
Il fattore di permeabilità vascolare/fattore di crescita vascolare endoteliale (VPF/VEGF)

Shirley I. Stiver MD, PhD Harold F. Dvorak MD

Il vivo interesse suscitato dalle applicazioni terapeutiche dell'angiogenesi ad un'ampia gamma di processi patologici deriva in parte dagli studi compiuti su uno dei fattori di crescita più potenti e biologicamente importanti, il fattore di permeabilità vascolare/fattore di crescita vascolare endoteliale (VPF/VEGF). Il VPF/VEGF, noto anche come VEGF-A, è il membro principale di una vasta famiglia di fattori di crescita, che include VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ed il fattore di crescita della placenta (PlGF). Il VPF/VEGF agisce come regolatore cruciale del processo angiogenico, inducendo l'iperpermeabilità, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali. Più di recente, è stato riconosciuto l'importante ruolo del VPF/VEGF nel promuovere la sopravvivenza delle cellule endoteliali. Le azioni biologiche del VPF/VEGF sono mediate da due recettori tirosino-chinasici, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1), espressi selettivamente dall'endotelio vascolare, insieme ad un recettore recentemente scoperto, la neuropilina. L'espressione del VPF/VEGF e dei suoi recettori è regolata principalmente dall'ipossia, da altre citochine, da oncogeni e da geni oncosoppressori. I meccanismi di segnalazione per la proliferazione, la migrazione e l'iperpermeabilità delle cellule endoteliali ed il ruolo della via apoptotica AKT nella sopravvivenza dell'endotelio sono aree di attiva ricerca.

L'angiogenesi mediata dal VPF/VEGF è cruciale nel processo di guarigione delle ferite, oltre che nell'ischemia e nella crescita dei tumori. Le metodiche di rivelazione e di quantificazione del VPF/VEGF nei tessuti e nei fluidi corporei diventano sempre più importanti man mano che il VPF/VEGF acquisisce importanza clinica nella diagnosi e nel trattamento delle malattie.

Parole chiave: Vascular permeability factor; VEGF; VEGF receptor; Angiogenesis; Endothelium; Immunoassay; Quantitation.

Journal of Clinical Ligand Assay 2000; 23: 189-201.

Introduzione

Il fattore di permeabilità vascolare/fattore di crescita vascolare endoteliale (VPF/VEGF) è il membro principale di una famiglia di citochine strutturalmente e funzionalmente correlate, che rivestono insieme dei ruoli essenziali nell'angiogenesi, nella linfangiogenesi e nella vasculogenesi. Il

VPF/VEGF (VEGF-A) è il membro meglio conosciuto e studiato di questa famiglia. Il VPF/VEGF ed i suoi recettori tirosino-chinasici, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1), sono iperespressi nell'angiogenesi patologica (ad es. tumori, guarigione delle ferite, infiammazione cronica) ed in quella fisiologica (ad es. formazione del corpo luteo, ciclo endometriale), e rivestono inoltre dei ruoli essenziali nello sviluppo vascolare. Di conseguenza, il VPF/VEGF è cruciale per la generazione di nuovi vasi sanguigni, sia che derivino da capillari preesistenti sia da precursori primordiali delle cellule endoteliali (angioblasti).

L'insieme di questi dati ha generato un ventaglio di stimolanti applicazioni, attualmente in fase di valutazione per essere attuate nella pratica medica. Le potenziali applicazioni vanno in due direzioni, verso tentativi di blocco del VPF/VEGF per prevenire l'angiogenesi dei tumori da un lato, verso terapie progettate per stimolare la generazione di nuovi vasi sanguigni allo scopo di alleviare l'ischemia tissutale dall'altro. A causa del suo interesse clinico, sono stati compiuti numerosi sforzi diretti a chiarire la struttura e le numerose funzioni del VPF/VEGF sull'endotelio vascolare, le sue interazioni con i due recettori tirosino-chinasici (un terzo recettore, la neuropilina, è stato recentemente scoperto), ed i meccanismi di segnalazione con cui il VPF/VEGF media la sua attività biologica nelle cellule endoteliali.

Prospettiva storica

Il VPF/VEGF è stato scoperto verso la fine degli anni '70 in seguito all'osservazione che nello stroma dei tumori animali trapiantati erano presenti dei depositi di fibrina (1, 2). La fibrina è generata dalla coagulazione del fibrinogeno, una proteina plasmatica normalmente contenuta all'interno dei vasi sanguigni. Perché il fibrinogeno potesse uscire dai vasi e potesse così coagulare formando la fibrina, occorreva che i capillari locali fossero diventati iperpermeabili al fibrinogeno. Questa ipotesi fu prontamente dimostrata per un'ampia gamma di tumori umani ed animali. Inoltre, fu isolata entro breve tempo e purificata da surnatanti di colture tumorali una proteina, denominata fattore di permeabilità vascolare o VPF, che aveva la capacità di rendere i capillari normali (principalmente le venule) iperpermeabili al fibrinogeno oltre che ad altre proteine plasmatiche (3, 4). In seguito, si osservò che il VPF agiva anche da

mitogeno selettivo nei confronti delle cellule endoteliali (5-8), e che esercitava una serie di attività ulteriori (9-16) sulle cellule dell'endotelio vascolare. Di conseguenza, questa proteina fu ribattezzata con il nome di VPF/VEGF o VEGF (fattore di crescita vascolare endoteliale).

Espressione, struttura ed attività biologica

Espressione del VPF/VEGF: Durante lo sviluppo embrionale, il VPF/VEGF è espresso da quasi tutti i tessuti. Curiosamente, non è espresso nell'endotelio vascolare in via di sviluppo, ad eccezione delle cellule endoteliali dell'aorta (17). Nell'adulto, il VPF/VEGF è espresso costitutivamente in molti tessuti (18), ed in modo particolare nelle cellule epiteliali del polmone, della ghiandola surrenale e del rene, oltre che dai miociti cardiaci (19, 20). Il VPF/VEGF è stato rilevato in tutte le cellule ematiche nucleate (neutrofili, linfociti, monociti) e nelle piastrine, ma non nelle cellule della linea eritroide (21, 22); è stato inoltre identificato nelle mastcellule (23, 24). Il VPF/VEGF è un importante fattore di sopravvivenza per l'endotelio vascolare, e si ritiene che i bassi livelli di VPF/VEGF osservati nel plasma degli adulti normali abbiano un ruolo nel mantenimento delle cellule endoteliali. Un suo ruolo nella divisione cellulare sembra meno probabile negli animali e nell'uomo, dal momento che l'endotelio adulto è prevalentemente quiescente, e solo una cellula endoteliale su 10.000 va incontro a divisione in un determinato tempo. Il VPF/VEGF è espresso a livelli elevati da gran parte delle cellule tumorali, e va incontro ad aumento in numerosi tipi cellulari in risposta a numerosi processi patologici.

Il gene e le isoforme del VPF/VEGF: Il gene del VPF/VEGF umano è stato localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (25). Contiene una regione codificante di otto esoni. Lo splicing differenziale determina la formazione di cinque isoforme note del VPF/VEGF composte da 121, 145, 165, 189 e 206 aminoacidi (tre VPF/VEGF murini identificati, il 120, il 164 ed il 188, hanno un aminoacido in meno) (26). L'isoforma 189 è codificata da tutti gli otto esoni. Il VPF/VEGF¹⁶⁵, spesso l'isoforma espressa in modo predominante, manca dei residui codificati dall'esone 6, ed il VPF/VEGF¹²¹ manca di entrambi gli esoni 6 e 7 (26). Il VPF/VEGF²⁰⁶ è espresso prevalentemente durante lo sviluppo embrionale (27), benché sia stato rilevato nelle mastcellule (25), e l'isoforma 145 è stata osservata in linee cellulari derivate da carcinomi del tratto riproduttivo femminile (28).

