcatamente più alto nelle cellule endoteliali cresciute con medium condizionato da SK-MEL28

rispetto all'endotelio controllo. Il merge delle due immagini mostra un incremento dell'espressione di entrambe le forme dell'enzima (c').

L'uso di AACOCF₃ non causa nessun cambiamento dell'espressione dell'enzima (a''-c''). Nelle colture di endotelio, la presenza di wortmannina più LY294002 causa una marcata riduzione a livello basale dell'intensità di fluorescenza associata alla cPLA₂ e alla sua forma fosforilata (dati non mostrati).

Gli stessi risultati sono stati ottenuti per l'espressione della forma totale di ERK1/2 e della sua forma fosforilata. PD98059, quando usato nelle colture di endotelio stimulate dal medium condizionato del melanoma, riduce marcatamente, quasi al livello basale, l'intensità di fluorescenza delle due forme dell'enzima (d''-f''). Nell'endotelio controllo il segnale di immunofluorescenza per la cPLA₂ o per ERK1/2 sono quasi percepibili sia nel citoplasma che nei sistemi di membrana (pannelli a-a'' e d-d'', rispettivamente). Le condizioni di coltura con il medium condizionato, fanno aumentare fortemente il segnale di immunofluorescenza rosso (associato all'attivazione di cPLA₂ e di ERK1/2) all'interno del citoplasma endoteliale e particolarmente all'interno del nucleo (pannelli a'-c' e d'-f').

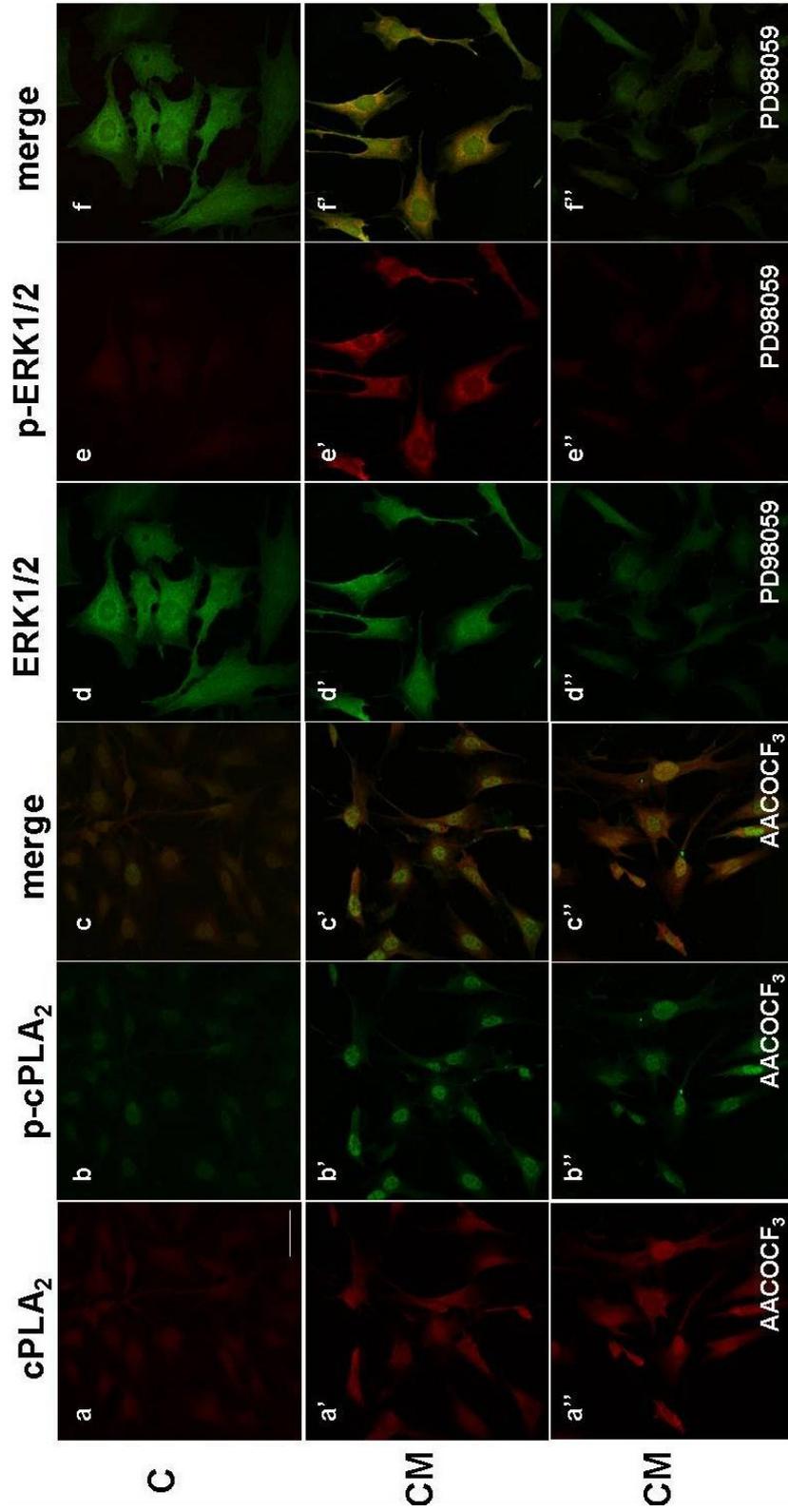


Fig. 27 Microscopia confocale. Espressione delle PLA₂ e di ERK1/2 e localizzazione cellulare nelle GP8.3. I monolayers cellulari sono stati lavati, fissati, permeabilizzati e marcati come descritto in Materiali e Metodi. I merges delle singole immagini sono mostrati nei pannelli (c-c'') e (f-f'). Le immagini delle cellule endoteliali controllo (cellule cresciute senza trattamenti), sono mostrate nei pannelli (a-f) (sequenza orizzontale), mentre quelle delle cellule trattate con il medium condizionato di SK-MEL28 più gli inibitori, sono mostrate nei pannelli (a''-c'') per AACOCF₃ (50 μm) e (d''-f'') per PD98059 (20 μm). L'ingrandimento usato è 40X. Gli esperimenti sono stati ripetuti diverse volte (3-4 gruppi indipendenti di cellule).

I risultati mostrati, comportano che la cPLA₂ e i suoi prodotti, dopo stimolazione dell'endotelio per 24 h con i media condizionati del melanoma, giocano un ruolo chiave nelle funzioni nucleari, come per esempio l'espressione genica e la proliferazione cellulare.

Per studiare la fluorescenza della PKC α e della sua forma fosforilata, le cellule endoteliali sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-PKC α accoppiato ad un anticorpo secondario marcato con il fluorocromo rosso CY3, o con un anticorpo policlonale anti-p-PKC α accoppiato ad un anticorpo secondario legato ad un fluorocromo verde, e le immagini sono state acquisite separatamente con filtri per il CY3 e per il FITC.

In Fig. 28, il livello di fluorescenza rosso (a') relativo alla PKC α totale, suggerisce che non vi sia nessun incremento nell'espressione proteica dell'enzima, dopo incubazione con il medium condizionato di SK-MEL28 per 24 h, comparato al controllo (pannello a). La maggior parte del pool dell'isoforma PKC α sembra essere traslocata a livello della regione perinucleare e nel nucleo delle cellule endoteliali.

Tuttavia si osserva un aumento del segnale di immunofluorescenza della forma fosforilata (b') nell'endotelio incubato con il medium condizionato di SK-MEL28, rispetto al controllo (b).

Il segnale di fluorescenza associato alla forma basale e costitutiva della p-PKC α sembra essere presente sia nel citoplasma che nei sistemi di membrana (pannelli a-b), come confermato dal merge delle singole immagini al confocale (pannello c). In seguito all'incubazione con il medium condizionato di SK-MEL28, il merge delle immagini al confocale (pannello c') mostra una considerevole sovrapposizione del FITC, associato alla p-PKC α , e del CY3, associato alla PKC α , nella regione perinucleare e in maniera diffusa nel corpo cellulare.

L'uso congiunto di wortmannina ed LY294002, quando usati nelle colture di endotelio incubate con medium condizionato di SK-MEL28, causano un decremento significativo della fluorescenza della forma fosforilata dell'enzima (a''-c'').

Dal momento questi due inibitori sono stati capaci di bloccare la fosforilazione della PKC α , questo risultato è in accordo con il concetto che la PKC α agisce a valle delle tirosina chinasi e della PI3K nella via di segnale endoteliale.

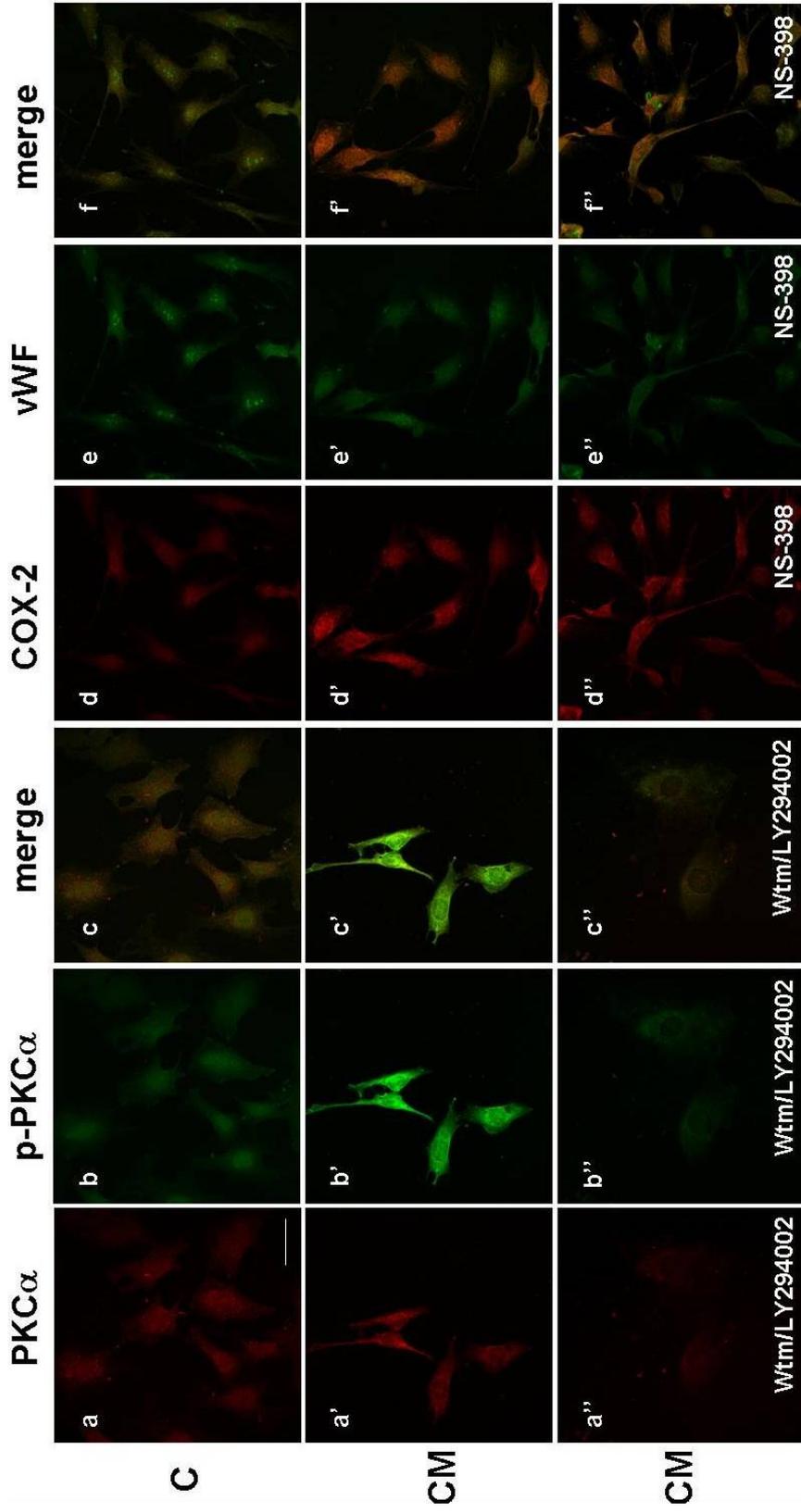


Fig. 28 Microscopia confocale. Espressione e localizzazione cellulare di PKC α e di COX-2 nelle GP8.39. I monolayers cellulari sono stati lavati, fissati, permeabilizzati e marcati come descritto in Materiali e Metodi. I merges delle singole immagini sono mostrati nei pannelli (c-c'') e (f-f''). Le immagini delle cellule endoteliali controllo (cellule cresciute senza trattamenti), sono mostrate nei pannelli (a-f) (sequenza orizzontale), mentre quelle delle cellule trattate con il medium condizionato di SK-MEL28, sono mostrate nei pannelli (a'-f'). Le immagini delle cellule endoteliali cresciute in presenza del medium condizionato di SK-MEL28 piú la miscela di inibitori wortmannina (60 nm)/LY294002 (20 μ m) o NS-398 (50 μ m), sono mostrate nei pannelli (d''-f''). L'ingrandimento usato è 40X. Gli esperimenti sono stati ripetuti diverse volte (3-4 gruppi indipendenti di cellule).

