

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

Dottorato di Ricerca in
Biologia Avanzata
XVIII Ciclo

**Caratterizzazione biochimica e funzionale del gene *pvf-1*, membro
della famiglia PDGF/VEGF, in *Caenorhabditis elegans***

Autore
Marina Tarsitano

Correlatore
Dott.ssa Maria G. Persico

Coordinatore
Prof.ssa Silvana Filosa

Tutore
Prof.ssa C. Campanella

Anno accademico 2004-2005

INDICE

Sommario	1
Introduzione	
1. Il sistema vascolare ed il sistema nervoso nei Vertebrati	4
1.1 Parallelismo strutturale tra il sistema vascolare ed il sistema nervoso.....	5
1.2 Sviluppo del sistema vascolare mediante meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso.....	7
2. La famiglia dei fattori di crescita PDGF/VEGF	8
2.1 Ruolo dei geni della famiglia VEGF.....	9
2.2 Ruolo dei geni della famiglia PDGF.....	12
2.3 Interazioni tra recettori e ligandi della famiglia PDGF/VEGF.....	13
3. Il nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
3.1 Descrizione generale ed anatomia.....	15
4. Identificazione del gene <i>pvf-1</i> (PDGF/VEGF factor 1)	19
Scopo della tesi	21
Materiali e Metodi	
1.1 Costruzioni dei vettori.....	22
1.2 Produzione e purificazione di anticorpi policlonali contro PVF-1.....	23
1.3 Linee cellulari e condizioni di coltura.....	23
1.4 Produzione e purificazione di PVF-1 in cellule eucariotiche.....	24
1.5 Analisi dei mezzi condizionati mediante <i>Western Blot</i>	24
1.6 Saggi di digestione enzimatica con la N-Glicosidasi F e di legame all'eparina.....	25
1.7 Saggi ELISA.....	25
1.8 Saggio di Immunoprecipitazione.....	27
1.9 Saggio di formazione di cappillari primitivi in cellule HUVEC.....	28

1.10 Saggio sulle membrane corioallantoidee di embrioni di pollo (CAM).....	28
1.11 RT-PCR semiquantitativa.....	28
1.12 Tecniche di coltura e trasformazione di <i>C.elegans</i>	29
1.13 Estrazione di proteine totali da colture di <i>C.elegans</i>	29
1.14 Saggio di Immunofluorescenza.....	30
1.15 Isolamento ed analisi del genotipo di <i>pvf-1(ev763)</i>	30
1.16 Analisi fenotipica della coda del maschio.....	31

Risultati

1. Caratterizzazione biochimica della proteina PVF-1

1.1 PVF-1 è una proteina secreta, glicosilata, dimerica e capace di legarsi all'eparina.....	33
1.2 PVF-1 si lega ai recettori umani VEGFR-1 e VEGFR-2.....	36
1.3 PVF-1 induce l'autofosforilazione del recettore h Flt-1.....	38
1.4 PVF-1 è in grado di stimolare Angiogenesi.....	39

2. Caratterizzazione funzionale della proteina PVF-1 in *C.elegans*

2.1 Analisi dell'espressione del gene <i>pvf-1</i> in <i>C.elegans</i>	41
2.2 Isolamento ed analisi molecolare del mutante di delezione del gene <i>pvf-1</i>	45
2.3 Analisi fenotipica del mutante di delezione di <i>pvf-1</i>	46
2.4 PVF-1 è coinvolto nella localizzazione del primo raggio della coda del maschio.....	49
2.5 Il "pathway" genetico di PVF-1 non coinvolge i recettori VER-3 e VER-4.....	53

Discussione

1.1 PVF-1 è un membro della famiglia VEGF.....	56
1.2 PVF-1 è una proteina coinvolta nel processo di migrazione cellulare neuronale in <i>C.elegans</i>	58

Bibliografia	64
---------------------------	----

SOMMARIO

PVF-1 (PDGF/VEGF Factor-1) è un membro della famiglia PDGF/VEGF in *C.elegans*. I membri di tale famiglia presentano il motivo “PDGF like”, contenente otto residui di cisteina con una caratteristica spaziatura, importante per la formazione di dimeri attivi. Questi ultimi sono fattori angiogenici: inducono angiogenesi *in vivo*, proliferazione e migrazione di cellule endoteliali *in vitro*. L’azione è mediata da recettori ad attività tirosin-chinasica e da recettori chiamati Neuropiline, identificate la prima volta nelle cellule nervose e poi ritrovate anche nelle cellule endoteliali. Questa scoperta è stata la prima evidenza di un coinvolgimento nello sviluppo del sistema vascolare di proteine importanti nello sviluppo del sistema nervoso, in particolare nella guida degli assoni.

Recentemente è stato dimostrato che i membri della famiglia delle Semaforine mediante l’interazione con la famiglia di recettori delle Plessine e delle Neuropiline, sono in grado di regolare la migrazione non solo degli assoni ma anche delle cellule endoteliali.

Lo scopo della tesi è caratterizzare biochimicamente e funzionalmente PVF-1 in *C.elegans* per chiarire i meccanismi molecolari che regolano la funzione dei geni della famiglia PDGF/VEGF coinvolti non solo nello sviluppo del sistema vascolare, ma anche del sistema nervoso ed identificare nuovi geni che possono interagire nello stesso “pathway”.

Nella prima parte del lavoro di tesi è stato dimostrato che PVF-1, prodotta in cellule di mammifero, è una proteina N-glicosilata secreta dalle cellule come dimero. Tale proteina è in grado di legare i recettori umani VEGFR-1 e VEGFR-2 e di indurre la fosforilazione dei residui di tirosina che attivano a loro volta la cascata di trasduzione intracellulare del segnale. Inoltre i risultati ottenuti da due tipi di saggi, il “Capillary-like tube formation” *in vitro* e “Chorioallantoic Membrane Assay” (CAM) *in vivo* dimostrano che PVF-1 induce angiogenesi proprio come gli altri membri della famiglia PDGF/VEGF. PVF-1 quindi è l’unico membro della famiglia PDGF/VEGF in *C.elegans* che conserva le caratteristiche biochimiche e le attività biologiche dei fattori di crescita PDGF/VEGF.

Nella seconda parte del lavoro di tesi si analizza l'espressione e la funzione di *pvf-1* in *C.elegans* con tecniche di biologia molecolare ed approcci di genetica classica avendo isolato un mutante nullo del gene.

Linee di vermi transgenici esprimono in tutte le cellule muscolari striate durante il secondo ed il terzo stadio larvale di sviluppo un gene marcatore la cui espressione è regolata dalla putativa regione regolativa di *pvf-1*. Questo dato di espressione spazio-temporale di *pvf-1* è stato confermato anche da esperimenti di immunofluorescenza usando un anticorpo policlonale prodotto in coniglio che riconosce PVF-1.

In collaborazione con il gruppo di ricerca canadese del Prof. Culotti, è stato isolato da una libreria di mutanti di delezione per PCR con oligo specifici per il gene d'interesse, un putativo mutante nullo di *pvf-1*, chiamato *pvf-1(ev763)*. L'analisi preliminare dei vermi *pvf-1(ev763)* evidenzia la mancanza di un ruolo cruciale del fattore sia durante lo sviluppo embrionale e larvale che nella vita adulta. Infatti i vermi omozigoti nulli sono vitali, fertili e non presentano alterazioni morfologiche evidenti.

Inoltre considerando che il gene è espresso nelle cellule muscolari striate, si è analizzata la capacità di movimento del mutante rispetto al ceppo selvatico N2. Dall'osservazione di questi vermi risulta che il modo di muoversi dei due ceppi non mostra differenze.

Il fatto che *pvf-1*, come è stato dimostrato nella prima parte del lavoro di tesi, è in grado di indurre angiogenesi *in vivo* ed *in vitro* ed è espresso in una precisa finestra temporale di sviluppo del verme in *C.elegans* suggerisce un suo possibile coinvolgimento in processi di migrazione cellulare che avvengono proprio durante lo stadio larvale L2 e L3.

Allo scopo di osservare la migrazione di specifiche cellule nel ceppo mutante del gene d'interesse, *pvf-1(ev763)* è stato incrociato con ceppi di vermi che mostrano alcune classi di motoneuroni, neuroni sensoriali e due cellule somatiche della gonade, chiamate DTC, marcate con proteine fluorescenti. L'osservazione, mediante microscopio ad alta risoluzione ed a fluorescenza, di questi vermi rivela che *pvf-1* non è coinvolto nei processi di migrazione di queste specifiche cellule.

La ricerca di un fenotipo dei vermi omozigoti nulli per *pvf-1* è proseguita incrociando il ceppo *pvf-1(ev763)* questa volta con mutanti di geni la cui funzione è già nota al fine non solo di capire in quale processo biologico è coinvolto *pvf-1*, ma anche di scoprire gli altri geni con cui può interagire.

In *C.elegans* sono stati identificati geni omologhi alle famiglie delle Semaforine e delle Plessine dei vertebrati e per alcuni di essi sono stati anche isolati e caratterizzati i mutanti. In particolare il gene *plx-1* che codifica il recettore Plessina-A è coinvolto nel processo di

migrazione delle cellule di tipo neuronale che costituiscono il primo raggio della coda del maschio. *pvf-1(ev763)* è stato incrociato con due alleli mutanti di *plx-1*, chiamati *plx-1(nc37)* e *plx-1(ev724)*.

L'analisi dei doppi mutanti rivela che l'assenza di PVF-1 determina un aumento di penetranza del fenotipo del primo raggio della coda del maschio rispetto ai singoli mutanti di *plx-1*.

Recentemente è stato anche dimostrato che il gene *unc-73* e *mig-2*, codificanti rispettivamente una proteina coinvolta nell'attivazione dei geni RAC-GTPase, ed una RAC-GTPasica, sono richiesti per la corretta migrazione del primo raggio. I doppi mutanti ottenuti dall'incrocio di *pvf-1(ev763)* con i mutanti di *unc-73* e *mig-2* mostrano anch'essi un aumento del fenotipo rispetto ai singoli mutanti. Ciò conferma che PVF-1 è coinvolto nel processo di migrazione del primo raggio della coda del maschio ed agisce mediante una proteina RAC-GTPasi.

In seguito si è cercato di scoprire il recettore con cui PVF-1 interagisce per attivare questo meccanismo molecolare.

In *C.elegans* sono stati indentificati, per omologia di sequenza ai VEGFRs dei vertebrati, quattro recettori tirosin-chinasici, chiamati *ver-1*, *ver-2*, *ver-3* e *ver-4*. In particolare sono stati isolati i mutanti di *ver-3* e *ver-4* che sono vitali e non mostrano, come *pvf-1(ev763)*, alcuna alterazione morfologica evidente.

I risultati dei doppi mutanti, ottenuti dall'incrocio di ciascun mutante dei recettori con *plx-1* rivelano che solo il gene *ver-4* si comporta come *pvf-1* la cui assenza determina l'aumento del difetto di migrazione del primo raggio, mentre l'assenza di *ver-3* sembra sopprimere tale fenotipo. Ciò suggerisce che PVF-1 potrebbe essere il ligando di VER-4.

Questa ipotesi è stata successivamente smentita dai risultati ottenuti dal triplo mutante dei geni *plx-1*, *ver-4* e *pvf-1*. Quest'ultimo infatti non mostra una penetranza del fenotipo uguale a quella del doppio mutante di *plx-1* e *ver-4* ma maggiore dimostrando che il recettore VER-4 agisce in questo processo con un meccanismo molecolare diverso da quello di PVF-1.

Si può concludere che il processo che determina la migrazione delle cellule che costituiscono il primo raggio della coda del maschio è regolato da più meccanismi molecolari. Quello costituito dal ligando SMP-1 ed il recettore PLX-1 è il principale, come è dimostrato dal fatto che i singoli mutanti di questi geni mostrano il difetto di migrazione del primo raggio della coda del maschio, al contrario dei singoli mutanti di *pvf-1* e *ver-4* che non hanno questo fenotipo.

Infine un altro dato interessante emerso in questo lavoro di tesi è che i meccanismi molecolari di SMP-1 e di PVF-1 utilizzano entrambi per la trasduzione del segnale i geni RAC-GTPasi che sono coinvolti in diversi processi di migrazione e crescita degli assoni.

INTRODUZIONE

1. Il sistema vascolare ed il sistema nervoso nei Vertebrati

L'esecuzione di complesse funzioni da parte di diversi tessuti ed organi dei vertebrati sono supportati e regolati dall'attività di due strutture anatomiche, chiamate vasi sanguigni e nervi (Gray H., 1995). Il sistema vascolare provvede ad assicurare i nutrienti ed a rimuovere i prodotti tossici di rifiuto delle cellule, mentre il sistema nervoso direttamente coordina e controlla le funzioni dei tessuti e degli organi attraverso segnali biochimici ed elettrici. La morfogenesi del sistema nervoso e sanguigno suggerisce che entrambi si sviluppino mediante meccanismi geneticamente programmati. Cinque secoli fa Andrea Vesalio fu il primo ad illustrare un parallelismo strutturale tra vasi e nervi (*fig. 1 A, B*). Oggi ci sono sempre più evidenze che i vasi sanguigni, che si sono generati evolutivamente dopo i nervi, si sviluppano mediante gli stessi meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso.

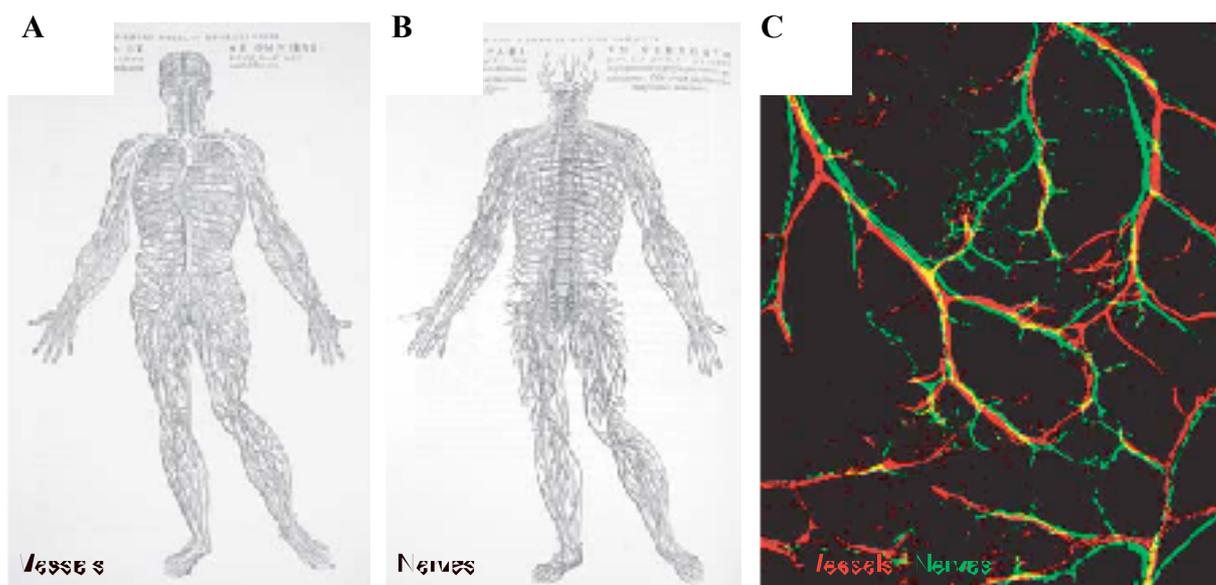


Figura 1 - Parallelismo strutturale tra il sistema vascolare ed il sistema nervoso. (A-B) Rappresentazione della rete vascolare e nervosa eseguita dall'anatomista Andrea Vesalio. (C) I vasi indicati in rosso migrano nella stessa direzione dei nervi indicati in verde. (Figura riportata da Mukouyama Y.S et al.,2002).

1.1 Parallelismo strutturale tra il sistema vascolare ed il sistema nervoso

Il sistema vascolare ed il sistema nervoso periferico sono costituiti da una fitta rete ordinata e ramificata nel primo caso di vasi sanguigni e nel secondo di nervi. In molti casi, entrambi i sistemi non solo sono simili nella loro struttura anatomica, ma seguono anche la stessa traiettoria di migrazione. Frequentemente infatti vasi e nervi si allineano l'uno sull'altro, come è stato osservato durante lo sviluppo della cute (Mukoyama Y.S. et al., 2002) (*fig. 1 C*).

Apparentemente può sembrare che il sistema nervoso ed il sistema vascolare nelle prime fasi si sviluppino diversamente. Infatti, nel caso del sistema nervoso, dai neuroni si diramano gli assoni che migrano per lunghe distanze fino a raggiungere il loro sito bersaglio. La funzione di guida assonale è svolta dal cono di crescita, una struttura sensoriale altamente mobile, che attraverso l'estensione e la retrazione dei filopodi permette all'assone di estendersi e di orientarsi nell'ambiente circostante (Tessier-Lavigne et al., 1996; Huber A.B. et al., 2003) (*fig. 2 A-B*). Una volta che l'assone ha poi finalmente raggiunto il sito bersaglio inizierà ad innervare il tessuto.

Al contrario il sistema vascolare si sviluppa attraverso una precisa gerarchia di movimenti delle cellule endoteliali. Durante le fasi iniziali della vasculogenesi un labirinto primitivo di vasi si forma a partire dalla proliferazione e fusione di cellule endoteliali (*fig. 2 C*). Durante l'angiogenesi, i vasi ramificano attraverso processi di degradazione della membrana basale e migrazione delle cellule endoteliali piuttosto che mediante un processo di estensione cellulare come nel caso degli assoni (*fig. 2 D*). Infine si ha una ulteriore maturazione della rete vascolare che implica fusione e regressione dei vasi sanguigni e cambi nel diametro del lume e/o nello spessore della parete dei vasi (Carmeliet P., 2003).

Le distanze che devono percorrere le cellule endoteliali vascolari sono minori rispetto a quelle dei coni di crescita assonali, ma in ogni caso queste cellule hanno bisogno di una grande capacità di movimento. Un secolo dopo la scoperta dei coni di crescita si è osservato che all'inizio del vaso sanguigno c'è una cellula specializzata chiamata "endothelial tip cell" molto simile ad un cono di crescita assonale (Gerhardt H. et al., 2003) (*fig. 2 E*). Queste cellule vascolari specializzate infatti come i coni di crescita assonali mediante i filopodi esplorano l'ambiente circostante e guidano l'estensione del vaso.

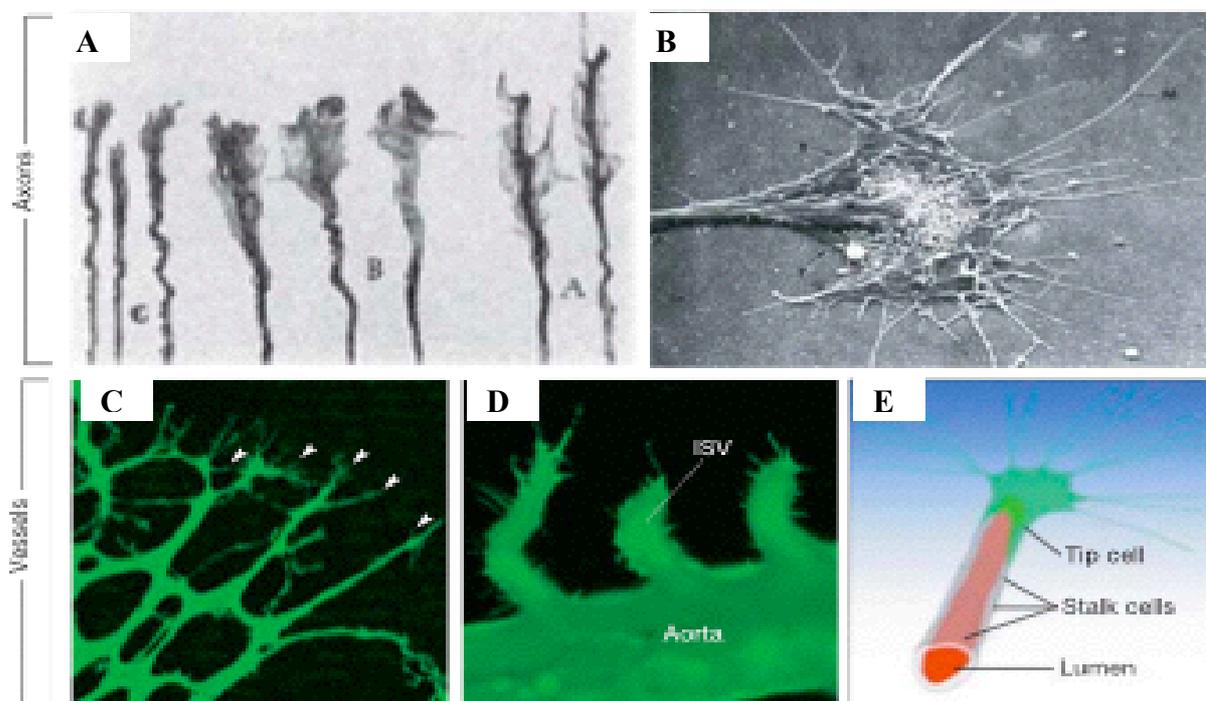


Figura 2 - Sviluppo del sistema nervoso e del sistema vascolare.

(A) Fotografie dei coni di crescita degli assoni contenenti numerosi filopodi. (B) Cono di crescita assonale con i filopodi in estensione. (C) Primitivo labirinto vascolare costituito da vasi di simili dimensioni della retina di un topo neonato. Le frecce indicano come i vasi sanguigni estendono numerosi filopodi. (D) Aorta dorsale di un embrione (22 ore) di Zebrafish da cui si ramificano i vasi intersomitici (ISVs). (E) Schematica rappresentazione di una cellula endoteliale “Tip” e di una cellula “Stalk”. (Figura riportata da Carmeliet P. et Tessier Lavigne M., 2005)

I nervi e i vasi si allineano seguendo una stessa traiettoria di migrazione. Ciò è dovuto in molti casi a segnali prodotti dalle cellule endoteliali vascolari (come artemina e neurotrofina 3) che determinano l’attrazione degli assoni lungo la traiettoria di vasi. Viceversa anche le cellule neuronali possono produrre segnali (come VEGF-A) che guidano i vasi sanguigni (Mukouyama Y.S. et al., 2002).

Il fatto che i vasi sono capaci di guidare i nervi, e viceversa, è sorprendente come la scoperta, avvenuta alla fine degli anni novanta, di fattori e recettori, Neuropiline ed Efrine, coinvolte sia nella migrazione dei vasi che dei nervi (Soker S. et al., 1998; Adams R.H. et al., 1999).

In conclusione se da un lato i due sistemi sembrano originarsi diversamente, le fasi di questi processi sembrano essere controllati dagli stessi meccanismi molecolari (Carmeliet P. et Tessier-Lavigne M., 2005).

1.2 Sviluppo del sistema vascolare mediante meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso

Le cellule endoteliali vascolari e gli assoni migrano attraverso la matrice extracellulare mediante fattori chemiorepulsivi o chemioattrattanti che possono essere legati alla matrice o diffusi. Studi svolti negli anni novanta hanno permesso di indentificare numerose molecole coinvolte nella migrazione degli assoni appartenenti a quattro famiglie: le Netrine, le Semaforine, le Efrine e le “Slits”. Un singolo fattore può attrarre o respingere un assone a seconda del recettore espresso o dell’attività del secondo messaggero per la risposta neuronale. Numerose sono le evidenze che dimostrano che queste famiglie hanno effetti anche sullo sviluppo del sistema vascolare.

In particolare i membri appartenenti alla terza classe della famiglia delle Semaforine sono in grado di riorientare le cellule dell’endotelio in modo che esse costruiscano una rete vascolare fisiologicamente corretta e adatta alle esigenze dei tessuti in accrescimento o in riparazione (fig. 3).