Le isoforme 165, 189 e 206 del VPF/VEGF legano l'eparina con affinità crescente. I residui di cisteina, otto codificati dagli esoni 3 e 4, uno dall'esone 8, e sette dall'esone 7, sono fondamentali per la struttura e le proprietà del VPF/VEGF. Poiché nel VPF/VEGF¹²¹ è assente la regione codificata dall'esone 7, questo contiene meno cisteine, ha una carica meno basica, e non si lega all'eparina (26, 29, 30). A causa del suo forte legame all'eparina, il VPF/VEGF¹⁸⁹ rimane associato alle cellule che lo secernono, mentre il VPF/VEGF¹²¹ diffonde liberamente; il VPF/VEGF¹⁶⁵ è secreto, ed è in parte diffusibile ed in parte legato alla superficie e alla matrice extracellulare (29). Il

VPF/VEGF 121 e il VPF/VEGF 165 sono entrambi presenti in circolo a bassi livelli, benché vengano prontamente rimossi e siano inoltre rapidamente inattivati dall'inibitore di proteasi sierico alfa 2-macroglobulina (31). L'eparina, l'eparina solfato e l'eparinasi inducono il distacco delle isoforme legate del VPF/VEGF dai loro siti di legame sul proteoglicano, mentre la plasmina cliva il VPF/VEGF 165, 189 e 206 legato alle cellule ad alla matrice, producendo un frammento N-terminale biologicamente attivo composto da 110 aminoacidi (29, 32).

Struttura del VPF/VEGF: Il VPF/VEGF è una glicoproteina dimerica altamente conservata unita da ponti disolfuro, ed ha un peso molecolare di 34-45 kDa. Le catene dell'omodimero legate da ponti disolfuro sono disposte in senso antiparallelo, e si legano ai recettori tramite dei siti localizzati ai due poli, prevalentemente con interazioni di tipo idrofobico. I monomeri prodotti dalla riduzione dei ponti disolfuro sono biologicamente inattivi. La cristallografia a raggi X (33) e la spettroscopia NMR eteronucleare (34) hanno rivelato che le strutture monomeriche e dimeriche del VPF/VEGF sono molto simili a quelle del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). Diversamente dal PDGF, l'estremità amino-terminale del VPF/VEGF contiene un'alfa-elica che, tramite interazioni idrofobiche, è essenziale per la formazione del dimero (35).

Il dominio di legame dell'eparina del VPF/VEGF¹⁶⁵ è localizzato nei 55 residui carbossi-terminali, ed è critico per l'attività mitogena nei confronti delle cellule endoteliali. La rimozione di questo dominio non altera l'affinità di legame del VPF/VEGF nei confronti dei suoi recettori, ma è associata con una notevole perdita di attività biologica (32, 36). Il VPF/VEGF¹²¹ ed il frammento da 110 aminoacidi, rilasciato dal taglio operato dalla plasmina sul VPF/VEGF 165, 189 o 206, non si legano in modo significativo all'eparina, e mostrano una capacità di 10-100 volte più debole rispetto al VPF/VEGF¹⁶⁵ nell'indurre proliferazione dell'endotelio (32, 37). La determinazione omo-nucleare 2-D ed eteronucleare 3-D in spettroscopia NMR della struttura assunta in soluzione dal dominio di legame di 55 aminoacidi dell'eparina ha dimostrato che si tratta di una sequenza nuova che non condivide similitudini strutturali con nessun'altra proteina nota (36).

Altri membri della famiglia del VPF/VEGF: Il VEGF-A (isoforme 165, 121, 189, 145, 206) è il capostipite di una vasta famiglia di proteine correlate che include il VEGF-B, il VEGF-C, il VEGF-D ed il fattore di crescita della placenta (PIGF), oltre al VEGF-E, che è elaborato dal virus *Orf* (37, 38) (Tabella 1). Dove non diversamente specificato, la sigla VPF/VEGF si riferisce al VEGF-A. Tutti gli isomeri del VPF/VEGF contengono otto residui di cisteina regolarmente spaziate che comprendono il motivo "nodo di cisteina", un segno distintivo delle famiglie del VPF/VEGF e del PDGF. La sequenza aminoacidica del dominio di omologia centrale VEGF presente nel VEGF-A ha un'identità del 46% con il PIGF, del 45% con il VEGF-B, del 30% con il VEGF-C e del 31% con il VEGF-D (39). Il PIGF è espresso prevalentemente nella placenta, e ne è stato proposto un ruolo nel modulare le proprietà mitogene,

TABELLA 1 Fattori di crescita vascolari endoteliali, recettori ed espressione tissutale

Fattore di crescita	Recettore	Espressione tissutale		
		Embrione	Adulto normale	Processi patologici
VEGF-A	Flt-1 (VEGFR-1) KDR/Flk-1 (VEGFR-2) Neuropilina	Espressione diffusa in tutto l'embrione Livelli elevati in: Cuore Rene Intestino Milza	Glomeruli renali Polmone Cuore Surrene Follicoli piliferi Ovario, endometrio Polmone	Cellule tumorali Follicoli cutanei e piliferi durante la guarigione delle ferite Cellule sinoviali delle articolazioni nell'artrite reumatoide Cellule retiniche dell'occhio nella retinopatia diabetica, nella prematurità fetale, nell'occlusione della vena retinica centrale Muscolo cardiaco e cervello in seguito ad ischemia o infarto
VEGF-B	Flt-1 (VEGFR-1) Neuropilina	Cuore Muscolo scheletrico Cervello	Maggiormente prominente in Cuore Muscolo scheletrico	Cellule tumorali Endotelio dei vasi tumorali
VEGF-C	VEGFR-3 KDR/Flk-1 (VEGFR-2)	Prominente nelle regioni dove si formano le strutture linfatiche	Bassi livelli in: Cuore Placenta Ovaio Intestino tenue Ghiandola tiroidea	Cellule tumorali
VEGF-D	VEGF-3 KDR/Flk-1 (VEGFR-2)	Polmone	Abbondante in: Polmone Cuore Intestino tenue	Non rilevabile nelle linee di cellule tumorali
VEGF-E	KDR/Flk-1 (VEGFR-2)			Dermatite pustolosa mediata dal virus <i>Orf</i>
PlGF	Flt-1 (VEGFR-1) Neuropilina		Placenta Bassi livelli in: Cuore Polmone Ghiandola tiroidea	Espressione variabile nei tumori Tumori trofoblastici derivati dalla placenta Carcinoma delle cellule renali Tumori delle cellule germinali
Ang 1	Tie2	Cuore Espressione diffusa negli stadi tardivi nello sviluppo vascolare	Ampiamente espresso	
Ang 2	Tie2	Aorta e principali diramazioni aortiche Pattern di espressione puntiforme nel resto dei vasi embrionali	Nei siti di rimodellamento vascolare (ad es. tratto riproduttivo vascolare)	

chemiotattiche e di permeabilizzazione vascolare del VEGF-A tramite la formazione di eterodimeri PIGF/VEGF-A (40). Il VEGF-B è espresso prevalentemente nel cuore embrionale ma non nei cuscinetti endocardici (41). I topi senza il gene VEGF-A (-/-) e gli eterozigoti +/- muoiono in fasi precoci dello sviluppo embrionale. I topi VEGF-B -/-, invece, sono sani e fertili, ma hanno un cuore piccolo che recupera in modo anormale in risposta all'ischemia miocardica (42). Il VEGF-B potrebbe modulare l'attività biologica del VPF/VEGF formando eterodimeri con quest'ultimo (43). Il VEGF-C svolge un ruolo importante nello sviluppo del sistema linfatico, ed i topi che esprimono il VEGF-C in eccesso hanno dei vasi linfatici ipertrofici (44). L'mRNA del VPF/VEGF è presente in tutte le cellule non eritroidi del sangue periferico, mentre il VEGF-C è esclusivo delle piastrine e dei linfociti-T (22). Come il VEGF-A, il VEGF-B è espresso da molti tipi di tumore; il VEGF-C è stato osservato in circa il 50% dei tumori studiati, particolarmente linfomi (45). L'espressione del VEGF-D è strettamente confinata al tessuto polmonare, ed il suo aumento prima della nascita suggerisce un importante ruolo di questa isoforma nella vascolarizzazione polmonare (46). L'espressione del VEGF-D è regolata dall'oncogene nucleare *c-fos* (47). Il VEGF-E, una proteina elaborata dal virus *Orf*, un parapoxvirus che colpisce le pecore, le capre ed occasionalmente l'uomo, ha un'omologia di circa il 25% a livello aminoacidico con il VPF/VEGF umano (37).

