

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE
CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA E SERVIZI PER LA
BIOLOGIA DELLA RIGENERAZIONE

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

CONFRONTO STRUTTURALE E STUDIO DELL'ATTIVITÀ
BIOLOGICA DI ANGIOGENINA E LACTOGENINA PER POSSIBILI
APPLICAZIONI DI TERAPIA MEDICA E INGEGNERIA TISSUTALE

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Supervisore: Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottoranda: MARIA LETIZIA FINEZZO

A mio marito Yari

"E se avessi il dono della profezia e conoscessi tutti i misteri e tutta la scienza,
e possedessi la pienezza della fede così da trasportare le montagne,
ma non avessi la carità, non sono nulla."
(S.Paolo 1Co 13,2)

INDICE

ABBREVIAZIONI	pag. 1
RIASSUNTO	pag. 3
ABSTRACT	pag. 5
1. INTRODUZIONE	pag. 7
1.1. La famiglia delle ribonucleasi	pag. 7
1.2. Ribonuclease A	pag. 8
1.3. Angiogenina	pag. 11
1.4. Lactogenina	pag. 15
1.5. Azione citotossica delle Ribonucleasi	pag. 16
1.6. Angiogenesi	pag. 17
1.7. Ingegneria dei tessuti e angiogenesi	pag. 19
2. PARTE SPERIMENTALE	pag. 21
2.1. Isolamento e purificazione delle proteine	pag. 21
2.1.1. Isolamento delle proteine da latte vaccino fresco	pag. 21
2.1.2. Purificazione delle proteine	pag. 21
2.3. Analisi spettroscopiche	pag. 24
2.3.1. Spettroscopia di assorbimento UV	pag. 24
2.3.2. Determinazioni tramite spettroscopia in fluorescenza	pag. 25
2.3.3. Analisi di dicroismo circolare	pag. 25
2.4. Proteolisi di Angiogenina con tripsina immobilizzata su Sepharose-4B	pag. 26
2.4.1. Preparazione dei peptidi 103-124 e 56-61 dal peptide triptico n°9	pag. 26
2.5. Saggio di attività ribonucleolitica	pag. 27
2.6. Preparazione di soluzioni delle proteine e dei peptidi	pag. 28
2.7. Colture cellulari	pag. 28
2.7.1.1. Estrazione di cellule endoteliali da vena di cordone ombelicale	pag. 29
2.7.1.2. Caratterizzazione fenotipica delle colture primarie di cellule HUVEC	pag. 30

2.7.2. Colture di linee cellulari	pag. 31
2.7.3. Isolamento e coltura di preadipociti umani	pag. 31
2.8. Valutazione dell'effetto citotossico su colture cellulari	pag. 32
2.8.1. Valutazione della vitalità cellulare	pag. 32
2.8.2. Valutazione della necrosi	pag. 33
2.8.3. Valutazione dell'apoptosi	pag. 35
2.9. Valutazione della proliferazione cellulare	pag. 36
2.10. Saggio di angiogenesi <i>in vitro</i> su Matrigel	pag. 37
2.11. Saggio di migrazione cellulare	pag. 38
2.12. Saggio di invasione	pag. 39
2.13. Saggio di angiogenesi <i>in vivo</i> su membrana corionallantoidea di pollo (CAM)	pag. 40
2.14. Sistemi di coltura tridimensionale	pag. 40
2.14.1.1. Preparazione della matrice di policaprolattone	pag. 41
2.14.1.2. Semina di cellule HUVEC su PLC, studio di adesione e vitalità cellulare	pag. 41
2.14.1.3. Analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione e analisi istologica.	pag. 42
2.14.2.1. Sistema di coltura tridimensionale in Puramatrix	pag. 43
2.14.2.2. Saggio di vitalità cellulare	pag. 43
2.15. Valutazione della citotossicità su colture cellulari non endoteliali	pag. 44
2.16. Analisi computazionale dell'interazione angiogenina bovina –inibitore RNase	pag. 44
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 45
3.1 Isolamento e purificazione delle proteine da latte vaccino	pag. 45
3.2. Determinazione del peso molecolare tramite spettrometria di massa ESI-TOF	pag. 47
3.3. Analisi Spettroscopiche	pag. 51
3.3.1. Spettri di assorbimento UV	pag. 51
3.3.2. Spettri in emissione di fluorescenza	pag. 53
3.3.4. Spettri di Dicroismo Circolare	pag. 55

3.4.1. Frammentazione dell' Angiogenina con tripsina immobilizzata su Sepharose-4B	pag. 58
3.4.2. Preparazione dl peptide RCM-I e RCM-II	pag. 59
3.5. Saggio di attività ribonucleolitica e valutazione di di k_{cat}/K_M relativamente ai substrati CpG e UpG	pag. 60
3.6.1. Estrazione e coltura di cellule endoteliali da vena di cordone ombelicale umano	pag. 61
3.6.2. Caratterizzazione fenotipica delle colture primarie di cellule HUVEC	pag. 62
3.6.2. Isolamento e caratterizzazione di preadipociti umani	pag. 63
3.7. Studio dell'effetto citotossico su colture di cellule HUVEC	pag. 63
3.7.1. Saggio di vitalità cellulare MTS	pag. 63
3.7.2. Analisi dell'induzione di apoptosi e necrosi	pag. 67
3.8. Valutazione della proliferazione cellulare	pag. 69
3.9. Saggio di angiogenesi <i>in vitro</i> su Matrigel	pag. 72
3.10. Saggio di migrazione e invasione cellulare	pag. 78
3.11. Saggio di angiogenesi <i>in vivo</i> su membrana corionallantoidea di pollo (CAM)	pag. 81
3.12. Sistemi di coltura tridimensionale	pag. 81
3.12.1. Colture di cellule HUVEC su supporti di PC.	pag. 83
3.12.2. Colture di cellule HUVEC incapsulate in Puramatrix	pag. 87
3.13. Valutazione dell'effetto citotossico delle proteine su colture non endoteliali	pag. 89
3.13.1. Citotossicità su cellule di linea tumorali	pag. 89
3.13.2. Citotossicità su pre-adipociti umani.	pag. 93
3.14. Analisi computazionale dell'interazione angiogenina bovina –inibitore RNase	pag.95
4. CONCLUSIONI	pag. 99
BIBLIOGRAFIA	pag.103

ABBREVIAZIONI

Da	Dalton
°C	Grado Celsius
API	“Atmospheric pressure Ionization” Ionizzazione a pressione atmosferica
APS	Antibiotico Penicillina Streptomina
bANG	Angiogenina bovina
BrdU	Bromodeossiridina
CAM	Membrana corionallantoidea
CD	Dicroismo circolare
cell	cellule
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
EDTA	Acido etilendiamminotetracetico
ESI	“Electron Spray Ionization”
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
hANG	Angiogenina umana
K_i	Costante di inibizione
λ	lunghezza d’onda
LG	Low Glucose
MeCN	Acetonitrile
m/z	rapporto massa su carica
NaP	Tampone sodio-fosfato
PBS	Phosphate buffer solution Soluzione salino fosfato tamponata
PCL	Policaprolattone
pI	Punto isoelettrico
PM	Peso Molecolare
Pz	pozzetto
RI	Inibitore della Ribonuclease
RP-HPLC	“Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography” Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa
Rpm	“Rounds per minute” giri al minuto

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Room Temperature, temperatura ambiente
SEM	“ Scannig Electron Microscope” Microscopia Elettronica a Scansione
TFA	Acido trifluoroacetico
TOF	“Time of Flight” Tempo di volo
UV	Ultravioletto

ABBREVIAZIONI DEGLI AMMINOACIDI

Amminoacido	Codice a tre lettere	Codice monolettera
Acido aspartico	ASP	D
Acido glutammico	GLU	E
Alanina	ALA	A
Arginina	ARG	R
Asparagina	ASN	N
Cisteina	CYS	C
Fenilalanina	PHE	F
Glicina	GLY	G
Glutamina	GLN	Q
Isoleucina	ILE	I
Istidina	HIS	H
Leucina	LEU	L
Lisina	LYS	K
Metionina	MET	M
Prolina	PRO	P
Serina	SER	S
Triptofano	TRP	W
Tirosina	TYR	Y
Treonina	THR	T
Valina	VAL	V

RIASSUNTO

Le ribonucleasi (RNasi) appartengono ad una famiglia di proteine implicate in molti processi biologici e contraddistinta dalla capacità di idrolizzare l'acido ribonucleico. L'oggetto di questo lavoro è stata la caratterizzazione strutturale e funzionale di tre proteine isolate dal latte vaccino e denominate RNase A, Angiogenina (bANG) e Lactogenina. RNase A è la più conosciuta e ampiamente studiata delle tre proteine; è caratterizzata da un'elevata attività enzimatica ma da una scarsa azione citotossica. L'Angiogenina bovina è un polipeptide che stimola l'angiogenesi, dotata di una scarsa attività ribonucleolitica, che però si è rivelata essere necessaria, seppur non sufficiente, per indurre la neoformazione di vasi sanguinei. Le informazioni circa la terza proteina, denominata anche RNase BL4, risultano essere molto limitate. In questo studio è stata esaminata la relazione tra la struttura molecolare e l'attività biologica delle proteine attraverso misure spettroscopiche, analisi dell'attività enzimatica e studio dell'effetto su colture cellulari endoteliali e tumorali.

Le tre ribonucleasi in esame presentano una elevata omologia di sequenza primaria. Anche l'architettura dei ponti disolfuro rimane conservata, ad eccezione della mancanza del quarto ponte disolfuro in bANG, e della presenza di un residuo di pirogluttanico all'N-terminale della Lactogenina. La RNase A risulta essere la più attiva nell'idrolisi di substrati dinucleotidici quali CpG e UpG. La Lactogenina presenta una specificità di substrato rispetto a bANG, prediligendo UpG invece che CpG.

Per poter andare a valutare quale porzione dell'Angiogenina sia maggiormente coinvolta nell'attività biologica, la proteina è stata sottoposta a digestione enzimatica con tripsina e vari frammenti ottenuti sono stati purificati e caratterizzati singolarmente.

bANG promuove la proliferazione di cellule HUVEC e la loro organizzazione in strutture capillari simili nel saggio di angiogenesi *in vitro* su Matrigel. La proliferazione cellulare viene promossa dai peptidi N-terminale (1-6) e 56-61 mentre è inibita da quello C-terminale 103-124. Tutti i frammenti appena menzionati promuovono, da parte delle cellule endoteliali, la formazione di strutture ramificate su Matrigel. L'azione della Lactogenina è paragonabile a quella di bANG, anche se meno intensa, mentre RNase A non stimola in modo significativo né la proliferazione né l'organizzazione in strutture capillari-simili su Matrigel. Angiogenina e Lactogenina favoriscono la migrazione di

colture di cellule endoteliali e la neovascolarizzazione nella membrana corionallantoidea di pollo..

L'Angiogenina e il suo peptide N-terminale promuovono l'adesione di cellule endoteliali HUVEC seminate su uno *scaffold* polimerico quale il policaprolattone.

Tutte e tre le proteine sono state valutate per le loro potenzialità citotossiche su colture di cellule di linea tumorali. L'Angiogenina risulta essere la più attiva fra le tre proteine ed induce la morte cellulare delle cellule tumorali attivando meccanismi pro-apoptotici.

La maggiore citotossicità di bANG rispetto a RNase A, potrebbe essere spiegata con una minore interazione con l'inibitore della ribonucleasi (RI). Questa ipotesi è stata esaminata andando a modellare la struttura di bANG con quella dell'Angiogenina umana in complesso con hRI, sulla base del presupposto che la conformazione della proteina nel complesso non vari rispetto alla forma libera. Numerosi dei contatti esistenti tra hANG e hRI non trovano corrispondenza in bANG. Uno dei principali siti di ancoraggio del hRI a hANG è rappresentato dal residuo Pro 88 dell'Angiogenina che viene accolto in una tasca idrofobica dell'inibitore costituita da tre residui di triptofano. In bANG tale residuo è sostituito da una serina, amminoacido idrofilico e non bloccato dal punto di vista conformazionale, che altererebbe in modo significativo l'interazione enzima-inibitore. In futuro questa ipotesi, interessante ma pur sempre teorica, dovrà essere avvalorata da studi di *binding* tra bANG e hRI.

ABSTRACT

Ribonucleases (RNases) are proteins involved into many biological processes and hydrolysis of ribonucleic acid. The topic of this study has been the structural and functional characterization of three bovine proteins, namely RNase-A, Angiogenin-1 (bANG) and Lactogenin. The enzymatic, pro-angiogenic and cytotoxic activity has been evaluated. RNase-A is the best known protein showing a strong ribonucleolytic activity and a low cytotoxic action.

bANG is a single-chain polypeptide stimulating angiogenesis; it has a weak ribonucleolytic activity necessary, but not sufficient, to induce the neoformation of blood vessels.

Lactogenin, also named RNase BL-4, has been relatively poorly studied. In this study the relationship between molecular structure and biological activity of the three RNases has been evaluated by spectroscopy, ribonucleolytic activity analysis and, finally, by their effects on the viability of human endothelial or cancerous cellular cultures.

High homology level of primary structure is resulted for all three under study proteins. Moreover, disulfide architecture is preserved except the missing of one bridge in bANG and the presence of a pyroglutamic residue at the N-terminus of Lactogenin. It is known that RNase-A is far more active in cleaving dinucleotide substrates as CpG and UpG in comparison with Lactogenin and bANG. On the other hand, Lactogenin presents a higher specificity for UpG instead of CpG than bANG. Angiogenin has been treated with immobilized trypsin in order to obtain its tryptic peptides and identify which part of protein is more involved into biological activity.

The research study has shown that bANG stimulates the proliferation and capillary-like structures formation of Huvec endothelial cells in Matrigel in vitro angiogenic assay. The fragment 1-6 (N-terminal, termed P1) and the fragment 56-61 have stimulated a cellular proliferation response comparable to the native protein's one while the C-terminal fragment 103-124 has exhibited an inhibition effect. Moreover, in the presence of all the fragments P1, 56-61 and C-terminal the cells have demonstrated branch points formation, after seeding on Matrigel. The activity of Lactogenin has been comparable to the one of bANG, even if less strong, while RNase-A have not stimulated HUVEC cells' proliferation or differentiation on Matrigel. Angiogenin and Lactogenin

have been shown to promote the migration of cultured endothelial cells and the neovascularization in the chicken chorioallantoic membrane.

The attachment and growth of HUVEC cells on synthetic materials such as polycaprolactone scaffolds seem to be improved by the addition of Angiogenin and its N-terminal fragment to the culture medium.

The cytotoxic properties of RNase-A, bANG and Lactogenin have been evaluated by using some tumor cell lines. bANG has expressed a stronger cytotoxic potential, inducing cell death by an apoptotic mechanism.

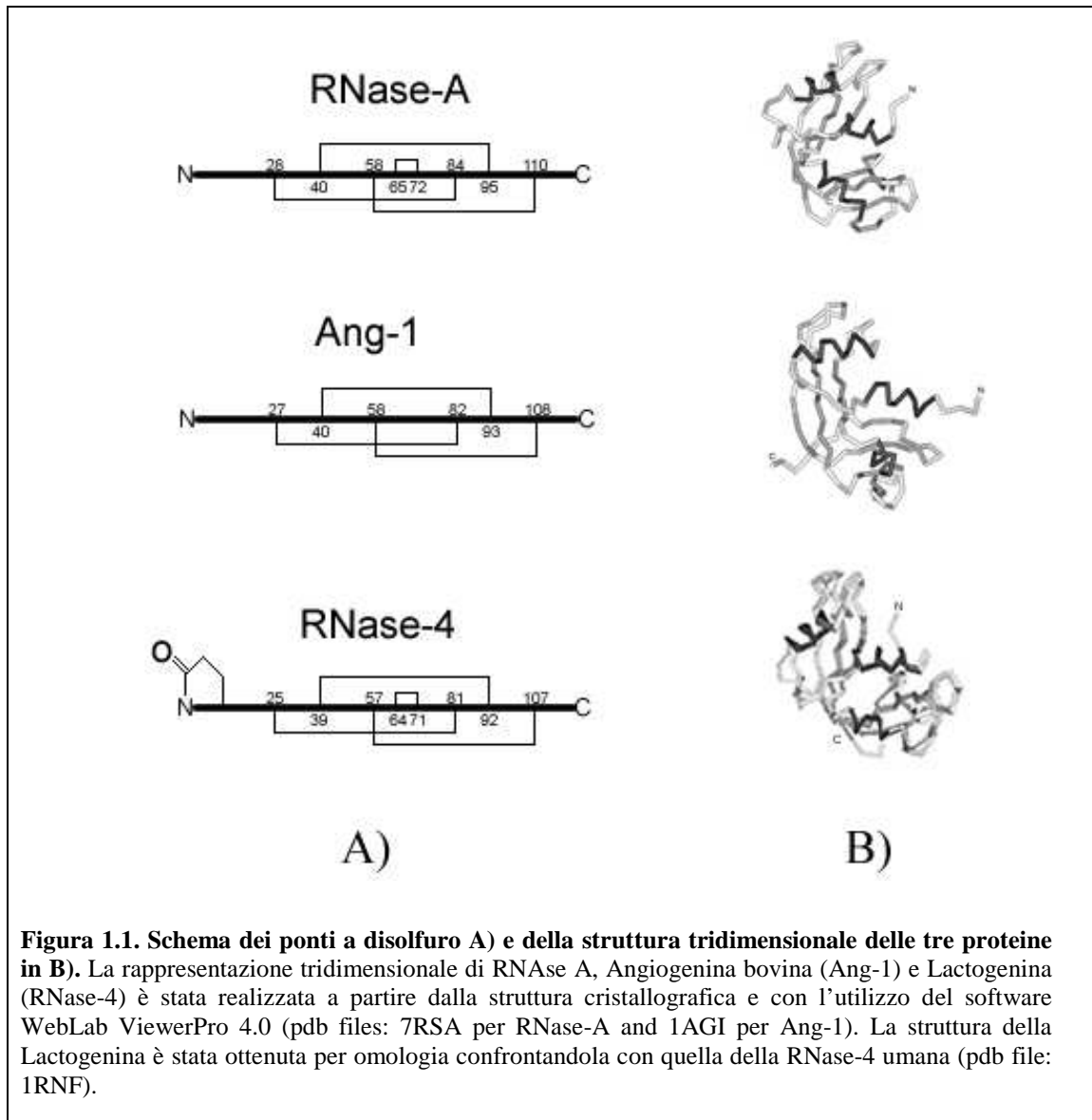
In comparison with RNase A, the major cytotoxicity of bANG could be explained as a minor interaction with the RNase inhibitor (RI). This hypothesis has been verified modelling bANG structure on the complex human Angiogenin-hRI, as the protein conformation is not so different in the complex from the free form. Many different contacts with hRI have been observed in hANG and bANG. One of the principal anchorage sites of hRI to hANG is resulted the Pro 88 residue, which lies within a hydrophobic pocket defined by three tryptophan residues of hRI. In bANG, the replacing of Pro88, with Ser89 causes a steric and electrostatic strain in the inhibitor enzymatic complex, decreasing the susceptibility of bANG to the inactivation by RI. Further studies will clarify the binding of bANG to hRI by calculating the inhibition constant.

1. INTRODUZIONE

1.1. La famiglia delle ribonucleasi.

Le ribonucleasi, comunemente abbreviate con RNase, sono degli enzimi che catalizzano il taglio del RNA. Si classificano in endoribonucleasi e esoribonucleasi. L'interesse verso le ribonucleasi è stato rinnovato in seguito alla dimostrazione che alcune di queste proteine erano più che enzimi digestivi. Ad esempio la ribonucleasi seminale bovina, composta da due unità identiche unite da un ponte a disolfuro, ha attività immunosoppressive, embriotossiche, aspermatogeniche e antitumorali (Kim *et al.*, 1995). L'Angiogenina è una proteina con attività ribonucleolitica, seppur debole, che favorisce l'angiogenesi, cioè la crescita di nuovi vasi sanguigni (Vallee *et al.*, 1993). La proteina cationica eosinofila umana è una ribonucleasi con probabile funzione di difesa contro agenti patogeni (Rosenberg¹ *et al.*, 2001). La ribonuclease H è presente in numerosi organismi e provvede alla degradazione selettiva di ibridi RNA/DNA, e in tal senso è importante anche nella replicazione virale (Rausch *et al.*, 2000). La ribonuclease P è un ribozima, cioè oltre alla porzione proteica contiene anche dell'acido ribonucleico, ed ha la funzione di rimuovere il segmento "leader" dal lato 5' del precursore dei tRNA in tutti gli organismi (Thomas *et al.*, 2000). Sono state isolate molte ribonucleasi da anfibi, ad esempio dalla rana, toro *Rana catesbeiana* (Rosenberg² *et al.*, 2001), e dalla rana leopardo, *Rana pipiens* (Liao *et al.*, 2003). In particolare dalle uova della rana leopardo è stata estratta una ribonucleasi, chiamata Onconase, attualmente in sperimentazione clinica, negli Stati Uniti, come agente antitumorale.

Oggetto di studio in questo lavoro sono due proteine, Angiogenina e Lactogenina, appartenenti alla famiglia delle ribonucleasi e isolate da una fonte facilmente accessibile quale il latte vaccino. L'attività biologica della prima, l'Angiogenina, è stata particolarmente studiata nell'omologa proteina umana mentre pochi sono gli studi inerenti alla proteina bovina. Attualmente mancano in letteratura studi sull'attività biologica della Lactogenina. La struttura e la funzione di queste due proteine è stata paragonata a quella della Ribonuclease A, una proteina modello, ben nota in letteratura. In Figura 1.1. sono riportate delle raffigurazioni schematiche delle strutture tridimensionali delle tre proteine.



Le tre proteine presentano una buona omologia di sequenza, come riportato nel file di allineamento di struttura primaria in Figura 1.2.

1.2. Ribonuclease A.

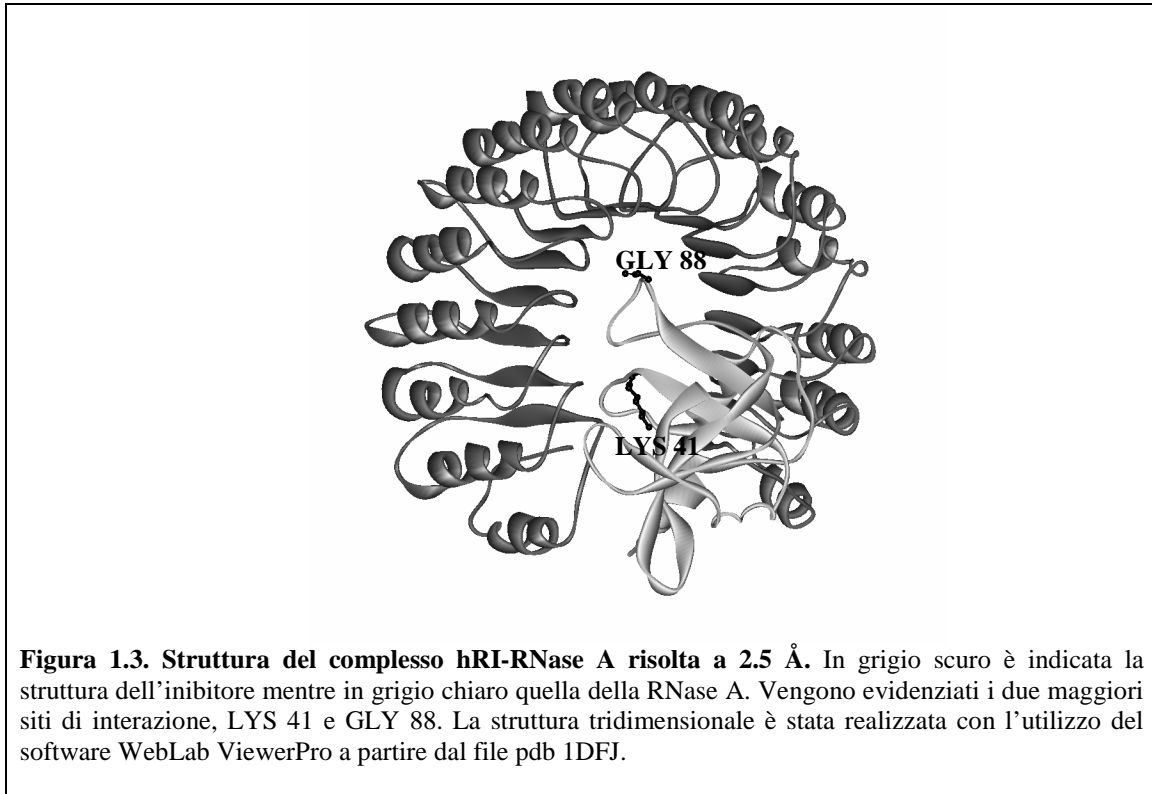
La ribonucleasi del pancreas bovino (o RNase A) è una endonucleasi in grado di scindere l'acido ribonucleico attraverso un meccanismo di transfosforilazione e idrolisi. È stata ampiamente studiata in passato come proteina modello, sia a causa della sua abbondanza in una fonte facilmente reperibile quale il pancreas bovino, sia grazie alla facilità di purificazione e alle piccole dimensioni molecolari (circa 14 kDa). La RNase-A è il primo enzima ribonucleolitico del quale è stata determinata la sequenza (Smyth *et*

Il sito attivo, responsabile dell'attività enzimatica, coinvolge tre amminoacidi: HIS 12, LYS 41 e HIS119, responsabili dell'idrolisi del legame P-O^{5'} del terzo sito del nucleoside pirimidinico dell'RNA. Si tratta di uno dei più efficienti processi catalitici identificati fino ad oggi. Il residuo di HIS 12 funge da base, rimuovendo un protone all'ossidrile in 2' del ribosio e facilitando allo stesso tempo l'attacco del fosforo per formare uno stato di transizione pentavalente. Tale stato di transizione è poco stabile e dà luogo ad un fosfato 2'-3' ciclico favorito dalla presenza del residuo di HIS-119 che funge da acido donando un protone al gruppo uscente

Esiste un inibitore naturale della RNase A, che ne regola la funzione, denominato Inibitore Ribonucleasico (RI). E' una proteina citosolica di circa 50 kDa, secreta dalle cellule, che costituisce lo 0.1%-0.1% del contenuto proteico citosolico nelle cellule di mammifero (Naddeo *et al.*, 2005). RI umano, hRI, presenta 32 residui di cisteina e 15 sequenze ricche di leucine ripetute, che si organizzano per formare una struttura a ferro di cavallo. Per essere attivo, RI richiede un ambiente riducente, come il citosol, perchè se ossidato perde la sua capacità di legare RNase A e viene quindi rapidamente degradato dalle proteasi cellulari. RI forma un complesso non covalente 1:1 con RNase A con una K_I del complesso 4.4x10⁻¹⁴ M. I quattro ponti a disolfuro della ribonucleasi ed i 32 residui di cisteina ridotta del RI rimangono inalterati nel complesso. Il ruolo biologico di RI non è ancora stato rigorosamente definito: dato che tutti i ligandi per RI finora scoperti sono RNase secrete dalle cellule si suppone che RI funga da protettore per la cellula contro ribonucleasi inavvertitamente internalizzate dalle cellule.

La struttura del complesso hRI-RNase A, rappresentata nella Figura 1.3, suggerisce quali siano i siti essenziali di interazione di queste proteine. Uno di essi è costituito dalla GLY 88, che va ad inserirsi in una tasca idrofobica del RI, definita da tre residui di triptofano; la sostituzione della GLY 88 con un residuo di arginina determina uno sconvolgimento elettrostatico del complesso enzima-inibitore, riducendo la predisposizione dell'RNase A alla disattivazione esercitata dall'RI (Leland P. *et al.*, 1998). Un secondo sito di interazione del complesso hRI-RNase A è costituito dalla LYS 41, che va ad interagire con TYR 430 e ASP 431 dell'RI tramite legami a idrogeno; anche la sostituzione di LYS 41 con un altro residuo determina riduzione dell'inibizione da parte del RI ed aumento di citotossicità di RNase A sostituita. La citotossicità di RNase A e di altre ribonucleasi dipende dalla loro attività

ribonucleolitica che può causare la degradazione del RNA intracellulare nelle sue varie forme. L'inibitore delle ribonucleasi gioca un ruolo integrante nel permettere o bloccare questa citotossicità.



1.3. Angiogenina.

L'Angiogenina è una proteina appartenente alla famiglia delle ribonucleasi e presente in differenti specie animali. L'Angiogenina umana fu inizialmente isolata dal mezzo di coltura di cellule (HT-29) di adenocarcinoma del colon (Vallee *et al.*, 1985) e successivamente anche dal siero di pazienti sani (Vallee *et al.*, 1987) dove è presente ad una concentrazione 10^{-8} M circa. La proteina vaccina fu isolata per la prima volta da Vallee (Bond e Vallee, 1988) che la ottennero da siero bovino. Nel latte si trova ad una concentrazione di qualche milligrammo per litro e la metodica di purificazione è stata messa a punto da Ng (Ng *et al.*, 1999). Presenta una modesta attività ribonucleolitica e fra i fattori angiogenici finora conosciuti è l'unica ad essere in grado di degradare l'acido ribonucleico. E' un proteina basica (pI 9.5) con un peso molecolare di circa 14 kDa. A differenza della RNase A presenta 3 ponti a disolfuro anziché 4, che sono comunque in grado di garantire alla molecola l'alta resistenza alle deformazioni

meccaniche e ai bassi valori di pH. Al momento sono state identificate 4 isoforme di Angiogenina e fra quelle isolate da latte vaccino, il polipeptide costituito da 125 amminoacidi, con un peso molecolare di circa 14.5 kDa e denominato ANG-1, o bANG, è il più rappresentato.

La sequenza amminoacidica dell'Angiogenina bovina (Bond and Strydom, 1989), è riportata in Tabella 1.2. La proteina è costituita da una singola catena polipeptidica di 125 amminoacidi, con un'omologia di sequenza primaria con la proteina umana del 64%. Sei residui di cisteina (27-82, 40-93 e 58-108) formano tre ponti a disolfuro. L'Angiogenina bovina presenta il 34% di omologia con RNase A conservando i tre residui del sito catalitico che sono: HIS 14, LYS 41, HIS 115. Tuttavia, pur conservando questi tre residui amminoacidici, l'Angiogenina, sia umana che bovina, presenta una attività ribonucleolitica di 5-6 ordini di grandezza inferiore a quella della RNase A. La principale differenza con RNase A risiede nel 4° ponte a disolfuro (CYS 65—CYS 72) che è assente nell'Angiogenina. Inserendo nella sequenza primaria di ANG-1 la porzione della ribonucleasi contenente il 4° ponte a disolfuro, si ottiene una proteina con un'elevata attività ribonucleolitica ma che ha perso l'attività angiogenica (Harper e Vallee, 1989). Questa diversità suggerisce che tale regione potrebbe fornire una possibile spiegazione della differente funzione biologica delle due proteine.

AQDDYRYIHF	LTQH Y DAKPK	GRNDEYCFNM	MKNRRLTRPC
K DRNTFIHGN	KNDIKAICED	RNGQPYRGDL	RISKSEFQIT
ICKHKGGSSR	PPCRYGATED	SRVIVVGCEN	GLPV H FDESF
ITPRH			

Tabella 1.2. Struttura primaria dell'Angiogenina bovina ANG-1 La molecola è formata da 125 e amminoacidi e presenta 3 ponti a disolfuro. Sono riportati in grassetto i residui implicati nel sito attivo.

ANG-1 è in grado di idrolizzare RNA ribosomiale 28S e 18S (Shapiro *et al.*, 1986). L'attività endonucleolitica risulta essere evidente, ma a differenza della RNase pancreatica, ANG-1 produce dei grandi frammenti costituiti da 100 a 500 nucleotidi, indicando quindi un'idrolisi limitata del substrato. Grazie a tale attività e all'idrolisi del tRNA (Lee *et al.*, 1989) l'Angiogenina inibisce la sintesi proteica esercitando un effetto citotossico il cui ruolo fisiologico non è stato ancora compreso.

L'attività ribonucleolitica dell'Angiogenina, seppur modesta, è necessaria ma non sufficiente, per promuovere la neovascolarizzazione. Esperimenti di mutagenesi sito-specifica hanno dimostrato che HIS-14, LYS-41 e HYS-115 sono necessari per l'attività enzimatica dell'Angiogenina e anche per quella angiogenica. Mutanti in HYS-14 o HYS-115 perdono sia l'attività angiogenica che quella enzimatica. Tale inibizione è probabilmente dovuta al legame del mutante con il possibile recettore dell'Angiogenina o con un altro *target* cellulare. Queste due attività possono essere separate come accade nella forma mutata di Angiogenina umana chiamata ANG-E, che presenta il taglio del legame peptidico tra i residui GLU 67-ASN 68 (Shapiro *et al.*, 1991). ANG-E mantiene l'attività ribonucleolitica ma non quella angiogenica. Un altro derivato, denominato ANG-K, ottenuto dopo trattamento con Endoproteasi Lys-C che taglia il legame peptidico tra LYS 60 e ASN 61, mostra simili proprietà. In entrambi i casi il taglio avviene entro la regione che è mancante del quarto ponte disolfuro presente in RNase A e questo suggerisce che appunto tale regione sia responsabile del legame dell'Angiogenina al recettore cellulare.

L'attività biologica dell'Angiogenina è mediata dall'interazione con un recettore cellulare, non ancora identificato in maniera univoca, ma la cui presenza viene dimostrata dalle seguenti evidenze sperimentali:

- ✓ effetti in vitro dell'Angiogenina sulle cellule endoteliali
- ✓ attivazione della fosfolipase C e A2
- ✓ alta affinità e specificità di legame con le cellule endoteliali
- ✓ isolamento di una proteina di superficie delle cellule endoteliali che lega l'Angiogenina
- ✓ capacità di alcuni mutanti dell'angiogenina, che mancano di attività enzimatica, di inibire l'attività angiogenica, per cui il sito di legame per il recettore è almeno in parte isolato dal sito catalitico.

Il meccanismo d'azione con cui agisce l'Angiogenina non è ancora stato completamente delucidato.

ANG-1 attiva nelle cellule endoteliali una cascata di segnali che portano alla formazione di secondi messaggeri. L'attivazione delle fosfolipasi aumenta la concentrazione del diacilglicerolo nelle cellule seguita dall'attivazione di proteine chinasi C diacilglicerolo dipendenti che a loro volta fosforilano proteine regolatorie

tuttora sconosciute (Bicknell e Vallee, 1998). La risposta cellulare all'Angiogenina dipende sia dalla presenza di recettori di membrana per l'enzima, sia dalle loro caratteristiche di legame. In particolare si registra un'elevata affinità ligando-recettore quando vi è una bassa densità cellulare, vice versa si ha una scarsa affinità quando la popolazione cellulare aumenta. Qualora le cellule endoteliali siano in stretto contatto fra di loro, la loro superficie si ricopre di actina che è in grado di legare ANG-1 ma non di favorirne l'internalizzazione (Vallee *et al.*, 1993). Il recettore per l'Angiogenina è una proteina di circa 170 kDa. Il complesso Angiogenina-recettore viene quindi endocitato, traslocato verso il nucleo e accumulato nel nucleolo dove regola la biogenesi di RNA (K.Kishimoto *et al.* 2005, Hu G. *et al.*, 2000). Dopo essere stata traslocata nel nucleo, l'Angiogenina stimola la proliferazione, la migrazione e l'invasione da parte delle cellule endoteliali. In Figura 1.4 è rappresentato uno schema riassuntivo del possibile meccanismo cellulare con cui opera l'Angiogenina.

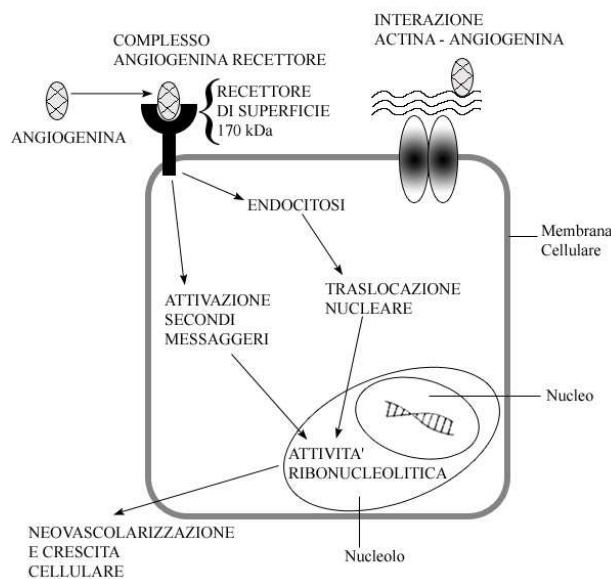


Figura 1.8. Meccanismo d'azione proposto per l'Angiogenina.

L'Angiogenina umana non risulta essere citotossica sulle cellule di mammifero perché, come per la Ribonuclease A, viene inibita dal hRI, con il quale forma un complesso stabile, risolto nella struttura tridimensionale da Papageorgiou nel 1997. Non si riscontrano articoli in letteratura circa l'interazione di hRI con ANG-1.

1.4. Lactogenina.

Assieme all'Angiogenina, in questo lavoro è stata purificata una proteina finora poco studiata, denominata *lactogenin*. Questa proteina è stata isolata, per la prima volta, dal latte bovino, da Ng e colleghi nel 1999. Nel loro lavoro, gli autori evidenziano che la peculiarità di questa proteina risiede nella sua attività ribonucleolitica sul substrato tRNA. Dalle fonti disponibili in letteratura si ricava che la proteina presenta un peso molecolare di circa 17 kDa (X.Y.Ye *et al.*, 1999 e Ng *et al.*, 2000). Dagli studi di frammentazione e analisi in spettrometria di massa, condotti presso il nostro laboratorio è emerso che la Lactogenina è identica ad un'altra proteina già isolata da fegato bovino e denominata RNase-4 (Hosoya *et al.*, 1990).

La struttura primaria della Lactogenina è riportata nella Tabella 1.3. Di essa non è stata risolta la struttura tridimensionale: è nota però quella della RNase-4 umana altamente omologa con la proteina bovina. Una minore omologia di sequenza sussiste tra RNase A e RNase-4 mentre la topologia dei 4 ponti a disolfuro, presenti in entrambe le proteine, è ben conservata.

QDRMYQRFLR QHVDPDETGG NDSYCNLMMQ RRKMTSHQCK
 RFNTFIHEDL WNIRSICSTT NIQCKNGQMN CHEGVVRVTD
 CRETGSSRAP NCRYRAKAST RRVVIACEGN PEVPVHFDK

Tabella 1.3. Struttura primaria della Lactogenina (Hosoya et al., 1990). Nella molecola sono presenti 119 amminoacidi di cui 3 tirosine, 1 triptofano e 8 cisteine che formano 4 ponti a disolfuro. La glutammina N-terminale forma un residuo di piroglutammico nella proteina matura. Il PM medio calcolato dalla struttura primaria corretta risulta 13887.7 Da. Sono riportati in grassetto i residui implicati nella catalisi.