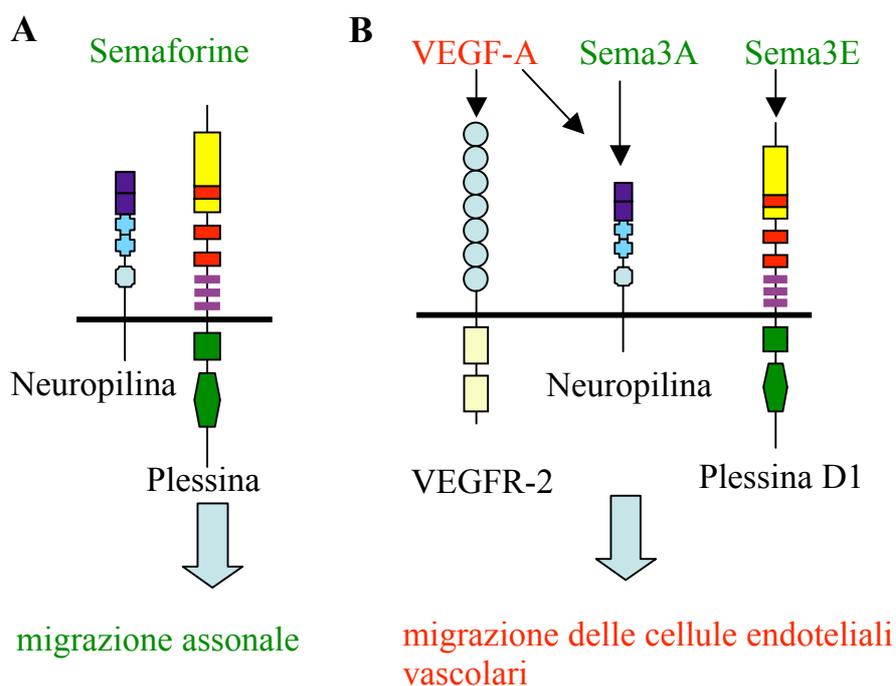


Figura 3 - Rappresentazione schematica dei ruoli svolti dalla famiglia delle Semaforine e dai loro recettori nello sviluppo del sistema nervoso e vascolare. **(A)** La migrazione dei coni di crescita assonale è regolata dall’interazione di Sema 3A con Neuropilina 1 che induce la cascata di trasduzione del segnale attraverso dei corecettori chiamati Plessina. **(B)** La migrazione dei vasi dipende dal legame diretto di Sema 3E al recettore Plessina D1. Inoltre Neuropilina agendo come co-recettore di VEGFR-2 a cui si lega VEGF contribuisce insieme all’interazione con Sema 3A allo sviluppo del sistema vascolare.

Le Semaforine rappresentano una grande famiglia di proteine secrete o legate alla membrana cellulare che interagiscono con due tipi di recettori le Neuropiline e le Plessine.

Le Neuropiline sono glicoproteine transmembrana che legano le semaforine di terza classe e VEGF-A, un membro della famiglia PDGF/VEGF (Fujisawa H et al., 2004).

Le Plessine sono una famiglia di molecole transmembrana con un grande dominio citoplasmatico in grado di attivare le proteine GTPasi (Pasterkamp R.J. et al., 2003).

Recenti studi hanno dimostrato che il sistema costituito da Sema 3A, Sema 3F, Neuropilina e Plessina è coinvolto anche nello sviluppo del sistema vascolare. Infatti le cellule endoteliali vascolari esprimono questi recettori e Sema 3A inibisce la migrazione di queste cellule bloccando l'attività delle integrine (Serini G. et al., 2003). L'assenza di Sema 3A, Plessina D1 in embrioni di topo causano difetti di ramificazione e rimodellamento dei vasi sanguigni (Gitler et al. 2004). In zebrafish, come in topo, l'assenza delle semaforine di terza classe determinano difetti nel sistema vascolare. Infatti è stato dimostrato che le semaforine, espresse dai somiti, agiscono come fattori repulsivi per la crescita dei vasi intersegmentali (Torres-Vazquez J. et al., 2004).

L'assenza delle neuropiline in topo causa difetti nello sviluppo del sistema vascolare ed è stato dimostrato che questi difetti sono dovuti alla perdita del "signaling" di VEGF-A₁₆₅. Infatti un topo che esprime una variante di Neuropilina capace di legare VEGF-A₁₆₅ e non semaforina, non esibisce difetti vascolari (Gu C. et al., 2003).

2. La famiglia dei fattori di crescita PDGF/VEGF

Negli ultimi anni sono stati identificati diversi fattori di crescita appartenenti sia alla famiglia VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sia alla famiglia PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), capaci di indurre angiogenesi in vivo, nonché proliferazione e migrazione di cellule endoteliali in vitro.

I membri della famiglia VEGF sono correlati ai membri della famiglia PDGF in quanto hanno in comune la regione minima trasformante di v-sis, una proteina di SSV (virus del sarcoma di scimmia) corrispondente a PDGF/c-sis (Doolittle et al., 1983). Tale sequenza amminoacidica è nota come motivo "PDGF-like" contenente otto residui di cisteina, la cui spaziatura è perfettamente conservata in tutte le proteine delle famiglie PDGF/VEGF (*Fig. 4*). I residui di cisteina sono importanti per la formazione di ponti disolfurici intracatena ed intercatena

necessari per determinare la corretta struttura e la dimerizzazione delle proteine della famiglia PDGF/VEGF (Potgens et al., 1994).

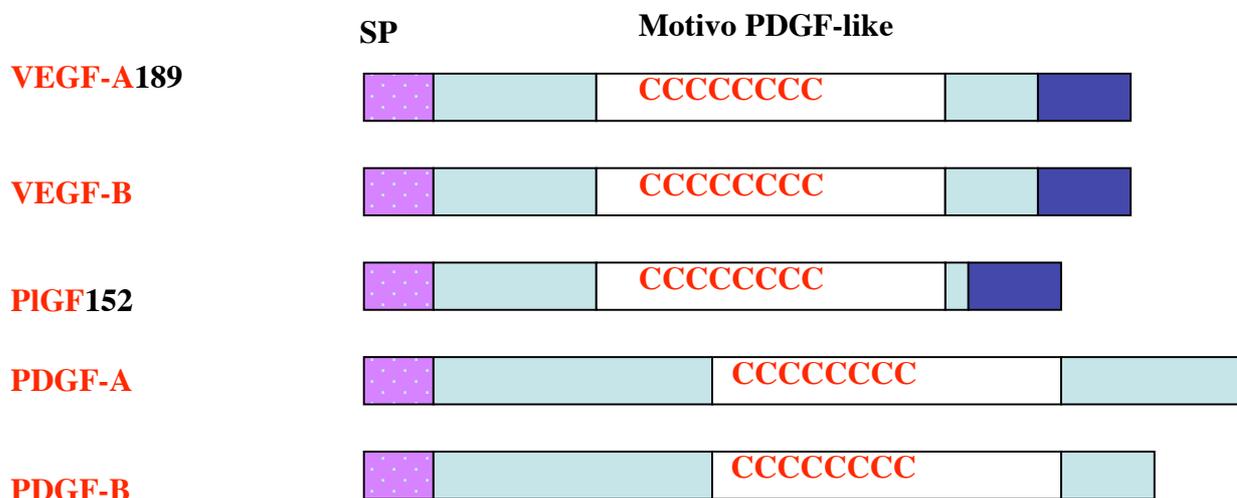


Figura 4 - Rappresentazione schematica di alcune proteine della famiglia PDGF/VEGF. Per VEGF-A e PlGF sono rappresentate le isoforme che derivano da splicing alternativo di un unico trascritto. SP indica il peptide segnale; le “C” in rosso indicano gli otto residui di cisteina del motivo “PDGF-like”; in blu sono indicate le sequenze ricche in residui di cisteina ed arginina in grado di legare l’eparina.

Tutte queste proteine sono secrete in forma glicosilata e come dimeri attivi (Bussolino et al., 1997). Alcuni membri, oltre a formare omodimeri attivi, sono anche in grado di formare eterodimeri attivi come ad esempio PlGF (Placenta Growth Factor) che è in grado di legarsi sia a VEGF-A che a VEGF-B (Di Salvo et al., 1995; Cao et al., 1996) oppure PDGF-A che può legare PDGF-B.

2.1 Ruolo dei geni della famiglia VEGF

I membri della famiglia VEGF fino ad ora identificati sono cinque: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e PlGF.

Il gene umano VEGF-A, che mappa sul cromosoma 6 nella regione p21.3, ha una struttura organizzata in sette esoni di cui il terzo ed il quarto sono gli esoni codificanti il dominio “PDGF-like”. Nell’uomo e nel topo per “splicing” alternativo si formano tre trascritti che codificano diverse isoforme denominate VEGF-A121, VEGF-A165, VEGF-A189, VEGF-A206

dove i pedici indicano il numero degli amminoacidi che compongono la proteina (Tisher et al., 1991). Sia la proteina VEGF-A₁₆₅, la forma maggiormente prodotta, che VEGF-A₁₈₉ contengono una sequenza amminoacidica ricca in residui di cisteina, codificata dall'esone sette, che conferisce loro la capacità di legare eparina.

La proteina VEGF-A₁₂₁ non è in grado di legare eparina.

Alcune citochine, quali TGF- β , come anche l'ipossia possono indurre un aumento dei livelli di mRNA e di proteina secreta nelle cellule epiteliali e nei fibroblasti dovuto sia ad un aumento di trascrizione sia ad un aumento della stabilità del messaggero (Pertovaara et al., 1994; Levy et al., 1996).

Durante lo sviluppo embrionale murino, l'espressione di VEGF-A inizia pochi giorni dopo l'impianto nelle cellule giganti trofoblastiche. Negli stadi successivi dello sviluppo embrionale, VEGF-A è espresso in diversi organi, quali cuore, rene, cervello e polmone (Breier et al., 1992). Nell'adulto, particolari stimoli possono indurre l'espressione di VEGF-A in diversi tipi cellulari quali macrofagi, linfociti, cellule endoteliali e cheratinociti (Ferrara and Davis-Smith, 1997).

Questa proteina è un potente fattore angiogenico indispensabile per lo sviluppo embrionale, infatti topi eterozigoti per l'inattivazione del gene muoiono in utero tra 11 e 12 d.p.c. (days post coitum) (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Questi animali mostrano gravi difetti del sistema vascolare.

Probabilmente quindi la riduzione della quantità della proteina VEGF-A non è compensata da nessun altro membro della famiglia. E' stato inoltre dimostrato in vitro che VEGF-A può indurre: proliferazione e migrazione di cellule endoteliali arteriose, venose e linfatiche (Ferrara and Davis Smith, 1997), permeabilità vascolare (Dvorak et al., 1995), formazione di endoteli fenestrati (Roberts and Palade, 1995) e angiogenesi del corpo luteo (Ferrara et al., 1998).

Recenti studi hanno rivelato che bassi livelli di VEGF-A causano la neurodegenerazione dei motoneuroni. Infatti i topi che hanno una delezione della regione responsabile della risposta all'ipossia nel promotore di VEGF-A mostrano durante lo stadio adulto la degenerazione dei motoneuroni e sviluppano una malattia chiamata Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) (Oosthuysen, B., et al. 2001) (*fig. 5*).

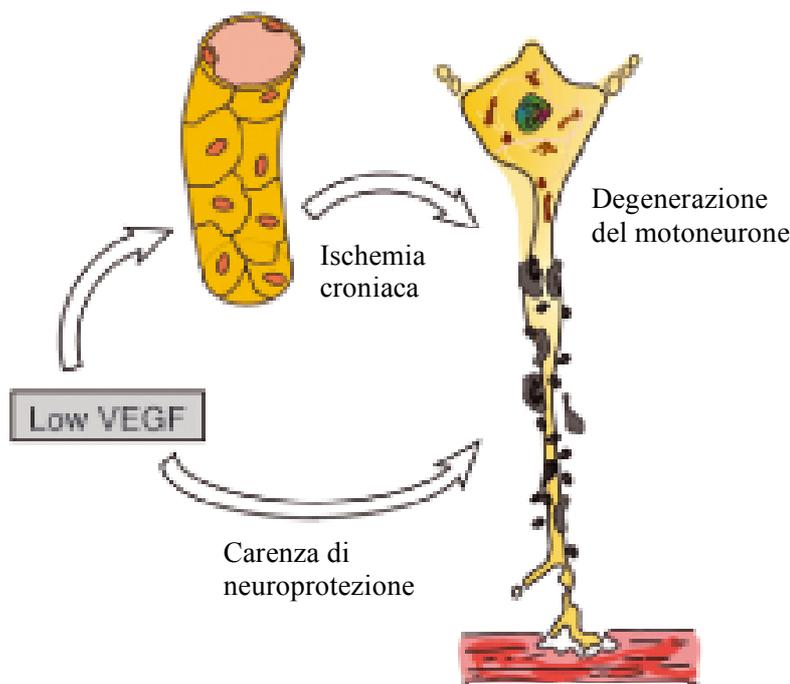


Figura 5 - Bassi livelli di VEGF-A causano la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). I bassi livelli di VEGF-A provocano una ischemia cronica dei motoneuroni ed una riduzione di segnali neuroprotettivi. Ciò porta alla conseguente degenerazione di questi motoneuroni con associata paralisi e morte dell'organismo affetto. (Figura riportata da Oosthuysen, B., et al. 2001)

I bassi livelli di VEGF-A non solo provocano una perdita del tono vascolare a cui segue un debole flusso sanguigno, ma anche una carenza di stimoli neuroprotettivi. Infatti il fatto che VEGF-A è espresso nei neuroni e nelle cellule gliali, ed i recettori neuropilina e VEGFR-2 nei motoneuroni, indica che ci sono tutti i componenti necessari per coordinare un effetto neuroprotettivo di VEGF-A *in vivo*. Inoltre è stato dimostrato *in vitro* che cellule in coltura di motoneuroni sottoposte a stress ossidativi ed a ipossia sopravvivono grazie alla presenza di VEGF-A (Oosthuysen, B., et al. 2001).

VEGF-B ha due isoforme che derivano da “splicing” alternativo del mRNA: VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆. La seconda proteina è in grado di legare eparina, infatti l'estremità carbossi-terminale è simile sia a VEGF-A₁₆₅ che a VEGF-A₁₈₉, mentre la prima non lega l'eparina (Olofsson et al., 1996a, 1996b).

VEGF-B oltre ad indurre angiogenesi *in vivo* e proliferazione di cellule endoteliali *in vitro*, svolge un ruolo importante durante l'embriogenesi, oltre che nello sviluppo del sistema vascolare anche in quello del sistema nervoso e del cuore (Lagercrantz et al., 1996).

VEGF-C sia nell'uomo che nel topo è una proteina di circa 400 amminoacidi, espressa in diversi tessuti come cuore, placenta, ovaio e tiroide, che è successivamente processata per mezzo di tagli proteolitici (Joukov et al., 1996).

La regione carbossi-terminale contiene dei motivi ripetuti tipici di una proteina della seta e probabilmente determina il legame della proteina VEGF-C alla membrana cellulare. Solo il successivo taglio del peptide C-terminale porta alla forma diffusibile ed attiva di VEGF-C (Joukov et al., 1997). VEGF-C induce proliferazione, migrazione delle cellule endoteliali e permeabilità vascolare, anche se a concentrazioni 50 volte superiori rispetto a quelle usate per VEGF-A per avere gli stessi effetti (Joukov et al., 1996). Inoltre in vivo, mediante il saggio di stimolazione dell'angiogenesi sulla membrana corioallantoidea di pollo (CAM), è stato dimostrato che VEGF-C, a differenza degli altri membri della famiglia, è in grado di indurre linfoangiogenesi (Oh et al., 1997).

VEGF-D, nel topo, è una proteina di 358 amminoacidi molto simile alla proteina VEGF-C sia nel dominio "PDGF-like" che all'estremità C-terminale (Orlandini et al., 1996). VEGF-D è presente in alcuni tessuti dell'adulto (cuore ed intestino) e non solo induce proliferazione di cellule endoteliali, ma anche cambiamenti morfologici di fibroblasti (Orlandini et al., 1996).

VEGF-E è una proteina prodotta da un parapoxvirus, Orf virus, che ha attività angiogenica in vivo simile a VEGF-A (Meyer et al., 1999). Infine PlGF nell'uomo è rappresentata da due isoforme PlGF₁₃₁ e PlGF₁₅₂ che differiscono per 21 amminoacidi basici, codificati dall'esone sei, che conferiscono alla forma lunga la capacità di legare eparina (Maglione et al., 1993a).

Nel topo e nel ratto la proteina PlGF è uguale a PlGF₁₅₂ ossia quella in grado di legare eparina (Di Palma et al., 1996). PlGF sia umana che murina è abbondantemente espressa nella placenta (Vuorela et al., 1997), ma anche a livelli più bassi nella tiroide, polmone e muscolo scheletrico (Di Palma et al., 1996). Questa proteina è in grado sia di indurre angiogenesi in vivo sia in vitro provocare, con un effetto paragonabile a quello di VEGF-A, la migrazione delle cellule CVEC (Coronary post-capillary venules), mentre con un'attività più bassa rispetto a VEGF-A, la migrazione delle cellule HUVEC (Human Umbelical Vein), (Ziche et al., 1997).

Infine PlGF è in grado di indurre la produzione dell'attivatore del plasminogeno (Landgren et al., 1998).

2.2 Ruolo dei geni della famiglia PDGF

I fattori di crescita della famiglia PDGF fino ad ora identificati sono tre: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C. Il gene umano *PDGF A* che mappa sul cromosoma 7 è costituito da sette esoni (Bonthron et al., 1987). Nell'uomo per "splicing" alternativo, in corrispondenza dell'esone sei, si originano due differenti trascritti codificanti due proteine PDGF-A che si

differenziano per l'estremità carbossiterminale poiché in un caso termina con 3 amminoacidi codificati da una sequenza a livello dell'esone sette, nell'altro caso termina con 18 amminoacidi basici trascritti dall'esone sei (Rorsman et al., 1987). La forma lunga di PDGF-A è stata ritrovata solo in cellule tumorali, mentre la forma breve nelle cellule endoteliali (Collins et al., 1987).

E' stato dimostrato che l'omodimero PDGF-AA e l'eterodimero PDGF-AB stimolano la mitosi di fibroblasti umani; PDGF-AA con un effetto minore rispetto a PDGF-AB. Quest'ultimo può stimolare la chemiotassi e riorganizzare l'actina dei fibroblasti (Nistèr et al., 1988a).

La proteina PDGF-A sembra essere indispensabile durante lo sviluppo embrionale del topo. Infatti l'analisi del "knockout" indica che questa proteina è importante per lo sviluppo degli oligodendrociti (Fruttiger et al., 1999).

Il gene umano *PDGF-B* produce una proteina attiva processata sia all'N-terminale che al C-terminale. Quest'ultimo ha una sequenza amminoacidica molto simile alla regione C-terminale, caratterizzata da residui basici, della forma lunga della proteina PDGF-A.

La proteina PDGF-B induce in vitro la riorganizzazione dell'actina nei fibroblasti umani (Hammacher et al., 1989) ed anche la proliferazione di diverse linee cellulari come ad esempio le cellule muscolari lisce dell'aorta di ratto (Facchiano et al., 2000). Inoltre è stato dimostrato che PDGF-B è in grado di indurre angiogenesi in vitro regolando la proliferazione di cellule endoteliali aortiche bovine (Battegay et al., 1994). Infine, il gene *PDGF-C* codifica una proteina che ha due domini importanti: un dominio CUB e un dominio contenente il motivo "PDGF-like". Questa proteina è proteoliticamente processata a livello del dominio CUB in vivo ed in vitro.

La proteina PDGF-C induce proliferazione dei fibroblasti quando è espressa ad alti livelli in topi transgenici, inoltre mediante ibridazione in situ si è osservata una preferenziale espressione di PDGF-C nei reni dell'embrione di topo a livello delle cellule mesenchimali del metanefro (Li et al., 2000).

2.3 Interazioni tra recettori e ligandi della famiglia VEGF/PDGF

I fattori di crescita della famiglia VEGF/PDGF possono interagire con dei recettori che sono caratterizzati da una regione extra-cellulare formata da sette o cinque loop "immunoglobulin-like" e da un dominio chinasi intracellulare diviso in due da un inserto

non catalitico. Il legame del fattore di crescita provoca la dimerizzazione dei recettori e la fosforilazione di alcuni residui di tirosina che attivano la cascata di trasduzione del segnale (Barleon et al., 1997).

Le cellule endoteliali inoltre presentano sulla superficie della loro membrana extracellulare i co-recettori chiamati Neuropiline (Midgal et al., 1998).. Infatti è stata dimostrata la capacità di VEGF-A, VEGF-B e PlGF₁₅₂ di legarsi a questi recettori. Quando Neuropilina 1 viene coespressa con il VEGFR-2 aumenta il suo legame con VEGF-A₁₆₅ e la chemiotassi mediata proprio da questo fattore (Soker S. et al., 1998).

Per chiarire il diverso ruolo dei recettori durante lo sviluppo vascolare embrionale sono stati prodotti ed analizzati topi transgenici in cui i geni codificanti tali recettori sono stati inattivati. L'analisi del "knockout" in topo dei recettori della famiglia PDGF/VEGF indica che tutti i recettori sono indispensabili durante lo sviluppo embrionale. Dall'analisi invece dei "knockout" dei fattori di crescita PDGF/VEGF risulta che solo VEGF-A e PDGF-A sono necessari per il normale sviluppo dell'embrione.

3. Il nematode *Caenorhabditis elegans*

Il nematode *C.elegans*, tra i metazoi, è l'organismo modello più idoneo per identificare e studiare la funzione di geni che presentano una significativa percentuale di identità e similarità con i geni di Mammifero (Ahringer, 1997). Ciò è dovuto a diversi motivi:

- 1) la facilità di studio poiché è un organismo di dimensioni ridotte, con un corpo trasparente e semplice da conservare anche congelato;
- 2) la disponibilità di avere molti dati riguardanti l'anatomia, lo sviluppo e la funzione delle singole cellule di questo organismo;
- 3) la disponibilità di servirsi della sequenza completa del suo genoma in una forma facilmente accessibile (banche dati pubbliche). Sono inoltre disponibili cloni genomici ordinati su di una mappa fisica del genoma e cloni di cDNA parzialmente sequenziati (EST, Expression Sequence Tag) che rappresentano più del 60% dei geni sequenziati;
- 4) la possibilità di poter usare approcci sia di genetica classica, che permette di scoprire altri componenti che agiscono nel medesimo "pathway" di un gene d'interesse, sia di genetica inversa, che rende possibile lo studio della funzione di un gene, conoscendone la sequenza e la struttura. Per esempio la generazione di mutanti nulli transienti attraverso interferenza con RNA a doppio filamento (Fire A. et al., 1998);
- 5) la possibilità di poter adoperare approcci di genetica molecolare (trasformazione, plasmidi reporters, promotori cellula e stadio specifici);
- 6) la possibilità di determinare e studiare in vivo, mediante la costruzione di ceppi transgenici appropriati, la funzione di regioni proteiche discrete e di singoli residui amminoacidici per mezzo di modificazioni della proteina (mutazioni generate in vitro).

3.1 Descrizione generale ed anatomia

C.elegans appartiene al phylum dei Nematodi ed è un piccolo verme di circa 1millimetro di lunghezza che conduce vita libera negli strati superficiali del terreno. Principalmente si nutre di batteri e si riproduce con un ciclo vitale di circa tre giorni in condizioni ottimali (*fig. 6*).

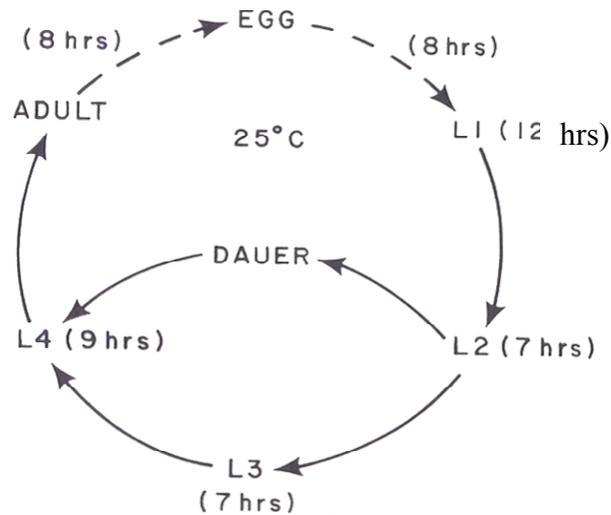


Figura 6 - Rappresentazione schematica del ciclo vitale di un verme. Lo schema mostra il tempo di sviluppo per ciascun stadio larvale. (Figura riportata da Sulston J., 1980)

Gli individui dei due sessi, ermafrodite e maschio, differiscono nell'aspetto esterno. Inoltre l'ermafrodita è in grado di produrre sia oociti che spermatozoi e può riprodursi per autofecondazione. Il maschio nasce spontaneamente con bassa frequenza, infatti deriva da eventi di non disgiunzione del cromosoma X durante la meiosi che avvengono con una frequenza dello 0,7%, e può fertilizzare l'ermafrodita (Wood W.B., 1983) (fig. 7).