Attività biologica del VPF/VEGF: Nonostante la comune percezione che il VPF/VEGF agisca primariamente come mitogeno endoteliale, l'attività biologica più rapida e potente della molecola è l'induzione della permeabilità microvascolare. Il VPF/VEGF è una delle poche citochine in grado di influenzare la permeabilità vascolare (5), oltre ad essere una delle più potenti, con una forza superiore di 50.000 volte a quella dell'istamina su base molare (48). Inoltre, l'induzione della permeabilità vascolare è stata proposta come passaggio iniziale necessario per l'angiogenesi, e tutti gli esempi di angiogenesi finora studiati, sia fisiologici che patologici, sono caratterizzati da un aumento della microporosità vascolare. Dopo una singola iniezione di VPF/VEGF nei tessuti, la permeabilità vascolare aumenta nel giro di alcuni minuti, ritornando a valori normali entro 20 minuti e senza lasciare segni di danno endoteliale (48). Bates e Curry (49) hanno dimostrato che dopo il ritorno ai livelli di base si verifica un secondo picco di incremento della permeabilità a circa 24 ore. L'effetto permeabilizzante esercitato dal VPF/VEGF è mediato in gran parte da un organulo recentemente scoperto nel citoplasma dell'endotelio venulare, l'organulo vescicolo-vacuolare (VVO) (50, 51). I VVO sono dei gruppetti di vescicole e di vacuoli interconnessi a forma di grappolo presenti lungo tutto lo spessore dell'endotelio venulare; in seguito all'attivazione da parte del VPF/VEGF forniscono una via cellulare trans-endoteliale per lo stravasamento delle proteine plasmatiche dal lume verso lo spazio extracellulare (52, 53). È stato inoltre osservato che il VPF/VEGF è in grado di indurre la formazione di zone di assottigliamento

focale dell'endotelio, dette fenestrazioni. In queste zone, il lume del vaso e l'interstizio sono separati solamente da un sottile diaframma che fornisce una via alternativa per lo stravasamento dei soluti (54, 55).

Nelle cellule endoteliali, il VPF/VEGF determina forti cambiamenti della morfologia cellulare e dell'organizzazione dell'actina, variazioni associate con la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali. Inoltre, il VPF/VEGF regola l'espressione della collagenasi e di altre metalloproteasi della matrice, dell'urochinasi dell'attivatore del plasminogeno tissutale (uPA e tPA), dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), e del recettore dell'urochinasi, fattori che si ritiene svolgano ruoli importanti nella degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare durante l'angiogenesi (9-12). Mentre l'aumento della permeabilità microvascolare in risposta al VPF/VEGF si verifica nell'arco di secondi, le variazioni della forma delle cellule endoteliali, dell'adesione, della migrazione, dell'espressione genica e della divisione cellulare si evolvono più lentamente, in un periodo variabile da poche ore ad alcune settimane.

Il VPF/VEGF funge inoltre da fattore di sopravvivenza, proteggendo le cellule endoteliali dall'apoptosi, e ritarda e potrebbe persino invertire il processo di senescenza delle cellule endoteliali (13-15). È stato recentemente scoperto che il VPF/VEGF stimola la proliferazione e la migrazione dei periciti in condizioni di ipossia (56, 57). Durante l'embriogenesi, il VPF/VEGF accelera la copertura di periciti nei vasi di nuova formazione; una volta ricoperte di periciti, le cellule endoteliali non necessitano più del VPF/VEGF per la sopravvivenza (58, 59).

Iniezioni endovenose di VPF/VEGF inducono ipotensione e tachicardia tramite una vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico, ed un diminuito ritorno venoso (16). Al contrario, il VPF/VEGF inibisce il rilassamento dei vasi uterini durante la gravidanza (60).

Anche se il VPF/VEGF agisce in modo estremamente specifico sulle cellule endoteliali, sono ben note anche altre azioni di tipo selettivo nei confronti di tipi cellulari non endoteliali. Il VPF/VEGF induce la chemiotassi monocito/macrofagica (61, 62), stimola la proliferazione della muscolatura liscia dell'utero (ma non di altri tipi di muscolo liscio) (63), è mitogeno per i linfociti IL-2 dipendenti (64) e svolge un ruolo di regolazione sulle cellule progenitrici dei monociti-macrofagi (65) e sulla differenziazione degli osteoblasti (66). È stato recentemente scoperto un ruolo di stimolazione sulla crescita delle cellule di Schwann (67) e di induzione della sintesi di collagene da parte delle cellule mesangiali del glomerulo renale umano (68).

Recettori del VPF/VEGF: Il VPF/VEGF agisce legandosi a due recettori tirosino-chinasici ad alta affinità, Flt-1 (VEGFR-1; tirosina chinasi 1 fms-simile) (69) e KDR/Flk-1 (VEGFR-2; conosciuto come recettore contenente il dominio chinasi o KDR nell'uomo e chinasi epatica fetale-1 o Flk-1 nei roditori) (70) (Tabella 2). Entrambi i recettori sono espressi prevalentemente, ma non unicamente, dall'endotelio vascolare. Sono altamente omologhi alla famiglia del recettore del fattore di crescita derivato dalle

TABELLA 2 Recettori dei fattori di crescita vascolari endoteliali e loro ligandi

Recettore	Ligando	Localizzazione del recettore
Flt-1 (VEGFR-1)	VEGF-A VEGF-B PlGF	Endotelio vascolare Monociti/macrofagi
KDR/Flk-1 (VEGFR-2)	VEGF-A VEGF-C VEGF-D <i>Orf</i> VEGF-E	Endotelio vascolare Non presente nei monociti/macrofagi
VEGFR-3	VEGF-C VEGF-D	Endotelio linfatico
Neuropilina	VEGF-A 165 PlGF VEGF-B <i>Orf</i> VEGF-E	Cellule endoteliali Superficie cellulare o cellule tumorali Sistema nervoso dell'embrione
Tie 1	Sconosciuto	
Tie 2	ANg1 Ang2	Endotelio vascolare

piastrine, e contengono sette domini immunoglobulinici (Ig) extracellulari, una componente transmembrana ed un dominio chinamico intracellulare (69-71). Il loro peso molecolare è di circa 220 kDa, e sono estesamente glicosilati. Flt-1 ha una frequenza di espressione inferiore, pari a circa 3.000 recettori per cellula, rispetto ai 40.000 recettori per cellula di KDR/Flk-1 (72), ma possiede un'affinità di legame di dieci volte superiore per il VPF/VEGF (Kd 10-12 pM) (69) rispetto a KDR/Flk-1 (Kd 75-125 pM) (70). Il legame ad alta affinità di VPF/VEGF ad Flt-1 dipende principalmente dal dominio Ig loop 2 più i domini loop-1 o loop-3 del recettore, poiché le molecole chimeriche contenenti solo il loop-2 legano il VPF/VEGF con un'affinità significativamente inferiore rispetto al recettore nativo (73). Studi condotti con i mutanti di delezione di KDR/Flk-1 dimostrano che il secondo ed il terzo dominio Ig-simile del recettore sono critici per lo stretto legame di VPF/VEGF (74). Il VPF/VEGF ha una forte preferenza per la forma pre-dimerizzata di KDR/Flk-1, poiché le forme monomeriche del dominio extracellulare di KDR/Flk-1 legano il VPF/VEGF con un'affinità di circa 100 volte inferiore (74).

