



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
Indirizzo in INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
XX CICLO

TESI DI DOTTORATO

**PEPTIDI DERIVATI DA FATTORI ENDOGENI AD
ATTIVITÀ PRO- ED ANTI-ANGIOGENICA: SINTESI,
CARATTERIZZAZIONE CONFORMAZIONALE E SAGGI
BIOLOGICI *IN VITRO* E *IN VIVO***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. PIER PAOLO PARNIGOTTO

Supervisore : Ch.mo Prof. CLAUDIO GRANDI

Dottorando : Dott. FRANCESCA GHEZZO

31 Gennaio 2008

Al nostro futuro

Abbreviazioni

aa = amminoacido

A / Ala = alanina

C / Cys = cisteina

D / Asp = acido aspartico

E / Glu = acido glutammico

F / Phe = fenilalanina

G / Gly = glicina

I / Ile = isoleucina

K / Lys = lisina

L / Leu = leucina

N / Asn = asparagina

Nal = β -(2-naphtyl)alanina

Nle = Norleucina

Q / Gln = glutammina

R / Arg = arginina

S / Ser = serina

T / Thr = treonina

V / Val = valina

W / Trp = triptofano

Y / Tyr = tirosina

AA: acido ascorbico

Abs = assorbanza

Acm = acetammidometil

Acm: acetammidometil

Ang: angiopoietina

Boc = *tert*-butilossicarbonile

BOP: 2-(1-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato

BrdU: bromodeossiuridina

BSA: albumina di siero bovino

CAM: membrana corioallantoidea

cAMP: adenosin monofosfato ciclico

CD = Circular Dicroism
CHO = formile
COSY: spettroscopia di correlazione
COSY-DQF: doppio filtro quantico
COX: ciclossigenasi
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo
DCC = N,N'-dicicloesilcarbodiimmide
DCI: dicicloesilurea
DCM = diclorometano
DCU = N,N'-dicicloesilurea
DEA = dietilammina
DIEA = N,N-diisopropilettilammina
DIPCDI: N,N'-diisopropilcarbodiimmide
DMAP = 4-dimetilamminopiridina
DMF = N,N-dimetilformammide
DMS = dimetilsolfuro
DNA: acido deossiribonucleico
ECM: matrice extracellulare
EDCI: 3-etil-1-(N,N-dimetil)amminopropilcarbodiimmide
EDTA = acido etilendiamminotetraacetico
EGF: fattore di crescita epidermico
EPC: precursori delle cellule endoteliali
EtOH: etanolo
FCS: siero fetale di vitello
FGF: fattore di crescita dei fibroblasti
FGFR: recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti
Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile
GAG: glicosaminoglicani
HATU = O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HC: idrocortisone
HCl: acido cloridrico
HFIP: esafluoro-isopropanolo
HGF: fattore di crescita degli epatociti
HIF: fattore di ipossia inducibile

HOAt = 7-aza-1-idrossibenzotriazolo

HOBt = 1-idrossibenzotriazolo

HONB: imide N-idrossi-5-norbornene-2,3-dicarbossilica

HOSu: N-idrossisuccinimide

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

HSPG: proteoglicano eparan solfato

HuDMEC: cellule endoteliali umane da microcircolo dermale

HUVEC: cellule endoteliali da cordone ombelicale umano

HVP: precursore della vitronectina umana

IFN: interferone

IGF-1: fattore di crescita insulino-simile

IL: interleuchina

IR: radiazione infrarossa

LDH: lattatodeidrogenasi

LY294002: (2-(4-Morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-one

MALDI-MS = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry

MAPK: proteina chinasi mitogeno-attivata

MBHA: resina 4-Metilbenzidrilamina

MKK-1: *Mitogen-activated protein kinase kinase 1*

MMP: metalloproteasi di matrice

Mmt: 4-Metossitritile

MTS: 3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolo

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolobromuro

NAD: nicotinammideadenindinucleotide

NMP = N-metil-2-pirrolidone

NMR: risonanza magnetica nucleare

NO: ossido nitrico

NOE: effetto Overhauser nucleare

NOESY: *NOE Enhancement Spectroscopy*

OPfp: pentafluorofenil estere

OtBu = *tert*-butilestere

PAI: inibitore dell'attivatore del plasminogeno

PBS: soluzione tampone sodio-fosfato

PCl₅: fosforo pentacloruro

PD98059: (2-(2-Ammino-3-metossifenil)-4H-1-benzopiran-4-one

PDGF: fattore di crescita di derivazione piastrinica

PF: fattore piastrinico

PI₃: inositolo 3 fosfato

PI-3K: protein chinasi inositolo 3 fosfato

PIGF: fattore di crescita placentale

PTC: fenilisotiocianato

PLC: fosfolipasi C

PLGF: fattore di crescita piastrinico

Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonile

PPI: fosfatidil inositolo

P^hTC-AA = feniltiocarbammil amminoacido

P^hTH-AA = feniltioidantoin amminoacido

PyBOP: benzotriazol-1-il-ossi-tris-pirrolidino-fosfonio esafluorofosfato

Resina HMP (detta anche resina di Wang) = p-idrossimetilfenossimetilpolistirene

Resina Rink Amide MBHA: resina 4-(2',4'-Dimetossifenil-Fmoc-amminometil)-
fenossiacetammido-norleucil-MBHA

RFU = unità di fluorescenza

RGD: arginina-glicina-aspartato

RGDS: arginina-glicina-aspartato-serina

RMSD: *Root Mean Square Deviation*

RNA: acido ribonucleico

Ro 31-8220: sale di 2-{1-[3-(Amidinotio)propil]-1H-indol-3-il}-3-(1-metilindol-3-yl)maleimmide metansulfonato

ROESY: *Rotatine-Frame NOE Spectroscopy*

Rp-cAMP: Rp-diastereoisomero del 3',5' adenosina monofosfato ciclico

RP-HPLC = Cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa

SDS = sodiododecilsolfato

SOCl₂: cloruro di tionile

SPPS = Sintesi peptidica su fase solida

Tacm: trimetilacetammidometile

t-Boc = *tert*-butilossicarbonile

TBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato

t-Bu = *tert*-butile

tButhio: *tert*-Butiltiolo

TEA: trietilammina

TFA = acido trifluoroacetico

TFE: trifluoroetano

TGF: fattore di crescita trasformante

TIC: corrente ionica totale

Tie: recettore per l'angiopoietina

TIMP: inibitore di metalloproteasi di matrice

Tmob: 2,4,6-Trimetilossibenzile

TNF: fattore di necrosi tumorale

TOCSY: spettroscopia di correlazione totale

TOF = Tempo di volo

TOPPipU: 2-(2-oso-1(2H)-piridil)-1,1,3,3-bis-pentametilneuronio tetrafluoroborato

Trt: tritil

TSP: trombospondina

U-73122: 1-[6-[(17 β)-3-Metossiestra-1,3,5[10]-trien-17-il)ammino]esil]-1H-pirrol-2,5-dione

u-PA: attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico

u-PAR: recettore dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico

VEGF: fattore di crescita dell'endotelio vascolare

VHL: von Hippel-Lindau

vWF: fattore di von Willebrand

RIASSUNTO

L'Angiogenesi, la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da strutture preesistenti, è di fondamentale importanza in alcuni processi fisiologici quali lo sviluppo embrionale, la cicatrizzazione delle ferite e il ciclo mestruale. Tuttavia se compromessa, può rappresentare, l'evento chiave di vari stati patologici: dalle infiammazioni croniche alle malattie ischemiche, dalla crescita tumorale allo sviluppo di metastasi.

L'Angiogenesi è di fatto un processo altamente complesso, che richiede il coinvolgimento attivo delle cellule endoteliali, di numerosi fattori solubili e dei componenti della matrice extracellulare.

Nell'organismo, in condizioni fisiologiche, l'accensione e lo spegnimento degli eventi che concorrono alla formazione di nuovi vasi, sono strettamente legati ad un fine bilanciamento di fattori pro- ed anti-angiogenici. Normalmente l'endotelio, si trova in uno stato quiescente (spento), tuttavia preserva la capacità di rispondere a stimoli ipossici, infiammatori o di stress meccanici, e di attivarsi in seguito alla stimolazione autocrino-paracrina di fattori di crescita e citochine prodotti localmente per sopperire alla carenza d'ossigeno e di nutrienti. La rottura di questo delicato sistema di regolazione può comportare anomalie nella formazione di nuovi vasi, e conseguentemente favorire lo progressione di malattie angiogenesi-dipendenti. In quest'ottica sia fattori stimolatori che inibitori, possono rappresentare un promettente target d'intervento terapeutico e per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Tra i numerosi mediatori endogeni, sia la citochina Stromal Derived-Factor 1 (SDF1) che il piccolo polipeptide Timosina $\beta 4$ ($T\beta 4$), giocano un ruolo cruciale nella angiogenesi, promuovendo la proliferazione, la migrazione e il differenziamento delle cellule endoteliali. A questi eventi prendono parte anche le varie molecole di adesione e composti contenenti sequenze adesive, come motivi RGD o di legame per l'eparina. Quest'ultimi possono essere impiegati sia nell'ingegneria tissutale, come fattori promuoventi l'adesione, che come agenti anti-angiogenici, capaci di interferire competitivamente con l'interazione cellule-componenti della ECM.

Questo lavoro di dottorato si è articolato in i) progettazione e sintesi su fase solida di sequenze peptidiche contenute in SDF-1, $T\beta 4$ e in alcune proteine delle matrice extracellulare; ii) studi conformazionali e iii) saggio biologici *in vitro* su colture di cellule endoteliali umane estratte da vena di cordone ombelicale (HUVEC), e *in vivo* su membrana corioallantoidea di pollo (CAM) per valutare gli effetti angiogenici.

La timosina $\beta 4$ appartiene alla famiglia delle β -timosine, molecole dalle proprietà simil-ormonali, e rappresenta il fattore sequestrante l'actina maggiormente espresso a livello delle piastrine e dei leucociti. Philp e collaboratori (2003), hanno evidenziato come l'attività pro-angiogenica esercitata *in vitro* e *in vivo*

dalla T β 4, sia strettamente correlata alla sequenza ¹⁷LKKTE²², motivo di legame per l'actina. Partendo da queste considerazioni è stato studiato il comportamento di tre peptidi bio-attivi, riproducenti il tratto centrale e le due porzioni terminali della proteina, e contenenti il sito di interazione con l'actina. Le analisi conformazionali (NMR e Dicroismo Circolare) hanno dimostrato che ogni frammento isolato assume in soluzione il *folding* adottato dallo stesso motivo all'interno della proteina nativa. Inoltre manifestano sia *in vitro* che *in vivo* un'attività pro-angiogenica, comparabile a quella indotta dall'azione del fattore di crescita basico per i fibroblasti (FGF-2). Questi risultati confermano il ruolo cruciale svolto dal motivo centrale di legame per l'actina nel promuovere la formazione di nuovi vasi, attività che sembra essere, *in vitro*, modulata positivamente dalla presenza del tratto ammino-terminale della T β 4.

Stromal Derived-Factor 1 è una chemochina di tipo alfa, in grado di esercitare la propria attività biologica mediante legame al recettore accoppiato alle proteine G, CXCR4. L'asse SDF-1/CXCR4, è di fondamentale importanza nella regolazione del *trafficking* di cellule staminali e progenitrici ematopoietiche, nello sviluppo del sistema nervoso e a livello del sistema ematopoietico, in generale. Inoltre promuove la mobilitazione delle cellule tumorali favorendo la comparsa di metastasi, ed è coinvolto nello sviluppo del sistema vascolare, esercitando *in vitro* e *in vivo*, una potente attività pro-angiogenica. Espresso costitutivamente da vari tipi cellulari, tra cui le cellule stromali, le cellule endoteliali e le cellule detritiche, SDF-1, è presente principalmente in due forme alternative di *splicing*, l'isoforma alfa e quella beta, sovrapponibili dal punto di vista strutturale, fatta eccezione per la presenza di quattro residui aggiuntivi al terminale carbossilico di SDF-1 β . Tuttavia, rimane ancora da chiarire il significato biologico dell'esistenza di queste due varianti della citochina. Dal punto di vista conformazionale, in SDF-1 sono rintracciabili tre distinte regioni: il tratto N-terminale, un *core* centrale a β -sheet, e la porzione C-terminale. Studi struttura-attività hanno identificato a livello della sequenza N-terminale il dominio deputato al legame col recettore e all'attivazione della cascata intracellulare del segnale, mentre suggeriscono per la porzione carbossi-terminale un ruolo nell'interazione coi glicosamminoglicani (GAG) e nel modulare gli effetti biologici della proteina. Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare la partecipazione del tratto C-terminale nell'attività pro-angiogenica di SDF-1. I peptidi sintetizzati riproducono, per l'appunto, le sequenze carbossi-terminali delle due isoforme native, degli analoghi mutati del suddetto motivo di SDF-1 β , e dei composti di fusione col tratto N-terminale. I dati raccolti indicano un coinvolgimento funzionale della regione C-terminale nell'attività angiogenica di SDF-1, tuttavia solo i peptidi wild-type sono stati capaci di indurre sia *in vitro* che *in vivo* eventi legati alla formazione di nuovi vasi.

Nel 1971, Folkman definì lo sviluppo tumorale e la comparsa di metastasi, come patologie angiogenesi-dipendenti, suggerendo così nuove strategie anti-tumorali aventi come *target* l'inibizione del processo angiogenico, e ha incentivato la ricerca di nuovi agenti anti-angiogenici. Le cellule endoteliali, per

proliferare e migrare all'interno della massa tumorale, necessitano di modificare i loro contatti con le macromolecole della ECM. In generale l'adesione cellulare è mediata da recettori posti sulla superficie, come integrine e proteoglicani eparan-solfato (HSPG), i quali riconoscono a livello delle proteine della matrice, rispettivamente, il motivo amminoacidico RGD e il dominio di legame per l'eparina. Evidenze sperimentali raccolte in questa tesi, hanno permesso di selezionare tra i composti testati, dei potenziali agenti anti-angiogenici, e precisamente le sequenze (GRGDSP)₄K e HVP, capaci di inibire sia eventi morfogenici che effetti angiogenici FGF-indotti .

SUMMARY

Angiogenesis, the formation of new capillaries, is among the key events in some physiological processes, like organ growth and development, wound healing and reproduction. However, an impairment of this process is also a hallmark of different pathologies, such as chronic inflammation, ischemic diseases, tumor growth and metastasis. Angiogenesis is a complex process involving extensive interplay among cells, soluble factors and extracellular matrix.

Physiologically, the body controls angiogenesis through a series of “on” and “off” regulatory switches, maintaining a perfect balance of positive and negative angiogenesis modulators. Normally, endothelium exists in a quiescent state (“turned off”); angiogenic stimuli, including hypoxia, inflammation, and mechanical factors, activate endothelial cells (ECs), by initiating the autocrine or paracrine production and release of growth factors or cytokine. Uncontrolled growth of vessels, due to a balance breakdown, may lead to angiogenesis-dependent diseases. So, the regulation of both angiogenesis stimulators and inhibitors, can represent a promising target for therapy and drug development.

Among endogenous modulators, the chemokine Stromal Derived-Factor 1 (SDF-1), and the small polypeptide Thymosin β 4 (T β 4), were found to play a crucial role in vascular biology, stimulating proliferation, migration and differentiation of ECs. The above mentioned events are also mediated by cell adhesion molecule. Compound containing adhesive sequences, such as RGD motif and heparin-binding domain, can be used either in tissue engineering as adhesion factors, or as anti-angiogenic agents, through a competition with extracellular matrix components for the binding to cell surface.

This work focused on i) design and solid phase synthesis of peptide sequences contained in SDF-1, T β 4 and ECM protein; ii) conformational studies and iii) evaluation *in vitro* and *in vivo* of their angiogenic effects on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) culture and chorioallantoic membrane (CAM).

T β 4 is a member of the β -thymosins, molecules with hormone-like properties, and is the most abundant G-actin sequestering peptide in human blood platelets and white cells. Philp *et al* (2003), suggested that T β 4 exerts its pro-angiogenic activity *in vitro* e *in vivo* through the sequence motif ¹⁷LKKTET²², involved in actin binding. Starting from these considerations it was studied the behavior of three bio-active peptides representing the central part, the N and C terminus of T β 4, and characterized of containing the binding actin site. The structural analysis (NMR and Circular Dichroism), demonstrates that each peptide reproduces the conformation adopted in native protein and exerts both *in vitro* and *in vivo* pro-angiogenic effects, comparable to that induced by Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2). These results confirm the significant role of central binding actin site in the

induction of neo-vessel formation and suggest *in vitro* a positively modulation by the N terminus part of T β 4.

Stromal Derived Factor-1 (SDF-1) is an α -chemokine that binds to G-protein-coupled CXCR4 receptor. The SDF-1/CXCR-4 axis plays an important role in the regulation of stem/progenitor cell trafficking, in normal development of the nervous system, and in hematopoietic system. Moreover, SDF-1 favours the formation of metastasis by increasing tumor cell motility (Libura *et al.* 2002), and plays an important role in the development of the vascular system by exerting a strong pro-angiogenic effect both *in vitro* and *in vivo*. SDF-1 is constitutively expressed in stromal cells, ECs, dendritic cells, and other cells. It is present mainly in two splice forms alpha and beta, which have identical amino acid sequences except for the presence of four additional amino acids at the carboxy terminus of SDF-1 β . The biological significance of the existence of 2 splice forms of SDF-1 has remained unclear. SDF-1 consists of three structural regions: N-terminus, a central beta sheet core, and C-terminus. Structure-function analysis of chemokine identified the NH₂-terminal amino acids as critical to CXCR4 binding and activation, and suggested that C-terminus of protein, is one of interaction sites with glycosaminoglycans (GAGs) and may exert a modulation to biological function of SDF-1. This research verified that the C-terminus could be responsible of the pro-angiogenic effects of SDF-1. The designed peptides correspond to the C-terminus sequences of the two natural isoforms of splicing, mutated analog peptides of SDF-1 β T C-terminal region, and fusion forms containing both N- and C-terminus. The collected data indicated that C-terminal region is functional implicated in pro-angiogenic SDF-1 activity, but only the wild-type sequence were able to induce both *in vitro* and *in vivo* an angiogenic response.

In 1971, Folkman proposed that tumour growth and metastasis are angiogenesis-dependent, and hence, blocking angiogenesis could be a strategy to arrest tumour growth. This possibility stimulated an intensive search for anti-angiogenic molecules. Cell adhesion to macromolecules of the extracellular matrix is needed to allow EC proliferation and migration inside the tumor. EC adhesion can be mediated by i) RGD-dependent integrin receptors or ii) heparin sulphate proteoglycans (HSPGs), which recognized heparin-binding sites on extracellular matrix proteins. Since the loss of anchorage can induce pro-apoptotic signals leading to an inhibition of angiogenic process, RGD-peptides and vitronectin heparin-binding domain (HVP) were assayed as soluble agents to evaluate the effects on angiogenesis. Experimental evidences indicate that some designed peptides, i.e. (GRGDSP)₄K and HVP, may represent promising anti-angiogenic agents whose effects seems to be related to an inhibition of both EC morphogenesis and FGF-2-induced angiogenic effects.

INDICE

Abbreviazioni	Pag.I
RIASSUNTO	Pag.IV
SUMMARY	Pag.IX
1. INTRODUZIONE: L'ANGIOGENESI	Pag.1
1.1 LA CASCATA ANGIOGENICA	Pag.2
1.1.1 Inizio della risposta angiogenica	Pag.2
1.1.2 Proliferazione delle cellule endoteliali	Pag.3
1.1.3 Formazione del lume e maturazione del vaso sanguigno	Pag.4
1.2 REGOLAZIONE DELL'ANGIOGENESI	Pag.4
1.2.1 Stimolatori endogeni dell'angiogenesi	Pag.5
1.2.2 Inibitori endogeni dell'angiogenesi	Pag.14
1.3 ANGIOGENESI PATOLOGICA	Pag.16
1.3.1 Fattori angiogenica nella rivascularizzazione terapeutica	Pag.17
1.3.2 L'angiogenesi nell'ingegneria tissutale	Pag.19
1.3.3 Angiogenesi nella crescita tumorale e nelle metastasi	Pag.20
1.3.4 Angiogenesi nelle infiammazioni croniche	Pag.22
1.4 PEPTIDE MIMICRY	Pag.23
2. METODI: CHIMICA DEI PEPTIDI	Pag.25
2.1 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA	Pag.25
2.1.1 Funzionalizzazione della resina	Pag.28
2.1.2 Stima del grado di funzionalizzazione della resina	Pag.29
2.1.3 Deprotezione del gruppo α -amminico	Pag.30
2.1.4 Reazione di condensazione	Pag.31
2.1.5 Stima della resa di coupling	Pag.35
2.1.6 Sblocco dei peptidi dalla resina e rimozione dei gruppi protettori	Pag.36
2.1.7 Modificazione del terminale amminico: reazione di acetilazione	Pag.39
2.2 PURIFICAZIONE	Pag.39
2.3 CARATTERIZZAZIONE	Pag.41

2.3.1	Analisi Amminoacidica	Pag.41
2.3.2	Analisi di massa	Pag.43
2.3.3	Analisi elettroforetica capillare	Pag.46
2.4	STUDI CONFORMAZIONALI	Pag.47
2.4.1	Predizioni statistiche	Pag.47
2.4.2	Dicroismo Circolare	Pag.48
2.4.3	Risonanza magnetica nucleare bidimensionale (NMR-2D)	Pag.54
3.	METODI: BIOLOGIA DELLE COLTURE CELLULARI	Pag.62
3.1	MODELLI DI STUDIO DELL'ANGIOGENESI	Pag.62
3.1.1	Modelli <i>in vitro</i>	Pag.62
3.1.2	Modelli <i>in vivo</i>	Pag.64
3.2	COLTURA DELLE CELLULE ENDOTELIALI	Pag.64
3.2.1	Immunoseparazione	Pag.65
3.3	SAGGIO DI ADESIONE CELLULARE	Pag.66
3.4	SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE	Pag.67
3.5	SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE	Pag.69
3.6	DETERMINAZIONE DEL RILASCIO DELL'ENZIMA LATTATO DEIDROGENASI (LDH)	Pag.70
3.7	DETERMINAZIONE DEL TASSO DI APOPTOSI	Pag.72
3.8	SAGGIO DI MORFOGENESI <i>IN VITRO</i>	Pag.75
3.9	INIBITORI DELLE VIE DI SEGNALE INTRACELLULARE	Pag.76
3.9.1	Saggio di vitalità con inibitori	Pag.80
3.10	SAGGIO IN VIVO SU MEMBRANA CORIOALLANTOIDEA (CAM TEST)	Pag.80
4.	PEPTIDI PRO-ANGIOGENICI: TIMOSINA β4	Pag.83
4.1	RISULTATI	Pag.87
4.1.1	Sintesi	Pag.87.
4.1.2	Purificazione	Pag.94
4.1.3	Caratterizzazione	Pag.94
4.1.4	Analisi di Dicroismo Circolare	Pag.100
4.1.5	Studi NMR in miscele TFE/acqua e analisi computazionale	Pag.102
4.1.6	Effetti sulla vitalità e sulla proliferazione cellulare	Pag.111
4.1.7	Effetti citotossici	Pag.112
4.1.8	Effetti sulla morfogenesi <i>in vitro</i>	Pag.113

4.1.9 Effetti sull'angiogenesi <i>in vivo</i>	Pag.113
4.2 DISCUSSIONE	Pag.117
5. PEPTIDI PRO-ANGIOGENICI: STROMAL DERIVED FACTOR-1	Pag.121
5.1 RISULTATI	Pag.125
5.1.1 Sintesi	Pag.125
5.1.2 Purificazione	Pag.136
5.1.3 Caratterizzazione	Pag.136
5.1.4 Effetti sull'adesione cellulare	Pag.143
5.1.5 Effetti sulla vitalità cellulare	Pag.144
5.1.6 Effetti di inibitori di vie di segnale sull'aumento di vitalità cellulare indotto dai derivati peptidici	Pag.145
5.1.7 Effetti sulla morfogenesi <i>in vitro</i>	Pag.150
5.1.8 Effetti sulla morfogenesi <i>in vivo</i>	Pag.156
5.2 DISCUSSIONE	Pag.156
6. PEPTIDI ANTI-ANGIOGENICI: MOTIVI DI ADESIONE	Pag.162
6.1 SEQUENZE RGD	Pag.162
6.2 SEQUENZE DI LEGAME PER L'EPARINA	Pag.163
6.3 RISULTATI	Pag.165
6.3.1 Sintesi	Pag.165
6.3.2 Purificazione	Pag.172
6.3.3 Caratterizzazione	Pag.173
6.3.4 Effetti sull'adesione cellulare	Pag.181
6.3.5 Effetti sulla vitalità cellulare	Pag.181
6.3.6 Effetti sulla morfogenesi <i>in vitro</i>	Pag.185
6.3.7 Effetti sull'angiogenesi <i>in vivo</i>	Pag.193
6.4 DISCUSSIONE	Pag.194
BIBLIOGRAFIA	Pag.199

1. INTRODUZIONE

L'ANGIOGENESI

Le cellule di mammifero per sopravvivere richiedono un continuo apporto d'ossigeno e di nutrienti (Carmeliet and Jain, 2000), questo spiega perché i vasi sanguigni costituiscano il primo organo che si sviluppa nell'embrione e rappresentino il *network* più esteso del nostro corpo. Durante l'embriogenesi, la componente vascolare si origina dal verificarsi di due processi, la vasculogenesi e l'angiogenesi. Per vasculogenesi si intende la formazione *ex novo* di vasi di tipo capillare, a partire dal differenziamento *in situ* delle isole sanguigne, strutture composte da progenitori ematopoietici e da precursori endoteliali di derivazione mesenchimale (angioblasti). Le cellule endoteliali si dividono e si fondono a formare un plesso vascolare primitivo che, con l'inizio della circolazione sanguigna, dà origine ad una rete vascolare artero-venosa. La crescita dei vasi sanguigni negli organi in via di sviluppo ha luogo prevalentemente come risultato di un processo di invasione degli abbozzi tessutali primitivi da parte di capillari, gemmati dal plesso vascolare iniziale. L'originarsi di queste ramificazioni si deve ad eventi angiogenici. L'angiogenesi è definita appunto come il processo che porta alla formazione di nuovi vasi sanguigni di tipo capillare a partire da vasi preesistenti (Carmeliet, 2000). Mentre la vasculogenesi è confinata a fasi molto precoci del periodo intrauterino, l'angiogenesi ha luogo sia durante lo sviluppo embrionale, con l'espansione e la maturazione delle strutture vascolari primordiali, sia nella vita postnatale. Tale processo è di fondamentale importanza in condizioni fisiologiche, come accade ciclicamente a livello uterino durante il ciclo mestruale, in eventi di rimodellamento tessutale o di cicatrizzazione delle ferite; che in situazioni patologiche, come nelle infiammazioni croniche e nell'accrescimento di un tumore maligno (Liekens *et al.*, 2001).

Cellule endoteliali, fattori solubili e componenti della matrice extracellulare sono gli attori coinvolti nel sequenziale verificarsi di eventi ben caratterizzati, che portano allo *sprouting* di un nuovo capillare. La complessità del processo può essere schematicamente delineata attraverso le seguenti fasi:

- i. attivazione delle cellule endoteliali in risposta ad uno stimolo ipossico e rilascio di fattori angiogenici e chemoattrattori;
- ii. destabilizzazione dei vasi preesistenti a seguito di un aumento della permeabilità vasale e della perdita delle connessioni cellulari;
- iii. degradazione della membrana basale e della ECM vascolare ad opera di proteasi secrete dalle cellule endoteliali attivate al fine di favorire la migrazione cellulare;

- iv. proliferazione e successivo differenziamento delle cellule endoteliali nella zona del tessuto d'origine dello stimolo angiogenico;
- v. fusione tra i neo-capillari provenienti dal circolo venoso e da quello arterioso (processo di anastomosi), a garantire il passaggio di un flusso continuo di sangue;
- vi. maturazione della struttura tubulare primitiva a seguito della creazione di una nuova membrana basale, del reclutamento di cellule muscolari lisce e periciti, e della riorganizzazione delle interazioni cellulari (Milkiewicz *et al.*, 2006).

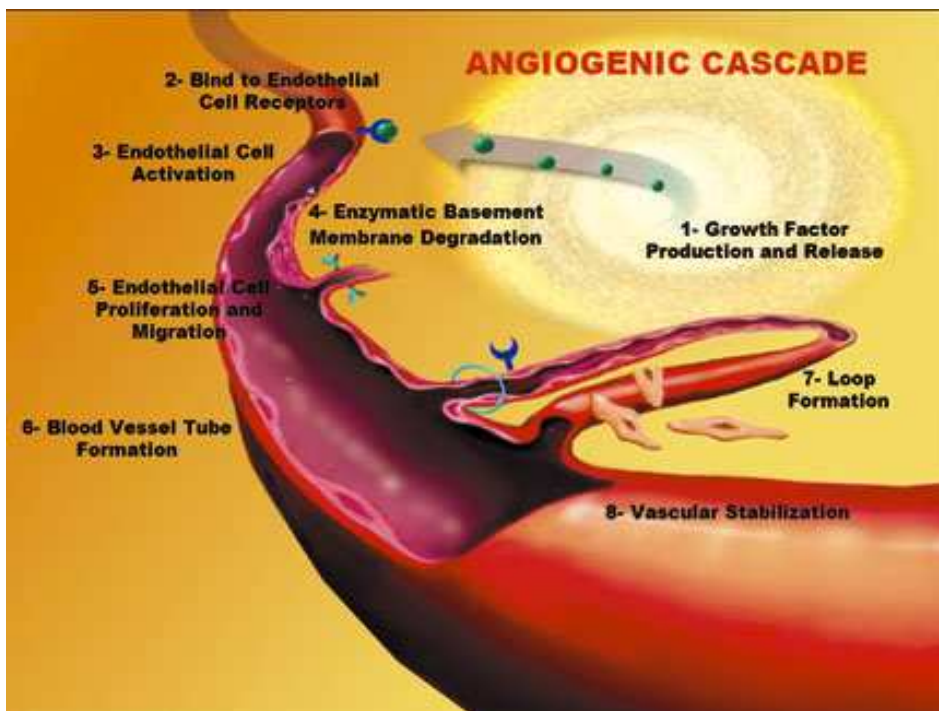


Figura 1.1 Schema della cascata angiogenica

1.1 LA CASCATA ANGIOGENICA

1.1.1 Inizio della risposta angiogenica

Eventi ipossici, infiammazioni e stress meccanici come la resistenza da taglio e l'allungamento, sono noti per la capacità di innescare rapidamente una risposta angiogenica. Questi stimoli attivano sia direttamente che indirettamente le cellule endoteliali a produrre e rilasciare citochine e fattori di crescita. Questi mediatori biochimici, tramite vie di segnalazione autocrine e paracrine, causano modificazioni emodinamiche dei vasi preesistenti (Milkiewicz *et al.*, 2006) e l'extravasazione di proteine del plasma. Il cruciale aumento della permeabilità dello strato endoteliale è il risultato della dissoluzione dei contatti

cellulari. Le giunzioni aderenti formate principalmente, dall'interazione tra le caderine dell'endotelio vascolare, vengono perse e la formazione di fenestrazioni promuove l'instaurarsi di una condizione pro-migratoria (Pepper, 2001; Dejana *et al.*, 2006). Le cellule così attivate ad un fenotipo migratorio necessitano, oltre alla rottura dei contatti interendoteliali, di liberarsi dal supporto periendoteliale; a questo scopo secernono nell'ambiente extracellulare vari tipi di proteinasi. Il sistema dell'attivatore del plasminogeno, le metallo proteasi della matrice (MMP) e la famiglia delle eparinasi sono i gruppi enzimatici che cooperano alla degradazione della membrana basale (Carmeliet, 2000) e al tempo stesso influenzano gli eventi angiogenici attivando o liberando fattori di crescita (*Fibroblast Growth Factor-2*, FGF-2, *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF, e *insuline-like growth factor-1*, IGF-1) sequestrati all'interno della matrice extracellulare (Coussens *et al.*, 1999).

Ogni fase della cascata angiogenica è strettamente regolata a più livelli, sulla stessa attività proteolitica locale è esercitato un rigoroso controllo, per proteggere la normale struttura tissutale. In primo luogo, l'espressione è up-regolata da fattori di crescita angiogenici e citochine (FGF-2 e VEGF), inoltre le proteasi così prodotte e secrete nell'ECM risultano tuttavia inattive, e per espletare la loro funzione devono essere processate proteoliticamente. Ad ulteriore garanzia le cellule rilasciano assieme agli enzimi anche i loro inibitori, come sistema di spegnimento.

Tale fine regolazione si perde in condizioni patologiche, quali, ad esempio, la crescita tumorale e la metastasi (Liekens *et al.*, 2001).

1.1.2 Proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali

L'adesione cellulare ai componenti della matrice e la rimodulazione intracellulare dei filamenti citoscheletrici, determinano la capacità di mobilitazione delle cellule. In questo assumono un ruolo importante i recettori sulla superficie della membrana cellulare come le integrine, ed in particolare le classi $\alpha v\beta 3$ $\alpha v\beta 5$, sovraesprese sulle cellule endoteliali proliferanti stimulate da FGF-2 e VEGF (Nisato *et al.*, 2003). La migrazione può essere promossa da una serie di perturbazioni meccaniche a livello dei contatti matrice-cellule. Durante l'angiogenesi la proteolisi delle proteine della membrana basale comporta un locale assottigliamento della struttura che si traduce in certi punti in una distorsione della membrana cellulare tale da alterare le forze trazionali (Ingber *et al.*, 2002). Il segnale meccanico così originatosi, è convertito intracellularmente in stimoli biochimici che innescano il movimento (Shin *et al.*, 2001). Le cellule endoteliali "guida" procedono quindi nello spazio intersitiziale, seguite dalle cellule proliferanti. Il collasso dell'ECM produce un aumento della concentrazione extracellulare di vari mediatori solubili pro-angiogenici, i quali alimentano e rafforzano le vie di segnale alla base del processo chemiotattico e proliferativo.

1.1.3 Formazione del lume e maturazione del vaso sanguigno

La proliferazione delle cellule endoteliali avviene già nelle fasi iniziali del processo angiogenico e continua durante tutto il periodo di elongazione del neo-capillare. Lungo l'abbozzo vascolare le cellule da subito, si organizzano in modo da creare il lume del vaso stesso. Il delinearsi di questa struttura multi-cellulare può avvenire tramite un processo di fusione di vacuoli citoplasmatici (canalizzazione intracellulare) o attraverso l'apposizione di più cellule attorno ad un tubulo centrale (canalizzazione intercellulare) (Egginton & Gerritsen, 2003). La perfusione del tessuto viene ripristinata a spese dell'anastomosi tra l'endotelio vascolare che avanza, e dei vasi pre-esistenti; si verifica cioè, la fusione delle due ramificazioni capillari a creare un nuovo canale al cui interno può fluire il sangue. Alternativamente, precursori delle cellule endoteliali (EPC), richiamati anch'essi da fattori chemiotattici, possono contribuire alla crescita del vaso. Le cellule pervenute nel punto di *sprouting* approfittano dell'aumento di permeabilità locale, per fuoriuscire nello spazio interstiziale e clusterizzare; una parte di esse si integrerà nel monostrato endoteliale neo-formato mentre una parte degli EPC può essere rintracciata negli strati perivascolari della struttura (Murasawa & Asahara, 2005; Schatteman *et al.*, 2004).

La fase finale di stabilizzazione e maturazione del capillare prevede la deposizione di una nuova membrana basale e il ristabilirsi dei contatti aderenti tra le cellule. Come le altre fasi di invasione, migrazione, e proliferazione, anche gli eventi che completano il processo angiogenico sono mediati dal contributo dato dalle molecole di adesione. Al fine di delineare il lume vasale, la distribuzione e la tipologia dei fattori di adesione determinano la polarità delle cellule endoteliali, discriminando il lato luminale da quello abluminale (Liekens, 2001).

Fattori angiogenici, quali l'Angiopietina-2 (Ang2) e il *Platelet-derived growth factor* (PDGF), partecipano al rimodellamento strutturale promuovendo rispettivamente l'arresto della proliferazione per favorire il differenziamento delle cellule endoteliali (Holash *et al.*, 1999) e il reclutamento di periciti e cellule muscolari lisce, per ricreare gli strati di rivestimento dell'endotelio (Jain *et al.*, 2003).

Il processo angiogenico si conclude con lo spegnimento delle vie di segnale pro-angiogeniche, in pratica si assiste ad una down-regolazione dei fattori angiogenici e/o ad un aumento locale della concentrazione degli inibitori dei *pathway* attivati (Liekens *et al.*, 2001).

1.2 REGOLAZIONE DELL'ANGIOGENESI

Nell'adulto il tessuto vascolare solitamente si trova in uno stato di quiescenza, la longevità è una delle caratteristiche delle cellule endoteliali, infatti in condizioni fisiologiche il *turnover* dell'endotelio vasale è notoriamente lento, con un ordine di grandezza di anni in quei tessuti e organi che non necessitano eventi angiogenici (Hanahan *et al.*, 1996). Nonostante l'abbondanza di fattori angiogenici all'interno dei tessuti, si ritiene che la controparte di molecole inibitorie riesca ad annullarne gli effetti e a mantenere le

cellule endoteliali in un stato inattivo. Il fatto che più studi abbiano osservato la co-esistenza di mediatori angiogenici positivi e negativi, anche durante lo svolgersi di tutto il processo di neovascolarizzazione, ha contribuito alla formulazione dell'ipotesi secondo cui l'attività dell'endotelio è governata da un delicato e costante bilanciamento di fattori dalle funzioni contrapposte (Iruela-Arispe *et al.*, 1997). Se le molecole pro-angiogeniche risultano dominanti, le cascate angiogeniche vengono “accese”, altrimenti permane lo stato di quiescenza. Metaforicamente il principio di regolazione viene paragonato ad un interruttore che viene premuto (*switch*) e cambia dalla posizione “on” ad “off”. Lo svolgimento stesso del processo di angiogenesi può essere suddiviso in una fase di attivazione (iniziazione e progressione dell'angiogenesi) che presenta uno sbilanciamento del rapporto stimoli positivi su stimoli negativi, a favore dei primi, e una fase di risoluzione (terminazione e stabilizzazione del vaso), in cui predomina l'azione di fattori inibitori endogeni, in seguito ad un aumento locale di concentrazione degli stessi e/o all'esaurimento dei segnali positivi.

Molti sono i partecipanti a questo continuo “braccio di ferro” e per alcuni di questi non è ancora stato dimostrato con certezza una correlazione diretta con gli eventi che portano alla formazione di nuovi vasi sanguigni, ma è nota sola un'azione indiretta di stimolazione sul rilascio di sostanze ad attività angiogenica intrinseca. Qui di seguito vengono presentate alcune di queste molecole, dal meccanismo d'azione accertato e con potenziali ricadute terapeutiche.

1.2.1 Stimolatori endogeni dell'angiogenesi

Sono state identificate, in diversi modelli *in vivo* ed *in vitro*, numerose molecole coinvolte nell'induzione dell'angiogenesi, e sulla base del loro comportamento possono essere divise in 3 classi principali (Klagsbrun *et al.*, 1999):

- i. la famiglia del VEGF e le Angiopoietine, la cui azione è diretta in modo specifico sulle cellule endoteliali;
- ii. vari tipi di chemochine, citochine, e alcuni enzimi, capaci di attivare in modo diretto, oltre alla componente endoteliale, un vasto *range* di bersagli cellulari. Il maggiore rappresentante di questo gruppo è il polipeptide FGF;
- iii. fattori indiretti, il cui effetto sull'angiogenesi si esplica col rilascio di molecole come citochine e fattori di crescita da parte di macrofagi e cellule endoteliali, come il *Tumor Necrosis Factor* (α -TNF), il *Transforming Growth Factor* (TGF) e il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) (Liekens *et al.*, 2001; Lichtenbeld *et al.*, 1996).

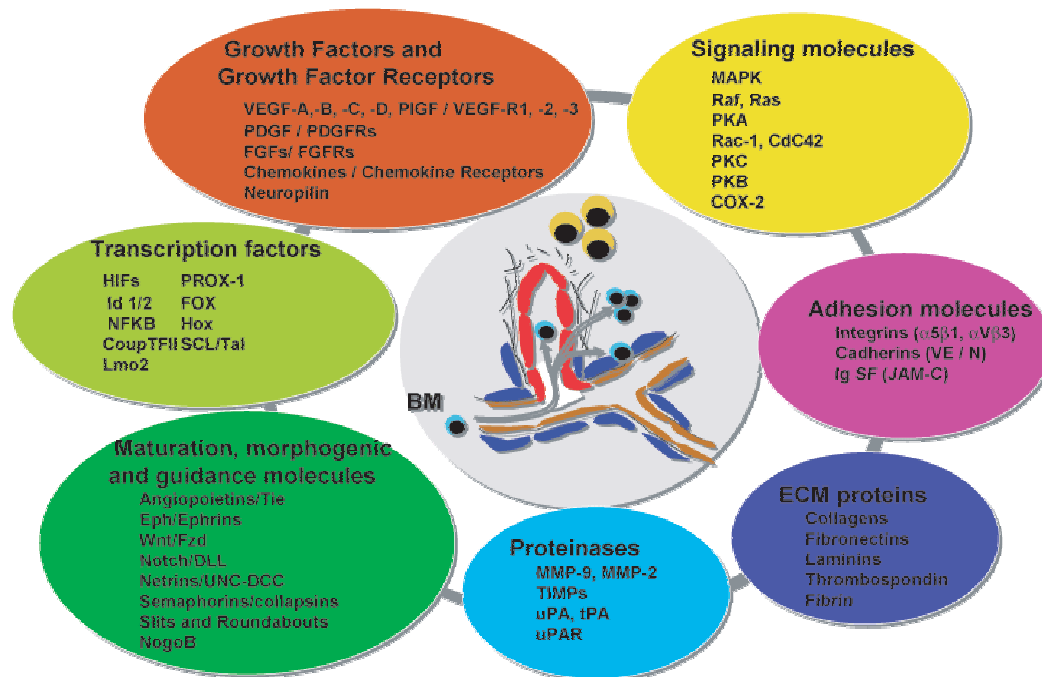


Figura 1.2 Schema delle fasi angiogeniche e dei fattori pro-angiogenici che vi partecipano

Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF è una tra le più importanti proteine coinvolte nella regolazione del processo di neovascolarizzazione sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Come evidenziato in molti studi VEGF esercita una potente attività angiogenica sia *in vitro*, in cui stimola la degradazione della ECM, la proliferazione, la migrazione e la mitogenesi delle cellule endoteliali e induce nelle stesse l'espressione di MMP e fattori del sistema del plasminogeno; sia *in vivo*, dove promuove la crescita di nuovi capillari e agisce da vasodilatatore incrementando la permeabilità microvascolare, essenziale per la fase iniziale dell'angiogenesi (Liekens *et al.*, 2001; Lichtenbeld *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1995). Esistono diverse isoforme di VEGF, rispettivamente di 206, 189, 165 e 121 amminoacidi, originate dallo *splicing* alternativo degli 8 esoni che ne compongono la sequenza genica. La specie molecolare predominante e dalla potente attività mitogena, è VEGF₁₆₅ che si presenta come una glicoproteina omodimerica basica che si lega all'eparina (Ferrara *et al.*, 1997). Sono stati identificati anche 4 geni strutturalmente correlati a VEGF i cui prodotti sono conosciuti come PlGF (*placental growth factor*), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, a cui si aggiungono i polipeptidi espressi da specie virali (VEGF-E) e quelli rintracciati nel veleno di alcuni serpenti (VEGF-F) (Veikkola *et al.*, 1999).

VEGF è espresso in tessuti differenti quali cervello, fegato, rene e milza, è stato ritrovato anche nell'ovaio durante la formazione del corpo luteo, nell'utero durante la crescita dell'endometrio vascolare e nella fase proliferativa della cicatrizzazione delle ferite (Liekens *et al.*, 2001; Lichtenbeld *et al.*, 1996).

Diversi meccanismi sono coinvolti nella regolazione genica dell'VEGF. Un ruolo rilevante è giocato dalla tensione tissutale di O₂, come dimostrato dall'aumento reversibile dei livelli di mRNA per VEGF in condizioni di ipossia *in vivo* e *in vitro*. È stato osservato inoltre, che il messaggero è regolato a livello trascrizionale e post-trascrizionale da deficit di glucosio, suggerendo come l'induzione del gene sia legata a stimoli di stress (Stein *et al.*, 1995). In aggiunta numerose citochine si sono dimostrate capaci di operare indirettamente un up-regolazione dell'espressione del fattore di crescita, con conseguente sintesi proteica e secrezione nell'ambiente extracellulare.

Tutti i membri della famiglia del VEGF esercitano i molteplici effetti biologici mediante il legame a 2 classi di recettori tirosin-chinasici posti sulla superficie cellulare: VEGFR-1 (o *fms-like tyrosine-kinase-1*, Flt-1) e VEGFR-2 (o *kinase domain region/fetal liver kinase-1*, KDR/Flk-1). L'interazione con entrambi i recettori è essenziale per indurre lo spettro completo di risposte biologiche, sono poi il diverso grado di affinità e la differente espressione tissutale delle due strutture recettoriali a determinare il tipo di effetto evocato (Veikkola *et al.*, 1999).

Il sistema Tie/Angiopoietina

Agli inizi degli anni '90, esperimenti condotti su topi *Knock-out* hanno portato alla scoperta di 2 recettori di superficie specifici per le cellule endoteliali, Tie-1 e Tie-2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF-like domain*), mettendone in evidenza al contempo, il coinvolgimento nella maturazione dei vasi sanguigni (Partanen *et al.*, 1992). Più recente è l'identificazione dei ligandi di questi recettori, l'Angiopoietina-1 (Ang-1) e l'Angiopoietina-2 (Ang-2). In generale, il sistema Tie/angiopoietine risulta essenziale per la comunicazione delle cellule endoteliali con quelle mesenchimali circostanti, allo scopo di instaurare interazioni cellulari e biochimiche stabili, finalizzate alla formazione e al mantenimento dei vasi neoformati. Ang-1 legandosi a Tie-2, agisce sulle cellule perivascolari mesenchimali stabilizzando i nuovi vasi primitivi (Davis *et al.*, 1996). L'Ang-2, invece, competendo per il legame al recettore, si comporta da antagonista dell'Ang-1. Dati sperimentali hanno mostrato che la sovraespressione dell'angiopoietina-2 conduce a destabilizzazione dei vasi sanguigni e comporta un rimodellamento vasale, tuttavia significative concentrazioni di questo fattore, sono state rintracciate anche nelle zone in attiva neovascularizzazione, dove si presume favorisca l'azione di VEGF, assumendo pertanto la funzione di fattore pro-angiogenico (Holash *et al.*, 1999; Maisonpierre *et al.*, 1996). Queste osservazioni dimostrano ancora una volta come il processo angiogenico sia enormemente complesso e dipenda strettamente dal preciso equilibrio tra stimoli negativi e positivi.

Fibroblast Growth Factor

Nel 1974 Gospodarowicz e colleghi riportarono l'isolamento di un nuovo fattore di crescita capace di indurre la proliferazione dei fibroblasti in vitro (Gospodarowicz D, 1974). Dal frazionamento dell'estratto biologico ottennero 2 distinte forme proteiche il *acidic fibroblast growth factor*, FGF-1, e il *basic fibroblast growth factor*, FGF-2. Sebbene mostrassero un'elevato grado di similarità di sequenza, possedevano una distinta attività come mitogeni. Poco dopo altri due gruppi di ricercatori riportarono la scoperta di coppie di fattori di crescita caratterizzate da una marcata affinità per l'eparina e capaci di stimolare la proliferazione in coltura delle cellule dell'endotelio vascolare. Analisi successive portarono all'identificazione di queste nuove sostanze con le proteine descritte da Gospodarowicz.

Attualmente la famiglia dei fattori di crescita per i fibroblasti (FGF) conta almeno 22 membri, tutti capaci di agire come molecole pleiotropiche su differenti tipi cellulari, incluse le cellule endoteliali. L'attività di questi polipeptidi si manifesta a seguito dell'interazione con 2 recettori: un recettore tirosin-chinasico ad alta affinità (FGFR) e uno a bassa affinità, rappresentato da proteoglicani eparan solfato (HSPG) (Presta *et al.*, 2005).

Un alto grado di eterogeneità è stato osservato per le cellule endoteliali isolate da diversi tessuti e/o specie animali differenti; una significativa variabilità esiste anche tra gli endoteli dei grossi vasi e quelli del microcircolo, non di meno sulla superficie di tutte queste cellule sono presenti i recettori ad alta affinità per FGF (Chi *et al.*, 2003; Prestz *et al.*, 2005). Il legame con la struttura glicoproteica di membrana, permette alle varie isoforme ad alto e basso peso molecolare, di FGF-2 di esercitare *in vivo* un'attività angiogenica, stimolando la proliferazione e la chemiotassi delle varie cellule endoteliali (Javerzat *et al.*, 2002; Presta *et al.*, 1986). Un "fenotipo angiogenico" piuttosto articolato, è evocato dalla forma basica del fattore di crescita per i fibroblasti anche *in vitro*: la modulazione della proliferazione e dell'espressione di recettori come integrine e caderine, l'alterazione di sistemi di comunicazioni intercellulari (*gap-junction*) e della produzione di proteasi, e la capacità di favorire la formazione di strutture simil-capillari in colture seminate su gel di estratti della matrice extracellulare, in qualche modo riassumono i vari aspetti del processo di neovascolarizzazione che avviene fisiologicamente nell'organismo (Bussolino *et al.*, 1996; Hata *et al.*, 1999).

I membri della famiglia di FGF appartengono alla classe delle proteine associate all'eparina (*heparin-binding protein*). L'eparina è un glicosamminoglicano (GAG) ricco di gruppi carichi negativamente, rilasciato nel torrente sanguigno a seguito di un evento infiammatorio. Più che il polisaccaride libero in soluzione, la citochina sembra interagire preferenzialmente con le catene di GAG eparan solfato attaccate al *core* proteico di certi proteoglicani, sfruttando motivi amminoacidici basici. Questo recettore a bassa affinità è presente a livello della ECM, della membrana basale e della superficie cellulare (Lindahl *et al.*, 1994); essenzialmente svolge un'attività di controllo della biodisponibilità di FGF, prevenendone la degradazione proteolitica e fornendo un sistema di immagazzinamento tale da

garantire localmente elevate concentrazioni del fattore di crescita e sostenerne risposte a lungo tempo. La mobilitazione della citochina avviene per azione di enzimi proteolitici, quali le eparinasi; per spiazzamento dal sito di legame ad opera dell'eparina circolante; oppure in seguito alla degradazione della matrice come avviene durante le fasi iniziali dell'angiogenesi (Rusnati *et al.*, 1996).

Gli HSPG, se associati alla membrana cellulare, sono in grado di attivare direttamente una cascata di eventi intracellulari in risposta a FGF-2, incrementandone l'attività mitogena, inoltre la loro presenza è richiesta per una corretta presentazione della molecola stessa a FGFR (Simons *et al.*, 2001; Rusnati *et al.*, 1996). Al contrario di VEGF, FGF-2 non è specifico per le cellule endoteliali, infatti il suo recettore ad alta affinità si può trovare non solo sulla superficie di queste cellule, ma anche su cellule della muscolatura liscia, fibroblasti, mioblasti e cellule tumorali (Basilico *et al.*, 1992). Evidenze sperimentali correlano FGF-2 al processo angiogenico sia in condizioni fisiologiche che patologiche; inoltre topi privi della proteina presentano difetti neuronali ed alterazioni negli eventi di cicatrizzazione delle ferite e di riparazione dei tessuti, sottolineandone il coinvolgimento (Ortega *et al.*, 1998).

Tumor Necrosis Factor

Il Tumor necrosis factor (TNF) appartiene al gruppo di citochine coinvolte nella stimolazione della fase acuta dell'infiammazione di tipo sistemico. Svolge un ruolo anche in numerosissimi processi biologici, tra cui la cancerogenesi, la replicazione virale, e influenza a livello cellulare la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi. Il membro più conosciuto di questa classe è il fattore TNF- α . Prodotto come una proteina transmembrana arrangiata in uno stabile omotrimerico, viene convertito in forma solubile trimerica a seguito dell'attività proteolitica di una metalloproteasi (Tang *et al.*, 1996). Indirettamente stimola l'angiogenesi *in vivo* attivando macrofagi, mastociti, cellule endoteliali e tumorali alla produzione di fattori ad azione pro-angiogenica diretta. Incrementa infatti l'espressione di VEGF e del suo recettore, di FGF-2 e di IL-8, un'interleuchina che induce il processo di neovascolarizzazione *in vivo* in modo dose-dipendente (Liekens *et al.*, 2001; Fajardo *et al.*, 1992).

Transforming Growth Factor

Il termine *Transforming Growth Factor* è usato per identificare due classi di fattori di crescita, TGF- α e TGF- β , tra loro nè strutturalmente, nè geneticamente correlate.

I polipeptidi della famiglia TGF- α , sono prodotti dai macrofagi, da cellule cerebrali e dai cheratinociti; sono sovraespressi in alcune forme tumorali; inducono lo sviluppo dell'epitelio e contribuiscono al recupero delle funzionalità del tessuto nervoso a seguito di danni o disordini neurodegenerativi (Fallon *et al.*, 2000).

La forma beta del fattore di crescita trasformante consiste invece, di tre isoforme multifunzionali in grado di regolare la proliferazione e il differenziamento cellulare. Prodotto e rilasciato da vari tipi cellulari, gioca un ruolo centrale nella rigenerazione tissutale, nel differenziamento cellulare, nello sviluppo embrionale e nella regolazione del sistema infiammatorio. Assieme a TGF- α , agisce sinergicamente per attivare processi di trasformazione cellulare, e per promuovere l'angiogenesi (Pepper, 1997; Schreiber *et al.*, 1986 -). L'effetto del TGF- β sul processo angiogenico è dovuto al reclutamento e alla stimolazione di macrofagi e fibroblasti, e alla produzione di fattori angiogenici diretti, in modo analogo al TNF (Pepper, 1997). Inoltre aiuta la stabilizzazione dei vasi neoformati attraverso il richiamo di cellule della muscolatura liscia e di periciti, stimolandone inoltre la proliferazione (Darland *et al.*, 1999).

Platelet-Derived Growth Factor

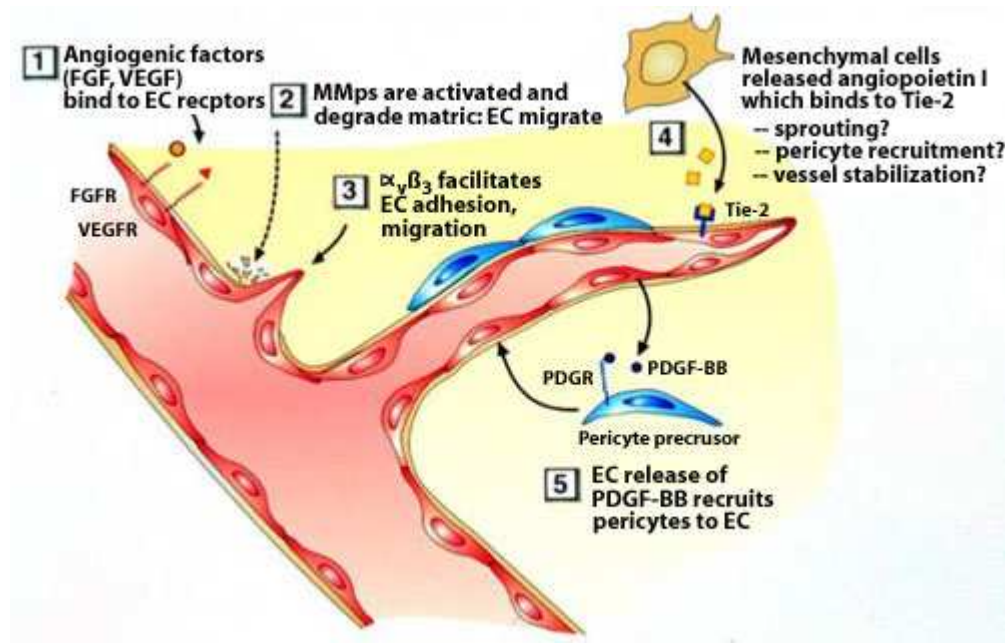
Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) è un potente induttore della proliferazione e della motilità dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce. Questa glicoproteina dimerica, partecipa allo sviluppo embrionale e all'angiogenesi, inoltre è correlata a varie condizioni patologiche, come l'arteriosclerosi, la fibrosi e alcune forme tumorali. L'isoforma PDGF-BB, legando il recettore espresso sulle cellule endoteliali induce *in vitro* lo *sprouting* e la formazioni di strutture tubulari; in aggiunta contribuisce a stabilizzare i vasi neo-formati agendo da mitogeno per le cellule muscolari lisce e i periciti (Battegay *et al.*, 1994; Lindahl *et al.*, 1997). L'attività pro-angiogenica è stata dimostrata ulteriormente in studi sulla membrana corioallantoidea di pollo (CAM-test) e su arti ischemici, ee è alla base dell'impiego di tale fattore nella cicatrizzazione delle ferite e nella riparazione tissutale per il ripristino di un tessuto connettivo vascolarizzato funzionale (Raines *et al.*, 1991).

Matrix MetalloProtease

Le Metalloproteasi della Matrice (MMP) costituiscono una famiglia di almeno 20 endopeptidasi zinco-dipendenti, in grado di degradare la matrice extracellulare. Sono note per il coinvolgimento nel processing di recettori di superficie, nel rilascio di induttori dell'apoptosi, e nella regolazione dell'attività delle chemochine. Prendono parte anche in vari eventi cellulari, come la proliferazione, la migrazione, il differenziamento e la sopravvivenza. Come modulatori del microambiente extracellulare, risultano essenziali per lo svolgersi delle varie fasi dell'angiogenesi: dalla deposizione alla destabilizzazione della membrana basale, per effetto diretto sui componenti della ECM; dalla proliferazione alla migrazione dell'endotelio, in relazione alla mobilitazione di fattori di crescita e allo shedding di recettori di membrana (Chang e Werb, 2001). Prodotti dalle cellule epiteliali, dai fibroblasti e dalle cellule mediatrici dell'infiammazione, sono secreti come zimogeni e convertiti in seguito nella forma attiva da proteasi presenti nell'ambiente extracellulare (Westermarck et al., 1999).

A garanzia dell'omeostasi tissutale, esiste un fine sistema di controllo dell'attività proteolitica delle MMP, che agisce a livello dell'espressione genica, dell'attivazione per perdita del prodominio inibitorio, e della produzione di inibitori tissutali endogeni (TIMP).

Le MMP sono coinvolte nella rimodellazione tissutale non solo in processi fisiologici, ma varie sono le condizioni patologiche che presentano alterazioni del sistema proteolitico: cirrosi, artrite, sviluppo tumorale e metastatizzazione.



Schema della regolazione delle fasi del processo angiogenico da parte di alcuni fattori positivi

Interleuchina 8

Studi recenti hanno dimostrato che tra i vari membri della famiglia delle citochine, l'interleuchina 8 (IL-8 o CXCL-8) e i suoi recettori CXCR1 e CXCR2, giocano un ruolo rilevante nel fenomeno angiogenico e nello sviluppo tumorale (Koch *et al.*, 1992; Salcedo *et al.*, 2000 -). Sia le glicoproteine di superficie che il loro ligando sono ampiamente espressi in vari tipi cellulari, fibroblasti, neutrofili, cellule endoteliali e linee tumorali (Wang *et al.*, 1998). Il meccanismo secondo cui IL-8 svolgerebbe un'attività regolatoria *in vivo* sull'angiogenesi, prevede da un lato l'alterazione dell'espressione di alcuni geni anti-apoptotici con ricadute positive sulla sopravvivenza e sulla proliferazione delle cellule endoteliali e dall'altro lato il coinvolgimento di proteasi della matrice. Il *signaling* autocrino e paracrino attivati dall'interleuchina, indurrebbero infatti, la degradazione della matrice extracellulare a favorire la migrazione delle cellule endoteliali e l'invasione delle cellule tumorali durante metastatizzazione, grazie all'attività della MMP-2 e della MMP-9. Il ruolo di IL-8 sulla neovascolarizzazione risulta ancor più critico ed evidente in diversi

stati patologici, in particolare nel progredire di tumori maligni, per questo la ricerca si è focalizzata maggiormente sullo sviluppo di strategie atte a limitare più che a favorire gli effetti della citochina (Li *et al.*, 2002).

Hepatocyte Growth Factor

Il Fattore di Crescita per gli Epatociti (HGF/SF) è un mediatore paracrino della crescita, del movimento e della morfogenesi cellulare. Secreto dalle cellule mesenchimali come precursore inattivo, richiede l'intervento proteolitico dei membri della famiglia dell'attivatore del plasminogeno, uPA o tPA. Agisce primariamente sulle cellule epiteliali ed endoteliali tramite il suo legame col recettore tirosin-chinasico c-met, ma esercita la sua attività anche su altre cellule, tra cui i precursori ematopoietici e i neuroni. Partecipa all'organogenesi durante l'embriogenesi, mentre nella fase adulta è richiesto nei processi di cicatrizzazione e nella rigenerazione d'organo (Gallagher *et al.*, 2000). Quest'ultimi processi sono in parte influenzati dal ruolo di potente mediatore angiogenico, che HGF svolge, sia mediante attivazione di c-met, che inducendo la produzione di VEGF da parte dell'endotelio (Reisinger *et al.*, 2003)

Angiogenina

L'angiogenina è un polipeptide di 123 amminoacidi in grado di legare l'eparina, e rappresenta uno dei primi fattori angiogenetici isolati da neoplasie umane. Numerose evidenze sperimentali accumulate negli ultimi anni, definiscono la proteina come un potente marker di angiogenesi, e ne evidenziano il ruolo critico nella patogenesi dei tumori (Fett *et al.*, 1985). Caratteristica che rende l'angiogenina unica tra i vari fattori pro-angiogenici, è la capacità di esercitare un'attività, seppur debole, ribonucleasica. Nonostante l'efficacia catalitica sia $10^5 - 10^6$ minore di quella della RNasi A, il dominio catalitico sembra indispensabile ai fini di stimolare gli eventi di neovascolarizzazione in condizioni fisiologiche che maligne (Riordan e Vallee, 1988). La molecola sfruttando un processo di internalizzazione mediata dal recettore actina, presente sulla superficie delle cellule endoteliali, viene endocitata e traslocata nel nucleo, dove promuove lo *switching* verso ad un fenotipo invasivo, indispensabile per la formazione di nuovi capillari. Sebbene *in vitro* l'angiogenina sembri favorire principalmente l'adesione delle cellule endoteliali senza influire sulla migrazione e sulla proliferazione, in modelli di studio quali la CAM o la cornea di coniglio manifesta invece un potente effetto stimolatorio sull'angiogenesi (Badet *et al.*, 1990).

Molecole di adesione cellulare

Lo svolgimento delle varie fasi del processo di neovascolarizzazione non dipende solo dalla presenza di enzimi, di fattori di crescita diretti e indiretti e dei loro recettori, ma anche dall'espressione di molecole di adesione. Sia nell'iniziazione che nella fase finale dell'angiogenesi, infatti, le cellule endoteliali devono modificare le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice per destabilizzare l'endotelio dei vasi

presistenti o per stabilizzare il capillare neoformato. Le molecole di adesione vengono generalmente suddivise in 4 famiglie diverse: selettine, immunoglobuline, caderine e integrine (Bischoff et al., 1997). Ognuno di questi gruppi di recettori contribuisce, in modo diverso, allo svolgersi del fenomeno angiogenico, rappresentando così possibili target diagnostico-terapici.

Le integrine sono una classe di proteine eterodimeriche derivate dalla combinazione di varie isoforme delle due subunità α e β . Le cellule endoteliali esprimono più tipi di integrine, e questo permette loro di prendere contatto con un'ampia varietà di componenti dell'ECM. I recettori di tipo $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_V\beta_5$ risultano difficilmente rintracciabili sull'endotelio quiescente, mentre sono sovraespressi a livello del tessuto vascolare tumorale e che in caso di neoplasie e malattie della retina, l'occupazione del loro sito di *binding* per il ligando comporta un arresto degli eventi angiogenici indotti da FGF-2, VEGF e da TNF- α . Partendo da tali osservazioni si attribuì alle due glicoproteine $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_V\beta_5$, una funzione pro-angiogenica (Brooks et al., 1994; Friedlander et al., 1996). Entrambe riconoscono il motivo di adesione RGD (Arg-Gly-Asp), esposto da alcune proteine della matrice extracellulare, quali fibronectina, vitronectina, laminina, fattore di von Willebrand (vWF), fibrinogeno e la forma denaturata del collagene. Oltre a mediare l'adesione tra le cellule e la ECM, tale legame produce, l'attivazione della cascata intracellulare del segnale, che comporta variazioni dell'espressione genica che può tradursi, a livello cellulare, in un aumento della sopravvivenza, della crescita e della migrazione. L'interina $\alpha_V\beta_3$, inoltre, sembra in grado di legare la metalloproteasi della matrice tipo 2, in modo RGD-indipendente, comportando una localizzazione dell'attività degradativa proprio nei pressi delle cellule endoteliali stesse. Tutti questi meccanismi risultano determinanti nello svolgersi delle varie fasi angiogeniche e vengono inoltre sfruttati largamente nell'ambito di neoplasie e malattie a carattere infiammatorio (Eliceiri e Cheresch, 1999 ; Brooks et al., 1996)

I recettori integrinici non sono gli unici ad essere chiamati in causa durante lo svolgersi delle fasi angiogeniche, prendono parte al processo anche proteine di superficie, quali: le caderine dell'endotelio vascolare (VE-caderine), il cui ruolo sembra correlato alla trasmissione di segnali di sopravvivenza indotti da citochine come il VEGF (Carmeliet et al., 1999); membri della superfamiglia delle immunoglobuline tra cui ICAM-1 e VCAM-1 (rispettivamente intercellular e vascular cell adhesion molecule-1), sovraespressi in seguito alla stimolazione di fattori angiogenici come INF- γ o TNF- α (Brooks, 1996) e vari tipi di selectine, in particolare E-, P- e V-selectine, che in modo paragonabile alle Ig promuovono *in vitro* migrazione e morfogenesi cellulare e *in vivo* la formazione di nuovi vasi (Halloran et al., 1995; Nguyen et al., 1993).

Nella modulazione dei processi adesivi e chemiotattici è coinvolta anche un'altra classe di molecole recettoriali poste sulla superficie cellulare, i proteoglicani (PG), delle glicoproteine altamente glicosilate, composte da un *core* proteico a cui sono legati uno o più catene di glicosamminoglicani (GAG). Queste macromolecole possono trovarsi secrete nella matrice extracellulare oppure inserite nella membrana

plasmatica come proteine integrali, e la loro presenza risulta critica in molti processi fisiologici tra cui l'angiogenesi. Un gran numero di fattori di crescita, di molecole della ECM e di enzimi legano siti specifici posti sulle catene zuccherine. Ad esempio i proteoglicani eparan solfato incidono in maniera rilevante sulla bioattività di fattori angiogenici chiave come l'FGF-2 e il VEGF, influenzandone la diffusione, il tempo di emivita e l'interazione con i loro recettori cellulari (Iozzo e San Antonio, 2001).

1.2.2 Inibitori endogeni dell'angiogenesi

Molti dei *signaling* intracellulari associati con la cascata angiogenica, una volta attivati, innescano dei feedback positivi, a sostenere una continua stimolazione del processo, mediante produzione e rilascio di fattori di crescita e dei loro recettori. La presenza di inibitori endogeni, risulta necessaria al fine di spegnere o limitare il segnale pro-angiogenico. Tali molecole possono essere suddivise in tre categorie:

- i. frammenti proteici dotati di attività proteolitica, quali angiostatina ed endostatina;
- ii. mediatori solubili appartenenti a varie classi biochimiche, tra i principali si possono citare: la trombospondina-1 (TSP-1), l'interferone- γ (IFN- γ), il fattore piastrinico-4 (PF-4), gli inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI) e gli inibitori delle metalloproteasi della matrice (TIMP) (Carmeliet, 2000);
- iii. geni oncosoppressori, come p-53 e VHL (Liekens *et al.*, 2001; Lichtenbeld *et al.*, 1996).

Angiostatina

L'angiostatina è una famiglia di isoforme derivate dal plasminogeno come risultato dell'attività di diverse endoproteasi, e che divergono per il contenuto di caratteristici domini a triplo loop, stabilizzati da ponti disolfuro, detti *Kringles* (Cao *et al.*, 1996).

Esistono ancora incertezze riguardo al meccanismo d'azione, ma sembra che tale molecola sia in grado di inibire *in vitro* la proliferazione delle cellule endoteliali inducendo eventi apoptotici (Hanford *et al.*, 2003) e di bloccare l'angiogenesi indotta da FGF-2 in saggi su membrana corioallantoidea di pollo. Inoltre esperimenti *in vivo* attribuiscono all'angiostatina la capacità di forzare le cellule tumorali, sia primarie che metastatiche, a regredire ad uno stato dormiente (Cao *et al.*, 1999).

Analisi di *Ligand-blot* su lisati di cellule endoteliali, indicherebbero che il polipeptide interagisce con numerose proteine tra le quali: l'ATP sintetasi, presente sulla superficie delle cellule endoteliali stesse; le

integrine; alcuni tipi di proteoglicani; ed una proteina di 42 kD corrispondente all'actina extracellulare di membrana.

L'attività angiogenica sembra essere contingente alla composizione in *Kringle*, conseguentemente le varie isoforme mostrano un diverso grado di effetto biologico. Tuttavia rimangono ancora da chiarire molti aspetti del *signaling* intracellulare attivato dalle varie isoforme e dai singoli *Kringle*, in particolare quale recettore, tra quelli prima elencati sia coinvolto direttamente nell'attività inibitoria.

Endostatina

L'endostatina è il frammento carbossi-terminale del collagene XVIII prodotto da *processing* enzimatico elastosi-mediato (Wen *et al.*, 1999). Similmente all'angiostatina, interferisce nel legame di alcuni fattori di crescita al loro recettore. All'interno di questa molecola sono stati identificati due motivi di legame per l'eparina (Sasaki *et al.*, 1999; Hohenester *et al.*, 1998), che sembrano essere responsabili della sua capacità inibitoria verso VEGF e FGF-2. Inoltre questa molecola interagisce a bassa affinità, con i vari glicosaminoglicani eparan solfato (HSPG) di superficie coinvolti nel *signaling* dei fattori di crescita (Karumanchi *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 1999). In particolare, la sua attività anti-angiogenica comporta una riduzione della proliferazione delle cellule endoteliali e tumorali per attivazione di processi apoptotici (O'Reilly *et al.*, 1997); l'inibizione della migrazione cellulare VEGF-indotta e dello *sprouting* capillare (Wickstrom *et al.*, 2004) per interazione con l'integrina $\alpha_5\beta_1$ esposta sulla superficie endoteliale e con l'eparina dell'ECM; e inoltre, l'inibizione dell'attività catalitica di alcune proteasi, e questo dà spiegazione della minor capacità invasiva mostrata dalle cellule dell'endotelio esposte al frammento proteolitico.

Trombospondina-1

L'endotelio vascolare normalmente si trova in uno stato di quiescenza, condizione che è garantita dall'azione di fattori anti-angiogenici espressi fisiologicamente dall'organismo, tra cui troviamo la trombospondina-1 (TPS-1). Potente inibitore della genesi vascolare, TPS-1 è in grado di bloccare vari fattori implicati nel processo come ad esempio VEGF, molecole attivatrici dei recettori tirosin chinasi, proteine G, recettori serin/treonin chinasi e lipidi. In particolare una sovraespressione di TSP-1 causa una diminuzione dell'angiogenesi ed una conseguente inibizione della crescita tumorale (Streit *et al.*, 1999).

Protein-53

P-53 è un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e appartenente alla famiglia degli oncosoppressori. La sua importanza è legata alla capacità di preservare il genoma dalle mutazioni attraverso meccanismi che implicano: l'attivazione di sistemi riparativi del DNA, il controllo durante ciclo cellulare del passaggio dalla fase G_1 a quella S di replicazione del materiale genetico, e

l'induzione dell'apoptosi in caso di danno irreversibile al DNA. Alcuni studi hanno evidenziato un suo coinvolgimento nel favorire la degradazione del polipeptide *Hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1), un fattore di trascrizione in grado di favorire l'espressione di induttori angiogenici (Ravi *et al.*, 2000), l'inibizione della produzione di VEGF (Mukhopadhyay *et al.*, 1995) e la stimolazione di TSP-1 (Dameron *et al.*, 1994).

Von Hippel-Lindau

VHL è un gene oncosoppressore, il cui nome von Hippel-Lindau deriva dalla sindrome genetica che si manifesta in seguito a mutazione dello stesso, con conseguente crescita anomala di tumori in parti del corpo particolarmente vascolarizzate. Il suo ruolo nella regolazione dell'angiogenesi è riconducibile all'attività ubiquitin-ligasica di cui è dotato, e che consiste nella "marcatura" di specifiche proteine da indirizzare a degradazione. Uno di questi target è l'HIF-1a, come sembra dimostrare l'osservazione che la perdita della funzione di VHL, causa un aumento della concentrazione del fattore ipossia-inducibile-1a che a sua volta comporta alti livelli di fattori angiogenici e una crescita sregolata dei vasi (Maxwell *et al.*, 1999).

1.3 ANGIOGENESI PATOLOGICA

L'angiogenesi è di fondamentale importanza in molti processi fisiologici, come lo sviluppo embrionale, la cicatrizzazione delle ferite e il ciclo mestruale, ma anche in alcuni processi patologici. Si possono individuare alcune differenze tra il processo angiogenico fisiologico e quello patologico, come ad esempio il mancato o scarso coinvolgimento nell'angiogenesi fisiologica della cicloossigenasi (COX₂), del fattore di crescita piastrinico (PLGF), dell'integrina $\alpha_5\beta_3$ e dell'ossido nitrico (NO), che presentano invece un ruolo attivo nel processo patologico (Liekens *et al.*, 2001). Inoltre, l'angiogenesi patologica oltre ad essere caratterizzata dall'assenza di alcuni meccanismi regolatori è spesso indotta da un processo infiammatorio: monociti/macrofagi, piastrine, mast cellule e altri leucociti vengono attratti nel sito dell'infiammazione o della cicatrizzazione in parte dai fattori angiogenici come il VEGF. Queste cellule producono a loro volta fattori angiogenici che attirano cellule endoteliali e muscolari lisce, fibroblasti, leucociti e piastrine (Lichtenbeld *et al.*, 1996).

In particolare si distinguono due classi di malattie associate alla genesi vascolare:

- i. quelle dovute ad una bassa attività angiogenica, come il danneggiamento dei tessuti in seguito ad ischemia o ad insufficienza cardiaca;

- ii. quelle dovute ad un'alta attività angiogenica come il cancro (sia tumori solidi sia ematologici) e le infiammazioni croniche tra cui l'artrite reumatoide, la sindrome di Crohn, la retinopatia diabetica, la psoriasi, l'endometriosi e l'arteriosclerosi (Lichtenbeld *et al.*, 1996).

La possibilità, quindi, di intervenire su tale processo può rappresentare una valida terapia per questi disturbi patologici. La stimolazione della neovascolarizzazione (angiogenesi terapeutica) è in fase di studio per favorire il recupero di organi o di tessuti danneggiati, anche attraverso la pratica dell'ingegneria tissutale, mentre l'inibizione del processo angiogenico viene effettuata nel trattamento di tumori, retinopatia diabetica, malattie infiammatorie e alcune malattie vascolari.

1.3.1 Fattori angiogenici nella rivascolarizzazione terapeutica

L'effetto specifico di alcuni fattori di crescita per cellule endoteliali, come VEGF o FGF, ne suggerisce il potenziale potere angiogenico terapeutico. I primi esperimenti condotti con FGF-2 hanno mostrato un aumento della formazione di vasi collaterali in conigli con ischemia agli arti posteriori (Baffour *et al.*, 1992) o con infarto del miocardio (Yanagisawa-Miwa *et al.*, 1992). Trattamenti con FGF-2 hanno portato ad un miglioramento della perfusione, un incremento del flusso sanguigno e al recupero di tessuti ischemici. Prove cliniche in cui vengono somministrati FGF-1 e FGF-2 a pazienti sottoposti a bypass chirurgico delle coronarie mostrano un aumento della perfusione e della rivascolarizzazione (Schumacher *et al.*, 1998; Laham *et al.*, 1999). Allo stesso modo, l'impiego di VEGF, e in particolare, dell'isoforma a 165 aminoacidi, in conigli affetti da ischemia agli arti posteriori, provoca un aumento della rivascolarizzazione (Takeshita *et al.*, 1994).

Una strategia alternativa per l'angiogenesi terapeutica attraverso l'impiego di fattori di crescita è la terapia genica, in cui si inoculano frammenti di DNA, contenenti il gene per il fattore angiogenico interessato, nel punto dell'organismo in cui si vuole aumentare l'espressione di quel determinato fattore di crescita, in modo che induca una stimolazione del processo angiogenico. Un esempio è rappresentato dall'impiego di cDNA codificante per VEGF, tecnica che è stata persino impiegata in *trials* clinici in soggetti affetti da malattie o danni all'apparato cardio-vascolari (Isner *et al.*, 1996).

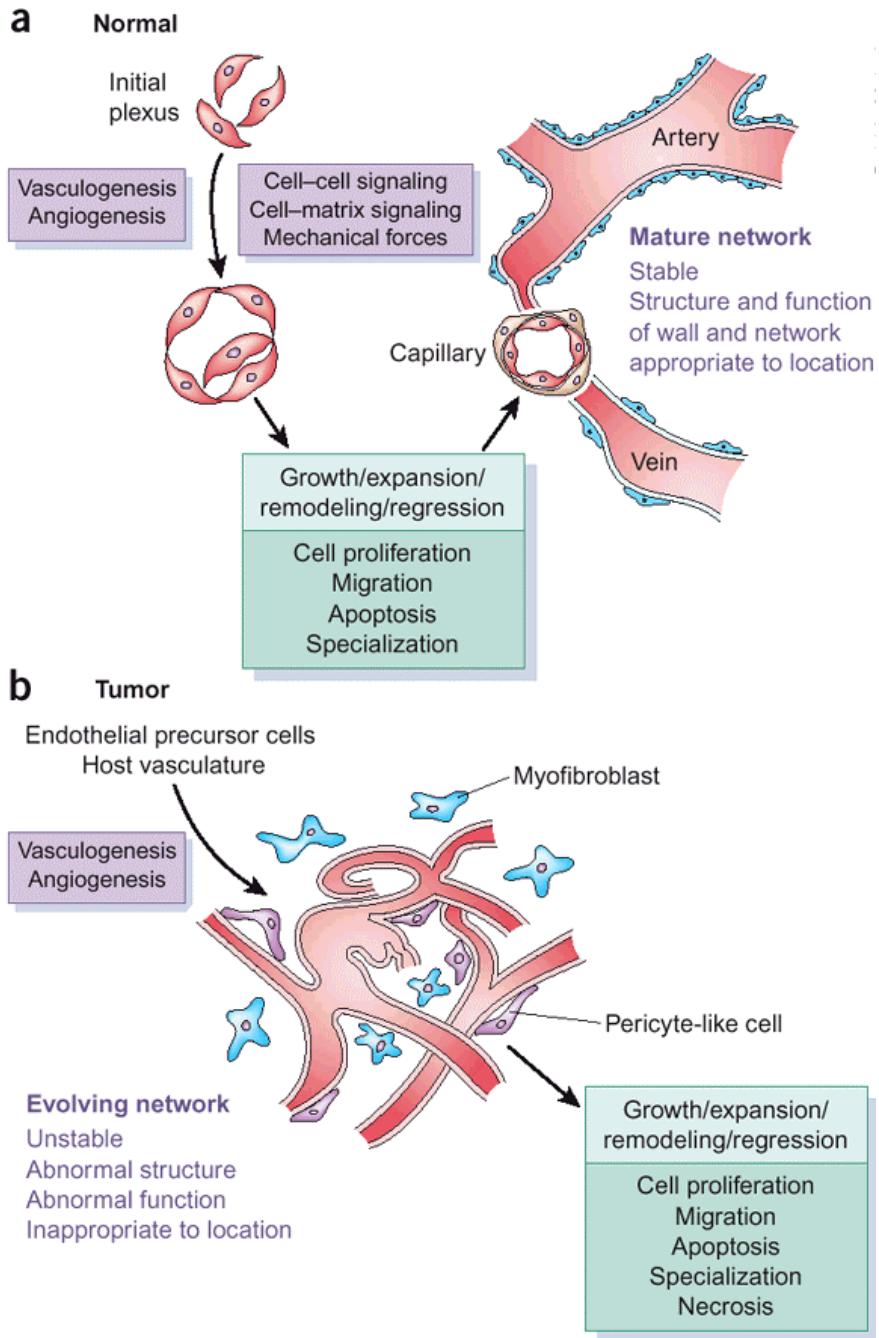


Figura 1.3 Schema delle fasi della neovascolarizzazione in condizioni fisiologiche (a) e patologiche (b)

I primi risultati hanno mostrato una soddisfacente rivascolarizzazione nel sito di iniezione (Isner, 1998). Una limitazione nell'impiego di proteine angiogeniche somministrate tramite iniezione è rappresentata dall'instabilità di questi fattori *in vivo* e dall'incapacità di ottenere effetti controllati anche in luoghi lontani da quello di somministrazione (Richardson *et al.*, 2001; Yancopoulos *et al.*, 2000). Nell'ottica di rimediare a questi svantaggi sono stati progettati dei sistemi polimerici biodegradabili che provvedono il rilascio localizzato e sostenuto nel tempo di uno o più fattori di crescita. Per esempio, sono stati ideati sistemi di rilascio di FGF-2, in cui questo fattore viene legato ad un supporto di eparina e il suo distacco avviene grazie all'azione di una eparinasi. Un meccanismo analogo di cessione continua è stato progettato anche per VEGF, ottenendo un rilascio continuo del fattore anche per 15 giorni (Murphy *et al.*, 2000). Questi sistemi sono stati progettati per liberare solo un tipo di fattore angiogenico, ma la formazione di nuovi vasi richiede l'intervento di diversi tipi di fattori di crescita e in tempi diversi durante il susseguirsi delle fasi del processo (Nomi *et al.*, 2000). Richardson *et al.* (2001) hanno progettato un nuovo sistema polimerico che permette la liberazione di due o più fattori di crescita, con dose e velocità di rilascio controllate.

L'impiego in terapia di fattori di crescita o di altre proteine endogene porta, come già accennato, ad alcune limitazioni, tra cui: sintesi complessa e dispendiosa della macromolecola e difficoltà nella formulazione di una forma farmaceutica che assicuri la stabilità fino alla somministrazione *in vivo* e un rilascio controllato ed efficace. Per ovviare a questi inconvenienti, attualmente si sta puntando all'uso di piccole molecole di sintesi o di frammenti delle proteine stesse, che ne mimino l'attività biologica (peptidi e peptidomimetici) e in quanto sostanze a basso peso molecolare, siano, di più semplice produzione anche su larga scala ed eventuale somministrazione *in vivo*.

1.3.2 L'angiogenesi nell'ingegneria tissutale

La perdita di organi o di tessuti a causa di incidenti, traumi, malattie o il loro deterioramento a causa dell'invecchiamento rappresentano un importante problema terapeutico nella pratica medica. Le soluzioni proposte, come per esempio il trapianto o la chirurgia ricostruttiva, sono spesso limitate da vari fattori, come la carenza di donatori o il rischio di rigetto nel caso dei trapianti, o la bassa qualità, funzionalità e anti-immunogenicità dei materiali impiegati nella ricostruzione chirurgica. Attualmente, uno dei campi più promettenti in grado di risolvere le problematiche elencate e garantire una maggiore disponibilità dei tessuti è rappresentato dall'ingegneria tissutale (Langer *et al.*, 1993), che si prefigge di sviluppare sostituti biologici in grado di mantenere, sostituire e/o aumentare le funzioni vitali degli organi o dei tessuti danneggiati (Schultheiss *et al.*, 2000), tramite l'identificazione *in vitro* di condizioni di coltura che mimino l'azione di segnali biologici e fisico-meccanici responsabili dello sviluppo e della sopravvivenza del tessuto *in vivo*. L'impianto ottimale è costituito da tre componenti:

- i. cellule autologhe, che possono essere rappresentate da cellule isolate deputate a svolgere una particolare funzione, qualora impiantate come tali nell'organismo ricevente (per esempio i sostituti cutanei, che contengono cheratinociti e/o fibroblasti) o cellule staminali, caratterizzate da un alto potenziale proliferativo e oggetto, negli ultimi anni, di diversi studi;
- ii. un supporto su cui seminare le cellule, che in gradi di fornire la struttura tridimensionale necessaria alla formazione di un tessuto; tale supporto (*scaffold*) può essere formato da materiali sintetici (propilene, politetrafluoroetilene, poliestere o poliammide) o naturali (collagene, gel di fibrina o acido ialuronico);
- iii. molecole segnale solubili o legate al supporto, come fattori di adesione, di crescita e angiogenici.

Lo sviluppo di metodi efficienti per vascolarizzare i tessuti bioingegnerizzati è sicuramente un passaggio critico per ottenere esiti positivi. Diversi approcci possono essere impiegati per migliorare la *performance* dell'impianto: l'incorporazione di fattori angiogenici nel tessuto ingegnerizzato, la semina di cellule endoteliali e altri tipi cellulari nel supporto insieme alle cellule autologhe e la prevascolarizzazione del supporto prima della semina delle cellule (Nomi *et al.*, 2000).

Come evidenziato in precedenza, i fattori di crescita angiogenici sono indispensabili per la proliferazione delle cellule endoteliali e per la formazione dei vasi sanguigni. È possibile perciò incorporare una fonte a lento rilascio di un fattore angiogenico nel tessuto bioingegnerizzato prima dell'impianto, per incrementare la crescita di nuovi capillari a partire dal *network* vascolare del tessuto ospitante (Eiselt *et al.*, 1998). Tali composti possono essere sia proteine che brevi sequenze peptidiche riproducenti motivi responsabili dell'attività biologica della molecola endogena intera.

1.3.3 Angiogenesi nella crescita tumorale e nelle metastasi

La crescita tumorale è un processo multifasico, che inizia con la perdita del controllo della proliferazione cellulare. Le cellule neoplastiche iniziano a dividersi rapidamente dando luogo a una piccola massa tumorale sferoidale detta "*carcinoma in situ*" o tumore primario. Col trascorrere del tempo questa può invadere i tessuti circostanti e andare incontro a metastasi.

Già all'inizio del XX secolo, Goldman osservò la formazione di nuovi vasi durante lo sviluppo di un tumore, descrivendo così tale processo: "*I normali vasi sanguigni di un organo, in cui si sta sviluppando il tumore, sono disturbati da una crescita caotica, si verificano dilatazione e spiralizzazione dei vasi interessati, crescita di capillari e nuova formazione di vasi, particolarmente quelli limitrofi.*"

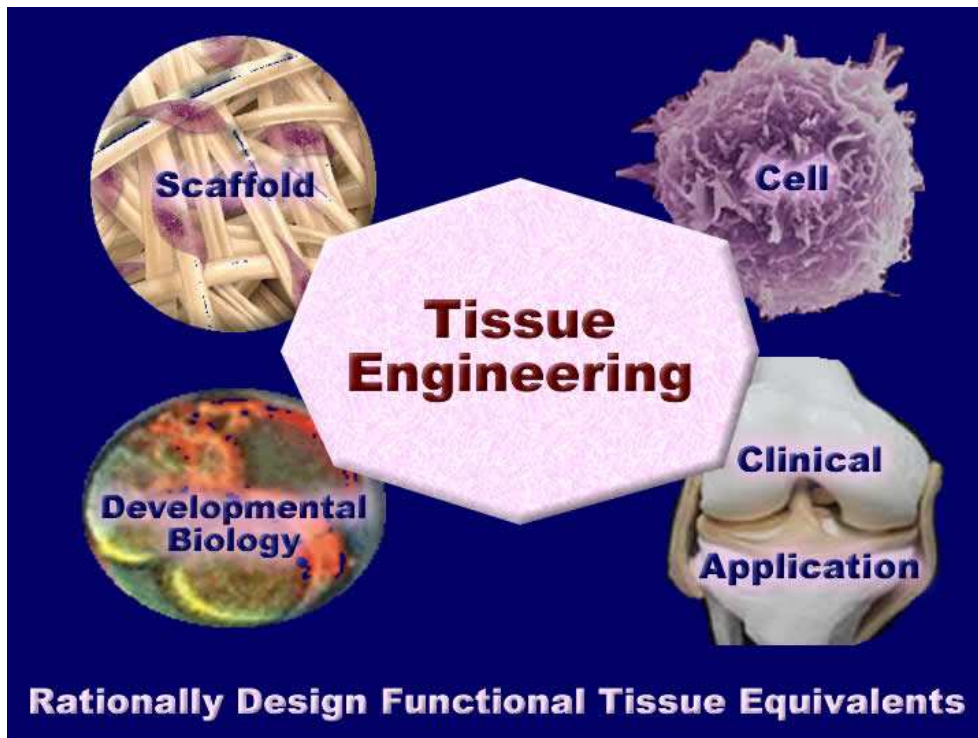


Figura 1.4 Schema degli ambiti biomedici legati all'ingegneria tessutale

Nel 1971 Folkman definì il cancro come una patologia angiogenesi-dipendente ed evidenziò il fatto che le cellule metastatiche sono in grado di diffondere solo dopo che il tumore stabilizza la sua microcircolazione (Folkman, 1971).