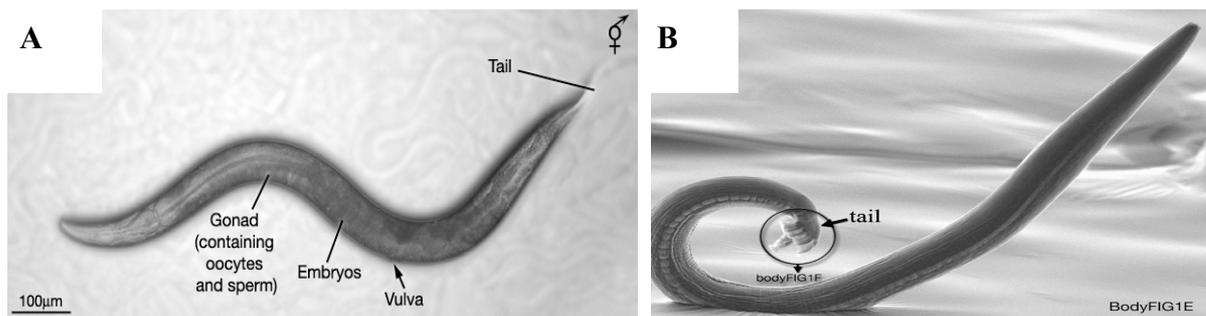


Figura 7 -. Fotografie due vermi: un ermafrodite (A) ed (B) un maschio adulto. La coda dell'ermafrodite non mostra all'estremità terminale nessuna struttura particolare. Il maschio diversamente ha una coda che termina con una struttura cuticolare chiamata fano contenente nove raggi a simmetria bilaterale. (Figura riportata da Wood W.B., 1983).

C.elegans è un organismo semplice sia da un punto di vista anatomico che genetico. Il suo genoma è all'incirca venti volte le dimensioni del genoma di *E.Coli* e circa 1/30 del genoma umano. Gli ermafroditi sono diploidi per i cinque autosomi e per il cromosoma X (XX),

mentre i maschi sono diploidi per quanto riguarda gli autosomi, ma hanno un solo cromosoma X (X0). Recentemente il genoma nucleare di *C.elegans* è stato completamente sequenziato ed è composto da circa 10^8 coppie di basi (Coupon et al., 1991) che codificano poco più di 19000 proteine (The *C.elegans* Sequencing Consortium, 1998). Il corpo trasparente di questi animali permette di seguire lo sviluppo e di poter determinare la discendenza delle differenti linee cellulari. L'embriogenesi può essere divisa in due fasi: una di proliferazione cellulare ed una di morfogenesi.

Durante la fase proliferativa i movimenti e alcune morti cellulari procedono secondo un preciso schema temporale e spaziale che dà origine ad un numero fisso di cellule il cui destino è rigidamente determinato (Sulston, 1983).

L'embriogenesi porta alla formazione della larva del primo stadio, L1, formata da 558 cellule e che fuoriesce dall'uovo circa 14 ore dopo la fecondazione. Nelle successive 50 ore si susseguono altri tre stadi larvali, L2, L3, L4, in cui avvengono ulteriori divisioni e movimenti cellulari che portano allo sviluppo dell'adulto sessualmente maturo (fig. 8).

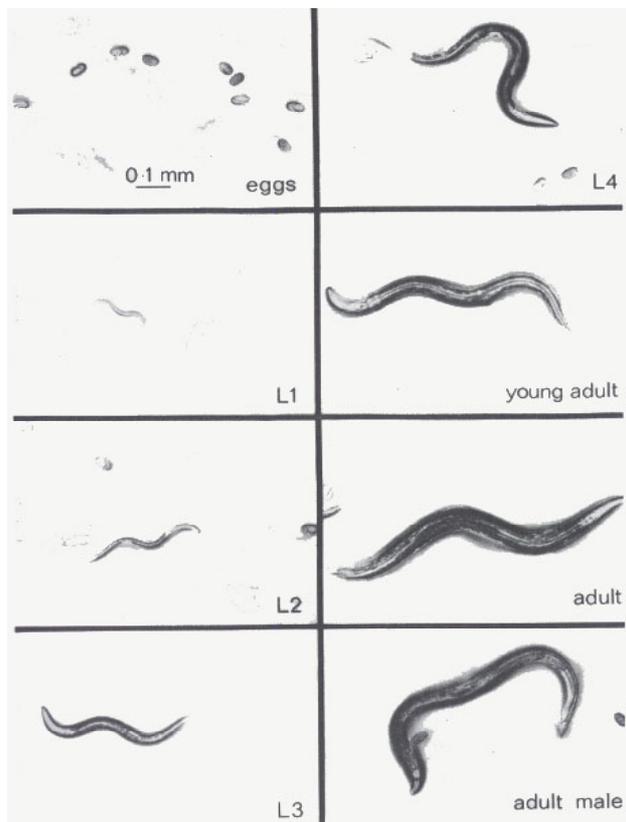


Figura 8 -. Fotografie di uova, larve ed adulti di *C.elegans*. Sono tutti ermafroditi escluso il verme in basso a destra che è un maschio adulto. (Figura riportata da Sulston J., 1980).

I quattro stadi larvali sono separati da mute: una nuova cuticola è sintetizzata sotto la vecchia, la quale si scolla così dall'ipoderma e viene persa. Sia l'ermafrodite che il maschio vivono per

circa 17 giorni dopo aver raggiunto l'età adulta (Bazzicalupo, 1983). Questo ciclo vitale avviene in condizioni ottimali di crescita. Se queste condizioni non si verificano, cioè in assenza di cibo e in sovraffollamento, i vermi, una volta raggiunto lo stadio larvale L2, non procedono al successivo L3, ma si trasformano in una forma resistente chiamata larva dauer .

C. elegans è costituito partendo dall'esterno da: cuticola, ipoderma, neuroni e muscoli che circondano uno spazio pseudocelomatico contenente l'intestino.

Le cellule muscolari striate sono posizionate obliquamente rispetto alla parete del corpo e sono disposte in quattro fasci che percorrono la lunghezza dell'animale, due dorsalmente e due ventralmente.

La maggior parte delle cellule nervose è localizzata intorno alla faringe, lungo la linea ventrale e nella coda. I processi di questi neuroni formano un anello che circonda la faringe (anello nervoso) o costituiscono dei fasci che corrono dorsalmente e ventralmente per tutta la lunghezza del corpo dell'animale.

C.elegans si nutre attraverso una faringe bilobata, che pompa cibo nell'intestino, macinandolo durante il passaggio attraverso il secondo lobo. Alla faringe segue l'intestino costituito da un anello anteriore di quattro cellule, seguito da due file di otto cellule ciascuna.

Il sistema escretore è semplice, formato da un paio di canali escretori, collegati con l'esterno attraverso il poro escretore.

La forma del verme è mantenuta dalla pressione idrostatica interna, controllata probabilmente dal sistema escretore che è responsabile della osmoregolazione.

L'apparato di riproduzione dell'ermafrodita è formato da una gonade divisa in due bracci che si estendono uno anteriormente e l'altro posteriormente e che sono ancorati a metà dell'animale dal lato ventrale, in corrispondenza della vulva. Ogni braccio ha una forma ad U e comprende un ovario con un ovidotto unico, che si apre in una spermateca e poi nell'utero. A sua volta l'utero si apre all'esterno tramite la vulva che è situata in posizione ventrale mediana.

La gonade del maschio è formata da un unico braccio a forma di U che si estende prima anteriormente, poi si piega posteriormente e si apre nella cloaca in prossimità della coda. Quest'ultima è l'organo copulatore del maschio: ha una forma a ventaglio, formato da ispessimenti chiamati raggi e da due appendici, le spicole che sono usate durante la copulazione.

4. Identificazione del gene *pvf-1* (PDGF/VEGF factor 1)

Grazie all'enorme quantità di informazioni contenute nelle diverse banche dati dell'istituto "Sanger Centre" si è iniziata la ricerca per via informatica con lo scopo di identificare geni simili a quelli della famiglia VEGF/PDGF dei vertebrati, prendendo in considerazione solo le percentuali di identità e similarità che vengono individuate sulla base di allineamenti tra regioni proteiche. Per mezzo del programma di ricerca di allineamenti significativi (BLAST) si è identificato un clone di cDNA (yk305g9) che codifica una proteina di 297 residui amminoacidici. Questa proteina mostra il 33% di identità ed il 46% di similarità con VEGF-C di topo, il 24% di identità ed il 40% di similarità con VEGF-B di topo, il 27% di identità ed il 47% di similarità con PDGF-B di *Xenopus*. Questi valori di identità e di similarità sono da considerarsi significativi tenendo presente soprattutto la distanza evolutiva che c'è tra i Mammiferi e i Nematodi.

Dai confronti delle sequenze proteiche della proteina in questione e i vari membri della famiglia VEGF/PDGF risulta che PVF-1 conserva il motivo "PDGF-like" costituito da otto cisteine con una caratteristica spaziatura (*fig. 9*).

Il fatto che si è individuato un unico clone di cDNA, suggerisce che probabilmente il gene *pvf-1* di *C.elegans* sia il solo rappresentante della famiglia VEGF/PDGF.

PVF-1

PVF-1	I S D D E M D G Y T L F H L Q S M K D I K Q G N - D T C N L Q S V C V P I P Q L
dPVF-1	G E M P S - S K E N F K R S I M K S T V R N A T P A S C S P Q P T I V E L K P P
mPDGF-A	I N H V P - E K R P V - P I R R K R S I E E A V P A V C K T R T V I Y E I P R S
hPDGF-A	T K H V P - E K R P L - P I R R K R S I E E A V P A V C K T R T V I Y E I P R S
mVEGF-A	Q A A P T T E G E Q - K S H E V I K F M D V Y Q R S Y C R P I E T L V D I - - F
hVEGF-A	- A P M A E G G G Q - N H H E V V K F M D V Y Q R S Y C H P I E T L V D I - - F
mPIGF	- - - - A G N N S - T E V E V V P F N E V W G R S Y C R P M E K L V Y I - - L
hPIGF-2	W A - L S A G N G S - S E V E V V P F Q E V W G R S Y C R A L E R L V D V - - V
PVF-1	S D D P Q V - - - L M Y P K C Y E V K Q C V G S C C N S V E T - C H P G T I N L
dPVF-1	A E D E A N Y Y Y M - - P A C T R I S R C N G - C C G S T L I S C Q P T E V E Q
mPDGF-A	Q V D P T S A N F L I W P P C V E V K R C T G - C C N T S S V K C Q P S R V H H
hPDGF-A	Q V D P T S A N F L I W P P C V E V K R C T G - C C N T S S V K C Q P S R V H H
mVEGF-A	Q E Y P D E I E Y I F K P S C V P L M R C A G - C C N D E A L E C V P T S E S N
hVEGF-A	Q E Y P D E I E Y I F K P S C V P L M R C G G - C C N D E G L E C V P T E E S N
mPIGF	D E Y P D E V S H I F S P S C V L L S R C S G - C C G D E G L H C V P I K T A N
hPIGF-2	S E Y P S E V E H M F S P S C V S L L R C T G - C C G D E N L H C V P V E T A N
PVF-1	V K K H V A E L L Y I G N G R F M F N M T K E I T M E E H T S C S C F D C G
dPVF-1	V Q L R V R K V D R A A T S G R R - - P F T I I T V E Q H T Q C R C D C R T
mPDGF-A	R S V K V A K V E Y V R K K P K L - - K E V Q V R L E E H L E C A C A T S N L
hPDGF-A	R S V K V A K V E Y V R K K P K L - - K E V Q V R L E E H L E C A C A T T S L
mVEGF-A	I T M Q I M R I K - P H Q S Q H I - - - - G E M S F L Q H S R C E C R P K K D
hVEGF-A	I T M Q I M R I K - P H Q G Q H I - - - - G E M S F L Q H N K C E C R P K K D
mPIGF	I T M Q I L K I P - P N R D P H F Y - - - - V E M T F S Q D V L C E C R P I L
hPIGF-2	V T M Q L L K I R - S G D R P S - Y - - - - V E L T F S Q H V R C E C R P L R

Figura 9 - Allineamento della sequenza amminoacidica di PVF-1 con le sequenze di alcuni membri della famiglia PDGF/VEGF. Con i rettangoli rossi sono indicati i residui di cisteina che costituiscono il motivo “PDGF-like”.

Scopo della tesi

Il lavoro sperimentale di tesi riguarda la caratterizzazione biochimica e funzionale di *pvf-1* (PDGF/VEGF factor 1) nel nematode *C.elegans*, un gene omologo ai membri della famiglia PDGF/VEGF dei vertebrati.

L'analisi biochimica della proteina consente di verificare se PVF-1 è effettivamente un membro della famiglia PDGF/VEGF. Come tale deve conservare determinate caratteristiche come: la secrezione, la glicosilazione, la dimerizzazione e la capacità di legare recettori di tipo tirosin-chinasico. Mediante saggi *in vitro* ed *in vivo* è possibile determinare anche se questa proteina conserva le stesse funzioni dei membri PDGF/VEGF dei vertebrati, come ad esempio la capacità di indurre angiogenesi.

Lo studio delle funzioni e dei meccanismi molecolari di questo gene mediante approcci di genetica classica, in un organismo, come *C.elegans* che non ha un sistema vascolare, può rappresentare un punto di partenza per scoprire se i membri della famiglia PDGF/VEGF possono regolare anche lo sviluppo del sistema nervoso nei vertebrati. Se da un lato infatti ci sono numerose evidenze che dimostrano come i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso regolano anche lo sviluppo del sistema vascolare, dall'altro non è chiaro se i fattori di crescita della famiglia PDGF/VEGF partecipano ed in che modo allo sviluppo del sistema nervoso.

MATERIALI E METODI

Per le tecniche generali di biologia molecolare e le soluzioni adoperate di cui non sono indicate le composizioni, sono state seguite le procedure descritte nel manuale di laboratorio “Molecular Cloning” (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.)

1.1 Costruzione dei vettori

Il plasmide yk305g9 contenente il cDNA di *pvf-1* è stato ottenuto dal Dott. Y. Kohara (National Institute of Genetics, Japan). Il cDNA è stato amplificato mediante la reazione di polimerizzazione a catena (PCR) con una coppia di oligonucleotidi sintetici disegnata opportunamente per permettere l’amplificazione ed il clonaggio in diversi vettori: pGEX-5X-1 (Pharmacia) e pET-22b(+) (Novagen) per la produzione della proteina in *E.Coli*, pcDNA3-His-Tag (Invitrogen) per la produzione di PVF-1 in cellule eucariotiche.

Per l’analisi dell’espressione del gene *pvf-1* in *C.elegans*, la regione genomica di circa 1800 coppie di basi a monte del primo esone contenente l’ATG è stata amplificata mediante PCR con oligonucleotidi specifici e clonata a monte di geni marcatori presenti in diversi vettori ottenuti dal Dott. A. Fire (Carnegie Institute, Baltimore, USA): il plasmide pPD95.75 contenente la sequenza codificante la GFP (Green Fluorescent Protein), il plasmide pPD21.28 contenente la sequenza codificante Lac-Z ed il plasmide pPD133.82 contenente la sequenza codificante la CFP (Cyan Fluorescent Protein).

Per ottenere il ceppo transgenico di *C.elegans* che esprime alti livelli di *pvf-1* è stato clonato nel vettore pPD95.75 tutto il gene incluso la sua putativa regione regolatrice, amplificato dal DNA genomico estratto dal verme mediante PCR con oligonucleotidi opportunamente scelti.

1.2 Produzione e purificazione di anticorpi policlonali contro PVF-1

Il plasmide pET-PVF-1 è stato usato per trasformare il ceppo di *E.Coli* (BL21DE3) (Stratagene). I batteri sono stati cresciuti a 37°C fino a circa 0,7 O.D. L'induzione della trascrizione del gene di interesse è stata ottenuta con IPTG alla concentrazione finale di 1mM per 3 h a 37°C. I batteri sono stati raccolti mediante centrifugazione ed il pellet è stato risospeso in una soluzione contenente: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7. Il campione è stato congelato una notte a -20°C e poi scongelato e sottoposto a centrifugazione 30' a 4°C a 12000 rpm. Il pellet dei corpi di inclusione è stato risospeso in una soluzione di 0,1% Triton X-100 ed incubato a 37°C per 10'. Dopo centrifugazione il pellet è stato risospeso in una soluzione contenente: 7M Urea, 25 mM Tris-HCl pH 6,8. Dopo aver centrifugato il campione per 30 minuti a 4°C, il pellet è stato risospeso in 0,1M Tris-HCl e 5mM EDTA e dializzato in una soluzione di PBS.

Un milligrammo di proteina ricombinante è stato usato per immunizzare due conigli. Gli anticorpi policlonali contro PVF-1 presenti nel siero sono stati purificati per affinità. Un milligrammo di proteina ricombinante prodotta in batteri trasformati con il vettore pGEX-PVF-1 è stato caricato su un gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE) e dopo corsa elettroforetica è stato trasferito mediante elettroforesi su membrana di PVDF (Immobilon-P, Millipore). Il filtro è stato incubato 1 h in una soluzione di 3% BSA in PBS e successivamente una notte a 4°C con 1ml di siero contenente anticorpi contro PVF-1. Dopo diversi lavaggi con PBS, gli anticorpi sono stati eluiti con 0,5 ml di 150mM glicina pH 2,8 ed immediatamente neutralizzati con 50 µl di 1M Tris-HCl pH 8,8. Gli anticorpi sono stati quantizzati, divisi in aliquote e conservati a -20°C.

1.3 Linee cellulari e condizioni di coltura

Le cellule 293-HEK (cellule renali embrionali umane) (Invitrogen) sono state coltivate in DMEM (GIBCO BRL) in presenza di 10% FCS (Fetal Calf Serum, GIBCO BRL), 2 mM glutammina ed antibiotici.

Le cellule HUVEC (Cambrex) sono state coltivate in EBM-2 (Cambrex) in presenza di fattori di crescita delle cellule endoteliali (EGM-2 bullet kit, Cambrex).

1.4 Produzione e purificazione di PVF-1 in cellule eucariotiche

Per la produzione e la purificazione di PVF-1 prodotta in cellule eucariotiche sono state utilizzate le cellule 293-HEK trasfettate stabilmente, mediante la tecnica di precipitazione con calcio fosfato, sia con il vettore di espressione pcDNA3- His-tag contenente il cDNA di *pvf-1* che con il vettore privo di inserto, come controllo negativo. Il vettore di espressione fornisce la resistenza alla geneticina e le cellule sono state mantenute in selezione con una concentrazione di 200µg/ml di tale antibiotico. Mediante *Western Blot* e saggi ELISA di tipo quantitativo è stata selezionata una linea che produce stabilmente alti livelli di PVF-1 (300ng/ml), chiamata 293-PVF-1.

La proteina ricombinante PVF-1-His-tag è stata purificata per cromatografia di affinità. Il mezzo condizionato della linea cellulare 293-PVF-1 è stato dializzato in 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl e 10 mM imidazolo e successivamente è stato passato su una colonna di Nickel. Dopo diversi lavaggi della colonna con 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl e 20 mM imidazolo, la proteina è stata eluita con una soluzione contenente 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl e 300 mM imidazolo.

1.5 Analisi dei mezzi condizionati mediante Western Blot

Le aliquote dei mezzi condizionati delle cellule 293 trasfettate stabilmente sono state precipitate a -20°C una notte con due volumi di acetone freddo e successivamente centrifugate a 4°C per 30 minuti a 12.000 rpm. I pellet sono stati risospesi in “Laemli buffer” e sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE) al 12% sia in condizioni riducenti, ovvero in presenza di 2-mercaptoetanololo, che non riducenti. Dopo la corsa le proteine sono state trasferite mediante elettroforesi su membrana di PVDF. I filtri di PVDF sono stati incubati per 1 h in una soluzione contenente 5% latte e 0,1% Tween 20 in PBS e successivamente è stato aggiunto l’anticorpo policlonale contro PVF-1 ad una concentrazione di 300 ng/ml per 1 h. Dopo diversi lavaggi in 0,1% Tween 20 in PBS, i filtri sono stati incubati per 1 h con l’anticorpo secondario, prodotto in capra che riconosce le IgG di coniglio coniugato con la perossidasi (Santa Cruz) diluito 1:10.000. Dopo diversi lavaggi in 0,1% Tween 20 in PBS, le proteine sono state rivelate usando come substrato della perossidasi un prodotto chemiluminescente (ECL, Amersham) secondo le modalità riportate dalla casa produttrice. Tutte le reazioni ed i lavaggi descritti sono stati eseguiti a temperatura ambiente.

1.6 Saggi di digestione enzimatica con la N-Glicosidasi F e di legame all'eparina

Il mezzo condizionato delle cellule 293-PVF-1 è stato incubato con l'enzima N-glicosidasi F (glycopeptide N-glycosidase; glycopeptide glycanohydrolase, EC3.2.2.18, Boehringer Mannheim) per una notte a 37°C. Successivamente le proteine sono state precipitate ed analizzate mediante *Western Blot* come sopra descritto.

Per il saggio di legame all'eparina il mezzo condizionato delle cellule 293-PVF-1 è stato caricato su una colonna (BIORAD) impaccata con 100 µl di resina eparina-sefariosio (Pharmacia). Dopo diversi lavaggi con PBS, le proteine sono state eluite con una scala di concentrazioni crescenti di sale di NaCl da 0,15 a 1M. La presenza di PVF-1 nelle diverse frazioni di eluizione è stata determinata mediante analisi di *Western Blot* come sopra descritto.

1.7 Saggi ELISA

Per determinare la capacità di PVF-1 di legarsi ai recettori umani VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2 (KDR) e PDGFRβ è stato eseguito un saggio ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Una piastra per microtitolazione è stata adsorbita con 100 µl/pozzetto di una soluzione contenente PBS pH 7,5 e le diverse forme solubili dei recettori alle concentrazioni di 0,1 µg/ml di hFlt-1/Fc chimera e hKDR/Fc chimera (R&D systems) o 0,5 µg/ml di hPDGFRβ (gentilmente avuto dal Dott. Heldin C., Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden). Il processo di adsorbimento procede per 12 h a temperatura ambiente.

Successivamente, i pozzetti sono stati lavati 3 volte (utilizzando un *washer* automatico) con una soluzione di PBS1x-Tween 20 0.004% (PBS-T). Quindi sono stati incubati con 180 µl/pozzetto di una soluzione di PBS1x, BSA 1% (*blocking*) per 2h a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione con PBS1x, BSA 1% , i pozzetti sono stati lavati 3 volte con PBS-T e quindi si è proceduto con l'incubazione della proteina PVF-1. A questo scopo sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di una soluzione di PVF-1 a diverse concentrazioni da 3 a 100 ng/ml in PBS1x, BSA 0.1%, EDTA 5mM, Tween 20 0.004% (PBE-T), l'incubazione procede per 1h a 37°C ed 1h a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi dei pozzetti con PBS-T sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di una soluzione 250 ng/ml di anticorpo policlonale contro PVF-1 in PBE-T. L'incubazione con l'anticorpo primario è stata eseguita per 1h a 37°C ed 1h a

temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con PBS-T, sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di una soluzione di un anticorpo secondario specifico per le IgG di coniglio coniugato con una perossidasi di rafano (GAR IgG HRP, DAKO) diluito 1:10.000 in PBE-T. L'incubazione procede per 1h a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione con l'anticorpo secondario, i pozzetti sono stati lavati per 3 volte con PBS-T ed è stata quindi eseguita la reazione di rivelazione. A questo scopo, sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di una soluzione del substrato cromogeno O-fenilen-diammina dicloruro (OPD) 1 mg/ml in tampone citrato 50 mM pH 5 contenente lo 0.006% di H₂O₂. L'incubazione è stata eseguita per 40 min. a temperatura ambiente al buio. Quindi la reazione è stata bloccata aggiungendo 30 µl/pozzetto di H₂SO₄ 4N ed è stata misurata la densità ottica (OD) a 490 nm mediante uno spettrofotometro con alloggiamento per piastre per microtitolazioni da 96 pozzetti (Benchmark, BioRad). I risultati sono stati poi elaborati per ottenere il valore medio dei duplicati e sottrarre i valori dei bianchi.

Il saggio ELISA di competizione è stato eseguito in condizioni analoghe al saggio di legame di PVF-1 ai recettori. Anche in questa tipologia di saggio sono stati messi in adsorbimento 100 µl/pozzetto di una soluzione di hFlt-1 alla concentrazione di 0,1 µg/mL in PBS1 in una piastra per microtitolazioni. Il processo di adsorbimento del recettore alla piastra è durato 12h a temperatura ambiente; successivamente, la piastra è stata lavata 3 volte con PBS-T e quindi incubata (2 h a temperatura ambiente) con 180 µl/pozzetto di PBS-BSA 1%. I pozzetti sono stati lavati 3 volte con PBS-T e sono stati incubati (1 h a 37°C ed 1 h a temperatura ambiente) con la proteina umana VEGF-A₁₆₅ (R&D systems) alla concentrazione di 2ng/ml insieme con la proteina PVF-1 alle diverse concentrazioni da 12,5 ng/ml a 250 ng/ml diluiti in PBE-T. Dopo i lavaggi come descritto sopra, i pozzetti sono stati incubati (1 h a 37°C ed 1 h a temperatura ambiente) con un anticorpo contro la proteina umana VEGF-A₁₆₅ coniugato con la biotina (R&D systems) alla concentrazione di 300 ng/ml in PBE-T e poi per 1 h con l'ABC (ABCComplex, Vectastain), ovvero un complesso di avidina e biotina coniugata alla perossidasi. Infine la rivelazione è stata eseguita seguendo la stessa procedura del saggio ELISA per testare il legame di PVF-1 ai recettori. I valori così ottenuti sono stati rapportati al valore di OD in assenza di competitore (PVF-1); quindi il risultato del saggio è stato riportato come rapporto tra il valore di OD a 490nm misurato in presenza di PVF-1 ed il valore di OD a 490 nm misurato in assenza di PVF-1 per 100.