La sequenza dei primi 36 aminoacidi N-terminali nella Lactogenina sembra essere omologa a quella della RNase A pancreatica; inoltre, entrambe inibiscono la migrazione di cellule libere nel lisato di corneociti di coniglio, ma in concentrazioni diverse: una soluzione 35.3 nM di Lactogenina inibisce il 91.1 % delle cellule, mentre una soluzione 1.16 nM di RNase A raggiunge il 96.5 %. Inoltre l'amminoacido N-terminale ciclizza per formare un residuo piroglutammico, in comune con quello della Onconase, che ne previene la degradazione e ne aumenta la stabilità. Non esistono informazioni sull'attività ribonucleolitica ma, da una prima analisi della sequenza

primaria, emerge che i tre residui appartenenti al sito catalitico delle RNase sono tutti conservati.

1.5. Azione citotossica delle Ribonucleasi.

Grazie alla loro capacità di poter scindere l'acido ribonucleico, le ribonucleasi sono in grado di provocare la morte cellulare e quindi possono essere considerate delle immunotossine. Quando una RNase esogena entra in una cellula, può essere in grado di provocarne la morte perché, degradando l'RNA, altera la biosintesi proteica e induce l'apoptosi. L'attività catalitica risulta quindi essere essenziale per la citotossicità di una RNase. Un mutante dell'Onconase, con i residui amminoacidici del sito catalitico alchilati, e quindi priva di attività enzimatica, manifesta il 2% della sua attività citotossica. Allo stesso modo però, proteine con una elevata attività ribonucleolitica, non sono citotossiche, per cui si può ritenere che l'attività enzimatica sia necessaria ma non sufficiente per determinare un effetto citotossico (Smith M.R. *et al.*, 2003).

Esiste inoltre una relazione ben definita tra stabilità dell'enzima e citotossicità. La citotossicità dell'Onconase è strettamente correlata alla sua stabilità e capacità di resistere alla degradazione proteolitica. La presenza di 4 ponti a disolfuro e di un residuo pirogluttamico all'N terminale aumentano questa stabilità.

Essendo citotossine esogene, le ribonucleasi devono essere internalizzate dalle cellule bersaglio (Leland *et al.*, 1998). Non sono ancora stati scoperti recettori specifici per le ribonucleasi perciò, grazie anche ad alcune evidenze sperimentali, si ritiene che le ribonucleasi entrino nella cellula per endocitosi. A differenza di molte tossine batteriche, che hanno campi catalitici e di translocazione distinti, la RNase A ed i suoi omologhi hanno un unico dominio catalitico, oltre a presentare una elevata carica ionica, e quindi una bassa lipofilia. In più, i ponti a disolfuro molecolari determinano una conformazione particolare della proteina, che le consente movimenti circolari. Questi legami a disolfuro devono restare intatti durante la traslocazione, affinché l'ambiente del citosol che si scompone progressivamente non ne provochi l'ossidazione (i legami disolfuro di RNase nativo sono inaccessibili per un solvente ed hanno una notevole stabilità cinetica in un ambiente che tende a scomporsi).

Nello studio dei sistemi cellulari, nei modelli animali e nei *tests* clinici effettuati sugli esseri umani, le ribonucleasi risultano essere più tossiche per le cellule cancerose

rispetto alle cellule sane (Makarov *et al.*, 2003). Resta sconosciuto il fondamento di questo indizio terapeutico favorevole. I cambiamenti apportati alla membrana plasmatica potrebbero aumentare la predisposizione delle cellule cancerose nei confronti delle ribonucleasi citotossiche. Le cellule maligne esprimono sulla superficie, della loro membrana plasmatica, molte glicorproteine e fosfolipidi acidi, conferendo alla superficie cellulare una carica negativa e favorendo l'interazione con proteine acide aventi un punto isoelettrico elevato. Sembra dimostrato che la variazione della carica netta di una ribonucleasi da negativa a positiva la renda più citotossica (Ilinskaja *et al.*, 2002).

Altra caratteristica che conferisce citotossicità ad una ribonuclease è l'evasione dall'interazione con RI. L'inibitore della ribonuclease si trova nel citosol delle cellule di mammifero e funge da sentinella per inattivare l'azione della RNase. La creazione di mutanti o la scoperta di nuove proteine che sappiano eludere l'interazione con l'inibitore, costituisce uno dei punti cardine su cui si basa la citotossicità di una ribonuclease.

Dopo essere stata internalizzata per endocitosi o traslocazione diretta, la RNase viene trasferita dall'endosoma all'apparato del Golgi e da qui al reticolo endoplasmatico. In alcuni casi è stata anche riscontrata una localizzazione nucleolare della RNase. A livello del citosol la ribonuclease idrolizza l'acido ribonucleico andando a compromettere la sintesi proteica e determinando la morte cellulare.

Le proteine oggetto di questo lavoro appartengono alla famiglia delle ribonucleasi. Precedenti studi hanno già dimostrato che Angiogenina umana e RNase A bovina possiedono scarse proprietà citotossiche (Chen *et al.*, 1997) mentre mancano dati inerenti a Lactogenina e bANG. Per questo motivo è stata valutata la loro citotossicità *in vitro* su cellule di linea tumorali isolate da tre differenti carcinomi: quello mammario, colon rettale e della cervice.

1.6. Angiogenesi.

La normale crescita di un tessuto, come accade nello sviluppo embrionale, nella guarigione e cicatrizzazione delle ferite e nel ciclo mestruale, è caratterizzata dalla formazione di nuovi vasi per il rifornimento di O₂ e sostanze nutrienti e per l'eliminazione dei residui metabolici. L'insieme dei fenomeni che danno origine alla formazione di nuovi vasi sanguinei, a partire da quelli preesistenti, viene denominato

angiogenesi. Gli stimoli angiogenici più comuni sono l'ipossia, l'ischemia, fattori meccanici e processi infiammatori. In risposta a tali segnali le cellule endoteliali, che rivestono un ruolo chiave nel fenomeno angiogenico, rispondono degradando la membrana basale, migrando verso la sorgente dello stimolo dove proliferano, si differenziano e maturano formando i nuovi capillari.

La formazione di un nuovo vaso sanguigno passa attraverso diversi stadi ben definiti, caratterizzati da modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare. Nella prima tappa dell'angiogenesi, in seguito a condizioni ipossiche e ischemiche, si ha un aumento della permeabilità vasale dei vasi già esistenti seguito dalla degradazione della membrana basale ad opera di proteasi secrete dalle stesse cellule endoteliali. In un secondo momento le cellule endoteliali invadono lo stroma adiacente e migrano verso il punto del tessuto, in cui è necessaria la formazione dei nuovi vasi, e qui iniziano a proliferare. Il terzo stadio corrisponde alla differenziazione delle cellule endoteliali con arresto della proliferazione cellulare e formazione di capillari primitivi. L'ultima tappa è caratterizzata dal reclutamento di cellule periendotheliali di supporto come periciti e cellule muscolari lisce e alla ricostituzione delle cellule endoteliali.

Esistono numerosi fattori che entrano in gioco nel processo angiogenico: tali molecole possono stimolare o inibire l'angiogenesi. In un soggetto adulto, la vascolarizzazione è generalmente in fase quiescente, e il ricambio delle cellule dei vasi sanguigni richiede anni. Tale processo è invece vitale nell'embriogenesi, nella crescita e nella rigenerazione tessutale durante la guarigione di una ferita. Quando l'equilibrio tra fattori pro o antiangiogenici viene alterato, l'organismo va incontro a varie patologie. Tra queste ultime si distinguono quelle caratterizzate da un deficit di attività angiogenica, come il danneggiamento di tessuti in seguito a ischemia o insufficienza cardiaca, e quelle contraddistinte da una eccessiva attività angiogenica come la psoriasi, le neoplasie, la retinopatia diabetica, l'artrite reumatoide, l'endometriosi e l'arteriosclerosi.

Negli animali le cellule endoteliali danno origine a nuovi capillari ogni qualora si crei la necessità. Si pensa che, quando le cellule nei tessuti sono private di ossigeno, rilascino fattori angiogenici che inducono la crescita di nuovi capillari. Probabilmente per questo motivo, quasi tutte le cellule dei vertebrati sono situate a non più di 50 μm da un capillare. In modo analogo, dopo una ferita, è stimolata un'esplosione di crescita di

capillari nelle vicinanze del tessuto danneggiato. Anche agenti locali irritanti e infezioni causano la proliferazione di nuovi capillari, la maggior parte dei quali regrediscono e scompaiono quando l'infiammazione scompare.

L'angiogenesi è anche coinvolta nella crescita tumorale. Lo sviluppo di una massa tumorale è legato all'approvvigionamento di O₂ e nutrienti per cui un tumore che non sia irrorato da vasi sanguigni, non può svilupparsi se non per pochi mm, perché deve dipendere dalle cellule attigue per la sopravvivenza. La formazione di nuovi vasi sanguigni è un importante processo per la progressione del tumore: favorisce la transizione da iperplasia a neoplasia, cioè il passaggio da uno stato di moltiplicazione cellulare ad uno stato di proliferazione incontrollata caratteristico delle cellule neoplastiche.

L'angiogenina umana è stata ben studiata per la sua proprietà di stimolare l'angiogenesi a cui deve appunto il nome. Per meglio caratterizzare l'effetto pro-angiogenico, sia in campo fisiologico che tumorale, si è deciso di isolare l'Angiogenina da una fonte facilmente accessibile, quale il latte vaccino, nel quale è presente in quantità dell'ordine dei mg/l. Data l'elevata omologia di sequenza, gli studi di angiogenesi sono stati condotti in parallelo anche sull'altra proteina isolata dal latte, la Lactogenina, e per confronto, sulla capostipite delle ribonucleasi, cioè la RNase A.

1.7. Ingegneria dei tessuti e angiogenesi.

Con il termine "ingegneria tissutale" si traduce l'espressione anglosassone "*tissue engineering*" coniata ufficialmente nel 1988 dal National Science Foundation a Lake Tahoe per indicare quel campo multidisciplinare che realizza sostituti biologici, contenenti cellule vive e funzionali, per la rigenerazione, il mantenimento o il miglioramento delle prestazioni dei tessuti (Langer *et al.*, 1993). L'ingegneria dei tessuti progetta organi e protesi andando a valutare l'interazione tra biomateriale e componente cellulare per favorire una rapida e efficace rigenerazione del tessuto originario. Il supporto deve perciò essere biocompatibile e biodegradabile.

In generale un costrutto di ingegneria dei tessuti è formato dalla componente cellulare, che producendo matrice extra-cellulare, favorisce l'interazione con il sito di impianto, e dalla struttura di base costituita da una componente artificiale, di tipo

polimerico, oppure una componete naturale che garantisce un supporto alle popolazioni cellulari di interesse.

Una delle principali limitazioni nella realizzazione dei costrutti, o *scaffold*, di ingegneria tissutale, è rappresentata dal trasporto di nutrienti e ossigeno alle cellule seminate sul supporto, che avviene prevalentemente per via diffusiva. La componente cellulare dello *scaffold*, anche in seguito ad un impianto, consuma velocemente le scorte di O₂ e nutrienti mentre il processo angiogenico richiede parecchi giorni per poter dar luogo ad un sistema vascolare efficiente.

Per far fronte a questa necessità si potrebbero realizzare degli *scaffolds* che siano in grado di rilasciare fattori di crescita che stimolino l'angiogenesi: in questo caso però si rischierebbe di ottenere una vascolarizzazione lenta e poco stabile. Un'altra soluzione potrebbe prevedere l'impiego di cellule staminali e progenitrici, che meglio sopravvivono in condizioni ipossiche; tuttavia l'impiego di cellule staminali in campo umano non è ancora stato regolamentato in maniera univoca. Un'alternativa, anche se molto ambiziosa, potrebbe essere quella di realizzare *in vitro* dei costrutti già vascolarizzati che consentano, al momento dell'impianto, di potersi integrare perfettamente con il sistema vascolare del ricevente.

In questo lavoro è stato valutato se le proteine isolate dal latte, Angiogenina, e il suo peptide N-terminale sono in grado di promuovere o meno l'adesione di cellule endoteliali su uno *scaffold*, e di promuovere la loro organizzazione in una struttura capillaro-simile.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1. Isolamento e purificazione delle proteine.

2.1.1. Isolamento delle proteine da latte vaccino fresco.

Angiogenina e Lactogenina sono state isolate da latte vaccino intero fresco mentre RNase A è stata acquistata da Sigma.

Un litro di latte, portato a temperatura ambiente (circa 20°C), viene acidificato con HCl 1 M (Carlo Erba), lentamente e sotto agitazione, fino al raggiungimento di un pH pari a 4.30 che causa la precipitazione delle caseine. Queste ultime vengono separate mediante filtrazione su filtro Büchner dotato di doppio filtro di carta. Il siero acido ottenuto viene neutralizzato con NaOH 1 M (Carlo Erba).

Si esegue una prima salatura per aggiunta, lenta e sotto agitazione, di ammonio solfato (Carlo Erba) fino ad una concentrazione 1.8 M. In seguito si lascia a riposo per una notte a 4°C. Il siero viene filtrato sottovuoto su imbuto Büchner ricoperto di celite (Fluka). Si procede quindi con una seconda salatura per aggiunta di ammonio solfato fino ad una concentrazione 3.6 M e lasciando a riposo per una notte a 4°C. La sospensione ottenuta viene centrifugata a 4500 rpm a 8 °C per 30 minuti con centrifuga Beckman modello GS-15R fino ad ottenere un surnatante limpido. Il pellet contenente le proteine viene ripreso con qualche millilitro di acqua e conservato a 4°C.

La sospensione del pellet viene trasferita in un tubo da dialisi (Spectra-Por) avente cut-off 3500 Da, chiuso sopra e sotto con dei nodini di sicurezza; immerso in circa 3 l di Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10 mM (Carlo Erba), pH 7.7, e posto in agitazione a 4°C. La dialisi viene condotta per 24 ore a 4°C effettuando un ricambio periodico di tampone ogni sei ore. Il dializzato è stato filtrato con filtri Millipore tipo GS aventi diametro 47 mm e porosità 1.2 µm.

2.1.2. Purificazione delle proteine.

Il liquido filtrato, ottenuto nella fase precedente, è stato fatto percolare attraverso una colonna, di diametro 1 cm e lunghezza 10 cm, impaccata con resina SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia). La resina è stata previamente equilibrata in tampone sodio fosfato 10 mM, pH 7.5, utilizzando il cromatografo FPLC (Pharmacia) e successivamente con lo stesso strumento è stato impostato il gradiente SP-SEPH

riportato in Tabella 2.1. Il tampone ad elevata forza ionica consente l'eluizione dalla colonna Sepharose delle proteine di interesse, che sono raccolte in apposite provette sulla base del profilo di assorbanza a 280 nm dell'eluato. Le frazioni contenenti Angiogenina e Lactogenina sono state riunite e sottoposte a dialisi con tampone $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 7.8, a 4°C. Il dializzato viene sottoposto a filtrazione con filtri Millipore aventi porosità di 0.22 μm .

Volume (ml)	Flusso (ml/min)	% di B	Rivelazione (nm)
0	2.0	0	280
40	2.0	40	280
55	2.0	100	280
65	2.0	100	280
70	2.0	0	280
100	2.0	0	280

Tabella 2.1. Gradiente FPLC SP-SEPH per cromatografia ionica del dializzato. Gli eluenti sono costituiti da: A) $\text{Na}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 10 mM, pH 7.5, e B) $\text{Na}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 10 mM, pH 7.5, contenente 1.0 M NaCl. Entrambi i tamponi sono stati filtrati a 0.22 μm e degassati sotto vuoto. La cromatografia è stata condotta a temperatura ambiente (22°C). La colonna usata è stata impaccata con SP-Sepharose FF.

Alle frazioni filtrate è stato aggiustato il pH a 7.5 e quindi aliquote, di 3 ml ciascuna, sono state caricate su colonna Mono-S (Pharmacia) equilibrata e successivamente eluita con il gradiente MONO-S riportato in Tabella 2.2.

Volume (ml)	Flusso (ml/min)	% di B	Rivelazione(nm)
0	0.80	0	280
2	0.80	0	280
13	0.80	50	280
14	0.80	50	280
15	0.80	0	280
22	0.80	0	280

Tabella 2.2. Gradiente FPLC MONO-S usato per la cromatografia ionica con colonna Mono-S. Gli eluenti sono costituiti da: A) $\text{Na}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 10 mM, pH 7.5, e B) $\text{Na}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 10 mM, pH 7.5, contenente 1.0 M NaCl. Entrambi i tamponi sono stati filtrati a 0.22 μm e degassati sotto vuoto. La cromatografia è stata condotta a temperatura ambiente (22°C).

Le frazioni provenienti dalla cromatografia su colonna Mono-S sono state riunite ed acidificate a pH 2.0 mediante aggiunta di TFA (Fluka). Aliquote di 1.5 ml per corsa sono state applicate su colonna RP Vydac C4 (The Separation Group) ed eluite secondo il gradiente HPLC-Vydac C4 riportato in Tabella 2.3. Lo strumento usato in questo caso è un cromatografo LKB-Pharmacia. Anche la proteina commerciale RNase A è stata ulteriormente purificata mediante cromatografia RP-HPLC su colonna Vydac C4.

Tempo (min)	Flusso (ml/min)	% di B	Rivelazione (nm)
0	1.00	6	220
20	1.00	38.5	220
22	1.00	80	220
23	1.00	80	220
23.5	1.00	6	220
30	1.00	6	220

Tabella 2.3. Gradiente HPLC-Vydac C4 per cromatografia RP-HPLC su colonna Vydac-C4. Gli eluenti utilizzati sono rispettivamente: A) Acqua con 0.05% v/v TFA e B) MeCN con 0.05% v/v TFA. Entrambi i solventi sono stati degassati sotto vuoto prima dell'uso. La rivelazione è stata effettuata a 220 nm.

2.2. Determinazione del peso molecolare tramite spettrometria di massa ESI-TOF delle proteine.

Per le misure di massa è stato usato uno spettrometro API-TOF Mariner della PerSeptive Biosystem (Stratford, Texas, USA). Il software di utilizzo dello spettrometro è la versione 4.1 rilasciata dalla Applied Biosystems. Esso comprende la sezione di controllo ed acquisizione degli spettri e la sezione denominata Data Explorer che permette l'elaborazione degli spettri acquisiti e numerose funzioni ausiliarie (calibrazione degli spettri, calcolo dello spettro teorico, calcolo della frammentazione di peptidi, estrapolazione di una composizione elementare, etc.).

La taratura è stata effettuata usando uno standard Mariner contenente angiotensina-I, bradichinina e neurotensina in Acqua/MeCN 1/1 acidificata con 1% di HCOOH. La soluzione viene iniettata nello spray al flusso di 5 μ l/minuto.

Per l'analisi alla massa vengono preparate soluzioni delle proteine isolate dal latte aventi una concentrazione di circa 5 pmoli/ μ l in solvente costituito da Acetonitrile/Acqua MilliQ 1:1 contenente 1% di HCOOH. La soluzione proteica viene

infusa a flusso costante di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ nello *electrospray* dello strumento usando una apposita pompa e quindi si acquisisce lo spettro.

Per l'infusione degli standards e dei campioni è stata usata una siringa micrometrica Harvard 11 (Holliston). L'iniezione in flusso di eluente, costituito sempre dalla miscela Acqua/MeCN 1/1 contenente HCOOH 1%, è stata ottenuta usando un sistema cromatografico costituito da due pompe Micro Pumps serie 200 della Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA)

2.3. Analisi spettroscopiche.

2.3.1. Spettroscopia di assorbimento UV.

Le analisi in spettroscopia UV sono state condotte con uno spettrofotometro Lambda-2 della Perkin-Elmer usando cuvette di quarzo Suprasil (Helma) con cammino ottico di 1.0 cm. Gli spettri sono stati registrati in un intervallo di lunghezza d'onda tra 330-240 nm, con velocità di scansione di 120 nm/min, a temperatura ambiente.

La soluzione di Lactogenina (proteina di cui non si disponeva di sequenza completa) è stata preparata a partire da una pesata accurata di 1 mg di liofilizzato, precedentemente messo sotto vuoto con essiccatore P_2O_5 , a cui è stato aggiunto 1 ml di tampone NaP 5 mM, pH 7.40, contenente NaCl 0.15 M. E' stato eseguito quindi uno spettro di assorbimento UV; l'assorbanza di questa soluzione a 280 nm risulta essere 0.591. Da questa è stato possibile stimare il contenuto di residui di tirosina e di triptofano per molecola di proteina, usando l'equazione di Edelhoch (1967) riportata di seguito e il valore di PM accurato della lactogenina grazie alla spettrometria di massa.

$$A_{280}^{0.1\%} = \frac{5690 \times n^{\circ} \text{ residui di TRP} + 1280 \times n^{\circ} \text{ residui di TYR} + 120 \times n^{\circ} \text{ residui di CYS}}{\text{PM}}$$

E' stata preparata una soluzione stock di Angiogenina sciogliendo 1 mg circa di liofilizzato in 1 ml di tampone fosfato impiegato per la precedente soluzione; quindi è stata eseguita la determinazione di spettroscopia UV con spettrofotometro Lambda-2.

La soluzione stock di RNase A è stata preparata sciogliendo il liofilizzato in 1 ml di tampone NaP 5 mM contenente NaCl 0.15 M (pH 7.4); la soluzione di

concentrazione 1 mg/ml circa è stata sottoposta ad una misurazione di assorbimento UV.

Vengono eseguiti anche gli spettri di assorbimento UV in derivata seconda delle tre stock solutions, utilizzando lo spettrofotometro Lambda-2 descritto precedentemente, impostando il numero di derivata e l'intervallo di lunghezza d'onda in cui applicarla. Le determinazioni sono condotte con cuvette in quarzo Suprasil con cammino ottico di 1.0 cm. Gli spettri, registrati con velocità di scansione di 120 nm/min ed a temperatura ambiente, vengono elaborati successivamente con programma Sigma-Plot.

2.3.2. Determinazioni tramite spettroscopia in fluorescenza.

Le analisi tramite spettroscopia di fluorescenza sono state effettuate utilizzando una spettrofluorimetro modello LS50B della Perkin Elmer dotato di termostato tipo LTD6G. Sono state utilizzate cuvette in quarzo Suprasil con dimensioni di 1.0 cm per il raggio di eccitazione e 0.5 cm per quello di emissione.

Gli spettri sono stati registrati sulle soluzioni di Lactogenina, Angiogenina e RNase A di concentrazione rispettivamente 0.09 mg/ml, 0.1 mg/ml e 0.08 mg/ml in tampone NaP 5 mM, pH 7.40, contenente NaCl 0.150 M, eccitando a 280, 290 e 295 nm con velocità di scansione di 240 nm/min, a temperatura ambiente.

2.3.3. Analisi di dicroismo circolare.

Le misure di dicroismo circolare sono state condotte con un dicrografo J-810 (JASCO) dotato di cella termostata. Lo strumento è stato calibrato con acido d-(+)-10-canforsolfonico. La velocità di scansione è stata impostata a 20 nm/min e sono stati eseguiti 4 accumuli per spettro con costante di tempo 2 secondi.

Gli spettri di dicroismo circolare registrati nel vicino UV (250-350 nm) vengono effettuati su soluzioni madre delle tre proteine (concentrazione 1 mg/ml) utilizzando cuvette in quarzo Suprasil con cammino ottico di 1.0 cm, a temperatura ambiente. Gli spettri registrati nel lontano UV (250-195 nm) vengono effettuati diluendo le soluzioni madre, fino ad una concentrazione di 0.09 mg/ml per la Lactogenina, 0.1 mg/ml per la Angiogenina e 0.08 mg/ml per RNase A. Sono utilizzate cuvette in quarzo Suprasil con cammino ottico di 1 mm. L'acquisizione avviene a temperatura ambiente.

2.4. Proteolisi di Angiogenina con tripsina immobilizzata su Sepharose-4B.

La tripsina è una proteasi serinica che idrolizza in modo selettivo il legame peptidico sul lato carbossilico di lisina e arginina. Per questa proteolisi è stata utilizzata tripsina legata covalentemente al Sepharose-4B allo scopo di allontanarla facilmente dalla miscela di reazione mediante filtrazione. La preparazione della tripsina immobilizzata su Sepharose-4B è stata riportata su un precedente lavoro di Tesi (Guerra, 2000).

La procedura tipica di proteolisi di un'aliquota di Angiogenina è la seguente: 100µl di sospensione di gel Sepharose-4B, con tripsina bovina legata covalentemente, sono trasferiti in un microcestello (Millipore) avente capacità di 500 µl e munito di filtro con porosità 0.45 µm (Millipore). Il gel viene lavato tre volte mediante sospensione in 400µl di tampone bicarbonato 0.2 M. Dopo il terzo lavaggio vengono introdotti circa 180 µl di soluzione di ciascuna proteina a concentrazione 2 mg/ml in tampone ammonio bicarbonato e si pone ad incubare per 1 ora a temperatura ambiente. I peptidi prodotti dall'azione della tripsina sono separati dalla proteasi e recuperati per centrifugazione del microfiltro; la soluzione che li contiene viene acidificata fino a pH 1 con TFA 50% (V/V) e subito analizzata mediante RP-HPLC in colonna Vydac C18 (The Separation Group) utilizzando il gradiente riportato in tabella 2.4.

Tempo (min.)	Flusso (ml/min.)	% eluente B	Rivelazione (nm)
0	1	5.5	220
25	1	38.5	220
27	1	82.5	220
29	1	82.5	220
30	1	5.5	220
35	1	5.5	220

Tabella 2.4. Gradiente VYDPEP usato per la cromatografia RP-HPLC dei peptidi triptici ottenuti dall'Angiogenina.

2.4.1. Preparazione dei peptidi 103-124 e 56-61 dal peptide triptico n°9.

Il peptide 9 (P9) ottenuto per digestione proteolitica dell'angiogenina con tripsina e purificato mediante RP-HPLC presenta un ponte a disolfuro, fra i residui di cisteina 58 e 108, che unisce il frammento 56-61 (denominato RCM-I) al frammento C-terminale della proteina 103-124 (denominato RCM-II). Per separare i due frammenti si

è provveduto a ridurre e carbossimetilare il P9 con la procedura che si procede a descrivere in seguito.

Alcune decine di μg di P9 liofilizzato sono state riprese con 100 μl di acqua, 50 μl di NH_4HCO_3 1M, 50 μl di MeCN (Lab Scan) e 2 μl di EDTA (Carlo Erba) 100 mM. La miscela di reazione viene quindi deareata per 10 min con flusso di N_2 e si aggiungono 10 μl di TBF (Fluka) 0.1M in etanolo e si pone ad incubare a 45°C per 10 min. Alla soluzione vengono quindi aggiunti 3 mg di Iodoacetammide (Fluka) disciolti in qualche μl di acqua e si pone ad incubare al buio per 15 min a 32°C. La reazione viene bloccata mediante acidificazione con TFA al 50% V/V e la miscela viene caricata su colonna Vydac C18 per separare i prodotti ottenuti utilizzando il gradiente VYDPEP già descritto in tabella 2.4. I peptidi RCM-I e RCM-II purificati sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa per confermarne l'esatta attribuzione.

2.5. Saggio di attività ribonucleolitica.

L'attività ribonucleolitica di Angiogenina, Lactogenina e RNase A è stata valutata su dinucleotidi attraverso la quantificazione, mediante RP-HPLC, dei prodotti della reazione di idrolisi enzimatica e del substrato rimasto non idrolizzato. I nucleotidi utilizzati sono il citidil (3'→5') guanosina, CpG, e l'uridil (3'→5') guanosina, UpG (Sigma). Gli enzimi ribonucleolitici idrolizzano il legame fosfodiesterico tra i nucleotidi liberando guanosina che può essere quantificata mediante RP-HPLC con rivelazione a 260 nm. In figura 2.1 è riportato un tipico cromatogramma. La citosina e l'uracile sono prodotti molto idrofili e vengono eluiti con il volume vuoto della colonna mentre la guanosina da un picco ben definito è quindi quantificabile. La relazione che esiste tra area del picco e la quantità di guanosina è di 439600 $\mu\text{volts} \times \text{sec}$ per nmole di prodotto.

La procedura adottata con substrati UpG o CpG è la seguente: a 20 μl di soluzione di substrato, ad opportuna concentrazione in tampone $\text{Na}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, pH 6.5, contenente 200 mM NaCl, vengono aggiunti 10 μl di soluzione di enzima e quindi si incuba a 37°C per un tempo di minuti variabile a seconda dell'estensione della idrolisi desiderata. La reazione viene bloccata per aggiunta di 10 μl di TFA 0.5% e 35 μl vengono analizzati mediante RP-HPLC in colonna Vydac C18 con eluizione isocratica (3% v/v MeCN in acqua contenente 0.05% v/v TFA) e rivelazione a 260 nm.

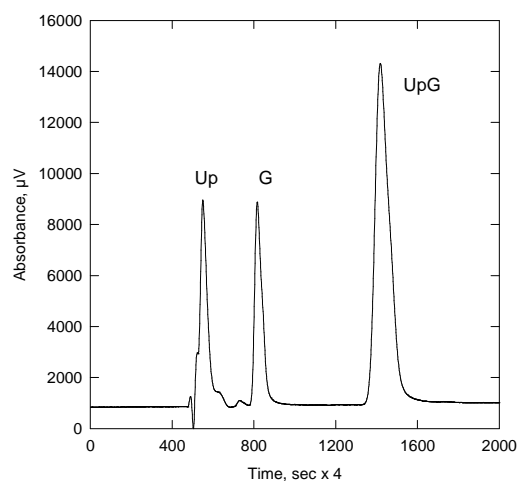


Figura 2.1. Analisi RP-HPLC della miscela di idrolisi parziale di UpG. E' stata usata una colonna Vydac C18 con eluente isocratico costituito da 3% v/v MeCN in acqua MilliQ addizionata di 0.05% v/v TFA. Il flusso di lavoro era di 1.00 ml/min e la rivelazione è stata effettuata a 260 nm.

2.6. Preparazione di soluzioni delle proteine e dei peptidi.

La concentrazione di una proteina in soluzione può essere misurata spettrofotometricamente tramite la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \times c \times l$$

dove ε_{λ} è il coefficiente di assorbività molare del soluto che assorbe la luce alla lunghezza d'onda λ , c è la concentrazione molare e l il cammino ottico della radiazione nella soluzione espresso in cm. Il coefficiente di assorbività molare per le proteine si calcola considerando la relazione di Edelhoch (cfr. parte sperimentale 2.3.1). Le proteine liofilizzate sono state disciolte in 1 ml di NaCl 0.9% in Acqua MilliQ e di ciascuna soluzione madre è stata misurata l'assorbanza a 280 nm. Dalla soluzione madre a concentrazione nota si sono preparate delle aliquote di lavoro attraverso diluizioni successive con NaCl 0.9% in Acqua MilliQ.

2.7. Colture cellulari.

Angiogenina, Lactogenina, RNase A e i peptidi triptici dell'Angiogenina sono stati saggiati per valutarne una possibile attività pro-angiogenica *in vitro* su colture di cellule HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) estratte per digestione della frazione endoteliale e sub-endoteliale della vena di cordoni ombelicali (Jaffe *et al.*, 1973).

Gli studi di citotossicità invece sono stati eseguiti su cellule di linea tumorale MCF-7, 3T3-L1, A431, HT 29 e preadipociti umani.

2.7.1.1. Estrazione di cellule endoteliali da vena di cordone ombelicale.

I funicoli utilizzati provengono da parti a termine avvenuti presso il reparto di ostetricia dell'ospedale San Luca di Trecenta (RO) e sono stati processati entro 24 ore dal loro prelievo. Ciascun cordone è stato inizialmente trattato con un agente disinfettante, Betadine® (Esoform), e quindi lavato con una soluzione salina tamponata (PBS 1X, Phosphate Buffered Saline, Gibco) contenente l'1% di soluzione antibiotica (APS, antibiotico penicillina streptomina, Sigma). La vena ombelicale è stata perfusa per incanalazione con PBS 1X addizionato dell'1% di soluzione antibiotica al fine di eliminare eventuali residui di sangue presenti all'interno del vaso. Dopo aver clampato un'estremità del cordone, la vena è stata riempita di una soluzione di Collagenasi IV (Sigma) allo 0,1% in DMEM-LG (Gibco), e, dopo chiusura dell'altra estremità, è stata eseguita la digestione enzimatica in incubatore (Thermo Forma Serie II mod.3111) a 37°C per 8 minuti circa. Le estremità dei cordoni sono state rimosse e le frazioni endoteliali e sub-endoteliale sono state ottenute attraverso numerosi lavaggi della vena ombelicale per iniezione di PBS 1X. La sospensione cellulare ottenuta è stata quindi centrifugata per 8 minuti a 1800 rpm con centrifuga Eppendorf mod. 5702 e il pellet formatosi è stato seminato su piastre Petri (Becton Dickinson) condizionate con fibronectina 1µg/cm² (Sigma) in terreno di proliferazione Endothelial Cell Basal Medium MV₂ (Promocell) contenente i seguenti fattori:

- 5% siero fetale bovino, FCS
- Epidermal Growth Factor (5µg/ml), EGF
- Vascular Endothelial Growth Factor (0.5 ng/ml), VEGF
- Idrocortisone (0.2 µg/ml)
- Basic Fibroblast Factor 10 ng/ml, bFGF
- Acido Ascorbico 1 µg/ml
- R3 IGF-1 20 ng/ml

Le colture primarie sono state osservate con un microscopio ottico Leica DMIL, dotato di fotocamera digitale Canon S70 per l'acquisizione delle immagini, e mantenute

in piastra sino ad una confluenza del 70-80%. Le cellule sono state staccate con una soluzione di Tripsina 0.25% (Sigma) ed EDTA 0.02% (Sigma) in PBS 1X per 1 minuto a 37°C. Le subculture ottenute sono state coltivate su piastre condizionate con fibronectina in terreno proliferativo fino al momento del loro utilizzo nei vari saggi.

2.7.1.2. Caratterizzazione fenotipica delle colture primarie di cellule HUVEC.

Le colture primarie sono state caratterizzate fenotipicamente mediante immunofluorescenza per verificare la presenza di *markers* tipicamente espressi dalle cellule endoteliali con anticorpi anti-von Willebrand Factor (vWF, Sigma), -CD31 (Santa Cruz), -CD146 (Sigma), -VE-Cadherin (Santa Cruz).

Sottopopolazioni cellulari di I generazione sono state seminate alla densità di 5000 cellule/cm², in pozzetti di *chamber slides* (Becton Dickinson) e mantenute in coltura fino al raggiungimento del 70-80% di confluenza. Le colture sono state quindi fissate con metanolo (Sigma) freddo per 8 min a -20°C e poi conservate a +4°C in PBS 1X fino al momento del loro utilizzo. Si è quindi eseguita la disattivazione dei siti aspecifici mediante incubazione a temperatura ambiente (RT) per 90 min con una soluzione di Horse Serum (HS) (Gibco) al 10% in PBS 1X. L'incubazione con anticorpi primari, diluiti 1:100 in soluzione di HS al 3% in PBS 1X, è stata condotta per 1 ora a RT in cameretta umidificata. Sono seguiti tre lavaggi, di 10 min ciascuno, con la stessa soluzione di diluizione dell'anticorpo primario e un'altra incubazione di 30 min, a RT in cameretta umidificata, con l'anticorpo secondario (Biotinylated pan-specific, secondary antibody, Vector) diluito in HS 1.5% in PBS 1X seguendo le istruzioni del produttore. Dopo tre lavaggi in PBS 1X i preparati sono stati trattati per 10 min al buio con una soluzione di Avidin DCS Fluorescein (Vector) diluita 1:500 in tampone Hepes 10 mM e NaCl 0.15M (pH 8.2). Tale soluzione è stata rimossa per mezzo di lavaggi in PBS 1X e ciascun vetrino è stato montato con mounting medium contenente DAPI (Vector). Questa soluzione ha permesso anche di eseguire la colorazione per il contrasto nucleare. Allo scopo di porre in evidenza eventuali reazioni aspecifiche dei preparati con gli anticorpi primari è stato allestito per ciascun campione un controllo negativo preparato con lo stesso protocollo a meno dell'incubazione con l'anticorpo primario.

Per valutare fino a quale generazione le popolazioni cellulari estratte conservano il fenotipo endoteliale è stato anche allestito un esperimento di analisi dell'espressione dei markers citati in precedenza fino alla X^a generazione.

I preparati sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza Leica DMR, dotato di telecamera Leica DC500 per l'acquisizione informatica delle immagini.

2.7.2. Colture di linee cellulari.

La linea cellulare 3T3-L1, ottenute da cellule Swiss 3T3 di embrioni di topo di 19 giorni (Green *et al.*, 1974) fa parte dell' American type Culture Collection (ACCT, Rockville, Md, USA). Le cellule sono state acquistate presso il Laboratorio Zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna e sono state coltivate in terreno EMEM (Cambrex), FCS (Foetal Calf serum) 10% (Sigma) e APS 1 % seguendo le indicazioni della ditta fornitrice.

Le cellule MCF-7 e HT-29 sono linee cellulari di carcinoma umano rispettivamente mammario, colon-rettale e sono state ottenute grazie alla collaborazione del Prof. Schiavon (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche-Università di Padova). Le cellule da carcinoma umano della cervice A431 sono state gentilmente fornite dal Prof. Zumino (Divisione oncologica sperimentale B, Istituto superiore dei tumori, Milano). Le linee cellulari sono state mantenute in fase logaritmica di crescita in terreno RPMI-1640 (Euroclone, Celbio) contenente FCS 10%, APS 1%.

2.7.3. Isolamento e coltura di preadipociti umani.

I preadipociti sono stati isolati da campioni di liposuzione e sottoposti a digestione enzimatica condotta per 45 min a 37°C, in agitazione, con una soluzione di Collagenasi IA (Sigma) al 1 % in terreno DMEM-LG (Gibco). La Collagenasi è stata disattivata con siero FCS e la soluzione è stata centrifugata a 1500 rpm per 5 min. Questa operazione consente di separare gli adipociti maturi nella fase superiore dai preadipociti che sedimentano nella fase inferiore. Il pellet ottenuto è stato più volte lavato in PBS 1X, ripreso in terreno di coltura costituito da DMEM-LG, FCS 20% e APS 1% e quindi seminato ad alta densità (15×10^3 cellule/cm²) su piastre Petri. Le cellule sono state così coltivate fino al raggiungimento del 80-90% di confluenza e quindi staccate con soluzione di EDTA-Tripsina come descritto in precedenza.

Il fenotipo cellulare delle popolazioni isolate è stato caratterizzato mediante colorazione citochimica Oil Red O. Questo colorante è liposolubile, quindi è in grado di legarsi ai lipidi neutri accumulati nella cellula conferendo ai siti di legame specifici una tipica colorazione rossa. Cellule di coltura primaria sono state seminate su *chamber slide* e, una volta adese, sono state fissate con formalina (Sigma) al 10% in PBS per 10 min a RT. Dopo un lavaggio in acqua distillata si è eseguita la colorazione, per 15 min a RT, con soluzione Oil Red O (Sigma) preparata da una soluzione madre allo 0.5 % in isopropanolo (Sigma) e diluita al 60% di acqua distillata. Sono seguiti dei lavaggi in acqua distillata e la colorazione di contrasto nucleare con Ematossilina (Sigma) per 8 minuti. Dopo due lavaggi in acqua distillata e uno in acqua di fonte per 5 min a RT i vetrini sono stati montati con montante acquoso Crystal Mount Acqueous (Sigma) e osservati al microscopio ottico.