Il VPF/VEGF contiene tre domini esposti, denominati loop I, II e III. Il loop I comprende gli aminoacidi 36-46, gli aminoacidi del loop II 61-68 formano un'area di carica negativa, e gli aminoacidi 84-87 si raggruppano generando una regione di carica positiva (75). Il legame di Flt-1 è associato con gli aminoacidi del loop II Asp 63, Glu 64 e Glu 67 del VPF/VEGF, mentre gli aminoacidi Arg 82, Lys 84 e

His 86 del loop III sono critici per il legame di VPF/VEGF a KDR/Flk-1 (75). È stato scoperto che la neuropilina, precedentemente nota per il suo ruolo nel guidare la crescita dei coni di emergenza dei neuriti, potenzia il legame di VPF/VEGF¹⁶⁵ a KDR/Flk-1 (76).

La proliferazione, la migrazione e la permeabilità delle cellule endoteliali indotte dal VPF/VEGF svolgono tutte un ruolo critico per l'angiogenesi, e sono mediate principalmente dal recettore KDR/Flk-1 (75, 77, 78). La funzione di Flt-1 è meno chiara, ed alcuni hanno proposto che funga da molecola in grado di catturare il ligando piuttosto che da tirosina chinasi di segnalazione (79). È stato proposto che Flt-1 possa fungere da regolatore negativo dell'attività del VPF/VEGF nello sviluppo embrionale (79). Flt-1 media la migrazione delle cellule e la chemiotassi dei monociti (61, 62, 79) e, benché non uniformemente accettato, è stato inoltre

implicato nella permeabilità indotta da VPF/VEGF nel dosaggio di Miles (80). Flt-1 e KDR/Flk-1 sono entrambi essenziali per il normale sviluppo, poiché i topi privati di uno dei due recettori hanno un esito letale in fase embrionale (81, 82).

Una forma solubile del recettore Flt-1, sFlt-1, lega il VPF/VEGF con un'elevata affinità (Kd 10-20 pM, simile a quella del recettore nativo) ed è un potente inibitore endogeno selettivo della mitogenesi indotta dal VPF/VEGF (83). L'sFlt-1 è il risultato di uno splicing alternativo del gene Flt-1 (83). La proteina solubile più corta che viene a formarsi è composta solo dai primi sei domini immunoglobulinici extracellulari, ed è priva del dominio Ig-simile prossimale alla membrana, del polipeptide transmembrana, e del dominio C-terminale tirosino-chinamico intracellulare (83). L's-Flt-1 è prodotta prevalentemente dalla placenta, ma alcuni studi di RT-PCR dimostrano che la molecola è presente anche nel polmone, nel rene e nel fegato di topi adulti (84). Non è stata ritrovata una forma solubile comparabile di KDR/Flk-1.

Il ruolo fisiologico di sFlt-1 non è noto, benché si ritenga che possa fungere da regolatore negativo dell'angiogenesi indotta dal VPF/VEGF (85). Formando un complesso con il VPF/VEGF, sFlt-1 potrebbe proteggerlo dalla degradazione delle proteasi, ed il rapporto di VPF/VEGF libero nei confronti di quello complessato con il recettore potrebbe controllare strettamente il bilancio angiogenico (85). sFlt-1 è stato identificato nel siero di donne gravide ma non di uomini o di donne non in stato di gravidanza (86). È

interessante che gli attuali dosaggi non siano in grado di rivelare la presenza del VPF/VEGF nel siero delle donne in gravidanza, anche se addizionato con la molecola, a causa del legame esercitato da parte di sFlt-1 (87). La crescita dei tumori e l'angiogenesi sono inibite nei tumori derivati da cellule manipolate in modo da esprimere la proteina sFlt-1, probabilmente perché l's-Flt-1 elaborato dalle cellule tumorali sequestra il VPF/VEGF o forma dei dimeri inattivi con i recettori del VPF/VEGF associati alla cellula (88). E' stato dimostrato che sFlt-1 è potenzialmente in grado di sopprimere totalmente la formazione del corpo luteo in un modello di ratto dell'ovulazione indotta da ormoni (89). Anche cellule leucemiche maligne e di linfoma sono in grado di elaborare l'mRNA di sFlt-1 (90).

Il VEGF-B si lega in modo selettivo ad Flt-1 ed induce un aumento dell'espressione di uPA e di PAI-1, suggerendo un ruolo del VEGF-B nella degradazione della matrice extracellulare e nella migrazione delle cellule endoteliali (91). Il VEGF-B possiede dei residui acidi quasi identici al loop II del VPF/VEGF, importanti per il legame ad Flt-1, e l'assenza di residui basici vicino al loop III del VPF/VEGF ne predice una scarsa affinità per il legame a KDR/Flk-1 (91). Il fattore di crescita della placenta (PlGF) ha anch'esso un'elevata affinità per il legame ad Flt-1, ma non induce la permeabilità vascolare e non ha significativi effetti mitogeni nei confronti delle cellule endoteliali (92).

Il recettore 3 del VEGF (VEGFR-3 o Flt-4), un recettore tirosino-chinasi per il VEGF-C ed il VEGF-D, è espresso dall'endotelio linfatico (93, 94). Nonostante il VEGF-C si legghi anche a KDR/Flk-1 (Kd 410 pM), la sua affinità di legame a VEGFR-3 (Kd 135 pM) è di tre volte superiore (95). Oltre ai suoi effetti linfoangiogenici, il VEGF-C ha molte proprietà simili a quelle del VPF/VEGF. E' in grado di indurre la migrazione e la mitosi delle cellule endoteliali e di incrementare la micropermeabilità vascolare (95), benché siano necessarie concentrazioni notevolmente più elevate rispetto al VPF/VEGF (96). Queste attività sono parzialmente, ma non interamente, attribuibili al legame a KDR/Flk-1, ed è stato inoltre riportato che il VEGFR-3 è in grado di sostenere la proliferazione e la chemiotassi delle cellule endoteliali indotte dal VEGF-C (97). VEGFR-3 ed il suo ligando VEGF-C sono iperespressi nei capillari di nuova formazione del tumore mammario (98). Il VEGFR-3 è inoltre importante per la maturazione del plesso vascolare durante lo sviluppo embrionale. I topi privi del VEGFR-3 formano vasi sanguigni anormalmente grandi con lumi difettivi, non subiscono il rimodellamento del plesso vascolare primario, e muoiono durante l'embriogenesi molto prima dell'inizio dello sviluppo linfatico (99).

Il VEGF-D si lega ai recettori KDR/Flk-1 e VEGFR-3 presenti sulle cellule endoteliali (47). Il VEGF-D stimola la proliferazione delle cellule endoteliali (94), ma non induce un aumento della permeabilità microvascolare (100). Il ruolo del VEGF-D nei vasi linfatici, se esistente, non è stato ancora determinato.

Il VEGF-E si lega a KDR/Flk-1 ma non a Flt-1, e conferisce un'attività mitogena potente quanto quella del VPF/VEGF¹⁶⁵, benché non abbia affinità per l'eparina (37).

Inoltre, la capacità del VEGF-E nell'indurre un incremento della permeabilità vascolare è confrontabile a quella del VPF/VEGF (37).

Le angiopoietine sono dei fattori di crescita che, come il VPF/VEGF, hanno un'alta specificità per l'endotelio vascolare (101). Questa specificità deriva da una ridotta espressione endoteliale del recettore tirosino-chinasi dell'angiopoietina, Tie2. Le angiopoietine non sembrano fungere da ligandi nei confronti dello strettamente correlato recettore Tie1. Ang1 ed Ang2, i membri meglio studiati della famiglia dell'angiopoietina, hanno un profilo biologico diverso da quello del VPF/VEGF. Ang1 non è mitogena per le cellule endoteliali in coltura, ma gioca un ruolo complementare al VPF/VEGF nel rimodellamento e nella stabilizzazione dei vasi nelle fasi tardive dello sviluppo vascolare (102). Ang2 agisce come antagonista di Ang1, bloccandone gli effetti di stabilizzazione vascolare, ed ha un'azione permissiva sulla regressione dei vasi (103).