E' stata investigata anche la fluorescenza di COX-2, un enzima funzionalmente e topograficamente associato alla cPLA₂ [201]. Le cellule endoteliali sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-COX-2 accoppiato ad un anticorpo secondario marcato con il fluorocromo rosso CY3, o con un anticorpo policlonale diretto contro il fattore di von Willebrandt (vWF) accoppiato ad un anticorpo secondario legato ad un fluorocromo verde (per evidenziare l'architettura delle cellule endoteliali).

Il medium condizionato di SK-MEL28 induce un incremento della fluorescenza dell'enzima nelle cellule endoteliali condizionate (d'-f') rispetto al controllo. L'uso di NS-398, inibitore dell'attività enzimatica dell'enzima, non riduce a livello basale l'intensità della fluorescenza di COX-2 (pannelli d''-f'').

La Fig. 29 mostra i merges delle immagini al confocale ottenute usando le cellule endoteliali cresciute in presenza del medium condizionato di OCM-1 per 24h.

Gli enzimi presi in considerazione, cPLA₂ più p-cPLA₂, ERK1/2 più p-ERK 1/2, PKC α più p-PKC α , and COX-2, sono stati espressi a livelli più alti nelle cellule trattate con il medium condizionato (pannelli a'-d') che nel controllo (pannelli a-d).

Un decremento notevole della fluorescenza è stato osservato per ERK1/2-p-ERK1/2 e PKC α -p-PKC α (merges) utilizzando gli specifici inibitori (PD98059 e wortmannina/LY294002) (b''-c''). Come atteso, gli inibitori competitivi AACOCF₃ ed NS-398 non modificano il segnale di immunofluorescenza (a'', d'').

Le immagini separate che contribuiscono ai merges, sono state analizzate individualmente per la determinazione delle intensità di emissione per cPLA₂ e p-cPLA₂, ERK1/2 e p-ERK1/2, PKC α e p-PKC α , COX-2 e vWF, con un software del microscopio confocale Olympus FV1000 e in grafico sono stati riportati i valori dei pixels all'interno delle cellule su una scala da 0 a 100 pixels (unità arbitraria di fluorescenza) per l'analisi quantitativa. L'intensità di fluorescenza è stata determinata e corretta per il background misurato in aree prive di cellule.

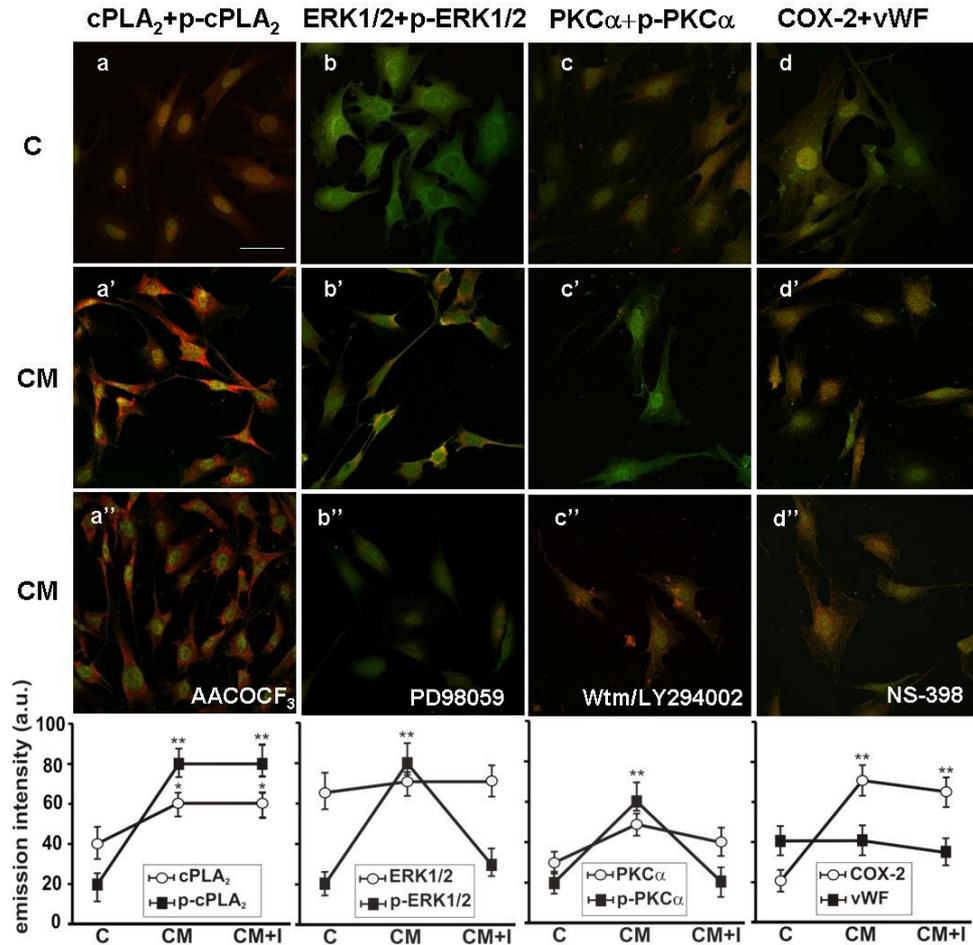


Fig. 29 Microscopia confocale. Espressione e localizzazione cellulare delle PLA₂, ERK1/2, PKC α e COX-2 nelle GP8.3 (merges delle immagini). I monolayers cellulari sono stati lavati, fissati, permeabilizzati e marcati come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini delle cellule endoteliali controllo (cellule cresciute senza trattamenti), sono mostrate nei pannelli (a-d) (sequenza orizzontale), mentre quelle delle cellule trattate con il medium condizionato di OCM-1 sono mostrate nei pannelli (a'-d'). Sono mostrate le immagini delle cellule endoteliali cresciute in presenza del medium condizionato di OCM-1 piú l'inibitore AACOCF₃ (50 μ m) (pannello a''), PD98059 (20 μ m) (pannello b''), la miscela di wortmannina (60 nM)/LY294002 (20 μ m) (pannello c'') o NS-398 (50 μ m) (pannello d''). L'ingrandimento usato è 40X. Gli esperimenti sono stati ripetuti diverse volte (3-4 gruppi indipendenti di cellule). Nei grafici, i quadrati neri e i cerchi bianchi rappresentano i valori delle intensità (pixels, in unità arbitrarie, a.u.) delle immagini singole per la cPLA₂, ERK1/2, PKC α e le loro forme fosforilate, o COX-2 e vWF. *p<0.05, **p<0.01, confrontando i valori nelle colture di cellule trattate con medium condizionato (CM) o con medium condizionato piú inibitore (CM+I) con i rispettivi controlli (C).

La Fig. 30 mostra l'intensità di fluorescenza nelle BBEC per gli enzimi cPLA₂ e p-cPLA₂, ERK1/2 e p-ERK1/2, PKC α e p-PKC α , COX-2 e vWF. Le cellule trattate con medium condizionato da OCM-1 esprimevano livelli significativamente elevati di p-cPLA₂, p-ERK 1/2, p-PKC α , e COX-2 comparate alle cellule controllo. Gli inibitori

specifici wortmannina più LY294002 e PD98059, quando usate in colture stimulate dal medium condizionato da OCM-1, riducevano marcatamente l'intensità di fluorescenza degli enzimi p-PKC α e p-ERK1/2 (pannelli b e c) quasi a livelli basali, mentre AACOCF3 e NS-398 non determinavano cambiamenti del segnale luminoso per p-cPLA₂ e COX-2 (pannelli a e d).

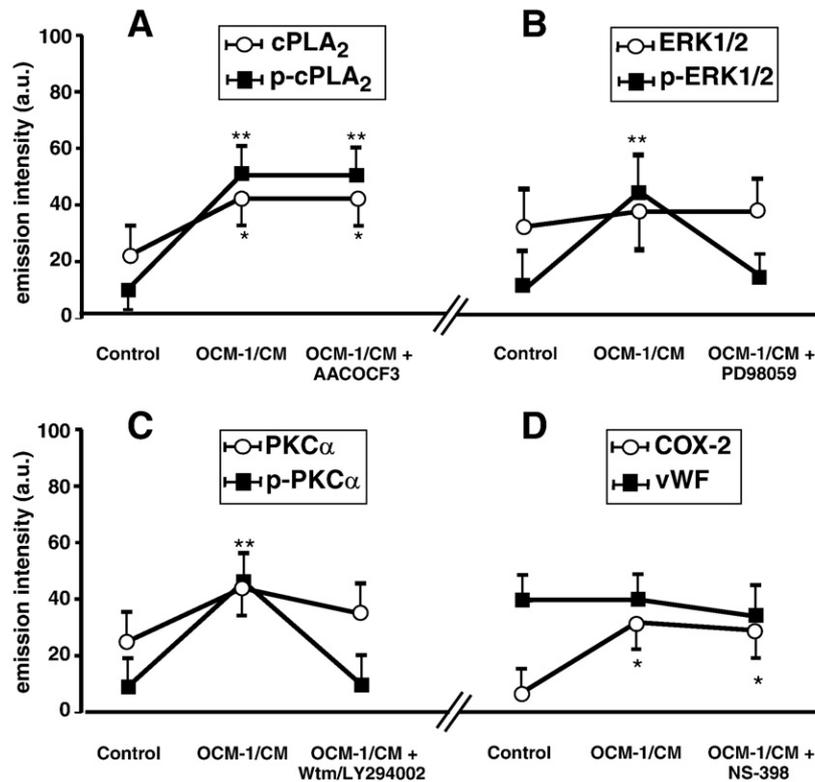


Fig 30 Microscopia confocale.. Le cellule endoteliali primarie (BBEC) sono cresciute in medium RPMI/F10-Ham (1:1) contenente 1% FBS ed incubate per 24 h in presenza o in assenza di medium condizionato dalla linea di melanoma OCM-1, come descritto nella sezione Materiali e metodi. Nel grafico, i quadrati neri e i cerchi bianchi rappresentano i valori delle intensità (pixels, in unità arbitrarie, a.u.) delle immagini singole per cPLA₂, ERK1/2, PKC α , e le loro forme fosforilate, o COX-2 e vWF. Gli esperimenti sono stati ripetuti diverse volte (3-4 gruppi indipendenti di cellule). *p<0.05, **p<0.01, confrontando i valori nelle colture di cellule trattate con medium condizionato o con medium condizionato più inibitore con i rispettivi controlli.