2.8. Valutazione dell'effetto citotossico su colture cellulari.

Le proteine isolate dal latte e i peptidi dell'Angiogenina sono stati testati sulle colture cellulari sopra citate per valutarne un eventuale effetto citotossico. A tale scopo si sono quindi eseguiti saggi di vitalità cellulare con sale di formazano, saggi di apoptosi che valutano la presenza di frammenti di DNA nucleare e saggi di necrosi che determinano la presenza dell'enzima lattico deidrogenasi nel surnatante cellulare.

2.8.1. Valutazione della vitalità cellulare.

Il saggio di vitalità cellulare è stato allestito utilizzando il kit CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Questo saggio colorimetrico sfrutta la riduzione, da parte di cellule biologicamente attive, del composto tetrazolico MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio) nel prodotto colorato formazano. Il sale, metabolizzato dalle deidrogenasi mitocondriali di cellule metabolicamente attive, viene rilasciato nel terreno di coltura, perciò l'assorbanza del prodotto colorato può essere misurata a 490 nm, avendo così una stima delle cellule vitali presenti in coltura.

Il saggio di vitalità è stato condotto sia su cellule HUVEC che su preadipociti e cellule di linea con il seguente procedimento:

3×10^3 cellule sono state seminate in ciascun pozzetto di una piastra *multiwells* da 96 pozzetti (Becton Dickinson) in terreno di espansione completo. Dopo 24 ore dalla semina è stato rimosso il terreno, fatto un lavaggio in PBS 1X e addizionato terreno base con i fattori da testare. Ogni trattamento è stato condotto in triplicato e su almeno tre popolazioni. Il controllo è costituito da cellule non trattate mentre come controllo positivo si è utilizzato il basic Fibroblast Growth Factor, bFGF (Sigma) alla concentrazione 2.5 ng/ml per le colture di HUVEC e preadipociti, mentre siero al 10 % per le linee tumorali. I fattori testati sono i seguenti:

- Angiogenina Bovina (ANG) 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M;
- Lactogenina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M;
- RnaseA 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M
- Peptidi triptici dell'angiogenina 10^{-8} M
- C-terminale umano 10^{-8} M (Calbiochem).

Trascorse 24, 48 o 72 ore di incubazione con i fattori, il terreno di coltura è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 μ l/pozzetto di terreno base arricchito con 20 μ l di reagente MTS. Dopo incubazione della piastra per 2 ore a 37°C in incubatore, 100 μ l di terreno di ciascun campione sono stati sottoposti a lettura spettrofotometrica a 490 nm utilizzando il lettore ELISA Ultra Microplate Reader della Bio-Tek Instruments.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite test di Student (*t-test*). I risultati finali, media di almeno tre esperimenti, sono stati espressi come valore percentuale rispetto al controllo non trattato posto uguale a 100.

2.8.2. Valutazione della necrosi.

Per valutare se l'effetto citotossico è dovuto a necrosi si è utilizzato il kit Cyto TOX 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Questo sistema di analisi misura in modo quantitativo la lattico deidrogenasi (LDH), un enzima normalmente presente nel citoplasma cellulare, che viene rilasciata dalle cellule nel surnatante in seguito a lisi della membrana plasmatica, provocata dalla necrosi. LDH rilasciato nel surnatante può essere quantificato mediante un saggio colorimetrico perchè è in grado di convertire il sale tetrazolico p-iodonitrotetrazolio (INT) in sale di formazano di colore rosso. L'intensità del colore sviluppato dal surnatante sarà pertanto proporzionale al numero di cellule lisate.

La valutazione della necrosi è stata eseguita su cellule HUVEC e su cellule di linea 3T3-L1 e MCF-7 utilizzando la metodica descritta qui di seguito. Le popolazioni cellulari sono state seminate in una piastra multiwell da 96 pozzetti in terreno completo ad una densità di semina di 3000 cell/pz. Dopo 24 ore dalla semina è stato rimosso il terreno, eseguito un lavaggio in PBS 1X, e addizionato terreno base con i fattori da testare. Sulle colture cellulari HUVEC sono stati testati Angiogenina 10^{-6} M, C-terminale angiogenina umana 10^{-8} M, RCM-I 10^{-8} M e bFGF 10 ng/ml, quest'ultimo come controllo positivo. Sulle cellule di linea MCF-7 e 3T3-L1 sono stati saggiati Angiogenina 10^{-6} M, Lactogenina 10^{-6} M, RNaseA 10^{-6} M e come controllo positivo siero al 10%. Ogni campione è stato preparato in triplicato e sono stati allestiti almeno tre esperimenti differenti. Come controllo si sono considerate cellule non trattate coltivate in terreno base. Dopo 24, 48 o 72 ore di esposizione ai fattori, 50 μ l di surnatante per ciascun campione sono stati prelevati e trasferiti in una nuova piastra da 96 pz. Su questo surnatante si andrà a valutare la presenza di LDH citosolico.

Per valutare il contenuto massimale di LDH nelle cellule non trattate, è stato rimosso il terreno rimanente nella piastra di coltura, addizionati 90 μ l di terreno base e 10 μ l di Lysis Solution, e incubato per 45 min a 37°C. La piastra è stata centrifugata a 250 x g per 4 minuti con centrifuga Tj-25 Centrifuge-Backman Coulter. 50 μ l di soluzione sono stati trasferiti in pozzetti vuoti della piastra da 96 dove erano già stati posti i surnatanti cellulari. A ciascun campione sono stati aggiunti 50 μ l di Substrate Mix ready to use e si è posto ad incubare al buio per 30 min a RT. Per fermare la reazione colorimetrica si sono posti 50 μ l di Stop Solution in ciascun pozzetto e la piastra è stata analizzata con un lettore di micropiastre a 490 nm entro un'ora dall'aggiunta della Stop Solution.

I valori di assorbanza registrati sono stati utilizzati per calcolare il parametro % di Citotossicità espresso come il rapporto tra il valore di assorbanza ottenuto dal surnatante dei vari campioni e il valore di assorbanza ottenuto per il contenuto massimale di LDH nelle cellule non trattate. Lo studio statistico è stato eseguito mediante il calcolo del parametro t di Student.

2.8.3. Valutazione dell'apoptosi.

Un termine di raffronto importante per valutare l'apoptosi consiste nella quantificazione della degradazione del DNA. A tal fine è stato utilizzato il kit Cellular DNA Fragmentation ELISA della Roche. Questa metodica prevede l'incubazione delle colture cellulari con un analogo della timidina, la bromodeossiuridina (BrdU), che viene incorporata nel DNA genomico. A seguito del trattamento con fattori pro-apoptotici si ha la degradazione del DNA con incorporata la BrdU che viene rilasciato nel citoplasma in caso di apoptosi o nel surnatante cellulare se c'è necrosi. I frammenti di DNA possono essere rilevati mediante analisi immunologia ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizzando una piastra funzionalizzata con un anticorpo anti-DNA per legare i frammenti di DNA e un anticorpo anti-BrdU coniugato con perossidasi che rileva la BrdU contenuta nei frammenti DNA.

Il saggio di apoptosi è stato condotto su colture di cellule HUVEC, cellule di linea 3T3-L1 e MCF-7. Le popolazioni cellulari sono state seminate su piastre Petri ad una densità di 15000 cell/cm² in terreno proliferativo completo. Ad adesione avvenuta, cioè circa dopo 6 ore, una soluzione di BrdU è stata addizionata al terreno di coltura, per una concentrazione finale 10 µM, e le colture cellulari sono state poste ad incubare a 37°C. Trascorse 18 ore, il surnatante è stato rimosso, si è eseguito un lavaggio in PBS 1X della piastra e le colture cellulari sono state staccate mediante l'utilizzo di un *cell scraper* (Becton Dickinson). La sospensione cellulare raccolta è stata pellettizzata per centrifugazione a 1000 rpm per 10 min. Le cellule sono state seminate in piastra *multiwells* da 96 pozzetti ad una densità di 1,0 x 10⁴ cell/pz in 100 µl di terreno base. Sono stati quindi addizionati altri 100 µl di terreno contenente i fattori da testare, ovvero terreno base per il controllo non trattato, siero al 10%, Angiogenina 10⁻⁶ M, RCM-I 10⁻⁸ M e C-terminale umano 10⁻⁸ M per le colture cellulari HUVEC, e Angiogenina 10⁻⁶ M, Lactogenina 10⁻⁶ M, RNaseA 10⁻⁶ M e siero al 10% per le cellule di linea. Le colture sono state incubate per 24 o 72 ore a 37°C. Terminato tale periodo, l'esperimento è stato portato avanti seguendo le istruzioni del produttore. Il saggio ELISA è stato condotto utilizzando piastre *multiwell* da 96 pz Immunosorp (Nunc) condizionate con l'anticorpo anti-DNA seguendo le istruzioni riportate nel kit. Ogni campione è stato preparato in triplicato e sono stati allestiti almeno tre esperimenti differenti. In parallelo, il controllo

positivo è stato allestito utilizzando cellule non trattate con i fattori e lisate con NaOH 0.25 M per estrarre il DNA genomico.

Le soluzioni ottenute dalla reazione immunologica sono state analizzate con un lettore di piastre ELISA alla lunghezza d'onda di 450 nm. I valori di assorbanza registrati vengono corretti per il contributo letto a 690 nm. L'analisi statistica è stata effettuata tramite test di Student ponendo il valore di assorbanza per il controllo trattato con siero uguale a 100 e esprimendo l'apoptosi come variazione percentuale del valore di assorbanza registrato per il trattato rispetto a quello del controllo.

2.9. Valutazione della proliferazione cellulare.

Una delle prime fasi dell'angiogenesi prevede la proliferazione delle cellule endoteliali in seguito ad uno stimolo angiogenico. Per valutare l'attività proliferogena di Lactogenina, RNase A, Angiogenina e dei suoi peptidi su colture di cellule HUVEC si è utilizzato il saggio di proliferazione con Bromodeossiuridina, Cell Proliferation ELISA BrdU della Roche.

La 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU) è un analogo della timidina. In seguito ad incubazione con BrdU le cellule che sintetizzano DNA (fase S del ciclo cellulare) incorporeranno BrdU al posto della timidina nel loro DNA e quindi tali cellule potranno essere identificate utilizzando un anticorpo anti-BrdU, in grado di riconoscere specificatamente la BrdU ma non la timidina. La percentuale di cellule in fase S potrà quindi essere stimata con un saggio colorimetrico registrando la quantità di anticorpo anti-BrdU coniugato con cromoforo che si è legato alla BrdU incorporata nel DNA di cellule in fase proliferativa.

Il saggio di proliferazione è stato condotto con almeno tre diverse popolazioni di cellule HUVEC di I°-II° generazione seminando in una piastra da 96 pozzetti 3000 cellule/pz in terreno MV₂ completo. Dopo 24 ore dalla semina è stato asportato il terreno, fatto un lavaggio in PBS 1X e addizionato terreno MV₂ base con i fattori da testare. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Il controllo negativo è stato preparato con cellule non trattate mentre come controllo positivo è stato utilizzato il bFGF alla concentrazione 2.5 ng/ml. I fattori testati sono i seguenti: Angiogenina Bovina (ANG) 10⁻⁷M, 10⁻⁸M, 10⁻⁹M;

➤ Lactogenina 10⁻⁷M, 10⁻⁸M, 10⁻⁹M;

- Peptidi triptici dell'angiogenina 10^{-8} M
- C-terminale umano 10^{-8} M.

Dopo 24 ore di incubazione con i fattori si è eseguito il saggio ELISA seguendo le istruzioni della casa fornitrice. La piastra è stata letta con un lettore ELISA di piastre alla lunghezza d'onda di 405 nm. L'analisi statistica è stata condotta mediante l'utilizzo del parametro t di Student, ponendo il controllo non trattato uguale a 100 ed esprimendo la proliferazione cellulare come variazione percentuale rispetto al controllo.

2.10. Saggio di angiogenesi *in vitro* su Matrigel.

Uno dei modelli sperimentali usati per studiare la formazione di una rete di capillari *in vitro* è costituito da una coltura di cellule endoteliali umane seminate sopra un substrato gelatinoso, chiamato Matrigel, estratto solubile della membrana basale del sarcoma di Engelbreth-Holm-Swarm di topo, i cui costituenti principali sono laminina, collagene IV, entactina, proteoglicani, fattori di crescita, attivatori del plasminogeno (Schnaper. *et al.*,1993). Tale substrato costituisce una matrice biologicamente attiva in grado di mimare la membrana basale delle cellule di mammifero. Le cellule si depositano sul substrato e dopo essere state opportunamente stimolate con i fattori da testare vengono osservate al microscopio per analizzare se si organizzano formando spontaneamente una rete di vasi capillari del tutto simile alle reti capillari dei tessuti *in vivo*.

Il Matrigel Growth Factor Reduced (Becton Dickinson) è stato scongelato in ghiaccio a 4°C per una notte e posto in uno strato sottile (50µl/pz) in piastre da 24 pozzetti (Sarsted). Le piastre sono state poste per almeno 1 ora a 37°C in incubatore per permettere al Matrigel di gelificarsi. Le cellule in subcultura dalla II^a alla III^a generazione sono state seminate ($2,0 \times 10^4$ cellule/cm²) su Matrigel con terreno base MV₂ addizionato dei fattori da testare. Le cellule sono state quindi incubate per 24 ore a 37°C in incubatore e successivamente fissate in glutaraldeide (Sigma) al 2% in PBS 1X. Di ogni pozzetto sono state acquisite immagini random al microscopio ottico. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Il controllo negativo è stato preparato con cellule non trattate mentre come controllo positivo è stato utilizzato il Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF (Sigma), alla concentrazione 10 ng/ml. Le proteine testate sono:

Angiogenina Bovina (ANG) 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M;

- Lactogenina 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M;
- RnaseA 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M
- Peptidi triptici dell'angiogenina 10^{-8} M
- C-terminale umano 10^{-8} M.

In collaborazione con il Dipartimento di Anatomia e Fisiologia dell'Università di Padova si è eseguita una analisi quantitativa del saggio *in vitro* su Matrigel. Sono stati valutati i seguenti parametri:

- l'area cellulare in rapporto all'area totale
- la lunghezza delle estensioni cellulari
- il numero delle ramificazioni.
- Il numero di maglie chiuse.

Brevemente, dopo aver evidenziato i contorni, è stato applicato un filtro geometrico per rimuovere le strutture troppo piccole in modo da evidenziare la rete formata dalle cellule. L'area occupata dalle cellule endoteliali è stata ottenuta togliendo dall'area totale l'area occupata dalle maglie chiuse, ossia l'area all'interno delle strutture capillaro-simili formate dalle cellule. Dopo aver scheletrizzato l'immagine binaria, la lunghezza delle estensioni è stata calcolata come il numero totale dei *pixels* presenti lungo il perimetro cellulare. La lunghezza dei tubuli è stata stabilita tracciando una linea lungo ciascun tubulo e misurando la lunghezza della linea in *pixels*.

L'immagine binaria è stata ulteriormente processata per evidenziare i punti di ramificazione, utilizzati per caratterizzare i parametri topologici dell'organizzazione delle cellule endoteliali; sono state valutate anche le regioni delimitate dalle cellule (Ribatti D., 2003).

L'analisi statistica è stata condotta con il parametro *t di Student* ponendo il controllo non trattato come 100 e esprimendo l'area cellulare, la lunghezza delle estensioni cellulari, il numero di ramificazioni e delle maglie chiuse, come variazione percentuale rispetto al controllo.

2.11. Saggio di migrazione cellulare.

La valutazione delle proprietà chemotattiche delle proteine in esame è stata saggiata attraverso l'utilizzo della camera di Boyden (Boyden S.V., 1962) con opportune

modifiche. Tale apparato è formato da due camere separate da un filtro: la prima camera è costituita da un pozzetto di piastra *multiwells* da 24 (Becton Dickinson) mentre la seconda camera è formata da un *cell culture insert* (Becton Dickinson D, transparent PET Membrane). L'*insert* è provvisto di un filtro a porosità 8 μm che separa il pozzetto, in cui verrà posta la sostanza da testare, dall'interno dell'*insert*, dove verranno seminate le cellule, creando in tal modo un gradiente di concentrazione della sostanza da testare.

Sottopopolazioni di cellule HUVEC di II-III generazione sono state seminate in piastra condizionata con fibronectina $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in terreno MV₂ completo fino al raggiungimento dell' 80% di confluenza. Le cellule sono state staccate con soluzione di EDTA-Tripsina, e separate e a 1200 rpm per 5 min. Il pellet ottenuto è stato lavato per 2 volte con PBS 1X per eliminare il siero usato per la disattivazione della tripsina. Gli *inserts* sono stati inseriti in pozzetti di piastra da 24 e condizionati per una notte a 37°C con una soluzione di fibronectina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS 1X ponendo 300 μl nel pozzetto e 150 μl nell'*insert*. Al momento della semina tale soluzione è stata rimossa e le cellule sono state seminate in terreno MV base con 1% di siero FCS ad una densità di $7,5 \times 10^4$ cell/*insert* in un volume di 250 $\mu\text{l}/\text{pz}$. Nel pozzetto sono stati addizionati 500 μl di terreno base con 1% di siero FCS. Trascorse 2 ore dalla semina, nel pozzetto sono stati aggiunti i fattori da testare (Angiogenina, Lactogenina, RNase A 10^{-8} M, Peptide 1, 9, RCM-I, RCM-II e C-terminale umano 10^{-8} M). Siero FCS al 10% è stato utilizzato come controllo positivo. Le colture sono state poste ad incubare a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂. Dopo 22 ore dalla semina si è rimosso il terreno, fatto un lavaggio delicato in PBS 1X per immersione degli *inserts* nella soluzione salina tamponata. Gli *inserts* sono stati fissati per 8 min a -20°C con metanolo freddo. Le cellule che non hanno migrato sono state rimosse con un bastoncino di cotone, prima asciutto e poi imbevuto di PBS 1X. La membrana è stata rimossa dall'*insert* con un bisturi e montata su un vetrino portaoggetto con montante DAPI che consente di effettuare la colorazione dei nuclei. Per ciascun campione sono state acquisite immagini random di 5 campi utilizzando il microscopio a fluorescenza e un ingrandimento x400.

Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato. I dati di migrazione sono stati espressi come rapporto percentuale tra il numero di cellule che hanno migrato in presenza della sostanza chemotattica e numero di cellule che hanno migrato nel controllo non trattato.

2.12. Saggio di invasione.

Il saggio di invasione è stato condotto in modo parallelo a quello di migrazione usando però in questo caso degli *inserts* preconditionati con Matrigel[®] (Becton Dickinson, Biocoat[™] Growth Factor Reduced MATRIGEL[™] Invasion Chamber). La semina delle cellule HUVEC, così come il trattamento con le proteine, sono stati eseguiti utilizzando lo stesso protocollo messo a punto per il saggio di migrazione.

Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato. L'indice di invasione viene espresso come rapporto percentuale tra media del numero delle cellule che hanno migrato in presenza del Matrigel[®] e la media del numero delle cellule che hanno migrato in pozzetti non condizionati con Matrigel[®].

2.13. Saggio di angiogenesi *in vivo* su membrana corionallantoidea di pollo (CAM).

Il saggio di angiogenesi *in vivo* è stato eseguito in collaborazione con il Dipartimento di Anatomia Umana e Istologia dell'Università degli Studi di Bari.

Uova di pollo fertilizzate White Leghorn sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Dopo 3 giorni dall'inizio dell'embriogenesi, si eseguita un'incisione sul guscio e sono stati prelevati 2-3 ml di albume, in modo tale da separare la membrana allantoidea dal guscio. L'apertura è stata richiusa con un vetrino e le uova sono state riposte incubatore. Dopo 8 giorni di incubazione sulla CAM di ciascun embrione è stata posta una spugnetta, della dimensione di 1 mm³, imbevuta della sostanza da testare. Sono state saggiate l'Angiogenina e la Lactogenina 10⁻⁸M mentre come controllo negativo si è utilizzato del PBS 1X. Trascorse 96 ore dall'inizio del trattamento con le proteine, le uova sono state fotografate *in ovo* con uno stereomicroscopio Zeiss SR dotato di fotocamera MC63, osservando la zona circostante la spugnetta, allo scopo di contare il numero di vasi neoformati aventi un calibro inferiore a 10 µm. Ciascuna analisi è stata condotta su almeno sei embrioni.

2.14. Sistemi di coltura tridimensionali.

Si è valutato il possibile effetto dell'angiogenina bovina e del suo peptide N-terminale P1 in un sistema di coltura cellulare tridimensionali, andando ad apprezzare l'adesione e l'eventuale formazioni di strutture capillari. Per tale scopo si sono utilizzati due tipi di *scaffold*: il policaprolattone e il Puramatrix (Becton Dickinson).

2.14.1.1. Preparazione della matrice di policaprolattone.

Il policaprolattone (PCL) è un poliestere alifatico, lineare e semicristallino, ottenuto per polimerizzazione del monomero ϵ -caprolattone (Coombes *et al.*,2004). Le matrici di PCL, utilizzate in questo studio, sono state realizzate utilizzando la tecnica dell'inversione di fase, che consente di ottenere matrici con una porosità del 75-80% circa.

La soluzione di PCL è stata preparata sciogliendo 85 g di polimero (Sigma) in 5 g di tetraidrofurano (Sigma, THF). Sono stati addizionati 1.02 g di saccarosio (Carlo Erba), pari al 15% del polimero, precedentemente polverizzati con mulino e setacciati per ottenere particelle con un diametro inferiore a 100 μm . La soluzione è stata posta in agitazione per circa 5-10 min e quindi si è proseguito con l'inversione di fase, ottenuta per aggiunta del 50% di acqua milliQ, rispetto al volume totale della soluzione. L'acqua consente la solubilizzazione del saccarosio e favorisce la formazione di un gel. Questo viene alloggiato in un apposito contenitore e posto a -20°C per una notte. Sul prodotto ottenuto sono stati eseguiti 3 lavaggi, di due ore ciascuno, con alcool assoluto (Sigma) freddo a -20°C . La matrice ottenuta viene quindi posta in alcool assoluto a -20°C per una notte. L'alcool assoluto viene quindi sostituito con acqua milliQ e il preparato viene lasciato per una notte a $+4^{\circ}\text{C}$. I cilindri di PCL ottenuti sono stati sezionati con un microtomo Leitz 1600, con lama circolare raffreddata ad acqua, per ottenere dei dischi adatti alla semina delle popolazioni cellulari.

2.14.1.2. Semina di cellule HUVEC su PLC, studio di adesione e vitalità cellulare.

I dischetti di PLC, sterilizzati in alcool al 70% e poi conservati in PBS 1X, sono stati tagliati con un bisturi per poter essere alloggiati in un *insert* millicell per piastra da 24 pozzetti (Millipore), e condizionati con terreno di coltura MV base, siero FCS al 10% per una notte a 37°C . In ogni pozzetto sono stati addizionati 400 μl di terreno base con FCS al 2% e 15×10^4 HUVEC di IV generazione sono state seminate su ciascun dischetto nella minima quantità di terreno necessaria. Dopo aver posto la piastra in incubatore per 20-30 min, sono stati aggiunti in ciascun *insert* 200 μl di terreno base con FCS al 2% addizionati di angiogenina o $P1 \ 10^{-8}\text{M}$. Come controllo si sono allestite delle colture su matrice in terreno base e siero.

Per valutare l'adesione e la vitalità cellulare si sono eseguiti dei saggi di vitalità con MTS dopo 0, 24, 72 ore e 7 giorni dalla semina.

2.14.1.3. Analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione e analisi istologica.

Le matrici di PCL sono state fissate, dopo 1, 3 e 7 giorni dalla semina di cellule HUVEC, per essere analizzate mediante microscopia elettronica (SEM) o indagine istologica.

I campioni per l'analisi al SEM sono stati lavati in PBS 1X, fissati in tampone cacodilato (Merk) 0.01 M pH 7.2 e glutaraldeide (Merk) al 3% e conservati a +4°C fino al momento della disidratazione. Quest'ultima è stata preceduta da tre lavaggi in tampone cacodilato 0.01M. La disidratazione è stata eseguita per immersione in scala ascendente di alcoli (30%, 50%, 70%, 80%, 90%) per 1 ora a temperatura ambiente, sotto agitazione e per una notte in alcool al 95%. I campioni, dopo un passaggio in alcool assoluto, sono stati sottoposti a Critical Point Drying e metallizzate con oro. Le matrici sono state osservate con microscopio elettronico a scansione (modello JSM Jeol 6490) in dotazione presso il centro interdipartimentale di servizi dell'Università di Padova CUGAS

Per l'analisi istologica i dischetti di PCL, trascorsi 1, 3 e 7 giorni dalla semina cellulare, sono stati fissati in formalina al 10% in PBS 1X. Si è quindi eseguita la disidratazione in scala ascendente di alcoli (70%, 80%, 95%, 100% e xilolo) immergendo i campioni in ciascun alcool per 2 ore sotto agitazione. I campioni disidratati sono stati inclusi in paraffina (Fluka) fusa a 60°C e mantenuti a temperatura ambiente per una notte per consentirne la solidificazione. I campioni di paraffina sono quindi stati sezionati al microtomo (Histoslide 2000, Reichertjung) per ottenere delle fette di 5 µm di spessore. I preparati sono stati reidratati in scala ascendente di alcoli e colorati con Ematossilina per 8 min e Eosina (Sigma) per 30'. I vetrini, dopo essere stati disidratati in scala ascendente di alcoli, sono stati montati con montante Eukitt (Sigma) e osservati al microscopio ottico in contrasto di fase.

2.14.2.1. Sistema di coltura tridimensionale in Puramatrix.

Per l'incapsulazione in Puramatrix si sono utilizzate cellule HUVEC sino alla IV generazione. Le colture cellulari, all'80-90% di confluenza, sono state staccate con tripsina e centrifugate per 5 min a 1200 rpm. Sulla sospensione cellulare si sono eseguiti 2 lavaggi con una soluzione sterile di saccarosio al 10% in Acqua milliQ. Per diminuire la viscosità della soluzione madre, il Puramatrix al'1% è stato sonicato per 30 min. Si è quindi preparata una soluzione allo 0.5% di Puramatrix in saccarosio al 20%. Le cellule (10^6 cell/ml), risospese in saccarosio al 10%, sono state incapsulate in Puramatrix allo 0.5%, aliquotando 100 μ l di sospensione cellulare su membrane di *insert* (Millipore) alloggiati in piastra *multiwells* da 24 pozzetti contenente 200 μ l di terreno MV base con FCS al 2%. L'assemblaggio del gel è stato condotto seguendo le istruzioni del produttore. Le colture cellulari sono state mantenute in terreno base MV/ siero FCS al 2% addizionati di Angiogenina o P1 10^{-8} M e osservate quotidianamente al microscopio ottico in campo chiaro.

2.14.2.2. Saggio di vitalità cellulare.

Sulle colture cellulari incapsulate in Puramatrix e incubate con angiogenina o P1 si è eseguito un saggio di vitalità cellulare utilizzando il sale 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolobromuro (MTT), fornito dalla Sigma. Analogamente al saggio MTS, questo tipo di analisi sfrutta la riduzione, ad opera delle deidrogenasi mitocondriali, del sale di tetrazolo, giallo, in cristalli di formazano, viola. Il prodotto della reazione è insolubile e viene quindi estratto con un solvente organico, il propan-2-olo acido (0.04 M HCl in propan-2-olo), e l'assorbanza del surnatante, misurata a 570 nm con un lettore ELISA di micropiastre, è direttamente proporzionale alla vitalità delle colture cellulari.

Dopo 1, 3 e 7 giorni dall'incapsulazione è stato allontanato il surnatante cellulare e i campioni sono stati incubati per 2 ore a 37°C con 1 ml di terreno base con 10% di MTT (soluzione madre 5 mg/ml). Al termine del periodo di incubazione, dopo aver centrifugato i campioni per 8 min a 1500 rpm per eliminare il surnatante, si sono aggiunti, a ciascun campione, 200 μ l di isopropanolo (Carlo Erba) acido e si è posto in agitazione per 15 min a RT. Dopo centrifugazione, a 3000 rpm per 10 min, i surnatanti sono stati aliquotati in una piastra *multiwells* da 96 pozzetti e la loro assorbanza è stata letta a 570 nm usando come lunghezza d'onda di riferimento 690 nm. Come controllo si

è utilizzato un campione non trattato con Angiogenina o P1 mentre come bianco si è adottato un campione con solo Puramatrix[®]. L'analisi statistica è stata effettuata tramite *t-test* di Student.

2.15. Valutazione della citotossicità su colture cellulari non endoteliali.

La possibile azione citotossica di Angiogenina, Lactogenina e RNase A è stata valutata su cellule di linea tumorali quali MCF-7, HT-29, A431 e 3T3-L1 e su colture primarie di preadipociti. Su tutte le colture è stato eseguito il saggio di vitalità cellulare MTS (cfr. paragrafo 2.8.1) dopo trattamento con le proteine, mentre su 3T3-L1 e MCF-7 sono stati eseguiti anche saggi di valutazione della necrosi e dell'apoptosi (cfr. paragrafo 2.8.2 e 2.8.3)

2.16. Analisi computazione dell'interazione angiogenina bovina –inibitore RNase.

I file di allineamento delle strutture primarie delle proteine sono stati realizzati con il programma CLUSTAL W disponibile presso l'European Bioinformatics Institute dell'EMBL. Le rappresentazioni schematiche delle strutture tridimensionali delle proteine sono state prodotte mediante l'utilizzo del software Weblab Viewer Pro 4.0 (Molecular Simulation Inc., USA). L'analisi computazionale e la comparazione di strutture proteiche è stata eseguita in collaborazione con il professor Vincenzo De Filippis dell'Università degli Studi di Padova.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE.

3.1 Isolamento e purificazione delle proteine da latte vaccino.

Angiogenina e Lactogenina sono proteine ad elevato punto isoelettrico presenti nel latte bovino intero in modesta quantità (mg/l) rispetto ad altre proteine, come le caseine, che vi si trovano in quantità di diversi g/l. La loro purificazione prevede una prima fase di precipitazione in ambiente acido della maggior parte delle proteine, soprattutto caseine, che, coagulando, inglobano anche la frazione lipidica presente nel latte. Seguono due frazionamenti a concentrazione di ammonio solfato crescenti, rispettivamente 1.8 M e 3.6 M a pH neutro. Dalla salatura a 3.6 M si ha la precipitazione di modeste quantità di proteine tra le quali sono compresa anche l'Angiogenina e la Lactogenina. Il precipitato viene risospeso mediante dialisi contro acqua e quindi sottoposto a stadi cromatografici di scambio ionico e di RP-HPLC fino all'ottenimento delle proteine purificate.

Al fine di rimuovere la maggior parte di proteine non di interesse, e cioè con un pI neutro-acido, si è eseguita una cromatografia di scambio ionico, con resina tradizionale, caricando il dializzato su una colonna di SP-Sepharose FF ed eluendo le proteine basiche mediante un gradiente a forza ionica crescente. La frazione indicata in Figura 3.1 è stata raccolta e riunita ad altre ottenute da cromatografie analoghe.

Il liquido recuperato è stato nuovamente dializzato per diminuirne l'elevata forza ionica e quindi sottoposto a cromatografia ionica su colonna Mono-S. Solo usando questa colonna cromatografica è stato possibile risolvere le due proteine di interesse, Angiogenina e Lactogenina, in quanto queste coeluiscono in cromatografia su fase inversa in qualsiasi condizione di gradiente. Un cromatogramma tipico è riportato in Figura 3.2.

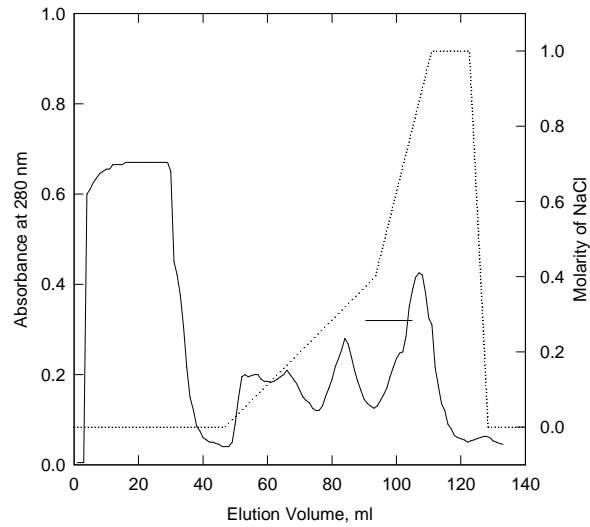


Figura 3.1. Cromatogramma della corsa preparativa del dializzato applicato su colonna SP-Sepharose FF. La colonna impaccata con la resina SP-Sepharose FF aveva dimensioni 1 cm di diametro per 10 cm di lunghezza. Il caricamento del dializzato è stato effettuato con flusso di 4 ml/min. mentre la successiva eluizione è stata ottenuta applicando il gradiente SP-SEPH. La posizione nel cromatogramma dove eluiscono le proteine Lactogenina e Angiogenina è indicata in figura; questa porzione di eluato è stata raccolta per i successivi trattamenti.

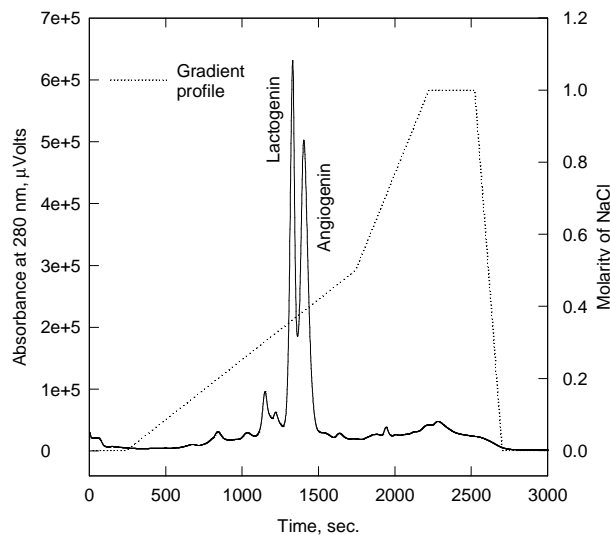


Figura 3.2. Separazione mediante cromatografia su colonna Mono-S delle proteine Lactogenina e Angiogenina. Un' aliquota di 6 ml di dializzato è stata caricata su colonna Mono S (dimensioni 6 mm x 6 cm) equilibrata con tampone NaP 20 mM, pH 7.70 ed eluita con il gradiente indicato in figura di NaP 20 mM, pH 7.70, contenente NaCl 1 M. Il flusso di lavoro era di 0.60 ml/min. e si è operato a temperatura ambiente con rivelazione dell'eluato a 280 nm. Sia il picco della Lactogenina che quello dell' Angiogenina sono stati raccolti per un'ulteriore purificazione.

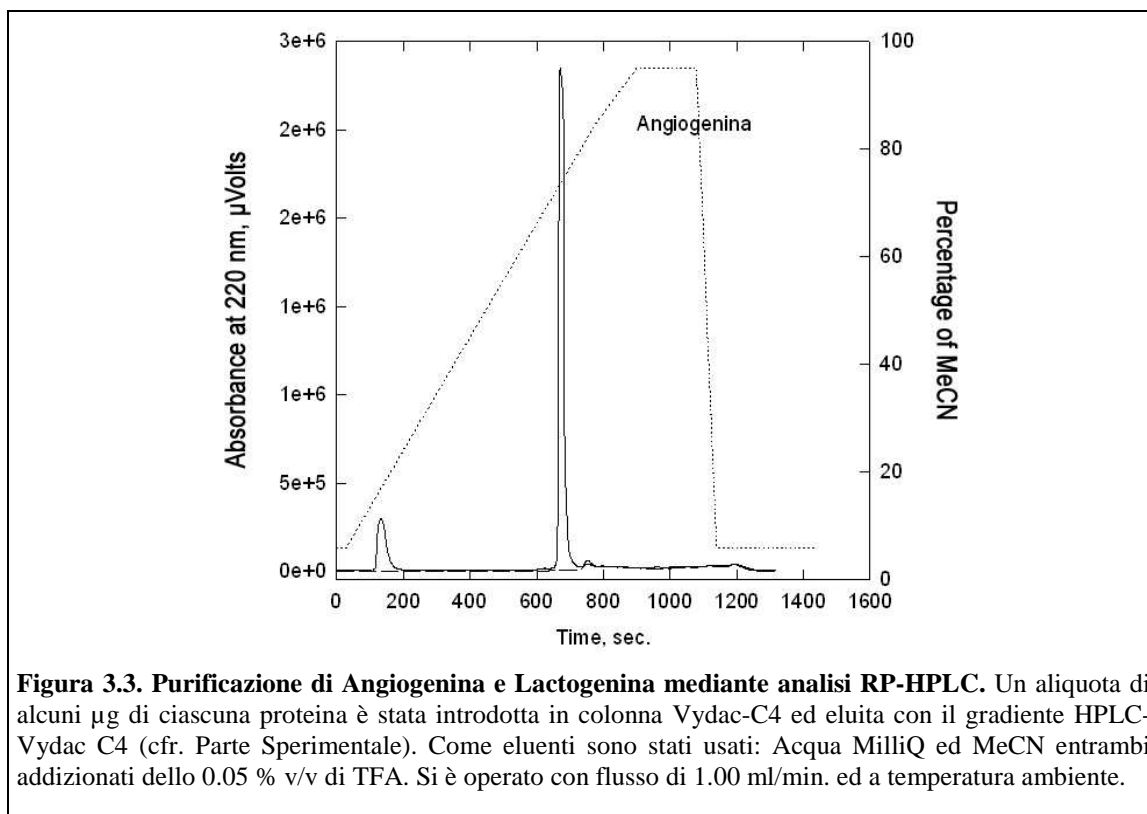
Lo stadio successivo di cromatografia RP su colonna Vydac C4 ha lo scopo di desalificare le frazioni separate e di purificarle ulteriormente. La cromatografia RP-HPLC è stata condotta utilizzando come eluenti acqua ed acetonitrile addizionati di TFA (pH 2.2). Tali condizioni non sono certamente le più adatte per preservare l'attività enzimatica, a causa del pH acido e dell'azione denaturante dell'acetonitrile. Tuttavia, nel caso delle proteine oggetto di questo studio, tale tipo di cromatografia è molto efficace per la purificazione e non comporta una denaturazione irreversibile.

In Figura 3.3 sono riportati due tipici cromatogrammi in fase inversa; ciascuna proteina produce un unico picco cromatografico che, dopo essere stato raccolto, viene liofilizzato in centrifuga sotto vuoto Savant. Il materiale liofilizzato viene conservato in freezer a -20°C.

La RNase-A non è stata recuperata dal latte vaccino ma è stata acquistata in forma liofilizzata dalla Sigma ed è di provenienza pancreatica. E' risultato da misure di spettrometria di massa effettuate in Tesi precedenti (Guerra, 1999-2000) che la forma di RNase-A isolata dal latte ha esattamente lo stesso peso molecolare di quella pancreatica.