Per la determinazione quantitativa di PVF-1 nel mezzo condizionato di cellule 293-PVF-1, anticorpi policlonali contro PVF-1, diluiti 4 µg/ml in PBS pH 7,5, sono stati adsorbiti su una piastra per microtitolazione (100 µl per pozzetto, una notte a 4°C). La proteina ricombinante

PVF-1 prodotta in batterio, alle diverse concentrazioni da 25 a 500 ng/ml, ed i mezzi condizionati delle cellule 293-PVF-1 diluiti in PBE-T sono stati aggiunti ai pozzetti. Per i successivi passaggi di lavaggio, incubazione e rivelazione è stata eseguita la stessa procedura del saggio ELISA per testare il legame di PVF-1 ai recettori. La concentrazione di PVF-1 è stata determinata per interpolazione di una curva standard usando un'analisi di regressione lineare. Tutti i saggi ELISA riportati sono stati eseguiti in duplicato.

1.8 Saggio di Immunoprecipitazione

Le cellule 293-hFlt-1 sono state lasciate una notte in mezzo condizionato DMEM senza siero.

Il mezzo condizionato è stato rimosso e per inibire l'attività delle fosfatasi endogene le cellule sono state trattate per 5 minuti con 100 μ M Na₃VO₄. Successivamente sono state incubate per 10 minuti a 37°C sia con il mezzo condizionato delle cellule 293-PVF-1 (contenente 150 ng/ml o 300 ng/ml di PVF-1) che con il mezzo condizionato delle cellule 293-pcDNA3 (non diluito o diluito 1:1), come controllo negativo. Dopo stimolazione, le cellule sono state trattate con 100 μ M Na₃VO₄ preraffreddato e poi lisate in una soluzione contenente 20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X 100, 10 % Glicerolo, 10 mM Zinc-acetato, 100 mM Na₃VO₄ ed un "cocktail" di inibitori di proteasi (Roche) per 1 h a 4°C. I campioni sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 15 minuti ed i sopranatanti sono stati raccolti e conservati a -80°C. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford (Biorad reagent). Per immunoprecipitare il recettore hFlt-1, 5 μ g/ml di anticorpo policlonale, prodotto in capra contro hFlt-1 (R&D systems), preincubato una notte a 4°C con proteina G-sefariosio, è stato aggiunto ad 1mg di estratto proteico ed incubato una notte a 4°C. Successivamente la resina è stata recuperata mediante centrifugazione, lavata una volta con la soluzione di lisi come sopra descritta, due volte con la stessa soluzione di lisi ma senza detergente ed una volta con TBS. I campioni sono stati caricati su un gel di poliacrilammide di 8,5% in condizioni riducenti. Le proteine sono state rivelate mediante *Western Blot* con la procedura sopra descritta. Per identificare la fosfotirosina (PY), un anticorpo monoclonale di topo contro PY (Santa Cruz), diluito 1:1000 in una soluzione di BSA 3% e TBS-0,1% Tween 20 (soluzione di blocco), è stato usato come anticorpo primario, mentre un anticorpo prodotto in capra che riconosce le IgG di topo coniugato con la perossidasi (Santa Cruz), diluito 1:10.000 nella soluzione di blocco, è stato usato come anticorpo secondario. Lo stesso filtro è stato successivamente trattato con 0.2 N NaOH in TBS per 5 minuti a temperatura ambiente,

ed usato per rivelare hFlt-1 mediante un anticorpo primario prodotto in capra contro hFlt-1 (Santa Cruz) diluito a 800ng/ml nella soluzione di blocco ed un secondario prodotto in asino che riconosce le IgG di capra coniugato con la perossidasi (Santa Cruz), diluito 1:10.000 nella soluzione di blocco.

1.9 Saggio di formazione di capillari primitivi in cellule HUVEC

Una piastra di 24 pozzetti è stata ricoperta con uno strato di Matrigel (230 µl/pozzetto) per 30 minuti a 37°C. Le cellule HUVEC (8x10⁴cells/pozzetto) sono state coltivate in 1 ml di mezzo EBM-2 in presenza di hVEGF-A₁₆₅ (200 ng/ml), in 1 ml di mezzo condizionato delle cellule 293-PVF-1 (300 ng/ml di PVF-1) ed 1ml di mezzo condizionato delle cellule 293-pcDNA3, come controllo negativo. Dopo 6 h di incubazione la formazione di capillari primitivi è stata osservata mediante microscopio a fase invertita. Le cellule sono state fissate con PBS contenente 0,2% glutaraldeide, 1% paraformaldeide, e fotografate. Per confermare la specificità di azione di PVF-1, il mezzo condizionato 293-PVF-1 è stato preincubato una notte a 4°C con l'anticorpo policlonale contro PVF-1 (100 µg/ml). I saggi sono stati eseguiti in triplicato.

1.10 Saggio sulle membrane corioallantoidee di embrioni di pollo (CAM)

Uova fecondate di pollo sono state incubate a 37°C in condizione di umidità costante. Al quarto giorno di incubazione è stata aperta una finestra nel guscio delle uova per permettere l'osservazione dello sviluppo delle membrane corioallantoidee ed è stato rimosso 3-4 ml di albume. La finestra è stata poi sigillata con un vetrino e le uova sono state così incubate a 37°C. Al nono giorno, i pellet cellulari (3x10⁶ cellule) dei cloni stabili 293-PVF-1, 293-PlGF-1 e 293-pcDNA3 sono stati impiantati sulle membrane corioallantoidee di dieci embrioni per ciascun campione. I vasi intorno agli impianti cellulari sono stati contati con uno stereo-microscopio e fotografati con una foto-camera digitale al tempo dell'impianto e dopo 72 h di incubazione.

1.11 RT-PCR semiquantitativa

L'estrazione di RNA totale dai diversi stadi vitali del verme e la sintesi dei cDNA da trascritti poliadenilati è stata realizzata usando rispettivamente il Trizol (GIBCO-BRL) ed il

Quantitect reverse transcription kit (QIAGEN) secondo le modalità riportate dalla casa produttrice.

Per essere sempre in grado di riconoscere una eventuale contaminazione da DNA genomico presente nelle preparazioni di RNA totale sono stati effettuati due controlli: la reazione di sintesi del cDNA di ogni campione è stata condotta in duplicato, ma in una reazione è stato ommesso l'enzima trascrittasi inversa; le coppie di oligonucleotidi sono state scelte sempre a cavallo di due esoni per cui un frammento amplificato da DNA genomico risulta più grande di quello amplificato dal cDNA corrispondente.

I campioni sono stati normalizzati mediante l'uso di una coppia di oligonucleotidi che permette l'amplificazione di un frammento di 300 paia di basi del cDNA della *beta-actina*. La reazione è stata condotta con un numero di 26 cicli di amplificazione e ad una temperatura di appaiamento (TM) di 55°C.

1.12 Tecniche di coltura e trasformazione di *C.elegans*

I nematodi sono stati cresciuti su piastre contenenti NG medium inseminate con il ceppo OP50 di *E.Coli* ad una temperatura di 20°C (Brenner, 1974). I vettori costruiti, come sopra descritto, per analizzare l'espressione di un gene reporter guidata dalla regione regolatrice del gene PVF-1, sono stati iniettati alla concentrazione di 50 ng/μl nelle gonadi dei vermi allo stadio di giovani adulti ermafroditi insieme ad un altro plasmide (30 ng/μl) contenente un marcatore che consente di discriminare tra vermi trasformati e non trasformati secondo il protocollo del Dott. Mello (Mello et al.,1991). Sono stati così ottenuti i seguenti ceppi trasgenici:

pPD95.75/PVF-1 (promotore *pvf-1::gfp*; *rol-6 (su1006)*)

pPD21.28/PVF-1 (promotore *pvf-1::lac-Z*; *rol-6 (su1006)*)

pPD133.82/PVF-1 (promotore *pvf-1::cfp*; promotore *myo-3::yfp*)

Il ceppo transgenico che produce alti livelli di PVF-1 (N2::PVF-1) è stato ottenuto iniettando in un ceppo mutante *lin-15 (n765ts)* il plasmide (30 ng/μl) che permette il recupero del fenotipo per individuare i vermi trasformati ed il plasmide pPD95.75 (50 ng/μl) contenente tutto il gene *pvf-1*.

1.13 Estrazione di proteine totali da colture di *C.elegans*

I ceppi N2 ed N2::PVF-1 sono stati cresciuti come descritto sopra. I vermi dopo essere stati raccolti e lavati, sono stati risospesi in una soluzione di lisi contenente 10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% Triton X-100. Successivamente i campioni sono stati omogenizzati mediante sonicazione (3 cicli di 30 secondi) e poi centrifugati a 4°C per 5 minuti a 13.000 rpm. I sopranatanti sono stati raccolti e le concentrazioni proteiche dei diversi campioni sono state determinate con il metodo Bradford (Bradford reagent). Cento µg di proteine totali estratte dai vermi sono stati analizzati mediante *Western Blot* in condizioni riducenti come descritto sopra.

1.14 Saggio di Immunofluorescenza

Il saggio di immunofluorescenza sui vermi del ceppo N2 selvatico e sul ceppo N2::PVF-1 è stato eseguito secondo il protocollo del Dott. Ruvkun di seguito descritta. I ceppi N2 ed N2::PVF-1 sono stati cresciuti come descritto sopra ed i vermi dopo essere stati raccolti e lavati, sono stati risospesi in una soluzione contenente 80 mM di KCl, 20 mM NaCl, 10 mM EGTA, 5 mM spermidina, 25% metanolo, 2% p-formaldeide. I campioni sono stati per tre volte congelati in ghiaccio secco e scongelati a 37°C. Dopo centrifugazione a 1000 rpm, i vermi sono stati lavati con 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA (Tris Triton buffer) ed incubati per 2 h a 37°C con il buffer Tris-Triton e 1% 2-mercaptoetanololo.

Dopo l'incubazione, i campioni sono stati lavati con 1 M H₃BO₃, 0,5 M NaOH (buffer BO₃) e trattati per 15 minuti a 37°C con il buffer BO₃ e 10 mM DTT. I campioni sono stati lavati nuovamente con il buffer BO₃ ed incubati con lo stesso buffer ed 1% H₂O₂ per 1 h a temperatura ambiente. Successivamente i vermi sono stati trattati, per una notte, prima con l'anticorpo contro PVF-1 ad una concentrazione di 300 ng/µl e poi con un anticorpo secondario (1:200) che riconosce le IgG di coniglio coniugato ad un cromogeno (red texas). Entrambi gli anticorpi sono stati diluiti in una soluzione contenente 1% BSA, 0,5% Triton X-100, 0,05% Na-azide, 1 mM EDTA, PBS, mentre i lavaggi sono stati eseguiti con una soluzione di 0,1% BSA, 0,5% Triton X-100, 0,05% Na-azide, 1 mM EDTA e PBS. Infine dopo i lavaggi, i vermi sono stati montati sui vetrini ed analizzati al microscopio a fluorescenza.

1.15 Isolamento ed analisi del genotipo di *pvf-1* (ev763)

Il gruppo del Dott. Culotti in Canada ha isolato da una libreria che rappresenta 1,7 milioni di genomi aploidi mutagenizzati di *C.elegans*, un mutante di delezione di *pvf-1*, chiamato *pvf-1* (ev763), mediante “nested” PCR con coppie di oligonucleotidi opportunamente scelti e testati. Il ceppo *pvf-1* (ev763) avente una delezione di 2000 coppie di basi che comprende parte del promotore fino al terzo esone, è stato incrociato con il ceppo N2 selvatico per quattro volte prima di iniziare l’analisi fenotipica. Per l’analisi del genotipo di *pvf-1* (ev763) è stato estratto il DNA genomico incubando i vermi in una soluzione di lisi (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂, 0,45 % NP40 e 0,45% Tween 20) a 60°C per 1h ed a 95°C per 25 minuti.

Successivamente 2 µl della soluzione contenente il DNA genomico sono stati sottoposti ad amplificazione tramite PCR. Sono state utilizzati tre oligonucleotidi:

GR 118- 5’ CGAAAATCGATAACTCTGCGAGC 3’

CVE G- 5’CAAATTTCCCGGATACCTCATAGC 3’

CVE P- 5’TTTCGAACCAATCGGCGACTTC 3’

La coppia di oligonucleotidi CVE G e CVE P permettono di amplificare un frammento di 150 coppie di basi e la seconda GR118 e CVE G permette di amplificare un frammento di 200 coppie di basi. La reazione è stata condotta ad una temperatura di appaiamento (TM) di 55°C. I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel all’1% di agarosio: si ottengono così una sola banda di 200 bp dal DNA di vermi *pvf-1* ^{-/-}, una sola banda di 150 bp da DNA dei vermi *pvf-1* ^{+/+}, ed entrambe le bande dal DNA dei vermi *pvf-1* ^{+/-}.

I ceppi *pvf-1*(ev763); *plx-1*(ev724), *pvf-1*(ev763); *plx-1*(nc37), *pvf-1*(ev763);*mig-2*(gm103), *pvf-1*(ev763); *unc-73*(e936), *pvf-1*(ev763); *ver-3*(ev760), *pvf-1*(ev763); *ver-4*(ev761) e *pvf-1*(ev763); *plx-1*(ev724); *ver-4*(ev761) sono stati ottenuti mediante incrocio di *pvf-1*(ev763) con i mutanti dei geni di *plx-1*, *mig-2*, *unc-73*, *ver-3* e *ver-4*. Questi doppi mutanti come il triplo sono stati selezionati mediante PCR per il mutante di *pvf-1* con le modalità sopra descritte, per tutti gli altri mutanti con coppie di oligonucleotidi specifiche per ciascun gene.

1.16 Analisi fenotipica della coda del maschio

Il difetto di localizzazione del primo raggio della coda del maschio di *C.elegans* è stato osservato mediante microscopio ad alta risoluzione (Leica DMRXA). I raggi della coda sono

visibili mediante l'uso di una proteina fluorescente (GFP) la cui espressione è regolata dal promotore del gene *ajm-1* (Simske and Hardin, 2001).

I vermi da osservare al microscopio vengono anestetizzati in 1 mM di levamisolo per poterli osservare vivi, ma immobili. Quindi sono depositati su di uno strato di agar al 2% disteso su di un vetrino portaoggetti. In seguito si applica il vetrino coprioggetto. I vetrini così montati sono stati osservati ad un microscopio ad alta risoluzione con ottiche Nomarsky (a contrasto d'interferenza differenziale).

RISULTATI

I risultati riportati nella prima parte del lavoro sperimentale di tesi dimostrano che PVF-1 è un membro della famiglia PDGF/VEGF. Infatti la proteina PVF-1 non solo conserva le stesse proprietà biochimiche, ma anche le stesse attività biologiche dei fattori di crescita PDGF/VEGF.

Nella seconda parte è riportata l'analisi fenotipica del mutante nullo di *pvf-1*, mediante approcci di genetica classica, al fine di caratterizzare una o più funzioni del gene in *C.elegans* e di indentificare altri geni che possano agire nello stesso “pathway” di *pvf-1*.

1. Caratterizzazione biochimica della proteina PVF-1

1.1 PVF-1 è una proteina secreta, glicosilata, dimerica e capace di legarsi all'eparina.

La sequenza amminoacidica di PVF-1 presenta all’N-terminale diciannove amminoacidi altamente idrofobici che potrebbero rappresentare un segnale peptidico per consentire alla proteina di essere secreta dalla cellula, proprio come tutti membri della famiglia PDGF/VEGF (*fig. 10*).

MONPMLLLIFCLFCAVICSRGTDSDIPHEFHKMLKHAKSLNSLLRDLHVIYSPEMTNRHVEKTDKHGAALSLKSGMSAQ	80
RIVSIQNISSDEMDGYTLFHLQSMKDIKQGNDCNLQSVCPVLPQLSDDPQVLMYPKCYEVKQCVGSCCNSVETCHPGTI	160
NLVKKHVAELLYIGNGRFMNMTKEITMEEHTSCSCFDCGSNTPQCAPGFVGRSCTCECANKEERNNCVGNATWNAETC	240
KCECDLKCEEGKILHKDRCDVRRRQHHGGPRGHHGHRHHHSRPIIDTEEVQKIGQLKVGRIGGX	

Figura 10 - Sequenza amminoacidica della proteina PVF-1. La linea gialla sottolinea i 19 residui amminoacidici idrofobici codificanti un peptide segnale; le linee verdi indicano i tre siti di N-glicosilazione, le linee blu mettono in evidenza le otto cisteine che costituiscono il motivo “PDGF-like”. Infine i residui amminoacidici colorati di blu e rosso sono quelli che determinano il legame all'eparina.

Per dimostrare che PVF-1 è una proteina secreta, cellule eucariotiche 293-EBNA (cellule renali embrionali umane) sono state trasfettate stabilmente con un vettore di espressione (pcDNA3, Invitrogen) contenente il cDNA di *pvf-1* fuso ad una coda di 6-His. La presenza di PVF-1 nel mezzo condizionato delle cellule è stata controllata mediante un saggio di *Western Blot*, usando un anticorpo policlonale anti-PVF-1, ottenuto immunizzando un coniglio con la proteina prodotta in batterio (vedi materiali e metodi). PVF-1 migra, in condizioni riducenti, come due bande principali delle dimensioni di circa 30-35 kDa ed una banda di peso molecolare inferiore (*fig. 11*). Il peso molecolare predetto di PVF-1, senza il segnale peptidico, è di circa 30 kDa, il fatto che sono visibili altre bande superiori ed inferiori rispetto a questo peso può essere dovuto a modificazioni post-traduzionali od a tagli enzimatici specifici o non specifici che processano la proteina ricombinante.

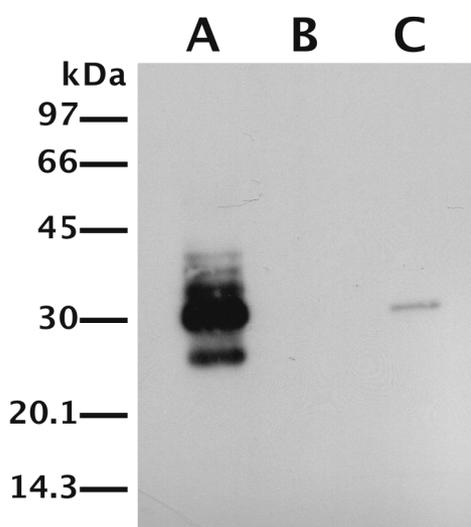


Figura 11 - Analisi mediante Western Blot, in condizioni riducenti, della proteina PVF-1. I mezzi condizionati delle cellule eucariotiche 293 trasfettate con il vettore di espressione pcDNA3 contenente il cDNA di *pvf-1* (A), con il vettore vuoto come controllo negativo (B), e la proteina PVF-1 prodotta in batteri come controllo positivo (C), sono stati caricati su un gel di 12% poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE) e trasferite su membrana PVDF. Il filtro è stato poi incubato con un anticorpo policlonale prodotto in coniglio che riconosce la proteina PVF-1. Nella corsia A sono visibili due bande principali delle dimensioni di circa 30-35kDa corrispondenti alla proteina PVF-1. Nella corsia B non è visibile alcuna banda, come atteso per il controllo negativo, nella corsia C si osserva un'unica banda di circa 30kDa che rappresenta la proteina batterica PVF-1.

PVF-1 è una proteina secreta dalla cellula la cui sequenza amminoacidica conserva il motivo "PDGF-like" che contiene i residui di cisteina coinvolti nella dimerizzazione dei fattori di crescita PDGF/VEGF (*fig. 10*). Ciò suggerisce che PVF-1, come gli altri membri, è secreta dalla cellula come dimero. La proteina ricombinante infatti in condizioni non riducenti migra con un peso molecolare di circa 60-70 kDa, proprio come si sarebbe atteso per un dimero di PVF-1 (*fig. 12*). Si può notare che non tutta la proteina è secreta come dimero, ma questo probabilmente è spiegabile in due modi: il primo che durante la preparazione del campione si possono essere ridotti i ponti di solfuro provocando la formazione dei monomeri; il secondo che all'alto livello di espressione della proteina non è seguito un altrettanto efficiente processo di dimerizzazione.

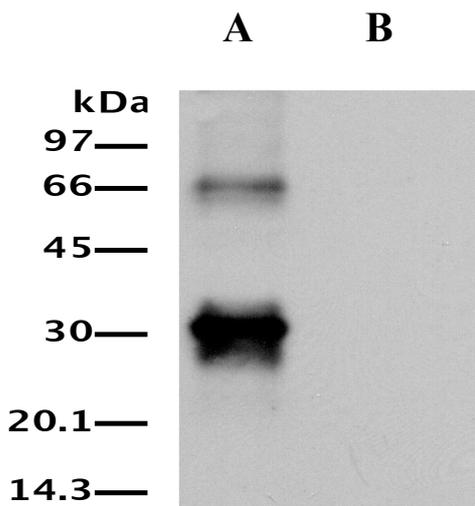


Figura 12 - Analisi mediante Western Blot, in condizioni non riducenti, della proteina PVF-1. I mezzi condizionati delle cellule eucariotiche 293 trasfettate con il vettore di espressione pcDNA3 contenente il cDNA di *pvf-1* (A) e con il vettore vuoto come controllo negativo (B), sono stati analizzati mediante *Western Blot* come descritto in fig. 11. Nella corsia A sono visibili due bande principali, una delle dimensioni di circa 30-35 kDa, corrispondente al monomero di PVF-1 ed una seconda banda, corrispondente al dimerico di peso molecolare di circa 66 kDa. Nella corsia B non è stata rivelata alcuna banda, come atteso per il controllo negativo.

La N-glicosilazione è un'altra proprietà biochimica che caratterizza i membri della famiglia PDGF/VEGF. Infatti questi fattori sono secreti dalle cellule come proteine N-glicosilate ed analizzando la sequenza di PVF-1 è possibile predire ben tre potenziali siti di N-glicosilazione (fig. 10).

E' stato usato l'enzima N-glicosidasi F per dimostrare che la proteina PVF-1 è N-glicosilata. Il mezzo condizionato delle cellule 293 che producono stabilmente la proteina, incubato con il suddetto enzima, è stato poi controllato mediante la tecnica del *Western Blot* sopradescritta. PVF-1 migra, in condizioni riducenti, molto più velocemente rispetto alla proteina presente nel mezzo condizionato non trattato con l'enzima N-glicosidasi F, proprio come si sarebbe atteso se PVF-1 fosse stata una proteina N-glicosilata (fig. 13).

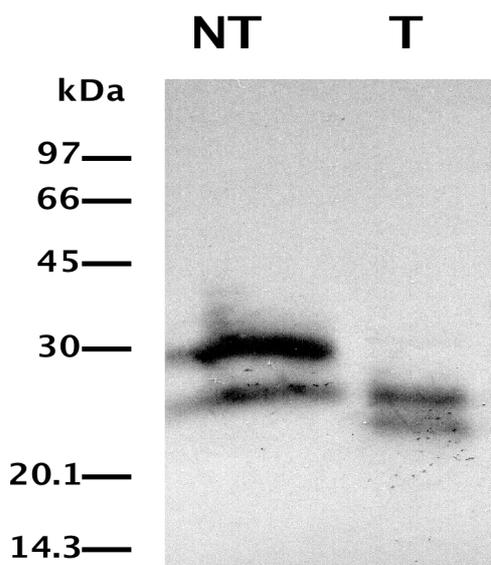


Figura 13 - PVF-1 è una proteina N-glicosilata. I mezzi condizionati delle cellule eucariotiche 293 che producono PVF-1 trattati (T) e non trattati (NT) con l'enzima N-glicosidasi F sono analizzati mediante *Western Blot* come descritto nella fig. 11. Si osserva che le bande presenti nella corsia T migrano attraverso il gel più velocemente rispetto alle bande della corsia NT.

I membri della famiglia PDGF/VEGF, a causa di splicing alternativi, presentano diverse isoforme, alcune solubili, altre che contengono al C-terminale una sequenza ricca di residui di arginina e cisteina che conferisce la capacità di legare gli eparan-solfati della matrice extracellulare.

La sequenza amminoacidica di PVF-1, come alcuni membri della famiglia PDGF/VEGF, mostra al C-terminale una regione ricca dei suddetti residui che probabilmente è necessaria per il legame della proteina all'eparina (*fig.10*).

Allo scopo quindi di testare la capacità di PVF-1 di legarsi all'eparina, il mezzo condizionato di una linea cellulare stabile di 293 che produce la proteina ricombinante è stato incubato con una resina di eparina-sefarosio. Per il rilascio della proteina dalla resina è stata usata una scala di concentrazione di NaCl da 0,15 a 1 molare (*fig.14*).