Riguardo alle colture endoteliali incubate per 24 h con il medium condizionato dal glioma abbiamo investigato l'attivazione e la localizzazione subcellulare di iPLA₂, cPLA₂, ERK1/2, PKC α e COX-2. In Fig. 31 è mostrata l'espressione della iPLA₂ e della cPLA₂, e delle loro forme fosforilate in assenza o presenza del medium condizionato da C6. L'intensità di fluorescenza è stata acquisita separatamente con filtri per il CY3 (pannelli a-a' e d-d') e per il FITC (pannelli b-b' e e-e) ed è stata anche riportata la sovrapposizione delle due immagini (pannelli c-c' and f-f').

Come mostrato per l'espressione della iPLA₂, l'intensità di fluorescenza è marcatamente elevata in quelle cellule trattate con il medium condizionato dal glioma (pannello b') rispetto alle cellule controllo (pannello b). Il merge delle due immagini mostra un aumento dell'espressione della forma enzimatiche (pannello c' contro pannello c). Il segnale di fluorescenza associato a cPLA₂ e alla sua forma fosforilata, è notevolmente più alto nelle cellule endoteliali cresciute in presenza di medium condizionato (pannelli d', e'), rispetto all'endotelio controllo (pannelli d e e). Anche in questo caso il merge delle due immagini mostra un incremento di entrambe le isoforme enzimatiche (pannello f' contro pannello f). Il trattamento con gli inibitori wortmannina ed LY294002 ne ha determinato un marcato decremento dell'intensità di segnale luminoso vicino ai valori basali (dati non mostrati).

Per studiare la fluorescenza di COX-2, le cellule endoteliali sono state trattate con i rispettivi anticorpi (Fig. 31). Il segnale luminoso rosso (CY3) è marcatamente elevato nelle cellule trattate con il medium condizionato (pannello h') rispetto alle cellule controllo (pannello h). Il merge delle due immagini mostra un incremento nell'espressione della forma enzimatica (pannello i' contro pannello i).

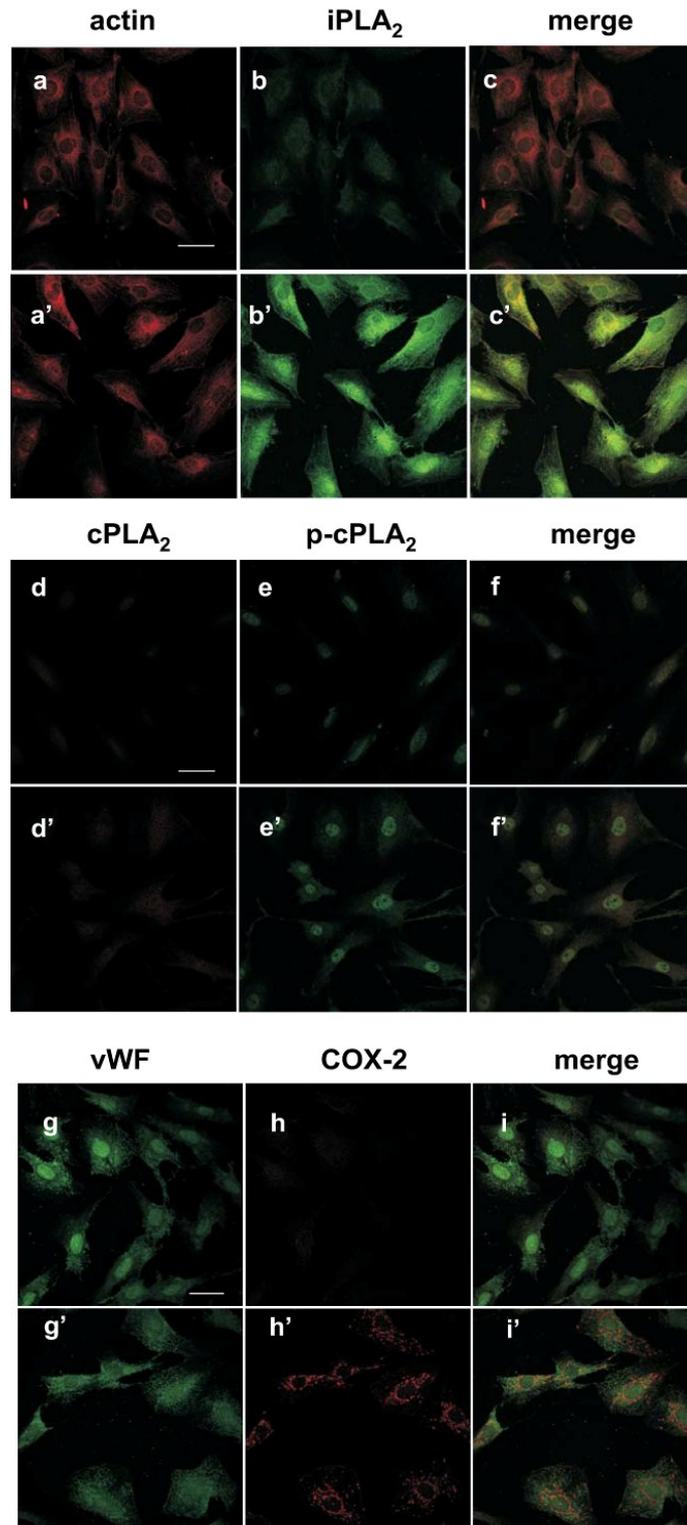


Fig.31 Microscopia confocale. Espressione e localizzazione cellulare delle PLA2 e di COX-2 nelle GP8.3. I monolayers cellulari sono stati lavati, fissati, permeabilizzati e marcati come descritto in Materiali e Metodi. I merges delle singole immagini sono mostrati nei pannelli (c-c'), (f-f') e (i-i'). Le immagini delle cellule endoteliali controllo (cellule cresciute senza trattamenti), sono mostrate nei pannelli (a-i) (sequenza orizzontale), mentre quelle delle cellule trattate con il medium condizionato dal C6 sono mostrate nei pannelli (a'-i'). L'ingrandimento usato è 60X; la scala bar è di 20 μ m. Gli esperimenti sono stati ripetuti diverse volte (3-4 gruppi indipendenti di cellule)

L'immunofluorescenza nelle cellule controllo per gli enzimi iPLA₂, cPLA₂ e COX-2 è quasi rilevabile nel citoplasma e nella membrana plasmatica. Il medium condizionato induceva nelle cellule stimulate una forte fluorescenza verde (attivazione di iPLA₂ e cPLA₂) e rossa (attivazione di COX-2) all'interno del citoplasma ed in particolare nella regione nucleare [pannelli (b-b'), (e-e') e (h-h')] [202]. Questi risultati implicano che iPLA₂ e cPLA₂ e i loro prodotti a valle, dopo 24 h di stimolazione da parte del glioma, svolgono un importante ruolo nelle funzioni nucleari quali la regolazione dell'espressione genica e della proliferazione cellulare.

Riguardo all'enzima PKC α e della sua forma fosforilata, come mostrato in Fig. 32, il livello di fluorescenza rosso (pannello a') relativo alla PKC α totale, suggerisce l'assenza di incrementi nell'espressione proteica dell'enzima, dopo incubazione con il medium condizionato dal glioma per 24 h, comparato al controllo (pannello a). Lo stesso non può dirsi per la fosfo-PKC α poiché il segnale luminoso verde risulta essere molto elevato nelle cellule stimulate (pannello b') che in quelle controllo (pannello b). Il segnale fluorescente della forma basale e costitutiva della fosfo-PKC α sembra essere presente sia nel citoplasma che nei sistemi di membrana (pannelli a-b), come conferma il merge (pannelli c). In seguito all'incubazione con il medium condizionato dal glioma, il merge delle immagini al confocale (pannelli c') mostra una considerevole sovrapposizione del FITC, associato alla p-PKC α , e del CY3, associato alla PKC α , nella regione perinucleare e in maniera diffusa nel corpo cellulare.

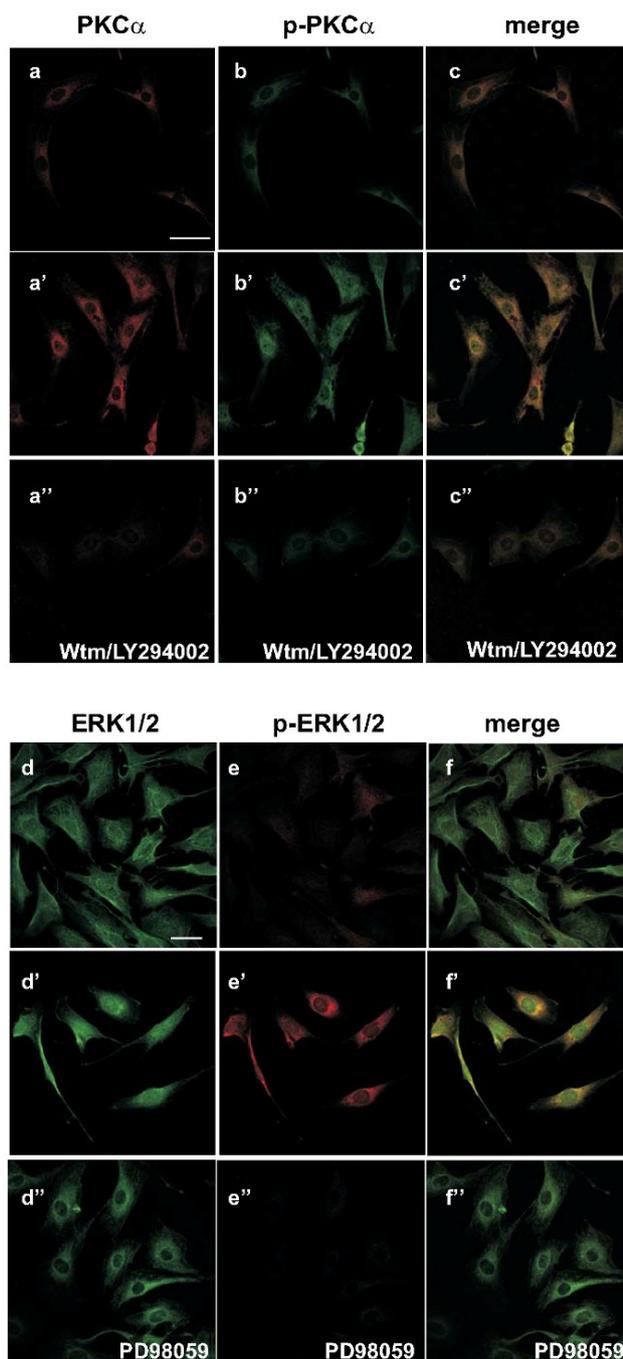


Fig. 32 Microscopia confocale. Espressione e localizzazione cellulare di PKC α e di ERK1/2 nelle GP8.3. I monolayers cellulari sono stati lavati, fissati, permeabilizzati e marcati come descritto in Materiali e Metodi. I merges delle singole immagini sono mostrati nei pannelli (c-c'') e (f-f''). Le immagini delle cellule endoteliali controllo (cellule cresciute senza trattamenti), sono mostrate nei pannelli (a-f) (sequenza orizzontale), mentre quelle delle cellule trattate con il medium condizionato da C6, sono mostrate nei pannelli (a'-f'). Le immagini delle cellule endoteliali cresciute in presenza del medium condizionato da C6 piÙ la miscela di inibitori Wtm (20 nM), LY294002 (10 μ M), e PD98059 (20 μ M), sono mostrate nei pannelli (a''-c'') e (d''-f'').