3.2. Determinazione del peso molecolare tramite spettrometria di massa ESI-TOF.

Il peso molecolare accurato delle proteine in esame è stato determinato mediante spettrometria di massa con l'utilizzo di uno spettrometro API-TOF Mariner. Tale strumento prevede la formazione degli ioni molecolari, attraverso la tecnica di ionizzazione ESI, a partire da una soluzione che viene iniettata in un tubo di acciaio avente un diametro di 100 µm e a cui è applicato un potenziale di 4000 Volts. L'evaporazione del solvente, assistita da un flusso di azoto, comporta una produzione di ioni del soluto, nel nostro caso ioni molecolari della proteina con diverso numero di cariche positive legate che, sotto l'azione del campo elettrico e del vuoto, penetrano attraverso un foro di 0.5 mm nella sezione detta interfaccia dello strumento dove un quadrupolo li focalizza per poi entrare nell'analizzatore a tempo di volo TOF. L'analizzatore rileva in una scala temporale risolta fino ai nanosecondi i tempi di arrivo dei vari ioni sul rivelatore; dai tempi di volo degli ioni un elaboratore calcola i valori di m/z che vengono registrati su file e presentati graficamente.



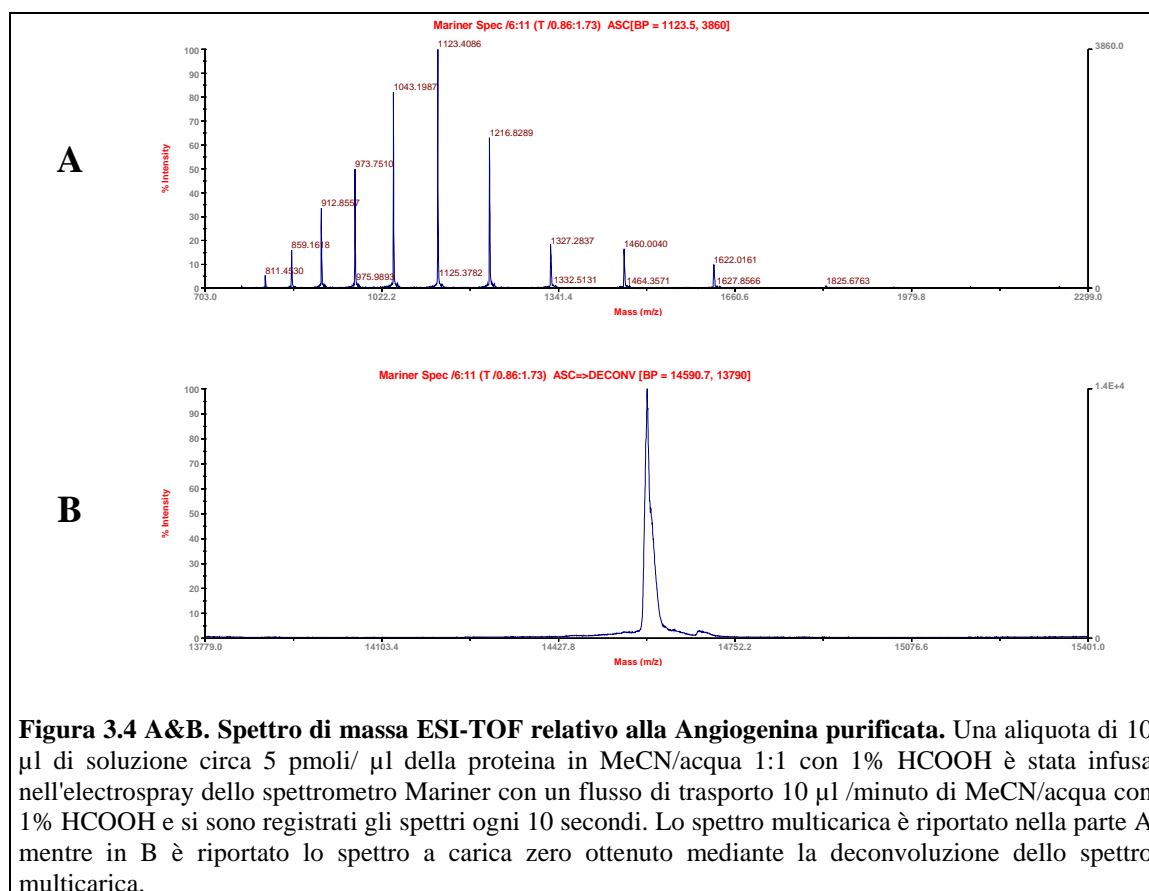
Per l'analisi sono state allestite delle soluzioni per ciascuna proteina aventi una concentrazione di circa 5 pmoli/ μl in solvente costituito da Acetonitrile/Acqua MilliQ 1:1 con 1% di acido formico. In Figura 3.4 è riportato lo spettro multicarica prodotto dall'Angiogenina, parte A, mentre nella parte B della stessa figura è riportato lo spettro deconvoluto.

Analogamente in Figura 3.5, parte A e 3.5 parte B sono riportati rispettivamente gli spettri multicarica e deconvoluto della Lactogenina e in Figura 3.6, parte A, e 3.6, parte B, rispettivamente gli spettri multicarica e deconvoluto ottenuti dalla Ribonucleasi A.

Le masse molecolari ottenute sperimentalmente per le tre proteine sono riportate in Tabella 3.1. A commento dei dati ricavati si può rilevare una buona concordanza tra i dati di massa ottenuti sperimentalmente e quelli ricavati dalla somma dei pesi molecolari dei singoli amminoacidi che costituiscono le proteine.

Proteina	PM ESI-TOF	PM dalla Sequenza
Angiogenina	14591	14593.4
Lactogenina	13888,7	13887.6
Ribonucleasi A	13685	13690.3

Tabella 3.1. Confronto tra i dati di PM ricavati dalle masse dalla struttura primaria.



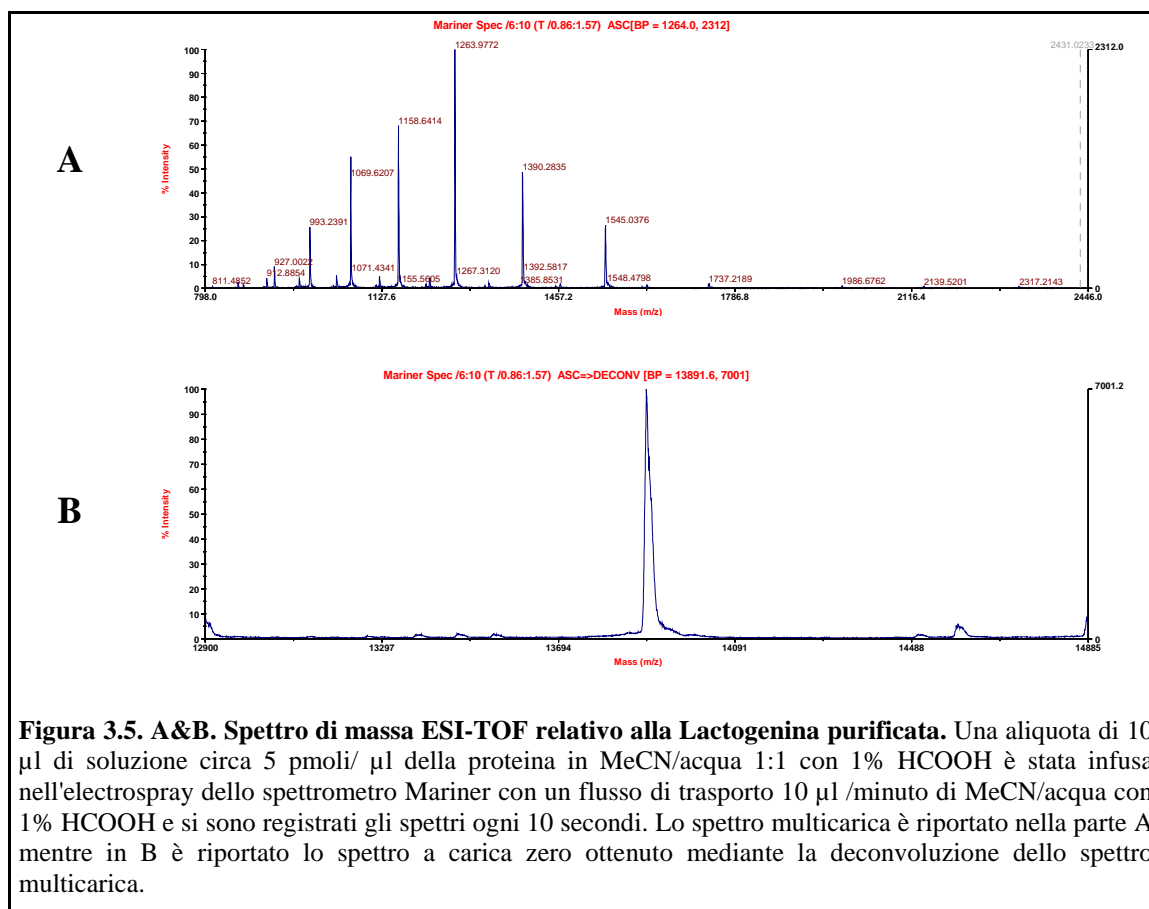


Figura 3.5. A&B. Spettro di massa ESI-TOF relativo alla Lactogenina purificata. Una aliquota di 10 μl di soluzione circa 5 pmoli/ μl della proteina in MeCN/acqua 1:1 con 1% HCOOH è stata infusa nell'electrospray dello spettrometro Mariner con un flusso di trasporto 10 μl /minuto di MeCN/acqua con 1% HCOOH e si sono registrati gli spettri ogni 10 secondi. Lo spettro multicarica è riportato nella parte A mentre in B è riportato lo spettro a carica zero ottenuto mediante la deconvoluzione dello spettro multicarica.

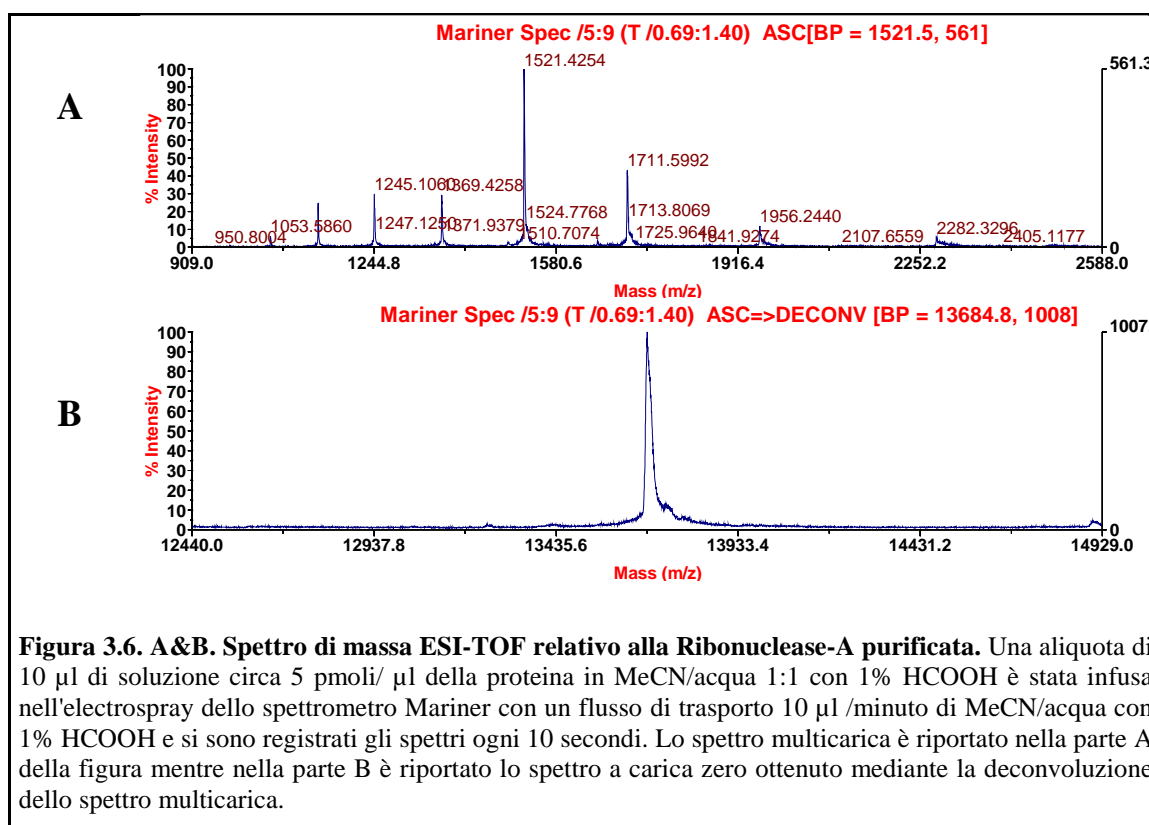


Figura 3.6. A&B. Spettro di massa ESI-TOF relativo alla Ribonuclease-A purificata. Una aliquota di 10 μ l di soluzione circa 5 pmoli/ μ l della proteina in MeCN/acqua 1:1 con 1% HCOOH è stata infusa nell'elettrospray dello spettrometro Mariner con un flusso di trasporto 10 μ l /minuto di MeCN/acqua con 1% HCOOH e si sono registrati gli spettri ogni 10 secondi. Lo spettro multicarica è riportato nella parte A della figura mentre nella parte B è riportato lo spettro a carica zero ottenuto mediante la deconvoluzione dello spettro multicarica.

3.3. Analisi Spettroscopiche.

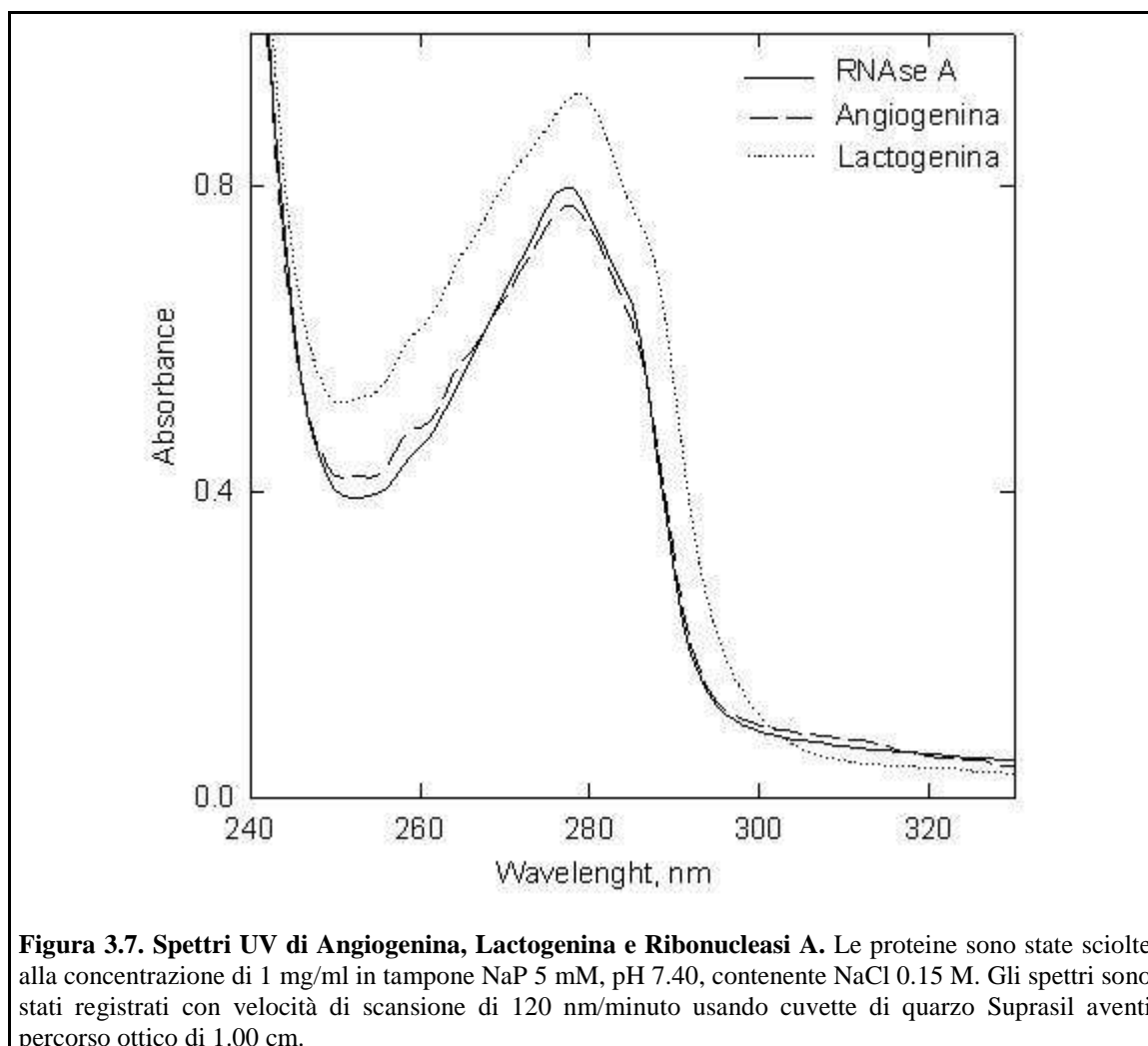
L'analisi spettroscopica ci fornisce informazioni circa la struttura secondaria e terziaria delle proteine. A tale scopo sono state condotte delle analisi di spettroscopia di assorbimento UV, normale e in derivata seconda, spettroscopia di emissione di fluorescenza e dicroismo circolare.

3.3.1. Spettri di assorbimento UV.

Per ciascuna delle tre proteine è stata allestita una soluzione madre, a partire dal materiale liofilizzato purificato su fase inversa con colonna Vydac C4 (cfr. Parte Sperimentale), alla concentrazione di circa 1 mg/ml da usarsi per gli studi spettroscopici. Gli spettri di assorbimento UV di Lactogenina, Angiogenina e Ribonucleasi A sono riportati in Figura 3.7 e corrispondono alla zona spettrale 330-240 nm. In questa zona l'assorbimento della radiazione ultravioletta è dovuta principalmente ai cromofori tirosina, triptofano, fenilalanina e ponti a disolfuro. Dagli spettri registrati emerge che la Lactogenina presenta un segnale di assorbanza di maggiore intensità, a

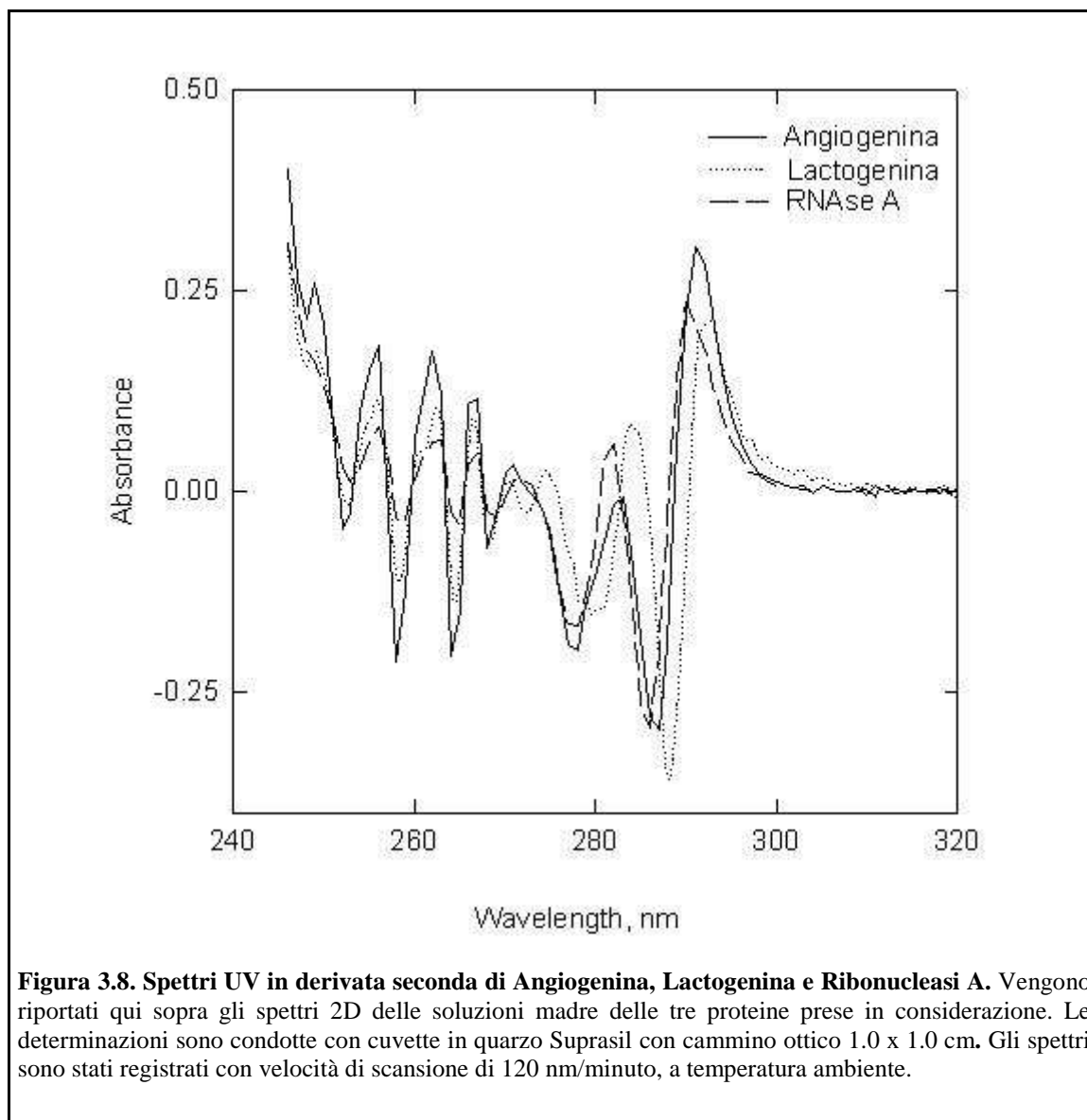
279 nm, rispetto a RNase A e Angiogenina, ed inoltre esibisce una spalla più pronunciata a 292 nm, indicativa della probabile presenza nella struttura primaria di residui di triptofano. Angiogenina e Ribonuclease A mostrano degli spettri UV quasi sovrapponibili con un massimo di assorbanza a 277 nm. I coefficienti di assorbività a 280 nm di soluzioni 1 mg/ml si ricavano dalla equazione di Edelhoch (come riportato nella Parte Sperimentale) noto il numero di residui di tirosina, triptofano e cistine presenti nella sequenza della proteina in esame. Nel caso dell'Angiogenina bovina essa contiene 6 tirosine, nessun triptofano e 3 cistine mentre sono rispettivamente 6, 0 e 4 nella RNase A. Invece, non disponendo della sequenza completa della Lactogenina (Ng *et al.*, 1999) la soluzione è stata preparata pesando accuratamente 1.00 mg di proteina liofilizzata e sciogliendoli in 1.00 ml di tampone. L'assorbanza di questa soluzione a 280 nm risulta essere 0.721 da cui, usando l'equazione di Edelhoch a ritroso, è stato stimato un contenuto di 2 residui di tirosina e 1 residuo di triptofano per molecola di proteina, essendo a noi noto il PM accurato della Lactogenina grazie alla spettrometria di massa. L'assorbanza di una soluzione 1 mg/ml di RNase A è 0.596 mentre quella di una soluzione 1 mg/ml di Angiogenina 0.551.

Mediante la spettrometria di assorbimento UV in derivata seconda è possibile porre in evidenza non solo la presenza di cromofori, come tirosina e triptofano, ma anche la loro eventuale esposizione ad un intorno chimico di tipo polare. Quando sussiste la condizione appena descritta, si assiste ad una traslazione delle bande di assorbimento verso lunghezze d'onda alte (bassa energia) mentre qualora i residui cromofori siano esposti ad un intorno chimico apolare e idrofobico si ha uno spostamento delle bande verso lunghezze d'onda minori (alta energia). Nel nostro caso, dall'analisi riportata in Figura 3.8, si può notare come l'andamento degli spettri di RNase A e Angiogenina sia quasi sovrapponibile con picchi intensi a 257-260 nm per le fenilalanine e a 270 nm per i residui delle tirosine. Il segnale di assorbanza prodotto dalla Lactogenina presenta invece uno spostamento verso lunghezze d'onda maggiori, con picco di massima intensità a 294 nm, indicativo della probabile presenza di residui di triptofano, all'interno della sequenza della proteina, situati in un intorno polare.



3.3.2. Spettri in emissione di fluorescenza.

La spettroscopia di fluorescenza in emissione è una tecnica molto sensibile che ci permette di ottenere informazioni sulla struttura terziaria di una proteina perché rileva la presenza di fluorofori intrinseci quali tirosina e triptofano. La lunghezza d'onda di emissione della tirosina non è influenzata dalla polarità dell'intorno in cui il fluoroforo fenolico viene a trovarsi mentre risulta che il nucleo indolico del triptofano è sensibile all'intorno e si osserva una emissione che può situarsi tra circa 320 nm e 360 nm, in relazione diretta con il crescere della polarità dell'intorno stesso. E' possibile anche osservare variazioni della resa quantica, cioè nel numero di fotoni emessi in rapporto a quelli assorbiti; sulla base dell'intorno chimico. Risulta quindi che tirosina e triptofano,



se presenti nella molecola, costituiscono sonde utili per lo studio della struttura terziaria delle proteine tramite misure di fluorescenza.

Le analisi fluorimetriche in emissione sono state effettuate sulle soluzioni delle tre proteine Lactogenina, Angiogenina e RNaseA, dopo diluizione con tampone NaP 5 mM, pH 7.40, contenente NaCl 0.150 M, fino ad assorbanza a 280 nm inferiore a 0.10 per evitare fenomeni di auto-assorbimento che deformerebbero gli spettri di emissione. Gli spettri di fluorescenza delle tre proteine sono riportati in Figura 3.9 e non sono stati corretti per la risposta del rivelatore e l'emissione della sorgente.

Lo spettro prodotto dalla Lactogenina si differenzia da quello delle altre due proteine perché presenta una banda molto intensa ad una λ di 360 nm che rivela la

presenza di residui di triptofano all'interno della sequenza della Lactogenina e invece assenti nella RNase A e nell'Angiogenina. Inoltre lo spostamento di tale banda verso lunghezze d'onda maggiori è indicativo di una completa esposizione al solvente acquoso da parte del residuo indolico.

Gli spettri ottenuti da Angiogenina e RNase A sono invece caratterizzati da una banda di emissione a circa 306 nm, dovuta ai residui di tirosina, banda che per la Lactogenina non è visibile a causa del fenomeno di trasferimento energetico tra tirosina e triptofano, che comporta la soppressione della banda dovuta alla tirosina.

3.3.4. Spettri di Dicroismo Circolare .

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica basata sulla differenza di assorbimento delle due componenti della luce polarizzata da parte di una sostanza chirale. Questa metodica viene sfruttata per ottenere informazioni riguardanti la struttura secondaria e terziaria di proteine e polipeptidi in soluzione. Il segnale rilevato nel lontano UV (180-250 nm) è dovuto all'assorbimento dei legami peptidici e fornisce informazioni sulla struttura secondaria di una proteina (α -elica, struttura- β e struttura non-ordinata) mentre il segnale nel vicino UV (250-350 nm) dà indicazioni sulla struttura terziaria della proteina.

In Figura 3.10.A sono riportati gli spettri registrati nel lontano UV. Le tre proteine producono degli spettri simili sia per l'andamento che per il valore di ellitticità per residuo medio. La banda principale ha ellitticità negativa con minimo a circa 207 nm e spalla a 220 nm. Questo indica che le proteine presentano una struttura secondaria comparabile con un modesto contenuto di α -elica, quantificabile mediante l'utilizzo dell'equazione di Fasman (Greenfield, 1969). In particolare si è calcolato per le tre proteine il seguente contenuto % in α -elica: 5.4 % per Lactogenina, 8.0 % per Angiogenina e 12.1 % per RNase A.

Analogamente a quanto descritto in precedenza per gli spettri di assorbimento UV e emissione in fluorescenza esiste una chiara differenza anche tra gli spettri dicroici nel vicino UV di Angiogenina e RNase A rispetto a Lactogenina. Come riportato in Figura 3.10.B, le prime due proteine sono caratterizzate da un andamento simile del segnale, con bande tra 270 e 285 nm corrispondenti ai residui di tirosina. La Lactogenina presenta invece uno spettro caratteristico, con banda attorno a 290-300 nm,

che rivela la presenza di tirosine e triptofano. Generalmente l'assorbimento del ponte disolfuro è debole, ma può generare un segnale dicroico intenso intorno a 250 nm.

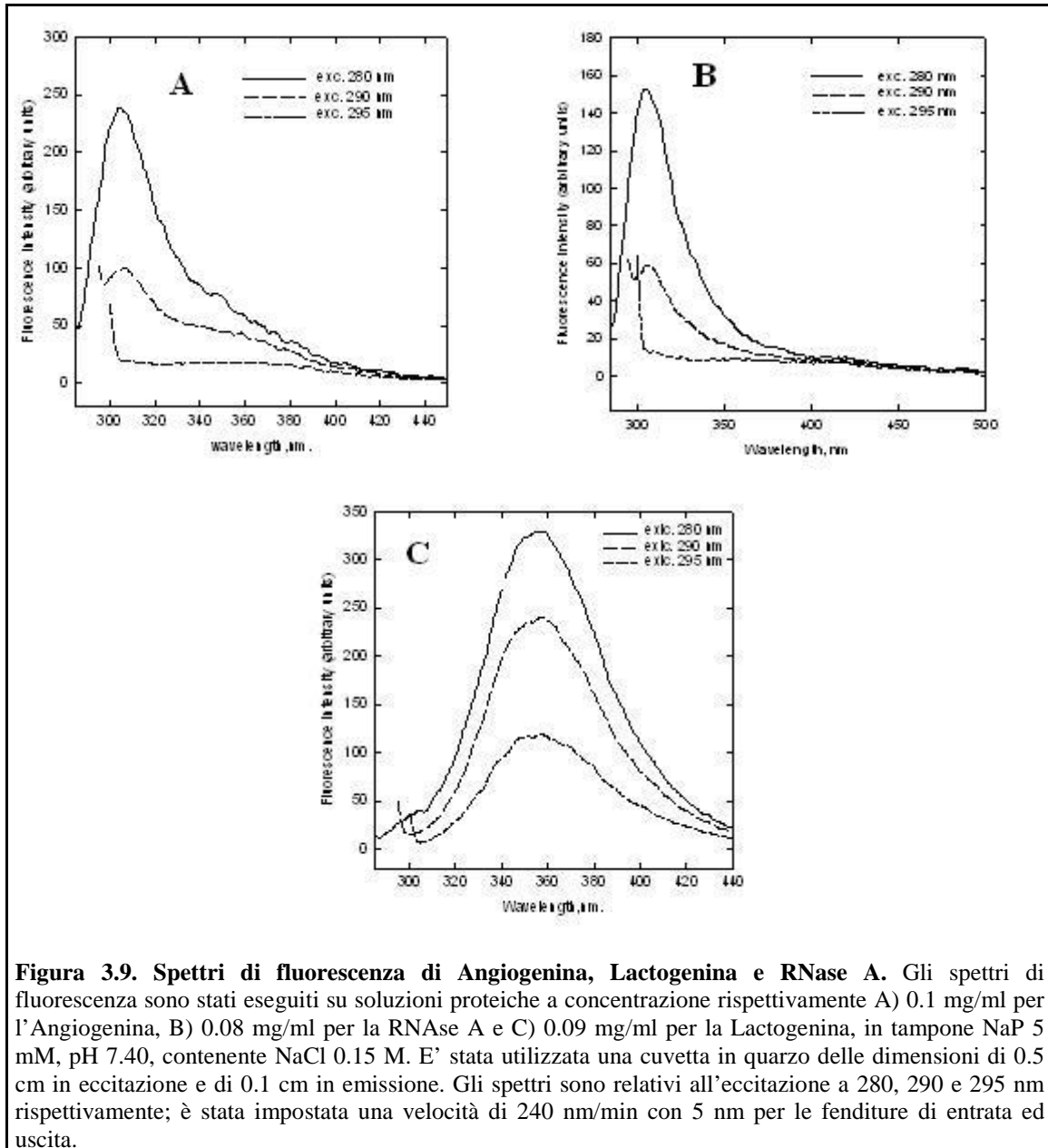
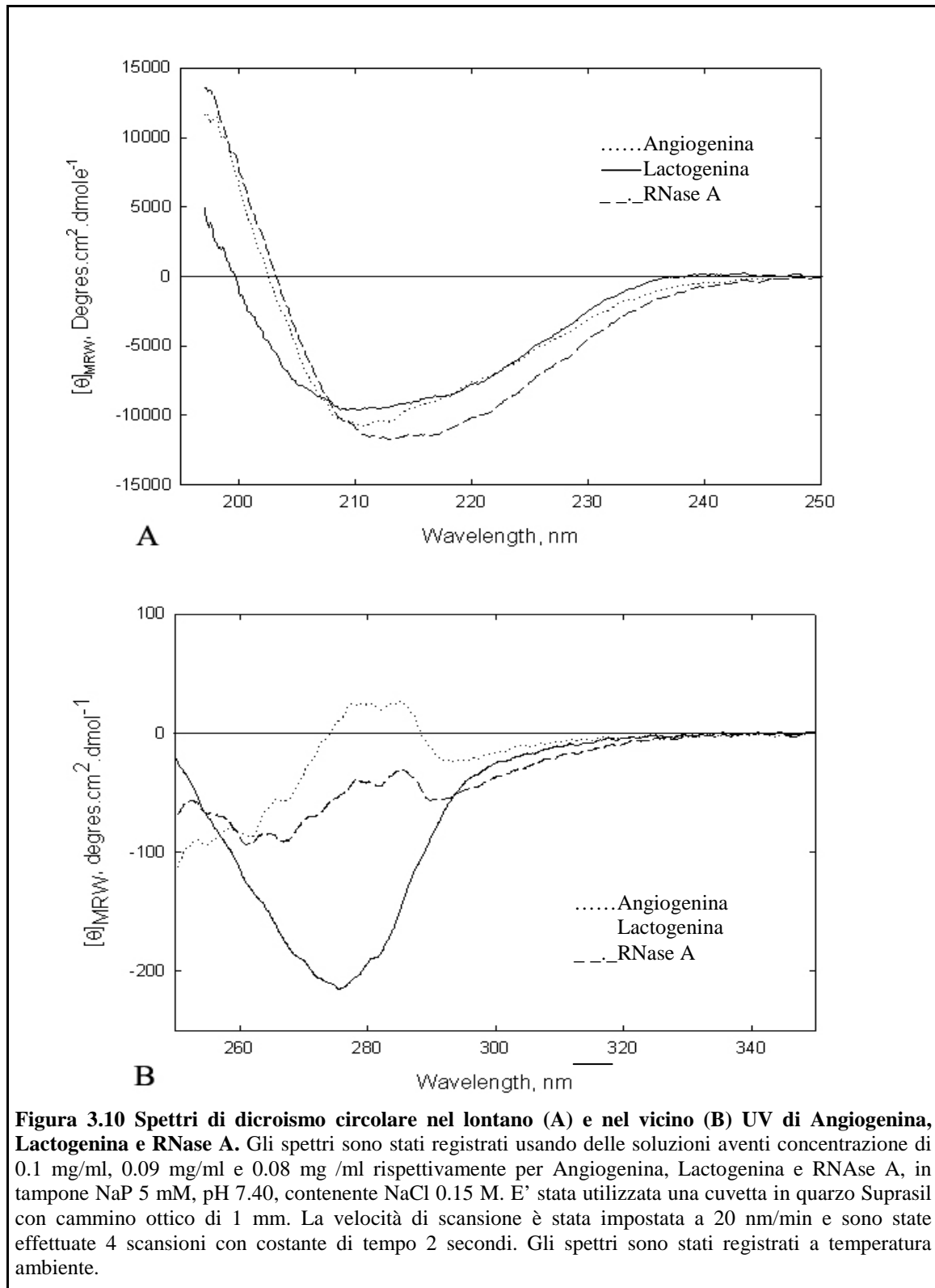


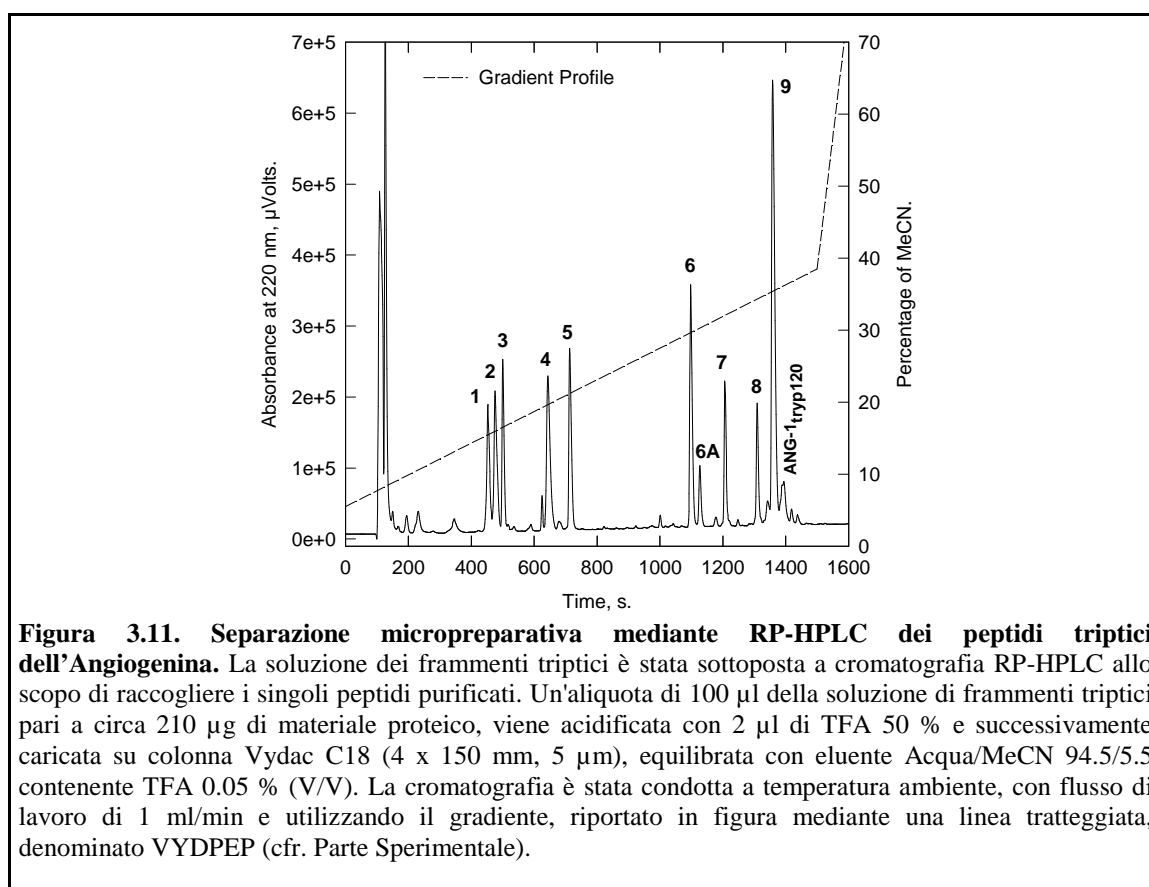
Figura 3.9. Spettri di fluorescenza di Angiogenina, Lactogenina e RNase A. Gli spettri di fluorescenza sono stati eseguiti su soluzioni proteiche a concentrazione rispettivamente A) 0.1 mg/ml per l'Angiogenina, B) 0.08 mg/ml per la RNase A e C) 0.09 mg/ml per la Lactogenina, in tampone NaP 5 mM, pH 7.40, contenente NaCl 0.15 M. E' stata utilizzata una cuvetta in quarzo delle dimensioni di 0.5 cm in eccitazione e di 0.1 cm in emissione. Gli spettri sono relativi all'eccitazione a 280, 290 e 295 nm rispettivamente; è stata impostata una velocità di 240 nm/min con 5 nm per le fenditure di entrata ed uscita.