Regolazione dell'espressione di VPF/VEGF e dei suoi recettori: La famiglia genica del VPF/VEGF manca tipicamente di una TATA box nella regione del promotore, e la sua trascrizione ha quindi inizio in siti multipli eterogenei ad opera di una varietà di fattori (26). Sono stati identificati i siti di legame promotori per i fattori trascrizionali Sp1, Ap-1 ed Ap-2 (26).

IPOSSIA: L'ipossia è il segnale primario che determina l'aumento di espressione del VPF/VEGF, e che agisce per incrementare sia la trascrizione del VPF/VEGF che la stabilità del suo mRNA. La regolazione trascrizionale del VPF/VEGF è mediata dal fattore 1 inducibile dall'ipossia (HIF-1), stabilizzato in condizioni di ipossia, che attiva il VPF/VEGF legandosi ad elementi responsivi all'HIF nella sua regione promotrice (104). L'iperespressione del VPF/VEGF indotta dall'ipossia è associata con l'aumento di espressione di Flt-1 e di KDR/Flk-1 nelle cellule endoteliali dei capillari tumorali. Tuttavia, l'ipossia induce anche un aumento di espressione dei recettori del VPF/VEGF indipendente al ligando. Gli effetti differenziali che l'ipossia ha sui geni di Flt-1 e di KDR-Flk-1 sostengono l'ipotesi che questa condizione abbia un effetto diretto sul gene del recettore Flt-1, mentre gli effetti su KDR/Flk-1 potrebbero coinvolgere una molecola intermedia (105). L'ipossia non induce il VEGF-B, il VEGF-C o il PlGF (106).

CITOCINE: Numerosi fattori di crescita e citochine esercitano un effetto di attivazione nei confronti dell'espressione del VPF/VEGF; i più importanti sono il fattore di crescita dell'epidermide, il fattore di crescita trasformante- (TGF- β), il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita dei cheratinociti, l'interleuchina 1 alfa e beta, la prostaglandina E2, l'interleuchina 6 ed il fattore di crescita insulino-simile 1 (18, 107).

ONCOGENI E GENI ONCOSOPPRESSORI: Gli oncogeni (*src*, *ras*) (108), il gene oncosoppressore p53 e il gene oncosoppressore del tumore di von Hippel Lindau svolgono un ruolo nella regolazione del VPF/VEGF. Il prodotto genico dell'oncosoppressore von Hippel Lindau inibisce l'espressione dell'mRNA per il VPF/VEGF (109-111). Il gene oncosoppressore p53 svolge un ruolo di regolazione

nell'angiogenesi dei tumori, sopprimendo la trascrizione di VPF/VEGF (112).

ORMONI: Durante il ciclo mestruale, il VPF/VEGF è influenzato dagli estrogeni e dal progesterone nell'ovaio e nell'utero (113), ma il meccanismo di questa regolazione non è stato chiarito. L'ormone tireotropo induce un aumento di espressione dell'mRNA per il VPF/VEGF nei follicoli tiroidei umani in coltura (114), e promuove la secrezione di VPF/VEGF in numerose linee cellulari derivate da tumori tiroidei (115).

REGOLAZIONE DA PARTE DI ALTRI AGENTI: La trombina amplifica la mitosi delle cellule endoteliali indotta dal VPF/VEGF inducendo l'espressione di mRNA per Flt-1 e KDR/Flk-1 (116). Le piastrine umane aggregate inducono l'espressione dell'mRNA del VPF/VEGF ed il rilascio del VPF/VEGF da parte di cellule di muscolo liscio in coltura (117), ed è stato dimostrato che la tensione meccanica induce l'espressione del VPF/VEGF nel cuore (118) e nelle cellule mesangiali del rene (119). La fosforilazione della tirosina ed il clustering del KDR/Flk-1 in cellule aortiche di bovino in coltura in risposta allo stress meccanico dimostrano che il recettore KDR/Flk-1 può agire traducendo uno stimolo meccanico in uno stimolo chimico (120).

Trasduzione del segnale: Si ritiene che i recettori Flt-1 e KDR/Flk-1 attivino diverse vie di trasduzione del segnale. In generale, si considera che Flt-1 faciliti la migrazione cellulare (macrofagi e monociti) (61, 62, 79) e che KDR/Flk-1 controlli la proliferazione cellulare (75, 78). Le cellule endoteliali quiescenti devono essere attivate per rispondere agli stimoli mitogeni, ma il meccanismo di questa attivazione non è noto (80). Il segnale mediato dal VPF/VEGF ha inizio con l'autofosforilazione di residui di cisteina presenti nei domini citoplasmatici di Flt-1 e KDR/Flk-1, cui segue la fosforilazione di ulteriori proteine cellulari, e che culmina con l'attivazione delle cascate di segnalazione mediate dalla fosforilasi C-gamma (PLC), dalla fosfatidilinositol 3'-chinasi (PI3K), dalla proteina chinasi C (PCK), e dalla proteina chinasi attivata dai mitogeni (MAPK).

I segnali del VPF/VEGF vengono trasmessi tramite vie multiple, ognuna delle quali potrebbe provocare una risposta cellulare diversa. L'Akt è una serina-treonina chinasi che promuove la sopravvivenza in diversi tipi cellulari. Il VPF/VEGF attiva la via di segnalazione della Akt inducendo un aumento di espressione della fosfatidilinositol 3'-chinasi (PI3K) (121). La cascata della Akt regola la sopravvivenza delle cellule endoteliali (121, 122) tramite l'induzione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 (13, 123), XIAP e survivin (122).

I meccanismi di segnalazione usati dal VPF/VEGF per indurre l'iperpermeabilità vascolare sono poco conosciuti, ma sembrano essere correlati con dei flussi intracellulari di calcio. Alcune prove che l'ossido nitrico (NO) contribuisca all'attività biologica del VPF/VEGF vengono dalla significativa inibizione operata da parte di inibitori della ossido nitrico sintetasi (eNOS), ed esistente in topi knock-out per gli eNOS (124, 125), nei confronti della permeabilità e dell'angiogenesi indotte dal VPF/VEGF.

Applicazioni diagnostiche del VPF/VEGF

Si ritiene che la misurazione dei livelli di VPF/VEGF nel tessuto tumorale e nei fluidi corporei potrebbe essere utile per la diagnosi dei tumori, e per determinare l'entità della malattia e la prognosi. L'esecuzione di misure ripetute nel tempo potrebbe essere utile per seguire la risposta alla terapia e la recidiva nei singoli pazienti. L'analisi dell'espressione del VPF/VEGF potrebbe avere un'applicazione per la rivelazione delle lesioni pre-maligne. Ad esempio, con l'uso della RT-PCR semi-quantitativa e dell'ibridazione *in situ*, degli adenomi colici pre-maligni sono stati associati con un aumento statisticamente significativo del VPF/VEGF rispetto al tessuto colico normale; i livelli aumentano ulteriormente in caso di progressione maligna verso l'adenocarcinoma (126). È stato osservato che degli alti livelli di VPF/VEGF negli astrocitomi cerebrali di basso grado sono indicativi di una maggiore possibilità di trasformazione maligna, e si correlano inversamente con la sopravvivenza del paziente (127). Man mano che le misurazioni quantitative dell'espressione tumorale del VPF/VEGF entreranno nella routine, il significato di questo parametro e la sua quantificazione saranno probabilmente standardizzati per ciascun tipo di tumore.