Anche in questo caso, l'uso degli inibitori wortmannina ed LY294002 causava una diminuzione significativa della fluorescenza della forma fosforilata dell'enzima (pannelli a''-c'').

Risultati simili sono stati ottenuti per l'espressione della forma totale di ERK1/2 e della sua forma fosforilata. Il segnale luminoso verde è marcatamente elevato nelle cellule stimulate dal glioma (pannello d') rispetto alle cellule controllo (pannello d). L'inibitore specifico PD98059, quando usato nelle colture di endotelio stimulate dal medium condizionato del glioma, riduceva notevolmente, quasi al livello basale, l'intensità di fluorescenza delle due forme dell'enzima (pannelli d''-f'').

3.13 Espressione delle PLA₂ e di ERK1/2 in cellule endoteliali primarie (BBEC)

Al fine di confermare i ruoli delle PLA₂ è stata valutata l'espressione e l'attivazione in risposta al medium condizionato mediante l'analisi Western blot in cellule endoteliali primarie (BBEC). Ventiquattro ore di esposizione al medium condizionato aumentavano l'espressione di PLA₂ in colture di BBEC, con un incremento di 1,8 volte e 1,4 volte nei riguardi di iPLA₂ e cPLA₂ rispettivamente (Fig. 3aA, B). Gli effetti degli inibitori wortmannina, LY294002 e PD98059 erano quasi simili a quelli osservati per le GP8.3. Inoltre, come mostra la Fig. 32C, la presenza di medium condizionato da C6 in colture di BBEC per 24 h non induceva cambiamenti nell'espressione delle forma totale della proteina p42/p44 MAPK (ERK1/2, doppia banda). Tuttavia, si verificava un incremento della forma fosforilata di ERK1/2 di 1,6 volte e 1,7 volte rispettivamente, rispetto alle cellule controllo.

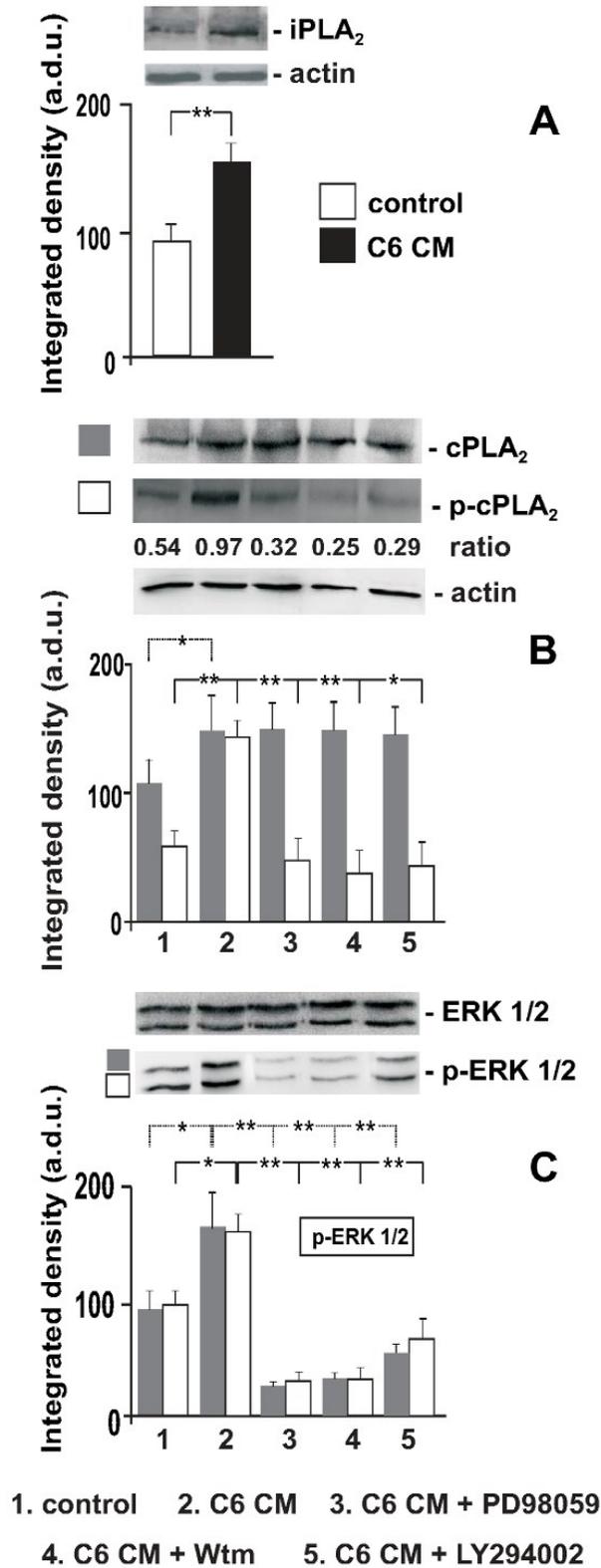


Fig. 33 Effetto del medium condizionato dal glioma sull'espressione di iPLA₂, cPLA₂ e della sua forma fosforilata, ERK1/2 e della sua forma fosforilata, in cellule endoteliali primarie di cervello bovino (BBEC).

CONCLUSIONI

La crescita e la metastasi tumorale è basata sull'angiogenesi. E' ben noto come ciò determini nell'endotelio dei vasi tumorali delle alterazioni strutturali e funzionali, così come la mancanza di permeabilità cellulare, l'espressione genica dei recettori per il VEGF, la riorganizzazione dei microfilamenti di F-actina e un incremento dell'espressione delle MMP-9. Tutto ciò può essere considerato un potenziale target terapeutico per le cellule tumorali [169,172].

Il lavoro svolto ha mostrato come i media condizionati dal melanoma e dal glioma siano in grado di incrementare la proliferazione e la motilità delle cellule endoteliali, due punti chiave nell'angiogenesi, e l'attività delle PLA₂. Inoltre, i nostri risultati hanno dimostrato che l'aumento dell'attività enzimatica totale della PLA₂ (vedi le Fig. 8, 9, 18, 19 e la Tabella 1) potrebbe essere veramente mediato da ambedue le PLA₂, citosolica e Ca²⁺-indipendente.

L'acido arachidonico, prontamente liberato dai fosfolipidi di membrana, può essere metabolizzato mediante le pathway della ciclossigenasi e della lipossigenasi (LOX), oppure essere re-incorporato nei fosfolipidi di membrana mediante esterificazione ad opera della arachidonil-CoA sintetasi e dell'arachidonil-lisofosfolipide transferasi. Prostanoidi e derivati dei leucotrieni sono molto conosciuti in quanto giocano un importante ruolo nel tono vascolare, nell'angiogenesi e nell'infiammazione. Oltre ai derivati lipidici di COX e LOX, i prodotti monossigenati della conversione dell'acido arachidonico, cioè il vasodilatatore 11,12-EET e il vasocostrittore 20-HETE, prodotti nell'endotelio dagli enzimi citocromo P450 epossigenasi ed idrolasi rispettivamente, sono caratterizzati per il loro coinvolgimento in numerosi segnali extracellulari e per il loro ruolo di modulatori durante l'angiogenesi [203-205]. I fattori di crescita, quali PGE₂ e HETEs, determinano l'attivazione dei recettori per l'EGF, che porta all'attivazione a cascata di PI3-K, Akt, chinasi, ERKs, metalloproteinasi, e ad un'intensificazione dell'espressione della ciclina D1 che svolge una funzione critica nella regolazione del ciclo cellulare durante la fase G2 in diversi tipi di cellule (fibroblasti, ECs, cellule cancerose umane) [206-208]. Nel sistema modello oggetto del presente studio, è stato osservato il riepilogo di questi eventi.

In primo luogo, è stato evidenziato che il medium condizionato dal melanoma ha indotto un incremento del release di acido arachidonico, della quantità e della fosforilazione di cPLA₂, ERK1/2. Il blocco della fosforilazione di ERK1/2 mediante l'uso degli inibitori specifici indica che l'attivazione delle MAK chinasi è un processo a

valle dell'attivazione della PI3-K e che la pathway PI3-K-ERK1/2 sia coinvolta nel release di acido arachidonico. A tal riguardo, il presente studio ha mostrato evidenze del ruolo chiave svolto dalla cPLA₂ come uno degli enzimi distali coinvolti nella proliferazione e migrazione cellulare mediata da fattori solubili presenti nei media condizionati. Dal momento che la cPLA₂ è un substrato di ERK1/2, quanto trovato nel presente studio, suggerisce una regolazione positiva della proliferazione endoteliale da parte delle MAP chinasi che catalizzano la loro attività a monte.

Sebbene diversi studi hanno dimostrato l'effetto pro-mitogenico di iPLA₂ in cellule proliferanti [209-211], pochissimi studi hanno dimostrato iPLA₂ coinvolgimento nella migrazione cellulare [211]. Una delle funzioni della iPLA₂ è controllare i livelli dei fosfolipidi e mantenere l'omeostasi attraverso il rimodellamento dei sistemi di membrana [182,183], anche se studi recenti ritengono più probabile un'attivazione della iPLA₂ in seguito alla presenza di segnali cellulari più che un suo ruolo da proteina housekeeping [141,211].

In secondo luogo, col presente studio è stato dimostrato, per la prima volta, che la iPLA₂ è coinvolta nella migrazione dell'endotelio dietro stimolazione da parte di un tumore, suggerendo un ruolo più significativo per la iPLA₂ nella modulazione del segnale angiogenico e nella diffusione delle metastasi.

Allo stesso modo, l'aumento dell'attività di iPLA₂ nella migrazione delle cellule endoteliali implica un potenziale ruolo nel rimodellamento del citoscheletro, che è un componente chiave di adesione e di regolazione delle cellule endoteliali di barriera oltre alla migrazione.

L'inibizione dell'attività di cPLA₂ e iPLA₂ da parte di siRNA riduce la proliferazione indotta dal medium condizionato sull'endotelio, suggerendo una possibile strategia, grazie allo sviluppo tecnologico, di terapie anti cancro.

Le cellule endoteliali sono in grado di secernere la sPLA₂(IIA) [213]. Nel presente studio è stato confermato che la presenza della sPLA₂(IIA) nelle colture di endotelio a livello proteico era scarsamente rilevabile, ed è stato inoltre trovato che la sPLA₂(IIA) non è up-regolata né indotta dal medium condizionato (dati non mostrati). Questi risultati indicano chiaramente che la cPLA₂ e la sPLA₂(IIA) non agiscono in maniera concertata per la liberazione di acido arachidonico dai fosfolipidi dell'endotelio, rilascio legato alla produzione di eicosanoidi, in risposta al medium condizionato dal melanoma e dal glioma.

La regolazione della migrazione endoteliale è potenzialmente importante nella comprensione sia degli eventi che conducono alla maturazione di vasi sanguigni cerebrali quiescenti, sia del reclutamento delle cellule endoteliali nell'angiogenesi cerebrale. I media condizionati utilizzati, sono ricchi probabilmente in fattori di crescita (principalmente PDGF, bFGF, HGF, VEGF) che potrebbero indurre la proliferazione e la migrazione cellulare [214-216]. Nei microvasi endoteliali l'azione pro-angiogenetica del PGE₂ potrebbe essere almeno parzialmente associata con il rilascio di VEGF e l'attivazione di ERK2/JNK1 [217], con aumento dell'attività di eNOS PKA/PI3K/Akt-dipendente [218] o con una up-regolazione di CXCR4, recettore delle chemiochine [219].