Inizialmente la neoplasia può presentare una fase avascolare, che lascia tuttavia subito il posto all'acquisizione di un fenotipo angiogenico e allo sviluppo dello stroma (tessuto) tumorale, costituito da pochi vasi sanguigni, cellule infiammatorie e tessuto connettivo.

La vascolarizzazione tumorale mostra due effetti contrapposti: da una parte la struttura della parete dei vasi tumorali disturba gli scambi transvascolari di sostanze nutritive (con effetto dannoso per il tumore) e di molecole terapeutiche; d'altra parte la struttura dei vasi permette un facile accesso per le cellule tumorali al torrente circolatorio, facilitandone la propagazione in altri organi e l'insorgenza di metastasi (Kleiner *et al.*, 1999).

I vasi tumorali differiscono da quelli normali per numerosi aspetti tra i quali: la mancanza di una membrana basale completa ed organizzata, il mantenimento di una morfologia ancora in sviluppo ed un'architettura abnorme. I vasi maligni appaiono infatti collassati, scarsamente differenziati, fragili, non seguono più un pattern di ramificazione gerarchica tipica di una rete vascolare normale e risultano incapaci di sopportare la rapida crescita delle cellule tumorali con conseguente ipossia e necrosi locale. Presentano inoltre un'alterata espressione dei *marker* specifici; ad esempio alcune cellule endoteliali non

espongono il CD31 (tipico *marker* endoteliale), mentre mostrano alte concentrazioni di proteine come l'endoglina, assente sull'endotelio fisiologico (Kumar *et al.*, 1999). Anche l'espressione delle molecole di adesione si presenta più eterogenea, e questo permette assieme ai caratteri sopraelencati di ricercare strategie terapeutiche mirate alla sola vascolatura tumorale.

1.3.4 Angiogenesi nelle infiammazioni croniche

L'infiammazione e la vasculogenesi sono due processi strettamente correlati. Il sistema immunitario, infatti ha un ruolo importante nella regolazione dell'angiogenesi, e molti studi indicano che alcuni protagonisti del sistema di difesa del nostro organismo, come ad esempio i leucociti, sono in grado di indurre la proliferazione vascolare e le citochine da essi prodotte a loro volta promuovono gli eventi di genesi capillare (Polverini *et al.*, 1977; Koch *et al.*, 1992). Accanto al controllo svolto dai leucociti sul processo angiogenico, è da evidenziare come la cascata di eventi legati alla formazione di nuovi vasi, abbia un forte impatto sui componenti del sistema immunitario e partecipi all'instaurarsi di una risposta infiammatoria. Su questo fronte, le cellule endoteliali contribuiscono al reclutamento delle cellule immunitarie nel luogo dell'infiammazione attraverso l'espressione di specifiche molecole di adesione. Diverse sono le famiglie di recettori coinvolti, tra le più rappresentative si può citare: la superfamiglia delle immunoglobuline, le selectine fondamentali nel promuovere l'adesione leucocitaria, e altre molecole presenti sulla superficie dell'endotelio come il CD34 e il CD4 (Vanhee *et al.*, 1994). L'espressione di queste proteine transmembrana è stimolata da citochine come TNF, IL-1, e IFN, che in questo modo favoriscono l'adesione leucocitaria alle cellule endoteliali e l'extravasazione all'interno di tessuti. Sebbene gli stimoli infiammatori sostengano una *up*-regolazione dei fattori pro-angiogenici, quest'ultimi, come ad esempio FGF-2, sembrano invece antagonizzare gli effetti innescati dalle citochine pro-infiammatorie, inibendo considerevolmente la migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio. Questi studi rendono conto di alcuni aspetti dello sviluppo tumorale e di come le cellule maligne riescano a sfuggire all'immuno-sorveglianza.

Negli ultimi anni si è posto molto interesse sulla relazione esistente tra angiogenesi e infiltrazione leucocitaria nelle malattie cardiovascolari e nelle infiammazioni croniche. In queste patologie il coinvolgimento del sistema immunitario rende conto in parte del delinearsi del quadro clinico della malattia. Inizialmente, nella fase acuta dell'infiammazione, si assiste ad alterazioni funzionali della vascolatura: vasodilatazione, incremento della permeabilità e attivazione delle cellule endoteli; nella successiva fase subacuta, i capillari si rimodellano e si verifica un aumento considerevole dell'attività mitotica endoteliale (Majno, 1998). Infine, la fase cronica è caratterizzata da un incremento della vasodilatazione e della densità capillare (Lichtenbeld *et al.*, 1996).

Nell'artrite reumatoide, per esempio, la presenza di nuovi capillari è una delle prime evidenze istopatologiche e si pensa sia indispensabile allo sviluppo del tessuto di granulazione (panno). In tale patologia l'endotelio sinoviale è costantemente soggetto a rimodellamento. I sinoviociti che si trovano nella lesione reumatoide presentano caratteristiche simili a quelle delle cellule tumorali, pertanto comportandosi come una massa tumorale invadono e distruggono l'ambiente circostante e sono alimentati dagli stessi fattori che promuovono l'angiogenesi come FGF-2, VEGF, IL-8, VCAM-1 e E-selettina (Koch, 1998).

Anche nella psoriasi l'espansione del microcircolo dermale rappresenta un aspetto centrale della malattia. Lo sviluppo di capillari anomali e di alterazioni all'epidermide, sono accompagnati da una massiva produzione e rilascio di stimoli pro-angiogenici (TGF, VEGF, IL-8), che partecipano sostenendo l'infiltrazione delle cellule polimorfonucleate, la rapida proliferazione dei cheratinociti e il processo angiogenico stesso (Detmar *et al.*, 1994).

I meccanismi di patogenesi descritti, in particolare il ruolo che il processo angiogenico svolge, sono rintracciabili anche in altre malattie infiammatorie come il morbo di Crohn, l'endometriosi, e la retinopatia diabetica. Questi aspetti sottolineano ancora una volta, come l'endotelio vascolare rappresenti un promettente target terapeutico.

1.4 PEPTIDE MIMICRY

Negli ultimi dieci anni il numero di nuove sostanze dall'attività modulatoria verso il processo angiogenico è aumentato considerevolmente. Sostanzialmente questi composti rientrano in tre grandi classi: anticorpi, peptidi e piccole molecole. Alcune di queste sono già state approvate soprattutto per terapie anti-tumorali (es. Avatin) o sono in fase finale di sperimentazione clinica.

Come riportato in precedenza l'impiego di proteine, in campo sperimentale o terapeutico, non ha sempre dato i risultati sperati, spesso a causa dalla scarsa stabilità, dall'elevato costo e, a volte, dalla difficile reperibilità dei composti stessi. Le informazioni che si possono ottenere, tuttavia, sulle relazioni struttura-attività e sulle proprietà conformazionali delle proteine, o sulle caratteristiche del legame col loro recettore, possono rappresentare la base per la progettazione di brevi sequenze aminoacidiche che ne mimino la struttura o la funzione (Horwell, 1995; Boteju, 1996; Chao, 1996). In quest'ottica, è stata concepita una strategia di progettazione razionale nota come *peptide mimicry*, che offre la possibilità di individuare frammenti delle proteine native in grado di indurre, almeno in parte, la risposta biologica propria della proteina intera. È stato evidenziato, infatti, che spesso esiste un dominio attivo minimo responsabile di gran parte dell'attività della proteina; perciò riproducendo solo questa porzione, si possono teoricamente, mimare le complesse interazioni molecolari della proteina d'origine. Brevi sequenze peptidiche possono essere sintetizzate per via chimica in grandi quantità e purificate fino a gradi

di omogeneità molto elevati. L'impiego inoltre, di tali peptidi non è accompagnato dagli inconvenienti connessi con l'utilizzo delle proteine native. Queste piccole molecole sono economicamente più accessibili, possono essere conservate più a lungo e facilmente rispetto alle proteine da cui derivano in quanto più stabili, e sono, in genere, maggiormente solubili in ambiente acquoso. Questi composti, mostrano un'elevata flessibilità di impiego e possono essere opportunamente modificati al fine di modulare le proprietà chimico-fisiche, di indurre alterazioni strutturali o del comportamento a livello biologico, come un'aumentata permeabilità attraverso le membrane o una minor sensibilità alla degradazione proteolitica. In particolare, per ovviare a quest'ultimo problema, si può ricorrere a diversi approcci per migliorare la stabilità del peptide contro gli enzimi proteolitici, andando a modificare la tipologia e/o la quantità di residui presenti nella molecola.

Tutto questo rende conto dei numerosi studi volti per lo sviluppo di peptidi e sostanze peptidomimetiche, come farmaci, in particolare, nel caso in cui si voglia interferire con interazioni proteina-proteina, questa classe di molecole rimane ancora di elezione rispetto alle altre.

Brevi sequenze aminoacidiche possono essere infatti impiegate:

- i. per la comprensione a livello molecolare degli eventi legati al *binding* con specifici ligandi, fungendo così da lead compound;
- ii. come strumenti biochimici per lo studio dettagliato di pathway molecolari (Mendoza *et al.*, 2005), per testare l'attività di enzimi e rintracciare la presenza e/o la localizzazione di precisi ligandi, sfruttando la marcatura con radioisotopi o fluorofori;
- iii. in diagnostica, accoppiati a tecniche di *imaging*, possono fungere da traccianti veicolabili nell'organismo, altamente selettivi nel rintracciare *target* angiogenici, per visualizzare zone della vascolatura alterate, con anomalie, come quelle tumorali. (D'Andrea *et al.*, 2006).

Molecole peptidiche rappresentano quindi una nuova linea di intervento in molti campi biomedici, e grazie alle enormi potenzialità, qui brevemente descritte, contribuiscono allo sviluppo e al miglioramento di nuovi approcci terapeutici come nell'ambito degli anti-tumorali o dell'ingegneria tissutale.

2. METODI

CHIMICA DEI PEPTIDI

2.1 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA (SPPS)

L'estrema efficienza della biosintesi delle proteine, che avviene nel citoplasma delle cellule al ritmo di 20 condensazioni di amminoacidi al secondo, è sempre stata uno stimolo forte per esplorare nuove strade nel campo della sintesi di peptidi. Durante la biosintesi le proteine non si trovano in soluzione, ma sono ancorate con legame estereo ad una molecola di RNA transfer il quale, a sua volta, è legato al complesso ribosoma/RNA-messaggero. Questo costituisce una sorta di supporto solido dal quale le proteine si staccano solo al completamento del processo. La tecnica SPPS (*Solid Phase Peptide Synthesis*), messa a punto nel 1963 ad opera di Bruce Merrifield (1986), è attualmente il metodo più vantaggioso per la sintesi peptidica e richiama, da un certo punto di vista, la biosintesi delle proteine.

La produzione di un peptide con tale tecnica, generalmente richiede 5 passaggi:

- assemblaggio della catena;
- sblocco dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale;
- purificazione;
- eventuali modifiche chimiche post-sintesi;
- caratterizzazione.

Diversamente da quanto avviene nelle cellule, la sequenza peptidica è sintetizzata a partire dall'estremità C-terminale verso l'N-terminale, con il gruppo carbossilico dell'ultimo amminoacido della sequenza legato ad un supporto solido (resina) tramite un *linker*, la crescita della catena polimerica avviene così in fase eterogenea. L'ancoraggio ad una matrice insolubile costituisce il vantaggio principale di questa tecnica in quanto permette di condurre l'intera sintesi nello stesso recipiente, dato che il prodotto viene isolato dopo

ogni ciclo attraverso semplice filtrazione. Questo comporta una ridotta perdita di materiale dovuto ad una minore manipolazione ed una sensibile riduzione dei tempi di lavoro, grazie alla possibilità di automatizzazione della procedura. Infatti, con la sintesi su fase solida si possono ottenere anche catene peptidiche lunghe fino a 50 amminoacidi, cosa molto difficile in soluzione, a causa della scarsa solubilità dei peptidi, legata alla presenza dei gruppi protettori delle catene laterali.

Le resine migliori per la sintesi peptidica sono quelle costituite da particelle di piccole dimensioni e scarsamente reticolate; tali resine permettono una rapida diffusione dei reagenti all'interno dei granuli e il loro notevole rigonfiamento permette di accomodare meglio le catene del peptide in crescita. Come supporti solidi si utilizzano solitamente resine quali polistirene copolimerizzato con 1% di divinilbenzene o resine poliacrilammidiche, che possiedono la proprietà di rigonfiarsi abbondantemente in solventi polari non protici come N-N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM) fino a raggiungere un volume pari a 10 volte quello iniziale (*User Manual*).

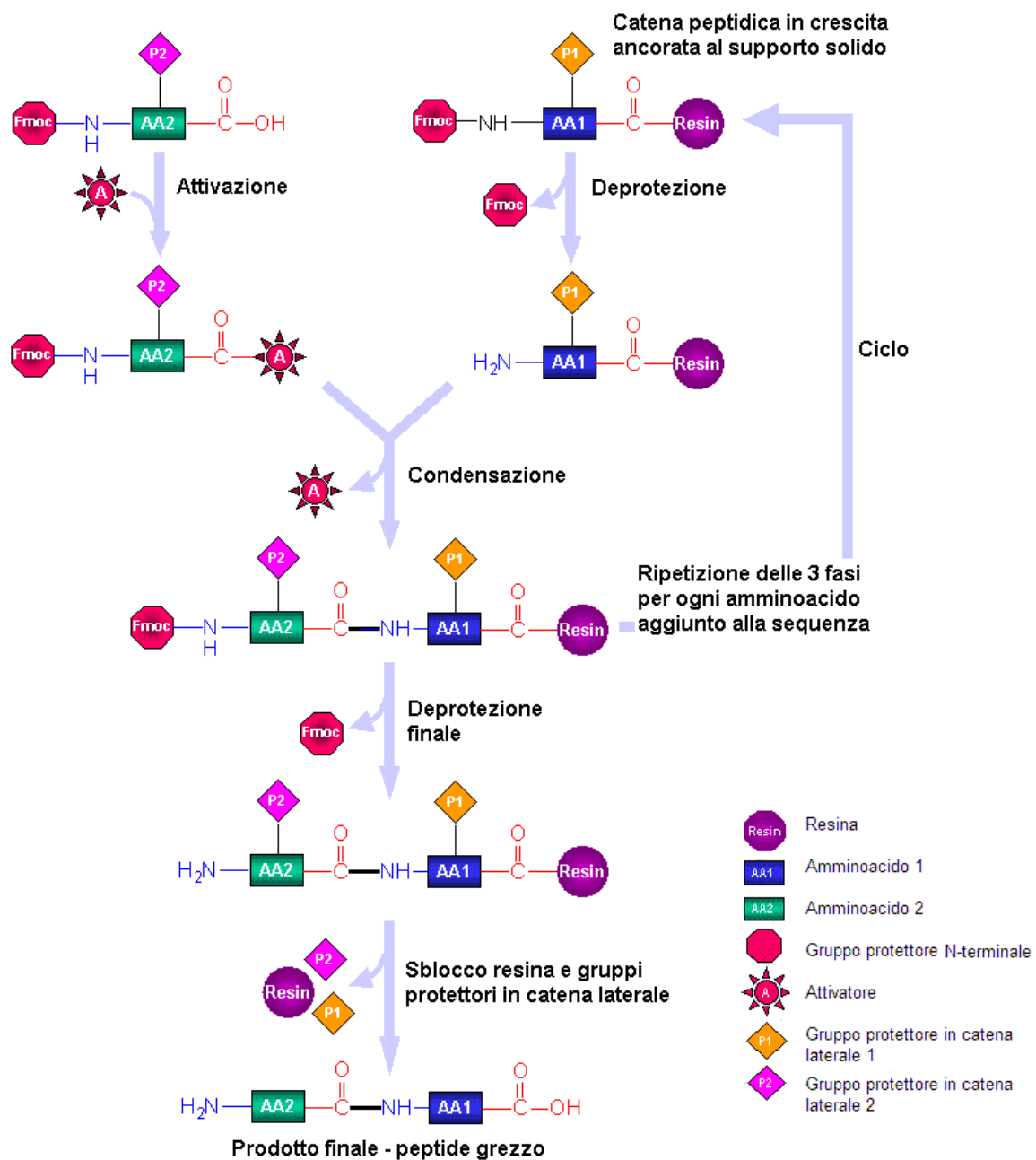


Figura 2.1. Schema generale della sintesi peptidica su fase solida

Attualmente in commercio sono disponibili resine derivatizzate con differenti *linker*, anche già funzionalizzate con il primo amminoacido protetto al gruppo α -amminico e in catena laterale se richiesto. Per soddisfare specifiche esigenze chimiche si può ricorrere a supporti atti a fornire peptidi acidi, estere- o ammido-terminali, contenenti particolari gruppi funzionali e con diverso grado di resistenza a condizioni di acidolisi.

Dopo lo sblocco del gruppo protettore α -amminico del residuo legato al peptide in crescita, si effettua una reazione di condensazione tra il gruppo α -amminico e la funzione carbossilica attivata di un nuovo

residuo, con formazione di un legame peptidico: l'assemblaggio della catena consiste perciò in una serie di cicli di reazioni di deprotezione e condensazione o *coupling*.

Gli amminoacidi oltre ai due gruppi funzionali principali, il terminale α -aminico e carbossilico, possono contenere in catena laterale altri gruppi reattivi, che potrebbero interferire durante la formazione del legame peptidico. Ne risulta la necessità di proteggere questi gruppi funzionali, considerando inoltre che nelle condizioni di rimozione del gruppo protettore α -aminico della catena principale, i gruppi protettori delle catene laterali devono rimanere stabili; strategia che va sotto il nome di protezione ortogonale.

Le due più comuni chimiche per la sintesi di catene peptidiche tramite SPPS, si basano sulla reattività dei rispettivi gruppi protettori del terminale α -aminico impiegati: Fmoc (N^{α} -9-fluorenilmetilossicarbonil), rimosso in ambiente basico, e *t*-Boc (*tert*-butilossicarbonil), rimosso in ambiente acido (Merrifield, 1986; Fields *et al.*, 1990). Le sintesi dei peptidi presentati in questa tesi sono state eseguite con strategia Fmoc.

Conclusa la sintesi, il peptide viene sbloccato dal supporto solido, operazione che solitamente comporta anche la simultanea deprotezione delle catene laterali. Nell'eventualità in cui si vogliano condurre reazioni che coinvolgano selettivamente uno dei terminali o una funzionalità in catena laterale è possibile, scegliendo opportunamente il *linker* e i gruppi protettori laterali, sbloccare solo il peptide dal supporto solido senza rimuovere i gruppi in catena laterale.

Un fattore critico della sintesi su fase solida è rappresentato dalla resa di *coupling*: che determina, durante la sintesi un progressivo decremento delle catene corrette in crescita. Inoltre la presenza di sequenze incomplete (delete e troncate), simili al prodotto voluto, possono creare problemi nella fase di purificazione. La difficoltà di sintesi è sequenza dipendente, peptidi e proteine amiloidi sono note quali “*difficult sequences*” e analogamente sequenze che presentano un'elevata tendenza ad aggregare possono dare seri problemi sintetici.

Solitamente, la procedura di sintesi prevede per ogni residuo, un unico ciclo di condensazione (*coupling singolo*), nei casi in cui le rese risultano relativamente basse, al fine di evitare la formazione di sequenze incomplete, si può cercare di forzare la formazione del legame peptidico impostando due reazioni consecutive di condensazione (*coupling doppio*) e/o si può bloccare la crescita di queste catene incomplete tramite reazione di *capping* con anidride benzoica o acetica.

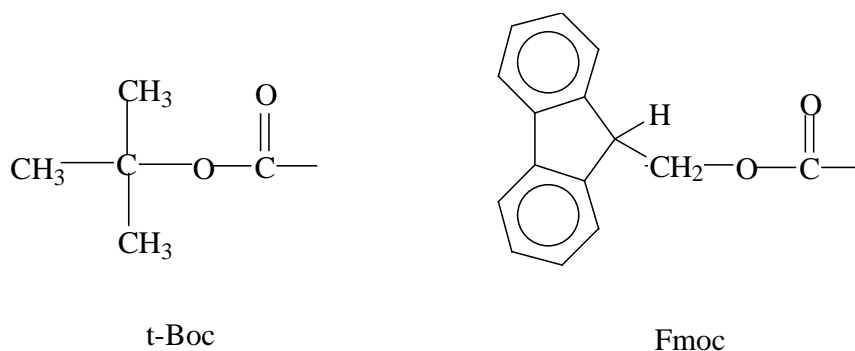


Figura 2.2. Struttura dei gruppi protettori del terminale α -amminico, *t*-Boc e Fmoc.

2.1.1 Funzionalizzazione della resina

Nel presente lavoro di dottorato sono state utilizzate le seguenti resine:

- HMP Resin;
- Fmoc-Met-Wang Resin;
- Rink Amide MBHA Resin;
- Fmoc-Lys(Boc)-Wang Resin;
- Fmoc₈-Lys₄-Lys₂-Lys- β Ala-Wang Resin.

Operando in chimica Fmoc è stato impiegato come supporto solido la resina HMP, conosciuta anche come Wang Resin, al fine di ottenere sequenze acide dopo lo sblocco con una miscela al 95% di TFA. Alcuni peptidi a seguito della loro suscettibilità a *cleavage* enzimatico, possono essere modificati per aumentarne la resistenza alla proteolisi, una delle strategie adottabili prevede il blocco delle funzioni terminali tramite amidazione del gruppo carbossilico e acetilazione del terminale amminico. Nel primo caso sono disponibili linker che forniscono, dopo lo sblocco, peptidi ammido-terminali, come la resina Rink Amide mBHA..

Nei casi in cui la resina non sia già funzionalizzata con l'amminoacido opportuno, si procede all'ancoraggio di questo. Per la realizzazione del *coupling*, il gruppo carbossilico dell'amminoacido deve essere attivato. A questo scopo, operando con resina HMP, il metodo utilizzato nel presente lavoro prevede la sintesi di un'anidride simmetrica altamente reattiva a partire da DCC e 2 equivalenti di Fmoc-amminoacido protetto in catena laterale (*User Manual*).

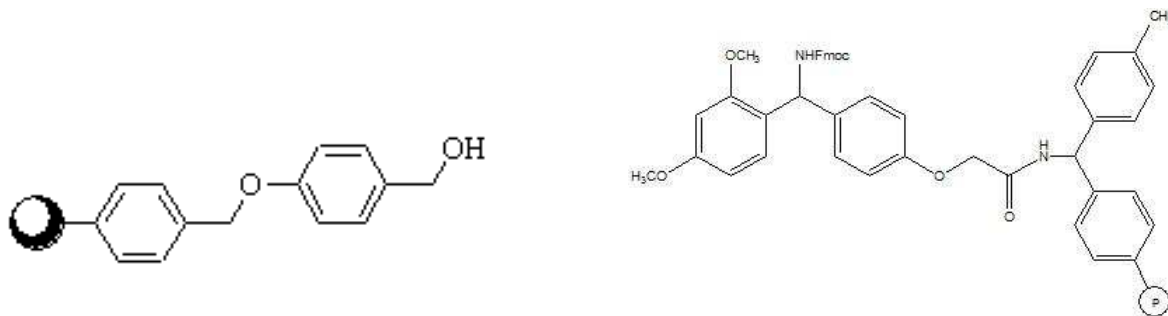


Figura 2.3. Struttura della resina HMP e Rink amide mbHA.

La dicicloesilurea che si forma come sottoprodotto, è un composto altamente insolubile in DMF/NMP che precipita e viene rimosso per filtrazione, mentre l'anidride viene trasferita nel reattore contenente la resina. La reazione è eseguita in doppio *coupling*, utilizzando come agente condensante 1 mL di soluzione DCC/NMP 1 M e come catalizzatore 0,1 equivalenti di DMAP (Wang *et al.*, 1981)

A tale step si può far seguire una reazione di *capping* con 2 mmoli anidride benzoica, per acetilare i siti della resina che non hanno reagito precedentemente. Per la funzionalizzazione della resina Rink amide mbHA è stata adottata un'attivazione *in situ* con una miscela HBTU/HOBt o col solo HBTU, analoga a quella impiegata nei cicli di accrescimento del peptide.

2.1.2 Stima del grado di funzionalizzazione della resina

La funzionalizzazione della resina con il primo amminoacido, è stata stimata utilizzando la procedura indicata nel manuale d'uso del sintetizzatore e che prevede la quantificazione del gruppo Fmoc rilasciato in soluzione dopo reazione di deprotezione del terminale α -amminico. In pratica si è operato nel modo seguente: 4÷8 mg di resina funzionalizzata, seccata sotto vuoto per 1 ora, sono stati accuratamente pesati e trattati con 0.5 mL di soluzione al 20% di piperidina in DMF per 15 min, a temperatura ambiente e agitando manualmente. La deprotezione della funzione α -amminica del residuo legato al supporto, genera il composto H-(9-fluorenilmetil)piperidina che assorbe a 301 nm ($\epsilon = 7800$) (figura 13). Dopo aver portato la miscela ad un volume finale (V) di 50 mL con DMF, si misura l'assorbanza della soluzione ottenuta a 301 nm tramite uno spettrofotometro UV a doppio raggio.

La sostituzione, espressa in mmol/g viene calcolata utilizzando la formula qui sotto riportata:

$$\text{Sostituzione (mmoli/g)} = [A_{301} \times V(\text{mL})] / [7800 \times \text{wt}(\text{g})]$$

dove wt indica il peso del campione di resina in grammi, dopo che è stato seccato sottovuoto.

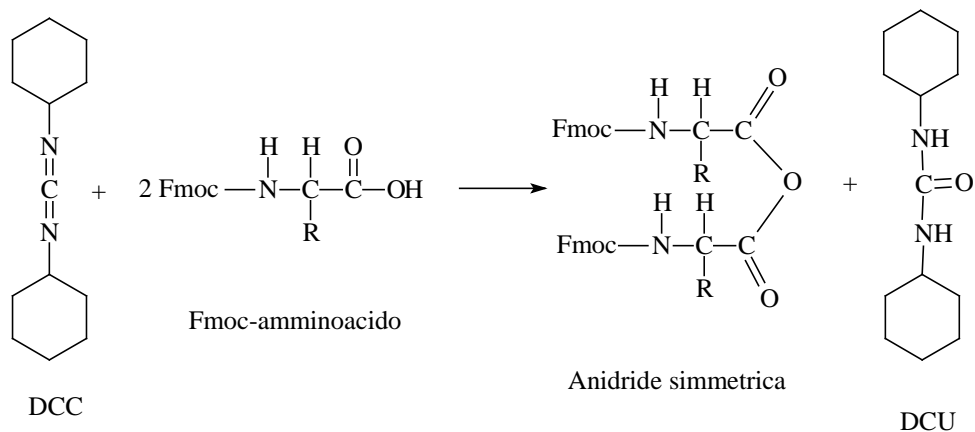


Figura 2.4. Attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N^α-Fmoc protetto tramite DCC via anidride simmetrica.

2.1.3 Deprotezione del gruppo α-amminico

All'inizio di ogni ciclo, per permettere l'accrescimento della catena peptidica ancorata al supporto solido, il gruppo protettore del terminale amminico dell'ultimo amminoacido incorporato deve essere rimosso (*User Manual*). La strategia di protezione della chimica Boc si basa su una graduale labilità in ambiente acido; il gruppo *t*-Boc risulta infatti stabile ad alcali e nucleofili, mentre viene rimosso rapidamente da acidi organici e inorganici, (solitamente si utilizza una miscela di TFA al 20÷50% in DCM, per 20-30 minuti; figura 12). I gruppi protettori in catena laterale impiegati, generalmente risultano stabili in tali condizioni, tuttavia per ridurre possibili reazioni collaterali, ogni traccia di TFA e di gruppi amminici protonati viene eliminata tramite reazione di neutralizzazione con una soluzione diluita di DIEA (Fields *et al.*, 1992).

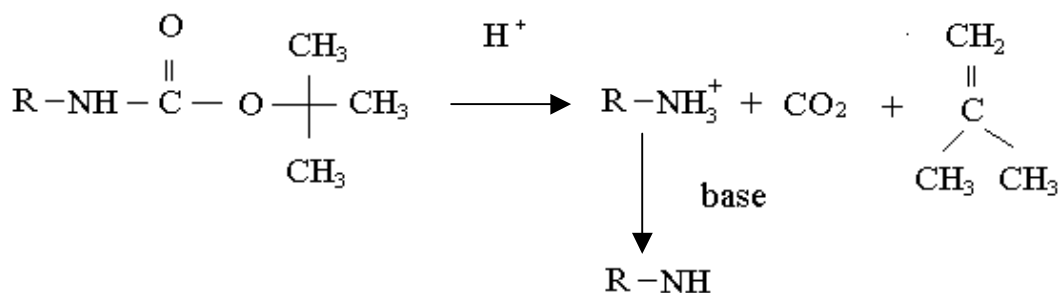


Figura 2.5. Reazione di acidolisi del gruppo Boc.

Caratteristiche completamente opposte mostrano le classi di gruppi protettori utilizzati in chimica Fmoc: quelli presenti in catena laterale sono di tipo acido-labili, mentre la rimozione del gruppo Fmoc avviene in soluzione al 20% di piperidina in NMP. Queste condizioni danno il vantaggio, una volta avvenuto lo sblocco di avere il gruppo amminico N-terminale libero, del peptide su resina, pronto per la successiva reazione di acilazione, senza richiedere passaggi aggiuntivi di neutralizzazione.

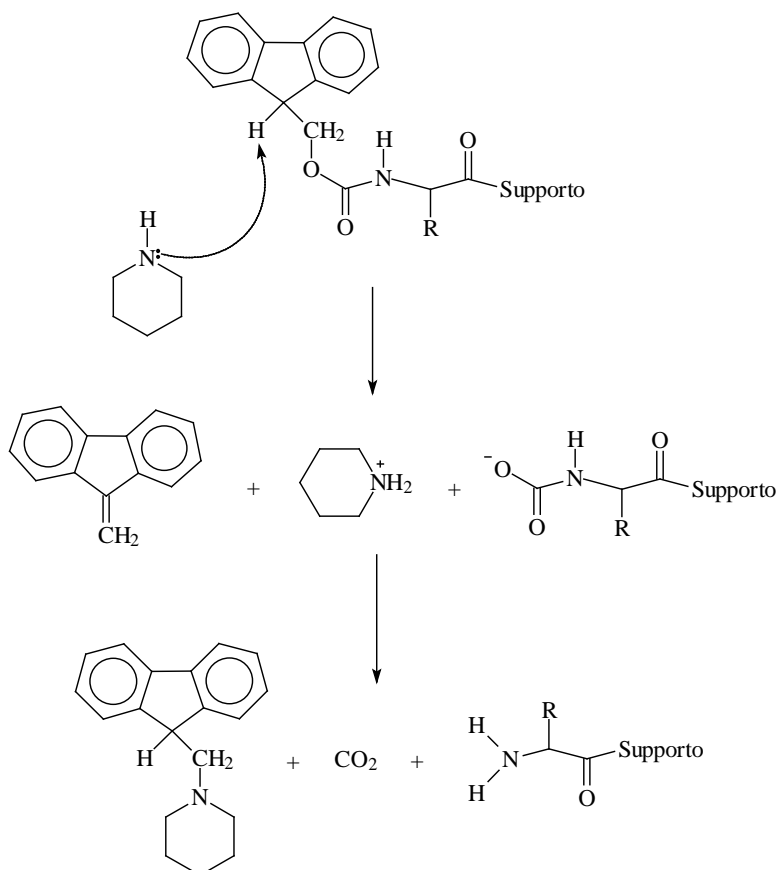


Figura 2.6. Reazione di deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina.

2.1.4 Reazione di condensazione

Nel considerare la fase di condensazione del processo di SPPS, si deve tener presente che la resa e la velocità di questa reazione sono legati ad una serie di variabili:

- i. la scelta del solvente. Questa determina in parte il grado di rigonfiamento del peptide su resina e ne influenza l'accessibilità ai siti reattivi. Inoltre esercita un effetto diretto sulla cinetica del *coupling* stesso;

- ii. l'ingombro sterico. È correlato alla natura delle catene laterali e al tipo di gruppi protettori impiegati;
- iii. la reattività del gruppo carbossilico attivato. Questo aspetto influenza non solo la velocità di acilazione, ma anche la comparsa di reazioni secondarie, come la racemizzazione.

Sono stati per questo, sviluppati diversi metodi per la formazione del legame ammidico, al fine di ottimizzare sempre più le condizioni di sintesi (riduzione dei tempi, limitazioni delle reazioni collaterali). La creazione di un legame peptidico richiede molta energia quindi è necessario procedere all'attivazione o del gruppo acido o del gruppo amminico, per favorire il verificarsi della reazione. L'attivazione del gruppo amminico è stata a lungo oggetto di studio, sostituenti elettrondonatori potrebbero aumentare la nucleofilicità dell'azoto, ma in contemporanea diminuirebbero anche la facilità di acilazione a causa di un aumentato ingombro sterico. Finora non si è ancora riusciti a trovare un approccio realmente praticabile, per cui l'attivazione del gruppo carbossilico, rappresenta tuttora il processo fondamentale di tutti i metodi di condensazione in uso. Le quattro diverse tecniche di attivazione più impiegate passano attraverso la preparazione di alogenuri acilici, anidridi simmetriche, esteri attivi e l'attivazione *in situ* di reagenti.

Cloruri acilici

Il gruppo carbossilico di un amminoacido può essere attivato trasformandolo nel corrispondente alogenuro acilico. I derivati così ottenuti hanno storicamente trovato largo impiego nella sintesi in soluzione, mentre il loro uso in SPPS è più limitato. Attualmente si ricorre a questa procedura strategica quando l'ingombro sterico così elevato da rendere proibitivo l'impiego di altri reagenti condensanti. I cloruri acilici dei residui amminoacidici sono dei derivati troppo attivati da rendere il carbonile suscettibile anche all'attacco di deboli nucleofili, e da rendere spesso spontanea ciclizzazione con possibile racemizzazione. Inoltre la loro preparazione richiede l'impiego di reattivi troppo forti, come SOCl_2 e PCl_5 , che risultano poco compatibili, in termini di stabilità, con il gruppo Boc e vari amminoacidi. Invece sono disponibili in commercio un gran numero di fluoruri acilici dei Fmoc-amminoacidi, che rispetto ai cloruri, hanno una reattività più simile agli esteri attivi, una stabilità maggiore in soluzione e limitano il verificarsi di reazioni secondarie.

Anidridi simmetriche

Le anidridi simmetriche sono preferenzialmente impiegate in chimica Boc, sono specie altamente reattive e si possono preparare facendo reagire *in situ* l'aa N^α -protetto con la $\text{N,N}'$ -dicicloesilcarbodiimmide, DCC, nel rapporto 2 : 1, in un solvente polare come diclorometano (DCM). La reazione tra la DCC e l' N^α -protetto-aa forma dapprima O-(N^α -protetto-amminoacil)- $\text{N,N}'$ -dicicloesilurea, DCI. Questo è un forte acilante e può reagire: con un secondo amminoacido, come in questo caso, oppure con un ossidrile, come

nella sintesi degli esteri attivi, o infine con una ammina, come nella sintesi diretta del legame ammidico con DCC aggiunta *in situ*. Dalla reazione si ottiene per ogni equivalente di aa attivato, un equivalente di DCU, che deve essere rimosso per filtrazione; mentre l'anidride simmetrica isolata, è fatta reagire con il gruppo amminico del peptide in crescita, per la formazione del legame ammidico tramite amminolisi.

Un inconveniente nell'utilizzo di anidridi simmetriche è che la loro preparazione è piuttosto dispendiosa, in quanto richiede l'utilizzo di 2 equivalenti di amminoacido per ottenere 1 equivalente di specie attivata che comunque deve essere utilizzata in eccesso rispetto alle moli di peptide su resina in crescita.

Esteri attivi

Gli esteri attivi sono una classe di esteri particolarmente reattivi perché contengono alcoli che sono ottimi gruppi uscenti. Questo può essere dovuto a due motivi:

- 1) l'alcol ha caratteristiche acide e quindi il suo alcossido è una basa debole ed è quindi un buon gruppo uscente. In questa categoria ci sono alcuni derivati del fenolo come p-nitrofenolo e 2,4,5-triclorofenolo;
- 2) l'alcol, anche senza essere particolarmente acido, ha una struttura tale da fornire assistenza anchimerica durante la reazione di amminolisi. In questa categoria ci sono i derivati della idrossilammina come N-idrossisuccinimide, HOSu, e N-idrossibenzotriazolo, HOBt.

Un estere attivo molto usato è quello con HOBt, data la rapidità di formazione e l'alta reattività. Altro agente condensante introdotto più recentemente nella pratica della sintesi peptidica è il pentafluorofenil estere (OPfp), preparato a partire da DCC e pentafluorofenolo. Poiché da solo Opfp, dà condensazioni con cinetica lenta, spesso si introduce nella miscela di reazione anche HOBt in rapporto 1:2.

Agenti condensanti *in situ*

L'esempio classico di un reagente condensante *in situ* è rappresentato dalla DCC, e dai suoi derivati come la N,N'-Diisopropilcarbodiimmide (DIPCDI) e la 3-etil-1(N,N-dimetil)aminopropilcarbodiimmide (EDCI), sviluppati al fine di ottenere come prodotti secondari di reazione, uree solubili nei solventi polari solitamente usati durante le sintesi, quali DCM e DMF, e in soluzioni acquose.

La diffusione di questa procedura di *coupling* si è accentuata in seguito all'introduzione nella miscela di acilazione di nucleofili ausiliari. Tra gli additivi catalitici maggiormente impiegati c'è l'HOBt, l'HOSu e il HONB (immide N-idrossi-5-norbornene-2.3-dicarbossilica). Il compito di queste molecole è quello di accelerare la velocità della reazione di condensazione carbodiimmide-mediata, di ridurre possibili reazioni secondarie, in particolare la racemizzazione. Tutti questi additivi sono capaci di agire da accettori di protoni, facilitando la deprotonazione dello ione ammonio intermedio, e quindi riducendo fortemente i tempi di reazione.

Essendo impiegati come catalizzatori, in misura equimolare al componente acilate, durante la fase di accrescimento della catena peptidica, la loro concentrazione rimane invariata e questo assicura che il prodotto secondario, derivato dell'isourea, altamente reattivo abbia vita breve.

Recentemente in alternativa alla DCC sono stati sviluppati altri agenti condensanti: benzotriazol-1-il-ossi-tris-(dimetilammino)-fosfonio esafluorofosfato, BOP, 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato, HBTU, 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato, TBTU, e 2-(2-oso-1(2H)-piridil)-1.1.3.3-bis-pentametileneuroniotetrafluoroborato, TOPPIP. Per ottenere alte efficienze di condensazione la presenza di un'ammina terziaria come diisopropiletilammina (DIEA) o N-metilmorfolina, e anche in questo caso l'introduzione di HOBt incrementa la velocità di *coupling* e sopprime possibili reazioni secondarie.

L'acilazione con BOP, tuttavia, porta alla liberazione di coprodotti cancerogeni che ne limitano l'impiego su larga scala. Per risolvere il problema, sono state apportate delle modifiche al reagente in modo da sviluppare un derivato potenzialmente meno tossico, il benzotriazol-1-il-ossi-tris-pirrolidino-fosfonio esafluorofosfato, PyBOP (Fields *et al.*, 1992).

In questo lavoro di dottorato è stata seguita la procedura chiamata FastMoc (*User Bulletin 33*), messa a punto dalla Applied Biosystems, prevede l'utilizzo dell'agente condensante HBTU, sciolto in una soluzione di HOBt e DMF.

L'attivazione *in situ* con HBTU/HOBt è più veloce e più efficace rispetto a quella via estere attivo, e non richiede la separazione delle fasi di attivazione e condensazione separate (Fields *et al.*, 1991; Ball *et al.*, 1996).

La procedura automatizzata richiede la dissoluzione dell'amminoacido protetto al terminale α -amminico e in catena laterale, da legare al peptide in crescita, in una soluzione composta da 2,1 g di NMP e 2,2 g di una soluzione 0.45 M di HBTU/HOBt in DMF (200 mL di una soluzione 0,5 M di HOBt cui si aggiungono 100 mmoli di HBTU). La soluzione è poi trasferita direttamente al reattore, dove si aggiungono 0,32 mL di ammina terziaria, DIEA, che promuovono *in situ* la reazione di *coupling*. L'intera procedura è completata in circa 30 min.

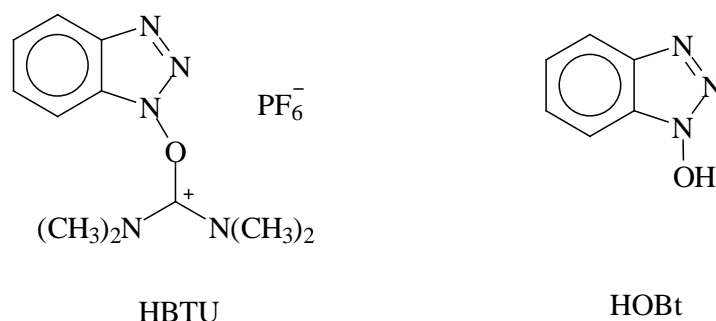


Figura 2.7. Struttura degli agenti condensanti HBTU e HOBt.

2.1.5 Stima della resa della reazione di coupling

Per valutare la percentuale di coupling dopo ogni ciclo di acilazione, si utilizza il Kaiser test, detto anche test alla ninidrina (Fields *et al.*, 1992; Sarin *et al.*, 1981).

Un campione di resina, tra 2 e 8 mg, viene lavato con 3 aliquote di metanolo, la prima delle quali con aggiunta di 2-3 gocce di acido acetico (nel caso di utilizzo di chimica Fmoc, per ovviare a eventuali reazioni di sblocco dello Fmoc), seccato sotto vuoto per 1 ora e pesato accuratamente.

Il protocollo, successivamente, prevede:

- 1 - addizione in sequenza di: 75 μL di Monitor 1 (soluzione al 76% (w/w) fenolo/etanolo), 100 μL di Monitor 2 (soluzione 0.2 mM di KCN/piridina) e 75 μL di Monitor 3 (soluzione 0.28 M ninidrina/etanolo);
- 2 - riscaldamento della miscela a bagnomaria a 100°C per 5 min;
- 3 - aggiunta di 4,8 mL di soluzione di etanolo al 60%;
- 4 -dopo centrifugazione, misura di assorbanza del liquido surnattante a 570 nm mediante spettrofotometro UV a doppio raggio.

La quantità di funzioni amminiche libere è calcolato mediante la seguente formula:

$$\mu\text{moli/g di gruppi amminici} = [A \times V \times 10^{-6}] / [\epsilon \times P]$$

dove A è il valore di assorbanza a 570 nm del campione meno il valore di assorbanza della soluzione di riferimento (75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2 e 75 μL di Monitor 3 in 4,8 mL di soluzione di etanolo al 60%); V è il volume del campione espresso in mL; ϵ è il coefficiente di estinzione molare pari a 15000 $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; P è il peso del campione espresso in mg.

La resa della reazione di *coupling* è data da:

$$\text{Resa \%} = \{1 - [\mu\text{moli/g di gruppi amminici} / (\text{sostituzione}(\text{mmoli/g}) \times 10^{-3})]\} \times 100$$

La reazione attraverso la quale si ottiene il gruppo cromoforo che assorbe nel visibile è riportata in figura 15:

Questo meccanismo è stato ipotizzato per le ammine primarie: la prolina, essendo un'immina, reagisce con la ninidrina con formazione di un addotto diverso, di colore giallo, legato alla resina (Fields *et al.*, 1992).

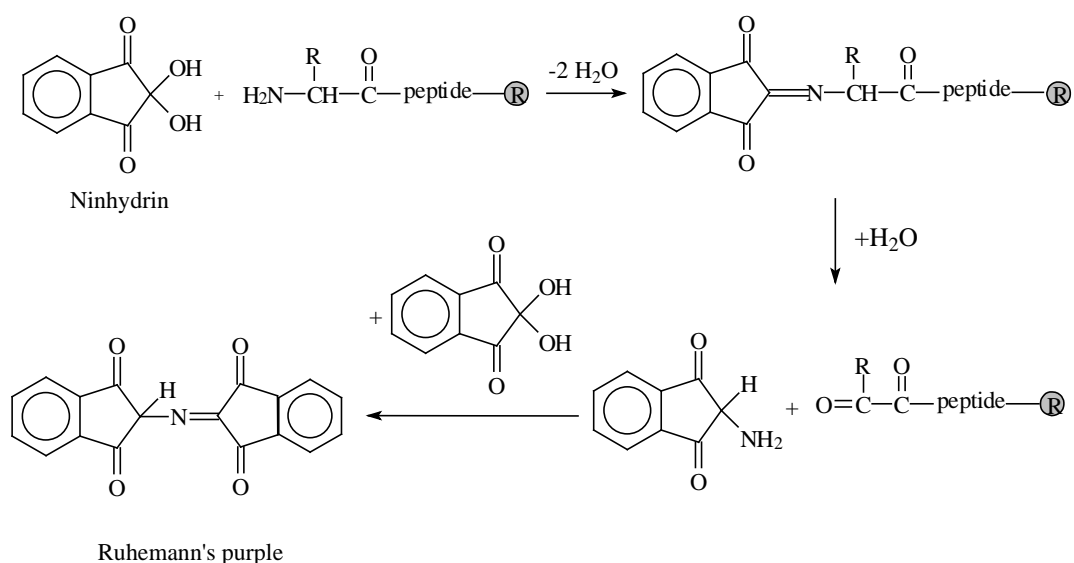


Figura 2.8. Reazione della ninidrina con il residuo terminale amminico del peptide in crescita che non ha subito condensazione.

2.1.6 Sblocco del peptide dalla resina e rimozione dei gruppi protettori

Caratteristica della SPPS con chimica Fmoc, è la simultanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale e la rottura del legame che ancora il peptide al supporto solido, per reazione in ambiente moderatamente acido (Fields *et al.*, 1992, *User Manual*).

La rimozione dei gruppi protettori in catena laterale genera specie altamente reattive (ad esempio carbocationi) che possono provocare modificazioni covalenti dei residui suscettibili. L'uso di *scavengers* (reattivi che hanno proprietà chimiche simili a quelle delle specie da proteggere), riduce grandemente le reazioni collaterali indesiderate (Fields, 1991; King *et al.*, 1990).

La miscela di *scavengers* varia a seconda degli amminoacidi presenti nella sequenza e in base al tipo di gruppi protettori usati per le catene laterali e alla chimica impiegata per la sintesi.

Gruppi protettori in catena laterale, compatibili con la chimica Fmoc, sono gruppi stabili in condizioni basiche e rimovibili in condizioni acide.

Gli amminoacidi utilizzati nelle sintesi con chimica Fmoc, qui riportate, presentano i seguenti gruppi protettori: Pmc per Arg, Trt per Asn, Gln e His, OtBu per Asp e Glu, AcM per Cys, Boc per Lys e *t*Bu per Ser, Thr e Tyr (tabella 1).

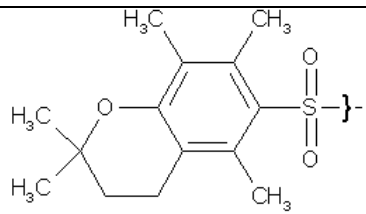
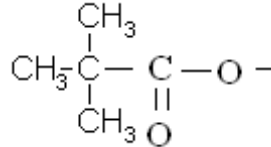
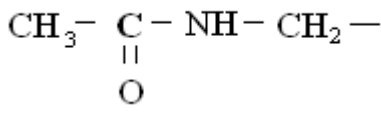
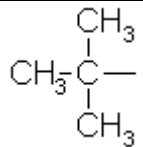
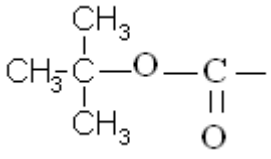
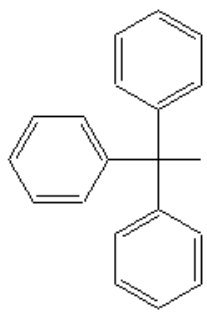
Amminoacido protetto	Gruppo protettore chimica Fmoc	
Arg		2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil (Pmc)
Asp/Glu		Estere <i>tert</i> -Butilico (OtBu)
Cys		Acetammidometile (AcM)
Ser/Thr/Tyr		<i>tert</i> -butile (tBu)
Trp/Lys		<i>tert</i> -butiossicarbonile (Boc)
Asn/Gln/His		Tritil (Trt)

Tabella 2.1. Protezioni delle catene laterali dei residui amminoacidici in chimica Fmoc.

Come accennato, durante la reazione di sblocco dalla resina e di perdita delle protezioni in catena laterale, si possono verificare delle reazioni secondarie che alterano il prodotto desiderato, le principali modifiche che possono aver luogo sono:

- i. T-butilazione. Lo sblocco con TFA dei gruppi *t*-Bu e *t*-Boc provoca la formazione di *t*-butil cationi e *t*-butil trifluoroacetati; queste specie sono responsabili della *t*-butilazione

- del gruppo tioetereo della Met e della posizione 3' della Tyr, seppur in misura molto limitata. Allo scopo di evitare queste reazioni collaterali si utilizzano come *scavengers* EDT (etanediolo), per i *t*-butiltrifluoroacetati, e H₂O, per i cationi *t*-butilici;
- ii. l'ossidazione catalizzata da acidi della Met al suo solfossido. Tale evento può essere prevenuto per aggiunta di tioanisolo nella miscela di sblocco;
 - iii. il gruppo Pmc durante la reazione di acidolisi può attaccare il gruppo ε-amminico della Lys; o può O-solfonare le catene laterali di Ser e Tyr. Per minimizzare tale effetto alla miscela di reazione si aggiungono EDT, H₂O e tioanisolo. È anche stato sperimentalmente osservato che quest'ultimo accelera la deprotezione di Arg(Pmc) ad opera di TFA;
 - iv. il gruppo Pmc, liberato in seguito allo sblocco, può provocare la solfonazione dell'anello indolico del Trp. L'evento può essere evitato riducendo il tempo di reazione o utilizzando per la sintesi del peptide, il derivato Fmoc-Trp(Boc)-OH;
 - V. in assenza di *scavengers* cationici, Cys e Trp, risultano particolarmente suscettibili di alchilazione da parte di cationi (es: catione *t*-butile), prodotti durante acidolisi.

Conclusa la sintesi, il gruppo protettore Fmoc della funzione N-terminale è stato rimosso con procedura automatizzata impiegando una soluzione di piperidina al 20% in NMP. Il peptide su resina è stato quindi seccato per almeno 2 ore sotto vuoto (fino a peso costante).

In riferimento alle sequenze riportate in questa tesi, sintetizzate tramite chimica Fmoc e impiegando resine HMP (o Wang) e Rink Amide MBHA, la procedura di sblocco ha previsto, nella maggioranza dei casi, il trattamento del peptide, con una miscela di TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5; v:v:v) per 90 minuti a temperatura ambiente, sotto continua agitazione magnetica; in presenza dei residui di Met o Cys(Trt), la composizione della miscela è stata la seguente: TFA/H₂O/EDT/TIS (94.5:2.5:2.5:1.5; v:v:v:v) e la reazione è stata condotta sempre per 90 min a temperatura ambiente (*Introduction to Cleavage Techniques*, 1990). In realtà il tempo di reazione è scelto in funzione del numero e del tipo di gruppi protettori, presenti in catena laterale (in particolare aumenta proporzionalmente al numero di Arg(Pmc) presenti in sequenza), e in rapporto alla miscela di sblocco.

La resina è stata eliminata tramite filtrazione con *gooch* G3 e la soluzione contenente il peptide è stata portata a piccolo volume in rotavapor. Il peptide, in seguito all'aggiunta di etere dietilco freddo (~ 4°C), compare sottoforma di precipitato bianco isolabile per filtrazione con *gooch* G4. A questo punto il peptide è stato seccato, sciolto in acqua MilliQ e infine liofilizzato.

La sintesi di peptidi contenenti residui di cisteina richiede delle particolari attenzioni, in quanto si può scegliere se lasciare il gruppo sulfidrilico libero, o se, per particolari esigenze, questo deve rimanere protetto o se, deve essere impiegato per creare dei ponti disolfuro inter- /intra-molecolari. Attualmente in

commercio sono presenti vari tipi di protezioni, per la chimica Fmoc quelli più comunemente utilizzati sono: Trt, Mmt (4-Metossitritile), AcM, tBu, tButhio (*tert*-Butiltiolo), Tacm (Trimetilacetammidometile), and Tmob (2,4,6-*t*-Trimetilossibenzile). Diversamente da Trt, Mmt e Tmob, i gruppi AcM, tBu, tButhio and Tacm risultano stabili nelle condizioni di sblocco con TFA e questo comporta un passaggio aggiuntivo di deprotezione. Quando usati in combinazioni, questi derivati, permettono di disegnare una strategia di rimozione delle protezioni e la selettiva formazione di legami tra coppie di cisteine (Albericio *et al.*, 2000).

Nel caso particolare del gruppo AcM, si possono impiegare come reagenti il mercurio (II) acetato, il trifluoroacetato d'argento (I) e lo iodio. Nel suddetto lavoro di dottorato la procedura di sblocco è stata effettuata sciogliendo il peptide in una miscela TFA/anisolo (99:1; v:v) a cui sono stati aggiunti 100 equivalenti di trifluoroacetato d'argento(I). Il sistema è stato mantenuto sotto agitazione magnetica e termostato a 4° C. Dopo 90 minuti la soluzione è stata concentrata a piccolo volume per evaporazione sottovuoto e sono stati aggiunti 10 mL di etere etilico freddo. Il precipitato peptidico formatosi, è stato decantato per centrifugazione, il surnattante è stato rimosso e il residuo è stato seccato sottovuoto, e successivamente sciolto in acqua e liofilizzato.

2.1.7 Modificazione del terminale amminico: reazione di acetilazione

La reazione di acetilazione può essere impiegata al fine di bloccare la funzione amminica terminale. La scelta di ricorrere a tale modificazione del peptide può essere legata alla necessità di migliorare la permeabilità cellulare, riducendo le cariche libere, o di aumentare la stabilità verso digestione enzimatica di amminopeptidasi, o di bloccare la suscettibilità all'attività di sintetasi.

Il protocollo di acetilazione impiegato prevede la reazione tra il peptide su resina, privo della protezione N-terminale, e l'anidride acetica in soluzione al 10% in NMP, a temperatura ambiente e sotto agitazione magnetica. Trascorsi 10 min il peptide è stato isolato per filtrazione con *gooch* G3, lavato con NMP e DCM, e seccato sottovuoto.

2.2 PURIFICAZIONE

La purificazione dei vari peptidi sintetizzati durante il dottorato è stata realizzata utilizzando la tecnica cromatografica RP-HPLC (*Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography*).

Il termine cromatografia riunisce un gruppo di importanti e differenti metodi in grado di separare componenti assai simili da miscele complesse.

Il campione viene sciolto in una fase mobile (gas, liquido o fluido supercritico), che viene poi fatta passare attraverso una fase stazionaria immiscibile. Quei componenti che vengono maggiormente trattenuti dalla fase stazionaria si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile, mentre quelli debolmente trattenuti si muovono più rapidamente. A causa della diversa mobilità, quindi, i componenti del campione si separano in bande discrete e possono perciò essere analizzati qualitativamente e/o quantitativamente oppure essere isolati e raccolti.

I vari metodi cromatografici possono essere classificati in base al tipo di fase mobile e stazionaria o in base al tipo di equilibri che i soluti instaurano tra le due fasi: in particolare, nella cromatografia liquida (LC), la fase mobile è costituita da un liquido mentre la fase stazionaria può essere un solido (cromatografia di adsorbimento), o un altro liquido immiscibile adsorbito su particelle solide impaccate in una colonna (cromatografia di ripartizione), o uno scambiatore anionico o cationico (cromatografia a scambio ionico). Si può distinguere inoltre tra la cromatografia su colonna e quella planare.

Un'evoluzione della cromatografia liquida classica è l'HPLC in cui si utilizzano colonne riempite con gel di silice funzionalizzata (granuli 3-10 μm), lunghe tra i 10 e i 30 cm e con diametro interno tra i 3.9 e gli 8.0 mm. La quantità di prodotto che può essere purificata dipende dalle dimensioni della colonna e dalle specifiche del riempimento. Tale tecnica nasce dall'esigenza di incrementare l'efficienza delle colonne cromatografiche diminuendo il diametro delle particelle di riempimento e ottimizzando l'impaccamento della fase stazionaria. Poiché tale modifica comporta una drastica riduzione del flusso della fase mobile e un insostenibile aumento dei tempi di separazione, la tecnica richiede l'utilizzo di pompe per forzare la fase mobile attraverso la colonna.

L'HPLC è una tecnica non distruttiva molto diffusa per la sua elevata sensibilità e la facilità con cui si adatta a separazioni quantitative accurate, in particolare di specie non volatili termicamente labili (ad es. peptidi) (Stulik *et al.*, 1997). In particolare la RP-HPLC è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari: nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate colonne con gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio.

Come fase mobile invece possono essere utilizzate miscele a vario titolo composte da soluzioni acquose e solventi organici (in genere acetonitrile). L'interazione che permette la ritenzione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente. Nel secondo caso, un aumento graduale della concentrazione di acetonitrile rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente desorbimento dell'analita ad una data percentuale di acetonitrile e successiva eluizione.

In genere, i peptidi sono separati meglio in ambiente acido, conseguentemente la maggior parte delle fasi mobili contengono basse concentrazioni di acido TFA (0.05% nel caso degli eluenti usati durante il dottorato) il quale agisce come coppia ionica incrementando la ritenzione, favorendo la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolicci presenti sulla

fase stazionaria; tale composto, inoltre, non assorbe nella regione UV utilizzata per la rivelazione ed è facilmente rimosso.

La composizione della fase mobile, in genere, influenza maggiormente la separazione rispetto al tipo di fase stazionaria legata utilizzata.

La soluzione contenente il campione può essere introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite aspirazione o iniezione. All'uscita della colonna cromatografica è posto un rivelatore che può essere di varia natura, come ad esempio spettrofotometri UV, con lettura impostata alla lunghezza d'onda (λ) di 214 nm, ovvero in corrispondenza del picco di assorbimento del legame peptidico, e/o di 280 nm, valore di assorbimento dei cromofori amminoacidici Phe, Tyr e Trp; oppure si possono interfacciare spettrometri di massa, o fluorimetro, o *detector* ad indice di rifrazione.

2.3 CARATTERIZZAZIONE

2.3.1 Analisi amminoacidica

Un campione di peptide da analizzare viene innanzitutto idrolizzato come segue: ~ 3 nmoli di peptide vengono trasferite in una provetta e vengono fatte reagire, in un reattore sigillato in atmosfera inerte e contenente 250 μ L di HCl 6 N e 1-2 cristalli di fenolo nel caso siano presenti Tyr o Trp nella sequenza, alla temperatura di 110°C e per 24 ore (procedura Pico Tag messa a punto per la Pico Tag Work Station della Waters). Le provette utilizzate per i campioni e il reattore di reazione sono preventivamente lavati con una miscela 1:1 di HNO₃ e H₂SO₄, sciacquati abbondantemente con H₂O MilliQ, EtOH e seccati sotto vuoto. Su tale campione e, parallelamente, su 5 μ L di soluzione standard di amminoacidi della Pierce (2500 mmoli/mL) si opera come segue:

- i. si portano a secco le soluzioni;
- ii. si aggiungono 20 μ L di soluzione redry (metanolo, H₂O MilliQ, TEA, in rapporto (v:v:v) 2:2:1);
- iii. si portano a secco le soluzioni;
- iv. si derivatizzano gli amminoacidi con 20 μ L di una soluzione contenente metanolo, H₂O MilliQ, TEA, PITC (fenilisotiocianato) in rapporto (v:v:v:v) 7:1:1:1 per 10 min esatti;
- v. si portano a secco le soluzioni;
- vi. si aggiungono 30 μ L di metanolo e si portano nuovamente a secco i campioni;
- vii. si aggiungono 400 μ L di diluente PicoTag allo standard mentre per i campioni se ne impiegano 250 μ L;
- viii. si sonicano i campioni per 2 min;

ix. si filtrano le soluzioni.

La metodica descritta permette di funzionalizzare ciascun residuo con il PITC ottenendo così un derivato, un PTH-amminoacido (feniltioidantoin derivato), facilmente rilevabile a 254 nm e adatto ad essere separato per via cromatografica su colonna a fase inversa.

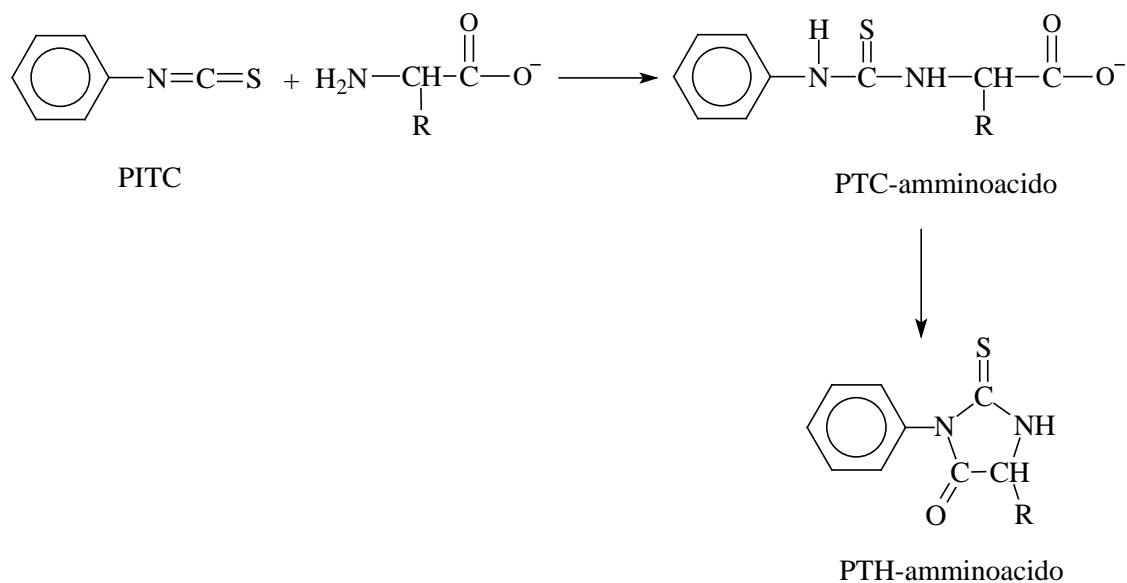


Figura 2.9. Reazione tra PITC e un amminoacido generico.

L'analisi cromatografica è stata condotta, nel presente lavoro di dottorato, utilizzando una colonna Pico Tag (3.9×300 mm) mantenuta a temperatura costante di 46°C , eluenti A e B per il sistema Pico Tag (cft. pag. 87), flusso $1 \text{ mL}/\text{min}$ e il seguente gradiente binario: 100% di A per 1 min, dallo 0% di B su A al 46% di B in 20 min, dal 46% al 100% di B in 1 min, 100% di B per 5 min; lettura dell'assorbanza a 254 nm.

L'integrazione dei picchi cromatografici degli standard ha permesso la formulazione di rette di taratura per ciascun feniltiocarbamilamminoacido e quindi la quantificazione del contenuto amminoacidico del campione. Questa analisi permette di quantificare la concentrazione esatta di un peptide in soluzione in quanto il valore di concentrazione calcolato a partire dalla quantità pesata di peptide non tiene conto della percentuale di acqua che rimane nel prodotto in seguito a liofilizzazione.

2.3.2 Analisi di massa

La spettrometria di massa (MS) è un metodo di analisi distruttivo che consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione quantità estremamente esigue.

Una molecola, per poter essere misurata dallo spettrometro di massa, deve essere prima ionizzata. Una volta creati gli ioni in fase gassosa questi possono essere separati, o nello spazio o nel tempo, in base al loro rapporto m/z (massa/carica).

Tutti gli spettrometri di massa richiedono per il loro funzionamento un vuoto molto spinto, per impedire una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici, e sono costituiti essenzialmente da tre parti:

- i. una camera di ionizzazione (S);
- ii. un analizzatore (A);
- iii. un rivelatore (R).

Il campione non è necessario che sia puro e può essere introdotto sotto diverse forme fisiche: i gas si trovano già nella forma fisica adatta; i solidi e i liquidi devono prima essere vaporizzati; nei casi di sostanze poco volatili si ricorre a derivatizzazione. Per introdurre il campione è necessario avere un'interfaccia per passare dalla pressione atmosferica al vuoto ($\sim 10^{-6}$ torr).

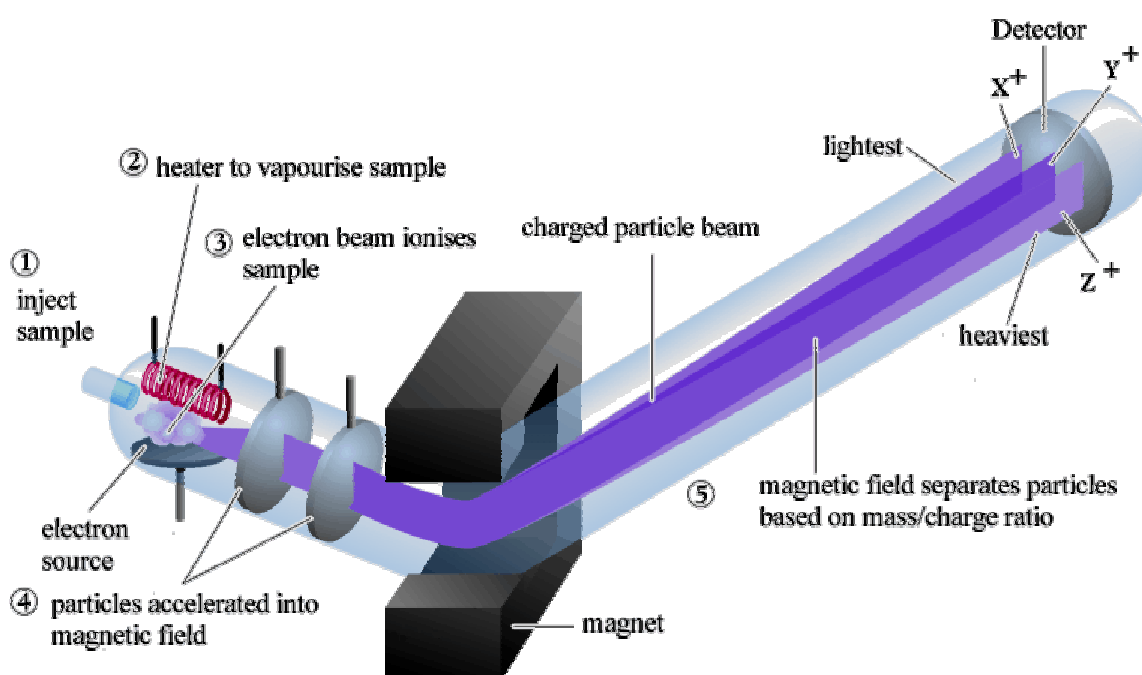


Figura 2.10. Schema del funzionamento di un spettrometro di massa.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione per impatto con un fascio di elettroni, atomi, ioni o fotoni, oppure ad opera di una elevata differenza di potenziale, a seconda della tecnica di ionizzazione utilizzata. Alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (tecniche *hard*), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (tecniche *soft*).

Le tecniche di ionizzazione si dividono in base al tipo di sorgente (*source*) utilizzata.

L'analizzatore è quel settore dello spettrometro di massa in cui avviene la selezione degli ioni, formati nella camera di ionizzazione, sulla base del rapporto massa/carica (m/z). Gli analizzatori possono essere classificati in base al modo in cui effettuano la selezione ionica.

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato uno strumento ESI-TOF e in un caso uno strumento MALDI-TOF. La tecnica di ionizzazione ESI (*Electrospray Ionization*) (Siuzdak, 1994) utilizza un gas inerte (di solito azoto) per favorire un processo di nebulizzazione provocato da una forte differenza di potenziale applicata all'ago metallico dell'iniettore che genera goccioline cariche di soluzione (analita e solvente). Le due caratteristiche essenziali dell'ESI sono che la ionizzazione si verifica a pressione atmosferica e sulla specie molecolare si può depositare una carica multipla. Questo processo avviene in soluzione (acquosa e organica) che viene poi nebulizzata in una camera termostata, ad 80°C in genere, in cui è applicato un campo elettrico.

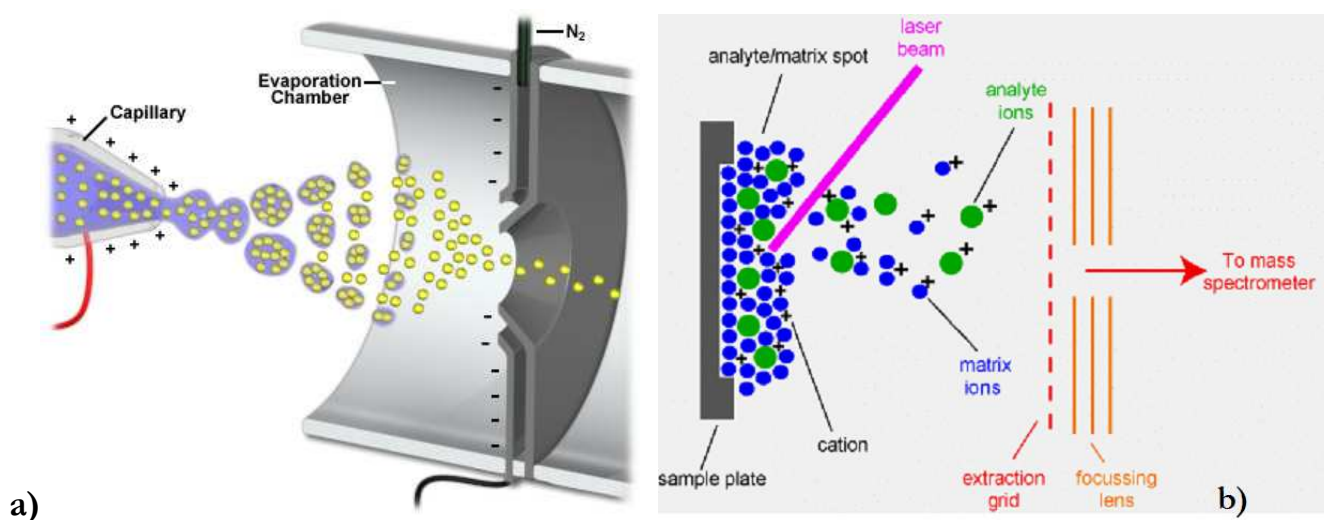


Figura 2.11. Rappresentazione schematica del processo di formazione del fascio di ioni che avviene in una sorgente ESI (a) e MALDI (b).

La nebulizzazione comporta la formazione di piccole goccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate (analita carico). Nella sorgente il gas fluisce a bassa velocità per facilitare l'evaporazione del solvente, questo permette di trattare anche composti termicamente labili. Man mano che il solvente

contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della crescente densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina “scoppia” creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore. Una caratteristica peculiare di questa tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di specie multicarica.

La tecnica di ionizzazione MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) (Beavis and Chait, 1990), può essere considerata l'evoluzione della tecnica FAB (*Fast Atom Bombardment*): il campione è immerso in un largo eccesso di matrice, come nella tecnica FAB, e bombardato da un fascio laser invece che da un fascio di atomi accelerati. L'energia del laser è sufficiente per formare ioni quasimolecolari MH^+ ma si possono anche formare *cluster* analita-matrice protonati o addotti con eventuali cationi presenti nella matrice. La ionizzazione del campione avviene nel seguente modo: il laser colpisce le molecole di matrice che, assorbendo la luce ultravioletta, passano ad uno stato eccitato e provocano un veloce riscaldamento della regione interessata; si ha quindi l'espulsione di aggregati di analita solvatato dalle molecole di matrice e una desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra le molecole di analita e della matrice). In genere questa tecnica di ionizzazione è associata ad un analizzatore TOF (*Time of Flight*).

L'analizzatore a tempo di volo (TOF), associato, si basa sul principio che ioni di differente valore m/z hanno uguale energia cinetica ma differente velocità dopo l'accelerazione subita all'uscita della camera di ionizzazione: ne consegue che il tempo che ciascuno ione impiega ad attraversare l'analizzatore è differente. In pratica, gli ioni provenienti dalla sorgente vengono accelerati da un forte campo elettrico e percorrono l'analizzatore, che ha la forma di un tubo in cui è fatto un alto vuoto ed in cui sono assenti sia campi elettrici che magnetici, in base alla velocità dovuta alla loro energia cinetica. Questo analizzatore riesce a misurare valori di massa anche estremamente elevati ed ha un'alta sensibilità.

La maggioranza dei rivelatori funzionano ad impatto elettronico o per cattura ionica. Entrambi i tipi richiedono una superficie che raccolga gli ioni e dove la carica venga neutralizzata. Si realizza quindi un trasferimento di elettroni ed un flusso di corrente ($TIC = Total Ion Current$) che può essere amplificato ed infine convertito in un segnale registrabile su carta o processabile da un computer.

Lo spettrometro “consegna” i risultati sotto forma di uno spettro di massa, cioè di una serie di picchi di intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore di m/z mentre sull'asse delle Y sono riportati i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. L'intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso, il cosiddetto picco base, cui si assegna arbitrariamente il valore di 100. Il potere risolutivo ($PR = m/\Delta m$), o risoluzione, dà una misura di quanto sensibile a differenze di massa è lo strumento utilizzato e dipende direttamente dalla massa del campione analizzato. La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici possiede diversi isotopi naturali di cui di solito il più leggero è anche il più abbondante: lo studio del *pattern* isotopico relativo ad un particolare

ione, nel caso la risoluzione dello strumento sia sufficientemente elevata da mostrarlo e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale degli isotopi di ogni elemento presente, è un altro strumento possibile per risalire alla formula molecolare di un composto incognito.

2.3.3 Analisi elettroforetica capillare

L'elettroforesi (*Capillary Electrophoresis*, CE) è una tecnica analitica che sfrutta le diverse velocità di migrazione di molecole cariche all'interno di un campo elettrico (Factor Affecting Capillary Electrophoresis Analysis, The Model 270 A (1990)).

L'elettroforesi capillare può essere impiegata per separare un'ampia gamma di composti biologici come amminoacidi, peptidi, proteine ed acidi nucleici, così come qualsiasi altro tipo di composto organico contenente gruppi ionizzabili e solubile in tampone acquoso.

La tecnica prevede l'utilizzo di un capillare in silice fusa, con un diametro interno tra 25 e 100 μm e contenente un tampone appropriato, le cui estremità pescano in due serbatoi separati, contenenti due elettrodi responsabili della generazione del campo elettrico. La CE presenta notevoli vantaggi rispetto all'elettroforesi tradizionale: l'uso di tubi capillari minimizza infatti i problemi derivanti dallo sviluppo di calore causato dal moto delle particelle cariche quando sono poste su un gel.

Il diametro ridotto del capillare fa in modo che sia molto alto il rapporto tra la superficie e il volume del capillare e ciò aumenta considerevolmente la dissipazione del calore con conseguente eliminazione sia dei moti convettivi all'interno del capillare che della dispersione dei campioni per effetto della diffusione. Non è quindi necessario includere all'interno del capillare un mezzo di supporto stabilizzante ed è così possibile fare l'elettroforesi in fase libera.

Alte efficienze di separazione sono ottenute utilizzando campi elettrici elevati; la lunghezza del capillare non influisce sull'efficienza del processo ma gioca un ruolo importante nel tempo di migrazione e, quindi, sulla durata dell'analisi. Comunemente si utilizzano potenziali compresi tra 15 e 30 kV con capillari di 50-100 cm di lunghezza.

Sperimentalmente si procede introducendo una piccola quantità di soluzione del campione (solitamente 5-30 nL contenenti poche femtomoli di prodotto) dall'estremità anodica di un capillare in silice fusa contenente un tampone adatto al composto che si vuole analizzare; i campioni analizzati nel presente lavoro di dottorato sono stati introdotti tramite iniezione sotto vuoto.

Per la separazione della miscela nei suoi componenti viene applicata una differenza di potenziale tra le due estremità del capillare per cui le molecole del campione, con carica positiva o negativa, cominciano a migrare con velocità differenti. La mobilità elettroforetica è funzione sia della carica che delle dimensioni delle particelle e quindi, dato che la carica dipende dal numero di gruppi ionizzabili presenti nella molecola e dal loro grado di ionizzazione, è legata al pH del tampone utilizzato. La differenza di

potenziale provoca, inoltre, il movimento delle molecole della soluzione tampone con carica positiva verso l'elettrodo di carica opposta. La differenza di potenziale ha quindi un doppio effetto sul moto dei componenti di una miscela: gli analiti sono separati in base alle diverse velocità di migrazione elettroforetica ed allo stesso tempo essi vengono spinti verso il catodo per il fenomeno dell'elettroendoosmosi del tampone. Essendo la velocità del flusso elettroendoosmotico molto maggiore della velocità di migrazione degli analiti, tutti gli ioni, indipendentemente dalla loro carica, si spostano verso il catodo. Le molecole con carica positiva raggiungono il catodo più velocemente perché la migrazione elettroforetica e il flusso elettroendoosmotico sono diretti verso la stessa direzione e, quindi, si sommano; le molecole neutre si muovono alla stessa velocità del flusso elettroendoosmotico, mentre gli ioni negativi si muovono più lentamente in quanto la migrazione elettroforetica e il flusso elettroendoosmotico sono diretti in direzioni opposte e, quindi, si sottraggono.

In vicinanza del catodo le molecole attraversano una finestra dove è situato un rivelatore costituito, nel presente lavoro di tesi, da uno spettrofotometro UV a lunghezza d'onda variabile.

In media una separazione impiega dai 10 ai 30 minuti.

2.4 STUDI CONFORMAZIONALI

2.4.1 Predizioni statistiche

Alcuni autori hanno elaborato dei metodi che, sulla base della sequenza amminoacidica, permettono delle predizioni sulla struttura conformazionale.

Tali approcci utilizzano i dati conformazionali di proteine ottenuti per cristallografia a raggi X o NMR. Il metodo di predizione della struttura secondaria più ampiamente usato è quello elaborato da Chou e Fasman (1978) (Fields et al., 1992; Chou and Fasman, 1974) che fa riferimento a dati cristallografici relativi alla struttura secondaria di proteine. Esso è basato sull'analisi statistica della frequenza con cui un residuo amminoacidico individuale è trovato in una specifica struttura secondaria (α -elica, turn oppure β -sheet), mediata con la frequenza totale con cui esso appare nelle sequenze proteiche.

Per ciascun residuo viene definito un valore numerico che indica la propensione conformazionale di quel dato amminoacido per una struttura secondaria specifica. Probabilità maggiori di 1 per una serie di residui contigui indicano la propensione per quel dato tratto di sequenza ad adottare un tipo particolare di struttura secondaria.

Attualmente non è possibile prevedere la struttura secondaria di una proteina dalla sola sequenza primaria. I metodi di previsione, in genere, hanno una accuratezza di circa il 70%, come testimonia la loro applicazione a proteine di struttura nota che non abbiano analoghi nella banca dati usata per generare le regole di predizione.

Si riscontra, inoltre, che strutture ad elica e turn sono previste con maggiore accuratezza rispetto alle strutture β .

2.4.2 Dicroismo circolare (CD)

Il CD può essere considerato un caso particolare di spettroscopia di assorbimento elettronico nella zona della radiazione UV-visibile e viene utilizzato ai fini dello studio delle conformazioni assunte dalle macromolecole in soluzione (Johnson, 1988).

Questa tecnica è legata alla proprietà delle molecole asimmetriche di interagire con la luce polarizzata.

La luce planarmente polarizzata si può scomporre in due componenti, polarizzata circolarmente sinistra (L) e destra (R), aventi la stessa lunghezza d'onda, fase e ampiezza ma opposto senso di rotazione.

Le due componenti attraversano un mezzo otticamente attivo con velocità v_L e v_R diverse, dovute ai differenti indici di rifrazione, n_L e n_R ; di conseguenza, uscendo sfasate, si verifica una rotazione del piano di polarizzazione, dando origine al fenomeno della rotazione ottica. Il potere rotatorio Φ misura l'angolo di rotazione del piano di polarizzazione della radiazione emergente rispetto a quello della radiazione incidente, secondo la relazione:

$$\Phi = 180 \times l \times [(n_L - n_R) / \lambda]$$

dove l è il cammino ottico e $n_L - n_R$ è la birifrangenza circolare.

La dispersione ottica rotatoria, ORD, è la variazione della rotazione ottica Φ in funzione della lunghezza d'onda λ , per effetto della birifrangenza circolare.

Assorbimenti A_L e A_R diversi (se presenti), relativi alle due componenti della luce piano polarizzata, escono da un mezzo otticamente attivo con diversa ampiezza: ciò è imputabile ai differenti coefficienti di estinzione molare, ϵ_L e ϵ_R . Ricombinate, le due componenti circolarmente polarizzate destra e sinistra danno luogo ad una radiazione polarizzata ellitticamente.

L'angolo la cui tangente è il rapporto fra l'asse minore (a) e quello maggiore (b) dell'ellisse è l'ellitticità θ :

$$\theta = \text{arctg} (a / b)$$

θ è legato alla differenza delle assorbanze A_L e A_R secondo la relazione:

$$\theta = 2.303 \times (180 / 4\pi) \times (A_L - A_R) = 33 \times \Delta A$$

Variando la lunghezza d'onda λ varia anche ΔA . Il dicroismo circolare studia quindi la variazione di ellitticità θ in funzione della lunghezza d'onda λ .

Per meglio confrontare campioni diversi per concentrazione e cammino ottico, è stata introdotta la seguente grandezza molare:

$$[\theta] = \theta / (C \times l) = 33 \times \Delta \epsilon$$

dove C è la concentrazione molare della soluzione contenente il campione. Tuttavia $[\theta]$ è tradizionalmente espresso in un sottomultiplo:

$$[\theta] = 3300 \times \Delta \epsilon$$

In particolare, per peptidi e proteine si parla di ellitticità molare per residuo:

$$[\theta]_R = [\theta] / (n^\circ \text{residui} - 1)$$

dove con $n^\circ \text{residui} - 1$ si intende il numero di cromofori presenti nella molecola in assenza di altri gruppi CD visibili, ovvero il numero di legami peptidici.

Perché un composto presenti attività chirottica, e sia quindi CD attivo, si devono verificare due condizioni:

- i. il composto deve possedere cromofori in grado di assorbire determinate λ ;
- ii. i cromofori devono essere chirali, o intrinsecamente (asimmetria configurazionale), o per induzione da centri asimmetrici vicini, o per asimmetria conformazionale (presenza di strutture elicoidali).

La spettroscopia CD è stata estensivamente applicata alla caratterizzazione strutturale di peptidi e proteine. Sia il gruppo peptidico che gli anelli aromatici dei residui Trp, Tyr e Phe sono cromofori planari simmetrici, e quindi achirali, che diventano otticamente attivi per induzione asimmetrica sia da parte dei carboni C_α di ciascun residuo, sia da parte della struttura secondaria chirale della catena polipeptidica. L'importanza della spettroscopia CD per studi conformazionali sta nel fatto che le proprietà ottiche rotatorie sono estremamente sensibili alla geometria molecolare: differenti conformazioni di catene polipeptidiche danno luogo a differenti modi di accoppiamento dei momenti di transizione dei gruppi cromofori presenti, con effetti vistosi sugli spettri CD.

La spettroscopia CD è largamente usata per la caratterizzazione strutturale di proteine e peptidi. Le applicazioni legate allo studio conformazionale sono generalmente di due tipi:

1. monitoraggio delle variazioni nel *folding*, che possono avvenire in seguito a transizioni monomero-oligomero; ad interazione con un substrato, a processi denaturanti o a variazioni di solvente, pH o temperatura, ecc.);

2. stima del contenuto di strutture secondarie.

Il metodo più diretto per analizzare lo spettro CD di una proteina in termini di struttura secondaria è quello di interpolarlo (*fitting*) con una combinazione di spettri CD di riferimento di strutture secondarie 'pure'.

Greenfield e Fasman (Greenfield and Fasman, 1969) furono i primi ad introdurre questa procedura; si basarono sugli spettri della poli(L-lisina) in soluzione acquosa in α -elica destrorsa (pH > 10.5 a T ambiente), in struttura β (o β -sheet, a pH > 10.5 e T \geq 50°C) e disordinata (*random-coil*, a pH < 10.5).

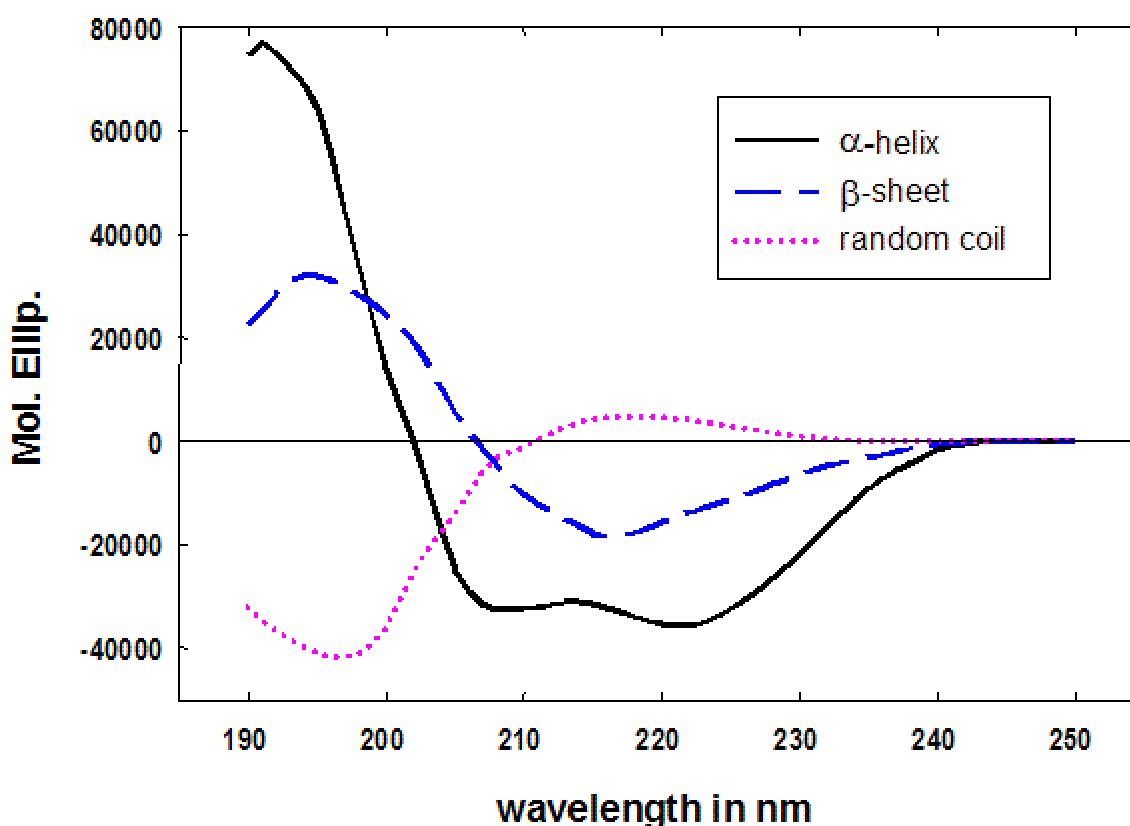


Figura 2.12. Spettri della poli(L-lisina) in soluzione acquosa in diverse condizioni: α -elica destrorsa, pH > 10.5 a T ambiente; β -sheet, pH > 10.5 e T \geq 50°C; *random-coil*, pH < 10.5.

Studi condotti su un gran numero di peptidi sintetici e naturali hanno consentito di definire degli spettri *standard* per tre importanti tipi di conformazione: α -elica, struttura β e *random-coil* (Greenfield, 1996; Fiori *et al.*, 1997; Perczel *et al.*, 1992).