3.4.1 Frammentazione dell' Angiogenina con tripsina immobilizzata su Sepharose-4B.

Allo scopo di individuare porzioni della proteina Angiogenina responsabili dell'attività biologica si è allestito un esperimento di proteolisi con tripsina. I peptidi triptici, ottenuti dopo due ore di digestione enzimatica a temperatura ambiente, sono stati purificati mediante cromatografia RP-HPLC su colonna Vydac C-18. In Figura 3.11 è riportato un tipico cromatogramma nel quale ciascun picco è stato nominato in base al tempo di eluizione.

Ogni frazione raccolta è stata liofilizzata e sottoposto a controllo mediante spettrometria di massa. In precedenti lavori di tesi (Parcianello 2000 e Fant, 2003) sono stati studiati i peptidi attribuendo a ciascuno una massa molecolare e la corrispondente sequenza nella struttura primaria della proteina. In tabella 3.2 sono riportate le attribuzioni di sequenza e di massa per ciascun peptide.



Tra i peptidi ottenuti il numero 4, 8 e 9 contengono un ponte disolfuro. Il peptide 1 (P1) corrisponde alla porzione N-terminale della proteina ed è formato da 6 amminoacidi. Il peptide 9 (P9) è costituito da due frammenti legati da un ponte disolfuro tra le cisterne 58 e 108: il frammento 103-124 corrisponde alla porzione C-terminale della proteina.

Peptidi da Vydac C18	Massa Sperimentale Monoisotopica MH ⁺	Massa Teorica MH ⁺	Sequenza in ANG-1	Sequenza monolettera
1	767.33	767.34	1-6	AQDDYR
2	734.35	734.36	62-67	NGQPYR
3	898.40	898.40	95-102	YGATEDSR
4	1630.80	1630.83	36-41--86-94	LTRPCK ⋮ GGSSRPPCR
5	930.45	930.48	44-51	NTFIHGK
6	1760.90	1760.92	7-20	YIHFLTQHYDAKPK
7	1221.58	1221.61	7-15	YIHFLTQHY
8	2360.05	2360.01	23-32--75-83	NDEYCFNMMK ⋮ SEFQITICK
9	3131.57	3131.53	56-61--103-124	AICEDR ⋮ VIVVGCENGLPVHFDESFITPR
6 A	1535.76	1535.77	7-18	YIHFLTQHYDAK

Tabella 3.2. Dati relativi ai peptidi ottenuti da ANG-1 per azione della tripsina e purificati mediante RP-HPLC.

3.4.2. Preparazione di peptide RCM-I e RCM-II.

Fett *et al.* nel 1989 hanno dimostrato che la porzione C-terminale dell'Angiogenina umana, peptide 108-123 (C-term-hu), inibisce l'attività ribonucleolitica dell'intera proteina. Attualmente tale peptide è reperibile commercialmente ed è stato acquistato dalla Calbiochem.

Per valutare il contributo della porzione C-terminale dell'Angiogenina bovina all'attività biologica della proteina stessa si è pensato di utilizzare il peptide triptico 9 (P9) costituito dai frammenti 56-61 e 103-124 uniti per mezzo di un ponte a disolfuro. Mediante riduzione e carbossimetilazione del P9 si sono ottenute la porzione 103-124 C-terminale, denominata RCM-II, a meno di un residuo di istidina e la porzione 56-61 denominata RCM-I. In un precedente lavoro di Tesi (Finezzo, 2004) i peptidi RCM-I e

RCM-II sono stati purificati mediante RP-HPLC e caratterizzati attraverso la spettrometria di massa, per verificarne la corretta attribuzione.

3.5. Saggio di attività ribonucleolitica e valutazione di k_{cat}/K_M relativamente ai substrati CpG e UpG.

Gli enzimi ribonucleolitici esplicano la loro attività idrolizzando l'acido ribonucleico. Risulta infatti da lavori presenti in letteratura (Shapiro and Vallee, 1989) che l'angiogenina deve possedere una certa attività ribonucleolitica per poter poi spiegare un'attività pro-angiogenica. Non risulta essere vero il contrario e cioè che un enzima con attività ribonucleolitica sia dotato di attività angiogenica.

Per valutare i parametri cinetici dell'attività ribonucleolitica delle proteine in esame è conveniente disporre di substrati semplici, come i dinucleotidi CpG e UpG, che in seguito ad idrolisi danno prodotti facilmente quantificabili.

Il parametro cinetico analizzato è il rapporto k_{cat}/K_M definito come costante di specificità e descritto dall'equazione di Michaelis-Menten. Per calcolare tale rapporto è necessario porsi nella condizione per cui la concentrazione del substrato è molto inferiore alla K_M ; in questo caso l'equazione appena citata può essere approssimata come indicato in Tabella 3.3. Sotto queste condizioni la velocità di reazione risulta direttamente proporzionale [2] alla concentrazione del substrato, tramite la costante di specificità, e alla concentrazione dell'enzima, che nell'esperimento viene mantenuta costante.

$v = \frac{k_{cat} [E_T] [S]}{K_M + [S]} \quad [1]$
$\text{per } [S] \ll K_M \quad v = \frac{k_{cat}}{K_M} [E_T] [S] \quad [2]$
$\text{per } [S] \gg K_M \quad v = k_{cat} [E_T] \quad [3]$

Tabella 3.3. Equazione di Michaelis-Menten ed equazioni correlate in condizioni particolari.

La velocità di reazione è stata calcolata come variazione del numero di moli di guanosina prodotte, per unità di tempo rispetto, alla concentrazione iniziale di substrato. Anche in questo caso si è fatto uso della cromatografia RP-HPLC per determinare la produzione della guanosina attraverso la misura dell'area del picco cromatografico.

Essendo stata determinata la proporzionalità tra area e moli in un precedente lavoro di Tesi (Finezzo, 2003-2004) è stato possibile risalire alla velocità di formazione della guanosina e quindi alla velocità di reazione.

In tabella 3.4 sono riportati i valori di costante di specificità ricavati per l e tre proteine.

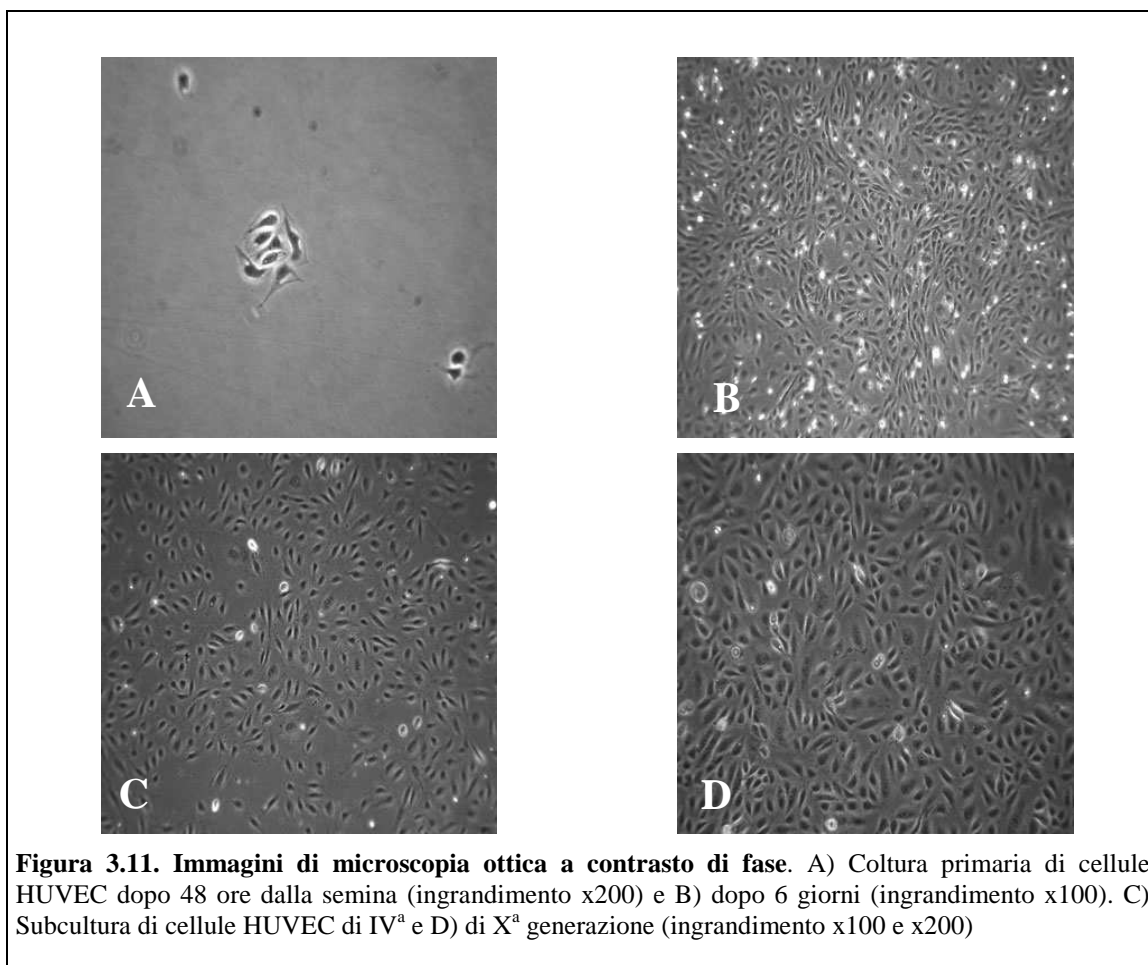
	Substrato	Costante di specificità k_{cat}/K_M a 37°C M⁻¹ s⁻¹
Ribonuclease A	CpG	8990
Ribonuclease A	UpG	16300
Angiogeniana	CpG	34.5
Angiogeniana	UpG	22.4
Lactogenina	CpG	10.1
Lactogenina	UpG	1770

Tabella 3.4 Costanti di specificità ottenute per la Ribonuclease A, Angiogenina e Lactogenina. Tutte le misure sono state eseguite a 37°C, pH 6.0 in tampone MES 33mM contenente NaCl 33 mM.

Tra le tre proteine in esame, la Ribonuclease A è risultata essere, come atteso, la più attiva con una leggera specificità di substrato per l'UpG. La Lactogenina presenta un'attività ribonucleolitica di molto inferiore rispetto alla RNase A ma sempre con una specificità di substrato per l'UpG mentre l'Angiogenina risulta essere la meno attiva delle tre proteine sui substrati analizzati.

3.6.1. Estrazione e coltura di cellule endoteliali da vena di cordone ombelicale umano.

Le popolazioni cellulari estratte dalla vena di funicolo e seminate su piastra condizionata con fibronectina, sono state osservate quotidianamente al microscopio ottico in contrasto di fase. Dopo 24-48 ore dalla semina è stata osservata, per ogni popolazione, la comparsa di tipici “clusters” costituiti da cellule aventi morfologia falciforme (Figura 3.11.A) che, nell'arco di 4-6 giorni, hanno formato monostrati cellulari costituiti da elementi di forma poligonale. (Figura 3.11.B).



Le subcolture cellulari fino alla X generazione sono risultate dotate di buona capacità proliferativa e non hanno mostrato segni di senescenza. (Figura 3.11 C,D)

3.6.2. Caratterizzazione fenotipica delle colture primarie di cellule HUVEC.

La verifica del fenotipo endoteliale delle colture estratte è stata ottenuta mediante ricerca, con immunofluorescenza, dell'espressione di *markers* tipici:

- Fattore di Von Willebrand (vWF): nelle cellule endoteliali il vWF è sintetizzato e accumulato in vescicole di deposito, i corpi di Weibel-Palade. In seguito ad opportuni stimoli il vWF viene rilasciato dalle cellule endoteliali e media la fase iniziale dell'adesione delle piastrine con il subendotelio dei vasi sanguigni che hanno subito lesioni e l'adesione tra piastrina e piastrina. Ha anche un ruolo importante nella stabilizzazione del fattore VIII, proteggendolo dalla degradazione.

- CD31 o PECAM1: fa parte della superfamiglia delle immunoglobuline e viene espresso nelle giunzioni intercellulari delle cellule endoteliali.
- CD146: come per il CD 31 appartiene alla famiglia delle molecole di adesione (CAM) ed è un costituente delle giunzioni intercellulari endoteliali.
- VE-Cadherin: molecola di adesione appartenente alla famiglia delle caderine, è essenziale per l'integrità delle giunzioni aderenti delle cellule endoteliali.

Tutte le popolazioni isolate e le subcolture fino alla X generazione hanno mostrato reattività positiva ai *markers* analizzati (Figura 3.12).

3.6.2. Isolamento e caratterizzazione di preadipociti umani.

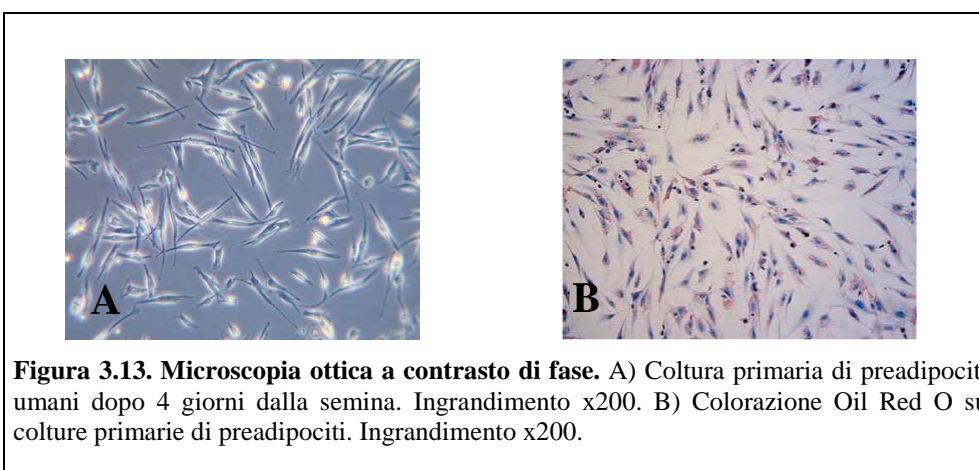
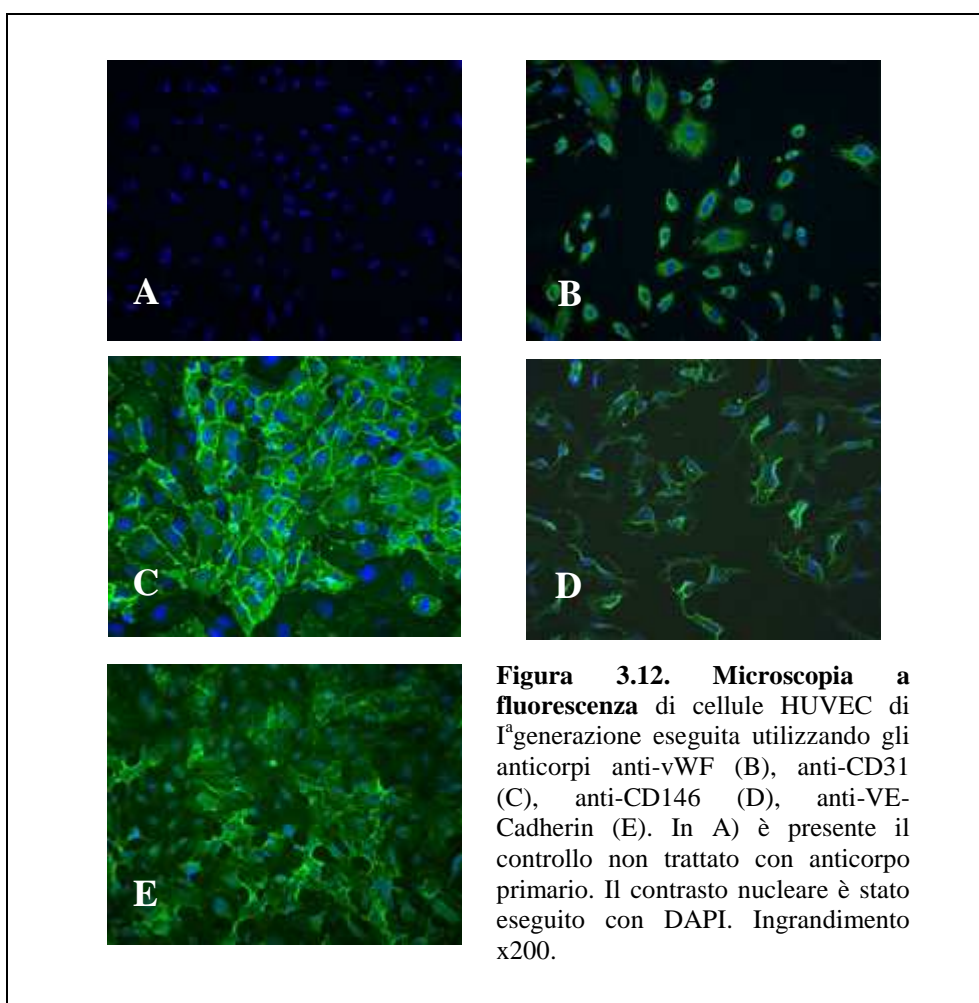
La procedura di isolamento ha consentito l'ottenimento di popolazioni di preadipociti con poche contaminazioni di tipi altri tipi cellulari. A 4 giorni dalla semina le cellule hanno mostrato tipica morfologia allungata (Figura 3.13 A) con numerose vescicole in sede citoplasmatica, che, l'analisi citochimica mediante colorazione Oil Red O (Figura 3.13 B) ha verificato essere accumuli lipidici.

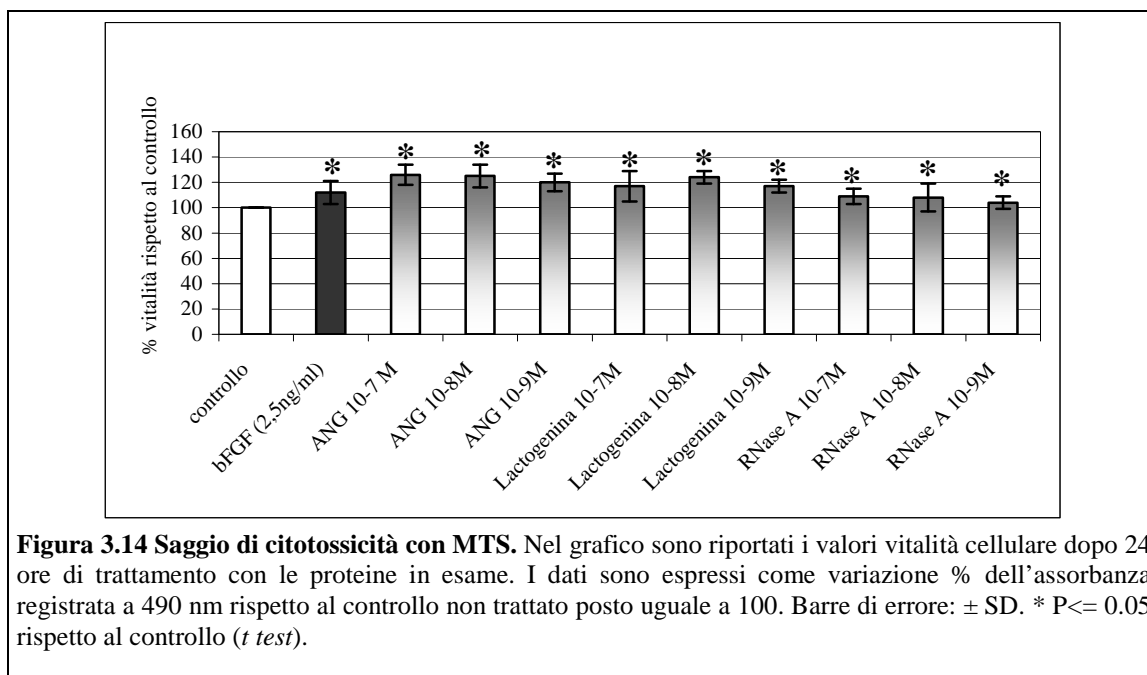
3.7. Studio dell'effetto citotossico su colture di cellule HUVEC.

3.7.1. Saggio di vitalità cellulare MTS.

Il saggio colorimetrico di vitalità cellulare MTS sfrutta la conversione, da parte di cellule biologicamente attive, del sale MTS in sale colorato di formazano, che viene rilasciato nel terreno di coltura. Il valore di assorbanza di quest'ultimo può essere analizzato con un lettore ELISA e sfruttato come indice di vitalità cellulare.

Gli esperimenti sono stati condotti su popolazioni HUVEC di II e III generazione e utilizzando un trattamento di 24 ore (Figura 3.14) delle concentrazioni 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M. Le concentrazioni impiegate sono state scelte in rapporto alla considerazione che la concentrazione plasmatica dell' Angiogenina umana è di circa 10 nmol/l (Blaser J. *et al.*, 1993). Il controllo positivo di bFGF, fattore di crescita ampiamente studiato in letteratura per le sue proprietà proliferogene (Pepper M.S., 1996) ha consentito di definire l'effetto citotossico indotto dalle proteine in esame.



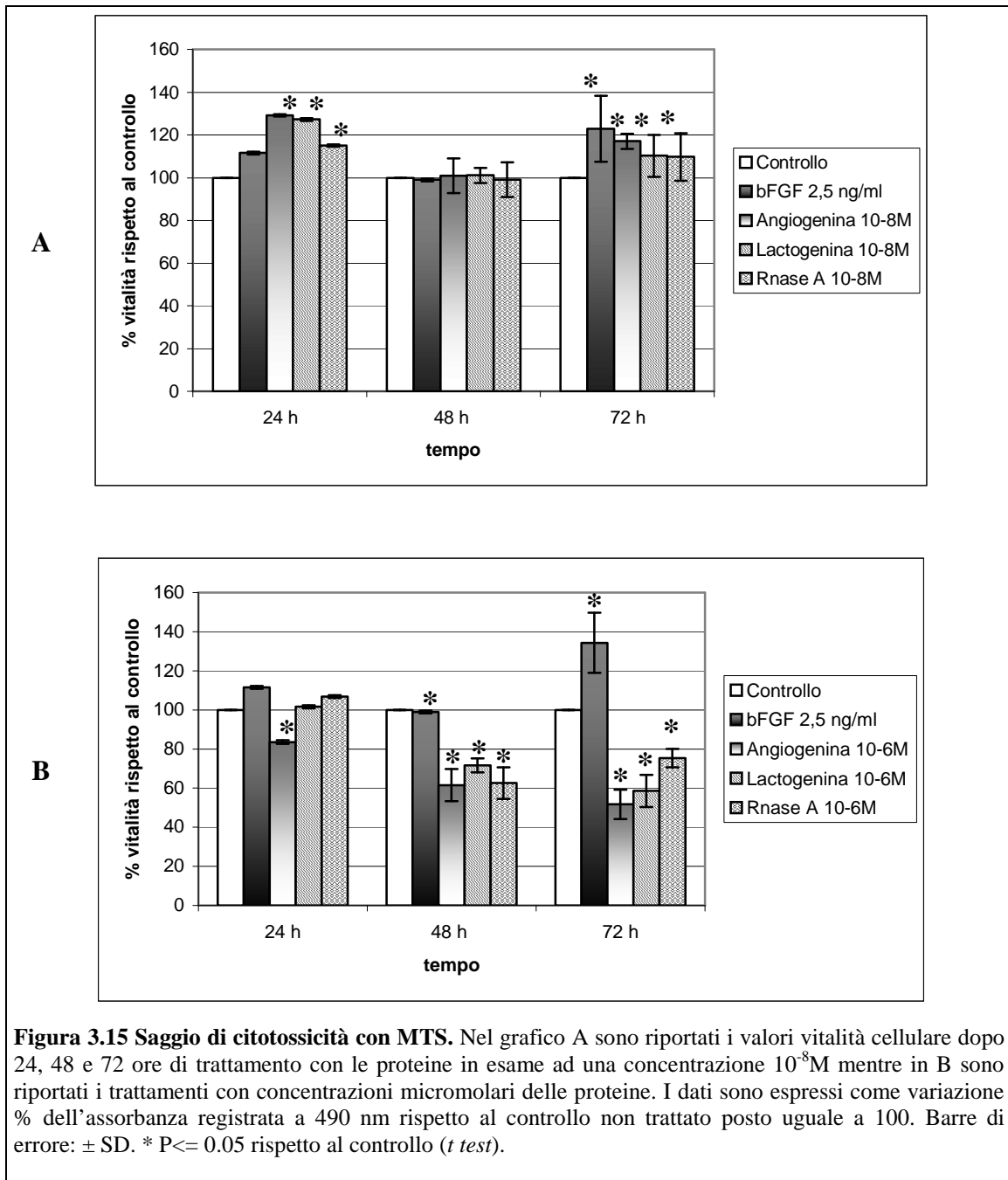


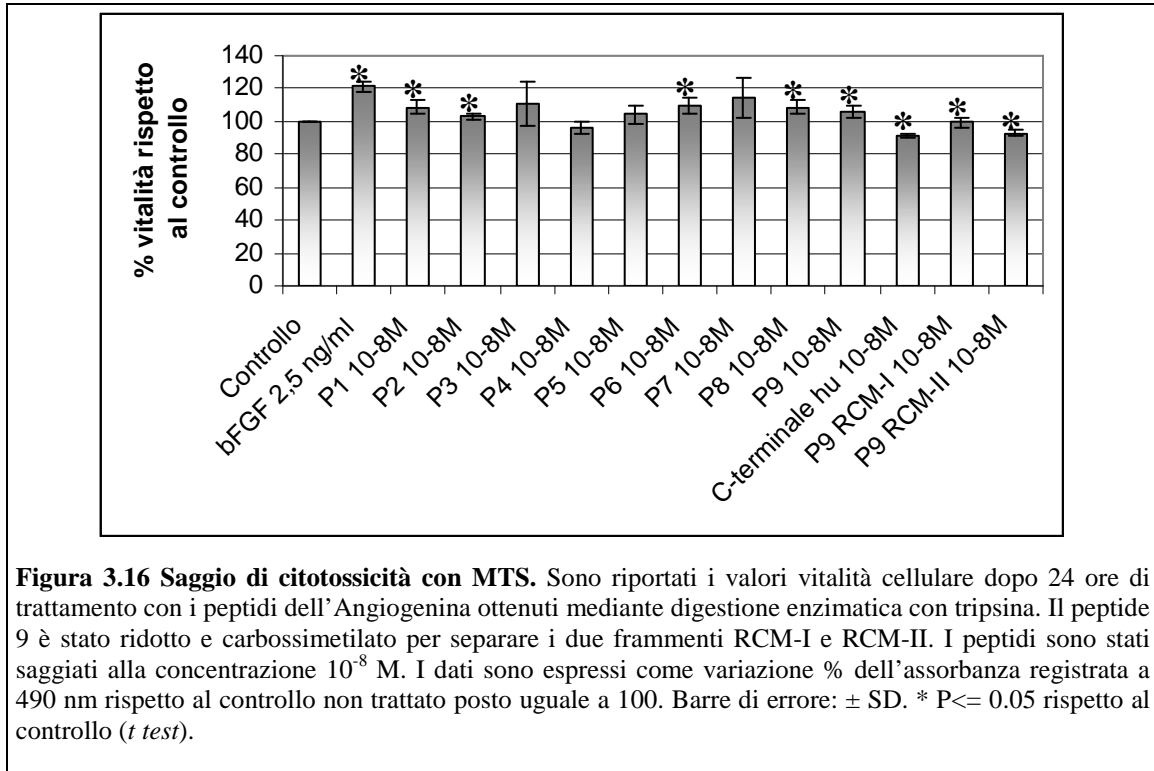
L'analisi statistica dei dati ottenuti evidenzia che i trattamenti eseguiti non sono risultati citotossici per le colture cellulari; anzi è stato registrato un incremento della vitalità cellulare significativo rispetto al controllo. Il trattamento prolungato di 72 ore, alla concentrazione 10^{-8} M, ha consentito di verificare che anche all'aumentare del tempo di esposizione delle colture cellulari l'effetto citotossico non cambia (Figura 3.15 A).

In Figura 3.15 B sono riportati i risultati relativi al saggio di citotossicità eseguito utilizzando concentrazioni proteiche superiori a quella fisiologica dell'Angiogenina. Il trattamento con Angiogenina micromolare ha dimostrato una diminuzione della vitalità cellulare tempo-dipendente. La citotossicità indotta dalle proteine alla concentrazione 10^{-6} M, dopo 2 giorni, è significativa non solo per l'Angiogenina ma anche per Lactogenina e RNase A. Alle 72 ore l'Angiogenina risulta essere la proteina più citotossica con una riduzione della vitalità cellulare rispetto al controllo di circa il 50%.

E' stato interessante valutare anche la possibile attività citotossica da parte dei peptidi triptici dell'Angiogenina alla concentrazione di utilizzo di 10^{-8} M. Come riportato in Figura 3.16, la maggior parte dei frammenti testati non ha rivelato attività citotossica.

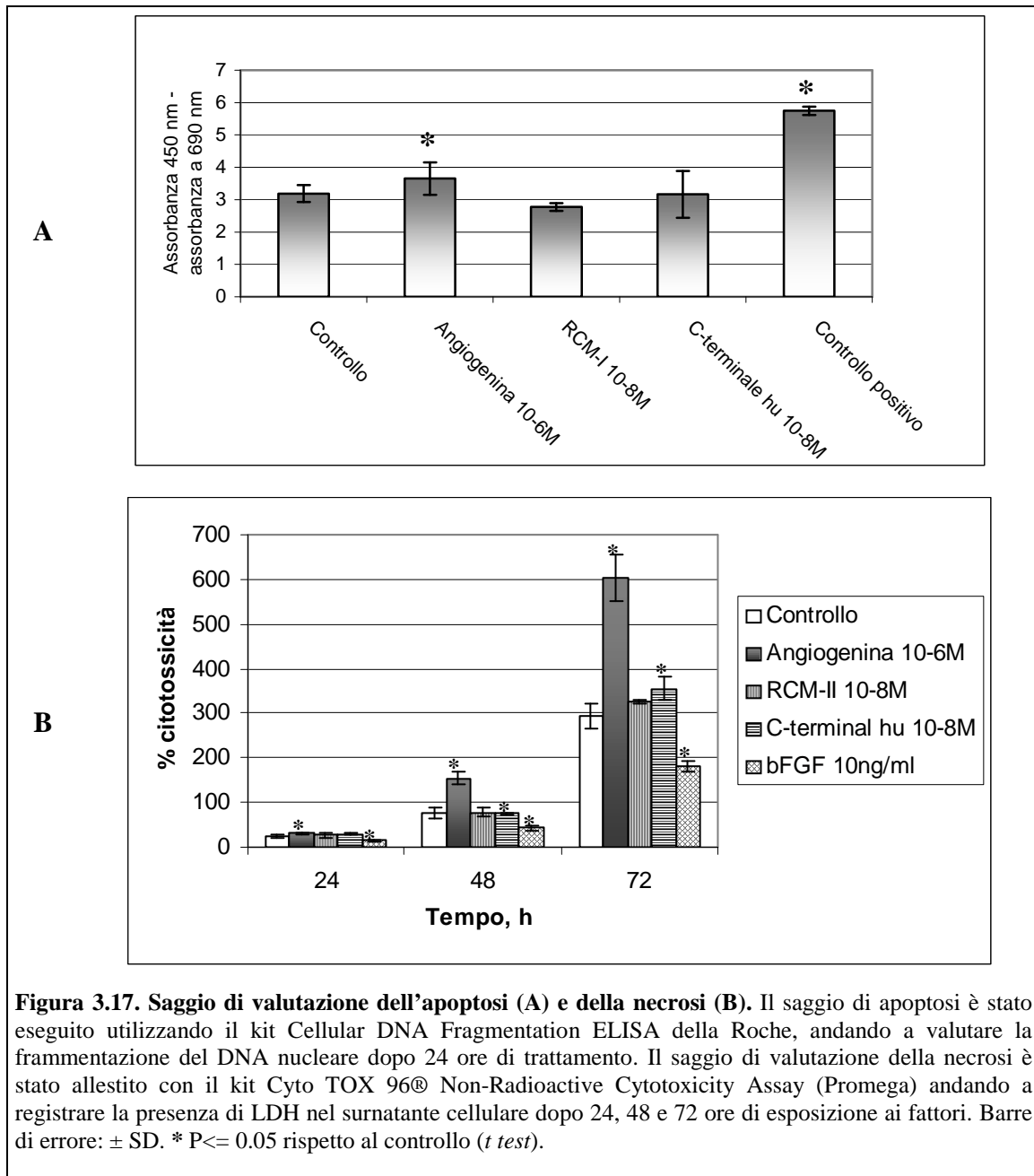
Pertanto, è emerso che il peptide C-terminale dell'Angiogenina bovina (RCM-II) e quello C-terminale dell'Angiogenina umana hanno manifestato un'azione citotossica significativa, dal punto di vista statistico, rispetto al controllo non trattato. Contrariamente, il peptide 9, che contiene RCM-II, così come il frammento RCM-I, non sono citotossici.





3.7.2. Analisi dell'induzione di apoptosi e necrosi.

Dall'analisi dei dati ottenuti con i saggi di vitalità cellulare è emerso che alcuni dei fattori testati esercitano un effetto citotossico. Il danno cellulare indotto può condurre a morte delle cellule principalmente attraverso due vie: necrosi o apoptosi. La prima comporta il rigonfiamento cellulare e la successiva lisi della membrana plasmatica con riversamento del contenuto citosolico all'esterno della cellula. L'apoptosi invece si riferisce ad una forma di morte cellulare programmata attiva e reversibile, che in condizioni fisiologiche consente la normale omeostasi cellulare. Una cellula in apoptosi mostra evidenti caratteristiche morfologiche quali l'assunzione di una forma sferica, l'addensamento della cromatina e la successiva degradazione. Nell'angiogenesi il processo apoptotico interviene nel rimodellamento e sviluppo dei vasi sanguigni (Dimmeler S., 2000). In Figura 3.17 sono riportati i valori di necrosi e apoptosi registrati negli esperimenti allestiti. L'analisi statistica ha evidenziato che i peptidi C-terminale dell'Angiogenina umana e bovina non inducono un effetto pro-apoptotico sulle colture trattate per 24 ore. L'esposizione invece alla proteina intera, alla concentrazione micromolare, provoca sulle cellule una risposta di tipo apoptotico che è significativa rispetto al controllo non trattato, ma inferiore rispetto al controllo positivo.



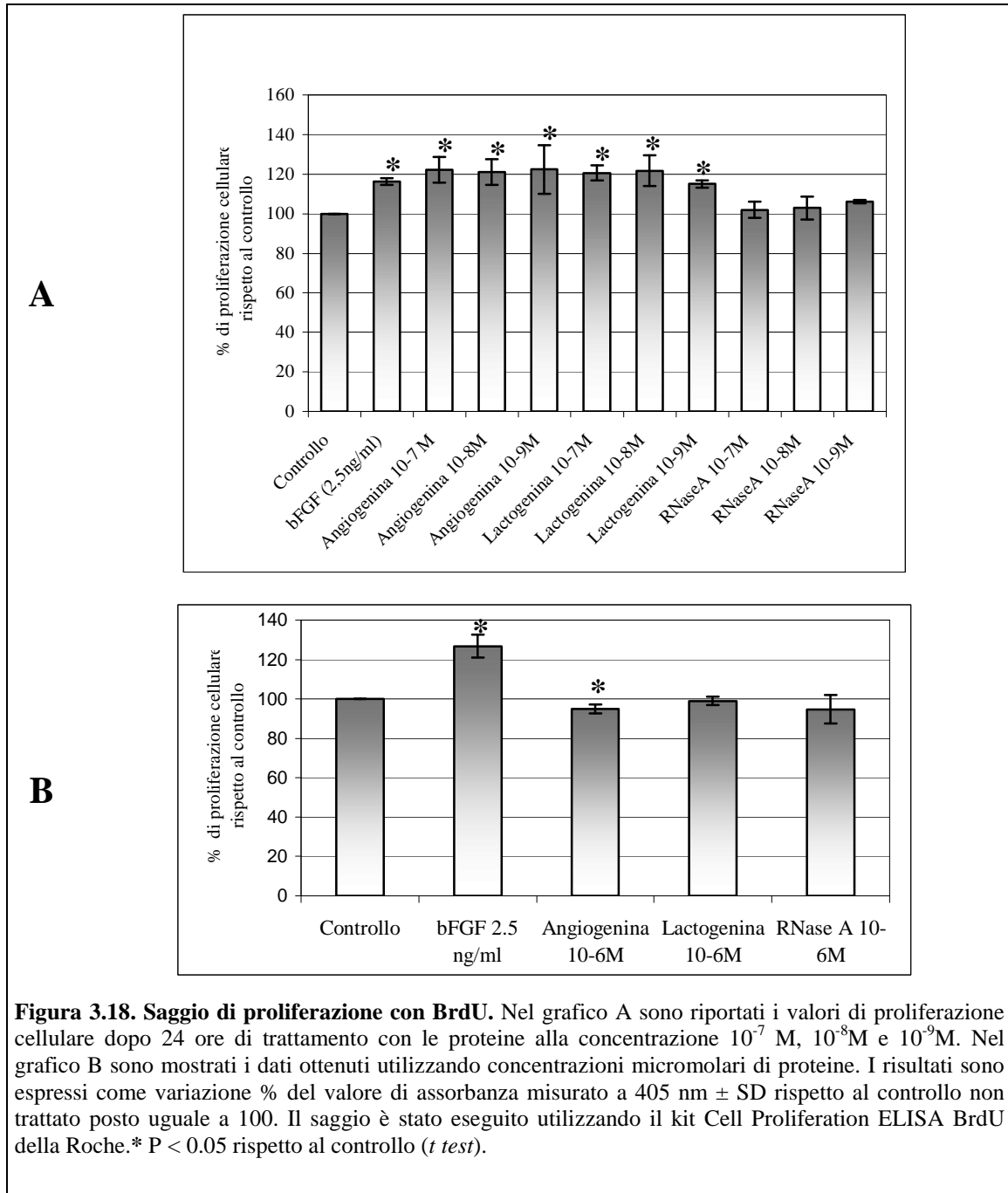
Lo studio del rilascio di Lattico Deidrogenasi, come parametro di valutazione di necrosi, fa risaltare un effetto citotossico dell'Angiogenina a concentrazione 10^{-6} M, che è già significativo alle 24 ore e che diviene più marcato prolungando il periodo di trattamento. Sempre da questa analisi emerge che il numero di cellule necrotiche nel saggio con peptidi C-terminali supera quello del controllo e che i due peptidi, bovino e umano, esercitano un effetto paragonabile in intensità a tutti i tempi di esposizione testati ($P=0.61$ alle 24 ore, $P=0.71$ alle 48 ore e $P=0.28$ alle 72 ore).