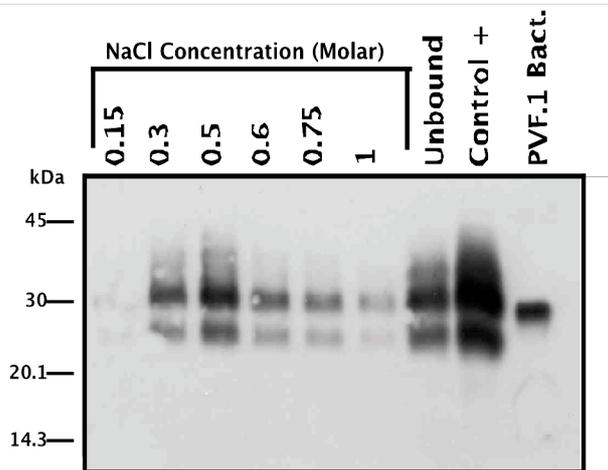


Figura 14 - PVF-1 è in grado di legarsi all'eparina. Il mezzo condizionato di cellule 293 che producono PVF-1 sono stati mescolati con una resina di eparina sefarosio che successivamente è stata lavata con le concentrazioni indicate di NaCl. Gli eluati sono stati analizzati mediante *Western Blot* in condizioni riducenti. Si osserva che una maggiore quantità di PVF-1 è visibile nella corsia dove la concentrazione usata di NaCl per l'eluizione è stata 0,5 M.

In figura 14 si osserva che la maggior parte della proteina prodotta in cellule eucariotiche si eluisce dalla resina con una concentrazione di 0,5M NaCl, una concentrazione ottimale per eluire anche altre proteine della famiglia PDGF/VEGF capaci di legarsi all'eparina (Di Palma T. et al., 1996).

1.2 PVF-1 si lega ai recettori umani VEGFR-1 e VEGFR-2

L'attività biologica dei membri della famiglia PDGF/VEGF dipende dal legame con recettori di tipo tirosina chinasi, caratterizzati da cinque o sette domini simili alle

immunoglobuline nella loro parte extracellulare seguiti da una regione contenuta nella membrana e da un dominio intracellulare con attività di enzima tirosina chinasi.

Allo scopo di testare la capacità di PVF-1 di legarsi a questi tipi di recettori, è stato eseguito un saggio immunoenzimatico (ELISA) in cui i recettori umani solubili VEGFR-1(Flt-1/Fc chimera), VEGFR-2 (KDR/Fc chimera) e PDGFR- β (PDGFR- β /Fc chimera) sono stati adsorbiti ad una concentrazione costante sul fondo di ciascun pozzetto di una piastra. La proteina ricombinante PVF-1, prodotta stabilmente dalle cellule 293, è stata purificata per cromatografia di affinità su colonna di nickel (vedi materiali e metodi) per essere poi aggiunta ai pozzetti ad una concentrazione da 3 a 100 ng/ml. Infine per rivelare il legame di PVF-1 ai recettori è stato usato un anticorpo policlonale biotinilato anti-PVF-1.

Si dimostra così che la proteina si lega, in maniera saturante, ad entrambi i recettori della famiglia VEGF, ma con una efficienza di legame a favore del recettore VEGFR-1; al contrario non è in grado di interagire con il recettore umano solubile PDGFR- β (fig.15).

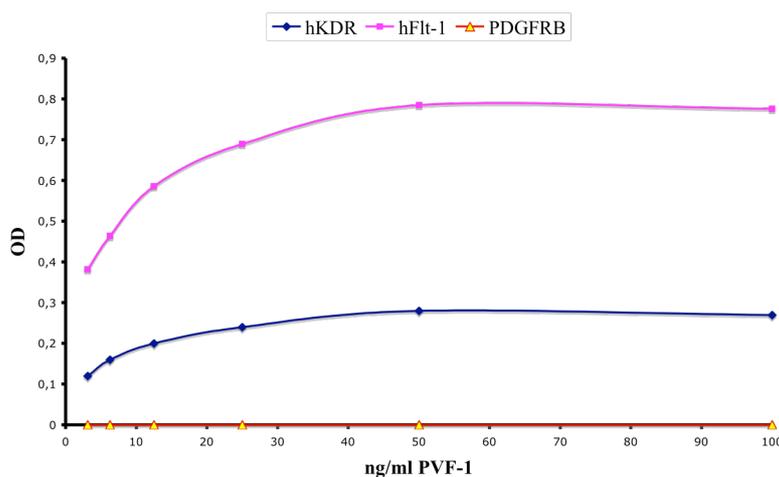


Figura 15 - Saggio ELISA per testare la capacità di PVF-1 di legare i recettori umani Flt-1, KDR e PDGFR β . I recettori umani solubili sono stati adsorbiti su una piastra di 96 pozzetti ad una concentrazione costante di 0,1 μ g/ml (hFlt-1 e KDR) o 0,5 μ g/ml (hPDGFR β). La proteina ricombinante PVF-1 prodotta stabilmente dalle cellule 293, è stata poi aggiunta ad una concentrazione crescente da 3 a 100 ng/ml. In grafico si osserva che entrambe le curve di colore rosa e blu, che rappresentano rispettivamente la capacità di legame di PVF-1 a hFlt-1 ed a hKDR, giungono a saturazione con la differenza che a parità di concentrazione di proteina c'è una maggiore affinità di legame di PVF-1 per il recettore hFlt-1 rispetto a hKDR. Dal grafico si osserva che PVF-1 non è in grado di legare hPDGFR β infatti il risultato del saggio ELISA in questo caso è una linea che coincide con l'ascissa (colore giallo). I dati mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti.

Allo scopo di dimostrare la specificità del legame di PVF-1 ai recettori della famiglia VEGF è stato eseguito un saggio ELISA di tipo competitivo in cui ad una concentrazione costante di recettore solubile umano Flt-1/Fc adsorbito al pozzetto della piastra è stato aggiunto contemporaneamente una concentrazione costante di hVEGF-A₁₆₅ umana ed il competitore, PVF-1, ad una concentrazione crescente da 12,5 a 250 ng/ml. L'uso di un anticorpo biotinilato anti-hVEGF-A₁₆₅ ha permesso di rivelare che PVF-1 compete con VEGF-A₁₆₅ per lo stesso sito di legame al recettore VEGFR-1 (*fig.16*).

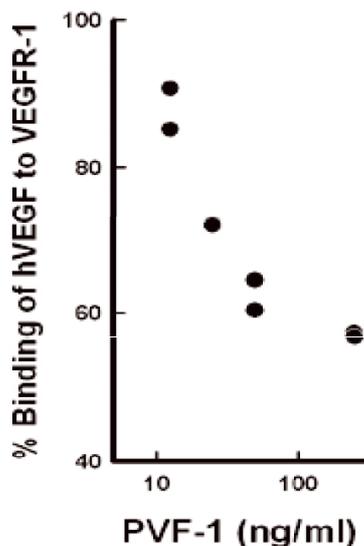


Figura 16 - Saggio ELISA di competizione di PVF-1 al legame di hVEGF-A con il recettore hFlt-1.

La proteina ricombinante PVF-1 prodotta dalle cellule 293 è stata usata a concentrazioni crescenti, da 12,5 a 250 ng/ml, per competere per il legame di hVEGF-A₁₆₅ al recettore solubile hFlt-1. Il grafico mostra una diminuzione della percentuale di legame di hVEGF-A₁₆₅ a hFlt-1 all'aumentare della concentrazione di competitore aggiunto. Queste percentuali sono state calcolate rispetto al valore 100 % di legame di hVEGF-A₁₆₅ a hFlt-1 attribuito quando PVF-1 è assente. I dati sono la media di due esperimenti indipendenti.

1.3 PVF-1 induce l'autofosforilazione del recettore hFlt-1

Il legame dei fattori di crescita ai loro rispettivi recettori di tipo tirosin-chinasico induce la fosforilazione dei residui di tirosina che attivano a loro volta la cascata di trasduzione intracellulare del segnale.

I dati in vitro dimostrano che PVF-1 è in grado di legarsi a hFlt-1, ma per verificare se è anche in grado di attivarlo (fosforilazione), una linea cellulare di 293 che esprime stabilmente hFlt-1 sulla superficie cellulare è stata incubata con i mezzi condizionati delle cellule eucariotiche 293 trasfettate con il vettore di espressione pcDNA3 contenente il cDNA di *pvf-1* e con il vettore vuoto come controllo negativo. La fosforilazione è stata valutata con saggi di immunoprecipitazione e *Western Blot*. Un' induzione della fosforilazione del recettore è evidente rispetto al controllo negativo quando la linea cellulare 293-hFlt-1 è stata incubata con PVF-1 (150-300 ng/ml per 10 minuti) (*fig.17*).

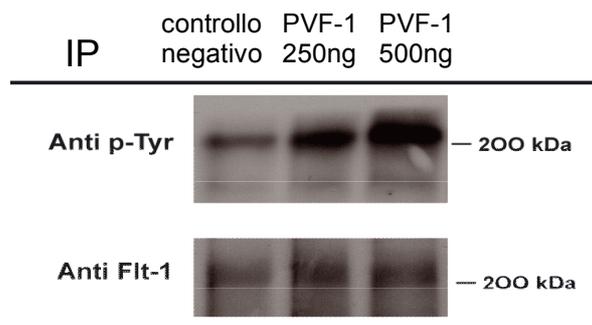


Figura 17 - PVF-1 attiva hFlt-1 inducendo la fosforilazione dei residui di tirosina. Cellule 293/hFlt-1 sono state stimulate con i mezzi condizionati di cellule 293 trasfettate con il vettore vuoto pcDNA3, come controllo, o contenenti PVF-1 alle concentrazioni di 250 e 500 ng/ml. Un mg di lisato cellulare è stato immunoprecipitato con un anticorpo anti-hFlt-1, analizzato con un anticorpo anti-fosfotirosina (anti p-Tyr) e con un anticorpo contro hFlt-1 (antiFlt-1).

1.4 PVF-1 è in grado di stimolare Angiogenesi

I fattori di crescita della famiglia PDGF/VEGF sono in grado di indurre angiogenesi *in vivo* e crescita *in vitro* delle cellule endoteliali. Allo scopo di dimostrare la capacità di PVF-1 di stimolare angiogenesi sono stati scelti due tipi di saggi: il primo chiamato “Capillary-like tube formation” *in vitro* ed il secondo “Chorioallantoic membrane assay” (CAM) *in vivo*.

Per il primo saggio le cellule HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) sono state poste in coltura all'interno di una matrice gelatinosa (Matrigel) ed incubate per circa otto ore con il mezzo condizionato della linea cellulare 293 che produce stabilmente PVF-1 (300 ng/ml) o con la proteina ricombinante hVEGF-A₁₆₅ (200 ng/ml). Le cellule così trattate sono capaci di organizzarsi in strutture simili a capillari (*fig. 18 A-B*), al contrario delle HUVEC, incubate o con il mezzo condizionato delle cellule 293 trasfettate con il vettore vuoto pcDNA3 o con il mezzo condizionato contenente PVF-1 (300 ng/ml) e gli anticorpi policlonali anti-PVF-1 (100 µg/ml) (*fig 18 C-D*). Quest'ultimo caso dimostra che l'induzione della formazione dei capillari è indotta specificamente dall'azione di PVF-1.

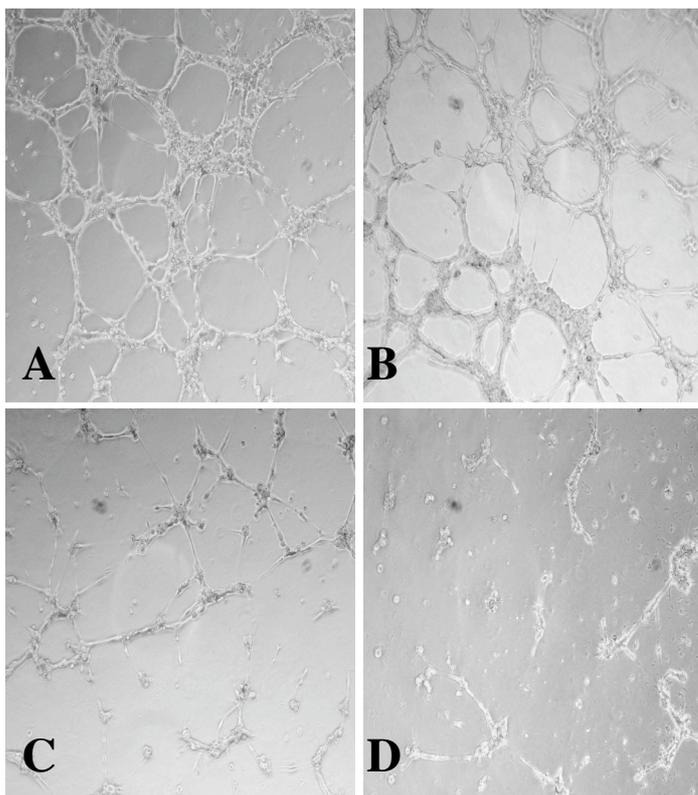


Figura 18 - PVF-1 è in grado di indurre la formazione di capillari primitivi in cellule HUVEC. Le cellule HUVEC sono state trattate nei seguenti modi: **A**, con il mezzo condizionato di cellule 293 che producono la proteina ricombinante PVF-1, alla concentrazione di 300 ng/ml; **B**, con la proteina hVEGF-A₁₆₅ alla concentrazione di 100 ng/ml, come controllo positivo; **C**, mezzo condizionato delle cellule 293 trasfettate con il vettore vuoto pcDNA3, come controllo negativo; **D**, con il mezzo condizionato di cellule 293 che producono PVF-1 (300 ng/ml) al quale è stato aggiunto l'anticorpo policlonale che riconosce PVF-1 (100 µg/ml). Dopo otto ore di incubazione a 37°C le piastre di cultura sono state fotografate.

Per il secondo saggio la linea cellulare 293 che produce stabilmente PVF-1 (300 ng/ml) e quella trasfettata con il vettore vuoto pcDNA3 sono state impiantate sulle membrane corioallantoidee degli embrioni di pollo ed incubate per tre giorni. La formazione di neo-vasi è visibile, mediante un microscopio ad alta risoluzione, solo intorno alle cellule impiantate che producono PVF-1 (*fig. 19 A-B*). Il risultato della conta del numero dei neo-vasi convergenti verso le cellule dimostra che PVF-1 è in grado di indurre angiogenesi (*fig. 19 D*) e che la sua azione è paragonabile a quella descritta in letteratura per hPIGF (*fig. 19 C*) (Errico M. et al.,2004).

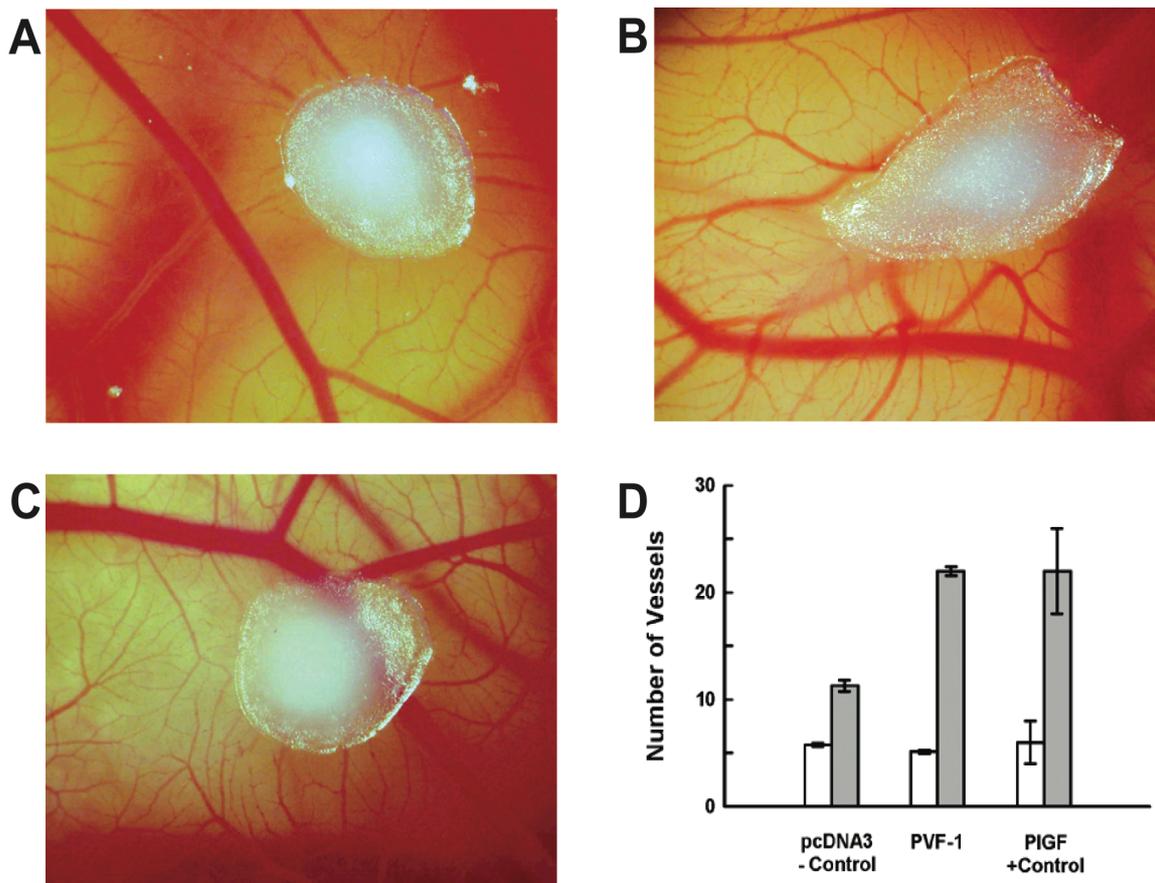


Figura 19 - PVF-1 induce neovascolarizzazione sulle membrane corioallantoidee di pollo. Le membrane corioallantoidee degli embrioni di pollo a 12 giorni sono state incubate nei seguenti modi: **A**, con il mezzo condizionato delle cellule 293 trasfettate con il vettore vuoto pcDNA3, come controllo negativo; **B-C**, con il mezzo condizionato delle cellule 293 che producono la proteina ricombinante PVF-1 (300 ng/ml) e PIGF (100 ng/ml). Per la quantizzazione della risposta vascolare è mostrato in **D** un istogramma che riporta il numero di vasi, convergenti verso le linee cellulari 293, al momento dell'impianto (tempo 0) e dopo 72h.

2. Caratterizzazione funzionale della proteina PVF-1 in *C.elegans*

2.1 Analisi dell'espressione del gene *pvf-1* in *C.elegans*

Per identificare le cellule dove è espresso *pvf-1* in *C.elegans*, sono stati usati vettori, creati dal Dott. A. Fire (Baltimora, U.S.A.) in cui la trascrizione di un gene reporter è guidata dalla presunta regione regolatrice del gene d'interesse. Tenendo in considerazione il fatto che il programma "Gene Finder" ha rivelato la presenza sul cromosoma III di un altro potenziale gene di *C.elegans*, la cui estremità 3' terminale dista dall'inizio del primo esone di *pvf-1* circa 2000 coppie di basi, la regione genomica di circa 1800 coppie di basi fino al primo esone di *pvf-1* è stata clonata a monte delle sequenze codificanti la GFP (Green Fluorescent Protein) e LacZ.

I vettori di fusione *pvf-1::GFP* e *pvf-1::LacZ* sono stati iniettati nelle gonadi del ceppo di tipo selvatico N2 di *C.elegans* in presenza di un vettore contenente un altro marcatore per poter individuare i vermi trasformati. Dall'analisi delle linee transgeniche, mediante un microscopio ottico ad alta risoluzione ed a fluorescenza, si è osservata l'espressione dei rispettivi geni reporter nelle cellule muscolari (*fig. 20 A-B-C-D*).

Allo scopo di confermare questo dato, sono stati coiniettati due vettori: il primo, *pvf-1::CFP* (Cyan Fluorescent Protein), in cui è stato clonato il presunto promotore di *pvf-1* a monte del gene marcatore *cfp* ed il secondo, *myo-3::YFP* (Yellow Fluorescent Protein), in cui il promotore del gene *myo-3*, un marcatore dei nuclei delle cellule muscolari, è stato clonato a monte del gene *pvf-1* con un segnale di localizzazione nucleare.

Dall'osservazione delle linee transgeniche, ottenute dall'inezione di questi plasmidi, è emerso che le cellule muscolari striate con i nuclei visibili grazie alla fluorescenza della proteina YFP mostrano l'espressione citoplasmatica della proteina CFP regolata proprio dal promotore di *pvf-1* (*fig. 20 E-F*). L'osservazione di tutte queste linee transgeniche inoltre suggerisce che *pvf-1* non è espresso durante lo stadio embrionale, ma principalmente durante lo stadio larvale L2 ed L3 (*fig. 20*).

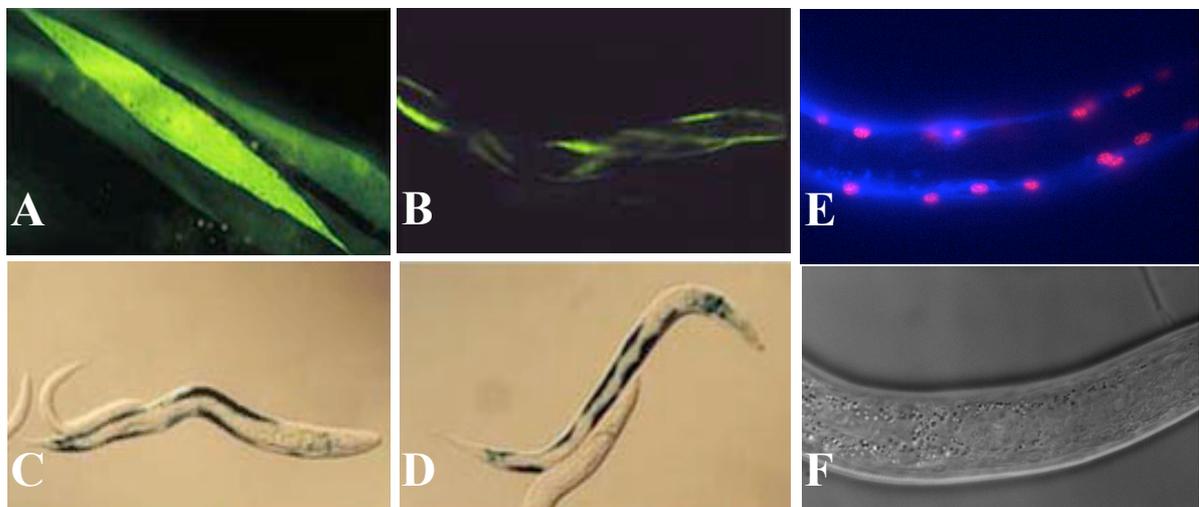


Figura 20 - *pvf-1* è espresso nelle cellule muscolari striate di *C.elegans*.

Il profilo di espressione di *pvf-1* è stato ottenuto mediante l'uso dei seguenti vettori: promotore *pvf-1::GFP* (A-B); promotore *pvf-1::LacZ* (C-D); promotore *myo-3::YFP* e promotore *pvf-1::CFP* (E-F). (A) Cellule muscolari striate. (B-C-D) Espressione di *pvf-1* nelle cellule muscolari striate al terzo stadio larvale di *C.elegans*. In (E) un verme tra il terzo ed il quarto stadio larvale mostra l'espressione di *myo-3* nel nucleo (rosa) e di *pvf-1* nel citoplasma (blu) delle cellule muscolari striate. (F) Immagine al visibile corrispondente al pannello E.

Il dato di espressione temporale è stato ulteriormente confermato anche dopo aver interrogato la banca SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) di *C.elegans* (<http://elegans.bcgsc.ca/home/sage.html>). Consultando questo servizio informatico è possibile avere una precisa informazione sulla composizione degli mRNA di *pvf-1* presenti nei diversi stadi di *C.elegans*. La tecnica del SAGE prevede una prima fase di estrazione di mRNA del gene di interesse e di produzione del DNA complementare (cDNA), una seconda fase in cui questi frammenti di cDNA vengono processati da enzimi che tagliano la prima sequenza iniziale per ogni frammento. Poiché ogni frammento, o tag, è riconducibile ad uno specifico mRNA, è possibile valutare se e quanto è espresso un certo gene.

Dal profilo di espressione genica di *pvf-1* risulta che è espresso a bassi livelli (1-2 per 100000 tags) soprattutto durante gli stadi larvali L2 ed L3 (fig. 21 A).

Il dato di espressione temporale è stato verificato sperimentalmente mediante RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) semiquantitativa. Dopo aver estratto l'RNA totale da ciascun stadio larvale ed adulto di *C.elegans* ed aver retrotrascritto il cDNA, è stato amplificato con una coppia di oligo specifica per *pvf-1* un frammento di circa 200 coppie di basi. Come gene costitutivo di controllo è stata usata la β -actina.