Lo spettro relativo all' α -elica mostra una larga banda negativa intorno a 222 nm dovuta alla transizione $n \rightarrow \pi^*$, elettricamente proibita ma dotata di elevato momento magnetico, mentre la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ genera due bande di segno opposto: una negativa a 208 nm ed una positiva a 192 nm, polarizzate rispettivamente

parallelamente e perpendicolarmente all'asse dell'elica. La forma e l'intensità delle bande nello spettro di una sequenze in conformazione α -elicoidale sono influenzate in maniera trascurabile dal solvente e dalla natura degli amminoacidi che compongono il peptide tranne nel caso che siano presenti residui con catene laterali aromatiche (Chakrabartty *et al.*, 1993).

Lo spettro della struttura β antiparallela è caratterizzato da una sola banda negativa localizzata a 216-218 nm, dovuta alla transizione $n-\pi^*$, e da una banda positiva a 195 nm corrispondente alla transizione $\pi-\pi^*$.

Infine, lo spettro CD della struttura disordinata ha un andamento generale dominato da una banda negativa a circa 197 nm, dovuto alla transizione $\pi-\pi^*$, e da un secondo segnale molto debole intorno a 220 nm, che può avere sia segno negativo che positivo, dovuto alla transizione $n-\pi^*$.

Struttura secondaria	Segno della banda	Transizione	Posizione della banda	Intensità (deg cm ² dmol ⁻¹)
α -elica	+	$\pi-\pi^*$	192 nm	60,000 ÷ 80,000
	-	$\pi-\pi^*$	208 nm	-36,000 ± 3,000
	-	$n-\pi^*$	222 nm	-36,000 ± 3,000
β -sheet antiparallelo	+	$\pi-\pi^*$	195 nm	30,000 ÷ 50,000
	-	$n-\pi^*$	216 – 218 nm	-10,000 ÷ -20,000
<i>Random coil</i>	-	$\pi-\pi^*$	197 nm	-20,000
	+/-	$n-\pi^*$	220 nm	piccola
	(molto debole)			

Tabella 2.2. Valori di λ relativi ai massimi e minimi di ellitticità molare per α -elica, β -sheet antiparallelo e *random-coil*.

Più complessa risulta invece la definizione di curve tipiche per i vari tipi di β -turn (Perczel *et al.*, 1991; Perczel *et al.*, 1993; Hollosi *et al.*, 1994; Dettin *et al.*, 2001). Sembra comunque accertato che il β -turn di tipo I e di tipo III generalmente danno spettri CD tipici della classe C secondo la distinzione operata da Woody [Woody, 1968 - Woody R.W (1968): Improved calculation of the n-pi rotational strength in polypeptides. *J. Chem. Phys.* **49**: 4797-4806], che presenta spettri simili all' α -elica leggermente spostati verso il blu e con bande meno intense; spettri tipici relativi a β -turn di tipo I misurati in acqua o TFE mostrano una banda positiva a 186 nm e due bande negative a 205 e 216 nm. I β -turn di tipo II esibiscono invece spettri di classe B.

Classe	Segno della banda	Range di λ
A	-	210-220
	+	195-200
	-	<190
B	-	>220
	+	200-210
	-	<190
C	-	200-210
	+	180-195
D	-	>225
	+	210-220
	-	190-200
	+	<190

Tabella 2.3. Definizione delle classi degli spettri CD secondo Woody.

La spettroscopia CD può distinguere i β -turn di tipo I da quelli di tipo II solo se le loro popolazioni sono sufficientemente elevate e gli spettri di classe B e C (di Woody) non sono sovrapposti dai forti spettri CD di conformazioni periodiche estese (α -elica o β -sheet) o oscurati dal contributo chirale dei cromofori in catena laterale (ad esempio amminoacidi aromatici).

L'assegnazione delle bande CD deve essere comunque fatta con prudenza e possibilmente supportata da dati ottenuti con altre tecniche (IR, NMR, ecc.) in quanto:

- i. è noto che lo spettro CD dell' α -elica dipende dalla sua lunghezza;
- ii. la posizione esatta e l'intensità delle bande relative ed assolute dei β -sheet (in pratica solo antiparalleli) variano da caso a caso;
- iii. non è chiaro quali spettri CD debbano attribuirsi ai vari tipi di β -turn;
- iv. lo spettro del *random coil*, che è di solito utilizzato per rappresentare la parte dello spettro che corrisponde ai residui non assegnati a nessun'altra categoria strutturale, presenta una caratteristica banda negativa a 190-200 nm, ma quest'ultima varia notevolmente per intensità e la debole banda a più elevate lunghezze d'onda può variare addirittura nel segno (in realtà poi, i residui di una proteina che non si trovano in una delle tre conformazioni ordinate non sono sempre e comunque disordinati);
- v. si dovrebbe inoltre tener conto delle distorsioni nella geometria di α -elica e β -sheet e del contributo dei gruppi aromatici delle catene laterali anche nel lontano UV.

Le catene laterali aromatiche dei residui Phe, Tyr e Trp hanno bande di assorbimento sia nella zona del gruppo peptidico, sia nel vicino UV, nell'intervallo spettrale tra 230 e 300 nm. In questa stessa zona si ha pure un debole assorbimento dei ponti -S-S- della cisteina. I contributi predominanti all'assorbimento nel vicino UV sono dovuti ai residui Trp e Tyr, mentre l'assorbimento del residuo Phe, dovuto ad una transizione $\pi-\pi^*$ proibita per ragioni di simmetria, è molto debole. Gli spettri CD nel vicino UV sono estremamente sensibili all'intorno dei cromofori aromatici e alle loro interazioni con gruppi vicini e permettono quindi di studiare i dettagli di struttura di particolari zone di conformazione proteiche. Gli spettri dei residui Trp e Tyr sono pH dipendenti, e ciò è dovuto al fatto che protonazione e deprotonazione influiscono direttamente sul sistema coniugato dei due cromofori.

In Fig. 25 sono riportati gli spettri standard relativi alle seguenti strutture secondarie: α -elica, β -sheet antiparallelo, β -turn di tipo II e *random-coil*.

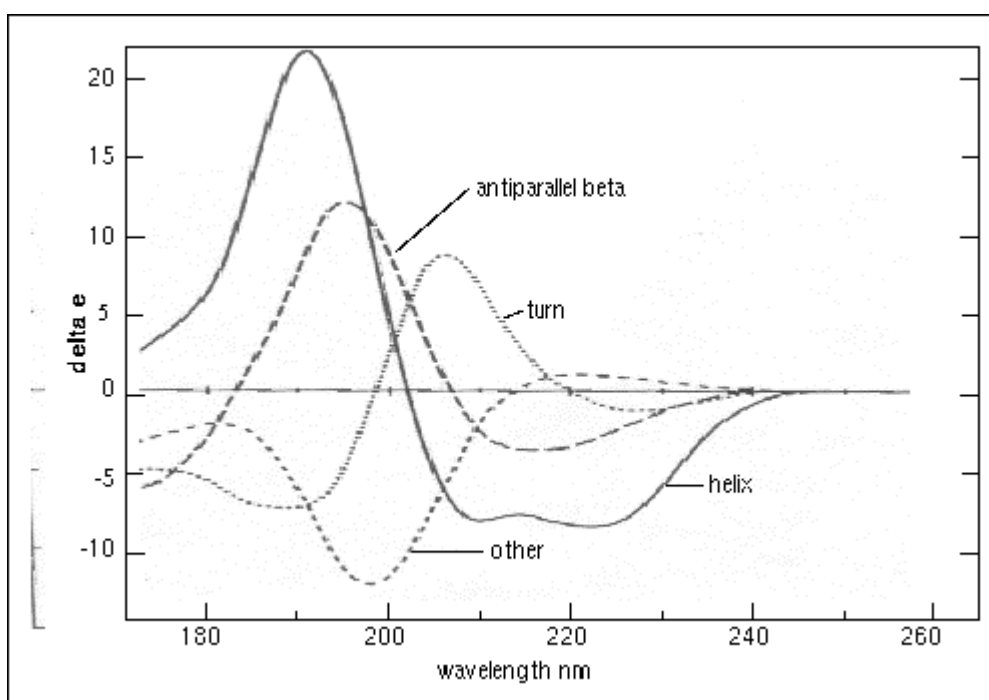


Figura 2.13. Spettri CD standard.

Per alcuni composti, gli spettri misurati durante le titolazioni si intersecano in un punto, che è chiamato punto isodicroico; l'esistenza di questo punto suggerisce l'esistenza di due strutture secondarie in equilibrio.

Le varie bande dicroiche sono caratterizzate non solo dalla posizione nello spettro ma anche dalla loro intensità; di conseguenza, tutti i metodi di analisi CD richiedono una conoscenza accurata del valore della concentrazione.

In generale, tutti i metodi per la stima del contenuto in struttura secondaria assumono che lo spettro di una proteina possa essere rappresentato da una combinazione lineare di spettri di elementi di struttura secondaria più un termine correttivo che include il contributo dei cromofori aromatici.

Questi metodi riescono a prevedere il contenuto in α -elica con una buona precisione ma variano molto nelle capacità di prevedere β -sheet e β -turn.

Sono oggi disponibili vari programmi per l'elaborazione dei dati CD, atti a prevedere il contenuto in α -elica, β -sheet, β -turn per un dato peptide.

Secondo Greenfield e Fasman (Greenfield *et al.*, 1969), è possibile valutare la percentuale di α -elica in un peptide o in una proteina utilizzando la seguente formula:

$$\% \alpha\text{-elica} = ([\theta]_{208} + 4000) / (-33000 + 4000)$$

dove $[\theta]_{208}$ è l'ellitticità molare misurata a 208 nm. Questa formula deriva dall'osservazione che i contributi di β -sheet e *random coil* sono entrambi piccoli ed uguali a questa lunghezza d'onda e corrispondono a circa -4 000 deg cm²/dmole mentre l' α -elica presenta un estremo a questo punto uguale a circa 33 000 deg cm²/dmole.

Molti sono i sistemi solvente impiegabili nell'analisi spettroscopica, oltre alle soluzioni acquose e a tamponi, di pratica comune, è l'uso di alcoli come il trifluoroetanolo (TFE) e l'esafuoro-isopropanolo (HFIP), per la loro capacità di promuovere strutture α -elicoidali. La rilevanza degli studi condotti in questi solventi, è legata al tentativo di riprodurre particolari ambienti e condizioni in cui una può trovarsi un peptide all'interno di un contesto proteico. Su questo argomento è incentrato un importante studio condotto da Waterhous and Johnson del 1994 (Waterhous and Johnson, 1994) in cui dimostrano che le sequenze peptidiche possono essere indotte in soluzioni di TFE e SDS (sodiododecilsolfato) a concentrazione non micellare, ad assumere riarrangiamenti, rispettivamente, ad α -elica o β -strand, confermando la rilevanza e la complessità di tali studi spettroscopici.

2.4.3 Risonanza magnetica nucleare in due dimensioni (NMR-2D)

La Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica analitica molto potente che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame. La risonanza magnetica nucleare è un fenomeno fisico basato sulle proprietà magnetiche quantomeccaniche dei nuclei degli atomi.

Non tutti i nuclei sono osservabili, solo quelli che avendo un numero dispari di protoni o neutroni possiedono un momento magnetico nucleare di spin. I nuclei maggiormente misurati sono l'idrogeno ^1H (l'isotopo più abbondante in natura) e il carbonio ^{13}C , comunque è possibile osservare anche i nuclei di molti altri elementi (^{15}N , ^{14}N , ^{19}F , ^{31}P , ^{17}O , ^{29}Si , ^{10}B , ^{11}B , ^{23}Na , ^{35}Cl , ^{195}Pt).

La tecnica NMR studia i nuclei magnetizzati, i quali immersi in un campo magnetico sono forzati ad allinearsi, questa disposizione viene perturbato per applicazione di una corrente elettrica alternata ortogonale al campo magnetico. La spettroscopia NMR e l'analisi di risonanza magnetica, analizzano appunto la risposta dei nuclei in questo campo magnetico perturbato, e osservando tale comportamento deducono ogni informazione sull'intorno chimico. Più potente è il campo applicato, maggiore è la risoluzione dello spettro, i cui parametri sono descritti dal *chemical shift* e dall'effetto Zeeman.

Le particelle elementari, neutroni e protoni, costituenti i nuclei atomici, sono dotati dell'intrinseca proprietà quanto-meccanica di spin (il cui valore è $1/2$), si comportano cioè, come se fossero in rotazione (spin) attorno al loro asse. Il valore totale di spin di un nucleo viene definito numero quantico di spin nucleare I . Se tale parametro è non-nullo, il nucleo è assimilabile ad una carica ruotante, quindi a un dipolo magnetico e come tale crea un campo magnetico e possiede un momento magnetico di spin nucleare μ , definito dalla seguente formula:

$$\mu = \gamma I (h / 2\pi)$$

dove γ è rapporto giromagnetico, il cui valore è una caratteristica del nucleo, e h è la costante di Plank. Il momento magnetico di spin nucleare è quantizzato, questo vuol dire che, sia l'intensità del momento angolare, che l'orientazione del momento angolare associato, sono quantizzati, cioè possono assumere solo un ristretto *range* di valori. Le possibili orientazioni che il nucleo può assumere in un campo magnetico sono governate dal numero quantico m che può assumere i valori da $-I$ a $+I$ e quindi può assumere $2I+1$ valori diversi. Nel caso di un nucleo con spin $1/2$ (come ^1H) ci sono 2 possibili orientazioni: $m = -1/2$ e $m = +1/2$.

Il momento magnetico nucleare m non rimane fermo, ma continua ad oscillare attorno alla direzione del campo magnetico applicato B_0 compiendo un moto di precessione simile a quello di una trottola. I due stati possibili del nucleo non hanno la stessa energia, ma lo stato con $m = +1/2$ (allineato con il campo) si trova ad energia leggermente più bassa di quello con $m = -1/2$ (opposto al campo) Il moto di precessione dei momenti magnetici nucleari avviene con una frequenza proporzionale alla differenza di energia tra i due livelli detta frequenza di Larmor data dalla formula:

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

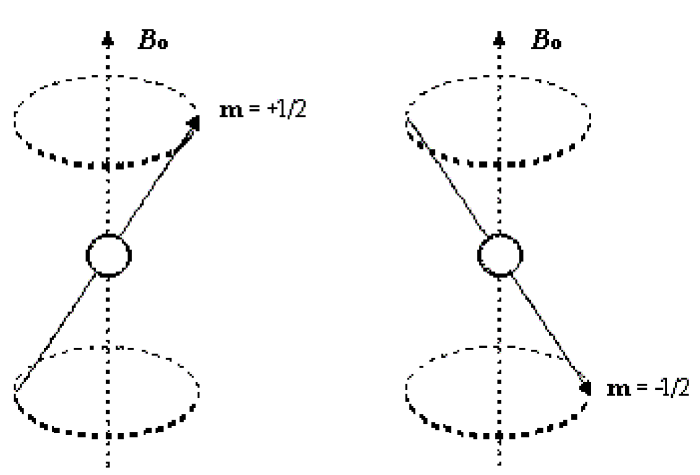


Figura 2.14. Il moto di precessione del momento magnetico nucleare di un nucleo con spin 1/2.

All'aumentare del campo applicato B_0 , aumenta la frequenza di Larmor e quindi aumenta la differenza di energia tra i due livelli. Poichè, però, la differenza di energia tra i due livelli è piccolissima, dell'ordine di $9 \cdot 10^{-6} \text{ kcal mol}^{-1}$, la popolazione di nuclei nei due stati è praticamente identica con una piccolissima prevalenza per lo stato a bassa energia allineato con il campo. Nel caso dei nuclei di idrogeno ^1H , a temperatura ambiente, in un campo magnetico di 1,41 Tesla ($\nu(^1\text{H}) = 60 \text{ MHz}$) abbiamo un nucleo in più nello stato di bassa energia ogni duecentomila nuclei, in un campo di 7,05 Tesla (300 MHz) abbiamo 5 nuclei in più nello stato di bassa energia ogni duecentomila nuclei.

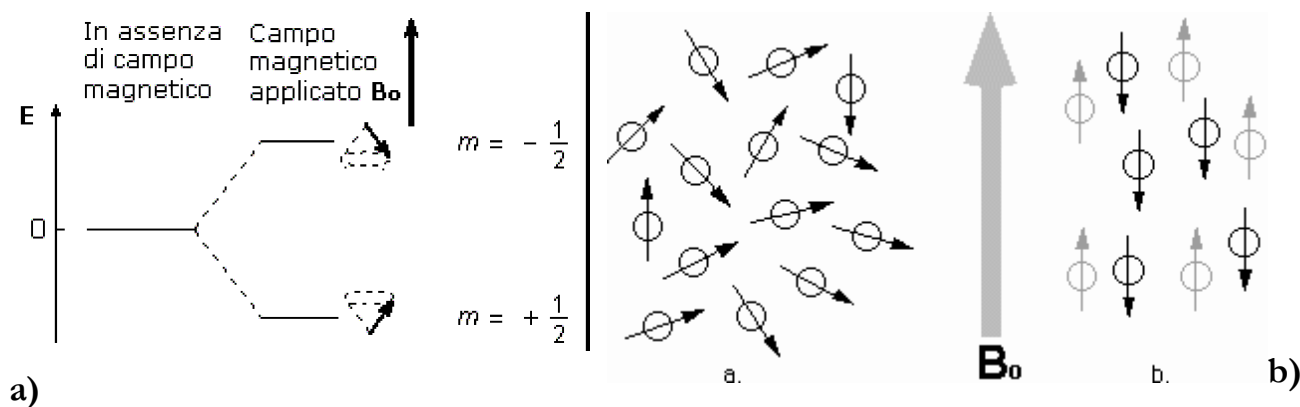


Figura 2.15. (a) stati energetici di un nucleo con spin $\frac{1}{2}$, immerso in un campo magnetico. (b) Comportamento dei nuclei sottoposti ad un campo magnetico.

Eppure sono proprio questi pochi nuclei in eccesso allineati con il campo magnetico B_0 quelli che permettono di generare il segnale NMR.

Se il campione viene irradiato con una radiazione elettromagnetica di frequenza uguale alla frequenza di Larmor, si ha un'interazione della componente magnetica della radiazione con i momenti magnetici nucleari (anche questi oscillanti alla frequenza di Larmor). L'energia della radiazione può così essere

trasferita ai nuclei. Ogni assorbimento di radiazione comporta un cambiamento di orientazione dello spin nucleare che ruota da allineato con il campo ad opposto al campo. Quando si verifica questa transizione di spin, si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata, da qui il nome di Risonanza Magnetica Nucleare, NMR. Anche nello stato di massima eccitazione, la popolazione dei nuclei nei due livelli permessi è circa uguale, data la piccolissima differenza di energia tra i livelli. Lo stato eccitato è solo leggermente più popolato di quello fondamentale.

Il segnale NMR negli strumenti moderni viene generato con il metodo ad impulso. Con questa tecnica tutti i nuclei di una specie vengono eccitati contemporaneamente da un impulso di radiofrequenza che contiene tutto l'intervallo di frequenze necessario. Dato che esiste un leggero eccesso di nuclei che si trovano allineati col campo magnetico B_0 , il vettore Magnetizzazione Macroscopica M_0 (la risultante di tutti i momenti magnetici nucleari) è piccolo e allineato col campo. Direzione che viene chiamata z .

Se il campione viene irradiato lungo l'asse x con un impulso di radiofrequenza che contiene anche la frequenza ω di Larmor dei nuclei in esame, questi assorbono energia e subiscono una transizione di spin. A livello macroscopico si osserva che il vettore Magnetizzazione Macroscopica M_0 ruota allontanandosi dall'asse z per avvicinarsi al piano xy iniziando un moto di precessione attorno all'asse z .

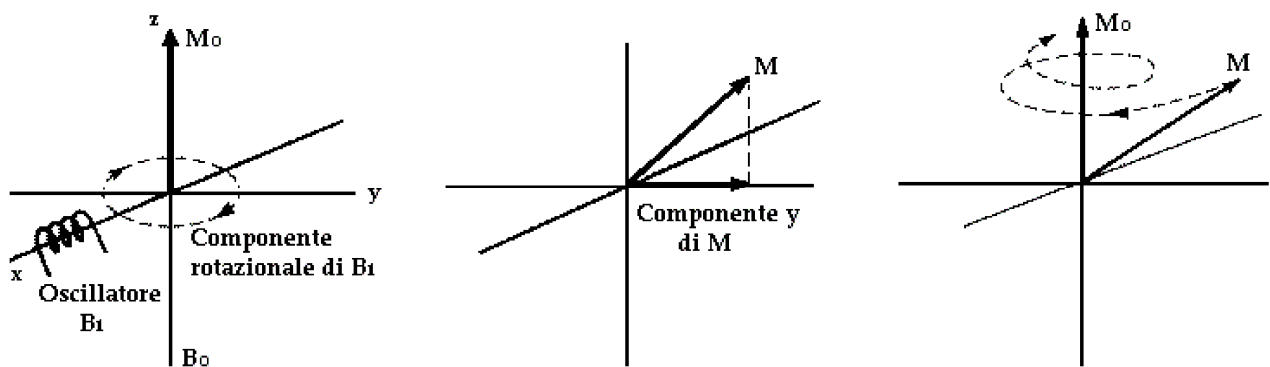


Figura 2.15. Movimento di M nei tre piani dello spazio.

A questo punto l'impulso di radiofrequenza cessa, ma i nuclei eccitati continuano ad emettere per qualche istante un debole segnale di radiofrequenza che si spegne nel tempo, una specie di eco del segnale assorbito. Per registrare questo segnale entra in funzione un circuito ricevente che ha lo scopo di misurare l'oscillazione della componente y del vettore M .

L'energia assorbita dai nuclei viene lentamente ceduta agli atomi vicini a causa di fenomeni detti di rilassamento e il vettore M , compiendo delle spirali di precessione attorno all'asse z , si riporta al valore

iniziale M_0 , posizione per la quale la componente M_y vale zero. La durata $t(i)$ dell'impulso di radiofrequenza deve essere determinata con precisione per produrre un forte segnale NMR. In genere $t(i)$ è di alcuni microsecondi.

Il segnale raccolto è un segnale oscillante con frequenza ν , la frequenza di Larmor del nucleo in esame, che si smorza nel tempo e che viene detto FID (*Free Induction Decay*), libero decadimento dell'induzione.

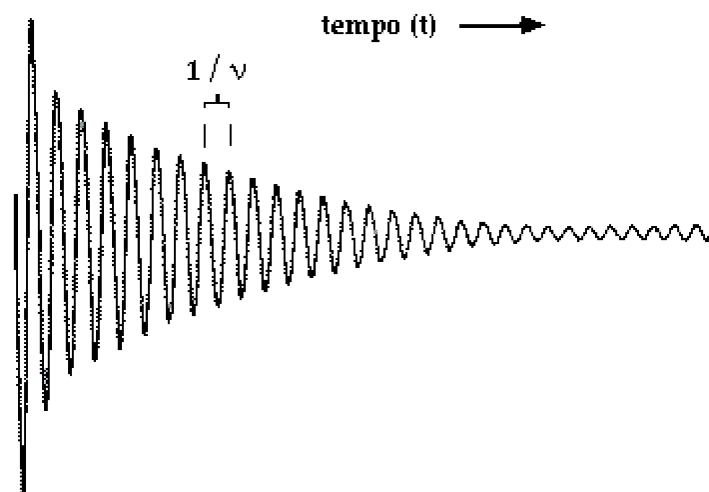


Figura 2.16. FID del CH₃I per l'atomo di idrogeno.

I campi magnetici sono generati da una corrente elettrica che gira nella spira di un superconduttore mantenuto alla temperatura dell'elio liquido (3 K). I superconduttori hanno una resistenza nulla per cui gli elettroni possono percorrere la spira liberamente, generando un campo magnetico perfettamente costante. Sul campione da analizzare viene inviato un impulso di radiofrequenza (pochi msec) che copre una banda di radiofrequenze abbastanza grande da permettere a tutti i nuclei di risuonare contemporaneamente. Terminato l'impulso, i nuclei tornano al loro stato originale (ripristino della popolazione di Boltzmann) disperdendo l'energia attraverso i meccanismi di rilassamento citati. Durante questo processo si genera un segnale modulato che viene raccolto per circa 1 sec ed inviato al rivelatore dello strumento. Il segnale registrato, FID, è rappresentato da un grafico che mette in relazione l'intensità del segnale in funzione del tempo. Questo segnale contiene tutte le informazioni sulle frequenze di risonanza. il grafico intensità del segnale vs. tempo, viene trasformato in un grafico intensità del segnale vs. frequenza, ossia nello spettro NMR.

A partire da un grafico in funzione del tempo $I_t = f(t)$, il FID, si può ottenere un nuovo grafico in funzione delle frequenze, chiamato spettro NMR, che mostra la frequenza assorbita dagli atomi durante rilassamento, attraverso un processo matematico detto trasformata di Fourier, FT. In realtà, nella scala

delle ascisse di uno spettro NMR non c'è mai né la frequenza di risonanza né il campo, ma la differenza espressa in ppm tra il campo (o la frequenza) a cui risuona l'atomo del campione in esame e quello a cui risuona l'atomo di una molecola campione (in genere, tetrametilsilano, TMS), che è preso come 0 della scala. Questa differenza si chiama *chemical shift* e si esprime in δ :

$$\delta = (\nu_x - \nu_{\text{TMS}}) / \nu_{\text{TMS}}$$

Con questa unità di misura il valore di risonanza di un nucleo è indipendente dal modo con cui si è ottenuto lo spettro (scansione di campo o di frequenza) e dal valore del campo applicato.

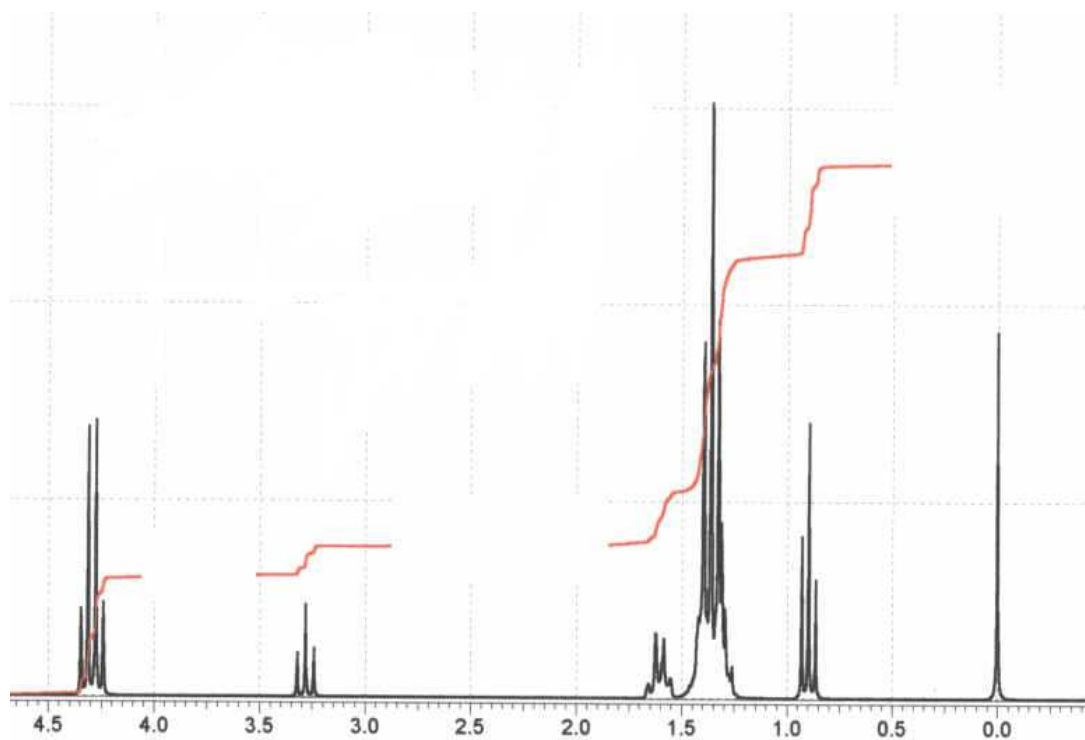


Figura 2.17. Esempio di spettro NMR

La spettroscopia NMR-2D è oggi una delle tecniche più utilizzate per lo studio conformazionale di peptidi e proteine in soluzione; essa è capace di fornire informazioni specifiche sui singoli residui della catena polipeptidica, quali distanze e relazioni geometriche tra nuclei e localizzazione di ponti a idrogeno intramolecolari, come pure sulle interazioni di sistemi polipeptidici con ioni e molecole piccole.

Gli spettri NMR-2D sono spettri in cui sia l'ascissa che l'ordinata sono assi di frequenze; un esperimento di questo tipo richiede due trasformate di Fourier ortogonali tra loro su due assi dei tempi indipendenti, per arrivare a due assi delle frequenze perpendicolari.

Un esperimento di NMR-2D classico (Fig. 26) è costituito dai seguenti periodi di tempo:

- i. preparazione: intervallo di tempo, lungo rispetto al tempo di rilassamento degli *spin* nucleari, durante il quale il sistema è riportato all'equilibrio termico;
- ii. evoluzione t_1 : intervallo di tempo successivo all'impulso, che viene progressivamente incrementato, durante il quale la magnetizzazione evolve per effetto del *chemical shift* e dell'accoppiamento scalare;
- iii. *mixing*: periodo di tempo, che consiste di uno o più impulsi separati da *delay* di tempo, che consente il trasferimento di magnetizzazione tra gli *spin*;
- iv. acquisizione t_2 : intervallo di tempo in cui la magnetizzazione osservabile viene rilevata e registrata sotto forma di FID (*Free Induction Decay*) che successivamente viene convertito, tramite la trasformata di Fourier (FT), da un segnale in funzione del tempo ad un segnale in funzione della frequenza.

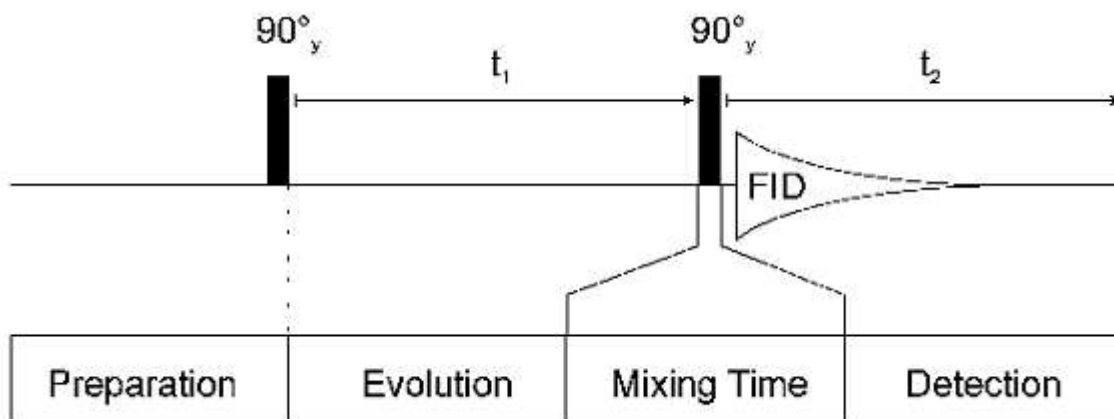


Figura 2.14. Periodi di tempo che caratterizzano un esperimento NMR-2D classico.

Gli esperimenti bidimensionali sono basati sull'accoppiamento tra nuclei. Questi accoppiamenti possono verificarsi tramite legami (accoppiamento scalare) o tramite lo spazio (accoppiamento dipolare). Se la correlazione si instaura tra nuclei uguali gli esperimenti NMR bidimensionali vengono classificati come omonucleari, se i nuclei sono diversi vengono detti eteronucleari.

Le principali tecniche che si basano su correlazioni omonucleari scalari sono: COSY e le tecniche derivate modificando la sequenza originale di impulsi, come ad esempio COSY45, che permette di ridurre l'intensità dei segnali in diagonale in modo da evitare che segnali di correlazione che cadono troppo vicino alla diagonale siano perturbati, COSY-DQF (*Double Quantum Filter*), che permette di eliminare i segnali come quelli dei solventi che sono singoletti, COSY LR (*Long Range*), in cui sono enfatizzati *coupling* piccoli come quelli allilici o quelli para in sistemi aromatici, ed infine TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), tecnica più sensibile del COSY e nella quale si ha il trasferimento di magnetizzazione a tutto il sistema di *spin*.

L'esperimento COSY (*CORrelation SpectroscopY*) (^1H - ^1H) consente, rispetto all'esperimento protonico monodimensionale, di individuare la sequenza degli accoppiamenti dei vari nuclei presenti in una molecola. Il risultato del COSY è un diagramma simmetrico. La proiezione dello spettro ^1H -NMR unidimensionale appare sulla diagonale (*diagonal signal*). I segnali di correlazione (o *cross-peak*) sono fuori diagonale ed indicano connettività tra protoni e protoni, ossia accoppiamenti vicinali, geminali e *long range*.

In una maniera simile lo spettro TOCSY mostrerà su una sola riga tutto l'intero sistema di *spin*.

Le tecniche che si basano sugli accoppiamenti omonucleari dipolari sono: NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) e ROESY (*Rotating-Frame NOE Spectroscopy*).

Il NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) è la variazione dell'intensità di un segnale I per saturazione di un nucleo S dipolarmente accoppiato ad esso.

Nell'accoppiamento dipolare si ha uno scambio incoerente di magnetizzazione tra due *spin* fisicamente vicini (processo di *cross-relaxation*) e quindi gli spettri NOESY e ROESY daranno informazioni sulle distanze tra nuclei vicini nello spazio. In una molecola organica, NOESY identificherà in modo peculiare protoni adiacenti (sullo stesso o su carboni adiacenti) e protoni che sono costretti alla vicinanza dalla geometria della molecola.

L'NMR è la tecnica più versatile nelle scienze fisiche e può essere utilizzata anche per determinare la struttura globale (*large-scale*) di oggetti, inclusa l'anatomia del corpo umano. Il principale vantaggio nell'utilizzo di questa tecnica per lo studio di bio-macromolecole è che non è necessario l'ottenimento di cristalli (cosa a volte molto difficile o impossibile), come per la spettroscopia ai raggi X, e quindi la molecola può essere studiata in soluzione, in condizioni fisiologiche. Inoltre, è possibile studiare interazioni molecolari in soluzione come ad esempio quelle tra un ligando ed il suo recettore.

Gli spettri mono e bi-dimensionali di risonanza magnetica nucleare sono stati acquisiti tramite uno spettrometro NMR del tipo Varian INOVA 500 operante alla frequenza protonica di 500 MHz e localizzato presso il Centro di Metodologie Chimico Fisiche dell'Università di Napoli "Federico II".

3. METODI

BIOLOGIA DELLE COLTURE CELLULARI

3.1. MODELLI DI STUDIO DELL'ANGIOGENESI

Protagonisti principali del fenomeno angiogenico, le cellule endoteliali, sono coinvolte in una sequenza di eventi, a partire dalla degradazione della ECM, che permette l'abbandono della loro posizione, e il movimento lungo la scia di chemoattrattori rilasciati dalle cellule circostanti. Nel contempo, il fronte migratorio di cellule endoteliali, viene attivato a proliferare per provvedere al numero necessario di "mattoni" per la creazione della parete di un nuovo vaso. Quest'ultima operazione richiede la riorganizzazione della componente cellulare in una struttura tubulare tridimensionale.

Ognuna di queste fasi: distruzione locale della matrice, chemiotassi cellulare, proliferazione e alterazioni della morfologia cellulare, possono costituire un bersaglio d'intervento e un aspetto d'indagine oggetto saggi sia *in vitro* che *in vivo*.

3.1.1. Modelli *in vitro*

I modelli *in vitro* si focalizzano principalmente sulla valutazione del comportamento proliferativo, migratorio e differenziativo delle cellule endoteliali in risposta ad agenti esterni. Questi modelli offrono il vantaggio di controllare le molteplici variabili che accompagnano i saggi (come le concentrazioni dei fattori angiogenici o il numero di cellule impiegate per il test), oltre alla possibilità di studiare uno stadio individuale del processo angiogenico con costi contenuti e minori difficoltà rispetto agli esperimenti *in vivo*.

Tuttavia, i saggi *in vitro* presentano anche delle limitazioni, prima fra tutte la natura stessa delle cellule endoteliali, le quali presentano differenze fenotipiche, soprattutto se si considerano quelle che rivestono il lume dei grandi vasi, il macrocircolo, come la vena del cordone ombelicale umano (HUVEC), e le cellule endoteliali appartenenti al microcircolo, ad esempio quelle che derivano dal derma (HuDMEC). A queste si devono aggiungere differenze strutturali (es. endoteli fenestrati rispetto a sinusoidali) e d'organo, poiché la risposta a fattori di crescita e sostanze inibitorie varia in rapporto al tessuto d'origine.

In coltura, le cellule endoteliali riacquistano la capacità di dividersi, uscendo dalla condizione di quiescenza in cui normalmente permangono gli endoteli *in vivo*. Le cellule proliferanti, una volta stabilitesi in coltura, subiscono però alterazioni del loro stato di attivazione, del cariotipo, dell'espressione di antigeni superficiali e nelle proprietà di crescita (Jackson and Nguyen, 1997).

Non si deve dimenticare che saggi condotti su colture di cellule endoteliali danno indicazioni riguardo un effetto diretto della sostanza o della condizione in esame; un riscontro negativo non necessariamente stabilisce con certezza l'assenza di un'attività angiogenica, a causa dell'incapacità del sistema di valutare gli effetti di tipo indiretto. Le cellule endoteliali, infatti, non sono le uniche coinvolte nell'angiogenesi, ma all'interno delle varie fasi del processo intervengono altri tipi cellulari, come le cellule di supporto (periciti, fibroblasti, cellule della muscolatura liscia), le cellule mesenchimali e le cellule circolanti del sangue. L'influenza di questo insieme di cellule sull'endotelio durante la creazione di nuovi vasi è difficile da valutare *in vitro*, rendendo indispensabile affiancare i risultati ottenuti da questi modelli a quelli derivanti da saggi *in vivo*.

Vitalità cellulare

Le prime indagini che vengono effettuate su una nuova sostanza solitamente cercano di stabilire se essa induce possibili alterazioni dei parametri di crescita cellulare (proliferazione, metabolismo) o l'insorgenza di un effetto tossico. I test di vitalità cellulare si dividono sostanzialmente in due grandi classi; quelle che determinano il numero totale di cellule nel campione e quelle che valutano la cinetica del ciclo cellulare. Del primo gruppo fanno parte: i) sistemi di conta cellulare (emocitometro, *Coulter Counter*); ii) metodi colorimetrici basati sulla capacità metabolica delle cellule di trasformare dei composti di sali di formazano (MTT, XTT, WST-1); iii) misurazioni di alterazioni nella sintesi del DNA, tramite quantificazione dell'incorporazione di precursori marcati del DNA (BrdU o timidina triziata), o di coloranti che legano l'acido deossiribonucleico. Metodi alternativi prevedono l'impiego di molecole che interagiscono col DNA e l'uso di strumentazioni come la citometria a flusso, per evidenziare variazioni nella distribuzione delle cellule in coltura nelle varie fasi del ciclo cellulare.

Nel caso in cui si rilevi un decremento del numero di cellule questo può essere determinato da un effetto citotossico piuttosto che citostatico, per tale motivo i risultati dei saggi di proliferazione devono essere affiancati da saggi di apoptosi o di necrosi.

Movimento cellulare

Il movimento delle cellule endoteliali è un processo chemotattico, avviene ciò lungo un gradiente di fattori angiogenici legati alla ECM. Il metodo maggiormente impiegato per valutare effetti sulla migrazione, ricorre alla camera di Boyden o ad una versione modificata dello stesso. Il saggio prevede che le cellule attraversino una superficie porosa per richiamo da parte di molecole poste nel comparto al di là del setto poroso. Alternativamente si può impiegare il test della cicatrizzazione, che esamina la capacità delle cellule endoteliali di riformare un monostrato confluyente dopo un danno (*scrape*) applicato alla coltura cellulare.

Morfogenesi *in vitro*

Seminando le cellule endoteliali su matrici costituite da componenti extracellulari, come fibrina, collagene o Matrigel, si verificano delle modificazioni morfologiche che mimano gli eventi differenziativi che si verificano nel processo angiogenico, con la formazione di una struttura a maglie simil-capillare.

3.1.2 Modelli *in vivo*

I classici saggi angiogenici, che vengono impiegati nello studio dell'attività modulatoria del processo di neovascolarizzazione da parte delle sostanze in esame, forniscono in genere un'informazione quantitativa circa il tipo di infiltrato vascolare che si è sviluppato dentro e/o attorno al materiale inoculato. Il test effettuato su membrana corioallantoidea di pollo (CAM test), per esempio, rappresenta forse la metodica d'esame più impiegata per valutare la capacità di un determinato impianto, posto all'interno della membrana di pollo, di stimolare lo sviluppo di una rete vascolare al suo interno (Ribatti *et al.*, 1996). Lo stesso principio sta alla base anche di altri saggi che prevedono, per esempio, l'inserimento sottocute di gel polimerici di componenti della matrice (*sponge* o Matrigel *plug*) contenente la sostanza di cui si vuole esaminare l'effetto sul modello animale (Plunkett and Hailey, 1990; Dellian *et al.*, 1996).

3.2 COLTURA DI CELLULE ENDOTELIALI

Le HUVEC sono state estratte dal cordone ombelicale umano attraverso digestione con Collagenasi IV, un enzima che distrugge la componente collagene del tessuto connettivo e che permette di disgregare i contatti fra le cellule. A seguito di ripetuti lavaggi, sia internamente che esternamente alla vena, con una soluzione tampone sodio-fosfato (PBS; Gibco-Invitrogen Corporation, Milano, Italia) addizionata con un 2-3% di antibiotico e di antimicotico (la formulazione contiene 10000 unità/mL di penicillina G, 10 mg/ml di streptomina solfato e 25 µg/ml di amfotericina B; Sigma Aldrich, Milano, Italia), in modo da eliminare eventuali coaguli di sangue, il cordone è stato incanalato per introdurre all'interno della vena una soluzione 0,1% di collagenasi IV in PBS (Sigma). Si è lasciato incubare con l'enzima per 15 minuti a 37° in atmosfera umidificata. Al termine del periodo di digestione, le cellule estratte sono state raccolte tramite lavaggio con 3-5 ml di terreno selettivo per cellule endoteliali MV₂ (terreno base) (PromoCell, Heidelberg, Germania). Questo terreno specifico è completato dall'aggiunta dei seguenti fattori:

Siero Fetale Bovino (FCS)	5%
<i>human Epidermal Growth Factor</i> (hEGF)	5.0 ng/ml
Idrocortisone (HC)	0.2 µg/ml
<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	0.5 ng/ml
<i>human basic Fibroblast Growth Factor</i> (hbFGF)	10 ng/ml
R3 IGF-1	20 ng/ml
Acido Ascorbico (AA)	1 µg/ml
Antibiotico/antimicotico	1%

Il terreno così composto è definito completo.

La sospensione cellulare isolata è stata centrifugata a 1500 giri/minuto per 5 minuti, il pellet risospeso nel terreno sopraindicato è stato seminato in una piastra Petri (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA) precedentemente condizionata con una soluzione di fibronectina (1 µg/cm²; BD) in PBS.

I saggi condotti sono stati effettuati impiegando cellule endoteliali provenienti da colture II o III.

3.2.1 Immunoseparazione

Dall'estrazione precedentemente descritta si può ottenere una coltura primaria contenente sia cellule endoteliali sia fibroblasti; quest'ultimi possono interferire con i saggi cellulari. Oltre alla identificazione visiva attraverso l'impiego del microscopio, le HUVEC possono essere individuate e separate da altre

cellule presenti in coltura attraverso il processo di immunoseparazione, una separazione immunomagnetica tramite biglie condizionate con anticorpo.

Condizionamento di biglie magnetiche con anticorpo CD31

Sono state impiegate biglie magnetiche di polistirene, dynabeads M-450 tosylactivated (Invitrogen), ricoperte con uno strato di poliuretano attivato da p-toluenesolfonilcloruro che fornisce gruppi reattivi per il legame covalente di proteine (per esempio anticorpi) o altri leganti contenenti gruppi solfidrici. In questo caso le biglie sono state condizionate con l'anticorpo anti-CD31 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), un anticorpo primario diretto contro un antigene di superficie specifico delle cellule endoteliali. La metodica per il condizionamento delle biglie prevede uno stadio di lavaggio delle biglie ed uno di trattamento delle stesse con l'anticorpo. Il primo passaggio è necessario per equilibrare le biglie nel buffer appropriato, preparandole in questo modo al condizionamento con l'anticorpo. Durante il secondo passaggio l'anticorpo è aggiunto alla soluzione delle biglie (4×10^8 biglie/ml di soluzione finale) in concentrazione $5 \mu\text{g}/10^7$ biglie; la soluzione è stata incubata per 24 ore a 37°C in continua blanda agitazione meccanica. Al termine le biglie condizionate sono state lavate con una soluzione 0.1% di BSA (*Bovine Serum Albumin*; Sigma) in PBS, e conservate alla temperatura di 4°C fino al momento dell'utilizzo.

Immunoseparazione

Le cellule, giunte a confluenza, sono state contate (mediante camera di Burker) e sospese in appropriato volume di PBS per ottenere una soluzione di 10^6 cellule/ml. Aggiunte alla sospensione le biglie condizionate con l'anticorpo (5 biglie/cellula), il tutto è stato incubato sotto agitazione a 4°C per 30 minuti; l'agitazione è essenziale per permettere il contatto tra cellule e biglie. Successivamente sono stati effettuati 4 lavaggi con medium di base, in modo da raccogliere le cellule che non avevano interagito con le biglie. Infine le cellule legate alle biglie sono state seminate in piastre Petri precedentemente condizionate con fibronectina.

3.3 SAGGIO DI ADESIONE CELLULARE

L'adesione cellulare gioca un ruolo fondamentale in moltissimi processi regolatori: dalla sopravvivenza alla crescita cellulare, dal differenziamento alla migrazione, dalla proliferazione alla rigenerazione. Inoltre risulta di cruciale importanza nella formazione e nel mantenimento dell'organizzazione cellulare all'interno dei tessuti e nei vari sistemi di comunicazione adottati dalle cellule.

Per valutare gli effetti delle molecole peptidiche sul processo adesivo, sono state impiegate piastre a 48 pozzetti *no-tissue culture* (BD Falcon), adatte per colture di cellule in sospensione, la cui superficie polistirenica non è stata trattata al fine di arricchire permanentemente il supporto di gruppi idrofilici e favorire così l'adesione e lo *spreading* cellulare. Ciascuno dei pozzetti è stato condizionato con una soluzione peptidica (2 mmol/cm²) in PBS, o solo tampone (controllo negativo) e lasciato 24 h a 37°. Al termine del pretrattamento la soluzione di condizionamento è stata eliminata, i pozzetti sono stati lavati con PBS e posti per 2 h a contatto con una soluzione 1mg/mL di BSA, a 37°, per bloccare i siti aspecifici di legame. Le cellule endoteliali (3x10⁴ cellule/cm²) sono state seminate in MV₂ base e si è lasciato che aderissero al supporto nelle normali condizioni di coltura per 3 h. Terminato il periodo di incubazione, le cellule che non hanno aderito sono state eliminate lavando i pozzetti accuratamente per 2 volte con tampone salino, mentre le cellule che si sono attaccate alla piastra, sono state fissate *overnight* con una soluzione al 4% di formalina (Sigma) in PBS. Il processo adesivo è stato quantificato contando per ogni pozzetto le cellule presenti in 3 campi scelti casualmente ad un ingrandimento x100.

Lo stesso saggio è stato eseguito seminando le HUVEC in terreno completo contenente o meno (controllo) i peptidi in studio (Tabella 3.1), su piastre *no-tissue culture*, non preconditionate. Anche in questo caso le cellule sono state incubate per 3h a 37°, e poi una volta eliminate quelle rimaste in sospensione, sono state fissate e contate (3 campi per ogni pozzetto, ingrandimento x100).

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come numero di cellule che hanno aderito al supporto. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

Sostanza		Concentrazione testata
Derivati dell'SDF-1	<u><i>SDF-1αT</i></u>	100 nM
	SDF-1 β T	100 nM
	SDF-1 β NC	100 nM
	Met-SDF-1 β NC	100 nM
Motivi di adesione	RGD	0.1 mM
	GRGDSPK	0.1 mM
	(GRGDSP) ₄ K	0.1 mM
	HVP	0.1 mM

Tabella 3.1. Peptidi impiegati nel saggio di adesione cellulare e relative concentrazioni usate in soluzione.

3.4 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE

Il saggio di vitalità cellulare è condotto verificando l'attività metabolica delle cellule in coltura attraverso un saggio colorimetrico che utilizza sali di tetrazolo, quali il 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolobromuro (MTT) e il 3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolo (MTS). Il test MTT sfrutta la riduzione del composto tetrazolico di colore giallo in cristalli viola di formazano, trasformazione indotta dalle deidrogenasi presenti nelle cellule vitali. I cristalli che si formano, insolubili in ambiente acquoso, vengono estratti dalle cellule con un solvente organico, il propanolo-2-acido (0,04 M HCl in propan-2-olo). La determinazione quantitativa avviene tramite lettura spettrofotometrica a 570 nm (Denizot and Lang, 1986; Wemme *et al.*, 1992).

Il *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega Italia, Milano Italia) sfrutta la ossido-riduzione del composto MTS in un formazano solubile in ambiente acquoso, ad opera sempre di deidrogenasi presenti nelle cellule attive metabolicamente. La quantificazione richiede la lettura spettrofotometrica del terreno di coltura a 490 nm (Barltrop *et al.*, 1991).

Le cellule sono state seminate ad una densità di 2×10^4 cellule/cm² in piastre da 96 pz in presenza di terreno MV₂ completo di fattori di crescita. Dopo 24 h è stato effettuato un lavaggio con PBS, per eliminare eventuali cellule morte e residui del terreno, e sono state aggiunte le sostanze peptidiche da testare, alle varie concentrazioni scelte (vedi tabella), disciolte in MV₂ base (volume finale 100 µl), privo di siero per evitare possibili fenomeni d'interazione con la componente proteica di quest'ultimo. In ogni esperimento sono state effettuate 6 repliche per ogni condizione. Come controllo si sono considerate le cellule non trattate in MV₂ base. Inoltre in 6 pz è stato posto solo MV₂ base per la lettura spettrofotometrica del *background*.

Sostanza		Concentrazione testata
Derivati della Tβ4	TYβ4-n	0.1 µM, 1.3 µM, 66 µM
	TYβ4-i	0.1 µM, 1.3 µM, 66 µM
	TYβ4-c	0.1 µM, 1.3 µM, 66 µM
Derivati dell'SDF-1	<i>SDF-1αT</i>	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1βT	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1βT Nal70	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1βT Nle72	5 nM, 10 nM, 100 nM

	SDF-1 β T D ^{Phe70} /N ^{Ile72}	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1 β NC	5 nM, 10 nM, 100 nM
	Met-SDF-1 β NC	5 nM, 10 nM, 100 nM
Motivi di adesione	RGD	0.025 mM, 0.1 mM
	GRGDSPK	0.025 mM, 0.1 mM
	(GRGDSP) ₄ K	0.025 mM, 0.1 mM
	MAP(RGDSP)	0.01 mM, 0.25 mM
	HVP	0.025 mM, 0.1 mM

Tabella 3.2. Peptidi impiegati nel saggio di vitalità cellulare e relative concentrazioni usate in soluzione.

Trascorse 20 h di incubazione a 37°C, nei pozzetti sono stati aggiunti 10 μ l di MTT (5 mg/ml in PBS; Sigma) o 20 μ l di *CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent* e si è atteso un periodo di altre 4 h affinché il composto venisse metabolizzato dalle cellule. I cristalli di formazano derivati dalla trasformazione dell'MTT sono stati solubilizzati con 50 μ l di isopropanolo acido e sotto blanda agitazione meccanica per 20 min al buio. La lettura dei valori di assorbanza è stata eseguita con Microplate autoreader EL 13 a 570 nm.

Nel caso invece del test MTS, la produzione di composti solubili nel terreno di coltura permette di valutare al termine del periodo di incubazione, direttamente la vitalità delle cellule tramite lettura spettrofotometrica a 490 nm.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo, a cui arbitrariamente è stato assegnato il valore 100%. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

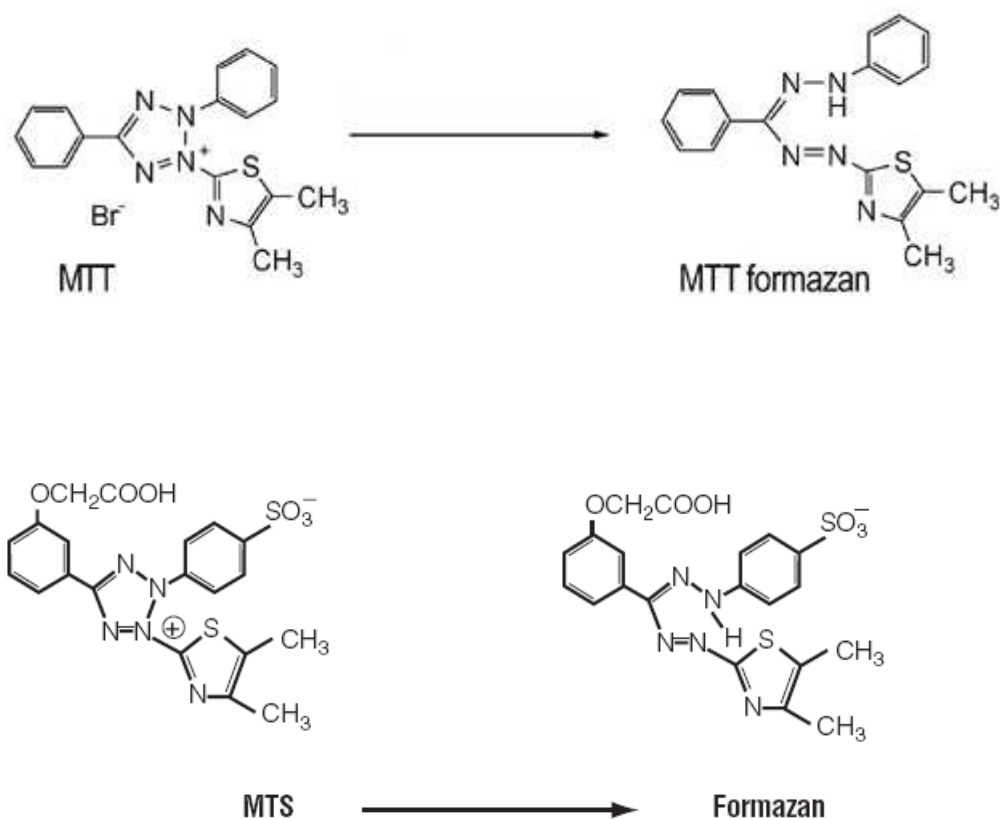


Figura 3.1 Reazione di conversione dei sali di tetrazolo, MTT e MTS nei corrispondenti formazani

3.5 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

Durante la proliferazione cellulare, il materiale genetico deve essere replicato per fornire una copia del genoma ad ogni cellula. Il monitoraggio del processo di sintesi del DNA risulta quindi un parametro indiretto di valutazione del grado di proliferazione di una coltura cellulare. Uno dei metodi tradizionalmente usati per la misura della mitosi è la marcatura del DNA delle cellule in divisione, con il precursore radioattivo timidina triziata (³H-timidina). Un successivo e importante sviluppo della metodica prevede l'utilizzo di analoghi di basi nucleotidiche contenenti atomi di alogeni, 5-bromo-2'-deossiridina (BrdU). Riconosciuto dalla polimerasi cellulari, la BrdU viene incorporata al posto della pirimidina nel DNA, e la sua presenza può essere rilevata in modo altamente specifico tramite saggio immunoenzimatico.

Le HUVEC sono state seminate su piastre a 96pz (2×10^4 cellule/cm²) in MV₂ completo e mantenute 24 h nelle normali condizioni di coltura. Il giorno seguente è stato eliminato il terreno, è stato fatto un

lavaggio con PBS e si sono incubate le cellule in 100 μL di terreno MV_2 base contenente o meno (controllo) i derivati peptidici della β -timosina, TY β 4-n, TY β 4-i e TY β 4-i alle concentrazioni 0.1 μM , 1.3 μM e 66 μM . Dopo 6 h, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 10 μL di *BrdU labeling Solution* (concentrazione finale 10 μM BrdU) e la piastra è stata nuovamente posta a 37°C in atmosfera umidificata per altre 18h. Al termine del periodo d'incubazione, la quantità di analogo nucleotidico incorporato è stata valutata mediante esecuzione del saggio colorimetrico *Cell Proliferation ELISA kit* (BrdU Assay, F. Hoffmann-La Roche Ltd Group, Basilea, Svizzera). Secondo le istruzioni riportate dalla ditta produttrice, il terreno è stato eliminato, le cellule sono state fissate e il DNA è stato denaturato per aggiunta di 200 μL di soluzione *Fixdenat*, incubando a temperatura ambiente per 30 min. La rottura dell'acido nucleico, è necessaria al fine di migliorare l'accessibilità dell'analogo incorporato dalle cellule alla rilevazione con anticorpo monoclonale diretto contro la BrdU e coniugato all'enzima perossidasi (anti-BrdU-POD). Dopo 90 min a temperatura ambiente, sotto blanda agitazione, i pozzetti sono stati lavati per tre volte con una soluzione tampone (Working Solution) per eliminare l'anticorpo in eccesso che non aveva reagito. L'immuno-complesso è stato rilevato tramite sviluppo di colore dato dall'attività enzimatica della POD, a seguito dell'incubazione con il substrato tetrametil-benzidina (TIMB). La reazione condotta temperatura ambiente per un tempo di 20 min, è stata bloccata per aggiunta di 25 μL di soluzione 1 M H_2SO_4 (Sigma). La lettura dell'assorbanza è stata eseguita a 690 nm con Microplate autoreader EL 13.

Per ogni peptide è stato inoltre valutata l'assenza di possibili interazioni con i componenti del kit.

I risultati, medie di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come percentuale di proliferazione cellulare rispetto al campione non trattato. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

3.6 DETERMINAZIONE DEL RILASCIO DELL'ENZIMA LATTATO DEIDROGENASI (LDH)

L'azione necrotica di alcuni peptidi è stata verificata mediante determinazione dell'enzima citoplasmatico LDH attraverso l'impiego del *Cytotoxicity Detection Kit* (LDH assay, Roche Diagnostic). Questo enzima si trova in forma stabile all'interno di tutte le cellule, ma viene rapidamente rilasciato nell'ambiente extracellulare in seguito ad un danno alla membrana plasmatica. Per quantificare tale enzima si effettua un saggio colorimetrico che sfrutta l'accoppiamento di due reazioni:

- i. riduzione del NAD^+ a NADH/H^+ in concomitanza alla conversione del lattato a piruvato catalizzata da LDH;

- ii. trasferimento, mediato dal catalizzatore, del H/H^+ dal $NADH/H^+$ al sale di tetrazolo (giallo) che viene in questo modo ridotto a formazano (rosso).

Un aumento del grado di morte cellulare o del numero di cellule con danni alla membrana plasmatica causa un aumento della quantità di LDH rilasciata; l'incremento dell'ammontare di enzima è correlato alla quantità di formazano formatosi in un certo periodo di tempo. Perciò l'entità dello sviluppo del colore, quantificata tramite assorbanza, è proporzionale al numero di cellule danneggiate.

Le cellule endoteliali sono state seminate su piastre a 96 pz (2×10^4 cell/cm²) e incubate per 24 h a 37°C in presenza di terreno completo. Successivamente, sono state lavate con PBS e incubate in MV₂ base contenente i peptidi per altre 24 h. Le sostanze peptidiche testate sono state solo quelle che avevano indotto una diminuzione significativa della vitalità cellulare.

Sostanza		Concentrazione testata
Derivati della Tβ4	TYβ4-n	1.3 μM
	TYβ4-i	1.3 μM
	TYβ4-c	1.3 μM
Motivi di adesione	RGD	0.1 mM
	GRGDSPK	0.1 mM
	(GRGDSP) ₄ K	0.1 mM
	HVP	0.1 mM

Tabella 3.3. Peptidi impiegati nel saggio LDH e relative concentrazioni usate in soluzione.

Le piastre sono state quindi centrifugate per 10 min a 300 rpm; 100 μl di surnatante sono stati trasferiti in una nuova piastra a 96 pz e in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 μl di miscela di reazione, preparata unendo la *Dye Solution* (contenente il cromoforo cloruro di iodotetrazolo e il sodio lattato) e il catalizzatore (soluzione di Diaforase/ NAD^+). La piastra è stata lasciata sotto blanda agitazione e al buio per 30 min; la reazione enzimatica è stata infine bloccata con 50 μl di HCl 1M (Carlo Erba Reagents, Milano Italia). La lettura dell'assorbanza è stata effettuata a 490 nm.

Per ogni saggio sono stati effettuati 5 tipi di controlli:

- i. MV₂ base con miscela di reazione, per quantificare il background;
- ii. cellule non trattate seminate in MV₂ base per misurare il normale rilascio di LDH;
- iii. cellule non trattate, lisate con una soluzione di Triton X-100 (Sigma) al 1% in MV₂ base, per misurare il massimo rilascio di LDH;

- iv. terreno contenente le stesse concentrazioni di peptidi impiegate nei pz con le cellule, per valutare possibili interazioni tra i campioni in esame e le sostanze componenti il Kit;
- v. soluzioni peptidiche in MV₂ base incubate con LDH (250 U/mL; Sigma) per 24 h, per verificare se i campioni fossero in grado di interferire direttamente con l'attività enzimatica della deidrogenasi.

I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto alle colture non trattate. L'analisi statistica dei dati, media di almeno 3 esperimenti, è stata effettuata con il t-test di Student

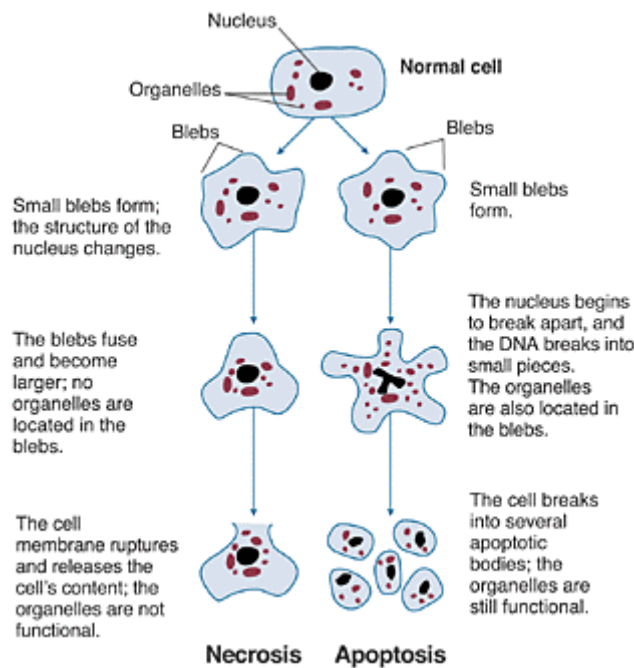


Figura 3.2. Il processo necrotico e apoptotico a confronto

3.7 DETERMINAZIONE DEL TASSO DI APOPTOSI

L'apoptosi o morte cellulare programmata, è un processo fisiologico che provvede al controllo omeostatico delle condizioni cellulari e del numero di cellule in un determinato tessuto; tuttavia, in determinate circostanze può essere innescata anche da condizioni patologiche. Questo suicidio fisiologico comporta una serie di caratteristiche alterazioni cellulari, quali: la riduzione delle dimensioni della cellula, la scomparsa di strutture specializzate di superficie e delle giunzioni intercellulari, la disgregazione della membrana plasmatica in vescicole (*blebbing*) e la degradazione della cromatina in mono- e oligo-nucleosomi, come risultato dell'attivazione di endonucleasi nucleari endogene Ca²⁺-Mg²⁺-dipendenti. I nucleosomi sono le unità fondamentali dell'arrangiamento/impacchettamento strutturale del genoma all'interno delle cellule, ognuno è formato da un ottamero istonico attorno cui si

avvolge il DNA. Queste unità sono tra loro legate da tratti di acido nucleico (*linker*) di varia lunghezza (5-100 bp), che data la maggior accessibilità risultano i siti preferenziali dell'azione delle varie endonucleasi. Nel presente lavoro, sono stati usati due diversi saggi per la determinazione del tasso di apoptosi: *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (TUNEL assay, Roche Diagnostic) e il *Cell Death detection ELISA^{plus} kit* (Roche Diagnostic). Il saggio TUNEL prevede l'utilizzo dell'enzima deossinucleotidiltransferasi terminale (TdT) che, dopo fissaggio e permeabilizzazione delle cellule apoptotiche, catalizza l'aggiunta di nucleotidi marcati con fluoresceina (fluorescein-dUTP) alle estremità 3'-OH libere in modo templato-indipendente, evidenziabili mediante fluorescenza.

Il saggio è stato condotto seminando le cellule in terreno MV₂ completo, ad una densità di 2 10⁴ cellule/cm², in chamber-slide (BD Falcon) da otto pozzetti, precedentemente condizionati con una soluzione di fibronectina (1 µg/cm²) e incubando per 24 h a 37°C. Dopo un lavaggio in PBS le HUVEC sono state esposte alle sostanze peptidiche sciolte in MV₂ base. Dopo un'incubazione di 24 h a 37°C, le cellule sono state lavate con PBS, fissate con paraformaldeide al 4% in PBS per 1 h a temperatura ambiente e permeabilizzate con una soluzione 0.1% Triton X-100 in 0.1% di sodio citrato per 2 minuti in ghiaccio. Dopo alcuni lavaggi in PBS, le cellule sono state asciugate all'aria e poste a contatto con 50 µl della miscela TUNEL (composta dall'enzima TdT e dalla fluorescein-dUTP) per 1h al buio, a 37°C e in atmosfera umidificata. Per eliminare l'eccesso di nucleotide marcato che non aveva reagito con il DNA frammentato, i pozzetti sono stati lavati tre volte con PBS. I vetrini sono stati quindi trattati con un montante acquoso contenente DAPI, un intercalante fluorescente nel blu, usato per la marcatura dei nuclei. Con un microscopio a fluorescenza sono stati osservati i nuclei apoptotici colorati di verde ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 515\text{-}565 \text{ nm}$) e i nuclei di tutte le cellule colorati in blu ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Utilizzando un obiettivo 40x, sono stati fotografati dieci campi random e sono state contate le cellule positive per i fluorocromi. Infine, dal rapporto cellule TUNEL-positive e numero di cellule totali 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI)-positive è stata determinata la percentuale di cellule apoptotiche. In ogni saggio sono stati introdotti due tipi di controllo:

- i. controllo negativo: costituito da cellule non trattate in MV₂ base per quantificare la percentuale di apoptosi spontanea;
- ii. controllo positivo: costituito da cellule trattate con DNasi I (3-3000 U/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mg/ml BSA; Sigma) per 10 min, prima di aggiungere la miscela Tunel, per indurre la frammentazione del DNA. Tale pozzetto serve a verificare la funzionalità del saggio rispetto ad un 100% di cellule apoptotiche.

Il *Cell Death detection* è invece un saggio ELISA colorimetrico, che permette di rilevare eventi degradativi internucleosomali del DNA genomico a seguito dell'attivazione di fenomeni apoptotici, impiegando tecniche immunochimiche.

Le cellule endoteliali (2×10^4 cellule/cm²) sono state seminate su piastre a 96 pz in terreno supplementato con fattori di crescita, e poste per 24h a 37° in atmosfera umidificata. Una volta eliminato il terreno e lavato i pozzetti con tampone fosfato, le HUVEC sono state incubate per 24h in presenza delle sostanze peptidiche, a 37°.

Sostanza		Concentrazione testata
Derivati della T β 4	TY β 4-n	1.3 μ M
	TY β 4-i	1.3 μ M
	TY β 4-c	1.3 μ M
Motivi di adesione	RGD	0.1 mM
	GRGDSPK	0.1 mM
	(GRGDSP) ₄ K	0.1 mM
	HVP	0.1 mM

Tabella 3.5. Peptidi impiegati nel saggio TUNEL e relative concentrazioni usate in soluzione.

Successivamente la piastra è stata centrifugata a 200 giri per 10 min, il surnatante è stato rimosso, le cellule sono state risospese nel *buffer* di lisi fornito col *kit*, e lasciate sotto blanda agitazione per 30 min a temperatura ambiente. Nuovamente la piastra è stata centrifugata nelle stesse condizioni riportate sopra, per separare i nuclei intatti delle cellule non apoptotiche dai frammenti cromatidici rilasciati dai corpi apoptotici, in seguito alla lisi delle membrane cellulari. Il surnatante (100 μ L di lisato) è stato trasferito nei pozzetti di una piastra preconditionata on Streptavidina. I campioni sono stati, a questo punto, incubati per 2 h con una mistura di due anticorpi monoclonali: uno diretto verso la componente istonica dei nucleosomi, e coniugato ad una molecola di Biotina (Anti-istone-Ac), e l'altro specifico per il DNA a singolo e doppio filamento, a sua volta coniugato con l'enzima perossidasi (Anti-DNA-POD). L'immuno-complesso che si forma è a sua volta immobilizzato alla pareti del pozzetto grazie all'interazione Streptavidina-Biotina, in modo che il materiale cellulare che non ha immunoreagito possa essere facilmente allontanato per lavaggio con una soluzione tampone (operazione ripetuta per 3 volte). I complessi trattenuti su piastra con legato l'enzima perossidasi, una volta incubati per 15 min col substrato 2',2'-azido-di-(3-tilbenzotiazidino solfato) (ABTS), comportano uno sviluppo di colore proporzionale al numero di nucleosomi catturati nel sandwich di anticorpi e che viene determinato tramite lettura dell'assorbanza a 405 nm.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come percentuale di apoptosi rispetto al controllo negativo. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con t-test di Student.

3.8 SAGGIO DI MORFOGENESI *IN VITRO*

Saggi *in vitro* hanno evidenziato che le cellule endoteliali sono in grado di aggregarsi per formare delle strutture simil-capillari mimando il processo di formazione dei capillari che si verifica *in vivo* (Folkman *et al.*, 1980; Maciag *et al.*, 1982; Madri *et al.*, 1983; Montesano *et al.*, 1983).

In alcuni studi è stato dimostrato che le HUVEC possono essere indotte a differenziare e a formare strutture tubulari dopo un periodo di 4-6 settimane se piastrate in assenza di agenti mitogeni (Maciag *et al.*, 1982). Tuttavia, questo evento può essere accelerato seminando le cellule su superfici condizionate con componenti proteiche della matrice extracellulare. In particolare, sostanze come la laminina o il collagene, oltre a promuovere l'adesione cellulare, sembrano stimolare anche la crescita, il differenziamento e la migrazione delle cellule endoteliali (Grant *et al.*, 1981; Hay *et al.*, 1981; Kleinman *et al.*, 1985). Sulla base di queste considerazioni è stato utilizzato, per il condizionamento delle piastre, il Matrigel, un estratto di lamina basale del sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm, ricco in proteine dell'ECM, quali: la laminina e il collagene IV stessi, l'entactina, gli HSGP e fattori di crescita come TGF-2, FGF-2, IGF-1 e IGF-2. Nella sperimentazione è stata utilizzata anche una variante di questo prodotto, il *Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix* (BD), caratterizzata da un minore contenuto di fattori di crescita e più adatta ad evidenziare possibili effetti di stimolazione. Il Matrigel a temperatura ambiente producendo una matrice biologicamente attiva simile a quella presente nei tessuti di mammifero. Si è dimostrato efficace nel promuovere i processi di adesione e differenziamento sia di cellule normali che trasformate, e fornisce un substrato ideale per studi di angiogenesi.

Ciascun pozzetto di una piastra da 24 pozzetti è stato condizionato con 50 µl di Matrigel normale o ridotto dei fattori di crescita, precedentemente scongelato *overnight* a 4°C in ghiaccio, con l'accortezza di utilizzare materiale (puntali, pipette, piastre) pre-raffreddato in freezer e che il supporto di plastica per la coltura cellulare rimanesse in ghiaccio durante tutta la procedura, per mantenere il prodotto allo stato liquido. La piastra è stata quindi incubata a 37°C per almeno un'ora per indurre la gelificazione della matrice glicoproteica. Nei pozzetti condizionati sono state seminate 4×10^4 cellule/cm² in 1 ml di terreno MV₂ base contenente l'1% di FCS e i peptidi da testare. A distanza di 18 h dall'inizio dell'incubazione a 37°C, dopo un lavaggio con PBS, le cellule sono state fissate con una soluzione (1ml/pz) al 2% di glutaraldeide in tampone sodio cacodilato 0.1 M (Albini *et al.*, 2004). Per ogni pozzetto sono stati fotografati 5 campi, seguendo uno schema a croce. Le immagini così ottenute sono state analizzate grazie all'impiego di un software misurando sia parametri dimensionali, come la

percentuale dell'area coperta dalle cellule e la lunghezza totale della rete formata dalle HUVEC per ogni campo, sia parametri topologici, quali il numero di maglie e di punti di ramificazione per campo.

I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come percentuali, attribuendo il valore di 100 alle colture di controllo non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

	Sostanza	Concentrazione testata
Derivati della Tβ4	TY β 4-n	0.1 μ M, 1.3 μ M, 66 μ M
	TY β 4-i	0.1 μ M, 1.3 μ M, 66 μ M
	TY β 4-c	0.1 μ M, 1.3 μ M, 66 μ M
Derivati dell'SDF-1	<i>SDF-1αT</i>	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1 β T	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1 β T Nal70	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1 β T Nle72	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1 β T DPh70/Nle72	5 nM, 10 nM, 100 nM
	SDF-1 β NC	5 nM, 10 nM, 100 nM
	Met-SDF-1 β NC	5 nM, 10 nM, 100 nM
Motivi di adesione	RGD	0.025 mM, 0.1 mM
	GRGDSPK	0.025 mM, 0.1 mM
	(GRGDSP) ₄ K	0.025 mM, 0.1 mM
	MAP(RGDSP)	0.01 mM, 0.25 mM
	HVP	0.025 mM, 0.1 mM

Tabella 3.6. Peptidi impiegati nel saggio di morfogenesi *in vitro* e relative concentrazioni usate in soluzione.

3.9 INIBITORI DELLE VIE DI SEGNALE INTRACELLULARE

Le varie fasi che caratterizzano l'angiogenesi, quali proliferazione, adesione e migrazione, possono essere stimulate da vari tipi di fattori, ognuno dei quali agisce a livello cellulare attivando una o più cascate intracellulari caratterizzate da una sequenza di eventi catalizzati da sistemi multi-enzimatici e mediati da piccole molecole segnale presenti nel citosol.

L'impiego di inibitori delle varie molecole attive nei *pathway* di trasduzione del segnale si è dimostrato un promettente metodo per l'identificazione dei substrati fisiologici di molti enzimi, ha permesso di chiarire il ruolo delle cascate del segnale in precisi fenomeni biologici e favorisce lo studio dei meccanismi molecolari tramite cui fattori di crescita, citochine, ormoni e sostanze esogene esplicano la loro azione a livello cellulare.

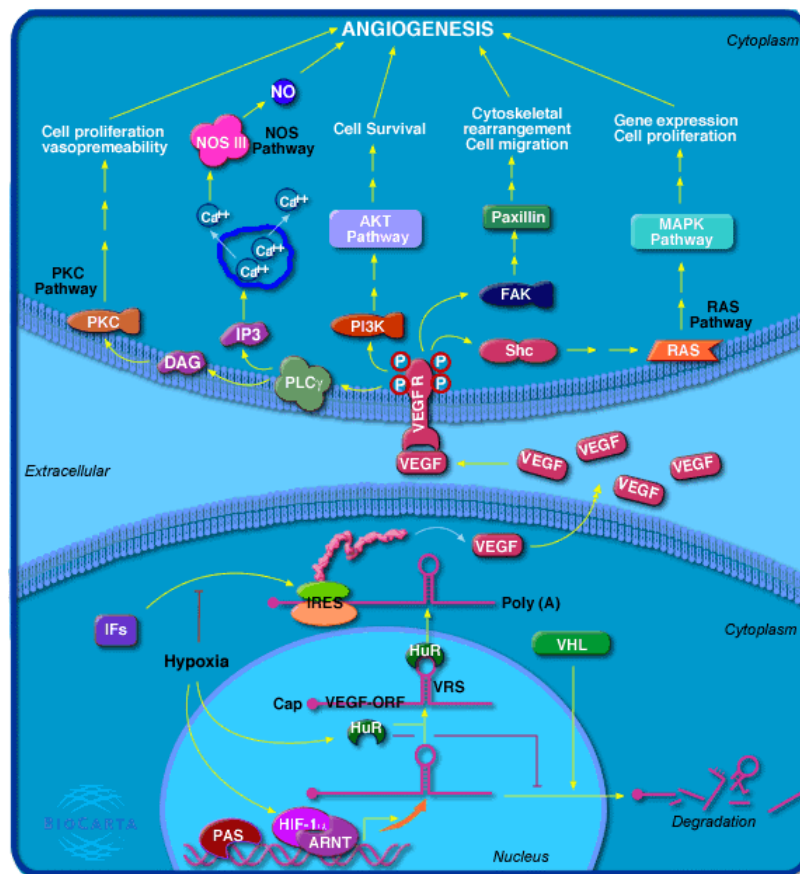
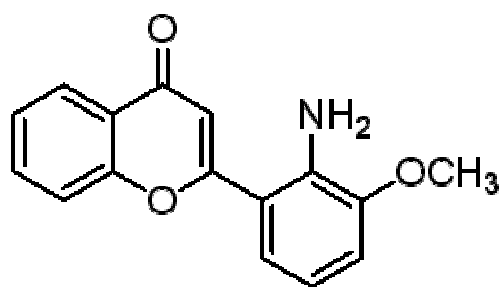


Figura 3.3. Cascate del segnale attivate durante il processo angiogenico.

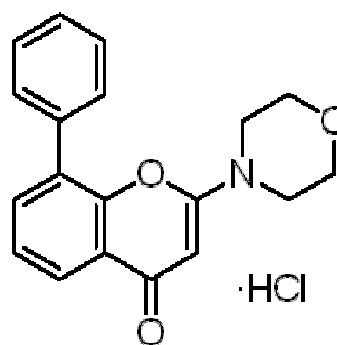
Con il fine di individuare le specifiche vie di segnale attivate dai peptidi che hanno comportato un aumento della vitalità e dei fenomeni morfogenici, sono stati utilizzati i seguenti inibitori:

- i. **PD98059** (2-(2-Ammino-3-metossifenil)-4H-1-benzopiran-4-one; Sigma): inibitore permeabile alle membrane cellulari, selettivo per la cascata MAPK/ERK-1/MEK, in particolare blocca l'attivazione della Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK-1) prevenendo la variazione conformazionale richiesta per l'attivazione dell'enzima stesso, e conseguentemente sopprime l'intera cascata della MAPK. L'impiego di questo inibitore prevede un pretrattamento delle cellule con lo stesso per 60 minuti (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1998);
- ii. **LY294002** (2-(4-Morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-one; Sigma): inibitore permeabile alle membrane cellulari specifico per PI-3K, e che non interferisce con l'azione di altre chinasi (Vlahos *et al.*, 1994). Questo inibitore è stato impiegato effettuando un pretrattamento delle cellule con lo stesso per 45 minuti;
- iii. **Wortmannin** (is-(1a,6ba,9ab,11a,11bb)]-11-(Acetilossi)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-octaidro-1-(metossimetil)-7,9,a,11b-dimetil-3-furo(4,3,2-de)indeno[4,5,-h]-2-benzopiran-3,6,9-trione; Sigma): metabolita fungino inibitore selettivo di PI-3K a basse concentrazioni, mentre aumentando la quantità di inibitore in soluzione si possono bloccare anche altre varietà di chinasi intracellulari (Powis *et al.*, 1994). Il pretrattamento delle cellule con questo inibitore è stato effettuato per un tempo pari a 30 minuti;
- iv. **U-73122** (1-[6-(((17 β)-3-Metossiestra-1,3,5[10]-trien-17-il)ammino)esil]-1H-pirrol-2,5-dione; Sigma): inibitore delle fosfolipasi C e A₂ (rispettivamente PLC e PLA₂), comporta la mancata idrolisi del fosfatidilinositolo (PPI) in inositolo-3-fosfato (IP₃), secondo messaggero intracellulare, e la diminuzione della concentrazione di Ca²⁺ libero nel citosolo. Inoltre blocca l'interazione tra la proteina G e la PLC, mentre sembra non interferire con la produzione del cAMP (Yule and Williams, 1992). L'azione inibitoria si manifesta a seguito di un pretrattamento delle colture endoteliali di 30 min;
- v. **Rp-cAMP** (Rp-diastereoisomero del 3',5' adenosina monofosfato ciclico; Sigma): inibitore specifico dell'attivazione della protein chinasi cAMP-dipendente di tipo I e II mediata dal secondo messaggero cAMP. L'interazione con le PKA intracellulari si ottiene trattando le cellule endoteliali per 20 min (Rothermel *et al.*, 1984);
- vi. **Ro 31-8220** (sale di 2-{1-[3-(Amidinotio)propil]-1H-indol-3-il}-3-(1-metilindol-3-yl)maleimmide metansulfonato; Sigma): molecola in grado di agire su più bersagli, con selettività dipendente dalla concentrazione utilizzata. Inibisce a bassi dosaggi (1 μ M) la protein chinasi C (PKC), e a concentrazioni superiori blocca l'attività del recettore chinasi tipo 5 accoppiato a proteine-G (GPK-5) e la *MAP kinase-activated protein kinase* (MAPKAP chinasi)-

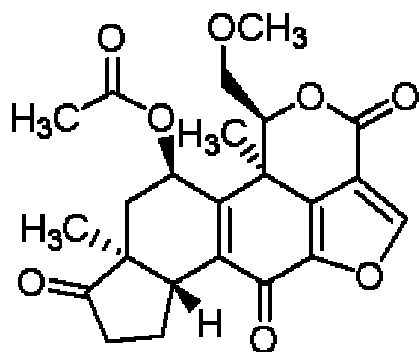
1beta (*Rsk-2*) and *p70 S6 kinase* (Alessi, 1997). Il trattamento con l'inibitore richiede un'incubazione di 45 min.



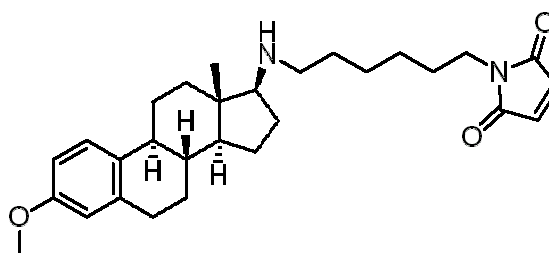
I. PD98059



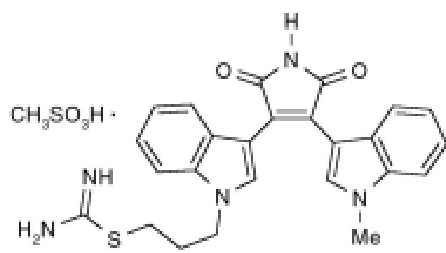
LY294002



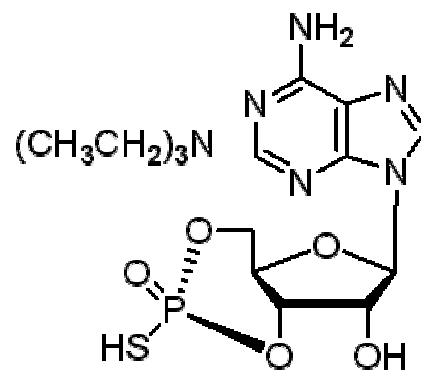
Wortmannin



U-73122



Ro 31-8220



Rp-cAMP

Figura 3.4. Struttura degli inibitori delle vie di segnale.

3.9.1 Saggio di vitalità con inibitori

Il saggio di vitalità cellulare è stato effettuato come descritto nel punto precedente. In alcuni esperimenti le colture sono state trattate con i soli inibitori a varie concentrazioni per stabilire la concentrazione non tossica, da impiegare nei successivi saggi coi peptidi.

Sostanza	Concentrazione testata	Tempo di incubazione
PD98059	5 μ M, 10 μ M, 20 μ M	60 min
LY294002	5 μ M, 10 μ M, 50 μ M	45 min
Wortmannin	0.025 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M	30 min
U-73122	1 μ M, 5 μ M, 10 μ M	30 min
Ro 31-8220	1 μ M, 3 μ M, 5 μ M	45 min
Rp-cAMP	10 μ M, 50 μ M, 100 μ M	20 min

Tabella 3.7. Inibitori delle vie di segnale impiegati nel saggio di vitalità cellulare, relative concentrazioni usate in soluzione e tempi di incubazione delle colture.

Le colture dopo 24 h dalla semina, sono state trattate con 5 μ M PD98059, 5 μ M LY294002, 0.025 μ M Wortmannin, 1 μ M U-73122, 1 μ M Ro 31-8220 e 50 μ M Rp-cAMP, per periodo variabile da 15 a 60 min in base al tipo di sostanza utilizzata (tabella 3.6). Al termine del pretrattamento, eliminato l'inibitore, le HUVEC sono state incubate con i peptidi SDF-1 α T (5 nM) o SDF-1 β T (5nM e 10 nM), o il solo terreno base (controllo). Trascorse 20 h nei pozzetti è stato aggiunto il sale di tetrazolo MTS; e si è lasciato la piastra a 37°C per altre 4 h, come precedentemente descritto nel punto 3.2.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono espressi come percentuale rispetto alle colture di controllo o a quelle trattate con solo l'inibitore. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata impiegando il t-test di Student

3.10 SAGGIO *IN VIVO* SU MEMBRANA CORIOALLANTOIDEA (CAM TEST)

La membrana corioallantoidea è una struttura extrauterina altamente vascolarizzata che delimita internamente il guscio delle uova di uccelli e rettili, mentre in molti mammiferi è identificabile con la placenta. Si forma dalla fusione tra la membrana allantoidea e il corion dopo quattro giorni dall'avvenuta fertilizzazione dell'uovo. Mentre l'allantoide è una componente extraembrionale di

derivazione mesodermica, in cui già a partire dal terzo giorno inizia a prendere forma una rete vascolare primitiva, il corion è invece un epitelio di origine ectodermica (Romanoff, 1960)

Il primo abozzo vascolare continua a proliferare e a differenziare fino ad originare un sistema capillare arteriovenoso che dall'allantoide si estende fino alla zona subito al di sotto del corion, e in questo modo media gli scambi gassosi con l'ambiente esterno. Il rapido sviluppo capillare cessa al giorno 11°, con arresto e decremento della proliferazione delle cellule endoteliali, per lasciar posto a fenomeni di maturazione e arrangiamento dell'apparato vascolare, che terminano poco prima (18°giorno) della schiusa dell'uovo (Ausprunk *et al.*, 1974).

Il test è stato condotto presso il laboratorio del Prof. Ribatti, Facoltà di Anatomia Umana, Istologia ed Embriologia; Dip. Di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana, dell'Università di Bari.

Uova di pollo *White Leghorn*, fertilizzate secondo il metodo Hamburger e Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1951) sono state poste in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata. Dopo 3 giorni con una siringa senza ago, a livello dell'estremità più appuntita dell'uovo, si è aspirato un volume di 2-3 mL di albume, in modo da favorire il distacco della membrana corioallantoidea dal guscio. Una porzione di quest'ultimo è stata rimossa con l'aiuto di forbici a creare un'apertura da cui fosse visibile la CAM. La finestra è stata poi chiusa con un vetrino e il tutto è stato riposto nuovamente in incubatore. All'8° giorno, sulla superficie esposta della membrana, sono state impiantate delle spugne sterili di gelatina di circa 1mm³, con adsorbite le sostanza da testare, disciolte in 1 µL di PBS (Ribatti *et al.*, 2006).

	Sostanza	Concentrazione testata
Derivati della Tβ4	TYβ4-n	50 µM
	TYβ4-i	50 µM
	TYβ4-c	50 µM
Derivati dell'SDF-1	<i><u>SDF-1αT</u></i>	10 mM
	SDF-1βT	10 mM
	SDF-1β NC	10 mM
Motivi di adesione	RGD	1 mM
	(GRGDSP) ₄ K	1 mM

	HVP	1 mM
Citochina pro-angiogenica	FGF-2	200 ng/embrione

Tabella 3.8. Peptidi e fattori pro-angiogenici impiegati nel saggio di morfogenesi *in vivo* e relative concentrazioni.