3.8. Valutazione della proliferazione cellulare.

La proliferazione cellulare interessa una delle prime fasi del processo angiogenico. Per questo motivo si è valutato il possibile effetto che hanno i fattori presi in esame sulla proliferazione *in vitro* di cellule HUVEC di II^a o III^a generazione. Inizialmente sono stati eseguiti alcuni saggi per stabilire la densità di semina ottimale per le cellule HUVEC, che è risultata essere di 1×10^4 cell/cm². L'utilizzo di una densità di semina più elevata non ha consentito di registrare alcun effetto sull'indice di proliferazione. Questo dato concorda con quanto riportato da Hu *et al.*, (Hu G-H, 1997) per l'angiogenina umana. Secondo tali autori, la densità cellulare è il fattore determinante affinché le cellule endoteliali rispondano allo stimolo indotto dall'Angiogenina in quanto, raggiunto un certo grado di confluenza, ne diventano insensibili.

L'Angiogenina bovina utilizzata alle concentrazioni di 10^{-7} M, 10^{-8} M e 10^{-9} M, provoca un incremento proliferativo di circa il 20% rispetto al controllo non trattato (Figura 3.18 A), similmente a quanto osservato per il bFGF. Tra le tre diverse concentrazioni testate non si nota una differenza significativa di effetto stimolatorio. Si ipotizza che, in ragione del meccanismo recettoriale di azione della proteina, quanto osservato sia dovuto alla possibile saturazione del legame ligando-recettore già evidente a concentrazioni nanomolari. Hallanhan *et al.* (1991) hanno individuato nel frammento 60-68 la porzione dell'Angiogenina umana responsabile del legame con il recettore e tale porzione risulta essere abbastanza conservata nella proteina bovina con un'omologia di sequenza del 44 %.

L'effetto dell'Angiogenina sulle cellule endoteliali è risultato di tipo specifico: la Ribonuclease A, che è un omologo dell'Angiogenina, nelle stesse condizioni non determina una risposta proliferativa significativa rispetto al controllo non trattato. La Lactogenina invece stimola la proliferazione delle cellule endoteliali analogamente all'Angiogenina.



E' stato oggetto di valutazione anche l'effetto sulla proliferazione cellulare da parte delle proteine alle concentrazioni micromolari. Il saggio con MTS aveva posto in evidenza un effetto citotossico a tale concentrazione. L'esperimento con BrdU, riportato in figura 3.18 B, mostra una debole inibizione della proliferazione cellulare dopo 24 ore di esposizione all'Angiogenina micromolare. RNase A e Lactogenina non inducono effetti significativi dal punto di vista statistico.

Il saggio di proliferazione mediante l'impiego dei frammenti triptici dell'Angiogenina, ha consentito di individuare quali porzioni sono maggiormente coinvolte nell'attività biologica della proteina in esame. Come riportato in Figura 3.19, lo studio condotto ha evidenziato una debole azione inibitoria sulla proliferazione cellulare da parte dei peptidi testati, fatta eccezione per il peptide N terminale, P1, e il peptide RCM I, che manifestano un effetto proliferogeno confrontabile con quello del bFGF. Degno di nota è anche il dato riguardante i peptidi 6 e 7, che corrispondono alle sequenze 7-20, 7-15 e sono adiacenti al P1 nella sequenza primaria della proteina. Tali peptidi, al contrario del P1, sembrano avere un debole effetto inibitorio.

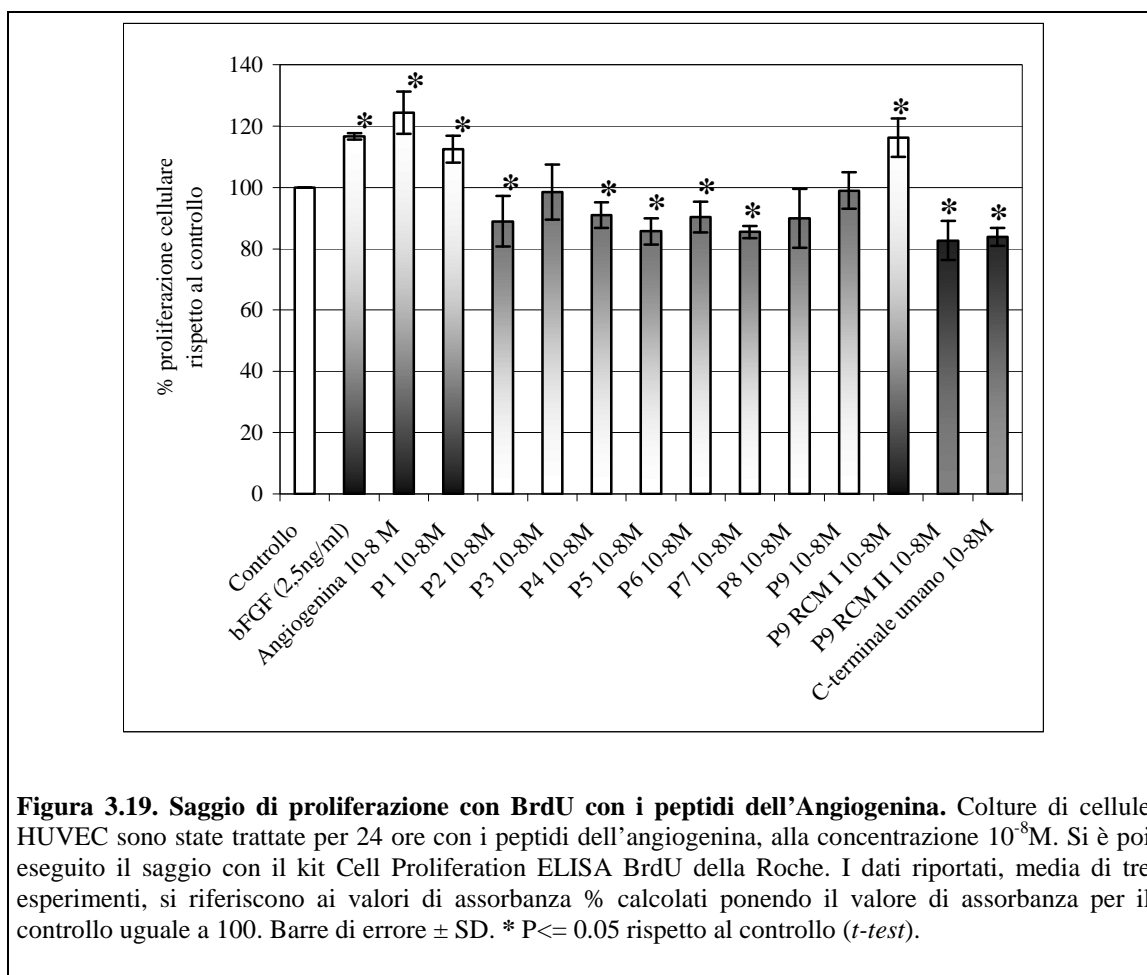


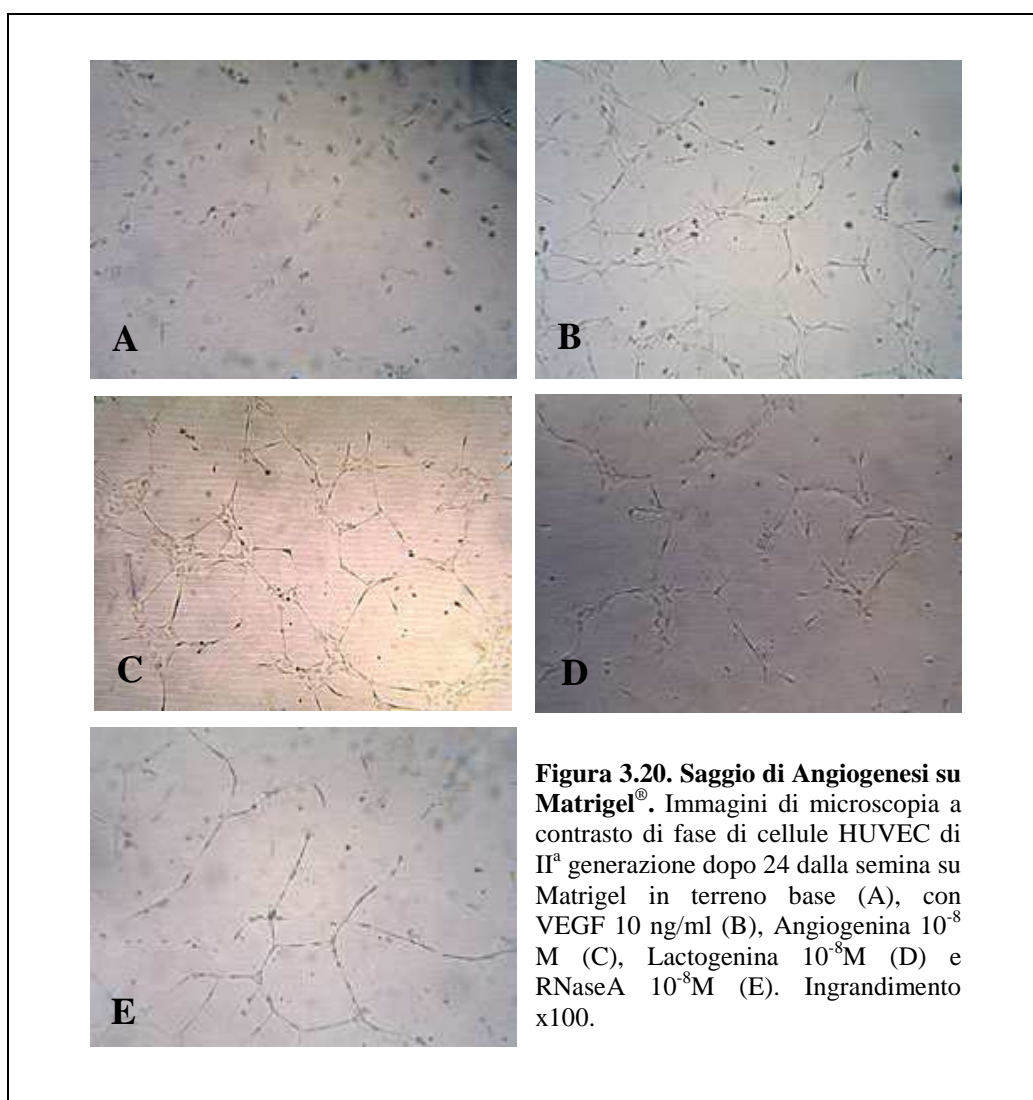
Figura 3.19. Saggio di proliferazione con BrdU con i peptidi dell'Angiogenina. Colture di cellule HUVEC sono state trattate per 24 ore con i peptidi dell'angiogenina, alla concentrazione 10^{-8} M. Si è poi eseguito il saggio con il kit Cell Proliferation ELISA BrdU della Roche. I dati riportati, media di tre esperimenti, si riferiscono ai valori di assorbanza % calcolati ponendo il valore di assorbanza per il controllo uguale a 100. Barre di errore \pm SD. * $P \leq 0.05$ rispetto al controllo (*t-test*).

Il peptide 2 corrisponde agli amminoacidi 62-67 che, come già accennato, sono coinvolti, nel caso dell'Angiogenina umana, nel legame con il recettore. Tale peptide non presenta effetti proliferogeni e questo dato ci porta a supporre che, qualora questa porzione sia implicata nel legame al recettore, tale condizione non sia sufficiente per indurre la proliferazione nelle cellule.

Risultati interessanti sono stati ottenuti con le porzioni C-terminali della proteina. Il frammento 9, costituito da due peptidi uniti con un ponte disolfuro, non ha avuto effetti significativi sulla crescita cellulare. Il peptide RCM-II, corrispondente agli amminoacidi 103-124, ha inibito la proliferazione cellulare del 20 % circa rispetto al controllo non trattato, analogamente a quanto osservato per il peptide C-terminale dell'Angiogenina umana. La porzione C-terminale della proteina, sia umana che bovina, sembra quindi giocare un ruolo importante nella attività della proteina. Studi in letteratura riportano un effetto inibitorio da parte del peptide C-terminale dell'Angiogenina umana sull'attività ribonucleolitica della proteina (Russo N. 1999; Fett J.W. 1989, Leonidas D.D., 2002.)

3.9. Saggio di angiogenesi *in vitro* su Matrigel.

Le cellule endoteliali seminate su Matrigel, in un opportuno terreno proliferativo, si organizzano spontaneamente a formare strutture capillaro-simili in 18-24 ore. Questo saggio consente quindi di valutare se i fattori in esame possano promuovere o inibire la formazione di tali strutture. All'analisi di microscopia ottica, le cellule HUVEC, seminate in terreno base, hanno mostrato morfologia rotondeggiante, sono risultate piccole e isolate, di rado allungate (Figura 3.20 A). Nelle colture trattate con VEGF le cellule sono risultate allungate, allineate a formare reticolazioni e maglie chiuse richiamanti la struttura capillaro-simile (Figura 3.20 B). Le colture seminate su Matrigel sono state incubate con le proteine a concentrazioni da 10^{-7} M a 10^{-9} M: il trattamento 10^{-8} M è risultato essere il più significativo. In presenza di Angiogenina, Lactogenina e RNase A sono stati osservati elementi cellulari molto allungati che hanno formato una struttura organizzata con numerosi punti di ramificazione (Figura 3.20 C, D, E).



L'analisi quantitativa delle immagini acquisite ha preso in considerazione i seguenti parametri:

1. Parametri dimensionali: sono l'area coperta dalle strutture tubulari rispetto all'area totale e la lunghezza delle strutture tubulari. Questi parametri rappresentano un indice della proliferazione cellulare.
2. Parametri topologici: sono il numero di ramificazioni formate dalle strutture tubulari e il numero di maglie chiuse che le strutture tubulari vanno a delimitare. Questi parametri rappresentano un indice dell'organizzazione strutturale della coltura cellulare su Matrigel®.

Lo studio eseguito ha evidenziato, per le tre proteine, un incremento sia dei parametri dimensionali che di quelli topologici (Figura 3.21). L'Angiogenina è risultata

essere, nel gruppo di interesse, la proteina più attiva: si è riscontrato infatti un incremento dell'area coperta dalle strutture capillari, della lunghezza, del numero di ramificazioni e del numero di maglie chiuse (rispettivamente di 1.79, 3.01, 1.60, 2.66 volte rispetto al controllo non trattato, $P \leq 0.05$, *t test*). Questo aumento risulta essere però inferiore a quello registrato per i controlli trattati con VEGF. La Lactogenina ha promosso l'allungamento delle cellule e la formazione di punti di ramificazione mentre la presenza di maglie chiuse non è risultata essere significativa. L'effetto indotto dalla RNase A, seppur significativo rispetto al controllo non trattato, è più debole rispetto a quello prodotto dalle altre due proteine estratte dal latte.

Come riportato nelle Figure 3.24 e 3.25, il saggio su Matrigel, condotto con i peptidi triptici dell'Angiogenina alla concentrazione 10^{-8} M (Figura 3.23), ha mostrato risultati più significativi, in presenza delle porzioni N e C-terminale della proteina. Il peptide 1 ha promosso un incremento dei parametri topologici e dimensionali, anche se in forma meno evidente rispetto alla proteina nativa. Il peptide 2 non ha indotto modificazioni morfologiche apprezzabili rispetto al controllo non trattato ad eccezione del numero di maglie chiuse risultato quadruplicato. I dati più interessanti provengono dal trattamento con le porzioni C-terminali della proteina. Il peptide umano 108-123 ha determinato un considerevole aumento dei parametri topologici. Quest'ultimi, indicando la prevalenza del processo differenziativo su quello proliferativo (Kubota Y. *et al.*, 1988), confermano i dati ottenuti con il saggio di proliferazione. La capacità pro-angiogenica su Matrigel® del peptide P9 intero è risultata inferiore rispetto a quella osservata per il peptide C-terminale dell'Angiogenina umana.

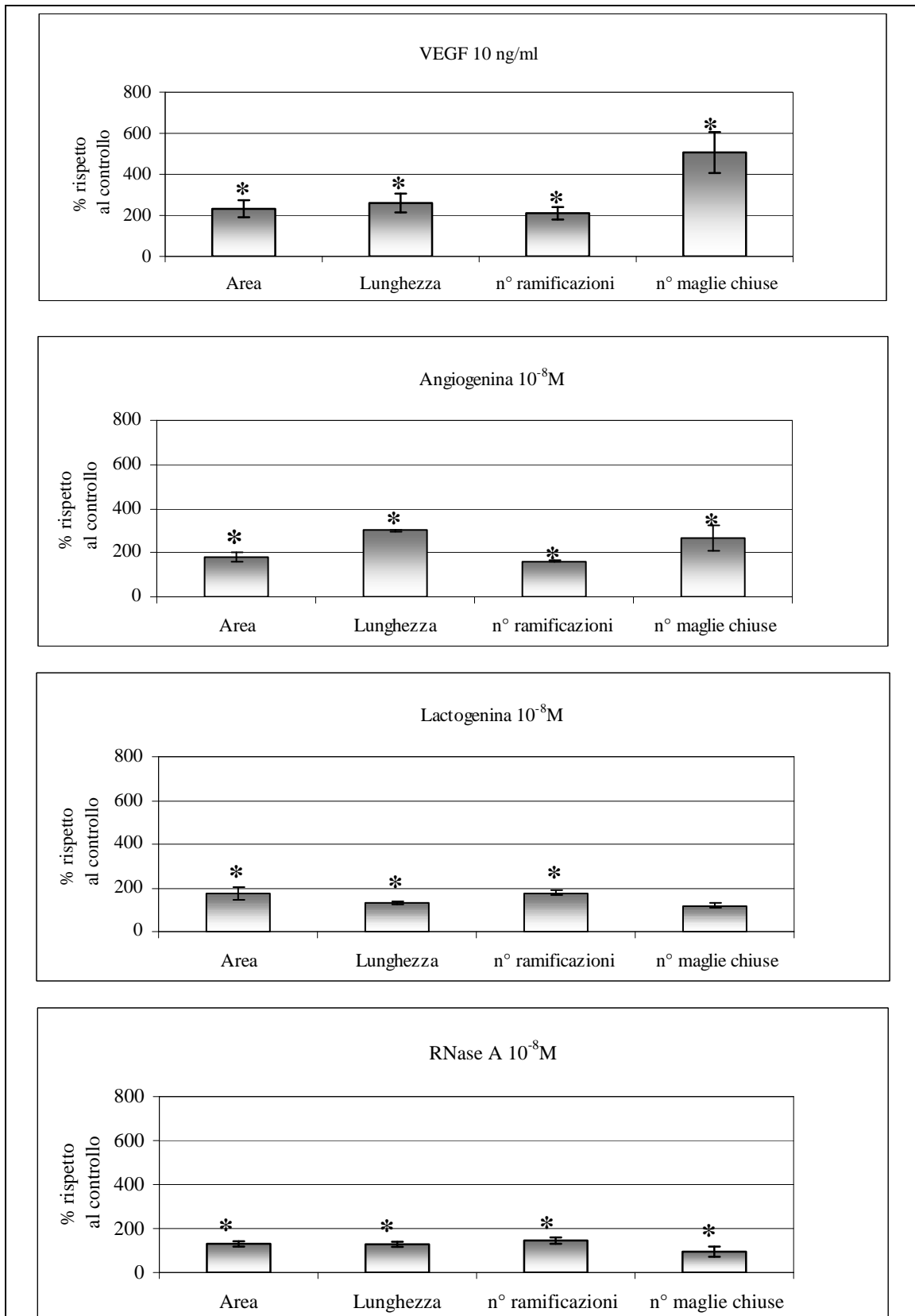
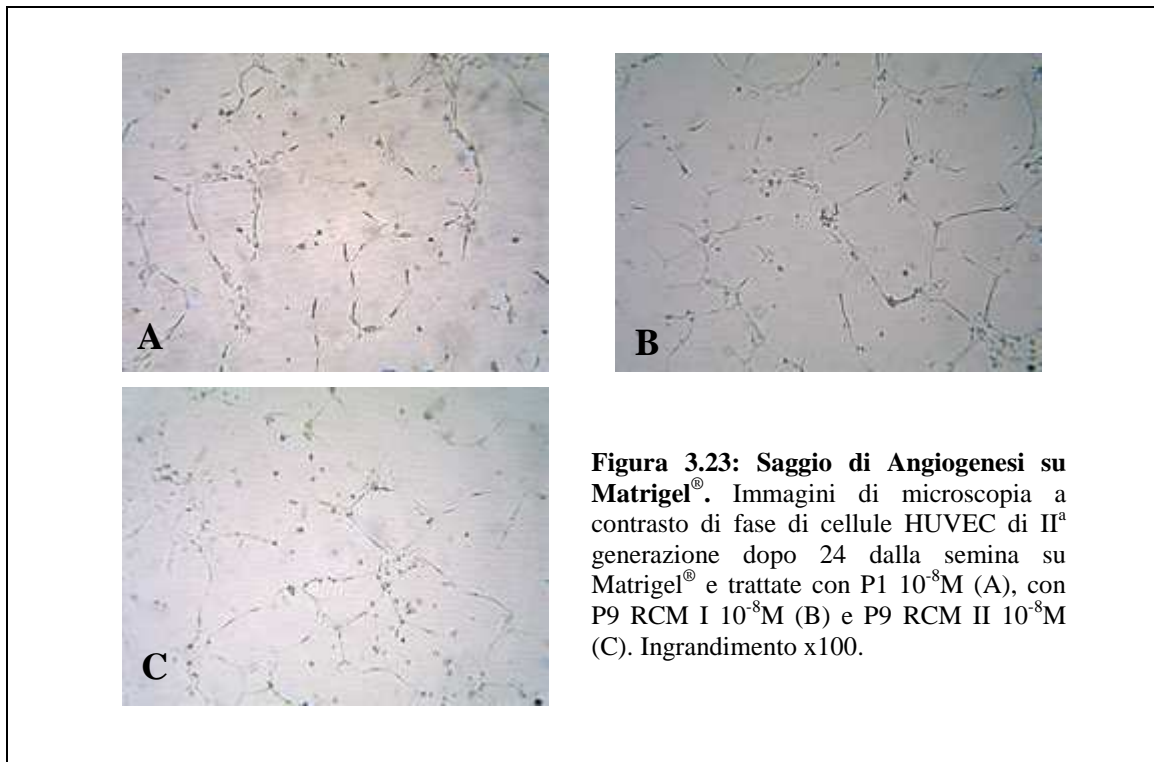


Figura 3.22 Analisi quantitativa saggio di angiogenesi su Matrigel. Nei grafici sono riportati i valori di Area cellulare, Lunghezza estensioni cellulari, numero ramificazioni e numero di maglie chiuse rispetto al controllo non trattato posto uguale a cento. Barre di errore \pm SD. * $P \leq 0.05$ rispetto al controllo (*t-test*).



I frammenti RCM-I e RCM-II invece determinano un notevole aumento di tutti i parametri analizzati. In particolar modo il peptide 103-124 comporta un aumento dell'area coperta e della lunghezza delle estensioni cellulari, del numero di ramificazioni e di maglie chiuse di 4.6, 7.2, 6.1 e 5.6 volte rispetto al controllo non trattato ($P \leq 0.05$, *t-test*). Il peptide più attivo è risultato essere quello centrale 56-61 con un incremento dei parametri prima elencati rispettivamente di 6.5, 12, 9.2 e 6 volte ($P \leq 0.05$, *t-test*).

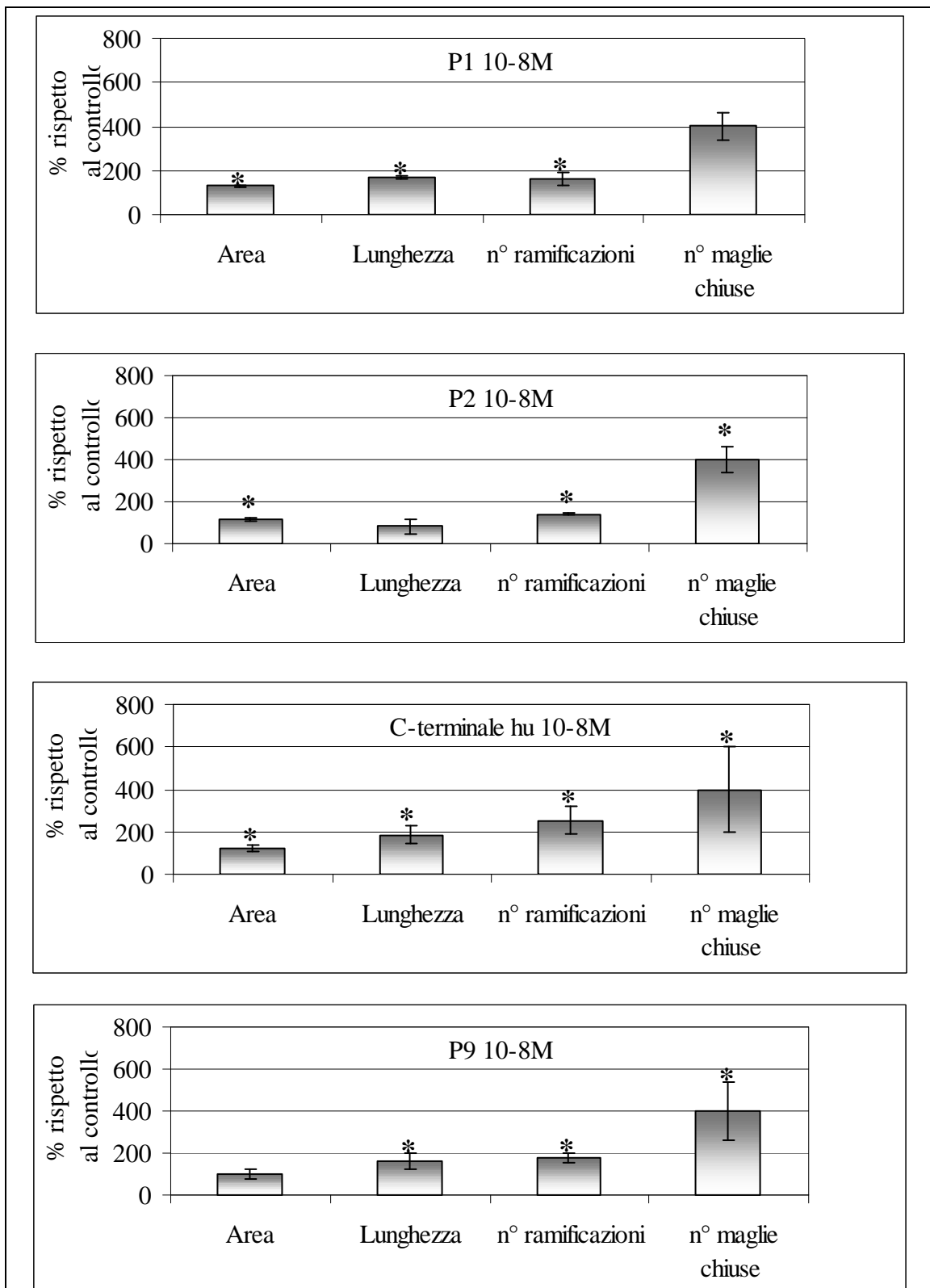
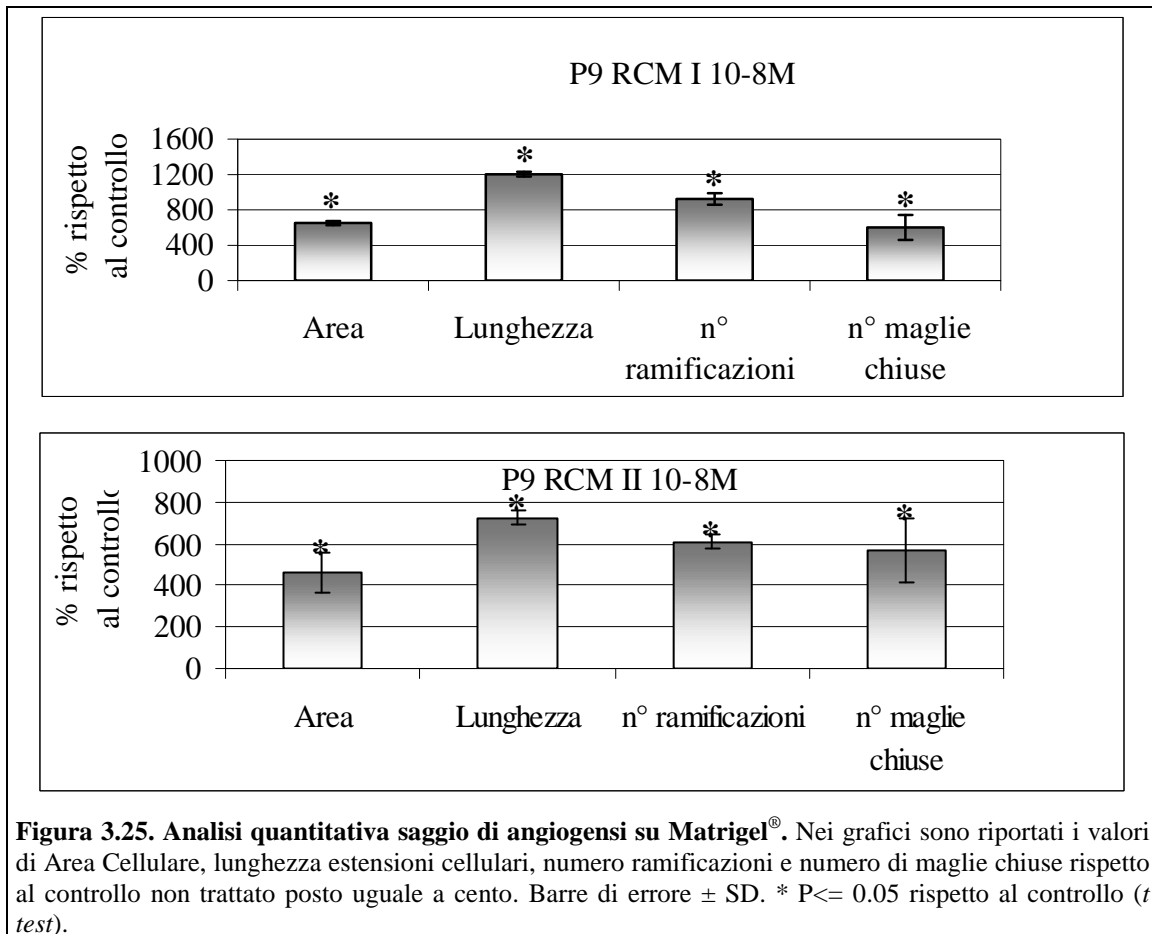


Figura 3.24. Analisi quantitativa saggio di angiogenesi su Matrigel. Nei grafici sono riportati i valori di Area Cellulare, lunghezza estensioni cellulari, numero ramificazioni e numero di maglie chiuse rispetto al controllo non trattato posto uguale a cento. Barre di errore \pm SD. * $P \leq 0.05$ rispetto al controllo (*t test*).



3.10. Saggio di migrazione e invasione cellulare.

La migrazione è il processo attraverso il quale una cellula rileva la presenza di un gradiente per un determinato fattore chimico ed è in grado di muoversi secondo un gradiente di concentrazione. Nel processo angiogenico, in seguito ad uno stimolo appropriato, è indispensabile che le cellule endoteliali migrino verso la sorgente dello stimolo, attraversando la lamina basale su cui poggia l'endotelio stesso. La membrana basale è costituita da una serie di foglietti continui di matrice extracellulare compatta che rivestono tutti gli organi e rappresenta una barriera per le macromolecole e le cellule.

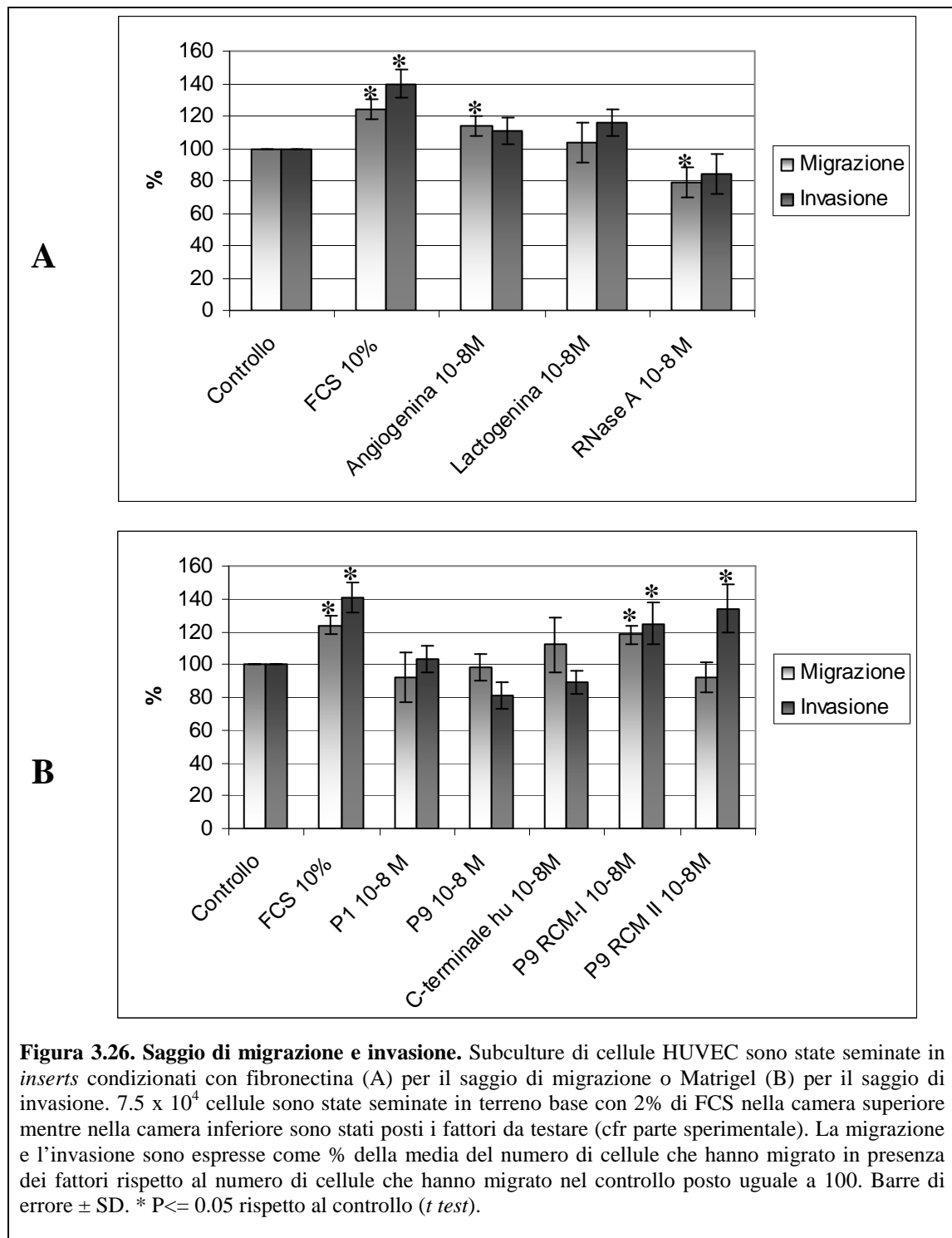
Il metodo adottato in questo lavoro, per valutare la capacità delle proteine in esame di stimolare la chemotassi, si basa sull'utilizzo della *boyden chamber*, nella quale due camere vengono separate da un filtro, a porosità controllata, attraverso il quale le cellule possono migrare dalla camera superiore verso quella inferiore, dove è contenuta la sostanza da testare.

I saggi sono stati allestiti utilizzando la densità di semina ottimale di 7.5×10^4 e un tempo di incubazione di 22 ore. La membrana dei dispositivi *insert* impiegati per il saggio è stata condizionata con fibronectina per favorire l'adesione delle cellule al filtro stesso.

La capacità "invasiva" delle colture endoteliali, ovvero la capacità di degradare la membrana basale e successivamente migrare è stata saggiata utilizzando la camera di *Boyden* dove la porzione superiore della membrana dell' *insert* è stata ricoperta da uno strato di matrice extracellulare Matrigel.

Subcolture di cellule HUVEC, stimulate con siero fetale bovino al 10% in terreno di coltura, hanno mostrato l'abilità di migrare verso la camera inferiore fino a rivestire completamente la porzione inferiore della membrana dell'*insert* in 24 ore. Anche le proprietà invasive delle cellule endoteliali sono risultate stimulate dalla presenza di siero come riportato nei grafici in Figura 3.26. Tra le tre proteine testate, solo l'Angiogenina ha mostrato la capacità di stimolare, in modo significativo, la migrazione cellulare rispetto al controllo non trattato. La Ribonuclease A invece sembra avere un effetto inibitorio di circa il 15 % rispetto al controllo. Non si registra, da parte delle tre proteine, un aumento nella capacità delle cellule endoteliali di poter degradare e successivamente invadere lo strato di Matrigel.

I peptidi triptici dell'Angiogenina non sembrano avere effetti significativi sulla migrazione delle cellule endoteliali. L'unica eccezione è rappresentata dal frammento centrale 56-61 che determina un incremento della migrazione del 18 %, paragonabilmente alla proteina nativa. Si ipotizza che tale porzione, coinvolta nella proteina umana nel legame con il recettore, sia una delle principali parti coinvolte nella stimolazione della migrazione cellulare. Lo studio ha evidenziato, inoltre, che i frammenti 56-61, 108-124 stimolano l'invasività mentre il trattamento con il peptide 9 intero sembra non indurre effetti significativi. E' stato osservato anche un incremento dell'invasività delle cellule HUVEC di circa il 34 % da parte del peptide C-terminale dell'Angiogenina bovina (RCM-II), contrariamente a quanto evidenziato nei campioni trattati con il peptide C-terminale umano.