Il risultato ottenuto per RT-PCR conferma che il gene *pvf-1* si esprime durante gli stadi larvali ed adulto, ma non allo stadio di embrione (fig. 21 B).

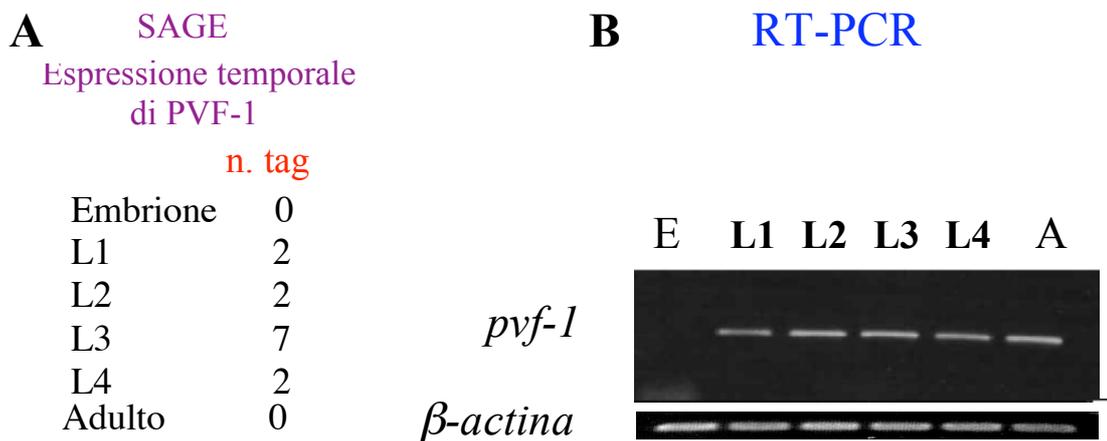


Figura 21 - Analisi dell'espressione temporale di *pvf-1*.

(A) Dati riportati dalla banca SAGE di *C.elegans*. *pvf-1* non è espresso allo stadio embrionale ed adulto, ma raggiunge un picco massimo di espressione solo durante il terzo stadio larvale.

(B) RT-PCR semiquantitativa usando come stampo il cDNA di tutti gli stadi vitali del ceppo selvatico N2. Le bande corrispondenti al frammento amplificato di cDNA di *pvf-1* sono visibili in tutti gli stadi larvali ed adulto escluso l'embrione. Il saggio di RT-PCR è stato normalizzato mediante l'amplificazione di un frammento del cDNA della β -actina.

Al scopo di localizzare e di determinare l'espressione temporale della proteina PVF-1 in *C.elegans* sono stati eseguiti dei saggi di immunostochimica usando lo stesso anticorpo policlonale anti PVF-1 degli esperimenti di *Western Blot*.

I risultati ottenuti dalla banca SAGE e dalla RT-PCR suggeriscono che *pvf-1* è espresso a bassi livelli per cui per i saggi di immunostochimica sono stati utilizzati il ceppo selvatico N2 ed una linea transgenica che esprime alti livelli di proteina PVF-1 (N2::PVF-1). Questa linea di vermi transgenica, N2::PVF-1 è stata ottenuta coiniettando nella gonade di un verme selvatico N2 due vettori, il primo dove è stata clonata la presunta regione regolatrice e la sequenza genomica completa di *pvf-1*, ed il secondo contenente un gene reporter per selezionare i vermi trasformati (*myo-3::GFP*).

La presenza di PVF-1 nel ceppo selvatico N2 ed in N2::PVF-1 è stato controllato mediante la tecnica di *Western Blot* sopra descritta. PVF-1 è evidenziato dall'anticorpo policlonale specifico solo nell'estratto proteico derivante dalla linea N2::PVF-1 al contrario non si è rilevata la sua presenza nel ceppo selvatico N2 probabilmente a causa dei bassi livelli di espressione (*fig.22*).

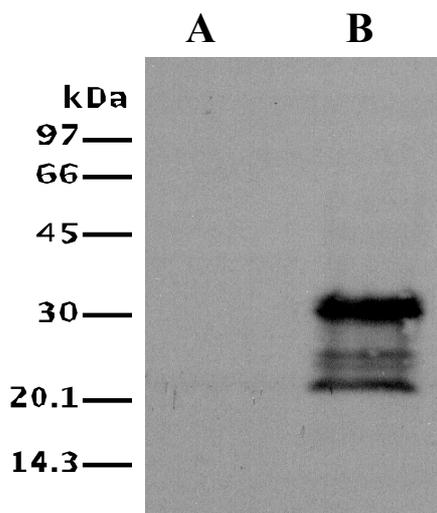


Figura 22 - La proteina PVF-1 può essere rivelata, mediante *Western Blot*, solo in una linea transgenica che esprime alti livelli di *pvf-1* (N2::PVF-1) e non nel ceppo selvatico N2. 100 μ g di proteine totali estratte sia dal ceppo selvatico N2 (corsia **A**) sia da N2::PVF-1 (corsia **B**) sono stati caricati su un gel di 12% poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE), in condizioni riducenti, e trasferite su membrana PVDF. Il filtro è stato successivamente incubato con un anticorpo policlonale prodotto in coniglio che riconosce la proteina PVF-1.

Per i saggi di immunostochimica gli animali del ceppo selvatico N2 e della linea N2::PVF-1, fissati e permeabilizzati, sono stati incubati con l'anticorpo che riconosce PVF-1 e con un anticorpo secondario fluorescente. L'analisi della linea N2::PVF-1 è stata effettuata mediante microscopio ottico ed a fluorescenza. PVF-1 è espressa in tutte le cellule muscolari striate di *C.elegans* tra il terzo ed il quarto stadio di sviluppo larvale (*fig. 23 A-B*). Al contrario il ceppo N2, come atteso, non permette di rilevare la presenza della proteina.

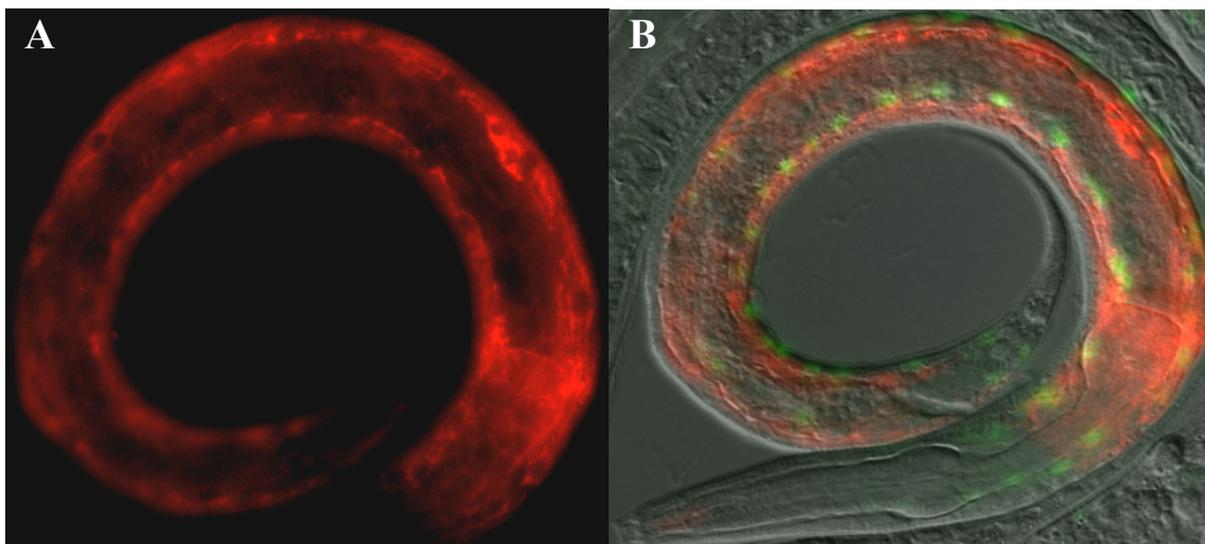


Figura 23 - Localizzazione di PVF-1 nelle cellule muscolari striate mediante analisi di immunofluorescenza. Vermi transgenici che esprimono alti livelli di *pvf-1* ed il gene reporter *myo-3::GFP* sono stati fissati ed incubati prima con un anticorpo policlonale prodotto in coniglio che riconosce la proteina PVF-1 e successivamente con un anticorpo secondario fluorescente (Texas-Red. anti-rabbit). **(A)** Localizzazione citoplasmatica di PVF-1 (rosso) in tutte le cellule muscolari striate al terzo stadio larvale. **(B)** In rosso è visibile il segnale citoplasmatico della proteina PVF-1, in verde il segnale nucleare della GFP nelle cellule muscolari striate.

2.2 Isolamento ed analisi molecolare del mutante di delezione del gene *pvf-1*

Al fine di comprendere la funzione di *pvf-1* in *C.elegans* è stato isolato (come descritto in materiali e metodi) un putativo mutante nullo di questo gene, chiamato *pvf-1(ev763)*. In *C.elegans* è infatti possibile selezionare da una libreria di animali mutagenizzati, mediante la tecnica di PCR con coppie di oligonucleotidi specifiche per il gene d'interesse, mutanti che abbiano una parte o tutto il gene deletato.

Il ceppo *pvf-1(ev763)* ha una delezione della sequenza genomica di *pvf-1* di 2000 coppie di basi che rimuove parte del promotore fino al terzo esone (fig. 24 A). *pvf-1(ev763)* è stato incrociato con un ceppo, chiamato *him-5 (e1490)*, che genera un'alta percentuale di maschi. Il ceppo così ottenuto, *pvf-1(ev763); him-5 (e1490)*, è stato successivamente incrociato per quattro volte con il ceppo selvatico N2 al fine di selezionare un mutante di delezione solo del gene d'interesse.

Il genotipo del ceppo *pvf-1(ev763)* è stato determinato mediante la tecnica di PCR eseguita sul DNA genomico estratto dagli animali adulti (come descritto in materiali e metodi). A tale scopo sono stati scelti tre oligonucleotidi che permettono di discriminare tra ceppi di animali selvatici, eterozigoti ed omozigoti per la delezione indotta. Una coppia di oligonucleotidi sono stati disegnati all'estremità della regione deletata per amplificare un frammento di circa 200

coppie di basi specifico per l'allele ricombinante, mentre un terzo oligonucleotide che cade all'interno della delezione, in coppia con l' oligonucleotide al 3'-terminale, amplifica un frammento di circa 150 coppie di basi contenute solo nella sequenza genomica dell'allele selvatico (*fig. 24 B*).

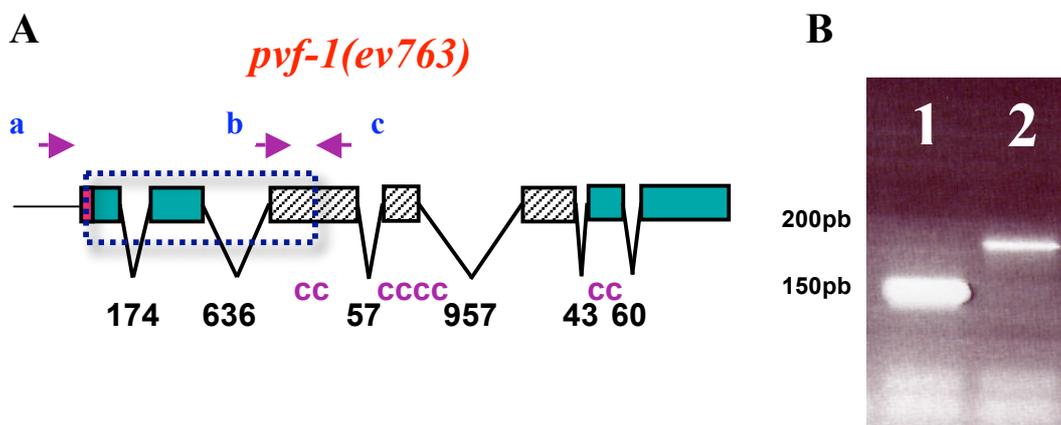


Figura 24 - Identificazione dell'allele delecto *pvf-1(ev763)*.

(A) Un allele delecto del gene *pvf-1* è stato identificato mediante mutagenesi del ceppo selvatico N2 ed analisi di PCR per identificare il mutante del gene di interesse. Il rettangolo tratteggiato indica la regione delecta che rimuove 2000 pb del gene di *pvf-1* dal promotore fino al terzo esone. Le frecce indicano la posizione sul gene degli oligo specifici scelti per discriminare tra il ceppo selvatico, eterozigote ed omozigote per la delezione indotta. (B) Nella corsia 1 è visibile un frammento amplificato con gli oligo (b) e (c) di circa 150 pb caratteristico dell'allele selvatico. Nella corsia 2 il frammento amplificato con gli oligo (a) e (c) è di circa 200 pb ed identifica allele delecto.

2.3 Analisi fenotipica del mutante di delezione di *pvf-1*

Il ceppo *pvf-1(ev763)*, da una prima osservazione mediante un microscopio ad alta risoluzione, non mostra alcuna evidente alterazione morfologica agli stadi larvali ed adulto. Allo scopo di determinare un fenotipo di letalità embrionale, sono stati disposti vermi ermafroditi gravidi ciascuno su singola piastra. Ogni due ore i vermi sono stati spostati su nuove piastre e contate le uova deposte. Dopo 24 ore, è stato contato il numero di larve schiuse per ciascuna piastra ed è stata calcolata la differenza tra questo numero e quello di uova deposte per ottenere il numero di uova non schiuse. Da questo esperimento sono emersi due dati: i vermi a cui manca la proteina PVF-1 rilasciano sulla piastra un numero di uova paragonabile a quello di un ceppo selvatico N2 e tutte le uova schiuse riescono a completare lo sviluppo larvale.

Inoltre considerando che il gene è espresso nelle cellule muscolari striate si è analizzata la capacità di movimento del mutante rispetto al ceppo selvatico N2. I vermi privi di PVF-1 sono perfettamente vitali e non presentano difetti legati al movimento.

In considerazione del fatto che, come è stato descritto sopra, PVF-1 è in grado di indurre angiogenesi in vitro ed in vivo, si può ipotizzare che in *C.elegans* dove non c'è un sistema vascolare la proteina possa comunque essere coinvolta in processi di migrazione cellulare.

Allo scopo quindi di verificare questa ipotesi, il putativo mutante nullo di *pvf-1* è stato incrociato con diversi ceppi di vermi che hanno specifiche cellule, coinvolte in processi di migrazione, marcate con proteine fluorescenti. Si può così verificare se nel ceppo *pvf-1(ev763)* la migrazione di queste cellule marcate avviene correttamente rispetto al ceppo selvatico N2.

I ceppi scelti da incrociare con *pvf-1(ev763)* sono stati i seguenti: *unc-129::GFP*, *mec-7::GFP* e *Lag-2::GFP*.

Il gene *unc-129* codifica un membro della superfamiglia TGF- β (Trasforming Growth Factor- β) ed è espresso dalle classi di motoneuroni DA e DB, esclusi DA8 e DA9, lungo l'asse dorso-ventrale del verme (*fig.25*) (Colavita A. et al.,1998).

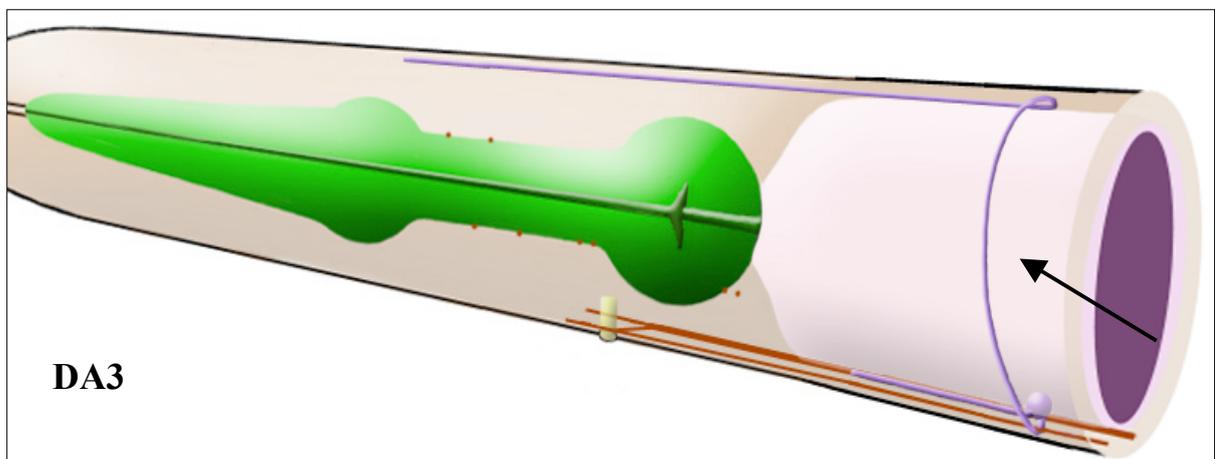
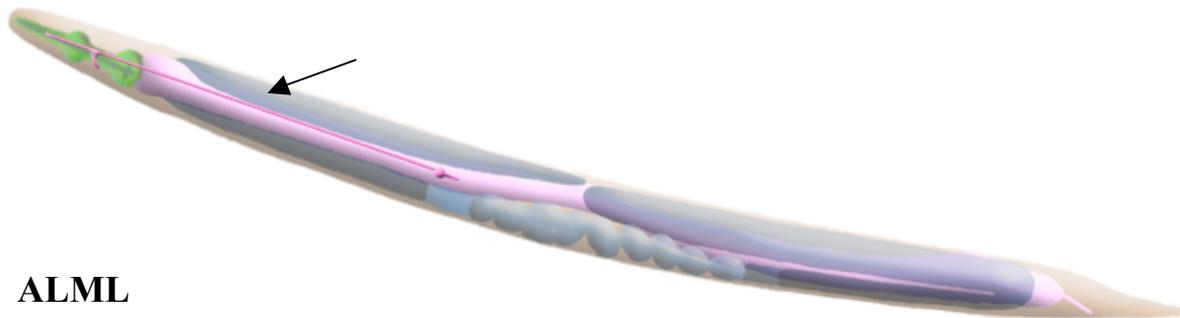


Figura 25 - Il gene *unc-129* è espresso nella classe dei motoneuroni DA e DB. L'immagine mostra uno schema della parte anteriore del corpo di un verme con in verde marcata la faringe. In viola, come indica la freccia è visibile il prolungamento assonale di una cellula neuronale di classe DA, in particolare DA3, che migra lungo l'asse dorsale del verme per innervare le cellule muscolari.

Gli assoni di queste cellule migrano durante lo sviluppo larvale per innervare le cellule muscolari posizionate lungo l'asse dorso-ventrale del verme. Il ceppo *unc-129::GFP* che ha la GFP sotto il controllo del promotore del gene *unc-129* è stato incrociato con *pvf-1(ev763)* al fine di seguire nel mutante d'interesse la migrazione assonale di queste specifiche cellule verso le cellule muscolari del corpo del verme. Dall'osservazione mediante un microscopio ad

alta risoluzione ed a fluorescenza del ceppo *pvf-1(ev763); unc-129::GFP* risulta che PVF-1 non è coinvolto nella migrazione assonale delle classi di motoneuroni DA e DB.

Il gene *mec-7* codifica una β -tubulina ed è espresso in sei cellule neuronali sensoriali: ALML/R, AVM, PVM, PLML/R i cui assoni migrano lungo l'asse dorso-ventrale durante lo sviluppo larvale (*fig. 26*) (Hamelin M. et al., 1992).



ALML

Figura 26 - Il gene *mec-7* è espresso in sei neuroni sensoriali.

L'immagine mostra lo schema di un verme adulto. In fucsia, come indica la freccia, è visibile l'assone del neurone ALML che ha terminato la migrazione lungo l'asse dorso-ventrale del verme.

L'osservazione del ceppo *pvf-1(ev763);mec-7::GFP*, derivante dall'incrocio di *pvf-1(ev763)* con *mec-7::GFP*, permette di escludere un coinvolgimento di PVF-1 nella migrazione di queste sei cellule neuronali sensoriali.

Il gene *Lag-2* infine codifica una proteina transmembrana della famiglia DSL (Delta/Serrate/Lag-2) espressa in due cellule somatiche chiamate "DTC" (Distal Tip Cell) (*fig. 27*) (Fitzgerald K. et al., 1995).

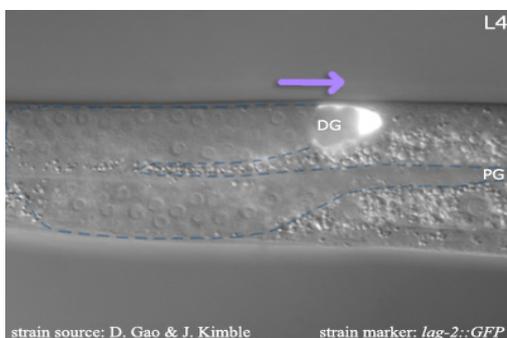


Figura 27 - Il gene *Lag-2* è espresso nelle cellule somatiche DTC (Distal Tip Cell). L'immagine mostra un verme al quarto stadio larvale. In fluorescenza è visibile una cellula DTC che ha quasi completato la migrazione lungo l'asse dorsale verso il centro del corpo del verme, come indica la freccia.

La migrazione delle DTCs, che inizia durante lo stadio larvale L3 e termina allo stadio adulto, determina l'estensione anteriormente e posteriormente dei due bracci della gonade del verme. Il ceppo *Lag-2::GFP*, che ha le DTCs marcate con la GFP, è stato incrociato con *pvf-1(ev763)* e dall'osservazione delle gonadi di *pvf-1(ev763);Lag-2::GFP* emerge che la migrazione di queste ultime avviene in maniera paragonabile a quella del ceppo selvatico.

2.4 PVF-1 è coinvolto nella localizzazione del primo raggio della coda del maschio

Si è proceduto allo studio del mutante con approcci di genetica classica, incrociando *pvf-1(ev763)* con mutanti di geni la cui funzione era già nota. In questo modo si possono ottenere due tipi d'informazione: la prima, capire in quale processo biologico PVF-1 è coinvolto e la seconda, scoprire gli altri geni con cui può interagire.

Nei vertebrati c'è un'altra grande famiglia di molecole secrete, chiamate Semaforine, caratterizzate originariamente per la loro capacità di agire da repellenti nei confronti del cono di crescita assonale che può essere messa in relazione alla famiglia PDGF/VEGF. Recentemente infatti è stato dimostrato che le semaforine possono agire da inibitori dell'adesione delle cellule endoteliali agendo sulla regolazione delle integrine durante l'angiogenesi (Serini et al., 2004). Inoltre le semaforine si legano a due tipi di recettori, le Plessine e le Neuropiline. Proprio quest'ultime sono anche corecettori di VEGF-A, VEGF-B e PlGF.

In *C.elegans* sono stati identificati alcuni membri della famiglia delle Semaforine ed i loro rispettivi recettori, le plessine (fig.28).

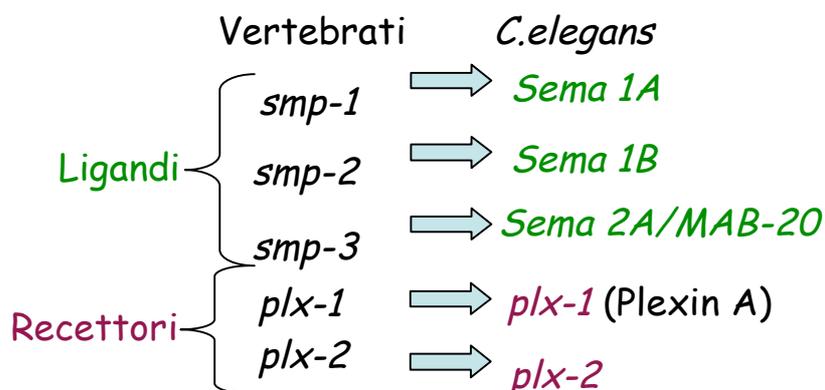


Figura 28 - Elenco dei geni identificati in *C.elegans* omologhi ai rispettivi geni della famiglia delle Semaforine e delle Plessine dei Vertebrati.

Recentemente sono stati anche isolati e descritti due alleli mutanti del gene *plx-1*. Il ceppo *plx-1(ev724)*, isolato da Dalpè e collaboratori (Dalpè et al., 2004), ha una delezione di circa 1200 coppie di basi della regione genomica di *plx-1* che rimuove l'esone 19. Lo "splicing" dall'esone 18 all'esone 20 crea un codone di stop che determina la traduzione di un recettore senza il dominio transmembrana e citoplasmatico. Il recettore mutante non è così in grado di ancorarsi alla membrana cellulare e di avere attività citoplasmatica. Il ceppo *plx-1(nc37)*, isolato da Fujii e collaboratori (Fujii et al., 2002), ha una delezione che al contrario determina la mancanza della regione ammino terminale della proteina. Entrambi questi mutanti mostrano difetti di localizzazione del primo raggio (R1) della coda del maschio di *C.elegans*. La coda del maschio diversamente da quella dell'ermafrodite è costituita da nove raggi a simmetria bilaterale contenute all'interno di una struttura cuticolare chiamata fano (fig. 29).