4. PEPTIDI PRO-ANGIOGENICI

TIMOSINA β 4

Le Timosine costituiscono una famiglia di piccoli polipeptidi coinvolta principalmente nella maturazione delle cellule T e delle plasmacellule in linfociti B. Furono identificate per la prima volta nel 1966 da AL Goldstein and A White (Goldstein *et al.*, 1966), e suddivise in tre gruppi a seconda del loro punto isoelettrico: alfa, beta e gamma-timosine.

La componente citoscheletrica di actina risulta essenziale per il corretto funzionamento dei fondamentali processi eucariotici, come il mantenimento della forma cellulare, l'organizzazione dei componenti citoplasmatici, il movimento e la divisione cellulare. All'interno delle cellule l'actina è presente in due forme, monomerica e polimerica, in costante equilibrio dinamico, grazie all'azione di proteine leganti l'actina (ABP) che regolano la transizione monomero-polimero interagendo con una delle due strutture. I membri del gruppo delle timosine- β sono i principali regolatori dello stato monomero dell'actina (G-actina): permettono il mantenimento del *pool* citoplasmatico richiesto per l'allungamento dei filamenti e rendono conto dei flussi dei monomeri tra la componente legata alle stesse ABP e immobilizzata come F-actina. Il membro più abbondante di tale famiglia dalla sequenza altamente conservata, è la timosina- β 4 (Dedova *et al.*, 2006). Questa proteina è considerata la principale ABP nelle cellule di mammifero, lega ad alta affinità l'actina-Mg-ATP (Carlier *et al.*, 1993), in rapporto stechiometrico 1:1 (Lodish *et al.*, 2000). T β 4 è presente nei tessuti e nelle cellule circolanti, ma è assente nei globuli rossi (Huff *et al.*, 2001); a livello cellulare è localizzata sia nel citosol che nel nucleo (Huff *et al.*, 2004). Il livello d'espressione varia in funzione del ciclo cellulare, aumentando in corrispondenza della transizione G₀/G₁ e durante la fase S (Schöbitz *et al.*, 1991). Sebbene non presenti una sequenza segnale di secrezione, in caso di fenomeni coagulativi o angiogenici, la concentrazione sierica e tissutale a livello locale aumenta. Questa forma extracellulare si pensa contribuisca alle funzioni biologiche (Huff *et al.*, 2002) tramite un meccanismo mediato da un recettore, ancora incognito, presente a livello della membrana cellulare, che alcuni identificano nell'actina di superficie.

Studi NMR in soluzione acquosa, hanno evidenziato come la timosina β 4 si presenti notevolmente destrutturata e flessibile; solo in seguito all'instaurarsi del *binding* con la molecola citoscheletrica, viene

indotto un *folding* α -elicoidale nei tratti ammino- e carbossi-terminale (Zarbock *et al.*, 1990; Domanski *et al.*, 2004). Peculiarità della T β_4 è appunto quella di assumere una determinata conformazione in seguito all'instaurarsi di interazioni con altre proteine e questo le dà la capacità di poter interagire con più molecole, aventi funzioni diverse e localizzate sia all'interno delle cellule che nello spazio extracellulare. Polipeptidi aventi un simile comportamento vengono denominati “*moonlighting protein*” (Jeffery, 1999, Jeffery, 2003). La sequenza primaria della timosina β_4 consta di 43 residui aminoacidici altamente conservati. Studi condotti utilizzando analoghi della proteina intera, con modificazioni puntiformi, hanno evidenziato che sia il segmento N-terminale (1-16) in α -elica, che il motivo esapeptidico di *binding* ¹⁷LKKTET²² sono importanti per il legame all'actina. Se vengono troncati i primi 24 residui, infatti, la molecola perde la sua capacità di sequestrare i monomeri di actina. In specifico, il tratto della molecola tra le posizioni 13 e 23 è indispensabile per la formazione di interazioni sia di carattere elettrostatico che idrofobico con la G-actina, mentre gli aminoacidi 1-7 sembrano necessari per l'attività inibitoria verso la polimerizzazione dell'actina in presenza di tampone salino (Troys *et al.*, 1996; Vancompernelle *et al.*, 1992). I dati raccolti dal gruppo di ricerca del Dott. Philip, suggeriscono che la molecola timica interagisca con le cellule endoteliali per attivare il processo di neovascolarizzazione, tramite il sito centrale di *binding* all'actina (Philip *et al.*, 2003). A questo si aggiungono evidenze di un trasporto nel nucleo della proteina. Non sembra sia presente una sequenza segnale canonica di localizzazione nucleare, un'ipotesi è rappresentata dal cluster di residui aminoacidici carichi positivamente ¹⁴KSKLKK¹⁹ che parzialmente si sovrappone al motivo di *binding* proposto per l'actina; tuttavia recenti indagini, sembrano escludere l'esistenza di un sistema di trasporto attivo specifico e a favore di un meccanismo controllato di diffusione passiva (Zoubek *et al.*, 2007).



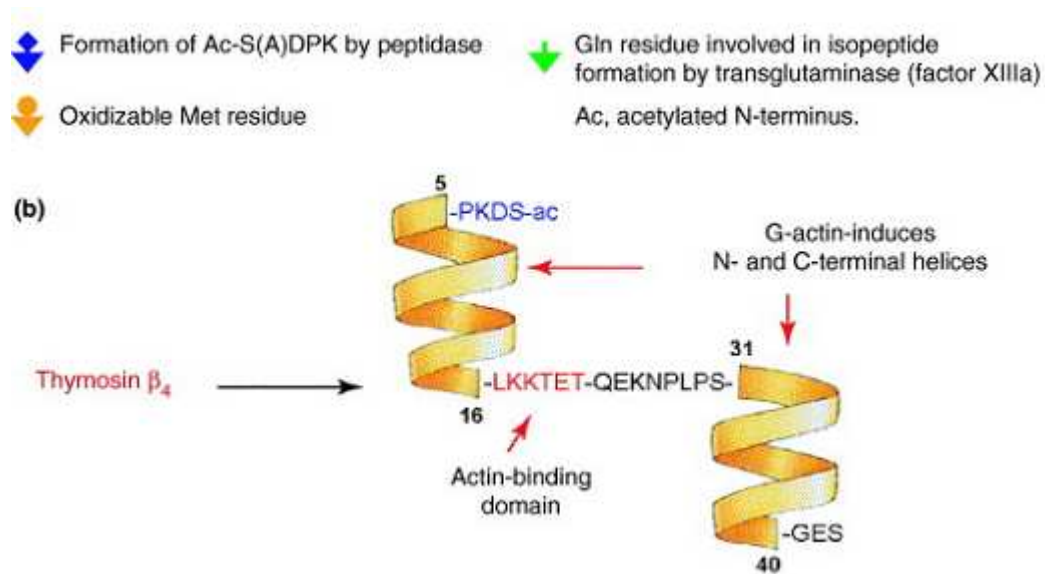


Figura 4.1. Timosine- β_4 . (a) Sequenza amminoacidica della proteina nativa espressa nell'uomo e dei frammenti peptidici prodotti dall'azione enzimatica. (b) Struttura della timosina β_4 indotta dal legame con l'actina. Il tratto centrale corrispondente al sito di *binding*, risulta conformazionalmente flessibile (Goldstein *et al.*, 2005).

Il ruolo biologico svolto dalla proteina nel nucleo non è noto, speculazioni associano la presenza del fattore stesso con quella di una considerevole quantità di actina e indicano una possibile azione come fattore di trascrizione (Huff *et al.*, 2004). Sebbene sia una proteina relativamente piccola, molteplici sono le funzioni biologiche finora attribuitele. Analisi di espressione genica di cellule endoteliali seminate su Matrigel, al fine di indurre variazioni morfologiche, hanno identificato T β_4 come un fattore angiogenico (Malinda *et al.*, 1997). Infatti sembrerebbe promuovere la migrazione di cellule endoteliali, la formazione di strutture tubolari e l'attività angiogenica, sia *in vitro* che *in vivo* (Malinda *et al.*, 1997; Malinda *et al.*, 1999). Nel trattamento delle ferite a livello del derma, a seguito di somministrazioni sia topiche che sistemiche del polipeptide, è stata osservata, in diversi modelli animali, una più rapida cicatrizzazione, imputabile ai vari eventi indotti da T β_4 (Malinda *et al.*, 1999). Nella rimarginazione delle ferite, l'angiogenesi infatti riveste un ruolo critico: localmente nuovi vasi risultano necessari per rifornire di nutrienti e di ossigeno le cellule coinvolte nella riparazione, per rimuovere metabolici tossici e frammenti di cellule morte, in modo da generare condizioni ottimali per la formazione di nuovo tessuto. A questo si aggiunge la richiesta di un movimento direzionale di cellule nell'area lesa, al fine di operare le funzioni riparative. Cheratinociti e cellule endoteliali, come evidenziato da saggi *in vitro* e *in vivo* (Malinda *et al.*, 1997), verrebbero richiamate dalla proteina timica.

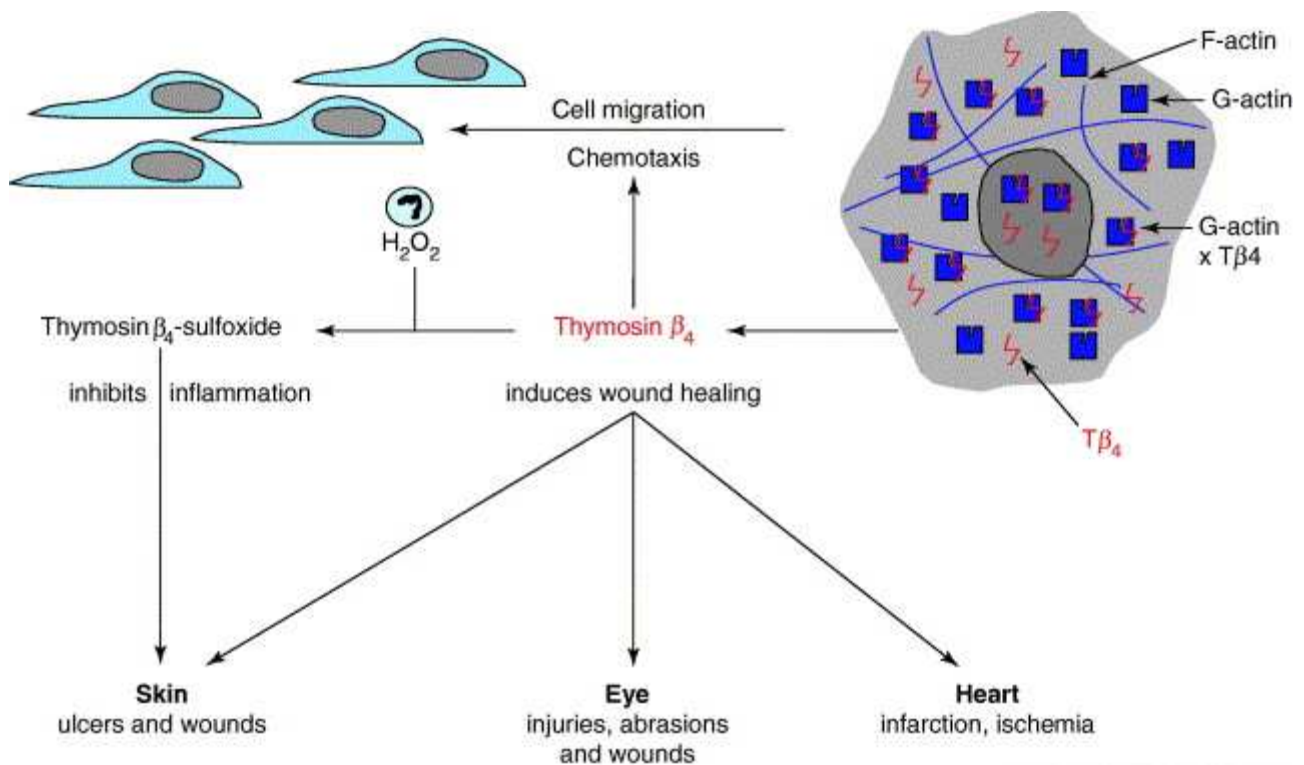


Figura 4.2. Proprietà biologiche della timosina- β_4 e dei derivati prodotti dall'azione enzimatica sulla proteina (Goldstein *et al.*, 2005).

Già a concentrazioni nanomolari la molecola si è dimostrata un potente chemoattrattore, e un fattore stimolante la secrezione di metallo-proteasi, la cui attività permette alle cellule di svincolarsi dalle interazioni con le altre cellule e la matrice extracellulare e di poter migrare (Malinda *et al.*, 1999; Kountrafouris *et al.*, 2001). Il rimodellamento tessutale comporta solitamente la presenza di una componente infiammatoria che può rallentare, se non precludere, la cicatrizzazione. Studi sullo shock settico e sui danni alla cornea, nei quali è stato operato un trattamento con $T\beta_4$ hanno documentato invece la riduzione sia dell'infiltrato cellulare che una sotto-regolazione di chemochine e citochine pro-infiammatorie (Sosne *et al.*, 2002), indicando che la somministrazione di dosi farmacologiche in ultima analisi ridurrebbe l'alto rischio di mortalità associato a infezioni gravi (Huff *et al.*, 2002), grazie ad un'azione sia anti-infiammatoria che anti-microbica.

Attualmente la proteina è entrata in *trial* clinici di fase I, per le ferite cutanee croniche (Huff *et al.*, 2002), tuttavia l'ottenimento di nuove informazioni sulle proprietà fisiologiche della timosina β_4 aprono la strada ad ulteriori strategie terapeutiche per la cura, ad esempio di tumori metastatici e dei danni associati a condizioni ischemiche generate da infarti acuti al miocardio (AMI) (Crockford, 2007).

Viste le molteplici attività della timosina β_4 , e le potenziali applicazioni nell'ambito della chirurgia rigenerativa e del *tissue-engineering*, uno degli obiettivi del presente lavoro è stata la valutazione dell'attività

di frammenti della T β 4. Sulla base delle considerazioni fatte in precedenza riguardo a correlazioni tra la sequenza primaria e l'attività biologica, sono state progettate e sintetizzate tre sequenze peptidiche riproducenti:

- la sequenza naturale N-terminale, TY β 4n, prodotta nell'organismo dall'azione di endoproteasi e contenete il motivo putativo di localizzazione nucleare e la sequenza a cui si deve la capacità anti-infiammatoria;
- il tratto centrale, TY β 4i;
- la sequenza carbossiterminale, TY β 4c.

Ognuno di questi peptidi contiene il motivo centrale di *binding* per l'actina.

PEPTIDE	SEQUENZA
TY β 4-n	Ac- ¹ SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKN ²⁶ -NH ₂
TY β 4-i	¹ SKLKKTTETQE ¹⁰ -NH ₂
TY β 4-c	¹ LKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES ²⁷ -NH ₂

Tabella 4.1. Sequenze dei peptidi derivati dalla timosina- β 4.

L'indagine sui tre motivi amminoacidici si è articolata da un lato in studi di caratterizzazione strutturale, dall'altro sono stati valutati sia *in vitro* che *in vivo* gli effetti angiogenici esercitati su colture di cellule endoteliali, HUVEC, e sulla membrana corioallantoidea (CAM).

4.1 RISULTATI

4.1.1 *Sintesi*

Tutti e tre i peptidi riportati per la proteina timosina- β 4 sono stati prodotti presso il laboratorio del Prof. Di Bello dell'Università di Padova, Dip. di Processi Chimici dell'Ingegneria, impiegando le metodologie di sintesi su fase solida, e utilizzando un sintetizzatore peptidico automatizzato (Applied Biosystems Mod. 431 A), via chimica Fmoc. Per ottenere peptidi ammido-terminali, come supporto solido per la sintesi, si è utilizzata la resina Rink Amide MBHA (0.66 mmol/g). In conformità ad una strategia di protezione ortogonale delle catene laterali rispetto al gruppo protettore α -amminico della catena principale, sono stati impiegati i seguenti gruppi protettori: tBu (Ser e Thr), Boc (Lys), OtBu (Asp e Glu) e Trt (Gln e Asn).

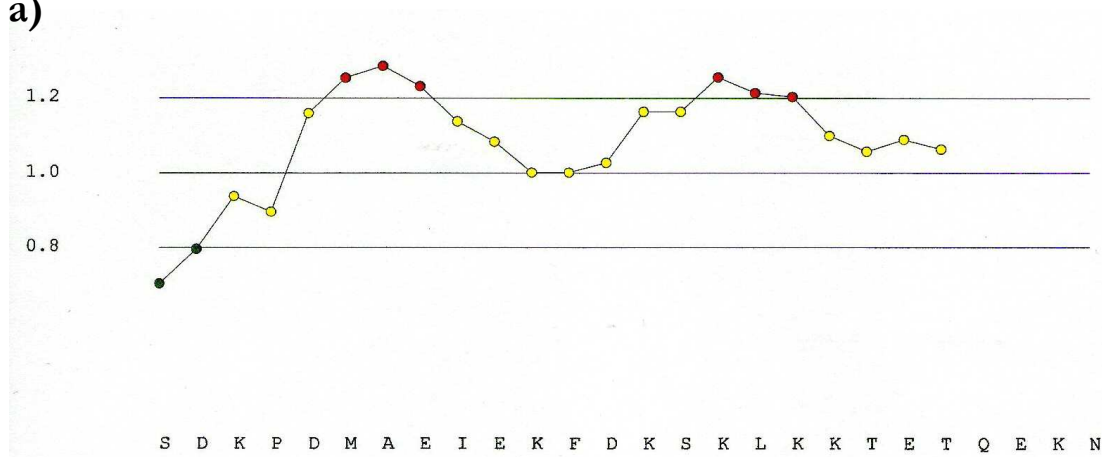
La funzionalizzazione della resina è stata condotta in doppio *coupling*, via anidride simmetrica usando come agente condensante impiegando una miscela di reazione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 0.32 mL di DIEA (chimica FastMoc). La resa di reazione è stata determinata tramite quantificazione

spettrofotometrica a 301 nm, del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)-piperidina, e per tutti i campioni ha dato un valore pari, se non superiore al 97%.

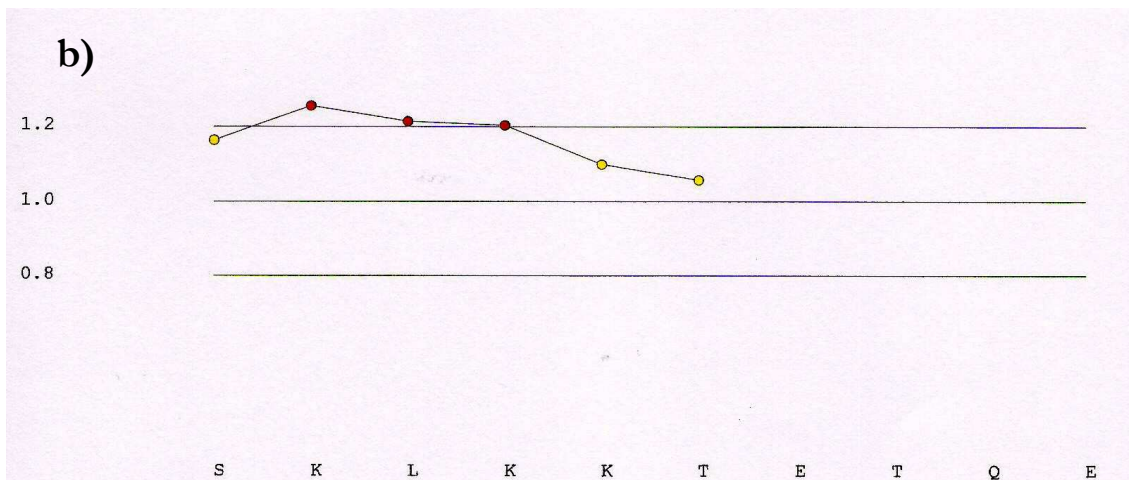
Sulla base dei dati di predizione statistica sul grado di difficoltà della sintesi delle sequenze (Figura 4.3) sono state progettate le seguenti strategie di sintesi:

- i. TYβ4n: i primi sei residui ($K^{25} \rightarrow T^{20}$) sono stati condensati impostando *coupling* singoli; i successivi ($K^{19} \rightarrow S^1$) sono stati addizionati con doppi *coupling*; e dalla posizione K^{16} , la reazione di deprotezione del gruppo Fmoc, solitamente ottenuta per trattamento del peptide in crescita su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 min, è stata prolungata di 15 min (Schema 4.1);
- ii. TYβ4i: i primi quattro aminoacidi della catena in crescita ($Q^9 \rightarrow T^6$) sono stati aggiunti tramite un *coupling* singolo, mentre le rimanenti 5 inserzioni hanno previsto l'impostazione di *coupling* doppi (Schema 4.2);

a)



b)



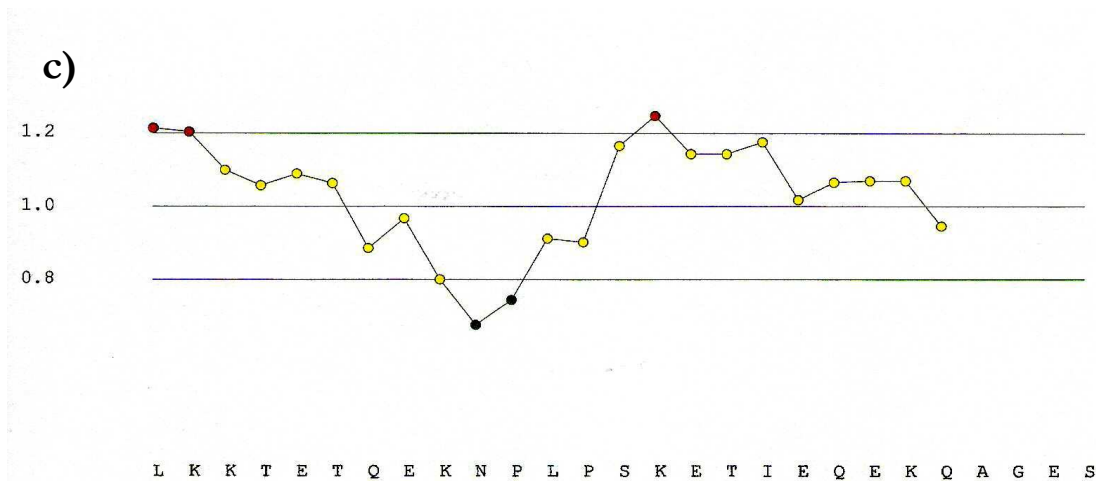
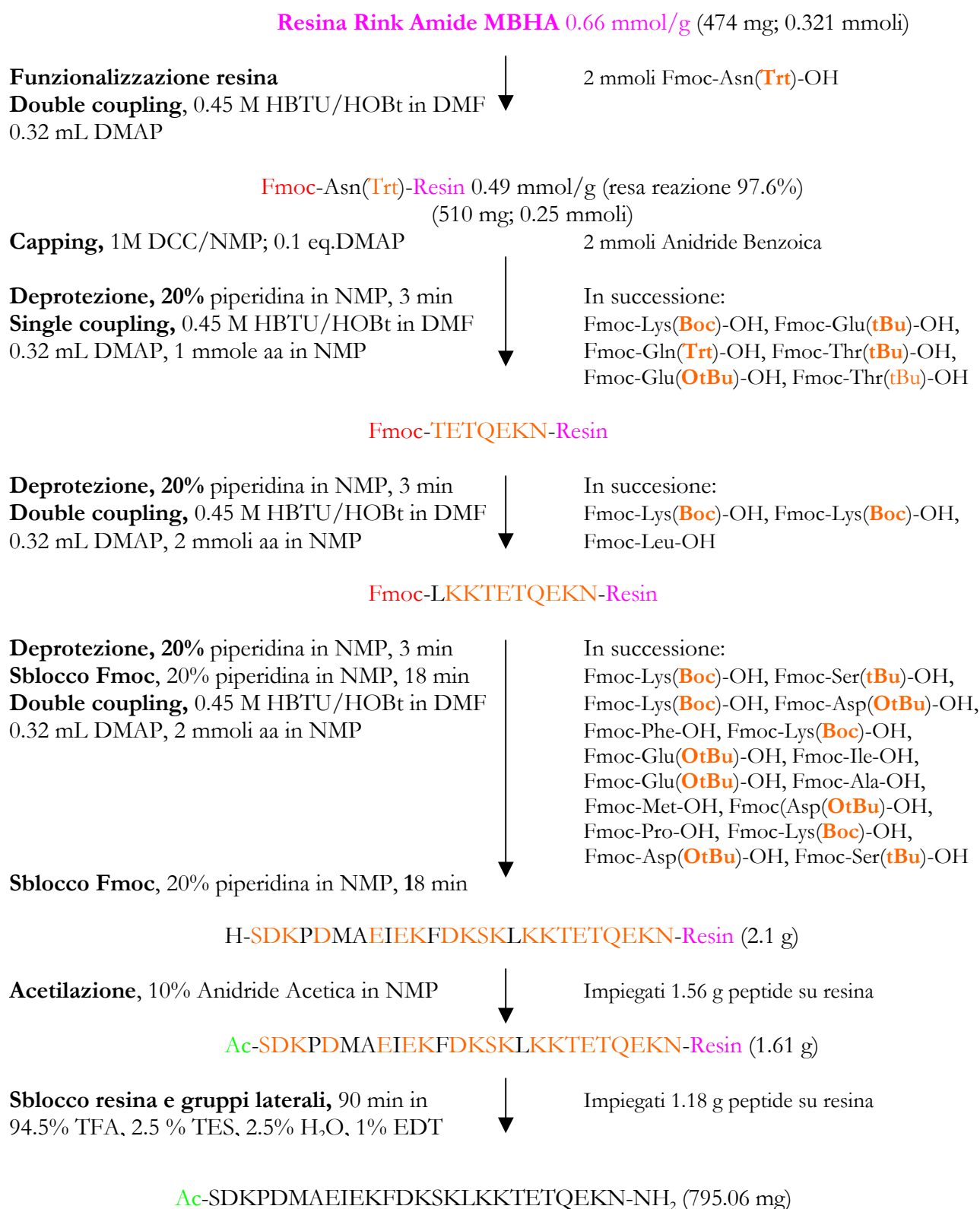


Figura 4.3: predizioni statistiche sulla tendenza delle sequenze peptidiche (a) TY β 4n, (b) TY β 4i e (c) TY β 4i, ad aggregare durante accrescimento della catena amminoacidica. L'individuazione di potenziali "difficult sequences" è stata effettuata tramite il *software Peptide Companion*. Questo programma sulla base delle regole stabilite da Krchnak e collaboratori (1993) assegna dei valori ai singoli residui, per indicare la probabilità che insorgano problemi durante sintesi. Maggiore è la difficoltà, potenziale, di un *coupling*, più il valore risulta > 1.1.

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA TYβ4n¹



¹Schema 4.1. Sintesi TYβ4. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **L** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **Q** = Gln(Trt), **S** = Ser(tBu), **T** = Thr(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA TYβ4i²

Resina Rink Amide MBHA 0.66 mmol/g (475 mg; 0.313 mmoli)

Funzionalizzazione resina

Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP

2 mmoli Fmoc-Glu(OtBu)-OH



Fmoc-Glu(OtBu)-Resin 0.61 mmol/g (resa reazione 88.2%)
(407 mg; 0.25 mmoli)

Capping, 1M DCC/NMP; 0.1 eq.DMAP

2 mmoli Anidride Benzoica

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Single coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 1 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH,
Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH,



Fmoc-TETQE-Resin

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 2 mmoli aa in NMP

In successione:
Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,
Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,
Fmoc-Ser(tBu)-OH

Sblocco Fmoc (finale), 20% piperidina in NMP



H-SKLKKTETQE -Resin (1.05 g)

Sblocco resina e gruppi laterali, 90 min in
95% TFA, 2.5 % TES, 2.5% H₂O



H-SKLKKTETQE -NH₂ (320.26 mg)

¹ Schema 4.2. Sintesi TYβ4i. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **E** = Glu(OtBu), **L** = Lys(Boc), **Q** = Gln(Trt), **S** = Ser(tBu), **T** = Thr(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA TYβ4c³

Resina Rink Amide MBHA 0.66 mmol/g (473 mg; 0.321 mmoli)

Funzionalizzazione resina

Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP

2 mmoli Fmoc-Ser(**tBu**)-OH

Fmoc-Ser(**tBu**)-Resin 0.468 mmol/g (resa reazione 74.7%)
(500 mg; 0.235 mmoli)

Capping, 1M DCC/NMP; 0.1 eq.DMAP

2 mmoli Anidride Benzoica

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Single coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 1 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Glu(**tBu**)-OH, Fmoc-Gly-OH
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(**Trt**)-OH
Fmoc-Lys(**Boc**)-OH, Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH,
Fmoc-Gln(**Trt**)-OH

Fmoc-QEKQAGES-Resin

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 18 min
Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 2 mmoli aa in NMP

In successione:
Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH, Fmoc-Ile-OH,
Fmoc-Thr(**tBu**)-OH, Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH
Fmoc-Lys(**Boc**)-OH, Fmoc-Ser(**tBu**)-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(**Trt**)-OH,
Fmoc-Lys(**Boc**)-OH, Fmoc-Glu(**OtBu**),
Fmoc-Gln(**Trt**)-OH, Fmoc-Thr(**Boc**)-OH,
Fmoc-Glu(**OtBu**), Fmoc-Thr(**Boc**)-OH,
Fmoc-Lys(**Boc**)-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH
Fmoc-Leu-OH

Sblocco Fmoc, 20% piperidina in NMP, 18 min

H-LKKTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES-Resin (1.36 g)

Sblocco resina e gruppi laterali, 90 min in
94.5% TFA, 2.5 % TES, 2.5% H₂O, 1% EDT

Impiegati 1.18 g peptide su resina

H-LKKTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES-NH₂ (663.81 mg)

- iii. TYβ4c: l'inserimento dei residui E²⁶→Q²⁰ è stato condotto in singolo *coupling* a differenza dei successivi residui E¹⁹→L¹, per i quali la reazione di condensazione è stata ripetuta due

¹ Schema 4.3. Sintesi TYβ4c. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **L** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **Q** = Gln(Trt), **S** = Ser(tBu), **T** = Thr(tBu).

volte. Per ogni ciclo è stato prolungato il tempo di deprotezione del terminale amminico di 15 min (Schema 4.3).

Al termine della sintesi, il solo peptide su resina TY β 4n è stato acetilato al sito N-terminale per reazione con anidride acetica (soluzione al 10% in NMP, per 10 min). Successivamente le catene aminoacidiche sono state sbloccate dal supporto solido con contemporanea deprotezione dei gruppi protettori in catena laterale.

Il profilo cromatografico dei peptidi grezzi è riportato nelle figure 4.4-4.6.

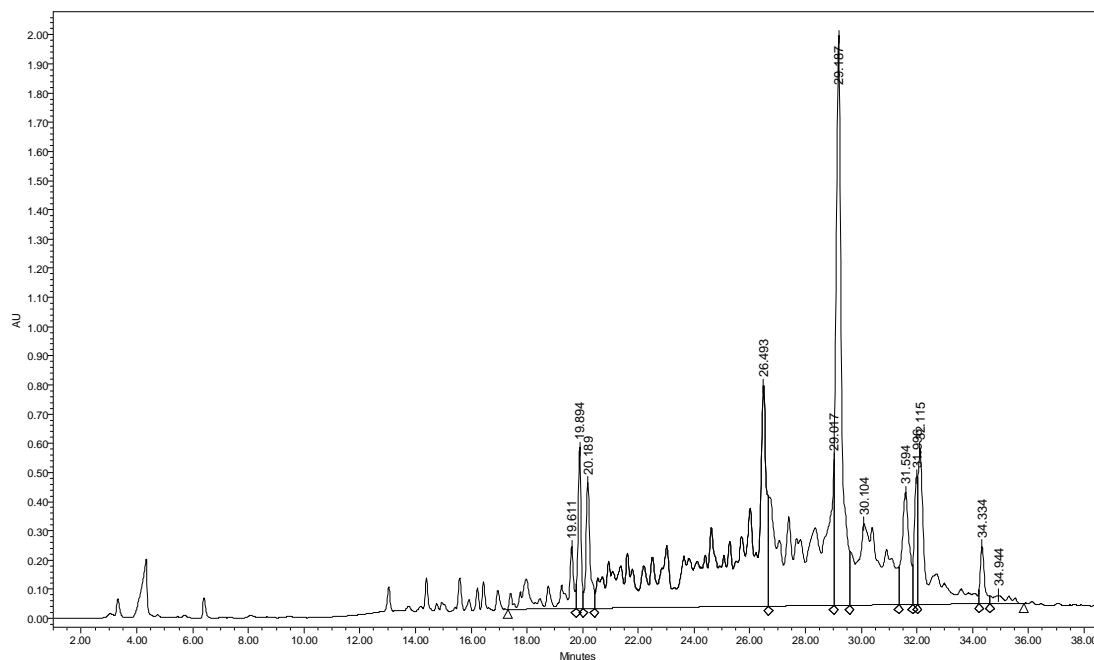


Figura 4.4. Cromatografia analitica del peptide TY β 4n grezzo, condotta impiegando una colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 \AA , 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 0% al 60% di B in 60 min; detector, 214 nm.

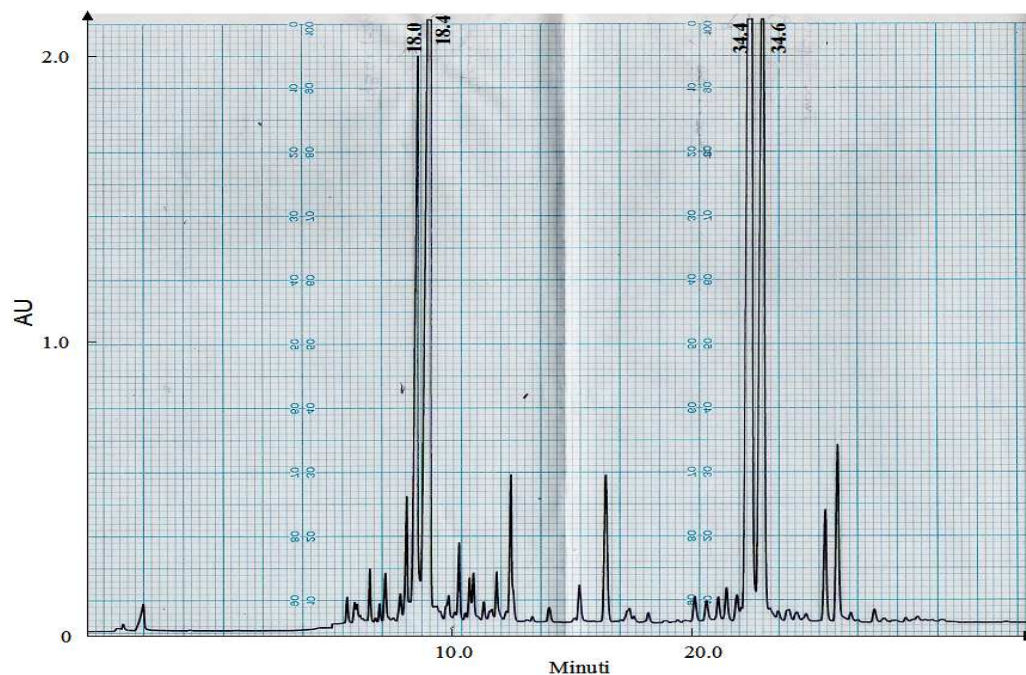


Figura 4.5. Cromatografia analitica del peptide TY β 4i grezzo, condotta impiegando una colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 0% al 60% di B in 60 min; detector, 214 nm.

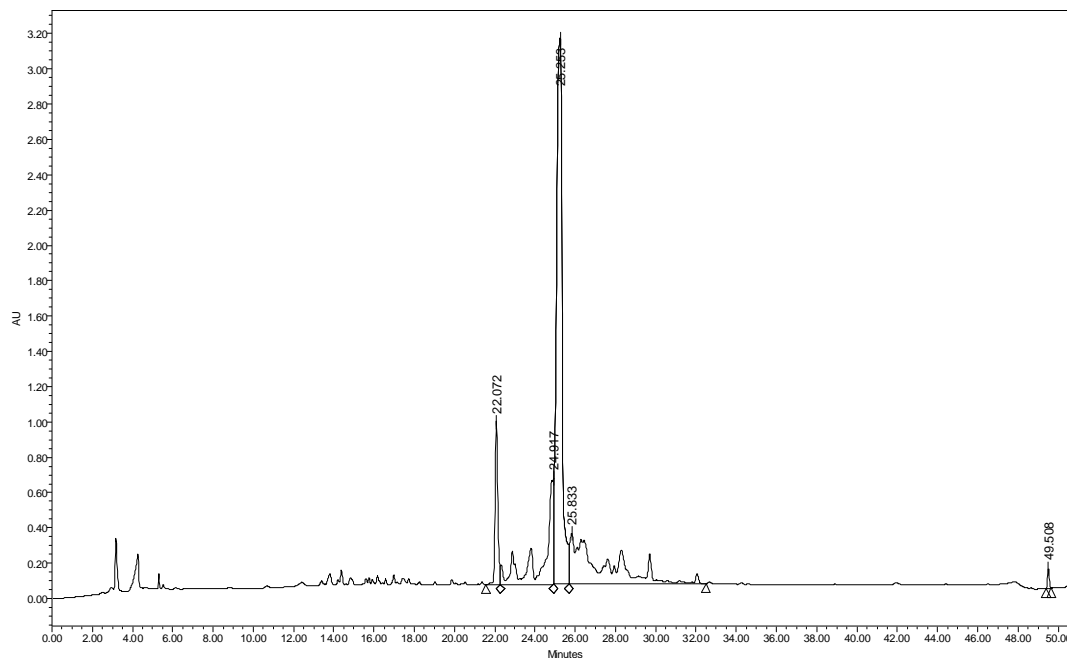


Figura 4.6. Corsa cromatografica analitica del campione TY β 4c, in seguito al passaggio in colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 0% al 70% di B in 70 min; detector, 214 nm.

4.1.2 Purificazione

I prodotti grezzi sono stati purificati tramite cromatografia RP-HPLC (HPLC Waters 600E; autocampionatore modello 717; rivelatore UV/VIS modello 490E), utilizzando colonne semipreparative nelle seguenti condizioni:

- i. TYβ4n: colonna Delta Pak C₁₈ (15 μm, 100 Å, 7.8 mm×300 mm; Waters), flusso, 4 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 10% al 25% di B in 60 min, 10 min al 10% B; detector, 214 nm;
- ii. TYβ4i: colonna Nova-Pak HR C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7.8 mm×300 mm; Waters), flusso, 4 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, 10 min al 100% A, da 0% al 10% di B in 30 min; detector, 214 nm;
- iii. TYβ4c: colonna Delta Pak C₁₈ (15 μm, 100 Å, 7.8 mm×300 mm; Waters), flusso, 4 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, 10 min al 5% B, dal 5% al 10% di B in 15 min, dal 10% al 20% di B in 40 min; detector, 214 nm.

4.1.3 Caratterizzazione

L'omogeneità delle frazioni raccolte durante la purificazione dei campioni, sono state valutate usando la cromatografia analitica in fase inversa, impostando per ogni sequenza le condizioni riportate qui di seguito:

- i. TYβ4n: colonna, Luna C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 16% al 28% di B in 24 min; detector, 214 nm. Dall'integrazione dei profili cromatografici (*software* Millennium 2010, Waters) si è verificato il livello di purezza raggiunto, pari al 99.26% (Figura 4.7);
- ii. TYβ4i: colonna, Luna C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 4% al 14% di B in 20 min; detector, 214 nm. Il grado di purezza raggiunto per il prodotto, valutato integrando il profilo cromatografico, è stato stimato pari al 99.6% (Figura 4.8);
- iii. TYβ4c: colonna, Luna C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 12% al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm. Il grado di purezza raggiunto per il peptide TYβ4i, valutato mediante integrazione dei profili cromatografici, è pari al 98.8% (Figura 4.9).

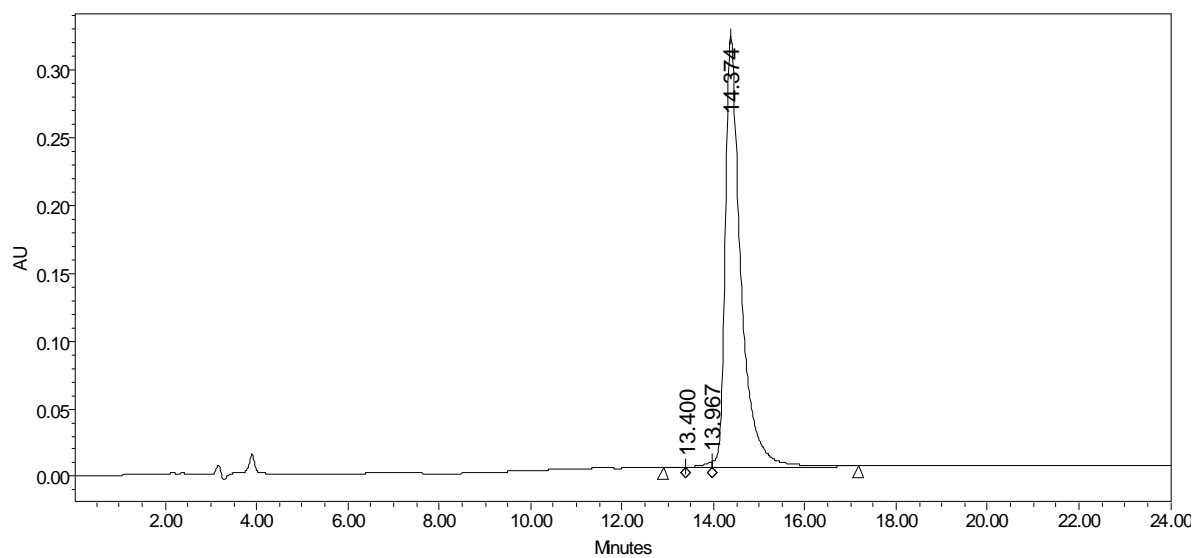


Figura 4.7. Cromatogramma del peptide TY β 4n purificato, ottenuta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm), flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 16% al 28% di B in 24 min; detector, 214 nm.

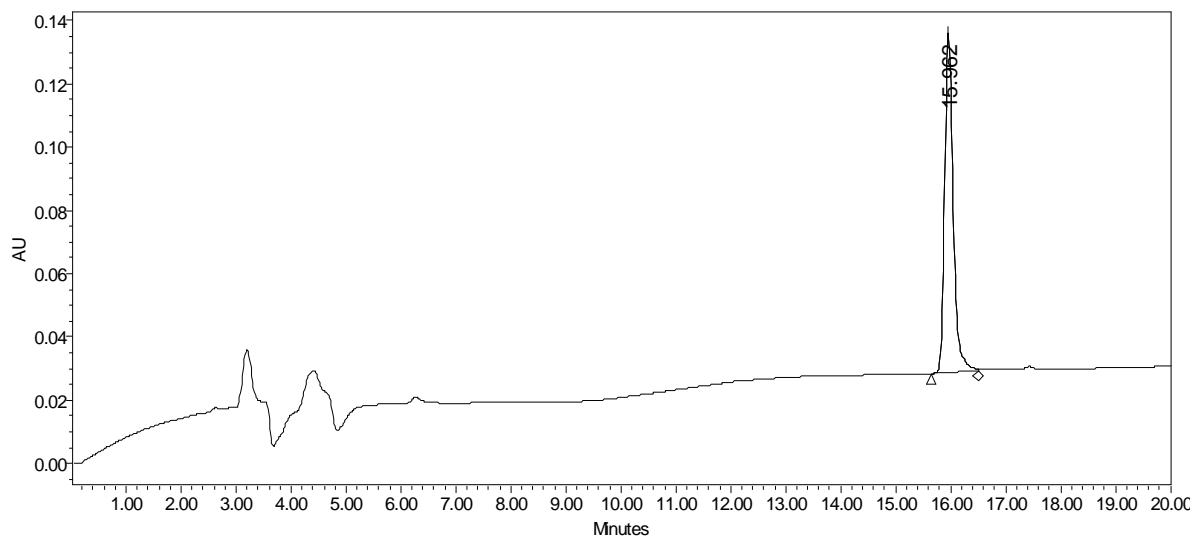


Figura 4.8. Cromatografia analitica del peptide TY β 4i purificato ottenuta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm); flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 4% al 14% di B in 20 min; detector, 214 nm.

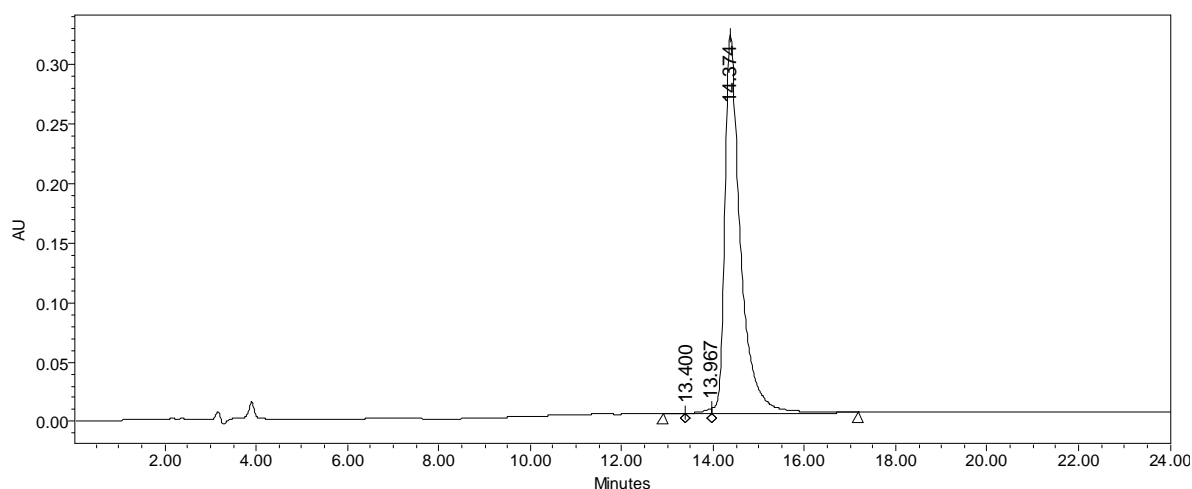


Figura 4.9. Cromatografia analitica del peptide TYβ4c purificato ottenuta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4.6×250 mm); flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 12% al 22% di B in 20 min; detector, 214 nm.

L'identità dei prodotti sintetizzati, riproducenti i frammenti della proteina Tβ4 e di alcuni prodotti secondari, è stata confermata utilizzando uno spettrometro di massa a tempo volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v:v)). L'analisi condotta sui grezzi e sulle frazioni raccolte durante purificazione, ha dato i seguenti risultati:

- i. TYβ4n: [Massa teorica = 3109.53 Da], nello spettro del grezzo (Figure 4.10-4.11) erano presenti più specie molecolari, il picco cromatografico eluito a $t_R = 29.2$ min (Figura 4.4) con massa sperimentale = 3109.62 corrispondeva al prodotto atteso, mentre gli altri erano attribuibili a possibili sequenze delete per almeno un residuo. I principali prodotti secondari rintracciati erano:

- $(M^+ + 5H^+)/5 = 593.32$, Massa sperimentale = 2961.60 Da, $\Delta MW = -147.93$;
- $(M^+ + 5H^+)/5 = 597.31$, Massa sperimentale = 2981.55 Da, $\Delta MW = -127.98$;
- $(M^+ + 5H^+)/5 = 608.38$, Massa sperimentale = 3036.9 Da, $\Delta MW = -69.68$;
- $(M^+ + 4H^+)/4 = 749.68$, Massa sperimentale = 2994.72 Da, $\Delta MW = -114.81$.

(ΔMW : di scostamento dalla massa teorica del prodotto d'interesse, Massa sperimentale del picco – Massa teorica).

Le differenze in peso molecolare erano riconducibili a peptidi privi degli amminoacidi Phe⁴ (MW = 147.78 Da) e Ala⁷ (MW = 71.08 Da) o incompleti per un residuo di Lys (MW = 128.18 Da) o di Asp (MW = 115.089 Da).

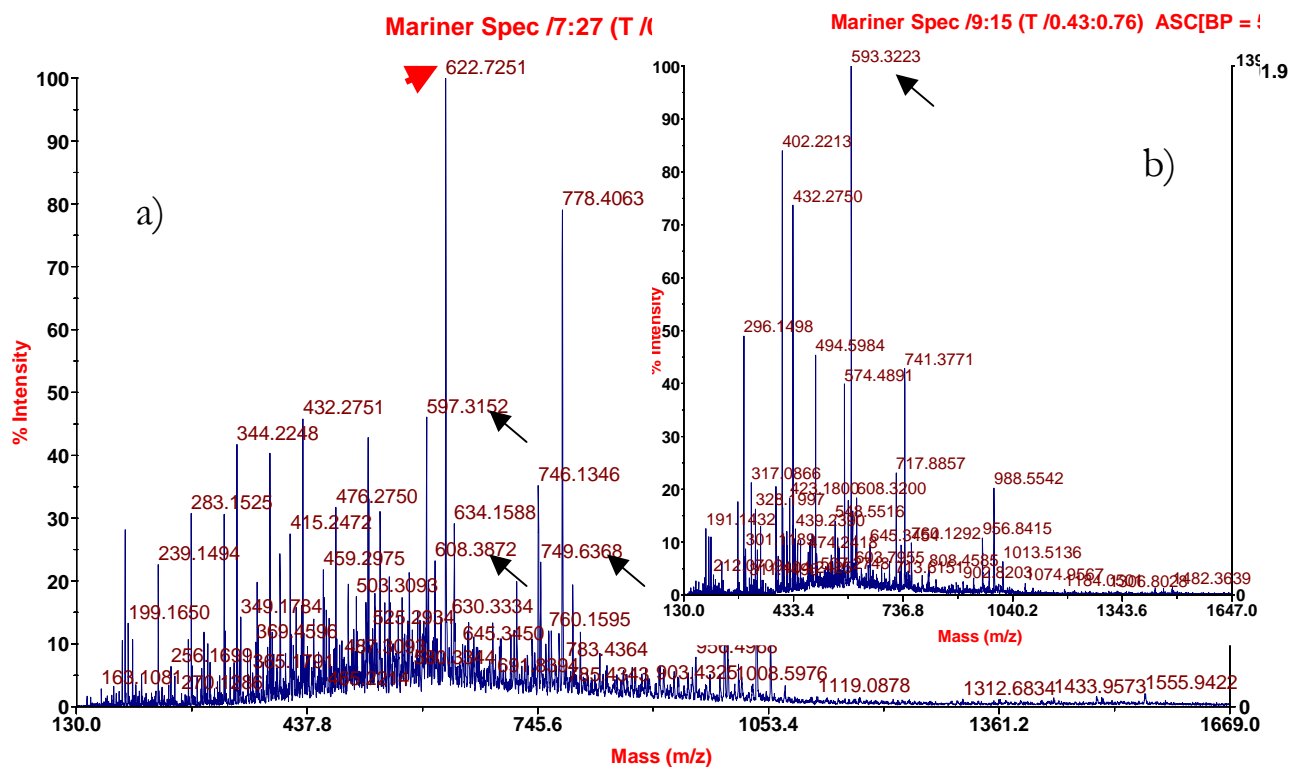


Figura 4.10. (a) Spettro di massa del campione grezzo TY β 4n, ottenuto impiegando uno spettrometro di massa a tempo di volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1v:v:v)). (b) Ingrandimento di una porzione dello spettro. La freccia rossa evidenzia lo ione molecolare corrispondente al prodotto TY β 4n, mentre le frecce nere indicano i picchi relativi alle sequenze delete.

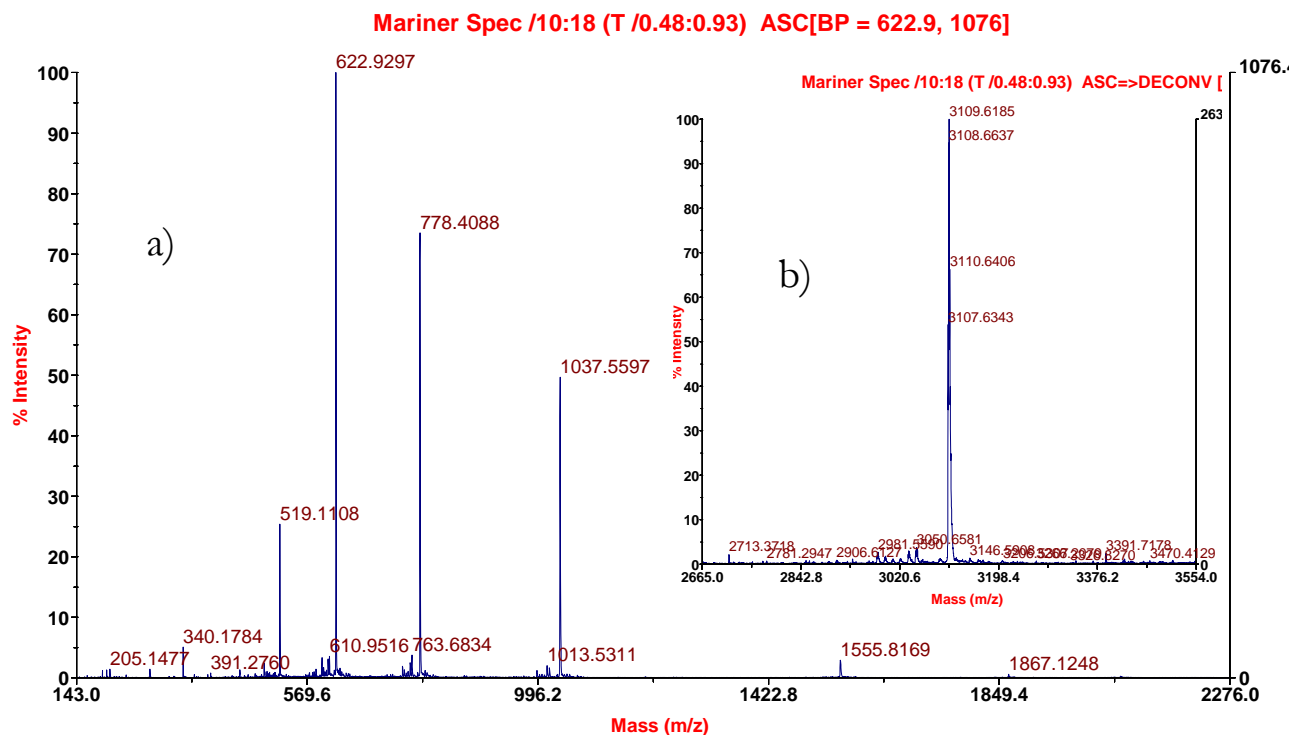


Figura 4.11. (a) Spettro di massa del campione purificato TY β 4n, ottenuto impiegando uno spettrometro di massa a tempo di volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1v:v:v)), [Massa teorica = 3109.53 Da, valore sperimentale = 3109.62 Da]. (b) Deconvoluzione dello spettro.

ii. TYβ4i: [Massa teorica = 1190.37 Da], in figura 3 sono evidenti quattro diversi picchi cromatografici, dall'analisi di massa (Figure 4.12-4.13), eseguita su campioni di ciascun picco, è stato possibile associare le seguenti masse sperimentali:

- frazione a $t_R = 18.0$ min, $(M^+ + 3H^+)/3 = 368.56$, Massa sperimentale = 1103.67 Da, $\Delta MW = -87.04$;
- frazione a $t_R = 18.4$ min, $(M^+ + 3H^+)/3 = 397.56$, Massa sperimentale = 1190.71 Da;
- frazione a $t_R = 34.4$ min, $(M^+ + 3H^+)/3 = 442.57$, Massa sperimentale = 1326.71 Da, $\Delta MW = 136$;
- frazione a $t_R = 34.6$ min, $(M^+ + 3H^+)/3 = 471.58$, Massa sperimentale = 1413.82 Da, $\Delta MW = 223.11$.

In base alla sequenza, alle variazioni dei valori di massa rispetto all'atteso, e ai tempi di eluizione nei cromatogrammi, i campioni sintetizzati corrisponderebbero rispettivamente ad una sequenza priva del terminale amminico dell'ultimo residuo di serina (MW = 87.07), al frammento centrale della Tβ4 e dei due corrispondenti analoghi ancora Fmoc (MW = 224.25 Da) protetti.

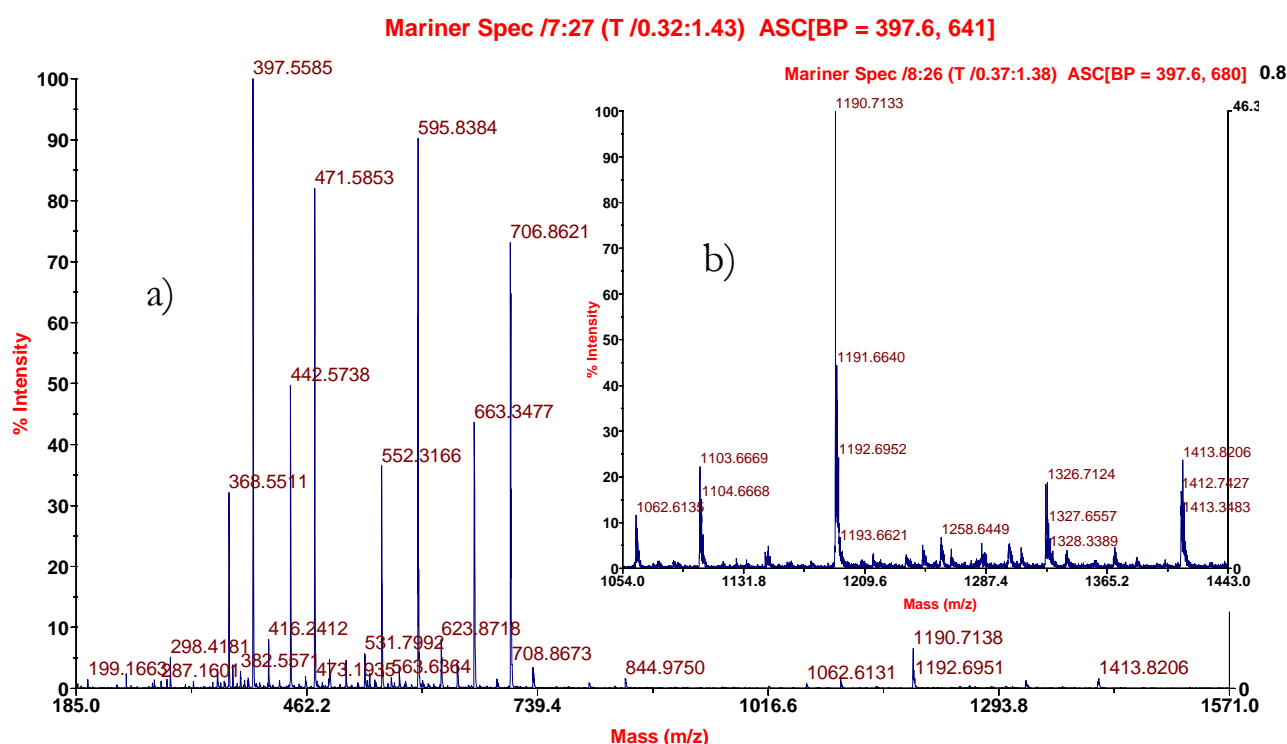


Figura 4.12. a) Spettro di massa del grezzo del peptide TYβ4i, ottenuto usando uno spettrometro di massa con sorgente elettrospray interfacciata con analizzatore TOF (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v:v)), i quattro tipi di frammenti, sono presenti come $(M^+ + 3H^+)/3$ e $(M^+ + 2H^+)/2$. b) Deconvoluzione dei picchi corrispondenti ai quattro ioni molecolari

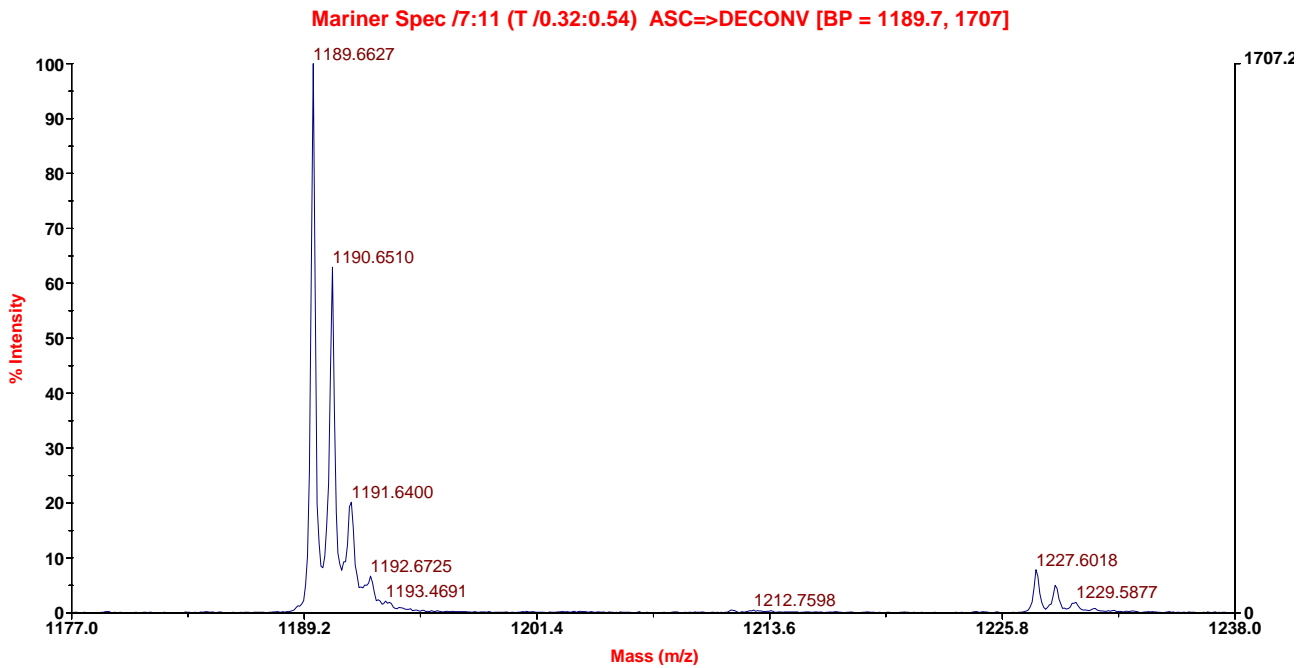


Figura 4.13. Spettro di massa di una frazione purificata del peptide TY β 4i, ottenuto tramite analisi di spettrometria di massa con sorgente elettrospray interfacciata con analizzatore TOF (Mariner Applied Biosystems; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v)), [Massa teorica = 1190.37 Da, valore sperimentale = 1189.66 Da].

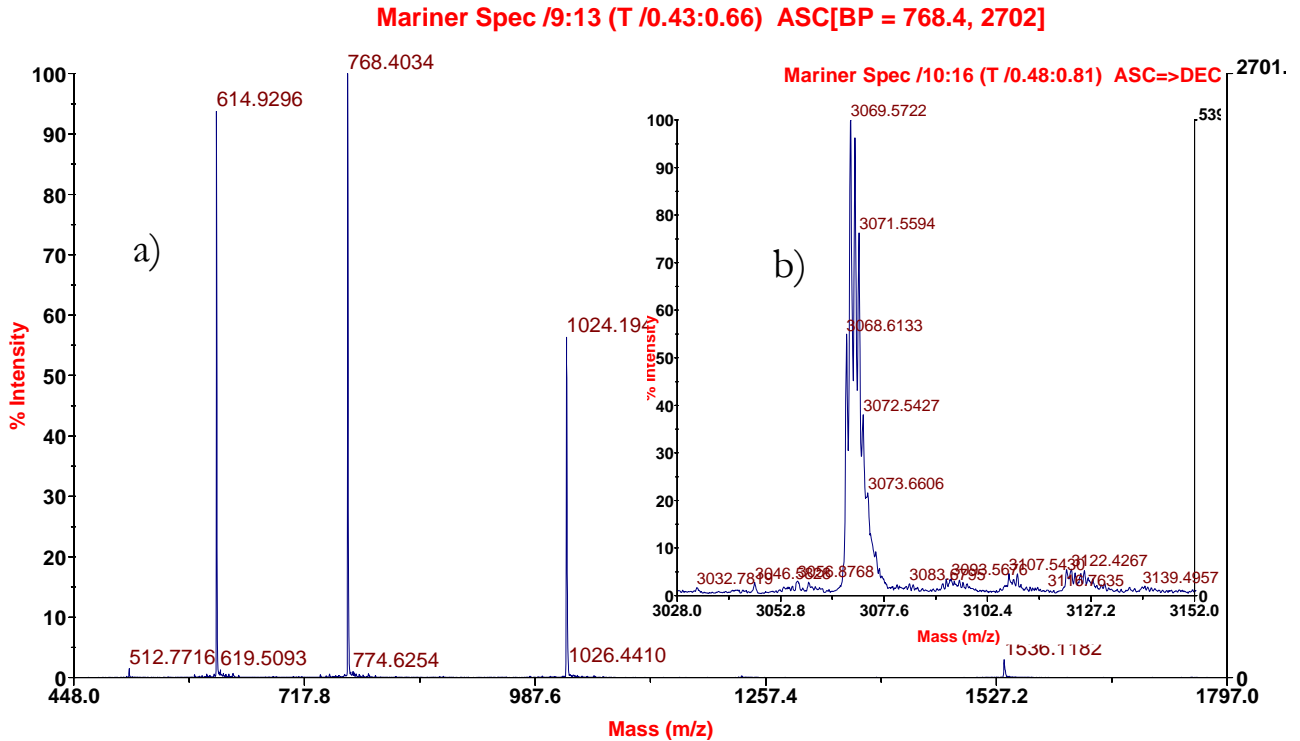


Figura 4.14. (a) Spettro di massa del peptide grezzo TY β 4c ottenuta con uno spettrometro di massa a tempo di volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v)), [Massa teorica = 3070.43 Da, massa sperimentale = 3069.57 Da]. (b) Deconvoluzione degli ioni molecolari

- iii. TYβ4c: [Massa teorica = 3070.43 Da], la sintesi ha portato ad ottenere quasi esclusivamente il prodotto di interesse, come confermato sia dal cromatogramma del grezzo (Figura 4.9) che dallo spettro di massa (Figura 4.14), in cui gli ioni molecolari corrispondono a specie multicarica aventi stessa massa sperimentale, pari a 3069.59 Da.

4.1.4 Analisi di Dicroismo Circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state ottenute con uno spettropolarimetro Jasco modello J-710. Gli spettri sono stati registrati ed elaborati tramite il programma J-700 fornito dalla medesima ditta.

Le misure CD sono state condotte a temperatura ambiente adottando i seguenti parametri: velocità di scansione: 5 nm/min, risposta: 2 sec, accumuli 2, sensibilità: 5, 10 o 20 mdeg, intervallo: 185-250 nm, risoluzione: 0.2 nm, cammino ottico della cella: 0.1 cm e 0.05 cm.

La soluzione madre dei peptidi è stata preparata sciogliendo una quantità pesata di campione in H₂O MilliQ. La concentrazione di tale soluzione è stata determinata tramite analisi amminoacidica quantitativa in seguito a idrolisi acida (HCl 6N; 24h a 110°C).

L'analisi dicroica è stata condotta in H₂O bidistillata, in tampone salino fosfato (137 mM NaCl, 10 mM sodio fosfato, 2.7 mM KCl, pH 7.4), in soluzione micellare di SDS (14 mM SDS in tampone sodio fosfato 10 mM pH 7.4), in 2,2,2-trifluoroetanolo (TFE) e in 1,1,1,3,3,3-esafuoro-2-propanolo. La quantità di soluzione madre nelle soluzioni finali costituiva il 2% (v/v).

Gli spettri in acqua e in tampone per tutti i peptidi presentano una banda principale negativa a circa 200 nm (Figure 4.15-4.17). Se si eseguono gli spettri in tampone salino, nel caso dei due frammenti N- e C-terminali, l'andamento è analogo al precedente, mentre nel caso del peptide TYβ4i si osservava un'intensificazione della banda negativa. In soluzione micellare TYβ4n rimaneva in struttura disordinata. Nella medesima soluzione le altre due sequenze mostravano un leggero *red-shift* della banda negativa osservata in acqua, e un andamento positivo per $\lambda < 193$ nm, indice di una transizione verso popolazioni di conformeri più ordinati.

In presenza di alcol fluorurati si assisteva ad una maggiore strutturazione dei peptidi corrispondenti ai tratti terminali della proteina nativa, con la comparsa, in particolare per gli spettri registrati in TFE, di una banda positiva a 193 nm e di due bande negative rispettivamente a 208 e 222 nm diagnostiche per strutture di tipo α -elicoidale. Nell'altro solvente polare, 1,1,1,3,3,3-esafuoro-2-propanolo, c'era una minore tendenza ad assumere uno stato più ordinato, data la minor intensità delle bande predittive. Lo spettro della sequenza centrale di Tβ4 mostra ancora la banda attorno a 200 nm, mentre non c'era alcuna rilevante differenza con gli spettri in acqua e tampone alle lunghezze d'onda di 208 e 220 nm. Appariva comunque composta di due contributi, probabilmente attribuibili a strutture aperiodiche.

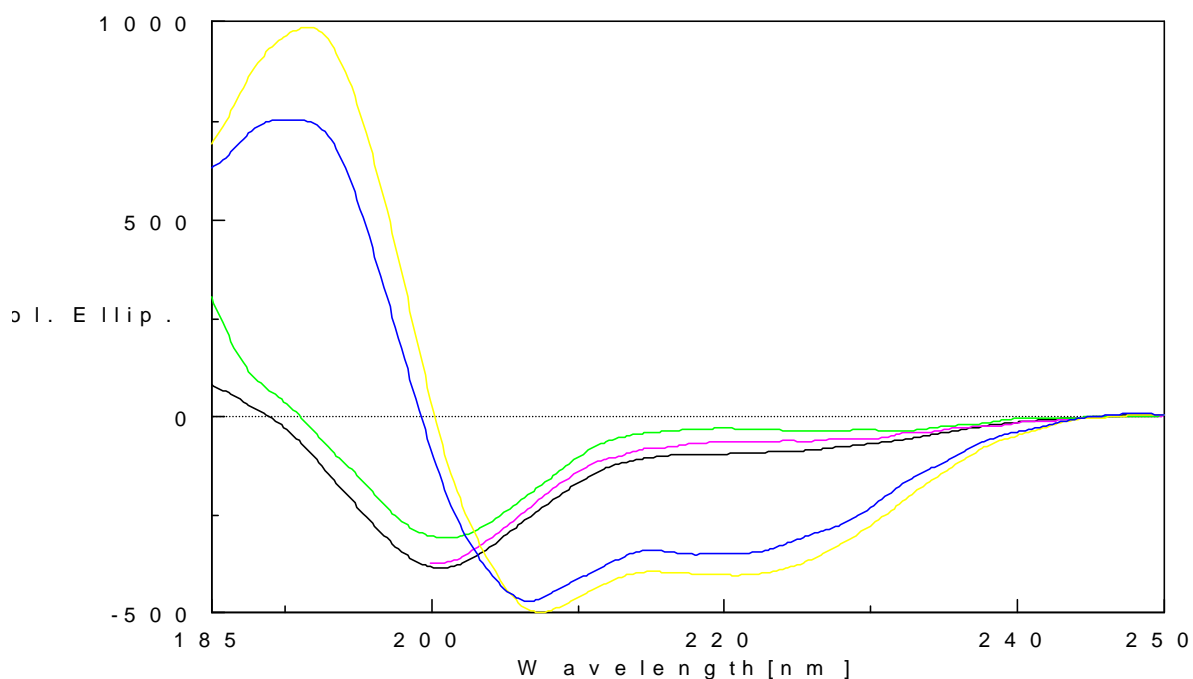


Figura 4.15. Spettro di dicroismo circolare del comportamento del frammento N-terminale della β -timosina nei seguenti solventi: H₂O MilliQ (—), in tampone salino fosfato a pH 7.4 (—), in soluzione 14 mM SDS in tampone fosfato (—), in TFE (—) e in 1,1,1,3,3,3-esfluoro-2-propanolo (—). Lo spettro è riportato in unità di elitticità media per residuo $[\theta]_R$ (deg cm²/ dmol).

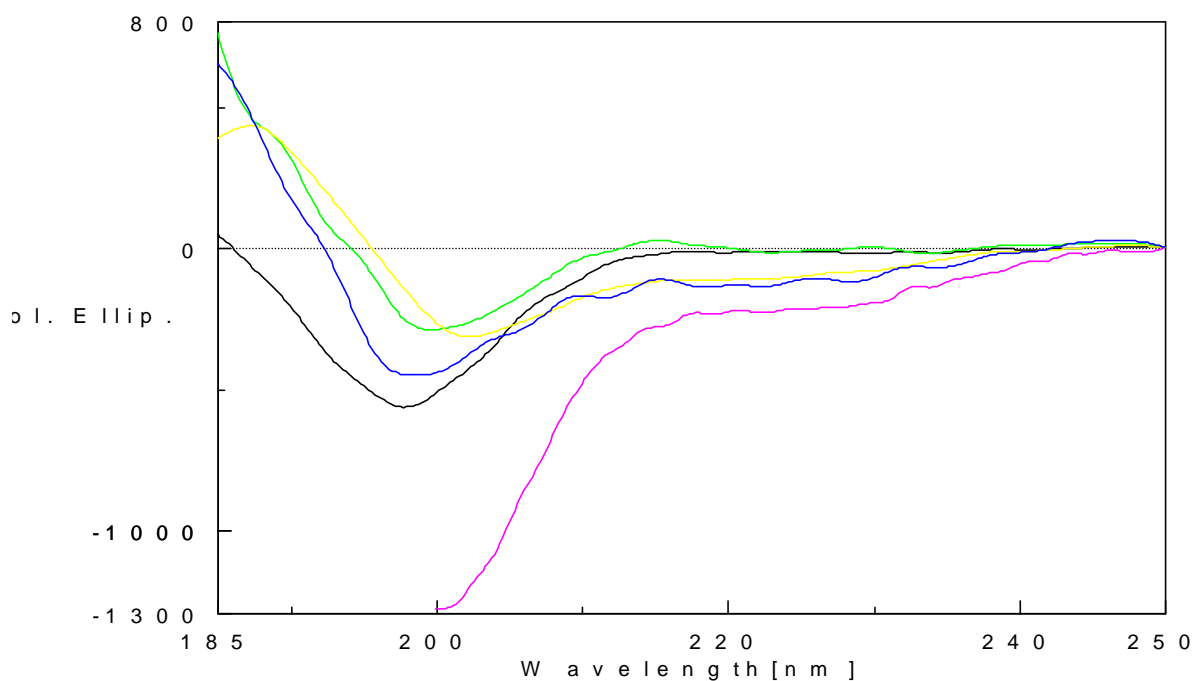


Figura 4.16. Spettro di dicroismo circolare del comportamento del frammento interno della β -timosina nei seguenti solventi: H₂O MilliQ (—), (—), in tampone salino fosfato a pH 7.4 (—), in soluzione 14 mM SDS in tampone fosfato (—), in TFE (—) e in 1,1,1,3,3,3-esfluoro-2-propanolo (—). Lo spettro è riportato in unità di elitticità media per residuo $[\theta]_R$ (deg cm²/ dmol).

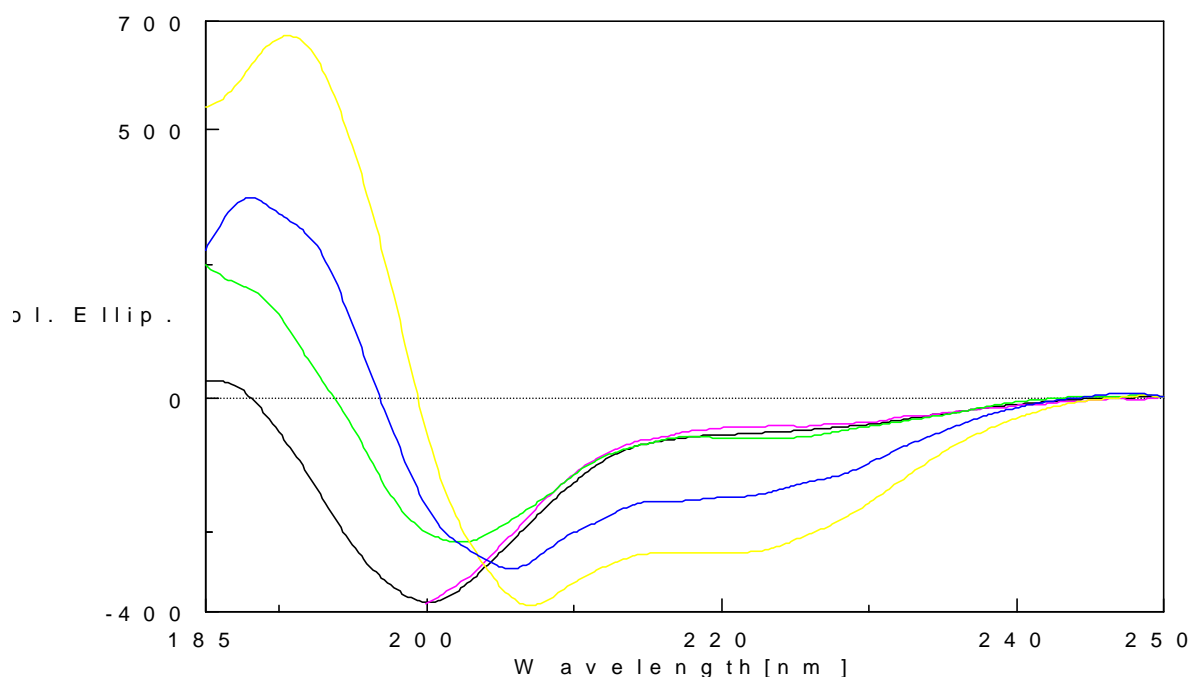


Figura 4.17. Spettro di dicroismo circolare del comportamento del frammento carbossi-terminale della β -timosina nei seguenti solventi: H₂O MilliQ (—), (—), in tampone salino fosfato a pH 7.4 (—), in soluzione 14 mM SDS in tampone fosfato (—), in TFE (—) e in 1,1,1,3,3,3-esaffluoro-2-propanolo (—). Lo spettro è riportato in unità di elitticità media per residuo $[\theta]_R$ (deg cm²/ dmol).

4.1.5 Studi NMR in miscele TFE/acqua e analisi computazionale

L'analisi NMR è stata condotta presso il laboratorio del Prof. Paolillo dell'Università di Napoli "Federico II", del Centro di Metodologie Chimico Fisiche.

I valori di risonanza protonica delle sequenze TY β 4n, TY β 4i e TY β 4c ottenuti dall'analisi in ambiente TFE/H₂O 70:30 (v/v) a 298 K, sono stati assegnati in conformità alla procedura descritta da Wuthrich (1986). Le tabelle 4.2-4.4 riportano i valori registrati, rispettivamente per le tre sequenze.

a.a.	<u>NH</u>	α	β	γ	<u>others</u>
Ac-					2.01
Ser ¹	7.88	4.46	3.94-3.82		
Asp ²	8.26	4.81	2.93		
Lys ³	7.96	4.64			

Pro ⁴		4.47	2.20-1.87	1.98	3.79-3.69
Asp ⁵	7.93	4.79	3.05		
Met ⁶	8.26	4.35	2.17	2.71-2.64	2.12(S-CH ₃)
Ala ⁷	8.02	4.15	1.52		
Glu ⁸	7.69	4.15	2.26	2.57	
Ile ⁹	7.92	3.82	2.07	1.78-1.22	1.02-0.90
Glu ¹⁰	8.44	4.15	2.27	2.68-2.50	
Lys ¹¹	7.95	4.06	2.02	1.54-1.87	
Phe ¹²	8.51	4.33	3.33		
Asp ¹³	9.00	4.43	3.15-2.86		
Lys ¹⁴	8.59	4.11	2.04	1.52-1.75	
Ser ¹⁵	8.13	4.23	4.08-3.97		
Lys ¹⁶	8.36	4.10	2.00	1.62-1.72	
Leu ¹⁷	8.11	4.16	1.84	1.52	0.96
Lys ¹⁸	8.22	4.12	1.98	1.57	
Lys ¹⁹	8.08	3.99	1.66-1.42	1.84	
Thr ²⁰	7.98	4.41	4.05	1.33	
Glu ²¹	8.55	4.17	2.25	2.66-2.51	
Thr ²²	8.13	4.41	4.04	1.33	
Gln ²³	8.08	4.22	2.26	2.56-2.46	CONH ₂ 7.26-6.57
Glu ²⁴	8.17	4.26	2.19	2.65-2.55	
Lys ²⁵	7.99	4.28	1.53-1.33	1.77	1.94
Asn ²⁶	7.97	4.76	2.84		CONH ₂ 7.45-6.63 (AsxC)
NH ₂	7.33-6.84				

Tabella 4.2. *Chemical shifts* protonico (ppm) del peptide TYβ4n a 298 K in TFE/H₂O (70:30; v/v) con TSP come riferimento interno.

a.a	NH	α	β	γ	others
Ser1		4.13	4.01		
Lys2	8.63	4.26	1.87-1.79	1.47	1.70 δ 2.98 ϵ
Leu3	7.86	4.27	1.59	1.59	0.91-0.87
Lys4	7.78	4.27	1.85-1.77	1.42	
Lys5	8.12	4.28	1.87-1.80	1.46	1.69 δ 2.98 ϵ
Thr6	7.90	4.27		1.22	
Glu7	8.21	4.35	2.19-2.06	2.47	
Thr8	7.90	4.27		1.22	
Gln9	8.12	4.28	2.15-2.06	2.37	7.32-6.52
Glu10	8.01	4.30	2.15-2.00	2.45	

Tabella 4.3. *Chemical shifts* protonico (ppm) del peptide TY β 4i a 298 K in TFE/H₂O (70:30; v/v) con TSP come riferimento interno.

a.a.	NH	α	β	γ	others
Leu1		4.03	1.72	1.68	0.94
Lys2	8.38	4.43	1.87-1.76	1.43	1.70
Lys3	8.26	4.37	1.86-1.79	1.45	1.70
Thr4	7.87	4.37	4.31	1.22	
Glu5	8.20	4.44	2.06	2.47-2.18	
Thr6	7.92	4.25	4.28	1.22	
Gln7	8.08	4.34	2.04	2.16-2.37	
Glu8	8.06	4.34	2.02	2.16-2.47	
Lys9	7.99	4.36	1.83-1.74	1.48	1.70
Asn10	8.03	5.01	2.87-2.75		
Pro11		4.49	2.23-2.01	1.99	3.78-3.78
Leu12	7.84	4.58	1.71-1.54	1.68	0.94-0.94
Pro13		4.44	2.22	2.05	3.76-3.60
Ser14	8.01	4.48	4.10-3.95		

Lys15	8.39	4.08	1.87-1.76	1.43	1.70
Glu16	8.17	4.16	2.09	2.49	
Thr17	7.81	4.06	4.31	1.28	
Ile18	7.87	3.79	1.96	0.93	0.85
Glu19	8.14	4.07	2.29-2.18	2.54-2.41	
Gln20	8.15	4.04	2.29-2.18	2.54-2.41	
Glu21	8.23	4.10	2.16-2.27	2.48-2.67	
Lys22	8.35	4.09	1.95-1.70	1.57-1.47	1.70
Gln23	8.08	4.14	2.03	2.16-2.47	
Ala24	8.09	4.22	1.49		
Gly25	8.07	3.93			
Glu26	7.95	4.39	2.10	2.43-2.21	
Ser27	7.91	4.42	3.92		

Tabella 4.4. Chemical shifts protonico (ppm) del peptide TY β 4c a 298 K in TFE/H₂O (70:30; v/v) con TSP come riferimento interno.

Lo studio dei *chemical shifts* del *backbone* di una molecola, è una tra le metodiche maggiormente usate per ottenere informazioni sulla conformazione che peptidi e proteine assumono in determinate condizioni (Wishart *et al.*, 1991). Come si può osservare in figura 4.18a, che riporta le deviazioni dei *chemical shift* dei protoni legati al carbonio in α , rispetto ai valori tabulati per strutture *random* ($\Delta\delta$, differenza tra i *chemical shift* sperimentali e quelli teorici di molecole prive di struttura secondaria) per il peptide TY β 4n, ai primi cinque residui (S¹-D⁵), corrispondeva una variazione in positivo del parametro calcolato, mentre in corrispondenza del tratto M⁶-K¹⁹, $\Delta\delta$ diminuiva drasticamente assumendo valori negativi. Deviazioni in positivo stanno ad indicare un arrangiamento abbastanza flessibile per le prime posizioni in N-terminale della sequenza in esame, diversamente il verificarsi di continui movimenti di stretching con valori di $\Delta\delta < -0.1$ ppm, suggerisce una strutturazione α -elicoidale, a livello della regione 6-19 (Wishart *et al.*, 1991). Tale ipotesi conformazionale è stata confermata anche dal pattern NOE (Figura 4.19). Infatti la presenza di molti effetti NOE di tipo NH_{*i*}-NH_{*i*+1}, assieme a contatti sequenziali NOE α _{*i*}-NH_{*i*+1} e β _{*i*}-NH_{*i*+1}, è riconducibile ad una struttura secondaria ordinata. Inoltre effetti NOE a medio e lungo raggio di tipo α _{*i*}-NH_{*i*+2}, β _{*i*}-NH_{*i*+3} e in particolare α _{*i*}- β _{*i*+3}, confermerebbero che il peptide, a livello del tratto M⁶-K¹⁹, assume una conformazione ad α -elica. Dalle intensità dei contatti NOE è stato ricavato un set di circa 167 distanze interprotoniche (85 intra-residui, 57 sequenziali, e 25 a medio-lungo raggio), che sono

state utilizzate per la successiva fase di costruzione del modello molecolare tramite l'analisi matematico-strutturale DYANA/REDAC. Le distanze sperimentali sono state utilizzate come vincoli per calcolare, un certo numero di strutture che, compatibili con i dati sperimentali, sono collettivamente descrittive del comportamento conformazionale in soluzione di TY β 4n. In figura 4.22 è riportato il *folding* dotato del valore più basso di *target function* e derivato dall'ottimizzazione di 10 strutture mediante calcolo DYANA. Come si può vedere, la sequenza riprodotte il frammento 1-26 della T β 4, presentava estremità piuttosto flessibili, mentre nella regione centrale si riconoscono quasi tre giri di elica che impegnano l'intero tratto da A⁷ a L¹⁷. L'RMSD (*Root Mean Square Deviation*, misura della distanza media tra i *backbone* di strutture proteiche superimposte) esteso agli atomi di *backbone* per la superimposizione di 10 strutture a livello del segmento di struttura secondaria era di $2.20 \pm 1.01 \text{ \AA}^2$.

Dall'analisi NMR di TY β 4i, non si rilevava alcuna propensione del peptide ad adottare una conformazione ordinata in miscela TFE/H₂O 70/30 a 298 K. La deviazione del *chemical shift* dal valore teorico per *random coil*, tende infatti a valori vicini allo zero per tutti i residui. Consistentemente a tali osservazioni è stato ottenuto un pattern di effetti NOE quasi insignificante, a confermare che la sequenza assumeva preferenzialmente un arrangiamento flessibile.

Per ciò che riguarda peptide TY β 4c, i risultati NMR raccolti, indicherebbero invece un coinvolgimento dei residui C-terminali in una struttura ordinata. I valori negativi ottenuti per le deviazioni ($\Delta\delta$) di *chemical shift* suggerirebbero anche in questo caso una conformazione elicoidale (Figura 4.18b). A partire dalla posizione K¹⁵, era presente un'alta densità di effetti NOE a lungo raggio. Un set di 136 vincoli sperimentali ricavati dai dati NOE (56 intra-residuo, 55 sequenziali e 22 a medio e lungo raggio) è stato impiegato per i calcoli strutturali DYANA. La figura 4.23 riporta la conformazione con più basso valore di *target function*, risultato della superimposizione delle 10 migliori strutture ottenute dal calcolo DYANA. Il campione appariva per metà della sequenza (fino al residuo K¹⁴) piuttosto flessibile, mentre il tratto successivo (K¹⁵-Q²³) riarrangiava in una struttura ad α -elica ben definita, con un valore di RMSD calcolato sul *backbone* a livello locale, pari a $1.421 \pm 0.60 \text{ \AA}$.