3.11. Saggio di angiogenesi *in vivo* su membrana corionallantoidea di pollo (CAM).

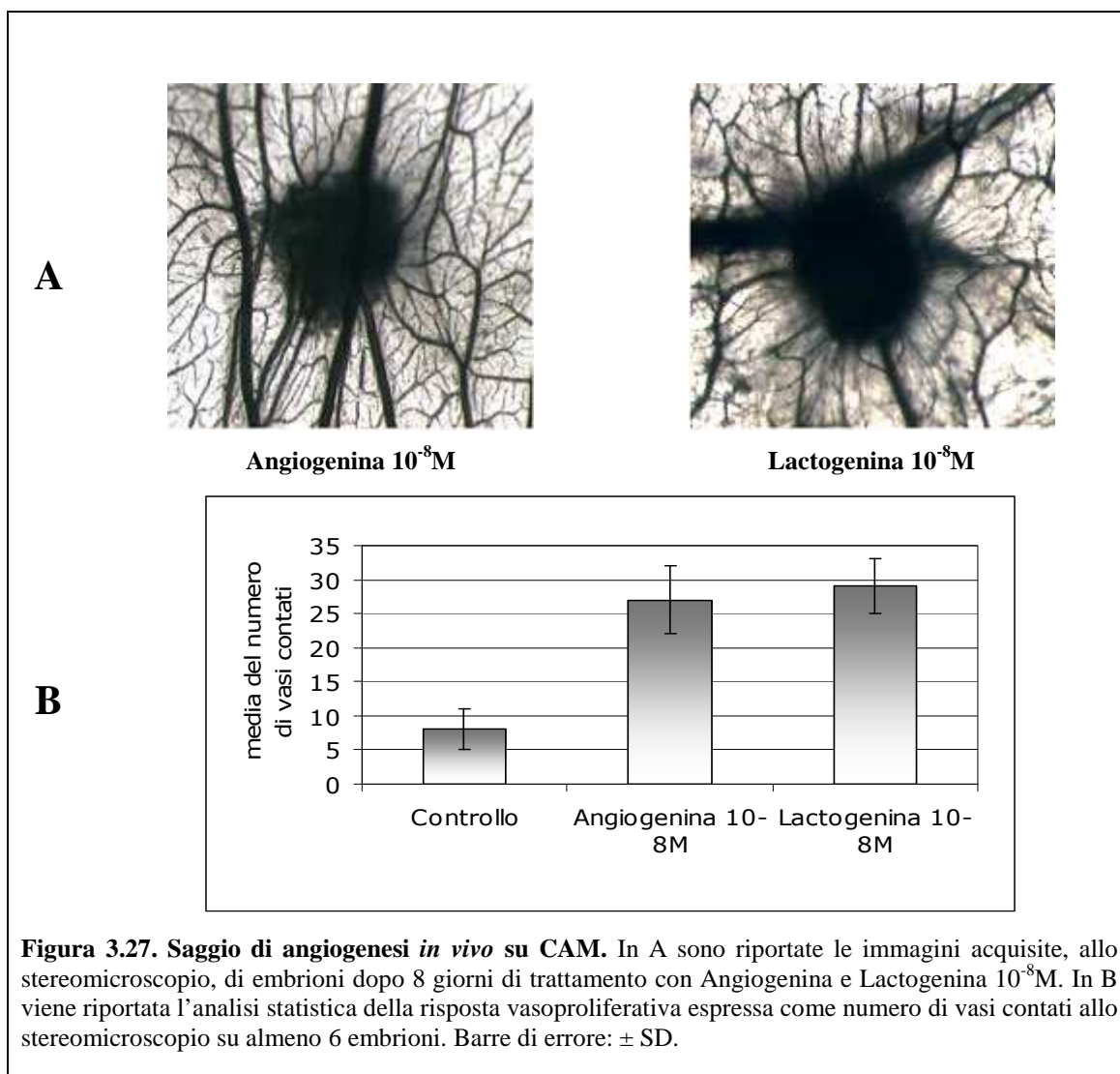
Il saggio di angiogenesi su membrana corionallantoidea di embrione di pollo (CAM) consente di apprezzare la capacità di un fattore di stimolare o inibire la formazione di strutture vascolari. La CAM è una membrana extra-embryonaria costituita dalla fusione dell'allantoide, di origine mesodermica, con il corion, di origine ectodermica. Tale fusione avviene a partire dal quarto giorno di incubazione dell'embrione anche se, già dal terzo giorno, si osservano nell'allantoide, vasi sanguigni primitivi che iniziano a prendere forma (Ribatti D., 1996). I vasi primitivi continuano a proliferare e a differenziarsi per dare origine al sistema circolatorio che, dall'ottavo giorno, è in grado di garantire gli scambi gassosi tra l'embrione e il mondo esterno. Questo tipo di membrana ricrea la condizione fisiologica in cui si verifica lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni, consentendo quindi un'accurata indagine sull'effetto pro-angiogenico o meno di determinati fattori.

E' stata valutata la capacità angiogenica su CAM da parte di Angiogenina e Lactogenina alla concentrazione 10^{-8} M. Le due proteine infatti, nei precedenti saggi di angiogenesi *in vitro*, hanno manifestato una maggiore azione angiogenica. La risposta vasoproliferativa è stata valutata mediante conta del numero di vasi sanguigni formati attorno alla sede di inoculo della sostanza in esame. In Figura 3.27 A sono riportate alcune delle immagini, acquisite allo stereomicroscopio, degli embrioni trattati per 8 giorni con le proteine. Il controllo, costituito da soluzione salina tamponata, dà luogo ad una scarsa vascolarizzazione mentre angiogenina e lactogenina determinano una significativa risposta vasoproliferativa, apprezzabile sia nelle immagini acquisite che dall'analisi statistica dei dati ottenuti (Figura 3.27 B).

3.12. Sistemi di coltura tridimensionale.

Attualmente, uno dei principali limiti nei costrutti ottenuti con tecniche di ingegneria tissutale, è rappresentato dalla non adeguata diffusione di nutrienti e ossigeno alle cellule che popolano lo *scaffold*. L'evoluzione ha stabilito che tale trasporto, di tipo diffusivo, venga garantito nei tessuti biologici da una fitta rete di vasi capillari. Una possibile soluzione del problema, seppur ambiziosa, prevede la realizzazione *in vitro* di costrutti che siano già vascolarizzati grazie alla semina, nello

scaffold in esame, di cellule endoteliali, in grado di organizzarsi e dar vita al processo angiogenico.



In questo studio si è voluto anche verificare l'effetto che hanno alcune delle proteine estratte dal latte, su colture di cellule endoteliali in un sistema tridimensionale, che meglio mima la condizione fisiologica. Si è scelto di saggiare, nei sistemi tridimensionali, Angiogenina e il peptide P1 alla concentrazione 10⁻⁸M, perchè fra tutti i fattori testati, sono risultati quelli più attivi nel promuovere la proliferazione cellulare.

Come *scaffolds* sono stati considerati il Policaprolattone e il Puramatrix[®]; il primo di tipo polimerico è caratterizzato da buone caratteristiche meccaniche e da una

elevata porosità mentre il secondo, avente consistenza simile ad un gel, viene applicato nella rigenerazione di tessuti molli.

3.12.1. Colture di cellule HUVEC su supporti di PCL.

Le matrici di PCL sono state realizzate utilizzando la tecnica dell'inversione di fase e impiegando saccarosio al 15%. L'analisi strutturale e la valutazione della porosità sono state eseguite mediante micrografia elettronica a scansione di campioni congelati in azoto liquido e successivamente sottoposti a frattura meccanica. Le matrici ottenute presentano tutte un buon grado di porosità: i pori sono mediamente distribuiti sulla superficie dello *scaffold* e presentano pori di 10-40 μm . All'interno dei pori la superficie appare spugnosa ed ad ingrandimenti maggiori si rileva la presenza di numerosi micropori. (Figura 3.28-A)

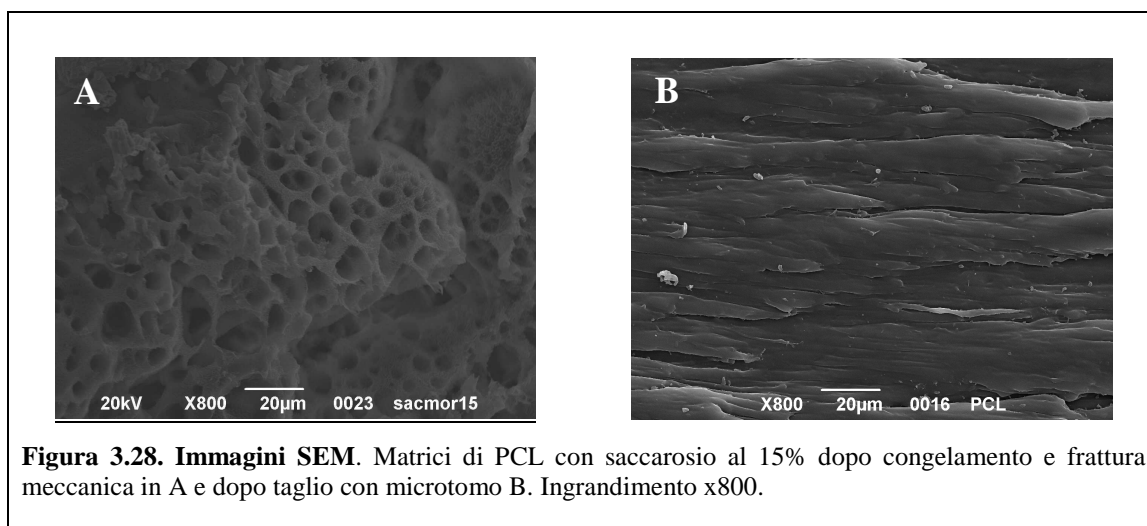
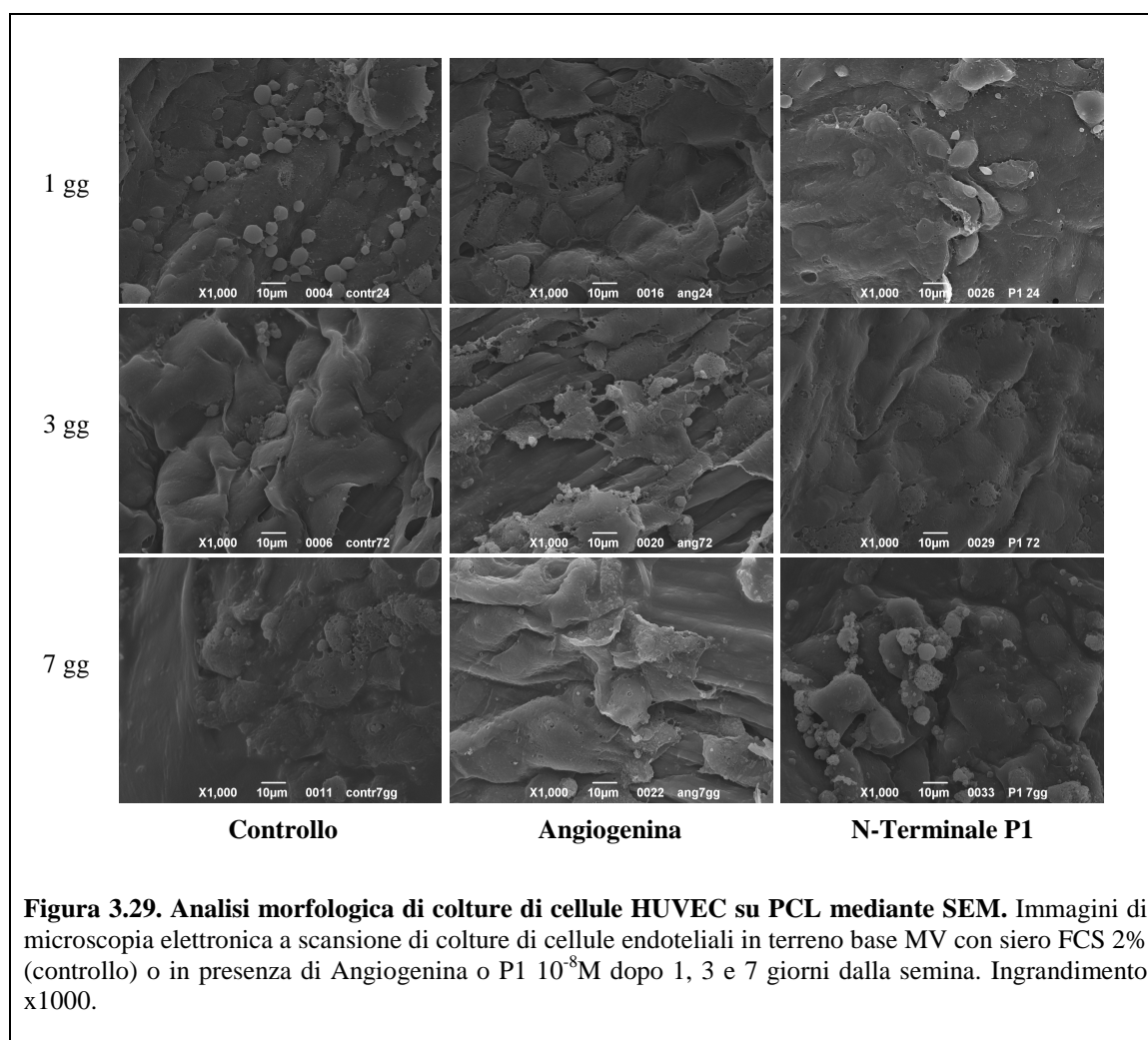


Figura 3.28. Immagini SEM. Matrici di PCL con saccarosio al 15% dopo congelamento e frattura meccanica in A e dopo taglio con microtomo B. Ingrandimento x800.

La semina delle cellule endoteliali è stata eseguita su dischetti ottenuti mediante taglio al microtomo a lama circolare. Tale procedura è stata adottata per ottenere degli *scaffolds* che potessero essere alloggiati in *inserts*, sistemi che garantiscono l'apporto dei nutrienti presenti nel terreno di coltura su entrambi i lati del dischetto. Il taglio al microtomo ha però provocato il livellamento della superficie del PCL andando ad occludere la maggior parte dei pori ed ad inficiare, come vedremo in seguito, la possibilità delle cellule endoteliali di poter migrare all'interno del biomateriale (Figura 3.28-B).

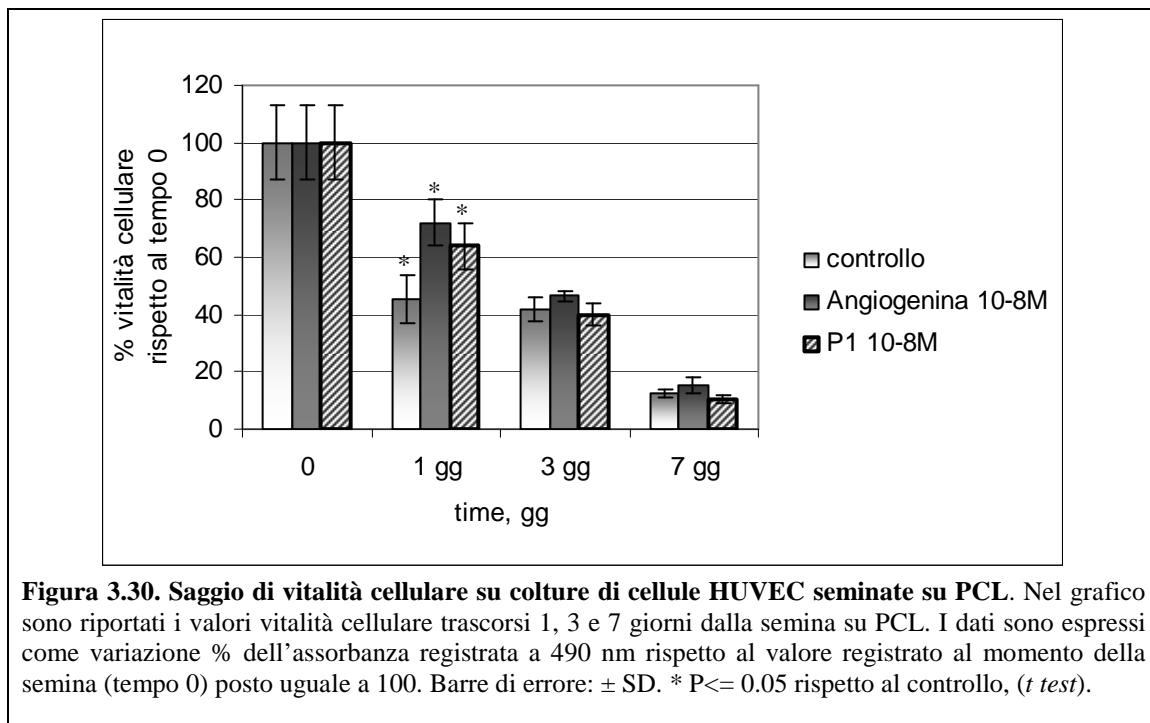
Le colture di cellule endoteliali su PCL, trattate con Angiogenina e P1 10^{-8} M, sono state analizzate mediante SEM dopo 1, 3 e 7 giorni dalla semina (Figura 3.29). Dopo 24 ore dalla semina le cellule HUVEC, in terreno base e siero, mostrano una morfologia rotondeggiante, indicativa di una certa difficoltà di adesione alla matrice. Il trattamento con Angiogenina o P1 promuove invece l'adesione allo *scaffold*: il giorno seguente alla semina le cellule sono risultate appiattite, di forma poligonale e con numerosi processi cellulari (Fig. 3.29).



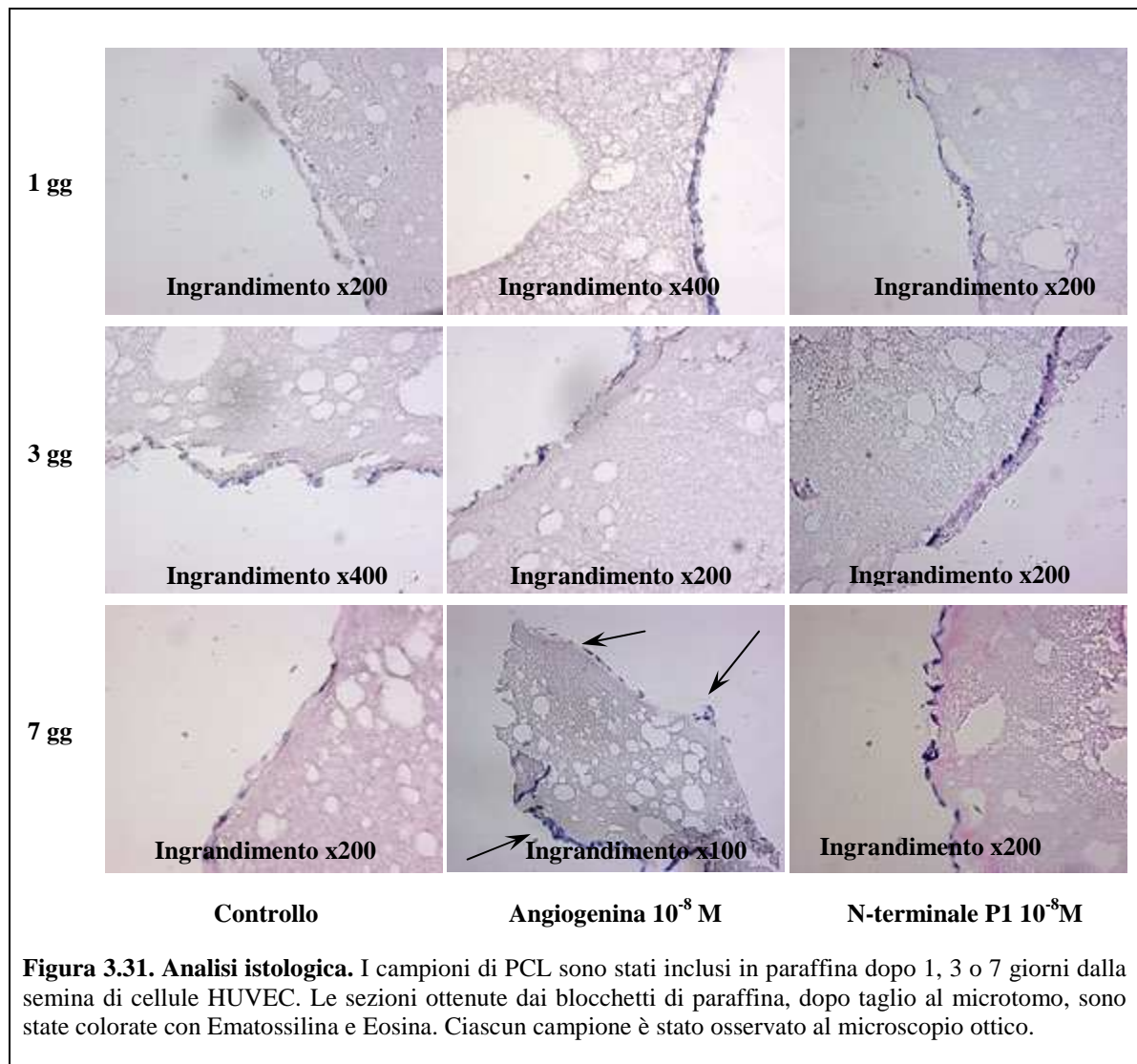
Dopo trattamento con il peptide N-terminale, le cellule, sono apparse organizzate a partire dalle 24 ore in un monostrato compatto, formato da elementi cellulari i cui contorni nelle successive 48 ore sono risultati poco marcati, evidenziando la tendenza delle cellule a differenziarsi in strati spessi. Anche dopo trattamento con Angiogenina, a 3 giorni dalla semina, si è riscontrata la formazione di strati cellulari più

densi rispetto a quelli caratterizzanti il controllo. Dopo una settimana di coltura, sia nei trattati che nel controllo, è stato osservato uno sfaldamento dello strato cellulare, probabilmente a seguito della scarsa migrazione cellulare all'interno della matrice causata dalla ridotta porosità superficiale dei dischetti di supporto.

Tali risultati sono stati in seguito confermati dallo studio di vitalità cellulare con saggio MTS. Il dato corrispondente al tempo 0 è un indice della vitalità cellulare al momento della semina mentre il valore registrato alle 24 ore offre una stima dell'adesione delle cellule al supporto di PCL. Nel controllo, meno del 50% delle cellule aderisce al biomateriale mentre Angiogenina e P1 promuovono un'adesione delle cellule seminate, significativa rispetto al controllo, pari circa al 70%. Dopo 72 ore dalla semina si registra una generale diminuzione del valore di assorbanza; ciò nonostante le cellule rimangono più vitali nei trattati rispetto al controllo. L'ulteriore diminuzione della vitalità cellulare ai 7 giorni è una conferma ai dati di microscopia elettronica a scansione, che in corrispondenza di tale tempo, ha evidenziato una perdita di integrità del monostrato. L'Angiogenina sembra promuovere maggiormente l'adesione e la crescita delle cellule endoteliali sul PCL, non solo rispetto al controllo ma anche rispetto al peptide N-terminale ($P < 0.05$ tra Angiogenina e P1 a tutti i tempi di analisi, *t-test*).



L'analisi istologica eseguita sui campioni di PCL inclusi in paraffina e sezionati al microtomo (Figura 3.31) ha confermato, alle 24 ore dalla semina, l'adesione e la formazione di stratificazioni cellulari. Il monostrato, costituito dalle cellule endoteliali, è risultato ispessito dopo le 72 ore e distribuito lungo tutta la superficie del supporto; non si è riscontrata la presenza di elementi cellulari nello spessore dello *scaffold*, a causa, probabilmente, della non adeguata porosità superficiale dei dischetti. E' stato interessante osservare che dopo 7 giorni dalla semina, nei campioni di controllo e di trattati con il peptide P1, le cellule sono localizzate solo lungo la superficie di semina. Al contrario, nei campioni trattati con angiogenina, la crescita cellulare caratterizza una superficie più estesa.



3.12.2. Colture di cellule HUVEC incapsulate in Puramatrix®.

Il Puramatrix è un biomateriale in forma di *hydrogel* che si ottiene per autoassemblaggio di monomeri rappresentati dalla sequenza RAD-16. E' costituito dal 99% di acqua e dal'1% di peptide. formato da una sequenza di 16 amminoacidi. Il peptide è costituito da residui amminoacidici di arginina, carichi positivamente, che si alternano a residui di acido aspartico, carichi negativamente, separati da un amminoacido neutro, l'adenina. (Zhang *et al.*, 1993, Zhang *et al.*, 1995). I peptidi in ambiente salino acquoso, e quindi anche in condizioni fisiologiche, si autoassemblano formando strutture costituite da foglietti β , grazie alla alternanza di amminoacidi carichi e neutri (Xiong *et al.*, 1995). Il Puramatrix si è dimostrato un biomateriale adatto alla coltura di differenti tipi cellulari, come ad esempio i pre-adipociti (Di Liddo R., 2005). Studi precedenti hanno previsto l'utilizzo del Puramatrix® in test di angiogenesi e colture tridimensionali di cellule endoteliali (Genove *et al.*, 2005 e Narmoneva *et al.*, 2005).

Le cellule endoteliali HUVEC sono state incapsulate in Puramatrix® allo 0.25%, trattate con Angiogenina o peptide P1 $10^{-8}M$ e osservate quotidianamente al microscopio ottico. Le cellule endoteliali, dopo 24 ore dall'incapsulamento, mantengono una morfologia di tipo rotondeggiante, sia nel controllo che nei trattati, e non si allungano, se non in qualche caso sporadico. Per tanto non si è registrata la presenza di strutture ramificate di tipo capillaro-simile (Figura 3.32).

In queste condizioni il Puramatrix® non si è rivelato un buon biomateriale per la coltura tridimensionale di cellule HUVEC, e i trattamenti con Angiogenina o P1 non hanno favorito la crescita cellulare. E' degna di nota però la presenza nei trattati, seppur sporadica, di strutture cave costituite da più elementi cellulari che permangono fino a 72 ore dopo l'incapsulazione.

I dati qualitativi ottenuti dall'osservazione, al microscopio ottico, delle colture cellulari sono stati confermati dal saggio di vitalità cellulare eseguito con MTT. Come illustrato dal grafico riportato in Figura 3.33 si denota una progressiva diminuzione della vitalità cellulare nel tempo, sia nel controllo che nei trattati, indice che tali condizioni di coltura non consentono la crescita di cellule HUVEC.

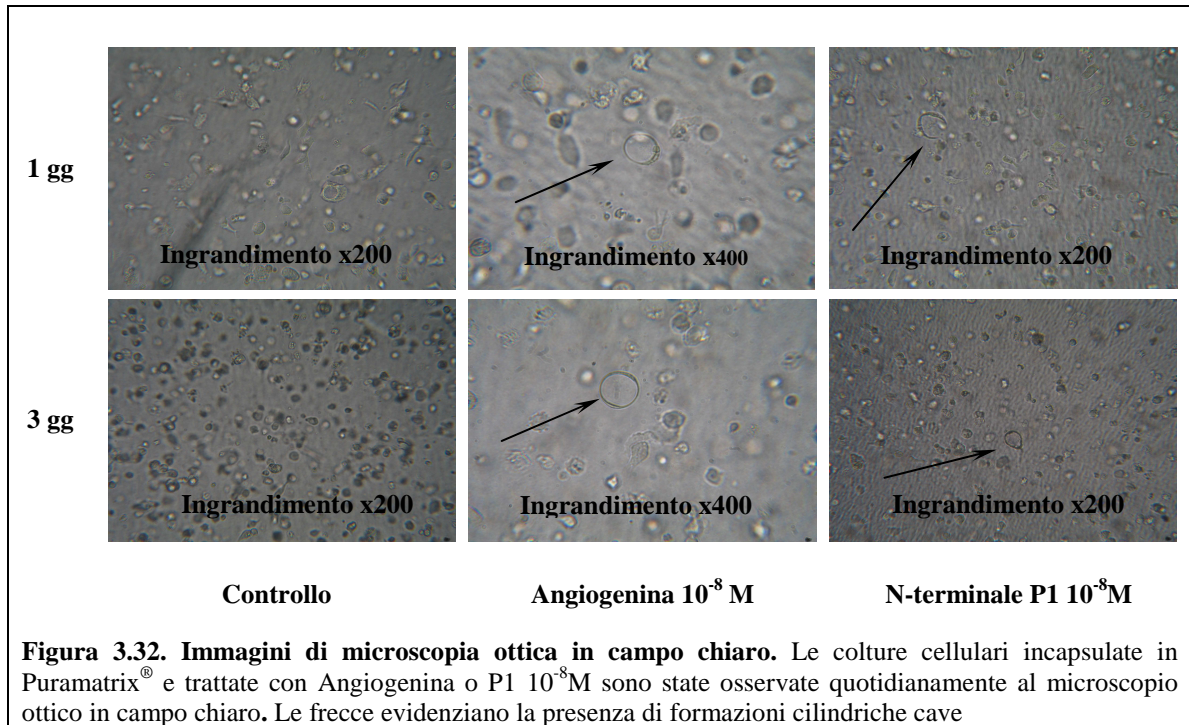


Figura 3.32. Immagini di microscopia ottica in campo chiaro. Le colture cellulari incapsulate in Puramatrix[®] e trattate con Angiogenina o P1 10^{-8} M sono state osservate quotidianamente al microscopio ottico in campo chiaro. Le frecce evidenziano la presenza di formazioni cilindriche cave

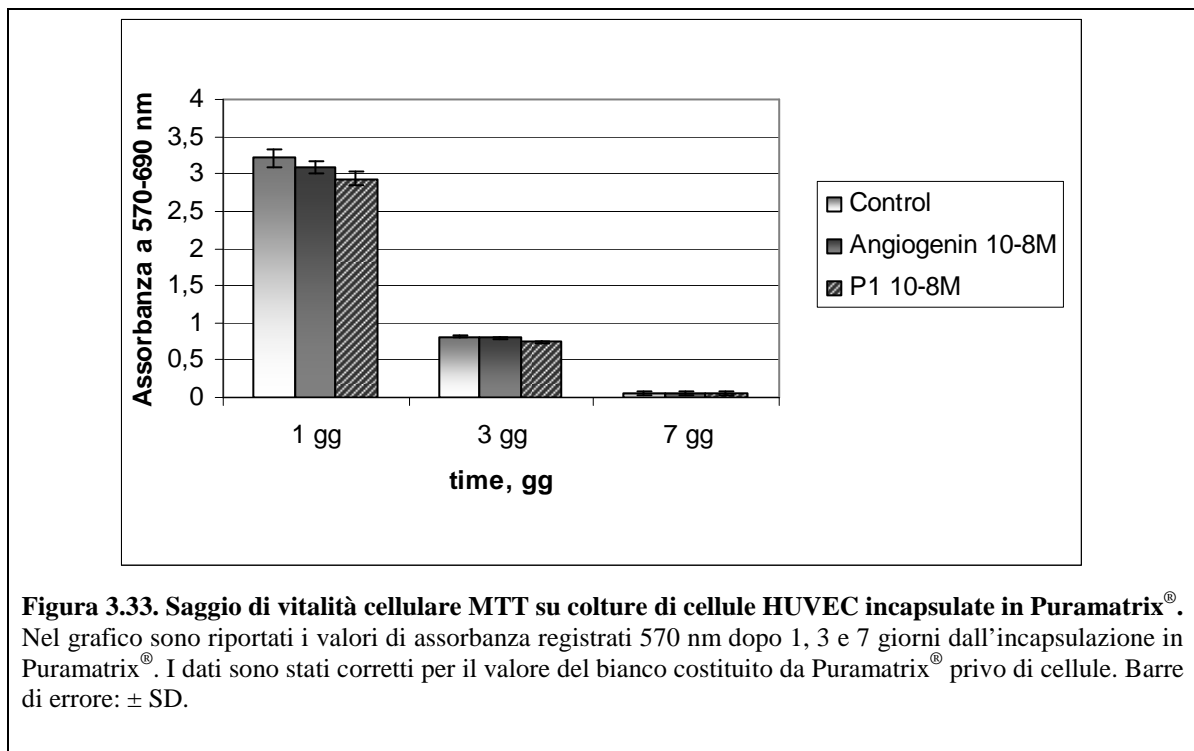


Figura 3.33. Saggio di vitalità cellulare MTT su colture di cellule HUVEC incapsulate in Puramatrix[®]. Nel grafico sono riportati i valori di assorbanza registrati 570 nm dopo 1, 3 e 7 giorni dall'incapsulazione in Puramatrix[®]. I dati sono stati corretti per il valore del bianco costituito da Puramatrix[®] privo di cellule. Barre di errore: \pm SD.

3.13. Valutazione dell'effetto citotossico delle proteine su colture non endoteliali.

Le cellule contengono circa 20 eso- e endo-ribonucleasi implicate nella regolazione del metabolismo dell'acido ribonucleico, nella maturazione cellulare e morte cellulare fisiologica, nella promozione della formazione del sangue e nella difesa contro i virus a RNA(Boix *et al.*, 1996,). Inoltre le ribonucleasi, grazie alla loro capacità di degradare RNA e causare di conseguenza la morte cellulare, possono essere considerate come delle tossine. Alcuni di questi enzimi, come l'Onconase[®], sono promettenti agenti chemioterapici. (Costanzi *et al.*, 2005). Sulla base di queste considerazioni si è quindi deciso di andare a valutare l'azione citotossica delle 3 proteine in esame su cellule non endoteliali.

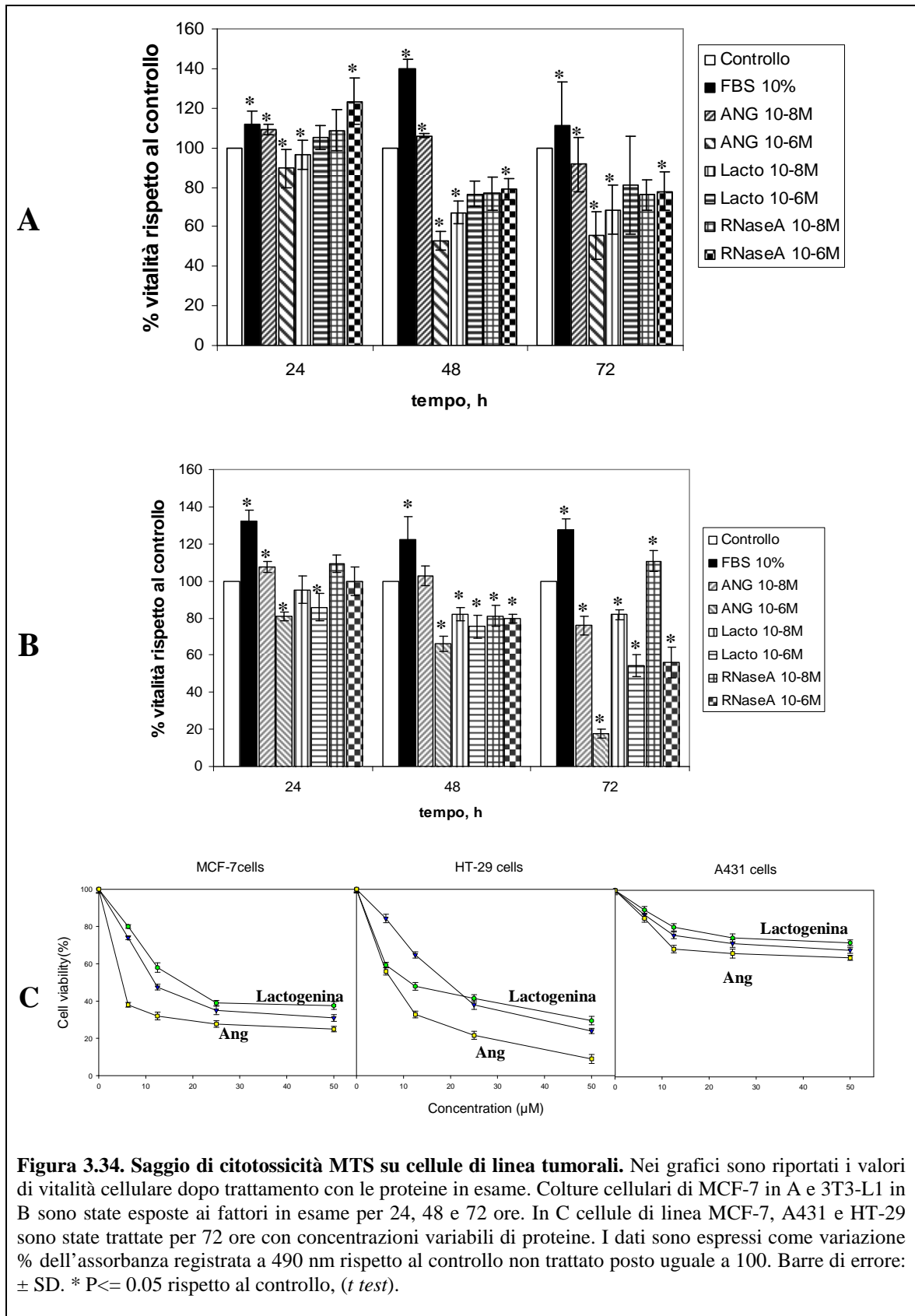
3.13.1. Citotossicità su cellule di linea tumorali.

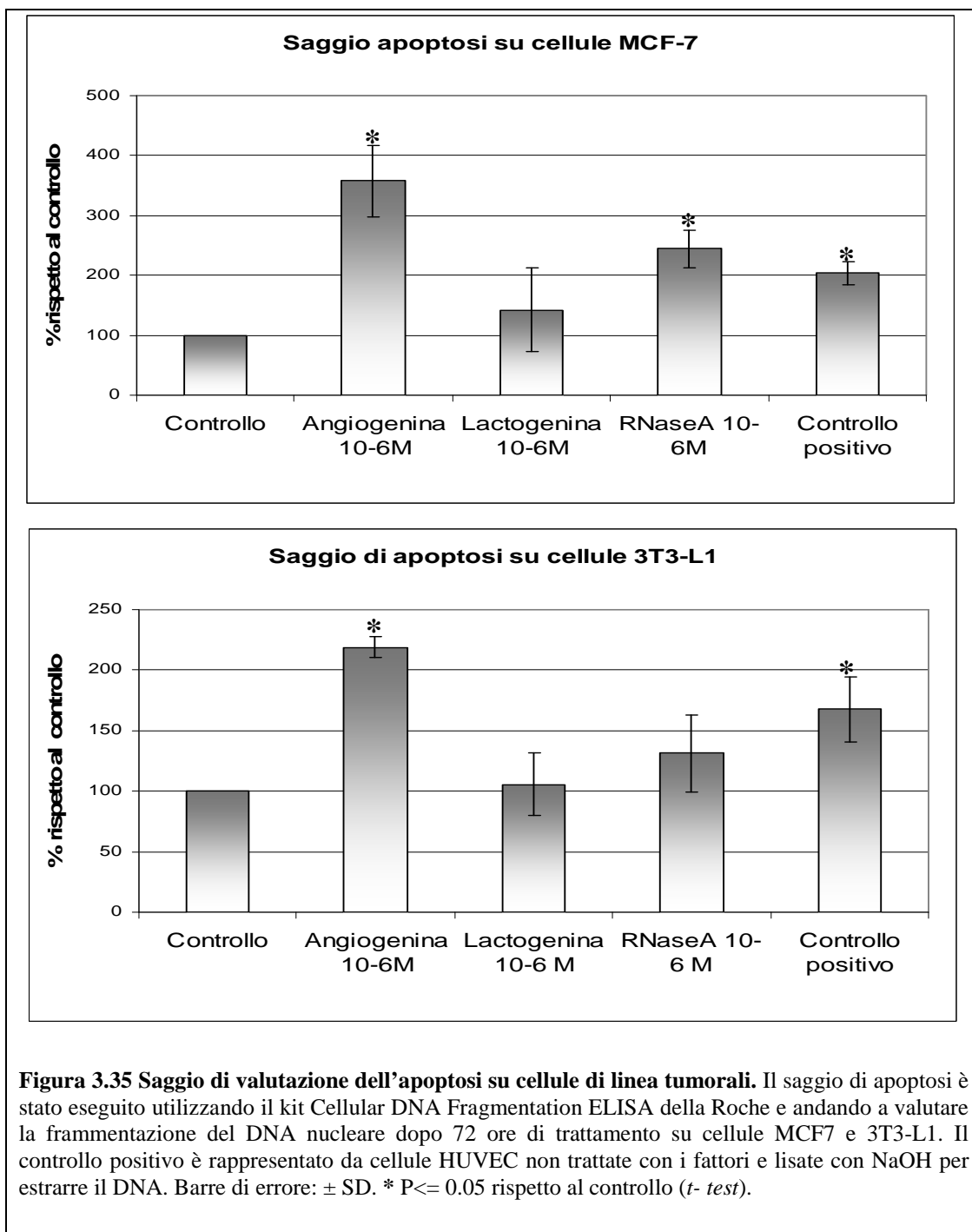
L'effetto citotossico di Angiogenina, Lactogenina e Ribonuclease A è stato esaminato *in vitro*, mediante saggio di vitalità MTS, su cellule di linea da carcinoma umano mammario, MCF-7, colon-rettale, HT-29, della cervice, A431, e su cellule tumorali murine quali le 3T3-L1.