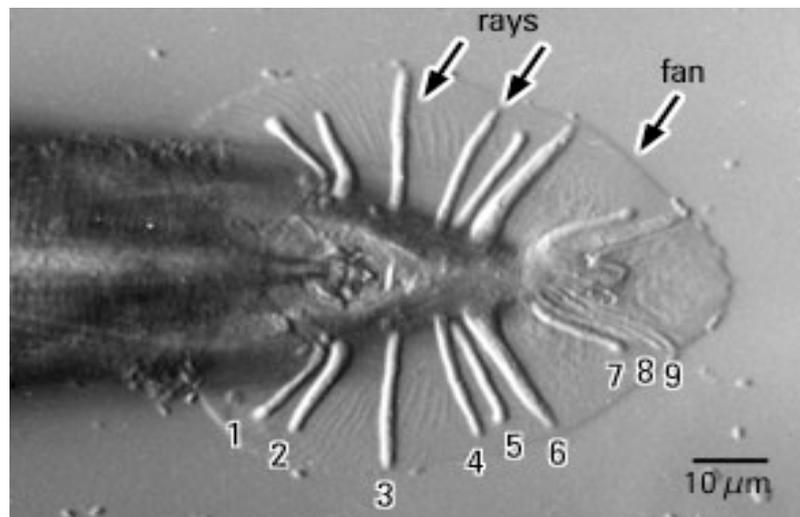


Figura 29 - Coda di un maschio adulto di *C.elegans*. La coda di un maschio è costituita da una membrana, chiamata fano, con all'interno nove raggi a simmetria bilaterale. (Figura riportata da Sulston and White, 1980)

Si può osservare in vivo la morfogenesi della coda del maschio mediante una proteina fluorescente (GFP) la cui espressione è regolata dal promotore del gene *ajm-1* che codifica una proteina localizzata sulle giunzioni aderenti delle cellule epiteliali (Simske and Hardin, 2001).

Nei due ceppi mutanti di *plx-1* è stato evidenziato che R1 è spostato anteriormente rispetto alla posizione osservata nel ceppo selvatico N2 (fig. 30 A-B). Per questo fenotipo sono stati descritti due gradi di severità: il primo nominato di classe 1, fenotipo severo, quando R1 è posizionato anteriormente fuori dall'area del fano ed è di dimensioni ridotte (fig. 30 D); il secondo nominato di classe 2, fenotipo medio, quando R1 è posizionato anteriormente ma resta ancora all'interno dell'area del fano (fig. 30 C). Inoltre questo fenotipo è temperatura

sensibile, infatti i due ceppi mutanti posti alla temperatura di 20°C hanno una percentuale di difetto che tende ad aumentare una volta cambiata la temperatura da quella normale di 20°C ad una più restrittiva di 25°C.

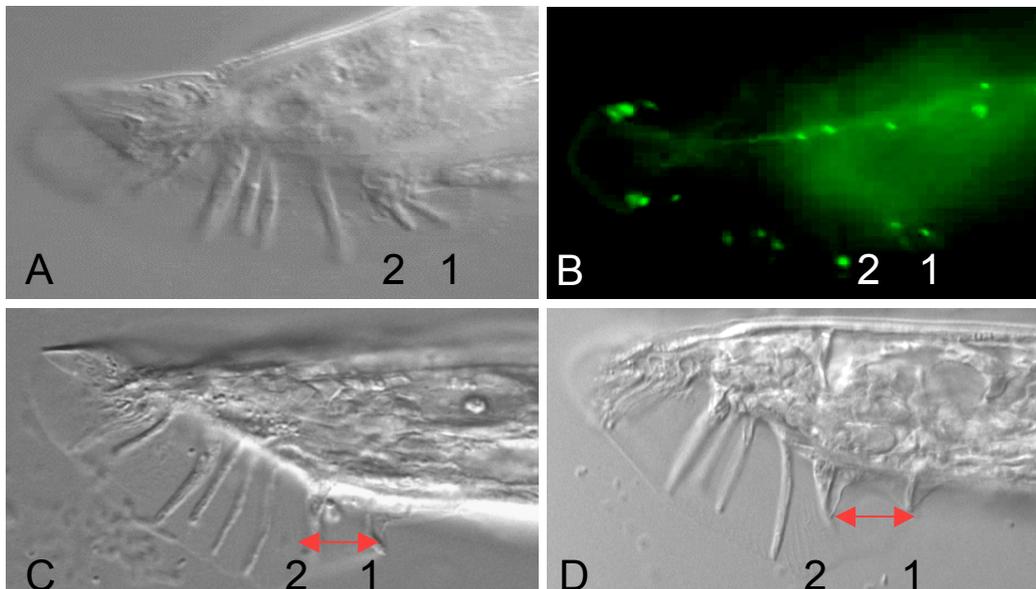


Figura 30 - Il raggio 1 della coda del verme è localizzato anteriormente negli alleli mutanti di *plx-1*.

La posizione dei raggi è stata determinata mediante l'uso della microscopia DIC ed a fluorescenza usando come gene reporter *ajm-1::GFP*. Nei maschi del ceppo N2 selvatico il raggio 1 è in posizione ravvicinata al raggio 2 ed entrambi hanno le stesse dimensioni (A-B). Negli alleli mutanti di *plx-1* il raggio 1 può localizzarsi in una posizione appena più anteriore rispetto ad un ceppo selvatico N2, ma resta all'interno del fano (C). Questo tipo di fenotipo del raggio 1 è stato denominato di classe 2 o medio. Si definisce fenotipo severo, o di classe 1, quando il raggio 1 è localizzato così anteriormente da uscire dal fano ed ha inoltre delle dimensioni più ridotte rispetto al raggio 2 (D).

Per determinare se PVF-1, come PLX-1, è coinvolto nella migrazione del primo raggio (R1) della coda del maschio, il mutante *pvf-1(ev763); him-5(e1490)* è stato incrociato con entrambi gli alleli mutanti di *plx-1*, *plx-1(ev724)* e *plx-1(nc37)*. Dall'osservazione delle code dei maschi, usando un microscopio ad alta risoluzione ed a fluorescenza, risulta che in entrambi i doppi mutanti, *pvf-1(ev763); plx-1(ev724)* e *pvf-1(ev763); plx-1(nc37)*, la percentuale di difetto sia di classe 1 che di classe 2 aumenta significativamente rispetto ai singoli mutanti sia alla temperatura di 20°C sia alla temperatura più restrittiva di 25°C (Tab. 1).

Tab. 1. Fenotipo raggio 1 anteriore nel ceppo N2 e nei mutanti *plx-1* e *pvf-1*

Genotipo		Raggio 1 classe 1 (%)	Raggio 1 classe 2 (%)	n
N2	20°C	0	0	120
N2	25°C	0	0	110
<i>plx-1 (ev724)</i>	20°C	10	39	359
<i>plx-1 (ev724)</i>	25°C	32	50	157
<i>plx-1 (nc37)</i>	20°C	11	30	120
<i>plx-1 (nc37)</i>	25°C	33	50	120
<i>pvf-1 (ev763)</i>	20°C	0	0	130
<i>pvf-1 (ev763)</i>	25°C	0	0	110
<i>pvf-1 (ev763); plx-1 (ev724)</i>	20°C	32	51	120
<i>pvf-1 (ev763); plx-1 (ev724)</i>	25°C	63	35	117
<i>pvf-1 (ev763); plx-1 (nc37)</i>	20°C	48	23	107
<i>pvf-1 (ev763); plx-1 (nc37)</i>	25°C	100	0	123

Tutti i ceppi hanno il gene reporter *ajm-1::GFP* e sono in un “background” *him-5(e1490)* che permette di avere un’alta percentuale di maschi. Tutti gli animali sono cresciuti alle temperature indicate.

Per determinare se l’aumento di difetto nel doppio mutante *pvf-1 (ev763); plx-1 (ev724)* è dovuto all’assenza di PVF-1, è stato iniettato in questo ceppo un plasmide contenente il gene completo di *pvf-1* per ottenere il recupero del fenotipo. Questa linea transgenica recupera il difetto di localizzazione di R1, confermando che PVF-1 è coinvolto in un meccanismo molecolare che regola la posizione di R1 della coda del maschio.

Altri geni, come *unc-73* e *mig-2*, codificanti rispettivamente una proteina coinvolta nell’attivazione delle proteine RAC ed una RAC GTPasi, sono richiesti per la corretta localizzazione di questo raggio (Dalpè et al., 2004).

Il ceppo *pvf-1(ev763)* è stato incrociato sia con un allele mutante di *unc-73*, *unc-73(e936)*, sia con un mutante “gain of function” di *mig-2*, *mig-2(gm103)*. Dall’analisi di entrambi i doppi mutanti di *pvf-1* si rileva una altissima penetranza di fenotipo rispetto ai singoli mutanti già a 20°C proprio come accade per i doppi mutanti di *plx-1* (tabelle 2 e 3).

Tab.2. Fenotipo raggio 1 anteriore nei ceppi mutanti *unc-73*, *pvf-1* e *plx-1*

Genotipo	Raggio 1 classe 1 (%)	Raggio 1 classe 2 (%)	n
<i>unc-73(e936)</i>	61	15	119
<i>plx-1 (ev724)</i>	10	39	359
<i>pvf-1 (ev763)</i>	0	0	130
<i>pvf-1 (ev763); unc-73 (e936)</i>	100	0	133
<i>plx-1 (ev724); unc-73 (e936)</i>	97	2	127

Tutti i ceppi hanno il gene reporter *ajm-1::GFP* e sono in un “background” *him-5(e1490)* che permette di avere un’alta percentuale di maschi. Tutti gli animali sono cresciuti alle temperature indicate.

Tab. 3. Fenotipo raggio 1 anteriore nei ceppi mutanti *mig-2* e *pvf-1*

Genotipo	Raggio 1 classe 1 (%)	Raggio 1 classe 2 (%)	n
<i>mig-2(gm 103)</i>	91	1	130
<i>pvf-1 (ev763)</i>	0	0	130
<i>pvf-1 (ev763); mig-2 (gm103)</i>	100	0	142

Tutti i ceppi hanno il gene reporter *ajm-1::GFP* e sono in un “background” *him-5(e1490)* che permette di avere un’alta percentuale di maschi. Tutti gli animali sono cresciuti alle temperature indicate.

Questi ultimi dati confermano che *pvf-1*, insieme ai geni *plx-1*, *unc-73* e *mig-2* è una molecola coinvolta in un segnale di attrazione di R1 all’interno del fano.

2.5 Il “pathway” genetico di *PVF-1* non coinvolge i recettori *VER-3* e *VER-4*

In *C.elegans* è stata identificata, per omologia di sequenza, una famiglia di quattro recettori tirosina chinasi strutturalmente correlata ai VEGFRs identificati nei vertebrati. A questa famiglia, chiamata VER (Vascular Endothelial growth factor receptor Related), appartengono i geni *ver-1(T17A3.1)*, *ver-2(T17A3.8)*, *ver-3(F59F3.1)*, *ver-4 (F59F3.5)* che sono espressi in cellule di origine muscolare e neuronale (Popovici C. et al., 2002). In particolare per i geni *ver-3* e *ver-4* sono disponibili, presso il laboratorio del Dott.Culotti, Canada, i rispettivi mutanti di delezione.

Il ceppo mutante *ver-3(ev760)* ha una delezione della sequenza genomica di *ver-3* che determina la perdita del dominio immunoglobulinico N-terminale, mentre il ceppo mutante *ver-4(ev761)* ha una delezione che causa la perdita del dominio tirosina chinasi. Le funzioni ed i meccanismi molecolari di questi recettori di *C.elegans* non sono stati ancora chiariti in quanto i singoli mutanti di *ver-3* e *ver-4* non mostrano alcuna alterazione morfologica evidente proprio come *pvf-1(ev763)*.

Allo scopo di verificare se VER-3 e VER-4, come PVF-1 e PLX-1, sono coinvolti nella localizzazione di R1 della coda del maschio, i ceppi *ver-3(ev760)* e *ver-4(ev761)* sono stati incrociati sia con l'allele mutante *plx-1(ev724)* sia con *pvf-1(ev763)*. Dall'osservazione delle code dei maschi, mediante un microscopio ad alta risoluzione ed a fluorescenza, è evidente che il doppio mutante *ver-3(ev760); plx-1(ev724)* mostra una penetranza di fenotipo sia di classe 1 che di classe 2 più bassa rispetto al singolo mutante *plx-1(ev724)* (tab. 4). Al contrario, per il doppio mutante *ver-4(ev761); plx-1(ev724)* la penetranza di fenotipo sia di classe 1 che di classe 2 aumenta rispetto al singolo mutante di *plx-1*, proprio come il doppio mutante *pvf-1(ev763); plx-1(ev724)* (tab. 4).

Tab. 4. Fenotipo raggio 1 anteriore nei ceppi mutanti *ver-3*, *ver-4* e *plx-1*

Genotipo		Raggio 1 classe 1 (%)	Raggio 1 classe 2 (%)	n
<i>ver-3 (ev760)</i>	20°C	0	0	142
<i>ver-3 (ev760)</i>	25°C	0	0	131
<i>ver-4 (ev761)</i>	20°C	0	0	137
<i>ver-4 (ev761)</i>	25°C	0	0	140
<i>plx-1 (ev724)</i>	20°C	10	39	359
<i>plx-1 (ev724)</i>	25°C	32	50	157
<i>ver-3 (ev760); plx-1 (ev724)</i>	20°C	0	0	115
<i>ver-3(ev760); plx-1 (ev724)</i>	25°C	2	70	122
<i>ver4 (ev761); plx-1 (ev724)</i>	20°C	25	61	123
<i>ver4 (ev761); plx-1 (ev724)</i>	25°C	27	61	135

Tutti i ceppi hanno il gene reporter *ajm-1::GFP* e sono in un "background" *him-5(e1490)* che permette di avere un'alta percentuale di maschi. Tutti gli animali sono cresciuti alle temperature indicate.

I doppi mutanti *pvf-1(ev763);ver-3(ev760)* e *pvf-1(ev763);ver-4(ev761)* non mostrano il difetto di migrazione del primo raggio proprio come i singoli mutanti (tab.5).

Quest'ultimo risultato non esclude la possibilità che PVF-1 sia il ligando del recettore VER-4, in quanto entrambi insieme a PLX-1 sono coinvolti nel processo di migrazione del suddetto raggio. Per verificare questa ipotesi è stato incrociato il doppio mutante *pvf-1(ev763); ver-4(ev761)* con il mutante *plx-1(ev724)*. Dall'analisi delle code del maschio del triplo mutante *pvf-1(ev763); ver-4(ev761); plx-1(ev724)* risulta che la penetranza di fenotipo è aumentata fino al cento per cento rispetto ai singoli mutanti (tab.5).

Tab. 5. Fenotipo raggio 1 anteriore nei ceppi mutanti *ver-4*, *plx-1* e *pvf-1*

Genotipo	Raggio 1 classe 1 (%)	Raggio 1 class 2 (%)	n
<i>ver-4 (ev761) 20°C</i>	0	0	142
<i>ver-4 (ev761) 25°C</i>	0	0	131
<i>plx-1 (ev724) 20°C</i>	10	39	359
<i>plx-1 (ev724) 25°C</i>	32	50	157
<i>pvf-1 (ev763) 20°C</i>	0	0	130
<i>pvf-1 (ev763) 25°C</i>	0	0	110
<i>ver-4 (ev761); pvf-1 (ev763) 20°C</i>	0	0	115
<i>ver-4 (ev761); pvf-1 (ev763) 25°C</i>	0	0	122
<i>ver4 (ev761); plx-1 (ev724) 20°C</i>	25	61	123
<i>ver4 (ev761); plx-1 (ev724) 25°C</i>	27	61	135
<i>ver4 (ev761); pvf-1 (ev763); plx-1 (ev724) 20°C</i>	50	29	105
<i>ver4 (ev761); pvf-1 (ev763); plx-1 (ev724) 25°C</i>	100	0	112

Tutti i ceppi hanno il gene reporter *ajm-1::GFP* e sono in un "background" *him-5(e1490)* che permette di avere un'alta percentuale di maschi. Tutti gli animali sono cresciuti alle temperature indicate.

Questo dato dimostra che PVF-1 non può essere il ligando del recettore VER-4 in questo specifico meccanismo molecolare, poichè la penetranza di fenotipo del triplo mutante, *ver4 (ev761); pvf-1 (ev763); plx-1 (ev724)* non è uguale a quella del doppio *pvf-1 (ev763); plx-1 (ev724)*.

In conclusione questa analisi genetica ha evidenziato che PVF-1 e VER-4 agiscono insieme a PLX-1 nel processo di migrazione del primo raggio della coda.

DISCUSSIONE

1.1 PVF-1 è un membro della famiglia VEGF

In questo lavoro di tesi sperimentale, volto alla comprensione della funzione del gene *pvf-1* in *C.elegans* ed alla identificazione di nuove molecole che possono interagire con *pvf-1*, si dimostra che questa proteina è un membro della famiglia PDGF/VEGF e conserva le caratteristiche biochimiche e funzionali dei membri di tale famiglia. Infatti i risultati ottenuti, dimostrano che PVF-1 è una proteina N-glicosilata, secreta dalla cellula come dimero. Il monomero migra con una banda di peso molecolare di circa 30 kDa, come atteso, ed altre bande di peso molecolare inferiore rispetto alla banda principale. Al momento non si conosce l'origine di queste bande che sono simili a quelle descritte per la proteina PVF-1 di *Drosophila* (Rosin D. et al., 2004). Si può solo ipotizzare che siano dovute o a modificazioni postraduzionali o a tagli enzimatici non specifici. Inoltre PVF-1 è anche in grado di legarsi all'eparina e ciò suggerisce che, come i fattori di crescita della famiglia PDGF/VEGF, può essere mantenuto in uno stato inattivo attraverso il suo legame con componenti eparino-simili della matrice extracellulare in particolari situazioni, fisiologiche o patologiche. I membri della famiglia PDGF/VEGF, come probabilmente anche PVF-1, sono poi rilasciati in forma attiva mediante l'azione di enzimi proteolitici che degradano tale matrice (Ruoslahti et al., 1991). Testando la capacità della proteina di legare i diversi recettori di tipo tirosin-chiansico, si è dimostrato che PVF-1 si lega con maggior affinità a hFlt-1 rispetto a hKDR e non è in grado di legare il recettore hPDGFR β . Questo risultato suggerisce che PVF-1 è una proteina con caratteristiche strutturali più simili ai membri della famiglia VEGF rispetto alla famiglia PDGF, in particolare a hVEGF-A. Infatti è noto che hVEGF-A, hVEGF-B, hPIGF, e l'eterodimero VEGF-A/PIGF sono tutti ligandi di hFlt-1, ma solo uno di loro, hVEGF-A, si lega anche a hKDR con una minore affinità rispetto al legame con hFlt-1. Questa ipotesi è stata ulteriormente confermata dai risultati ottenuti da un tipo di saggio ELISA, definito di competizione diretta. In questo saggio infatti ad una concentrazione

costante di PVF-1 che si lega al recettore viene aggiunta prima una concentrazione crescente di competitore, in questo caso hVEGF-A₁₆₅, e poi un anticorpo che riconosce PVF-1. In questo modo non è stato possibile rivelare la competizione tra hVEGF-A₁₆₅ e PVF-1 per il sito di legame a hFlt-1, poichè inaspettatamente l'anticorpo che avrebbe dovuto riconoscere solo PVF-1, riconosceva anche hVEGF-A₁₆₅. Questo risultato quindi conferma che le due proteine hanno una struttura proteica molto conservata.

Un secondo tipo di saggio ELISA, definito di competizione indiretta, ha dimostrato invece che il legame di PVF-1 al recettore hFlt-1 è specifico ed avviene nello stesso sito del recettore dove si lega hVEGF-A₁₆₅. In questo caso aggiungendo una concentrazione molare di competitore dieci volte in eccesso rispetto alla concentrazione molare di hVEGF-A₁₆₅, che satura tutti i siti di legame delle molecole di recettore, si ottiene una diminuzione del legame di hVEGF-A₁₆₅ al recettore pari al 40%. Questa percentuale di legame di hVEGF-A₁₆₅ a hFlt-1 in presenza del competitore è significativa considerando la grande distanza evolutiva che c'è tra il nematode e l'uomo ed il fatto che hVEGF-A ha un'affinità di legame al recettore hFlt-1 più alta rispetto a PVF-1.

Inoltre i risultati, ottenuti dai saggi di immunoprecipitazione, di "Capillary-like tube formation" *in vitro* e di "Chorioallantoic membrane assay" (CAM) *in vivo*, dimostrano che PVF-1 non solo è in grado di legare, ma anche di attivare il recettore inducendo la fosforilazione dei residui di tirosina e di indurre angiogenesi.

L'induzione dell'angiogenesi da parte di PVF-1 è paragonabile sia *in vitro* che *in vivo* a quello dei membri della famiglia PDGF/VEGF, ma le concentrazioni di PVF-1 usate in questi esperimenti sono sempre più alte rispetto a quelle dei fattori di crescita. Le ragioni di questa differenza di concentrazione tra PVF-1 e le altre proteine usate nei due saggi funzionali possono essere due. La prima è che una parte di PVF-1 prodotta dalle cellule di mammifero, come è visibile anche per analisi mediante *Western Blot*, probabilmente subisce dei tagli enzimatici che determinano la formazione di una proteina processata non attiva biologicamente. La seconda ragione è che a causa della grande distanza evolutiva tra i vertebrati e gli invertebrati, si deve considerare che l'affinità di legame al recettore hFlt-1 è più alta per hVEGF-A₁₆₅ e hPlGF, i suoi rispettivi ligandi, rispetto a PVF-1.

1.2 PVF-1 è una proteina coinvolta nel processo di migrazione cellulare neuronale in *C.elegans*

E' stato dimostrato in questo lavoro sperimentale che la proteina PVF-1 è espressa a bassi livelli nelle cellule muscolari striate del verme durante lo stadio larvale tra L2 ed L3. Infatti l'immunofluorescenza eseguita sul ceppo selvatico N2 non ha permesso di rivelare la presenza della proteina endogena.

In *C.elegans* molti processi di migrazione cellulare, che portano ad esempio alla sviluppo della vulva, delle gonadi, o della coda del maschio, iniziano proprio tra lo stadio larvale L2 ed L3. Quindi il fatto che PVF-1 è espresso proprio in questa finestra temporale ed è in grado di indurre angiogenesi *in vivo* ed *in vitro* nei vertebrati, suggerisce che può essere coinvolto in qualche specifico processo di migrazione cellulare, probabilmente neuronale visto che il nematode non ha un sistema vascolare. D'altronde anche in *Drosophila* i membri di questa famiglia sono coinvolti in processi di migrazione cellulare, infatti i mutanti di *Pvr* (PDGF/VEGF receptor) mostrano difetti di localizzazione delle cellule gliali del sistema nervoso centrale (Sears H.C. et al., 2003).

Il mutante *pvf-1(ev763)* isolato in collaborazione con il Dott.Culotti, è un putativo mutante nullo per due ragioni: 1) la regione genomica deleta comprende l'ATG d'inizio della proteina; 2) analizzando la sequenza del gene deleta si può escludere la presenza di altre ORF (open reading frame) che potrebbero determinare la traduzione di una proteina mutata. Inoltre anche se fossero presenti trascritti aberranti stabili, questi ultimi sarebbero tradotti in proteine mutate, la cui sequenza non conterrebbe tutte le cisteine che sono state descritte in letteratura essere importanti per la dimerizzazione e l'attività biologica di tutti i membri della famiglia PDGF/VEGF. La proteina non è essenziale per lo sviluppo embrionale infatti i vermi mutanti sono vivi, riescono a completare lo sviluppo embrionale e non presentano alcuna apparente alterazione morfologica. Questo risultato non è stato inaspettato in quanto i "knock-out" murini dei membri della famiglia PDGF/VEGF, escluso VEGF-A e PDGF-A, sono vitali. Un esempio è il "knock-out" murino di PlGF che in condizioni fisiologiche non mostra alcun difetto, ma solo in condizioni patologiche mostra difetti nei processi di infiammazione e di neoangiogenesi (Carmeliet et al., 2001).

La ricerca di un fenotipo dei vermi omozigoti nulli per *pvf-1* è iniziata incrociando *pvf-1(ev763)* con mutanti di geni la cui funzione è già nota, al fine non solo di capire in quale processo biologico è coinvolto *pvf-1*, ma anche di scoprire gli altri geni con cui può interagire. I mutanti da incrociare con *pvf-1(ev763)* sono stati scelti considerando due aspetti. Il primo è

che nei vertebrati la famiglia VEGF e Semaforina sono entrambe coinvolte nello sviluppo del sistema vascolare ed hanno in comune la famiglia recettoriale delle Neuropiline.