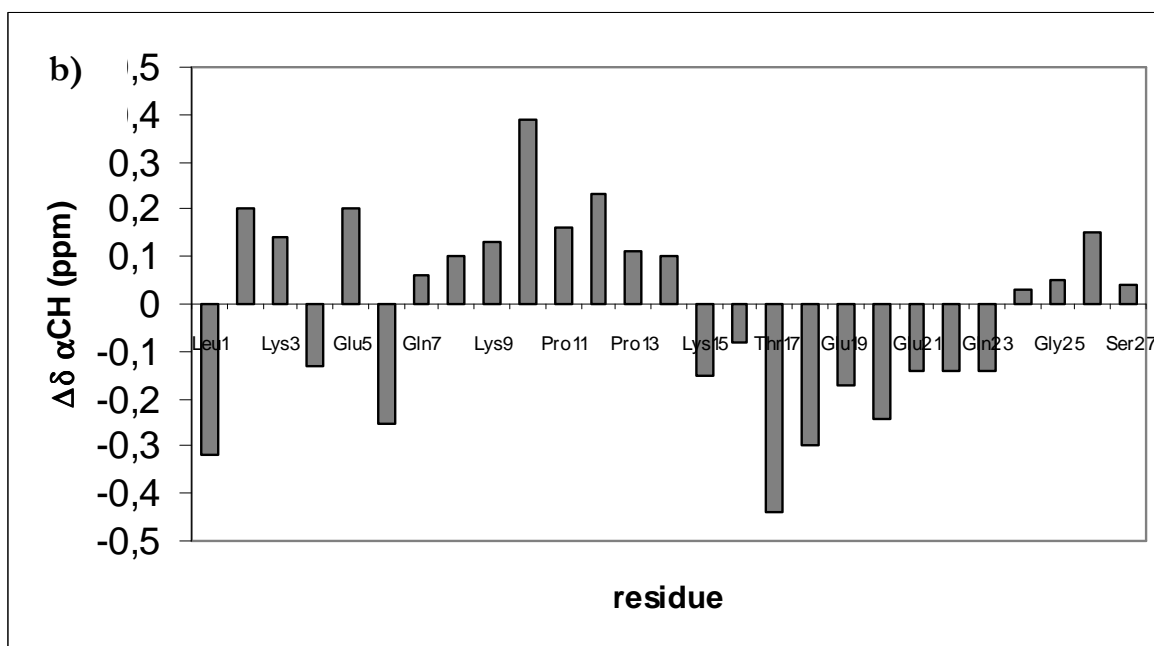
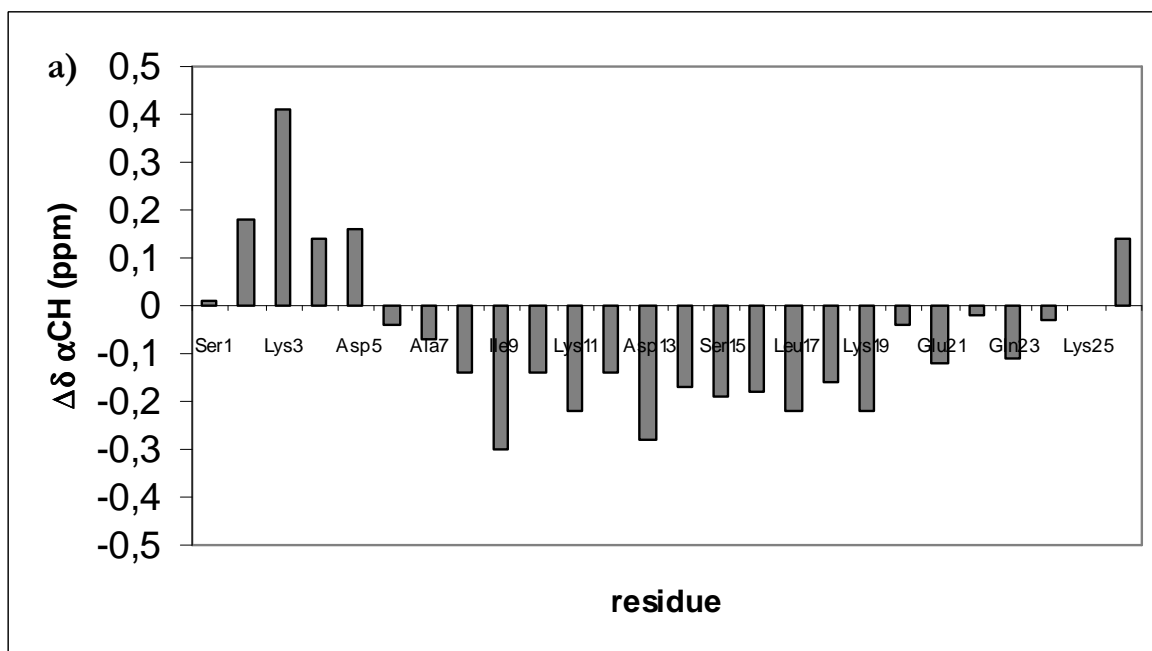


Figura 4.18. Deviazioni dei chemical shift dei protoni αCH rispetto ai valori di random coil ($\Delta\delta_{\alpha\text{CH}}$, ppm) di (a) TY34n e (b) TY34c in soluzione di TFE/acqua 70/30 a 298 K.



Figura 4.19. Istogramma delle intensità dei contatti NOE lungo la catena peptidica misurati in TFE/acqua 70/30 a 298 K per TYβ4n.



Figura 4.20. Istogramma delle intensità dei contatti NOE lungo la catena peptidica di TYβ4c.



Figura 4.21 Superimposizione del *backbone* delle migliori 10 strutture DYANA/REDAC per la regione 8-18 di TY β 4n.

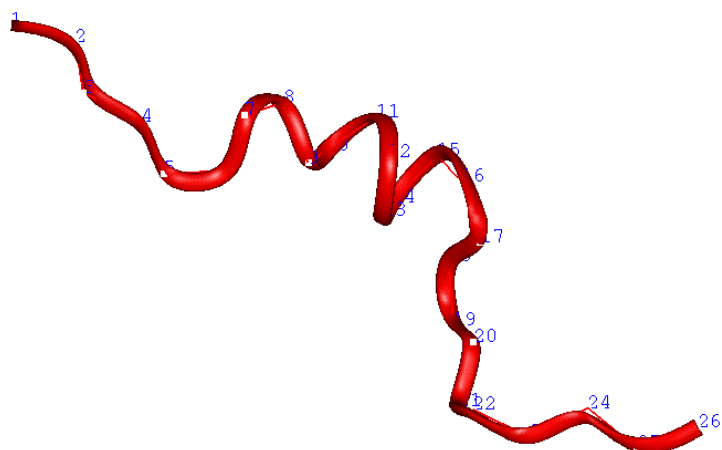


Figura 4.22. Struttura dotata del valore più basso di *target function* per TY β 4n.

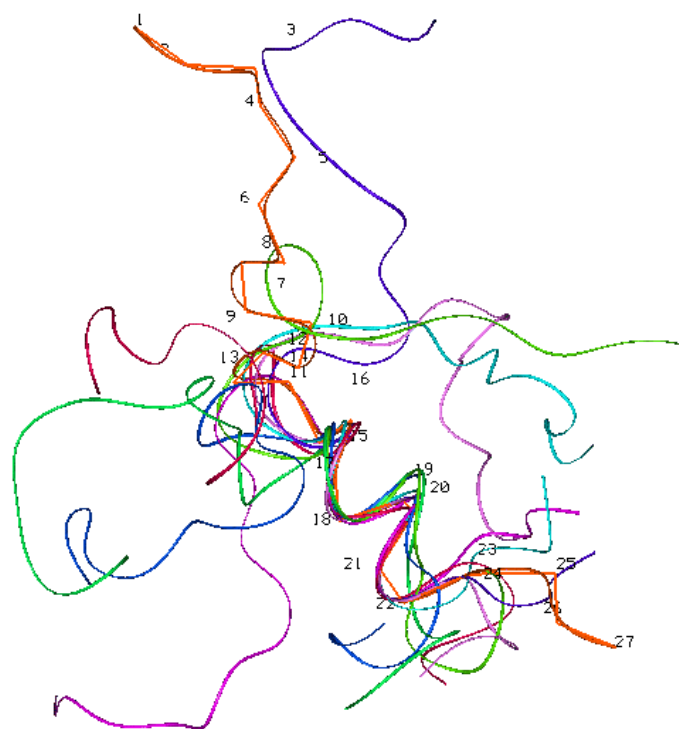


Figura 4.23. Superimposizione del *backbone* delle migliori 10 strutture DYANA/REDAC per la regione 15-23 di TYβ4c.

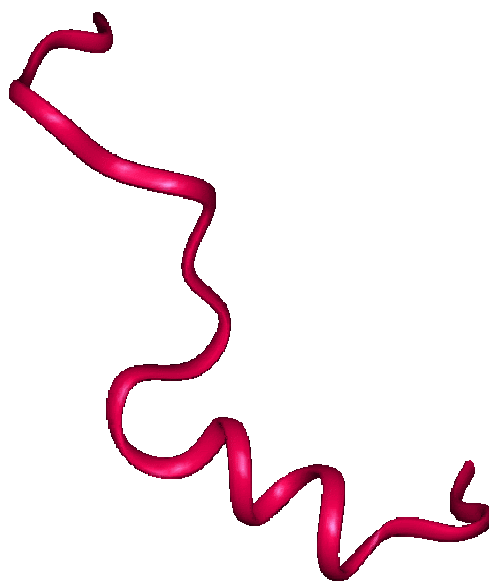


Figura 4.24. Modelli molecolari di TYβ4c ottenuti da analisi computazionale.

4.1.6 Effetti sulla vitalità e sulla proliferazione cellulare

Tutti i derivati della β -timosina, a tutte le concentrazioni testate (0.1 μ M, 1.3 μ M, e 66 μ M), hanno indotto una significativa ($p < 0.05$) diminuzione della vitalità cellulare determinata tramite test con MTT, rispetto alle colture di controllo (Figura 4.25a). Al contrario non sono state osservate variazioni del tasso di incorporazione dell'analogo nucleosidico BrdU all'interno del DNA, fatta eccezione per i due frammenti N e C-terminali, alla dose più elevata (66 μ M), che hanno comportato una significativa, seppur limitata, riduzione della proliferazione delle colture di HUVEC (Figura 4.25b).

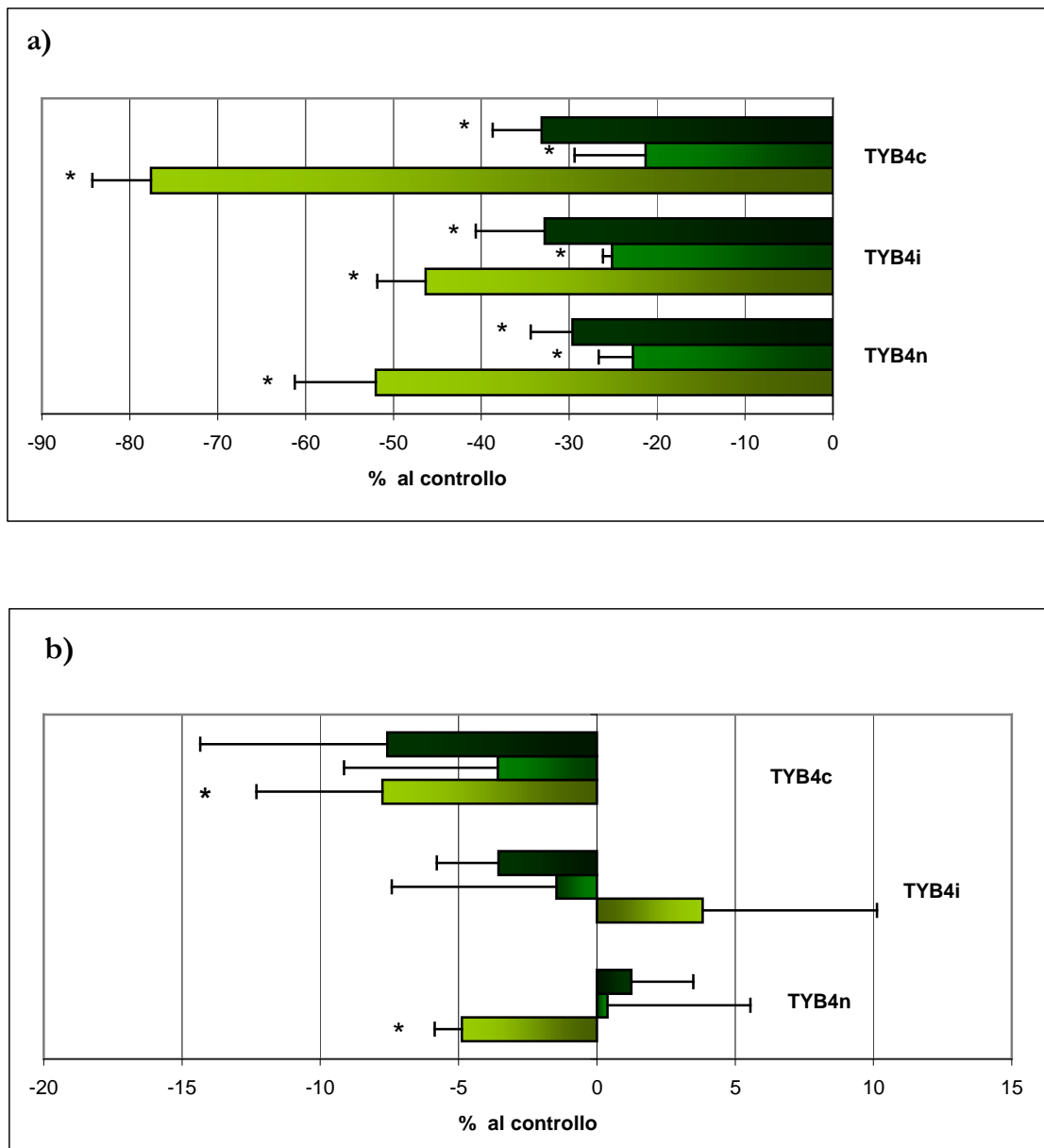


Figura 4.25. (a) Vitalità e (b) proliferazione di HUVEC trattate per 24 ore con peptidi derivati della β -timosina impiegati alle concentrazioni: verde chiaro = 66 μ M, verde = 1.3 μ M e verde scuro = 0.1 μ M. I risultati sono espressi come percentuale rispetto al controllo, rappresentato da cellule non trattate. I dati, espressi come media \pm deviazione standard, sono stati ottenuti da 3 esperimenti. * $p < 0.05$. t-test di Student.

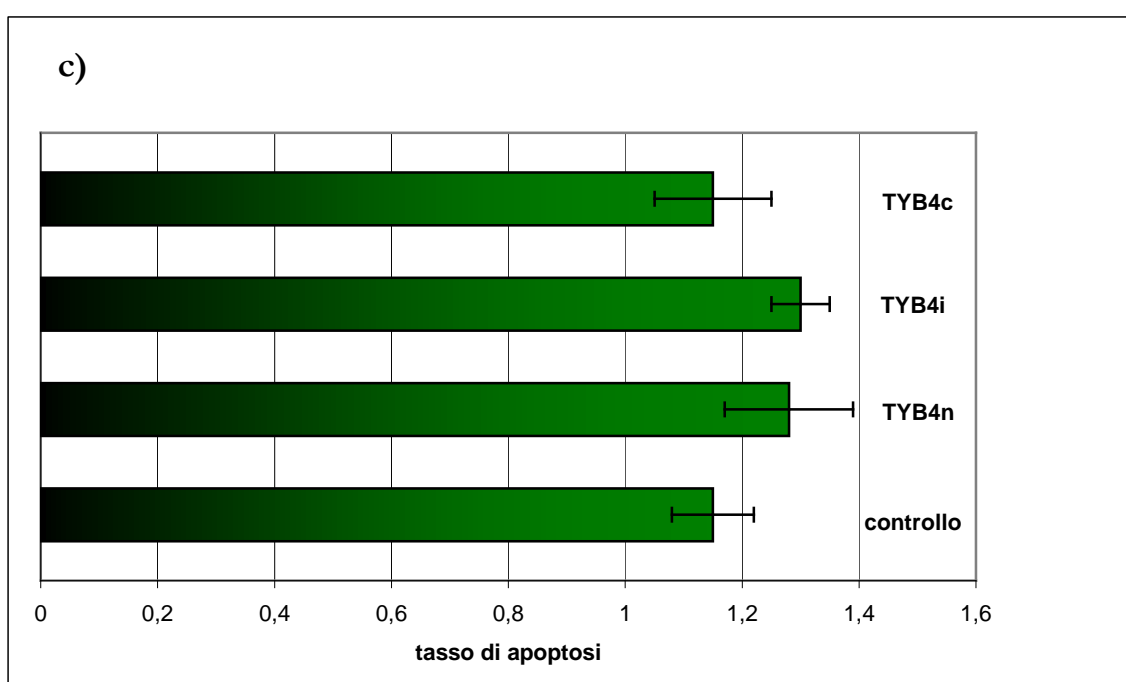
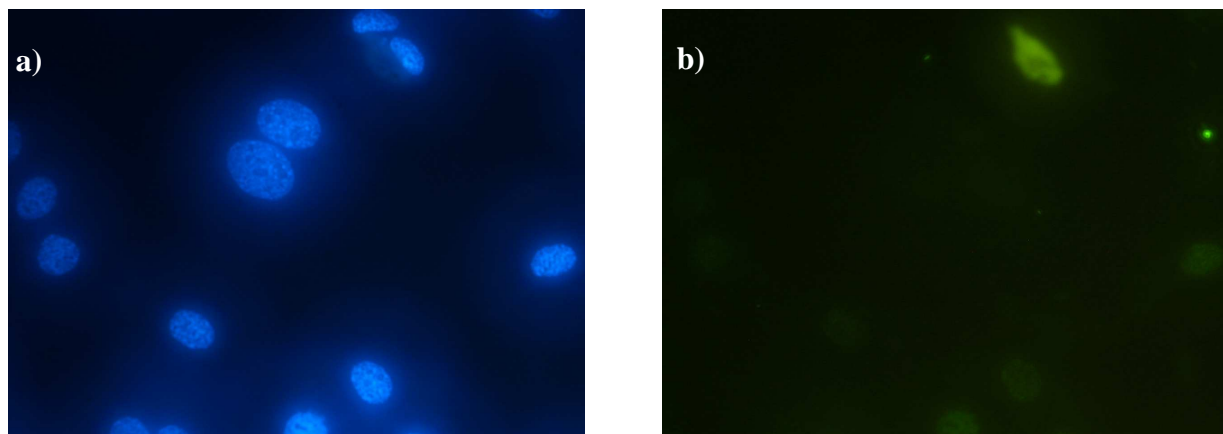


Figura 4.26. (a) Cellule DAPI-positive, (b) cellule TUNEL-positive, in colture di HUVEC trattate per 24 h con 1.3 μM TB4i. (c) Effetti dei peptidi della β -timosina, utilizzati in concentrazione pari a 1.3 μM , sul tasso di apoptosi di HUVEC, quantificati tramite saggio TUNEL, dopo 24h di incubazione. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard. t test di Student.

4.1.7 Effetti citotossici

Il trattamento per 24 h con i derivati della β -timosina alla concentrazione di 1.3 μM , non ha comportato alcuna alterazione del rilascio di LDH (dati non mostrati), né ha portato alcuna variazione del tasso di apoptosi nelle colture di HUVEC (Figura 4.26).

4.1.8 Effetti sulla morfogenesi *in vitro*

Una volta seminate su Matrigel, le cellule endoteliali, tendevano ad allinearsi reciprocamente in modo da formare strutture tubulari ramificate, con giunzioni multicentriche, che in un arco temporale di 18 h, portavano alla formazione di una rete di strutture simil-capillari (Figura 4.27a). Il motivo TYβ4n, impiegato alla concentrazione di 66 μM (Figura 4.27b), comporta un incremento della densità di strutture a maglia rispetto al campione di riferimento non trattato. L'analisi d'immagine (Figura 4.28) ha confermato queste osservazioni. Infatti per il peptide N-terminale della β-timosina al dosaggio di 66 μM induceva un significativo aumento sia dei parametri dimensionali (% dell'area ricoperta dalle HUVEC e la lunghezza totale dei contatti, per campo) che di quelli topologici (numero di magli e di punti di ramificazione, per campo). Tale effetto era comparabile con quello ottenuto a seguito dell'incubazione delle cellule con la citochina FGF-2 (50 ng/mL). Concentrazioni più basse del fattore TYβ4n, comportavano anch'esse, variazioni significative di una parte dei parametri quantificati: la lunghezza totale e il numero delle ramificazioni a 0.1 μM, diversamente, dopo trattamento con 1.3 μM si aveva un incremento del solo numero di maglie.

L'efficacia dimostrata dalle altre due sequenze, TYβ4i e TYβ4c, è risultata minore, in confronto a quella riportata per il tratto ammino-terminale, ed una modesta stimolazione differenziativa si è osservata solo a seguito dell'incubazione con la concentrazione più alta (66 μM).

4.1.9 Effetti sull'angiogenesi *in vivo*

La valutazione al microscopio delle CAM trattate con i tre motivi peptidici alla concentrazione di 50 μM, hanno evidenziato, come gli impianti fossero circondati da vasi provenienti dallo strato allantoideo con deposizione radiale tutt'attorno al *patch*, con caratteristico pattern "a raggi di ruota" (Figura 4.29a). In termini quantitativi il numero medio di vasi che circondavano gli impianti era pari a 29±3 per TYB4n; 27±4 per TYB4i e 28±2 per TYB4c; e risultava statisticamente superiore ($p < 0.001$) rispetto a quello registrato per il trattamento con il solo veicolo, PBS, pari a 8±2 (Figura 4.29c). Inoltre la risposta angiogenica indotta dai campioni in esame è risultata comparabile a quella esercitata dal fattore FGF-2, noto per stimolare eventi di neovascolarizzazione. Il valore medio dei vasi contati attorno alle spugne trattate con la chemochina era pari a di 30±3, ($p < 0.001$ rispetto al controllo negativo; Figura 4.29b).

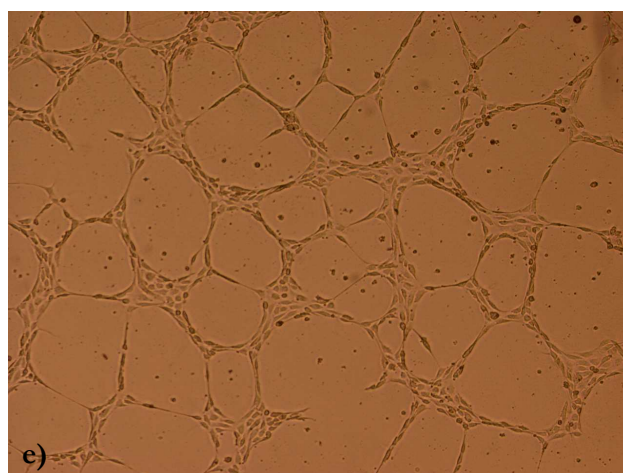
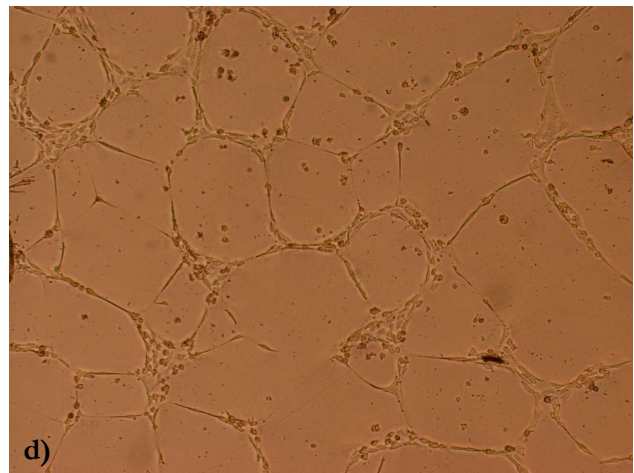
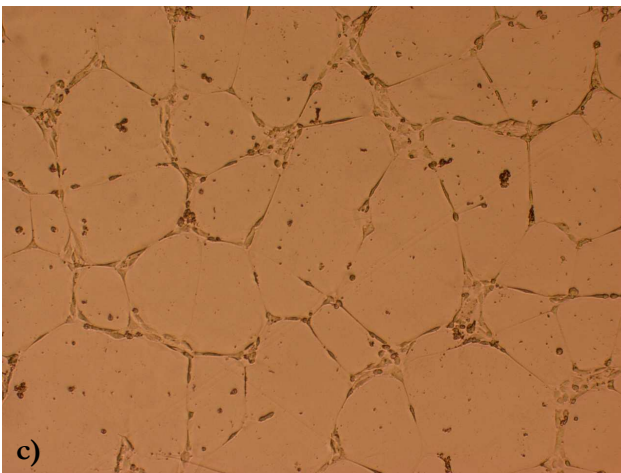
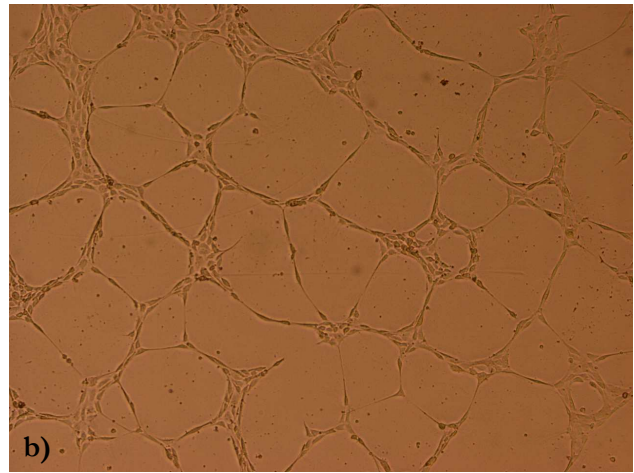
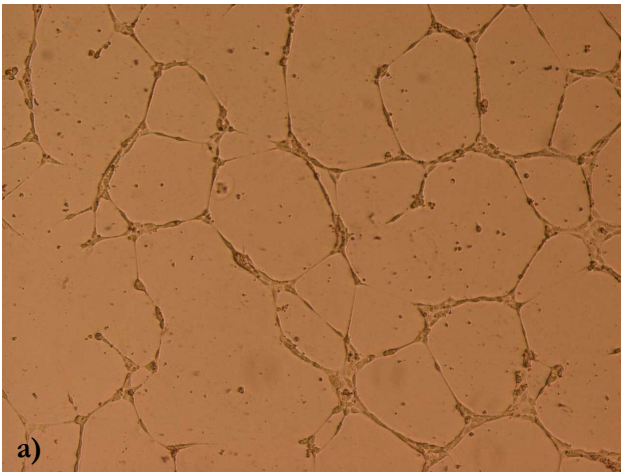
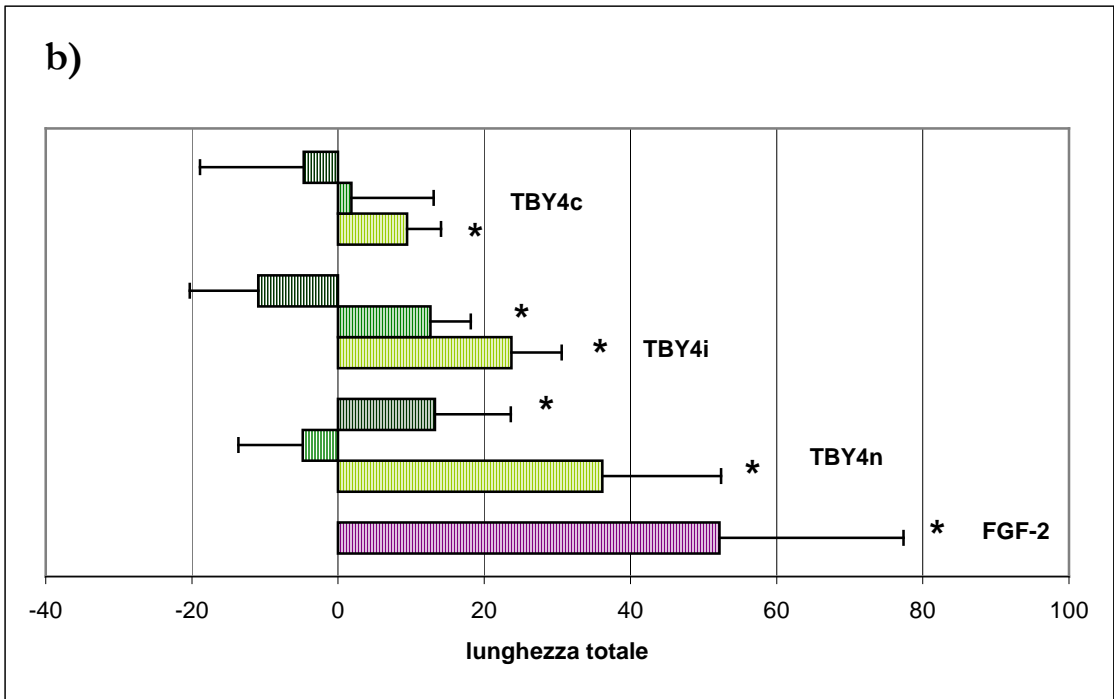
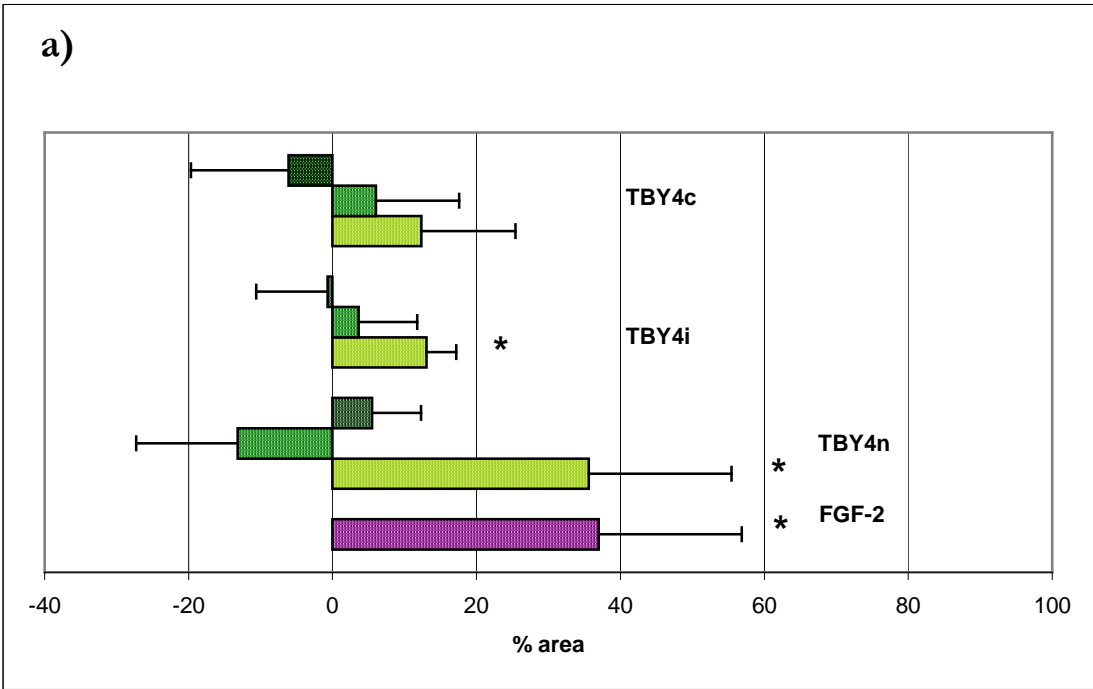


Figura 25: HUVEC coltivate su Matrigel: a) controllo; b) cellule trattate con 66 μ M TY β 4n; c) cellule trattate con 66 μ M TY β 4i; d) cellule trattate con 66 μ M TY β 4c; E) cellule trattate con 50 ng/mL FGF-2. Ingrandimento x50.



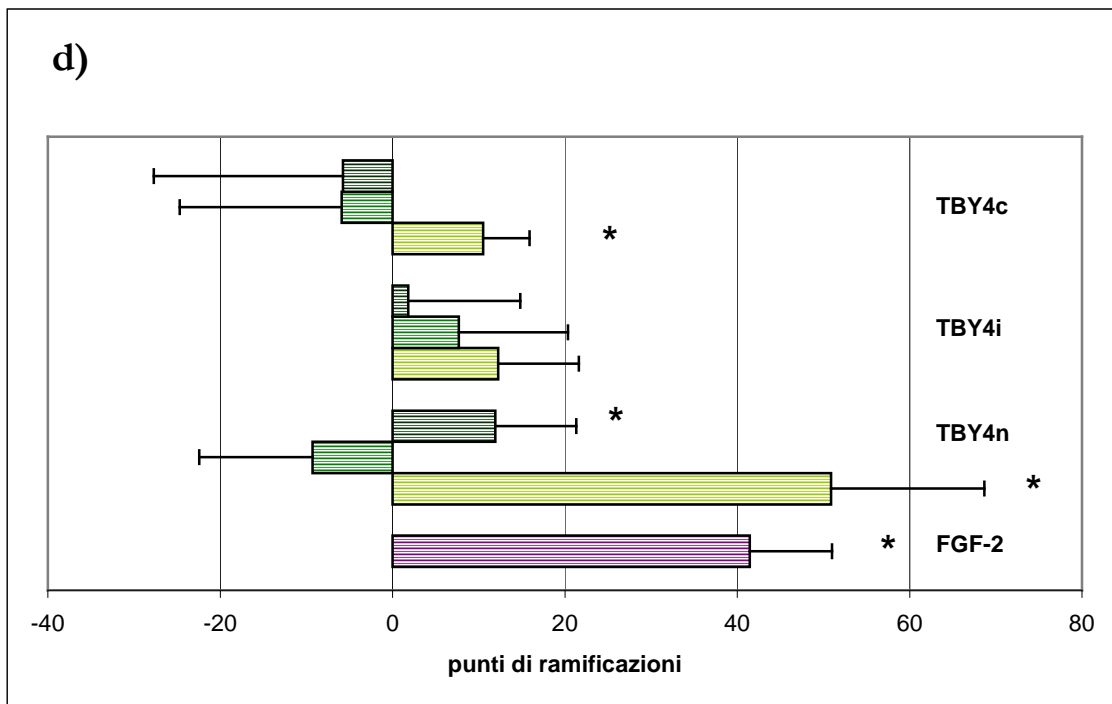
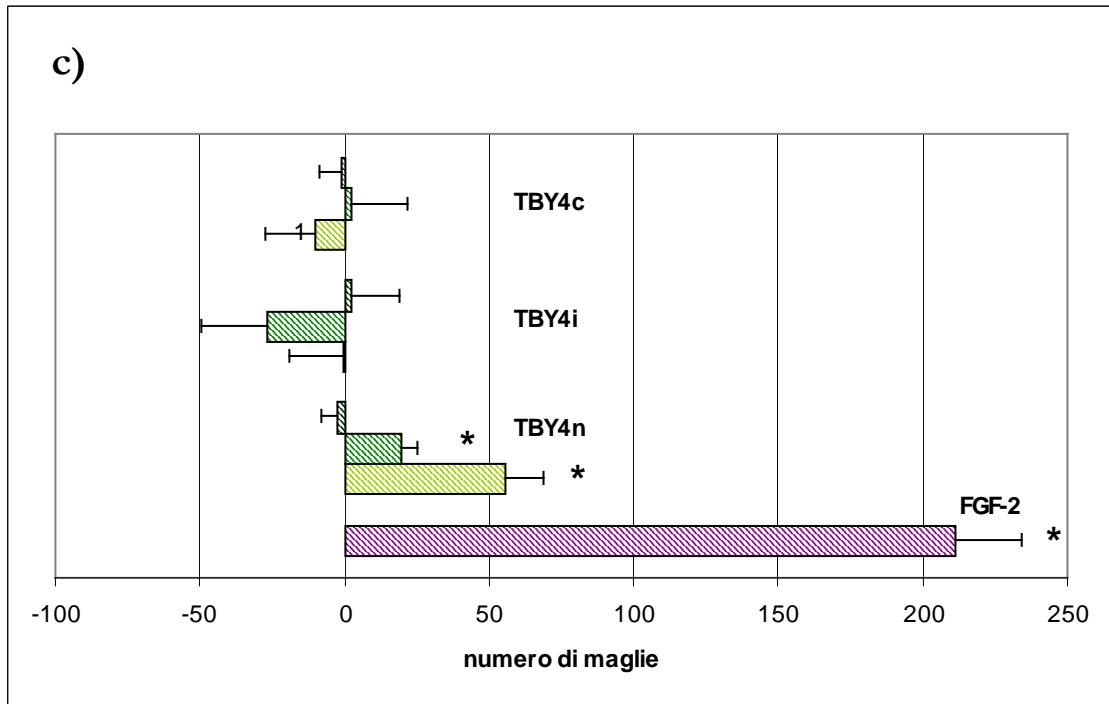


Figura 4.28. Analisi quantitative degli effetti dei peptidi $\text{TY}\beta 4\text{n}$, $\text{TY}\beta 4\text{i}$ e $\text{TY}\beta 4\text{c}$ sui parametrici dimensionali (area percentuale ricoperta dalle cellule (a) e lunghezza totale (b) per campo) e su quelli topologici (numero di maglie (c) e numero dei punti di ramificazione (d) per campo) delle strutture a maglie formate dalle HUVEC seminate su Matrigel per 18h. I dati sono espressi come percentuale rispetto alle colture di controllo non trattate e gli istogrammi (verde chiaro = 66 μM , verde = 1.3 μM e verde scuro = 0.1 μM) corrispondono al valore della media \pm deviazione standard di 4 esperimenti. * = $p < 0.05$. t test di Student.

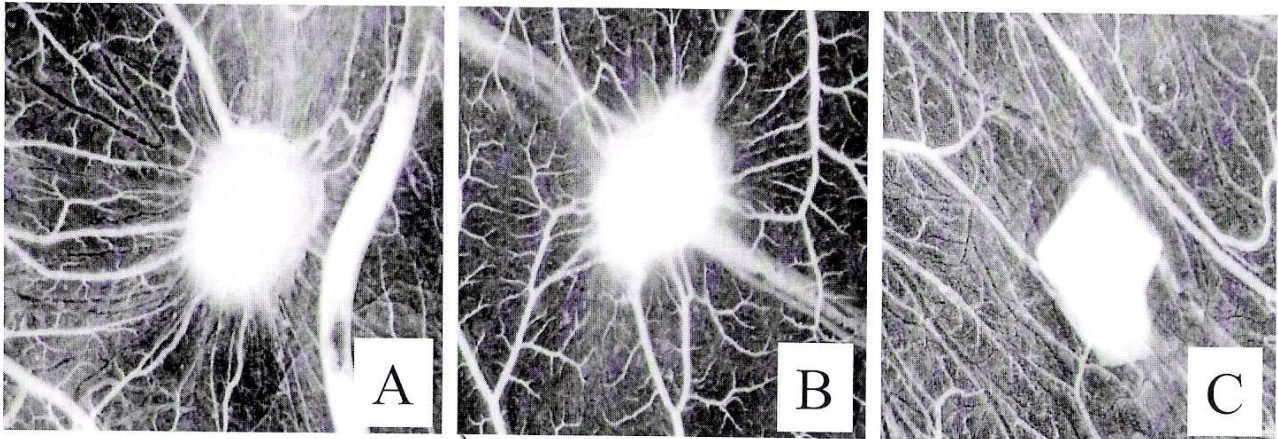


Figura 4.29. Immagini al microscopio degli impianti di gelatina con adsorbiti i fattori (a) TY β 4n alla concentrazione 50 μ M e (b) FGF-2 alla concentrazione 200 ng/embrione, impiantati sulla membrana corioallantoidea di embrioni di pollo, dopo 12 giorni di incubazione. Dalle foto si può notare un significativo sviluppo radiale di vasi attorno alle spugne trattate, diversamente nei *patch* di controllo trattati con solo veicolo PBS (c), non è rintracciabile alcuna risposta angiogenica. Ingrandimento (A-E) x50.

2. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, un gran numero di evidenze sperimentali hanno portato a concludere che il polipeptide T β 4, possa rappresentare un promettente agente terapeutico non solo per favorire la cicatrizzazione delle ferite, ma anche per il trattamento di stati patologici scatenati da eventi ipossici come l'infarto al miocardio, l'ischemia cerebrale e malattie all'apparato vascolare periferico (Goldstein *et al.*, 2005). Il tutto è supportato dalla partecipazione della β -timosina in meccanismi protettivi e/o di recupero di tessuti lesionati dalla carenza di un'adeguata ossigenazione, a questo si somma il marcato effetto pro-angiogenico esercitato sia *in vitro* che *in vivo* (Koutrafouris *et al.*, 2001; Huff *et al.*, 2002). Il fattore presente a livello extracellulare, è legato e internalizzato dalle cellule, probabilmente attraverso l'instaurarsi di interazioni con l'actina esposta a livello della membrana cellulare (Philp *et al.*, 2003). L'azione angiogenica manifestata, è attribuibile principalmente al motivo amminoacidico ¹⁷LKKTET²², di *binding* per l'actina. Sequenza che è presente anche nei tre peptidi di sintesi utilizzati in questo lavoro di ricerca:

- TY β 4n, corrispondente al tratto amino-terminale, prodotto fisiologicamente dall'attività di endoproteasi, e responsabile sia della localizzazione nucleare, che di un'azione anti-infiammatoria;
- TY β 4i, riprodotto il tratto centrale della proteina nativa;
- TY β 4c, frammento sovrapponibile alla porzione carbossi-terminale di T β 4.

La strategia di sintesi peptidica automatizzata su fase solida, con chimica Fmoc, ha permesso di ottenere come prodotto principale per tutte e tre le sequenze progettate, il peptide di interesse.

Tuttavia per i campioni TY β 4n e TY β 4i è stata ottenuta una resa di sintesi bassa, rispettivamente del 10% e 25% circa, per la presenza nei grezzi di una percentuale non trascurabile di sequenze secondarie indesiderate. La causa più probabile è una riduzione dell'efficienza della reazione di sblocco del gruppo protettore N-terminale Fmoc e/o della reazione di condensazione. Queste circostanze sono riconducibili spesso a fenomeni di aggregazione dei peptidi in crescita sulla fase solida. Infatti sulla base di predizioni statistiche sul grado di difficoltà nella sintesi delle sequenze, che indicavano la presenza di tratti con tendenza ad aggregare (⁶MAE⁸ e ¹⁶KLK¹⁸), sono stati aumentati i tempi di reazione per la formazione del legame peptidico e sono stati impostati *coupling* doppi, in modo da la resa di reazione. La sintesi di TY β 4i ha portato ad ottenere 3 prodotti secondari: una sequenza deleta del residuo S¹¹ e gli analoghi Fmoc-protetti sia del campione TY β 4i che del peptide troncato all'N-terminale. Nel caso della sintesi del campione TY β 4n, si sono ottenute sequenze indesiderate in maggior numero, mancanti di uno o più residui, localizzati principalmente a livello delle regioni caratterizzate da una maggior tendenza a creare interazioni intra- ed inter-catena.

Proprio a causa della complessità dei prodotti grezzi, la fase di purificazione è risultata impegnativa. In particolare per TY β 4n, le impurezze sono risultate insolubili in solvente acquoso, dando precipitati o forme di aggregazione irreversibile al variare del pH (4-10) e della polarità del solvente (soluzioni acquose, etanolo, acetonitrile, DMS). Nonostante ciò la purificazione ha fornito prodotti di omogeneità superiore al 98%.

Studi conformazionali eseguiti sulla proteina nativa timica, indicano la tendenza ad assumere, in soluzione acquosa a temperatura ambiente, una struttura altamente flessibile; al diminuire della temperatura a 14°, a livello dei residui 5-16, si assiste ad una strutturazione ad α -elica. È necessario porsi in condizioni di temperatura vicino a 1°, per poter osservare anche nel tratto C-terminale (posizione 31-37) una conformazione elicoidale (Czisch *et al.*, 1993). Questa propensione conformazionale della T β 4 è inoltre presente in miscele di acqua e alcoli fluorurati, a temperatura ambiente (Simenel *et al.*, 2000; Zarbock *et al.*, 1990). Per quanto riportato in letteratura, lo studio NMR delle tre sequenze di sintesi della β -timosina, è stato condotto in miscele 70% trifluoroetanolo (TFE) in acqua. In questa soluzione, le proprietà conformazionali dei frammenti, risultano paragonabili a quelle dei corrispondenti tratti all'interno della proteina. Il modello molecolare ottenuto mediante analisi NMR e metodi computazionali per il peptide TY β 4n (sequenza Ac-S¹-N²⁶), ha evidenziato una struttura ad α -elica che si estende dalla posizione A⁷ a K¹⁸. Sebbene di ugual lunghezza rispetto a quello presente nella proteina intera (frammento P⁴-K¹⁶), il tratto di struttura secondaria risulta spazialmente traslato in direzione C-terminale, coinvolgendo nell'elica anche uno o due residui del sito di legame per l'actina (¹⁷LKKTET²²). Questo stesso motivo funzionale, all'interno dei due frammenti isolati TY β 4i e TY β 4c, non assume alcuna organizzazione strutturale ordinata. Il peptide centrale adotta, nella miscela TFE/H₂O usata, un *folding random*, simile a quello attribuito al medesimo tratto della limosina nativa. Diversamente in

TY β 4c, il tratto flessibile di 14 residui è seguito da una zona organizzata in α -elica e che si estende dal residuo K¹⁵ a E²³ (sequenza 31-37 nella proteina nativa). Questa seconda elica, nel polipeptide timico inizia più precisamente dall'amminoacido K³⁰ occupando così una regione più lunga di un residuo.

L'analisi conformazionale NMR, ha dimostrato che ogni frammento di sintesi è capace di riprodurre, ponendosi in analoghe condizioni, il *folding* adottato dalla sequenza nativa.

Come ulteriore conferma di quanto detto, gli spettri di dicroismo circolare, hanno mostrato una struttura disordinata sia in soluzione al 98% di alcol fluorurati che in solventi acquosi. Diversamente i due peptidi corrispondenti ai tratti terminali, sebbene anch'essi risultino molto flessibili assumono conformazioni più ordinate in presenza di solventi fortemente elicizzanti quali TFE e in parte 1,1,1,3,3,3-esfluoro-2-propanolo.

Dal punto di vista dell'attività biologica, tutte e tre le sequenze testate hanno causato una significativa riduzione della vitalità cellulare, mentre il solo trattamento delle colture con TY β 4n e TY β 4c, alla concentrazione più elevata (66 μ M) ha influito negativamente sulla proliferazione cellulare. Questi effetti non sembrano essere legati al verificarsi di processi apoptotici o necrotici, visto che non si è osservata alcuna variazione sia del numero di cellule TUNEL-positive che nel rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi (dati non mostrati), tra le HUVEC incubate per 24h con i derivati proteici e le cellule di controllo non trattate. L'azione della molecola nativa sulla sopravvivenza cellulare sembra in gran parte dipendere dal tipo cellulare. Infatti, è stata osservata una inibizione della proliferazione cellulare in linfociti T e in cellule endoteliali (Grant et al., 1995), mentre un'induzione in linee cellulari tumorali (Wang et al., 2003). Bock-Marquette e collaboratori (2004), hanno inoltre osservato che T β 4 esercita un effetto protettivo sui cardiomiociti, tramite modulazione del metabolismo cellulare e/o delle interazioni cellula-cellula. Un meccanismo plausibile sembra essere quello di "ibernazione", che comporterebbe variazioni del metabolismo e della quantità di energia spesa per le funzioni cellulari. L'espressione stessa della proteina non è costante e risulta correlata al ciclo cellulare, durante il quale si hanno aumenti dei livelli intracellulari in corrispondenza della fase di transizione G₀/G₁ e in quella S, di duplicazione (Schöbits et al., 1991).

I risultati sperimentali ottenuti, valutati assieme a quanto già noto, suggerirebbero che le tre sequenze peptidiche abbiano un'azione inibitoria sul metabolismo. Il saggio MTT utilizzato in questa tesi per valutare l'effetto dei peptidi sulla vitalità cellulare fornisce informazioni sulla capacità delle cellule di trasformare il sale di tetrazolo e quindi sul grado di attività metabolica presente. La diminuzione nella percentuale di cellule vitali, osservata in seguito a trattamento con i tre derivati peptidici, quindi può essere imputabile in realtà ad alterazioni del ciclo cellulare, o ad un rallentamento delle funzioni metaboliche. Tutti i peptidi, sebbene in misura diversa, sono stati in grado di stimolare la formazione di strutture tubulari su Matrigel. Una maggiore attività stimolatoria è stata osservata dopo trattamento con il peptide TY β 4n, e l'effetto era in parte comparabile a quello evocato da FGF-2 (alla concentrazione di 50 ng/mL).

Si può ipotizzare che la marcata attività di T β 4n, sia imputabile ad una più forte interazione con l'actina, in quanto all'interno del tratto amino-terminale considerato, sono presenti entrambi i siti di legame per l'actina (Vancompernelle et al., 1992). Inoltre nella sequenza è presente il motivo ¹⁴KSKLKK¹⁹ costituito da un cluster di residui carichi positivamente, e responsabile secondo gli studi condotti dal Dr. Huff (Huff et al., 2004) della traslocazione della β -timosina nel nucleo. In questa sede, è stata avanzata l'ipotesi che il polipeptide nativo, oltre a preservare il pool nucleare di G-actina, eserciti una funzione di regolatore dell'espressione genica. Come fattore di trascrizione, T β 4, attiverebbe vie di segnale coinvolte in processi quali il differenziamento cellulare e l'angiogenesi. In conclusione, i risultati ottenuti confermano il ruolo centrale della sequenza di legame all'actina nell'indurre *in vitro* gli effetti pro-angiogenici della proteina e l'importanza della porzione N-terminale come modulatore positivo di tale attività.

Ulteriori studi saranno condotti per verificare la capacità dei derivati peptidici di T β 4 di migliorare il recupero delle funzioni in modelli animali di danno ipossico, come quello causato da infarto al miocardio.

5. PEPTIDI PRO-ANGIOGENICI

STROMAL DERIVED FACTOR-1

Le chemochine sono piccole citochine pro-infiammatorie coinvolte in numerose reazioni immunitarie, quali infezioni e infiammazioni, e nella riparazione di tessuti. Questa classe di proteine è conosciuta per l'effetto stimolante la migrazione cellulare, non solo delle cellule coinvolte nelle risposte infiammatorie, ma di diversi tipi cellulari, anche durante l'embriogenesi. Inoltre, sembrano avere un ruolo essenziale nel processo di metastatizzazione delle cellule tumorali.

Le chemochine possono essere divise in 4 gruppi in base alla struttura e alla sequenza primaria aminoacidica: CXC, CC, C o CX3C (Schall *et al.*, 1994; Rollins, 1997). La presenza di un motivo strutturale di tre aminoacidi Glu-Leu-Arg (ELR) prossimale alla porzione amino-terminale è stata correlata alla capacità di stimolare l'angiogenesi da parte delle chemochine (Strieter *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1998). Tuttavia, nonostante la classe CXC non presenti questo motivo aminoacidico, una chemochina appartenente a questo gruppo, detta Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1), ha mostrato una potente azione chemoattrattiva per cellule endoteliali che ne esprimono il recettore e un coinvolgimento in eventi angiogenici indotti da VEGF e bFGF (Salcedo *et al.*, 1999). SDF-1 rappresenta un'eccezione anche nel caso del recettore, denominato CXCR4, dato che esiste una correlazione univoca nel *binding* tra i due. Le altre chemochine, invece, possono interagire con diversi recettori e lo stesso recettore può legare più di un tipo di chemochina (recettori promiscui) (Horuk, 2001). Il recettore, a sette domini transmembrana, è espresso quasi ubiquitariamente nell'organismo, e sulle cellule endoteliali subisce una sovra-regolazione da parte di fattori di crescita angiogenici (Mirshahi *et al.*, 2000). La chemochina esiste principalmente in due forme dovute a *splicing* alternativo: SDF-1 α , isoforma predominante di 68 aminoacidi, e SDF-1 β , che differisce solo per la presenza di 4 residui aggiuntivi alla terminazione carbossilica. Entrambe le forme risultano attive come monomeri, tuttavia, ad alta concentrazione, possono dimerizzare mediante associazione con oligosaccaridi ricchi di gruppi tiolici come i proteoglicani eparan solfato. SDF-1, infatti, viene selettivamente immobilizzato a livello dei proteoglicani della ECM o della superficie cellulare, grazie all'instaurarsi di interazioni elettrostatiche tra cluster di residui basici, presenti nella citochina, e gruppi cariche negativamente nelle catene saccaridiche. Questo tipo di interazione riveste un ruolo importante per la chemochina nella

formazione di elevate concentrazioni locali o di gradienti, promuovendone inoltre la presentazione al recettore e favorendo l'attivazione di processi di rimodellamento tessutale.

La zona centrale della proteina (core) contiene numerosi potenziali siti di legame per i glicosamminoglicani, a cui si somma un effetto cooperativo del tratto carbossi-terminale, che si manifesta in modo più accentuato nella forma SDF-1 β , per la presenza della sequenza aggiuntiva ⁶⁸KRFK⁷¹ che contiene il motivo minimo di legame per l'eparina BBXB (B: residuo basico; X: un qualsiasi aminoacido).

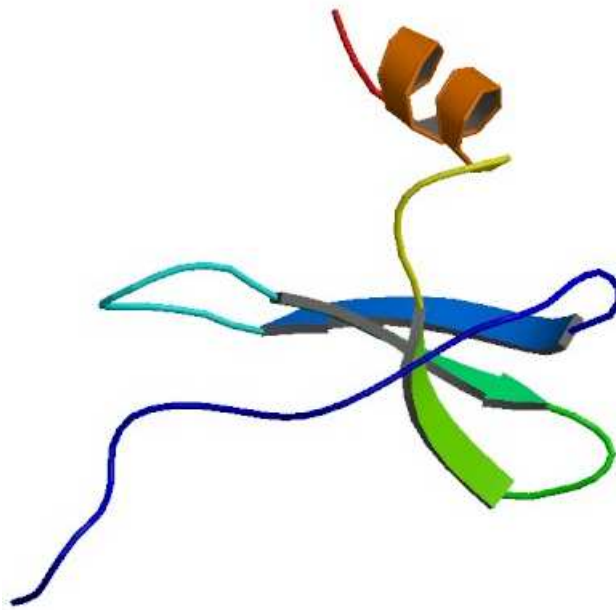


Figura 5.1. Struttura della chemochina SDF-1.

La porzione amino-terminale, ha un ruolo fondamentale nel *binding* col recettore e nell'attivazione della trasduzione del segnale intracellulare. Quest'ultimo sembra indurre più vie legate al *trafficking* cellulare e all'interazione cellule-ambiente circostante e che comportano l'attivazione di flussi di Ca²⁺ e di eventi fosforilativi mediati da proteine G_{αi}, fosfolipasi-C γ (PLC γ), protein chinasi C (PKC), il coinvolgimento dell'asse PI-3K-AKT, con conseguente variazione dell'espressione genica mediata dalla cascata delle MAPK e dal sistema Jack/STAT, e modificazioni citoscheletriche e della membrana plasmatica che coinvolgono le strutture definite "adesioni focali" (Ganju *et al.*, 1998; Tilton *et al.*, 2000; Chernock *et al.*, 2001; Helbig *et al.*, 2003; Neuhaus *et al.*, 2003).

SDF-1 è prodotta e secreta nello spazio extracellulare da vari tipi cellulari, tra cui le cellule stromali, le cellule endoteliali vascolari, i fibroblasti, gli osteoblasti, le cellule endoteliali del midollo osseo, gli astrociti e le cellule dendritiche (Pablos *et al.*, 1999; Ponomaryov *et al.*, 2000; Tanabe *et al.*, 1997). Questa

chemochina svolge un ruolo essenziale nell'embriogenesi, nei processi di ematopoiesi e nello sviluppo del sistema nervoso e cardiovascolare. Il suo coinvolgimento dell'organogenesi e nello sviluppo del sistema vascolare è evidenziato da studi condotti impiegando topi *knock-out* per il gene *sdf-1*, i quali solitamente non sopravvivono oltre il periodo prenatale o sono affetti da gravi anomalie a cuore, cervello e sistema vascolare (Nagasawa *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1998; Bagri *et al.*, 2002; Lazarini *et al.*, 2003). Inoltre, topi che non esprimono il recettore CXCR4, presentano difetti nella formazione e nella struttura dei vasi di grosso calibro del tratto gastrointestinale (Ma Q *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 1998). L'incremento dell'espressione di SDF-1 nei tessuti lesi, anche in quelli che solitamente non lo sintetizzano, influenza il movimento delle cellule che esprimono il recettore CXCR4, esplicando così un'importante modulazione, non solo nei processi infiammatori, ma anche nella rigenerazione e riparazione tissutale (Pituch-Noworolska *et al.*, 2003; Kucia *et al.*, 2004; Ratajczak *et al.*, 2004). Gli effetti biologici di SDF-1 sono collegati alla sua capacità di indurre motilità, chemiotassi, adesione e secrezione di MMP e fattori angiogenici (come NO e VEGF) da parte delle cellule che esprimono CXCR4 (Janowska-Wieczorek *et al.*, 2000; Marquez-Curtiz *et al.*, 2001).

Studi dimostrano che SDF-1 induce in modelli sia *in vitro* che *in vivo* un effetto pro-angiogenico, favorendo la proliferazione delle cellule endoteliali, il processo di morfogenesi tubolare, la migrazione e il reclutamento di cellule progenitrici endoteliali e lo *sprouting* dei vasi. La chemochina agisce sia in modo diretto, stimolando soprattutto la migrazione e la riorganizzazione cellulare per la formazione della struttura tubolare primitiva, che indirettamente, favorendo il rilascio di fattori di crescita da parte di mast cellule (che sono coinvolte nell'angiogenesi per la produzione di Il-8, VEGF e bFGF) (Lin T-J *et al.*, 2001) e delle cellule endoteliali, instaurando un *loop* autocrino in cui le cellule endoteliali che esprimono CXCR4 vengono stimulate da SDF-1 alla produzione di VEGF, il quale incrementa l'espressione, da parte delle cellule stesse, del recettore per SDF-1 (Mirshahi F *et al.*, 2000). I fattori SDF-1 e VEGF agiscono, quindi, in modo sinergico e additivo, completandosi a vicenda.

Dato il ruolo di mediatore positivo verso l'angiogenesi, e di chemoattrattore, SDF-1 viene largamente espresso anche dalle cellule di vari tumori, sia solidi (tumore mammario, alle ovaie, al pancreas, ai polmoni, glioma e neuroblastoma) che ematologici, promuovendo lo sviluppo della massa tumorale, soprattutto attraverso l'induzione della vascolarizzazione, e favorendo il processo di metastatizzazione, grazie all'azione chemoattrattiva, da parte di SDF-1, delle cellule tumorali che sovraesprimono il recettore CXCR4 (Homey *et al.*, 2002; Kucia *et al.*, 2004).

Il coinvolgimento della citochina SDF-1 in molteplici eventi fisio-patologici, soprattutto nei processi legati all'angiogenesi, ha reso l'asse SDF-1-CXCR4 molto "interessante" dal punto di vista terapeutico-farmacologico. Il *design* di agenti che interferiscano con tale sistema può costituire un promettente approccio, sia per il trattamento dei tumori, nel caso di antagonisti, che per la cura di disordini

all'apparato cardiovascolare (Carr *et al.*, 2006) o per migliorare l'*engraftment* nel trapianto di progenitori ematopoietici del midollo osseo (Kucia *et al.*, 2004), se si considerano molecole dall'azione agonista.

Strutturalmente come accennato in precedenza, SDF-1 consiste in tre regioni distinte: i) il tratto flessibile N-terminale, ii) il *core*, caratterizzato da *tre* β -*strand* antiparalleli e iii) il terminale carbossilico ad α -elica (Ohnishi *et al.*, 2000).

La sequenza 1-18 costituisce il sito di legame recettoriale, in particolare le posizioni K¹ e P² sono indispensabili per l'attivazione della cascata del segnale intracellulare, mentre la presenza del motivo ¹²RFFESH¹⁷ risulta necessaria nelle fasi iniziali di *docking* tra recettore e ligando (Heveker *et al.*, 1998). Attualmente non è ancora completamente chiaro se il tratto carbossi-terminale svolga solamente un'azione coadiuvante e modulatoria, sia nell'evocare un più potente segnale intracellulare che nell'instaurarsi di interazioni coi GAG. Luo e collaboratori (1999) studiando le proprietà di un polipeptide chimerico, derivato dalla fusione tra i due tratti terminali, hanno riportato che la presenza di entrambe le sequenze, rispetto ad un peptide riprodotto la sola porzione N-terminale, garantisce una maggiore efficienza nell'indurre flussi di Ca²⁺ e conseguentemente favorisce la chemiotassi di cellule T.

In questo lavoro è stato verificato il ruolo funzionale del dominio C-terminale di SDF-1, in particolare come mediatore nell'angiogenesi. A questo scopo sono stati condotti saggi *in vitro* su HUVEC e *in vivo* su CAM, per valutare la potenzialità pro-angiogenica di tre serie di peptidi di sintesi (tabella 1):

- i. SDF-1 α T e SDF-1 β T, sequenze (51-68) e (51-72) riproducenti il terminale carbossilico delle due isoforme;
- ii. Analoghi del tratto C-terminale di SDF-1 β , contenenti mutazioni puntiformi e denominate: SDF-1 β T Nal 70, SDF-1 β T DPhe 70/Nle 72 e SDF-1 β T Nle. Questi peptidi sono caratterizzati da sostituzioni di alcuni residui della sequenza nativa, originariamente studiate per aumentare l'attività antivirale verso il virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Le mutazioni a livello di due posizioni critiche (F⁷⁰ e M⁷²) per il manifestarsi dell'azione agonistica, permetterebbero di chiarire l'esistenza di correlazioni con la chiralità dei residui (Phe→DPhe70), l'ingombro sterico (Phe→Nal70), o la presenza di particolari funzioni chimiche in catena laterale (Met→Nle72);
- iii. Met-SDF-1 β NC e SDF-1 β NC, sequenze di fusione tra il dominio N-terminale, di legame al recettore, e il tratto C-terminale di SDF-1 β . I due peptidi differiscono per il residuo aggiuntivo M¹, studiato inizialmente in correlazione alla capacità di contrastare l'entrata di HIV nelle cellule e per aumentare la resistenza all'attività di proteasi cellulari (Yang *et al.*, 1999)

	PEPTIDE	SEQUENZA
C-terminale wild type	<i>SDF-1αT</i> <i>(51-68)</i>	IDPKLKWIQEYLEKALNK
	SDF-1 β T (51-72)	IDPKLKWIQEYLEKALNK RFKM
Derivati SDF-1 β T con mutazioni puntiformi	SDF-1 β T Nal70	IDPKLKWIQEYLEKALNK R-Nal-FKM
	SDF-1 β T Nle72	IDPKLKWIQEYLEKALNK RFK-Nle
	SDF-1 β T DPhe70/Nle72	IDPKLKWIQEYLEKALNK R-DPhe-K-Nle
Fusione tratti N- e C-terminale SDF-1 β	SDF-1 β NC (1-13, 51-72)	KPVSLSYRCPCRF IDPKLKWIQEYLEKALNK RFKM
	Met-SDF-1 β NC	MKPVSLSYRCPCRF IDPKLKWIQEYLEKALNK RFKM

Tabella 5.1. Sequenze dei peptidi derivati da SDF-1

5.1 RISULTATI

5.1.1 Sintesi

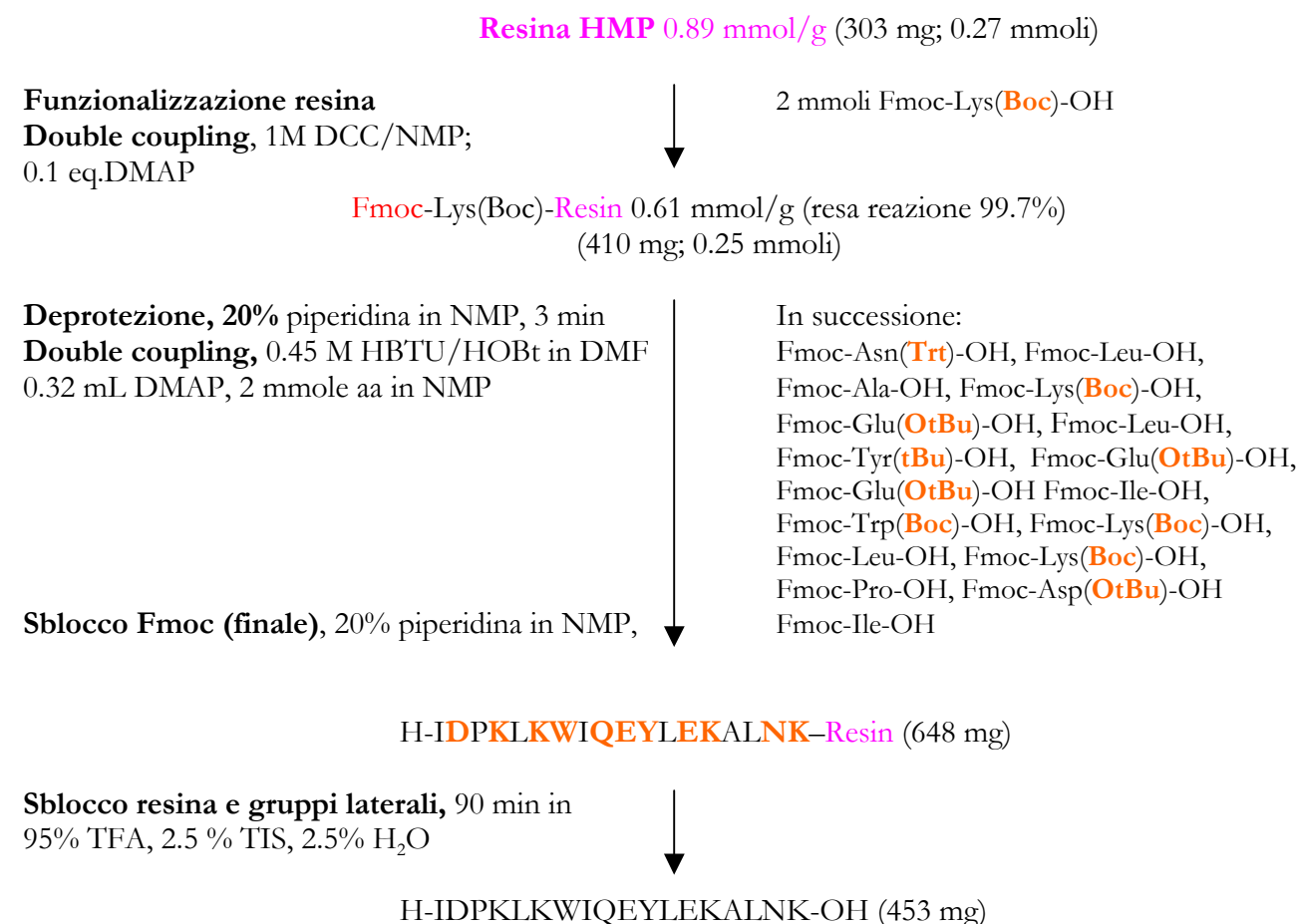
I peptidi impiegati sono stati progettati e sintetizzati presso il laboratorio del Prof. Di Bello, Università di Padova, Dip. dei Processi Chimici dell'Ingegneria, applicando le metodiche di sintesi peptidica su fase solida con chimica Fmoc e utilizzando un sintetizzatore automatico (Applied Biosystems, Model 431A). L'ottenimento con alte rese, delle sequenze descritte, è stato reso possibile grazie a precedenti studi (Dettin M. *et al*, 2003), di cui si è seguito il protocollo (Schemi 5.1-5.6).

Per la sintesi di SDF-1 α T, e degli analoghi SDF-1 β T Nle72 e SDF-1 β T DPhe70/Nle72, è stato impiegato come supporto solido la resina HMP (0.89 mmol/g), per le rimanenti sequenze invece si è preferito usare la resina Fmoc-Met-Wang (0.43 mmol/g). Nel caso in cui il supporto di ancoraggio non fosse già funzionalizzato, si è operato un doppio *coupling* via anidride simmetrica, usando 2 mmoli di residuo Fmoc-protetto e come agente condensante 1 M DCC in NMP e come catalizzatore 0.1 equivalenti di DMAP. La reazione ha dato una resa pari circa al 100% per il *loading* di Lys(Boc), diversamente l'ottenimento di Fmoc-Nle-HMP Resin (0.245 mmol/g), ha registrato un'efficienza massima del 36.6%.

Sono stati scelti i seguenti gruppi protettori per le catene laterali: OtBu (Asp e Glu), Boc (Lys e Trp), Trt (Asn e Gln), tBu (Ser e Tyr), Pmc (Arg) e AcM (Cys).

Per la sintesi dei vari peptidi sono stati impostati *coupling* doppi per l'inserimento di tutti i residui, ed è stata usata la strategia FastMoc con agente condensante HBTU. Fanno eccezione le due sequenze con mutazione Met→Nle72, per cui si è deciso di operare con doppio coupling solo in corrispondenza della

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA SDF-1 α T⁴



¹ Schema 5.1. Sintesi SDF-1 α T. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **K** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu). **W** = Trp(Boc) e **Y** = Tyr(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA SDF-1 β T⁵

Fmoc-Met-Wang Resin (0.43 mmol/g) (581 mg; 0.25 mmoli)

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 2 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Lys(**Boc**)-OH, Fmoc-Phe-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Asn(**Trt**)-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Tyr(**tBu**)-OH, Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH,
Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH Fmoc-Ile-OH,
Fmoc-Trp(**Boc**)-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(**OtBu**)-OH
Fmoc-Ile-OH

Sblocco Fmoc (finale), 20% piperidina in NMP,

H-IDPKLKWI**QEYLEKALNKRFKM**-Resin (872 mg)

Sblocco resina e gruppi laterali, 90 min in
94.5% TFA, 2.5 % TIS, 2.5% H₂O, 1% EDT

H-IDPKLKWI**QEYLEKALNKRFKM**-OH (519 mg)

⁵Schema 5.2. Sintesi SDF-1 β T. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **K** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu). **W** = Trp(Boc) e **Y** = Tyr(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA SDF-1 β T Nal70⁶

Fmoc-Met-Wang Resin (0.43 mmol/g) (582 mg; 0.25 mmoli)

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 2 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Nal-OH,
Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,
Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,
Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH,
Fmoc-Glu(OtBu)-OH Fmoc-Ile-OH,
Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,
Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH
Fmoc-Ile-OH

Sblocco Fmoc (finale), 20% piperidina in NMP, ↓

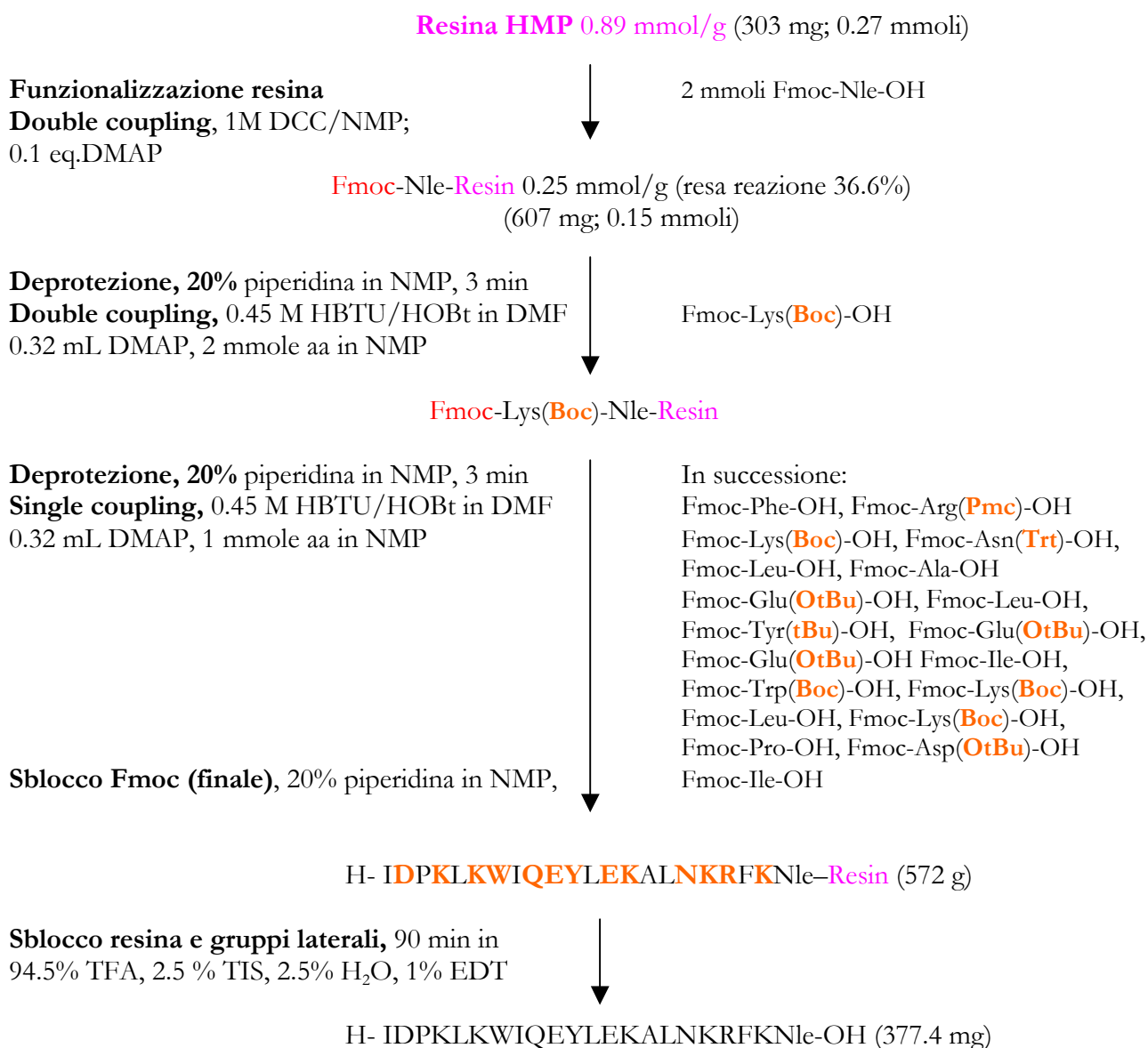
H-IDPKLKWIQEYLEKALNKR NalKM-Resin (1.53 g)

Sblocco resina e gruppi laterali, 90 min in
94.5% TFA, 2.5 % TIS, 2.5% H₂O, 1% EDT ↓

H-IDPKLKWIQEYLEKALNKR NalKM-OH (895 mg)

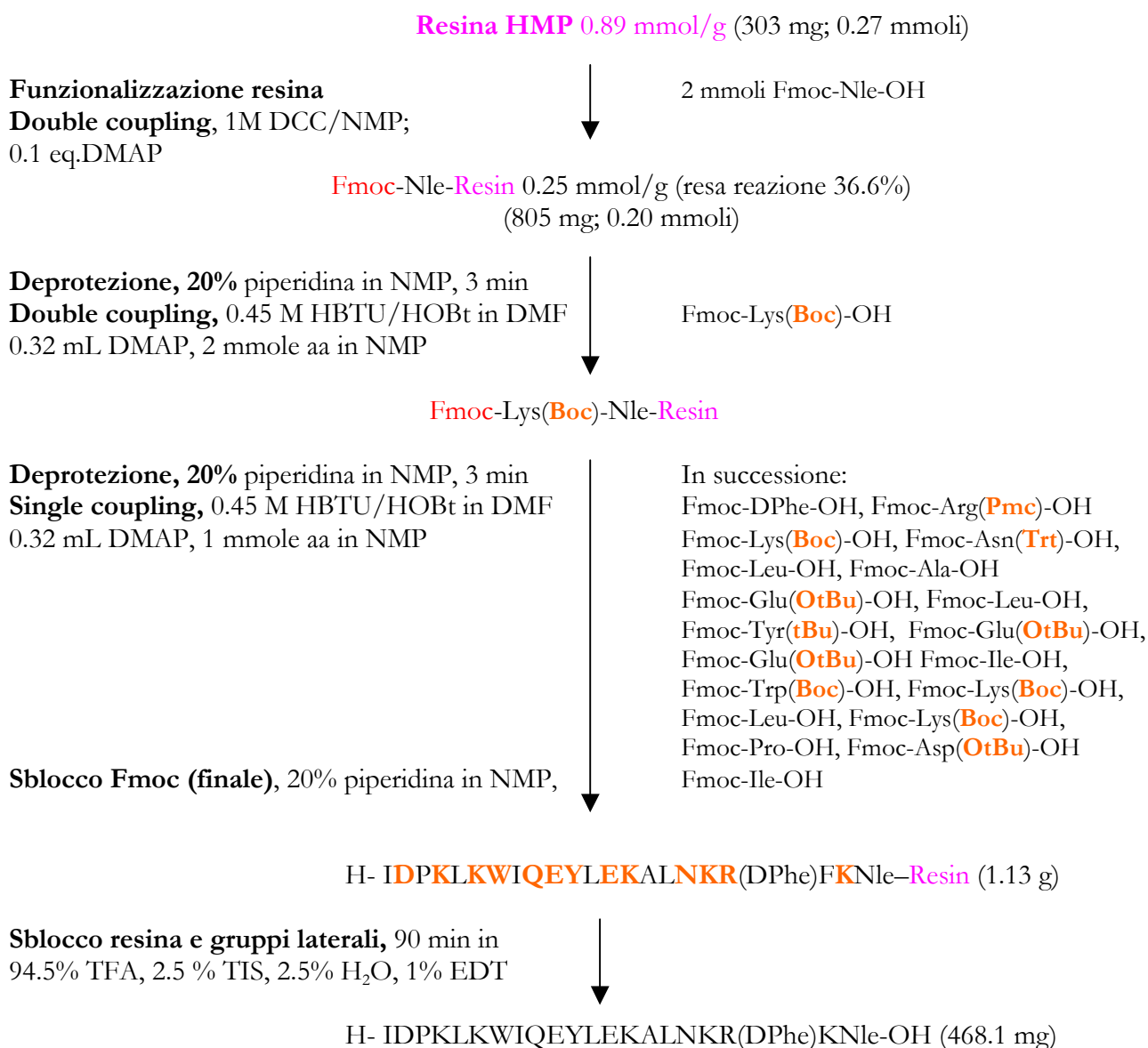
⁶Schema 5.3. Sintesi SDF-1 β T Nal70. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **K** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu). **W** = Trp(Boc) e **Y** = Tyr(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA SDF-1 β T Nle72⁷



¹ Schema 5.4. Sintesi SDF-1 β T Nle72. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **K** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu). **W** = Trp(Boc) e **Y** = Tyr(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA SDF-1 β T DPhe70/Nle72⁸



¹ Schema 5.5. Sintesi SDF-1 β T DPhe70/Nle72. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **K** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu). **W** = Trp(Boc) e **Y** = Tyr(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA SDF-1 β T NC e Met-SDF-1 β T NC⁹

Fmoc-Met-Wang Resin (0.43 mmol/g) (582 mg; 0.25 mmoli)

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 2 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Lys(**Boc**)-OH, Fmoc-Phe-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Asn(**Trt**)-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Tyr(**tBu**)-OH, Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH,
Fmoc-Glu(**OtBu**)-OH Fmoc-Ile-OH,
Fmoc-Trp(**Boc**)-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(**OtBu**)-OH
Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Phe-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Cys(**Acm**)-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(**Acm**)-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Tyr(**tBu**)-OH,
Fmoc-Ser(**tBu**)-OH, Fmoc-Leu-OH,
Fmoc-Ser(**tBu**)-OH, Fmoc-Val-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH
(Per **Met-SDF-1 β T NC** inserimento di
Fmoc-Met-OH)

Sblocco Fmoc (finale), 20% piperidina in NMP

(SDF-1 β T NC) H-K**P**V**S**L**S**Y**R**C**P**C**R**FID**P**K**L**K**W**I**Q**E**Y**L**E**K**A**L**N**K**R**Na**L**K**M**-Resin (1.2 g)

(Met-SDF-1 β T NC) H-M**K**P**V****S**L**S**Y**R**C**P**C**R**FID**P**K**L**K**W**I**Q**E**Y**L**E**K**A**L**N**K**R**Na**L**K**M**-Resin (1.5 g)

Sblocco resina e gruppi laterali, 120 min in
94.5% TFA, 2.5 % TIS, 2.5% H₂O, 1% EDT

(SDF-1 β T NC) H-K**P**V**S**L**S**Y**R**C**P**C**R**FID**P**K**L**K**W**I**Q**E**Y**L**E**K**A**L**N**K**R**Na**L**K**M**-OH

(Met-SDF-1 β T NC) H-M**K**P**V****S**L**S**Y**R**C**P**C**R**FID**P**K**L**K**W**I**Q**E**Y**L**E**K**A**L**N**K**R**Na**L**K**M**-OH

Sblocco gruppo Acm, 90 min a 4° in
99% TFA, 1% anisolo,
100 eq.trifluoroacetato d'argento(I)

(SDF-1 β T NC) H-K**P**V**S**L**S**Y**R**C**P**C**R**FID**P**K**L**K**W**I**Q**E**Y**L**E**K**A**L**N**K**R**Na**L**K**M**-OH (905 mg)

(Met-SDF-1 β T NC) H-M**K**P**V****S**L**S**Y**R**C**P**C**R**FID**P**K**L**K**W**I**Q**E**Y**L**E**K**A**L**N**K**R**Na**L**K**M**-OH (1.1 g)

⁹Schema 5.6. Sintesi SDF-1 β T NC e Met-SDF-1 β T NC. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **C** = Cys(Acm), **D** = Asp(OtBu), **E** = Glu(OtBu), **K** = Lys(Boc), **N** = Asn(Trt), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu). **W** = Trp(Boc) e **Y** = Tyr(tBu).

posizione K⁷¹, mentre l'accrescimento successivo della catena è stato condotto mediante cicli a condensazione singola.

Lo sblocco dalla resina di tutti gli analoghi SDF-1 β T compresa la sequenza naturale, con contemporanea deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto per trattamento con miscela acido trifluoroacetico: etandiololo: acqua: trietilsilano = 94.5:2.5:2.5:1 per 90 min. Per lo sblocco dei peptidi Met-SDF-1 β -NC e SDF-1 β -NC è stato necessario un tempo di 2 h; mentre per campione SDF-1 α T è stata usata una diversa miscela di reagenti, TFA:H₂O:TIS = 95:2.5:2.5.

Un successivo trattamento (TFA/anisolo=99/1, 100 equivalenti di trifluoroacetato d'argento(I), 4° C, per 90 min) dei campioni Met-SDF-1 β -NC e SDF-1 β -NC ha permesso la deprotezione dalla catena laterale di Cys dal gruppo Acm.

Le figure 5.2-5.8 mostrano il profili cromatografico dei grezzi ottenuti. Da ogni sintesi è stato possibile ottenere come prodotto principale il peptide d'interesse.

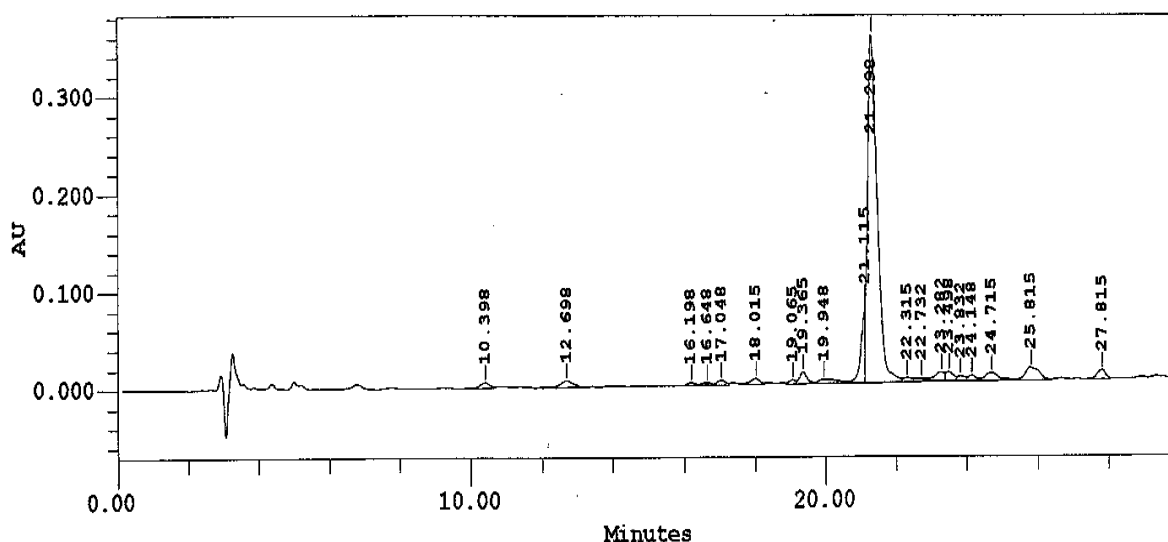


Figura 5.2. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide SDF-1 α T grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C₁₈ analitica (4 μ m, 60 Å, 3.9 \times 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm.

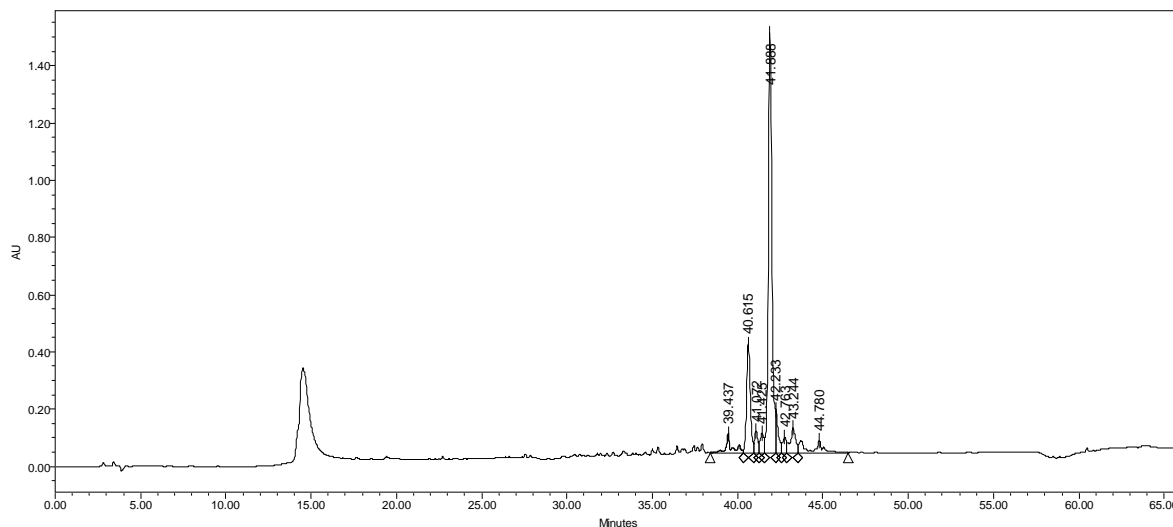


Figura 5.3. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide SDF-1 β T grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å , 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 0 al 70% di B in 70 min; detector, 214 nm.

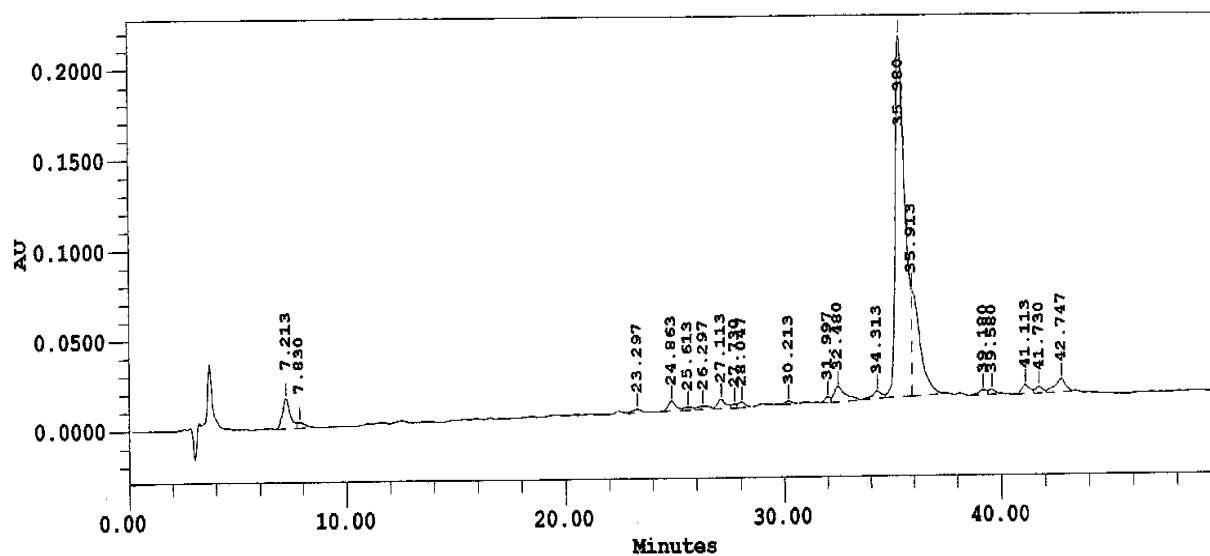


Figura 5.4. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide SDF-1 β T Na170 grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å , 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 25 al 40% di B in 40 min; detector, 214 nm.