La valutazione e la quantificazione dell'espressione del VEGF-C nei tumori solidi ha anch'essa delle potenziali applicazioni cliniche. È ben noto che lo stato dei linfonodi è un forte indicatore prognostico indipendente per la sopravvivenza dei pazienti. In alcuni tumori selezionati, è stata riportata una correlazione fra l'espressione di VEGF-C da parte del tumore e l'invasione linfonodale (128-131). Ad esempio, tramite RT-PCR, l'espressione del VEGF-C è stata riportata in 9 su 12 (75%) tumori mammari linfonodopositivi, ma è stata rilevata in zero su otto tumori linfonodonegativi (129). Tuttavia, la causalità fra l'espressione di VEGF-C e la diffusione metastatica dei tumori tramite i vasi linfatici rimane ancora da dimostrare.

La maggior parte dei pazienti oncologici, ed in particolare quelli con la malattia metastatica, mostrano un aumento dei livelli sierici del VPF/VEGF (132-134). Alti livelli sierici di VPF/VEGF sono associati con parametri clinici sfavorevoli, come una malattia progressiva ed estesa, una scarsa risposta alla chemioterapia ed una sopravvivenza limitata. Un aumento dei livelli sierici di VPF/VEGF in un paziente può significare un aumento della crescita, una recidiva del tumore o una diffusione metastatica. Lo scopo della medicina clinica di laboratorio è definire dei parametri di laboratorio obiettivi per formulare la diagnosi e per definire l'entità della malattia. Questo obiettivo è stato raggiunto con successo per il cancro del colon-retto, in cui un valore sierico del VPF/VEGF pari a 217 pg/mL misurato tramite ELISA ha una sensibilità del 91% ed un valore predittivo negativo dell'89% nella rivelazione del tumore. Livelli sierici inferiori a 600 pg/mL possono escludere le metastasi epatiche con un valore predittivo negativo del 97% (135). I livelli indicativi e le analisi di sensibilità/specificità sono ancora da definire per gli altri tumori. Tuttavia, è possibile che in molti tumori la sovrapposizione fra le ampie curve di distribuzione sieriche del VPF/VEGF

presenti in condizioni fisiologiche non consenta di discriminare così chiaramente fra i soggetti con tumore, specialmente nelle fasi precoci, e quelli in buona salute. Anche se non fosse possibile stabilire dei livelli diagnostici indicativi per tutti i tumori, il VPF/VEGF sierico potrebbe essere utile per seguire la risposta al trattamento, e per eseguire lo screening delle recidive o dello sviluppo di metastasi in un dato paziente.

I livelli di VPF/VEGF possono avere un valore diagnostico anche in altri fluidi. I livelli di VPF/VEGF sono elevati nei versamenti pleurici maligni (136), ed i valori nelle asciti causate da tumori ovarici, gastrici e colici sono superiori rispettivamente di 45, 23 e 12 volte rispetto a quelli dei fluidi ascitici non maligni (137). I livelli di VPF/VEGF nelle cisti ovariche maligne ($38,5 \pm 8,2$ ng/mL) sono notevolmente elevati rispetto alle cisti benigne ($1,6 \pm 0,4$ ng/mL; $P < 0,001$) o funzionali ($3,8 \pm 2,0$ ng/mL $P < 0,001$) (138). La sensibilità e la specificità dei livelli urinari del VPF/VEGF nella diagnosi del tumore primario o ricorrente della vescica sono state riportate come superiori alla citologia, attualmente la metodica di diagnosi non invasiva preferita (139).

Analisi del VPF/VEGF

Sono disponibili dei dosaggi di vari produttori che consentono la rivelazione del VPF/VEGF tramite ELISA a partire da concentrazioni di 9-25 pg/mL, con variabilità interdosaggio del 5-8% ed intradosaggio del 3-6% (140, 141). Degli standard di VPF/VEGF ricombinante usati per "immunoassay" sono stati confrontati utilizzando dei dosaggi di cattura mediati da recettori e dei dosaggi con anticorpi monoclonali (142). Molte metodiche di ELISA chemiluminescenti e colorimetriche non sono state sufficientemente sensibili da rilevare i livelli endogeni di VPF/VEGF nel plasma degli individui sani (143). E' stato riportato un dosaggio fluorimetrico in ELISA specifico per l'isoforma 165 del VPF/VEGF nel plasma umano, dotato di una sensibilità superiore di circa 15 volte nella misurazione di basse concentrazioni di VPF/VEGF, e con un limite di 10 pg/mL (0,2 pM), una variabilità intradosaggio dell'8-18%, ed una variabilità interdosaggio del 5-14% (143). Utilizzando questa metodica, i livelli plasmatici circolanti del VPF/VEGF endogeno sono risultati compresi in una media di 42 ± 22 pg/mL (range 20-141 pg/mL) negli individui normali sani, mentre nei pazienti oncologici i livelli sono stati in media di 129 ± 17 pg/mL (range 32-418 pg/mL) (143).

L'importanza di distinguere i livelli sierici da quelli plasmatici del VPF/VEGF deriva dal dato ormai accettato che le piastrine contengono VPF/VEGF e che lo rilasciano durante la coagulazione del sangue (140-142). I livelli di VPF/VEGF sono riproducibilmente più elevati nel siero che nel plasma, sia nei bambini (media \pm SEM) ($306,1 \pm 39,4$ contro $107,4 \pm 24,9$ pg/mL; $P < 0,0001$) che negli adulti ($249,4 \pm 46,4$ contro $76,1 \pm 10,7$ pg/mL; $P < 0,0001$) (142). Il contenuto medio di VPF/VEGF è di circa 0,5 pg per 10^6 piastrine, ed è dipendente dal volume piastrinico medio (140, 144). E' stato riportato che per una varietà di

tumori solidi, escluse le neoplasie ematologiche, i livelli plasmatici del VPF/VEGF sono in grado di discriminare i controlli sani normali (mediana 4 pg/mL [0-68 pg/mL]) dai soggetti con tumore e senza metastasi clinicamente rilevabili (mediana 22 pg/mL [0-266 pg/mL]; $P < 0,0001$) e da quelli con tumore metastatico (mediana 55 pg/mL [6-383 pg/mL]; $P < 0,00001$) (134). Tuttavia, esiste una considerevole variabilità fra studi, ed è improbabile che i livelli plasmatici di VPF/VEGF si rivelino utili come strumento di screening per il tumore; tuttavia, come citato in precedenza, questo tipo di misurazioni potrebbe essere utile per riconoscere le recidive e per seguire la risposta al trattamento nei singoli pazienti oncologici.

I livelli circolanti del VPF/VEGF variano considerevolmente a dipendenza del fatto che vengano misurati nel siero, nel plasma citrato, nel plasma citrato coagulato, nel sangue citrato coagulato, o nel plasma ricco di piastrine attivato con trombina o calcio. Benché sia un dato ancora controverso, è stato riportato che le misurazioni vengono eseguite al meglio su sangue citrato povero di piastrine appena raccolto (entro 1 ora) (140, 145). Questo approccio evita la misurazione del VPF/VEGF contenuto nelle piastrine, proposte come fonte contributiva ai valori elevati del VPF/VEGF nei pazienti oncologici, ed assume che il VPF/VEGF derivato dal tumore circoli libero nel plasma (140-142, 145, 146).