Sia l'espressione di COX-2 che l'incremento del release di PGE₂ nell'ambiente circostante le cellule ospiti dello stroma, incluso l'endotelio, e non mediante le cellule tumorali stesse, suggeriscono che i segnali autocrini e paracrini delle cellule circostanti giochino un ruolo nella tumorigenesi. 12-HETE funziona fisiologicamente come un fattore mitogenico per l'endotelio, e promuove la migrazione transendoteliale *in vitro* [177,220], probabilmente mediante la regolazione dell'espressione di molecole di adesione.

I risultati ottenuti con il sistema modello del presente studio, sono stati in linea con queste scoperte, dal momento che il medium condizionato di entrambe le forme tumorali è stato in grado di incrementare l'espressione della COX-2 endoteliale e l'inibitore della COX ha bloccato in maniera specifica la proliferazione cellulare indotta dal medium, dato consistente con quanto trovato da altri ricercatori [203,220,221].

La migrazione delle cellule endoteliali richiede la riorganizzazione del citocheletro di actina e l'attivazione dei processi di adesione. L'FGF-2, che, sulla base di precedenti studi è probabilmente presente nel medium condizionato del tumore, può essere responsabile delle alterazioni morfologiche dell'endotelio attraverso l'azione delle PI3-chinasi endoteliali [222,223]. Anche il VEGF è in grado di indurre cambiamenti nella permeabilità endoteliale attraverso il rimodellamento dello scheletro di actina per mezzo di ERK, JNK, e la famiglia delle GTPasi Rho così come l'attivazione della PI3-K [224]. Inoltre, nelle prime fasi dell'angiogenesi, la PI3-K regola la produzione endoteliale di entrambe le metalloproteinasi di matrice, MMP-2 e MT1-MMP [225] attraverso la riorganizzazione del citoscheletro di actina.

La via di segnale PI3-K/PIP₃ prende vie differenti e può essere anche modulata da una pathway Akt-indipendente che consiste in una up-regolazione intracellulare della PKC [226,227].

I dati ottenuti con l'utilizzo di inibitori a monte delle attività fosforilative, sottolineano il ruolo centrale della PKC α nel controllo dell'attività della cPLA₂ e nella modulazione della proliferazione e della motilità cellulare (Fig. 9). Gli enzimi della famiglia delle protein chinasi C (PKC) appartengono a un gruppo di enzimi le cui funzioni biologiche vengono innescate da una serie di fosforilazioni a catena. La forma cataliticamente attiva di 80 kDa della PKC α , richiede la fosforilazione del loop di attivazione (Thr497) ad opera della PDK1 [228]. Questa rappresenta la forma matura dell'enzima, capace di traslocare dal citosol (traslocazione dipendente da cofattori), dove viene mantenuta in una forma inattiva, alle membrane dove viene attivata [200,229]. Tuttavia, l'esatta localizzazione subcellulare della PKC α , dopo stimolazione, varia a seconda della linea cellulare e del tipo di stimolo. Poiché PKC α citosolica trasmette segnali intracellulari muovendosi tra i compartimenti cellulari, siamo stati in grado di osservare al microscopio confocale la traslocazione della fosfo-PKC- α alla regione perinucleare (Fig. 7b').

Lo scopo di questo studio è stato quello di investigare l'espressione delle fosfolipasi A₂ e dell'attività degli enzimi coinvolti nella via di segnale PI3-K e PKC α /ERK/MAPK, ed il loro ruolo nel governare l'incremento della proliferazione e della migrazione dell'endotelio esposto ai media condizionati di due forme tumorali, melanoma e glioma. Abbiamo dimostrato che l'aumento della proliferazione e della migrazione indotto dai media condizionati è mediato dagli enzimi cPLA₂ e iPLA₂, attraverso le seguenti osservazioni: 1) i media condizionati inducono la fosforilazione di cPLA₂, PKC α ed ERK1/2; 2) i media condizionati aumentano l'espressione e l'attività enzimatica di cPLA₂ e iPLA₂ e i livelli di mRNA di entrambe le protein; 3) gli inibitori delle chinasi che stanno a monte della via di segnale hanno la capacità di bloccare tali fenomeni proliferativi; 4) le analisi al microscopio confocale sono correlate con l'attivazione degli enzimi cPLA₂, PKC α , ERK1/2 e COX-2 endoteliali (Fig. 9); 5) il blocco delle attività di cPLA₂ e iPLA₂, con specifici anticorpi ed siRNA iniettato o trasfettato all'interno delle cellule endoteliali, riduce significativamente la proliferazione indotta dai media condizionati; 6) il VEGF svolge un ruolo critico nel segnale di risposta endoteliale e nella regolazione della proliferazione e migrazione endoteliale; 7) i livelli di PGE₂ nei media di crescita sono correlati con l'attività di

PLA₂ e con l'espressione di PLA₂ e COX-2. Questi risultati suggeriscono anche che la proliferazione dell'endotelio è positivamente regolata a monte dalla cascata PI3K, PKC α e dalle MAP chinasi.

BIBLIOGRAFIA

1. Kumar S., West D.C., Ager A., Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels, 1987, *Differentiation*, 36: 57-70.
2. Graeber M.B., Streit W.J., Kreutzberg J.W., Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain, 1989, *J. Neurosci. Res.*, 22: 103-106.
3. Hirschi K.K., D'Amore P., Pericytes in the microvasculature, 1996, *Cardiovas. Res.*, 687-698.
4. Allt G., Lawrenson J.G., Pericytes: cell biology pathology, 2001, *Cells Tissues Organs*, 169: 1-11.
5. Balabanov R., Dore-Duffy P., Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier, 1998, *J. Neurosci. Res.*, 53: 637-644.
6. Jackson C.J., Nguyen M., Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases, 1997, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 1167-1177.
7. Miyashita T., Takeishi Y., Takahashi H., Miyamoto T., Fujii S., Yoshimura T., Tomoike H., Kato S., Kubota I., Comparison of nitric oxide production in response to carvachol between macrovascular and microvascular cardiac endothelial cells, 2002, *Circ. J.*, 66: 511-515.
8. Hickey W.F., Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles, 1999, *Sein. Immunol.*, 11: 125-137.
9. Vestweber D., Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts, 2000, *J. Pathol.*, 190(3): 281-91.
10. Kudo I., Murakami M., Phospholipase A₂ enzymes, 2002, *Prostagl. Lipid Mediat.*, 68-69: 3-58.
11. Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A., Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization, 2002, *FEBS Lett.*, 531: 2-6.
12. Bradbury M.V., The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium, 1985, *Circ. Res.*, 57: 213-222.
13. Joè F., Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences, 1996, *Prog. Neurobiol.*, 48: 255-273.
14. Rubin L.L., Endothelial cells: adhesion and tight junctions, 1992, *Curr. Opin Cell Biol.*, 4: 830-833.
15. Anderson J.M., Balda M.S, Funning A.S., The structure and regulation of tight junctions, 1993, *Curr Opin. Cell Biol.*, 5: 772-778.
16. Beyer E.C., Gap junctions, 1993, *Int. Rev. Cytol.*, 137C1-37.

17. Schmelz M., Franke W.W., Complexus adherentes, a new group of desmoplakin-containing junction in endothelial cells: the syndesmos connecting rethelial cells of lymph nodes, 1993, *Eur. J. Cell Biol.*, 61: 274-289.
18. Gumbiner B.M., Breacking through the tight junction barrier, 1993, *J. Cell Biol.*, 123: 1631-1633.
19. Schulze C., Firth J.A., Immunohistochemical localization of adherents junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat, 1993, *J. Cell. Sci.*, 104: 78-82.
20. Gumbiner B., Simons K., A functional assay for proteins involved in establishing and epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide, 1986, *J.Cell. Biol.*, 102: 457-468.
21. Simionescu M., Simionescu N., Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology, 1991, *Cell Biol. Rev.*, 25: 5-78.
22. Butt A.M., Johns H.C., Abbott N.J., Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a development study, 1990, *J. Fisiol.*, 42: 947-962.
23. Cunha-Vaz J.G., The blood-retinal barriers, 1976, *Documenta Ophthalmologica*, 41(2): 287-327.
24. Pardridge W.M., The blood-brain barrier, 1993, *Cellular and Molecular Biology*, Raven Press, New York.
25. Cervos-Navarro J., Kannuki S., Nakagawa Y., Blood-brain barrier (BBB). Review from morphological aspect, 1988, *Histol. Histopathol.*, 3: 203-213.
26. Banks W.A., Broadwell R.D., Blood to brain and brain to blood passage of native horseradish peroxidase, wheat germ agglutinin, and albumin: Pharmacokinetic and morphological assessments, 1994, *J. Neurochem.*, 62: 2404-2419.
27. Levitan H., Rapoport S.I., Contrast media: quantitative criteria for designing compounds with low toxicity, 1976, *Acta Radiol.Diagn.* (Stockh) 1F: 81-92.
28. Rapoport S.I., Opening of the blood-brain barrier by acute hypertension, 1976, *Exp. Neurol.*, 52: 467-479.
29. Oldendorf W.H., Lipid solubility and drug penetration of the blood-brain barrier, 1974, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 174: 813-815.
30. Banks W.A., Kastin A.J., Michals E.A., Transport of thyroxine across the blood-brain barrier is directed primarily from brain to blood in the mouse, 1985, *Life Sci.*, 37: 2407-2414.
31. Begley D.J., Squires L.K., Zlokovic B.V., Mitrovic D.M., Hughes C.C., Revest P.A., Greenwood J., Permeability of the blood-brain barrier to the

- immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin A, 1990, *J. Neurochem.*, 55: 1222-1230.
32. Banks W.A., Kastin A.J., Brain-to-blood transport of peptides and the alcohol withdrawal syndrome, 1994b, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 739: 108-118.
 33. Banks W.A., Kastin A.J., Opposite direction of transport across the blood-brain barrier for Tyr-MIF-1 and MIF-1: comparison with morphine, 1994a, *Peptides*, 15: 23-29.
 34. Davson H., Oldendorf W.H., Symposium on membrane transport. Transport in the cerebral nervous system, 1967, *Proc. R. Soc. Med.*, 60: 326-329.
 35. Davson H., Segal M.B., The effects of some inhibitors and accelerators of sodium transport on the turnover of ²²Na in the cerebrospinal fluid and the brain, 1970, *J. Physiol.*, 209: 131-153.
 36. Betz A.L., Goldstein G.W., Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries, 1978, *Science*, 202: 225-227.
 37. Pardridge W.M., Blood-brain transport of nutrients. Introduction, 1986, *Fed. Proc.*, 45: 2047-2049.
 38. Pardridge W.M., Boado R.J., Molecular cloning and regulation of gene expression of blood-brain barrier glucose transporter. In: "The blood-brain barrier". Raven Press, New York, 1993, 395-440.
 39. Kalaria R.N., Harik.S.I., Differential postnatal development of monoamine oxidase A and B in the blood-brain barrier of the rat, 1987, *J. Neurochem.*, 49: 1589-1594.
 40. Baranczyk-Kuzma A., Audus K.L., Characteristics of aminopeptidase activity from bovine brain microvessel endothelium, 1987, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 7: 801-805.
 41. Betz A.L., Firth J.A., Goldstein G.W., Polarity of the blood-brain distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of the brain capillary endothelial cell, 1980, *Brain Res.*, 192: 17-28.
 42. Kreutzberg G.W., Tòth L., Enzyme cytochemistry of the cerebral microvessel wall, 1983, *Acta Neuropathol.*, Suppl. VIII: 35-41.
 43. Vorbrodts A.W., Lossinsky A.S., Wisnieski H.M., Localization of alkaline phosphatase activity in endothelia of developing mature mouse blood-brain barrier, 1986, *Dev. Neurosci.*, 8: 1-13.
 44. Vorbrodts A.W., Ultrastructural cytochemistry of blood-brain barrier endothelial, 1988, *Progress Histochem. Cytochem.*, 18(3), Stuttgart Gustav Fisher Verlag.
 45. Orłowski M., Meister A., The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids, 1970, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67: 1248-1255.