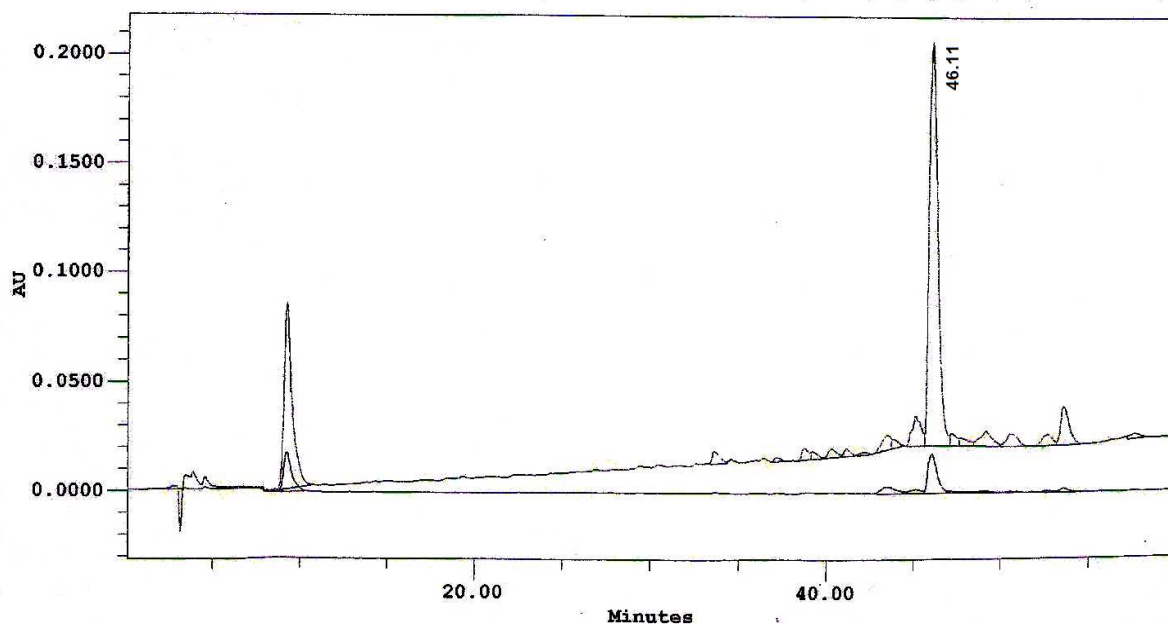


Figura 5.5 Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide SDF-1 β T Nle72 grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 15 al 45% di B in 60 min; detector, 214 nm.

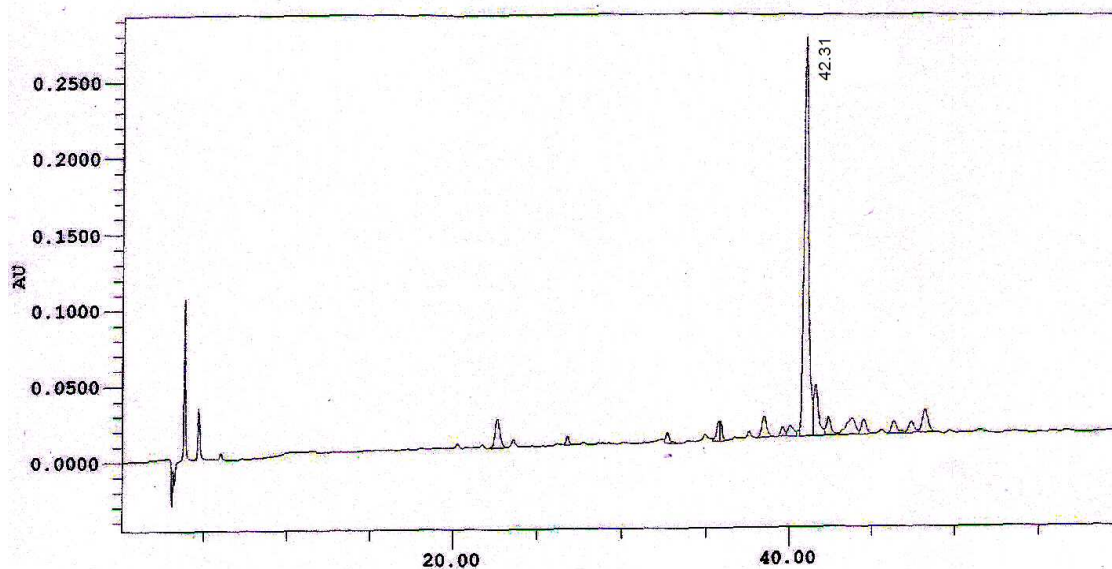


Figura 5.6. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide SDF-1 β T DPhe70/Nle72 grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 15 al 45% di B in 60 min; detector, 214 nm.

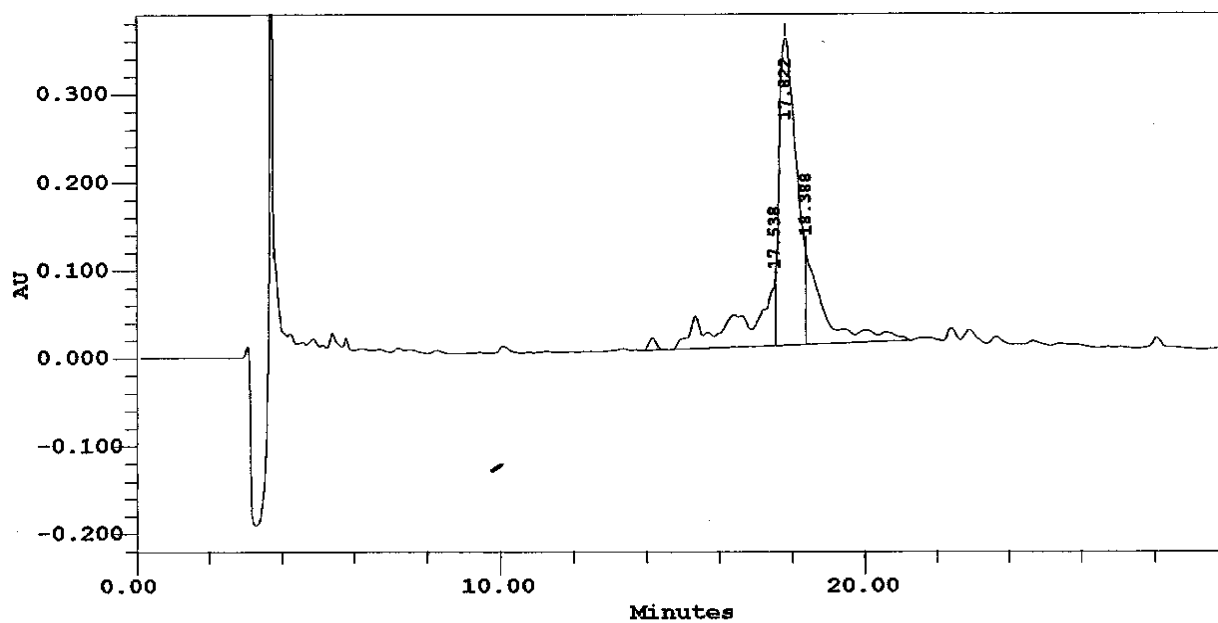


Figura 5.7. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide SDF-1 β T NC grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30 al 45% di B in 30 min; detector, 214 nm.

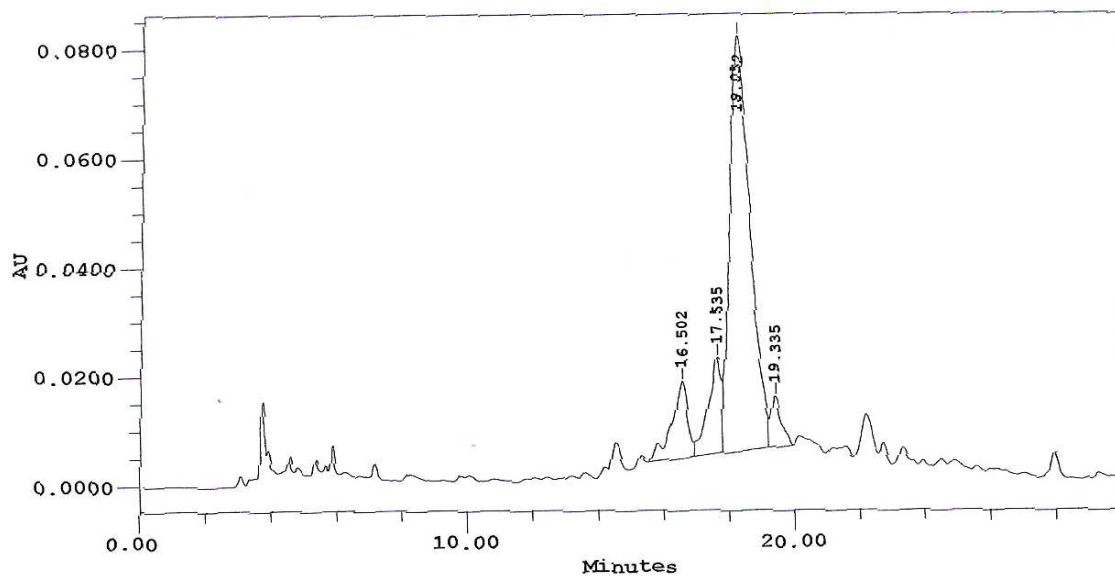


Figura 7: cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide Met-SDF-1 β T NC grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm.

5.1.2 Purificazione

La purificazione dei prodotti di sintesi è stata condotta mediante tecnica cromatografica RP-HPLC. Per ogni campione sono state studiate le condizioni ottimali di separazione in colonna semipreparativa:

- i. SDF-1 α T: colonna Nova Pak HR C₁₈ SP (6 μ m, 60 Å, 7.8 \times 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 18 al 38% di B in 60 min; detector, 214 nm;
- ii. SDF-1 β T: colonna Nova Pak HR C₁₈ SP (6 μ m, 60 Å, 7.8 \times 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 20 al 40% di B in 60 min; detector, 214 nm;
- iii. SDF-1 β T Nal70: colonna Delta Pak C₁₈ SP (15 μ m, 100 Å, 7.8 \times 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 25 al 40% di B in 60 min; detector, 214 nm;
- iv. SDF-1 β T Nle72: colonna Delta Pak C₁₈ SP (15 μ m, 100 Å, 7.8 \times 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 28 al 38% di B in 40 min; detector, 214 nm;
- v. SDF-1 β T DPhe70/Nle72: colonna Delta Pak C₁₈ SP (15 μ m, 100 Å, 7.8 \times 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 28 al 38% di B in 40 min; detector, 214 nm;
- vi. SDF-1 β NC: colonna Nova Pak HR C₁₈ SP (6 μ m, 60 Å, 7.8 \times 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 25 al 45% di B in 60 min; detector, 214 nm;
- vii. Met-SDF-1 β NC: colonna Delta Pak C₁₈ SP (15 μ m, 100 Å, 7.8 \times 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30 al 41% di B in 44 min; detector, 214 nm.

5.1.3 Caratterizzazione

Il grado di purezza raggiunto per ogni campione è stato quantificato tramite integrazione del cromatogramma HPLC analitico.

Di seguito sono riportate le condizioni cromatografiche usate per la caratterizzazione e i rispettivi valori di omogeneità registrati:

- i. SDF-1 α T: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm; Phenomenex); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente,

dall'28 al 38% di B in 20 min; detector, 214 nm. Il livello di purezza raggiunto è pari al 98% (Figura 5.9);

- ii. SDF-1 β T: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'30 al 40% di B in 20 min; detector, 214 nm. Il grado di omogeneità raggiunto è di 98.9% (Figura 5.10);
- iii. SDF-1 β T Nal70: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'30 al 40% di B in 20 min; detector, 214 nm. Il grado di omogeneità raggiunto è di 98.8% (Figura 5.11);
- iv. SDF-1 β T Nle72: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30 al 40% di B in 20 min; detector, 214 nm. È stato raggiunto per il seguente campione un livello di omogeneità pari al 98% (Figura 5.12);
- v. SDF-1 β T DPhc70/Nle72: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 28 al 38% di B in 20 min; detector, 214 nm. Il passaggio in colonna HPLC ha permesso di raggiungere un livello di purezza del 98.9% (Figura 5.13);
- vi. SDF-1 β NC: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'30 al 45% di B in 30 min; detector, 214 nm. Il grado di omogeneità raggiunto è pari al 99.2% (Figura 5.14);
- vii. Met-SDF-1 β NC: colonna Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6×250 mm; Phenomenex); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'30 al 45% di B in 30 min; detector, 214 nm. Il grado di omogeneità raggiunto è di 95.5% (Figura 5.15).

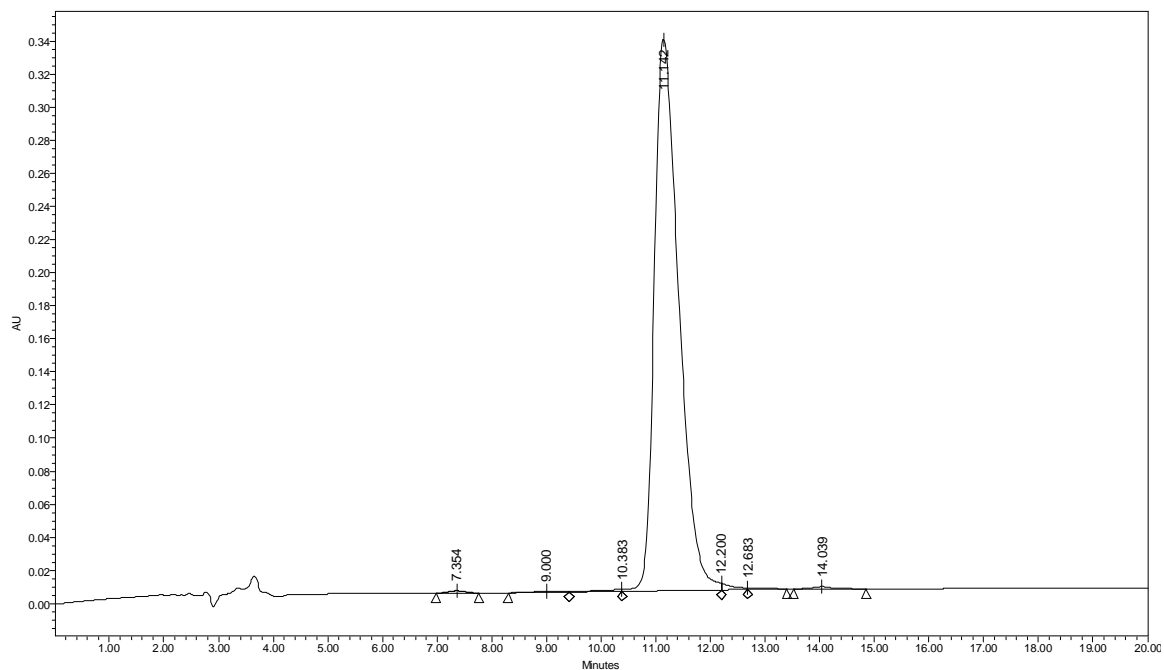


Figura 5.9. Cromatografia analitica del peptide SDF-1 α T purificato, condotta impiegando una colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 28% al 38% di B in 20 min; detector, 214 nm.

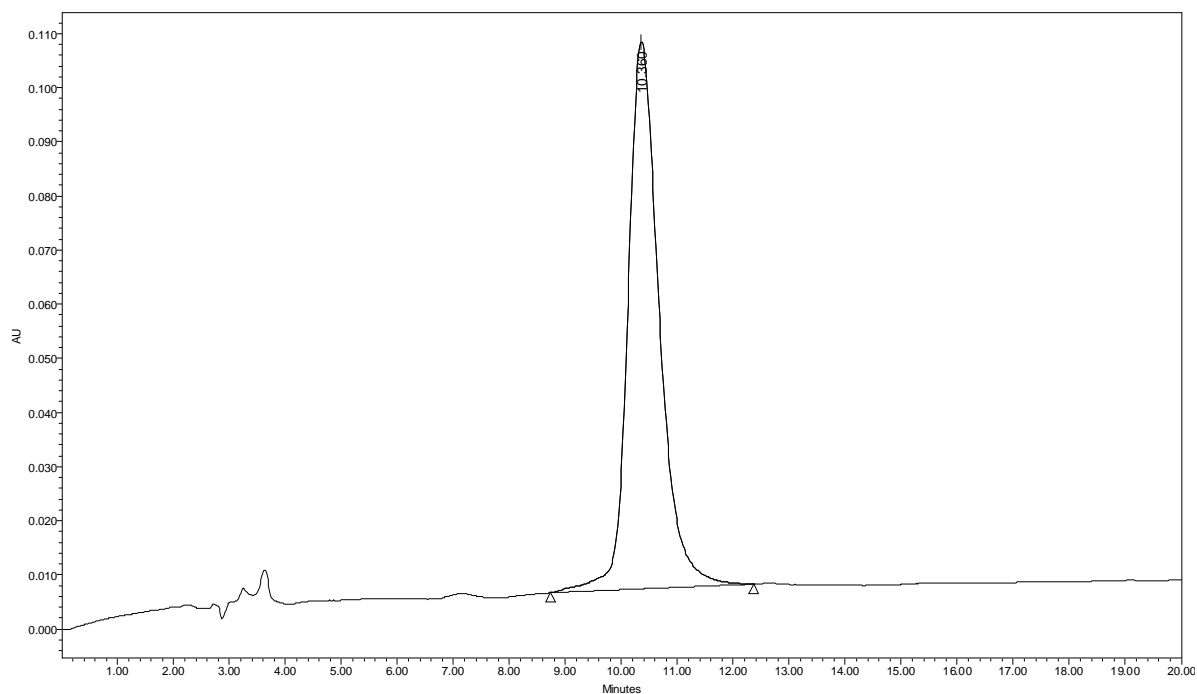


Figura 5.10. Cromatografia analitica del peptide SDF-1 β T purificato, condotta impiegando una colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30% al 40% di B in 20 min; detector, 214 nm.

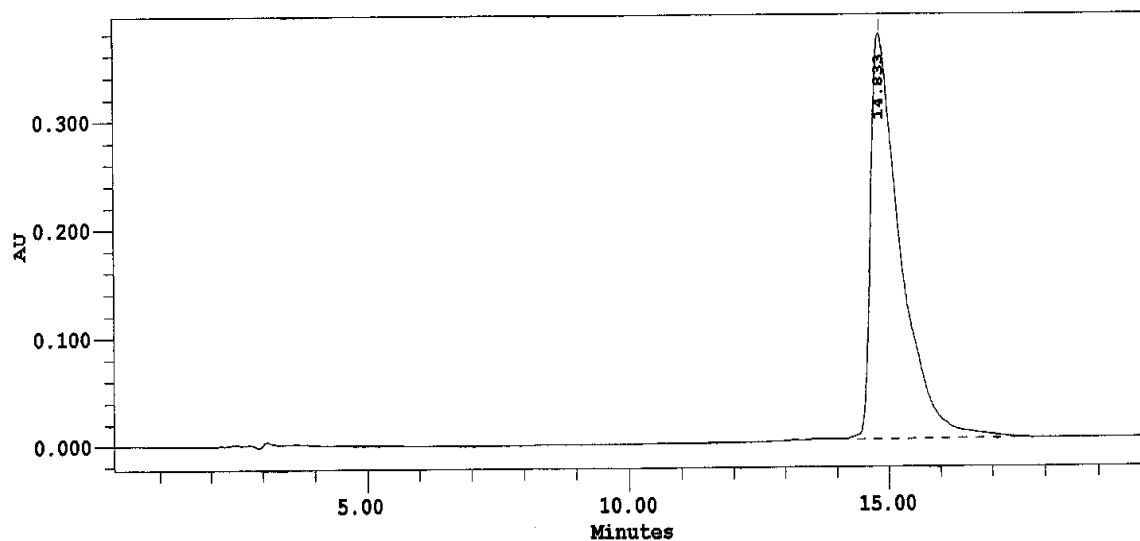


Figura 5.11 Cromatografia analitica del peptide SDF-1 β T Nal70 purificato, condotta impiegando una colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30% al 40% di B in 20 min; detector, 214 nm.

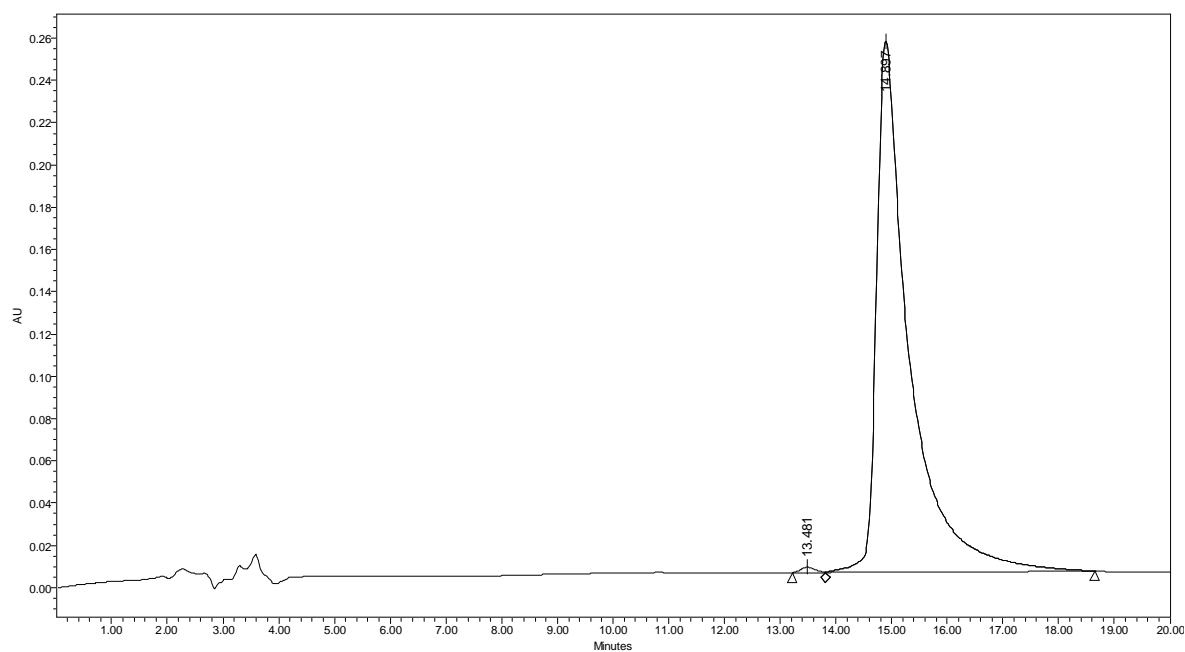


Figura 5.12 Cromatografia analitica del peptide SDF-1 β T Nle72 purificato, condotta impiegando una colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30 al 40% di B in 20 min; detector, 214 nm

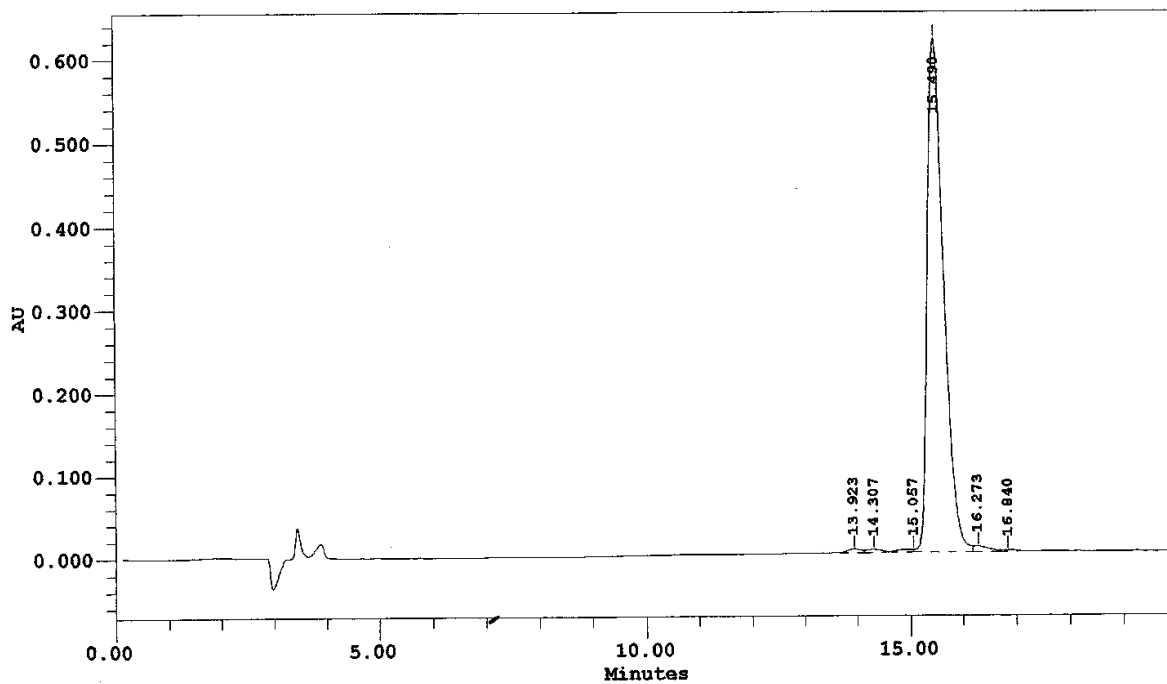


Figura 5.13 Cromatografia analitica del peptide SDF-1 β T DPhe70/Nle72 purificato, condotta impiegando una colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30 al 40% di B in 20 min; detector, 214 nm

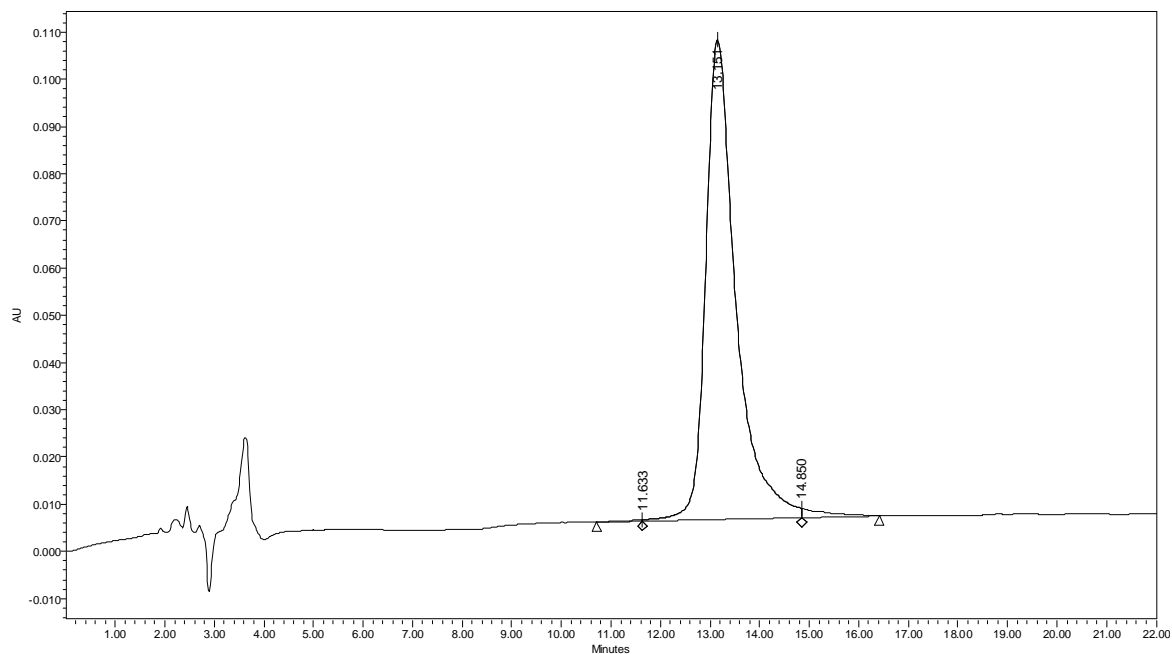


Figura 5.14 Cromatografia analitica del peptide SDF-1 β NC purificato, condotta impiegando una colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30% al 45% di B in 30 min; detector, 214 nm.

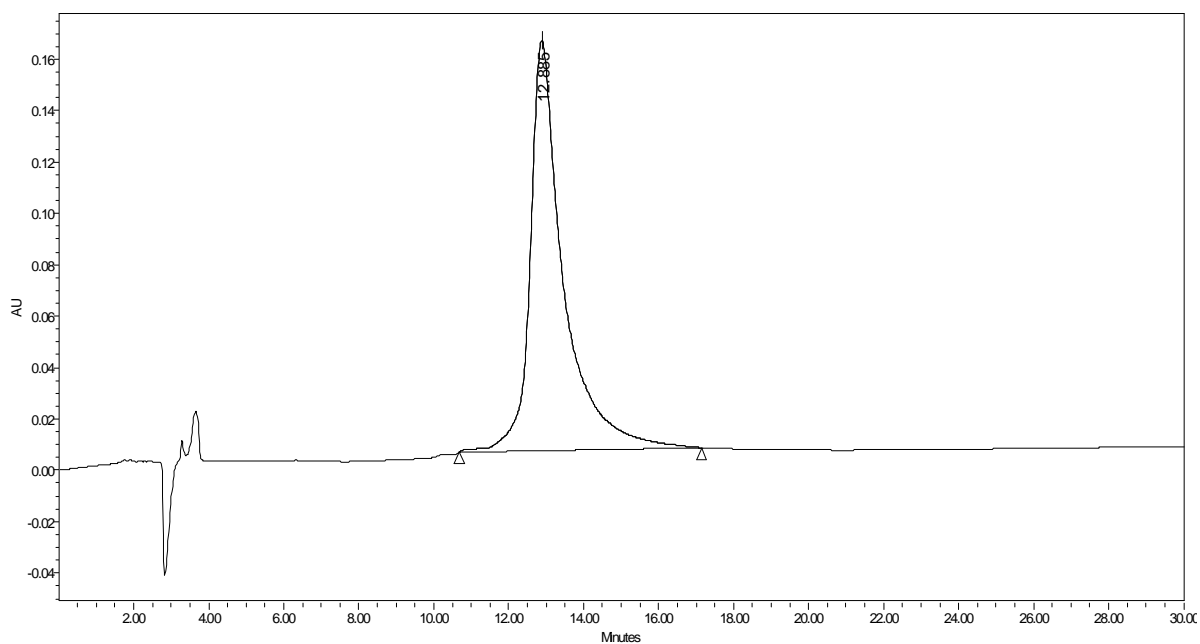


Figura 5.15 Cromatografia analitica del peptide Met-SDF-1 β NC purificato, condotta impiegando una colonna analitica Luna C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm), nelle seguenti condizioni: flusso, 1 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 30% al 45% di B in 30 min; detector, 214 nm.

L'identità dei campione è stata confermata tramite spettrometria di massa con strumentazione ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220) o per confronto dei profili cromatografici e dei tempi di eluizione, con campioni del medesimo peptide ottenuti da precedenti sintesi.

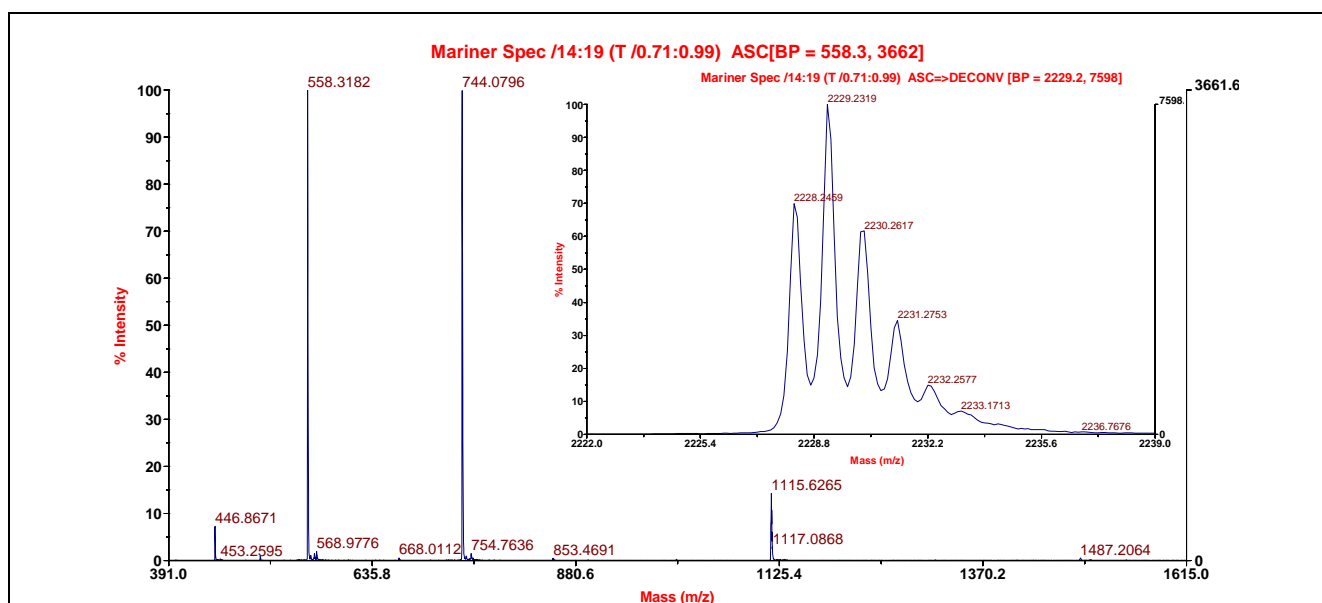


Figura 5.16. (a) Spettro di massa del campione purificato SDF-1 α T, ottenuto impiegando uno spettrometro di massa a tempo di volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v:v)), [Massa teorica = 2229.5 Da, valore sperimentale = 2229.22 Da]. (b) Deconvoluzione dello spettro.

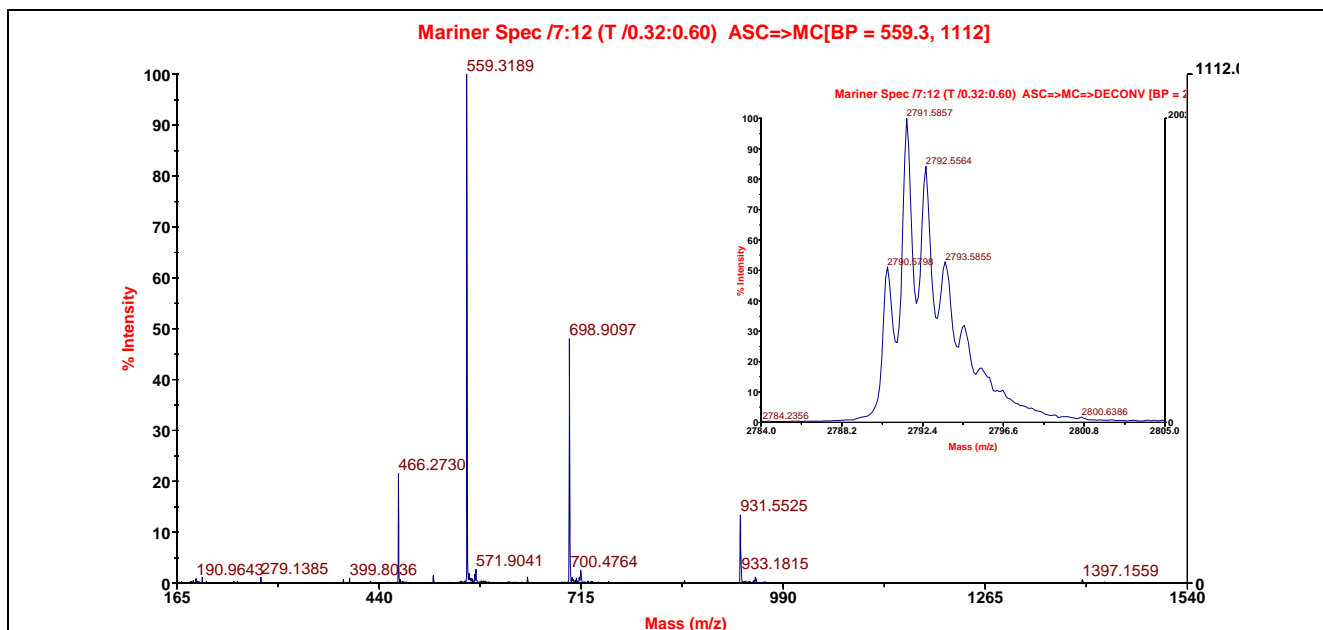


Figura 5.17. (a) Spettro di massa del campione purificato SDF-1 β T, ottenuto impiegando uno spettrometro di massa a tempo di volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v:v)), [Massa teorica = 2792.1 Da, valore sperimentale = 2791.59 Da]. (b) Deconvoluzione dello spettro.

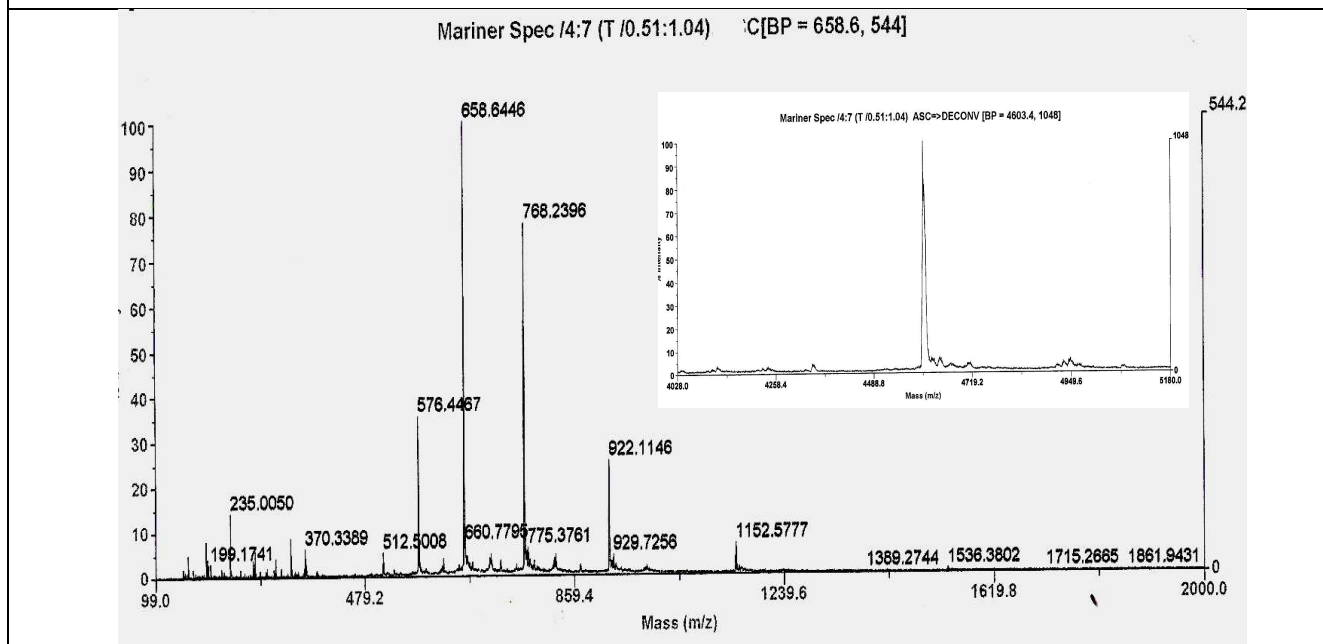


Figura 5.18. (a) Spettro di massa del campione purificato Met-SDF-1 β T NC, ottenuto impiegando uno spettrometro di massa a tempo di volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v:v)), [Massa teorica = 4603.2 Da, valore sperimentale = 4603.03 Da]. (b) Deconvoluzione dello spettro.

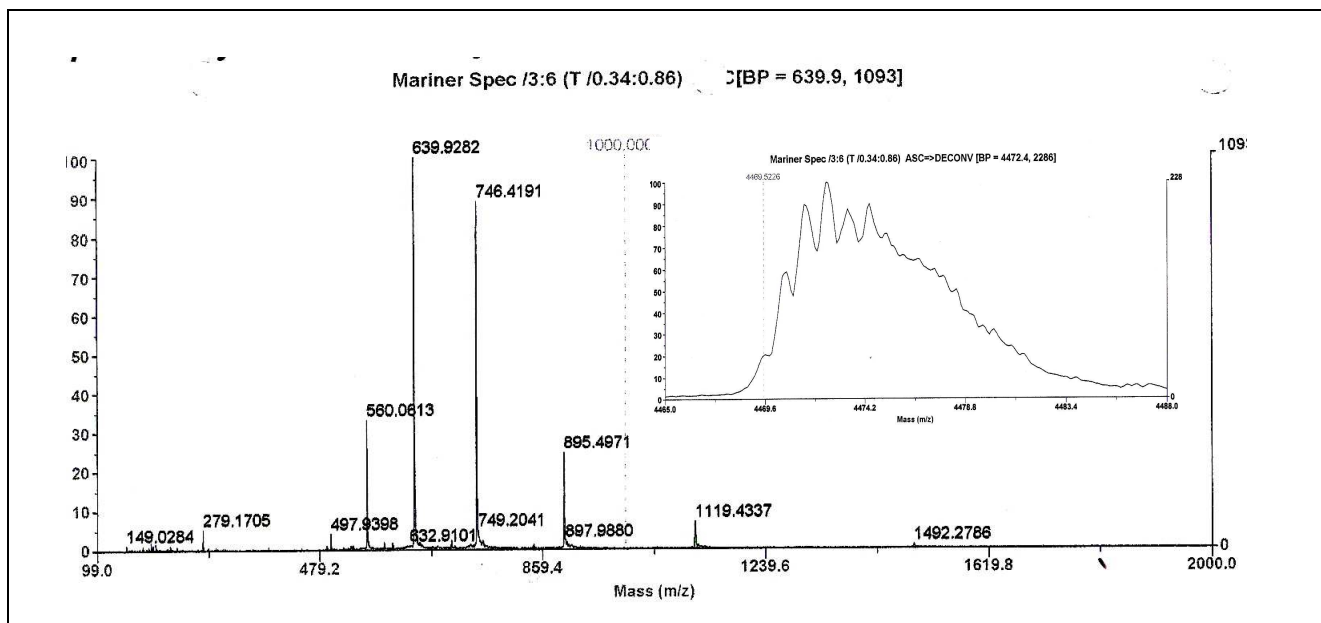


Figura 5.19. (a) Spettro di massa del campione purificato SDF-1 β T NC, ottenuto impiegando uno spettrometro di massa a tempo di volo con sorgente elettrospray (Mariner Applied Biosystems System 5220; solvente H₂O/CH₃CN/HCOH (50:50:1;v:v:v)), [Massa teorica = 446.6 Da, valore sperimentale = 447.4 Da]. (b) Deconvoluzione dello spettro.

5.1.4 Effetti sull'adesione cellulare

La chemochina SDF-1, secreta dalle cellule, per attuare i suoi effetti biologici agisce come fattore solubile, tuttavia esiste anche una sua forma immobilizzata a livello dei HSPG. Per questo si è deciso di valutare la capacità dei peptidi di favorire l'adesione cellulare su piastre non trattate per colture cellulari, sia impiegandoli come condizionamento (2 mmol/cm²) del supporto, sia aggiungendoli come fattori solubili nel terreno di coltura.

L'incubazione per 3 h su piastre condizionate, in terreno base ha comportato un significativo aumento ($p < 0.05$) dell'adesione cellulare da parte di tutte e quattro le sequenze testate (SDF-1 α T, SDF-1 β T, Met-SDF-1 β NC e SDF-1 β NC), rispetto al numero di cellule presenti nei pozzetti di controllo (Tabella 2, colonna A).

Per valutare gli effetti dei peptidi posti in soluzione, sono stati effettuati ulteriori esperimenti utilizzando terreno MV₂ contenente siero poiché, usando il solo terreno base, non era stata riscontrata alcuna variazione nel comportamento adesivo delle cellule. In questo caso, unicamente SDF-1 β T (Tabella 5.2, colonna B) ha portato un incremento significativo, anche se di modesta intensità, del numero di cellule adese al supporto.

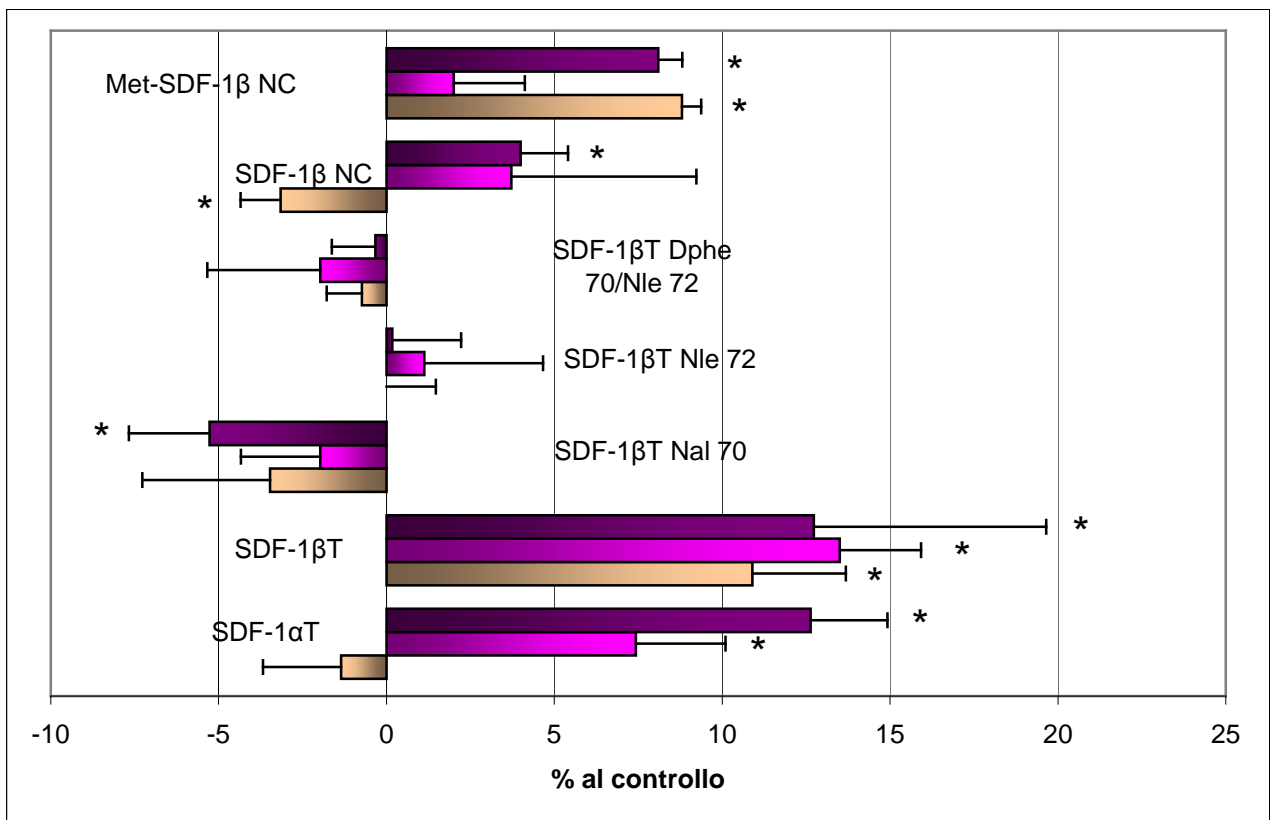


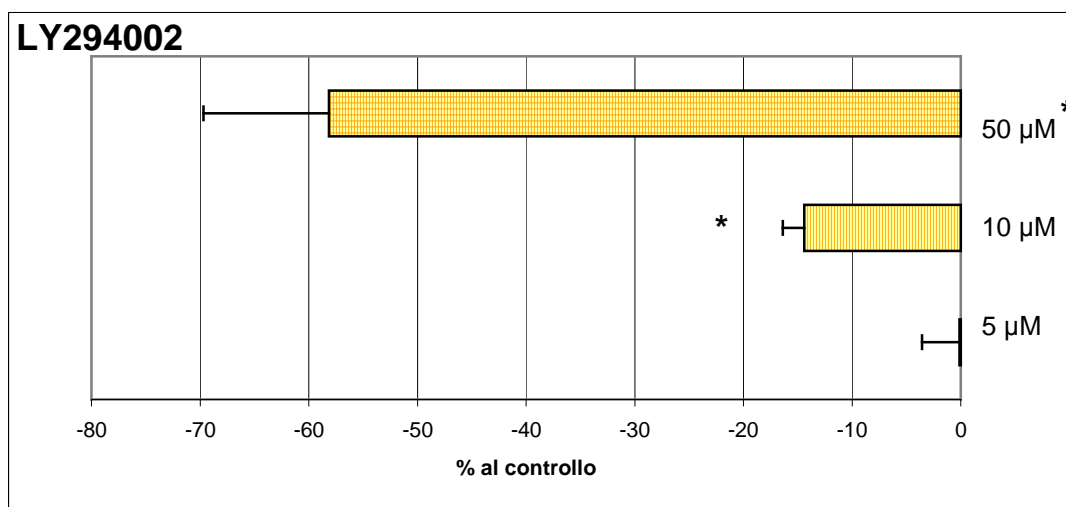
Figura 5.20. Vitalità di HUVEC trattate per 24 ore con peptidi derivati da SDF-1 impiegati alle seguenti concentrazioni: viola = 5 nM, rosa = 10nM, rosa chiaro = 100 nM. I risultati sono espressi come percentuale rispetto al controllo, rappresentato da cellule non trattate. I dati, espressi come media \pm deviazione standard, sono stati ottenuti da 6 esperimenti. * = $p < 0.05$ rispetto al controllo); t-test di Student.

5.1.6 Effetti di inibitori di vie di segnale sull'aumento di vitalità cellulare indotto dai derivati peptidici

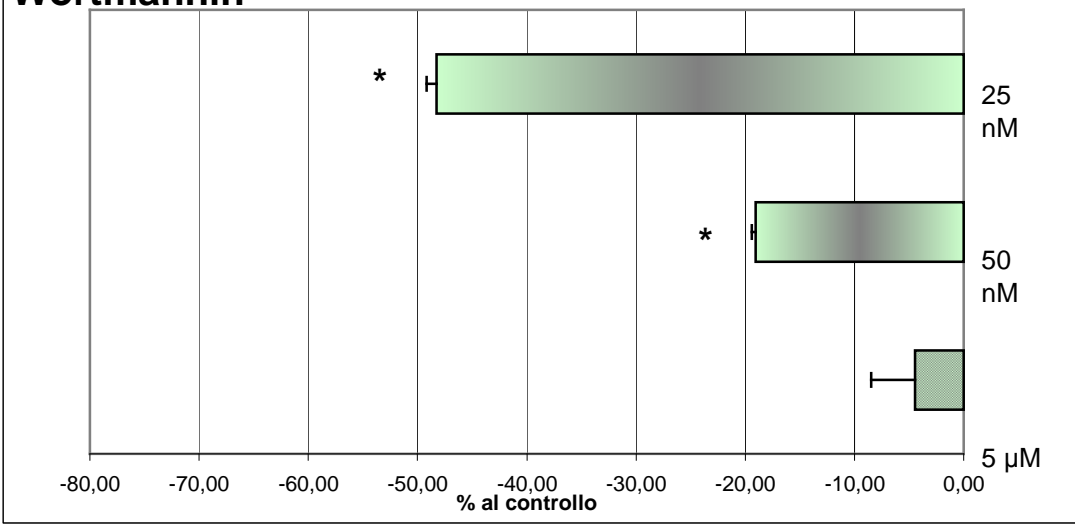
Le varie fasi dell'angiogenesi, come proliferazione, adesione e migrazione prevedono l'attivazione di alcune vie di trasduzione del segnale, in seguito a stimolazione di recettori o altre strutture cellulari. I fattori di crescita che inducono questi processi determinano i loro effetti attivando delle cascate intracellulari che coinvolgono enzimi come fosfolipasi-C (PLC), protein-chinasi C (PKC), protein-chinasi PKA, fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI-3K) e mitogen-activated protein kinases (MAPK). Sulla base di queste considerazioni, è stato verificato se l'aumento della vitalità cellulare indotto da SDF-1 α T e SDF-1 β T potesse essere mediato dall'attivazione di specifiche vie di segnale. Questo tipo di indagine ha previsto un pre-trattamento delle colture di HUVEC con i seguenti composti: i) LY294002, inibitore specifico per PI-3K; ii) Wortmannin in grado di inibire PI-3K, ma anche altre varietà di chinasi

intracellulari iii) PD98059 inibitore selettivo per la cascata MAPK-ERK1/2, in particolare blocca l'attivazione di MEK e, di conseguenza, la fosforilazione di ERK1/2; iv) U-73122 inibitore delle fosfolipasi C e A₂; v) Rp-cAMP, analogo del cAMP, lega a livello della PKA il sito di *binding* per il metabolita inducendo il blocco della cascata dell'adenosin-mono-fosfato ciclico; vi) Ro 31-8220 inibitore selettivo a bassi dosaggi per la protein chinasi C.

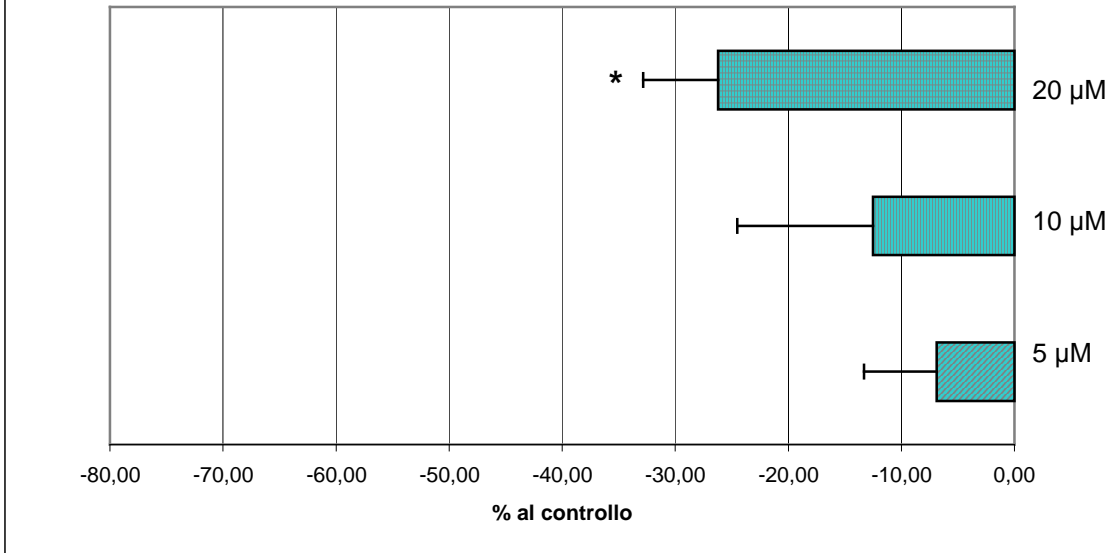
Inizialmente, è stato valutato l'effetto dei soli inibitori sulla vitalità cellulare per utilizzare, nella sperimentazione successiva, concentrazioni non citotossiche che avrebbero potuto portare a falsi positivi. Come riportato in figura 5.22, non si sono osservate variazioni nella vitalità cellulare in seguito a trattamento con 5 μ M LY294002, 0.025 μ M Wortmannin, 5 μ M e 10 μ M PD98059, 1 μ M U-73122 e Rp-cAMP a tutte le concentrazioni testate. Invece nel *range* di 1-5 μ M Ro 31-8220 ha comportato una diminuzione del parametro di vitalità a seguito di un trattamento di 45 min. Poiché i dosaggi impiegati erano stati selezionati sulla base di ricerche bibliografiche e di quanto riportato dalla ditta fornitrice, si è comunque deciso di usare la concentrazione più bassa (1 μ M) per gli esperimenti successivi, per non precludere un'efficace blocco della via del segnale ed ottenere dei falsi negativi.



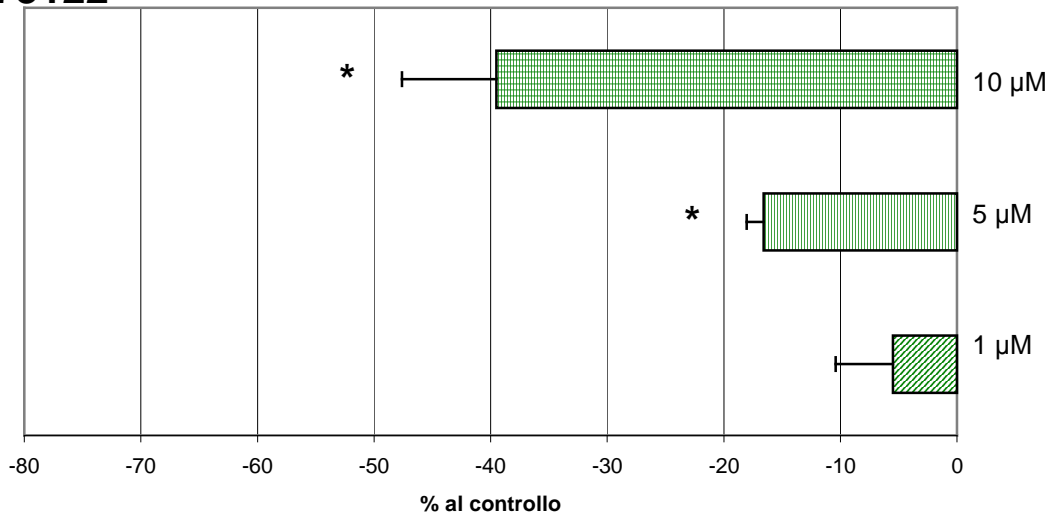
Wortmannin



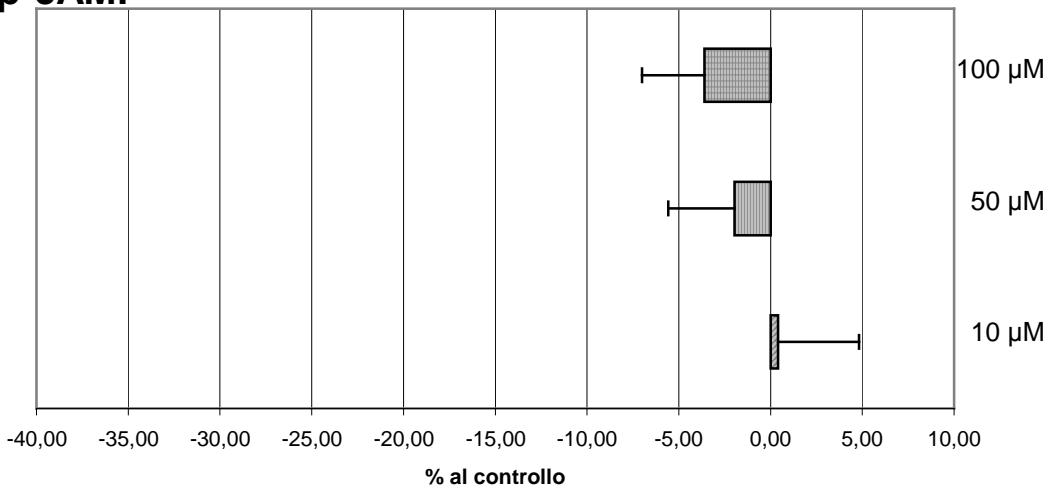
PD98059



U73122



Rp-cAMP



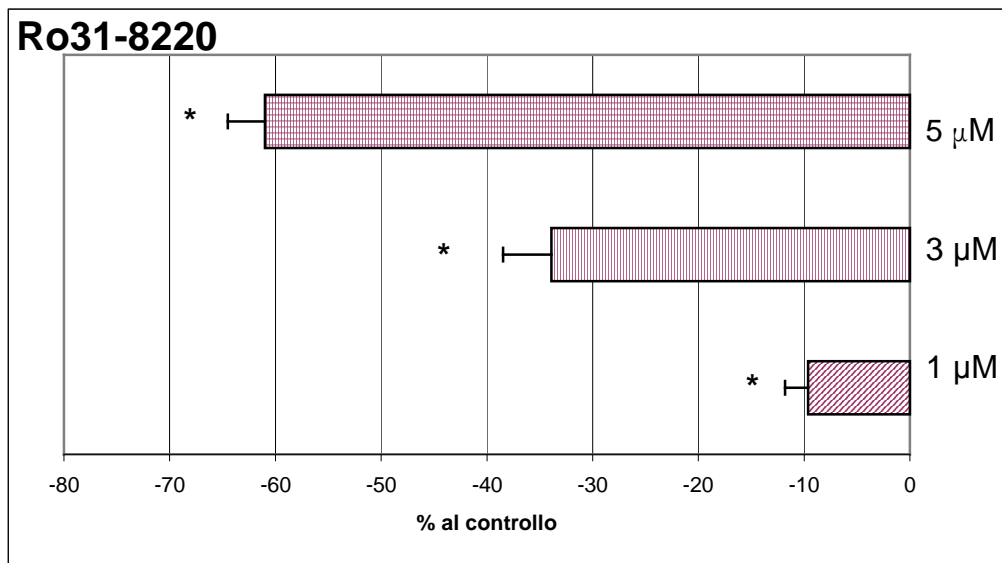


Figura 5.22. Vitalità di HUVEC trattate con i seguenti inibitori: LY294002, Wortmannin, PD98059, U-73122, Rp-cAMP e Ro 31-8220. I risultati sono espressi come percentuale rispetto alle colture non trattate. I dati, espressi come media \pm deviazione standard, sono stati ottenuti da 3 esperimenti.

* = $p < 0.05$ vs controllo; t-test di Student.

Il pre-trattamento con 5 μM LY294002, 0.025 μM wortmannin, 5 μM PD98059, 1 μM U-73122 (Figura 5.23) ha provocato una significativa ($p < 0.05$) diminuzione dei valori di vitalità cellulare indotta da SDF-1 α T (5 nM) o SDF-1 β T (5 nM e 10 nM); mentre 50 μM Rp-cAMP e 1 μM Ro 31-8222 hanno interferito, rispettivamente, con l'attività o solo di SDF-1 α T o SDF-1 β T. Rispetto agli altri inibitori, di cui è stata impiegata una dose non tossica, nel caso dell'inibitore della PKC, è stata usata una concentrazione, capace di diminuire, seppur modestamente, la vitalità delle HUVEC. A fronte di questo, la riduzione del parametro di vitalità, registrato per 10 μM SDF-1 β T può essere dovuto in realtà al lieve effetto citotossico dell'inibitore. Mentre non c'era dubbio che basse concentrazioni del tratto C-terminale dell'isoforma beta non sono in grado di revertire l'azione di blocco di Ro 31-8220 su PKC.

Il fatto che l'inibizione dovuta a trattamento con Wortmannin sia risultata meno efficace rispetto a LY294002, era probabilmente legato alla scelta di impiegare una concentrazione più bassa, rispetto a quella riportata in altri studi con SDF-1 (Gong et al., 2006), sia per non indurre effetti tossici sulle colture, sia per evitare d'inibire altre chinasi intracellulari.

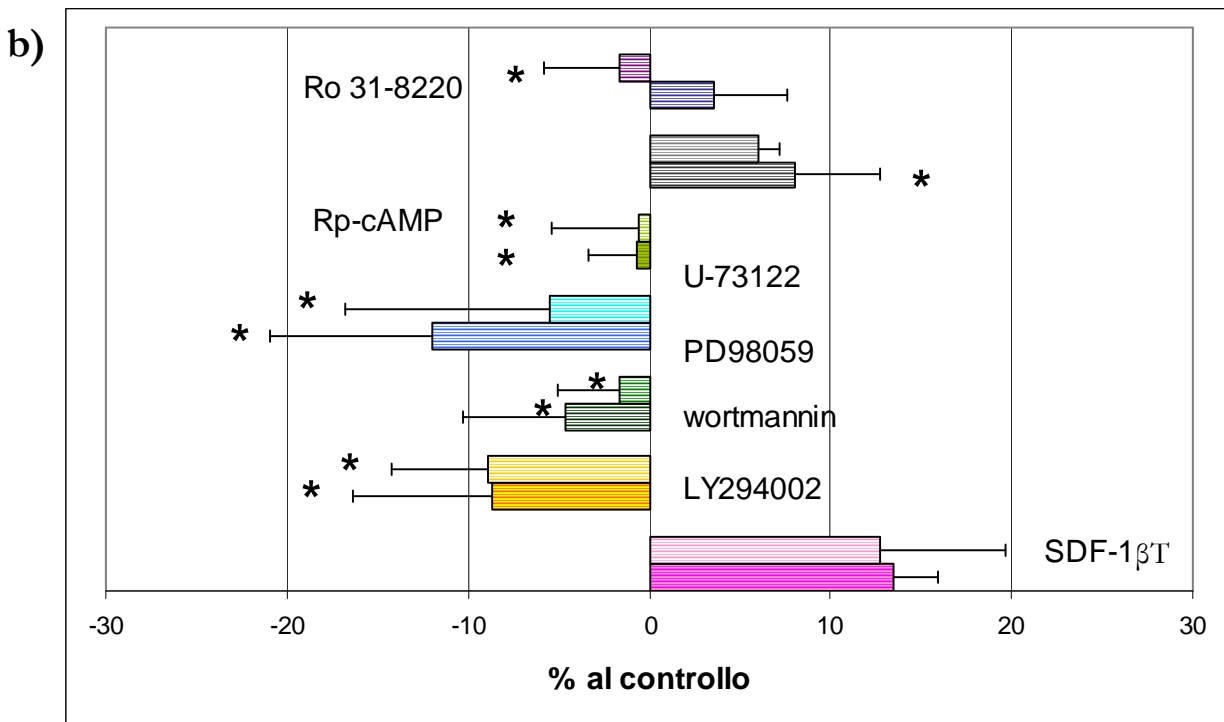
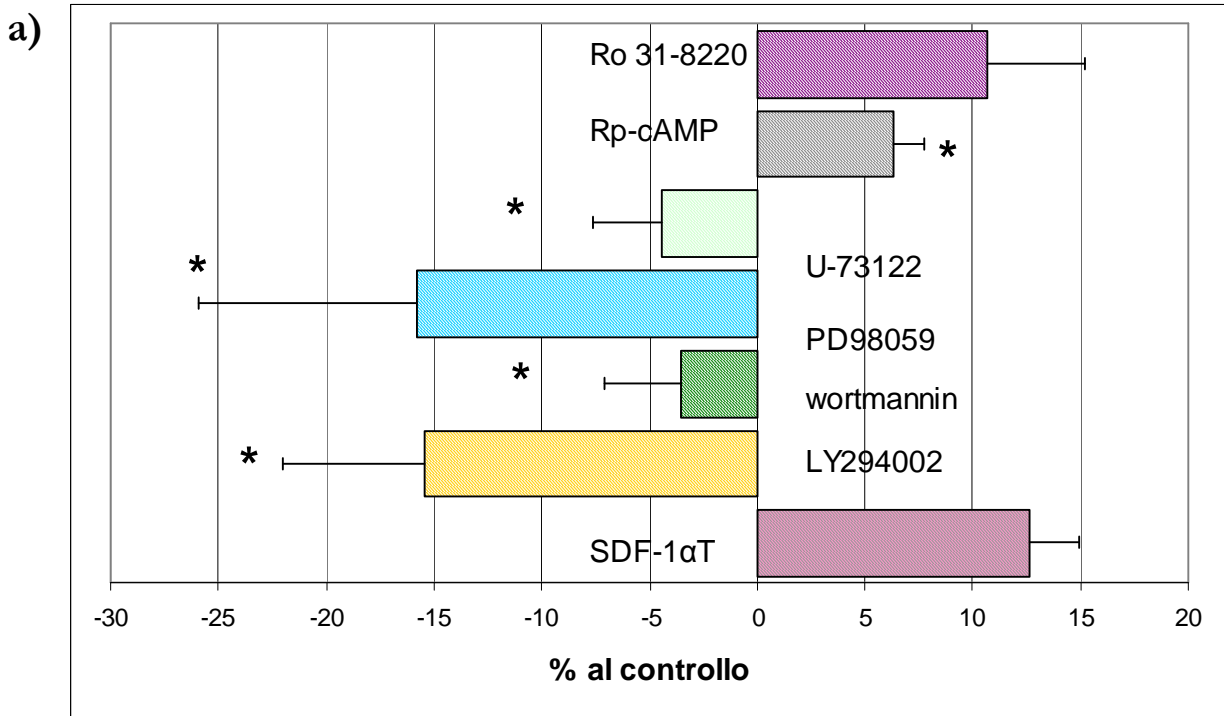


Figura 5.23. Vitalità di HUVEC pre-trattate con 5 μM LY294002, 0.025 μM wortmannin, 5 μM PD98059, 1 μM U-73122, 50 μM Rp-cAMP e 1 μM Ro 31-822, e successivamente incubate per 24 h con (a) 5 nM SDF-1 α T o (b) 5nM e 10 nM SDF-1 β T. I risultati sono espressi come percentuale rispetto alle colture non trattate. I dati, espressi come media \pm deviazione standard, sono stati ottenuti da 3 esperimenti. Nel grafico sono riportati anche i valori di vitalità di HUVEC trattate coi soli peptidi alle concentrazioni indicate sopra. * = $p < 0.05$ vs (a) SDF-1 α T; (b) vs SDF-1 β T; t-test di Student.

5.1.7

Effetti sulla morfogenesi *in vitro*

Per valutare *in vitro* l'effetto dei derivati peptidici sulla morfogenesi, le HUVEC sono state seminate su Matrigel, un estratto di un sarcoma murino ricco di componenti della membrana basale e ampiamente utilizzato per determinare *in vitro* l'azione pro- o anti-angiogenica di sostanze di origine sia naturale che sintetica. Le cellule endoteliali non trattate normalmente si organizzano in modo tale da formare all'interno del gel strutture a maglie chiuse. Dopo 18 ore di trattamento con i peptidi oggetto di studio alle concentrazioni di 5, 10, 100 nM, le colture sono state fissate e per ciascuna di esse sono state acquisite 5 immagini utilizzando un microscopio a contrasto di fase collegato ad una fotocamera digitale. Su tali immagini, grazie ad un sistema computerizzato di analisi di immagine, sono stati misurati parametri dimensionali, quali, l'area percentuale coperta dalle cellule endoteliali e la lunghezza totale della rete cellulare per campo, e parametri topologici, quali il numero di maglie chiuse e i punti di ramificazione per campo.

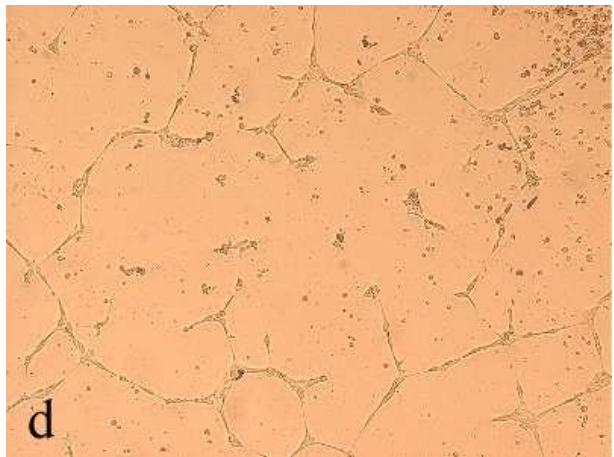
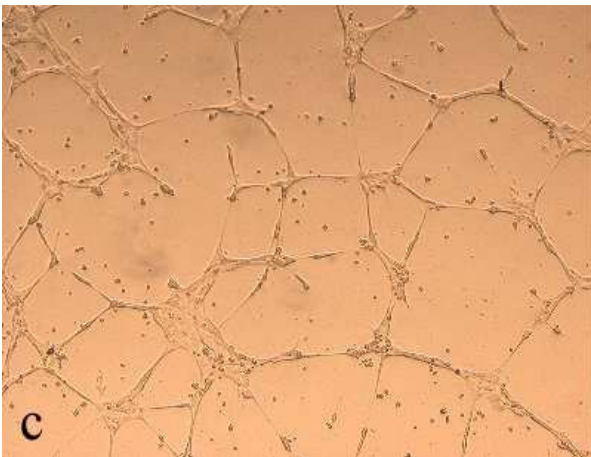
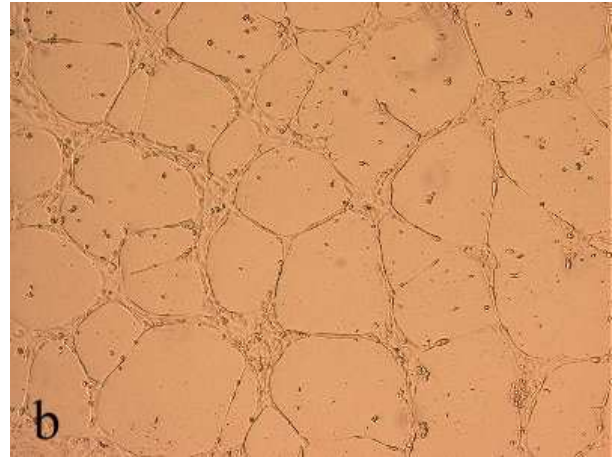
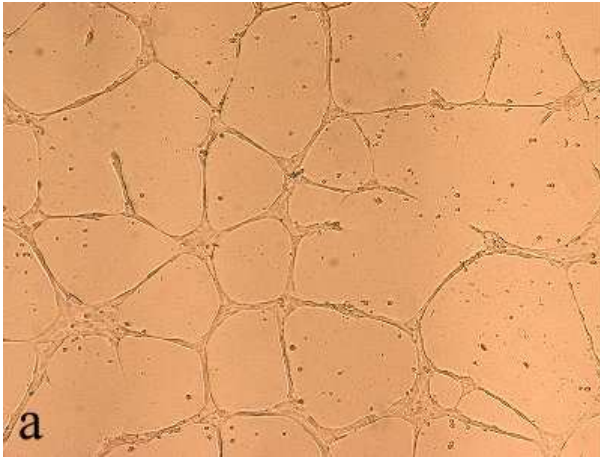
In figura 5.24, sono riportati alcuni esempi di immagini relative alle colture in seguito ai vari tipi di trattamento.

Si può osservare che in presenza delle isoforme naturali del tratto C-terminale, le cellule avevano una maggior tendenza ad organizzarsi in una rete di strutture simil-capillari, rispetto a quanto accadeva per le colture di controllo. Gli analoghi di SDF-1 β T con mutazioni puntiformi hanno interferito negativamente nell'organizzazione delle HUVEC seminate su Matrigel.

La valutazione quantitativa delle foto raccolte al microscopio per ogni condizione testata, ha confermato che SDF-1 α T (Figura 5.25a) promuoveva, già alla concentrazione di 5 nM, un aumento significativo di tutti i parametri sia dimensionali che topologici. Il trattamento con SDF-1 β T (Figura 5.25b) si ripercuoteva solo sulle proprietà dimensionali. Al contrario, la sostituzione di alcuni residui della sequenza C-terminale dell'isoforma beta, causava l'inibizione *in vitro* di eventi morfogenici. L'efficacia di SDF-1 β T Nal70 (Figura 5.25c) e SDF-1 β T Nle72 (Figura 5.25d) sembrava superiore rispetto a quella ottenibile con SDF-1 β T DPhe70/Nle72. Infatti, i primi due peptidi hanno sempre indotto diminuzioni significative di tutti i parametri misurati, fatta eccezione per parametri dimensionali e punti di ramificazione in seguito a trattamento con SDF-1 β T Nal70, rispettivamente, alla concentrazione di 10 e 5 nM e parametri topologici dopo esposizione con 5 nM SDF-1 β T Nle72. SDF-1 β T DPhe70/Nle72 (Figura 5.25e) ha indotto invece diminuzioni significative solamente in alcuni parametri: area percentuale, lunghezza e numero delle maglie alla concentrazione di 5 nM, solamente la lunghezza delle maglie alla concentrazione di 10 nM e il numero di maglie alla concentrazione di 100 nM.

Il comportamento delle sostanze derivate da fusione dei tratti N- e C-terminali sembra dipendere dalla concentrazione. SDF-1 β T NC alla concentrazione di 100 nM ha causato un decremento nella lunghezza e nel numero di maglie (Figura 5.25f). Al contrario, 5 e 10 nM SDF-1 β T NC hanno entrambi

determinato un aumento dell'area percentuale ricoperta dalle cellule e dei parametri topologici. Dagli effetti quasi opposti, Met-SDF-1 β T NC alla concentrazione piú elevata (100 nM) ha indotto un aumento del numero di maglie e dei parametri dimensionali; ad una dose 10 volte inferiore si osservava una riduzione di tutti e quattro i parametri valutati, mentre l'esposizione a 5 nM non causava alcuna variazione (Figura 5.25g).



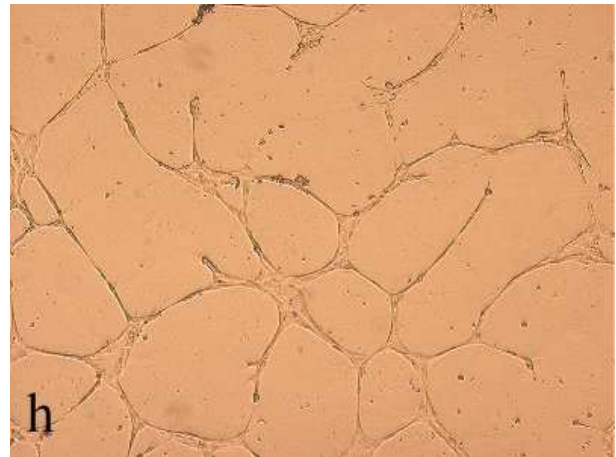
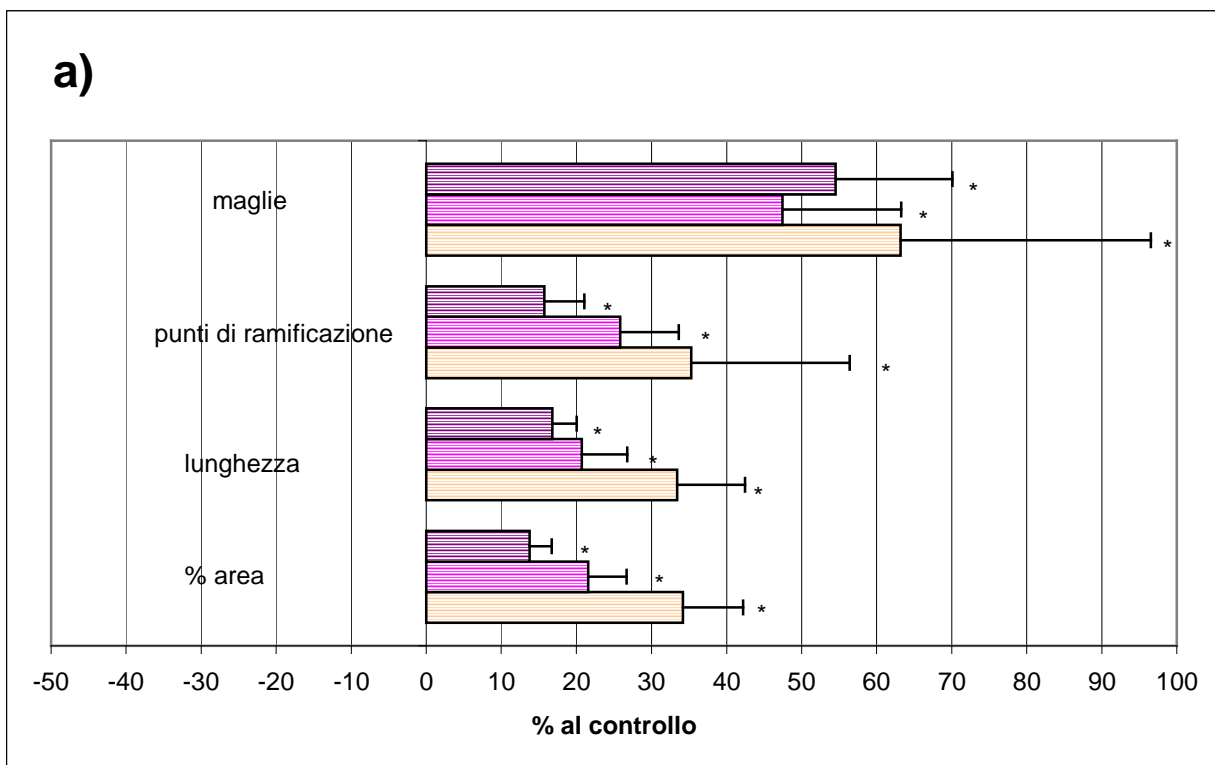
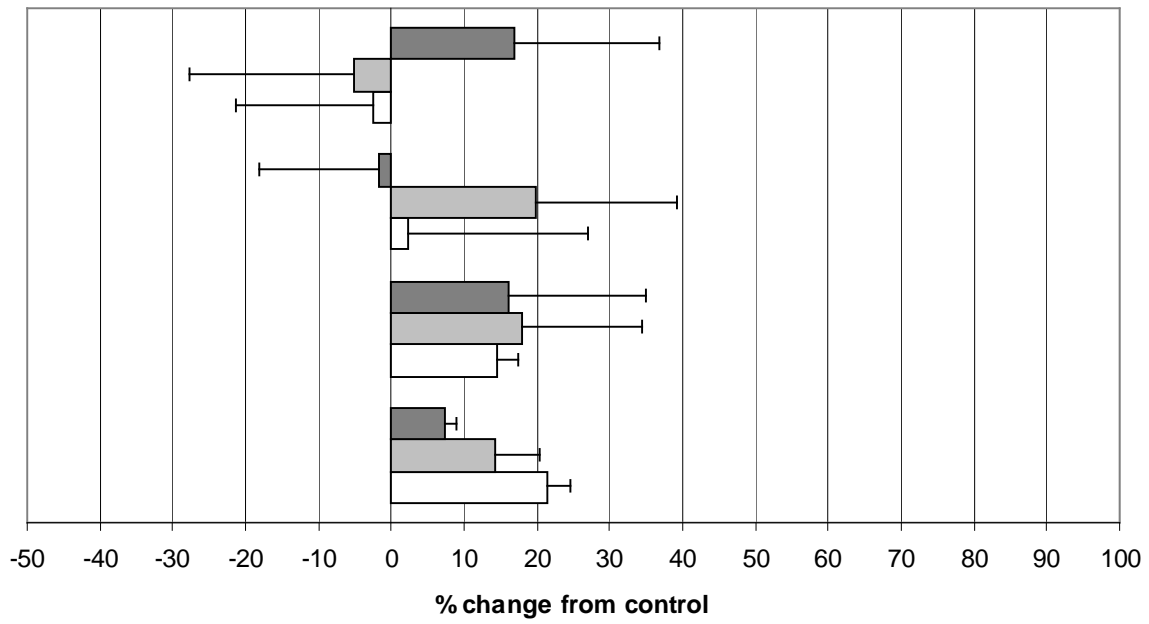


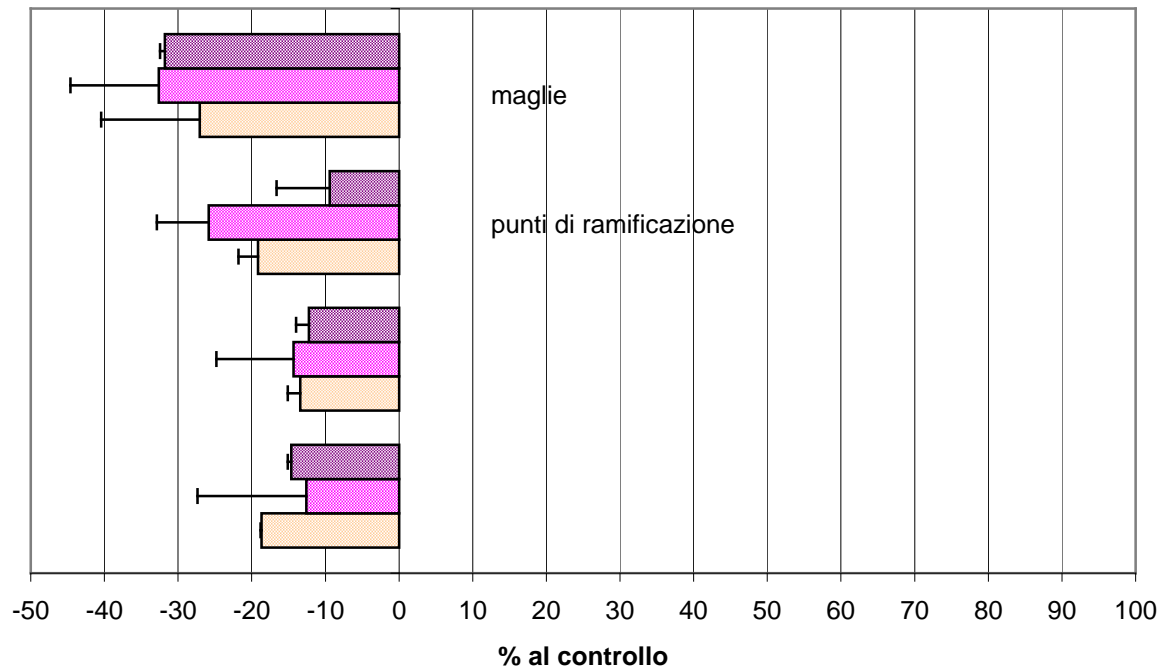
Figura 5.24. HUVEC seminate su Matrigel: a) Controllo; b) Cellule trattate con SDF-1 α T (100 nM); c) Cellule trattate con SDF-1 β T (100 nM); d) Cellule trattate con SDF-1 β T Nal70 (100 nM); e) Cellule trattate con SDF-1 β T DPhe70/Nle72 (5 nM); f) Cellule trattate con SDF-1 β T Nle72 (10 nM); g) Cellule trattate con Met-SDF-1 β NC (100 nM); h) Cellule trattate con SDF-1 β NC (10 nM). Ingrandimento x50.