Numerosi gruppi si sono impegnati a determinare la fonte degli elevati livelli di VPF/VEGF nel siero dei pazienti oncologici, sia esso derivato dalle cellule tumorali che esprimono la molecola o dal sangue periferico e dalle piastrine. Salven e collaboratori (144) hanno misurato il VPF/VEGF nel siero, nel plasma e nel sangue intero dei soggetti normali e dei pazienti affetti da tumore. I livelli di VPF/VEGF nel sangue intero sono stati elevati in tutti i pazienti oncologici come gruppo (mediana 464 pg/mL) rispetto ai controlli normali (mediana 298 pg/mL; $P < 0,0001$), ed i livelli più elevati sono stati rilevati in quelli affetti da tumore disseminato (mediana 563 pg/mL). Nel plasma sono stati rilevati valori decisamente ridotti di VPF/VEGF. In contrapposizione con i fautori della misurazione dei livelli plasmatici del VPF/VEGF, Salven e collaboratori (144) hanno riportato che i pazienti oncologici hanno livelli di VPF/VEGF più elevati dei soggetti sani quando vengono normalizzati per la conta delle piastrine e dei leucociti, e sostengono che i livelli più elevati non siano da attribuire alla leucocitosi o alla trombocitosi. Dato interessante, questi autori hanno osservato che le cellule ematiche dei pazienti tumorali contengono livelli anormalmente elevati di VPF/VEGF. Nei pazienti oncologici, le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMNC) contengono 12 volte (10,6 contro 0,9 pg per 10^6 PBMNC; $P < 0,0001$), e le piastrine tre volte (1,6 contro 0,5 pg per 10^6 piastrine), più VPF/VEGF dei controlli normali sani (144). Il contenuto di VPF/VEGF delle cellule ematiche, e particolarmente quello delle cellule mononucleate, è stato superiore ai livelli sierici di VPF/VEGF nel discriminare fra i pazienti con tumore ed i controlli normali. Salven (144) ha postulato che una porzione del VPF/VEGF presente nelle

piastrine derivi da un'endocitosi dal plasma, e se questo fosse effettivamente il caso, i livelli plasmatici non potrebbero rappresentare una buona stima del VPF/VEGF secreto nel circolo dalle cellule tumorali.

I dosaggi descritti in precedenza non rilevano il VPF/VEGF legato a sFlt-1 che, se presente in quantità significative (ad es. durante la gravidanza), può determinare una riduzione del VPF/VEGF misurato nel plasma o nel siero (142). Utilizzando un anticorpo con un epitopo di legame compreso fra i primi due domini extracellulari Ig-simili di sFlt-1, è stato sviluppato un dosaggio ELISA specifico per l'sFLT-1 umano, dotato di una sensibilità pari ad 1 ng/mL (85). Il dosaggio riconosce le forme libera e complessata di sFlt-1. L'anticorpo non ha mostrato nessuna reattività crociata con i recettori solubili KDR/Flk-1, VEGFR-3 o PDGFR-, dato importante poiché tutti e quattro i recettori condividono un alto grado di omologia.

L'analisi "phosphorimage" di sonde di RNA antisense radiomarcate del VPF/VEGF consente la quantificazione dei livelli di mRNA della molecola, ma la risoluzione è scarsa; l'autoradiografia consente invece una dettagliata localizzazione cellulare dell'mRNA ma non ne permette una buona quantificazione. Una tecnica che combina queste due metodologie consente di quantificare l'mRNA del VPF/VEGF nei tumori (147). Un dosaggio di RT-PCR quantitativa diretto ad analizzare i livelli di mRNA del VPF/VEGF nei tumori, studiato per l'utilizzo diffuso nel laboratorio clinico, è stato realizzato utilizzando sonde fluorogeniche ed un ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (148). Un dosaggio quantitativo simultaneo delle diverse isoforme del VPF/VEGF è stato sviluppato utilizzando una RT-PCR competitiva, e questa tecnica è stata applicata per quantificare il VPF/VEGF 121, 165 e 189 nelle cellule mononucleate del sangue periferico umano (149).

Riassunto

Fin dalla sua scoperta, avvenuta alla fine degli anni '70, un'intensa ricerca di base ha portato il VPF/VEGF alla soglia dell'applicazione clinica. L'importanza del VPF/VEGF nella medicina clinica, già evidente nella pratica oncologica, continuerà ad aumentare man mano che verrà scoperto l'intero potenziale insito nell'uso clinico del VPF/VEGF.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dallo US Public Health Service NIH Grant CA-50453, nei termini di un contratto della National Foundation for Cancer Research, e da una sovvenzione della Beth Israel Pathology Foundation, Inc.

Bibliografia

1. Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, et al: Induction of a fibrin-gel investment: An early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol* 1979;122:166-174.
2. Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ, et al: Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs: Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:1459-1472.
3. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
4. Senger DR, Connolly DT, Van De Water L, et al: Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990;50:1774-1778.
5. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84:1470-1478.
6. Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858.
7. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J: Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7311-7315.
8. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, et al: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
9. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, et al: Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:9709-9716.
10. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:902-906.
11. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, et al: Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992;153:557-562.
12. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, et al: Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 1998;55:29-42.
13. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-13316.
14. Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene* 1997;14:2025-2032.
15. Watanabe Y, Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor inhibits anchorage-disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation. *Exp Cell Res* 1997;233:340-349.
16. Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, et al: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2793-2800.
17. Miquelol L, Gertsenstein M, Harpal K, et al: Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev Biol* 1999;212: 307-322.
18. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997;79:233-269.
19. Berse B, Brown LF, Van De Water L, et al: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3:211-220.
20. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, et al: Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114:521-532.
21. Taichman NS, Young S, Cruchley AT, et al: Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 1997;62: 397-400.
22. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, et al: Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost* 1998;80:171-175.
23. Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H, et al: Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF 206. *Mol Biol Cell* 1998;9: 875-884.

24. Boesiger J, Tsai M, Maurer M, et al: Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med* 1998;188:1135-1145.
25. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-1495.
26. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266:11947-11954.
27. Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814.
28. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, et al: VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997;272:7151-7158.
29. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, et al: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-26037.
30. Park JE, Keller G-A, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-1326.
31. Soker S, Svahn CM, Neufeld G: Vascular endothelial growth factor is inactivated by binding to alpha 2-macroglobulin and the binding is inhibited by heparin. *J Biol Chem* 1993;268:7685-7691.
32. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al: The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996;271:7788-7795.
33. Muller YA, Li B, Christinger HW, et al: Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7192-7197.
34. Fairbrother WJ, Champe MA, Christinger HW, et al: 1H, 13C, and 15N backbone assignment and secondary structure of the receptor-binding domain of vascular endothelial growth factor. *Protein Sci* 1997;6:2250-2260.
35. Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G: The alpha-helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998;273:11115-11120.
36. Fairbrother WJ, Champe MA, Christinger HW, et al: Solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor. *Structure* 1998;6:637-648.
37. Ogawa S, Oku A, Sawano A, et al: A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-31282.
38. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, et al: A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999;18:363-374.
39. Veikkola T, Alitalo K: VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211-220.
40. Cao Y, Chen H, Zhou L, et al: Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271: 3154-3162.
41. Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, et al: Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn* 1999;215:12-25.
42. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, et al: Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000;86:E29-35.
43. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, et al: Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2576-2581.
44. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al: Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:1423-1425.
45. Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, et al: Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998;153:103-108.
46. Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J: Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: High expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:891-894.
47. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, et al: c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9671-9676.
48. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039.
49. Bates DO, Curry FE: Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol* 1996;271(6Pt2):H2520-2528.
50. Feng D, Nagy J, Pyne K, et al: Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. *Microcirculation* 1999;6:23-44.
51. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:97-132.
52. Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, et al: The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc Biol* 1996;59:100-115.
53. Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, et al: Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 1992;67:596-607.
54. Roberts WG, Palade GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-2379.
55. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, et al: Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140: 947-959.
56. Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Dupl a C, et al: Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* 1999;58:128-136.
57. Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, et al: Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* 1999;79:501-509.
58. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E: A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998;125: 1591-1598.
59. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999;126:1149-1159.
60. Brockelsby J, Hayman R, Ahmed A, et al: VEGF via VEGF receptor-1 (Flt-1) mimics preeclamptic plasma in inhibiting uterine blood vessel relaxation in pregnancy: implications in the pathogenesis of preeclampsia. *Lab Invest* 1999;79:1101-1111.
61. Clauss M, Weich H, Breier G, et al: The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placental growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996;271:17629-17634.
62. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al: Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535-1545.
63. Brown LF, Detmar M, Tognazzi K, et al: Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 1997;76: 245-255.
64. Praloran V, Mirshahi S, Favard C, et al: Mitogenic activity of vasculotropin for peripheral human lymphocytes. *CR Acad Sci III* 1991;313:21-26.
65. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, et al: Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol* 1995;62:203-215.
66. Midy V, Plou t J: VAS/VEGF induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:380-386.
67. Sondell M, Lundborg G, Kanje M: Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular

- nerve grafts. *Brain Res* 1999;846:219–228.
68. Amemiya T, Sasamura H, Mifune M, et al: Vascular endothelial growth factor activates MAP kinase and enhances collagen synthesis in human mesangial cells. *Kidney Int* 1999;56:2055–2063.
 69. deVries C, Escobedo JA, Ueno H, et al: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989–991.
 70. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, et al: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579–1586.
 71. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, et al: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835–846.
 72. Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G: Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1990;265:19461–19466.
 73. Herley MT, Yu Y, Whitney RG, et al: Characterization of the VEGF binding site on the Flt-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:731–738.
 74. Fuh G, Li B, Crowley C, et al: Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998;273:11197–11204.
 75. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, et al: Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1996;271:5638–5646.
 76. Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735–745.
 77. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG: Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999;274:31047–31054.
 78. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, et al: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988–26995.
 79. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, et al: Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9349–9354.
 80. Ortéga N, Hutchings H, Plouët J: Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci* 1999;4:D141–152.
 81. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62–66.
 82. Fong GH, Rossant J, Gertsentain M, et al: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66–70.
 83. Kendall RL, Thomas KA: Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10705–10709.
 84. He Y, Smith SK, Day KA, et al: Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (Flt-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 1999;13:537–545.
 85. Hornig C, Behn T, Bartsch W, et al: Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immunol Methods* 1999;226:169–177.
 86. Clark DE, Smith SK, He Y, et al: A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998;59:1540–1548.
 87. Banks RE, Forbes MA, Searles J, et al: Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Mol Hum Reprod* 1998;4:377–386.
 88. Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, et al: Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8795–8800.
 89. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, et al: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998;4:336–340.
 90. Inoue T, Kibata K, Suzuki M, et al: Identification of a vascular endothelial growth factor (VEGF) antagonist, sFlt-1, from a human hematopoietic cell line NALM-16. *FEBS Lett* 2000;469:14–18.
 91. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al: Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11709–11714.
 92. Park JE, Chen HH, Winer J, et al: Placenta growth factor. Potentiation of vascular growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;269:25646–25654.
 93. Kukkk EA, Lymboussaki S, Taira A, et al: VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122:3829–3837.
 94. Achen MG, Jeltsch M, Kukkk E, et al: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinase VEGF receptor 2 (FLK) and VEGF receptor 3 (Flt-4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:548–553.
 95. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al: Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997;16:3898–3911.
 96. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290–298.
 97. Cao Y, Linden P, Farnebo J, et al: Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14389–14394.
 98. Valtola R, Salven P, Heikkilä P, et al: VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancers. *Am J Pathol* 1999;154:1381–1390.
 99. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al: Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998;282:946–949.
 100. Stacker SA, Vitali A, Caesar C, et al: A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability. *J Biol Chem* 1999;274:34884–34892.
 101. Gale NW, Yancopoulos GD: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999;13:1055–1066.
 102. Suri C, Jones PF, Patan S, et al: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171–1180.
 103. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60.
 104. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604–4613.
 105. Gerber HP, Condorelli F, Park J, et al: Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997;272:23659–23667.
 106. Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, et al: Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997;14:2475–2483.
 107. Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527–543.
 108. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, et al: Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 1995;375:577–581.
 109. Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, et al: Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1996;56:2299–2301.
 110. Ohh M, Kaelin WG: The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new perspectives. *Mol Med Today* 1999;5:257–263.
 111. Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, et al: The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1997;272:27509–27512.

112. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP: Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995;55:6161-6165.
113. Cullinan-Bove K, Koos RD: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: Rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 1993;133:829-837.
114. Sato K, Yamazaki K, Shizume K, et al: Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Graves' immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J Clin Invest* 1995;96:1295-1302.
115. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, et al: Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 1996;120:944-947.
116. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME: On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *J Biol Chem* 1999;34:23969-23976.
117. Kronemann N, Bouloumi A, Bassus S, et al: Aggregating human platelets stimulate expression of vascular endothelial growth factor in cultured vascular smooth muscle cells through a synergistic effect of transforming growth factor- β 1 and platelet-derived growth factorAB. *Circulation* 1999;100:855-860.
118. Li J, Hampton T, Morgan JP, et al: Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest* 1997;100:18-24.
119. Gruden G, Thomas S, Burt D, et al: Mechanical stretch induces vascular permeability factor in human mesangial cells: Mechanisms of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12112-12116.
120. Chen KD, Li YS, Kim M, et al: Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem* 1999;274:18393-18400.
121. Gerber HP, McMurtry A, Kowalski J, et al: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway: Requirement for Flk-1/KD Ractivation. *JBiol Chem* 1998;273:30336-30343.
122. Tran J, Rak J, Sheehan C, et al: Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:781-788.
123. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999;154:375-384.
124. Murohara T, Asahara T, Silver M, et al: Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101:2567-2578.
125. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, et al: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998;97:99-107.
126. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, et al: Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer* 1999;81:845-850.
127. Abdulrauf SI, Edvardsen K, Ho KL, et al: Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers for survival in patients with low-grade astrocytoma. *J Neurosurg* 1998;88:513-520.
128. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, et al: Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 1999;155:1967-1976.
129. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, et al: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:977-981.
130. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, et al: Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1823-1829.
131. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al: Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999;80:309-313.
132. Salven P, Mäenpää H, Orpana A, et al: Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:647-651.
133. Kraft A, Weindel K, Ochs A, et al: Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 1999;85:178-187.
134. Fuhrmann-Benzakein E, Ma MN, Rubbia-Brandt L, et al: Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients. *Int J Cancer* 2000;85:40-45.
135. Kumar H, Heer K, Lee PWR, et al: Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1279-1285.
136. Zebrowski BK, Yano S, Liu W, et al: Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999;5:3364-3368.
137. Zebrowski BK, Liu W, Ramirez K, et al: Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol* 1999;6:373-378.
138. Hazelton D, Nicosia RF, Nicosia SV: Vascular endothelial growth factor levels in ovarian cyst fluid correlate with malignancy. *Clin Cancer Res* 1999;5:823-829.
139. Jones A, Crew J: Vascular endothelial growth factor and its correlation with superficial bladder cancer recurrence rates and stage progression. *Urol Clin North Am* 2000;27:191-197.
140. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al: Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77:956-964.
141. Günsilius E, Petzer A, Stockhammer G, et al: Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology* 2000;58:169-174.
142. Webb NJA, Bottomley MJ, Watson CJ, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: Implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Colch)* 1998;94:395-404.
143. Rodriguez CR, Fei DT, Keyt B, et al: A sensitive fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay that measures vascular endothelial growth factor165 in human plasma. *J Immunol Methods* 1998;219:45-55.
144. Salven P, Orpana A, Joensuu H: Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999;5:487-491.
145. Wynendaele W, Derua R, Hoylaerts MF, et al: Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: A key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol* 1999;10:965-971.
146. Günsilius E, Gastl G: Platelets and VEGF blood levels in cancer patients [letter]. *Br J Cancer* 1999;81:184-186.
147. Woessner RD, Wright PS, Loudy DE, et al: Microautoradiographic quantitation of vascular endothelial growth factor mRNA levels in human prostate specimens containing normal and neoplastic epithelium. *Exp Mol Pathol* 1998;65:37-52.
148. Tricarico C, Salvadori B, Villari D, et al: Quantitative RT-PCR assay for VEGF mRNA in human tumors in the kidney. *Int J Biol Markers* 1999;14:247-250.
149. Renner W, Pilger E: Simultaneous in vivo quantitation of vascular endothelial growth factor mRNA splice variants. *J Vasc Res* 1999;36:133-138.

From the Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA.

Corrispondenza e richiesta di estratti a: Shirley I. Stiver MD, PhD, Department of Pathology, Research North, Beth Israel Deaconess Medical Center, 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215.

E-mail: sstiver@caregroup.harvard.edu