46. Meister A., Metabolism and function of glutathione. In "Glutathione: chemical, biochemical and medical aspect", 1989, Dolphin D., Avramovic O., Poulson R. (eds.) part. A New York: John Wiley and sons, 367-474.
47. Griffith O.W., Bridges R.J., Meister A., Transport of gamma-glutamyl amino acids: role of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 6319-6322.
48. Bridges R.J., Meister A., Gamma-glutamyl aminoacids, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260: 7304.
49. Vina J.R., Palacin M., Puertes I.R., Hernandez R., Vina J., Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation, 1989, *Am J. Physiol.*, 257: E916-922.
50. Samuelsson B., Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, 1983, *Science*, 220: 568-575.
51. Pryce G., Male D., Sedgwick J., Antigen presentation in brain: brain endothelial cells are poorstimulators of T-cell proliferation, 1989, *Immunology*, 66: 207-212.
52. Dos-Santos W.L., Rahman, Klein N., Male D.K., Control of lymphocyte adhesion to brain and aortic endothelium: ICAM-1, VCAM-1 and negative charge, 1996, *J. Neuroimmunol.*, 66: 125-134.
53. Hughes C.C., Male D.K., Lantos P.L., Adhesion of lymphocytes to cerebral microvascular cells: effect of interferon-gamma. Tumor necrosis factor and interleukin-1, 1988, *Immunology*, 64: 677-681.
54. Male D.K., Pryce C.C., Hughes, Lantos P., Lymphocyte migration into brain modelled in vitro: control by lymphocyte activation, cytokines and antigen, 1990, *Cell. Immunol.*, 127: 1-11.
55. Wlalen M.J., Carlos T.M., Dixon C.E., Robichaud P., Clark R.S., Marion D.W., Kochanek P.M., Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1, 2000, *J. Leukoc. Biol.*, 272: 160-168.
56. Springer T.A., Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, 1994, *Cell*, 76: 301-314.
57. Pryce G., Male D., Campbell I., Greenwood J., Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro, 1997, *J. Neuroimmunol.*, 75: 84-94.
58. Navrtatil E., Couvelard A., Rey A., Henin D., Scoazec J.Y., Expression of cell adhesion molecules by microvascular endothelial cells in the cortical and subcortical regions of the normal human brain: an immunohistochemical analysis, 1997, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 23: 68-80.

59. Dustin M.L., Rothlein R., Bhan A.K., Dinarello C.A., Springer T.A., Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1), 1986, *J. Immunol.*, 137: 245-254.
60. Pober J.S., Effects of tumor necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells, 1987, *Ciba Found. Symp.*, 131: 170-184.
61. Carlos T.M., Schwartz B.R., Kovach N.L., Yee E., Rosa M., Osborn L., Chi-Rosso G., Newman B., Lobb R., Rosso M., et al., Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells, 1990, *Blood*, 76: 965-970.
62. Frank R.N., Turczyn T.J., Das A., Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries, 1990, *Inv. Ophthalm. & Visual Science* 31(6): 999-1007.
63. Stewart P.A., Tuor U. I., Blood-eye barriers in the rat: correlation of ultrastructure with function, 1994, *J. Comp. Neurol.*, 340: 566-576.
64. Hayashi K., Nakao S., Nakaoke R., Nakagawa S., Kitagawa N., Niwa M., Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier, 2004, *Regul. Pept.*, 123: 77-83.
65. Dohgu S., Takata F., Yamauchi A., Nakagawa S., Egawa T., Naito M., Tsuruo T., Sawada Y., Niwa M., Kataoka Y., Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production, 2005, *Brain Res.*, 1038: 208-215.
66. Anfuso C.D., Lupo G., Romeo L., Giurdanella G., Motta C., Pascale A., Tirolo, C., Marchetti, B., Alberghina, M., Endothelial cell-pericyte cocultures induce PLA₂ protein expression through activation of PKC α and the MAPK/ERK cascade, 2007, *J. Lipid Res.*, 48: 782-793.
67. Hellstrom M., Gerhardt H., Kalén M., Li X., Eriksson U., Wolburg H., Betsholtz C., Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis, 2001, *J. Cell Biol.*, 153: 543-553.
68. Joice N.C., De Camilli J.B., Pericytes, like vascular smooth muscle cells and immunocytochemically positive for cyclic GMP-dependent protein kinase, 1984, *Microvasc. Res.*, 28: 206-219.
69. Herman I., D'Amore P.A., Microvascular pericytes contain muscle and non-muscle actins, 1985, *J. Cell Biol.*, 101: 43-52.
70. Nehls V., Drenckhahn D., Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin, 1991, *J. Cell Biol.*, 113: 147-154.
71. Fabry V., Fitzsimmons K.M., Herlein J.A., Moninger T.O., Dobbs M.B., Hart M.N., Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes, 1993, *J. Neuroimmunol.*, 47: 23-34.

72. Angelov D.N., Walther M., Streppel M., Guntinas-Lichius O., Van Dam A.M., Stennert E., Neiss W.F., ED2-positive perivascular fagocytes produce interleukin-1beta during delayed neuronal loss in the facial nucleus of the rat, 1998, *Neurosci. Res.*, 54: 820-827.
73. Larson D.L., Carson M.P., Haudenschild C.C., Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes, 1987, *Microvasc. Res.*, 34: 184-199.
74. Sweet E., Abraham E.H, D'Amore P. A., Functional evidence of gap junction between capillary endothelial cells and pericytes in vitro, 1988, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29: 109a.
75. Orlidge A., D'Amore P.A., Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells, 1987, *J. Cell Biol.*, 105: 1455-1462.
76. Sato Y., Rifkin D.B., Inhibition of endothelial cells movement by pericytes and smooth muscle cell: activation of a latent transforming growth factor-beta1-like molecule by plasmin during co.culture, 1989, *J. Cell Biol.*, 109: 309-315.
77. Herman I.M., Microvascular pericytes in development and disease. In "the blood-brain barrier", 1993, Pardridge W.M. (ed.) Raven Press, New York, 1993, 127-135.
78. Sims D.E., Recent advances in pericytes biology: implication for health and disease, 1991, *Can J. Cardiol.*, 7: 431-443.
79. Herman I.M., Jacobson S., In situ analysis of microvascular pericytes in hypertensive rat brains, 1988, *Tissue Cell*, 20: 1-12.
80. Richardson R.L., Hausman G.J., Champion D.R., Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10-day-old rats, 1982, *Acta Anat.*, 114: 41-57.
81. Brighton C.T., Lorich D.G., Kupcha R., et al., The pericytes as a possible osteoblast progenitor cell, 1992, *Clin. Orthoped.*, 275: 287-299.
82. Thomas W.E., Brain macrophages: On the role of pericytes and perivascular cells, 1999, *Brain Res. Rev.*, 31: 42-57.
83. Maxwell D.S., Kruger L., Small blood vessels and origine on phagocyties in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation, 1965, *Exp.Neurol.*, 12: 33-54.
84. Mori S., Leblond C.P., Identification of microglia in light and electron microscopy, 1969, *J. Comp. Neurol.*, 135: 57-80
85. Vaughn J.E., Pease D.C., Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. II. Astrocytes, oligodendrocytes ed advential cells, 1970, *J.Comp. Neurol.*, 140: 207-226.

86. Torvik A., Shjorten F., Electron microscopy observation on nerve cell generation and degeneration after axon lesions. II. Changes in glial cells, 1971, *Acta Neuropathol.*, 17: 265-282.
87. Broadwell R.D., Salzman M., Expanding the definition of the blood-brain barrier to protein, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 7820-7824.
88. Spector A.A., Yorek M.A., Membrane lipid composition and cellular function, 1985, *J. Lipid Res.*, 26: 1015-35.
89. Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G.I., Inoue K., 1977, *Crit. Rev. Immunol.*, 17: 225-228.
90. Murakami M., Kudo I., Phospholipase A₂, 2002, *Biochem.*, 131: 285-292.
91. Ost M., Uhl E., Carlsson M., Gidlof A., Soderkvist P., Sirjo A., Expression of mRNA for phospholipase A₂, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cultured human umbilical vascular endothelial and smooth muscle cells and in biopsies from umbilical arteries and veins, 1998, *J. Vasc. Res.*, 35: 150-155.
92. Paglin S., Roy R., Polarg P., Characterization of hormonally regulated and particulate-associated phospholipase A₂ from bovine endothelial cells, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 11697-702.
93. Mayer R.J., Marshall L.A., New insights on mammalian phospholipase A₂(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes, 1993, *FABES J.*, 7: 339-348.
94. Balsinde J., Balboa M.A., Insel P.A., Dennis E.A., Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D₁ macrophage-like cells, 1999, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 175-189.
95. Dennis E.A., The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes, 1997, *Trends Biochem. Sci.*, 22: 1-2.
96. Clark J.D., Schievella A.R., Nalefski E.A., Lin L., Cytosolic phospholipase A₂, 1995, *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, 12: 83-117.
97. Shimizu T., Localization and regulation of cytosolic phospholipase A₂, 2000, *Biochim. Biophys. Acta*, 1488: 124-138.
98. Uozumi N., Kume K., Nakatani N., Ishii F., Tashiro, Komagata Y., Maki K., Ikuta K., Ouchi Y., Miyazaki J., Shimizu T., Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition, 1997, *Nature*, 390: 618-622.
99. Bonventre J.V., Huang Z., Taheri M.R., O'Leary E., Li E., Moskowitz M.A., Sapirstein A., Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂, 1997, *Nature*, 390: 622-625.

100. Glover S., de Carvalho M.S., Bayburt T., Jonas M., Chi E., Leslie C.C., Gelb M.H., Translocation of the 85-kDa phospholipase A₂ from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 15359-15367.
101. Peters-Golden M., Song K., Marshall T., Brock T., Translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis, 1996, *Biochem. J.*, 318: 797-803.
102. Schievella A.R., Regier M.K., Smith W.L., Lin L.L., Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 30749-30754.
103. Sierra-Honigsmann M.R., Bradley J.R., Pober J.S., "Cytosolic" phospholipase A₂ is in the nucleus of sub-confluent endothelial cells but confined to the cytoplasm of confluent endothelial cells and redistributes to the nuclear envelope and cell junctions upon histamine stimulation, 1996, *Lab. Invest.*, 74: 684-695.
104. Gijòn M. A., Spencer D. M., Kaiser A.L., Leslie C.C., Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A₂, 1999, *J. Cell Biol.*, 145: 1219-1232.
105. Clark J.D., Lin L.L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N., Knopf J.L., A novel arachidonic acidselective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP, 1991, *Cell*, 65: 1043-1051.
106. Leslie C.C., Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 16709-16712.
107. Nalefski E.A., L.A. Sultzman, D.M. Martin, R. W. Kriz, P.S. Towler, J.L. Knopf and J.D. Clark. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca⁺⁺-dependent lipid- binding domain and a Ca⁺⁺-independent catalytic domain, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 18239-18249.
108. Nalefski E.A., Slazas M.M., Falke J.J., Ca⁺⁺-signaling cycle of a membrane-docking C2 domain, 1997, *Biochem.*, 36: 12011-12018.
109. Nalefski E.A., McDonagh T., Somers W., Seehra J., Falke J.J., Clark J.D., Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A₂, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273: 1365-1372.
110. Bittova L., Sumandea M., Cho W., A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274: 9665-9672.
111. Perisic O., Paterson H.F., Mosedale G., Lara Gonzales S., Williams R.L., Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A₂, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274: 14979-14987.