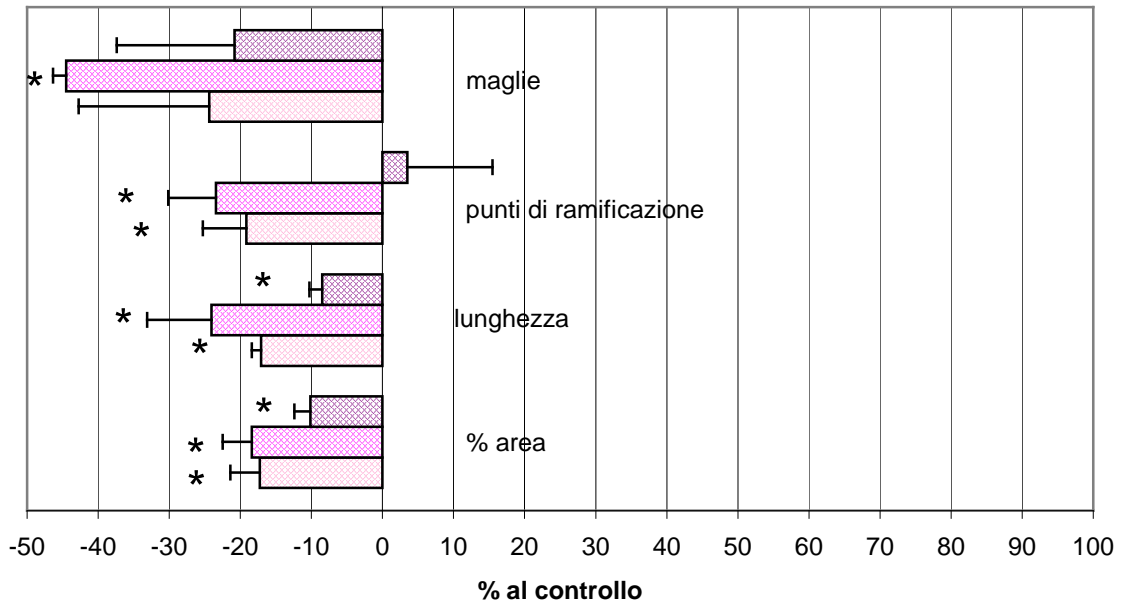
B



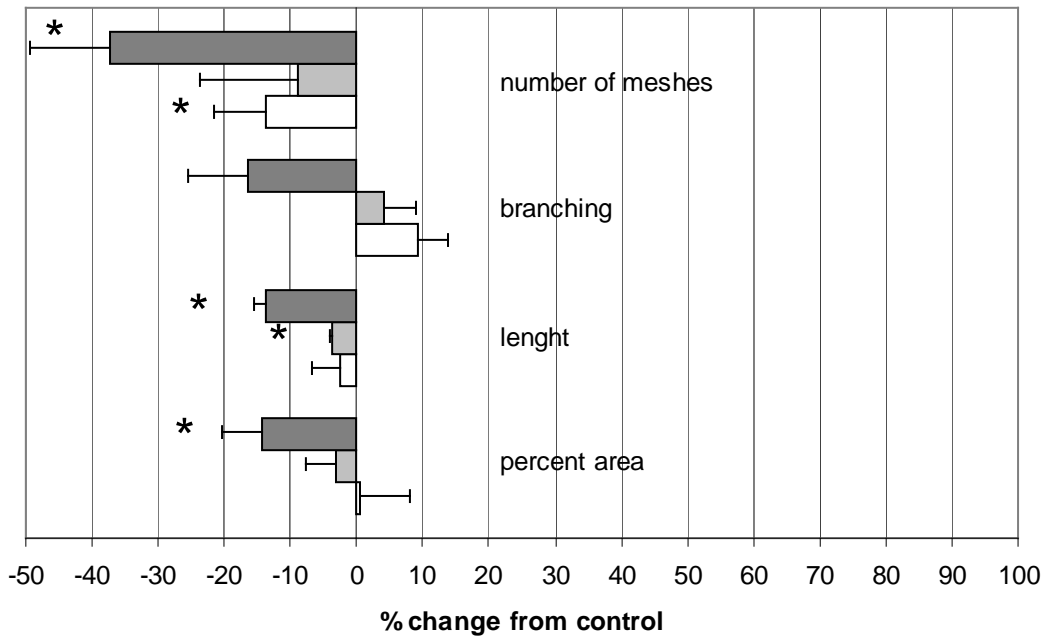
c)



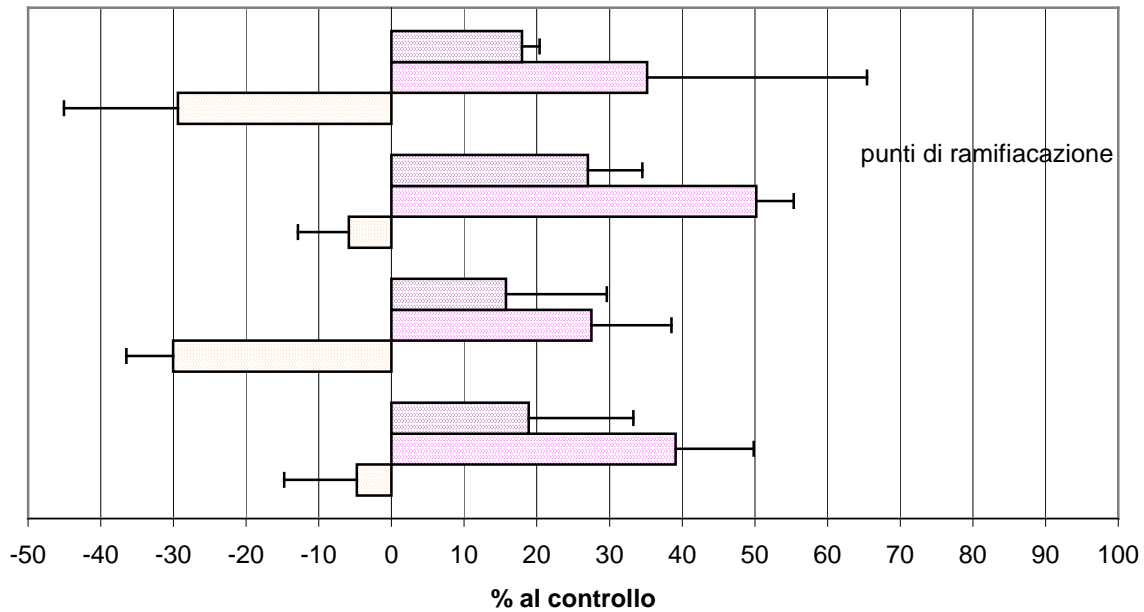
d)



E



f)



g)

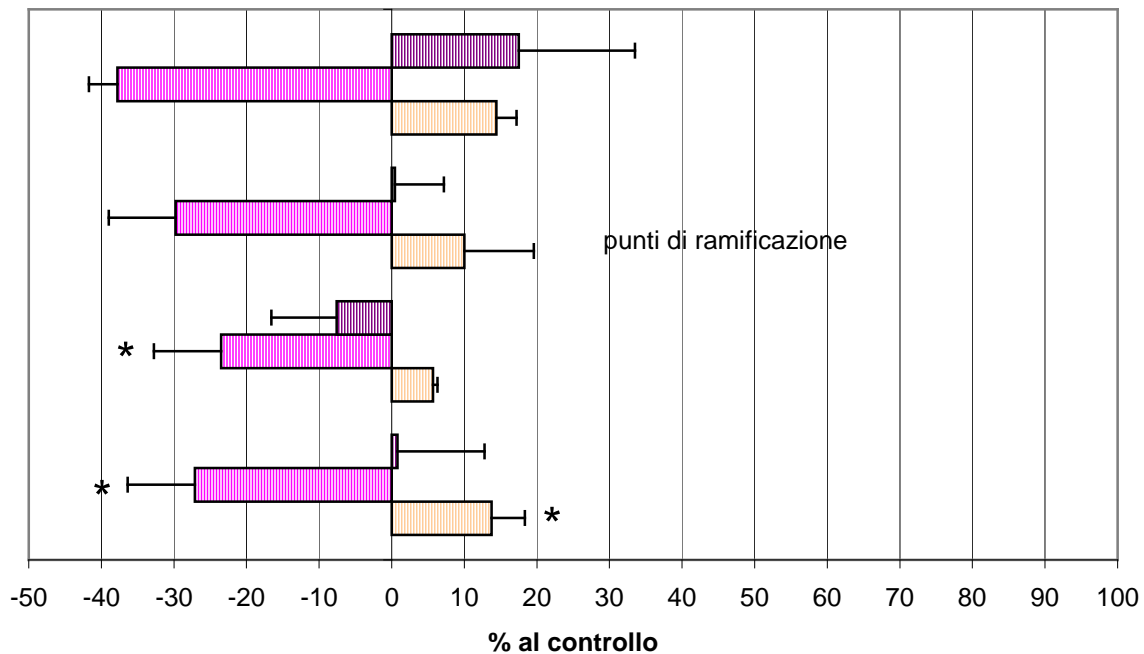


Figure 5.25. Analisi quantitative degli effetti di SDF-1 α T (a), SDF-1 β T (b), SDF-1 β T NaI70 (c), SDF-1 β T Nle72 (d), SDF-1 β T DPhe70/Nle72 (e), SDF-1 β NC (f), and Met-SDF-1 β NC (g) sui parametri dimensionali (area percentuale ricoperta dalle cellule e lunghezza delle maglie, per campo), e su quelli topologici (numero di maglie e numero di punti di ramificazione, per campo) della rete di strutture simil-capilari formate dalle HUVEC seminate su Matrigel. I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato. Gli istogrammi (rosa chiaro = 100 nM, rosa = 10 nM, viola = 5 nM), corrispondono ai valori delle medie \pm deviazione standard, di almeno 3 esperimenti. * = $p < 0.05$ rispetto alle colture di controllo, t test di Student.

5.1.8

Effetti sulla morfogenesi *in vivo*

Per una valutazione dell'efficacia *in vivo* dei derivati dell'SDF-1, sono state testate le sole sequenze naturali, precisamente SDF-1 α T, SDF-1 β T, e SDF-1 β NC alla concentrazione di 10 mM. Il trattamento delle membrane corioallantoiche di embrione di pollo, evidenziava come tutt'attorno agli impianti ci fosse un richiamo dei vasi dallo strato allantoico, con disposizione radiale alle spugne, illustrabile con il paragone dei raggi di una ruota. L'analisi quantitativa ha riportato i seguenti valori medi: 25 \pm 5 per SDF-1 α T; 24 \pm 5 per SDF-1 β T e 27 \pm 5 per SDF-1 β NC ($p < 0.001$ verso il controllo trattato col solo PBS). L'efficacia di tale risposta angiogenica era paragonabile a quella ottenuta dal trattamento con la chemochina FGF-2 in concentrazione pari a 200 ng/(29 \pm 4; $p < 0.001$ rispetto al controllo) e i valori numerici relativi, risultavano significativamente superiori a quelli dei controlli negativi, nei cui impianti non era rintracciabile alcuna reazione vascolare (8 \pm 2; tabella 3).

Trattamento	N° di vasi
SDF-1 α T	25 \pm 5*
SDF-1 β T	24 \pm 5*
SDF-1 β NC	27 \pm 5*
FGF-2	29 \pm 4*
PBS	8 \pm 2

Tabella 5.3. Effetti dei peptidi dell'SDF-1 sull'angiogenesi *in vivo*, saggio sulla membrana corioallantoica di pollo.

5.1.9 DISCUSSIONE

È stato dimostrato che SDF-1 è in grado di indurre, tramite interazione con il recettore CXCR4 presente sulla superficie cellulare, motilità, risposte chemotattiche, adesione cellulare e secrezione di MMP e fattori angiogenici, quali VEGF (Kucia et al, 2004). L'attivazione di numerose vie di segnale si traduce in una modulazione del traffico cellulare e dell'interazione tra cellule e ambiente circostante.

SDF-1 è una chemochina coinvolta in processi sia fisiologici che patologici: induce l'*homing* delle cellule ematopoietiche staminali nel midollo osseo (Moepps *et al.*, 2000) e, aumentando la motilità delle cellule tumorali CXCR4⁺ (Libura *et al.* 2002), favorisce la formazione di metastasi. Gioca, inoltre, un ruolo importante nello sviluppo del sistema vascolare, in quanto, tramite interazione con il recettore CXCR4 espresso sulla superficie delle cellule endoteliali (Feil and Augustin, 1998)), esercita un forte effetto angiogenico sia *in vitro* che *in vivo* (Salvucci *et al.*, 2002; Salcedo *et al.*, 1999).

Attualmente, l'asse SDF-1-CXCR4 rappresenta un bersaglio per interventi terapeutici: la progettazione di antagonisti per tale sistema può trovare applicazione nella terapia antitumorale e nella mobilitazione a livello periferico di cellule staminali ematopoietiche, mentre agonisti potrebbero venire utilizzati per migliorare l'attecchimento di progenitori ematopoietici nel midollo osseo in seguito a trapianto (Kucia *et al.*, 2004), la rigenerazione di organi e tessuti danneggiati o per il trattamento di patologie cardiovascolare di natura ostruttiva (Carr *et al.*, 2006).

SDF-1 è prodotto nell'uomo in 6 diverse isoforme derivate da *splicing* alternativo di un singolo gene localizzato nel cromosoma 10 (Yu *et al.*, 2006). Le varianti maggiormente espresse e meglio caratterizzate sono: alfa, beta e gamma. SDF-1beta differisce dall'alfa, dal punto di vista della struttura primaria, per la presenza di 4 amminoacidi addizionali alla regione C-terminale. SDF-1gamma ha una sequenza C-terminale più lunga con una sequenza amminoacidica diversa da quella del beta.

Conformazionalmente la citochina consiste di tre domini distinti: una regione N-terminale, un dominio centrale con tre β -sheet antiparalleli e una regione C-terminale anfifilica ad α -elica (Crump *et al.*, 1997). La regione N-terminale (residui 1-18) forma un importante sito recettoriale, in particolare le prime due posizioni della catena polipeptidica assieme alla sequenza ¹²REFRESH¹⁷ sono direttamente coinvolte nell'attivazione del recettore CXCR4 (Luo *et al.*, 1999). Rimane ancora da chiarire se il ruolo della regione C-terminale sia prettamente strutturale o sia in qualche modo legato alla funzione biologica. Il frammento N-terminale isolato, conserva la capacità di interagire con CXCR4, ma non risulta in grado di indurre flussi di Ca²⁺ e conseguentemente promuovere la chemiotassi di linfociti T (Cai *et al.*, 2004). Funzioni che vengono riacquistate da sequenze di fusione tra i due tratti terminali. Inoltre la presenza di vari residui carichi positivamente a livello del C-terminale, favorisce l'interazione coi GAG presenti sulla cellula o sulla ECM (Crump *et al.*, 1997). In tal modo i GAG immobilizzano e aumentano la concentrazione locale della chemochina, promuovendo la sua oligomerizzazione e facilitando la sua presentazione al recettore.

In questa tesi è stato verificato il possibile coinvolgimento della regione C-terminale nell'induzione degli effetti pro-angiogenici esercitati dall'SDF-1. A tal fine è stata valutata *in vitro* e *in vivo* l'attività angiogenica di tre gruppi di peptidi. Il primo gruppo conteneva due peptidi, SDF-1 α T e SDF-1 β T, in cui erano presenti le sequenze naturali del terminale carbossilico delle due forme di *splicing*. Gli altri due gruppi comprendevano derivati dell'SDF-1beta, poiché è stato dimostrato che quest'ultimo esercita

attività antivirali più intense rispetto alla forma alfa (Crump *et al.*, 1997; Heveker *et al.*, 1998). In particolare, nel secondo gruppo erano presenti tre peptidi, SDF-1 β T Nal70, SDF-1 β T DPhe70/Nle72 e SDF-1 β T Nle72, contenenti tre diverse mutazioni puntiformi nel tratto C terminale. Il terzo gruppo comprendeva 2 peptidi, Met-SDF-1 β NC e SDF-1 β NC, nei quali la porzione N-terminale è stata fusa sequenzialmente con il tratto C-terminale.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come il dominio C-terminale sia un elemento strutturale importante nell'induzione di effetti pro-angiogenici, in quanto solamente i derivati SDF-1 α T e SDF-1 β T, hanno determinato un aumento di tutti i parametri considerati *in vitro*, quali morfogenesi, vitalità e adesione cellulare e hanno promosso eventi angiogenici *in vivo* su CAM. Al contrario, i peptidi appartenenti agli altri due gruppi, nei quali il tratto C terminale era stato modificato o fuso con una sequenza N terminale, si sono rivelati o inefficaci o meno attivi o parzialmente dotati di azione anti-angiogenica.

Poiché i peptidi SDF-1 α T e SDF-1 β T, corrispondono al solo tratto C-terminale e non sono, rispetto a quanto riportato in letteratura, in grado di interagire con il recettore CXCR4, il loro effetto è probabilmente imputabile all'interazione con altre strutture cellulari. Una prima ipotesi prevede l'interazione della regione C-terminale con il recettore, denominato RCD1/CXCR7. Fino a qualche anno fa si riteneva che il legame di SDF-1 per CXCR4 fosse di tipo esclusivo; il gruppo di ricerca del Prof. Bachelier ha individuato invece in CXCR7, un nuovo recettore ad alta affinità di legame per la chemochina. La proteina a sette domini transmembrana, è implicata nella regolazione di importanti processi fisiologici, tra cui l'adesione e la sopravvivenza cellulare, e patologici, in particolare lo sviluppo di tumori in modelli sperimentali animali. CXCR7 infatti è espresso su varie linee tumorali, sulla membrana delle cellule endoteliali attivate, soprattutto è presente sull'endotelio di vasi tumorali, e pochi altri tipi cellulari. Al momento non è stato ancora identificato in SDF-1, il tratto amminoacidico interessato al legame con il nuovo recettore; è stato osservato solamente, che la perdita dei primi tre residui ¹KPV³ all'N-terminale, come per CXCR4, comporta una riduzione dell'affinità di legame (Balabanian *et al.*, 2005).

Per cui è possibile che i peptidi oggetto di studio leghino tale recettore, espresso nelle colture *in vitro* di HUVEC (Hatse S. *et al.*, 2006), e a differenza, perciò di CXCR4, il *binding* e l'attivazione del *signaling* intracellulare, coinvolgerebbe direttamente l'altra estremità della proteina nativa.

La seconda ipotesi, formulabile per il peptide SDF-1 β T, prevede invece un'interazione con i GAG della superficie cellulare. Infatti, SDF-1 β presenta, rispetto all'isoforma alfa, un sito di legame per l'eparina (⁶⁹RFKM⁷²), ricco di amminoacidi basici (Dettin *et al.*, 2005). Tale motivo assieme a quello presente nel core (²⁴KHLK²⁷), permette il legame ai proteoglicani eparan-solfato, e viene fisiologicamente sfruttato per modulare la concentrazione locale del ligando e per prevenire eventi di inattivazione proteolitica. D'altra parte l'immobilizzazione ai GAG può comportare una riduzione dell'efficacia del peptide, come

evidenziato dai risultati ottenuti nei saggi di morfogenesi, e la richiesta di concentrazioni più elevate rispetto all'analogo SDF-1 α . Un'altra spiegazione della minor attività di SDF-1 β T potrebbe risiedere in motivi conformazionali di ingombro sterico, a seguito del tratto amminoacidico aggiuntivo. Tali ipotesi è avvalorata dal fatto che mutazioni puntiformi, principalmente di carattere conformazionale e che aumentano l'ingombro sterico della struttura, precludono in parte l'attività angiogenica della sequenza 52-68, dominio proteico in cui sembra risiedere l'azione biologica pro-angiogenica evidenziata dai saggi. Tra i derivati peptidici studiati, SDF-1 β T Nal 70 (caratterizzato dalla sostituzione di un anello benzenico in catena laterale della Phe, con un sistema aromatico di due anelli a sei atomi di carbonio fusi tra loro, del residuo di Naftilalanina) non è stato in grado di migliorare i livelli di vitalità cellulare e ha esercitato un effetto inibitorio sulla formazione di strutture tubolari su Matrigel. Inoltre, le differenze osservate nell'attività potrebbero anche essere dovute a variazioni nella conformazione del peptide. Infatti, Dettin *et al.* (2005) hanno osservato che, in seguito a legame con eparina, l'estensione dei tratti ad alfa elica diminuisce in SDF-1 β T Nal 70, mentre aumenta nel caso di SDF-1 β T, traducendosi in una maggiore attività anti-virale anti-HIV di quest'ultimo peptide.

L'attività biologica delle chemochine è mediata dal legame ai recettori della famiglia rodopsina-simili accoppiati a proteine G. La traduzione del segnale, nel caso dei membri della sottofamiglia delle G_{i/o} sensibili alla tossina della pertosse (come CXCR4), comporta l'inibizione dell'adenilato ciclasi da parte della subunità α , e l'attivazione della fosfolipasi C, via subunità $\beta\gamma$, responsabile dell'aumento di Ca²⁺ citoplasmatico. Altri *pathway* coinvolti negli effetti indotti dalle citochine sono: la cascata PI-3K-AKT-NF- κ B e quella MAPK-ERK-1/2. Entrambi questi *signaling* sono legati alla sopravvivenza e proliferazione cellulare; numerosi studi riportano inoltre, l'associazione tra variazioni della densità dei vasi del microcircolo e l'attivazione di ERK-1/2 e Akt, in relazione all'espressione di Il-8 e VEGF, noti fattori pro-angiogenici. (Fureder et al., 2006; Jubb et al., 2006). E' stato dimostrato che l'interazione tra SDF-1 e CXCR4, analogamente a FGF-2 e altre citochine, attiva molteplici vie di segnale, tra cui quelle citate precedentemente, e cioè la mobilitazione di calcio dai depositi intra-citoplasmatici, la cascata PLC/PKC, la chinasi ERK-1/2 e la via PI-3K/Akt (Kucia et al, 2004); a queste si aggiungono le chinasi coinvolte nelle adesioni focali e quelle appartenenti alla famiglia Scr (Thelen et al., 2001), le Jak-STAT e la PCK ξ atipica. Quest'ultima è un'isoforma della PKC, recentemente scoperta da Goichberg e collaboratori (2006) e sembra aver un ruolo rilevante nella modulazione dell'asse SDF-1/CXCR4.

Diversamente il legame di SDF-1 a CXCR7 non è ancora stato caratterizzato dal punto di vista delle vie di segnale intracellulari, le uniche evidenze fanno presupporre che il *pathway* legato al nuovo recettore sia diverso da quello descritto per i recettori accoppiati a proteine G (Burns *et al.*, 2006), tuttavia a livello delle cellule endoteliali sembra ugualmente mediato dall'attivazione di ERK-1/2 (Hatse *et al.*, 2006).

A fronte di quanto riportato, è stata valutata la vitalità cellulare di colture di HUVEC pre-trattate con alcuni noti inibitori delle vie di segnale, e successivamente incubate con SDF-1 α T e SDF-1 β T. Dai risultati ottenuti, l'aumento della vitalità cellulare indotto dai peptidi sembrerebbe coinvolgere le stesse vie di segnale attivate dalla proteina nativa, e da fattori pro-angiogenici. Infatti, il pre-trattamento delle colture con LY294002 e con PD98059, ha comportato una significativa e marcata riduzione dell'effetto proliferogeno dei campioni, facendo ipotizzare un ruolo chiave, rispettivamente, delle cascate PI-3K e MAPK/ERK-1/2, nell'attività biologica osservata *in vitro*. L'effetto di entrambi i peptidi è stato contrastato in modo significativo anche dall'inibitore U-73122, selettivo per la PLC. Unica differenza tra SDF-1 α T e SDF-1 β T riguarda il coinvolgimento delle chinasi PKC e PKA; al segnale intracellulare attivato da SDF-1 β T, sembra partecipare anche una o più delle isoforme di PKC, mentre alcuna inibizione è stata riscontrata nella vitalità delle colture trattate con la sequenza alfa C-terminale.

Il ruolo di PKA e della cascata del cAMP, sembrerebbe più controverso, dato che il suo effetto sull'asse SDF-1/CXCR4 è sia di tipo positivo che negativo, e a quanto sembra, dipende dalla mediazione o meno di PKC ζ (Goinchberg et al., 2004). Il trattamento con l'analogo del cAMP, Rp-cAMP, può da un lato favorire la sopravvivenza e la proliferazione cellulare indotta da SDF-1, poiché verrebbe meno l'azione inibitoria diretta della cascata di PKA, su ERK-1/2; dall'altro lato bloccherebbe l'effetto attivante, mediato da PKC ζ , sugli stessi eventi cellulari. A riguardo del diverso comportamento osservato per i due derivati di SDF-1, questo potrebbe dipendere da più fattori, in primo luogo dalla capacità di bilanciare segnali intracellulari positivi e negativi legati alla via del cAMP, dal livello di attivazione dei vari pathway, e dall'induzione di differenti effettori intracellulari, come ad esempio la PKC.

Come precedentemente ricordato, nel tratto N-terminale sono presenti sequenze responsabili del corretto binding al recettore CXCR4 e conseguente attivazione delle vie di segnale. Entrambe le sequenze 1-8 e 12-17 sono necessarie per indurre la risposta biologica (Crump M.P. *et al*, 1997). Il motivo RFFESH è importante per un legame ottimale, ma non è sufficiente per l'attivazione del recettore e probabilmente è responsabile solo della fase iniziale di contatto. Successivamente il tratto N-terminale 1-8 si lega a una tasca tra le eliche, viene così indotta una variazione conformazionale del recettore transmembrana e che permette il legame intracellulare della proteina G e l'inizio della trasduzione del segnale (Farrens *et al.*, 1996). L'attivazione del recettore richiede la presenza di Lys-1 and Pro-2 all'interno della sequenza 1-8 del tratto N terminale e modificazioni di questi 2 amminoacidi portano a molecole ad azione antagonista. Anche i peptidi Met-SDF-1 β NC e SDF-1 β NC mancando del sito ¹²RFFESH¹⁷, hanno potenzialmente attività antagonista. Infatti, nonostante la presenza della sequenza C-terminale, SDF-1 β NC alla concentrazione più elevata (100 nM) esercita un effetto anti-proliferativo ed entrambi mostrano un'attività parzialmente inibitoria dipendente dalla concentrazione, verso la formazione di strutture simil-capillari. È difficile dire se l'aumento dell'adesione su piastre

condizionate con tali peptidi sia legata i) alla presenza di parte del sito di legame per CXCR4; ii) al tratto C-terminale, dato che, anche SDF-1 α T e SDF-1 β T promuovono, seppur in misura minore, l'adesione al supporto di coltura; o iii) ad entrambe le condizioni. La possibilità di interagire con più strutture recettoriali, grazie alla presenza delle due regioni terminali, assieme tuttavia all'incapacità totale o parziale, di non portare ad un *binding* "produttivo" per CXCR4, con conseguente attivazione del segnale intracellulare, può spiegare il comportamento duplice osservabile nei saggi *in vitro*, in rapporto, inoltre, ai risultati su CAM. SDF-1 NC infatti, promuove *in vivo* un aumento della densità vascolare con efficacia comparabile a quella mostrata da i due derivati wild-type del tratto C-terminale, e da FGF-2, fattore di crescita noto per la sua azione angiogenica.

In conclusione, in questo studio è stato evidenziato che:

- i. il tratto C terminale dell'SDF-1 non ha solo funzione strutturale, ma è responsabile dell'attivazione di chinasi intracellulari, che inducono *in vitro* e *in vivo* una forte effetto pro-angiogenico;
- ii. modifiche puntiformi a carico dei residui Phe70 e Met72, annullano l'azione pro-angiogenica del tratto C-terminale, e nel caso di un aumento dell'ingombro sterico, si assiste persino ad effetti di tipo inibitorio;
- iii. anche il tratto N-terminale gioca un ruolo nell'induzione dell'angiogenesi e la mancanza della sequenza di *binding* RFFESH si traduce in derivati caratterizzati da un'azione mista, dipendente *in vitro* dalla concentrazione impiegata.

I risultati ottenuti incoraggiano lo svolgimento di ulteriori indagini sia *in vitro* che *in vivo* sull'attività biologica dei peptidi SDF-1 α T e SDF-1 β T, che potrebbero rappresentare dei promettenti agenti pro-angiogenici utilizzabili in campo terapeutico.

6. PEPTIDI ANTI-ANGIOGENICI

MOTIVI DI ADESIONE

Nell'ultimo decennio la ricerca di nuovi agenti ad attività antitumorale si è focalizzata nell'individuare composti attivi su ogni singola fase del processo angiogenico. Dal momento che ogni stadio dell'angiogenesi coinvolge un'ampia varietà di enzimi, citochine e recettori, vari e differenti sono i potenziali bersagli per intervenire terapeuticamente in condizioni patologiche sul processo angiogenico (Liekens *et al.*, 2001). Come già accennato in precedenza, l'ECM ha un ruolo fondamentale nel supporto fisiologico per l'adesione cellulare, nella migrazione, nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule endoteliali. L'inibizione delle interazioni cellula-matrice rappresenta dunque un potenziale approccio nella terapia antiangiogenica e può coinvolgere due *target* diversi presenti sulla superficie cellulare: i recettori di adesione, come le integrine, e i recettori glicoproteici di superficie, i proteoglicani eparan solfato (HSPG).

6.1 SEQUENZE RGD

Le integrine sono un gruppo di recettori di adesione cellulare eterodimerici, costituiti da una subunità α e una β non legate covalentemente, in grado di mediare le interazioni sia cellula-cellula sia quelle cellula-matrice (Giancotti *et al.*, 1999). È stato messo in evidenza che alcune proteine dell'ECM, come ad esempio la fibronectina, la vitronectina e la laminina, contengono la sequenza RGD (Figura 6.1) che, riconosciuta dalle integrine della superficie cellulare, permette alle cellule di ancorarsi alla matrice (Maeshima *et al.*, 2001). Sulla base di queste considerazioni, studi condotti su peptidi contenenti il motivo RGD hanno evidenziato la capacità di interferire con l'adesione cellulare, per competizione con il legame integrine-matrice, e di esercitare un'azione antinfiammatoria, anticoagulante, antiangiogenica e antimetastatica (Vassilev *et al.*, 1999; Romanov *et al.*, 1999). Infatti, l'interruzione dei contatti tra l'ECM e le cellule comporta una riduzione della vitalità cellulare in seguito all'attivazione di segnali proapoptotici trasdotti dalle integrine e legati alla dipendenza di certe cellule all'adesione ad un substrato, fenomeno definito *anoikis* (Chen *et al.*, 1997; Montgomery *et al.*, 1994).

Ad esempio, l'integrina $\alpha_5\beta_3$, un recettore di adesione per i componenti dell'ECM che presentano la sequenza RGD, rappresenta un ottimo *target* per la terapia antiangiogenica dal momento che è esclusivamente presente sulla superficie delle cellule endoteliali attivate, ma assente sull'endotelio

quiescente o su altri tipi di cellule (Eliceiri *et al.*, 1999). Recentemente sono state individuate due molecole: un antagonista peptidico dell'integrina $\alpha_5\beta_3$ contenente la sequenza RGD e un anticorpo monoclonale anti- $\alpha_5\beta_3$, che hanno dimostrato di essere capaci di inibire il segnale di trasduzione adesione-dipendente da fattori angiogenici, determinando l'apoptosi dell'endotelio attivato (Brower *et al.*, 1999). Inoltre, sembra che la sequenza RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) presenti un effetto antimigratorio e di inibizione della proliferazione indotta da FGF-2 verso le cellule endoteliali di cordone ombelicale (Aguzzi *et al.*, 2004). Questo effetto è legato all'interazione con le caspasi 8 e 9. Si ipotizza infatti che il polipeptide possa agire sia a livello superficiale con un meccanismo mediato da integrine, sia all'interno delle HUVEC scatenando direttamente il processamento e l'attivazione degli effettori del programma di morte cellulare, svincolandosi dalla mediazione dei recettori di superficie (Aguzzi *et al.*, 2004).

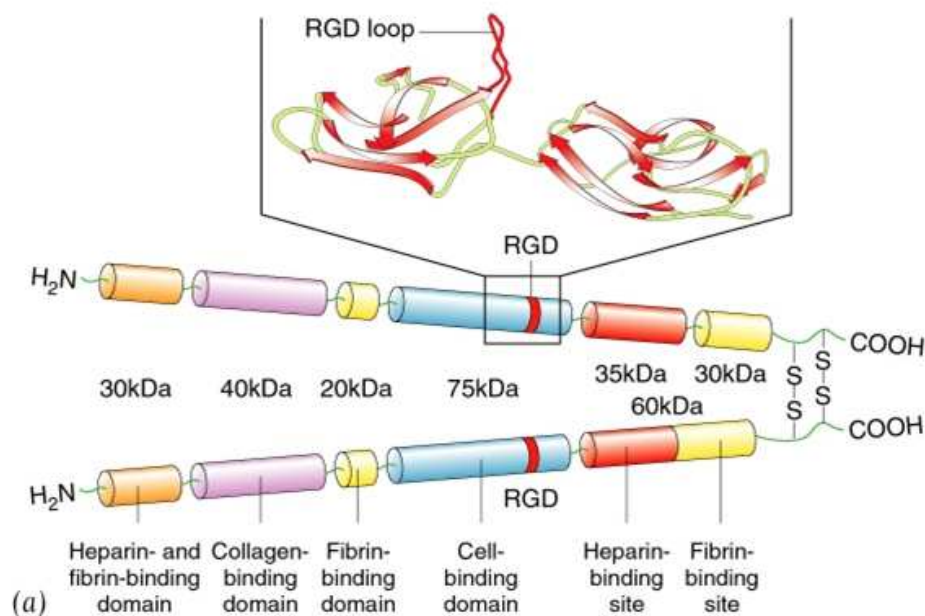


Figura 6.1. Struttura della Fibronectina, con ingrandimento del *loop* contenente il motivo RGD.

6.2 SEQUENZE DI LEGAME PER L'EPARINA

Oltre al motivo RGD esistono altre sequenze di riconoscimento cellulare in grado di mediare interazioni e comportamenti cellulari specifici. In particolare gli HSPG della superficie cellulare, essendo in grado di riconoscere il dominio di legame dell'eparina, permettono legami cellula-ECM (Dettin *et al.*, 2005). Gli HSPG sono costituiti da proteine *core* alle cui catene sono legati i glicosaminoglicani (GAG) contenenti gruppi eparan solfato. L'interazione cellula-ECM che si instaura è

dunque di tipo ionico, poiché coinvolge le catene saccaridiche cariche negativamente dei proteoglicani e le regioni di binding dell'ECM ricche in aminoacidi basici (Hersel *et al.*, 2003). Infatti i domini di binding dell'eparina presentano sequenze del tipo XBBXB_x o XBBBXXXB_x, dove B rappresenta un aminoacido basico e X un qualsiasi aminoacido non basico (Cardin *et al.*, 1989). Dal momento che legano proteine della matrice tra cui collagene, TSP, fibronectina e vitronectina, gli HSPG intervengono sia nell'organizzazione dell'ECM favorendo l'adesione e la migrazione cellulare, sia in fenomeni differenziativi e proliferativi.

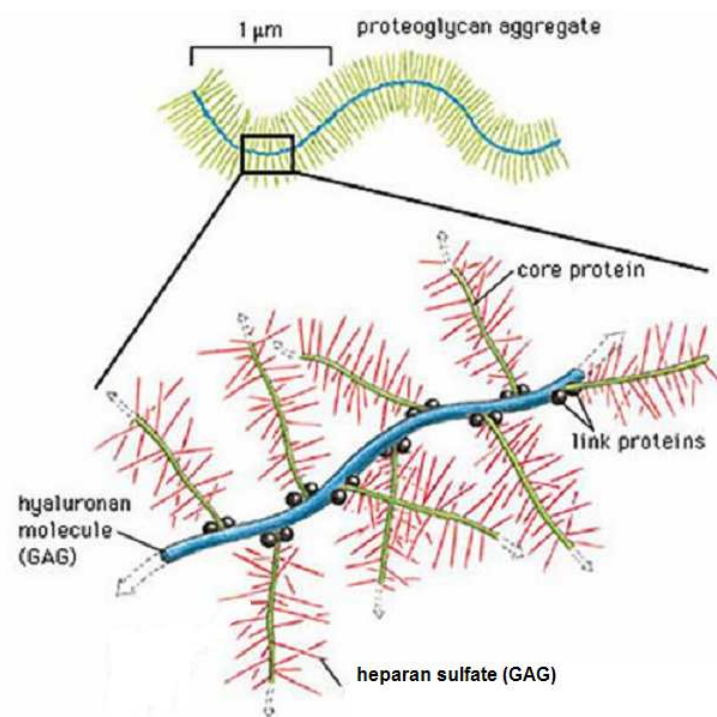


Figura 6.2. Struttura generale dei proteoglicani

Considerando l'importanza che rivestono le interazioni con la matrice, nel processo angiogenico, in questo lavoro di dottorato è stato valutato *in vitro* e *in vivo*, l'effetto indotto sul processo angiogenico di alcune sequenze peptidiche riproducenti due diverse tipologie di domini di adesione, progettati originariamente con il fine di promuovere l'adesione cellulare su biomateriali (Dettin *et al.*, 2005). I due gruppi di molecole sono così composti:

i. peptidi contenenti la sequenza RGD

- il motivo minimo di adesione RGD;
- GRGDSPK, motivo naturale presente all'interno della fibronectina a cui è stato addizionato un residuo di lisina al C-terminale per ragioni sintetiche;
- (GRGDSP)₄K, sequenza lineare costituita dalla ripetizione di quattro motivi RGD;

- MAP(RGDSP), molecola ramificata in cui il tripeptide RGD compare per otto volte (Figura 4.3);
- ii. $^{351}\text{FRHRNRKGY}^{359}$, sequenza naturale di *binding* dell'eparina (XBBBXBX) appartenente alla vitronectina, a cui si legano gli eparan-solfati e denominata HVP (352-360).

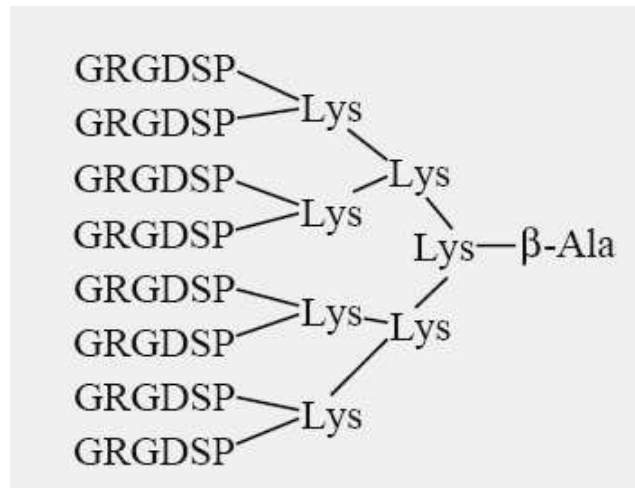


Figura 6.3. Struttura ramificata del peptide MAP(RGDSP).

6.3.6 RISULTATI

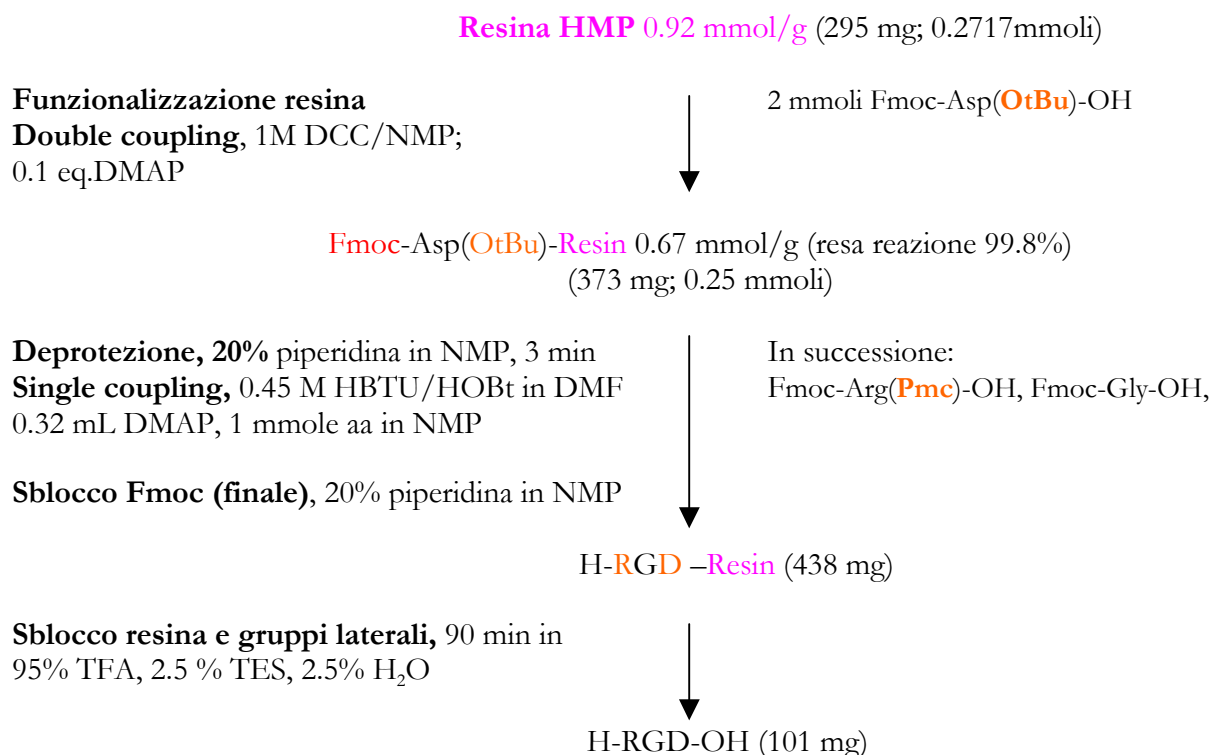
6.3.1 Sintesi

I peptidi riproducenti i motivi di legame per recettori implicati nell'adesione cellulare, sono stati sintetizzati presso il laboratorio del Prof. Di Bello dell'Università di Padova, Dip. di Processi Chimici dell'Ingegneria, tramite metodica di sintesi su fase solida automatizzata (sintetizzatore Applied Biosystems Mod. 431 A) e usando la chimica Fmoc.

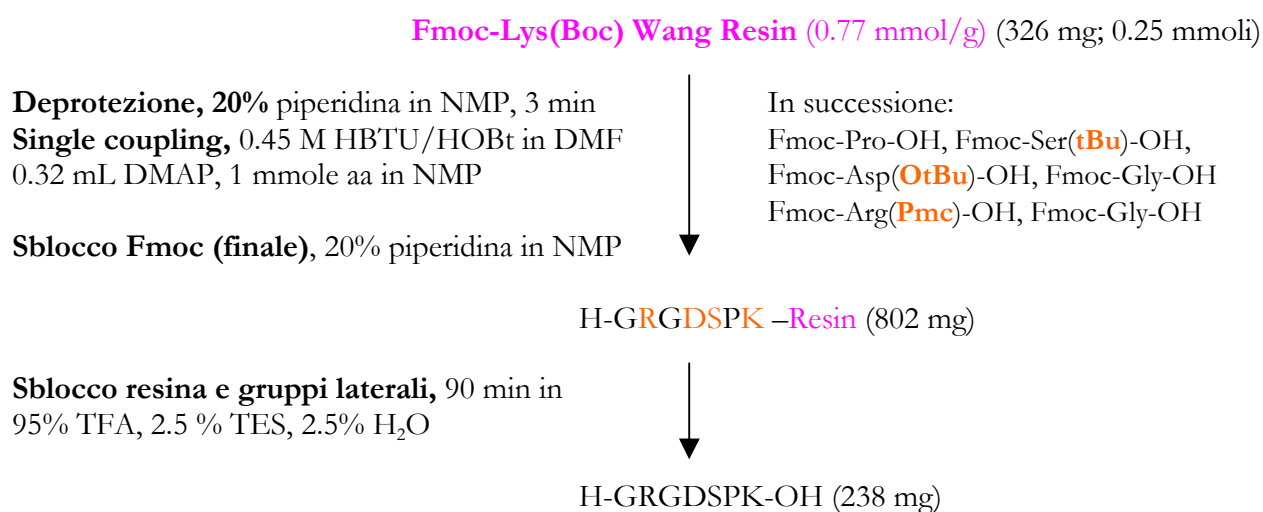
Lo schema di sintesi adottato si basa su considerazioni ricavate da precedenti lavori condotti dal gruppo di ricerca del suddetto laboratorio (Dettin *et al.*, 2002; Dettin *et al.*, 2005; Dottorato di Ricerca Dr. Roberta Gambaretto, Università degli Studi di Napoli, "Federico II").

Tutte le sequenze sono state progettate come peptidi acidi, per cui è stato scelto come supporto solido la resina Wang, già funzionalizzata col primo residuo C-terminale della sequenza, come nel caso del campione MAP(RGDSP), per cui è stata impiegata la resina Fmoc₈-Lys₄-Lys₂-Lys-βAla Wang Resin (0.39 mmol Fmoc/g), e dei motivi GRGDSPK e (GRGDSP)₄K, accresciuti per ancoraggio alla resina Fmoc-Lys(Boc) Wang Resin (0.77 mmol/g); mentre per RGD e HVP è stata usata la sola resina HMP.

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA RGD¹⁰



SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA GRGDSPK



¹ Schema 6.1. Sintesi RGD e GRGDSPK. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **K** = Lys(Boc), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA (GRGDSP)₄K¹

Fmoc-Lys(Boc) Wang Resin (0.77 mmol/g) (330 mg; 0.25 mmoli)

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Single coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 1 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(**tBu**)-OH,
Fmoc-Asp(**OtBu**)-OH, Fmoc-Gly-OH
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Gly-OH
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(**tBu**)-OH,
Fmoc-Asp(**OtBu**)-OH, Fmoc-Gly-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Gly-OH,
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(**tBu**)-OH,
Fmoc-Asp(**OtBu**)-OH, Fmoc-Gly-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Gly-OH

Fmoc-GRGDSPGRGDSPGRGDSPK-Resin

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 18 min
Double coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 2 mmoli aa in NMP

In successione:
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(**tBu**)-OH,
Fmoc-Asp(**OtBu**)-OH, Fmoc-Gly-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Gly-OH

Sblocco Fmoc (finale), 20% piperidina in NMP

H-GRGDSPGRGDSPGRGDSPGRGDSPK-Resin (802 mg)

Sblocco resina e gruppi laterali, 90 min in
95% TFA, 2.5 % TES, 2.5% H₂O

H-GRGDSPGRGDSPGRGDSPGRGDSPK-OH (237 mg)

¹ Schema 6.2. Sintesi (GRGDSP)₄K. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **K** = Lys(Boc), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu).

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA MAP(GRGDSP)¹²

Fmoc₈-Lys₄-Lys₂-Lys-βAla Wang Resin (0.39 mmol Fmoc/g)
(694.4 mg; 0.26 mmoli)

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Single coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 1 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(**tBu**)-OH,
Fmoc-Asp(**OtBu**)-OH, Fmoc-Gly-OH
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Gly-OH

Sblocco Fmoc (finale), 20% piperidina in NMP

H-(GRGDSP)₈K₄K₂K-βAla-Resin (808 mg)

Sblocco resina e gruppi laterali, 90 min in
95% TFA, 2.5 % TES, 2.5% H₂O

H-(GRGDSP)₈K₄K₂K-βAla-OH

SCHEMA DI SINTESI DELLA SEQUENZA HVP

Resina HMP 0.92 mmol/g (295 mg; 0.2717mmoli)

Funzionalizzazione resina
Double coupling, 1M DCC/NMP;
0.1 eq.DMAP

2 mmoli Fmoc-Tyr(**tBu**)-OH

Fmoc-Tyr(tBu)-Resin 0.58 mmol/g (resa reazione 98.1%)
(430 mg; 0.25 mmoli)

Deprotezione, 20% piperidina in NMP, 3 min
Single coupling, 0.45 M HBTU/HOBt in DMF
0.32 mL DMAP, 1 mmole aa in NMP

In successione:
Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(**Boc**)-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Asn(**Trt**)-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-His(**Trt**)-OH,
Fmoc-Arg(**Pmc**)-OH, Fmoc-Phe-OH

Sblocco Fmoc (finale), 20% piperidina in NMP

H-FRHNRRKGY-Resin (751mg)

Sblocco resina e gruppi laterali, 90 min in
95% TFA, 2.5 % TES, 2.5% H₂O

H-FRHNRRKGY-OH (104 mg)

¹² Schema 6.3. Sintesi MAP(RGDSP) e HVP. Le lettere colorate si riferiscono ad amminoacidi protetti in catena laterale: in particolare **D** = Asp(OtBu), **H** = His(Trt), **N** = Asn(Trt), **K** = Lys(Boc), **R** = Arg(Pmc), **S** = Ser(tBu), **Y** = Tyr(tBu).

In quest'ultimo caso, la procedura sintetica ha richiesto lo *step* aggiuntivo di *loading* del primo amminoacido al supporto, via anidride simmetrica, utilizzando come reagenti DCC 1 M in NMP e 0.1 equivalenti di DMAP e impostando *coupling* doppio. La reazione ha dato in ambo i casi una resa superiore al 99%.

La strategia di protezione ortogonale delle catene laterali, dato l'impiego del gruppo protettore α -amminico Fmoc, ha previsto la scelta dei seguenti residui: Asn(Trt), Asp(OtBu), Arg(Pmc), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu) e Tyr(tBu).

Brevemente la sintesi delle sequenze ha previsto cicli ripetuti di deprotezione del terminale amminico dal gruppo Fmoc per trattamento con una soluzione al 20% di piperidina in NMP per 3 min, di una fase di condensazione con il gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc-protetto successivo, in termini di sequenza, e con formazione del legame peptidico, impiegando una miscela di reazione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 0.32 mL di DIEA (chimica FastMoc).

Ad eccezione della sequenza (GRGDSP)₄K, per cui è stato scelto di impostare *coupling* singoli dalla posizione P²⁴ a quella G⁷, e i rimanenti residui sono stati aggiunti con cicli a doppio *coupling*, per tutti gli altri motivi sono state ottenute rese di sintesi soddisfacenti, programmando condensazioni singole per ogni amminoacido.

La fase successiva di sblocco delle catene peptidiche dal supporto solido con contemporanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale (Schemi 6.1-6.3), ha permesso di isolare i vari campioni grezzi, il cui profilo cromatografico è visibile nelle figure 6.4-6.8.

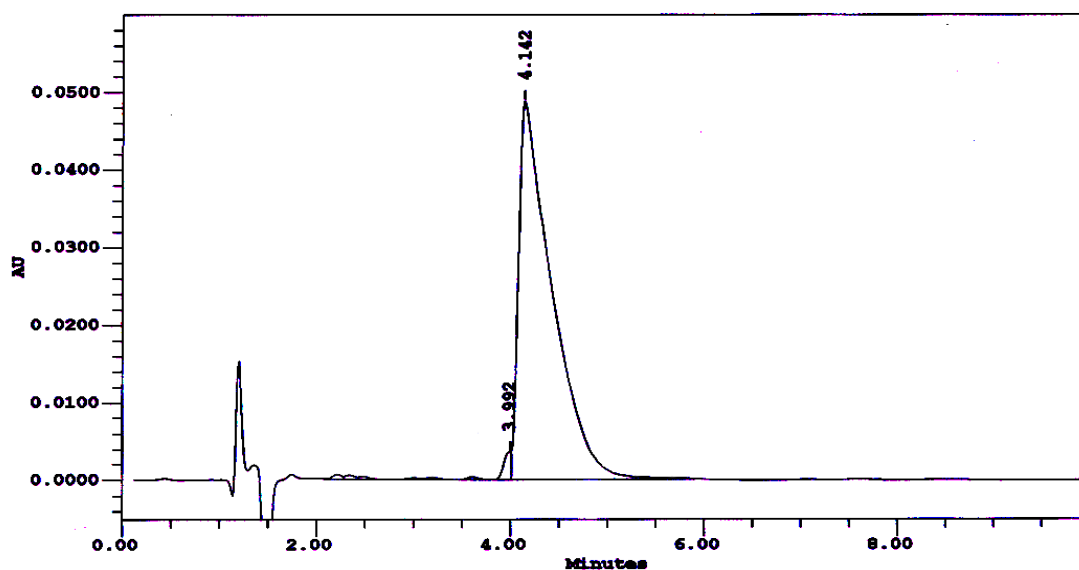


Figura 6.4. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide RGD grezzo condotta nelle seguenti condizioni:

colonna Nova Pak C₁₈ analitica (4 μm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; isocratica al 100% di A per 10 min; detector, 214 nm.

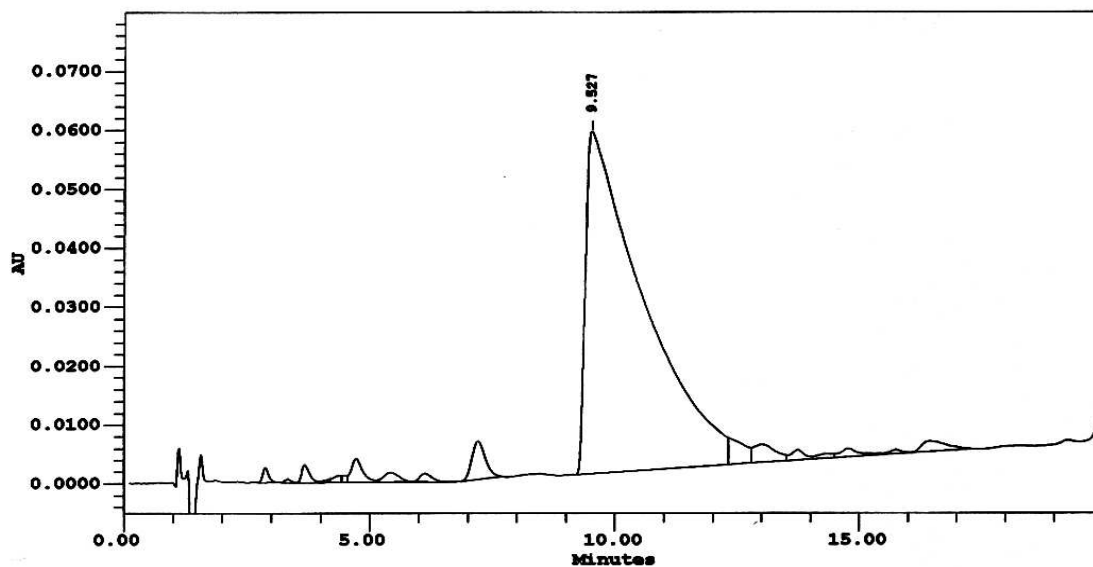


Figura 6.5. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide GRGDSPK grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C₁₈ analitica (4 μm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm.

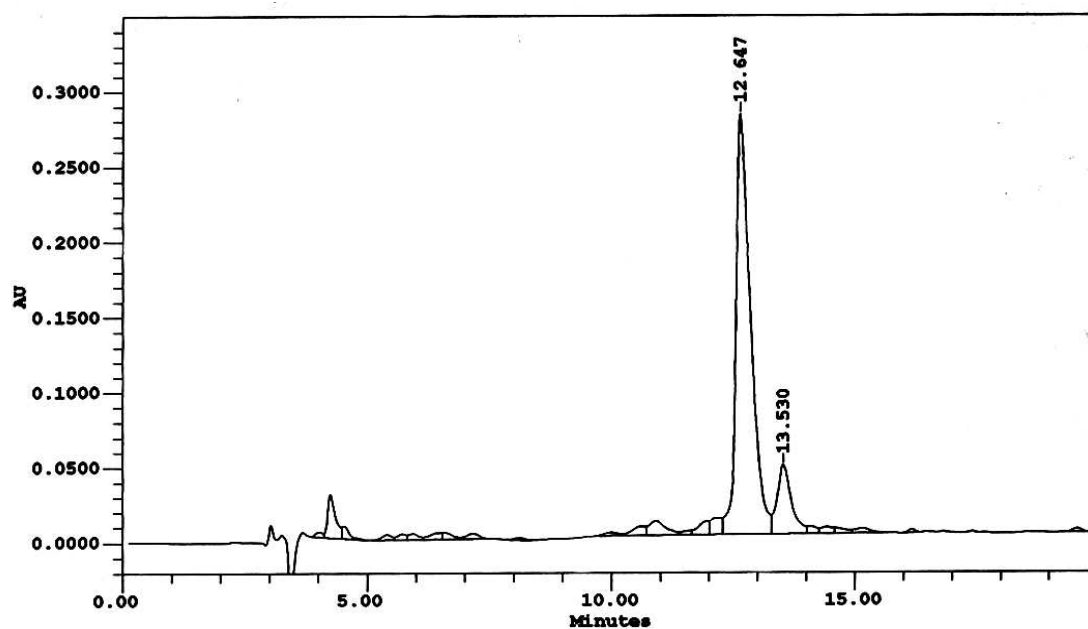


Figura 6.6. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (GRGDSP)₄K grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'8 al 18% di B in 20 min; detector, 214 nm.

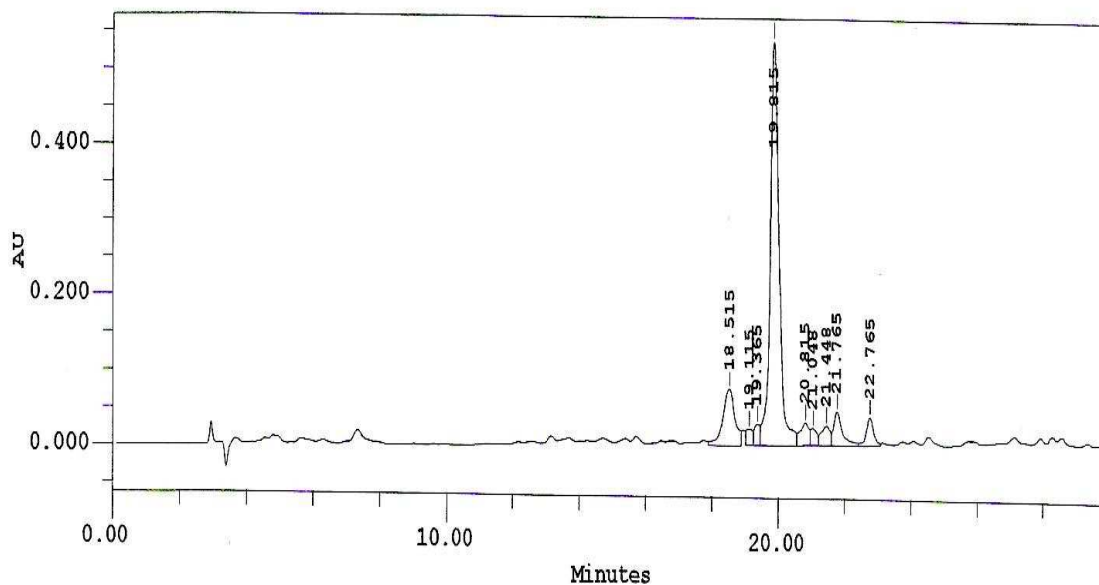


Figura 6.7. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide MAP(RGDSP) grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 8% al 23% di B in 30 min; detector, 214 nm.

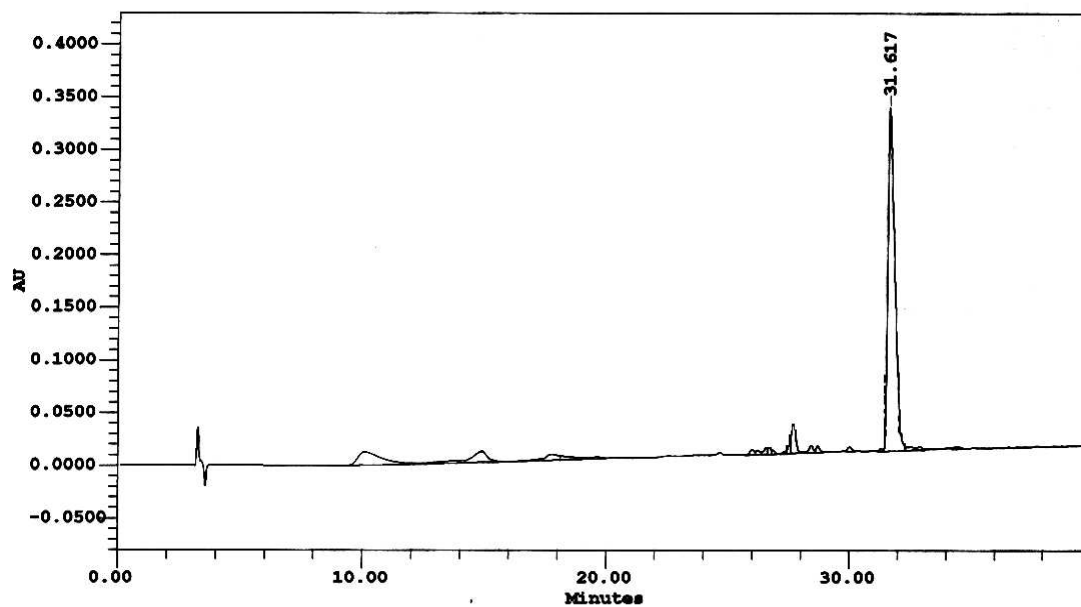


Figura 6.8. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide (352-360) HVP grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 al 20% di B in 40 min; detector, 214 nm.

i. Purificazione

I grezzi sono stati purificati tramite cromatografia RP-HPLC. Le condizioni impostate per ogni campione sono di seguito riportate:

- i. RGD: colonna semipreparativa Nova Pak HR C₁₈ SP (6 μm, 60 Å, 7.8 × 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; isocratica al 100% di A; detector, 214 nm; La purificazione del peptide, così condotta, ha permesso di raggiungere un grado di purezza superiore al 98%;
- ii. GRGDSPK: colonna semipreparativa Nova Pak HR C₁₈ SP (6 μm, 60 Å, 7.8 × 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, 100% di A per 20 min e dal 0 al 10% di B in 10 min; detector, 214 nm;
- iii. (GRGDSP)₄K: colonna semipreparativa Delta Pak C₁₈ SP (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 0 al 5% di B in 2 min e dal 5 al 12% di B in 28 min; detector, 214 nm;
- iv. MAP(RGDSP): colonna semipreparativa Delta Pak C₁₈ SP (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 6 al 16% in 40 min; detector, 214 nm;
- v. HVP: colonna semipreparativa Delta Pak C₁₈ SP (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm; Waters); flusso, 4.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 0 al 5% di B in 1 min e dal 5 al 13% di B in 24 min; detector, 214 nm.

Le varie frazioni raccolte dopo la corsa semipreparativa, sono state analizzate tramite HPLC analitico nelle medesime condizioni utilizzate per il peptide grezzo, per valutare il grado di purezza.

6.3.3 Caratterizzazione

La caratterizzazione del prodotto purificato è stata effettuata impiegando sia colonne HPLC analitiche, che, in certi casi, l'elettroforesi capillare. In specifico le condizioni impostate per ogni campioni sono state:

- i. **RGD**: cromatografia analitica in fase inversa: colonna Nova Pak C₁₈ analitica (4 μm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; isocratica al 100% di A per 10 min; detector, 214 nm. La purificazione del peptide, così condotta, ha permesso di raggiungere un grado di purezza superiore al 98.7% (Figura 6.9a).

Elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 99.82% (Figura 6.9b)

- ii. **GRGDSPK**: cromatografia analitica in fase inversa: colonna Nova Pak C₁₈ analitica (4 μm, 60 Å, 3.9 × 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm. L'omogeneità del campione, quantificata per integrazione del tracciato cromatografico, ha raggiunto un valore del 98.73% (Figura 6.10a).

Elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza comparabile a quello HPLC e pari al 99.05% (Figura 6.10b)

- iii. **(GRGDSP)₄K**: cromatografia analitica in fase inversa: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'8 al 18% di B in 20 min; detector, 214 nm. Il livello di purezza raggiunto il 99.41% (Figura 6.11a).

Elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 93.77% (Figura 6.11b);

- iv. **MAP(RGDSP)**: cromatografia analitica in fase inversa: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'8 al 23% di B in 30 min; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98.20% (Figura 6.12a);

Elettroforesi capillare: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 92.37% (Figura 6.12b)

- v. **HVP**: cromatografia analitica in fase inversa eseguita delle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 9 al 17% di B in 16 min;

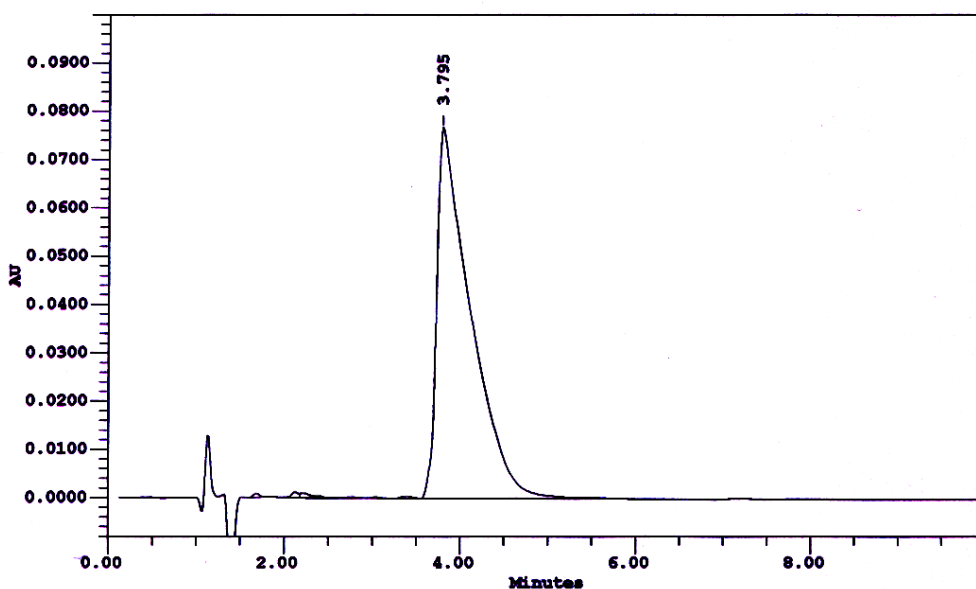
detector, 214 nm. L'integrazione dei tracciati cromatografici ha fornito un valore di omogeneità massimo del 99.91% (Fig. 6.13a).

Elettroforesi capillare eseguita delle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5. L'integrazione del tracciato elettroforetico ha fornito un valore di purezza del 100% (Figura 6.13b)

Oltre a fornire indicazioni sul grado di purezza raggiunto, la tecnica RP-HPLC ha permesso di confermare l'identità del prodotto principale di sintesi, per confronto con i tempi di ritenzione riportati per i medesimi campioni purificati e ottenuti da sintesi precedenti. Ulteriormente sono state effettuate delle corse cromatografiche iniettando una soluzione composta da un'aliquota di peptide purificato e una pari quantità di soluzione alla medesima concentrazione di un campione dello stesso già disponibile in laboratorio. La coeluzione ha dato conferma sulla riuscita della sintesi.

Per quanto riguarda le sequenze (GRGDSP)₄K e HVP, a supporto delle evidenze sperimentali del comportamento in cromatografia analitica, per l'assegnazione dell'identità del prodotto si riportano anche gli spettri di massa (Fig. 6.14-6.15) eseguiti con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220).

a)



b)

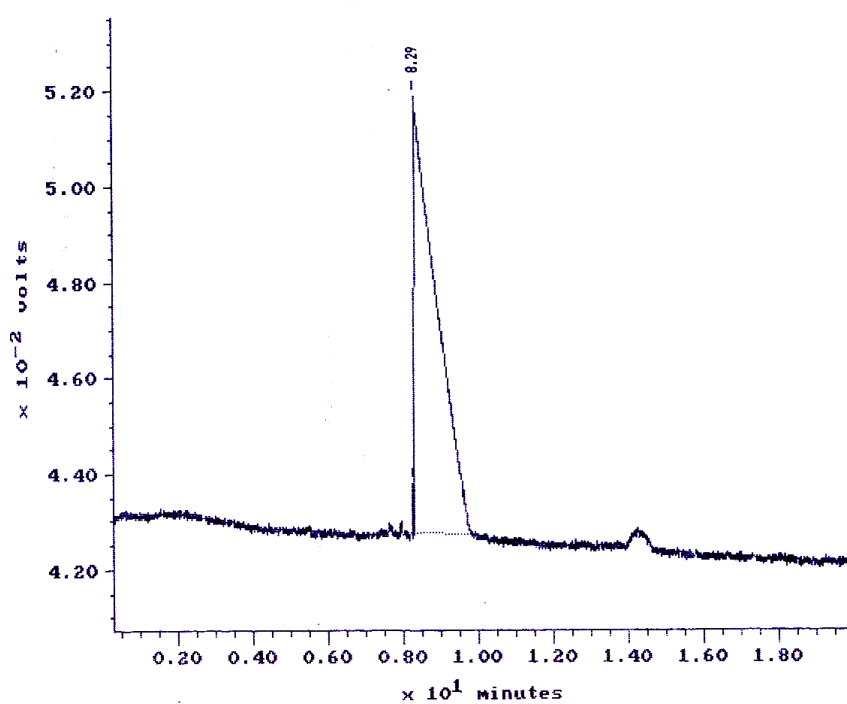
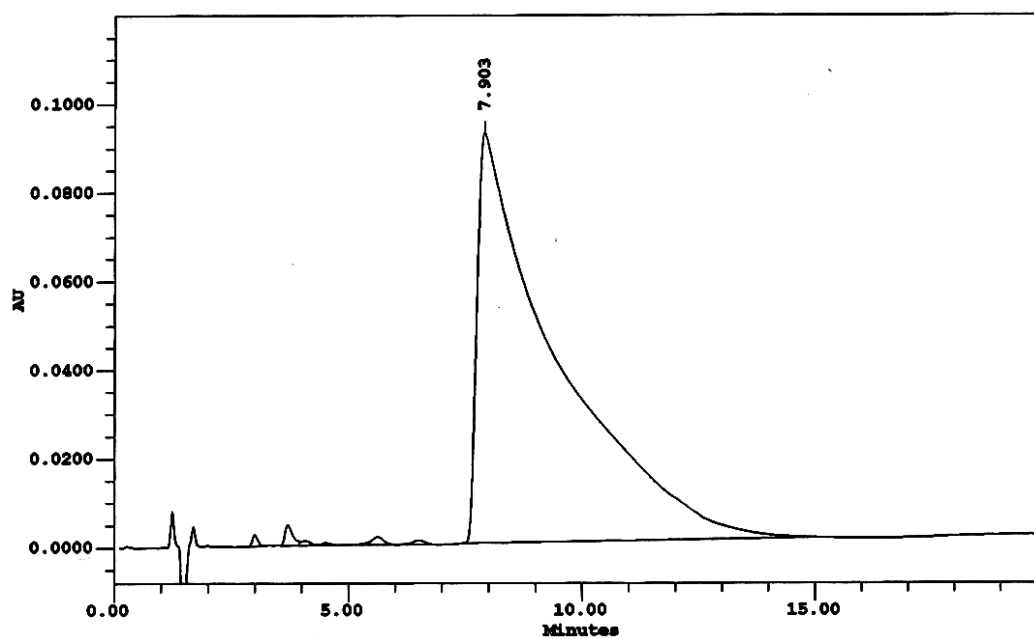


Figura 6.9. Caratterizzazione del peptide RGD purificato tramite (a) cromatografia analitica in RP-HPLC condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C₁₈ analitica (4 μ m, 60 Å, 3.9 \times 150 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; isocratica al 100% di A per 10 min; detector, 214 nm. (b) Elettroforesi capillare condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

a)



b)

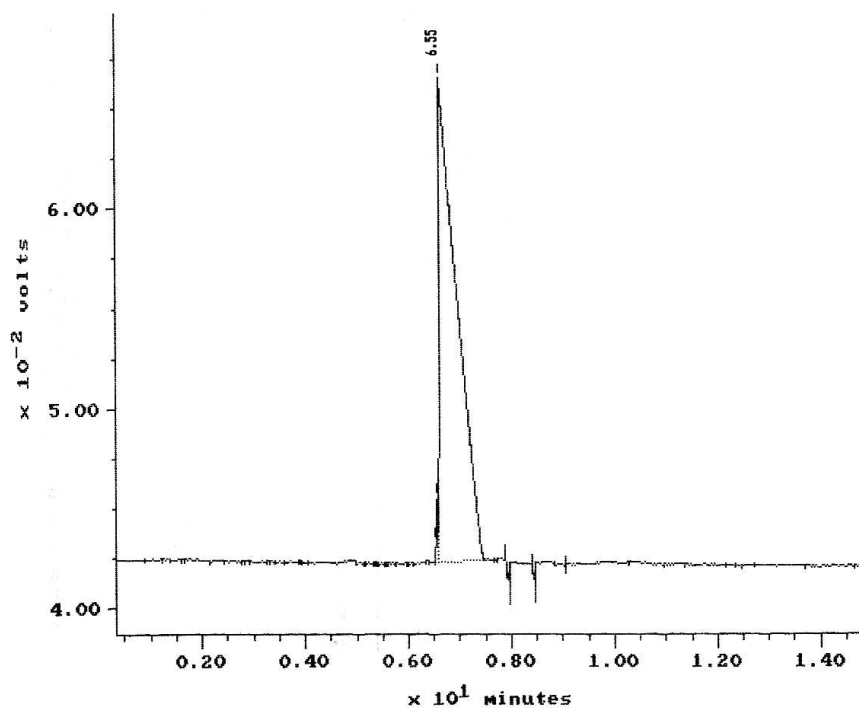


Figura 6.10. Cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide GRGDSPK con grado di purezza superiore al 98% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Nova Pak C_{18} analitica ($4 \mu\text{m}$, 60 \AA , $3.9 \times 150 \text{ mm}$); flusso, 1.0 mL/min ; eluente A, 0.05% TFA in H_2O ; eluente B, 0.05% TFA in CH_3CN ; gradiente, dal 3 al 13% di B in 20 min; detector, 214 nm. Fig. 32: Elettroforesi capillare condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C ; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

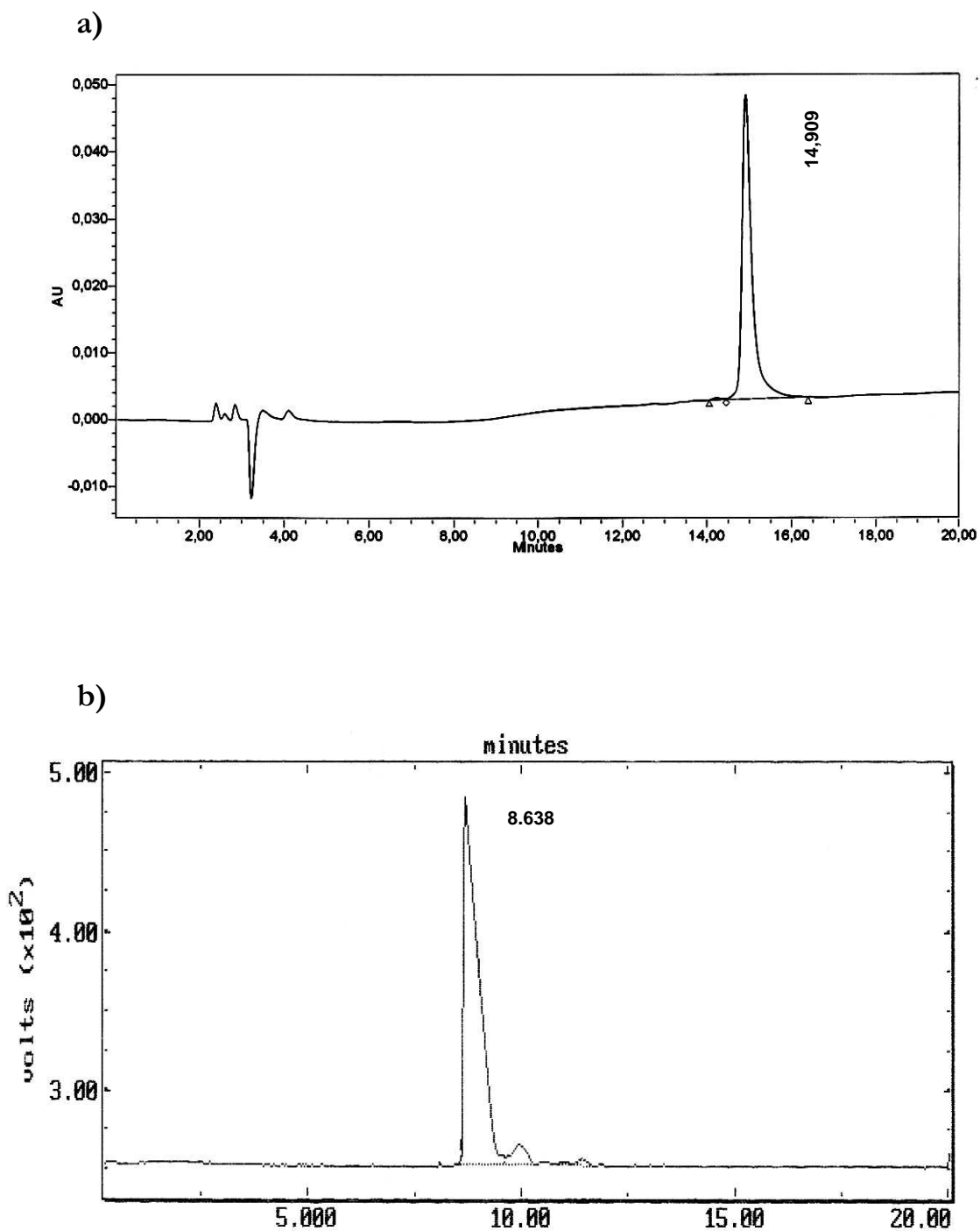
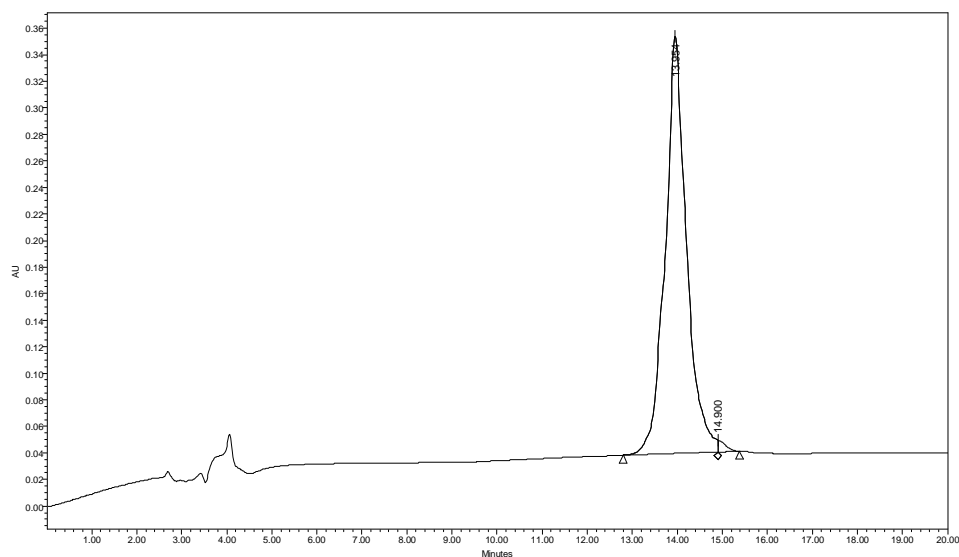


Figura 6.11. Caratterizzazione del peptide purificato (GRGDSP)₄K mediante: (a) cromatografia analitica in RP-HPLC condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μm, 300 Å, 4.6 × 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dall'8 al 18% di B in 20 min; detector, 214 nm. (b) Elettroforesi capillare condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

a)



b)

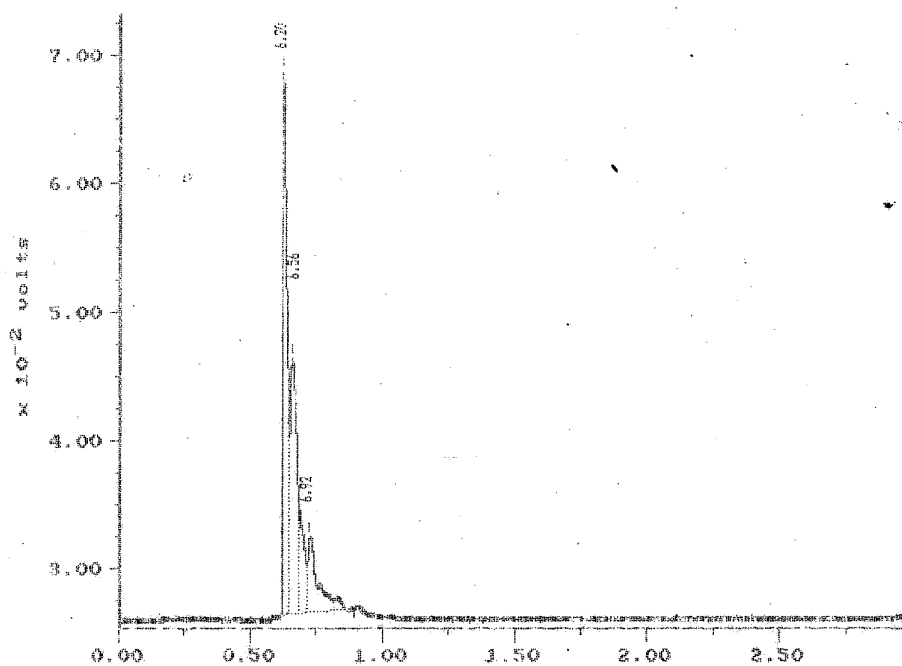
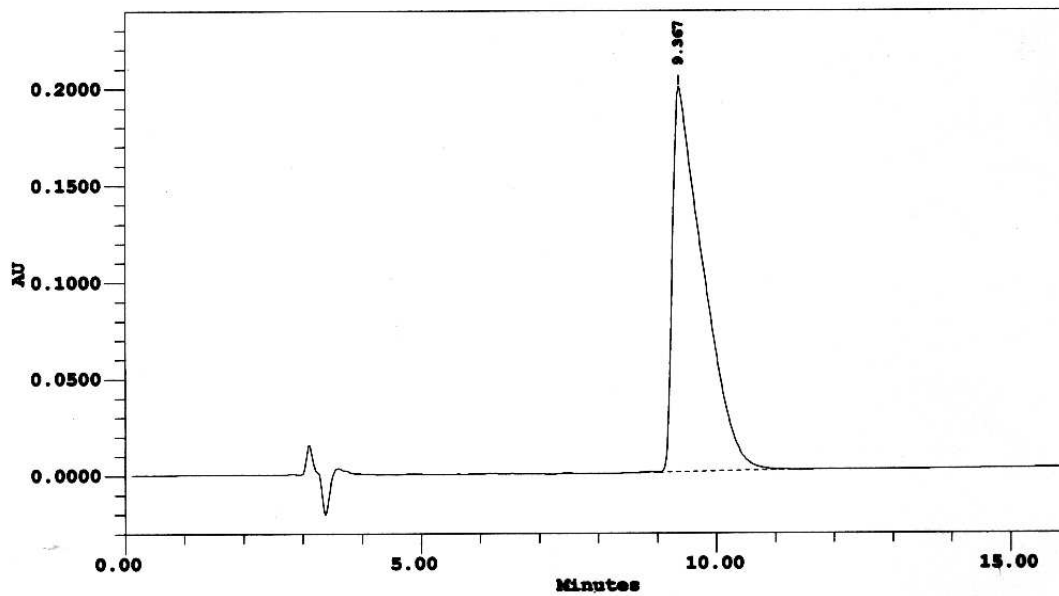


Figura 6.12. Caratterizzazione del peptide purificato MAP(RGDSP) mediante (a) cromatografia analitica in RP-HPLC della riunione delle frazioni del peptide MAP(RGDSP) con grado di purezza superiore al 98.2% condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ analitica (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250 mm); flusso, 1.0 mL/min; eluente A, 0.05% TFA in H₂O; eluente B, 0.05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 8 al 23% di B in 30 min; detector, 214 nm. (b) Elettroforesi capillare condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm; temperatura, 30°C; voltaggio, 15 kV; detector, 214 nm; tampone, sodio citrato 20 mM, pH 2.5.

a)



b)

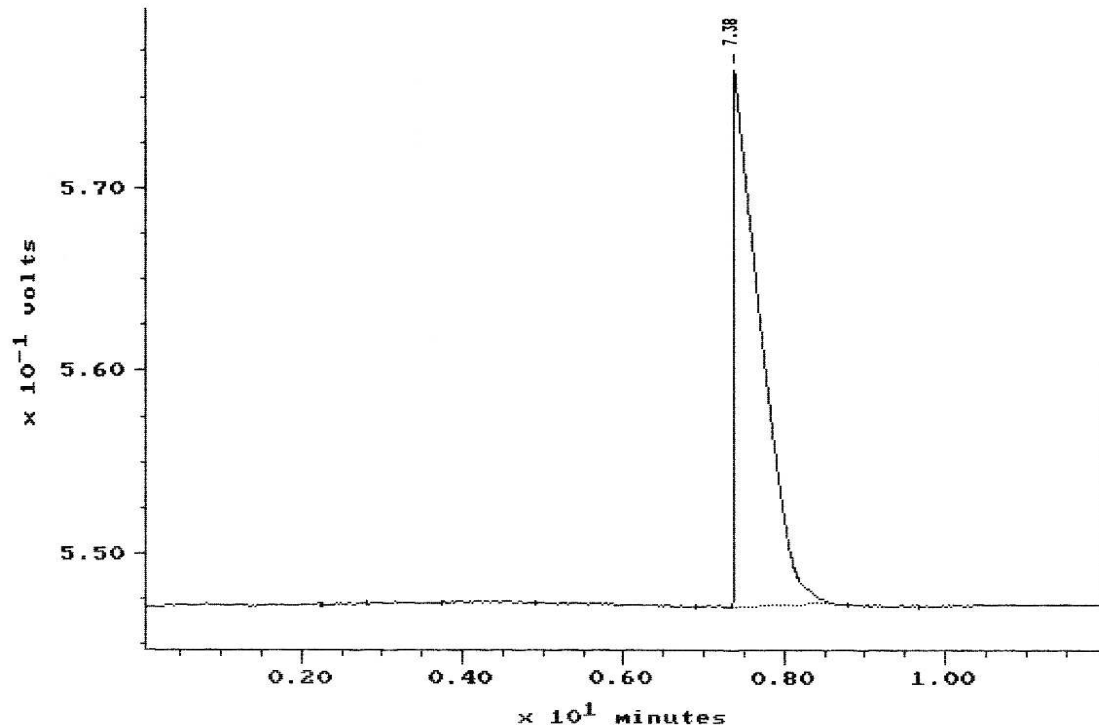


Figura 6.13. Caratterizzazione del peptide purificato HVP mediante: (a) cromatografia analitica in RP-HPLC condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C_{18} analitica ($5 \mu\text{m}$, 300 \AA , $4.6 \times 250 \text{ mm}$); flusso, 1.0 mL/min ; eluente A, $0.05\% \text{ TFA in H}_2\text{O}$; eluente B, $0.05\% \text{ TFA in CH}_3\text{CN}$; gradiente, dal 9 al 17% di B in 16 min; detector, 214 nm . (b) Elettroforesi capillare condotta nelle seguenti condizioni: capillare in silice di 72 cm ; temperatura, 30°C ; voltaggio, 15 kV ; detector, 214 nm ; tampone, sodio citrato 20 mM , $\text{pH } 2.5$.

6.3.4 Effetti sull'adesione cellulare

È stato valutata la capacità dei peptidi in esame di indurre l'adesione delle cellule al supporto di crescita, sia che essi fossero presenti nel mezzo di coltura come fattori solubili, sia usati come condizionamento della piastra. In tal modo si è voluto riprodurre le condizioni fisiologiche in cui tali motivi possono interagire con i recettori cellulari: vincolati all'interno delle proteine o liberi nel fluido extracellulare in seguito all'azione di proteasi.

Il condizionamento di piastre *no-tissue* con (GRGDSP)₄K (2 mmol/cm²), ha comportato un aumento significativo ($p < 0.05$) dell'adesione cellulare in terreno privo di siero e fattori di crescita, rispetto alle colture di controllo (tabella 6.1 colonna A), mentre gli altri peptidi si sono rivelati inefficaci.

Per valutare gli effetti delle sequenze di adesione, utilizzate come fattori solubili, sono stati effettuati ulteriori esperimenti utilizzando terreno MV₂ contenente siero. Infatti, usando terreno base, non era riscontrabile alcuna variazione nel comportamento adesivo delle cellule. Come si può osservare dai dati riportati in colonna B della tabella 6.1, solamente il peptide contenete quattro motivi RGD ripetuti linearmente, è stato in grado di diminuire in modo significativo l'adesione delle HUVEC.

Peptide	A Numero di cellule \pm D.S.	B Numero di cellule \pm D.S.
controllo	1,0 \pm 0,3	361 \pm 5,7
RGD	0,0	362 \pm 15,1
GRGDSPK	0,0	315 \pm 68,6
(GRGDSP) ₄ K	118,0 \pm 22,6 *	10 \pm 3,5 *
HVP	1,0 \pm 0,3	333 \pm 35,8

Tabella 6.1. Adesione delle HUVEC su piastre non trattate per colture cellulari. Colonna A: cellule seminate in terreno base su pozzetti precedentemente condizionati coi peptidi (2 nmoles/cm²). Colonna B: cellule in MV₂ completo supplementato con i peptidi (0.1 mM). I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come numero di cellule \pm deviazione standard. * = $p < 0.05$ verso le colture di controllo in pozzetti non condizionati. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come numero di cellule che hanno aderito al supporto. t-test di Student.

6.3.5 Effetti sulla vitalità cellulare

Diminuzioni significative ($p < 0.05$) della vitalità cellulare, sono state osservate in seguito a trattamento per 24h con i derivati lineari del motivo di adesione RGD, GRGDSPK (0.1 mM) e (GRGDSP)₄K (0.1 e 0.025 mM), e con il peptide derivato dalla vitronectina, HVP (0.1 e 0.025 mM). In questo contesto, HVP e il composto lineare contenente 4 sequenze RGD si sono dimostrati più attivi della sequenza

GRGDSPK contenuta nella fibronectina. Al contrario né la sequenza RGD, né il derivato ramificato contenente 8 sequenze RGD hanno indotto variazioni della vitalità cellulare rispetto a quanto determinato nelle colture di controllo (Fig. 13).

Per determinare la causa della diminuzione della vitalità cellulare osservata negli esperimenti precedenti, è stato verificato se i derivati peptidici inducessero un effetto necrotico o apoptotico. La valutazione di un possibile effetto necrotico è stata effettuata tramite quantificazione del rilascio dell'LDH, enzima che viene liberato nell'ambiente extracellulare in seguito a lesioni della membrana cellulare, tipiche del processo necrotico. Sia i derivati dell'RGD (GRGDSPK e (GRGDSP)₄K) che quello della vitronectina, alla concentrazione di 0.1 mM, hanno indotto una significativa diminuzione del rilascio dell'enzima rispetto a quanto osservato nelle colture non trattate (Fig. 14). Al fine di valutare la presenza di effetti proapoptotici è stato effettuato il saggio TUNEL, che mette in evidenza la frammentazione del DNA, evento caratteristico del processo di morte cellulare programmata.