Il secondo aspetto è che PVF-1 legandosi ai recettori VEGFR, sembra essere correlato strutturalmente più alla famiglia VEGF che PDGF.

Per queste due ragioni *pvf-1(ev763)* è stato incrociato con mutanti dei geni della famiglia dei recettori delle Semaforine, le Plessine, e dei recettori della famiglia VEGF. In *C.elegans* recentemente infatti sono stati identificati geni omologhi alle famiglie delle Semaforine, delle Plessine e dei recettori VEGF dei vertebrati, inoltre per alcuni di essi sono stati anche isolati e caratterizzati i mutanti. In particolare il gene di *plx-1* che codifica il recettore Plessina-A è coinvolto nel processo di migrazione delle cellule di tipo neuronale che costituiscono il primo raggio della coda del maschio (Dalpè G. et al., 2004).

La coda del maschio presenta una struttura costituita da una membrana detta fano al cui interno ci sono nove raggi a simmetria bilaterale. Ciascun raggio si forma attraverso due fasi. Durante la prima fase, dopo una serie di divisioni cellulari, si ha la formazione di tre cellule: due neuronali sensoriali ed una di tipo strutturale. Durante la seconda fase i dendriti delle cellule neuronali migrano e determinano la specifica localizzazione dei raggi.

Lo sviluppo della coda del maschio può essere usato come un modello quindi per studiare i meccanismi molecolari della migrazione cellulare. Inoltre il fatto che i due alleli mutanti di *plx-1*, chiamati *plx-1(nc37)* e *plx-1(ev724)*, mostrano un difetto di localizzazione del primo raggio della coda la cui penetranza di fenotipo non è 100%, suggerisce che questo processo è regolato da diversi meccanismi molecolari.

L'analisi dei doppi mutanti, *pvf-1(ev763);plx-1(ev724)* e *pvf-1(ev763); plx-1(nc37)*, rivela che l'assenza di PVF-1 determina un aumento del difetto di localizzazione del primo raggio della coda del maschio rispetto ai singoli mutanti di *plx-1*. Questi primi risultati rivelano che PVF-1 può essere una proteina coinvolta nella migrazione cellulare del primo raggio.

Questa ipotesi è stata confermata dai dati ottenuti successivamente dall'analisi dei doppi mutanti *pvf-1(ev763); mig-2 (gm103)*, *pvf-1(ev763); unc-73(e936)*. *mig-2* ed *Unc-73* codificano rispettivamente una proteina coinvolta nell'attivazione dei geni RAC-GTPasi, ed una RAC-GTPasi, entrambi richiesti per la corretta migrazione del primo raggio della coda (Dalpè G. et al., 2004). I doppi mutanti mostrano anche in questo caso un aumento di penetranza del fenotipo rispetto ai singoli mutanti. Inoltre una linea transgenica iniettata con un plasmide contenente il gene completo di *pvf-1* nella gonade del doppio mutante *pvf-1(ev763);plx-1(ev724)* recupera il fenotipo, confermando la specificità di azione di PVF-1.

Questa analisi genetica dimostra che il processo di migrazione del primo raggio della coda del maschio avviene mediante più meccanismi molecolari, quali quello delle semaforine e quello di PVF-1, agendo mediante una proteina RAC-GTPasi (fig. 31).

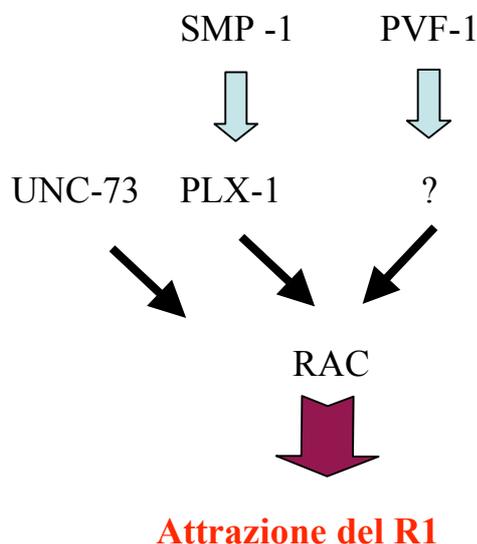


Figura 31 - Modello di meccanismo molecolare di PLX-1 e PVF-1 coinvolti nella localizzazione del raggio 1 della coda del maschio. PVF-1 agisce con un "pathway" parallelo a quello di PLX-1 ed UNC-73, ma attraverso le proteine RAC.

In *C.elegans* sono stati identificati, per omologia di sequenza ai VEGFRs dei vertebrati, quattro recettori tirosin-chinasici, chiamati *ver-1*, *ver-2*, *ver-3* e *ver-4* (Popovici et al., 1999). Un'analisi approfondita dell'espressione spazio-temporale di questi geni non è stata ancora condotta, ma sono stati isolati i mutanti di *ver-3* e *ver-4* che sono vitali e non mostrano, proprio come *pvf-1(ev763)*, alcuna alterazione morfologica evidente. I risultati dei doppi mutanti, *plx-1(ev724); ver-3(ev761)* e *plx-1(ev724); ver-4(ev760)* rivelano che solo il gene *ver-4* si comporta come *pvf-1* la cui assenza determina l'aumento del difetto di localizzazione del primo raggio, mentre l'assenza di *ver-3* sembra sopprimere tale fenotipo. Questi dati suggeriscono che *ver-4* è un gene coinvolto nel processo di migrazione del primo della coda e potrebbe essere il recettore di PVF-1 (fig. 32).

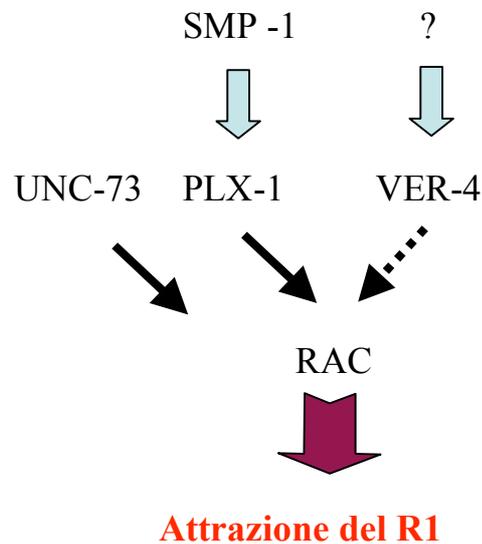


Figura 32 - Modello di meccanismo molecolare di PLX-1 e VER-4 coinvolti nella localizzazione del raggio 1 della coda del maschio. VER-4 agisce con un “pathway” parallelo a quello di PLX-1 ed UNC-73, ma ancora sconosciuto è il suo ligando. La freccia costituita da puntini rappresenta l’ipotesi che VER-4, così come PLX-1, possa presentare a valle del suo “pathway” le proteine RAC.

Infine l’analisi del triplo mutante dei geni *plx-1*, *ver-4* e *pvf-1* mostrando una penetranza di fenotipo maggiore rispetto a quella del doppio mutante di *plx-1* e *ver-4*, permette di escludere una interazione tra il recettore VER-4 ed il ligando PVF-1.

Si può concludere quindi che il processo che determina la migrazione delle cellule che costituiscono il primo raggio della coda del maschio è regolato da più meccanismi molecolari, dove quello regolato da Semaforina e Plessina dà un contributo maggiore al processo di migrazione rispetto agli altri “pathway” coinvolti, quello di PVF-1 e VER-4 (*fig.33*).

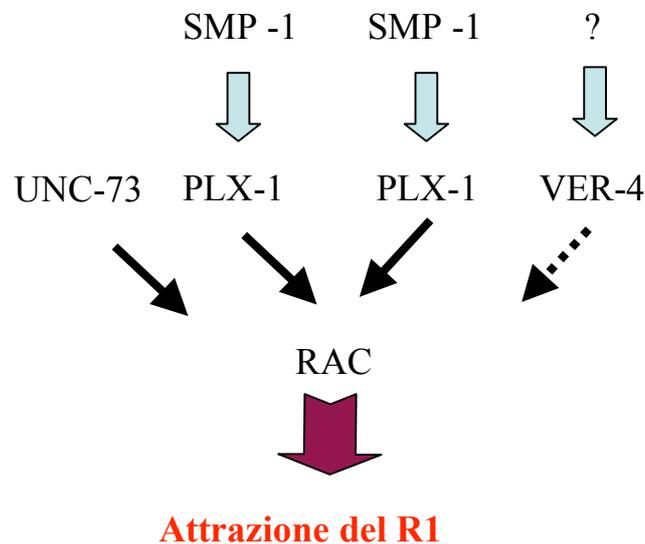


Figura 33 - Modello di meccanismo molecolare di PLX-1, PVF-1 e VER-4 coinvolti nella localizzazione del raggio 1 della coda del maschio. VER-4 non è il recettore di PVF-1 ed agisce in questo meccanismo con un “pathway” parallelo a quello di PVF-1. Il processo di attrazione del raggio 1 all’interno del fano è mediato dall’azione dei geni RAC.

Infatti i singoli mutanti di *smg-1* e del recettore *plx-1* mostrano una penetranza di fenotipo al contrario dei singoli mutanti di *pvf-1* e *ver-4* che non mostrano difetti di migrazione del primo raggio della coda del maschio.

Dall’analisi genetica dei mutanti si può proporre un modello di meccanismo molecolare in cui PVF-1, secreta dalle cellule muscolari striate durante il terzo stadio larvale, agisce mediante un recettore, ancora sconosciuto, sulle cellule neuronali del primo raggio della coda del maschio. Il meccanismo di trasduzione del segnale coinvolge i geni RAC-GTPasi che agiscono in diversi processi di migrazione e crescita degli assoni.

Si può ipotizzare inoltre un ruolo di PVF-1 anche in altri meccanismi di migrazione cellulare. Recentemente infatti è stato dimostrato che Semaforina-1 e Plessina-1 sono coinvolti nella morfogenesi della vulva (Dalpè G. et al., 2005). Anche in questo caso i singoli mutanti hanno una penetranza di fenotipo che non è 100% e ciò suggerisce che PVF-1 potrebbe regolare insieme a queste proteine il processo di sviluppo della vulva.

In conclusione l’aver identificato un membro della famiglia PDGF/VEGF in *C.elegans* dove un sistema vascolare non c’è e l’aver dimostrato che agisce in un processo di migrazione

cellulare neuronale insieme ad altri geni coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso, sono di supporto all'ipotesi che i fattori che guidano la migrazione dei vasi nei vertebrati sono anche in grado di guidare i coni di crescita assonali, avvalorando così l'ipotesi di un legame evolutivo tra neurogenesi ed angiogenesi. Altre proteine di *C.elegans* omologhe a proteine dei vertebrati coinvolte nello sviluppo del sistema vascolare, svolgono un ruolo nello sviluppo del sistema nervoso del verme. Un esempio sono la famiglia delle Efrine ed i loro recettori implicati nello sviluppo del sistema vascolare nei vertebrati, i cui mutanti in *C.elegans* mostrano difetti nello sviluppo del sistema nervoso (Chin-Sang I.D. et al., 1999). Questi recenti dati mettono in evidenza come una proteina possa svolgere in diversi sistemi cellulari più funzioni e di come spesso la tendenza ad assegnare un gene o una proteina ad un unico sistema sia errata.

BIBLIOGRAFIA

- Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, and Klein R. (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 13: 295–306.
- Ahringer, (1997). Turn to the worm, *Current Opinion in Genetics e Development* 7, 410-415.
- Battegay, E. J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E. H., Pech, M. (1994). PDGF-BB Modulates Endothelial Proliferation and Angiogenesis In Vitro via PDGF β -Receptors, *The Journal of Cell Biology* 125, 917-928.
- Barleon B., Totzke F., Herzog C., Blanke S., Kremmer E., Siemeister G., Marme D., Martiny-Baron G. (1997). Expression of the VEGF-related factor gene in pre- and postnatal mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 147-152.
- Bazzicalupo P. (1983). C.elegans: model system for the study of nematodes, *Molecular Biology of Parasites* (curatori Guardiola J., Luzzato L., Trager W.), Raven Press, N.Y., 73-91.
- Bonthron D. T., Morton C. C., Orkin, S. H., Collins, T. (1988). Platelet-derived growth factor A chain: Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 1492-1496.
- Breier G., Albrecht U., Sterrer S., Risau W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development, *Dev. Dyn.* 204, 228-239.
- Bussolino, F., Mantovani A., Persico M. G. (1997). Molecular mechanisms of blood vessel formation. *TIBS* 22, 251-256.
- Cao Y., Chen H., Zhou L., Chiang M.-K., Anand-Apte B., Weatherbee J. A., Wang Y., Fang F., Flanagan J. G., Lik-Shing Tsang M. (1996a). Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR, *J. Biol. Chem.* 271, 3154-3162.

- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyet, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, K., Harpal, H., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature* 380, 435-439.
- Carmeliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compennolle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions, *Nat. Med.* 7(5):575-83.
- Carmeliet, P. (2003). Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nature Rev. Genet.* 4, 710–720.
- Carmeliet P. and Tessier-Lavigne M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring, *Nature* 436, 193-200.
- Chin-Sang I.D., George S.E., Ding M., Moseley S.L., Lynch A.S. and Chisholm A.D. (1999). The ephrin VAB-2/EFN-1 functions in neuronal signaling to regulate epidermal morphogenesis in *C.elegans*, *Cell* 99, 781-790.
- Colavita A., Krishna S., Zheng H., Padgett R.W., Culotti J.G. (1998). Pioneer Axon Guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF- β , *Science* 281, 706-709.
- Collins, T., Bonthron, T. D., Orkin, S. H. (1987). Alternative RNA splicing affects function of encoded platelet-derived growth factor A-chain, *Nature* 328, 123-129.
- Coupon, A., Kozano, Y., Lutterbach, B., Shown Keen, R., Sulston, J., Waterston, R. (1991). YACS and the *C.elegans* genome, *Bioessays* 13, 413-417.
- Dalpè, G., Zhang, L. W., Zheng, H. and Culotti, J. G. (2004). Conversion of cell movement responses to Semaphorin-1 and Plexin-1 from attraction to repulsion by lowered levels of specific RAC GTPases in *C. elegans*. *Development* 131, 2073-2088.
- Dalpè G., Brown L. and Culotti J.G. (2005). Vulva morphogenesis involves attraction of plexin 1-expressing primordial vulva cells to semaphorin 1a sequentially expressed at the vulva midline, *Development* 132, 1387-1400.
- Di Palma T., Tucci M., Russo G., Maglione D., Lago C. T., Romano A., Saccone S., Della Valle G., De Gregorio L., Dragani T. A., Viglietto G., Persico M. G. (1996). The placenta growth factor gene of the mouse, *Mamm. Gen.* 7, 6-12.
- Di Salvo J., Bayne M. L., Conn G., Kwock PW., Trivedi P. G., Soderman D. D., Palisi T.M., Sullivan K. A., Thomas K. A. (1995). Purification and characterization of a naturally

- occurring vascular endothelial growth factor – placenta growth factor, *J. Biol. Chem.* 270, 7717- 7723.
- Doolittle R. F., Hunkapiller M. W., Hood L., Devare S. G., Robbins K. C., Aaronson S. A., Antoniades H. N. (1983). Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding platelet-derived growth factor, *Science* 221, 275-277.
 - 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.
 - Errico M., Riccioni T., Iyer S., Pisano C., Acharya K.R., Persico M.G. and DeFalco,S.(2004). Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *J. Biol. Chem.* **279**, 43929-39.
 - Facchiano A., De Marchis F., Turchetti E., Facchiano F., Guglielmi M., Denaro A., Palombo R., Scoccianti M., Caporossi M. C. (2000). The chemotactic and mitogenic effects of platelet-derived growth factor-BB on rat aorta smooth muscle cells are inhibited by basic fibroblast growth factor, *Journal of Cell Science* 113, 2855-2863.
 - Ferrara N., Carter Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O’Shea K. S., Powell Braxton L., Hillan K. J., Moore M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene, *Nature* 380, 439-442.
 - Ferrara N., Davis-Smith T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocr. Rev.* 18, 4-25.
 - Ferrara N., Chen H., Davis-Smith T., Gerber H. P., Nguyen T. N., Peers D., Chisholm V., Hillan K. J., Schwall R. H. (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis, *Nat. Med.* 4, 336-340.
 - Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostos S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *C.elegans*, *Nature* 391, 806-811.
 - Fitzgerald K. and Greenwald I. (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo, *Development* 121, 4275-4282.
 - Fruttiger M., Karlsson L., Hall A. C., Abramsson A., Calver A. R., Bostrom H., Willetts K., Bertold C. H., Heath J. K., Betsholtz C., Richardson W. D. (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A Knockout mice, *Development* 126, 457-467.

- Fujii T., Nakao F., Shibata Y., Shioi G., Kodama E., Fujisawa H., and Takagi S. (2002). *Caenorhabditis elegans* PlexinA, PLX-1, interacts with transmembrane semaphorins and regulates epidermal morphogenesis, *Development* 129, 2053-2063.
- Fujisawa, H. (2004). Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J. Neurobiol.* 59, 24–33.
- Gerhardt, H. Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177.
- Gitler A.D., Lu M.M., and Epstein J.A. (2004). PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev. Cell* 7: 107–116.
- Gray H. Gray's Anatomy. Churchill Livingstone, 1995. Hamelin M., Scott I.M., Way J.C., and Culotti J. G. (1992). The mec-7 β -tubulin gene of *Caenorhabditis elegans* is expressed primarily in the touch receptor neurons, *EMBO J.* vol. 11 no.8 , 2885 – 2893.
- Gu C., Rodriguez E.R., Reimert D.V., Shu T., Fritsch B., Richards L.J., Kolodkin A.L., Ginty D.D. (2003) Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signalling during neural and cardiovascular development. *Dev. Cell* 5, 45–57 .
- Hammacher A., Mellstrom K., Heldin C. H., Westermark B. (1989). Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer, *EMBO J.* 8, 2489-2495.
- Hamelin M., Scott I.M., Way J.C. and Culotti J.G. (1992). The mec-7 β -tubulin gene of *Caenorhabditis elegans* is expressed primarily in the touch receptor neurons, *EMBO J.* 11 no.8, 2885 – 2893.
- Huber A. B., Kolodkin A. L., Ginty D. D. and Cloutier J. F. (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 509–563.
- Joukov V., Pajusola K., Kaipaine A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases, *EMBO J.* 15, 290-298.
- Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K. (1997). Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C, *EMBO J.* 16, 3898-3911.
- Landgren E., Shiller P., Cao Y. and Claesson-Welsh L. (1998). Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt-1, *Oncogene* 16, 359-367.

- Lagercrantz J., Larsson C., Grimmond S., Fredriksson M., Weber G., Piehl F. (1996). Expression of the VEGF-related factor gene in pre- and postnatal mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 147-152.
- Levy A. P., Levy N. S., Goldberg M. A. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia, *J. Biol. Chem.* 271, 2746-2753.
- Li X., Potèn A., Aase K., Karisson L., Abramssont A., Uutela M., Backstrom G., Hellstrom M., Bostrom H., Li H., Soriano P., Betsholtz C., Heldin C. H., Alitalo K., Ostman A., Eriksson U. (2000). PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF α -receptor, *Nature Cell Biology* 2, 302-309.
- Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M. G., Aprelikova O., Alitalo K., Del Vecchio S., Lei K. J., Chou J. Y., Persico M. G. (1993a). Two alternative m RNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14, *Oncogene* 8, 925-931.
- Mello C.C., Kramer J.M., Stinchcomb D., Ambros V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* 10(12):3959-70.
- Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., Waltenberger J., Augustin H. G., Ziche M., Lanz C., Buttner M., Rziba H. J., Dehio C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases, *EMBO J.* 18, 363-374.
- Migdal M., Huppertz B., Tessler S., Comforti A., Shibuya M., Reich R., Baumann H., Neufeld G. (1998). Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor, *J. Biol. Chem.* 273, 22272-22278.
- Mukoyama Y. S., Shin D., Britsch S., Taniguchi M. and Anderson D. J. (2002). Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109, 693–705.
- Nistèr M., Hammacher A., Mellstrom K., Siegbahn A., Ronnstrand L., Westermark B., Heldin C. H. (1988a). A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities than a PDGF AB heterodimer purified from human platelets, *Cell* 52, 791-799.
- Oh S. J., Jeltsch M. M., Birkenhager R., McCarthy J. E. G., Weich H. A., Christ B., Alitalo K., Wilting J. (1997). VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane, *Dev. Biol.* 188, 96-109.

- Oosthuysen B., Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermynlen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor degeneration, *Nat. Genet.* 28:131–138.
- Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., Von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana O., Pettersson R., Alitalo K., Eriksson U. (1996a). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2576-2581.
- Olofsson B., Pajusola K., Von Euler G., Chilov D., Alitalo K., Eriksson U. (1996b). Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform, *J. Biol.Chem.* 271, 19310-19317.
- Orlandini M., Marconcini L., Ferruzzi R., Oliviero S. (1996). Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11675-11680.
- Pasterkamp R.J. and Kolodkin A.L.(2003). Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 13: 79–89.
- Pertovaara L., Kaipainen A., Mustonen T., Orpana A., Ferrara N., Saksela O., Alitalo K. (1994). Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells, *J. Biol.Chem.* 269, 6271-6274.
- Popovici C., Roubin R., Coulier F., Pontarotti P. and Birnbaum D. (1999). The family of *Caenorhabditis elegans* tyrosine kinase receptors: similarities and differences with mammalian receptors, *Genome Res.* 9, 1026-1039.
- Popovici C., Isnardom D., Birnbaum D. and Roubin R. (2002). *Caenorhabditis elegans* receptors related to mammalian vascular endothelial growth factor receptors are expressed in neural cells, *Neuroscience letters* 329, 116-120.
- Potgens A. J. G., Lubsen N. H., Van Altena M. C., Vermeulen R., Bakker A., Schoenmakers J. G. G., Ruiter D. J., Waal R. M. W. (1994). Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from cys to ser mutation, *J. Biol. Chem.* 269, 32879-32885.
- Roberts W.G. and Palade G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial growth factor, *J. Cell Sci* 108, 2369-2379.
- Rorsman F., Bywater M., Knott T., Scott J., Betsholtz C. (1988). Structural Characterization of the Human Platelet-Derived Growth Factor A-Chain cDNA and Gene: Alternative Exon

- Usage Predicts Two Different Precursor Proteins, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 8, 571-577.
- Rosin D., Scheijter E., Volk T. and Shilo B. Z. (2004) Apical accumulation of the Drosophila PDGF/VEGF receptor ligands provides a mechanism for triggering localized actin polymerization, *Development* **131**, 1939-1948
 - Ruoslahti E., Yamaguchi Y. (1991). Proteoglycans as Modulators of Growth Factor Activities, *Cell* 64, 867-869.
 - Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - Sears H.C., Kennedy C.J., Garrity P.A. (2003). Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal Drosophila CNS morphogenesis, *Development* 130(15):3557-65.
 - Serini G., Valdembri D., Zanivan S., Morterra G., Burkhardt C., Caccavari F., Zammataro L., Primo L., Tamagnone L., Logan M., Tessier-Lavigne M., Taniguchi M., Puschel A.W., and Bussolino F. (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function, *Nature* 424, 391–397.
 - Simske J. S. and Hardin J. (2001). Getting into shape: epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* embryos, *BioEssays* 23, 12-23.
 - Soker S., Takashima S., Miao H. Q., Neufeld G. and Klagsbrun M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumour cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735–745.
 - Sulston J. E., Schierenberg E., White J. G., Thomson Jn. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Dev. Biol.* 100, 64-119.
 - Tessier-Lavigne M. and Goodman C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance, *Science* 274, 1123–1133.
 - Tisher E., Mitchel R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J. C., Abraham J. A. (1991). The human gene for vesicular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing, *J. Biol. Chem.* 266, 11974-11984.
 - Torres-Vazquez J., Gitler A.D., Fraser S.D., Berk J.D., Van N.P., Fishman M.C., Childs S., Epstein J.A., and Weinstein B.M. (2004). Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature, *Dev. Cell* 7: 117–123.
 - Vuorela P., Hatva E., Lymboussaki A., Kaipainen A., Joukov V., Persico M. G., Alitalo K., Halmesmaki E. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta, *Biology of Reprod.* 56, 489-494.

- Ziche M., Maglione D., Ribatti D., Morbidelli L., Lago C. T., Battisti M., Paletti I., Barra A., Tucci M., Parise G., Vincenti V., Granger H. J., Viglietto G., Persico M. G. (1997). Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic, *Lab. Inves.* 76, 717-531.
- Wood W.B. (1983). The Nematode *Caenorhabditis elegans*, *C. S. H. Lab. Press.*