112. Glikli G., Abu-Ghazaleh R., Jezequel S., Wheeler-Jones C., Zachary I., Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca^{2+} , 2001, *Biochem. J.*, 353: 503-512.
113. Gudmundsdottir I.J., Halldorsson H., Magnusdottir K., Thorgeirsson, G., Involvement of MAP kinases in the control of cPLA₂ and arachidonic acid release in endothelial cells, 2001, *Atherosclerosis*, 156: 81-90.
114. Houliston R.A., Pearson J.D., Wheeler-Jones C.P., Agonistspecific cross talk between ERKs and p38(mapk) regulates PGI(2) synthesis in endothelium, 2001, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 281: C1266-C1276.
115. Sa G., Murugesan G., Jaye M., Ivashchenko Y., Fox P.L., Activation of cytosolic phospholipase A₂ by basic fibroblast growth factor via a p42 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 2360-2366.
116. Wheeler-Jones C., Abu-Ghazaleh R., Cospedal R., Houliston R.A., Martin J., Zachary I., Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A₂ in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase, 1997, *FEBS Lett.*, 420: 28-32.
117. Grewal S., Morrison E.E., Ponnambalam S., Walker J.H., Nuclear localisation of cytosolic phospholipase A₂- α in the EA.hy.926 human endothelial cell line is proliferation dependent and modulated by phosphorylation, 2002, *J. Cell Sci.*, 115: 4533-4543.
118. Lin L.L., Wartmann M., Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A., Davis R., cPLA₂ is phosphorilated and acted by MAP kinase, 1993, *Cell*, 72: 269-278.
119. Kramer R.M., Roberts R.F., Um S.L., Borsch-Haubold A.G., Watson S.P., Fisher M.J., Jakubowski J.A., p38 mitogen-activated protein kinase phosphorilates cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in trombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA₂, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271: 27723-27729.
120. Qui Z.H., Gijòn M.A., Carvalho M.S., Spencer D.M., Leslie C.C., The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in regulating arachidonic acid release in macrophages, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273: 8203-8211.
121. Borsh-Haubold A.G., Asselin J., Dudler T., Kramer R.M., Aptz-Castro R., Watson S.P., Gelb M.H., Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A₂ in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273: 4449-4458.
122. Hefner Y., Borsh-Haubold A.G., Murakami M., Wilde J.I., Pasquett S., Schieltz D., Ghomashchi F., Yates J.R., III, Armstrong C.G., Paterson M., Cohen P., Fukunaga R., Hunter T., Kudo I., Watson S.P., Gelb M.H., Serine 727

- phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinase, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 37542-37551.
123. Muthalif M.M., Hefner Y., Canaan S., Harper J., Zhou H., Parmentier J.H., Aepersold R., Gelb M. H., Malik K.U., Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A₂, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 39653-39660.
 124. Mosior M., Six D.A., Dennis E.A., Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273: 2184-2191.
 125. Das S., Cho W., Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A₂, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 23838-23846.
 126. Winstead M.V., Balsinde J., Dennis E.A., Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function, 2002, *Biochim. Biophys. Acta*, 1488: 28-39.
 127. Larsson Forsell P.K.A., Kennedy B.P., Cleaesson H.E., The human calcium-independent phospholipase A₂ gene. Multiple enzymes with distinct properties from a single gene, 1999, *Eur. J. Biochem.*, 262: 575-585.
 128. Ma Z., Turk J., The molecular biology of the group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A₂, 2001, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 67: 1-33.
 129. Michiels C., Renard C., Bouaziz N., Heck N., Eliaers F., Ninane N., Quarck R., Holvoet P., Raes M., Identification of the phospholipase A₂ isoforms that contribute to arachidonic acid release in hypoxic endothelial cells: limits of phospholipase A₂ inhibitors, 2002, *Biochem. Pharmacol.*, 63: 321-332.
 130. Akiba S., Ohno S., Chiba M., Kume K., Hayama M., Sato T., Protein kinase C α -dependent increase in Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in membranes and arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D₁ cells, 2002, *Biochem. Pharmacol.*, 63: 1969-1977.
 131. Akiba S., Hayama M., Sato T., Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ by bromoenol lactone attenuates prostaglandin generation induced by interleukine-1 β and dibutyryl cAMP in rat mesangial cells, 1998, *FEBS Lett.*, 437: 225-228.
 132. Akiba S., Mizunaga S., Kume K., Hayama M., Sato T., Involvement of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in protein kinase C-dependent arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D₁ cells, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274: 19906-19912.
 133. Yellaturu C.R., Rao G.N., A requirement for calcium-independent iPLA₂ in thrombin-induced arachidonic acid release and growth in vascular smooth muscle cells, 2003, *J. Biol. Chem.*, 278: 43831-43837.

134. Wong J.T., Tran K., Pierce G.N., Chan A.C., Choy P.C., Lysophosphatidylcholine stimulates the release of arachidonic acid in human endothelial cells, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273: 6830-6836.
135. Wolf M.J., Wang J., Turk J., Gross R.W., Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A₂. A novel mechanism underlying arachidonic acid mobilization, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 1522-1526
136. Barbour S.E., Kapur A., Deal C.L., Regulation of phosphatidylcholine homeostasis by calcium-independent phospholipase A₂, 1999, *Biochim. Biophys. Acta*, 1439: 77-88.
137. Atsumi G., Murakami M., Kojima K., Hadano A., Tajima M., Kudo I., Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 18248-18258.
138. Atsumi G., Tajima M., Hadano A., Nakatani Y., Murakami M., Kudo I., Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A₂ but not cytosolic phospholipase A₂ which undergoes proteolytic inactivation, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273: 13870-13877.
139. Martinez J., Moreno J.J., Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species, 2001, *Arch. Biochem. Biophys.*, 392: 257-262.
140. Martinson B.D., Albert C.J., Corbett J.A., Wysolmerski R.B., Ford D.A., Calcium-independent phospholipase A₂ mediated CREB phosphorylation in double-stranded RNA-stimulated endothelial cells, 2003, *J. Lipid Res.*, 44: 1686-1691.
141. Tithof P.K., Peters-Golden M., Ganey P.E., Distinct phospholipases A₂ regulate the release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide anion generation in neutrophils, 1998, *J. Immunol.*, 160: 953-960.
142. Ma Z., Ramanadham S., Wohltmann M.A., Bohrer F., Hsu F., Turk J., Studies of insulin secretory responses and of arachidonic acid incorporation into phospholipids of stably transfected insulinoma cells that overexpress group VIA phospholipase A₂ (iPLA₂) indicate a signaling rather than a housekeeping role for iPLA₂, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 13198-13208.
143. Winitz S., Gupta S.K., Quian N.X., Heasley L.E., Nemenoff R.A., Johnson G.L., Expression of a mutant G₁₂ α subunit inhibits ATP and thrombin stimulation of cytoplasmic phospholipase A₂-mediated arachidonic acid release independent of Ca⁺⁺ and mitogen-activated protein kinase regulation, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 1889-1895.
144. Alberghina M., Lupo G., Anfuso C., Phospholipid metabolism in macrovascular endothelial cells and pericytes, 2003, *Research Development in Biochemistry*, Research Sighpost Publ., 125-127.

145. Carmeliet P., Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, 2000, *Nature Med.*, 6: 389–395.
146. Folkman J., Angiogenesis, 2006, *Annu. Rev. Med.*, 57: 1-18.
147. Hanahan D. et al., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, 1996, *Cell*, 86: 353–364.
148. Folkman J, D'Amore PA., Blood vessel formation: what is its molecular basis? 1996, *Cell*, 87: 1153–5.
149. Risau W., Mechanisms of angiogenesis, 1997, *Nature*, 386: 671–4.
150. Cao R., Bråkenhielm E., Li X., Pietras K., Widenfalk J., Östman A., Eriksson U., Cao Y., Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- $\alpha\alpha$ and - $\alpha\beta$ receptors, 2002, *The FASEB Journal*, 16: 1575-1583.
151. Hu Y.L., et al., Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells, 2001, *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 762–768.
152. Volpert O.V., et al., The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression, 1995, *Breast Cancer Res. Treat.*, 36: 119–126.
153. O'Reilly M.S., Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth, 1997, *EXS.*, 79: 273–294.
154. Maeshima Y., et al., Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin, 2000, *J. Biol. Chem.*, 276: 15240–15248.
155. Kamphaus G.D., et al., Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 1209–1215.
156. Bruce R. Zetter, Angiogenesis and tumor metastasis, 1998, *Annual Review of Medicine*, 49: 407-424.
157. Morikawa S., et al., Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors, 2002, *Am. J. Pathol.*, 160: 985–1000.
158. Jimbow K., Quevedo W.C. Jr, Fitzpatrick T., Szabo G., in *Dermatology in General Medicine* (eds. Fitzpatrick, T. B. et al.) 261–289 (McGraw-Hill, Inc, New York), 1993.
159. Balch C.M., et al, Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system, 2001, *J. Clin. Oncol.*, 19: 3622–3634.
160. Norris W., A case of fungoid disease, 1820, *Edinburgh Medicine and Surgery*, 16: 562–565.

161. Armstrong B.K., Krickler A., The epidemiology of UV induced skin cancer, 2001, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 63: 8–18.
162. Matthew C. Tate and Manish K. Aghi, Biology of angiogenesis and invasion in glioma, 2009, The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc., 6: 447-457.
163. Gilbertson R.J., Rich J.N., Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche, 2007, *Nat Rev Cancer*, 7: 733-736.
164. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., et al., Identification of human brain tumour initiating cells, 2004, *Nature*; 432: 396-401.
165. Raza S.M., Lang F.F., Aggarwal B.B. et al., Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis, 2002, *Neurosurg*, 51: 2-12.
166. Lund E.L., Hog A., Olsen M.W., Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma, 2004, *Int J Cancer*, 108:833-838.
167. Rofstad E.K., Halsor E.F., Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts, 2000, *Cancer Res.*, 60: 4932-4938.
168. Strieter R.B., Burdick M.D., Mestas J., Gomperts B., Keane M.P., Belperio J.A., Cancer CXC chemokine network and tumor angiogenesis, 2006, *Eur. J. Cancer.*, 42: 768-778.
169. Kenig S., Duràn Alonso, M.B., Mueller M.M., Lah T.T., Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsin B, S, and MMP-9, 2010, *Cancer Letters*, 289(1): 53-61.
170. Ramjeesingh R., Leung R., Siu C.H., Interleukin-8 secreted by endothelial cells induces chemotaxis of melanoma cells through the chemokine receptor CXCR1, 2003, *FASEB J.*, 17: 1292-1294.
171. Patey N., Vazeux R., Canioni D., Potter T., Gallatin W.M., Brousse N., Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells. Expression in tumors but not in inflammatory responses, 1996, *Am. J. Pathol.*, 148: 465-472.
172. Plate K.H., Breier G., Weich H.A., Risau W., Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo, 1992, *Nature*, 359: 845-48.8.
173. van der Valk P., Linderman J., Kamphorst W., Growth factor profiles of human gliomas. Do non-tumour cells contribute to tumour growth in glioma? 1997, *Annals Oncol.*, 8: 1023-1029.