L'incubazione della coltura con le sequenze prima indicate ha portato ad una riduzione del tasso di apoptosi (Figura 6.18). Questa osservazione è stata inoltre confermata dai risultati ottenuti da un altro saggio, in grado di quantificare la formazione di oligo-e mononucleosomi (dati non mostrati).

Il motivo tripeptidico non ha indotto alcuna variazione dei parametri necrotici e apoptotici.

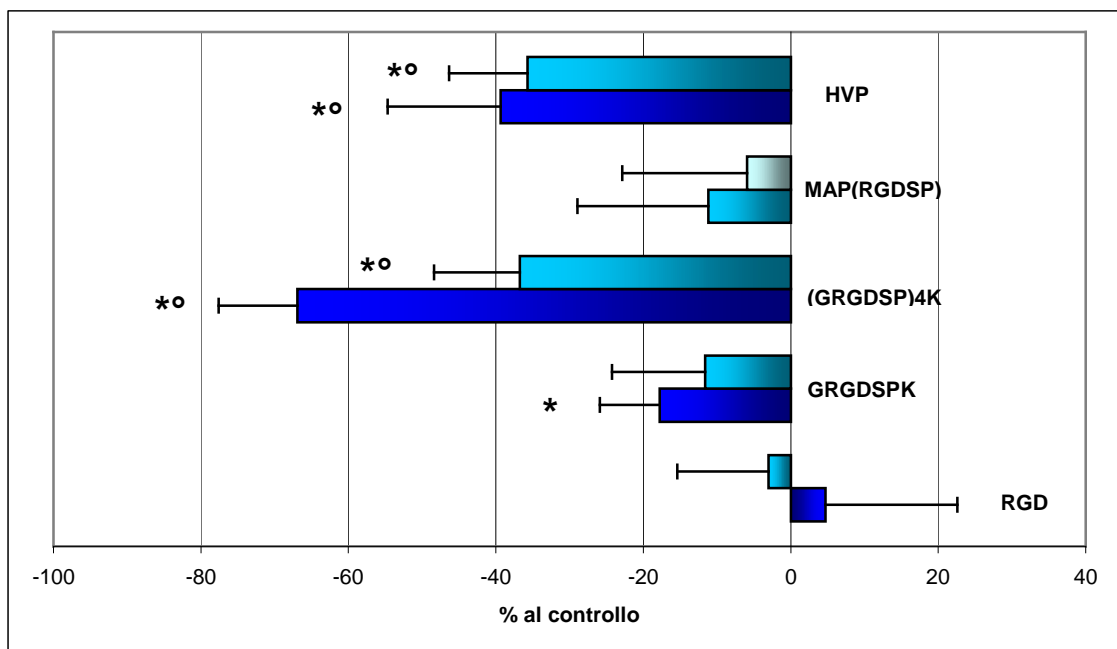


Figura 6.16. Vitalità di HUVEC trattate per 24h con i derivati peptidici in studio alle seguenti concentrazioni: blu = 0.1 mM, celeste = 0.025 mM, celeste chiaro = 0.001 mM. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono

stati espressi come media \pm deviazione standard. * = $p < 0.05$ vs controllo; ° = $p < 0.05$ vs 0.1 mM GRGDSPK, t test di Student.

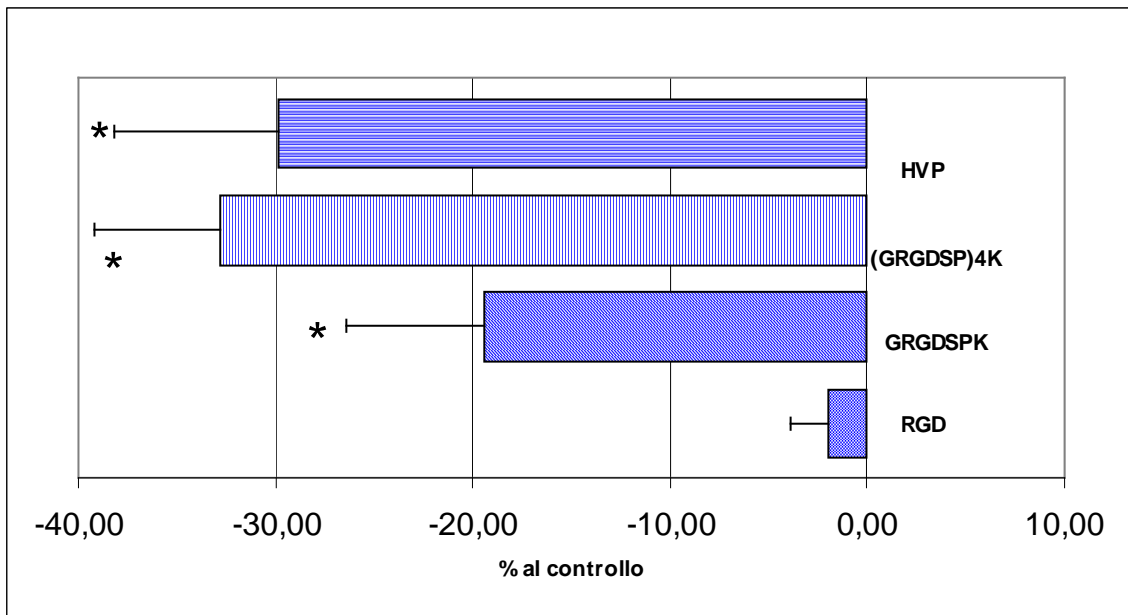


Figura 6.17. Percentuale di rilascio di LDH da HUVEC trattate per 24h con GRGDSPK, (GRGDSP)₄K e HVP utilizzati alla concentrazione di 0.1 mM. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

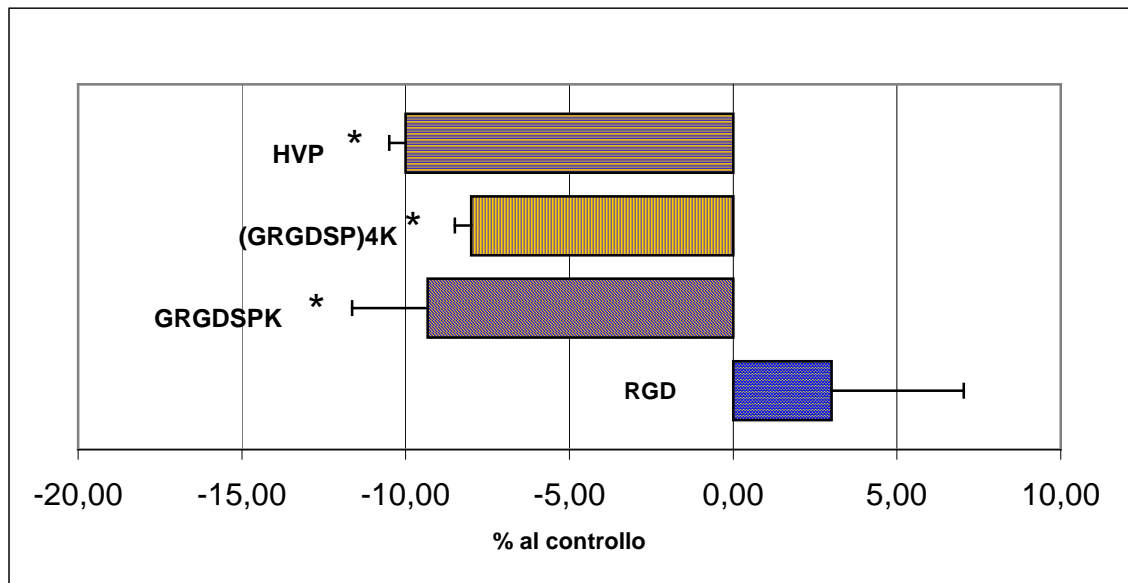


Figura 6.18. Percentuale di apoptosi di HUVEC trattate per 24h con GRGDSPK, (GRGDSP)₄K e HVP utilizzati alla concentrazione di 0.1 mM. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

Sia il peptide derivato dalla vitronectina sia quelli lineari contenenti una o 4 sequenze RGD (alla concentrazione di 0.1 mM) hanno inibito in modo significativo l'effetto proliferogeno indotto da FGF-2 (50 ng/mL; Fig. 14) valutato nelle 24 h. In particolare, (GRGDSP)₄K si è rivelato più efficace, rispetto agli altri composti, nel contrastare l'azione della citochina. Il motivo minimo RGD, riconosciuto dalle integrine si è rivelato invece inefficaci.

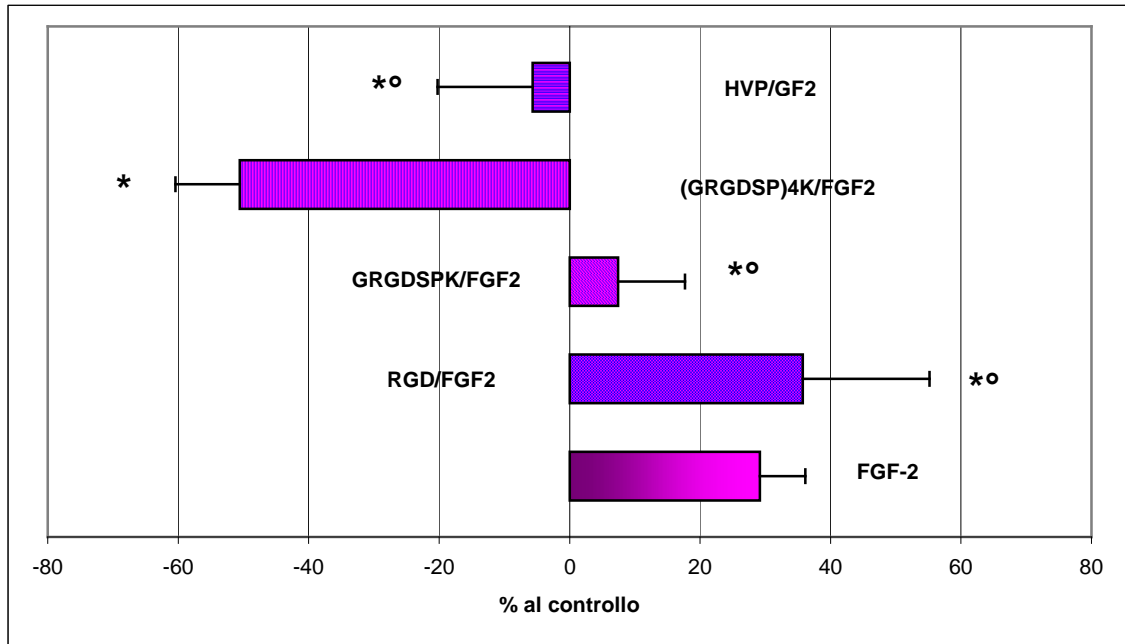


Figura 6.19. Vitalità di HUVEC trattate per 24h con 50 ng/ml di FGF-2 in presenza di RGD, GRGDSPK, (GRGDSP)₄K o HVP utilizzati alla concentrazione 0.1 mM. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard. * = $p < 0.05$ vs FGF-2; ° = $p < 0.05$ vs (GRGDSP)₄K/FGF-2, t test di Student.

6.3.6 Effetti sulla morfogenesi *in vitro*

Per valutare *in vitro* l'effetto dei derivati peptidici sulla morfogenesi, le HUVEC sono state seminate su Matrigel, un estratto di un sarcoma murino ricco di componenti della membrana basale e ampiamente utilizzato per determinare *in vitro* l'azione pro-angiogenica o anti-angiogenica di sostanze di origine sia naturale che sintetica. Sulla sua superficie, le cellule endoteliali si organizzano in modo tale da formare sulla superficie del gel strutture a maglie chiuse. Dopo 18h di trattamento con i peptidi oggetto di studio, le colture sono state fissate e per ciascuna di esse sono state acquisite 5 immagini utilizzando un microscopio a contrasto di fase collegato ad una fotocamera digitale. Su tali immagini, grazie ad un sistema computerizzato di analisi di immagine, sono stati misurati parametri dimensionali, quali l'area percentuale coperta dalle cellule endoteliali e la lunghezza totale della rete cellulare per campo, e parametri topologici, quali il numero di maglie chiuse e i punti di ramificazione per campo.

In figura 4, sono riportati alcuni esempi di immagini relative alle colture in seguito ai vari tipi di trattamento. In presenza del motivo GRGDSPK, le HUVEC hanno mostrato una maggior tendenza a formare una rete di strutture simil-capillari rispetto alle colture di controllo. Diversamente il trattamento con (GRGDSP)₄K e HVP ha indotto un'inibizione della morfogenesi (Figura 6.20). L'analisi quantitativa delle immagini raccolte, ha confermato le osservazioni fatte, evidenziando come già alla concentrazione di 0.025 mM, GRGDSPK comporti un aumento significativo dei parametri topologici (Figura 6.21b). La sequenza contenuta nella vitronectina, alla concentrazione più bassa testata (0.025 mM), e il peptide lineare con quattro motivi RGD, ad entrambe le concentrazioni di 0.1 mM e 0.025 mM, hanno influenzato in modo marcatamente negativo tutti i parametri (Figure 6.21c e 6.21d). 0.025 mM RGD ha dimostrato un effetto inibitorio solo sui parametri topologici (Figura 6.21a). Anche 0.001 mM MAP(RGDSP) ha provocato una diminuzione significativa della lunghezza della rete cellulare e del numero di maglie rispetto a quanto rilevato nelle colture di controllo (Figura 6.21e).

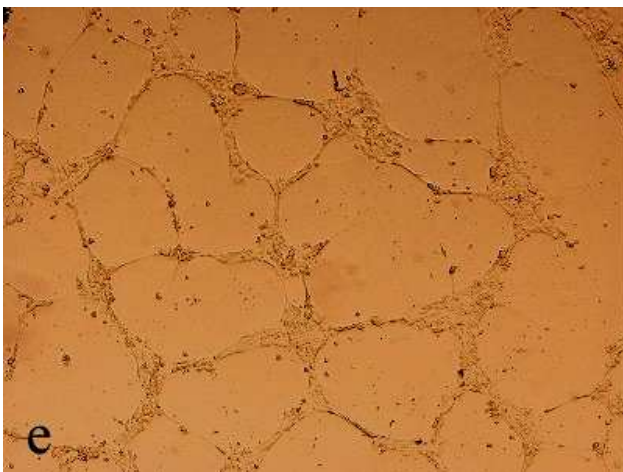
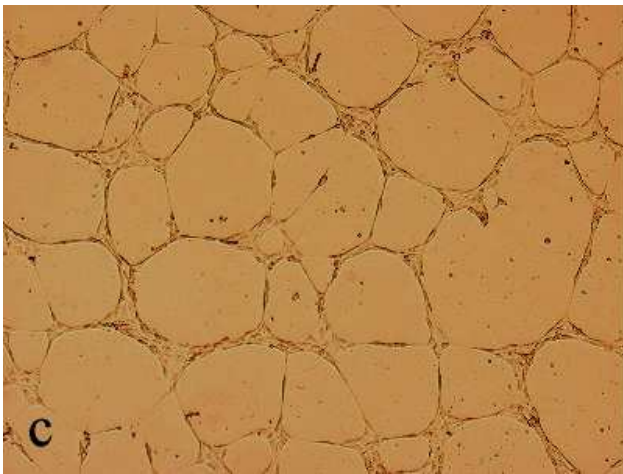
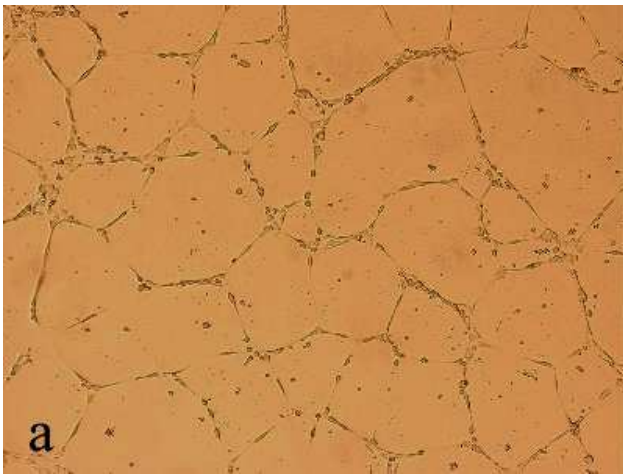
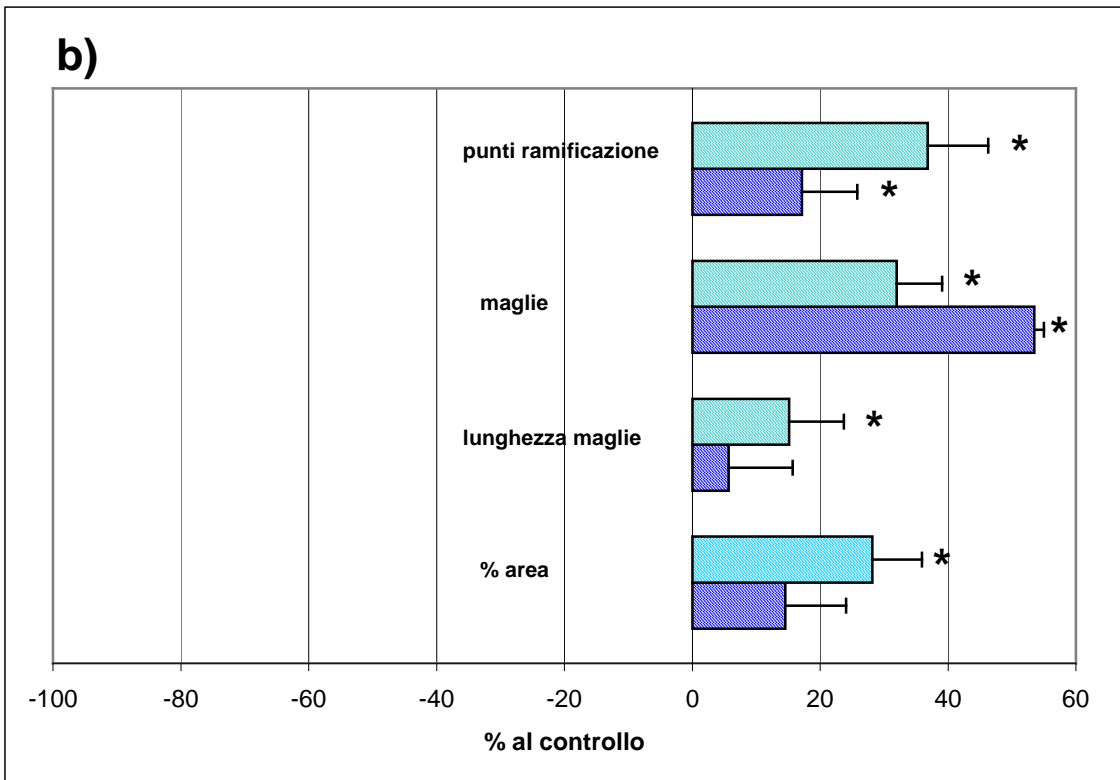
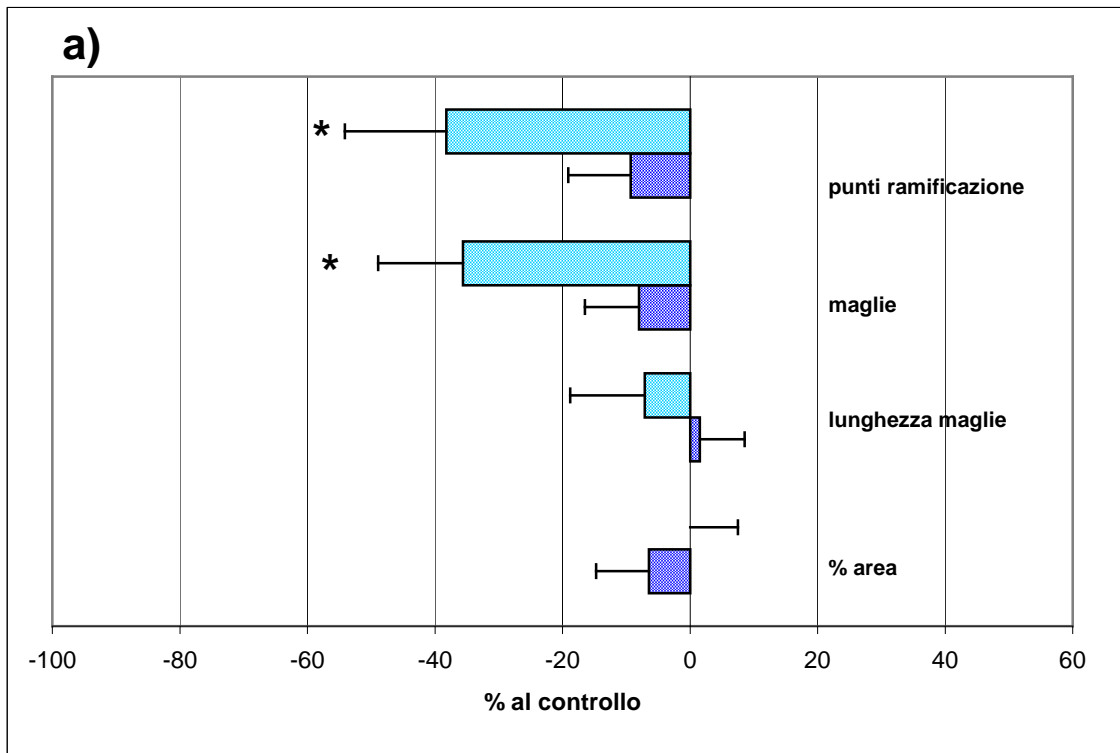
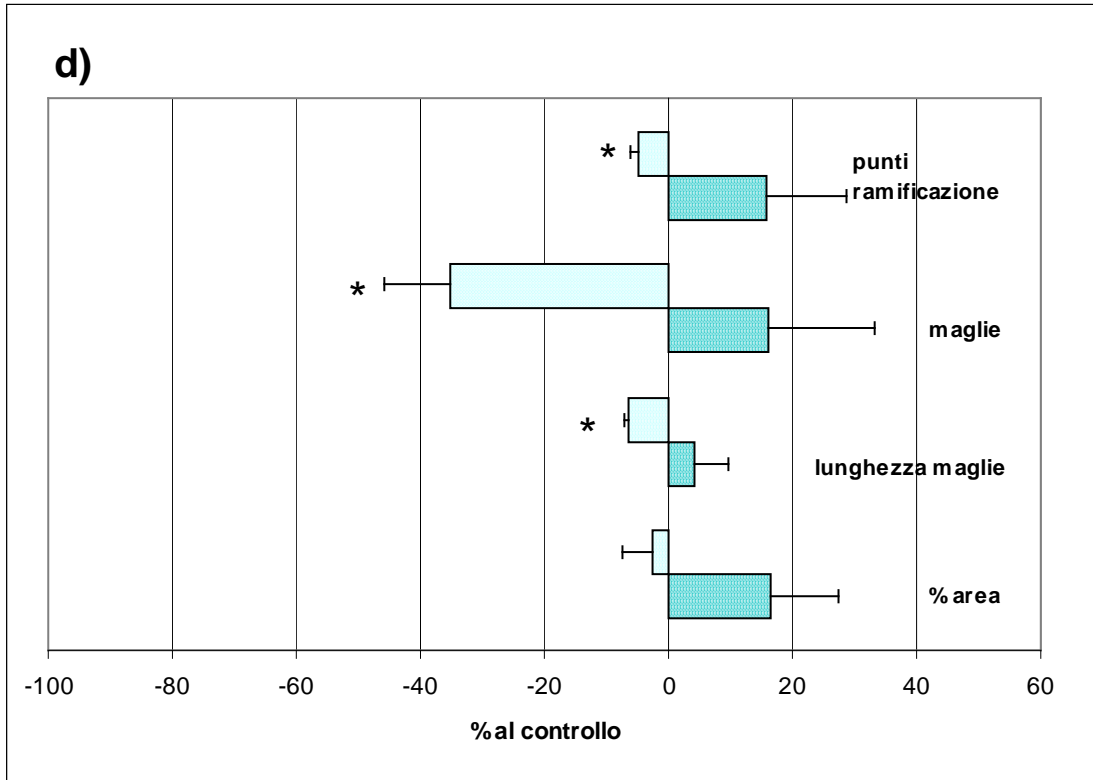
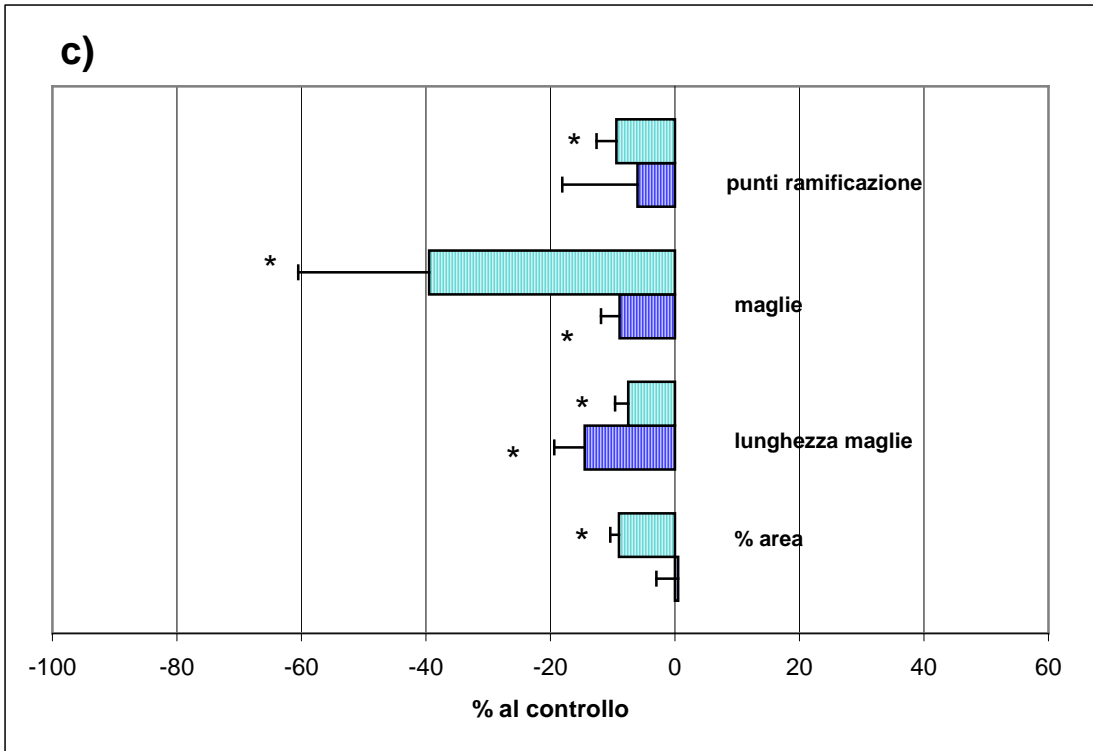


Figura 6.20. Foto al microscopio ottico a contrasto di fase delle strutture simil-capillari formate dalle HUVEC coltivate su Matrigel per 18 h: (a) Controllo; cellule trattate con: (b) RGD (0.025mM); (c) GRGDSPK (0.025 mM); (d) (GRGDSPK)₄K (0.025 mM); (e) MAP (0.001 mM); (f) HVP (0.025 mM). Ingrandimento x50.





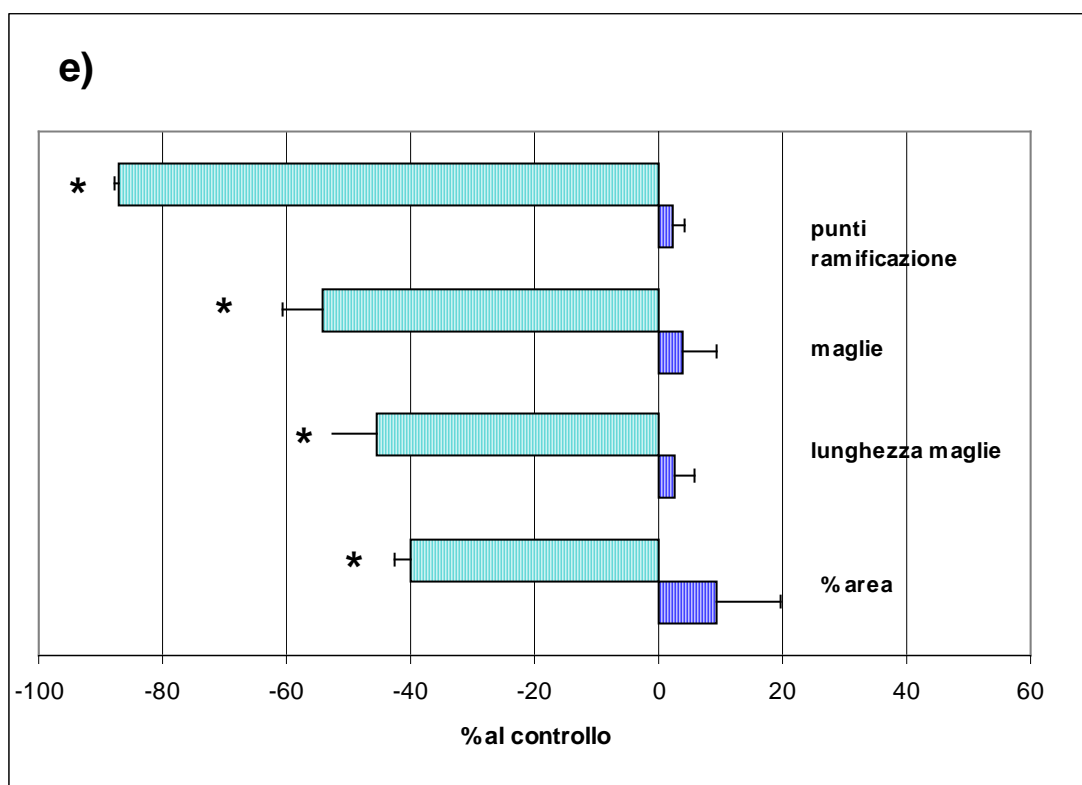


Figura 6.21. Analisi quantitative degli effetti di (a) RGD, (b) GRGDSPK, (c) (GRGDSP)₄K, (d) MAP e (e) HVP sui parametri dimensionali (area percentuale ricoperta dalle cellule e lunghezza totale delle maglie, per campo), e quelli topologici (numero di maglie e numero di punti di ramificazione, per campo) delle strutture a maglie formate dalle HUVEC. Gli istogrammi (blu = 0.1 mM, celeste = 0.025 mM, celeste chiaro = 0.001 mM) rappresentano i valori delle medie \pm deviazione standard, di 3 esperimenti *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

Come atteso, il trattamento con FGF-2 (50 ng/mL) ha indotto un aumento della densità di strutture a maglie chiuse all'interno del Matrigel, determinando un notevole e significativo incremento di tutti i parametri misurati (Figura 6.22). Tale effetto di induzione è stato significativamente contrastato dal trattamento con (GRGDSP)₄K 0.1 mM, che ha comportato una diminuzione sia dei parametri dimensionali che topologici (Figura 6.23). Invece RGD e HVP, testati alla concentrazione di 0.1 mM, non sono stati in grado di alterare l'aumento dei parametri indotto da FGF-2.

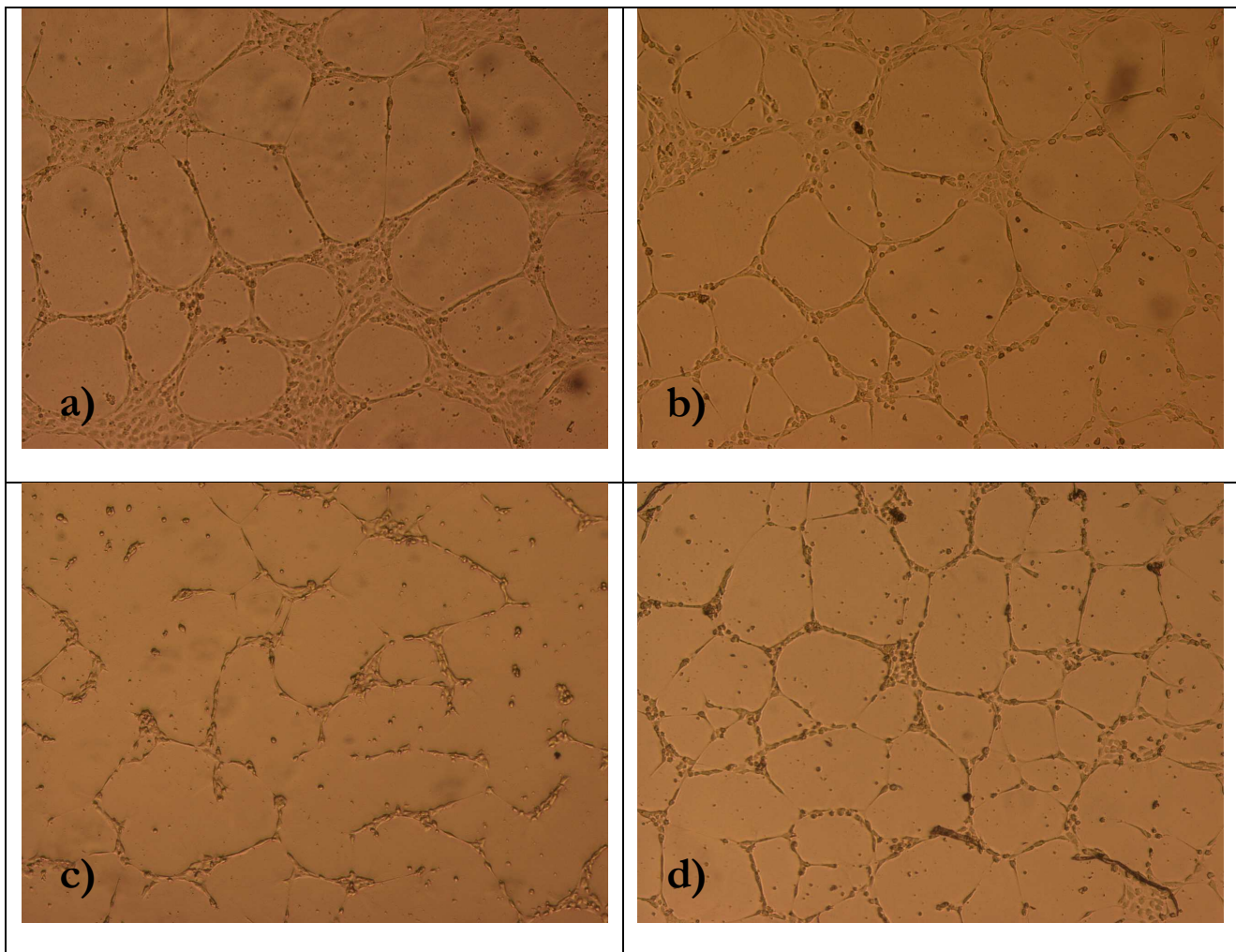
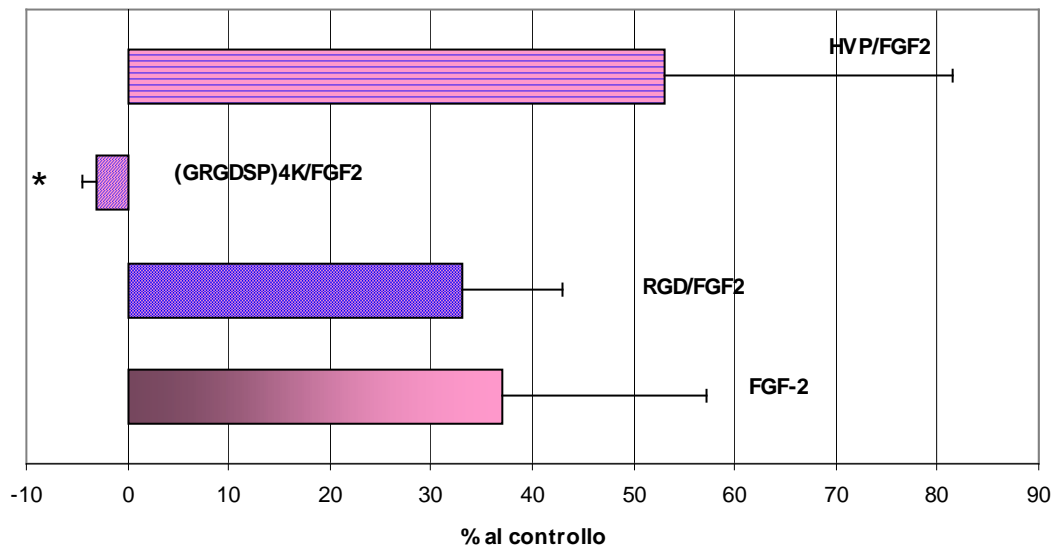
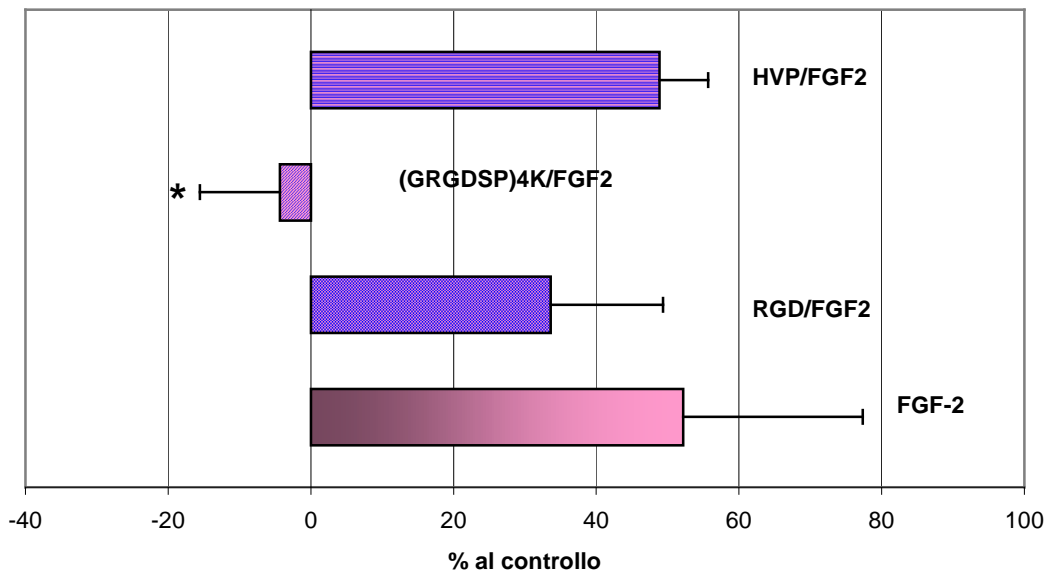


Figura 6.22. Foto al microscopio ottico a contrasto di fase delle strutture simil-capillari formate dalle HUVEC coltivate su Matrigel per 18 h e trattate con FGF-2 (50 ng/mL) in presenza o meno dei peptidi alla concentrazione di 0.1 mM. (a) FGF-2; (b) FGF-2/RGD; (c) FGF-2/(GRGDSP)₄K; (e) FGF-2/HVP. Ingrandimento x50.

a)



b)



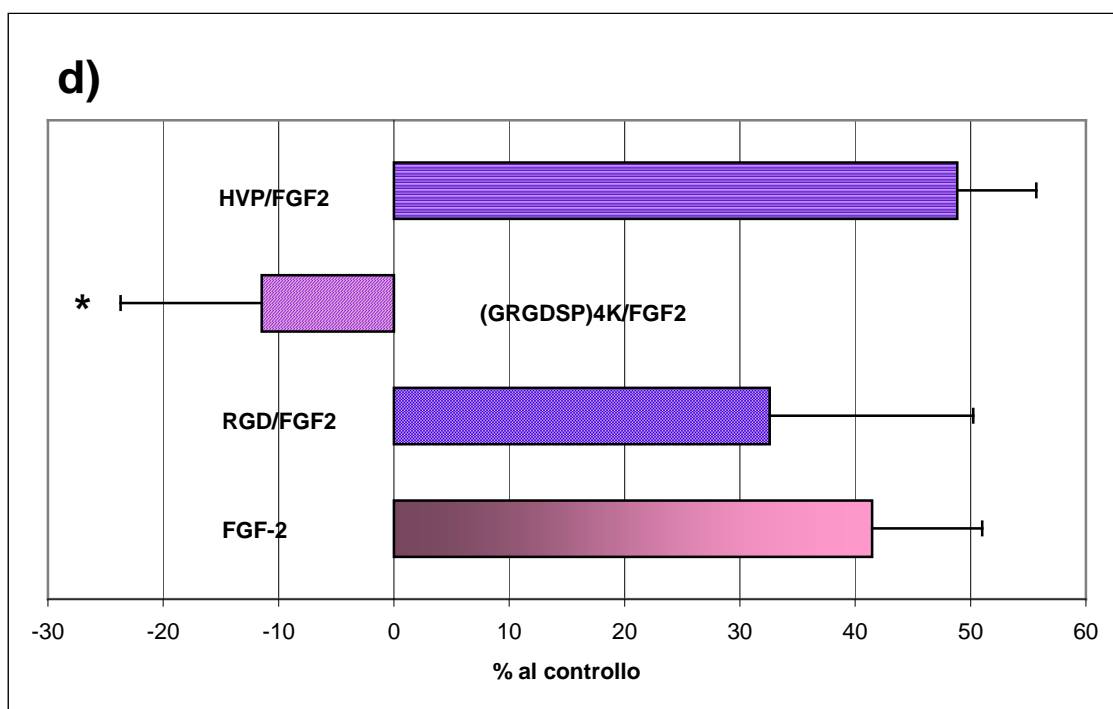
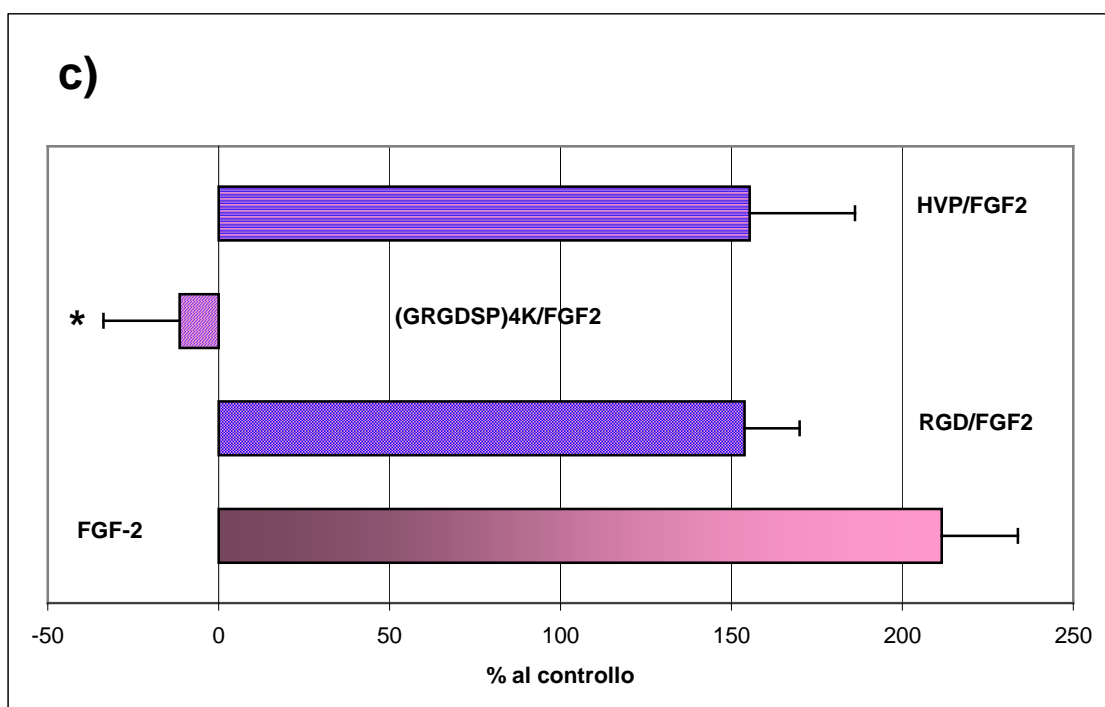


Figura 6.23. Analisi quantitative dei parametri dimensionali (percentuale dell'area coperta dalle HUVEC (a) e lunghezza totale delle maglie (b), per campo) e dei parametri topologici (numero di maglie (c) e numero dei punti di ramificazione (d), per campo) delle strutture a rete create dalle cellule endoteliali seminate su Matrigel. Le HUVEC sono state trattate con 50ng/ml FGF-2 in presenza o meno dei peptidi alla concentrazione di 0.1 mM. I dati sono espressi come percentuale rispetto alle colture di controllo e gli istogrammi rappresentano il valore medio \pm deviazione standard, calcolato su almeno 3 esperimenti. * = $p < 0.05$ verso FGF-2. t test di Student.

6.3.7 Effetti sull'angiogenesi in vivo

In seguito a trattamento delle CAM con 1 mM RGD, (GRGDSP)₄K e HVP, l'analisi al microscopio ha evidenziato un significativo effetto inibitorio verso il processo angiogenico, fisiologicamente presente negli impiantati di controllo col solo PBS come veicolo (tabella 3) Nei saggi condotti somministrando i campioni (alla dose di 1 mM) assieme al fattore FGF-2 (50 ng/mL), è risultato che solo (GRGDSP)₄K è in grado di revertire significativamente la risposta angiogenica evocata dal fattore di crescita (Tabella 6.2).

COMPOUND	NUMBER OF VESSELS
RGD	4±2*
(GRGDSP) ₄ K	3±1*
HVP	4±2*
RGD + FGF-2	26±3
(GRGDSP) ₄ K + FGF-2	15±4**
HVP + FGF-2	27±4
FGF-2	28±4
PBS	8±2

Tabella 6.2. Effetti di RGD, (GRGDSP)₄K e HVP somministrati da soli o in combinazione con FGF-2 sull'angiogenesi *in vivo*, saggio sulla membrana corioallantoidea embrionale di pollo. * p < 0.001 verso PBS; ** p < 0.001 verso FGF-2, t test di Student.

6.4 DISCUSSIONE

Da quando Folkman (1971) ha dimostrato come la crescita del tumore sia dipendente dalla vascolarizzazione e quindi possa essere inibita attraverso un preciso controllo della formazione di neovasi all'interno della massa tumorale, sono state progettate, sviluppate e valutate sia *in vivo* che *in vitro* numerose strategie volte a bloccare i vari stadi del processo angiogenico (Cao, 2004). L'utilizzo di antagonisti di singoli fattori angiogenici non ha fornito risultati soddisfacenti. Infatti, poiché il genoma delle cellule tumorali è instabile e il tumore è formato da una popolazione di cellule eterogenea, il pattern di espressione dei fattori proangiogenici può venire alterato durante lo sviluppo del tumore con conseguente comparsa di fenomeni di resistenza. Al contrario, gli inibitori dell'angiogenesi che bloccano direttamente la proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule endoteliali dovrebbero superare tale inconveniente, poiché il genoma delle cellule endoteliali è stabile. A tale gruppo appartengono diverse categorie di inibitori proteici e composti chimici, che si sono rivelati molto efficaci in numerosi modelli animali di tumore (Cao, 2004).

Le cellule endoteliali rappresentano il punto di partenza del processo angiogenico, il cui svolgimento richiede necessariamente che le EC possano proliferare e migrare all'interno della massa tumorale solamente se viene garantita la loro adesione alle macromolecole della matrice extracellulare. Questo può avvenire tramite riconoscimento da parte delle integrine della sequenza RGD o in seguito all'interazione tra i HSPG con il dominio di legame dell'eparina.

Utilizzando quindi derivati dell'RGD (Vassilev *et al.*, 1999; Romanov *et al.*, 1999) o frammenti peptidici contenenti i siti di binding dell'eparina (Cardin *et al.*, 1989), è possibile inibire l'adesione cellulare tramite competizione per l'interazione recettore/matrice. In tal modo, la perdita di ancoraggio dovrebbe indurre segnali pro-apoptotici con conseguente effetto anti-angiogenico.

In questo lavoro sono stati valutati gli effetti di due classi di peptidi. La prima è caratterizzata dalla presenza della sequenza RGD di legame per le integrine e comprende, oltre al motivo minimo Arg-Gly-Asp, i campioni: i) GRGDSPK, motivo contenuto all'interno della fibronectina con un residuo di lisina al C-terminale, ii) (GRGDSP)₄K, peptide lineare contenente quattro motivi RGD e iii) MAP, derivato ramificato contenente otto sequenze RGD. L'altro gruppo è costituito dalla sola sequenza di legame per l'eparina, X-B-B-B-X-B-B-X (dove B è un aminoacido basico e X un qualsiasi aminoacido non basico), contenuta nella vitronectina, e riprodotta nel peptide HVP.

I dati raccolti indicano che l'attività dei peptidi derivati dall'RGD, appare correlata alle loro proprietà adesive. Infatti i risultati dei saggi di adesione, mostrano che solo (GRGDSP)₄K è capace di alterare sia promuovendo che ostacolando, l'ancoraggio delle cellule alle piastre *no-tissue*, a seconda che venga usato, rispettivamente, come condizionamento o fattore solubile. Queste conclusioni si accordano con le osservazioni derivate da precedenti esperienze (Dettin *et al.*, 2005) condotti su osteoblasti, estratti da

midollo osseo di ratti Sprague Dawley, e su colture di cellule endoteliali di aorta porcina. (GRGDSP)₄K esercita *in vitro* una potente attività anti-angiogenica, superiore a quella registrata dopo trattamento con RGD, usato come composto di riferimento, e con gli altri derivati della stessa serie. Diminuisce sia la vitalità cellulare che gli eventi differenziativi su Matrigel, mentre il tripeptide e la molecola ramificata MAP(RGDSP), contenente ben 8 motivi RGD, non hanno modificato la crescita cellulare e hanno indotto un blando effetto inibitorio sugli eventi morfogenici. Queste evidenze indicherebbero che la presenza di più sequenze segnale per catena peptidica, non è una condizione sufficiente per potenziare l'attività biologica. Inoltre la ripetizione del motivo di adesione in strutture lineari probabilmente permette una maggior accessibilità del motivo stesso e conformazionalmente risulta più disponibile per il riconoscimento cellulare. Come sottolineato, anche i residui fiancheggianti il motivo di adesione RGD, sembrano essere responsabili di un effetto modulatore sull'attività biologica. Infatti GRGDSPK, che riproduce la sequenza esapeptidica naturalmente presente nella fibronectina con l'aggiunta per motivi sintetici di una lisina al terminale carbossilico, manifesta un'attività inibitoria sulla vitalità cellulare, mentre promuove la formazione di strutture tubulari su Matrigel. Il fatto che *in vivo* sia la breve sequenza RGD che (GRGDSP)₄K evocano una risposta anti-angiogenica, può essere correlato a un periodo di incubazione più lungo, richiesto per il saggio su CAM, rispetto ad un trattamento di sole 18 h selezionato per il test di morfogenesi *in vitro*.

Inoltre (GRGDSP)₄K è stato in grado di contrastare efficacemente l'angiogenesi *in vivo*, valutata su CAM, la vitalità cellulare e l'organizzazione in strutture simil-capillari su Matrigel, indotte da FGF-2, uno tra i più importanti fattori coinvolti nel processo di neovascolarizzazione. Da questo punto di vista gli altri derivati RGD sono risultati inefficaci.

Conseguente al suo rilascio dalle cellule tumorali o stromali o alla sua mobilitazione dalla matrice extracellulare, FGF-2 esercita il suo effetto pro-angiogenico sulle cellule endoteliali mediante stimolazione autocrina e/o paracrina. Legandosi a recettori tirosin chinasi della superficie cellulare, stimola la proliferazione e la chemotassi delle cellule endoteliali e la loro morfogenesi su Matrigel, in conseguenza all'attivazione della proteina chinasi mitogeno-attivata (MAPK), della proteina chinasi C e di alcuni sistemi proteolitici (Presta *et al.*, 2005). In condizioni fisiologiche FGF-2 è presente nel sangue in concentrazione pari a 0.6 pM e sopra a 6.0 pM in condizioni patologiche, mentre i suoi recettori sono presenti in concentrazioni un milione di volte più elevate. Da ciò deriva che FGF-2 esiste principalmente come fattore immobilizzato, legato alla matrice extracellulare e/o alla superficie cellulare o come complesso circolante. I dati sperimentali raccolti si accordano con quanto concluso da Sahni e collaboratori (2004), sul fatto che la risposta delle EC alla citochina libera o immobilizzata, è modulata anche da recettori integrinici, sebbene il meccanismo molecolare di tale regolazione non sia stato ancora completamente compreso. Sembra che un'interazione diretta tra integrina $\alpha_5\beta_3$ e FGFR-1 sia richiesta per una piena risposta all'FGF-2. L'interazione integrina $\alpha_5\beta_3$ /FGF-2 porterebbe all'assemblamento di

placche di adesione focale contenenti integrine $\alpha_5\beta_3$ e FGFR-1, la cui presenza è essenziale per l'attivazione di ERK-1/2 e la proliferazione cellulare (Tanghetti *et al.*, 2002). In questo contesto numerosi peptidi contenenti il motivo RGD sono stati sviluppati appunto per bloccare sia *in vitro* che *in vivo*, gli effetti angiogenici indotti da FGF-2.

FGF-2 è una proteina legante l'eparina, GAG caricato negativamente rilasciato nel flusso sanguigno nel corso di processi infiammatori. Tuttavia, FGF-2 interagisce maggiormente con le catene di GAG ad eparan solfato attaccate a HSPG. Questi ultimi sono espressi sulla superficie di quasi tutte le cellule dove si possono trovare come recettori associati alla membrana, come componenti della matrice extracellulare o rilasciati come molecole libere (Lindahl *et al.*, 1994). HSPG modulano l'angiogenesi interagendo con regolatori positivi e negativi. L'interazione con FGF-2 avviene con bassa affinità ed è mediata dai gruppi solfato carichi negativamente della catena saccaridica, che riconoscono i motivi contenenti aminoacidi basici (Eriksson *et al.*, 1991). Il legame alternato dell'FGF all'eparina o a HSPG (liberi o associati alla matrice o alla superficie cellulare) si traduce in una fine modulazione dell'attività biologica *in vitro* e *in vivo*, attuata tramite controllo della biodisponibilità e dell'interazione con le cellule endoteliali (Rusnati *et al.*, 1996). In generale HSPG liberi sequestrano FGF nell'ambiente extracellulare e agiscono come antagonisti dell'FGF. Al contrario i HSPG associati alla cellula attivano direttamente una via di trasduzione del segnale in risposta a FGF-2, lo internalizzano e sono richiesti per una corretta presentazione dell'FGF al suo recettore, portando alla formazione di un complesso ternario HSPG/FGF/FGFR (Presta *et al.*, 2005). L'abilità di FGF-2 di legarsi all'eparina implica che molecole in grado di interferire con questa interazione possano agire come inibitori dell'angiogenesi. Su tale base numerose molecole anioniche simili all'eparina e derivati di essa sono stati sviluppati come possibili agenti antiangiogenici (Presta *et al.*, 2003).

Sulla base di queste considerazioni, HVP, possedendo il motivo di legame per l'eparina, rintracciato all'interno della sequenza della vitronectina umana, è in grado d'interagire con gli HSPG di membrana. A seguito del trattamento delle HUVEC con tale molecola, è stata osservata una significativa riduzione della vitalità cellulare, l'inibizione della morfogenesi su Matigel e della formazione di vasi negli impianti su membrana corioallantoidea di pollo, rispetto a quanto visibile nelle colture di controllo non trattate. Anche se non in grado di interferire con l'adesione di cellule endoteliali, come riportato in precedenza (Dettin *et al.*, 2005) e nuovamente confermato in questo lavoro, si può ipotizzare che le proprietà antiangiogeniche mostrate, siano riconducibili ad alterazioni dell'interazione HSPG/FGF-2, e conseguente blocco della stimolazione autocrino/paracrina della citochina. Sebbene HVP riesca a revertire completamente l'effetto proliferogeno di FGF2, fallisce nell'antagonizzare la risposta pro-angiogenica indotta su Matrigel e sulla CAM. Al fine di spiegare tali risultati, è bene considerare che molecole, quali HVP, contenenti motivi basici di legame per l'eparina possono modulare la risposta cellulare riconducibile al solo FGF-2 immobilizzato, rispetto invece a peptidi che presentano la sequenza RGD,

che possono agire anche sulla forma libera della chemochina, come prima riportato. Inoltre la diversa modalità di somministrazione di FGF-2 alle colture durante i saggi *in vitro* di morfogenesi e di vitalità cellulare, può essere responsabile, almeno in parte, questi dati contraddittori: nel primo caso il fattore di crescita è addizionato alla sospensione cellulare prima della semina su Matrigel, mentre nell'altro saggio, l'incubazione coinvolge HUVEC già adese alla piastra e seminate 24h prima.

La modulazione degli effetti autocrini/paracrini dell'FGF-2 sulle EC, sembra essere anche coinvolto nella diminuzione della vitalità cellulare indotta da HVP e (GRGDSP)₄K. Infatti non sembra esistere una connessione tra l'inibizione osservata e l'attivazione di eventi necrotici o apoptotici, poichè dai dati dei saggi di citotossicità i peptidi non sembrano attivi nell'alterare la formazione di mono e oligonucleosomi, o il rilascio di LDH, o piuttosto portano ad una diminuzione di tali eventi rispetto a quanto avviene nelle colture di controllo.

In uno sguardo d'insieme i risultati ottenuti indicano senza dubbio che (GRGDSP)₄K, possa costituire un promettente agente anti-angiogenico, il cui meccanismo d'azione sembra essere legato all'interazione con le integrine, che si traduce in un'inibizione sia dell'adesione cellulare sia degli effetti pro-angiogenici indotti da FGF-2. D'altra parte gli effetti di HVP, contenente la sequenza di *binding* per l'eparina, sembrano riconducibili ad uno squilibrio dell'interazione tra il fattore di crescita e i HSPG. L'inibizione manifestata è comunque di minore intensità se confrontata a quella ottenuta con (GRGDSP)₄K. Attualmente sono in corso ulteriori indagini sia *in vitro* che *in vivo* per confermare l'effettiva potenzialità anti-tumorale di (GRGDSP)₄K e per meglio identificare i suoi bersagli a livello molecolare.

BIBLIOGRAFIA

Aguzzi M.S., Giampietri C., De Marchis F., Padula F., Gaeta R., Ragone G., Caporossi M.C., Facchiano A. (2004) RGDS peptide induces caspase 8 and 9 activation in human endothelial cells. *Blood*, **103**:4180-4186.

Albericio F et al., (2000): Fmoc solid phase peptide synthesis a practical approach. Chan WC, White PD (Eds.), Oxford University Press, Oxford. p. 104

Albini A., Benelli R., Douglas M.N., Brigati C. (2004) The “chemoinvasion assay”: a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *Int. J. Biol.*, **48**:563-571.

Alessandri G., Raju K., Gullino P.M. (1983) Mobilization of capillary endothelium *in vitro* induced by effectors of angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res.*, **43**:1790-1797.

Alessi, DR (1997) The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* **402**: 121-3

Amara A., Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, Virelizier JL, Delepierre M, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F. *Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine*. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274(34):23916-25

Auerbach R., Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. *Angiogenesis assays: a critical overview*. *Clin Chem.* 2003 Jan;49(1):32-40.

Auerbach R., Kubai L., Knighton D., Folkman J. (1974) A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev. Biol.*, **41**:391-394.

Ausprunk DH, Folkman J (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. [Microvasc Res.](#) **14**: 53-65.

Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J (1974): Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol.* **38**: 237-48

Badet J, Soncin F, N'Guyen T, Barritault D (1990): *In vivo* and *in vitro* studies of angiogenin-a potent angiogenic factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* **1**: 721-4

Ball HL, Ma scagni P (1996): Chemical synthesis and purification of protein: a methodology. *Int. J. Peptide Protein Res.* **48**: 31-47

Bartrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG (1991): 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett.* **1**: 611–614; Cory *et al.*, 1991 - Cory AH, Owen TC, Bartrop JA, Cory JG (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* **3**: 207-212

Basilico C., Moscatelli D. (1992) The FGF family of growth factors and angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, **159**:115-165.

Battagay EJ, Rupp J, Irvella-Arispe L, Sage EH, Pech M (1994): PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis *in vitro* via PDGF β -receptor. *J. Cell Biol.* **125**: 917-28

Bax A (1985); Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J Magn Res* **63**: 207-213.

Beavis RC and Chait BT (1990): High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **62**: 1836-1840

Bock-Marquette I, Safena A, White MD, DiMaio JM, Srivastava D (2004): Thymosin- β 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nat Pub Group* **432**: 466-472.

Boteju LW, [Nikiforovich GV](#), [Haskell-Luevano C](#), [Fang SN](#), [Zalewska T](#), [Stropova D](#), [Yamamura HI](#), [Hruby VJ](#) (1996) The use of topographical constraints in receptor mapping: investigation of the topographical requirements of the tryptophan 30 residue for receptor binding of Asp-Tyr-D-Phe-Gly-Trp-(N-Me)Nle-Asp-Phe-NH₂ (SNF 9007), a cholecystokinin (26-33) analogue that binds to both CCK-B and delta-opioid receptors. *J Med Chem* **39**: 4120-4.

Brooks PC (1996): Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **15**: 187–94)

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA (1994): Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**: 1157-64

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA (1996): Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin avb3. *Cell* **85**: 683-93.

Brower V. (1999) Tumor angiogenesis-new drugs on the block. *Nat. Biotechnol.*, **17**:963-968.

Brown N.S., Bicknell R. (1998) Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem. J.*, **334**:1-8.

Buckley D.C., Pilling D., Henriquez N.V., Parsonage G., Threlfall K, Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M, Salmon M. (1999) RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature*, **397**:534-539.

Bussolino F., Albini A., Camussi G., Presta M., Viglietto G., Ziche M., Persico G. (1996) Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur. J. Cancer*, **32A**:2401-2412.

Cao Y (1999): Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* **84**: 643-50

Cao Y. (1999) Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica*, **84**:643-650.

Cao Y. (2004) Antiangiogenic cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, **14**:19-145.

Caplan MR, Schwartzfarb EM, Zhang S, Kamm RD, Lauffenburger DA. *Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence.* *Biomaterials.* 2002 Jan;**23**(1):219-27.

Cardin AD, Weintraub H JR (1989) Molecular modelling of protein- glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9**: 21-32.

Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin Mi, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E (1999): Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**: 147–57

Carmeliet P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med. 2000 Apr;6(4):389-95

Celotti F. (2002) Patologia generale e fisiopatologia. Edises, Napoli, 40-41.

Chakrabartty A, Kortemme T, Padmanabhan S, Baldwin RL (1993): Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry* **32**: 5560-5565

Chang C, Werb Z (2001): The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 11: S37-43

Chen X., Wang J., Fu B., Yu L. (1997) RGD-containing peptides trigger apoptosis in glomerular mesangial of adult human kidneys. *Biochem Biophys Res Commun.*, **234**:594-599.

Chiarugi V., Magnelli L., Gallo O. (1998) Cox-2, iNOS and p-53 as play-markers of tumor angiogenesis. *Int. J. Mol. Med.*, **2**:715-19.

Chou PY, Fasman GD (1974): Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet and random coil regions calculated from protein. *Biochemistry* **13**: 222-243

Claesson-Welsh L., Welsh M., Ito N. (1998) Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**:5579-5583.

Crockford D (2007): Development of thymosin beta4 for treatment of patients with ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* **1112**: 385-95.

Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I. *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. EMBO J. 1997 Dec 1;16(23):6996-7007.

Czisch M., Schleicher M., Horger S., Voelter W., Holak T.A. (1993) : Conformation of thymosin β 4 in water determined by NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem. **218**, 335-344.

Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N. (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, **265**:1582-1584.

D'Andrea LD, Del Gatto A, Pedone C, Benedetti E (2006): Peptide-based molecules in angiogenesis. *Chem Biol Drug Des.* **67**: 115-26

De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, Zhang HH, Fales H, Tosato G. *Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity*. Blood. 2004 Apr 1;103(7):2452-9. Epub 2003 Oct 2.

Dedova IV, Nikolaeva OP, Safer D, De La Cruz EM, dos Remedios CG (2006): Thymosin beta4 induces a conformational change in actin monomers. *Biophys J* **90(3)**: 985-992.

Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J Biomol NMR 1995;6(3):277-293.

Dellian M, Witwer BP, Salehi HA, Yuan F, Jain RK (1996): Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol.* **149**: 59-71

Denizot F., Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*, **89**:271-277.

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

Dettin M, Biciato S, Scarinci C, Cline E, Lingen MW, Di Bello C. *Synthetic peptides derived from the angiostatin K4 domain inhibit endothelial cell migration*. *Chembiochem*. 2003 Nov 7;4(11):1238-42

Dettin M, Conconi MT, Gambaretto R, Bagno A, Di bello C, Menti AM, Grandi C, Parnigotto PP (2005) Effect of synthetic peptides on osteoblast adhesion. *Biomaterials* **26**: 4507-4515.

Dettin M, Conconi MT, Gambaretto R, Pasquato A, Folin M, Di Bello C, Parnigotto PP. *Novel osteoblast-adhesive peptides for dental/orthopedic biomaterials*. *J Biomed Mater Res*. 2002 Jun 5;60(3):466-71.

Dettin M, Falcigno L, Campanile T, Scarinci C, D'Auria G, Cusin M, Paolillo L, Di Bello C (2001): A type-II beta-turn, proline-containing, cyclic pentapeptide as a building block for the construction of models of the cleavage site of pro-oxytocin. *J. Pept. Sci.* **7**: 358-373

Dettin M, Pasquato A, Scarinci C, Zanchetta M, De Rossi A, Di Bello C. *Anti-HIV activity and conformational studies of peptides derived from the C-terminal sequence of SDF-1*. *J Med Chem*. 2004 Jun 3;47(12):3058-64.

Domansi M, Hertzog M, Coutant J, Gutsche-Perelroizen I, Bontems F, Carter MF, Guitten E, van Heijenoort C (2004): Coupling of folding and binding of thymosin β 4 upon interaction with monomeric actin monitored by nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* **279**: 23637-23645.

Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **146**:1029-1039.

Eliceiri B.P., Cheresch D.A. (1999) The role of alpha-v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.*, **103**:1227-1230.

Eriksson A.E., Cousens L.S., Weaver L.H., Matthews B.W. (1991) Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**:3441-3445.

Factor Affecting Capillary Electrophoresis Analysis, The Model 270 A (1990) Applied Biosystems (ed.)

Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC (1992): Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis. *Am J Path* **140**: 539-544

Falk W., Goodwin R.H., Leonard E.J., Leonard E.J. Jr (1980) A 48-well micro-chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods*, **33**:239-247.

Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S (2000): *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 14686-91

Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, Gioranni CW, Ehrlich MG, Valentini RF (1999) RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation *in vivo*. *Biomaterials* **20**: 2323-31.

Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*. 1985 Sep 24;24(20):5480-6

Fields CG, Lloyd DH, Macdonald RL, Otteson KM, Noble RL (1991): HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis, *Peptide Research* **4**: 95-101

Fields GB and Noble RL (1990): Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**: 161-214

Fields GB, Tian Z, Barany G (1992): *Synthetic Peptides: A User's Guide*. Grant GA(ed.), Freeman WH and Company

Fiori S, Mammi S, Peggion E, Rovero P, Pegoraro S, Revoltella RP (1997): Conformation of four peptides corresponding to the alpha-helical segments of human GM-CSF *J. Pept. Sci.* **3**: 336-346

Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**: 1182-1186.

Folkman J. (1975) Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, **43**:175-203.

Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, **1**:27-31.

Folkman J., Haudenschild C. (1980) Angiogenesis *in vitro*. *Nature*, **288**:551-556.

Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresch DA (1996): Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9764-9

Frisch SM, Screatton RA (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 555-62.

Gallagher JT, Lyon M: Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens, in Iozzo MV (2000): Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions. *Marcel Dekker Inc. New York, New York* pp 27-59

Garber K (2002) Angiogenesis inhibitors suffer new setback. *Nat Biotechnol* **20**: 1067-8.

Giancotti F.G., Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**:1028-1032.

Goldman E, (1907): The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* **2**: 1236–1240

Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK (2005): Thymosin- β 4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends Mol Med* **11**: 422-429.

Gospodarowicz D (1974): Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**: 453

Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, La Flamme S, Burbero PD, Goldstein AL, Kleinman HK (1995): Matrigel induces thymosin β 4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Scien* **106**: 3685-3694.

Grant M.E., Heathcote J.G., Orkin R.W. (1981) Current concepts of basement membrane structure and function. *Biosci. Rep.*, **1**:819-842.

Greenfield N and Fasman GD (1969): Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**: 4108-4116

Greenfield N (1996): Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analyt. Biochem.* **235**: 1-10

Greenfield N, e Fasman GC, (1969); Computer circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**: 4108-4116.

Guntert P, Braun W, Wuthrich K. Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J Mol Biol* 1991;217(3):517-530.

Guntert P, Wuthrich K. Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints. *J Biomol NMR* 1991;1(4):447-456.

Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ (1995): Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* **376**: 517-9

Hamburger V, Hamilton HL (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol* **88**: 49-92

Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J (1996): Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* **32A**: 2386-93

Hanford HA, Wong CA, Kassan H, Cundiff DL, Chandel N, Underwood S, Mitchell CA, Soff GA. *Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells*. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):4275-80.

Hanford HA, Wong CA, Kassan H, Cundiff DL, Chandel N, Underwood S, Mitchell CA, Soff GA (2003): Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells. *Cancer Res.* **63**: 4275-80

Hata Y., Rook S.L., Aiello L.P. (1999) Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Diabetes*, **48**:1145-1155.

Hay E.D. (1981) Extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, **91**:205-223.

Hendrix M.J., Seftor E.A., Seftor R.E., Fidler I.J. (1987) A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer Lett.*, **38**:137-147.

Hersel U., Dahmen C., Kessler H. (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, **24**:4385-4415.

Hirano Y., Okuno M., Hayashi T., Goto K., Nakajima A. (1993) Cell-attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDY and YIGSR toward fine cell lines. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*; **4**:681-689.

Hohenester E., Sasaki T., Olsen B.R., Timpl R. (1998) Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *EMBO J.*, **17**:1656-1664.

Hollósi M., Majer Z, Rónai AZ, Magyar A, Medzihradzsky K, Holly S, Perczel A, Fasman GD (1994): CD and Fourier transform infrared spectroscopic studies of peptides. II. Detection of beta-turns in linear peptides. *Biopolymers* **34**: 177-185

Hong Y., Legge RL, Zhang S, Chen P. *Effect of amino acid sequence and pH on nanofiber formation of self-assembling peptides EAK16-II and EAK16-IV*. *Biomacromolecules*. 2003 Sep-Oct;4(5):1433-42.

Horwell DC (1995) The 'peptoid' approach to the design of non-peptide, small molecule agonists and antagonists of neuropeptides. *Trends Biotechnol* **13**: 132-4.

Huebsch JB, **Fields GB**, **Triebes TG**, **Mooradian DL** (1996) Photoreactive analog of peptide FN-C/H-V from the carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin supports endothelial cell adhesion and spreading on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* **31**: 555-67.

Huff T., Muller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E (2001): β -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* **33**: 205-220.

Huff T., Otto AM, Muller CS, Meier M, Hannappel E (2002): Thymosin β 4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen. *FASEB J* **16**: 691-696.

Huff T., Rosorius O, Otto AM, Muller CS, Ballweber E, Hannappel E, Mannherz HG (2004): Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin β 4. *J Cell Sci* **117**: 5333-5343.

Huff T, Rosorius O, Otto AM, Muller CS, Ballweber E, Hannappel E, Mannherz HG. *Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin beta4*. *J Cell Sci.* 2004 Oct 15;117(Pt 22):5333-41

Iliopoulos O., Levy A.P., Jiang C., Kaelin W.G. Jr, Goldberg M.A. (1996) Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**:10595-10599.

Introduction to Cleavage Techniques (1990) *Strategies in Peptide Synthesis*, Applied Biosystems (ed.)

Iozzo RV, San Antonio JD (2001): Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest.* **108**: 349-55)

Ito Y., Kajihara M., Imanishi Y. (1991) Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide. *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**:1325.1327.

Jackson CJ and Nguyen M (1997): Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol.* **29**: 1167-77

Jeffery CJ (1999): Moonlighting proteins, *Trends Biochem. Sci.* **24**: 8–11.

Jeffery CJ (2003) Multifunctional proteins: examples of gene sharing, *Ann. Med.* **35**: 28–35.

Ji WR, Castellino FJ, Chang Y, Deford ME, Gray H, Villarreal X, Kondri ME, Marti DN, Llinas M, Schaller J, Kramer RA, Trail PA. *Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis*. *FASEB J.* 1998 Dec;12(15):1731-8.

Johnson BA (2004); Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol* **278**: 313-352.

Johnson D.E., Williams L.T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.*, **60**:1-41.

Johnson WC (1988): Secondary Structure of Proteins Through Circular Dichroism Spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**: 145-166

Juarez J, Bendall L, Bradstock K. *Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis*. *Curr Pharm Des.* 2004;10(11):1245-59.

Karumanchi S.A., Jha V., Ramchandran R. (2001) Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol. Cell*, **7**:811-822.

King DS, Fields CG, Fields GB (1990) A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**: 255-266

Klagsbrun M., Moses M.A., (1999) Molecular angiogenesis. *Chem. Biol.*, **6**:217-224.

Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **43**:S42-51.

Kleinman H.K., Cannon F.B., Laurie G.W., Hassell J.R., Aumailley M., Terranova V.P., Martin G.R., **Dabois-Dalcq M.** (1985) Biological activity of laminin. *J. Cell Biochem.*, **27**:317-325.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, Di-Pietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**: 1798–1801

Koch AE, Szekanecz Z, Friedman J, Haines GK, Langman CB and Bouck NP (1998): Effects of thrombospondin-1 on disease course and angiogenesis in rat adjuvant-induced arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* **86**: 199-208

Koutrafouris V, Leondiadis L, Avgoustakis K, Livaniou E, Czarnecki J, Ithakissios DS, Evangelatos GP (2001): Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Biochim Biophys Acta* **1568**: 60-66.

Krchnak V, Flegelova Z, Vagner J (1993); Aggregation of resin-bound peptides during solid-phase

Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. *Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures*. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1589-98.

Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. *CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion*. *J Mol Histol*. 2004 Mar;35(3):233-45.

Kuhlmann CR, Schaefer CA, Reinhold L, Tillmanns H, Erdogan A. *Signalling mechanisms of SDF-induced endothelial cell proliferation and migration*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 7;335(4):1107-14.

Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, Tanghetti E, Yaremko B, Nechuta T, *et al.* (2001) Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin receptor antagonist. *Cancer Res* **61**: 2232–8.

Kumar S., Ghellal A., Li C., Byrne G., Haboubi N., Wang J.M., Bundred N. (1999) Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.*, **59**:856-861.

Li A, Dubey S, Varney ML, Singh RK (2002): Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMP production in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res*. **64**: 476-81

Lichtenbeld H.H.C., van Dam-Mieras M.C.E., Hillen H.F.P. (1996) Humour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance. *Neth. J. Med.*, **49**:42-51.

Liekens S., De clerq E., Neyts J. (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, **61**:253-270.

Lindahl P, Johansson BR, Leveen P., Betsholts C (1997): Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**: 244-5

Lindahl U., Lidholt K., Spillmann D., Kjellen L. (1994) More to “heparin” than anticoagulation. *Thromb Res*, **75**:1–32.

Luo J, Luo Z, Zhou N, Hall JW, Huang Z. *Attachment of C-terminus of SDF-1 enhances the biological activity of its N-terminal peptide*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Oct 14;264(1):42-7.

Maciag T., Kadish J., Wilkins L., Stemerma M.B., Weinstein R. (1982) Organizational behaviour of human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **94**:511-520.

Madri J.A., Williams S.K. (1983) Capillary endothelial cell culture phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.*, **97**:153-165.

Maeshima Y., Yerramalla U.L., Dhanabal M. (2001) Extra-cellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem.*, **276**:31959-31968.

Majno G (1998) Chronic inflammation. Links with angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol* **153**: 1035-1039

Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK (1997): Thymosin β 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* **11**: 474-481.

Malinda KM, Sidhu GS, Mani H, Banaudha K, Maheshwari RK, Goldstein AL, Kleinman HK (1999): Thymosin β 4 accelerates wound healing. *J Invest Dermatol* **113**: 364-368.

Mandriota S.J., Seghezzi G., Vassalli J.D., Ferrara N., Wasi S., Mazzieri R., Mignatti P., Pepper M.S. (1995) Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **270**:9709-9716.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271–5).

Mendoza FJ, Espino PS, Cann KL, Bristow N, McCrea K, Los M (2005): Anti-tumor chemotherapy utilizing peptide-based approaches--apoptotic pathways, kinases, and proteasome as targets. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. **53**: 47-60

Merrifield RB, Solid phase synthesis, Science 232 (1986) 341-347; Fields et al., 1992 - G.B. Fields, Z. Tian, G. Barany, Synthetic Peptides: A User's Guide, (1992) Grant GA(ed.), W.H. Freeman and Company

- Mignatti P.**, Rifkin D.B. (1996) Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*, **49**:117-137.
- Mirshahi F.**, Pourtau J, Li H, Muraine M, Trochon V, Legrand E, Vannier J, Soria J, Vasse M, Soria C. *SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models.* *Thromb Res.* 2000 Sep 15;99(6):587-94
- Montesano R.**, Orci L., Vassalli P. (1983) *In vitro* rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J. Cell Biol.*, **97**:1648-1652.
- Montgomery A.M.**, Reisfeld R.A., Cheresch D.A. (1994) Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; **91**:8856-8860.
- Moore B.B.**, Keane M.P., Addison C.L., Arenberg D.A., Strieter R.M. (1998) CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J. Investig. Med.*, **46**:113-120.
- Moser T.L.**, Stack M.S., Asplin I. (1999) Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**:2811-2816.
- Mukhopadhyay D.**, Tsiokas L., Sukhatme V.P. (1995) Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res.*, **55**:6161-6165.
- Murphy G.**, Stanton H., Cowell S., Butler G., Knauper V., Atkinson S., Gavrilovic J. (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*, **107**:38-44.
- Narmoneva DA**, Oni O, Sieminski AL, Zhang S, Gertler JP, Kamm RD, Lee RT. *Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis.* *Biomaterials.* 2005 Aug;26(23):4837-46.
- Nguyen M.**, Shing Y., Folkman J. (1994) Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc Res.*, **47**:31-40.
- Nguyen M.**, Strubel N.A., Bischoff J. (1993) A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature*, **365**:267-269.

Nissen N.N., Polverini P.J., Koch A.E., Volin M.V., Gamelli R.L., Di Pietro L.A. (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am. J. Pathol.*, **152**:1445-1452.

Nyberg P., Xie L., Kalluri R. (2005) Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.*, **65**:3967-3975.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS (1997): Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277–285)

Ortega S., Ittmann M., Tsang S.H., Ehrlich M., Basilico C. (1998) Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**:5672-5677.

Partanen J, Armstrong E, Mäkelä TP, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, Knuutila S, Huebner K, Alitalo K (1992): A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol.* **12**: 1698-707).

Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., Montesano R. (1991) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**:902-906.

Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., Montesano R. (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**:824-831.

Peptide synthesis. Prediction of difficult sequences. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **42**: 450-454.

Perczel A, Hello M., Foxman BH, Fasman GD (1991) Conformational analysis of pseudocyclic hexapeptides based on quantitative circular dichroism (CD), NOE, and x-ray data. The pure CD spectra of type I and type II .beta.-turns. *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 9772-9784

Perczel A, Hollósi M, Sándor P, Fasman GD (1993): The evaluation of type I and type II beta-turn mixtures. Circular dichroism, NMR and molecular dynamics studies. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **41**: 223-236

Perczel A, Park K, Fasman GD (1992): Deconvolution of the circular dichroism spectra of proteins: the circular dichroism spectra of the antiparallel beta-sheet in proteins. *Protein* **13**: 57-69

Philp D, Huff T, Gho YS, Hannappel E, Kleinman HK (2003): The actin binding site on thymosin β 4 promotes angiogenesis. *FASEB J* **17**: 2103-2105.

Plunkett ML, Hailey JA (1990): An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab Invest.* **62**: 510-7

Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr and Unanue ER (1977): Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* **269**: 804-806

Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G (1994): Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54**: 2419-2423

Presta M, Rusnati M, Urbinati C, Sommer A, Ragnotti G. (1991) Biologically active synthetic fragments of human basic fibroblast growth factor (bFGF): identification of two Asp-Gly-Arg-containing domains involved in the mitogenic activity of bFGF in endothelial cells. *J Cell Physiol* **149**: 512-24.

Presta M., Dell'Era P., Mitola F., Moroni E., Ronca R., Rusnati M. (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine and Growth Factors Reviews*, **16**:159-178.

Presta M., Leali D., Stabile H., Ronca R., Camozzi M., Coco L. (2003) Heparin derivatives as angiogenesis inhibitors. *Curr Pharm Des*, **9**:553-566.

Presta M., Moscatelli D., Joseph-Silverstein J., Rifkin D.B. (1986) Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol. Cell. Biol.*, **6**:4060-4066.

Ravi R., Mookerjee B., Bhujwalla Z.M., Sutter C.H., Artemov D., Zeng Q., Dillehay L.E., Madan A., Semenza G.L., Bedi A. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of

hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.*, **14**:34-44.

Reisinger K, Kaufmann R, Gille J (2003): Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci.* **116**: 225-38).

Ribatti D, Nico B, Vacca A, Presta M. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nature Protocols* 2006; 1: 85-91.

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

Riordan JF, Vallee BL (1988): Human angiogenin, an organogenic protein. *Br J Cancer* **57**: 587-90

Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. [*Nature*](#) **386**: 671-4.

Romanoff AL (1960): The extraembryonic membranes. *In the Avian Embryo. Structural and Functional Development.* Mac Millan, New York.. pp 1039-1141

Romanov V.I., Goligorsky M.S. (1999) RGD-recognizing integrins mediate interactions of human prostate carcinoma cells with endothelial cells *in vitro*. *The Prostate*, **39**:108-118.

Rothermel JD, Perillo NL, Marks JS, Botelho LH (1994): Effects of the specific cAMP antagonist, (Rp)-adenosine cyclic3',5'-phosphorothioate, on the cAMP-dependent protein kinase-induced activity of hepatic glycogen phosphorylase and glycogen synthase. *J Biol Chem.* **259**: 15294-15300

[**Ruoslahti E**](#) (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 697-715.

Rusnati M., Presta M. (1996) Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycans. Biological implications in neovascularization. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **26**:15–23.

Sahni A., Francis C.W. (2004) Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires $\alpha\beta_3$. *Blood*, **104**:3635–3641.

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000): Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: Direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* **96**: 34–40

Sarin VK, Kent BH, Tam JP, Merrifield RB (1981): Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry* **117**: 147-157

Sasaki T., Larsson H., Kreuger J. (1999) Structural basis and potential role of heparin/heparin sulphate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.*, **18**:6240-6248.

Schöbitz B, Netzker R, Hannappel E, Brand K (2001): Cell-cycle-regulated expression of thymosin- β 4 in thymocytes. *Eur J Biochem* **199**: 257-262.

Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R (1998): Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* **232**: 1250-1253.

Simenel C., Van Troys M., Vandekerckhove J., Ampe C., Delepierre M. (2000) : Structural requirements for thymosin β 4 in its contact with Actin. An NMR-analysis of thymosin β 4 mutants in solution and correlation with their biological activity. *Eur. Journal Biochemistry*, **267**, 3530-3538.

Siuzdak G (1994): The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 11290-11297

Sosne G, Szliter EA, Barrett R, Kernacki KA, Kleinman H, Hazlett LD (2002): Thymosin β 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation *in vivo* following alkali injury. *Exp Eye Res* **74**: 293-299.

States DJ, *et al.* A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J Magn Res* 1982;48:286-292.

Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. *Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo.* *Int J Exp Pathol.* 2004 Oct;85(5):233-48

Streit M., Velasco P., Brown L.F., Skobe M., Richard L., Riccardi L., Lawler J., Detmar M. (1999) Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.*, **155**:441-452

Stulík K, Pacáková V, Suchánková J, Claessens HA (1997): Stationary phases for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* **352**, 1-19

Suri C., Jones P.F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P.C., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, **87**:1171-1180.

Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinhal T, Asahara T, Bauters C, Symes J.F, Ferrara N, Isner JM (1996) Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development *in vivo*. *Lab Invest* **75**: 487-502.

Tang P, Hung MC, Klostergaard J (1996): Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*. **35**: 8216-25

Tanghetti E., Ria R., Dell'Era P., Urbinati C., Rusnati M., Ennas M.G. (2002) Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor (FGF-2): recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts. *Oncogene*, **21**:3889–3897.

Troys MV, Defitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C (1996): The actin binding site of thymosin β 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J* **15(2)**: 201-210.

Unemori E.N., Ferrara N., Bauer E.A., Amento E.P. (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **153**:557-562.

User Bulletin 33, Model 431 A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystems (ed.)

User Manual, Model 431 A Peptide Synthesizer, Applied Biosystems (ed.), versione 1.12

Vancompennolle K, Goethals M, Huet C, Louvard D, Vanderkerckhove J (1992): G- to F-actin modulation by a single aminoacid substitution in the actin binding site of actobinding and thymosin β 4. *EMBO J* **11**: 4739-4746.

Vanhee D, Delneste Y, Lassalle P, Gosset P, Joseph M and Tonnel AB (1994): Modulation of endothelial cell adhesion molecule expression in a situation of chronic inflammatory stimulation. *Cell Immunol* **155**: 446-456

Vassilev TL, Kazatchkine MD, Van Huyen JD. (1999) Inhibition of cell adhesion by antibodies to Arg-Gly-Asp (RGD) in normal immunoglobulin for therapeutic use (intravenous immunoglobulin, IVIg). *Blood*, **93**: 3624-3631.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994): A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241-5248

Wang JM, Deng X, Gong W, Su S (1998): Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J. Immunol. Methods* **220**: 1-17)

Wang SS, Tam JP, Wang BS, Merrifield BR (1981): Enhancement of peptide coupling reactions by 4-dimethylaminopyridine. *Int. J. Peptide Protein Res.* **18**: 459-467

Wang WS, Chen PM, Hsiao HL, Ju SY, Su Y (2003): Overexpression of the thymosin- β 4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cell. *Oncogene* **22**: 3297-3306.

Waterhous DV, Johnson WC (1994): Importance of environment in determining secondary structure in proteins. *Biochemistry* **33**: 2121-8

Wemme H., Pfeifer S., Heck R., Muller-Quernheim J. (1992) Measurement of lymphocyte proliferation: Critical analysis of radioactive and photometric methods. *Immunobiology*, **185**:78-89.

Wen W., Moses M.A., Wiederschain D., Arbiser J.L., Folkman J. (1999) The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res.*, **59**:6052-6056.

Westermarck J., Kahari V.M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.*, **13**:781-792.

Wickstrom S.A., Alitalo K., Keski Oja J. (2004) An endostatin derived peptide interacts with integrins and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **279**:20178-20185.

Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol* 1991;222(2):311-333.

Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York: Wiley; 1986.

Yamada K.M., Miyamoto S. (1995) Integrin transmembrane signalling and cytoskeleton control. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**:681-689.

Yule DI, Williams JA (1992): U73122 inhibits Ca²⁺ oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* **267**: 13830-5

Zarbock J, Oschkinat H., Hannappel E. , Kalbacher H., Voelter W., Holak T. A. (1990) : Solution Conformation of Thymosin β 4: A Nuclear Magnetic Resonance and Simulated Annealing Study. *Biochemistry*, **29**, 7814-7821.

Zhang S, Gelain F, Zhao X. *Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures*. *Semin Cancer Biol.* 2005 Oct;15(5):413-20.

Zhang S. *Emerging biological materials through molecular self-assembly*. *Biotechnol Adv.* 2002 Dec;20(5-6):321-39.

Zoubek RE, Hannappel E (2007): Subcellular distribution of thymosin beta4. *Ann N Y Acad Sci* **1112**: 442-50.

Il fattore di crescita pro-angiogenico FGF-2 è stato impiegato come controllo positivo, mentre il solo PBS, usato come veicolo, è servito da controllo negativo. Le uova riposte in incubatore, sono state esaminate giornalmente fino al 12° giorno e fotografate *in ovo* (direttamente sull'uovo, senza la rimozione dell'impianto) con uno stereomicroscopio dotato di fotocamera, Camera System MC 63 (Zeiss, Oberkochen, Germany), ad ingrandimento 50x.

La quantificazione della risposta angiogenica indotta, è stata valutata contando i vasi sanguigni che dalla CAM sono migrati all'interno dell'impianto e della spugna. La conta è stata effettuata da due diversi esaminatori, in modalità a doppio cieco.

L'analisi statistica dei dati di ciascun campione, media di 20 esperimenti, è stata effettuata con t-test di Student.