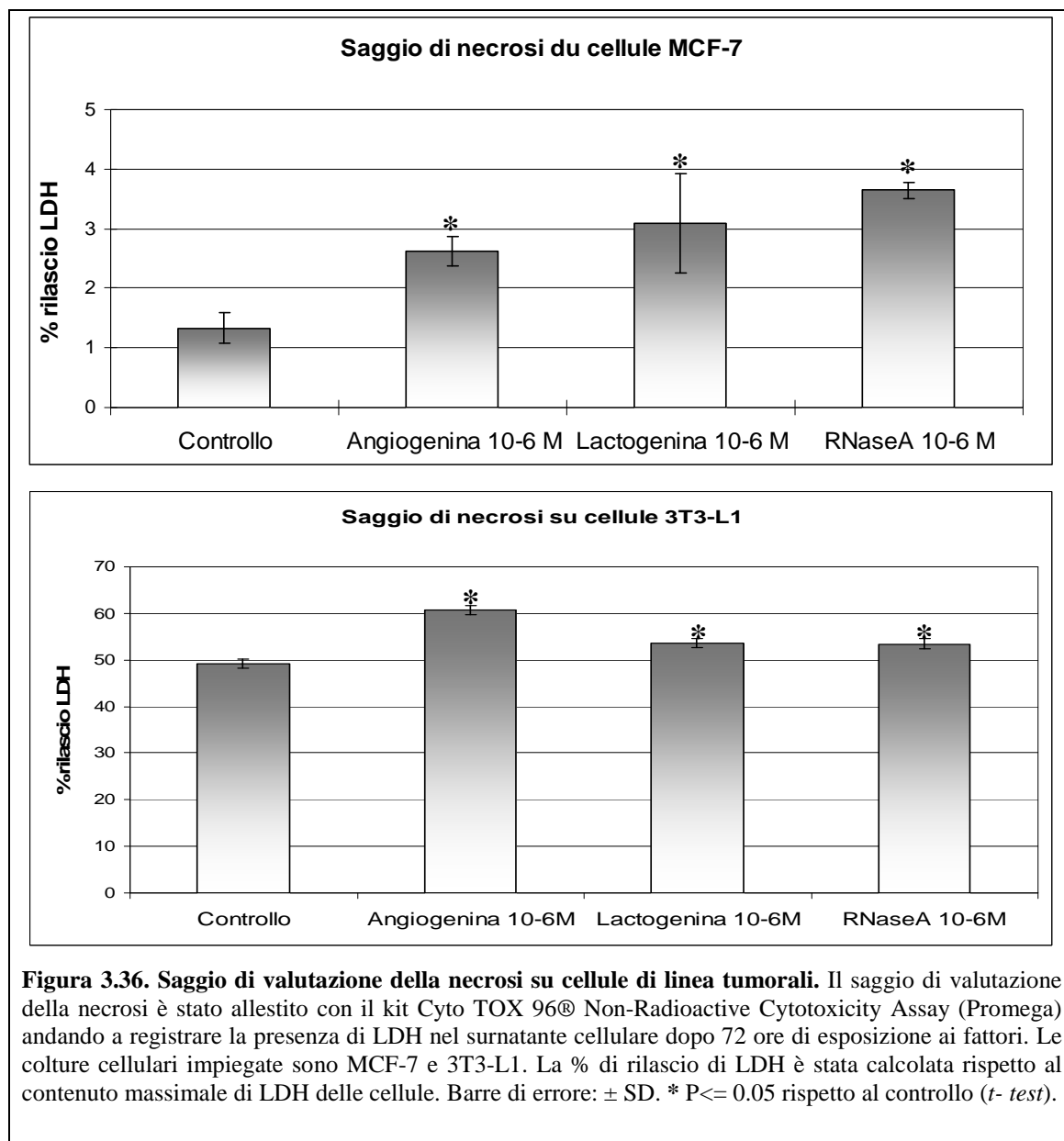
Le tre proteine manifestano un'azione citotossica sulle linee cellulari che aumenta al crescere del tempo di esposizione e della concentrazione utilizzata. Il massimo effetto è stato registrato dopo 72 ore e a concentrazioni micromolari, come illustrato dai grafici in Figura 3.34. L'Angiogenina risulta essere la più citotossica delle tre proteine provocando, dopo 72 ore di trattamento ad una concentrazione micromolare, una riduzione della vitalità di circa il 50% su MCF-7, HT-29 e 3T3-L1. L'azione citotossica rilevata è dose dipendente: per l'Angiogenina, ad esempio, esiste una differenza significativa, dal punto di vista statistico, tra l'effetto indotto dalla concentrazione 10^{-8} M e 10^{-6} M. ($P \leq 0.05$ rispettivamente dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, *t test*). Le tre proteine sembrano essere meno efficaci sulle cellule A431.

Per determinare il tipo di morte cellulare indotto dalle ribonucleasi in esame, si sono eseguiti saggi di apoptosi e di valutazione della necrosi sulle linee cellulari MCF-7 e 3T3-L1, utilizzando la concentrazione e il tempo di esposizione più efficaci, rispettivamente micromolare e 72 ore (Figure 3.35 e 3.36). L'Angiogenina sembra manifestare un effetto pro-apoptotico significativo, rispetto al controllo, su entrambe le linee cellulari, e superiore a quello indotto dalle altre due proteine. La Lactogenina

appare meno citotossica della RNase A, confermando i dati ottenuti nei saggi di vitalità. Il saggio di necrosi, che valuta la presenza di LDH nel surnatante cellulare, mostra che le tre proteine sono in grado di provocare la morte cellulare anche attraverso l'induzione della necrosi, sebbene le modificazioni cellulari conseguenti alla necrosi siano meno evidenti rispetto a quelle registrate per l'apoptosi. La capacità delle ribonucleasi isolate dal latte, e in particolar modo dell'Angiogenina, di indurre l'apoptosi su cellule tumorali, trova riscontro in altri studi effettuati su altre proteine appartenenti alla famiglia delle ribonucleasi. L'Onconase ad esempio, una ribonuclease isolata dagli oociti della *Rana pipiens*, si trova attualmente in fase III di sperimentazione clinica, negli Stati Uniti, come farmaco antitumorale. Studi recenti hanno dimostrato che la citotossicità indotta da Onconase attiva il processo apoptotico come conseguenza dell'idrolisi selettiva di tRNA (Jordanov *et al.*, 2000). Ulteriori studi dovranno quindi andare ad approfondire quali meccanismi pro-apoptotici vengono innescati dall'Angiogenina sulle cellule di linea tumorali.







3.13.2. Citotossicità su pre-adipociti umani.

Nel precedente paragrafo è stata riscontrata un'azione citotossica su preadipociti di linea murini, 3T3-L1, da parte di Angiogenina, Lactogenina e RNase A. Sulla base di questi risultati si è voluto testare il possibile effetto delle proteine in esame, su preadipociti umani ottenuti da materiale di liposuzione. Anche in questo caso, come per le cellule di linea, si è riscontrata una diminuzione della vitalità, determinata mediante saggio colorimetrico MTS. (Figura 3.37).

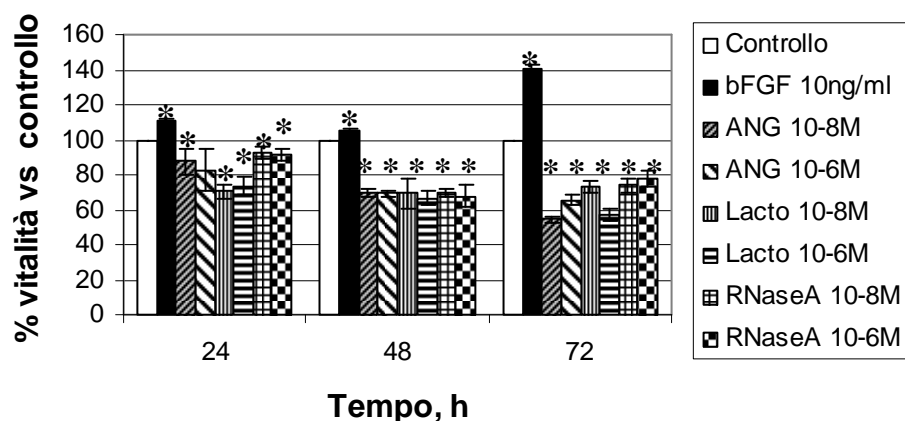


Figura 3.37. Saggio di vitalità su pre-adipociti umani di IV generazione. Il saggio colorimetrico MTS è stato condotto al termine del periodo di incubazione delle colture cellulari con le proteine in esame. Il controllo è costituito da colture cellulari in terreno base. La vitalità cellulare viene espressa come variazione percentuale del valore di assorbanza, letto a 490 nm, rispetto al controllo posto uguale a 100. Barre di errore: \pm SD. * $P \leq 0.05$ rispetto al controllo (*t-test*).

L'Angiogenina presenta un'attività citotossica superiore alle altre due proteine, che diviene particolarmente significativa alle 72 ore di trattamento. In studi futuri si potrà verificare se l'Angiogenina possa essere impiegata nel controllo della crescita degli adipociti, e quindi della massa grassa.

L'analisi dei dati ottenuti dal saggio di vitalità su pre-adipociti ci porta a fare un'ulteriore considerazione. L'Angiogenina e le altre ribonucleasi analizzate sembrano presentare una un'azione selettiva rispetto al tipo cellulare. E' infatti interessante notare che sulle cellule endoteliali, a concentrazioni fisiologiche, non manifestano proprietà citotossiche, ma bensì mitotiche e pro-angiogeniche, mentre su altri tipi cellulari di coltura primaria, quali i pre-adipociti, risultano essere citotossiche. L'ipotesi di un possibile meccanismo recettoriale nell'interazione con le cellule endoteliali viene quindi ulteriormente avvalorata. E' plausibile pensare che le cellule endoteliali esprimano un recettore per l'Angiogenina, non presente in altri tipi cellulari, che legghi la proteina favorendone l'endocitosi e l'invio verso la sede d'azione, preservando allo stesso tempo, la cellula dall'azione citotossica della ribonucleasi.

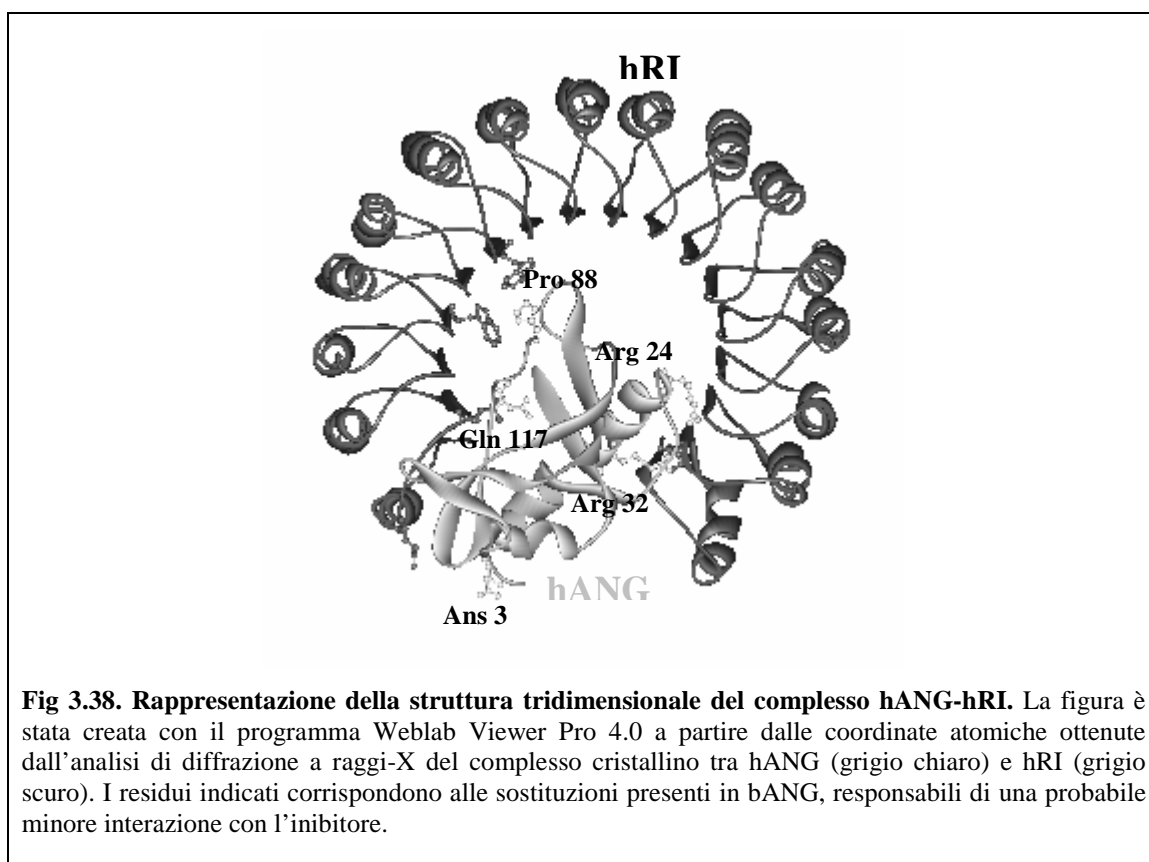
3.14. Analisi computazionale dell'interazione angiogenina bovina –inibitore RNase.

L'angiogenina umana (hANG) forma con RI un complesso con $K_I < 1$ fM (Lee *et al.*, 1989). Il legame con hRI comporta la perdita dell'attività enzimatica e biologica dell'angiogenina umana (Shapiro and Vallee, 1987) con conseguente mancanza di azione citotossica. Gli studi effettuati in questo lavoro invece, evidenziano per l'angiogenina bovina (bANG), proprietà citotossiche *in vitro* su cellule di linea tumorali. L'attività citotossica di alcune ribonucleasi, come la ribonuclease seminale bovina (BS-RNase) e l'Onconase[®], si esplica grazie alla loro capacità di eludere l'interazione con RI (Wu Y. *et al.*, 1993). A tale scopo si è deciso di comparare la sequenza, la struttura secondaria e terziaria di hANG con quelle bovina per valutare, mediante analisi computazionale, se le sostituzioni presenti nella sequenza amminoacidica di bANG, rispetto a quella umana, possano sfavorire l'interazione con RI e quindi giustificare l'azione citotossica.

L'angiogenina umana e quella bovina presentano un'omologia di struttura primaria del 64%. Papageorgiu *et al.* (1997) hanno risolto la struttura cristallografica a Raggi-X del complesso hANG-hRI con una risoluzione di 2 Å (PDB file 1a4y). Il complesso cristallizza sottoforma di dimero anche se, probabilmente, in soluzione è presente come monomero. La struttura di hANG in complesso con hRI è molto simile a quella della forma libera (Acharya K.R. *et al.* 1994). Sulla base di questa considerazione è stato possibile andare a modellare la struttura di bANG su quella della struttura umana: le sostituzioni presenti nella sequenza primaria bovina interessano buona parte dei 24 residui amminoacidici della proteina umana che sono coinvolti nel legame con hRI come illustrato in tabella 3.5. Dall'analisi effettuata è emerso che la sostituzione di angiogenina umana con la corrispondente proteina bovina nel complesso con hRI comporterebbe la rimozione di alcuni ponti salini esistenti tra hANG e l'inibitore, l'alterazione di interazione di tipo aromatico e l'introduzione di alcune repulsioni di tipo elettrostatico.

AA hANG	AA bANG	Commento alla sostituzione
ASN 3	ASP 4	Introduzione di una repulsione elettrostatica con GLU 440 hRI
ARG 24	GLU 25	Destabilizzazione dell'interazione con ASP 36, GLU 66 e ASP 21 del hRI
GLU 27	PHE 28	Rottura del ponte salino con ARG 95 e alterata l'interazione con TYR 150 hRI
ARG 31	LYS 32	Indebolita l' interazione ASP 35 e ARG 63 del hRI
ARG 32	ASN 33	Rottura del ponte salino con ASP 36
GLY 34 SER 37	ARG 35 ARG 38	Introduzione di una repulsione elettrostatica con cariche positive del hRI presenti in quella regione
PRO 88	SER 89	Nel cuore della struttura dell'inibitore è presenta una coppia di triptofani, TRP 375 e 318, che sono disposti a sandwich e accolgono al loro interno il residuo PRO 88 dell'angiogenina umana, che è un aminoacido bloccato dal punto di vista conformazionale. La sostituzione con SER comporta un'alterazione del loop dell'angiogenina che interagisce con RI andando a compromettere questo tipo di interazione molto importante tra proteina e inibitore
TRP 89	ARG 90	ARG potrebbe formare un ponte salino con GLU 344 di hRI ma l'alterazione del loop sfavorisce questo tipo di interazione
GLN 117	GLU 118	Repulsione elettrostatica con ASP 435

Tabella 3.5. Analisi delle possibili nell'interazione con hRI, alterazioni tra hANG e bANG sulla base delle differenze nella struttura delle due proteine.



Interessanti modificazioni subirebbe il *loop* dell'angiogenina 84-89, che interagisce con hRI a livello di una tasca idrofobica, costituita da più residui di triptofano dell'inibitore. In particolare gli anelli indolici dei residui TRP 375 e 318 di hRI avvolgono il residuo PRO 88 di hANG formando ben 15 interazioni di van der Waals. La sostituzione con un residuo idrofilico, quale la serina, potrebbe rappresentare una delle principali destabilizzazioni delle interazione tra ANG e hRI. Altri autori (Rutkoski et al, 2005) hanno già dimostrato che sostituendo la GLY 88 della RNase A con ARG si produce un mutante della ribonucleasi in grado di evadere l'interazione con hRI con un aumento sia della costante di dissociazione, del complesso proteina-inibitore, che della citotossicità su cellule tumorali.

Alla luce di queste considerazioni è quindi ragionevole ipotizzare che, alla base della citotossicità in vitro di bANG su cellule di linea tumorali, ci sia anche una minore interazione con hRI. Tuttavia queste ipotesi dovranno essere confermate, in futuro, da studi di *binding* tra bANG e hRI.

4. CONCLUSIONI.

Nel presente lavoro sono state isolate, fino all'omogeneità, tre proteine da latte vaccino presenti in concentrazione di qualche mg/l; si tratta in particolare di Angiogenina, Lactogenina e RNase A. La loro funzione nel latte in realtà non è ben nota. Esistono evidenze sperimentali che attribuiscono all'Angiogenina un possibile coinvolgimento nel trasferimento dell'immunità passiva tra madre e feto. La sintesi di Angiogenina a livello della ghiandola mammaria e la dipendenza del suo contenuto nel latte da fattori strettamente correlati alle funzioni riproduttive dei mammiferi, confermano ulteriormente questa teoria (Chang S.I *et al.*, 1997 e Malamitsi-Puchner A. *et al.*, 1997).

La purificazione è stata resa possibile grazie all'utilizzo di differenti tecniche cromatografiche che hanno separato le ribonucleasi di interesse dal restante materiale proteico, prima sfruttando il loro elevato punto isoelettrico mediante cromatografia a scambio ionico e in seguito mediante cromatografia HPLC in fase inversa. Contrariamente a quanto accade per la maggior parte degli altri enzimi, le tre ribonucleasi purificate non perdono la loro attività enzimatica dopo il passaggio cromatografico HPLC.

Le tre proteine mostrano un'elevata omologia di sequenza e di struttura come confermato dalle tecniche spettroscopiche impiegate per la loro analisi quali spettroscopia UV, UV in derivata seconda, fluorescenza e dicroismo circolare. Angiogenina e RNase A presentano degli spettri UV sovrapponibili per forma ed intensità mentre Lactogenina produce degli spettri che si differenziano, da quelli delle altre due proteine, per la presenza di un residuo di triptofano esposto ad un intorno chimico molto polare. L'analisi condotta mediante dicroismo circolare evidenzia che le tre proteine presentano una struttura secondaria comparabile con un modesto contenuto di α -elica. L'Angiogenina, a differenza delle altre due ribonucleasi, possiede un ponte a disolfuro in meno. Il quarto ponte a disolfuro è sostituito da un'ansa contenente un sito tipico per il riconoscimento cellulare, la sequenza amminoacidica RGD, che probabilmente riveste un ruolo importante nella funzione cellulare della proteina. La Lactogenina, invece, presenta all'estremità N-terminale un residuo pirogluttamico, che conferisce maggiore stabilità alla proteina e che si ritrova anche in una proteina dotata di citotossicità quale l'Onconase.

Le tre ribonucleasi sono state saggiate per la loro capacità di idrolizzare substrati dinucleotidici. Come noto la RNase A idrolizza più velocemente entrambi i substrati mentre la Lactogenina risulta essere più selettiva per il riconoscimento dell'uracile rispetto alla citosina con i substrati UpG e CpG. L'Angiogenina si è rivelata la meno attiva delle tre proteine. Studi presenti in letteratura però, evidenziano che tale attività ribonucleolitica, seppur debole, è essenziale per l'azione pro-angiogenica.

Allo scopo di individuare frammenti peptidici, responsabili dell'attività biologica, è stato condotto uno studio di frammentazione enzimatica dell'Angiogenina con tripsina. Il frammento contenente la porzione C-terminale della proteina presentava un ponte a disolfuro per cui è stato ridotto e carbossimetilato per separare ulteriormente le due componenti 56-61 e 108-124. Dagli studi effettuati sono risultati di particolare interesse i frammenti N e C-terminale e il frammento centrale 56-61.

La proteina umana omologa di bANG è stata ampiamente studiata per la sua capacità di stimolare l'angiogenesi, a cui deve il nome. In questo lavoro si è riscontrato anche per l'Angiogenina bovina la capacità di attivare i vari stadi dell'angiogenesi in saggi eseguiti sia *in vitro* che *in vivo*. bANG promuove in particolar modo la proliferazione cellulare, ma anche l'organizzazione in strutture capillari simili su Matrigel, la migrazione e la neovascolarizzazione nella membrana corionallantoidea di pollo. L'induzione del fenomeno angiogenico avviene utilizzando concentrazioni di proteina che si trovano nel *range* del livello plasmatico (10^{-8} M). A concentrazioni più elevate, l'Angiogenina e le altre ribonucleasi in esame risultano essere citotossiche per le cellule endoteliali. Una possibile spiegazione potrebbe venire dal meccanismo recettoriale con il quale è stato dimostrato che agisce l'angiogenina umana e che prevede l'internalizzazione della proteina e la sua traslocazione nel nucleo. Data l'elevata omologia di sequenza, si può supporre che anche l'Angiogenina bovina operi in tal modo e che a concentrazioni elevate il legame con il recettore sia saturo. In tali condizioni l'Angiogenina può entrare nella cellula per endocitosi, come una qualsiasi ribonucleasi, ed esplicare la sua azione citotossica.

Il peptide N terminale e il frammento centrale 56-61 promuovono la proliferazione di cellule endoteliali mentre la porzione C-terminale la inibisce. Quest'ultima porzione è risultata essere particolarmente attiva nel saggio di angiogenesi

su Matrigel suggerendo che l'azione della proteina nativa si esplica sia nella fase proliferativa che in quella differenziativa dell'angiogenesi.

In questo lavoro è anche emerso che l'azione dell'Angiogenina è selettiva per le cellule endoteliali: anche a concentrazioni fisiologiche l'Angiogenina si è dimostrata citotossica su cellule pre-adipocitiche umane.

La Lactogenina ha dimostrato di possedere un'attività pro-angiogenica simile, ma leggermente inferiore, a quella dell'Angiogenina e superiore a quella della Ribonucleasi A. La maggiore omologia con bANG rispetto alla RNase A potrebbe spiegare questa similitudine d'azione.

I fattori angiogenici, come l'Angiogenina, possono essere utili nelle applicazioni di medicina rigenerativa dove una rapida vascolarizzazione è garanzia di attecchimento del sostituto tessutale. A tale scopo si è valutato l'effetto promosso da bANG e dal suo peptide N-terminale sull'adesione e organizzazione di cellule endoteliali su *scaffold* di policaprolattone e Puramatrix. Quest'ultimo biomateriale si è rivelato inadatto alla coltura di cellule endoteliali nelle condizioni adottate ma, sebbene bANG e il peptide N-terminale non abbiano promosso la vitalità delle cellule endoteliali incapsulate, si è riscontrata la presenza di cellule organizzate a formare strutture cilindriche cave. L'adesione su policaprolattone invece, è stata favorita dalla presenza della proteina e del suo peptide, come confermato dall'analisi di microscopia elettronica a scansione e dal saggio di vitalità cellulare.

Uno dei dati più interessanti che sono emersi da questo studio è rappresentato dalla citotossicità esercitata dalle ribonucleasi in esame su colture di cellule di linea tumorali. Fra le tre proteine, l'Angiogenina è risultata essere la più attiva. Alcuni lavori presenti in letteratura evidenziano quali devono essere le caratteristiche molecolari di una ribonucleasi per poter essere citotossica (Makarov *et al.*, 2003) e le ribonucleasi qui studiate rispondono a molti di questi quesiti.

L'attività ribonucleolitica è indispensabile per l'azione citotossica. Se l'Onconase viene alchilata, perdendo la sua attività ribonucleolitica viene meno anche quella citotossica. Angiogenina e Lactogenina, come dimostrato in questo lavoro, possiedono la capacità di idrolizzare l'acido ribonucleico.

Esiste un legame ben definito tra stabilità e metabolismo di una proteina. La citotossicità delle ribonucleasi viene favorita da una elevata stabilità e capacità di

resistere alla degradazione proteolitica. Le tre proteine in esame sono tutte stabilizzate da almeno tre ponti a disolfuro e la Lactogenina presenta all'estremità N-terminale un residuo pirogluttamico, che ne previene la degradazione.

L'internalizzazione in una cellula è probabilmente lo *step* limitante per la citotossicità. Le cellule tumorali esprimono sulla loro membrana plasmatica un elevato numero di glicoproteine e fosfolipidi acidi, conferendo alla superficie della cellula una carica negativa. Per questo motivo è favorita l'interazione con proteine aventi carica positiva e quindi con proprietà basiche. Angiogenina e Lactogenina soddisfano anche questo requisito perché possiedono un $pI > 9.5$.

Nella sequenza amminoacidica della RNase A è presente un peptide segnale, KFERQ, che individua le proteine citosoliche per la degradazione lisosomiale. Questo peptide, assieme all'inibitore della ribonucleasi (RI), protegge la cellula dall'azione delle ribonucleasi. Nella struttura primaria di Angiogenina e Lactogenina manca questo peptide segnale.

Un altro fattore determinante per la citotossicità di una ribonucleasi è costituito dall'evasione dell'interazione con RI. Papageorgiou e colleghi hanno isolato e caratterizzato il complesso angiogenina umana – RI. L'inattivazione della proteina umana, da parte dell'inibitore, spiega la mancanza di citotossicità di hANG. Attualmente non esistono studi in letteratura circa l'interazione tra l'Angiogenina bovina e hRI. In questo lavoro si è confrontata la struttura tridimensionale della proteina bovina con quella umana in complesso con RI; nonostante l'elevata omologia di sequenza che esiste tra le due proteine, le sostituzioni presenti nella proteina bovina sembrano compromettere in modo decisivo il legame con l'inibitore. Questa analisi, sebbene teorica, fornisce una spiegazione ulteriore della citotossicità dell'Angiogenina bovina.

I dati preliminari, ma allo stesso tempo incoraggianti, fin qui ottenuti, sono il presupposto per la realizzazione di studi futuri che, prendendo a modello Angiogenina e Lactogenina, portino alla realizzazione di nuovi agenti antitumorali.

BIBLIOGRAFIA

Acharya K.R., Shairo R., Allen S.C., Riordan J.F. and Vallee B.L. *Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 2915-2919, 1994.

Bicknell R. and Vallee B.L. *Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C.* Proc Natl Acad Sci U S A **85**, 5961-65, 1988.

Blaser J., Triebel S., Kopp C. and Tschesche H. *A highly sensitive immunoenzymometric assay for the determination of angiogenin.* Eur J Chem Clin Biochem **31 (8)**: 513-6, 1993

Boix E., Wu Y., Vasandani V.M., Saxena S.K., Ardelt W., Ladner J., Youle R.J. *Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity.* J Mol Biol. **19**;257(5):992-1007, 1996.

Bond M.D. and Strydom D.J. *Amino acid sequence of bovine angiogenin.* Biochemistry **28**, 6110-13, 1989.

Bond MD, Vallee BL. *Isolation of bovine angiogenin using a placental ribonuclease inhibitor binding assay.* Biochemistry. **27(17)**: 6282-7, 1988.

Boyden, S.V. *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes.* J Exp Med **115**: 453, 1962.

Carsana A., Confalone E., Palmieri M., Libonati M. and Furia A., *Structure of the bovine pancreatic ribonuclease gene: the unique intervening sequence in the 5' untranslated region contains a promoter-like element.* Nucleic Acids Res., **16**, 5491-5502, 1988.

Chen C.Z. and Shapiro R. *Site-specific mutagenesis reveals differences in the structural bases for tight binding of RNase inhibitor to angiogenin and RNase A* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 1761-1766, 1997

Chang S.I., Jeong G.B., Park S.H., Ahn B.C., Choi J.D., Chae Q., Namgoong S.K., Chung S.I. *Detection, quantitation, and localization of bovine angiogenin by immunological assays.* Biochem Biophys Res Commun. **232(2)**, 323-327, 1997

Coombes A.G.A., Rizzi S.C, Williamsonc M., Barraletd J.E, Downesa S., Wallacee W.A. *Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery.* Biomaterials **25(2)**, 315-325, 2004.

Costanzi J., Sidransky D., Navon A., Goldsweig H. *Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase.* Cancer Invest. **23(7)**:643-50, 2005.

Di Liddo R. *Ingegneria del tessuto adiposo: adipogenesi e apetti applicativi.* Tesi di dottorato. 2005.

Dimmeler S., Zeiher A.M. *Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression.* Circ. Res. **87**: 434-439, 2000.

Edelhoch H. *Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins.* Biochemistry **6(7)**: 1948-54, 1967.

Fant J. *Caratterizzazione dell'Angiogenina mediante lo studio dei suoi peptidi triptici. Valutazione dell'attività biologica.* Lavoro di Tesi. AA 2003-2004.

Fett J.W, Rybak R.M., Auld D.S., St.Clair D.K, Yao Q. *C-Terminal Angiogenin peptides inhibit the biological and enzymatic activities of angiogenin.* Biochem Biophys Res Commun **162(1)**: 535-543, 1989.

Finezzo M.L., *Studi sull'angiogenina. Analisi dell'attività enzimatica.* Lavoro di Tesi. AA 2003-2004.

Genove E., Shen C., Zhanga S., Semino C.E. *The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function.* Biomaterials **26** 3341-3351, 2005.

Green H., Meuth M. *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture.* Cell **3**: 127-133, 1974.

Greenfield, N. and Fasman, G.D., *Computer circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation.* Biochemistry, **8**: 4108-4116, 1969

Guerra M. *Isolamento di angiogenina da latte vaccino e preparazione di frammenti peptidici con potenziale attività angiogenica.* Tesi di Laurea AA 1999-2000.

Hallan T.W., Shapiro R., Vallee B.L. *Dual site model for organogenic activity of angiogenin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**:2222-6, 1991.

Harper J.W. and Vallee B.L., *A covalent Angiogenin ribonuclease hybrid with fourth disulfide bond generated by regional mutagenesis.* Biochemistry **28**,1875-84, 1989.

Hosoya K., Nagareda Y., Hasemi S., Sanda A., Takizawa Y., Watanabe H., Ohgi K. and Irie M., *Primary structure of an alkaline ribonuclease from bovine liver.* J. Biochem., **107**, 613-618, 1990.

Hu G., Riordan J.F., Vallee B.L. *A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells.* Proc. Natl. vAcad. Sci. USA. 94:2204-9,1997.

Hu G., Xu C., Riordan J.F. *Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA.* J Cell Biochem **76(3)**:452-62, 2000.

Ilinskaya, Olga N., Dreyer, Florian, Mitkevich, Vladimir A., Shaw, Kevin L., Pace, C. Nick and Makarov, Alexander A., *Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic.* Protein Science, **11(10)**, 2522-2525, 2002.

Iordanov M.S., Ryabinina O.P., Wong J., Dinh T.H., Newton D.L., Rybak S.M., Magun B.E. *Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis.* Cancer Res. **60(7)**, 1983-94, 2000.

Jaffe, E. A., Nachman R.L., Becker C.G. and Minck C.R., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.* J. Clin. Invest. 52: 2745-2756, 1973.

Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. *Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease.* J Biol Chem. **270(18)**:10525-30,1995.

Kishimoto K., Liu S., Tsuji T., Olson K.A., Hu G.F. *Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis* Oncogene. **24(3)**:445-56, 2005

Kubota Y., Kleinman H.K., Martin G.R. and Lawley T.J. *Role of Laminin and Basement Membrane in the Morphological Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-like Structures.* The Journal of Cell Biology, **107**,1589-1598,1988

Langer R., Vacanti J.P., *Tissue engineering* , Science, **260**: 920-926, 1993.

Lee F.S. and Valle B.L. *Binding of placental ribonuclease inhibitor to the active site of angiogenin.* Biochemistry, **28**, 3556-3561, 1989

Lee F.S. and Vallee B.L. *Characterization of ribonucleolytic activity of Angiogenin towards tRNA.* Biochem Biophys Res Commun **161(1)**, 121-126, 1989.

Lee F.S., Shapiro R., and Valle B.L., *Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor.* Biochemistry **28**, 225.230, 1989.

Leland P.A., Schultz L.W., Byung-Moon Kim, Raines T. *Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 10407-10412, 1998.

Leoinidas D.D, Shapiro R., Subbarao G.V., Russo N. and Acharya R.R. *Crystallographic studies of the C-Terminal segment of Human Angiogenin in defining enzymatic potency*. Biochemistry, **41(8)**, 2552-62, 2002.

Liao, You-Di; Wang, Sui-Chi; Leu, Ying-Jen; Wang, Chiu-Feng; Chang, Shu-Ting; Hong, Yu-Ting; Pan, Yun-Ru and Chen, Chinpan, *The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from Rana pipiens*. Nucleic Acids Research, **31(18)**, 5247-5255, 2003.

Makarov A.A., Ilinskaya O.N. *Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets*. FEBS Lett. **540(1-3)**:15-20, 2003.

Malamitsi-Puchner A., Sarandakou A., Giannaki G., Rizos D., Phocas I. *Changes of angiogenin serum concentrations in the perinatal period*. Pediatr Res. **41(6)**, 909-911, 1997.

Naddeo, M., Vitagliano, L., Russo, A., Gotte, G., D'Alessio, G. and Sorrentino, S., *Interactions of the cytotoxic RNase A dimers with the cytosolic ribonuclease inhibitor*. FEBS Lett., **579(12)**, 2663-8, 2005.

Narmoneva D.A., Onib O., Sieminski A.L., Zhang S., Gertler J.P., Kamm R.D., T. Leea R.T., *Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis*. Biomaterials **26** 4837-4846, 2005.

Ng T.B., Ye X.Y. and Cheng K.J., *Isolation and characterization of angiogenin-1 and a novel protein designated lactogenin from bovine milk*. Biochem Biophys Res Commun, **263**: 187-91, 1999.

Ng, T.B., Lam, T.L., Au, T.K., Ye, X.Y. and Wan, C.C., *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase by bovine milk proteins*. Life sci., **69(19)**, 2217-23, 2001.

Papageorgiou A.C., Shapiro R., Acharya K.R. *Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution*. EMBO J. **16**. 5162-5177, 1997.

Parcianello A. *Studi mediante spettrometria di massa dell'angiogenina bovina e di peptidi da essa derivati*. Lavoro di Tesi AA 2000 – 2001.

Pepper M.S., Mandriota S.J., Vassalli J.D., Orci L., Montesano R. *Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions*. Curr Top Microbiol Immunol 213:31-67, 1996.

Rausch, Jason W., Sathyanarayana, B. K., Bona, Marion K. and Le Grice, Stuart F. J., *Probing contacts between the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase and nucleic acid by site-specific photocross-linking*. J. Biol. Chem., **275(21)**, 16015-16022, 2000.

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

Ribatti D., Vacca A., Roncali L. and Dammacco F. *The chick embryo chorionallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis*. Int. J. Dev. Biol. **40**, 1189-1197, 1996.

Rosenberg¹, Helene F. and Domachowske, Joseph B., *Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens*. Journal of Leukocyte Biology, **70(5)**, 691-698, 2001.

Rosenberg², Helene F., Zhang, Jianzhi, Liao, You-Di and Dyer, Kimberly D., *Rapid Diversification of RNase A Superfamily Ribonucleases from the Bullfrog, Rana catesbeiana*. J. Mol. Evol., **53(1)**, 31-38, 2001.

Rutkoski T.J., Kurten E.L., Mitchell J.C., Raines RT. *Disruption of shape-complementarity markers to create cytotoxic variants of ribonuclease A*. J Mol Biol. **18**, 41-54. 2005

Russo N., Nobile V, Di Donato A., Riordan J.F. and Vallee B.L. *The C-terminal region of Human Angiogenin has a dual role in enzymatic activity*. Biochemistry **93**, 3243-47, 1996

Schnaper H.W., Kleinman H.K., Grant D.S., *Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation*. Kidney International 43: 20-25, 1993.

Shapiro R. and Vallee B.L. *Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of Human Angiogenin. Alanine derivatives inhibit Angiogenin-induced angiogenesis*. Biochemistry **28**,7401-08, 1989.

Shapiro R. and Vallee B.L. *Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activity of Angiogenin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 2238-2241, 1987

Shapiro R., Hallahan T.W and Vallee B.L. *Dual site model for the angiogenic activity of Angiogenin*. Proc. Natl Acad Sci USA **88**, 2222-26, 1991.

Shapiro R., Riordan J.F. and Valle B.L. *Characteristic ribonucleolytic activity of Human Angiogenin*. Biochemistry **25** 3527-32, 1986

Smith M.R., Newton D.L., Mikulski S.M., Rybak S.M. *Cell cycle-related differences in susceptibility of NIH/3T3 cells to ribonucleases*. Exp Cell Res. **247(1)**:220-32, 1999

Smyth D.G., Stein W.H. and Moore S., *The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmation*. J Biol Chem, **238**, 227-234, 1963.

Thomas, Brian C., Chamberlain, Joel, Engelke, David R. and Gegenheimer, Peter, *Evidence for an RNA-based catalytic mechanism in eukaryotic nuclear ribonuclease P*. RNA, **6(4)**, 554-562, 2000.

Vallee B.L., Fett J.W., Strydom D.J., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L. and Riordan J.F. *Isolation and characterization of Angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells*. Biochemistry **24**, 5480-6, 1985.

Vallee B.L., Hu G.F., Strydom D. J., Fett J.W. and Riordan J.F. *Actin is a binding protein for Angiogenin*. Proc Natl Acad Sci USA **90**, 1217-21, 1993.

Vallee B.L., Shapiro R., Strydom D.J. and Olson K.A. *Isolation of angiogenin from normal human plasma*. Biochemistry **26**, 5141-6, 1987.

Zhang S., Holmes T.C., Lockshin C. & Rich A. *Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane*. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa; **90**: 3334- 1993.