174. Ramsohoye P.V., Fritz I.B., Preliminary characterization of glia-secreted factors responsible for the induction of high electrical resistances across endothelial monolayers in a blood-brain barrier model, 1998, *Neurochem. Res.*, 23: 1545-1551.
175. Guo P., Hu B., Gu W., Xu L., Wang D., Huang H.J., Cavenee W.K., Cheng S.Y., Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment, 2003, *Am. J. Pathol.*, 162: 1083-93.
176. Ohnishi T., Sher P.B., Posner J.B., Shapiro W.R., Capillary permeability factor secreted by malignant brain tumor. Role in peritumoral brain edema and possible mechanism for anti-edema effect of glucocorticoids, 1990, *J. Neurosurg.*, 72: 245-51.
177. Tang D.G., Renaud C., Stojakovic S., Diglio C. A., Porter A., Honn K.V., 12(S)-HETE is a mitogenic factor for microvascular endothelial cells: its potential role in angiogenesis, 1995, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 211: 462-468.
178. Tsujii M., Kawano S., Tsujii S., Sawaoka H., Masatsugu H., DuBois R.N., Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells, 1998, *Cell*, 93: 705-716.
179. Wendum D., Comperat E., Boelle P.Y., Parc R., Masliah J., Trugnan G., Cytoplasmic phospholipase A₂ alpha overexpression in stromal cells is correlated with angiogenesis in human colorectal cancer, 2005, *Mod. Pathol.*, 18: 212-220.
180. Bogatcheva N.V., Sergeeva M.G., Dudek S.M., Verin A.D. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology, 2005, *Microvasc. Res.*, 69: 107-127.
181. Akiba S., Sato T., Cellular function of calcium independent phospholipase A₂, 2004, *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 1174-1178.
182. Balboa M.A., Balsinde J., Oxidative stress and arachidonic acid mobilization, 2006, *Biochim. Biophys. Acta*, 1761: 385-391.
183. Burke J.E., Dennis E. A., Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signalling, 2009, *J. Lipid Res.*, 50: S237-S242.
184. Meyer M.C., Kell P.J., Creer M.H., McHowat J., Calcium-independent phospholipase A₂ is regulated by a novel protein kinase C in human coronary artery endothelial cells, 2005, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 288: C475-82.
185. Abe T., Okamura K., Ono M., Kohno K., Mori T., Hori S., Kuwano M., Induction of vascular endothelial tubular morphogenesis by human glioma cells. A model system for tumor angiogenesis, 1993, *J. Clin. Invest.*, 92: 54-61.
186. Goldbrunner R.H., Bendszus M., Sasaki M., Kraemer T., Plate K.H., Roosen K., Tonn J. C., Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and

- vascularization in an orthotopic rat monitored by magnetic resonance imaging, 2000, *Neurosurgery*, 47: 921-29.
187. Erhard H., Rietveld F.J., van Altena M.C., Brocker E.B., Ruiters D.J., de Waal R.M., Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis, 1997, *Melanoma Res.*, 7 (Suppl. 2): S19–S26.
 188. Marcoval, J., Moreno, A., Graells, J., Vidal, A., Escriba, J.M., Garcia-Ramirez, M., Fabra, A., 1997, Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase, *J. Cutan. Pathol.*, 24: 212–218.
 189. Tan P.H., Chan C., Xue S.A., Dong R., Ananthasayanan B., Manunta M., Kerouedan C., Cheshire N.J.W., Wolfe J.H., Haskard D.O., Taylor K.M., George A.J.T., Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells, 2004, *Ather.*, 173: 171-183.
 190. Paunescu V., Suciuc E., Tatu C., Plesa A., Herman D., Raluca Siska I., Suciuc C., Crisnic D., Nistor D., Tanasie G., Bunu C., Raica M., Endothelial cells from hematopoietic stem cells are functionally different from those of human umbilical vein, 2003, *J. Cell. Mol. Med.*, 7: 455–460.
 191. Murakami S., Morioka T., Nakagawa Y., Suzuki Y., Arakawa M., Oite T., Expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: comparison to human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells, 2001, *Microvasc. Res.*, 62: 383-391.
 192. Greenwood J., Pryce G., Devine L., Male D.K., dos Santos W.L., Calder V.L., Adamson P., SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics, 1996, *J. Neuroimmunol.*, 71: 51-63.
 193. Short S.M., Talbott G.A., Juliano R.L., Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells, 1998, *Mol. Biol. Cell*, 9: 1969-1980.
 194. Anfuso C.D., Lupo G., Alberghina M., Amyloid beta but not bradykinin induces phosphatidylcholine hydrolysis in immortalized rat brain endothelial cells, 1999, *Neurosci. Lett.*, 271: 151-4.
 195. Lupo G., Assero G., Anfuso C.D., Nicotra A., Palumbo M., Cannavò G., Renis M., Ragusa N., Alberghina M., Cytosolic phospholipase A₂ mediates arachidonoyl phospholipid hydrolysis in immortalized rat brain endothelial cells stimulated by oxidized LDL, 2002, *Biochim. Biophys. Acta*, 1585: 19-29.
 196. Lupo G., Nicotra A., Giurdanella G., Anfuso C.D., Romeo L., Biondi G., Tirolo C., Marchetti B., Ragusa N., Alberghina M., Activation of phospholipase A₂ and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells, 2005, *Biochim. Biophys. Acta*, 1753: 135-150.

197. Nicotra A., Lupo G., Giurdanella G., Anfuso C.D., Ragusa N., Tirolo C., Marchetti B., MAPKs mediate the activation of cytosolic phospholipase A₂ by amyloid β (25-35) peptide in bovine retina pericytes, 2005, *Biochim. Biophys. Acta*, 1733: 172-186.
198. Futaki N., Takahashi S., Yokoyama M., Arai I., Higuchi S., Otomo S., NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro, 1994, *Prostaglandins*, 47: 55-59.
199. Bornancin F., Parker P.J., Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 3544-9.
200. Newton A.C., Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm, 2003, *Biochem. J.*, 370, (Pt 2): 361-371.
201. Grewal S., Herbert S.P., Ponnambalam S., Walker J.H., Cytosolic phospholipase A₂-alpha and cyclooxygenase-2 localize to intracellular membranes of EA.hy.926 endothelial cells that are distinct from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, 2005, *FEBS J.*, 272: 1278-90.
202. Evans J.H., Fergus D.J., Leslie C.C., Regulation of cytosolic phospholipase A(2) translocation, 2003, *Adv. Enzyme Regul.*, 43: 229-44
203. Dethlefsen S.M., Shepro D., D'Amore P.A., Arachidonic acid metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth, 1994, *Exp. Cell Res.*, 212: 262-273.
204. Amaral S.L., Maier K.G., Schippers D.N., Roman R.J., Greene A.S., CYP4A metabolites of arachidonic acid and VEGF are mediators of skeletal muscle angiogenesis, 2003, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284: H1528-H1535.
205. Fleming I., Epoxyeicosatrienoic acids, cell signalling and angiogenesis, 2007, *Prost. Lipid Med.*, 82: 60-67
206. Tang D.G., Chen Y. Q., Honn K. V., Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 5241-5246.
207. Yasui M., Yamamoto H., Ngan C.Y., Damdinsuren B., Sugita Y., Fukunaga H., Gu J., Maeda M., Takemasa I., Ikeda M., Fujio Y., Sekimoto M., Matsuura N., Weinstein I.B., Monden M., Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization, 2006, *Clin. Cancer Res.*, 12: 4720-29.
208. Chen Z., Liu F., Ren Q., Zhao Q., Ren H., Lu S., Zhang L., Han Z., Hemangiopoietin promotes endothelial cell proliferation through PI-3K/Akt pathway, 2008, *Cell. Physiol. Biochem.*, 22: 307-14.

209. Herbert S.P., Walker J.H., Group VIA calcium-independent phospholipase A₂ mediates endothelial cell S phase progression, 2006, *J. Biol. Chem.*, 281: 35709-35716.
210. Saavedra G., Zhang W., Peterson B., Cummings B.S., Differential roles for cytosolic and microsomal Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in cell growth and maintenance of phospholipids, 2006, *J. Pharm. Exp. Therap.*, 318: 1211-1219.
211. Zhao X.D., Wang Z.Z., Xiao Y., Sengupta S., Xiao Y., Zhang R., Lauber K., Wesselborg S., Feng L., Rose T.M., Shen Y., Zhang J., Prestwich G., Xu Y., Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A₂ enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells, 2006, *J. Biol. Chem.*, 281: 29357-29368.
212. Hooks S.B., Cummings B.S., Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in cell growth and signalling, 2008, *Biochem. Pharm.*, 76: 1059-1067.
213. Murakami M., Kudo I., Inoue K., Molecular nature of phospholipases A₂ involved in prostaglandin I₂ synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A₂, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 839-844.
214. Boyd S.R., Zachary I., Chakravarthy U., Allen G.J., Wisdom G.B., Cree I.A., Martin J.F., Hykin P.G., Correlation of increased vascular endothelial growth factor with neovascularization and permeability in ischemic central vein occlusion, 2002, *Arch. Ophthalmol.*, 120: 1644-50.
215. Yang G.Y., Yao J.S., Huey M., Hashimoto T., Young W.L., Participation of PI3K and ERK1/2 pathways are required for human brain vascular smooth muscle cell migration, 2004, *Neurochem. Int.*, 44: 441-446.
216. Rush S., Khan G., Bamisaiye A., Bidwell P., Leaver H.A., Rizzo M.T., c-jun amino-terminal kinase and mitogen activated protein kinase 1/2 mediate hepatocyte growth factor-induced migration of brain endothelial cells, 2007, *Exp. Cell Res.*, 313: 121-132.
217. Pai R., Szabo I.L., Soreghan B.A., Atay S., Kawanaka H., Tarnawsk A.S., PGE₂ stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways, 2001, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 923-928.
218. Namkoong S., Lee S.J., Kim C.K., Kim Y.M., Chung H.T., Lee H., Han J.A., Ha K.S., Kwon Y.G., Kim Y.M., Prostaglandin E₂ stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells, 2005, *Exp. Mol. Med.*, 37: 588-600
219. Salcedo R., Zhang X., Young H.A., Michael N., Wasserman K., Ma W.H., Martins-Green M., Murphy W.J., Oppenheim J.J., Angiogenic effects of prostaglandin E₂ are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells, 2003, *Blood*, 102: 1966-1977.

220. Nie D., Tang K., Diglio C., Honn K.V., Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase, 2000, *Blood*, 95: 2304-2311.
221. Murphy J.F., Fitzgerald D.J., Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) induces cyclooxygenase (COX)-dependent proliferation of endothelial cells (EC) via the VEGF-2 receptor, 2001, *FASEB J.*, 15: 1664-1676.
222. Jimenez C., Portela R.A., Mellado M., Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration, 2000, *J. Cell Biol.*, 151: 249–261.
223. Lee H.T., Lee J.G., Na M., Kay E.P., FGF-2 induced by interleukin-1 beta through the action of phosphatidylinositol 3-kinase mediates endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells, 2004, *J. Biol. Chem.* 279: 32325–32332.
224. Pedram A., Razandi M., Levin E.R., Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 44385-98.
225. Ispanovic E., Haas T.L., JNK and PI3K differentially regulate MMP-2 and MT1-MMP mRNA and protein in response to actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells, 2006, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 291: C579-88.
226. Blume-Jensen P., Hunter T., Oncogenic kinase signalling, 2001, *Nature* 411: 355- 365.
227. Gliko G., Wheeler-Jones C., Zachary I., Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated PKC δ phosphorylation: role of PKC in angiogenesis, 2002, *Cell Biol. Intern.* 26: 751-759.
228. Newton H.B., Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors, 2004, *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 4: 105-128.
229. Harrington E.O., Loffler J., Nelson P.R., Kent K.C., Simons M., Ware J.A., Enhancement of migration by protein kinase C α and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase C δ in capillary endothelial cells, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 7390–7397.